



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

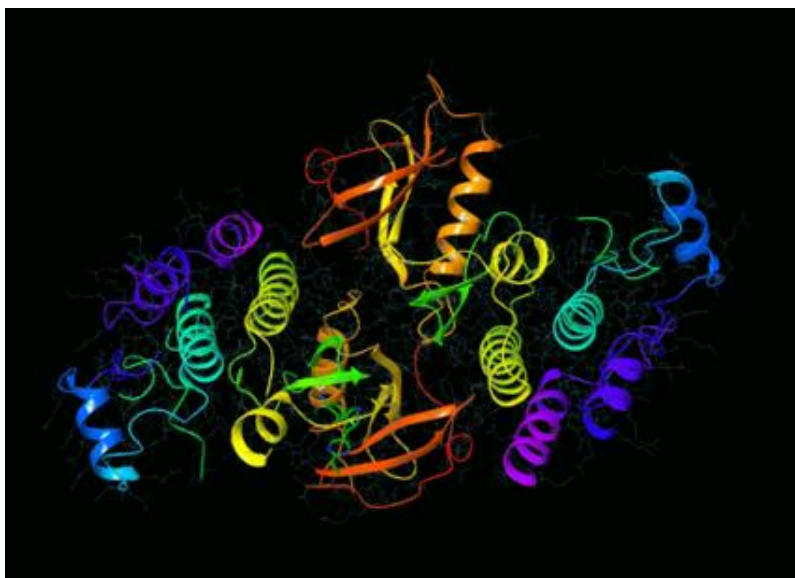
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ

ΣΠΟΥΔΩΝ

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

**«Επιλεκτικοί αναστολείς της ογκοπρωτεΐνης  
BRAFV600E μέσω ανάλυσης χημικής  
ομοιότητας, in silico μελέτες πρόσδεσης και in  
vitro έλεγχο»**



**Δούνα Σταυρούλα**

Πτυχιούχος Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΑΘΗΝΑ (2021)**



HELLENIC REPUBLIC  
National and Kapodistrian  
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE  
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN “BIOINFORMATICS”

---

**“Identification of new selective inhibitors of the BRAFV600E mutant oncoprotein, using similarity methods, in silico docking and in vitro testing.”**



**Douna Stavroula**

BSc Medicine, National and Kapodistrian University of Athens

**ATHENS 2021**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

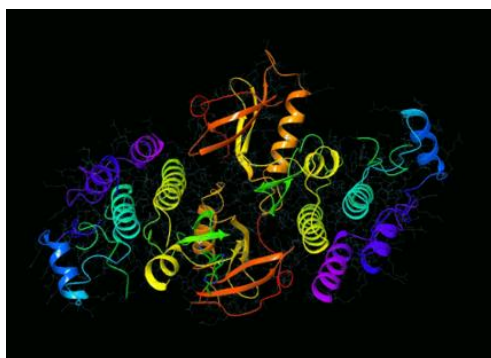
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ

ΣΠΟΥΔΩΝ

## Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Επιλεκτικοί αναστολείς της ογκοπρωτεΐνης BRAFV600E  
μέσω ανάλυσης χημικής ομοιότητας, *in silico* μελέτες  
πρόσδεσης και *in vitro* έλεγχο»



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Καθηγητής Ι. Τρουγκάκος

*Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Δρ. Μ. Ζερβού

Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας (ΙΧΒ/ΕΙΕ)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Β. Οικονομίδου

*Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
ABSTRACT .....	8
Ευχαριστίες.....	10
Μέρος Α .....	11
Α.1 Η οικογένεια των RAF πρωτεϊνών .....	11
Α.2 Η πρωτεΐνη BRAF.....	13
Α.3 BRAF και καρκίνος. Η μετάλλαξη V600E .....	16
Α.4 BRAF αναστολείς- Παράδοση ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού.....	17
Α.5 Επίκτητη και εγγενής αντοχή στους BRAF αναστολείς. Συνδυαστικές θεραπείες.....	21
Α.6 Paradox breakers .....	24
Α.7 Νέοι υποψήφιοι αναστολείς με εφαρμογή επανατοποθέτησης φαρμάκων .....	28
Μέρος Β .....	30
Β.1 Εισαγωγή .....	30
Β.2 Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων.....	32
Β.3 Σχεδιασμός φαρμάκων με μεθόδους Υπολογιστικής Χημείας (Computer Aided Drug Design) .....	32
Β.4 Σάρωση Υψηλής Απόδοσης (High Throughput Screening) έναντι Εικονικής Σάρωσης (Virtual Screening) .....	34
Β.5 Βιβλιοθήκες Μορίων .....	35
Β.6 Lead like, drug like και ADMET Κριτήρια.....	36
Β.7 Η έννοια της Μοριακής Ομοιότητας .....	38
Β.7.1 Descriptors.....	39
Β.7.2 Fingerprints.....	40
Β.8 Σχεδιασμός φαρμάκου με γνωστή δομή του φαρμακευτικού στόχου (Structure- Based Drug Design) .....	41
Β.8.1 Δομή του Φαρμακευτικού στόχου.....	43
Β.8.1.α Κρυσταλλογραφία ακτίνων .....	43
Β.8.1.β NMR (Nuclear Magnetic Resonance).....	43
Β.8.2. Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking).....	44
Σκοπός.....	47
Μέρος Γ .....	48
Γ.1. Βάσεις και Υπολογιστικά εργαλεία για την εφαρμογή Μοριακής Ομοιότητας.....	48
Γ.1.1 Βάση αναζήτησης όμοιων ενώσεων MCULE.....	48
Γ.1.2 Clustering ανακτηθέντων ενώσεων με βάση τα μοριακά αποτυπώματα (molecular descriptors) .....	49
Γ.1.3 Μελέτες Μοριακής πρόσδεσης και φυσικοχημικού προφίλ ενώσεων.....	50

Γ.2 Αρχεία ενώσεων.....	51
Γ.2.1 Αρχεία smiles .....	51
Γ.2.2 Αρχεία SDF.....	52
Γ.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	53
Γ.3.1. Εφαρμογή Μοριακής Ομοιότητας .....	53
Γ.3.2. Εφαρμογή <i>in silico</i> Μοριακής Πρόσδεσης .....	57
Γ.3.3. Αποτελέσματα Μοριακής Πρόσδεσης .....	61
Γ.3.4. Πρόβλεψη Φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εξεταζόμενων ενώσεων .....	70
Μέρος Δ.....	73
Δ.1 Μέθοδοι μελέτης κυτταροτοξικότητας.....	73
Δ.2 Ενώσεις.....	74
Μέρος Δ.3 Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών.....	75
Δ.4 Κυτταροκαλλιέργειες .....	77
Δ.4.1 Θρεπτικά υλικά.....	77
Δ.4.2 Καλλιέργειες.....	77
Δ.5. Κυτταρικές Σειρές-Πειραματική διαδικασία.....	77
Δ.5.1 Προετοιμασία κυττάρων.....	77
Δ.5.2 Διάλυση ουσιών .....	79
Δ.5.3 Προσθήκη των ουσιών στην κυτταροκαλλιέργεια .....	79
Δ.5.4 Διάλυση του ΧΤΤ .....	79
Δ.5.5 Προσθήκη του ΧΤΤ .....	79
Δ.6 Αποτελέσματα.....	80
Δ.7. Σύνοψη αποτελεσμάτων-Συζήτηση .....	84
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α .....	86
Βιβλιογραφία.....	95

## Περίληψη

Η ογκοπρωτεΐνη BRAF είναι μέλος της οικογένειας των RAF πρωτεϊνών που αποτελούν συνιστώσες του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) το οποίο ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση καθώς και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Μεταλλάξεις στην ογκοπρωτεΐνη BRAF έχουν παρατηρηθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του καρκίνου του θυρεοειδούς, της τριχωτής λευχαιμίας και σε μικρότερο ποσοστό σε καρκίνους του πνεύμονα και των ωθηκών. Η συχνότερη μετάλλαξη που παρατηρείται είναι η V600E, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη λειτουργία της ογκοπρωτεΐνης BRAF και ως συνέπεια τη συνεχή ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες για την εύρεση αναστολέων της BRAF ογκοπρωτεΐνης. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι το Dabrafenib και το Vemurafenib αποτελούν δύο εγκεκριμένους από τον FDA εκλεκτικούς αναστολείς της BRAFV600E, οι οποίοι έχουν βελτιώσει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών προχωρημένου σταδίου μελανώματος.

Η μονοθεραπεία με τους BRAFV600E αναστολείς επάγει δευτερογενή νεοπλάσματα, εξαιτίας της παράδοξης ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού που επάγεται από το χορηγούμενο αναστολέα. Παράλληλα, η επίκτητη ανοχή που παρουσιάζεται στο μελάνωμα καθώς και η ανοχή που παρουσιάζεται σε άλλους καρκίνους περιορίζουν περαιτέρω σημαντικά τη δράση τους καθιστώντας την ανακάλυψη νέων αναστολέων επιτακτική.

Οι ερευνητικές προσπάθειες για να ξεπεραστεί η παράδοξη ενεργοποίηση οδήγησαν στους ονομαζόμενους paradox breakers (PLX7904 και PLX8394 με το δεύτερο να είναι επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές). Οι νέοι αναστολείς πλεονεκτούν έναντι των εγκεκριμένων φαρμάκων δεδομένου ότι καταστέλλουν τα μεταλλαγμένα κύτταρα BRAF χωρίς παράδοξη ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK σε κύτταρα WT-BRAF και επιπλέον, φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί έναντι αρκετών μηχανισμών ανοχής.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας αναζητήθηκαν με εφαρμογή *in silico* προσεγγίσεων νέοι εξειδικευμένοι αναστολείς της BRAFV600E. Προηγούμενες

μελέτες της Ομάδας Μοριακής Ανάλυσης, του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του ΕΙΕ, οδήγησαν στην ανακάλυψη μίας νέας πρόδρομης ένωσης (hit713) με δυνατότητα αναστολής της BRAFV600E μέσω εφαρμογής εικονικής σάρωσης στη βιβλιοθήκη ενώσεων Mcule. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η περαιτέρω αναζήτηση όμοιων δομών προς το hit713 με σάρωση της βιβλιοθήκης Mcule και χρήση αλγόριθμου χημικής ομοιότητας. Οι δομές που προέκυψαν αξιολογήθηκαν ως προς την *in silico* πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας το κρυσταλλικό σύμπλοκο του paradox breaker PLX7904.

Στα πλαίσια των προσπαθειών βελτιστοποίησης, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Οργανικής & Οργανομεταλλικής Χημείας (ΕΥ Δρ Ι. Κώστας) του ΙΧΒ/ΕΙΕ και στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής που βρίσκεται σε εξέλιξη σχεδιάζονται ορθολογικά και συντίθενται νέες ενώσεις ανάλογες του hit713.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας διενεργήθηκε *in vitro* αξιολόγηση του hit713 και των πλέον δραστικών νέων συνθετικών αναλόγων (σύμφωνα με δοκιμές που έχουν διενεργηθεί σε ενζυμικό assay) σε κυτταρικές σειρές μελανώματος ομόζυγες ή ετερόζυγες ως προς την BRAFV600E μετάλλαξη αλλά και σε wtBRAF σειρές με μετάλλαξη στο RAS, με εφαρμογή της XTT Δοκιμασίας Βιωσιμότητας κυττάρων. Τα *in vitro* πειράματα υλοποιήθηκαν υπό την επίβλεψη του Δρ. Π. Γεωργιάδη, Ερευνητική Ομάδα «Περιβάλλον και Υγεία», ΙΧΒ/ΕΙΕ.

## ABSTRACT

BRAF protein is a member of RAF family proteins and is an important component of the RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) signaling pathway which controls cell growth, differentiation, and proliferation.

BRAF mutation plays a major role in the development of many human tumors such as melanoma (>50%), colon cancer (5-10%), hairy cell leukemia (100%). It is also often present in thyroid carcinomas (25%-45%) and less commonly in lung and ovarian cancers. The most common mutation is the BRAF V600E which is a hyperactivating point mutation leading to uncontrolled cell growth and survival.

Vemurafenib and Dabrafenib are two FDA approved drugs targeting specifically the BRAF V600E oncogenic mutation, which have significantly improved the survival of patients that suffer from metastatic melanoma.

Despite the initial response the disease often progresses in less than a year, due to acquired resistance. Furthermore, cancers like colon cancer are primary resistant to BRAF inhibitors. Notably, secondary skin cancers are often developed after months of monotherapy treatment because the inhibitors paradoxically activate the MAPK signaling pathway in WT-BRAF cells. Thus, there is an urgent need towards the discovery of new selective and potent mutated BRAF inhibitors.

Research efforts to overcome paradoxical activation have led to so-called paradox breakers (PLX7904 and PLX8394 with the latter currently in clinical trials). The new inhibitors have an advantage over approved drugs as they suppress mutant BRAF cells without paradoxically activating the MAPK pathway in WT-BRAF cells and, in addition, they seem to be effective against several resistance mechanisms.

The first part of the current thesis includes in silico approaches towards the identification of novel specific BRAFV600E inhibitors. Previous studies of the Molecular Analysis Team, of the Institute of Chemical Biology of NHRF, led to the discovery of a lead compound (hit713) with low  $\mu\text{M}$  inhibitory activity against BRAFV600E. In the current thesis, Mcule database was exhaustively screened for structures similar to hit713 by applying molecular similarity algorithms. The retrieved structures were evaluated for their in silico binding to the active site of the mutant protein using the paradox breaker PLX7904 crystal complex.



In the context of our collaboration with the Organic & Organometallic Chemistry Team of ICB/NHRF (PI: Dr. I. Costas) and within the frame of an ongoing doctoral thesis, a lead optimization process is currently in progress comprising the design and synthesis of new modified analogs.

In the second part of the current thesis, hit 713 and the most active new synthesized analogs (according to their inhibitory effect as measured at the kinase assay) were evaluated in vitro against melanoma cell lines homozygous or heterozygous for the BRAFV600E mutation or wtBRAF cell lines bearing RAS mutation. The XTT Cell Viability Test was applied. The in vitro experiments were performed under the supervision of Dr. P. Georgiadis, Research Group "Environment and Health", ICB / NHRF.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοπληροφορική -Υπολογιστική Βιολογία» του ΕΚΠΑ στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΧΒ/ΕΙΕ).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ι. Τρουγκάκο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, ως υπευθύνου στην παρούσα εργασία αλλά και για την προθυμία του ως Διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος, να επικοινωνήσει και να συζητήσει με τους φοιτητές του οποτεδήποτε εκείνοι το ζητούσαν.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Μ.Ζερβού, για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε και να τονίσω ότι χωρίς τη καθοδήγηση και τη στήριξη της θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση αυτής της εργασίας, όπως και τον Δρ. Παναγιώτη Γεωργιάδη για την επίβλεψη των πειραμάτων *in vitro* αξιολόγησης της βιολογικής δραστηριότητας, καθώς η καθοδήγηση και οι συμβουλές του ήταν πάντα πολύτιμες.

Επιπροσθέτως, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αναπληρώτρια καθηγήτρια Β.Οικονομίδου για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή αλλά και για τις πολύτιμες γνώσεις και τον τρόπο που μας τις παρείχε ως διδάσκουσα στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ.Κρίση Ευτυχία, μεταδιδακτορική ερευνήτρια και την υποψήφια διδάκτορα Σοφία Βιδάλη για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Ι. Κώστα, Διευθυντή ερευνών και την Υακίνθη Μπάτση, υποψήφια διδάκτορα, από το εργαστήριο Οργανικής και Οργανομεταλλικής χημείας, ΙΧΒ/ΕΙΕ, καθώς μας παρείχαν τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν στα *in vitro* πειράματα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου, δείχνοντας κατανόηση και συμπαράσταση, όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

## Μέρος Α

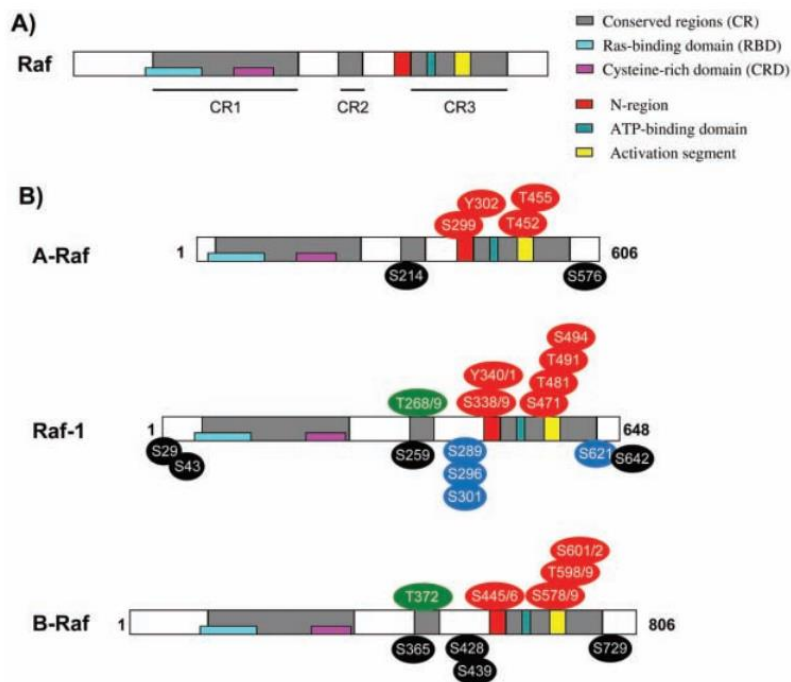
### A.1 Η οικογένεια των RAF πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη BRAF είναι μέλος της οικογένειας των RAF πρωτεϊνών με δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Η οικογένεια των RAF πρωτεϊνών αποτελεί συνιστώσα του μονοπατιού MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων.

Οι RAF πρωτεΐνες απαντώνται σε τρεις διαφορετικές ισομορφές, την A-RAF, την B-RAF και την C-RAF οι οποίες παρουσιάζουν αρκετές δομικές ομοιότητες (Εικόνα 1).

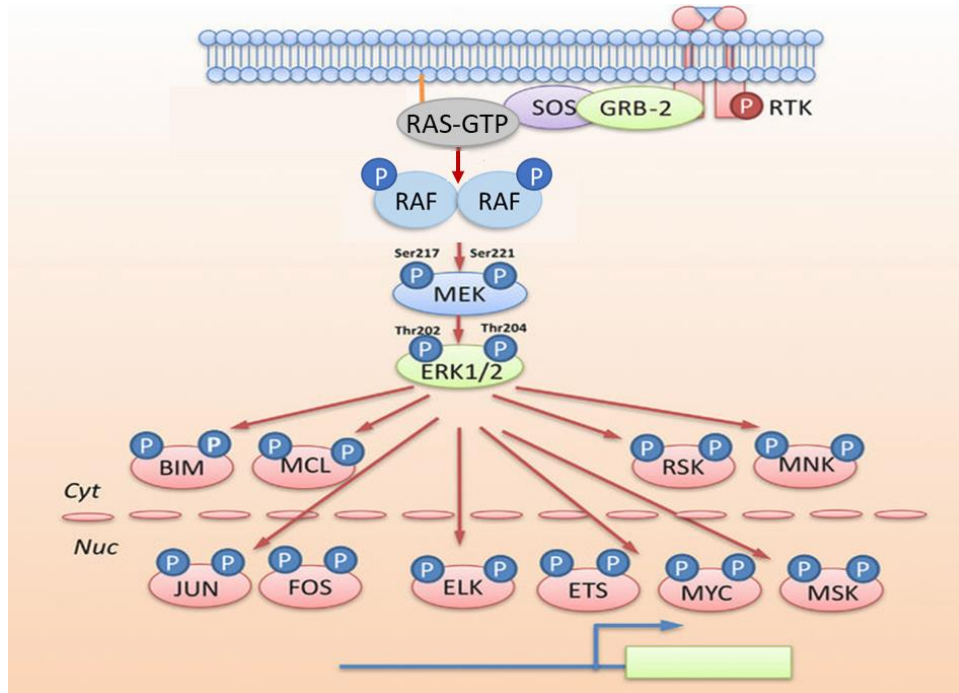
Αποτελούνται από τρεις συντηρημένες περιοχές, την CR1 και την CR2 που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών και είναι ρυθμιστικές περιοχές και την CR3 περιοχή η οποία περιέχει το domain της κινάσης<sup>1</sup>.

Πιο συγκεκριμένα, η CR1 περιέχει την περιοχή σύνδεσης με το RAS καθώς και μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, η οποία συμμετέχει επίσης στην αλληλεπίδραση με το RAS. Η CR2 περιοχή είναι πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης τα οποία αποτελούν θέσεις ρυθμιστικής φωσφορυλίωσης<sup>1</sup>. Τέλος η CR3 περιοχή η οποία περιέχει τόσο το τμήμα ενεργοποίησης (AS-activation segment), το οποίο περιέχει επίσης θέσεις ρυθμιστικής φωσφορυλίωσης<sup>2</sup> (θρεονίνη 599, σερίνη 602 ) όσο και το domain της κινάσης<sup>1</sup>. Οι τρεις ισομορφές παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στις αμινοξικές τους αλληλουχίες (στο domain της κινάσης 75%).



Εικόνα 1: Α. Συντηρημένες περιοχές στις τρεις ισομορφές των RAF πρωτεϊνών (ARAF, BRAF και CRAF ή RAF-1) και Β. Θέσεις φωσφορυλίωσης στις διαφορετικές ισομορφές<sup>1</sup>.

Οι RAF πρωτεΐνες είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες οι οποίες προσελκύονται στην κυτταρική μεμβράνη μετά από αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο RAS-GTP, η δημιουργία του οποίου οφείλεται σε εξωκυτταρικά σήματα, όπως οι αυξητικοί παράγοντες που ενεργοποιούν υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όπως οι υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (RTK). Ακολούθως ενεργοποιούνται μέσω της αυτοφωσφορυλίωσης και του διμερισμού (όμο- ή ετερο-διμερισμός), ξεκινώντας έναν καταρράκτη φωσφορυλίωσης ο οποίος καταλήγει στις φωσφορυλίωσεις των υποστρωμάτων των ERK κινασών, κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 2), προάγοντας εξέχουσας σημασίας λειτουργίες του κυττάρου σχετιζόμενες με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση<sup>2</sup>.



Εικόνα 2: Η ενεργοποίηση των RAF κινασών ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης και του ομο- ή ετερο-διμερισμού τους οδηγεί στη δημιουργία ενός καταρράκτη φωσφορυλιώσεων κινασών που ως αποτέλεσμα έχει την τελική φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων των ERK κινασών στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα προάγοντας την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση [τροποποιημένη εικόνα από την *Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy*, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.008>]

## A.2 Η πρωτεΐνη BRAF

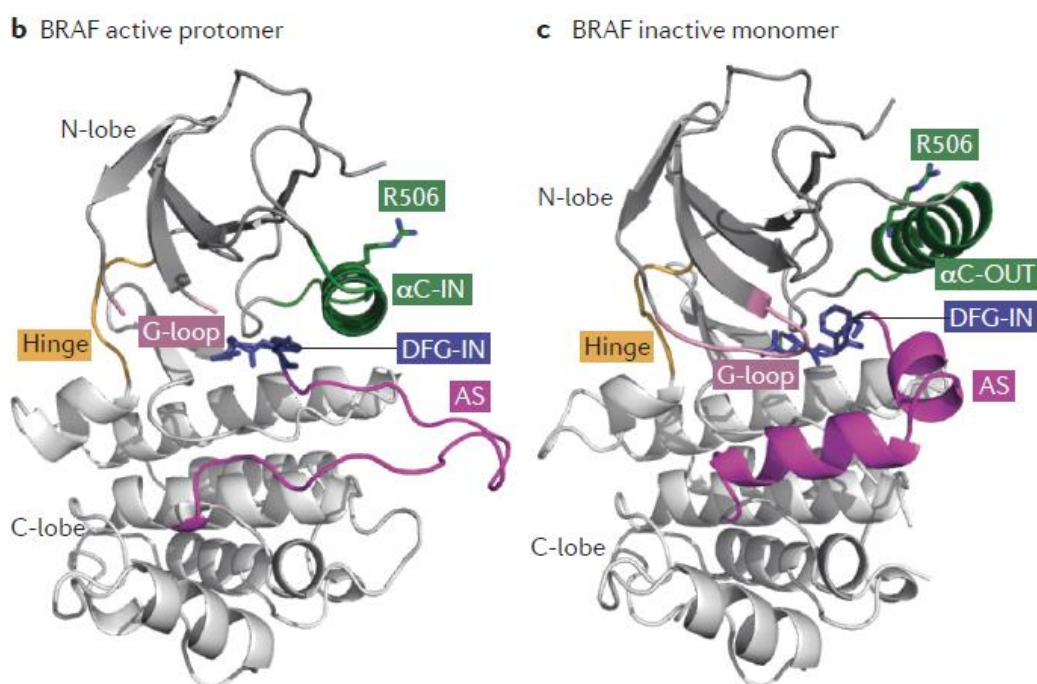
Η BRAF αποτελεί το αρχαιότερο φυλογενετικά μέλος της οικογένειας. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~ 95 kDa, η οποία αποτελείται από 766 αμινοξικά κατάλοιπα<sup>3</sup>.

Το CR3 τμήμα της BRAF<sup>3</sup> (αμινοξέα 457–717) έχει τυπική δομή κινάσης αποτελούμενο από δύο λοβούς, έναν μικρό λοβό στο αμινοτελικό άκρο (N-lobe) που περιλαμβάνει μία β-πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από πέντε β-κλώνους και μια α-έλικα που ονομάζεται "αC-έλικα" και έναν μεγάλο λοβό στο καρβοξυτελικό άκρο (C-lobe) που αποτελείται ως επί το πλείστον από α-έλικες<sup>4</sup>.

Οι δύο λοβοί συνδέονται μέσω ενός ευέλικτου βρόγχου (hinge) που συμβάλλει στη σχετική κίνηση μεταξύ των δύο λοβών καθιστώντας την μεσεπιφάνεια τους, κλειστή και ανοιχτή αντίστοιχα<sup>2</sup>. Στη μεσεπιφάνεια των δύο λοβών βρίσκεται το ενεργό κέντρο της κινάσης που περιλαμβάνει την κοιλότητα πρόσδεσης του ATP, τη θέση σύνδεσης των ιόντων μαγνησίου<sup>5,6</sup> (συντηρημένο μοτίβο DFG αποτελούμενο από τα αμινοξέα

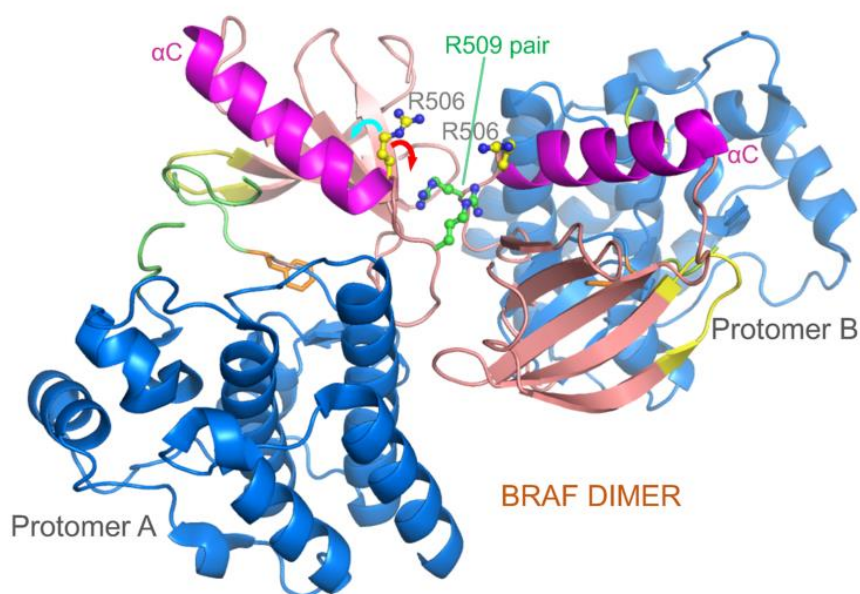
Asp(594)-Phe(595)-Gly(596)) και το βρόχο ενεργοποίησης (AS) που περιλαμβάνει τα αμινοξέα Thr(599) και Ser(602)<sup>7</sup>, η φωσφορυλίωση των οποίων συνδέεται με τη σηματοδοτική λειτουργία της πρωτεΐνης.

Η κρυσταλλικά λυμένη δομή BRAF-υποστρώματος MEK1 υποδεικνύει τις απαραίτητες διαμορφωτικές μεταβολές τις οποίες υφίστανται οι BRAF προκειμένου να ενεργοποιηθούν<sup>8</sup>. Η μετάβαση μεταξύ της ανενεργής και ενεργής κατάστασης της κινάσης περιλαμβάνει τις συντονισμένες κινήσεις του τμήματος ενεργοποίησης AS και της  $\alpha$ C-έλικας. Η ανενεργή κατάσταση διακρίνεται συνήθως από ένα συμπαγές δομημένο AS και μία μετατοπισμένη προς τα έξω  $\alpha$ C-έλικα (OUT conformation). Κατά την ενεργοποίηση, η ανενεργή διαμόρφωση διαταράσσεται επιτρέποντας το AS να υιοθετήσει μια θέση που απαιτείται για την κατάλυση " Κατάσταση DFG-in ", και την  $\alpha$ C έλικα να μετατοπιστεί προς τα μέσα ( $\alpha$ C-in) ώστε να σχηματιστεί η καταλυτική γέφυρα άλατος μεταξύ της λυσίνης (K483) του κλώνου b3 στο N-τελικό άκρο της κινάσης και του γλουταμικού οξέος (E501) της  $\alpha$ C-έλικας<sup>9</sup>. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Διαμόρφωση της περιοχής της κινάσης στην ενεργή (σύμπλοκο BRAF:MEK1, pdb: 4MNE) και την ανενεργή μορφή της (σύμπλοκο BRAF(R509H):Vemurafenib, pdb: 4RZV). Η κίνηση της  $\alpha$ C-έλικας από τη θέση OUT στη θέση IN και το ζετόλιγμα του τμήματος ενεργοποίησης AS σηματοδοτούν την ενεργοποίηση της BRAF<sup>5</sup>

Για την πλήρη ενεργοποίηση της BRAF απαιτείται ο διμερισμός της και η διεπιφάνεια διμερισμού έχει διευκρινιστεί με τη βοήθεια κρυσταλλικών δομών της BRAF με αναστολείς. Αυτή περιλαμβάνει την αC-έλικα του κάθε μονομερούς και πιο συγκεκριμένα τα κατάλοιπα R509 στο C-τελικό άκρο της αC-έλικας των δύο μονομερών αλληλεπιδρούν μέσω van der Waals και δεσμών υδρογόνου<sup>6</sup>. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι απαραίτητες για να διατηρηθεί ο διμερισμός όπως αποδεικνύεται και από μελέτες μεταλλαξογένεσης. Περαιτέρω, έχει προταθεί ότι ο προσανατολισμός του κατάλοιπου R506 το οποίο επίσης βρίσκεται στην αC-έλικα στην επιφάνεια διμερισμού καθορίζει την επαγόμενη από τον αναστολέα αλληλεπίδραση με το GTP-RAS, γεγονός που σχετίζεται με την επαγόμενη παράδοση ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού όπως θα εκτεθεί στη συνέχεια<sup>6</sup> (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Διμερές BRAF από το κρυσταλλικό σύμπλοκο με τον αναστολέα RAF709 (PDB: 5VAM). Ο διμερισμός των BRAF σταθεροποιείται από δεσμούς-H και van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων R509 των αC-ελίκων<sup>6</sup>



### A.3 BRAF και καρκίνος. Η μετάλλαξη V600E

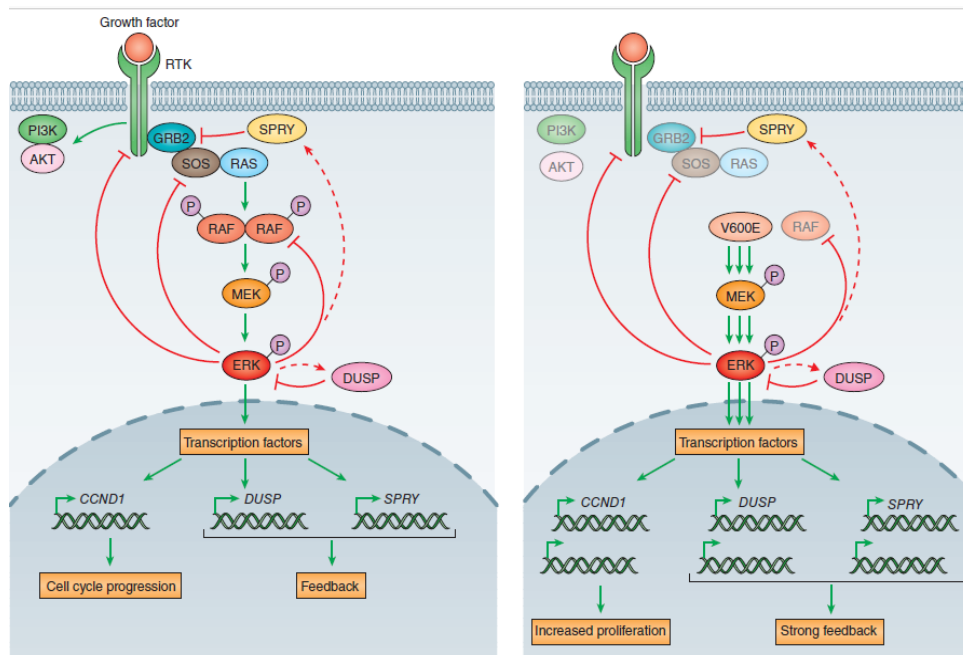
Δεδομένης της κεντρικής θέσης του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK σε κομβικές λειτουργίες του κυττάρου δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός της συμμετοχής του στην παθογένεση διάφορων κακοηθειών.

Ειδικότερα, ογκογενείς μεταλλάξεις στην BRAF παρατηρούνται σε διαφορετικές κακοήθειες<sup>10</sup> όπως είναι το μελάνωμα σε ποσοστό >60% , στη λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων σε ποσοστό 100%<sup>11</sup> , στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε ποσοστό 10% , στον αδιαφοροποίητο κυρίως καρκίνο του θυρεοειδούς αλλά και σπανιότερα σε άλλες κακοήθειες όπως είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και ο καρκίνος των ωοθηκών.

Οι συχνότερες μεταλλάξεις της BRAF είναι οι σημειακές όπως αυτές στο κατάλοιπο V600 με συχνότερη τη V600E που αφορά στην αλλαγή του αμινοξικού καταλοίπου της βαλίνης στη θέση 600 από το αμινοξικό κατάλοιπο του γλουταμικού οξέος και καταγράφεται σε ποσοστό 90% των καρκίνων με μεταλλαγμένη BRAF<sup>5,6</sup>.

Η μετάλλαξη καθιστά την πρωτεΐνη BRAF συνεχώς ενεργοποιημένη αυξάνοντας την καταλυτική δραστηριότητα κατά 500 φορές σε σχέση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου και σε αντίθεση με την WT-BRAF όπου απαιτείται διμερισμός για την ενεργοποίησή της, αυτή είναι σε θέση να σηματοδοτεί ισχυρά ως λειτουργικό μονομερές, φωσφορυλιώνοντας το MEK και ενεργοποιώντας το μονοπάτι παρακάτω.<sup>12</sup> (Εικόνα 5)





Εικόνα 5: Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK και η λειτουργία του σε φυσιολογικά κύτταρα (αριστερά) και σε κύτταρα με μεταλλαγμένη την BRAF (δεξιά). Η BRAFV600E είναι ικανή να φωσφορυλιώνει το υπόστρωμά της, την MEK ως μονομερές και λειτουργεί ανεξάρτητα από την ύπαρξη ενεργοποιημένης RAS. Σε όγκους που φέρουν μετάλλαξη BRAFV600E, η υπερενεργοποιημένη σηματοδότηση του ERK έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο πολλαπλασιασμό και αποφυγή απόπτωσης. Επιπλέον, σε όγκους με BRAF-μετάλλαξη, παρακάμπτονται τα ανασταλτικά αποτελέσματα της αρνητικής ανάδρασης διαμεσολαβούμενης από το ERK<sup>12</sup>

Έχουν παρατηρηθεί αν και σπανιότερα επιπλέον μεταλλάξεις όπως χιμαιρικές πρωτεΐνες και ελλείψεις περιοχών, οι οποίες έχουν συνήθως ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της ανενεργού δομής και το «κλείδωμα» της BRAF στην ενεργό διαμόρφωση, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ενεργοποιημένης RAS<sup>5,6</sup>.

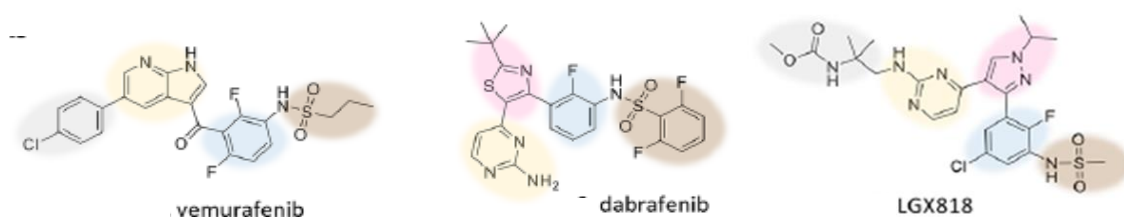
#### A.4 BRAF αναστολείς- Παράδοση ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού

Η ανακάλυψη της ογκογενούς μετάλλαξης V600E η συσχέτισή της με διάφορες κακοήθειες σήμανε το ξεκίνημα των προσπαθειών για τη φαρμακευτική στόχευσή της. Πράγματι το 2011 και το 2012 πήραν έγκριση για το μεταστατικό μελάνωμα δύο εκλεκτικοί αναστολείς της BRAFV600E, το vemurafenib<sup>13</sup> από την εταιρία Plexxikon και το dabrafenib<sup>14</sup> από την Novartis αντίστοιχα, αλλάζοντας τη φυσική πορεία της νόσου, βελτιώνοντας την ανταπόκριση και αυξάνοντας την επιβίωσή<sup>15</sup>.

Γενικά, οι αναστολείς που έχουν αναπτυχθεί ανταγωνίζονται το ATP στην πρόσδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και διακρίνονται ανάλογα με τις διαμορφωτικές αλλαγές που προκαλούν στις αC-έλικες και στο DFG μοτίβο σε τρεις διαφορετικούς τύπους.

Πιο συγκεκριμένα αναγνωρίζονται ο τύπος I αC-IN/DFG-IN, ο τύπος II αC-IN/DFG-OUT και ο τύπος I1/2 αC-OUT/DFG-IN.

Το Vemurafenib, το Dabrafenib αλλά και ο πρόσφατα εγκεκριμένος αναστολέας Encorafenib από την Array BioPharma ανήκουν στην κατηγορία των αναστολέων τύπου I1/2. Πρόκειται για ισχυρούς επιλεκτικούς αναστολείς της BRAFV600E, ενώ το Encorafenib καταστέλλει με την ίδια ισχύ και την αγρίου τύπου BRAF και τη CRAF ωστόσο ο ημίσειος χρόνος αποδέσμευσής του είναι αρκετά μεγαλύτερος σε σχέση με τα άλλα δύο φάρμακα γεγονός που υποδεικνύει και αυξημένη δραστηριότητα. (Εικόνα 6)



IC <sub>50</sub> nM	vemurafenib	dabrafenib	Encorafenib (LGX818)
BRAF-wt	100	3.2	0.47
BRAFV600E	31	0.6	0.35
CRAF	48	5.0	0.3

	vemurafenib	dabrafenib	Encorafenib (LGX818)
B-Raf dissociation half-life T <sub>1/2</sub>	0,5 h	2 h	> 30 h

Εικόνα 6: Εγκεκριμένοι από τον FDA BRAF αναστολείς έναντι της μετάλλαξης BRAF V600E.

Η μονοθεραπεία με τους BRAF αναστολείς vemurafenib, dabrafenib, και encorafenib επάγει δευτερογενή νεοπλάσματα, συνήθως του δέρματος και κυρίως

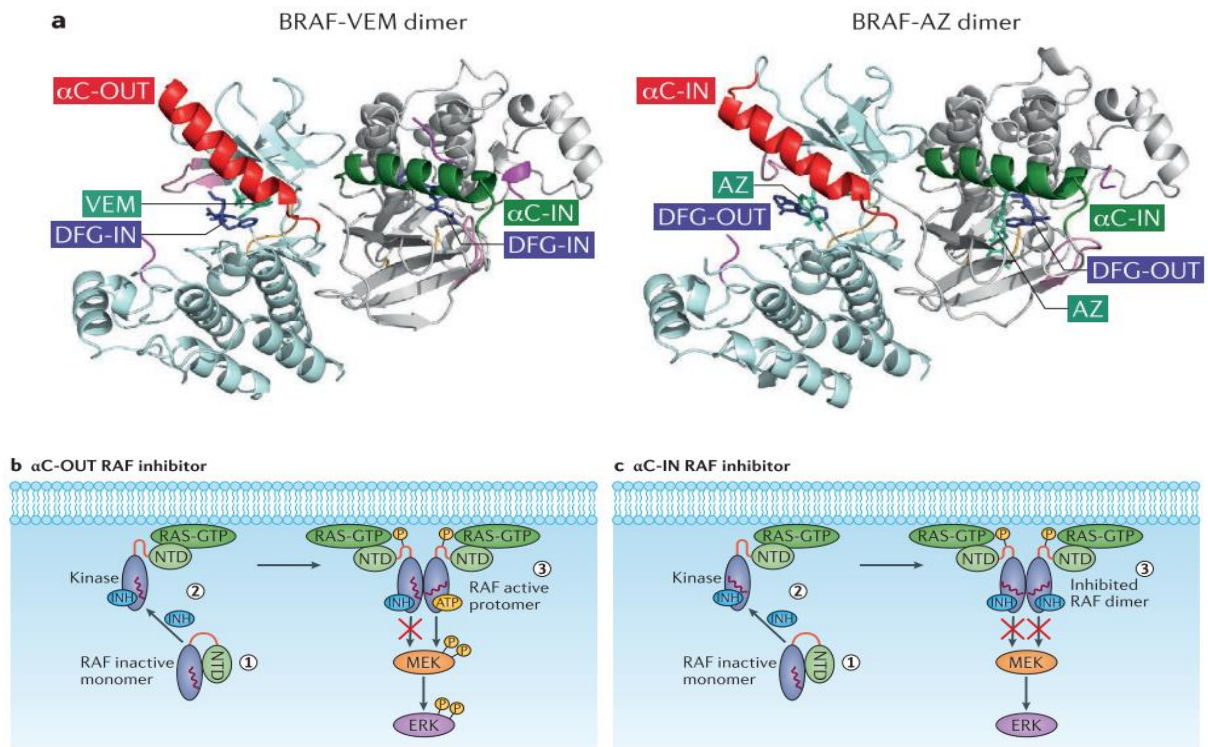
κερατινοακανθώματα σε ποσοστά 22%, 6%, and 3.7% αντίστοιχα<sup>16</sup>. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην παράδοξη ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού που επάγεται από το χορηγούμενο αναστολέα<sup>17</sup>.

Συγκεκριμένα, οι τρέχοντες κλινικοί αναστολείς καταστέλλουν τη δραστηριότητα του BRAF και τη σηματοδότηση του ERK επιλεκτικά σε κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένο BRAF. Σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα που εκφράζουν WT BRAF, αυτοί οι αναστολείς δεν αναστέλλουν, αλλά αντ' αυτού ενεργοποιούν παράδοξα τη δραστηριότητα της BRAF και την καθοδική σηματοδότηση του ERK ('RAF inhibitor paradox'). Οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η παράδοξη ενεργοποίηση απαιτεί ενεργό RAS (RAS-GTP).<sup>5,6</sup>

Το προτεινόμενο μοντέλο περιγράφει ότι η σύνδεση με τον αναστολέα προάγει την αλληλεπίδραση RAF-RAS-GTP και τον ομό- ή έτερο διμερισμό των RAF ισομορφών (BRAF-BRAF ή BRAF-CRAF). (Εικόνα 7)

Οι αναστολείς I  $\frac{1}{2}$  όπως τα χορηγούμενα φάρμακα, εξαιτίας της OUT διαμόρφωσης της  $\alpha$ C-έλικας που επάγουν με τη σύνδεσή τους στο ένα μονομερές προκαλούν αλλοστερικά τη μετατόπιση της  $\alpha$ C-έλικας του έτερου μονομερούς σε IN διαμόρφωση και έτσι παρεμποδίζεται στερεοχημικά η πρόσδεση του αναστολέα στο δεύτερο μονομερές, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ασύμμετρων διμερών.

Όπως αναδεικνύεται και από την κρυσταλλική δομή του BRAFV600E με το Vemurafenib, το ελεύθερο από αναστολέα μονομερές υιοθετεί μια κλειστή διαμόρφωση με  $\alpha$ C-in και DFG-in η οποία σταθεροποιείται περαιτέρω με ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ της  $\alpha$ C-έλικας (K507) και του τμήματος ενεργοποίησης (E600) αποτρέποντας την πρόσδεση του αναστολέα και στο δεύτερο μονομερές. Περαιτέρω, η διαμόρφωση αυτή συνάδει με την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου και θεωρείται ότι αυτό το μονομερές μπορεί να σηματοδοτεί κανονικά<sup>5,18</sup>.(Εικόνα 7)



Εικόνα 7: (α) Η δομή του ασύμμετρου διμερούς του BRAFV600E με το Vemurafenib (PLX4032) (pdb: 3O7G) και του συμμετρικού διμερούς με το AZ628 (AZ), αναστολέα τύπου II ( $\alpha$ C-IN/DFG-OUT) (pdb: 4RZW), (b, c): Σχηματική αναπαράσταση της παράδοξης ενεργοποίησης του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού σε wt-BRAF κύτταρα. Οι  $\alpha$ C-OUT αναστολείς όπως τα vemurafenib και dabrafenib προκαλούν μετατόπιση προς τα έξω της  $\alpha$ C-έλικας (με χρώμα κόκκινο) όταν προσδέονται στο μονομερές. Όταν υφίστανται μηχανισμοί που ευνοούν το διμερισμό, η μετατόπιση αυτή παρεμποδίζει την πρόσδεση του αναστολέα και στο άλλο μονομερές, έτσι παρά την παρουσία του αναστολέα, το μονοπάτι MAPK ενεργοποιείται. Αντίθετα, οι αναστολείς τύπου  $\alpha$ C-IN επιτρέπουν τη σύνδεση ενός μορίου του αναστολέα σε κάθε μονομερές, δημιουργώντας συμμετρικά μονομερή και καταστέλλοντας τη σηματοδότηση του ERK. [Τροποποιημένη εικόνα από *New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer*, doi:10.1038/nrc.2017.79 7]

Αντιθέτως οι αναστολείς τύπου  $\alpha$ C-IN επιτρέπουν τη σύνδεση ενός μορίου του αναστολέα σε κάθε μονομερές, δημιουργώντας συμμετρικά μονομερή. Οι αναστολείς  $\alpha$ C-IN προάγουν την αλληλεπίδραση RAF-RAS-GTP σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις όμως καταστέλλουν αποτελεσματικά τη σηματοδότηση ERK. Ωστόσο, οι αναστολείς  $\alpha$ C-IN έχουν μικρό θεραπευτικό παράθυρο (εύρος των συγκεντρώσεων ενός φαρμάκου

στον ασθενή που παρέχει ασφαλή αποτελεσματική θεραπεία), καθώς καταστέλλουν τα διμερή BRAF-WT και σε φυσιολογικά κύτταρα σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για την καταστολή της σηματοδότησης του ERK σε καρκινικά κύτταρα, όπως προκύπτει από προκλινικά δεδομένα<sup>5</sup>.

#### A.5 Επίκτητη και εγγενής αντοχή στους BRAF αναστολείς. Συνδυαστικές θεραπείες

Έκτος από την παράδοξη ενεργοποίηση του μονοπατιού λόγω της τάσης του διμερισμού των RAF πρωτεϊνών, έχουν περιγραφεί και άλλοι μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής των καρκινικών κυττάρων, τόσο εγγενούς αντοχής όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου όσο και επίκτητης.

Οι μηχανισμοί αντοχής μπορεί να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες σε κυτταρικούς μηχανισμούς που αφορούν το ίδιο το κύτταρο αλλά και σε μη κυτταρικούς μηχανισμούς που αφορούν συνήθως το μικροπεριβάλλον του όγκου.

Οι κυτταρικοί μηχανισμοί αντοχής μπορούν να χωριστούν επίσης σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά μηχανισμούς που εμπλέκουν σε κάποιο επίπεδο το MAPK μονοπάτι και η δεύτερη κατηγορία εκείνους τους μηχανισμούς που είναι ανεξάρτητοι του MAPK<sup>19</sup>. (Εικόνα 8)

#### MAPK εξαρτώμενοι μηχανισμοί

- **Ανωθεν του επιπέδου των RAF πρωτεϊνών<sup>19</sup>**
  1. Υπερέκφραση των Ras
  2. Μεταλλάξεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση των Ras πρωτεϊνών
  3. Απενεργοποίηση του NF1 αναστολέα της Ras
  4. Αύξηση της σηματοδότησης των RTKs (PDGFR, EGFR, IGFR1)
  
- **Στο επίπεδο των RAF πρωτεϊνών<sup>19</sup>**
  - Υπερέκφραση των CRAF πρωτεϊνών
  - Ενίσχυση του γονιδίου BRAF<sup>20</sup>
  - Γενετικές τροποποιήσεις στην BRAF που οδηγούν σε απώλεια τμημάτων της (in frame deletions) όπως την απώλεια των τμημάτων της στη συντηρημένη περιοχή β3/αC έλικα καθώς και προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος όπως η πρωτεΐνη p61BRAFV600E η οποία στερείται του RBD<sup>21</sup>, επάγοντας τη

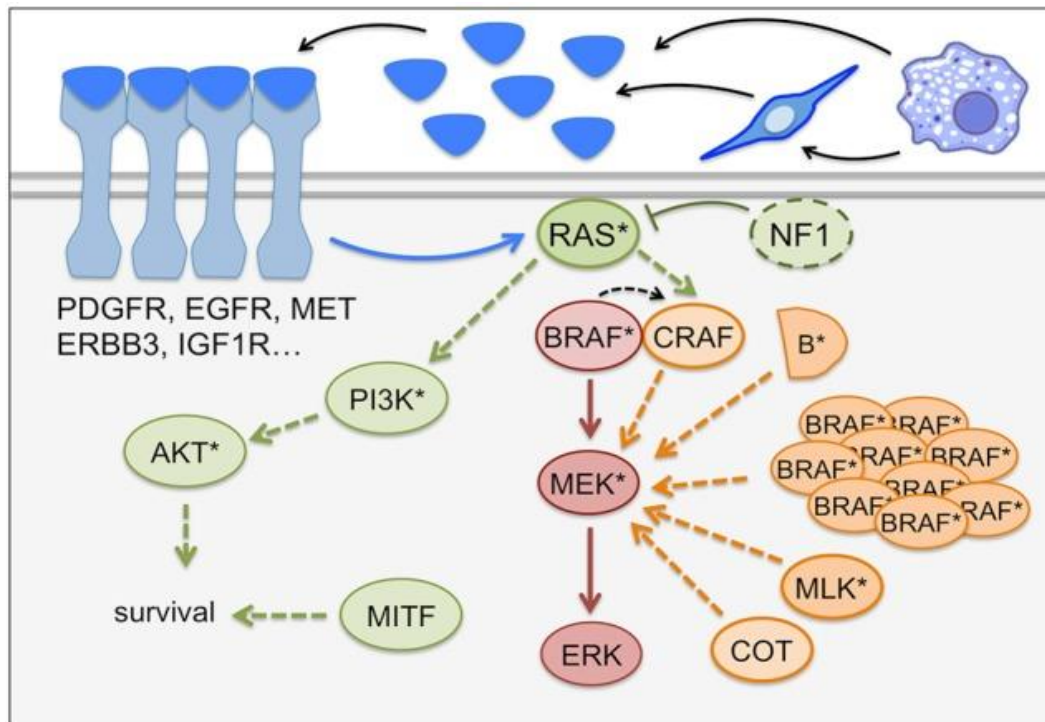
συνεχή ενεργοποίηση και ομό-διμερισμό του ενζύμου ανεξάρτητα της ύπαρξης ανοδικής ενεργοποίησης.

➤ **Κάτωθεν του επιπέδου των RAF πρωτεϊνών<sup>19</sup>**

- Μεταλλάξεις στις MEK
- Υπερέκφραση των μορίων ενεργοποιητών των MEK ,όπως η κινάση COT (γνωστή και ως Tumor progression locus 2 (TPL2) ή MAP3K8) και οι MLks (Mixed Lineage Kinases)

**MAPK ανεξάρτητοι μηχανισμοί**

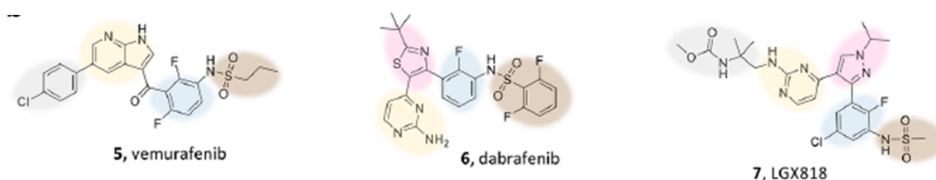
- Ενεργοποίηση του RAS εξαρτώμενου μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR ή μεταλλάξεις στην PTEN, την AKT που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ρύθμισης αντιαποπτωτικών μηχανισμών, όπως συμβαίνει στον καρκίνο του παχέος εντέρου<sup>22</sup>.
- Αυξημένη έκφραση του MIFT (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) μέσω ενεργοποίησης του PAX3, ενεργοποιώντας επίσης αντιαποπτωτικά σήματα.



Εικόνα 8: Ανάπτυξη αντοχής στους BRAF αναστολείς. Περιλαμβάνει τόσο την ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού όσο και την ενεργοποίηση MAPK ανεξάρτητων μηχανισμών<sup>19</sup>

Στη προσπάθεια να ξεπεραστεί η αντοχή που οφείλεται στην ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού και να περιοριστούν οι παρενέργειες της παράδοξης ενεργοποίησης του MAPK έχουν δοκιμαστεί συνδυαστικές θεραπείες BRAFi/MEKi οι οποίες αποτελούν σήμερα και την πρώτη γραμμής θεραπείας για το μεταστατικό μελάνωμα, ενώ πρόσφατα πήρε έγκριση και συνδυασμός EGFRi/BRAFi για το μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου με μετάλλαξη V600E<sup>23</sup>. Πρόσφατα επίσης εγκρίθηκε και συνδυαστική θεραπεία με αναστολέα MEK και αναστολέα PD-L1<sup>24</sup> (ανοσοθεραπεία με αντισώματα κατά των ανοσολογικών σημείων ελέγχου). Τα ειδικά αντισώματα έναντι των ανοσολογικών σημείων ελέγχου δρουν επαναρυθμίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε να στραφεί εκ νέου κατά των καρκινικών κυττάρων. (Εικόνα 9)





2011	- BRAF-V600E metastatic melanoma - Erdheim-Chester Disease with BRAF V600 mutation.		
2013		BRAF-V600E advanced melanoma	
2014		+ <b>trametinib</b> (MEK inhibitor) for BRAF-V600E melanoma	
2015	+ <b>cobimetinib</b> (MEK inhibitor) against BRAF V600E/K melanoma		
2017		+ <b>trametinib</b> (MEK inhibitor) against BRAF V600E Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer	
2018		+ <b>trametinib</b> (MEK inhibitor) against BRAF-Positive Anaplastic Thyroid cancer	+ <b>binimetinib</b> (MEK inhibitor) for BRAF-V600E/K melanoma
2020	+ <b>cobimetinib</b> (MEK inhibitor) + <b>atezolizumab</b> (PD-L1 inhibitor) against BRAF V600E/K melanoma		+ <b>cetuximab</b> (EGFR inhibitor) <u>against BRAF V600E metastatic CRC</u>

Εικόνα 9: Εγκριμένες από τον FDA συνδυαστικές θεραπείες κατά της μετάλλαξης BRAFV600E.

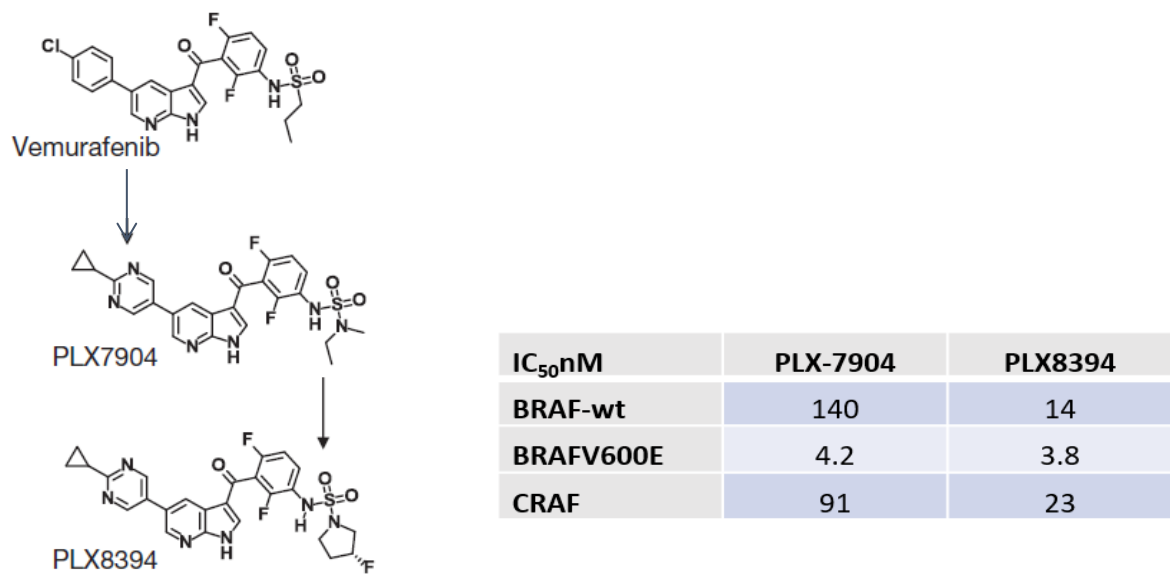
#### A.6 Paradox breakers

Το αποτέλεσμα διαφόρων μελετών BRAF πρωτεϊνών με τους αναστολείς τους έδειξαν ότι η θέση ενός καταλοίπου της αC-έλικας, του R506 παίζει σημαντικό ρόλο στην παράδοση ενεργοποίηση του μονοπατιού<sup>5</sup>. Αναστολείς που επάγουν την OUT διαμόρφωση αυτού του καταλοίπου δεν παρουσιάζουν παράδοση ενεργοποίηση του μονοπατιού. Οι αναστολείς αυτοί χαρακτηρίζονται ως paradox breakers.

Η στρατηγική της Plexxikon προκειμένου να ξεπεραστεί η παράδοση ενεργοποίηση ήταν να βρεθούν μικρά μόρια αναστολείς της BRAF<sup>V600E</sup> ικανά να διαταράζουν τον σχηματισμό διμερών RAF.

Το PLX-7904 είναι ένα μόριο με δομή παρόμοια με αυτή του vemurafenib, η ουρά πρόπυλο-σουλφοναμιδίου του vemurafenib έχει αντικατασταθεί με N-αιθυλμεθυλ-σουλφοναμίδιο και το φαίνυλιο στη θέση 5 του αζα-ινδολίου έχει αντικατασταθεί από πυριμιδυλομάδα. Το ανάλογο PLX8394 είναι σε κλινικές δοκιμές φάσης I/II<sup>25</sup>. (Εικόνα 10)



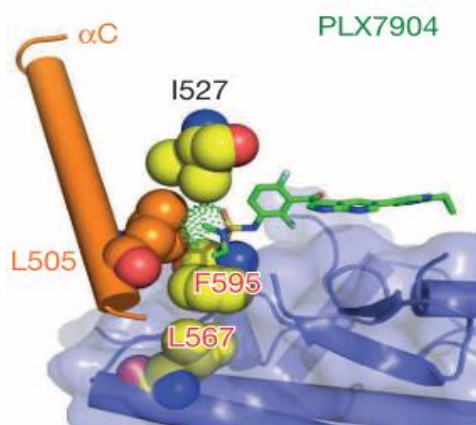


Εικόνα 10: Paradox breakers PLX7904 και PLX8394 σε κλινικές δοκιμές<sup>25</sup>.

Οι νέοι αναστολείς πλεονεκτούν έναντι των εγκεκριμένων φαρμάκων δεδομένου ότι καταστέλλουν τα μεταλλαγμένα κύτταρα BRAF χωρίς ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK σε κύτταρα WT-BRAF που φέρουν μετάλλαξη στο RAS γι' αυτό και ονομάστηκαν Paradox breakers. Επιπλέον, φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί έναντι αρκετών μηχανισμών αντοχής.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα δείχνουν το τελικό N-μεθύλιο του PLX7904 να προσεγγίζει περισσότερο την Leu505 στο άκρο της αC-έλικας προκαλώντας μία μετατόπιση των ατόμων άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας κατά 0.6–1Å μεγαλύτερη σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο αναστολέα. (Εικόνα 11)

Αν και η κρυσταλλική δομή δείχνει τη BRAFV600E ως διμερές με το PLX7904 να φιλοξενείται στο ενεργό κέντρο μόνο του ενός μονομερούς, υποστηρίζεται ότι σε συνθήκες κυττάρου, η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ PLX7904 και Leu505 θα μπορούσε να οδηγήσει σε περαιτέρω απομάκρυνση προς τα έξω της αC-έλικας, διαταράσσοντας τη διεπιφάνεια του διμερούς και τελικά εμποδίζοντας το διμερισμό<sup>25</sup>.



Εικόνα 11: Προτεινόμενος μοριακός μηχανισμός δράσης των paradox breakers. Η διακεκομμένη επιφάνεια γύρω από την ομάδα N-μεθυλίου του PLX7904 απεικονίζει την στενή επαφή του με το Leu505 στο άκρο της αC-έλικας απομακρύνοντας περισσότερο προς τα έξω την αC-έλικα και εμποδίζοντας το διμερισμό [εικόνα από Zhang et al, Nature, 2015; 526(7574):583-6]

Τέλος, έχει προταθεί ότι η θέση του R506 καταλοίπου της αC-έλικας που επάγεται από την πρόσδεση του αναστολέα, παίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα διμερισμού με συνέπεια την παράδοξη ενεργοποίηση του μονοπατιού ή την εμφάνιση αντίστασης λόγω αυξημένης τάσης διμερισμού<sup>5</sup>. Οι paradox breakers σταθεροποιούν την πλευρική αλυσίδα του R506 στην πιο απομακρυσμένη OUT διαμόρφωση σε σχέση με όλους τους αναστολείς που έχουν έως τώρα αναπτυχθεί<sup>26</sup>. (Εικόνα 12)

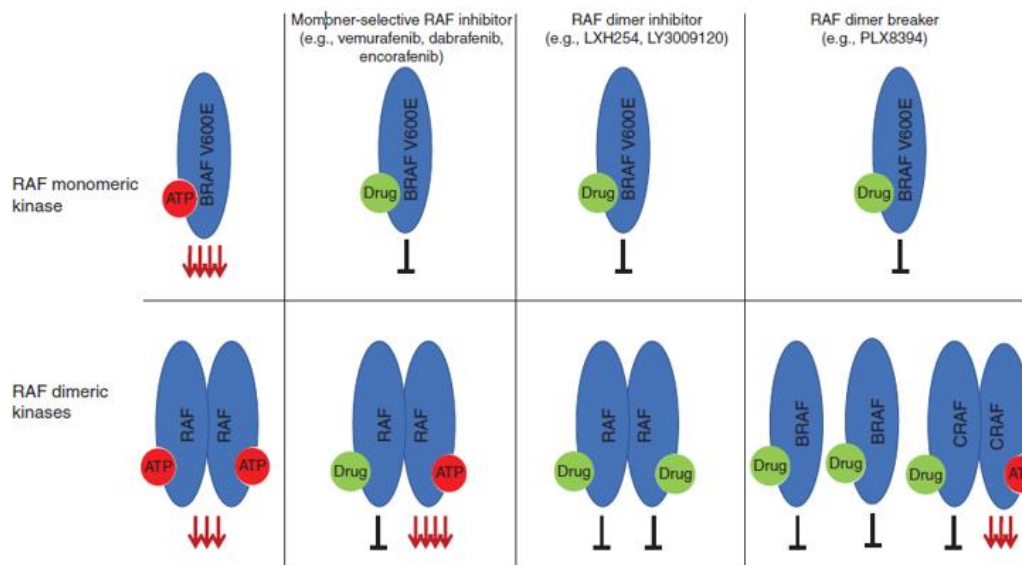


Εικόνα 12: Υπέρθυση των κρυσταλλικών δομών της BRAF (μονομερή δεσμευμένα με αναστολείς) που δείχνουν την επαγόμενη μετακίνηση της αC-έλικας προς τη θέση OUT ή IN ανάλογα με το είδος του αναστολέα και τη θέση της πλευρικής αλυσίδας του καταλοίπου R506. Το Paradox breaker (PB) σταθεροποιεί την πλευρική αλυσίδα R506 στην πιο απομακρυσμένη έξω θέση σε σχέση με τα φάρμακα Vemurafenib (VEM) και Dabrafenib (DAB) και προφανώς σε σχέση με τους ac-IN αναστολείς AZ-628 (AZ), TAK-632 (TAK), LY3009120 (LY), GDC-0879 (GDC), SB-590885 (SB) [εικόνα από Cancer Cell 30, 485–498, September 12, 2016 489, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.024>]

Στην Εικόνα 13 συνοψίζεται γραφικά η επίδραση των διαφορετικών RAF αναστολέων στη μεταλλαγμένη BRAFV600E που σηματοδοτεί ως μονομερές και στα ομό- και έτερο- διμερή. Οι αναστολείς αC-OUT που χορηγούνται ως φάρμακα (Vemurafenib, Dabrafenib, Encorafenib) αναστέλλουν εκλεκτικά το μονομερές BRAFV600E όμως σε κλινικές δόσεις προκαλούν παράδοξη ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού στα RAF διμερή γιατί αδυνατούν να προσδέσουν και στα δύο μονομερή (αρνητικό συνεργιστικό φαινόμενο για τη δεύτερη θέση-negative cooperativity).

Οι αναστολείς αC-IN δύνανται να προσδέσουν και να καταστείλουν τα μεταλλαγμένα μονομερή και τα διμερή RAF μπορούν να αναστέλλουν τα μεταλλαγμένα μονομερή και διμερή RAF στην ίδια δόση όμως πιθανά εμφανίζουν στενό θεραπευτικό παράθυρο.

Οι paradox breakers συνδέονται και καταστέλλουν<sup>25</sup> τη μεταλλαγμένη BRAFV600E ενώ η δράση τους στα διμερή (BRAF-BRAF, BRAF-CRAF) συνδυάζεται με την παρεμπόδιση του διμερισμού. Δεν δύνανται να παρεμποδίσουν τον ομό-διμερισμό των CRAF ισομορφών λόγω διαφοροποίησης της διεπιφάνειας διμερισμού και στην περίπτωση αυτή εμφανίζεται αρνητικό συνεργιστικό φαινόμενο για τη δεύτερη θέση και παράδοξη ενεργοποίηση του MAPK. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι σε κύτταρα WTRAS / RAF, όπου εκφράζονται όλες οι ισομορφές, η χορήγηση του PLX8394<sup>27</sup> δεν προκαλεί ούτε αναστολή ούτε ενίσχυση της σηματοδότησης ERK έτσι είναι απαλλαγμένο από τοξικότητα.

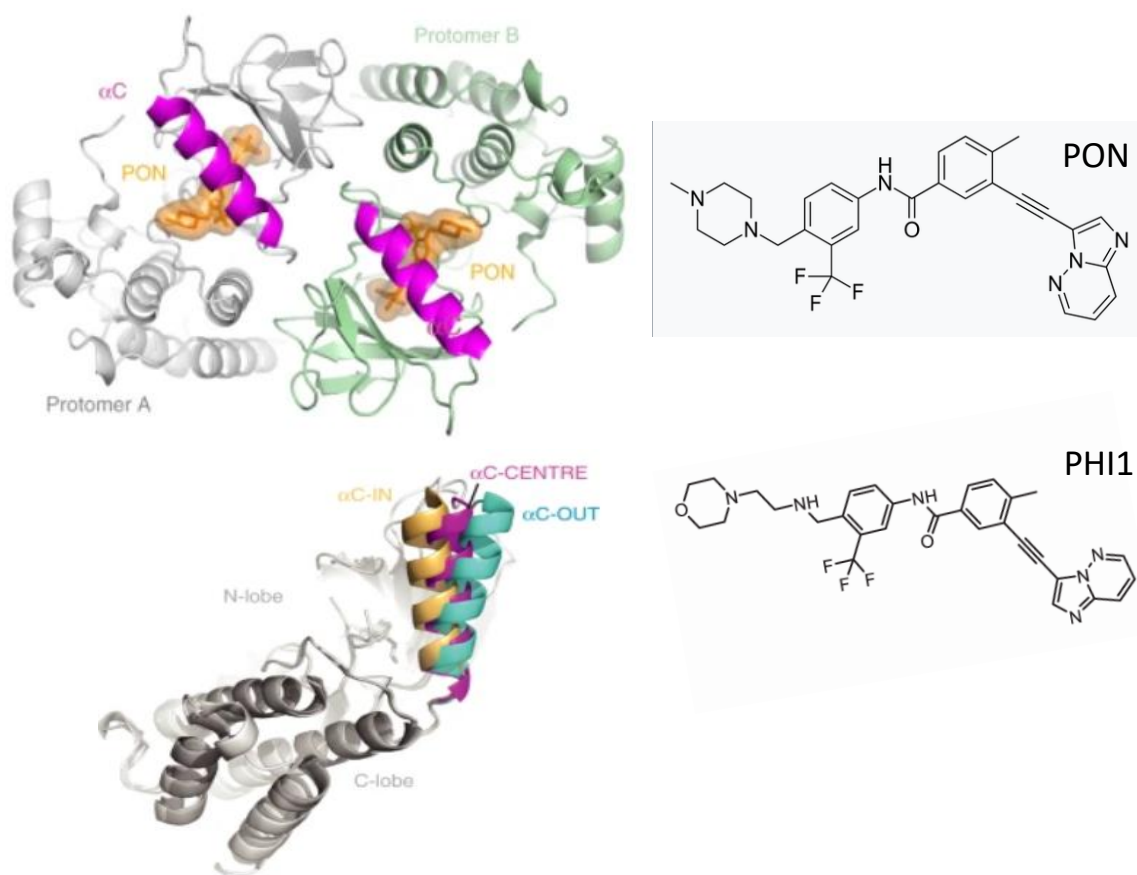


Εικόνα 13: Εικόνα 19: Επίδραση των διαφορετικών RAF αναστολέων (aC-OUT Vemurafenib, Dabrafenib, Encorafenib, aC-IN LXH254 και LY3009120 και Paradox breaker PLX8394) στη μονομερή μεταλλαγμένη BRAFV600E (άνω τμήμα) ή στις ομό και έτερο-διμερείς BRAF/CRAF κινάσες (κάτω μέρος). [Εικόνα από Targeting Alterations in the RAF–MEK Pathway Rona Yaeger<sup>1</sup> and Ryan B. Corcoran<sup>2</sup> MARCH 2019 CANCER DISCOVERY DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1321]

#### A.7 Νέοι υποψήφιοι αναστολείς με εφαρμογή επανατοποθέτησης φαρμάκων

Σε μία προσπάθεια εύρεσης νέων αναστολέων έναντι της BRAFV600E σε πολύ πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη<sup>28</sup> πραγματοποιήθηκε σάρωση βιβλιοθήκης μορίων με γνωστούς αναστολείς κινασών. Το Ponatinib, ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης που χορηγείται στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία που φέρει τη μετάλλαξη T315I στο BCR-ABL γονίδιο, αναδείχθηκε ως πιθανός αναστολέας τόσο των μονομερών BRAFV600E όσο και των διμερών των BRAF αλλά και της p61BRAF V600E. Η κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος BRAF V600E/ponatinib ανέδειξε έναν νέο τρόπο αλληλεπιδράσεων που οδηγεί σε τέτοια διαμόρφωση της αC έλικας και στα δύο μονομερή που επιτρέπει τη σύνδεση δύο μορίων του αναστολέα. Η νέα αυτή διαμόρφωση της αC- έλικας καλείται αC-Centre διαμόρφωση και βρίσκεται ανάμεσα στις αC-IN και αC-OUT διαμορφώσεις. (Εικόνα 14)

Στοχευμένη τροποποίηση του ponatinib οδήγησε στο νέο ανάλογο PHI1 που παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς την καταστολή των μεταλλαγμένων διμερών της BRAF (όπως τα διμερή p61BRAF V600E) έναντι της μονομερούς BRAF V600E και μάλιστα οδηγώντας σε μια νέα κατηγορία αναστολέων που θα μπορούσαν να χορηγηθούν συνδυαστικά με τους αC-OUT για την αντιμετώπιση της αντοχής λόγω διμερισμού και εμφάνισης αρνητικού συνεργιστικού φαινομένου για τη δεύτερη θέση.



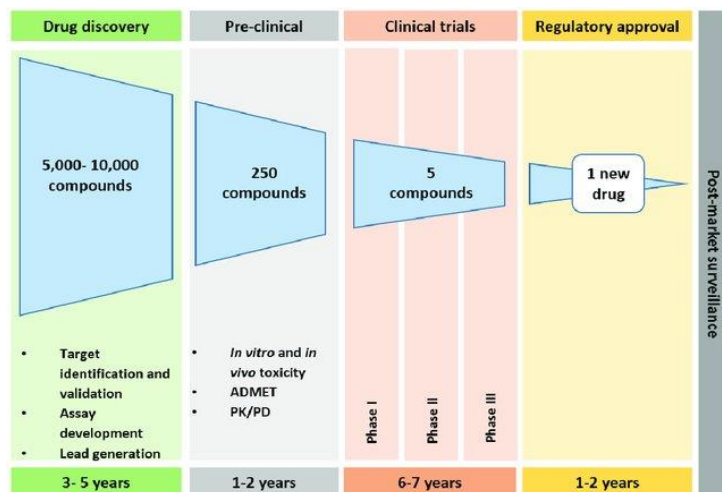
Εικόνα 14: Σύνδεση ενός μορίου Ponatinib σε κάθε πρωτομερές της BRAF V600E<sup>28</sup>. Η σύνδεση του Ponatinib (PON) και του τροποποιημένου αναλόγου PHI1 επάγει μία νέα διαμόρφωση στην αC-έλικα, τη διαμόρφωση αC-centre που βρίσκεται ανάμεσα στην αC-IN και αC-OUT διαμόρφωση<sup>28</sup>.

## Μέρος Β

### Β.1 Εισαγωγή

Φάρμακο ορίζεται μία ουσία ή ένα μίγμα ουσιών που εισέρχεται στον οργανισμό, απορροφάται και κατανέμεται στα κύτταρα και στους ιστούς με αποτέλεσμα να μεταβάλλει τη λειτουργία τους, στοχεύοντας στη θεραπεία, στην πρόληψη, στην έγκαιρη διάγνωση μίας νόσου αλλά και στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της.

Η ανάπτυξη ενός φαρμάκου αποτελεί μια ιδιαίτερα χρονοβόρα διαδικασία δεδομένου ότι χρειάζονται κατά μέσο όρο 10-15 έτη, για την τελική διάθεσή του στην αγορά καθώς επίσης και εξαιρετικά κοστοβόρα, χρειάζονται περισσότερα από 2,5 δισεκατομμύρια δολάρια για την ανάπτυξη ενός φαρμάκου, η οποία σε πολλές περιπτώσεις αποτυγχάνει στα στάδια των κλινικών δοκιμών. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία από μία πληθώρα ενώσεων που ελέγχονται στην προκλινική φάση (5.000-10.000) μόνο 250 θα περάσουν στο στάδιο των προκλινικών δοκιμών, 5 θα περάσουν στο στάδιο των κλινικών δοκιμών και τελικά μόνο μία θα καταφέρει να πάρει έγκριση (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Στάδια ανάπτυξης ενός φαρμάκου<sup>71</sup>

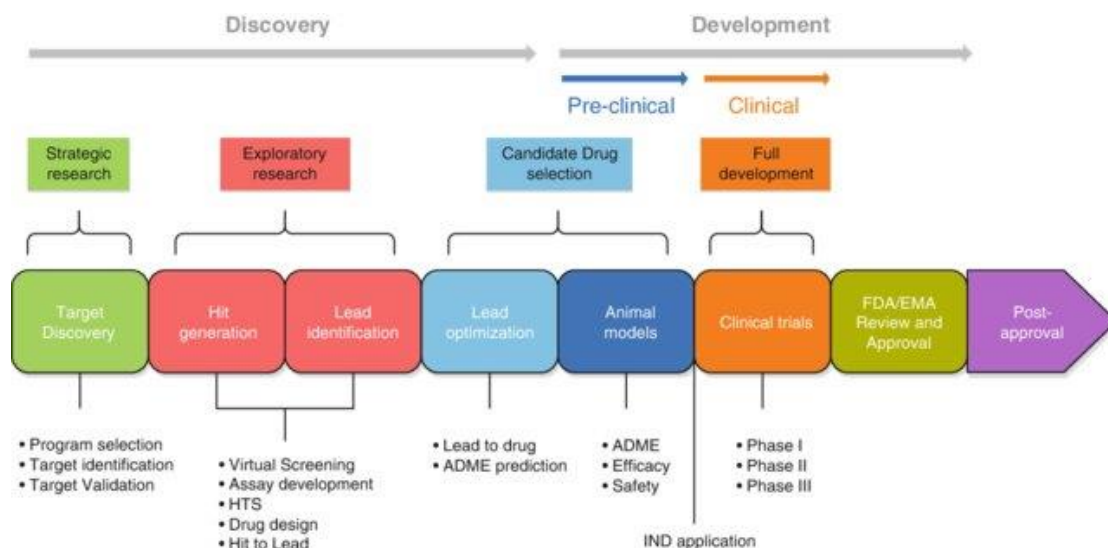
Οι κύριοι λόγοι αποτυχίας αυτής της διαδικασίας είναι προβλήματα φαρμακοκινητικής, η έλλειψη αποτελεσματικότητας, οι ανεπιθύμητες ενέργειες, η μη αποδεκτή τοξικότητα αλλά και τα αυστηρά κριτήρια τα οποία πλέον πρέπει να πληρούν τα φάρμακα για να διατεθούν στην αγορά<sup>29</sup> (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Λόγοι αποτυχίας της διαδικασίας ανάπτυξης ενός φαρμάκου.

Στην Εικόνα 17 παρατίθενται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα στάδια που προηγούνται και οι σύγχρονες ερευνητικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται έως την κατάθεση φακέλου (IND: Investigational New Drug) στον αρμόδιο Οργανισμό αδειοδότησης (FDA, EMA) από μέρος της φαρμακευτικής εταιρίας για την έναρξη κλινικών δοκιμών.





Εικόνα 17: Βασικά στάδια ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου<sup>30</sup>

## B.2 Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων

Η αλματώδης ανάπτυξη της τεχνολογίας τις τελευταίες δεκαετίες, προσέφερε τεράστια ώθηση σε τομείς της επιστήμης, όπως η χημεία, η βιοτεχνολογία, η γονιδιωματική, η πρωτεωμική, η μεταβολομική και η βιολογία συστημάτων. Ο συνδυασμός της ανάπτυξης αυτής καθώς και η πρόοδος στον τομέα της βιοπληροφορικής άνοιξε νέους δρόμους στην ανάπτυξη φαρμάκων, ώστε από την εποχή της τυχαίας ανακάλυψης να περάσουμε πλέον στην εποχή του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων.

Σήμερα, ο ορθολογικός σχεδιασμός αποτελεί βασικό εργαλείο σχεδιασμού φαρμάκων, συνεισφέροντας ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, προϋποθέτοντας όμως την κατανόηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της ασθένειας σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Ειδικότερα, βασική προϋπόθεση αποτελεί η αναγνώριση ενός φαρμακευτικού στόχου (π.χ. πρωτεϊνική κινάση, σύμπλεγμα πρωτεϊνών) καθώς και η αναγνώριση της διασύνδεσης του με μία συγκεκριμένη ασθένεια (επικύρωση στόχου).

## B.3 Σχεδιασμός φαρμάκων με μεθόδους Υπολογιστικής Χημείας (Computer Aided Drug Design)

Η επίτευξη των πρώτων σταδίων ανάπτυξης ενός φαρμάκου, δηλαδή των σταδίων της ανακάλυψης και της βελτιστοποίησης της πρόδρομης ένωσης σε ένωση οδηγό (lead compound), συνεισφέρει σημαντικά τόσο στη μείωση του κόστους αλλά και του χρόνου της διαδικασίας. Το “Fail early, fail fast, fail cheap”, είναι πλέον ένας από τους



βασικούς κανόνες της βιομηχανίας ανάπτυξης φαρμάκων. Επομένως, ο σχεδιασμός φαρμάκων με χρήση μεθόδων Υπολογιστικής Χημείας αφενός προσφέρει τη δυνατότητα ταυτόχρονης αναζήτησης πιθανών βιοδραστικών ενώσεων, χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες ενώσεων με ποικιλομορφία δομικών χαρακτηριστικών (Εικονική Σάρωση – Virtual Screening) αφετέρου δύναται να επιταχύνει αυτή την αναζήτηση μέσω εφαρμογής εργαλείων που στοχεύουν στην επιλογή των ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα αλληλεπίδρασης με το φαρμακευτικό στόχο (πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης στον εκάστοτε βιολογικό στόχο). Επίσης, η Υπολογιστική Χημεία συμβάλλει καθοριστικά στη βελτιστοποίηση των ενώσεων προς ενώσεις-οδηγούς καθώς καθοδηγεί στοχευμένα τη σύνθεση νέων ενώσεων <sup>31</sup>. Επιπλέον, εφαρμόζεται ευρέως στη διαδικασία της επανατοποθέτησης φαρμάκων.

Οι υπολογιστικές τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων μπορούν να ταξινομηθούν: στις ακόλουθες μεθόδους:

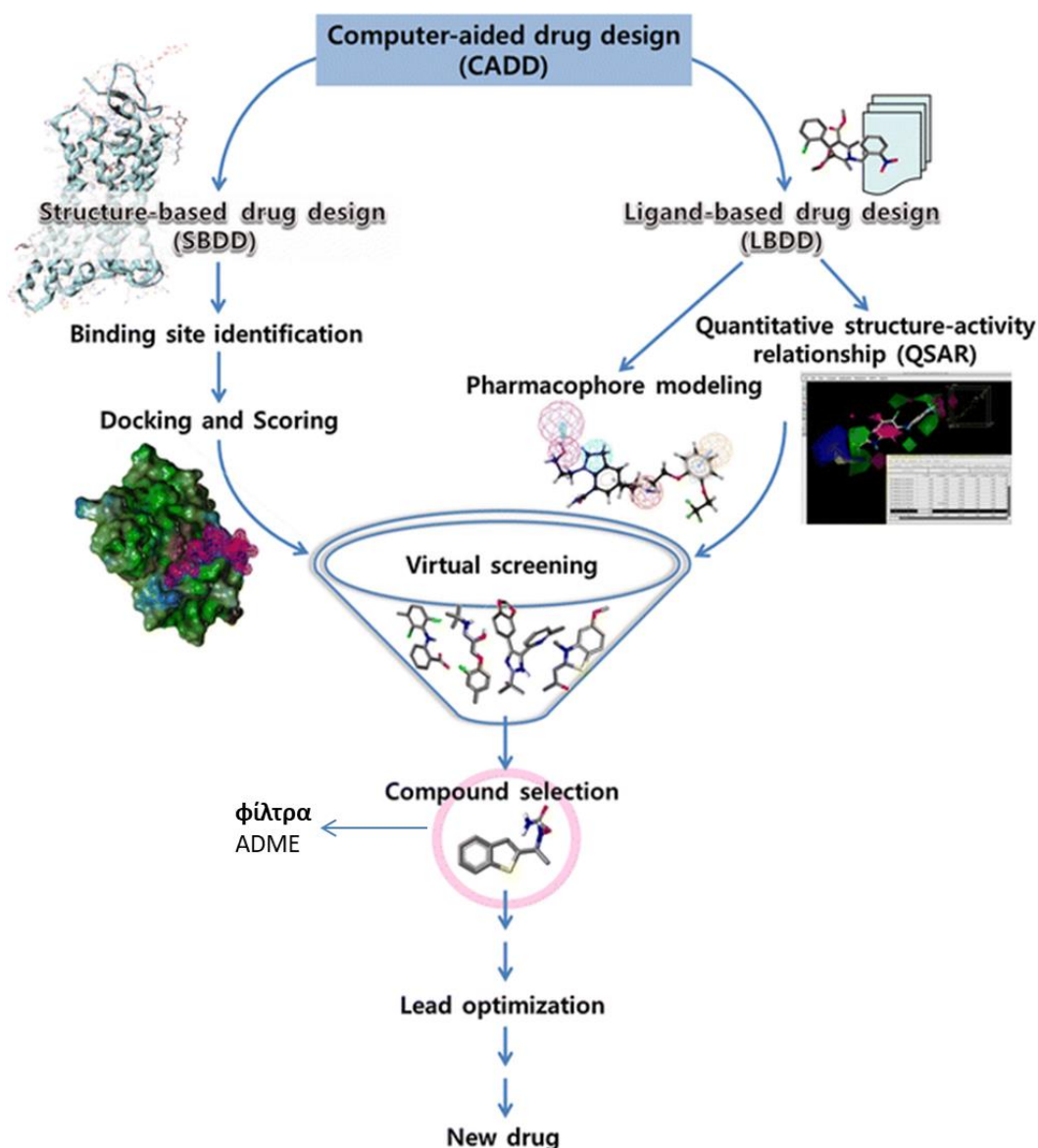
- Μέθοδοι που βασίζονται στην τρισδιάστατη δομή του φαρμακευτικού στόχου (Structure-Based Drug Design),
- Μέθοδοι που βασίζονται στη δομή γνωστών προσδετών (Ligand-Based Drug Design) καθώς και
- Μέθοδοι με βάση τα δομικά θραύσματα (Fragment-Based Drug Design).

Στην πρώτη περίπτωση, απαραίτητη είναι η ύπαρξη της τρισδιάστατης δομής του πρωτεϊνικού στόχου και κυρίως της περιοχής πρόσδεσης του προσδέτη, ώστε να μελετηθούν οι κρίσιμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ στόχου-προσδέτη και να εκτιμηθεί η συγγένεια πρόσδεσης. Στη δεύτερη περίπτωση εξάγονται τα κοινά φαρμακοφόρα χαρακτηριστικά των γνωστών προσδετών και η χωρική διευθέτησή τους (φαρμακοφόρο μοντέλο) και αναζητούνται ενώσεις που υπερτίθενται βέλτιστα στο εξαχθέν μοντέλο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως όταν δεν υπάρχει γνώση της 3D δομής του φαρμακευτικού στόχου. Τέλος, ο σχεδιασμός σύμφωνα με τα δομικά θραύσματα αποτελεί την πλέον σύγχρονη προσέγγιση, κατά την οποία συνδέονται ορθολογικά μικρά δομικά θραύσματα που φέρουν δομικά χαρακτηριστικά ικανά να αλληλεπιδράσουν μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, για τη δημιουργία της ένωσης-οδηγού.

#### B.4 Σάρωση Υψηλής Απόδοσης (High Throughput Screening) έναντι Εικονικής Σάρωσης (Virtual Screening)

Η Σάρωση Υψηλής Απόδοσης (HTS - High Throughput Screening) ήταν η πλέον συνήθης προσέγγιση φαρμακευτικών και βιοτεχνολογικών εταιρειών για τον εντοπισμό βιοδραστικών ενώσεων. Η εφαρμογή HTS συνίσταται στον ταυτόχρονο *in vitro* έλεγχο μεγάλου αριθμού υποψήφιων ενώσεων ως προς την αποτελεσματικότητά τους σε διάφορους φαρμακευτικούς στόχους χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένα ρομποτικά συστήματα<sup>32</sup>.

Αντίθετα, η Εικονική Σάρωση (Virtual Screening) που αποτελεί τον πυρήνα της εφαρμογής Υπολογιστικής Χημείας για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων, είναι η υπολογιστική τεχνική κατά την οποία σαρώνεται μία βιβλιοθήκη συνθετικών ή φυσικών, εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων, με απώτερο σκοπό την εύρεση βιοδραστικών ενώσεων, στοχευμένα έναντι του φαρμακευτικού στόχου ενδιαφέροντος. Ανάλογα με την ύπαρξη ή την απουσία της 3D του φαρμακευτικού στόχου που μελετάται, η Εικονική Σάρωση μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο βασικές κατηγορίες. Στην Εικονική Σάρωση που βασίζεται στη δομή της πρωτεΐνης (Structure-Based Virtual Screening) και στην Εικονική Σάρωση που βασίζεται στη δομή βιβλιογραφικά γνωστών προσδετών (Ligand-Based Virtual Screening). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τεχνικών των δυο αυτών κατηγοριών αποτελούν η Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) και η δημιουργία φαρμακοφόρων μοντέλων που βασίζονται στους προσδέτες (Ligand-Based Pharmacophore Screening). (Εικόνα 18)



Εικόνα 18: Σχεδιασμός νέων φαρμάκων με χρήση Υπολογιστικής Χημείας (CADD).

### B.5 Βιβλιοθήκες Μορίων

Μείζονος σημασίας για την επιτυχή έκβαση της διαδικασίας ανακάλυψης νέου φαρμάκου είναι η επιλογή καθώς και προετοιμασία κατάλληλων βιβλιοθηκών ενώσεων που θα σαρωθούν εικονικά<sup>31</sup>. Βασική αρχή για την επιλογή κατάλληλης βιβλιοθήκης ενώσεων είναι η ύπαρξη βιοδραστικών ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν δομική ποικιλομορφία, αλλά και η ύπαρξη κάποιου βαθμού ομοιότητας δεδομένου ότι όμοιες δομικά ενώσεις ενδέχεται να παρουσιάζουν παρόμοια δράση. Και τα δύο έχουν ως σκοπό την αύξηση πιθανότητας ανακάλυψης βιοδραστικών ενώσεων (hits) για συγκεκριμένο φαρμακευτικό στόχο. Για το λόγο αυτό μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες μέθοδοι ομαδοποίησης (cluster) και η επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών

ουσιών από κάθε ομάδα (cluster representatives). Η επιλογή της βιβλιοθήκης μπορεί επίσης να κατευθυνθεί με βάση το φαρμακευτικό στόχο, π.χ. εάν ο στόχος ανήκει σε μία συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών π.χ. δραστικές ενώσεις έναντι κινασών.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναγνωρίζονται και να αφαιρούνται από την εξεταζόμενη βιβλιοθήκη οι ουσίες που είναι γνωστό ότι δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε διάφορες βιοχημικές δοκιμασίες (PAINS- pan-assay interference compounds).

#### B.6 Lead like, drug like και ADMET Κριτήρια

Ένα μεγάλο ποσοστό (~95%) των εγκεκριμένων φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα διαθέτουν φυσικοχημικές ιδιότητες που πληρούν τα κριτήρια Lipinski<sup>33</sup>, τα οποία είναι γνωστά ως ο κανόνας των πέντε -Ro5 (Εικόνα 19). Τα υποψήφια φάρμακα που βρίσκονται εντός των ορίων του Ro5 (Drug-like criteria) τείνουν να έχουν χαμηλότερα ποσοστά αποτυχίας στις κλινικές δοκιμές και κατά συνέπεια να αυξάνονται οι πιθανότητες έγκρισης και διάθεσής τους στην αγορά.

Κατά αντιστοιχία με τα Drug-like κριτήρια αναπτύχθηκαν και τα Lead-like κριτήρια. Η διαφορά που παρατηρείται στα Drug like κριτήρια και τα Lead- like κριτήρια αντικατοπτρίζει τη διαφορά στην πολυπλοκότητα του μορίου των ενώσεων-οδηγών και των φαρμάκων. Προχωρώντας από τα πρωιμότερα στα μεταγενέστερα στάδια αυξάνεται η πολυπλοκότητα του μορίου και μαζί με αυτήν και οι σχετιζόμενες φυσικοχημικές ιδιότητες<sup>31</sup>. Τα μέλη των Lead-like βιβλιοθηκών δίνουν τη δυνατότητα περισσότερων τροποποιήσεων κατά τη φάση της βελτιστοποίησης(Εικόνα 19).

Properties	Leadlikeness	Druglikeness
Molecular weight (MW)	≤350	≤500
Lipophilicity (clog <i>P</i> )	≤3.0	≤5.0
H-bond donor (sum of NH and OH)	≤3	≤5
H-bond acceptor (sum of N and O)	≤8	≤10
Polar surface area (PSA)	≤120 Å <sup>2</sup>	≤150 Å <sup>2</sup>
Number of rotatable bonds	≤8	≤10
Structural filters	Reactive groups	
	Warhead-containing agents	
	Frequent hitters	
	Promiscuous inhibitors	

Εικόνα 19: Η σύγκριση των Lead-like και Drug-like κριτηρίων <sup>31</sup>.

Επιπλέον, για να μπορέσει μία ένωση να συνεχίσει την πορεία της προς υποψήφιο φάρμακο θα πρέπει να πληροί και κάποια κριτήρια ως προς την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια. Τα κριτήρια αυτά ονομάζονται κριτήρια ADMET<sup>34</sup> (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) και σχετίζονται με την πρόβλεψη του φαρμακοκινητικού προφίλ<sup>35</sup> (π.χ. συγγένεια ως προς την αλβουμίνη, διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού, απορρόφηση φαρμάκου μέσω της πεπτικής οδού) αλλά και την πιθανή τοξικότητα (π.χ. αριθμός πιθανών μεταβολιτών, ύπαρξη ομάδων που μπορούν να αλληλεπιδράσουν ομοιοπολικά με τα ένζυμα μεταβολισμού CYP, παρεμπόδιση των hERG K<sup>+</sup> καναλιών που σχετίζονται με την ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς). Η πρόβλεψη των ADMET ιδιοτήτων εφαρμόζεται κατά τα πρώτα στάδια του σχεδιασμού φαρμάκων, ώστε στα πρώτα στάδια να αποκλειστούν ή να τροποποιηθούν οι ενώσεις που δεν τα ικανοποιούν.

## B.7 Η έννοια της Μοριακής Ομοιότητας

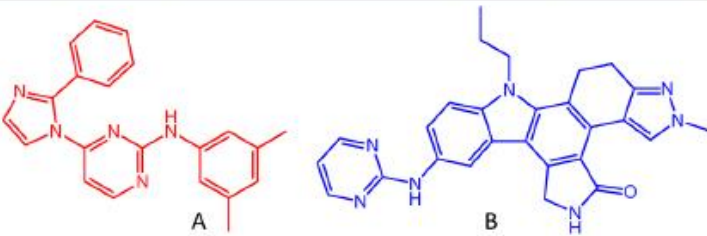
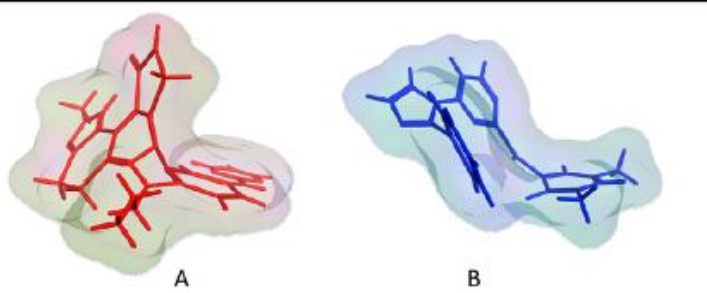
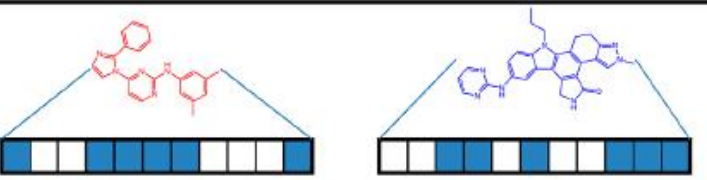
Η τεχνική της μοριακής ομοιότητας έχει διερευνηθεί και αξιοποιηθεί διεξοδικά στο πεδίο της Χημειοπληροφορικής ενώ αποτελεί μια προσέγγιση με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη Φαρμακευτική Χημεία. Η αρχή της Μοριακής ομοιότητας δηλώνει ότι μόρια με κοινά δομικά στοιχεία τείνουν να έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές καθώς και βιολογικές ιδιότητες συχνότερα συγκριτικά με δομικά ανόμοια μόρια<sup>36</sup>. Η παραπάνω αρχή έχει γνωρίσει εκτεταμένη χρήση στο στάδιο της ανακάλυψης ενώσεων-οδηγών και καθώς και σε μελέτες βελτιστοποίησης.

Τα ερωτήματα που στοχεύει να απαντήσει η αξιολόγηση της μοριακής ομοιότητας (ή ανομοιότητας) στα πλαίσια του σχεδιασμού νέων φαρμάκων συνοψίζονται στα ακόλουθα σημεία<sup>37</sup>.

- Υπάρχουν ενώσεις με δομικά όμοια χαρακτηριστικά ως προς ένα αναγνωρισμένο hit (φέρουν στη δομή τους κοινό βιολογικά δραστικό template) ώστε να διερευνηθούν περαιτέρω γιατί πιθανά θα έχουν καλύτερο φαρμακοκινητικό προφίλ ή ακόμα και ισχυρότερη δράση;
- Οι παρόμοιες ενώσεις ως προς ένα αναγνωρισμένο hit μπορούν να καθοδηγήσουν περαιτέρω τις συνθετικές προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση του hit προς ένωση-οδηγό;
- Είναι η υποψήφια ένωση (hit) δομικά παρόμοια με κάποια γνωστή δραστική ένωση ώστε να προκύψουν θέματα πνευματικής ιδιοκτησίας;
- Πώς μπορεί να συμπληρωθεί η βιβλιοθήκη ενώσεων που θα ελεγχθούν περαιτέρω με *in vitro* δοκιμές με διαφορετικές ενώσεις, ώστε να ελεγχθεί η δραστηριότητα διαφορετικών scaffolds;
- Πως όμως μπορεί να οριστεί και να μετρηθεί αυτή η ομοιότητα; Για να γίνει δυνατή η μέτρηση της ομοιότητας μεταξύ δύο μορίων θα πρέπει να υπάρχει ένας τρόπος να περιγραφούν εκείνες οι ιδιότητες των μορίων που θα αξιολογηθούν ως προς την ομοιότητα τους. Για την περιγραφή των ιδιοτήτων των μορίων έχουν αναπτυχθεί οι διάφοροι μοριακοί descriptors και τα μοριακά αποτυπώματα (molecular fingerprints).

### B.7.1 Descriptors

Οι descriptors είναι η μαθηματική αποτύπωση διαφόρων ιδιοτήτων των μορίων<sup>38,39</sup>. Αναρίθμητοι descriptors με διαφορετική πολυπλοκότητα και διαφορετικό είδος πληροφορίας έχουν αναπτυχθεί ανάλογα με το είδος των ιδιοτήτων που επιθυμούμε να αποτυπώσουμε.

Chemical similarity		Mol. weight	LogP	Rotatable bonds	Aromatic rings	Heavy atoms
	A	341.4	5.23	4	4	26
	B	463.5	4.43	4	5	35
Molecular similarity						
2D similarity						
3D similarity						
Biological similarity		Vascular endothelial growth factor receptor 2		Tyrosine-protein kinase TIE-2		
	A	active		inactive		
	B	active		active		
Global similarity						

Εικόνα 20: Η έννοια της μοριακής ομοιότητας μέσω της σύγκρισης δύο αναστολέων του vascular endothelial growth factor receptor 2<sup>37</sup>

Για παράδειγμα υπάρχουν descriptors για την περιγραφή φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων, όπως π.χ. το μοριακό βάρος (MW), η λιποφιλικότητα (logP), η

διαλυτότητα (logS), descriptors που αφορούν τα δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων (ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων, άτομα με δυνατότητα σχηματισμού δεσμών H, κλπ.), descriptors που το πληροφοριακό τους περιεχόμενο συμπεριλαμβάνει και τον τρόπο που συνδέονται τα άτομα ή τα επιμέρους δομικά στοιχεία του μορίου (2D αναπαράσταση) και descriptors που λαμβάνουν υπόψη τη 3D διαμόρφωση των μορίων και περιλαμβάνουν πληροφορίες σχετικές με τις χωρικές συντεταγμένες των επιμέρους ατόμων της ένωσης, ώστε να χαρτογραφηθούν οι πολικές (solvent accessible surface areas) και οι περισσότερο λιπόφιλες επιφάνειες του μορίου, να διερευνηθεί η χωρική διευθέτηση των κύριων φαρμακοφόρων τμημάτων του μορίου κλπ.

Οι descriptors βρίσκουν εφαρμογή σε μελέτες ομοιότητας ενώσεων στην ανάπτυξη QSAR μοντέλων<sup>39</sup>, σε μελέτες εικονικής σάρωσης αλλά και σε μελέτες πρόβλεψης ADMET ιδιοτήτων<sup>34</sup>.

### B.7.2 Fingerprints

Τα μοριακά αποτυπώματα<sup>40</sup> (molecular fingerprints) είναι ένας τρόπος αποτύπωσης της δομής και των ιδιοτήτων των χημικών ενώσεων σε μία σειρά (string) από bits. Κάθε bit εκφράζει την παρουσία (bit=1) ή την απουσία (bit=0) συγκεκριμένων θραυσμάτων ή δομικών υπομονάδων του μορίου.

Οι πλέον σύγχρονοι αλγόριθμοι δημιουργίας fingerprints για τις μοριακές δομές περιλαμβάνουν την εξαντλητική δημιουργία μοτίβων (patterns) για κάθε μόριο «βαδίζοντας» ακολουθιακά στη δομή όπως περιγράφεται στο ακόλουθο παράδειγμα<sup>41</sup>.

Για το μόριο OC=CN δημιουργούνται τα εξής μοτίβα:

0-bond paths: C O N

1-bond paths: OC C=C CN

2-bond paths: OC=C C=CN

3-bond paths: OC=CN

Στη συνέχεια, σε κάθε μοτίβο αντιστοιχίζεται από γεννήτρια ψευδοτυχαίων αριθμών μια ακολουθία 4-5 bits. Το fingerprint του μορίου προκύπτει ως το λογικό άθροισμα (OR) των bits που παράχθηκαν.



Η σύγκριση των επιμέρους αποτυπωμάτων διαφορετικών μορίων επιτρέπει τον καθορισμό της ομοιότητας μεταξύ τους. Ως μέτρο ομοιότητας μπορεί να ληφθεί η Ευκλείδεια απόσταση, η απόσταση Manhattan ενώ ο συντελεστής ομοιότητας Tanimoto<sup>42</sup> αποτελεί τον πλέον χρησιμοποιούμενο στο πεδίο του σχεδιασμού νέων φαρμάκων. (Εικόνα 21)

Distance metric	Formula for dichotomous variables <sup>a</sup>
Manhattan distance	$D_{A,B} = a + b - 2c$
Euclidean distance	$D_{A,B} = [a + b - 2c]^{1/2}$
Cosine coefficient	$S_{A,B} = \frac{c}{ ab ^{1/2}}$
Dice coefficient	$S_{A,B} = 2c/[a + b]$
Tanimoto coefficient	$S_{A,B} = c/[a + b - c]$
Soergel distance <sup>b</sup>	$D_{A,B} = 1 - \frac{c}{[a+b-c]}$

*Εικόνα 21: Χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις για την έκφραση του μέτρου ομοιότητας μεταξύ δύο μορίων A και B.*

*a: αριθμός bits με τιμή 1 στο μόριο A*

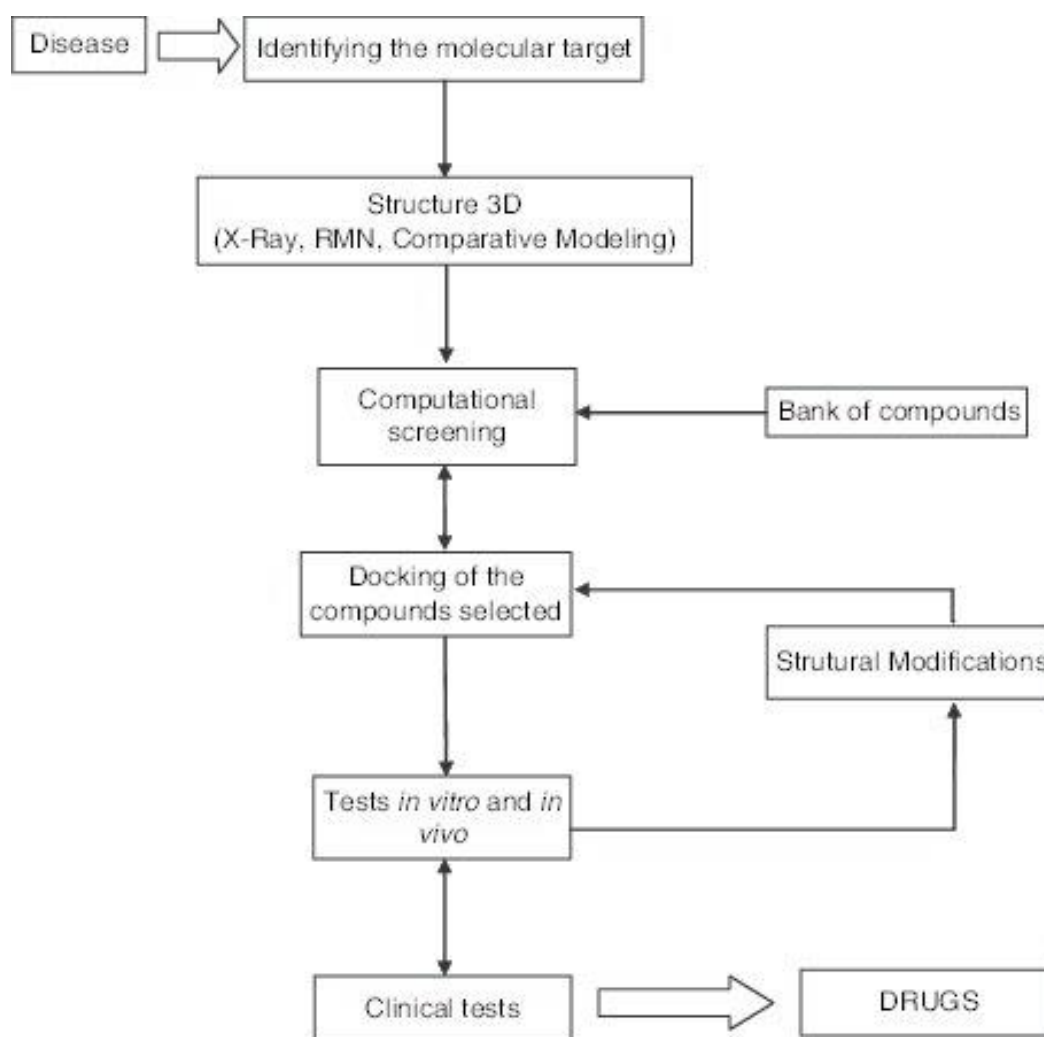
*b: αριθμός bits με τιμή 1 στο μόριο B*

*c: αριθμός bits με τιμή 1 και στα δύο μόρια (κοινά χαρακτηριστικά)*

## B.8 Σχεδιασμός φαρμάκου με γνωστή δομή του φαρμακευτικού στόχου (Structure-Based Drug Design)

Στο σχεδιασμό φαρμάκων με γνωστή τη δομή του φαρμακευτικού στόχου, η δομή μπορεί να έχει προσδιοριστεί πειραματικά με βιοφυσικές μεθόδους<sup>29,43,44</sup>, όπως η κρυσταλλογραφία ακτινών X, είτε με NMR, είτε με την πλέον σύγχρονη προσέγγιση της κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM). Σε περιπτώσεις απουσίας της δομής του φαρμακευτικού στόχου, αλλά υπάρχουν γνωστές δομές πρωτεϊνών με τις οποίες ο φαρμακευτικός στόχος παρουσιάζει ικανοποιητικό ποσοστό ομολογίας, μπορεί να

εφαρμοστεί η μέθοδος της συγκριτικής μοντελοποίησης ή μοντελοποίησης βάσει της ομολογίας. Έπειτα με τη βοήθεια υπολογιστικών τεχνικών, γίνεται σάρωση μεγάλων βιβλιοθηκών χημικών ενώσεων με σκοπό να βρεθούν εκείνες που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αλληλεπιδρούν με το φαρμακευτικό στόχο (πχ ενεργοποίηση, αναστολή). Επιπλέον, παρέχεται η δυνατότητα μέσω διαθέσιμων προγραμμάτων να γίνει πρόβλεψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, ώστε να επιλεγθούν μόρια που εν δυνάμει παρουσιάζουν ικανοποιητικό φαρμακοκινητικό προφίλ. Η ανακάλυψη μιας πρόδρομης δραστικής ένωσης (hit) ή ένωσης-οδηγού επιβεβαιώνεται με *in vitro* και *in vivo* δοκιμές, ενώ μια ανατροφοδοτούμενη διεργασία που περιλαμβάνει συνθετικές τροποποιήσεις στοχεύει στη περαιτέρω βελτιστοποίηση της δραστηριότητας, της εκλεκτικότητας και του φαρμακοκινητικού προφίλ, ώστε το βελτιστοποιημένο ανάλογο να οδηγηθεί στο επόμενο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Στο στάδιο αυτό θα κριθεί τελικά η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του υποψήφιου φαρμάκου.



Εικόνα 22: Βήματα ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων<sup>45</sup>

### B.8.1 Δομή του Φαρμακευτικού στόχου

Οι προσδιορισμένες πρωτεϊνικές δομές βρίσκονται καταχωρημένες στη βάση πρωτεϊνικών δεδομένων PDB (Protein Data Bank)<sup>46</sup>, η οποία παρέχει πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή τόσο μεμονωμένων μακρομορίων (πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων) όσο και συμπλόκων με γνωστές βιοδραστικές ενώσεις/φάρμακα, καθιστώντας τες αξιοποιήσιμες για την καλύτερη κατανόηση μηχανισμών που εμπλέκονται σε ασθένειες συμβάλλοντας στην ανάπτυξη τρόπων για την αντιμετώπισή τους<sup>46</sup>.

#### B.8.1.α Κρυσταλλογραφία ακτινών

Η κρυσταλλογραφία ακτινών X είναι η κυριότερη πηγή δομικής πληροφορίας για το σχεδιασμό φαρμάκων. Βασίζεται στο φαινόμενο της περίθλασης των ακτινών X όταν αυτές προσκρούουν σε έναν πρωτεϊνικό κρύσταλλο<sup>47</sup>. Το διάγραμμα περίθλασης που ανιχνεύεται αφορά στο ηλεκτρονικό νέφος της πρωτεΐνης, η κατανομή του οποίου είναι χαρακτηριστική για το είδος των πυρήνων, τη σχετική θέση τους, τους δεσμούς μεταξύ τους. Η προσαρμογή της πρωτεϊνικής ακολουθίας στο ηλεκτρονικό νέφος θα αναδείξει την θερμοδυναμικά προτιμώμενη 3D διαμόρφωση.

Ένα βασικό πλεονέκτημα των κρυσταλλογραφικών δομών είναι ότι υπάρχουν αρκετές δομές που έχουν προσδιοριστεί σε αρκετά καλή ανάλυση. Ακόμη ένα πλεονέκτημα της κρυσταλλογραφίας είναι ότι στις προσδιορισμένες δομές αναγνωρίζονται κρίσιμα μόρια νερού, τα οποία ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τον προσδέτη. Παρόλα αυτά για να αξιοποιηθούν οι κρυσταλλικές δομές στο σχεδιασμό φαρμάκων θα πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια<sup>44</sup>. Αρχικά θα πρέπει να αξιολογηθούν ως προς την ανάλυση. Κατά κύριο λόγο τιμές  $<2.7 \text{ \AA}$  είναι αποδεκτές για το σχεδιασμό φαρμάκων. Άλλοι παράγοντες ως προς τους οποίους αξιολογείται μία κρυσταλλική δομή πριν χρησιμοποιηθεί γι' αυτό το σκοπό είναι ο παράγοντας αξιοπιστίας R, οι παράγοντες θερμοκρασίας, τα λάθη στις συντεταγμένες.

#### B.8.1.β NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

Μία ακόμη πολύτιμη πηγή δομικής πληροφορίας λαμβάνεται μέσω του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού<sup>44</sup>. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής, η

προσδιοριζόμενη δομή βρίσκεται συνήθως σε μορφή διαλύματος, προσφέροντας τη δυνατότητα προσδιορισμού της δομής αλλά και σημαντικών πληροφοριών για τη δυναμική συμπεριφορά του μορίου σε συνθήκες που ομοιάζουν στο βιολογικό του περιβάλλον.

Επιπλέον, ειδικές ακολουθίες του bioNMR μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοφυσικό assay για τον έλεγχο πρόσδεσης βιβλιοθήκης μορίων ( $^1\text{H}$ - STD NMR) και για τη διεκρίνιση του κέντρου πρόσδεσης ή ακόμα και για την ανάδειξη αλλοστερικής θέσης πρόσδεσης ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR).

#### B.8.1.γ Συγκριτική μοντελοποίηση (Comparative modeling)

Σε περιπτώσεις στις οποίες η δομή είναι άγνωστη αλλά υπάρχει ομολογία του μελετούμενου στόχου με πρωτεΐνες γνωστών δομών, υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου της συγκριτικής μοντελοποίησης.<sup>48</sup> Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται την εξελικτική σχέση των πρωτεϊνών και το γεγονός ότι εξελικτικά κοντινές πρωτεϊνικές αλληλουχίες θα παρουσιάζουν και παρόμοιες δομές. Υπάρχουν διαθέσιμα προγράμματα για τη δημιουργία του μοντέλου, το οποίο στη συνέχεια βελτιστοποιείται και αξιολογείται ως προς την πιστότητα του και ως προς την ικανοποίηση συγκεκριμένων περιορισμένων που αφορούν αποστάσεις, δεσμούς, δίεδρες γωνίες, κλπ.

#### B.8.2. Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)

Η μοριακή πρόσδεση εφαρμόζεται κατά την ταξινόμηση (ranking) των hits που προκύπτουν από την εικονική σάρωση, κατά την de novo σχεδίαση προσδετών και φυσικά κατά τα στάδια βελτιστοποίησης hit-to-lead κατά ορθολογικό τρόπο.

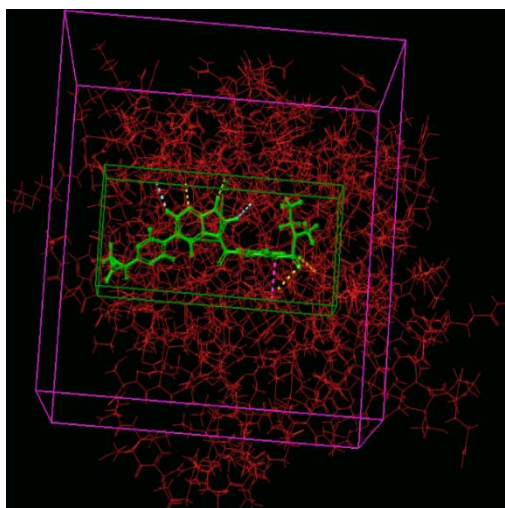
Η μοριακή πρόσδεση μιμείται τη δέσμευση ενός «εν δυνάμει» προσδέτη στο ενεργό κέντρο (binding or active site) της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (target) προβλέποντας τον τρόπο πρόσδεσης (binding mode) και εκτιμώντας τη συγγένεια πρόσδεσης (binding affinity) ως ένα σκορ που αντιπροσωπεύει την ισχύ της πρόσδεσης και συνίσταται στην ενεργειακή συνεισφορά των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του προσδέτη και των αμινοξέων της θήκης πρόσδεσης<sup>49</sup>. Σκοπός είναι η εύρεση εκείνων των προσδετών αλλά και εκείνων των διαμορφώσεων που παρουσιάζουν καλύτερο score άρα και μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται στα ακόλουθα βήματα:

A. Προετοιμασία της πρωτεΐνης στο pH που είναι λειτουργική. Κατά την προετοιμασία γίνονται διορθώσεις που μπορεί να υπάρχουν στις δομές της PDB, προστίθενται τα υδρογόνα που λείπουν και αφαιρούνται τα μόρια  $H_2O$  πλην αυτών που περιλαμβάνονται στο ενεργό κέντρο και μπορεί να δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τους προσδέτες. Τέλος γίνεται βελτιστοποίηση των δεσμών υδρογόνου και ελαχιστοποίηση της ενέργειας της δομής.

B. Προετοιμασία της βιβλιοθήκης ενώσεων που θα δοκιμαστούν ως προς την πρόσδεσή τους που περιλαμβάνει τη δημιουργία των 3D μοριακών μοντέλων, την πρόβλεψη των δυνατών διαμορφώσεων των δακτυλίων, την πρόβλεψη στερεοϊσομερών και ταυτομερών καθώς και την πρόβλεψη όλων των συνθηκών πρωτονίωσης στο εξεταζόμενο pH.

Γ. Δημιουργία του πλέγματος (grid) που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης. Το πλέγμα περικλείει την περιοχή πρόσδεσης και περιέχει πληροφορία για τη μορφή της κοιλότητας πρόσδεσης και τις ιδιότητες της (υπολογισμός ηλεκτροστατικών και vdW αλληλεπιδράσεων σε κάθε σημείο του πλέγματος). Οι υπό εξέταση ενώσεις στη συνέχεια προσαρμόζονται εντός του πλέγματος με όλους τους δυνατούς προσανατολισμούς και η βαθμονόμηση της πρόσδεσης βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των επιμέρους ατόμων με τα πλεγματικά σημεία. (Εικόνα 23)



*Εικόνα 23: Δημιουργία πλέγματος: προσδιορίζεται η θέση της θήκης πρόσδεσης καθώς και οι ιδιότητες της (υπολογισμός ηλεκτροστατικών και vdW αλληλεπιδράσεων σε κάθε σημείο του πλέγματος). Το μικρότερο πλέγμα οριοθετεί την περιοχή την οποία μπορούν να καταλάβουν τα μόρια υπό εξέταση.*

Ενδεικτικά, το πρόγραμμα GLIDE της σουίτας Schrodinger που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία χρησιμοποιεί μία εμπειρική συνάρτηση ενέργειας<sup>50</sup> για τον προσδιορισμό του score (GLIDE Score)<sup>50</sup>.

$$\text{GScore} = 0.05 * \text{vdW} + 0.15 * \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{Hbond} + \text{Metal} + \text{Rewards} + \text{RotB} + \text{Site}$$

Όπου:

**vdW:** Ενέργεια van der Waals

**Coul:** Ενέργεια Coulomb

**Lipo:** Λιποφιλικός όρος. Ανταμείβει τις πιο ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις.

**Hbond:** Όρος που αφορά στη συνεισφορά των δεσμών υδρογόνου. Ο όρος αυτός χωρίζεται σε τρεις διαφορετικά συστατικά καθένα τα οποία συμμετέχει με διαφορετική βαρύτητα ανάλογα με το αν οι δότες ή οι δέκτες είναι και οι δύο ουδέτερα άτομα, το ένα άτομο είναι ουδέτερο και το άλλο φορτισμένο ή είναι και τα δύο φορτισμένα άτομα.

**Metal:** Ο όρος αυτός αφορά υπολογίζει τις αλληλεπιδράσεις μόνο με ανιονικά άτομα.

**Rewards:** αφορά ανταμοιβές και ποινές για διάφορα χαρακτηριστικά όπως για εγκλωβισμένα στο εσωτερικό της πρωτεΐνης πολικά αμινοξέα

**RotB:** Ποινές για τον περιορισμό της κίνησης των ελεύθερα περιστρεφόμενων δεσμών.

**Site:** Όρος που περιλαμβάνει τις πολικές αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο.

Στα πειράματα μοριακής πρόσδεσης η πρωτεΐνη στόχος μπορεί να θεωρείται άκαμπτος, κάτι που όμως είναι αναληθές δεδομένου ότι η σύνδεση των προσδεμάτων προκαλεί μικρές μετατοπίσεις των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων του ενεργού κέντρου. Υπάρχουν ωστόσο πρωτόκολλα «Induced Fit» που εισάγουν ένα βαθμό ευελιξίας, επιτρέποντας κάποιες κινήσεις των πλευρικών αλυσίδων, αυξάνοντας όμως τον υπολογιστικό χρόνο.

## Σκοπός

Στα πλαίσια προηγούμενων μελετών της Ομάδας Μοριακής Ανάλυσης του IXB-EIE και με εφαρμογή εικονικής σάρωσης της βιβλιοθήκη Mcule με χρήση φαρμακοφόρου μοντέλου που δημιουργήθηκε από το κρυσταλλικό σύμπλεγμα BRAFV600E: Vemurafenib εντοπίστηκαν 2 hits με ικανότητα αναστολής ~20 μM (ενζυμική δοκιμή) και ικανότητα καταστολής του επιπέδου φωσφορυλίωσης του ERK (κυτταρική δοκιμή). Στα πλαίσια των προσπαθειών βελτιστοποίησης, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Οργανικής & Οργανομεταλλικής Χημείας (ΕΥ Δρ Ι. Κώστας) του IXB/EIE και στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής που βρίσκεται σε εξέλιξη σχεδιάζονται ορθολογικά και συντίθενται νέες ενώσεις ανάλογες του hit713.

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν οι εξής:

A) Ενδελεχής διερεύνηση της βάσης Mcule με εφαρμογή Μοριακής Ομοιότητας και *in silico* πρόσδεσης στο κρυσταλλικό σύμπλοκο του Paradox Breaker (PDB: 4XV1) προκειμένου να εντοπιστούν νέες ενώσεις που φέρουν το αναγνωρισμένο βιολογικά δραστικό scaffold του βενζοθειαζολίου (hit713) και να καθοδηγήσουν περαιτέρω τις προσπάθειες βελτιστοποίησης.

B) *in vitro* αξιολόγηση του hit713 και των πλέον δραστικών νέων συντεθειμένων αναλόγων σε κυτταρικές σειρές μελανώματος ομόζυγες ή ετερόζυγες ως προς την BRAFV600E μετάλλαξη αλλά και σε WTBRFV600E σειρές με μετάλλαξη στο RAS με εφαρμογή της XTT Δοκιμασίας Βιωσιμότητας κυττάρων. Τα *in vitro* πειράματα υλοποιήθηκαν υπό την επίβλεψη του Δρ. Π. Γεωργιάδη, Ερευνητική Ομάδα «Περιβάλλον και Υγεία», IXB/EIE.

## Μέρος Γ

### Γ.1. Βάσεις και Υπολογιστικά εργαλεία για την εφαρμογή Μοριακής Ομοιότητας

#### Γ.1.1 Βάση αναζήτησης όμοιων ενώσεων MCULE

Η βάση MCULE<sup>51</sup> αποτελεί μία ελεύθερα προσβάσιμη online πλατφόρμα που χρησιμοποιείται ευρέως στο σχεδιασμό φαρμάκων (Εικόνα 24). Περιλαμβάνει μία μεγάλη βιβλιοθήκη (> 35 M) με διαθέσιμες χημικές ενώσεις υψηλής ποιότητας για αγορά αλλά και χρήσιμα online εργαλεία με εφαρμογή στην αναγνώριση βιοδραστικών ενώσεων και βελτιστοποίηση ενώσεων οδηγών, όπως εικονική σάρωση με βάση τη δομή του πρωτεϊνικού στόχου ή με βάση τη δομή γνωστών προσδετών, κατάταξη ενώσεων με βάση τα σκορ πρόσδεσης στο βιολογικό στόχο ενδιαφέροντος και τις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις, υπολογισμό φυσικοχημικών παραμέτρων, αναζήτηση νέων scaffolds. Η συγκεκριμένη πλατφόρμα χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση νέων πιθανά βιοδραστικών ενώσεων έπειτα από εφαρμογή φίλτρου ομοιότητας με την πρόδρομη ένωση MCULE-713.



Mcule integrates the purchasable chemical space with molecular modeling tools. Find the best drug candidates for your project with just a few clicks.

Create your account in just 60 seconds.

**SIGN UP FOR FREE**

Let me show you how it works »



**Hit Identification**  
Build structure- and ligand-based virtual screening workflows and design screening libraries by putting together molecular modeling tools like LEGO bricks.  
**Learn more »**



**Mcule Compound Sourcing**  
High quality compounds database, advanced compound selection, automated price optimization and professional delivery.  
**Learn more »**  
**DOWNLOAD DATABASE**



**Lead Optimization**  
Molecular docking, scaffold hopping, toxicity checker, property profiling and more!  
Ready-to-use modeling applications to test your ideas.  
**Learn more »**

Comprehensive set of drug discovery tools that can be used as LEGO bricks to build up complex workflows

**Modeling tools**

- Structure-based virtual screening (Docking (Vina))
- Ligand-based virtual screening (FTrees Visual Similarities)
- Physicochemical property filter with high quality descriptors (ChemAxon)
- Pioneer technologies in web based molecule visualization
- Large-scale molecular diversity selection
- Continuously growing modeling toolkit
- Integrated with 35M+ purchasable screening compound database

[Learn more »](#)

**Molecule collection management**

- Store, modify, delete, merge, import, export and share molecule databases and libraries
- Permanent and automated storage of search / screening results
- Intuitive collection and result visualization with multiple views
- Display / undisplay properties and search results, fast sorting capabilities

[Learn more »](#)

Continuously growing set of simple modeling applications to get immediate feedback on your ideas

**1-Click Docking**

- Single ligand docking into a single target
- Visualize or download the best binding poses
- Rank your ideas based on docking scores and the formation of critical interactions

**1-Click Scaffold Hop**

- Draw a reference structure and discover new scaffolds in just a few seconds
- Generate new ideas to replace toxic, IP protected and other problematic substructures
- Intuitive visualization helps to understand the similarity between the query and the identified scaffold

**Property calculator**

- Create a physicochemical property profile for your compound in seconds
- Reject compounds with unsuitable logP, insufficient number of H-bond acceptors/donors, too many rotatable bonds, etc.
- Prioritize compounds with highest ligand efficiency (low number of heavy atoms and logP)

**Toxicity checker**

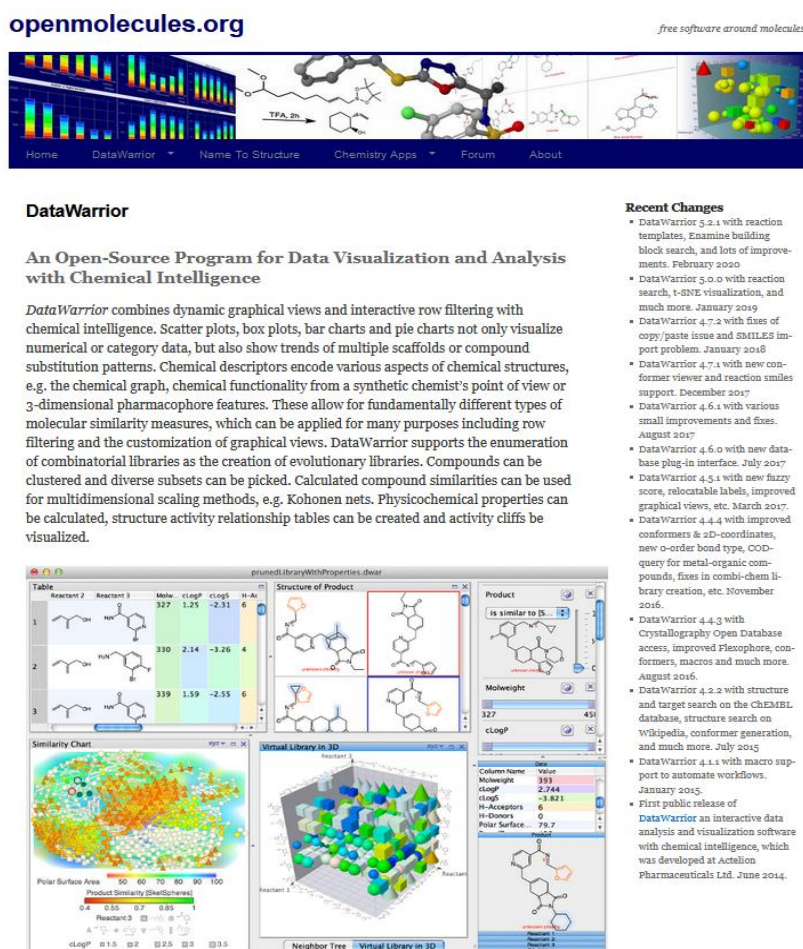
- Searching for substructures commonly found in toxic and promiscuous ligands
- Based on more than 100 SMARTS toxic matching rules
- Reject problematic compounds to avoid toxicity, selectivity and pharmacokinetic issues in further development

Εικόνα 24: Περιβάλλον online πλατφόρμας MCULE (<https://mcule.com/>)

### Γ.1.2 Clustering ανακτηθέντων ενώσεων με βάση τα μοριακά αποτυπώματα (molecular descriptors)

Η πλατφόρμα DataWarrior<sup>52</sup> είναι ένα πρόγραμμα ανοιχτού κώδικα το οποίο χρησιμοποιείται για την απεικόνιση και την ανάλυση χημικών δομών καθώς και τη συσχέτιση δομικών μοτίβων με τη δραστηριότητα. Παρέχει τη δυνατότητα υπολογισμού μεγάλου εύρους descriptors και διαφορετικών μέτρων ομοιότητας προσφέροντας τη δυνατότητα ομαδοποίησης (clustering) μεγάλων βάσεων ενώσεων και επιλογής των πιο αντιπροσωπευτικών μελών συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία υψηλής ποιότητας βιβλιοθηκών. Το παρόν πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των μοριακών αποτυπωμάτων (descriptors) της βιβλιοθήκης των «όμοιων» προς το Hit713 ενώσεων που προέκυψαν από τη σάρωση της MCULE, την ομαδοποίηση αυτών

(clustering) και την επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών ενώσεων για την εφαρμογή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης (Εικόνα 25).



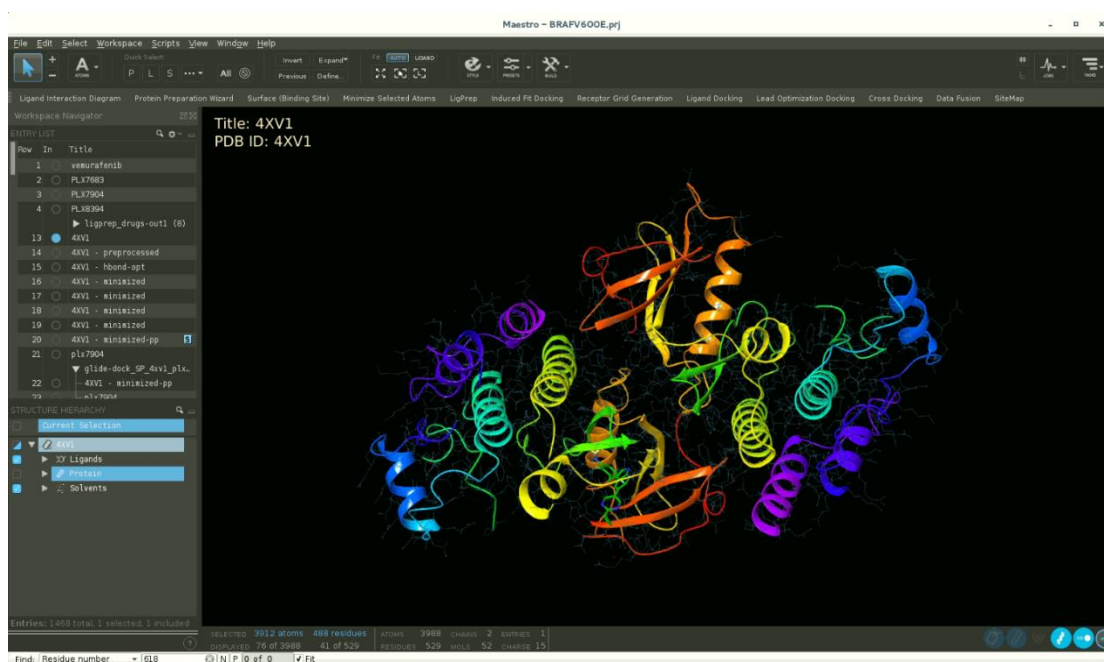
Εικόνα 25: Περιβάλλον online πλατφόρμας DataWarrior (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>)

Γ.1.3 Μελέτες Μοριακής πρόσδεσης και φυσικοχημικού προφίλ ενώσεων  
Το MAESTRO<sup>53</sup> αποτελεί μέρος της πλατφόρμας Schrodinger Suite και περιέχει χρήσιμα εργαλεία που χρησιμοποιούνται κατά το σχεδιασμό φαρμάκων. (Εικόνα 26)

Εργαλεία του MAESTRO που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

- Το 2D sketcher για το σχεδιασμό και την εισαγωγή νέων δομών.
- Το protein preparation wizard που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή της δομής της πρωτεΐνης, την προετοιμασία της, τη βελτιστοποίηση των δεσμών υδρογόνου και την ελαχιστοποίηση της ενέργειας της.

- Το minimization mode του MacroModel<sup>54</sup> χρησιμοποιήθηκε για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας των εξεταζόμενων ενώσεων.
- Το LigPrep<sup>55</sup> χρησιμοποιείται για την προετοιμασία των εξεταζόμενων ενώσεων και πιο συγκεκριμένα για τη δημιουργία τρισδιάστατων δομών με ελαχιστοποίηση ενέργειας, δίνοντας τη δυνατότητα υπολογισμού όλων των δυνατών καταστάσεων πρωτονίωσης με βάση το βέλτιστο για την πρωτεΐνη pH καθώς και οι ταυτομερείς και στερεοϊσομερείς δομές.
- Το Πρόγραμμα Glide<sup>56</sup> χρησιμοποιήθηκε τόσο για τη δημιουργία του πλέγματος (grid generation) το οποίο είναι απαραίτητο για τη διεξαγωγή των μελετών μοριακής πρόσδεσης αλλά και για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης.
- Το πρόγραμμα QikProp<sup>57</sup> το οποίο προσδιορίζοντας διάφορους descriptors εκτιμά τις φυσικοχημικές/ADMET ιδιότητες των μορίων.



Εικόνα 26: Υπολογιστικό περιβάλλον MAESTRO της πλατφόρμας Schrodinger Suite.

## Γ.2 Αρχεία ενώσεων

### Γ.2.1 Αρχεία smiles

SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System): είναι μία μορφή γραμμικής περιγραφής των χημικών δομών. Αναπτύχθηκαν το 1980 από την Daylight Chemical

Information Systems και χρησιμοποιούνται ευρέως. Στα αρχεία smiles η ένωση περιγράφεται με μία συμβολοσειρά ASCII στην οποία περιλαμβάνονται τα άτομα και το είδος των δεσμών. Δεν δίνεται η πληροφορία για τη θέση των ατόμων στο χώρο.

### Γ.2.2 Αρχεία SDF

SDF (Structure Data File): είναι μία μορφή περιγραφής χημικών δομών που βασίζεται στα Mol-files παρέχοντας πληροφορίες τόσο για τα άτομα και τους δεσμούς αλλά και τις συντεταγμένες των ατόμων, όπως και πληροφορίες για τις ιδιότητες των μορίων (π.χ. φορτίο). Υποστηρίζει τη δυνατότητα περιγραφής πολλών ενώσεων σε ένα αρχείο.

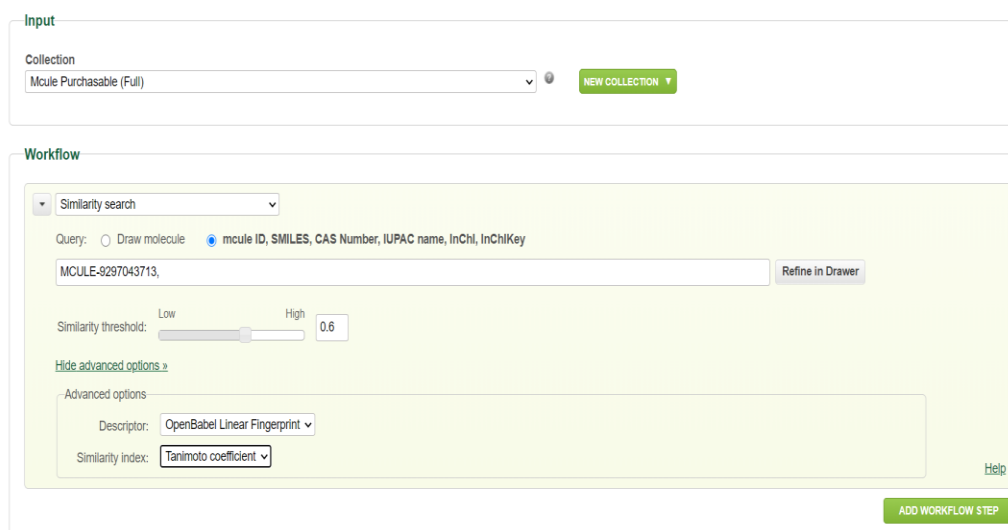
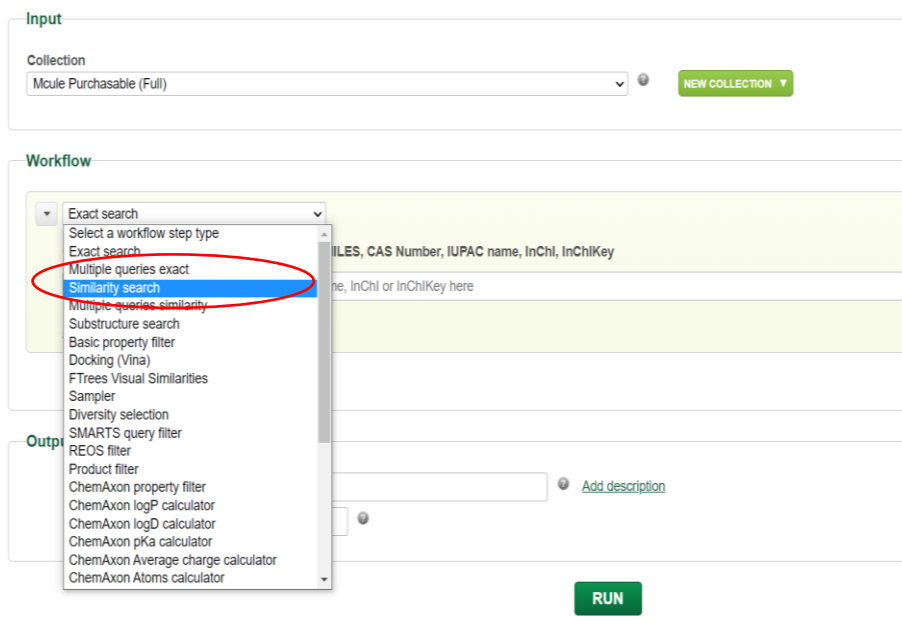
### Γ.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

#### Γ.3.1. Εφαρμογή Μοριακής Ομοιότητας

Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε περιγράφεται στα ακόλουθα βήματα:

1. Ανάκτηση από τη βάση MCULE των ενώσεων που παρουσιάζουν ομοιότητα με την πρόδρομη ένωση MCULE-713. Η εν λόγω βάση επιλέχθηκε δεδομένου ότι περιέχει πλήθος βενζοθειαζολικών παραγώγων. Η μοριακή ομοιότητα ελέγχθηκε με σύγκριση των μοριακών αποτυπωμάτων (molecular fingerprints) και εφαρμογή του αλγορίθμου OpenBabel Linear Fingerprint ([FP2](#)). Ο αλγόριθμος αναλύει την ένωση σε θραύσματα και αντιστοιχεί ακολουθιακά γραμμικά μοτίβα (patterns) μήκους 1-7 ατόμων<sup>58</sup>. Ο βαθμός ομοιότητας προσδιορίστηκε βάση του συντελεστή ομοιότητας Tanimoto<sup>58</sup>. Χρησιμοποιήθηκε η default επιλογή ως κατώφλι (cut off) για το συντελεστή ομοιότητας και ορίστηκε ίση με 0.6. (Εικόνα 27)

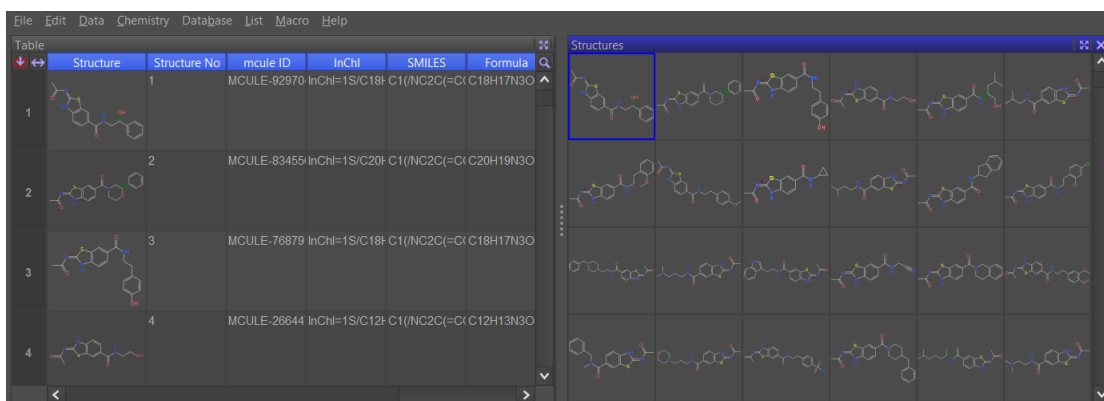
**Από την αναζήτηση προέκυψαν 1.000 ενώσεις, που ανακτήθηκαν από τη βάση ως SDF αρχείο.**



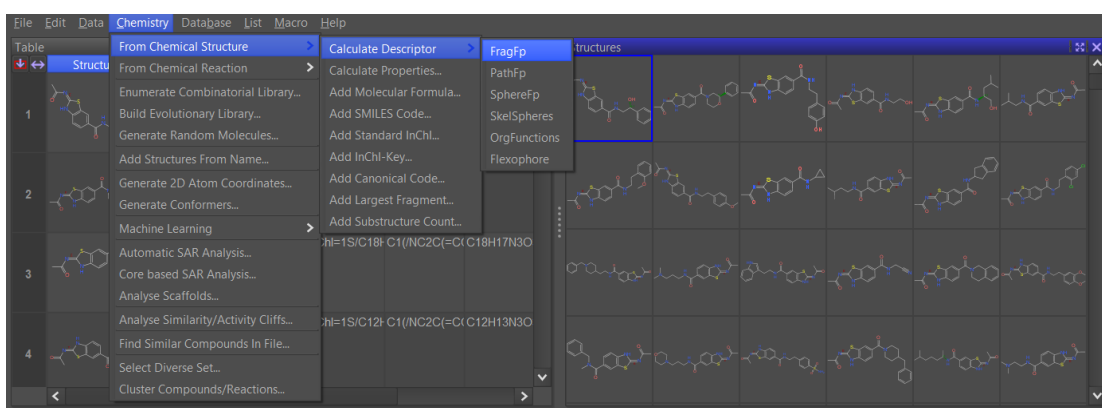
Εικόνα 27: Αναζήτηση στη βάση MCULE των ενώσεων που παρουσιάζουν ομοιότητα με την ένωση MCULE-713 με συντελεστή ομοιότητας Tanimoto > 0.6 .

- Εισαγωγή (upload) του SDF αρχείου των 1.000 ενώσεων στο πρόγραμμα DataWarrior και υπολογισμός των FragFp descriptors βάσει των οποίων επιχειρήθηκε η ομαδοποίηση των ενώσεων. Η περιγραφή μιας ένωσης με τους FragFp descriptors βασίζεται σε ένα λεξικό 512 προκαθορισμένων θραυσμάτων κατ' αναλογία με την αναπαράσταση μέσω MDL mol keys που χρησιμοποιούνται στο σχεδιασμό φαρμάκων<sup>59</sup>. Ο FragFp descriptor είναι μια δυαδική συμβολοσειρά που αντιστοιχεί σε κάθε bit 1 ή 0 ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία συγκεκριμένου θραύσματος<sup>60</sup>. (Εικόνες 28 & 29)



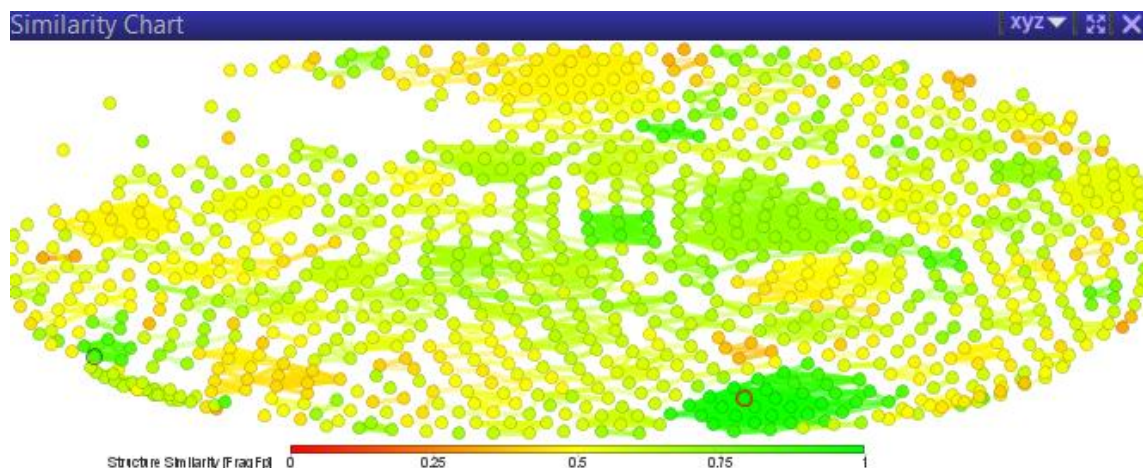


Εικόνα 28: Εισαγωγή των SDF αρχείων στο DataWarrior



Εικόνα 29: Επιλογή δημιουργίας των αντίστοιχων Fingerprints

Στην εικόνα 30 παρουσιάζεται ενδεικτικά η κατανομή των μορίων στο διδιάστατο χώρο με βάση την ομοιότητα τους ως προς τους FragFp descriptors. Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της επιλογής analyze similarity. Παρόμοιοι γείτονες συνδέονται με μια γραμμή σύνδεσης ενώ ο βαθμός ομοιότητας σε σχέση με το μόριο που επιλέγεται (μόριο αναφοράς) ακολουθεί χρωματικό κώδικα.

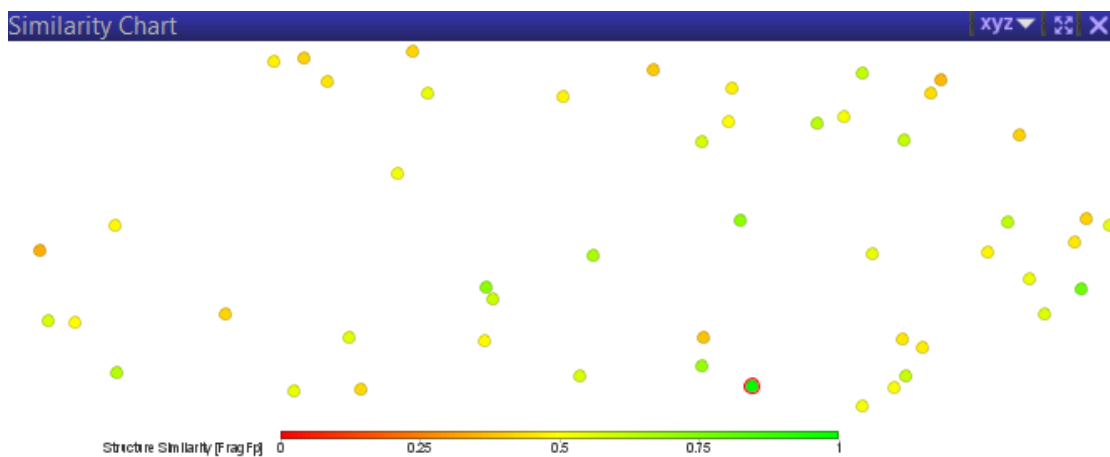


Εικόνα 30: Χάρτης ομοιότητας των ενώσεων σε σχέση με την ένωση αναφοράς (σημειωμένη επί του χάρτη με κόκκινο περίγραμμα) με βάση τα FragFp fingerprints.

3. Ομαδοποίηση (clustering) των 1.000 ενώσεων προκειμένου να ληφθούν τα αντιπροσωπευτικότερα μέλη ενώ επιλέχθηκε η δημιουργία 50 clusters. Ο αλγόριθμος clustering που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί εσωτερικό αλγόριθμο του προγράμματος, ο οποίος ακολουθεί την εξής διαδικασία: Αρχικά πραγματοποιείται υπολογισμός του πίνακα ομοιότητας όλων των ενώσεων. Ο υπολογισμός μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας οποιονδήποτε descriptor (στην εν λόγω υλοποίηση χρησιμοποιήθηκε ο FragFp descriptor). Στη συνέχεια, μέσω μίας προοδευτικής διαδικασίας συγχωνεύονται οι πλέον όμοιες ενώσεις ή τα πλέον όμοια clusters, ώστε να δημιουργηθεί ένα νέο cluster. Η διαδικασία συγχώνευσης ολοκληρώνεται έως ότου ικανοποιηθεί ένα προκαθορισμένο κριτήριο τερματισμού, που στην εν λόγω περίπτωση ήταν ο αριθμός των clusters<sup>61</sup>.

Στην Εικόνα 31 παρατίθεται ο χημικός χώρος που καταλαμβάνουν τα αντιπροσωπευτικά μέλη των 50 ομάδων (clusters) και στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος Α παρατίθενται οι χημικές δομές των ενώσεων.



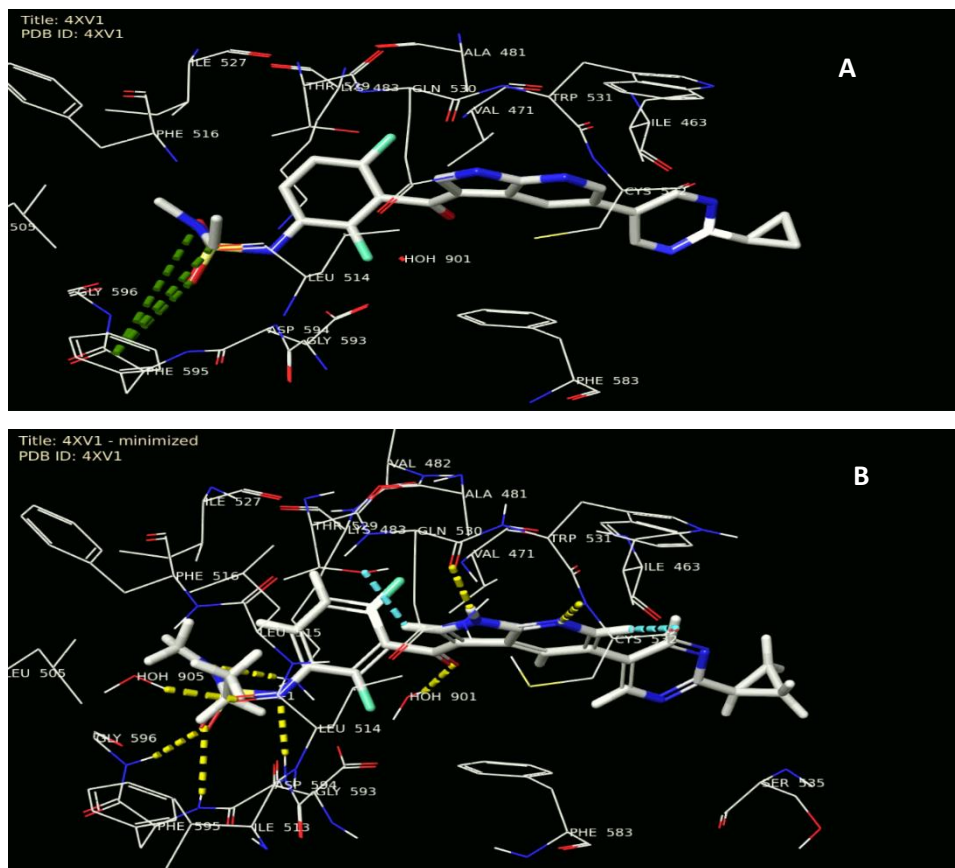


Εικόνα 31: Η όψη του χάρτη ομοιότητας μετά την επιλογή της απεικόνισης μόνο των αντιπροσωπευτικών ενώσεων του κάθε cluster.

### Γ.3.2. Εφαρμογή *in silico* Μοριακής Πρόσδεσης

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε περιγράφεται στα ακόλουθα βήματα:

1. Εισαγωγή της PDB δομής με κωδικό 4XV1, η οποία περιλαμβάνει το κρυσταλλικό σύμπλοκο της της BRAFV600E με τον αναστολέα PLX7904, στο πρόγραμμα MAESTRO<sup>53</sup>.
2. Προετοιμασία της πρωτεΐνης με τη βοήθεια του προγράμματος Protein preparation wizard<sup>62</sup> σε pH=7+/-0.5. (Εικόνα 32)
3. Εισαγωγή των ενώσεων που δοκιμάστηκαν ως προς την πρόσδεσή τους ως αρχεία smiles.



Εικόνα 32: Το PLX7904 στο καταλυτικό κέντρο της BRAFV600E πριν (A) και μετά (B) την προετοιμασία της πρωτεΐνης.

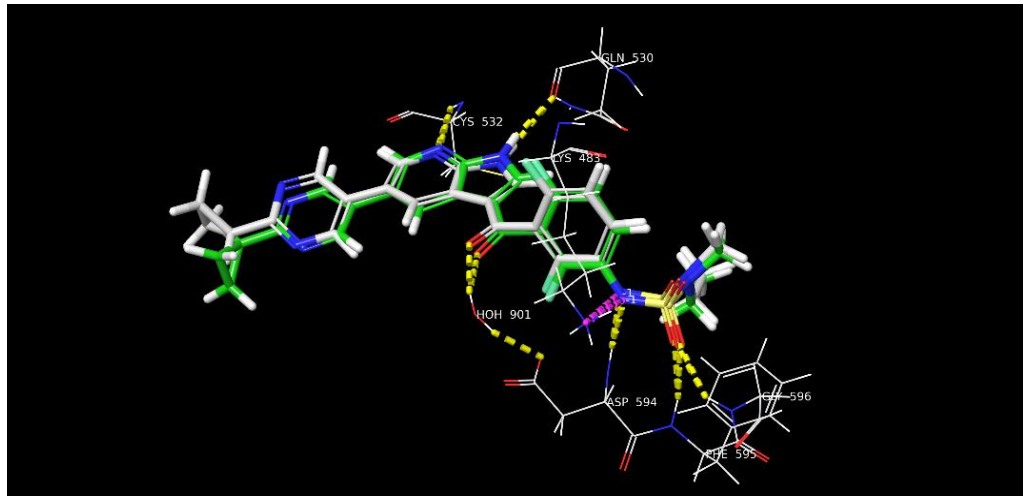
4. Προετοιμασία των ενώσεων με τη βοήθεια του LigPrep<sup>63</sup> στο βέλτιστο pH της πρωτεΐνης που είναι 7.0+/-0.5.
5. Δημιουργία του πλέγματος (grid) που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης, με τη χρήση του προγράμματος GLIDE<sup>56</sup>.
6. Επικύρωση μεθόδου Μοριακής Πρόσδεσης

Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε μέσω εφαρμογής πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στον αναστολέα PLX7904 με χρήση των αλγορίθμων πρόσδεσης SP (Standard Precision), XP (Extra Precision) και IFD (Induced Fit Protocol) (Schrödinger Release 2020-3: Induced Fit Docking protocol; Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) του προγράμματος GLIDE<sup>56</sup> (Εικόνες 33-35).

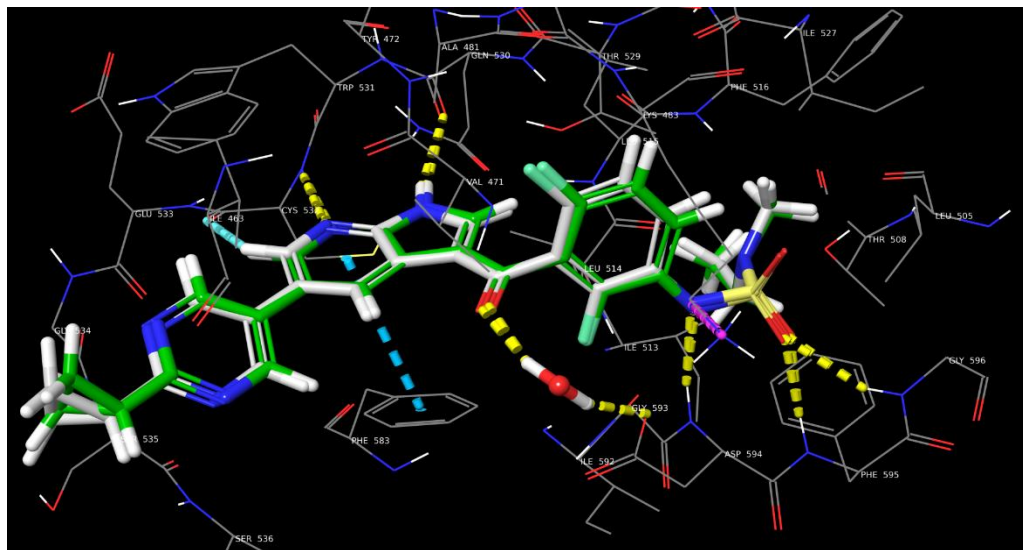
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ακολούθησε υπέρθεση του θεωρητικού τρόπου πρόσδεσης και της κρυσταλλικής διαμόρφωσης.

Οι αλγόριθμοι SP και XP εφαρμόζονται σε πειράματα πρόσδεσης με άκαμπτο πρωτεϊνικό στόχο, ενώ στο IFD protocol δίνεται η δυνατότητα εισαγωγής

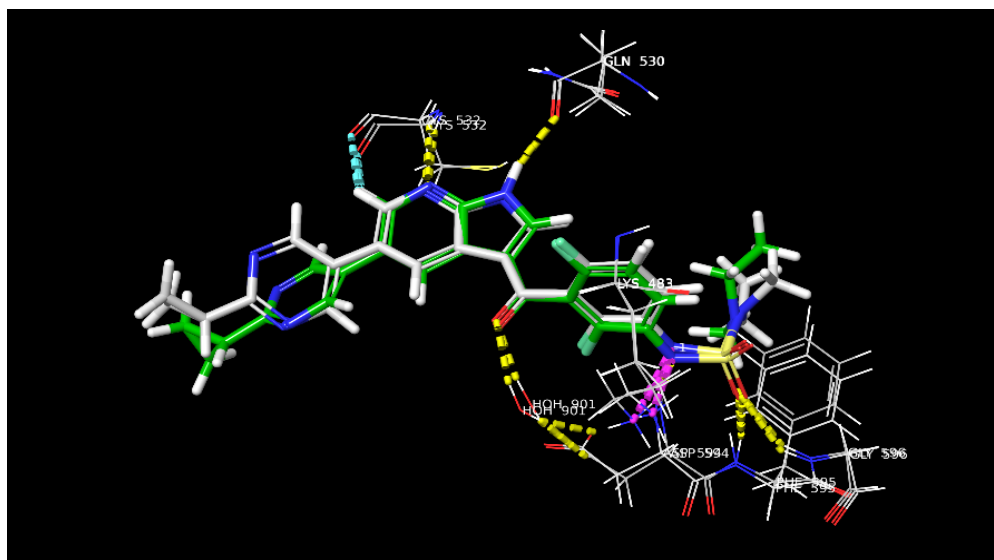
διαμορφωτικής ευελιξίας στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων στην περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη.



Εικόνα 33: Υπέρθηση της κρυσταλλικής πόζας του PLX7904 (λευκό χρώμα) και της ληφθείσας από μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγορίθμου SP (πράσινο χρώμα) (PDB: 4XV1).



Εικόνα 34: Υπέρθηση της κρυσταλλικής πόζας του PLX7904 (λευκό χρώμα) και της ληφθείσας από μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγορίθμου XP (πράσινο χρώμα) (PDB: 4XV1).



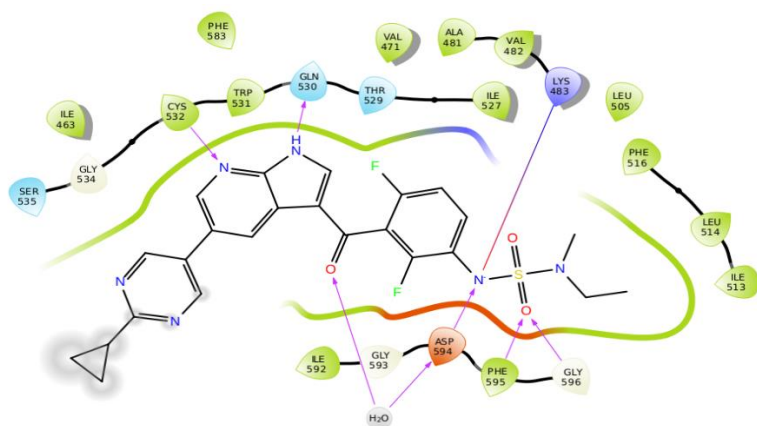
Εικόνα 35: Υπέρθυση της κρυσταλλικής πόζας του PLX7904 (λευκό χρώμα) και της ληφθείσας από μοριακή πρόσδεση με χρήση του IFD πρωτόκολλου (πράσινο χρώμα) (PDB: 4XV1).

Όπως είναι φανερό από τις Εικόνες (33-35), τα καλύτερα αποτελέσματα κατά την υπέρθεση της κρυσταλλικής διαμόρφωσης της ένωσης PLX7904 με τη διαμόρφωση που προέκυψε από τη Μοριακή Πρόσδεση, ελήφθησαν με τον αλγόριθμο Extra Precision (XP), ο οποίος επικυρώθηκε και χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τις *in silico* μελέτες πρόσδεσης.

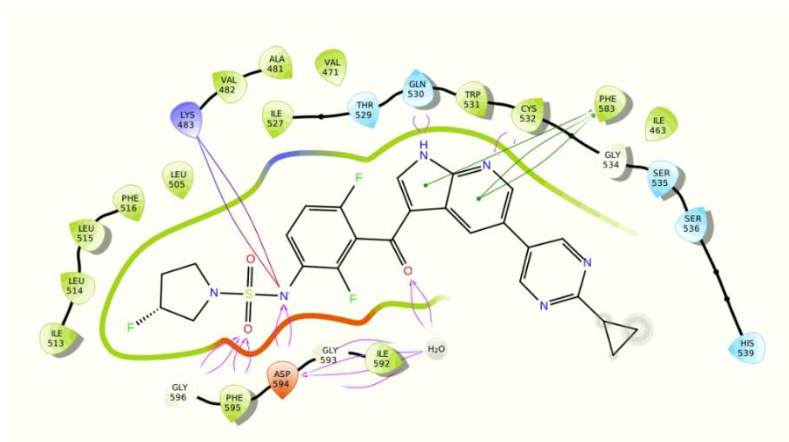
7. Ακολούθησαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης, τα οποία πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος GLIDE<sup>56</sup> και χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο XP. Για κάθε προσδέτη ορίστηκαν δέκα διαφορετικές πόζες. Κατά τη διενέργεια των πειραμάτων βαθμονομήθηκαν διαφορετικές διαμορφώσεις και προσανατολισμοί των εξεταζόμενων μορίων στη θήκη πρόσδεσης.

### Γ.3.3. Αποτελέσματα Μοριακής Πρόσδεσης

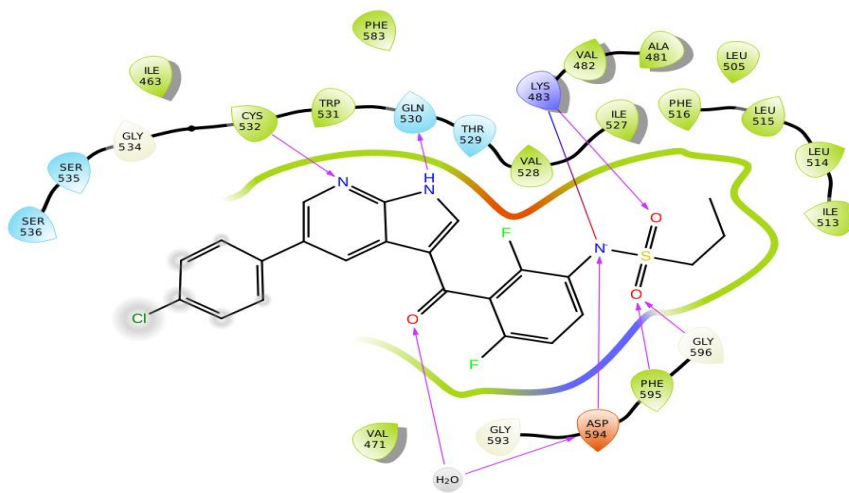
Οι κρίσιμες αλληλεπιδράσεις της BRAFV600E με τους γνωστούς αναστολείς της: PLX 7904, Vemurafenib και PLX8394, είναι οι αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μέσω σχηματισμού δεσμών Η του αζα-ινδολίου με τα αμινοξικά κατάλοιπα Cys532 και Gln530 του hinge region καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών Η του σουλφονάμιδο τμήματος με τα αμινοξικά κατάλοιπα του DFG μοτίβου (Asp594, Phe595 και Gly596), όπως και η γέφυρα άλατος του φορτισμένου αζώτου με την Lys483. Σημειώνεται επίσης, η αλληλεπίδραση της καρβονυλομάδας με το Asp594 του DFG μέσω γέφυρας ύδατος και η πi-πi αλληλεπίδραση του αζα-ινδολίου με τη Phe583 (η τελευταία μόνο στο PLX8394) (Εικόνες 36,37,38). Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις αποτελούν κρίσιμο κριτήριο κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων που προέκυψαν από την εφαρμογή Μοριακής Ομοιότητας



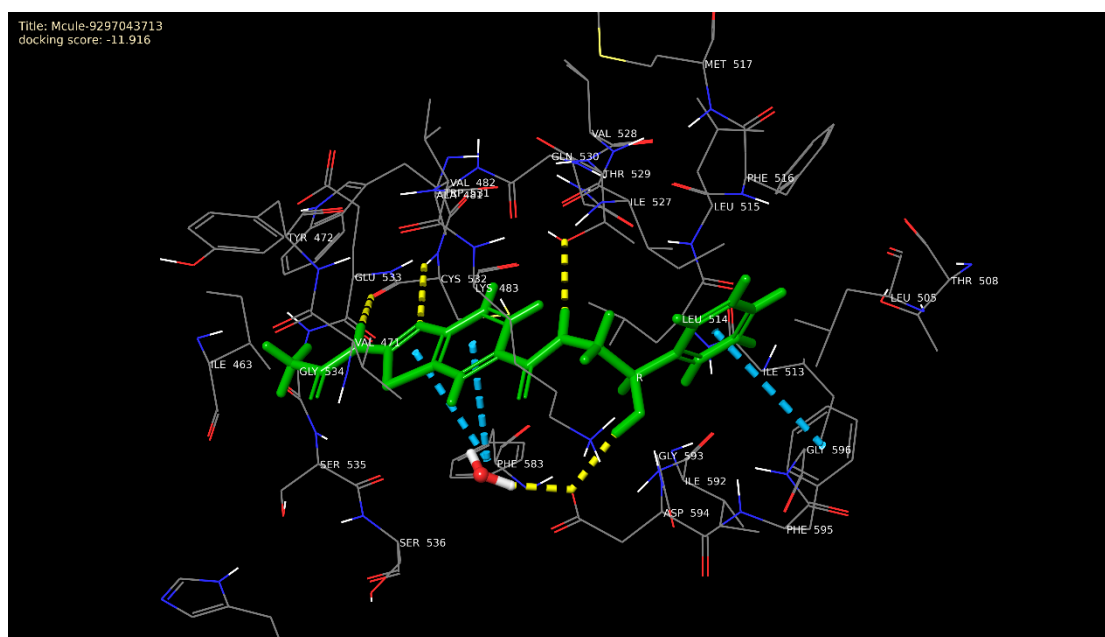
Εικόνα 36: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του paradox breaker PLX 7904 με την BRAFV600E (docking score: -12.3).



Εικόνα 37: 2D διαγράμματα αλληλεπιδράσεων του paradox breaker PLX 8394 (σε κλινικές δοκιμές) με την BRAFV600E (docking score: -14.0).



Εικόνα 38: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του vemurafenib με την BRAFV600E (docking score: -14.9).



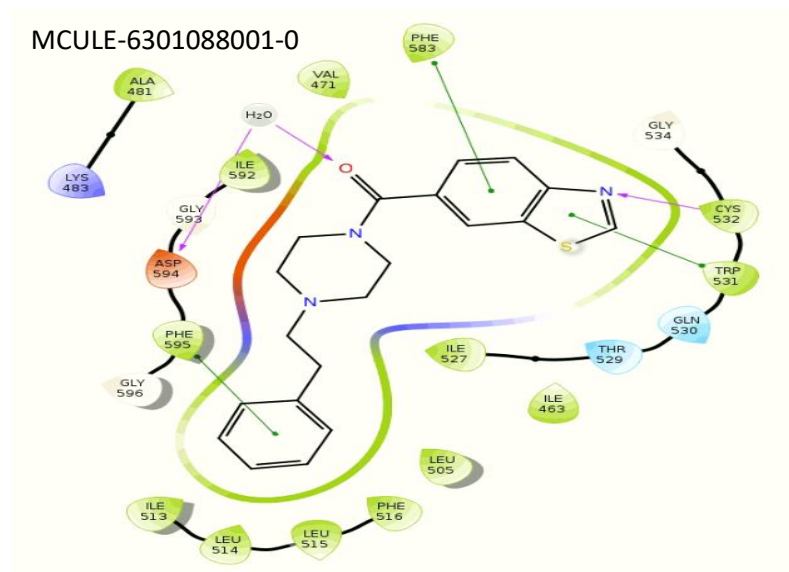
Εικόνα 39: Αλληλεπιδράσεις της MCULE-713 στο καταλυτικό κέντρο της BRAFV600E. Αναπτύσσονται 2 δεσμοί H με την Cys532, πi-πi αλληλεπίδραση του βενζοθειαζολίου με την Phe583 ενώ το πίσω τμήμα του μορίου αλληλεπιδρά με 2 από τα 3 αμινοξέα του DFG (πi-πi αλληλεπίδραση με την Phe595 και σχηματίζει δεσμό H με το Asp594 (docking score: -11.9).



In silico πρόσδεση νέων ενώσεων που προέκυψαν από την εφαρμογή Μοριακής Ομοιότητας με βάση την ένωση MCULE713

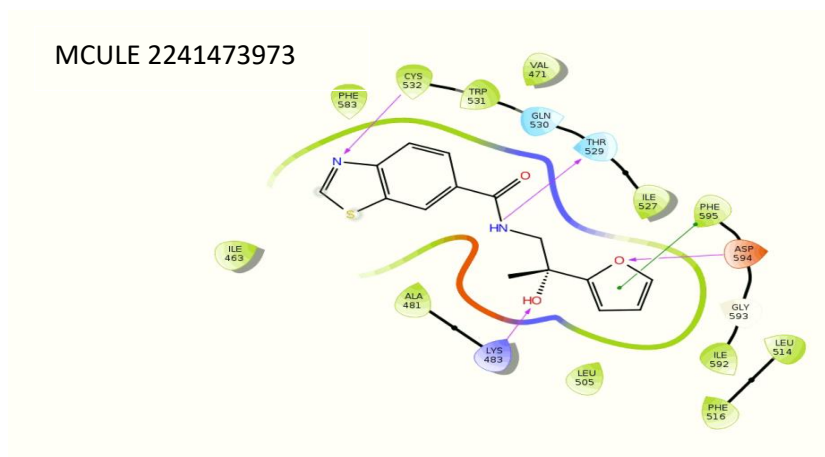
Παρατίθενται τα 2D διαγράμματα πρόσδεσης των ενώσεων που παρουσίασαν τις βέλτιστες αλληλεπιδράσεις με τα κρίσιμα αμινοξέα και το καλύτερο score πρόσδεσης στα πειράματα μοριακής πρόσδεσης. Γενικά, τα ληφθέντα αποτελέσματα δεν ανέδειξαν κάποια ένωση με καλύτερο score συγκριτικά με την πρόδρομη ένωση Hit713, όμως παρείχαν χρήσιμα στοιχεία για τις μελέτες βελτιστοποίησης τα οποία παρατίθενται στα ακόλουθα σημεία.

- 1) Η αντικατάσταση της αμινομάδας από το δακτύλιο της πιπεραζίνης είναι ανεκτή σε ότι αφορά τη σωστή διεύθυνση του προσδέτη μέσα στην κοιλότητα πρόσδεσης, απαιτείται όμως περαιτέρω παραγοντοποίηση με υποκατάστατες ικανούς να σχηματίζουν δεσμό H με τα υπόλοιπα αμινοξέα του DFG. (Εικόνα 40)



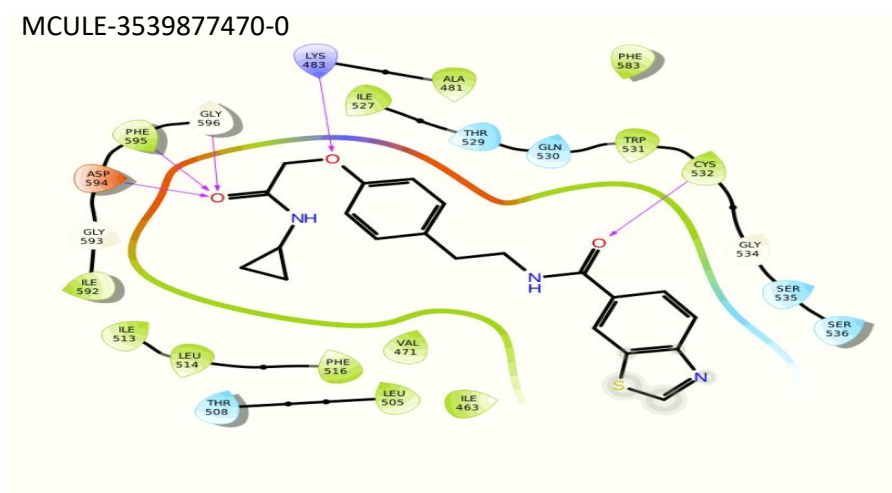
Εικόνα 40: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAF V600E και της MCULE-6301088001-0. Το βενζοθειαζόλιο αλληλεπιδρά μέσω δεσμού H με την Cys532 και μέσω *pi-pi* με την Phe583. Το καρβονύλιο αλληλεπιδρά με δεσμό H μέσω γέφυρας ύδατος με το Asp594 και το τελικό φαινύλιο αλληλεπιδρά με *pi-pi* με τη Phe595 (DFG) (docking score: -10.5).

- 2) Η αντικατάσταση του τελικού φαινυλίου με φουρανικό δακτύλιο μπορεί να λειτουργήσει ευεργετικά για την σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων με το DFG.



Εικόνα 41: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-2241473973. Αναπτύσσονται δεσμός H του βενζοθειαζολίου με την Cys532, της OH-ομάδας με τη Lys483 ενώ ο φουρανικός δακτύλιος αλληλεπιδρά με δύο από τα τρία αμινοξικά κατάλοιπα του DFG μοτίβου, μέσω πi-πi με την Phe595 και μέσω δεσμού-H με το Asp594 (docking score: -10.2).

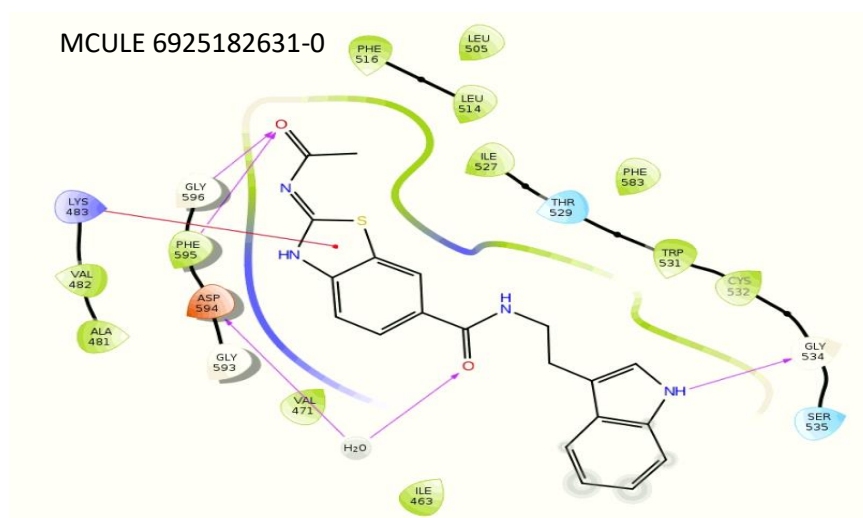
- 3) Η υποκατάσταση στο τελικό φαινύλιο της MCULE470 εξωθεί το βενζοθειαζόλιο στο διαλύτη παρόλα αυτά είναι ενδιαφέρουσες οι αλληλεπιδράσεις με όλα τα αμινοξέα του DFG καθώς και με την Lys483, αλληλεπίδραση που υπάρχει τόσο στο vemurafenib όσο και στα paradox breakers. Τροποποίηση στο μήκος της δομής θα μπορούσε να οδηγήσει σε βελτιωμένο ανάλογο.





Εικόνα 42: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-MCULE-3539877470-0. Αναπτύσσονται δεσμοί και με την Cys532 καθώς και με τα τρία κατάλοιπα του DFG μοτίβου και με τη Lys483 (docking score: -7.9).

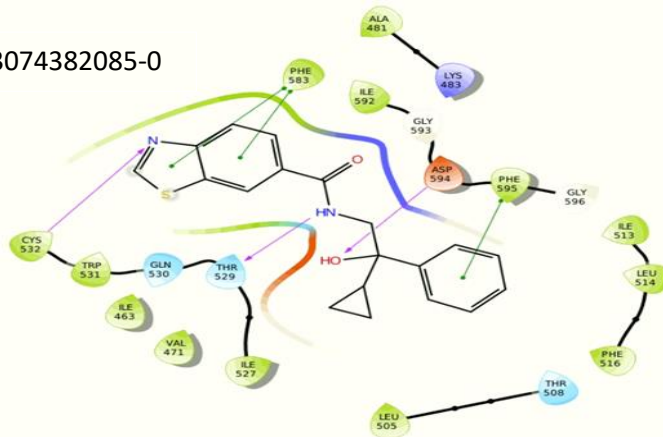
- 4) Η αντικατάσταση της τελικής φαινυλομάδας με την ογκοδέστερη ομάδα του ινδολίου δεν είναι ανεκτή για τις διαστάσεις της κοιλότητας με αποτέλεσμα να αλλάξει ο προσανατολισμός του βενζοθειαζολίου προς το εσωτερικό της κοιλότητας και το ινδόλιο να εκτίθεται στο διαλύτη. Επιπλέον, χάνονται οι αλληλεπιδράσεις με το hinge region.



Εικόνα 43: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-6925182631-0. Αναπτύσσονται δεσμοί και με τα τρία κατάλοιπα του DFG μοτίβου καθώς και δεσμός H με τη Lys483. (docking score: -8.7)

- 5) Η προσθήκη κυκλοπροπανίου στο χειρόμορφο κέντρο δεν διαταράσσει τη διευθέτηση της ένωσης στην κοιλότητα πρόσδεσης, διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις ενώ αυξάνεται η λιποφιλικότητα σε σχέση με το HIT713 στα όρια του vemurafenib και των paradox breakers. (Πίνακας 2 με ADME)

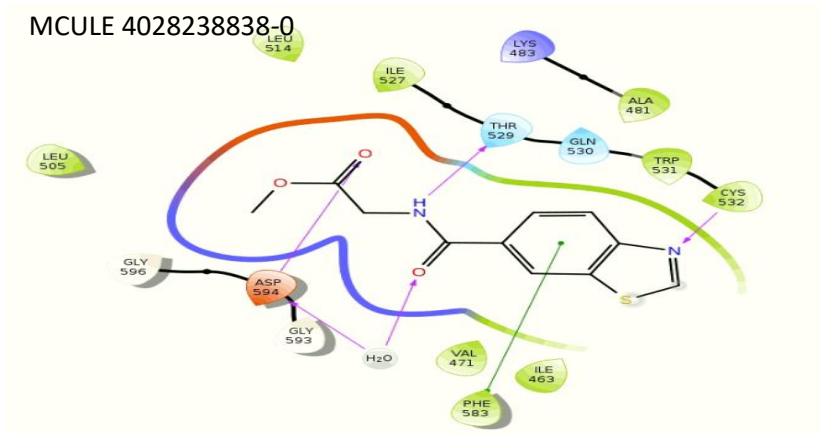
MCULE 3074382085-0



Εικόνα 44: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-3074382085. Το βενζοθειαζόλιο αλληλεπιδρά μέσω δεσμού H με την Cys532 αναπτύσσει *pi-pi* με την Phe583. Το πίσω τμήμα του μορίου αλληλεπιδρά με 2 από τα 3 αμινοξέα του DFG (*pi-pi* αλληλεπίδραση με την Phe595 και δεσμός H με το Asp594 (docking score: -9.1).

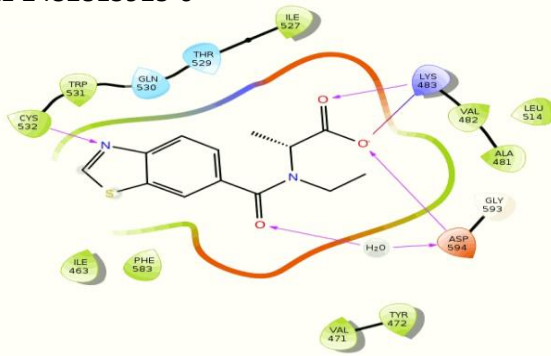
- 6) Οι επόμενες 2 ενώσεις αν και μικρότερου MB (fragment-like) εντούτοις παρέχουν πληροφορία που αφορά σε δομικές τροποποιήσεις σχετικές με το πίσω τμήμα του μορίου ικανές να σχηματίσουν ικανοποιητικές αλληλεπιδράσεις με το DFG.

MCULE 4028238838-0



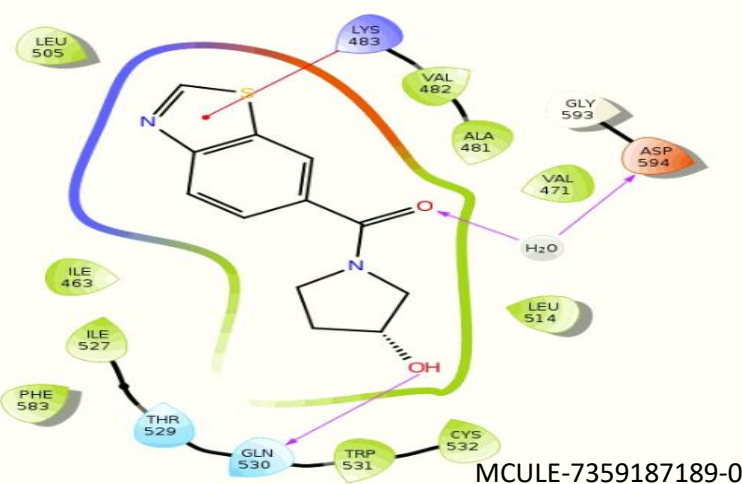
Εικόνα 45: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-4028238838-0. Το βενζοθειαζόλιο αλληλεπιδρά μέσω δεσμού H με τη Cys532 και *pi-pi* με την Phe583. Οι δύο καρβονυλικές ομάδες αλληλεπιδρούν μέσω δεσμού H απευθείας ή μέσω ύδατος με το Asp594 του DFG μοτίβου (docking score: -9.5).

MCULE 2482815925-0

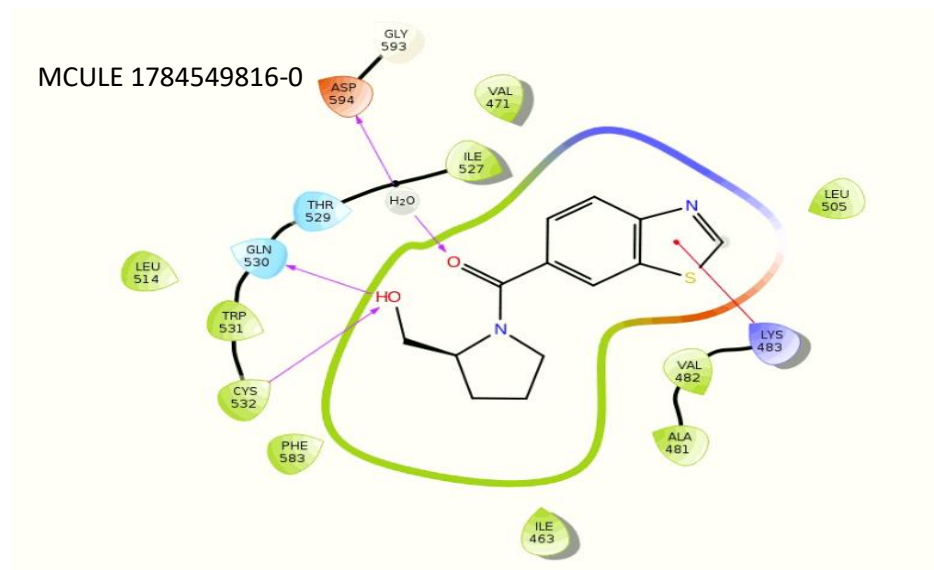


Εικόνα 46: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-2482815925-0. Το βενζοθειαζόλιο αλληλεπιδρά μέσω δεσμού H με τη Cys532, η τελική καρβοξυλομάδα μέσω δεσμού H και ιοντικής αλληλεπίδρασης με τη Lys483 καθώς και με το Asp594 του DFG μοτίβου ενώ με το Asp594 αλληλεπιδρά επίσης και η καρβονυλομάδα μέσω γέφυρας ύδατος. (docking score: -9.2)

7) Οι επόμενες 2 ενώσεις ανήκουν και πάλι στην κατηγορία fragment-like και υποδεικνύουν ότι η χρήση του υποκατεστημένου δακτυλίου της πυρρολιδόνης αντιστρέφει τον τρόπο πρόσδεσης, διευθετώντας το βενζοθειαζόλιο προς το εσωτερικό της κοιλότητας. Περαιτέρω, το νέο σύστημα προσανατολίζεται προς το hinge region αλληλεπιδρώντας με τα κρίσιμα αμινοξέα ενώ επιπλέον αλληλεπιδρά μέσω ύδατος με το Asp594 του DFG.



Εικόνα 47: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-7359187189-0. Το υποκαταστημένο OH του δακτύλιου της πυρρολιδίνης αλληλεπιδρά μέσω δεσμού H με την Gln530 και η καρβονυλομάδα μέσω γέφυρας ύδατος με το Asp594 του DFG μοτίβου. Το βενζοθειαζόλιο αναπτύσσει *pi*-cation αλληλεπίδραση με τη Lys483 (docking score: -9.2).



Εικόνα 48: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της BRAFV600E και της MCULE-1784579816-0. Η OH-ομάδα της πυρρολιδόνης αλληλεπιδρά μέσω 2 δεσμών H με το Gln530 και την Cys532 (hinge region), η καρβonyλομάδα μέσω δεσμού H διαμεσολαβούμενου από το μόριο ύδατος με το Asp594 του DFG μοτίβου και το βενζοθειαζόλιο αναπτύσσει *πi*-cation αλληλεπίδραση με τη Lys483 (docking score: -9.1).

Ακολουθεί ο πίνακας 1 που συνοψίζει τις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις και τα docking scores.

**Πίνακας 1: Docking Scores και κρίσιμες αλληλεπιδράσεις.**

	Docking Score (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Gln530	Cys532	Lys483	Asp594	Phe595	Gly596
PLX 7904	-12.3	H-bond	H-bond	Salt bridge	H-bond	H-bond	H-bond
PLX 8394	-14.0	H-bond	H-bond	Salt bridge	H-bond (backbone + via H <sub>2</sub> O)	H-bond	H-bond

Vemurafenib	-14.9	H-bond	H-bond	Salt bridge+ H-bond	H-bond (backbone + via H <sub>2</sub> O)	H-bond	H-bond
HIT 713	-11.9	-	H-bond	-	H-bond	H-bond	-
MCULE- 6301088001-0	-10.5		H-bond	-	H-bond via H <sub>2</sub> O	pi-pi	-
MCULE- 2241473973-0	-10.2	-	H-bond	H-bond	H-bond	pi-pi	-
MCULE- 3539877470-0	7.9	-	H-bond	H-bond	H-bond	H-bond	H-bond
MCULE- 6925182631-0	-8.7	-	-	pi-cation	H-bond via H <sub>2</sub> O	H-bond	H-bond
MCULE- 3074382085-0	-9.1	-	H-bond	-	H-bond	pi-pi	-
MCULE- 4028238838-0	-9.65	-	H-bond	-	H-bond via H <sub>2</sub> O	-	-
MCULE- 2482815925-0	-9.2	-	H-bond	Salt bridge+ H-bond	H-bond via H <sub>2</sub> O	H-bond	H-bond
MCULE- 7359187189-0	-9.2	H-bond	-	pi-cation	H-bond via H <sub>2</sub> O		
MCULE- 1784549816-0	-9.1	H-bond	H-bond	pi-cation	H-bond via H <sub>2</sub> O	-	-

#### Γ.3.4. Πρόβλεψη Φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εξεταζόμενων ενώσεων

Ακολούθως, υπολογίστηκαν μέσω εφαρμογής του προγράμματος QikProp<sup>57</sup> οι φυσικοχημικές ιδιότητες των παραπάνω ενώσεων και πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη του φαρμακοκινητικού τους προφίλ (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2: ADMET ιδιότητες όπως αυτές προέκυψαν από το πρόγραμμα QikProp (Οι τιμές στις παρενθέσεις παρουσιάζουν το εύρος των τιμών που αντιστοιχεί στο 95% των φαρμάκων).**

Ενώση	QP logP (-2.0-6.5)	QP logS (-6.5-0.5)	QP log Khsa (-1.5-1.5)	QP logBB (-3.0/1.2)
Vemurafenib	4.4	-6.050	0.582	-1.058
PLX 7904	3.276	-4.890	0.298	-1.571
PLX 8394	4.397	-7.763	0.666	-1.810
Mcule 713	3.057	-5.045	0.130	-1.407
MCULE- 6301088001-0	3.127	-3.197	-0.014	0.240
MCULE- 2241473973-0	2.858	-3.763	-0.50	-0.470
MCULE- 3539877470-0	3.255	-5.037	-0.013	-1.239
MCULE- 6925182631-0	3.585	-5.150	-6.102	0.523
MCULE- 3074382085-0	3.897	-4.688	-4.836	-0.381
MCULE- 4028238838-0	1.665	-2.777	-0.382	-0.719

MCULE- 2482815925-0	2.524	-3.591	-3.348	-0.295
MCULE- 7359187189-0	-0.533	-0.491	-1.327	-0.846
MCULE- 1784549816-0	1.688	-2.859	-0.385	-0.355

**Πίνακας 2 (συνέχεια): ADMET ιδιότητες όπως αυτές προέκυψαν από το πρόγραμμα QikProp (Οι τιμές στις παρενθέσεις παρουσιάζουν το εύρος των τιμών που αντιστοιχεί στο 95% των φαρμάκων).**

Ένωση	Αριθμός μεταβολιτών (1-8)	hERG K+ channels (log IC50 <-5 ανησυχητικό)	Απορρόφηση από το γαστρεντερικό <25% μικρή >80% μεγάλη	Διαπερατότητα Caco-2 κυττάρων (nm/sec) <25 χαμηλή, >500 υψηλή	Lipinski Rule Violations
Vemurafenib	1	-5.653	100%	327	0
PLX 7904	3	-4.871	70%	114	1
PIX 8394	3	-6.721	79%	149	1
Hit 713	3	-6.382	90%	318	0
MCULE- 6301088001-0	3	-6.661	95%	629	0
MCULE- 2241473973-0	3	-5.294	100%	699	0

MCULE- 3539877470-0	4	-5.478	91%	335	0
MCULE- 6925182631-0	2	-5.550	91%	249	0
MCULE- 3074382085-0	3	-5.610	100%	1900	0
MCULE- 4028238838-0	2	-4.858	86%	561	0
MCULE- 2182815925-0	2	-2.920	78%	103	0
MCULE- 7359187189-0	0	-4.334	66%	240	0
MCULE- 1784549816-0	2	-4.310	91%	1131	0

**Όπου:**

**QlogP:** Λογάριθμος του συντελεστή κατανομής Οκτανόλης/νερού. Είναι ενδεικτικός της λιποφιλικότητας του μορίου.

**QlogS:** Λογάριθμος της διαλυτότητας μίας ουσίας στο νερό.

**QlogK hsa:** Πρόβλεψη σύνδεσης με την αλβουμίνη.

**QlogBB:** Λογάριθμος του συντελεστή κατανομής εγκεφάλου/αίματος. Είναι ενδεικτικός της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

**Διαπερατότητα των Caco-2 κυττάρων:** Είναι ενδεικτική του φραγμού αίματος/γαστρεντερικού.

**hERG K+:** Η προβλεπόμενη IC50 για την αναστολή των hERG K+ καναλιών.

**Συνοψίζοντας, το προβλεπόμενο ADME προφίλ για τις ενώσεις που εξετάστηκαν είναι γενικά αποδεκτό.**



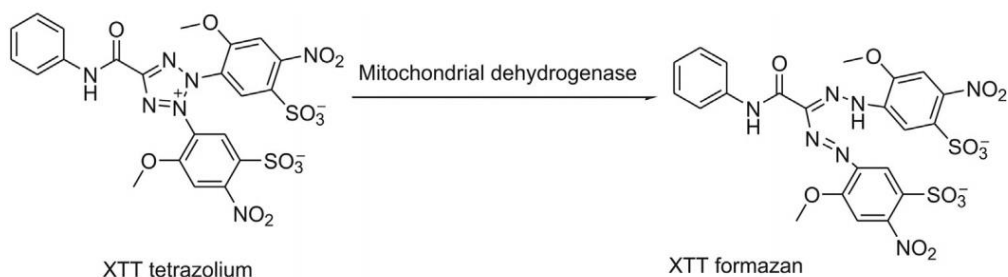
## Μέρος Δ

### Δ.1 Μέθοδοι μελέτης κυτταροτοξικότητας

Η αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας μίας χημικής ένωσης με *in vitro* μελέτες είναι ένα σημαντικό εργαλείο που χρησιμοποιείται κατά το σχεδιασμό φαρμάκων. Μία ουσία θεωρείται ότι είναι κυτταροτοξική όταν παρεμβαίνει στην κυτταρική προσκόλληση, αλλάζει τη μορφολογία του κυττάρου, μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού ή προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι οι οποίες αδρά μπορεί να χωριστούν σε μεθόδους βιωσιμότητας και σε μεθόδους κυτταροτοξικότητας κάθε μία από τις οποίες εξετάζει το φαινόμενο από τη δική της σκοπιά. Οι μέθοδοι βιωσιμότητας μετράνε εκείνα τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το μεταβολισμό των ζωντανών κυττάρων ενώ αντιθέτως οι μέθοδοι κυτταροτοξικότητας μετράνε ουσίες που εκλύονται κατά τον κυτταρικό θάνατο. Η κάθε μέθοδος έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, και το ποια θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το ποιοι είναι οι στόχοι της κάθε μελέτης, ωστόσο ο συνδυασμός των μεθόδων συμβάλλει σε μία πιο σφαιρική αποτίμηση του φαινομένου<sup>64</sup>.

Από τις πιο συχνές μεθόδους βιωσιμότητας είναι εκείνες που μετρούν τη δράση των αφυδρογονασών, μέσω αναγωγής διαφόρων ουσιών όπως είναι τα άλατα του τετραζολίου. Με την ποσοτικοποίηση της αναγωγικής αντίδρασης εκτιμάται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων<sup>64</sup>.

Το XTT είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου (sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) η αναγωγή του οποίου από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες με τη προσθήκη αναγωγικών παραγόντων όπως το PMS (phenazine methosulfate)<sup>65</sup>, παράγει ένα έντονο πορτοκαλί χρώμα. Στη συνέχεια η ποσότητα της παραγόμενης χρωστικής μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτόμετρο ορατού. Η ένταση της οπτικής απορρόφησης είναι συνάρτηση της ποσότητας της παραγόμενης χρωστικής η οποία εξαρτάται από τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

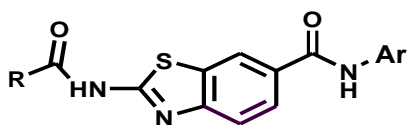


Εικόνα 49: Αναγωγή του XTT άλατος του τετραζολίου στην υδατοδιαλυτή XTT φορμαζάνη που έχει έντονο πορτοκαλί χρώμα<sup>66</sup>

## Δ.2 Ενώσεις

Οι ενώσεις που εξετάστηκαν στις κυτταρικές σειρές μελανώματος ήταν το Hit713 που ανακαλύφθηκε μετά από Εικονική Σάρωση στη βάση Mcule με βάση το φαρμακοφόρο μοντέλο του Vemurafenib και οι ανάλογες ενώσεις IDK 130, IDK 132, IDK 133, IDK 135, IDK 142, IDK 145 οι οποίες συντέθηκαν από την ομάδα Οργανικής και Οργανομεταλλικής Χημείας του IXB/EIE στα πλαίσια της ανάπτυξης βελτιστοποιημένων αναλόγων. Οι ενώσεις επιλέχθηκαν ανάμεσα από μια βιβλιοθήκη αναλόγων ενώσεων δεδομένου ότι είχαν δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα εκλεκτικής καταστολής του BRAFV600E σε βιοχημικές δοκιμασίες (Thermo Fisher Scientific's SelectScreen™ Kinase Profiling).

Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν είχαν το γενικό τύπο της Εικόνας 50 φέροντας ως κεντρικό scaffold το βενζοθειαζόλιο



Εικόνα 50: Δομικό μοτίβο των ενώσεων που δοκιμάστηκαν ως προς τη βιωσιμότητα κυτταρικών σειρών μελανώματος.

Εκτός από τις ανωτέρω ουσίες στις κυτταρικές σειρές δοκιμάστηκαν και ο χορηγούμενος ως BRAFV600E εκλεκτικός αναστολέας vemurafenib και το paradox breaker PLX 8394 (σε κλινικές δοκιμές) ως θετικά control.

### Μέρος Δ.3 Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών

**Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών μελανώματος που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές δοκιμασίες<sup>67</sup>.**

Κυτταρική σειρά	ιστός	BRAF	NRAS	CDK4	EGFR	CDKN2A	άλλες
SK-MEL-2	μελάνωμα	wt	Q61R homoz	wt	wt	wt	TERT C250 C>T in promoter TP53 G245S heteroz
SK-MEL-28	μελάνωμα	V600E homoz	wt	R24C heteroz	P753S homoz	wt	PTEN T167A
A375	μελάνωμα	V600E homoz	wt	wt	wt	E61Term/ E69Term homoz	TERT C250 C>T in promoter
WM164	μελάνωμα	V600E heteroz	wt	wt	wt	wt	-

**Όπου:**

**WT:** άγριος τύπος

Για τη τελική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη σημασία των ανωτέρω μεταλλάξεων στη συμπεριφορά των κυττάρων, καθώς πολλές από τις μεταλλάξεις μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη συμπεριφορά των κυττάρων.

**SK MEL 2:**

**Ομόζυγος για NRAS.Gln61Arg (c.182A>G) :** Μεταλλάξεις που αλλάζουν τα αμινοξικά κατάλοιπα 12,13,61 προκαλούν παγίδευση του Ras στην ενεργό του μορφή προάγοντας την καρκινογένεση. Η εν λόγω μετάλλαξη έχει χαρακτηριστεί ως παθογόνος<sup>68</sup>.

**TERT c.250C>T (-146C>T); in promoter:** Σωματικές μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου για την αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης θεωρούνται ότι είναι οι πιο συχνές μη κωδικές μεταλλάξεις που εμπλέκονται στον καρκίνο. Η BRAFV600E μετάλλαξη σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στον υποκινητή της TERT ευθύνονται για την απώλεια της ευαισθησίας στο ιώδιο στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς<sup>69</sup>.

***Heterozygous for TP53 p.Gly245Ser (c.733G>A):*** απαντάται σε σποραδικούς καρκίνους αλλά και ως κληρονομική μετάλλαξη. Η εν λόγω μετάλλαξη έχει χαρακτηριστεί ως παθογόνος<sup>68</sup>.

#### **SK MEL 28:**

***Homozygous for BRAF p.Val600Glu (c.1799T>A) :*** Η μετάλλαξη αυτή «κλειδώνει» την BRAF στην ενεργό της διαμόρφωση, καθιστώντας το MAPK μονοπάτι συνεχώς ενεργό.

***Heterozygous for CDK4 p.Arg24Cys (c.70C>T) :*** Η εν λόγω μετάλλαξη οδηγεί στη δημιουργία ενός ογκογονιδίου, ανθεκτικού στην αναστολή από την p16(INK4a), που είναι ο αναστολέας της CDK4/6 και χαρακτηρίζεται ως πιθανά παθογόνος<sup>68</sup>.

***Homozygous for EGFR p.Pro753Ser (c.2257C>T):*** αυξημένη δράση κινάσης άρα ενεργοποίηση του μονοπατιού. Αν και η εν λόγω μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως πιθανά παθογόνος<sup>68</sup> έχει βρεθεί σε πλακώδη καρκινώματα ευαίσθητα στο cetuximab (αναστολέας του EGFR)<sup>70</sup>.

***PTEN p.Thr167Ala (c.499A>G) :*** το PTEN είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Πρόκειται για μία φωσφατάση η οποία αποφωσφορυλιώνει την PIP3 και αναστέλλει το PI3K εξαρτώμενο μονοπάτι. Οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με το PTEN και τον καρκίνο αφορούν σε απώλεια της λειτουργίας του. Η ανωτέρω μετάλλαξη έχει χαρακτηριστεί ως παθογόνος<sup>68</sup>.

#### **A 375**

***Homozygous for BRAF p.Val600Glu (c.1799T>A):*** Η μετάλλαξη αυτή «κλειδώνει» την BRAF στην ενεργό της διαμόρφωση, καθιστώντας το MAPK μονοπάτι συνεχώς ενεργό.

***Homozygous for CDKN2A p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val; c.224G>T) and p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val; c.248G>T): p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val; c.248G>T):*** οι ανωτέρω μεταλλάξεις έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες.

***TERT c.250C>T (-146C>T); in promoter:*** Η BRAFV600E μετάλλαξη σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στον υποκινητή της TERT ευθύνονται για την απώλεια της ευαισθησίας στο ιώδιο στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς<sup>69</sup>.

## **WM 164**

***Heterozygous BRAF V600E:*** Η μετάλλαξη αυτή «κλειδώνει» την BRAF στην ενεργό της διαμόρφωση, καθιστώντας το MAPK μονοπάτι συνεχώς ενεργό.

### Δ.4 Κυτταροκαλλιέργειες

#### Δ.4.1 Θρεπτικά υλικά

Οι κυτταρικές σειρές SK-MEL-2 και SK-MEL-28 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό EMEM (Earle's minimal essential medium), το οποίο περιέχει μη απαραίτητα αμινοξέα, 2mM L-glutamine, 1 mM πυροσταφυλικού νατρίου και 1500mg/L διττανθρακικού νατρίου με 10% FBS και 1% διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Οι κυτταρικές σειρές A 375 και WM 164 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% FBS και 1% διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

#### Δ.4.2 Καλλιέργειες

Όλες οι καλλιέργειες αποτελούνται από κύτταρα που προσκολλώνται στην πλάκα καλλιέργειας και για την επώαση χρησιμοποιήθηκε κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας 37°C και συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> 5%.

### Δ.5. Κυτταρικές Σειρές-Πειραματική διαδικασία

#### Δ.5.1 Προετοιμασία κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε η επώαση των κυττάρων έγινε στο κατάλληλο για κάθε κυτταρική σειρά θρεπτικό υλικό και σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας και συγκέντρωσης CO<sub>2</sub>.

Για την προετοιμασία των κυττάρων για τη χορήγηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

1. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων.

2. Έκπλυση των κυττάρων με PBS (phosphate buffered saline).
3. Προσθήκη 3ml διαλύματος θρυψίνης ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την πλάκα καλλιέργειας. Έλεγχος στο μικροσκόπιο για την αποκόλληση των κυττάρων.
4. Προσθήκη 7 ml διαλύματος θρεπτικού υλικού ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης.
5. Μεταφορά του διαλύματος σε σωλήνα τύπου falcon.
6. Φυγοκέντρηση στις 1800στροφές/min και 10 λεπτά. Στο τέλος της φυγοκέντρησης έχει δημιουργηθεί ίζημα.
7. Αναρρόφηση του υπερκείμενου διαλύματος και διάλυση του ιζήματος σε 1ml θρεπτικού υλικού.
8. Προσθήκη 9ml θρεπτικού υλικού ώστε να δημιουργηθεί συνολικό διάλυμα 10ml και αναρρόφηση μικρής ποσότητας 10μl και μεταφορά της σε αιμοκυτταρόμετρο για τη μέτρηση των κυττάρων.
9. Αναγωγή του αριθμού των κυττάρων στον συνολικό όγκο και προσθήκη θρεπτικού υλικού ώστε να προκύψει διάλυμα με συγκέντρωση κυττάρων 2.000.000/ml.
10. Τοποθέτηση 50μl κυττάρων (περίπου  $10^4$  κύτταρα) σε κάθε θέση στην πλάκα μικροτιτλοδότησης (96 well plate) σε τετραπλές επαναλήψεις. Κύτταρα τοποθετήθηκαν στις 10 από τις 12 στήλες. Στην πλάκα μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκε επίσης θρεπτικό υλικό για διόρθωση υποβάθρου κατά τη διάρκεια της φωτομέτρησης.
11. Στη συνέχεια ακολούθησε η επώαση των κυττάρων για 24 ώρες στον κλίβανο ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα.

#### Δ.5.2 Διάλυση ουσιών

Η αρχική διάλυση των ουσιών έγινε σε DMSO έτσι ώστε το διάλυμα των ουσιών να είναι 10 mM.

Στη συνέχεια οι ουσίες διαλύθηκαν στο εκάστοτε θρεπτικό υλικό των κυττάρων ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών 2μM, 20μM, 200μM

#### Δ.5.3 Προσθήκη των ουσιών στην κυτταροκαλλιέργεια

Μετά από επώαση 24 ωρών πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 50μl διαλύματος ουσιών σε κάθε θέση της πλάκας μικροτιτλοδότησης, ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση των ουσιών 1μM, 10μM, 100μM. Η προσθήκη των ουσιών έγινε με αύξουσα συγκέντρωση, ενώ σε κάθε συγκέντρωση αντιστοιχούσαν τέσσερις επαναλήψεις. Σε μία τετράδα κυττάρων δεν προστέθηκε κάποια ουσία αλλά 50μM θρεπτικού υλικού. Αυτή η στήλη αποτέλεσε το control. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με τις ουσίες σε κλίβανο για 72 ώρες.

#### Δ.5.4 Διάλυση του ΧΤΤ

Το ΧΤΤ διαλύεται λίγο πριν τη χρήση του. Αρχικά προετοιμάζεται ένα διάλυμα προσθέτοντας 3mg PMS (Phenazine Methosulfate) σε 1ml PBS (Phosphate Buffered Saline) με τελική συγκέντρωση 10mM. Έπειτα διαλύονται 4mg ΧΤΤ σε 4ml θρεπτικού υλικού. Τέλος προστίθενται 10μM από το πρώτο διάλυμα στα 4ml διαλύματος του ΧΤΤ.

#### Δ.5.5 Προσθήκη του ΧΤΤ

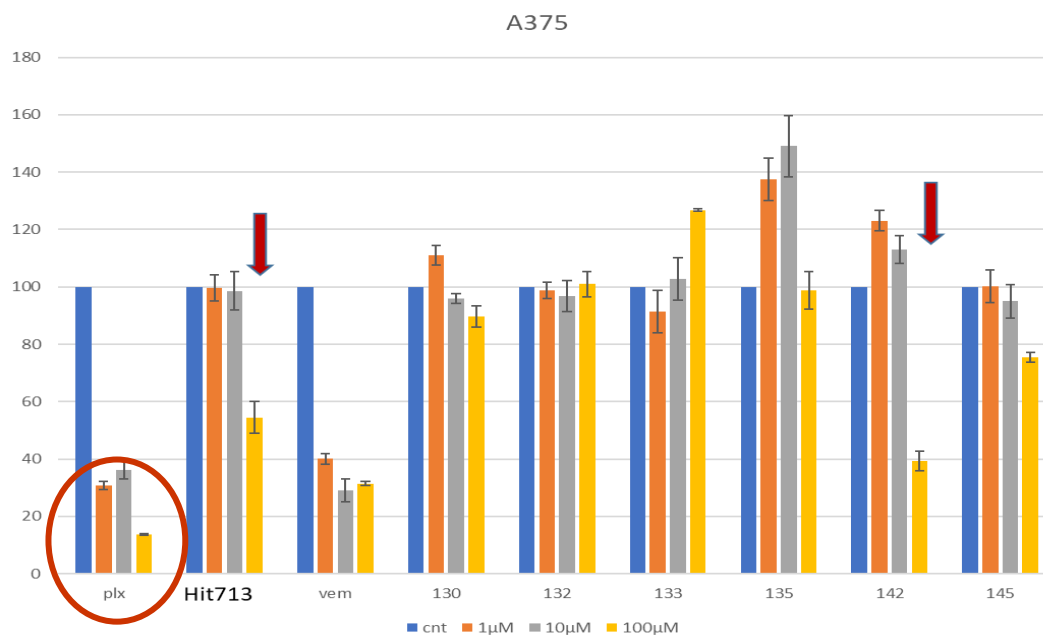
Μετά τη διάλυση του προστίθενται 25μM του διαλύματος ΧΤΤ σε κάθε θέση της πλάκας, όπου είχαν τοποθετηθεί κύτταρα, προσέχοντας την έκθεση στο φως καθώς το ΧΤΤ και το PMS είναι φωτοευαίσθητα. Η πλάκα τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για τρεις ώρες.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 470nm και στα 650nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan και ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

## Δ.6 Αποτελέσματα

### A375

Η εικόνα 51 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της κυτταρικής βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά A 375 ομόζυγη για τη μετάλλαξη BRAF V600E.



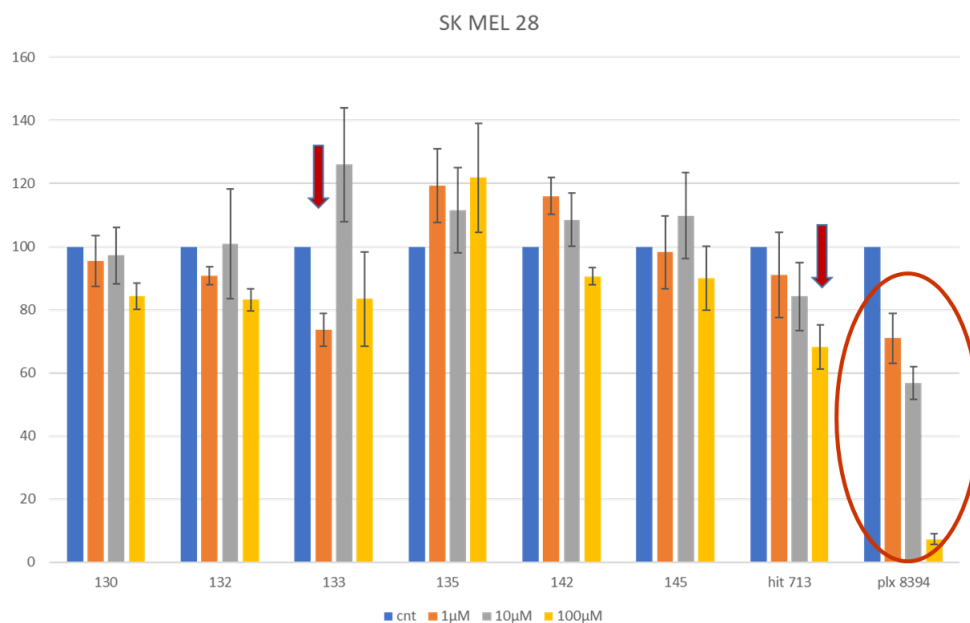
Εικόνα 51: Κυτταρική βιωσιμότητα για τη σειρά A 375. Κυκλωμένο το Paradox breaker.

Το PLX8394 και το Vemurafenib αναστέλλουν δραστικά την επιβίωση των κυττάρων A 375. Ενδεικτικά η βιωσιμότητα ελαττώνεται σε 35% σε συγκέντρωση 10 μM PB. Οι ενώσεις hit 713 και η IDK 142 φαίνεται να παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις (ελάττωση βιωσιμότητας σε 55% και 40% αντίστοιχα στα 100μM).



## SK MEL 28

Η εικόνα 52 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της κυτταρικής βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά SK MEL 28.



Εικόνα 52: Κυτταρική βιωσιμότητα για τη σειρά SK MEL 28. Κυκλωμένο το Paradox breaker

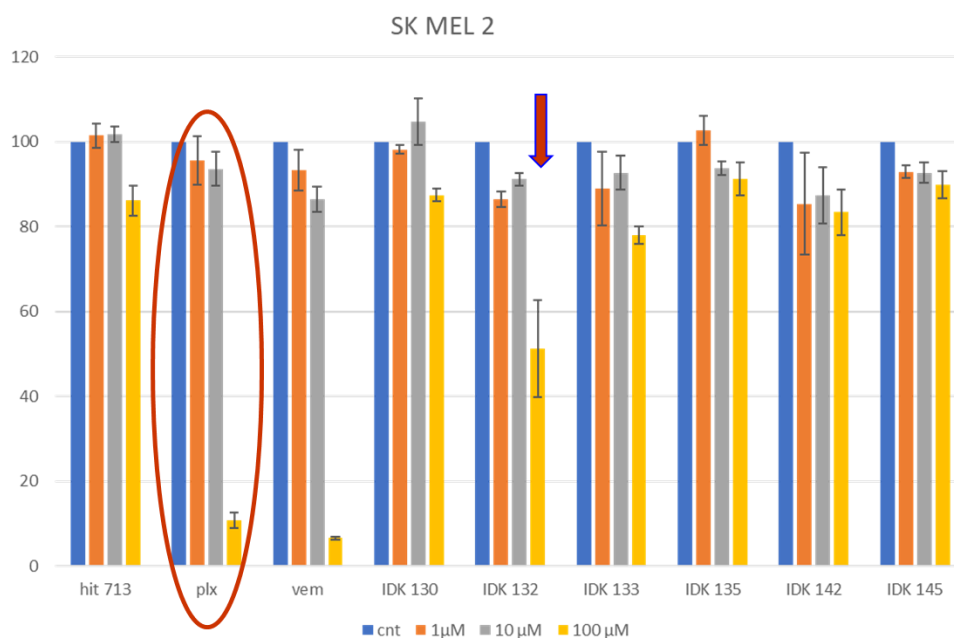
Ο paradox breaker είναι αποτελεσματικός σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Η κυτταρική βιωσιμότητα ελαττώνεται σε 75% σε συγκέντρωση 1 µM, σε 56% στα 10 µM PB και σε 7% στα 100 µM.

Περιορισμένη αποτελεσματικότητα παρατηρείται για το Hit713 (ελάττωση της βιωσιμότητας σε 68% στα 100 µM) ενώ το IDK133 φαίνεται να προκαλεί σημαντική μείωση της βιωσιμότητας στο 75% σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (1 µM) όμως δεν φαίνεται να υπάρχει δόσοεξαρτώμενη απόκριση.

Επειδή η σειρά είναι άγριος τύπος ως προς το RAS ογκογονίδιο και ομόζυγος για την BRAF V600E θα περιμέναμε να υπάρξει μείωση της βιωσιμότητας μετά από 72 ώρες επώασης. Η μετάλλαξη στο EGFR όμως ενδεχομένως ενεργοποιεί άλλα κυτταρικά μονοπάτια επιβίωσης των κυττάρων .

## SK-MEL 2

Η εικόνα 53 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της κυτταρικής βιωσιμότητας για την κυτταρική σειρά SK MEL 2.



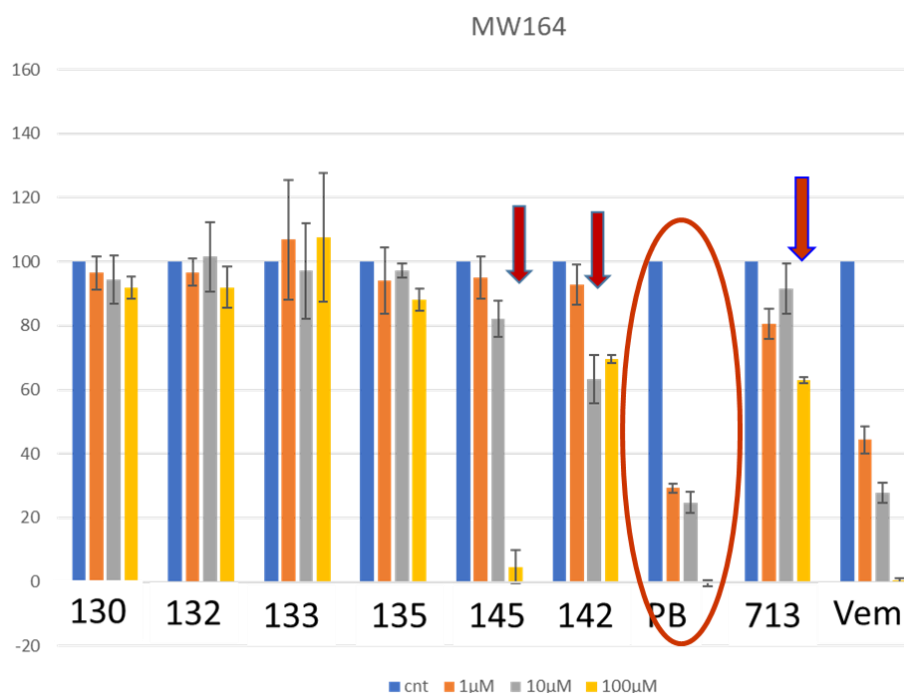
Εικόνα 53: Κυτταρική βιωσιμότητα για τη σειρά SK MEL 2. Κυκλωμένο το Paradox breaker.

Η σειρά αυτή παρουσιάζει αντίσταση σε αναστολείς τύπου I1/2. Είναι wtBRAF και η μετάλλαξη NRASQ61R πιθανά προάγει το διμερισμό, τη συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Πράγματι, ο paradox breaker και το vemurafenib είναι αποτελεσματικά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (100 µM). Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν παρουσιάζουν επίσης μειωμένη αποτελεσματικότητα σε συμφωνία με το προφίλ αναστολέων τύπου I1/2 όπως και σχεδιάστηκαν. Μόνο η IDK 132 φαίνεται να παρουσιάζει ελάττωση κατά 50% της βιωσιμότητας στα 100µM

## MW164

Η εικόνα 54 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της κυτταρικής βιωσιμότητας για την σειρά MW164 που είναι ετερόζυγος για τη μετάλλαξη V600E



Εικόνα 54: Κυτταρική βιωσιμότητα για τη σειρά MW164. Κυκλωμένο το Paradox breaker.

Τα PLX8394 (PB) και Vemurafenib αναστέλλουν ελαττώνουν δραστικά τη βιωσιμότητα ήδη από το 1 μM. Οι ενώσεις IDK 145 και Hit713 παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις με την πρώτη να καταστέλλει τη βιωσιμότητα κατά 90% στα 100 μM ενώ η IDK142 φαίνεται να είναι αποτελεσματική και σε μικρότερες συγκεντρώσεις (60% βιωσιμότητα στα 10 μM).

## Δ.7. Σύνοψη αποτελεσμάτων-Συζήτηση

Στον **Πίνακα 4** παρατίθενται τα αποτελέσματα των ενώσεων που δοκιμάστηκαν ως προς την αναστολή της μεταλλαγμένης BRAFV600E και της wtBRAF σε ενζυμικό assay (Thermo Fisher Scientific's SelectScreen™ Kinase Profiling).

Επίσης, έχουν καταχωρηθεί τα σημαντικότερα αποτελέσματα της κυτταρικής δοκιμής βιωσιμότητας στις σειρές που δοκιμάστηκαν στην παρούσα εργασία.

**Πίνακας 4**

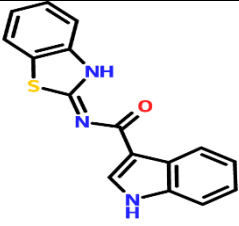
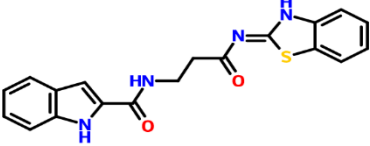
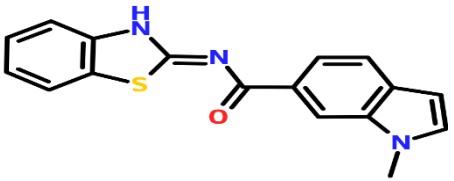
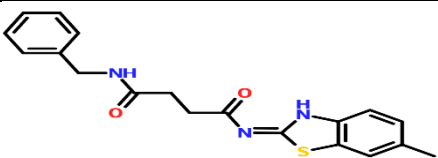
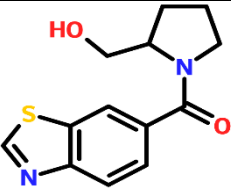
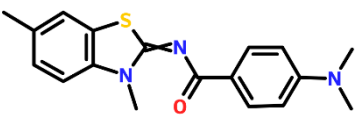
Ενωση	Ενζυμικό assay			Κυτταρική δοκιμή (βιωσιμότητα)			
	BRAFV600E (IC50 $\mu$ M)	BRAF WT (IC50 $\mu$ M)	CRAF WT (% inhibition $\mu$ M)	A375	SK-MEL-28	SK-MEL-2	MW164
<b>PLX8394</b>				30% @1 $\mu$ M	70 -10 % @ 1 -100 $\mu$ M	10% @ 100 $\mu$ M	30% @ 1 $\mu$ M
<b>Vemurafenib</b>				40% @ 1 $\mu$ M		10% @ 100 $\mu$ M	45% @ 1 $\mu$ M
<b>Hit 713</b>	21	>200	41% @ 200 $\mu$ M	55% @ 100 $\mu$ M	85-70% @ 10-100 $\mu$ M		80-60% @ 1- 100 $\mu$ M
<b>IDK130</b>	36.7	155					
<b>IDK133</b>	7.9	>66.7			70% @ 1-100 $\mu$ M (plateau)		
<b>IDK142</b>	60.3	>200		40% @ 100 $\mu$ M			60% @ 10 $\mu$ M
<b>IDK145</b>	>100	>200		70% @ 100 $\mu$ M			80 - 5% @ 10- 100 $\mu$ M
<b>%inhibition</b>							
<b>IDK132</b>	36% @ 10 $\mu$ M	4% @ 10 $\mu$ M				50% @ 100 $\mu$ M	
<b>IDK 135</b>	47% @ 10 $\mu$ M	-9 @ 10 $\mu$ M					

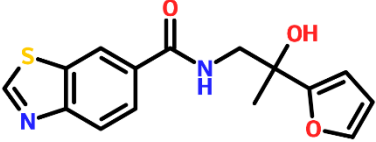
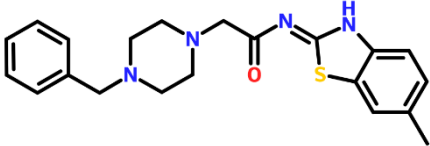
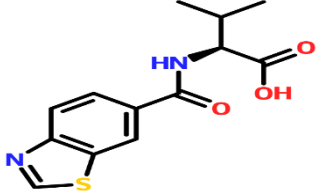
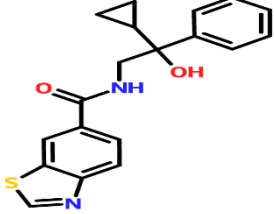
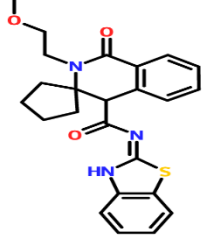
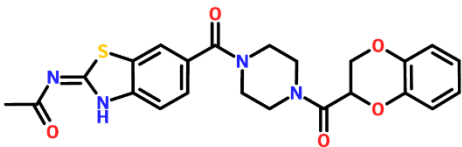
Η δραστηριότητα των ενώσεων που εξετάστηκαν στο ενζυμικό assay ήταν σε χαμηλό εύρος  $\mu$ M ενώ όλες παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς την αναστολή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης έναντι της πρωτεΐνης αγρίου τύπου. Τα PB και vemurafenib παρουσιάζουν δραστηριότητα σε low nM όπως έχει παρουσιαστεί στην (Εικόνα 6).

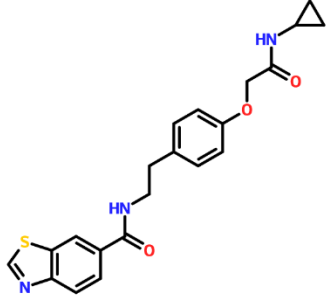
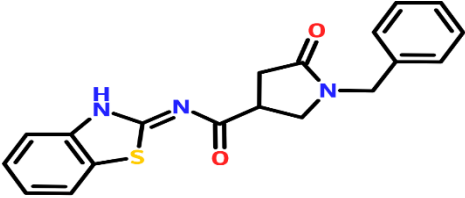
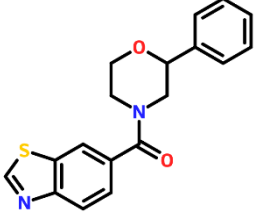
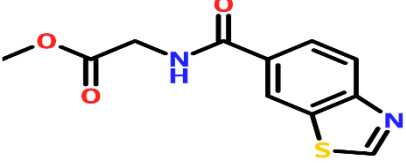
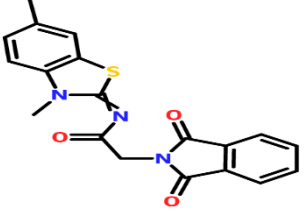
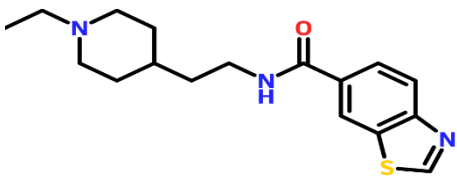
Οι ενώσεις Hit713, IDK142 και IDK145 αναστέλλουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στις σειρές που περιλαμβάνουν μεταλλαγμένη BRAFV600E ενώ ειδικότερα στη σειρά MW164 οι IDK142 και IDK145 φαίνονται αρκετά υποσχόμενες. Επίσης είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι η IDK133 που στο ενζυμικό assay φαίνεται να προκαλεί μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη αναστολή της μεταλλαγμένης BRAF σε σχέση με το Hit713 παρουσιάζει ήπια κυτταροστατική δραστηριότητα στη σειρά SK-MEL-28 ήδη από το 1μM. Τέλος, η IDK132 φαίνεται να έχει δραστηριότητα μόνο στην κυτταρική σειρά SK-MEL-2 (wtBRAF και παρουσία ογκογενούς μετάλλαξης στο RAS ) και αυτό πιθανά αποτελεί ένδειξη ότι δεν έχει προφίλ αναστολέα I1/2 και πιθανά είναι δραστική έναντι των διμερών RAF.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

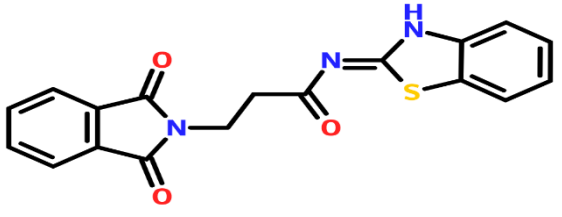
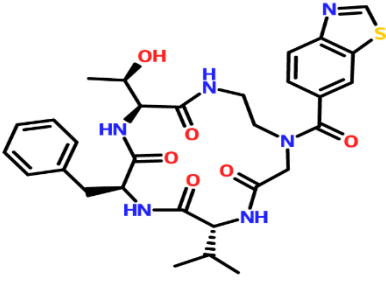
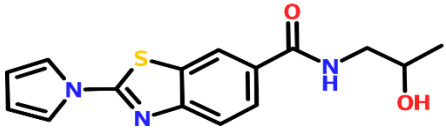
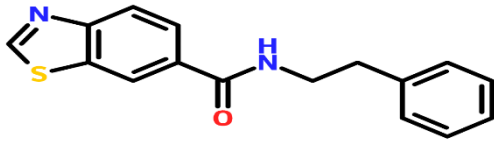
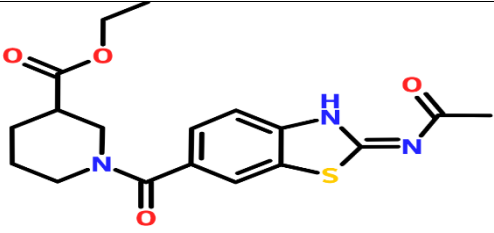
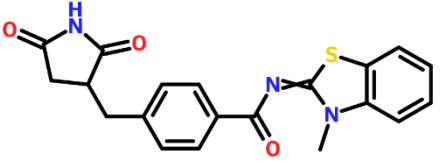
**Πίνακας 1: Δομές των 50 ενώσεων που προέκυψαν από το clustering με το πρόγραμμα DataWarrior με τη χρήση των FragFp descriptors.**

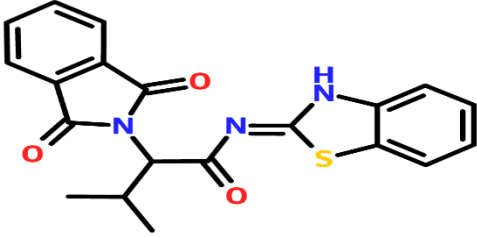
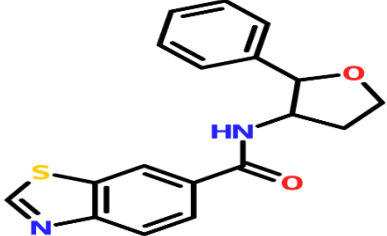
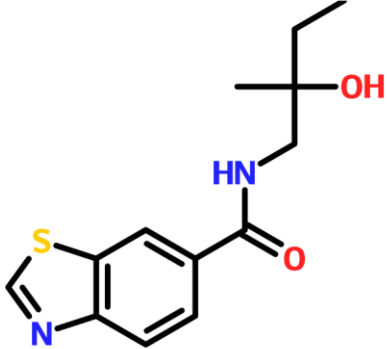
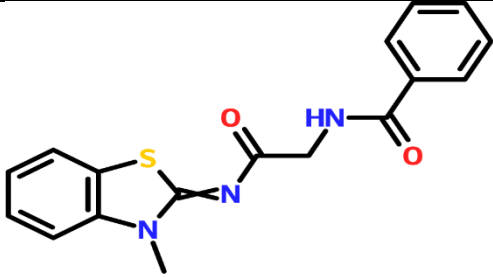
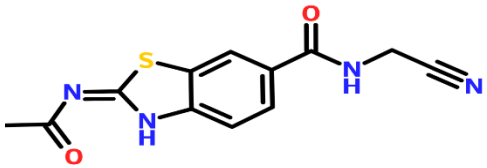
Structure	MCULE ID
	MCULE-1189838771-0
	MCULE-1376851564-0
	MCULE-1407699247-0
	MCULE-1497221367-0
	MCULE-1784549816-0
	MCULE-2232593369-0

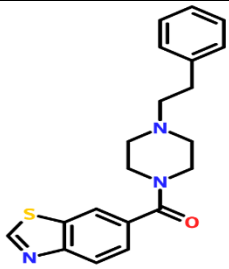
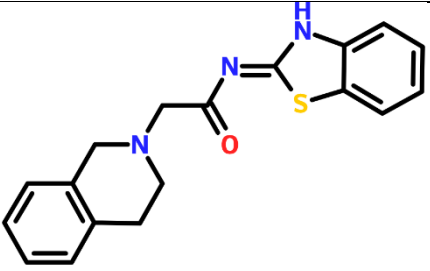
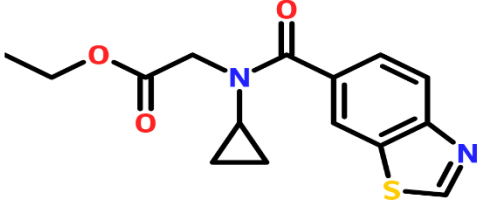
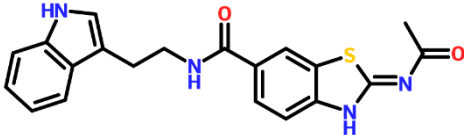
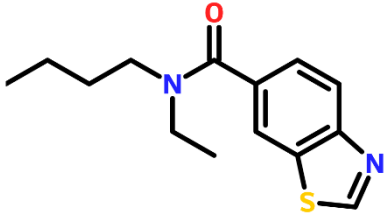
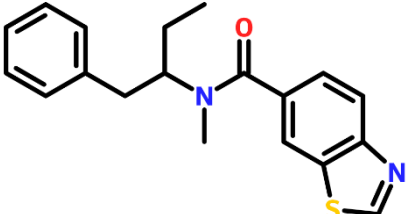
	MCULE-2241473973-0
	MCULE-2345100537-0
	MCULE-2482815925-0
	MCULE-3074382085-0
	MCULE-3403682314-0
	MCULE-3469548182-0

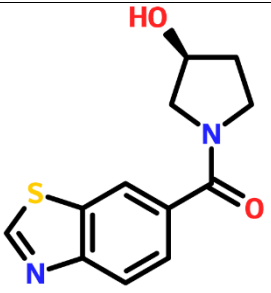
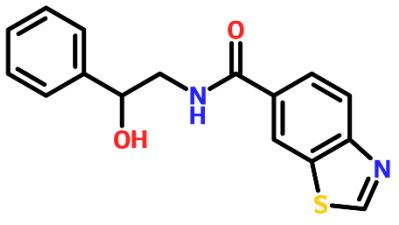
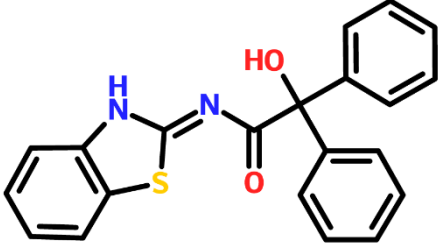
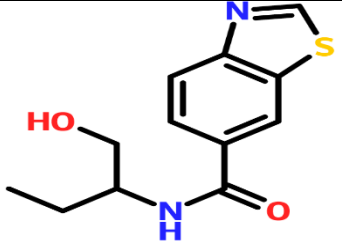
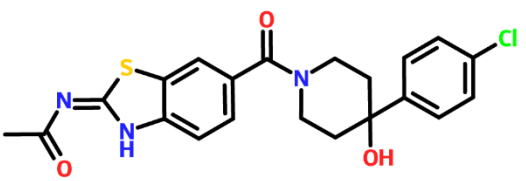
	MCULE-3539877470-0
	MCULE-3622420207-0
	MCULE-3769007820-0
	MCULE-4028238838-0
	MCULE-4047102865-0
	MCULE-4310982125-0

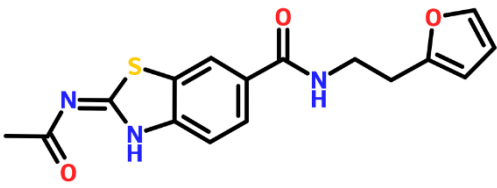
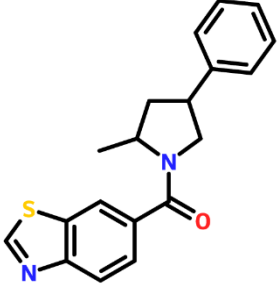
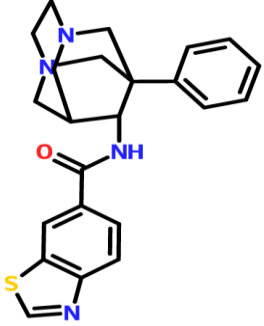
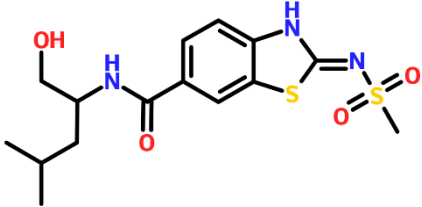
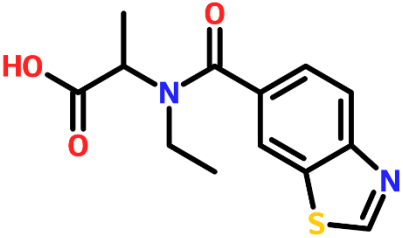


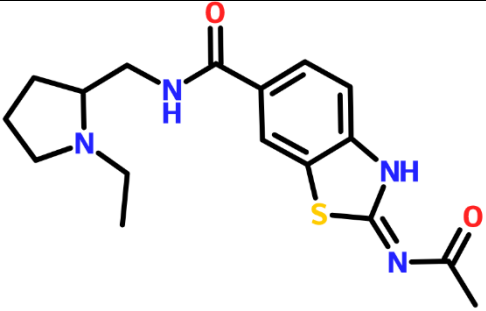
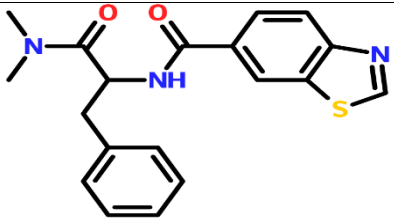
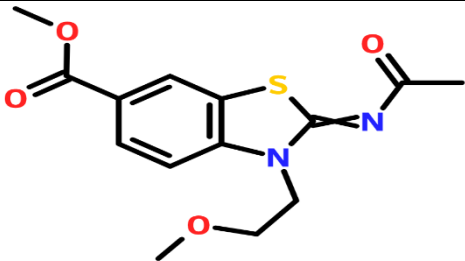
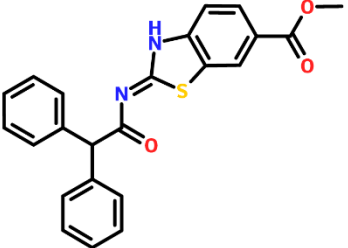
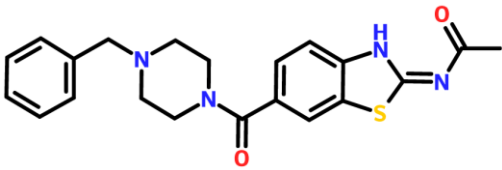
	MCULE-5018881199-0
	MCULE-5044949424-0
	MCULE-5163213962-0
	MCULE-5239895484-0
	MCULE-5499655078-0
	MCULE-5671279498-0

	MCULE-5768959430-0
	MCULE-6046454299-0
	MCULE-6200867757-0
	MCULE-6258673429-0
	MCULE-6294301895-0

	MCULE-6301088001-0
	MCULE-6357525991-0
	MCULE-6858192138-0
	MCULE-6925182631-0
	MCULE-7064307308-0
	MCULE-7100399298-0

 <p>Chemical structure of 4-(4-hydroxypiperidin-1-yl)benzo[1,2-b]thiazole. The structure features a benzothiazole ring system (a benzene ring fused to a five-membered thiazole ring) connected at the 4-position to the nitrogen atom of a piperidine ring. The piperidine ring has a hydroxyl group (-OH) attached to the carbon at the 4-position.</p>	MCULE-7359187189-0
 <p>Chemical structure of N-(2-hydroxy-1-phenylethyl)thiazole-5-carboxamide. It consists of a thiazole ring with a carboxamide group (-CONH-) at the 5-position. The nitrogen of the amide is bonded to a 1-phenylethanol group (-CH(OH)CH<sub>2</sub>Ph).</p>	MCULE-7583275975-0
 <p>Chemical structure of N-(1,1-diphenylethyl)thiazole-2-carboxamide. It features a thiazole ring with a carboxamide group (-CONH-) at the 2-position. The nitrogen of the amide is bonded to a 1,1-diphenylethanol group (-C(OH)(Ph)<sub>2</sub>).</p>	MCULE-7592849207-0
 <p>Chemical structure of N-(1-hydroxypropan-2-yl)thiazole-5-carboxamide. It consists of a thiazole ring with a carboxamide group (-CONH-) at the 5-position. The nitrogen of the amide is bonded to a 1-hydroxypropan-2-yl group (-CH(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).</p>	MCULE-7781083781-0
 <p>Chemical structure of N-(4-chlorophenyl)piperidin-4-yl 1,2,4-thiazole-5-carboxamide. It features a 1,2,4-thiazole ring with a carboxamide group (-CONH-) at the 5-position. The nitrogen of the amide is bonded to a piperidine ring at the 4-position. The piperidine ring is also substituted at the 4-position with a 4-chlorophenyl group (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl).</p>	MCULE-8054350244-0

	<p>MCULE-8137610909-0</p>
	<p>MCULE-8218633516-0</p>
	<p>MCULE-8363968039-0</p>
	<p>MCULE-8559715987-0</p>
	<p>MCULE-8642289749-0</p>

	MCULE-9122786136-0
	MCULE-9223139285-0
	MCULE-9402823715-0
	MCULE-9402966662-0
	MCULE-9790036796-0

## Βιβλιογραφία

1. Matallanas, D. *et al.* Raf Family Kinases: Old Dogs Have Learned New Tricks. *Genes Cancer* **2**, 232–260 (2011).
2. Lavoie, H. & Therrien, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 281–298 (2015).
3. <https://www.uniprot.org/uniprot/P15056>. No Title.
4. Taylor, S. S. & Kornev, A. P. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 65–77 (2011).
5. Karoulia, Z., Gavathiotis, E. & Poulikakos, P. I. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 676–691 (2017).
6. Agianian, B. & Gavathiotis, E. Current Insights of BRAF Inhibitors in Cancer. *J. Med. Chem.* **61**, 5775–5793 (2018).
7. Zhang, B. H. & Guan, K. L. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J.* **19**, 5429–5439 (2000).
8. Haling, J. R. *et al.* Structure of the BRAF-MEK Complex Reveals a Kinase Activity Independent Role for BRAF in MAPK Signaling. *Cancer Cell* **26**, 402–413 (2014).
9. Foster, S. A. *et al.* Activation Mechanism of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell* **29**, 477–493 (2016).
10. Pratilas, C. A., Xing, F. & Solit, D. B. Targeting oncogenic BRAF in human cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **355**, 83–98 (2012).
11. Falini, B., Martelli, M. P. & Tiacci, E. BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia: from bench to bedside. *Blood* **128**, 1918–1927 (2016).
12. Lito, P., Rosen, N. & Solit, D. B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat. Med.* **19**, 1401–1409 (2013).
13. Chapman, P. B. *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2011).
14. Ballantyne, A. D. & Garnock-Jones, K. P. Dabrafenib: first global approval. *Drugs* **73**, 1367–1376 (2013).
15. Robert, C. *et al.* Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **381**, 626–636 (2019).



16. Adelman, C. H. *et al.* Comparative profiles of BRAF inhibitors: the paradox index as a predictor of clinical toxicity. *Oncotarget* **7**, 30453–30460 (2016).
17. Hatzivassiliou, G. *et al.* RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* **464**, 431–435 (2010).
18. Bollag, G. *et al.* Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* **467**, 596–599 (2010).
19. Arozarena, I. & Wellbrock, C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Ann. Transl. Med.* **5**, 387 (2017).
20. Corcoran, R. B. *et al.* BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci. Signal.* **3**, ra84–ra84 (2010).
21. Poulikakos, P. I. *et al.* RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**, 387–390 (2011).
22. Villanueva, J. *et al.* Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* **18**, 683–695 (2010).
23. FDA approves encorafenib in combination with cetuximab for metastatic colorectal cancer with a BRAF V600E mutation.
24. FDA approves atezolizumab for BRAF V600 unresectable or metastatic melanoma. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-atezolizumab-braf-v600-unresectable-or-metastatic-melanoma>.
25. Zhang, C. *et al.* RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature* **526**, 583–586 (2015).
26. Karoulia, Z. *et al.* An Integrated Model of RAF Inhibitor Action Predicts Inhibitor Activity against Oncogenic BRAF Signaling. *Cancer Cell* **30**, 485–498 (2016).
27. Tutuka, C. S. A. *et al.* PLX8394, a new generation BRAF inhibitor, selectively inhibits BRAF in colonic adenocarcinoma cells and prevents paradoxical MAPK pathway activation. *Mol. Cancer* **16**, 112 (2017).
28. Cotto-Rios, X. M. *et al.* Inhibitors of BRAF dimers using an allosteric site. *Nat. Commun.* **11**, 4370 (2020).
29. ΒΑΣΙΛΗΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Α. Τ.-Κ. *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων.*

30. Duelen R., Corvelyn M., Tortorella I., Leonardi L., Chai Y.C., Sampaolesi M. (2019) Medicinal Biotechnology for Disease Modeling, Clinical Therapy, and Drug Discovery and Development. In: Matei F., Zirra D. (eds) Introduction to Biotech Entrepreneurship:, C. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22141-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22141-6_5). No Title.
31. Christoph Sotrifer. *Virtual Screening*.
32. Carnero, A. High throughput screening in drug discovery. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Spanish Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **8**, 482–490 (2006).
33. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3–25 (1997).
34. Chandrasekaran, B., Abed, S. N., Al-Attraqchi, O., Kuche, K. & Tekade, R. K. Chapter 21 - Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties. in *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research* (ed. Tekade, R. K. B. T.-D. F. D. P.) 731–755 (Academic Press, 2018). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814421-3.00021-X>.
35. Zhong, H. A. ADMET Properties: Overview and Current Topics BT - Drug Design: Principles and Applications. in (ed. Grover, A.) 113–133 (Springer Singapore, 2017). doi:10.1007/978-981-10-5187-6\_8.
36. Mark A. Johnson, G. M. M. *Concepts and Applications of Molecular Similarity*. (1990).
37. Maggiora, G., Vogt, M., Stumpfe, D. & Bajorath, J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **57**, 3186–3204 (2014).
38. Balaban, A. T. Drug Design, Molecular Descriptors in BT - Encyclopedia of Complexity and Systems Science. in (ed. Meyers, R. A.) 1–31 (Springer New York, 2009). doi:10.1007/978-3-642-27737-5\_136-2.
39. Danishuddin & Khan, A. U. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discov. Today* **21**, 1291–1302 (2016).
40. Cereto-Massagué, A. *et al.* Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Methods* **71**, 58–63 (2015).
41. <https://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.finger.html>.
42. Bajusz, D., Rácz, A. & Héberger, K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J. Cheminform.* **7**, 20

- (2015).
43. Huang, H.-J. *et al.* Current developments of computer-aided drug design. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **41**, 623–635 (2010).
  44. Anderson, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem. Biol.* **10**, 787–797 (2003).
  45. Santos, C. B. R. dos, Lobato, C. C., de Sousa, M. A. C., Macêdo, W. J. da C. & Carvalho, J. C. T. Molecular Modeling: Origin, Fundamental Concepts and Applications Using Structure-Activity Relationship and Quantitative Structure-Activity Relationship. *Rev. Theor. Sci.* (2014) doi:10.1166/rits.2014.1016.
  46. Index @ Wwww.Rcsb.Org.
  47. Smyth, M. S. & Martin, J. H. x ray crystallography. *Mol. Pathol.* **53**, 8–14 (2000).
  48. Lam, S. D., Das, S., Sillitoe, I. & Orengo, C. An overview of comparative modelling and resources dedicated to large-scale modelling of genome sequences. *Acta Crystallogr. Sect. D, Struct. Biol.* **73**, 628–640 (2017).
  49. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H. & Nussinov, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* **47**, 409–443 (2002).
  50. Glide User Manual Copyright © 2015 Schrödinger, LLC.
  51. <https://mcule.com/>.
  52. Sander, T., Freyss, J., von Korff, M. & Rufener, C. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 460–473 (2015).
  53. Schrödinger Release 2020-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
  54. Schrödinger Release 2020-4: MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
  55. Schrödinger Release 2020-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
  56. Schrödinger Release 2020-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
  57. Schrödinger Release 2020-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
  58. <http://openbabel.org/docs/dev/Features/Fingerprints.html>.
  59. [http://www.akosgmbh.de/AKosSamples/mdl\\_mol\\_keys.htm](http://www.akosgmbh.de/AKosSamples/mdl_mol_keys.htm).

60. <http://www.openmolecules.org/help/similarity.html>.
61. <http://www.openmolecules.org/help/chemistry.html#ClusterCompounds>.
62. Schrödinger Release 2020-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
63. Schrödinger Release 2020-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
64. Niles, A. L., Moravec, R. A. & Riss, T. L. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin. Drug Discov.* **3**, 655–669 (2008).
65. Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M. & Glasebrook, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* **142**, 257–265 (1991).
66. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O. & Sivas, H. Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. in (ed. Kuete, V. B. T.-M. S. and V. from A.) 271–297 (Academic Press, 2017).  
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>.
67. <https://web.expasy.org/cellosaurus/>.
68. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
69. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/>.
70. Ganesan, P. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor P753S Mutation in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Responsive to Cetuximab-Based Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34**, e34-7 (2016).
71. [www.phrm.org](http://www.phrm.org).