



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Κτηνιατρικής  
Εργαστήριο Βιοχημείας



Διδακτορική διατριβή

«Ανακάλυψη αναστολέων για την πρωτεΐνη TNF-α  
σαν ενώσεις οδηγούς για φάρμακα έναντι της  
Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας»

Ανθούλα Κ. Μέττου

Καρδίτσα 2017

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έτυχε χρηματοδότησης από το έργο «Από Μόρια Στόχους σε Μόρια-Οδηγούς: Καινοτόμες Φαρμακευτικές Ουσίες για την Αρθρίτιδα – The RAlead» στα πλαίσια δράσης εθνικής εμβέλειας «Συνεργασία» - Πράξη II. Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης – ΕΤΠΑ) και από εθνικούς πόρους.



### *Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή*

1. *Γιώργος Κοντοπίδης*, Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. *Ελένη Ντούνη*, Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. *Ηλίας Ηλιόπουλος*, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

### *Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή*

1. *Γιώργος Κοντοπίδης*, Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. *Ελένη Ντούνη*, Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. *Ηλίας Ηλιόπουλος*, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
4. *Σπύρος Ζωγράφος*, Ερευνητής Β', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
5. *Δημήτρης Λεωνίδας*, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6. *Ιωάννης Παππάς*, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7. *Σταύρος Λαλάς*, Καθηγητής Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλίας

<i>Περιεχόμενα</i>	<i>Σελίδα</i>
Περίληψη	5
Abstract	8
1. Εισαγωγή TNF	11
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	11
1.2 Δομή και λειτουργία TNF	13
1.2.1 Γενικά δομικά χαρακτηριστικά TNF	13
1.2.2 Δομική ομοιότητα TNF με άλλες πρωτεΐνες	14
1.2.3 Κατανομή αμινοξέων και δομικά μοτίβα	15
1.2.4 Συμμετρία κρυσταλλικής δομής	18
1.2.5 Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις τριμερούς	19
1.3 Υποδοχείς TNF και σηματοδοτικά μονοπάτια	21
1.3.1 Υποδοχείς TNF	21
1.3.1.2 Ο ρόλος των υποδοχέων TNFR1 και TNFR2	22
1.3.2 Μονοπάτια TNF	24
1.3.2.1 Ενεργοποίηση του NF-κΒ μονοπατιού	26
1.3.2.2 Ενεργοποίηση MAPK μονοπατιών	28
1.3.2.3 Επαγωγή της σηματοδότησης της απόπτωσης	28
1.4 Αναστολή του TNF ως θεραπευτικό μέσο	30
1.4.1 Συσχέτιση TNF με ασθένειες και αντι-TNF θεραπεία	30
1.4.2 Παρενέργειες των αντι-TNF θεραπειών	34
1.4.3 Αναστολή TNF με μικρά μόρια	36
1.4.3.1 Ο αναστολέας SPD304	39
1.4.3.2 Προσδιορισμός της συγγένειας πρόσδεσης μικρομοριακών αναστολέων στον TNF με φασματοσκοπία φθορισμού	44
1.5 Το πρόβλημα της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των μικρών φαρμακευτικών μορίων	48

1.5.1 Επιπλοκές της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας στις βιολογικές δοκιμές	51
1.5.1.1 Επιπτώσεις της χαμηλής διαλυτότητας του μητρικού διαλύματος σε καθαρό διαλύτη, το παράδειγμα του DMSO	52
1.5.1.2 Μη ειδική αναστολή από κατακρημνισμένους αναστολείς	54
1.5.1.3 Το παράδειγμα των μικρομοριακών αναστολέων του TNF	55
1.5.2 Μέθοδοι ενίσχυσης της διαλυτότητας	55
1.5.2.1 Προσθήκη συνδιαλυτών και εκδόχων	56
1.5.2.1.1 Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	57
1.5.2.1.2 Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)	59
1.5.2.1.3 Κυκλοδεξτρίνη	60
1.5.2.2 Πρωτόκολλο διάλυσης	63
1.5.2.2.1 Κινητική και θερμοδυναμική διαλυτότητα	63
1.5.3 Μοντέλα πρόβλεψης διαλυτότητας	66
1.6 Σκοπός της παρούσας μελέτης	69
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>70</b>
2.1 Όργανα	70
2.2 Υλικά	71
2.3 Μέθοδοι	72
2.3.1 Πρωτεϊνική έκφραση και καθαρισμός	72
2.3.1.1 Φορέας έκφρασης TNF	72
2.3.1.2 Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση	73
2.3.1.3 Επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών επισημασμένων με τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)	73
2.3.1.4. Καθαρισμός πρωτεϊνών επισημασμένων με GST υπό φυσικές (native) συνθήκες	74

2.3.1.5 Διαχωρισμός φυσικών πληθυσμών ολιγομερών TNF με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size Exclusion Chromatography)	75
2.3.1.6 Χειρισμοί πρωτεϊνικών δειγμάτων	76
2.3.1.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε διάλυμα	76
2.3.1.6.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE electrophoresis)	77
2.3.2 Μελέτες δραστικότητας χημικών μορίων	80
2.3.2.1 Φασματοσκοπία φθορισμού	80
2.3.2.2 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης	80
2.3.3 Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών	84
2.3.4 Μελέτες διαλυτότητας πιθανών προσδετών	88
2.3.4.1 Σύνθεση χημικών προσδετών	88
2.3.4.2 Πρωτόκολλο διάλυσης πιθανών προσδετών	89
2.3.4.3 Πρωτόκολλο μέτρησης διαλυτότητας στο υπεριώδες	90
2.3.4.4 Μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τη διαλυτότητα	91
2.3.4.4.1 Επίδραση χρόνου διάλυσης στην κινητική διαλυτότητα	91
2.3.4.4.2 Μέτρηση θερμοδυναμικής και κινητικής διαλυτότητας	91
2.3.4.4.3 Επίδραση προσθήκης συνδιαλύτη (5%DMSO, 5%PEG3350) στην κινητική διαλυτότητα	92
2.3.4.4.4 Επίδραση φιλτραρίσματος στην κινητική διαλυτότητα	92
<b>3. Συζήτηση αποτελεσμάτων</b>	<b>93</b>
3.1 Πρωτεϊνική έκφραση και καθαρισμός	93
3.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός 3C-πρωτεάσης	95
3.1.2 Διερεύνηση υπερέκφρασης και καθαρισμός του TNF	95
3.1.3 Διερεύνηση υπερέκφρασης και καθαρισμός νέας κατασκευής του TNF	99
3.2 Μελέτες διαλυτότητας πιθανών αναστολέων	101

3.2.1 Μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν την διαλυτότητα	106
3.2.1.1 Χρόνος διάλυσης	106
3.2.1.2 Αρχική μορφή ενώσεων (στερεή/ σε υγρό διάλυμα)	108
3.2.1.3 Μέθοδος διαχωρισμού διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος	110
3.2.1.4 Σύγκριση τεχνικών UV και HPLC για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών	111
3.2.2 Ενίσχυση της διαλυτότητας με προσθήκη συνδιαλυτών και εκδόχων	112
3.2.2.1 Επιλογή συνδιαλυτών και άλλων προσθέτων	113
3.2.2.2 Αξιολόγηση επίδρασης συνδιαλυτών στις <i>in vitro</i> βιολογικές δοκιμές	114
3.2.2.3 Μελέτη ενίσχυσης διαλυτότητας με προσθήκη συνδιαλυτών	117
3.2.2.3.1 Συσχέτιση δεδομένων διαλυτότητας σε 5% PEG3350 με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	121
3.2.2.4 Μελέτη ενίσχυσης της διαλυτότητας μέσω εγκλωβισμού με β-κυκλοδεξτρίνη	123
3.2.3 Πρωτόκολλο διάλυσης μικρών οργανικών μορίων με τάση προς υδροφοβικότητα	129
3.2.4 Πρωτόκολλο μέτρησης υδατικής διαλυτότητας μικρών οργανικών μορίων που απορροφούν στο υπεριώδες	132
3.2.5 Δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης υδατικής διαλυτότητας παρουσία 5% DMSO	132
3.3 Μελέτες πρόσδεσης με φασματοσκοπία φθορισμού	133
3.4 Μελέτη του μηχανισμού πρόσδεσης με Ισόθερμη Θερμιδομετρία Τιτλοδότησης (ITC)	159
3.5 Κρυστάλλωση συμπλόκου TNF με αναστολείς	168
Συμπεράσματα	176
Αναφορές	180

## Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής είναι η ανακάλυψη νέων μικρομοριακών αναστολέων για τον Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (Tumour Necrosis Factor, TNF). Ο TNF έχει συσχετισθεί με αυτοάνοσες διαταραχές όπως ψωρίαση, νόσος του Crohn, νόσος του Alzheimer και παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η αντι-TNF θεραπεία χρησιμοποιείται για ασθένειες όπως η αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα, η ρευματοειδής και ψωριασική αρθρίτιδα, η ψωρίαση, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου κ.ά.

Το SPD304 είναι ένα μικρό μόριο που αναστέλλει τη δράση του TNF καθώς αλληλεπιδρά με το τριμερές της πρωτεΐνης, προωθεί τον αποτριμερισμό της και έτσι προκύπτει ένα ανενεργό διμερές. Το SPD304 είναι τοξικό και για τον λόγο αυτό δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί σαν φαρμακευτική ουσία στην αντι-TNF θεραπεία αλλά σαν βάση για την ανακάλυψη νέων μικρομοριακών αναστολέων που εμποδίζουν τον τριμερισμό της πρωτεΐνης. Επομένως, η ανάπτυξη μικρομοριακών αναστολέων του TNF χαμηλής τοξικότητας παραμένει ένας διακαής στόχος.

Το αντικείμενο του προγράμματος RLead ήταν η ανακάλυψη μικρομοριακών αναστολέων του TNF και σε αυτό το πλαίσιο σχεδιάστηκε και συντέθηκε μια σειρά αναλόγων του SPD304 με σκοπό τη μείωση της τοξικότητας και την ενίσχυση της βιοδραστικότητας. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις που προέκυψαν από *in silico* μελέτες ελλιμενισμού (docking studies) αλλά και ενώσεις που σχεδιάστηκαν βάσει των ενδιάμεσων αποτελεσμάτων των μελετών πρόσδεσης.

Για την αξιολόγηση των πιθανών προσδετών μετρήθηκε η σταθερά διάσπασης (dissociation constant,  $K_d$ ) με φασματοσκοπία φθορισμού. Παράλληλα, μελετήθηκε ο μηχανισμός πρόσδεσης με την τεχνική της Ισόθερμης Θερμιδομετρίας Τυλοδότησης (ITC). Επίσης μελετήθηκε κρυσταλλογραφικά ο



τρόπος πρόσδεσης του SPD304 στην πρωτεΐνη TNF που χρησιμοποιήθηκε και στις μελέτες πρόσδεσης. Για όλες τις παραπάνω μελέτες προηγήθηκε έκφραση του TNF σε κύτταρα *E-coli* και καθαρισμός βάσει ενός πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε.

Ένα σοβαρό πρόβλημα που εμφανίστηκε και αντιμετωπίστηκε με επιτυχία κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας, ήταν η χαμηλή υδατική διαλυτότητα των υπό μελέτη ουσιών. Μελετήθηκαν συγκεκριμένες τεχνικές για την ενίσχυση της διαλυτότητας και δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο διάλυσης μικρών μορίων. Το πρωτόκολλο αυτό διαμορφώθηκε έτσι ώστε να είναι συμβατό με τις βιοχημικές δοκιμές πρόσδεσης όπως και με την πρωτεΐνη. Εκτός από τις *in vitro* βιοχημικές δοκιμές οι τεχνικές αυτές μπορούν να αποτελέσουν ένα δυνατό εργαλείο και στην κρυστάλλωση πρωτεϊνικών συμπλόκων με μικρά φαρμακευτικά μόρια.

Μελετήθηκε μια σειρά 86 αναλόγων του SPD304 καθώς και μία σειρά 60 πιθανών αναστολέων που προέκυψαν από μελέτες ελλειμνισμού. Η πλειοψηφία των μορίων αυτών δεν ήταν αρκετά υδατοδιαλυτή έτσι ώστε να μετρηθεί η σταθερά διάσπασης. Με τις μελέτες διαλυτότητας κατέστη δυνατό οι περισσότερες από αυτές να διαλυθούν αρκετά έτσι ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της σταθεράς διάσπασης. Στο πλαίσιο των μελετών διαλυτότητας αξιολογήθηκε η επίδραση της προσθήκης συνδιαλυτών (DMSO, PEG3350) και άλλων προσθέτων (β-κυκλοδεξτρίνης) όπου φάνηκε ότι η PEG3350 είναι πιο αποτελεσματική από το DMSO για μετρίως αδιάλυτα μόρια και ότι η β-κυκλοδεξτρίνη είναι καταλληλότερη σε περιπτώσεις εξαιρετικά αδιάλυτων μορίων. Επίσης μελετήθηκε η επιρροή του χρόνου διάλυσης, της αρχικής φάσης των χημικών ενώσεων (στερεή/ υγρή) και του φιλτραρίσματος των δειγμάτων πριν από τη μέτρηση της διαλυτότητας.

Οι μελέτες δραστηριότητας ανέδειξαν περίπου 30 ενώσεις με δραστηριότητα καλύτερη εκείνης του SPD304 (<5μM) και 20 ενώσεις με εφάμιλλη του SPD304 δραστηριότητα (~5μM). Μερικές από αυτές είχαν σαφώς μειωμένη τοξικότητα. Το ποσοστό των ενώσεων που ήταν αδιάλυτες σε καθαρά υδατικά διαλύματα το οποίο είχε υπολογιστεί σε 76%, βάσει των μελετών διαλυτότητας, με τη χρήση συνδιαλυτών και άλλων τεχνικών ενίσχυσης της διαλυτότητας μειώθηκε σε 20%. Αυτό σημαίνει ότι έγινε εφικτή η ικανοποιητική διάλυση του 80% των ενώσεων έτσι ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της σταθεράς διάσπασής τους.

Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα διαλυτότητας δημιουργήθηκε ένα μοντέλο πρόβλεψης διαλυτοτήτων (Novamechanics) το οποίο στηρίζεται στην ταξινόμηση διαχωρίζοντας τις αδιάλυτες από τις διαλυτές ενώσεις. Το μοντέλο Ποσοτικής Συσχέτισης Δομής Ιδιότητας (predictive Quantitative Structure Property Relationship model) στοχεύει στην πρόβλεψη της διαλυτότητας πιθανών μικρομοριακών αναστολέων του TNF σε υδατικά διαλύματα παρουσία 5% DMSO. Η απλότητα της προτεινόμενης μεθόδου την καθιστά ευρέως εφαρμόσιμη σε υπολογιστική διαλογή (virtual screening) και εξαγωγή δεδομένων (data mining) για την ταυτοποίηση διαλυτών μορίων.

## *Abstract*

The subject of this thesis is the discovery of novel small-molecule inhibitors of Tumor Necrosis Factor (TNF). TNF has been related to autoimmune diseases such as psoriasis, Crohn's disease, Alzheimer's disease and plays a pivotal role in Rheumatoid Arthritis pathogenesis. Anti-TNF therapy is used for diseases such as ankylosing spondylitis, rheumatoid and psoriatic arthritis, psoriasis, inflammatory bowel disease etc.

SPD304 is a small molecule that inhibits the activity of TNF by interacting with the protein trimer, promoting protein detrimerization and thus an inactivated dimer is formed in complex with SPD304. SPD304 is toxic and for this reason it can not be utilized as a drug for anti-TNF therapy but only as a basis for the discovery of new small-molecule inhibitors that prevent protein trimerization. Thus, the development of small-molecule TNF inhibitors remains a desirable goal.

The subject of RALeAD project was the discovery of small-molecule TNF inhibitors and for this purpose a series of SPD304 analogs was designed and synthesized aiming at the elimination of toxicity and the enhancement of activity. Additionally, commercially available compounds that have risen from docking studies as well as compounds designed on the basis of the results of the binding assays were studied.

For the evaluation of the potential inhibitors the dissociation constant ( $K_d$ ) was measured with fluorescence spectroscopy. The binding mechanism was studied with Isothermal Titration Calorimetry (ITC). The binding mode of SPD304 to TNF protein used for the binding assays, was studied with X-ray crystallography. For all the assays above, TNF was expressed as a GST-

protein in *E-coli* cells and purified according to the protocol that was developed.

A serious problem that has risen during this study was the low aqueous solubility of the studied compounds. Techniques on solubility enhancement were studied and a solubilization protocol for small molecules was developed. This protocol was adapted to the binding assay in order to be compatible with the assay and the protein. Except for *in vitro* biochemical assays such techniques can be a powerful tool in crystallization of protein complexes with small molecules.

A series of 86 SPD304 analogues were studied together with 60 potential inhibitors derived from docking studies. The majority of these compounds was not soluble enough for the measurement of dissociation constant. With solubility enhancement most of them became sufficiently soluble and the binding studies took place. During solubility studies different cosolvents (DMSO, PEG3350) and other additives ( $\beta$ -cyclodextrin) were tested and it was shown that PEG3350 is more effective than DMSO for moderately insoluble compounds while  $\beta$ -cyclodextrin is efficient even for extremely insoluble compounds. Furthermore, factors that affect solubility such as dissolution time, initial state of the compound and filtering of the sample before the measurement were studied.

Binding studies showed that 30 compounds were more active than SPD304 ( $<5\mu\text{M}$ ) and 20 more had similar activity with SPD304 ( $\sim 5\mu\text{M}$ ). Some of them had also decreased toxicity. The percentage of the compounds that were initially insoluble in aqueous solutions was calculated at 76% and after the solubility studies it decreased to 20%. This means that finally 80% of the compounds was soluble enough for the binding assays.

An aqueous solubility prediction model was developed (Novamechanics) which was based on the above results. This predictive Quantitative Structure Property Relationship model categorizes soluble from insoluble compounds. It aims at solubility prediction of small-molecule candidate inhibitors of TNF in aqueous solutions with 5% DMSO. The simplicity of the proposed method makes it broadly applicable to virtual screening and data mining in order to identify soluble molecules.

## 1. Εισαγωγή TNF

### 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

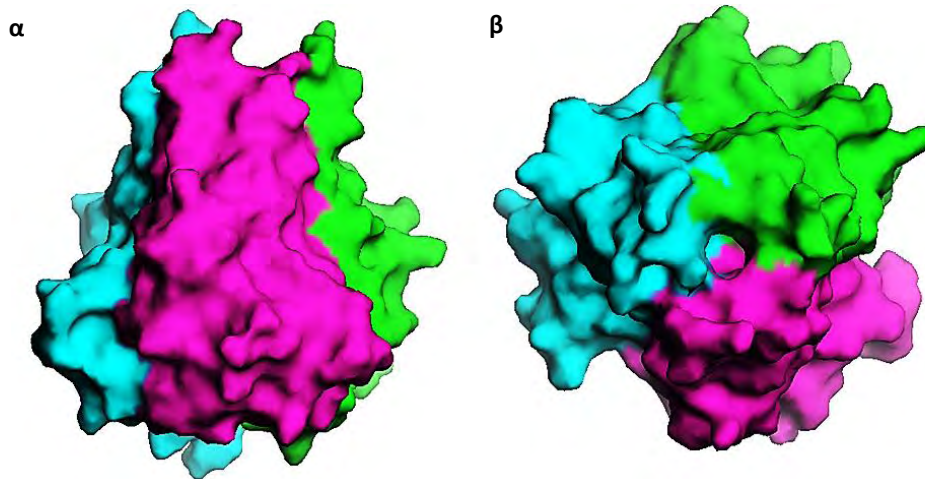
Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων TNF (ή αλλιώς καχεκτίνη) είναι μια κυτταροκίνη οξείας φάσης. Η αρχική του ονομασία ήταν Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων – α (Tumor Necrosis Factor – alpha, TNF-α) αλλά έχει επικρατήσει ως TNF. Ανήκει στην υπεροικογένεια TNF η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 20 διαφορετικά μέλη (Πίνακας 1.1). Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και δευτερευόντως από άλλα είδη κυττάρων όπως Β-λεμφοκύτταρα, CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα, ουδετερόφιλα, ιστιοκύτταρα, ηωσινόφιλα και νευρώνες (Martin and Dorf, 1990). Είναι ένα ενδογενές πυρετογόνο που εμπλέκεται στην καχεξία και τη φλεγμονώδη απόκριση σε τραυματισμούς των ιστών και σε μολύνσεις τόσο από βακτήρια όσο και από ιούς.

Κυτταρική έκφραση των ligands και των υποδοχέων της υπεροικογένειας TNF			
Κυτταροκίνη	Κύτταρα	Υποδοχέας	Κύτταρα
LTα	NK, T and B cells	TNFR1 TNFR2	Most normal and transformed cells Endothelial cells and immune cells
TNF	Macrophages, NK, T and B cells	TNFR1, TNFR2	See above
LTβ	DCs, macrophages, T, B and NK cells	LTβR	NK cells, CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T cells
CD95L	Activated splenocytes, thymocytes and non-lymphoid tissues, such as the eye and testis	CD95	Most normal and transformed cells
		DCR3	Lung and colon cells
TRAIL	NK cells, T cells and DCs	DR4, DR5 DCR1, DCR2, OPG	Most normal and transformed cells Most normal and transformed cells
TWEAK	Monocytes	FN14	Endothelial cells and fibroblasts
CD27L	NK, T and B cells	CD27	CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T cells
CD30L	T cells and monocytes	CD30	Reed-Sternberg cells
CD40L	T and B cells	CD40	Reed-Sternberg cells
4-1BBL	B cells, DCs and macrophages	4-1BB	Activated T cells, monocytes and NK cells
OX40L	T and B cells	OX40	T cells
APRIL	Macrophages, lymphoid cells and tumour cells	BCMA TACI	B cells, PBLs, spleen, thymus, lymph nodes, liver and adrenals B cells, PBLs, activated T cells, spleen, thymus and small intestine
BAFF	T cells, DCs, monocytes and macrophages	TACI BCMA BAFFR	See above See above B cells, PBLs, resting T cells, spleen and lymph nodes
LIGHT*	T cells, granulocytes, monocytes and DCs	HVEM LTβR	T cells Non-lymphoid haematopoietic cells and stromal cells
VEG1*	Endothelial cells	DR3, DCR3	Activated T cells
GITRL	N. D.	GITR	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T cells
RANKL	Activated T cells and osteoblasts	RANK OPG	Osteoclasts, osteoblasts and activated T cells Osteoclast precursors, endothelial cells and others
EDA1	Skin	EDAR	Ectodermal derivative
EDA2	Skin	XEDAR	Ectodermal derivative

**Πίνακας 1.1** Κυτταρική έκφραση προσδετών και υποδοχέων της υπεροικογένειας TNF (Aggarwal, 2003).

Ο TNF χαρακτηρίζεται κυρίως από την ιδιότητά του να ρυθμίζει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και να επάγει την απόπτωση κυττάρων όγκων. Αν και η δράση του ως αντικαρκινικός παράγοντας είναι ιδιαίτερα περιορισμένη, η ονομασία του έχει παραμείνει για ιστορικούς λόγους. Θεωρείται κεντρικός μεσολαβητής για ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών με πιο γνωστή την ευεργετική επίδραση στον ξενιστή κατά τη φλεγμονή και την προστατευτική ανοσολογική απόκριση απέναντι σε διάφορους μολυσματικούς παθογόνους οργανισμούς. Τα μέλη της υπερικογένειας TNF παράλληλα εμφανίζουν καταστροφική επίδραση στα κύτταρα του ξενιστή κατά τη σήψη (μέσω κυττάρων που παράγουν ιντερλευκίνες I και II), την καχεξία όγκων καθώς και τις αυτοάνοσες ασθένειες. Επίσης, είναι πλέον γνωστός ο ουσιώδης ρόλος των κεντρικών μελών της υπερικογένειας TNF (όπως LT-α, LT-β, TNF και LIGHT) καθώς και των υποδοχέων τους κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης των δευτερευόντων λεμφικών οργάνων και τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των λεμφικών ιστών (Pfeffer, 2003).

Στην αρχική του μορφή ο TNF είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II μήκους 233 αμινοξέων που σχηματίζει σταθερά ομοτριμερή (Kriegler et al., 1988; Tang et al., 1996). Από αυτόν απελευθερώνεται στο αίμα και στα άλλα βιολογικά υγρά το υδατοδιαλυτό τμήμα (V77-L233) μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης από τη μεταλλοπρωτεάση TACE (Black et al., 1997). Το υδατοδιαλυτό τριμερές του TNF (51 kDa) έχει πυραμιδοειδές σχήμα (Εικόνα 1.1α) και τείνει να αποτριμερίζεται σε συγκεντρώσεις κάτω της κλίμακας των νανογραμμομορίων χάνοντας έτσι τη δραστικότητά του. Αμφότερες η διαμεμβρανική και η υδατοδιαλυτή μορφή του TNF είναι βιολογικά ενεργές επιτελώντας κάποιες κοινές και κάποιες ανεξάρτητες λειτουργίες και δεσμεύονται στους υποδοχείς TNFR1 και TNFR2.



**Εικόνα 1.1** Τριμερές TNF: **α.** πρόσοψη και **β.** κάτοψη (Pdb database, entry: 1TNF).

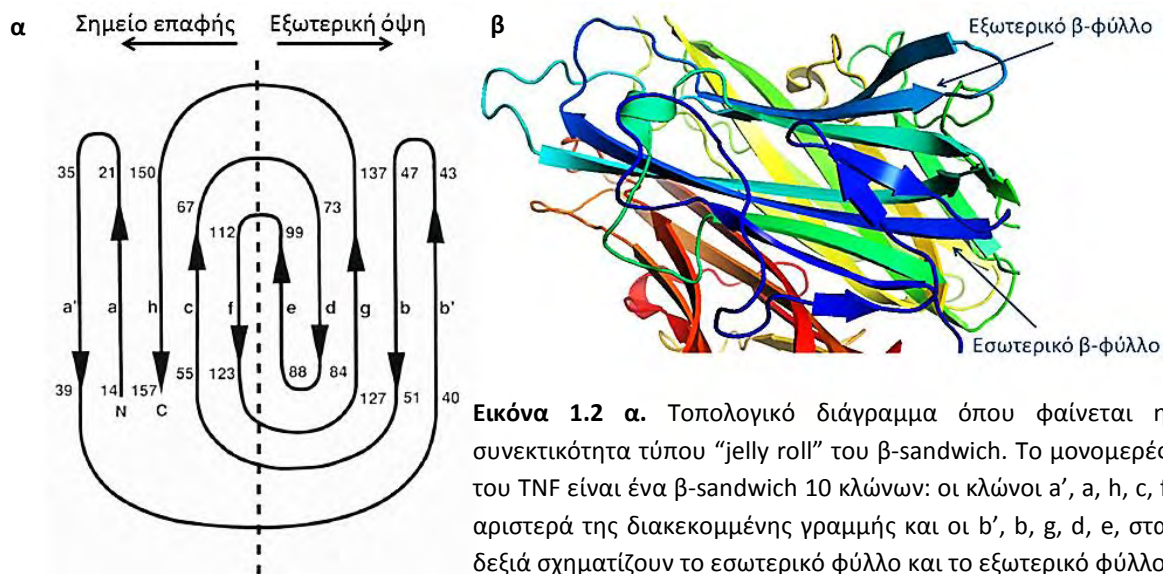
## 1.2 Δομή και λειτουργία TNF

### 1.2.1 Γενικά δομικά χαρακτηριστικά TNF

Τα μονομερή του διαλυτού TNF έχουν μοριακό βάρος 17.35 kDa και αποτελούνται από 157 αμινοξέα. Το τριμερές φέρει δυο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα με αντιπαράλληλους β-κλώνους, που σχηματίζουν ένα β-sandwich με τοπολογία “jelly roll” βαρελιού, τυπικού για την οικογένεια TNF αλλά και για μερικές πρωτεΐνες της ιικής κάψας. Το εσωτερικό φύλλο (κλώνοι a', a, c, f, h) σχετίζεται με τα σημεία επαφής των μονομερών για τον σχηματισμό τριμερούς, ενώ το εξωτερικό φύλλο (κλώνοι b', b, g, d, e) σχηματίζει την εξωτερική επιφάνεια του τριμερούς (Εικόνα 1.2).

Οι κλώνοι a και h που βρίσκονται στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα, πακετάρονται μαζί και διαμορφώνουν τους δύο πρώτους κλώνους του εσωτερικού φύλλου το οποίο είναι επίπεδο σε αντίθεση με το εξωτερικό που είναι εξαιρετικά πτυχωμένο (Εικόνα 1.2β). Τα κατάλοιπα 8-12 συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις του τριμερούς.



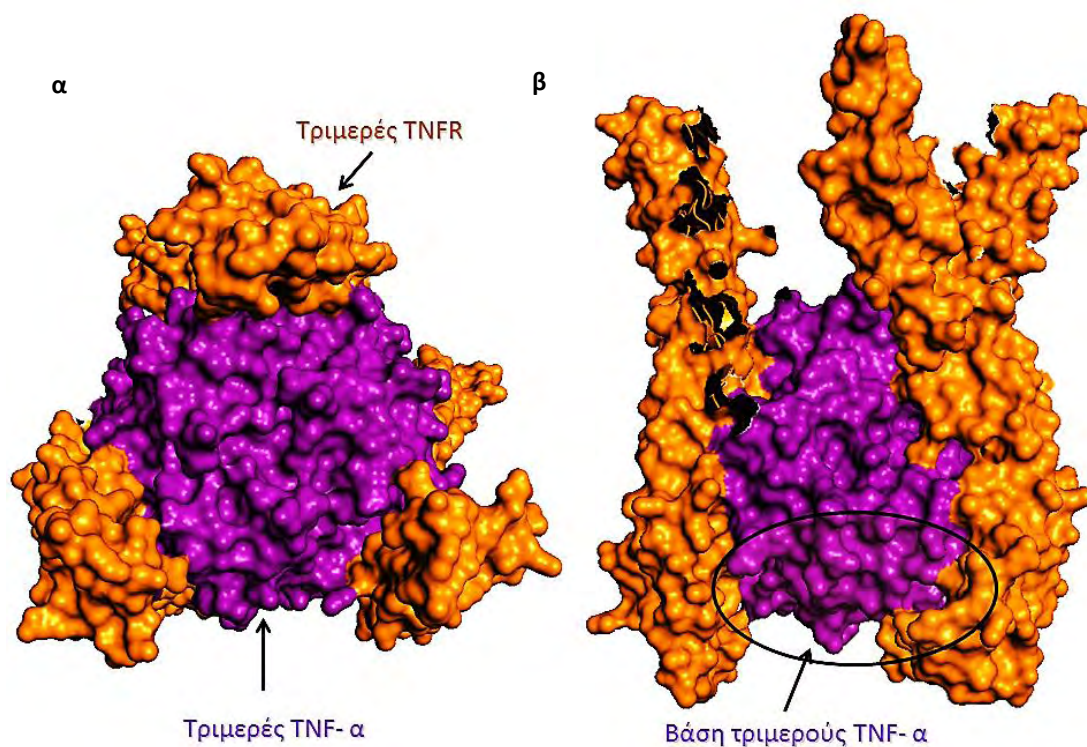


**Εικόνα 1.2** α. Τοπολογικό διάγραμμα όπου φαίνεται η συνεκτικότητα τύπου “jelly roll” του β-sandwich. Το μονομέρες του TNF είναι ένα β-sandwich 10 κλώνων: οι κλώνοι α', α, η, c, f αριστερά της διακεκομμένης γραμμής και οι β', b, g, d, e, στα δεξιά σχηματίζουν το εσωτερικό φύλλο και το εξωτερικό φύλλο

αντίστοιχα. Οι κλώνοι έχουν επισημανθεί με τα γράμματα a-h σύμφωνα με τη σειρά που ακολουθούν στην πολυπεπτιδική αλληλουχία. Τα α' και β' αντιστοιχούν σε μετατοπίσεις από τους κλώνους a και b αντίστοιχα οι οποίες σχηματίζουν επιπλέον μικρούς κλώνους που πακετάρονται απέναντι από τους κλώνους a και b (Ecks and Sprang, 1989). β. Δομή εσωτερικού και εξωτερικού φύλλου (Pdb database, entry: 1TNF).

### 1.2.2 Δομική ομοιότητα TNF με άλλες πρωτεΐνες

Η εξέταση αυτού του μοντέλου και η σύγκρισή του με άλλες γνωστές δομές πρωτεϊνών, δείχνει μεγάλη δομική ομοιότητα με αρκετές πρωτεΐνες ιών και ιδιαίτερα του ιού δορυφόρου νέκρωσης του καπνού (satellite tobacco necrosis virus). Επίσης περιοχές συντηρημένων αμινοξέων στις πρωτεΐνες TNF και λεμφοτοξίνης-α (TNF-β ή αλλιώς LT-α) οι οποίες δεσμεύονται στον κοινό υποδοχέα TNFR1 αντικατοπτρίζουν το γεγονός ότι οι δυο πρωτεΐνες δεσμεύονται σαν τριμερή και η περιοχή πρόσδεσής τους με τον υποδοχέα βρίσκεται στη βάση του τριμερούς τους (Ecks and Sprang, 1989, Εικόνα 1.3).

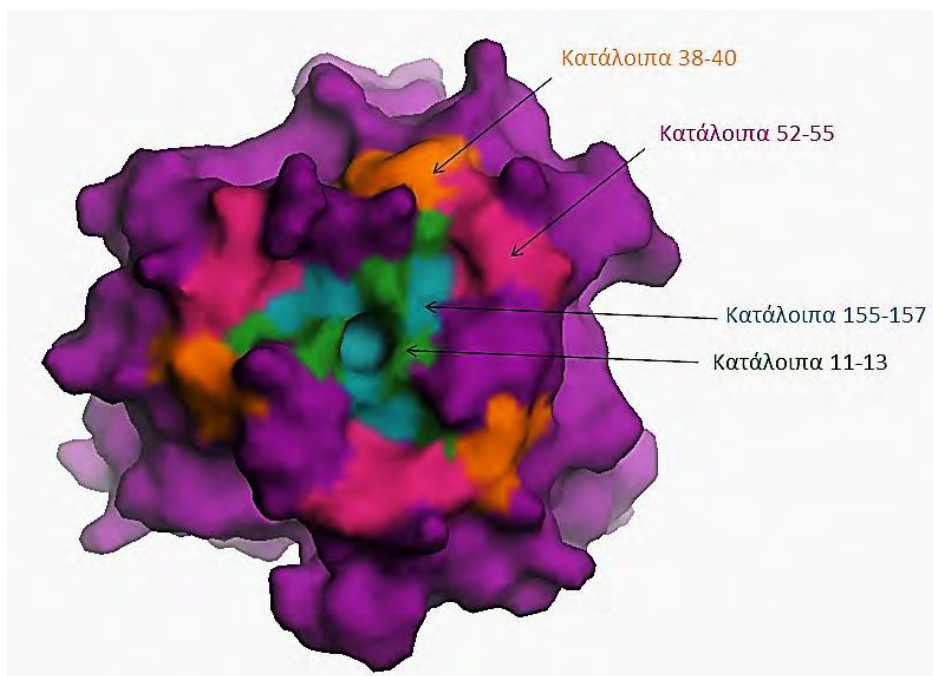


**Εικόνα 1.3** Σύμπλοκο TNF με TNFR **α.** κάτωψη, **β.** πρόσοψη (Pdb database, entry: 1TNF).

### 1.2.3 Κατανομή αμινοξέων και δομικά μοτίβα

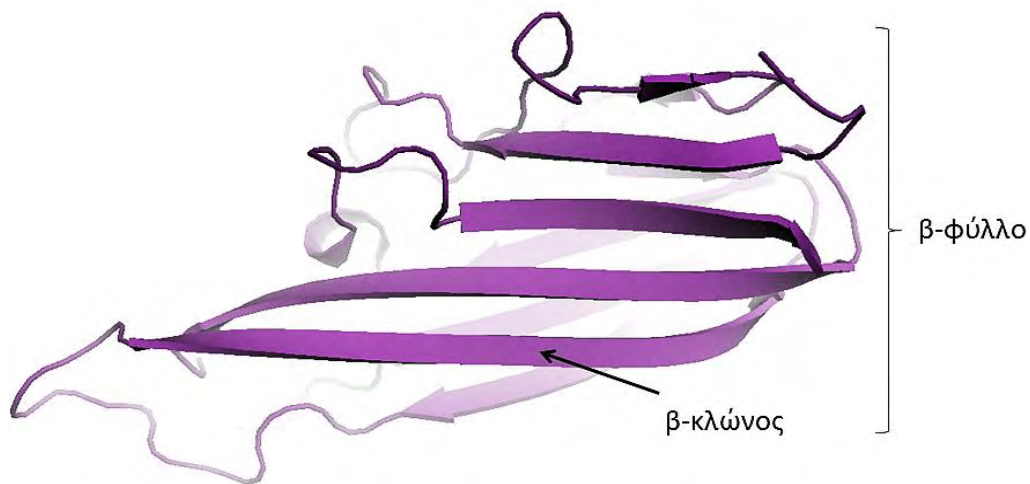
Η χωρική κατανομή των αμινοξικών πλευρικών ομάδων του TNF είναι τυπική για τις β-sandwich πρωτεΐνες: το εσωτερικό της υπομονάδας είναι στενά πακεταρισμένο κυρίως με τις πλευρικές ομάδες υδρόφοβων αμινοξέων. Η βασική ακολουθία στους κλώνους α', α, h, c, f στο εσωτερικό φύλλο και στο άκρο του sandwich δεν εναλλάσσεται ανάμεσα σε υδρόφοβα και υδρόφιλα αμινοξέα όπως θα ήταν αναμενόμενο για ένα αμφίφυλο β-βαρέλι. Στους κλώνους που απαρτίζουν τον β-πυρήνα του sandwich καθώς και την περιοχή της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης των υπομονάδων του τριμερούς, εμφανίζονται διαστήματα τριών ή και περισσότερων υδρόφοβων αμινοξέων. Κοντά στη βάση των υπομονάδων, όπου τα αμινοξέα του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου βρίσκονται σε στενή επαφή, υπάρχει μια αβαθής κοιλότητα που περιστοιχίζεται από τα αμινοξέα 11-13, 38-40, 51-55 και 155-157 (Εικόνα 1.4)

τα οποία αντιστοιχούν είτε σε προεκτάσεις (extensions) των β-κλώνων (αμινοξέα 11-13 στον κλώνο α και 155-157 στον κλώνο η) είτε σε πολυπεπτιδικές λούπες που συνδέουν β-κλώνους (τα αμινοξέα 37-42 συνδέουν τον κλώνο α με τον κλώνο β ενώ τα αμινοξέα 49-57 συνδέουν τον κλώνο β με τον κλώνο γ). Η πλευρική αλυσίδα της Tyr-56 προβάλλει μέσα σε αυτή την κοιλότητα η οποία καλύπτεται πρωτίτως από τις πολικές και μικρές υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων: Lys-11, Pro-12, Val-13, Ala-14, Ala-38, Asn-39, Gly-40, Ser-52, Glu-53, Gly-54, Ala-156. Η υδροξυλομάδα της Tyr-56 στην εσωτερική επιφάνεια της κοιλότητας βρίσκεται περίπου 3.5 Å κάτω από το επίπεδο που σχηματίζεται από τις πολυπεπτιδικές συνδετικές λούπες και μπορεί να είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την πρόσδεση του υποδοχέα. Οι τρεις υπομονάδες του τριμερούς του TNF είναι εικονικά πανομοιότυπες στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή αλλά εμφανίζουν κάποιες τοπικές δομικές διαφορές.

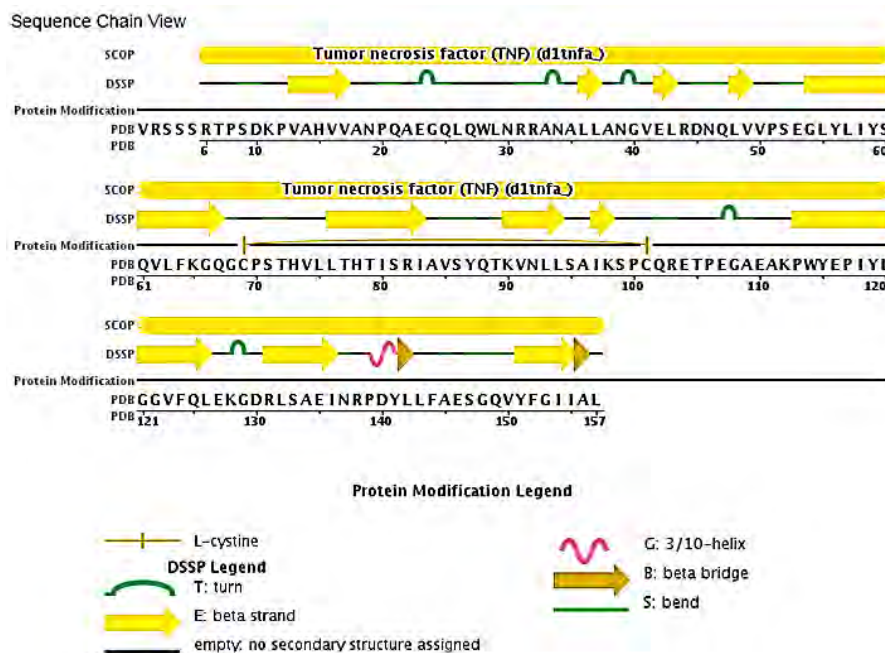


**Εικόνα 1.4** Ομάδες αμινοξέων που περιστοιχίζουν την αβαθή κοιλότητα που σχηματίζεται στη βάση των υπομονάδων οι οποίες σχηματίζουν το τριμερές (Pdb database, entry: 1TNF).

Καθώς μετακινούμαστε από το αμινοτελικό στο καρβοξυτελικό άκρο του κάθε φύλλου οι β-κλώνοι είναι προοδευτικά μακρύτεροι δίνοντας στο μόριο μια κλιμακωτή όψη (Εικόνα 1.5). Ολόκληρο το μόριο του TNF έχει μήκος περίπου 55 Å κατά μήκος των κλώνων, 25 Å κατά μήκος του φύλλου και 20 Å από φύλλο σε φύλλο. Στο μονομερές του TNF υπάρχουν συνολικά πέντε βρόχοι και ένα ελικοειδές τμήμα (Εικόνα 1.6).



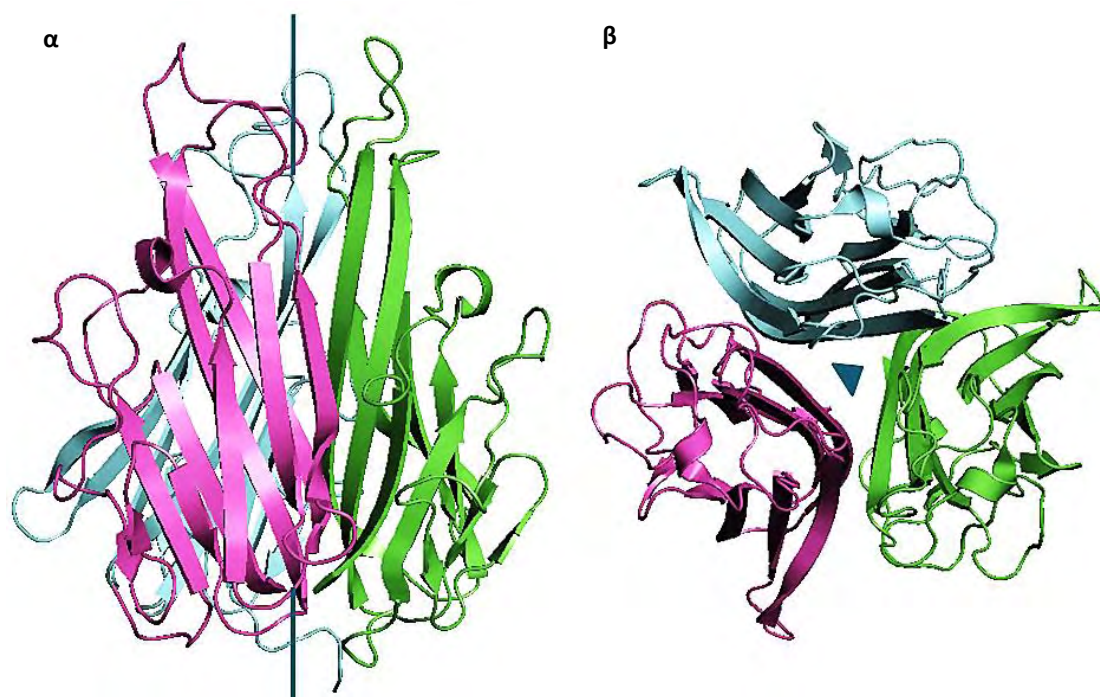
**Εικόνα 1.5** Μονομερές TNF: η προοδευτική επιμήκυνση των β-κλώνων δίνουν στο μόριο μια κλιμακωτή όψη (Ecks and Sprang, 1989).



**Εικόνα 1.6** Η αμινοξική αλληλουχία και τα δομικά στοιχεία του TNF (Pdb database, entry: 1TNF).

#### 1.2.4 Συμμετρία κρυσταλλικής δομής

Στο τριμερές του TNF οι υπομονάδες πακετάρονται γύρω από έναν τριπλό άξονα συμμετρίας (Εικόνα 1.7). Στους τετραγωνικούς κρυστάλλους ο άξονας του τριμερούς σχηματίζει μια κατά προσέγγιση τριπλή συμμετρία. Είναι συστρεμμένος κατά  $40^\circ$  σε σχέση με τον άξονα  $\psi$  της κυψελίδας και σχηματίζει μια γωνία  $140^\circ$  με το κρυσταλλογραφικό επίπεδο  $xz$ . Αυτή η απόκλιση από την κανονική τριπλή συμμετρία εμφανίζεται σαν μια συνέπεια των μη ισοδύναμων περιβαλλόντων όπου πακετάρονται οι τρεις υπομονάδες καθώς κάθε υπομονάδα του τριμερούς συμμετέχει σε ελαφρώς διαφορετικές επαφές με τα γειτονικά μονομερή κατά το πακετάρισμα.



**Εικόνα 1.7** Δομή του τριμερούς του TNF (1TNF, RCSB Protein Data Bank). Τα μονομερή αλληλεπιδρούν και διαμορφώνουν συμπαγή ομοτριμερή σε σχήμα καμπάνας με έναν κατά προσέγγιση τριπλό άξονα συμμετρίας (Ecks and Sprang, 1989). **α.** εμπρόσθια όψη. **β.** κάτωψη (άξονας C3).

Η έλλειψη ισοδυναμίας των τριμερών του TNF σε τετραγωνικούς κρυστάλλους είναι ενδεικτική του βαθμού στον οποίο οι δυνάμεις που αναπτύσσονται κατά το πακετάρισμα μπορούν να μεταβάλλουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε

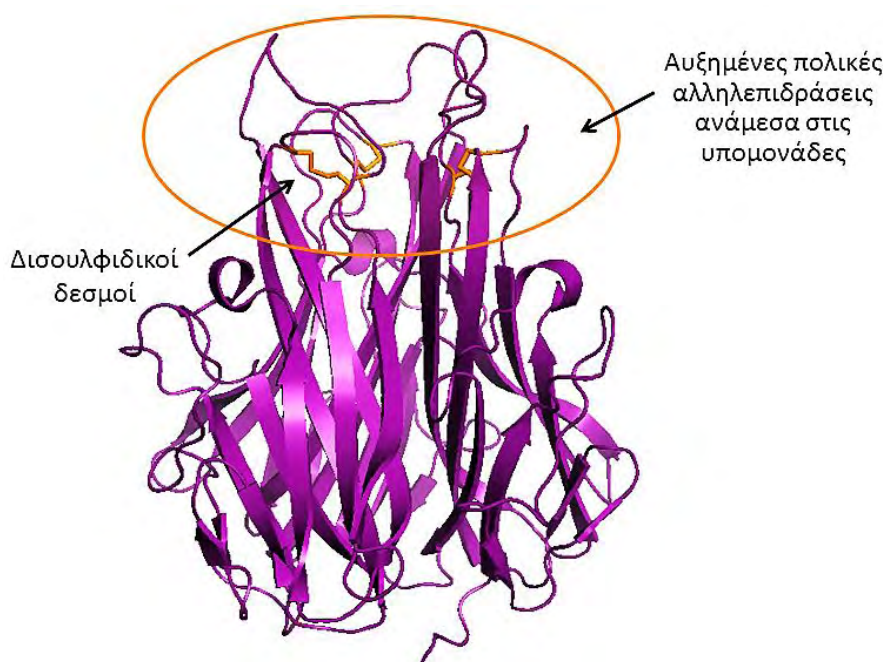
πρωτεϊνικά μόρια και υποδεικνύει τη δυνατότητα μη συμμετρικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο τριμερές του TNF και τον υποδοχέα του (Ecks and Sprang, 1989). Σε αντίθεση με τους τετραγωνικούς κρυστάλλους του TNF οι ρομβοεδρικές και κυβικές κρυσταλλικές μορφές που έχουν αναφερθεί για τον TNF περιέχουν σχεδόν πάντα τριμερή με ακριβώς τριπλή συμμετρία (Eck et al., 1988).

#### *1.2.5 Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις τριμερούς*

Η πλειοψηφία των εκτεταμένων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις υπομονάδες συμπεριλαμβάνουν υδρόφοβα αμινοξέα και περίπου 2200 Å<sup>2</sup> ανά υπομονάδα βρίσκονται θαμμένα στο εσωτερικό του τριμερούς. Ανάμεσα στα περίπου 40 αμινοξέα οι πλευρικές αλυσίδες των οποίων είναι πακεταρισμένες στην περιοχική αλληλεπίδραση των υπομονάδων, 18 είναι γλυκίνες, αλανίνες, βαλίνες, λευκίνες, ισολευκίνες ή προλίνες, 5 είναι τυροσίνες ή φαινυλαλανίνες, 8 είναι μη φορτισμένα πολικά αμινοξέα και τα υπόλοιπα είναι φορτισμένα. Οι πολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις υπομονάδες δεσπόζουν στην κορυφή του τριμερούς κοντά στον δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στα αμινοξέα 69 και 101 (Εικόνα 1.8). Εδώ ο τριπλός άξονας συμμετρίας διέρχεται μέσα από το ανοικτό, πολικό κανάλι που ορίζουν τα καρβονυλικά οξυγόνα και οι αμιδικές ομάδες -NH των β-κλώνων f και e.

Περίπου στο κέντρο του τριμερούς, το κανάλι που σχηματίζουν οι υπομονάδες στενεύει και πακετάρεται στενά με υδρόφοβα αμινοξέα. Η πλευρική αλυσίδα της Tyr-119 αποτελεί την πιο κοντινή κοινή αλληλεπίδραση ανάμεσα στις τρεις υπομονάδες γύρω από τον τριπλό άξονα. Οι Leu-57 και Leu-157 τυλίγονται γύρω από τον τριπλό άξονα κοντά στη βάση του μορίου συμπληρώνοντας τον υδρόφοβο πυρήνα του τριμερούς. Στη βάση του τριμερούς επίσης η Lys-11 της

μιας υπομονάδας σχηματίζει μια γέφυρα άλατος με το καρβοξυτελικό άκρο (Leu-157) της γειτονικής υπομονάδας.



**Εικόνα 1.8** Στην κορυφή του τριμερούς παρατηρούνται αυξημένες πολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις υπομονάδες καθώς και τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα στα αμινοξέα C69 και C101 (Pdb database, entry: 1TNF).

Τα β-φύλλα των sandwiches των γειτονικών υπομονάδων της πρωτεΐνης εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις κάθετων επιφανειών (“edge to face” ή αλλιώς “butt joint” interactions): οι άκρες των κλώνων e και f διασταυρώνονται με την εσωτερική πρόσοψη του εσωτερικού β-φύλλου της γειτονικής υπομονάδας υπό γωνία 30°. Η γωνία αυτή επιτρέπει ένα πλήθος επαφών ανάμεσα στα αμινοξέα. Σχεδόν κάθε δεύτερο αμινοξύ στους κλώνους e και f το οποίο συμμετέχει εκτενώς στην παραπάνω αλληλεπίδραση, εμπλέκεται στις επαφές του τριμερούς. Η αλληλεπίδραση κάθετων επιφανειών, είναι μια διμερής επαφή ανάμεσα στις γειτονικές υπομονάδες και χαρακτηρίζεται από επαφές ανάμεσα σε πλευρικές ομάδες του εσωτερικού φύλλου (face) και την κύρια αλυσίδα του εσωτερικού φύλλου (edge). Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σε αυτό το σημείο επαφής περιλαμβάνουν άτομα πλευρικών αλυσίδων των κλώνων h, c και f της

μιας υπομονάδας με άτομα πλευρικών αλυσίδων που προεξέχουν μέσα στο β-φύλλο της γειτονικής υπομονάδας. Έτσι σε αυτή την επαφή υπάρχει μια μικρή διείσδυση των πλευρικών αλυσίδων του “face” εσωτερικού φύλλου καθώς αυτές προεξέχουν κάθετα στις ομάδες των κλώνων του “edge” εσωτερικού φύλλου. Σε αυτές τις επαφές δεσπόζει μια συστοιχία αρωματικών αμινοξέων: Tyr-59, Tyr-119, Tyr-153 στο εσωτερικό φύλλο και Phe-124 στον κλώνο f της γειτνιαζουσας υπομονάδας.

### *1.3 Υποδοχείς TNF και σηματοδοτικά μονοπάτια*

#### *1.3.1 Υποδοχείς TNF*

Στην ενεργή τους μορφή ένα μικρό ποσοστό των υποδοχέων της οικογένειας TNF δεν περιέχει διαμεμβρανική περιοχή (π.χ. DcR3, OPG) ενώ η πλειοψηφία τους σχηματίζει τριμερή σύμπλοκα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη έπειτα από την πρόσδεση των προσδετών τους. Ωστόσο κάποιοι από αυτούς συναντώνται τόσο στη διαμεμβρανική όσο και στη διαλυτή τους μορφή (π.χ. TNFR1). Οι περισσότεροι χρειάζονται κάποια συγκεκριμένη πρωτεΐνη-προσαρμογέα (όπως TRADD, TRAF, RIP και FADD) για να μεταδώσουν το σήμα τους. Ο λειτουργικός τους ρόλος εμπλέκεται πρωτίστως στην απόπτωση και στη φλεγμονή αλλά μπορούν να συμμετάσχουν και σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση. Οι υποδοχείς της οικογένειας TNF (Πίνακας 1.2) στα θηλαστικά εκφράζονται σε πολλά είδη ιστών κυρίως σε λευκοκύτταρα (Gravestain and Borst, 1998).

Ο όρος υποδοχέας νέκρωσης αναφέρεται στα μέλη εκείνα της οικογένειας των TNF υποδοχέων που περιλαμβάνουν περιοχές νέκρωσης (death domains) όπως είναι οι TNFR1, Fas, DR4 και DR5 (Gravestain and Borst, 1998). Ονομάστηκαν έτσι λόγω του σημαντικού τους ρόλου στην απόπτωση



(προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) παρόλο που είναι γνωστό ότι έχουν και επιπρόσθετους ρόλους (Ashkenazi and Dixit, 1998). Οι υποδοχείς νέκρωσης είναι επιφανειακοί υποδοχείς που μεταφέρουν αποπτωτικά σήματα τα οποία εκκινούνται από ειδικούς προσδέτες όπως ο FasL, ο TNF και ο TRAIL. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και μπορούν να ενεργοποιήσουν έναν καταρράκτη κασπασών (caspase cascade) μέσα σε δευτερόλεπτα μετά από την πρόσδεση του προσδέτη. Η επαγωγή της απόπτωσης μέσω αυτού του μηχανισμού είναι επομένως πολύ γρήγορη.

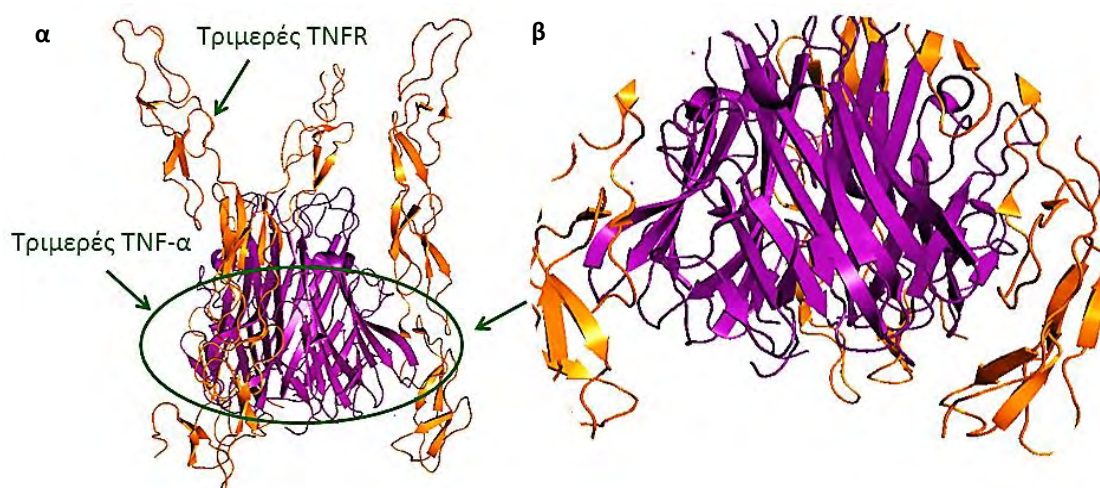
Ligands		Υποδοχείς		Λειτουργίες
Ονομασία Κοινή	Επίσημη	Άλλες ονομασίες		
TNF $\alpha$	TNFSF2		TNFR1/TNFR2	Programmed cell death/cellular proliferation/inflammatory reaction
TNF $\beta$	TNFSF1	Lt $\alpha$	TNFR1/TNFR2/HveA/LT $\beta$ R	
LT $\beta$	TNFSF3		LT $\beta$ R	Lymphoid organogenesis
Fas-L	TNFSF6	CD95L/Apo1 Ligand	Fas/DcR3	Apoptosis induction
CD40-L	TNFSF5	CD154	CD40	B-cell co-stimulation
TRAIL	TNFSF10	Apo2L	TRAIL-R1/TRAIL-R2/TRAIL-R3/TRAIL-R4/OPG	Apoptosis induction in dendritic cells
APRIL	TNFSF13	TALL-2	TACI/BCMA	T-cell and B-cell proliferation
OX40L	TNFSF4	OX-40	T-cell co-stimulation	
TALL-1	TNFSF13b	BAFF/Blys/THANK/zTNF4	BAFF-R/TACI/BCMA	B-cell development and plasma cell differentiation
TRANCE	TNFSF11	RANKL/OPGL	TRANCE-R	Dendritic cell proliferation/bone development
TWEAK	TNFSF12	Apo3L	TWEAK-R	
VEGI	TNFSF15	TL-1		
4-1BBL	TNFSF9		4-1BB	T-cell co-stimulation
CD27L	TNFSF7	CD70	CD27	
CD30L	TNFSF8		CD30	
GITRL	TNFSF18	AITRL/TL6	GITR	Regulatory T-cell function
LIGHT	TNFSF14		DcR3/HveA/LT $\beta$ R	
EDA			EDAR/XEDAR	

**Πίνακας 1.2** Μέλη της υπερικογένειας των ligands που σχετίζονται με τους TNF και οι υποδοχείς τους (Chan and Lenardo, 2002)

### 1.3.1.2 Ο ρόλος των υποδοχέων TNFR1 και TNFR2

Ο όρος υποδοχέας του TNF αναφέρεται συνήθως στα αρχέτυπα μέλη της οικογένειας TNF: τον TNFR1 (55 kDa) και τον TNFR2 (75 kDa). Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν και προσδένουν τον TNF (Εικόνα 1.9) μεταδίδοντας εν συνεχεία το σήμα του. Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες που έχουν την ιδιότητα να προσδένουν τον TNF μέσω μιας εξωκυττάριας δομικής επικράτειας πλούσιας σε

κυστεΐνες στην αμινοτελική της περιοχή (Hehlgans and Pfeffer, 2005; Locksley et al., 2001). Τμήμα των δύο αυτών διαμεμβρανικών υποδοχέων αποχωρίζεται από την επιφάνεια των κυττάρων μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης που υφίστανται από TACE (Tumor necrosis factor-Α Converting Enzyme) μεταλλοπρωτεάσες. Σε αυτή την περίπτωση δρουν ως φυσικοί αναστολείς καθώς διατηρούν την ικανότητα δέσμησης του TNF. Οι δύο υποδοχείς διαφέρουν τόσο στη συγγένεια δέσμησης όσο και στα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια.

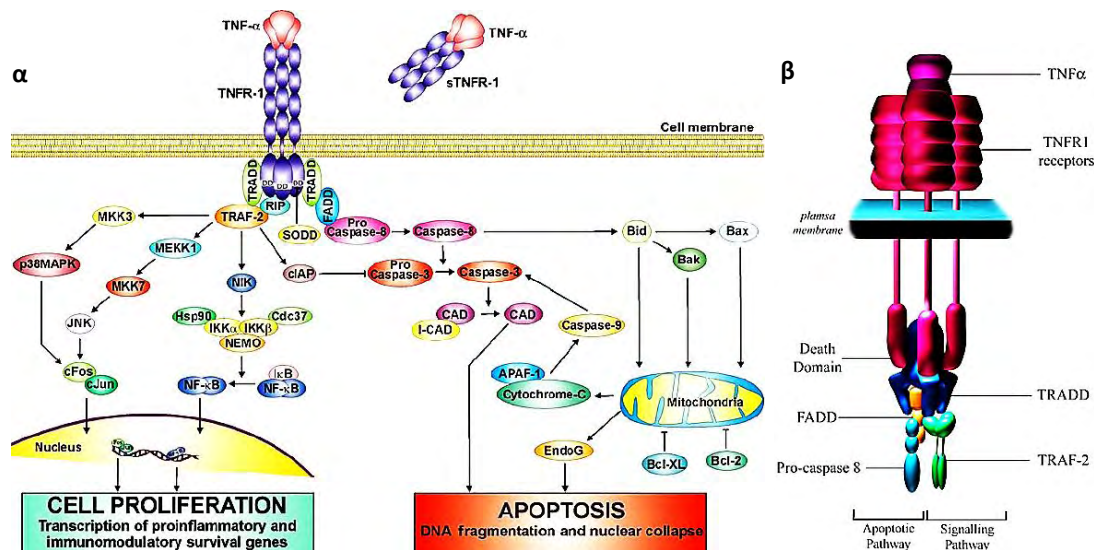


**Εικόνα 1.9** Σύμπλοκο του TNF με τον υποδοχέα TNFR2 (Mukai et al., 2010): **α.** επιμήκης πρόσοψη, **β.** κάτοψη

Ο υποδοχέας TNFR1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς και μπορεί να ενεργοποιηθεί πλήρως από αμφότερες τη διαμεμβρανική και τη διαλυτή μορφή του TNF. Ο TNFR2 συνήθως συναντάται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού (Mukai et al., 2010) και ενεργοποιείται πρωτίστως από τη διαμεμβρανική μορφή του TNF (tmTNF) (Grell et al., 1995). Μελέτες με απαλοιφή του γονιδίου του TNFR2 σε ποντίκια υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη προστατεύει τους νευρώνες από την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών αντιοξειδωτικού στρες.

### 1.3.2 Μονοπάτια TNF

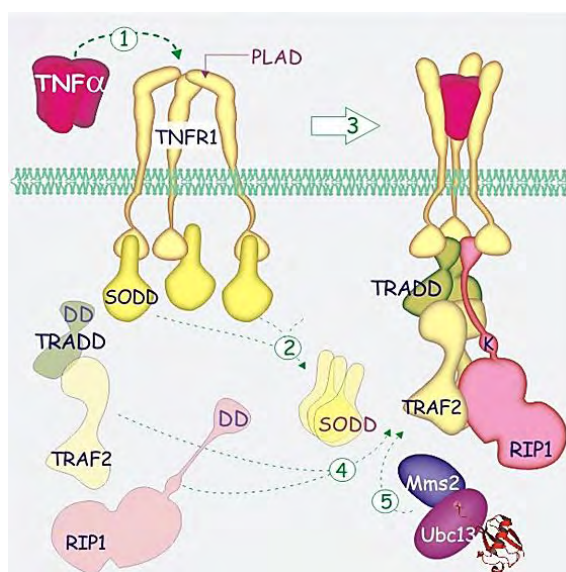
Η σύνδεση του υδατοδιαλυτού τμήματος του TNF με τον υποδοχέα TNFR1 ενεργοποιεί μονοπάτια που σχετίζονται -όπως προαναφέρθηκε- τόσο με την απόπτωση όσο με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Στα μονοπάτια αυτά φαίνεται να εμπλέκεται πληθώρα άλλων πρωτεϊνικών μορίων (Εικόνα 1.10) όπως για παράδειγμα παράγοντες απόπτωσης (APAF), μιτοχondριακές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, DNAασες (CAD), αποπτωτικές πρωτεάσες (caspases), πρωτεΐνες-συνοδοί (Cdc37), μεταγραφικοί παράγοντες (cFos/cJun, NF-κB), κινάσες (JNK, MEKK1) κ.ά. (van Horssen et al., 2006).



**Εικόνα 1.10** α. Σηματοδοτικό μονοπάτι TNFR1. Ο TNF ενεργοποιεί τα μονοπάτια επιβίωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού παράλληλα με τα αποπτωτικά μονοπάτια μέσω του TNFR1 (van Horssen et al., 2006). β. Σύμπλοκο του υποδοχέα TNFR1 με τον TNF και άλλα πρωτεϊνικά μόρια (FADD, TRADD κλπ.) που συμμετέχουν στο αποπτωτικό και στο σηματοδοτικό μονοπάτι (Πηγή: <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/apoptosis/receptor.htm>).

Ο TNFR1 συναντάται συνδεδεμένος με την κυτταρική μεμβράνη αλλά και σε διαλυτή μορφή. Η πρωτεόλυση του υποδοχέα οδηγεί στην απελευθέρωση της διαλυτής μορφής του η οποία μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον ελεύθερο TNF και να τον αναστείλει. Η σύνδεση TNF και υποδοχέα προκαλεί τον τριμερισμό του δεύτερου και την ενεργοποίησή του. Στο σύμπλοκο που σχηματίζεται οι

κορυφές του τριμερούς του TNFR1 εφαρμόζουν στις εσοχές ανάμεσα στις υπομονάδες του τριμερούς του TNF. Οι δομικές αλλαγές που προκαλεί η πρόσδεση αυτή οδηγούν στην αποσύνδεση της ανασταλτικής πρωτεΐνης SODD από την ενδοκυτταρική περιοχή νέκρωσης του TNFR1 (Εικόνα 1.11). Αυτή η αποδέσμευση επιτρέπει στην πρωτεΐνη TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) να δεσμευτεί στην περιοχή νέκρωσης λειτουργώντας σαν μια πλατφόρμα για περαιτέρω δέσμευση πρωτεϊνικών μορίων.



**Εικόνα 1.11.** Η ενεργοποίηση του TNFR1 μέσω της πρόσδεσης του TNF πυροδοτεί μια σειρά πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνει πληθώρα πρωτεϊνών (Kramer, 2016).

Η δέσμευση της πρωτεΐνης TRADD της προσδίδει ρόλο πρωτεϊνικού προσαρμογέα και εν τέλει διαμεσολαβητή ανάμεσα στον ενεργοποιημένο υποδοχέα (TNFR1) και διάφορα σηματοδοτικά μόρια. Ο παράγοντας TRAF2 (TNFR Associated Factor 2) συνδέεται με τον TRADD και την πρωτεΐνη RIP (Receptor Interacting Protein) η οποία και αλληλεπιδρά με τον TNFR1. Η σύνδεση αυτή πυροδοτεί σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και JNK/AP-1 (cJun N-terminal Kinase/ Activator Protein 1), ενώ η πρωτεΐνη FADD (Fas Associated Death Domain) οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση μέσω της πρόσδεσης και

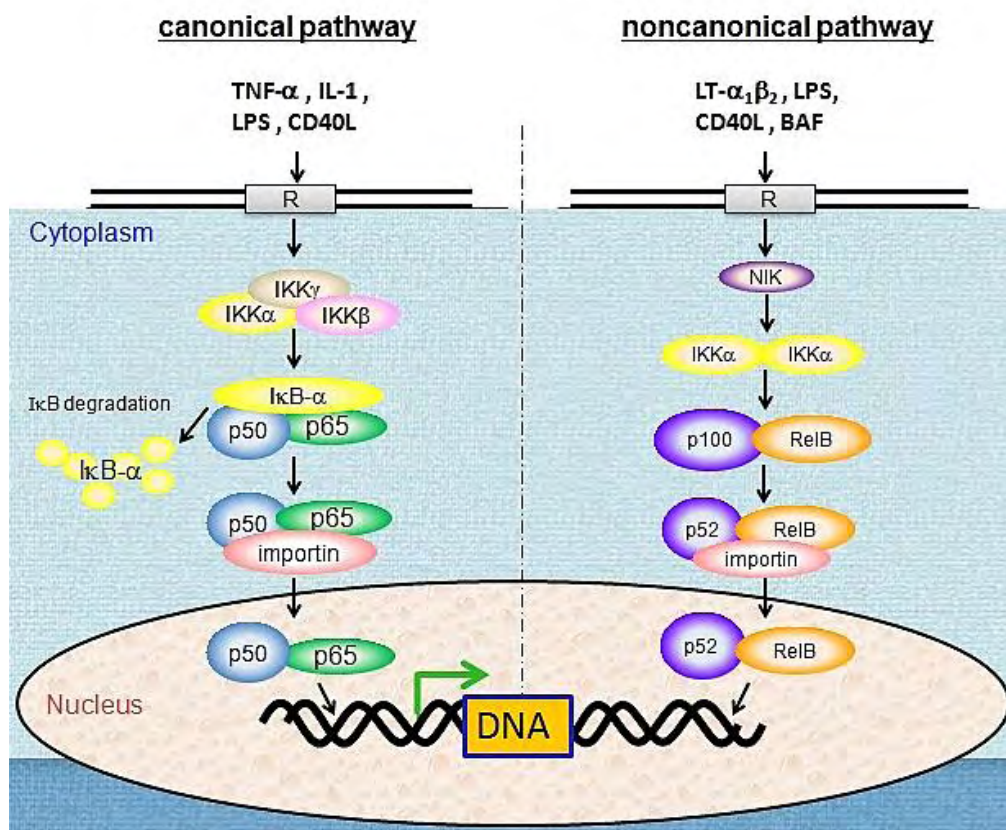
διάσπασης της προκασπάσης 8. Επίσης ο TRAF2 συνδέεται με τις πρωτεΐνες cIAP-1 και cIAP-2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1,2) οι οποίες εμφανίζουν αντιαποπτωτική δραστηριότητα.

Σε συνέχεια της δέσμευσης του TRADD στον TNFR1, τρία μονοπάτια μπορεί να ενεργοποιηθούν: α. το NF-κB, β. το MAPK και γ. το αποπτωτικό μονοπάτι (Chen and Goeddel, 2002; Wajant et al., 2003).

#### *1.3.2.1 Ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού*

Ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF-κB) είναι ένας ετεροδιμερής παράγοντας μεταγραφής. Η ενεργοποίησή του ξεκινά με τη σηματοδοτικά επαγόμενη αποικοδόμηση των IκB αναστολέων του. Τα σηματοδοτικά μόρια που εκκινούν την αποικοδόμηση των IκB αναστολέων ποικίλουν και διαμορφώνουν το μονοπάτι που θα ακολουθήσει ο NF-κB (Εικόνα 1.12): ο TNF και η IL-1 (Interleukin 1) διεγείρουν το «κανονικό» μονοπάτι σε αντίθεση με το «μη κανονικό» που διεγείρεται από τους παράγοντες CD40L (Cluster of Differentiation Ligand), LPS (LipoPolySaccharide), BAF (B-cell Activating Factor) και LT-α<sub>1</sub>β<sub>2</sub> (Lymphotoxin heterotrimer) (Claudio et al., 2002; Coope et al., 2002; K. Horie, 2012). Η διέγερση του NF-κB από τον TNF οδηγεί στη δέσμευση των πρωτεϊνών-προσαρμογέων TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor-2) και RIP (Receptor-Interacting Protein) στην πρωτεΐνη TRADD (TNF associated Receptor Death Domain) που συνδέεται με τον υποδοχέα του TNF, TNFR1 (Devin et al., 2000). Ο TRAF2 με τη σειρά του προσλαμβάνει το σύμπλεγμα IKK δίνοντας τη δυνατότητα στην RIP να ενεργοποιήσει τον TNFR1. Μετά την αποικοδόμηση των αναστολέων του ο NF-κB, με τη μορφή διμερών πρωτεϊνών p50/p65 στο κανονικό μονοπάτι και p100/RelB στο μη κανονικό, μεταναστεύει στον πυρήνα όπου μεσολαβεί την ενεργοποίηση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση, τον

πολλαπλασιασμό και πρωτίτως στη φλεγμονώδη απόκριση. Συνεπώς, δεν είναι περιεργό το ότι είναι χρονίως ενεργοποιημένος σε πολλές φλεγμονώδεις παθήσεις όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η αρθρίτιδα, η σήψη, η γαστρίτιδα, το άσθμα, η αθηροσκλήρωση κ.ά. (Monaco et al., 2004).



**Εικόνα 1.12.** Κανονικό (canonical) και μη κανονικό (non canonical) μονοπάτι ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB (Horie et al, 2012).

Ωστόσο, τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς που περιορίζουν το εύρος των γονιδίων που ενεργοποιούνται από τον NF-κB. Κατά τη φλεγμονή, η λειτουργία ενός κυττάρου εξαρτάται από σήματα που ενεργοποιεί ως απόκριση στην επαφή με γειτονικά κύτταρα και κυτταροκίνες που ενεργούν πάνω σε αυτό μέσω των υποδοχέων τους (Hajishengallis and Chavakis, 2013). Η ακρίβεια των ανατροφοδοτούμενων αποκρίσεων ανάμεσα σε διαφορετικά είδη κυττάρων και το ανοσοποιητικό εξαρτάται από τη συνοχή των μηχανισμών οι οποίοι καταφέρνουν να μειώσουν το εύρος των γονιδίων που ενεργοποιεί ο παράγοντας

NF-κB. Με τον τρόπο αυτό επιτρέπουν μόνο την έκφραση γονιδίων τα οποία συμβάλλουν σε μια αποτελεσματική ανοσοαπόκριση και συνεπώς μια πλήρη αποκατάσταση της λειτουργίας του ιστού μετά το πέρας της φλεγμονής (Vidal et al., 2013).

#### *1.3.2.2 Ενεργοποίηση MAPK μονοπατιών*

Οι MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) είναι ένας τύπος κινασών που ενεργοποιούνται από κάποιο μιτογόνο και ειδικεύονται στα αμινοξέα σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη. Η δέσμευση του TNF στον υποδοχέα του, TNFR1, σηματοδοτεί μια ισχυρή ενεργοποίηση της ομάδας JNK που συνδέεται με το stress, προκαλεί μια ήπια απόκριση των p38-MAPKs και είναι υπεύθυνη για μια πολύ περιορισμένη ενεργοποίηση των ERK κινασών (Extracellular signal-Regulated Kinases). Το μονοπάτι JNK εμπλέκεται στην κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό και θεωρείται γενικά προ-αποπτωτικό μονοπάτι.

Οι p38 MAPKs συμμετέχουν σε ένα σηματοδοτικό καταράκτη που ελέγχει την κυτταρική απόκριση σε κυτταροκίνες και στο stress. Ενεργοποιούνται από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα όπως είναι η UV ακτινοβολία, το θερμικό και το ωσμωτικό shock, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, οι λιποσακαχαρίτες και οι αυξητικοί παράγοντες. Παράλληλα, εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση, την απόπτωση και την αυτοφαγία.

#### *1.3.2.3 Επαγωγή της σηματοδότησης της απόπτωσης*

Η απόπτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που χρησιμοποιείται από τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Έχει καταλυτικό ρόλο στην άμυνα απέναντι σε παθογόνα, τη φυσιολογική ανάπτυξη, την ομοιοστάση των ιστών και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Η διαταραχή της μπορεί να

οδηγήσει σε καρκίνο καθώς και σε αυτοάνοσα και εκφυλιστικά νοσήματα. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόπτωση μελετήθηκαν για πρώτη φορά στον *C. elegans*. Παρόλο το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον που έχει προσελκύσει η μελέτη αυτού του μηχανισμού, λόγω της πολυπλοκότητάς του δεν έχει διερευνηθεί πλήρως.

Αντίθετα από τη νέκρωση που είναι αποτέλεσμα οξέος κυτταρικού τραυματισμού, η απόπτωση είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη και ελεγχόμενη διαδικασία που προσφέρει πλεονεκτήματα στον οργανισμό. Αποπτωτικοί παράγοντες είναι οι ιοί, η ακτινοβολία, η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA κ.ά. Η απόπτωση πραγματοποιείται τόσο σε ενήλικα όσο και σε εμβρυικά κύτταρα στην περίπτωση που η δομή η οποία σχηματίζουν δεν είναι πλέον απαραίτητη (για παράδειγμα στην ουρά του γυρίνου ή στα δάκτυλα των άκρων). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος όμως στοχεύει και στη ρύθμιση του κυτταρικού αριθμού. Τα καρκινικά κύτταρα για παράδειγμα ανθίστανται στην απόπτωση με αποτέλεσμα ο αριθμός τους να μεγαλώνει ανεξέλεγκτα. Υπάρχουν δυο βασικοί τύποι ενεργοποίησης της απόπτωσης: α. ένα εσωτερικό μονοπάτι που στοχεύει στη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων και β. ένα εξωτερικό μονοπάτι όπου το σήμα μεταβιβάζεται μέσω πρωτεϊνικών προσαρμογών.

Το εσωτερικό μονοπάτι ξεκινά από τα μιτοχόνδρια ή το ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα μιτοχόνδρια μπορεί να ενεργοποιηθεί υπό συνθήκες κυτταρικού στρες αλλά και από μια οικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόπτωση, την Bcl2. Το εξωτερικό μονοπάτι ενεργοποιείται με την πρόσδεση σηματοδοτικών μορίων στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς κυτταρικής νέκρωσης και ακολουθεί μετάδοση του αποπτωτικού σήματος μέσω των κασπασών (Harwood et al., 2005). Σχετικά με την εκκίνηση του εξωτερικού μονοπατιού στα θηλαστικά έχουν προταθεί δύο θεωρίες: α. το μονοπάτι του Fas και β. το μονοπάτι του



TNF. Τα δύο αυτά μοντέλα περιλαμβάνουν υποδοχείς της οικογένειας TNF οι οποίοι συνδέονται με εξωκυττάρια σήματα (Wajant, 2002).

Ωστόσο, ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από τον TNF παίζει έναν ελάχισον ρόλο συγκριτικά με τις συντριπτικές λειτουργίες στη διαδικασία της φλεγμονής. Η ικανότητα να επάγει τον κυτταρικό θάνατο είναι αδύναμη σε σχέση με άλλα μέλη της οικογένειας (όπως η πρωτεΐνη Fas) και συχνά επικαλύπτεται από την αντιαποπτωτική επίδραση του παράγοντα NF-κB.

Τα αναρίθμητα και συχνά αντικρουόμενα αποτελέσματα που μεσολαμβάνονται από τα παραπάνω μονοπάτια υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας εκτεταμένης διασταύρωσης των μονοπατιών. Για παράδειγμα, ο παράγοντας NF-κB ενισχύει την μεταγραφή ορισμένων ανασταλτικών πρωτεϊνών (C-FLIP, Bcl-2 και cIAP1/cIAP2) οι οποίες αλληλεπιδρούν με την αποπτωτική σηματοδότηση. Από την άλλη οι ενεργοποιημένες κασπάσες κόβουν αρκετά συστατικά του μονοπατιού του NF-κB (για παράδειγμα cIAP1/ cIAP) καθώς και των υπομονάδων του ίδιου του NF-κB. Άλλοι παράγοντες όπως ο κυτταρικός τύπος, ταυτόχρονη διέγερση και άλλων κυτταροκινών ή το σύνολο των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) μπορούν να μεταφέρουν την ισορροπία προς όφελος του ενός ή του άλλου μονοπατιού. Αυτή η πολυπλοκότητα της σηματοδότησης διασφαλίζει ότι όποτε απελευθερώνεται TNF, διάφορα κύτταρα με εντελώς διαφορετικές λειτουργίες και συνθήκες μπορούν να αποκριθούν κατάλληλα στα εκκινούμενα μονοπάτια.

#### *1.4 Αναστολή του TNF ως θεραπευτικό μέσο*

##### *1.4.1 Συσχέτιση TNF με ασθένειες και αντι-TNF θεραπεία*

Ο TNF ταυτοποιήθηκε και ονομάστηκε από τους Carswell και Old το 1975 όταν διαπίστωσαν ότι μια ενδογενής πρωτεΐνη η οποία υπερεκφράζεται στον ορό ζώων που είχαν λάβει θεραπεία με λιποπολυσακχαρίτες, ήταν υπεύθυνη για την

αιμορραγική νέκρωση μεταμοσχευμένων όγκων (Carswell et al., 1975). Καθώς η τοξικότητα του TNF καθιστούσε τη χρήση του στη χημειοθεραπεία απαγορευτική, διερευνήθηκε η πιθανή σημασία της αναστολής του στη θεραπεία άλλων ασθενειών. Η κυτταροκίνη αυτή φάνηκε να έχει ρόλο βασικού διαμεσολαβητή της φλεγμονής οξείας φάσης καθώς και της χρόνιας φλεγμονώδους νόσου. Η αναστολή της έκφρασης ή της ενεργότητας του TNF άρχισε να εξελίσσεται σε έναν σημαντικό στόχο. Οι δυο προσεγγίσεις που ακολουθούνται σήμερα στην αντι-TNF θεραπεία βασίζονται: α. σε αντισώματα και β. σε διαλυτούς υποδοχείς (Πίνακας 1.3).

Όπως προαναφέρθηκε η πρόσδεση του TNF στους υποδοχείς του μπορεί να καταλήξει στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών ή πρωτεϊνών προσαρμογέων που μπορεί να οδηγήσουν στην απόπτωση ή να έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που οδηγούν στην κυτταρική επιβίωση/ πολλαπλασιασμό. Ο παράγοντας αυτός μπορεί επίσης να επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην οξεία και τη χρόνια φλεγμονώδη απόκριση (Gruss and Dower, 1995; Liz-Graña et al., 2001). Η απορύθμιση της παραγωγής του TNF έχει συσχετισθεί με μια σειρά από αυτοάνοσες διαταραχές όπως ψωρίαση (Victor and Gottlieb, 2002), νόσος του Alzheimer (Swardfager et al., 2010), νόσος του Crohn και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Brynskov et al., 2002). Ο TNF έχει επίσης συσχετισθεί με τον καρκίνο (Locksley et al., 2001) όπου μπορεί να παράγεται εκτοπικά στο περιβάλλον της κακοήθειας και να ακολουθεί την παραθυρεοειδή ορμόνη τόσο κατά την πρόκληση δευτερογενούς υπερασβεστιαϊμίας όσο και σε καρκίνους οι οποίοι συνδέονται με την υπερπαραγωγή του. Έτσι ο TNF έχει καθιερωθεί ως πρωτεΐνη-στόχος τόσο για τον καρκίνο αλλά πολύ περισσότερο για φλεγμονώδεις παθήσεις.

Παράγοντας	Περιγραφή	Θεραπεία	Τρόπος χορήγησης
Infliximab (Remicade)	Ανασυνδιασμένο χημειοκίμο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 έναντι του TNF	Ψωρίαση, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ρευματοειδής αρθρίτιδα	Ενδοφλεβίως
Etanercept (Enbrel)	Διαλυτός υποδοχέας του TNF	Ψωρίαση, ρευματοειδής και ψωριασική αρθρίτιδα, αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα	Υποδορίως
Adalimumab (Humira)	Ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF	Ρευματοειδής και ψωριασική αρθρίτιδα, αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου	Υποδορίως
Golimumab (Simponi)	Πλήρες ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF	Ρευματοειδής αρθρίτιδα, αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου	Υποδορίως
Certolizumab Pegol (Cimzia)	Πεγκυλιωμένος αναστολέας του TNF	Ρευματοειδής αρθρίτιδα	Υποδορίως

**Πίνακας 1.3.** Παράγοντες που χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα στην αντι-TNF θεραπεία διάφορων ασθενειών.

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή των αρθρώσεων καθώς και εκφυλισμό του χόνδρου. Η ασθένεια αυτή προσβάλλει περίπου το 0,5-1% του γενικού πληθυσμού προκαλώντας αυξημένη θνησιμότητα κυρίως εξαιτίας της επιταχυνόμενης αθηροσκλήρωσης (Maradit-Kremers et al., 2005; McInnes and Schett, 2007). Η αναστολή των κυτταροκινών και ιδιαίτερα του TNF παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Atreya et al., 2000; Feldmann, 2002). Ο ρόλος αυτός καθώς και η πιθανή αποτελεσματικότητα της αντι-TNF θεραπείας στην ανθρώπινη ρευματοειδή αρθρίτιδα αποδείχθηκε στο διαγονιαδιακό Tg197 μοντέλο ποντικών. Τα ποντίκια αυτά υπερέκφραζαν τον

ανθρώπινο TNF και ανέπτυξαν χρόνια, διαβρωτική, συμμετρική πολυαρθρίτιδα με ιστολογικές εξετάσεις που έμοιαζαν με την παθογένεια της ανθρώπινης ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Kefffer et al., 1991). Η διαπίστωση αυτή αποδείχθηκε μετέπειτα και σε κλινικές δοκιμές και οδήγησε στην ανάπτυξη των πρώτων βιολογικών θεραπειών για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Elliott et al., 1994). Τα συνθετικά θεραπευτικά αντισώματα etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade) και adalimumab (Humira), προσδένουν άμεσα τον TNF αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε αυτόν και τους υποδοχείς του TNFR1,2 (Chatzantoni and Mouzaki, 2006). Οι παράγοντες αυτοί έχουν προσφέρει σημαντική πρόοδο και έχουν επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητα της εξωκυτταρικής αναστολής αυτής της κυτταροκίνης στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Palladino et al., 2003; Stanczyk et al., 2008).

Δοκιμές σε ένα πειραματικό μοντέλο σκλήρυνσης κατά πλάκας σε ποντίκια (την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα), έδειξαν ότι η αναστολή του διαλυτού μόνο τμήματος του TNF και όχι του διαλυτού και του διαμεμβρανικού μαζί, προάγει την προστασία των νευρώνων σε συγκαλλιέργειες αστροκυττάρων και νευρώνων (Γαουφίκ et al., 2011). Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξε η μελέτη αυτή ήταν ότι η διαλυτή μορφή του TNF προάγει τη φλεγμονή του κεντρικού νευρικού συστήματος ενώ η διαμεμβρανική μορφή του έχει νευροπροστατευτικό ρόλο. Επομένως, η αναστολή του διαλυτού TNF μπορεί να οδηγήσει σε ένα νέο δρόμο για τη θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας όπως πιθανότατα και για άλλες φλεγμονώδεις παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Ο σχεδιασμός των ανταγωνιστών του TNF βασίζεται τόσο στην παραγωγή διαλυτών υποδοχέων όσο και στη σύντηξη των εξωκυττάρων περιοχών των υποδοχέων του (TNFR1,2) με τη βαριά αλυσίδα ενός αντισώματος. Η στρατηγική αυτή έχει οδηγήσει σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα

(Πίνακας 1.3) και έχει αλλάξει την πορεία ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα και η νόσος του Crohn των οποίων η παθογένεια και η εξέλιξη φαίνεται να σχετίζονται με τον TNF.

#### *1.4.2 Παρενέργειες των αντι-TNF θεραπειών*

Η αντι-TNF αγωγή έφερε επανάσταση στη θεραπεία της φλεγμονώδους αρθρίτιδας και άλλων αυτοάνοσων νόσων. Ωστόσο διερευνώνται οι παρενέργειες που μπορεί να εμφανίσει η θεραπεία αυτή. Παραδείγματα τέτοιων παρενεργειών είναι: μολύνσεις (ιδιαίτερα επανενεργοποίηση λανθάνουσας φυματίωσης), μολύνσεις που συνδέονται με τη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, κακοήθειες (για παράδειγμα λεμφώματα), αυτοάνοσα νοσήματα (όπως σύνδρομο παρόμοια με τον ερυθρηματώδη λύκο και την αγγειίτιδα), απομυελίνωση κ.ά. (Scheinfeld, 2004, Πίνακας 1.4).

Ακόμα και ο ίδιος ο χειρισμός του TNF και των κυτταροκινών γενικότερα, μπορεί να έχει επιβλαβείς συνέπειες εξαιτίας της διττής φύσης αυτού του μορίου καθώς έχει φυσιολογικό αλλά και παθολογικό ρόλο ταυτόχρονα. Οξείες αλλά και χρόνιες παρενέργειες που προκύπτουν ορισμένες φορές από τέτοιου είδους θεραπείες έχουν αποδοθεί και σε δευτερεύουσες ανοσοπαθολογίες που επάγονται από την παρεμπόδιση του TNF. Πιο συχνές είναι άμεσου ή επιβραδυνόμενου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας καθώς και αντιδράσεις σχετιζόμενες με επαγόμενες ανισορροπίες του ανοσοποιητικού. Πολύ σπανιότερες είναι οι ανισορροπίες στις κυτταροκίνες ή η αντιγονική διασταυρωτή επανενεργοποίηση (Malíčková, 2016).

<b>Βασικές ανεπιθύμητες ενέργειες αντι-TNF θεραπείας</b>	
Μόλυνση	Αντικρουόμενα αποτελέσματα, ορισμένες μελέτες έδειξαν να υπάρχει μια τάση διπλασιασμού της πιθανότητας σοβαρής μόλυνσης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που λαμβάνουν infliximab ή adalimumab
Κακοήθεια	Αντικρουόμενα αποτελέσματα, ορισμένες μελέτες έδειξαν να υπάρχει μια τάση έως και τριπλασιασμού της πιθανότητας εμφάνισης κακοήθειας με τη χορήγηση των infliximab και adalimumab
Αντίδραση στην περιοχή της ένεσης και αντίδραση στο έγχυμα	Αντίδραση στην περιοχή της ένεσης είναι συχνή (20-40%) για τα σκευάσματα etanercept και adalimumab
Αυτοάνοσα νοσήματα όπως σύνδρομο παρόμοια με τον λύκο και αγγειίτιδα	Συχνή ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων όπως anti-dsDNA, παρόλα αυτά είναι σπάνια η εμφάνιση λύκου ή αγγειίτιδας
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	Το infliximab (σε δόση 10 mg/kg) σχετίζεται με επιδείνωση της ασθένειας και θνησιμότητα, παρόλα αυτά ορισμένες μελέτες προτείνουν ότι η επίδραση στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι απειροελάχιστη
Πανκυτταροπενία, απλαστική αναιμία, ουδετεροπενία, θρομβοπενία	Περιστασιακές αναφορές περιστατικών σοβαρής κυτταροπενίας, με έντονη ασυμπτωματική ουδετεροπενία σε ορισμένες περιπτώσεις
Απομυελινωτικά νοσήματα, οπτική νευρίτιδα, σύνδρομο Guillain-Barré	Σπάνιες περιπτώσεις σοβαρής απομυελίνωσης και άλλων σοβαρών νευρολογικών επιπλοκών
Πνευμονική ίνωση και άλλες σοβαρές παρενέργειες στον πνεύμονα	Αναφορές για νέα εμφάνιση σοβαρής πνευμονοπάθειας ή παρόξυνση ήδη υπάρχουσας ασθένειας
Ψωρίαση	Αναφορές για νέα εμφάνιση ή παρόξυνση ήδη υπάρχουσας ψωρίασης
Φλεβική θρόμβωση	Λίγες αναφορές εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης μετά από θεραπεία με infliximab

**Πίνακας 1.4.** Οι κύριες παρενέργειες των αντι-TNF θεραπειών (Ding and Deighton, 2007).

Ένα επιπλέον μειονέκτημα των θεραπειών αυτών είναι ότι δεν προορίζονται για από του στόματος χρήση αλλά μόνο για ενδοφλέβια χορήγηση. Έτσι είναι πιο δαπανηρές και παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες ανοσογονικότητας. Για τον λόγο αυτό υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη εναλλακτικών θεραπειών με μικρά μόρια αναστολεις του TNF που έχουν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα, προορίζονται για από του στόματος χρήση και είναι καλύτερα ανεκτά από τον οργανισμό. Μια τέτοιου είδους θεραπεία για τη ρύθμιση της βιολογικής δράσης του TNF θα μπορούσε να αντικαταστήσει τις ενέσιμες θεραπείες ή να προσφέρει καλύτερο έλεγχο της ασθένειας όταν χρησιμοποιείται είτε κατά αποκλειστικότητα είτε σε συνδυασμό με άλλες ήδη υπάρχουσες θεραπείες (Palladino et al., 2003).

#### *1.4.3 Αναστολή TNF με μικρά μόρια*

Η αναστολή της παραγωγής ή της δράσης του TNF με μικρά μόρια έχει έρθει στο επίκεντρο της φαρμακευτικής βιομηχανίας στα πλαίσια της αντιμετώπισης διαφόρων αυτοάνοσων ασθενειών (όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου κ.ά.). Επιπλέον, αναμένεται ότι οι μικρομοριακές φαρμακευτικές ενώσεις που βασίζονται στον δομικό σχεδιασμό μπορούν να φτάσουν ή και να ξεπεράσουν σε αποτελεσματικότητα τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές (αντισώματα και υποδοχείς) ιδιαίτερα όσο αφορά την αντιμετώπιση ρευματικών ασθενειών. Με αυτόν τον τρόπο είναι πιθανό να βρεθούν νέες εναλλακτικές λύσεις με βελτιωμένα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των ρευματικών παθήσεων (Stanczyk et al., 2008).

Μέχρι στιγμής έχει ανακαλυφθεί μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μικρομοριακών αναστολέων που στην πλειοψηφία τους δεν έχουν φτάσει στο στάδιο των κλινικών μελετών (Shen et al., 2014). Οι αναστολεις αυτοί

χωρίζονται σε δυο κατηγορίες βάσει του στόχου τους που μπορεί να είναι α. η έκφραση του TNF και β. η αλληλεπίδραση TNF/TNFR.

Οι περισσότεροι από τους αναστολείς της πρώτης κατηγορίας στοχεύουν στον περιορισμό της έκφρασης του TNF μέσω της αναστολής ενδιάμεσων πρωτεϊνών (Burke et al., 2003; Haraguchi et al., 2006; Leung et al., 2006; Rasmussen and McCann, 1997) όπως είναι η κινάση MAP p38 (Lee and Dominguez, 2005). Παραδείγματα τέτοιων αναστολέων είναι οι 2-υδροξυ-β-χλωροβυνιλοχαλκόνες (Bandgar et al., 2010) και παράγωγα χαλκονών γενικότερα (Wu et al., 2011) καθώς και μη χαρακτηρισμένοι αναστολείς της έκφρασης του TNF (Cheng et al., 2003; Clark et al., 2004; Niwayama et al., 1998, 1996; Sampraiο et al., 1991), μη χαρακτηρισμένοι αναστολείς του TNF σε κυτταρικές δοκιμές (Jackson et al., 2003, 2002) και αναστολείς εσωτερικών μονοπατιών οι οποίοι ανταγωνίζονται τον NF-κB, την ενεργοποίηση πρωτεΐνη 1(1AP) ή τη μετάδοση σήματος μέσω των πρωτεϊνών JNK/p38. Επίσης, υπάρχουν κάποιοι αναστολείς που αναστέλλουν τη μεταλλοπρωτεάση TACE η οποία απελευθερώνει το μεμβρανικό κομμάτι του TNF (Levin et al., 2001). Παρόλο που έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην ανάπτυξη μικρών μορίων που δύνανται να διακόπτουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, όπως αυτή του TNF με τους υποδοχείς του, αυτή η διεργασία παραμένει μια δύσκολη πρόκληση (Berg, 2003; Toogood, 2002).

Η θαλιδομίδη (immunoprin) και τα παράγωγά της lenalidomide (revlimid) και pomalidomide (pomalyst, imnovid) αποτελούν ένα παράδειγμα μικρομοριακών αναστολέων της έκφρασης του TNF. Η δράση της θαλιδομίδης έγκειται στην αναστολή της παραγωγής του TNF από τα μονοκύτταρα καθώς και από T-λεμφοκύτταρα (Moreira et al., 1997, 1993; Partida-Sanchez et al., 1998; Rowland et al., 1999, 1998; Sampraiο et al., 1991). Εξαιτίας των σοβαρών παρενεργειών της (τερατογενέσεις κ.ά.) (Kim and Scialli, 2011) αποσύρθηκε



πολύ νωρίς από το εμπόριο με εξαίρεση την περιορισμένη χρήση της στη θεραπεία συγκεκριμένων μορφών καρκίνου (πολλαπλό μυέλωμα) και σε μια επιπλοκή της λέπρας. Άλλοι τέτοιου είδους αναστολείς του TNF είναι τα παράγωγα της ξανθίνης (Essayan, 2001) όπως είναι η πεντοξυφυλλίνη (Marques et al., 1999) και η μπουπροπριόνη (Brustolim et al., 2006).

Η δεύτερη κατηγορία μικρομοριακών αναστολέων του TNF στοχεύει στην άμεση αναστολή της αλληλεπίδρασης TNF/TNFR. Η στρατηγική αυτή είναι πολύ σημαντική και χρησιμοποιείται στο σχεδιασμό μικρομοριακών αναστολέων (Davis and Colangelo, 2013). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται μόνο λίγα μικρά μόρια τα οποία διακόπτουν άμεσα την αλληλεπίδραση TNF/TNFR όπως η πολυσουλφονωμένη ναφθουρία, η σουραμίνη και ανάλογά της (Mancini et al., 1999). Στην περίπτωση της σουραμίνης η χαμηλή δραστικότητα και επιλεκτικότητα καθώς και οι παρενέργειές της την καθιστούν ακατάλληλη για την αντι-TNF θεραπεία (McGeary et al., 2008). Το 2010 ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση υπολογιστικής διαλογής βασισμένη στη δομή (structure-based virtual screening) δυο μικρομοριακοί αναστολείς του TNF από βιβλιοθήκες που βασίζονταν σε φυσικά προϊόντα: η κινουκλιδίνη (quinuclidine) και η κινολιζίνη (quinolizine) (Chan et al., 2010). Επίσης, έχει αναφερθεί η σύνθεση μιας σειράς παραγώγων κινολιζίνης ως πιθανών αναστολέων του TNF (Kumar et al., 2011) καθώς και ο πρώτος αναστολέας του TNF που βασίζεται σε μέταλλα (Leung et al., 2012). Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκαν νέα μικρά μόρια αναστολείς του TNF τα οποία στοχεύουν το διμερές και σε κυτταρικές δοκιμές μείωσαν την ενεργότητα του TNF (Shen et al., 2014).

Η αντι-TNF θεραπεία βασίζεται σε πρωτεϊνικούς αναστολείς και βρίσκεται στην πρώτη γραμμή της θεραπείας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων. Το ποσοστό επιτυχίας των προαναφερόμενων βιολογικών φαρμάκων στις κλινικές δοκιμές αγγίζει το 60% (Feldmann, 2002).

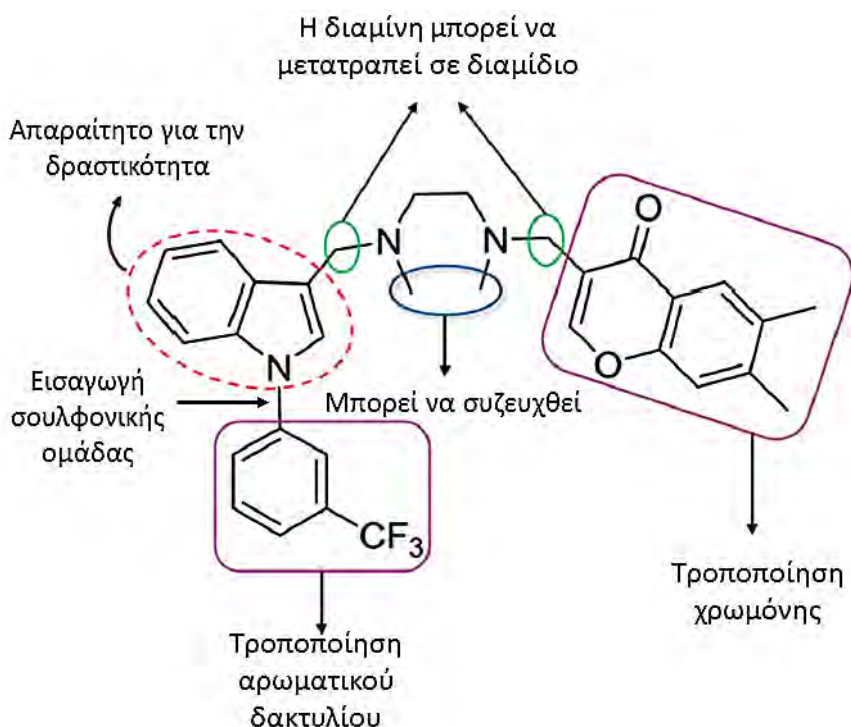
Ωστόσο, η χρήση τους παρακωλύεται από διάφορους περιορισμούς τόσο από άποψη παραγωγής (υψηλό κόστος) και πρακτικότητας (ενεσοθεραπεία) όσο και από κλινικής άποψης καθώς συχνά εμφανίζουν μη ικανοποιητικό έλεγχο της ασθένειας, ύφεση, ανοσογονικότητα, ανοσοκαταστολή και δυσκολία στη χρήση σε συνδυαστική θεραπεία (Palladino et al., 2003; van Vollenhoven, 2011). Από την άλλη, οι μικρομοριακοί αναστολείς έχουν αναδυθεί σαν μια ελκυστική εναλλακτική για τα βιολογικά φάρμακα εξαιτίας του χαμηλού κόστους και της ευκολίας στην παραγωγή και την ανάπτυξή τους καθώς και λόγω της αυξημένης βιοδιαθεσιμότητάς τους στην από του στόματος χορήγηση (Stanczyk et al., 2008). Η ανάπτυξη μικρών μορίων για από του στόματος χρήση θα μπορούσε να αντικαταστήσει τα ενέσιμα φάρμακα καθώς προσφέρουν καλύτερο έλεγχο της ασθένειας, καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών, διευκόλυνση της διείσδυσης των ιστών, μικρότερο χρόνο ημιζωής με μειωμένη ανοσοκαταστολή, απουσία ανοσογονικότητας, ευκολία χρήσης κ.ά. (Alexiou et al., 2014). Αυτά τα πλεονεκτήματα επί του παρόντος καθιστούν τους μικρομοριακούς αναστολείς του TNF ένα πεδίο έρευνας με έντονη δραστηριότητα στη φαρμακευτική βιομηχανία που έχει σαν τελικό στόχο την ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικών και ασφαλών θεραπειών για αυτοάνοσα νοσήματα.

#### *1.4.3.1 Ο αναστολέας SPD304*

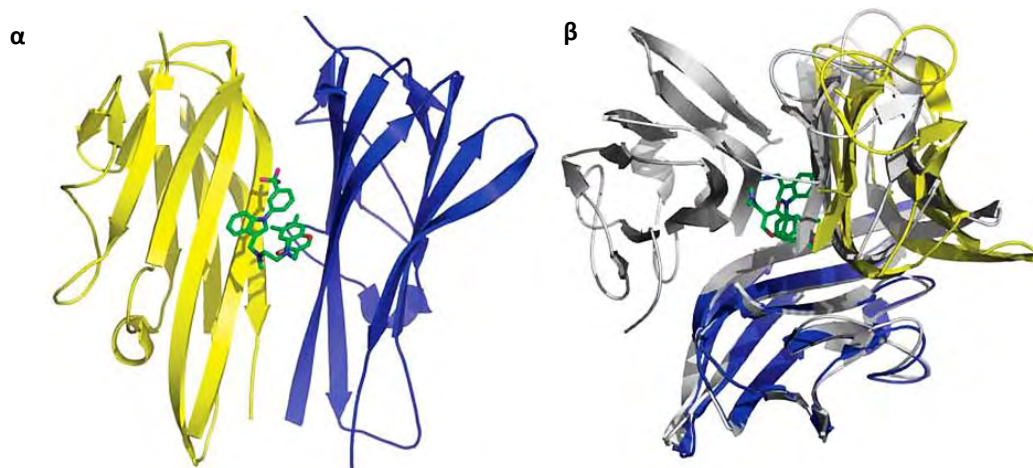
Το 2005 στην εργασία των He et al. έγινε αναφορά σε μια νέα ένωση η οποία αναστέλλει τη δράση του TNF αρχικά μέσω της προώθησης της διάσπασης μιας υπομονάδας από το ομοτριμερές της πρωτεΐνης και στη συνέχεια με την πρόσδεση του αναστολέα στο σχηματιζόμενο διμερές. Το SPD304 είναι ένας από τους πιο ισχυρούς μικρομοριακούς αναστολείς του TNF και ο μόνος για τον οποίο έχει μελετηθεί σε βάθος ο ανασταλτικός μηχανισμός και έχει λυθεί η κρυσταλλική του δομή (He et al., 2005). Επομένως, το SPD304 είναι ο

μοναδικός αναστολέας που δίνει τη δυνατότητα για σχεδιασμό άλλων μικρομοριακών αναστολέων με βάση τη δομή.

Πρόκειται για ένα μικρό μόριο (545 Da) που αναστέλλει την πρόσδεση του TNF στον υποδοχέα του και αποτελείται από ένα *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλοινδόλιο και μια ομάδα διμεθυλο-χρωμόνης ενωμένα με μια διαμινική γέφυρα (Εικόνα 1.13). Η ανασταλτική δράση του SPD304 βασίζεται στο γεγονός ότι έχει τη δυνατότητα να αντικαθιστά μια από τις υπομονάδες του τριμερούς του TNF (Εικόνα 1.14α). Στο σύμπλοκο που προκύπτει το διμερές του TNF διατηρεί την ίδια βασική δομική αναδίπλωση των υπομονάδων όπως και στο τριμερές όμως η γωνία ανάμεσα στις υπομονάδες έχει ελαφρώς διευρυνθεί (Εικόνα 1.14β). Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα όπως φαίνεται στα δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ έδειξε ότι το SPD304 βρίσκεται προσδεμένο σε μια ρηχή υδρόφοβη εσοχή του διμερούς και αλληλεπιδρά με αμινοξέα και των δυο υπομονάδων του.

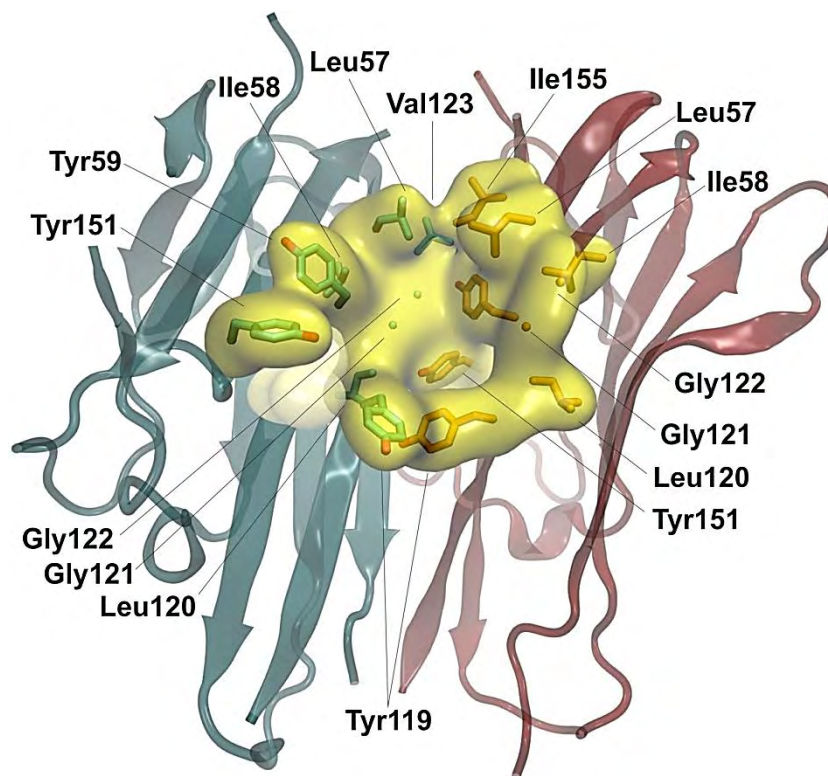


**Εικόνα 1.13.** Δομή του SPD-304 και δομικές αλλαγές με σκοπό την αύξηση της ενεργότητας και μείωση της τοξικότητας.



**Εικόνα 1.14. α.** Δομή του συμπλόκου του διμερούς του TNF με το SPD304 που προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και **β.** μετατόπιση του προσανατολισμού των υπομονάδων στο σύμπλοκο διμερούς TNF/SPD304. Η υπέρθεση του τριμερούς του TNF (γκρι) με το σύμπλοκο διμερούς TNF/SPD304 (κίτρινο-μωβ) δείχνει μια μικρή διεύρυνση της γωνίας ανάμεσα στις υπομονάδες στην περιοχή πρόσδεσης του αναστολέα (He et al., 2005).

Η περιοχική πρόσδεση του αναστολέα στο διμερές αποτελείται από 16 αμινοξέα επαφής από τα οποία τα 6 είναι τυροσίνες: τα εννέα από αυτά ανήκουν στην αλυσίδα A (Glu-157, Tyr-59, Ser-60, Gln-61, Tyr-119, Leu-120, Gly-121, Gly-122, και Tyr-151) ενώ τα υπόλοιπα επτά αμινοξέα ανήκουν στην αλυσίδα B (Leu-57, Tyr-59, Ser-60, Tyr-119, Leu-120, Gly-121 και Tyr-151) (Εικόνα 1.15). Είναι σημαντικό το γεγονός ότι αυτές οι επιφάνειες επαφής βρίσκονται εντελώς θαμμένες μέσα στις περιοχές αλληλεπίδρασης των υπομονάδων και όπως προαναφέρθηκε τα αμινοξέα Tyr-59 και Tyr-119 συμμετέχουν στις “edge to face” τύπου αλληλεπιδράσεις στην κρυσταλλική δομή του ανέπαφου τριμερούς του TNF (βλ. §1.2.5). Παρόλο που το εμβαδό των επιφανειών επαφής φτάνει τα 330 Å<sup>2</sup> δεν σχηματίζονται διαμοριακοί υδρογονικοί δεσμοί ή γέφυρες άλατος υπονοώντας έτσι ότι η αλληλεπίδραση είναι ισχυρά υδρόφοβη και καθοδηγούμενη από το σχήμα (shape driven interaction). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι η παρουσία του SPD304 οδηγεί σε διαχωρισμό του τριμερούς αλλά και επάγει τον σχηματισμό του διμερούς όχι μόνο υπό συνθήκες κρυστάλλωσης αλλά και σε διάλυμα (He et al., 2005).



**Εικόνα 1.15.** Ο TNF έχει μια ρηχή περιοχή πρόσδεσης όπου το SPD304 προσδέεται μέσω αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένα αμινοξέα η πλειοψηφία των οποίων είναι υδρόφοβα. Αλυσίδα Α (μπλε): Leu-57, Ile-58, Tyr-59, Tyr-119, Leu-120, Gly-121, Gly-122, Val-123, Tyr-151. Αλυσίδα Β (κόκκινο): Leu-57, Ile-58, Tyr-119, Leu-120, Gly-121, Gly-122, Tyr-151 (Mettou et al., 2017).

Ο ακριβής μηχανισμός βάσει του οποίου το SPD304 οδηγεί στον σχηματισμό του διμερούς έχει μελετηθεί αναλυτικά από τον He (2005). Για τον μηχανισμό αυτό είχαν προταθεί αρχικά δυο μοντέλα. Το πρώτο ήταν το εξαρτώμενο από την προδιάσπαση μοντέλο, όπου ο αναστολέας λειτουργεί παθητικά καθώς συνδέεται και σταθεροποιεί το διμερές της πρωτεΐνης μετά από αυθόρμητη διάσπαση μιας υπομονάδας από το τριμερές. Στο δεύτερο, το ανεξάρτητο από την προδιάσπαση μοντέλο, ο αναστολέας λειτουργεί ενεργητικά καθώς αλληλεπιδρά με το τριμερές του TNF για να προωθήσει τη διάσπαση μιας υπομονάδας που οδηγεί στον σχηματισμό του διμερούς. Αυτή η διαπίστωση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το αρχικό βήμα για την απενεργοποίηση του TNF είναι η πρόσδεση του αναστολέα στο τριμερές προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου συμπλόκου, το οποίο οδηγείται σε επιταχυνόμενη διάσπαση της μιας υπομονάδας από το τριμερές.

Το δεύτερο μοντέλο ήταν αυτό που τελικά επικράτησε στην περίπτωση του SPD304 (He et al., 2005) και προβλέπει ότι το τριμερές του TNF αλληλεπιδρά αρχικά με τον αναστολέα και με τον τρόπο αυτό εξασθενούν οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις υπομονάδες του. Αυτό σημαίνει ότι στη συγκεκριμένη κατάσταση το τριμερές εμφανίζει μειωμένη σταθερότητα σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του. Υπό πραγματικές-φυσιολογικές συγκεντρώσεις του TNF, το σύμπλοκο του τριμερούς με το SPD304 είναι εξαιρετικά ασταθές και οδηγείται ταχύτατα σε διάσπαση μιας υπομονάδας του οπότε και απενεργοποιείται.

Η δομή του συμπλόκου του SPD304 με τον TNF καθώς και ο μηχανισμός δράσης του καθιστούν δυνατό το μοντέλο όπου ένα μικρό μόριο μπορεί να αλληλεπιδράσει και στη συνέχεια να διασπάσει ένα ισχυρά συζευγμένο πρωτεϊνικό ολιγομερές. Ορισμένοι μικρομοριακοί αναστολείς κάποιων ενδοκυτταρικών ομοδιμερών πρωτεϊνών που έχουν ανακαλυφθεί (Berg, 2003; Capps et al., 2005) συνήθως λειτουργούν μέσω του μηχανισμού που εξαρτάται από την προδιάσπαση του πρωτεϊνικού ολιγομερούς όπως συμβαίνει με έναν αναστολέα της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) (Blasko et al., 2002; McMillan et al., 2000). Οι αναστολείς αυτού του τύπου μπορεί να έχουν περιορισμένη χρησιμότητα σε εξωκυτταρικές συζευγμένες ολιγομερείς πρωτεΐνες όπως ο TNF που έχουν πολύ χαμηλούς ρυθμούς αυθόρμητης διάσπασης των υπομονάδων τους.

Όσο αφορά την τοξικότητα του SPD304, μελέτες μεταβολισμού έχουν δείξει ότι όταν το μόριο αυτό εισέρχεται στον οργανισμό λόγω του 3-υποκατεστημένου ινδολίου καθίσταται εξαιρετικό υπόστρωμα για αφυδρογόνωση από ένζυμα του P450 κυτοχρώματος και επιπλέον απενεργοποιεί την ισομορφή του CYP3A4. Με τον τρόπο αυτό αφυδρογονώνεται το 3-υποκατεστημένο ινδόλιο και παράγεται μια ιμίνη, το 3-μεθυλενοϊνδολένιο. Το ηλεκτρονιόφιλο αυτό ενδιάμεσο μπορεί να δεσμεύεται ομοιοπολικά στο DNA και σε πρωτεΐνες,

παρουσιάζοντας έτσι υψηλή τοξικότητα. Επιπλέον, η υδροξυλίωση του 6-μεθυλίου της διμεθυλοχρωμόνης του SPD304 βρέθηκε ότι αποτελεί το έτερο βασικό μεταβολικό μονοπάτι για αυτήν την αντίδραση (Sun and Yost, 2008). Για τον λόγο αυτό δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί το SPD304 σαν φαρμακευτική ουσία αλλά μόνο σαν βάση για την ανακάλυψη νέων μικρομοριακών αναστολέων του τριμερισμού του TNF. Επομένως, η ανάπτυξη υδατοδιαλυτών μικρομοριακών αναστολέων του TNF χαμηλής τοξικότητας παραμένει ένας διακαής σκοπός (Yang et al., 2010). Παρόλο που υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων χημικών βιβλιοθηκών, η χαμηλή υδατική διαλυτότητα των περισσότερων μικρομοριακών αναστολέων του TNF παραμένει ένα πρόβλημα. Μερικά από τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του SPD304 είναι:

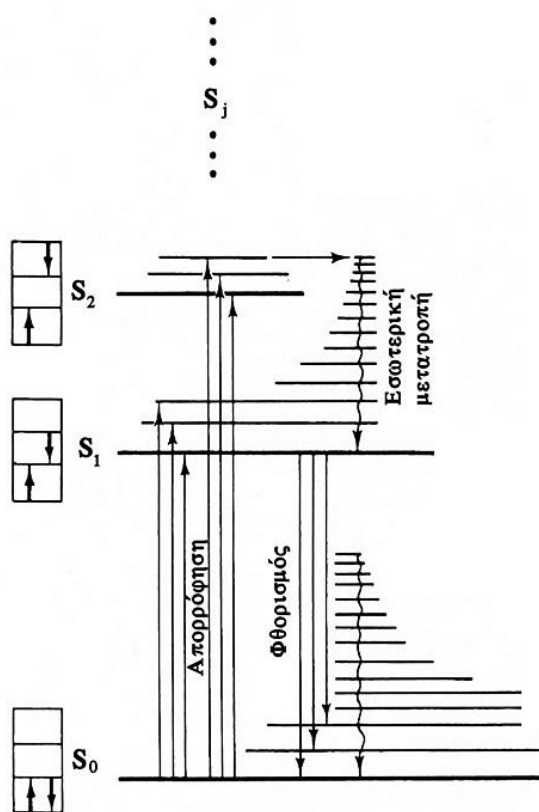
- α. μοριακό βάρος (MW): 545 Da
- β. συντελεστής μερισμού clogP: 6.25
- γ. συντελεστής κατανομής logD (pH 6.5): 5.
- δ. δέκτες πρωτονίων δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptors, HBA): 5
- ε. δότες πρωτονίων δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Donors, HBD): 0

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω για το SPD304 δεν ακολουθείται ο κανόνας του πέντε του Chris Lipinski (βλ. §1.4.3.2) καθώς το μοριακό του βάρος ξεπερνάει τα 500 Da και ο συντελεστής μερισμού clogP την τιμή του πέντε.

#### *1.4.3.2 Προσδιορισμός της συγγένειας πρόσδεσης μικρομοριακών αναστολέων στον TNF με φασματοσκοπία φθορισμού*

Η τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού βασίζεται στην ύπαρξη διακριτών ενεργειακών επιπέδων των ηλεκτρονίων. Στο φαινόμενο του φθορισμού η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με

απορρόφηση φωτονίου δεν διατηρείται στο διεγερμένο μόριο αλλά αποβάλλεται με εκπομπή θερμότητας και δευτερεύουσας ακτινοβολίας (Εικόνα 1.16). Βάσει αυτής της διαδικασίας προκύπτουν το φάσμα διέγερσης (ή απορρόφησης) και το φάσμα εκπομπής που είναι χαρακτηριστικά για κάθε φθορίζουσα ουσία. Το φάσμα διέγερσης σχετίζεται με το σύνολο των φωτονίων που μπορούν να διεγείρουν το μόριο από τη θεμελιώδη στη διεγερμένη κατάσταση. Κατά τη διέγερση το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει από τη βασική ( $S_0$ ) σε μονήρη διεγερμένη στάθμη ( $S_1$ ,  $S_2$  κλπ.) και οι μεταβάσεις αυτές ευθύνονται για τα φάσματα απορρόφησης των μορίων στο ορατό και το υπεριώδες. Για τη λήψη του φάσματος διέγερσης ο μονοχρωμάτορας φθορισμού ορίζεται στο μήκος κύματος όπου έχουμε τη μέγιστη τιμή της ακτινοβολίας φθορισμού  $F$  ( $\lambda_{max}$ ) και στη συνέχεια γίνεται σάρωση με τον μονοχρωμάτορα διέγερσης με σύγχρονη μέτρηση του  $F$ .

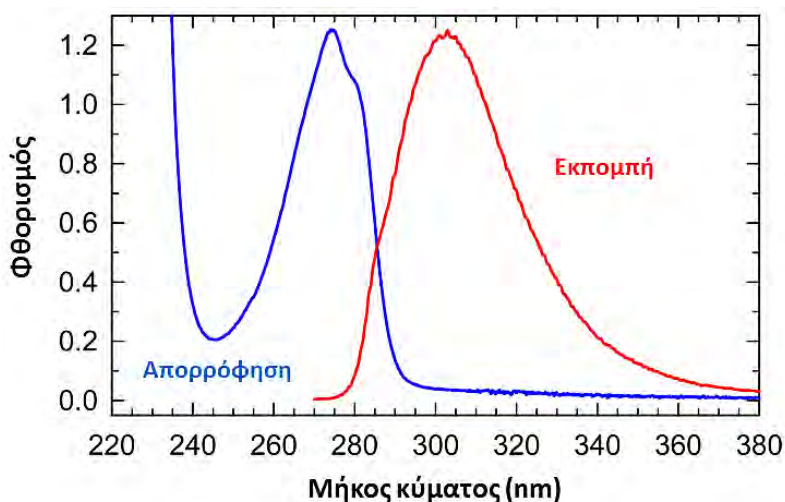


**Εικόνα 1.16.** Σχηματικό διάγραμμα των κατώτερων ενεργειακών επιπέδων ενός οργανικού μορίου με βάση την απορρόφηση φωτός (Πηγή: [www.biomed.ntua.gr/Portals](http://www.biomed.ntua.gr/Portals))



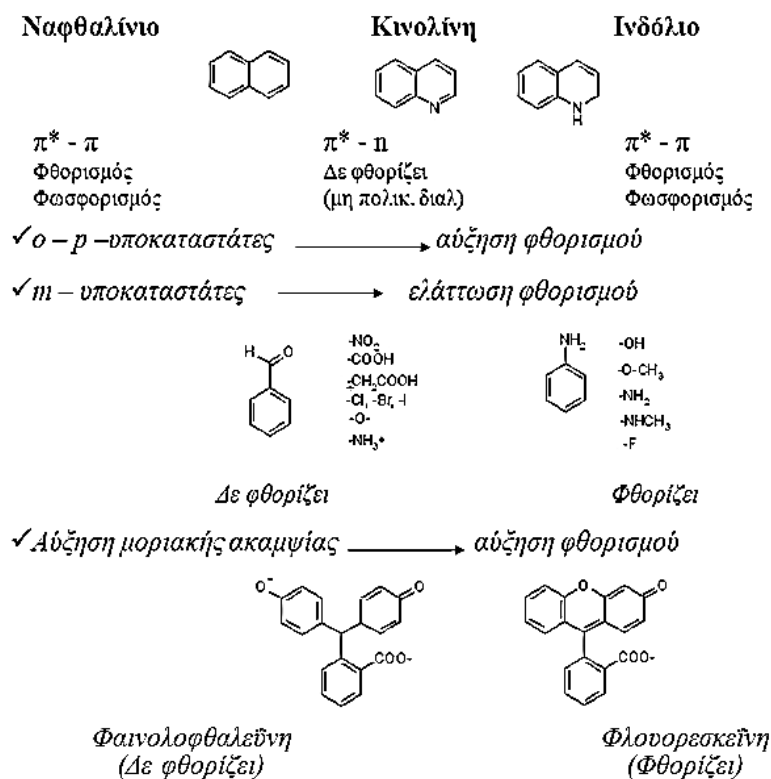
Το φάσμα εκπομπής αποτελείται από το σύνολο των μηκών κύματος των φωτονίων όταν αυτά εκπέμπονται κατά την αποδιέγερση του μορίου όπου παρατηρείται μετάπτωση των ηλεκτρονίων από την διεγερμένη ( $S_1$ ,  $S_2$  κλπ.) στη βασική τους κατάσταση ( $S_0$ ). Για τη λήψη του φάσματος ρυθμίζεται ο μονοχρωμάτορας διέγερσης στο μήκος κύματος όπου το  $F$  είναι μέγιστο ( $\lambda_{max}$ ) και γίνεται σάρωση με τον μονοχρωμάτορα φθορισμού με σύγχρονη μέτρηση του  $F$ .

Η μελέτη φθορισμού βιολογικών μορίων βασίζεται σε τρία φθορίζοντα αμινοξέα: την τρυπτοφάνη, την τυροσίνη (κυρίως) και τη φαινυλαλανίνη (σπανιότερα) τα οποία φέρουν αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Βάσει των καμπυλών διέγερσης και εκπομπής η τυροσίνη εμφανίζει μέγιστα σε μήκος κύματος 275 nm και 302 nm αντίστοιχα (Εικόνα 1.17). Το διμερές της πρωτεΐνης TNF φέρει στην περιοχική πρόσδεσης (binding site) 6 μόρια τυροσίνης. Αυτό σημαίνει ότι τυχόν αλλαγές στο περιβάλλον της περιοχής πρόσδεσης επιδρούν στο σήμα φθορισμού. Για τον λόγο αυτό είναι δυνατή η μελέτη του μηχανισμού αναστολής του TNF από μικρά μόρια με την τεχνική της φασματοσκοπίας ενδογενούς φθορισμού (intrinsic fluorescence spectroscopy).

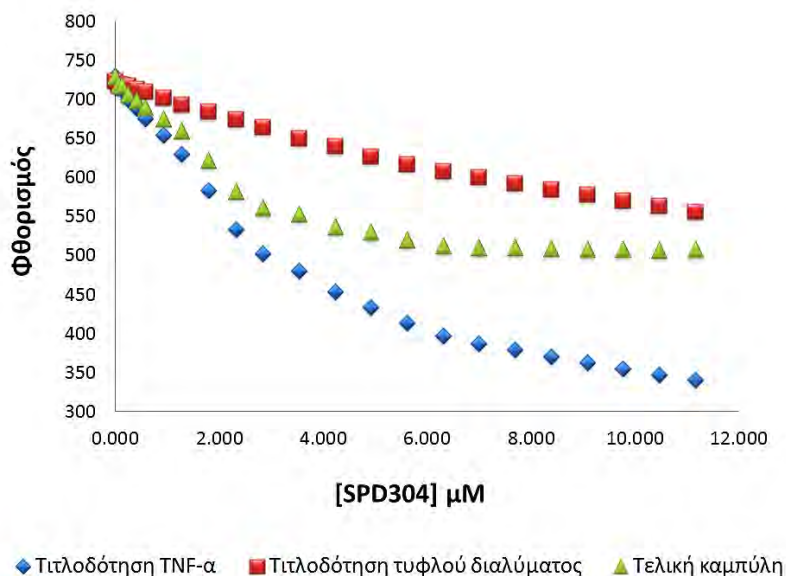


**Εικόνα 1.17.** Φάσματα απορρόφησης (μπλε) και εκπομπής (κόκκινο) της τυροσίνης (Πηγή: <http://community.asdlib.org>)

Ωστόσο, πολλές από τις ενώσεις φέρουν ομάδες όπως το ινδόλιο και το ναφθαλίνιο ή και υποκαταστάτες τα ηλεκτρόνια των οποίων διεγείρονται και δίνουν σήμα φθορισμού (Εικόνα 1.18). Για τον λόγο αυτό στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, πάντα μετά την τιτλοδότηση της πρωτεΐνης γινόταν ένα «τυφλό» πείραμα. Στο πείραμα αυτό ουσιαστικά γινόταν τιτλοδότηση του πιθανού αναστολέα σε διάλυμα στο οποίο είχε γίνει προσομοίωση των συνθηκών τιτλοδότησης της πρωτεΐνης: χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με αυτό της πρωτεΐνης και προστέθηκε εξ αρχής μικρή ποσότητα τυροσίνης τέτοιας ώστε να δίνει το ίδιο σήμα φθορισμού με την πρωτεΐνη. Η καμπύλη τιτλοδότησης του τυφλού αφαιρείτο από την αντίστοιχη καμπύλη της πρωτεΐνης σημείο προς σημείο (Εικόνα 1.19) και η σταθερά διάσπασης  $K_d$  (ή αλλιώς συγγένεια πρόσδεσης) υπολογιζόταν από την τελική καμπύλη που προέκυπτε (Paraneophytou et al., 2013).



**Εικόνα 1.18.** Χημικές ομάδες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν.  
(Πηγή: [www.biomed.ntua.gr/Portals](http://www.biomed.ntua.gr/Portals))



**Εικόνα 1.19.** Καμπύλες τιτλοδότησης για τη μέτρηση του  $K_d$  του SPD304 με φασματοσκοπία φθορισμού.

### 1.5 Το πρόβλημα της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των μικρών φαρμακευτικών μορίων

Είναι γνωστή η στενή συσχέτιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρών φαρμακευτικών μορίων (small drug molecules) με τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Για παράδειγμα, είναι συχνό φαινόμενο ενώσεις οδηγού λόγω χαμηλής λιποφιλικότητας να εμφανίζουν περιορισμένη ή και ανεπαρκή διαπερατότητα όσον αφορά τις μεμβράνες που συναντούν από την περιοχή λήψης της ουσίας στην περιοχή δράσης. Ωστόσο, μια ένωση οδηγός χρειάζεται να φέρει και κάποιες υδρόφιλες ομάδες έτσι ώστε να είναι αρκετά υδατοδιαλυτή για να είναι δυνατή η μεταφορά της μέχρι την περιοχή απορρόφησης της (drug delivery). Η υδατοδιαλυτότητα μιας ουσίας είναι σημαντική ιδιαίτερα όσον αφορά τη διέλευσή της από τη γαστρεντερική οδό (GI track).

Μια εκτίμηση της ικανότητας ενός φαρμακευτικού μορίου να έχει αμφοτέρως λιπόφιλο και υδρόφιλο χαρακτήρα μπορεί να προσδιοριστεί από τη χημική δομή της ένωσης χρησιμοποιώντας τον λεγόμενο κανόνα του πέντε του Chris

Lipinski. Βάσει του κανόνα αυτού μια ουσία για να έχει μια ικανοποιητική φαρμακο-ομοιότητα (drug-likeness) θα πρέπει να ισχύουν τα εξής:

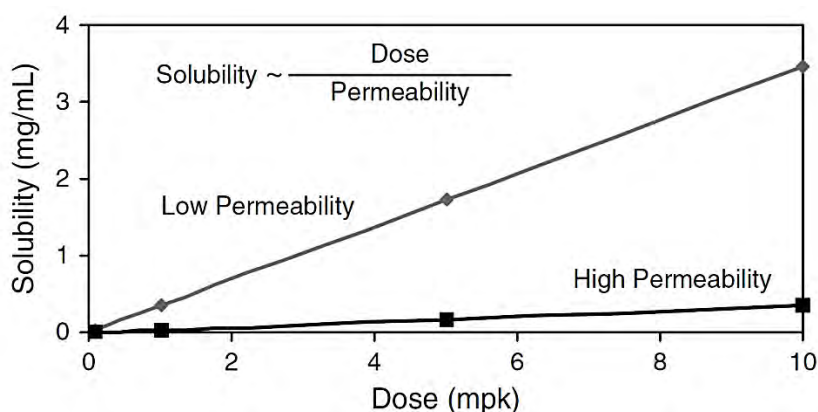
- $MW < 500$
- $clogP \leq 5$
- $HBD \leq 5$
- $HBA \leq 10$

Εντούτοις, συχνά ενώσεις που έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά δεν απορροφώνται ή δεν διαπερνούν με επιτυχία τις μεμβράνες. Έτσι ο παραπάνω κανόνας είναι ενδεικτικός και χρειάζεται πάντα η πειραματική επαλήθευση για το αν μια ένωση είναι βιοδιαθέσιμη στην περιοχική δράσης της.

Ένα σύνηθες πρόβλημα που εμφανίζεται στην έρευνα για νέες μικρομοριακές φαρμακευτικές ενώσεις (small-molecule drugs) είναι τόσο η μειωμένη διαπερατότητα όσο και η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα των πιθανών φαρμακευτικών μορίων. Το φαινόμενο αυτό δημιουργεί προβλήματα όχι μόνο στις *in vitro* και *in vivo* δοκιμές αλλά και μετέπειτα καθώς έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο αποτυχίας κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων (Alsenz and Kansy, 2007; Di et al., 2012).

Η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα σε πολλές περιπτώσεις παρεμποδίζει την αξιολόγηση των μορίων αυτών με βιολογικές δοκιμές και καταλήγει στον πρώιμο αποκλεισμό τους από την περαιτέρω εκμετάλλευσή τους. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο συχνό στα αρχικά στάδια της έρευνας όπου οι βιοδραστικές ενώσεις που προκύπτουν είναι χαμηλής δραστικότητας συνεπώς χρειάζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις για την ανίχνευσή τους (Savjani et al., 2012). Επίσης, ενώσεις με χαμηλή διαλυτότητα σε συνδυασμό με χαμηλή διαπερατότητα χρειάζονται αυξημένες δόσεις για να επιτευχθεί η επιθυμητή απορρόφηση. Αντίστροφα, όταν μια ένωση είναι αρκετά διαπερατή, χρειάζεται χαμηλότερη διαλυτότητα για να απορροφηθεί ικανοποιητικά (Εικόνα 1.20).

Ένα μικρό ποσοστό βιοδραστικών μορίων τα οποία εμφανίζουν εξαιρετικά καλή δραστικότητα (μεταξύ  $\mu\text{M}$  και  $\text{nM}$ ) μπορεί να ξεπεράσει εύκολα αυτό το εμπόδιο. Αυτό συμβαίνει γιατί στην περίπτωση αυτή οι συγκεντρώσεις που απαιτούνται για τις βιολογικές δοκιμές δεν ξεπερνούν τα όρια της χαμηλής διαλυτότητας ( $20\mu\text{M}$ ) (Lipinski et al., 2001).



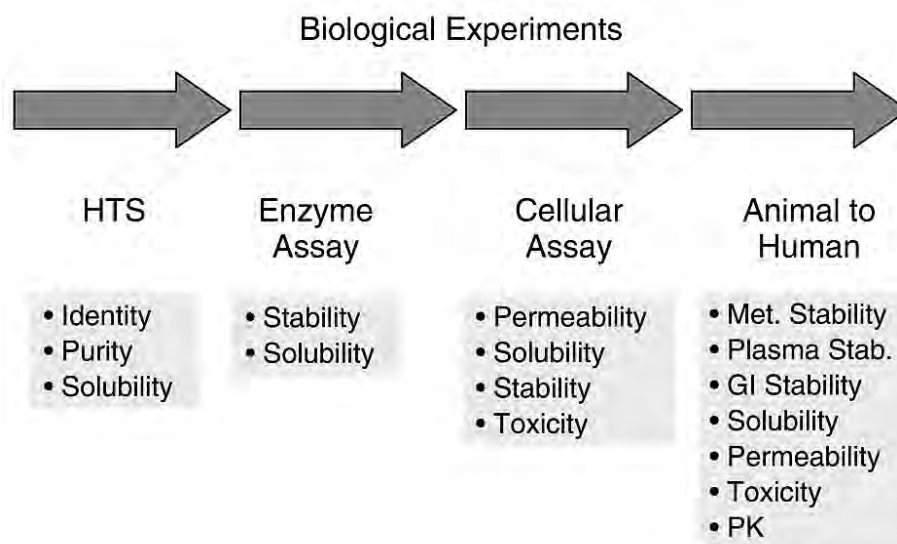
**Εικόνα 1.20.** Συσχέτιση διαλυτότητας, διαπερατότητας και μέγιστης απορροφημένης δόσης. Ενώσεις με χαμηλή διαλυτότητα χρειάζονται μεγαλύτερη διαπερατότητα και αντίστροφα για να επιτευχθεί η μέγιστη απορρόφηση για από του στόματος χρήση (Bighley et al., 1995).

Η χαμηλή υδατική διαλυτότητα αποτελεί πρόβλημα ακόμα και στα μετέπειτα στάδια της ανακάλυψης φαρμάκων καθώς έχει αναφερθεί ότι πάνω από το 40% των νέων χημικών οντοτήτων (new chemical entities) στη φαρμακοβιομηχανία παρουσιάζουν υπερβολικά χαμηλή διαλυτότητα (Savjani et al., 2012). Επίσης σύμφωνα με τον Lipinski (2000), διαφορετικές ερευνητικές προσεγγίσεις όπως η διαλογή υψηλής απόδοσης (High Throughput Screening, HTS) και ο σχεδιασμός φαρμάκων βάσει της δομής τις οποίες υιοθέτησαν δυο μεγάλες φαρμακευτικές βιομηχανίες (Pfizer και Merck), οδήγησαν και στις δυο περιπτώσεις σε φαρμακευτικές ουσίες με αυξανόμενα μοριακά βάρη και χαμηλή διαλυτότητα. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση την καλή συσχέτιση που υπάρχει ανάμεσα σε λιπόφιλες δομές των φαρμακοφόρων

ουσιών και βελτιωμένης δραστικότητας (Di and Kerns, 2006) και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον μελετών που αφορούν την πρόβλεψη διαλυτοτήτων ουσιών με φαρμακευτικές ιδιότητες (Faller and Ertl, 2007).

#### *1.5.1 Επιπλοκές της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας στις βιολογικές δοκιμές*

Η επίδραση που μπορεί να έχει η χαμηλή διαλυτότητα στις βιολογικές δοκιμές είναι ισχυρή. Για παράδειγμα αν οι ενώσεις είναι αδιάλυτες στο νερό τότε οι μετρούμενες τιμές της συγγένειας πρόσδεσης θα είναι εσφαλμένες. Αυτή η παρατήρηση είναι πολύ σημαντική καθώς μια συσχέτιση δομής-δραστικότητας (Structure-Activity Relationship) μπορεί να αποχτήσει λόγω κακής διαλυτότητας, διαπερατότητας ή σταθερότητας. Η χαμηλή διαλυτότητα στις βιολογικές δοκιμές μπορεί να οδηγήσει σε ανυπόστατα υψηλές τιμές  $K_d$  ή  $IC_{50}$ , κακή συσχέτιση δομής-δραστικότητας, αντίφαση ανάμεσα στα δεδομένα, διαφορές στην κατάταξη των δραστικών ουσιών ανάμεσα στις βιοχημικές και τις κυτταρικές δοκιμές κ.ά. Μια άλλη επίπτωση της χαμηλής διαλυτότητας είναι η μη ειδική αναστολή, όπως έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερα σε περιπτώσεις αναστολέων πολλαπλών στόχων (promiscuous inhibitors) που σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα (McGovern et al., 2003), καθώς και ο αποκλεισμός χημικών μορίων από περαιτέρω μελέτες (Di and Kerns, 2006). Έτσι η χαμηλή διαλυτότητα μπορεί να προκαλέσει χαμηλά ποσοστά επιτυχίας στο HTS. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι βιβλιοθήκες διαλογής μπορούν να εμπεριέχουν υψηλά ποσοστά αδιάλυτων ενώσεων (Pora-Burke et al., 2004). Στα διαφορετικά στάδια της ανακάλυψης και ανάπτυξης μιας φαρμακευτικής ουσίας είναι διαφορετικές εκείνες οι ιδιότητες που επηρεάζουν τις βιολογικές δοκιμές (Εικόνα 1.21).



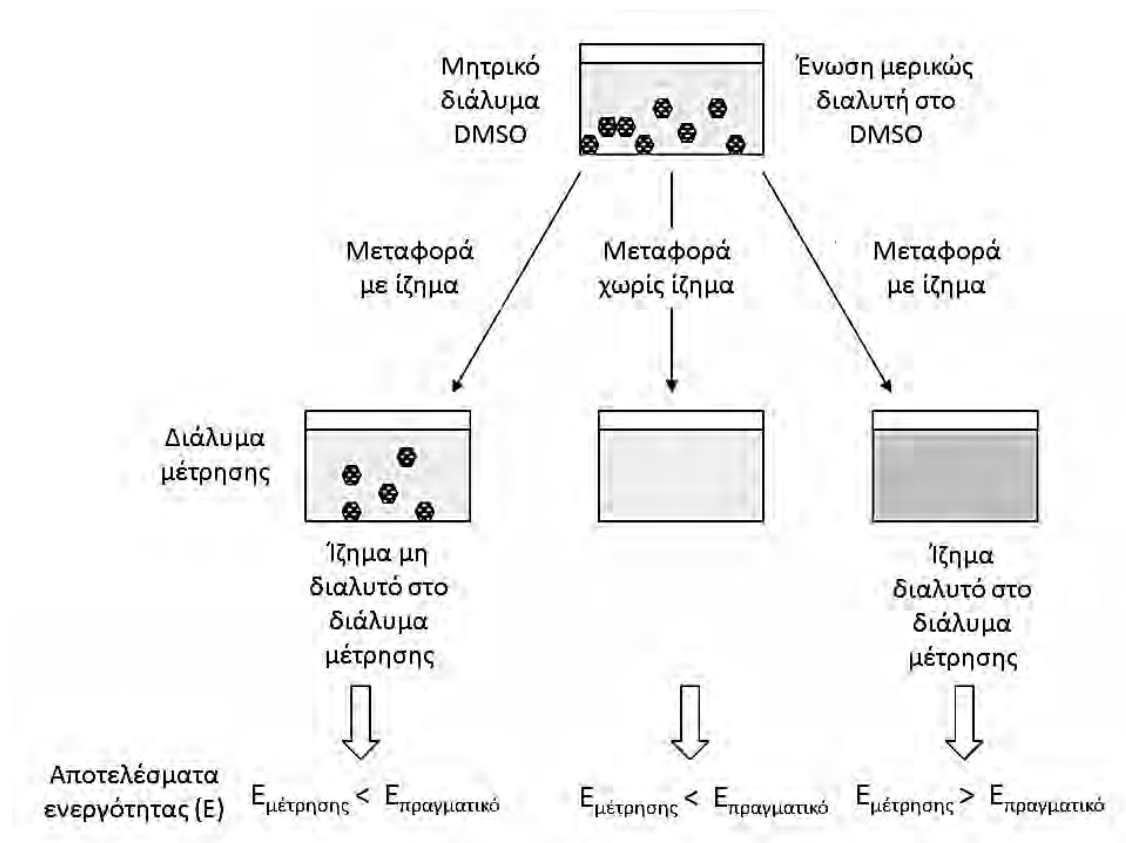
**Εικόνα 1.21.** Τα στάδια των βιολογικών δοκιμών στην ανακάλυψη φαρμάκων εμπεριέχουν περιορισμούς που σχετίζονται με τις ιδιότητες των ουσιών (Kerns and Di, 2008).

#### 1.5.1.1 Επιπτώσεις της χαμηλής διαλυτότητας του μητρικού διαλύματος σε καθαρό διαλύτη, το παράδειγμα του DMSO

Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί ως προς τη διαλυτότητα των ενώσεων στο DMSO (Balakin et al., 2006; Lipinski, 2004). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι ενώσεις που έχουν ισχυρό κρυσταλλικό πλέγμα (όπως ενώσεις σε κρυσταλλική μορφή) οι οποίες είναι πιθανό να έχουν χαμηλή διαλυτότητα στον συγκεκριμένο διαλύτη. Ενώσεις αυτής της κατηγορίας τείνουν να έχουν χαμηλότερα μοριακά βάρη, να είναι υδρόφιλες και σχετικά δύσκαμπτες όπως τα οργανικά άλατα. Μια άλλη κατηγορία ενώσεων με περιορισμένη διαλυτότητα στο DMSO έχουν μεγάλα μοριακά βάρη σε συνδυασμό με υψηλό logP, μεγάλο αριθμό περιστροφικών δεσμών ή υψηλό SASA (Solvent Accessible Surface Area) (Kerns and Di, 2008).

Η χαμηλή διαλυτότητα σε DMSO μπορεί να προκαλέσει κατακρήμνιση των ενώσεων πράγμα που πιθανώς να οδηγήσει σε μικρότερες από τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις στο διάλυμα των βιολογικών δοκιμών και σε

μετρούμενες ενεργότητες χαμηλότερες από τις πραγματικές. Ωστόσο σε περίπτωση που μεταφερθούν κατακρημνίσματα από το μητρικό διάλυμα στο διάλυμα του τιτλοδότη και διαλυθούν σε αυτό, τότε το ίδιο φαινόμενο μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες από τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις και κατ' επέκταση σε ενεργότητες υψηλότερες από τις πραγματικές (Εικόνα 1.22).



**Εικόνα 1.22.** Όταν το μητρικό διάλυμα σε DMSO έχει αδιάλυτα σωματίδια (ίζημα) η μετρούμενη ενεργότητα μπορεί να είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη της πραγματικής ενεργότητας ανάλογα με το αν έχει μεταφερθεί ποσότητα ιζήματος στο τελικό διάλυμα και αν είναι διαλυτό στο διάλυμα αυτό (τροποποιημένο σήμα από Kerns and Di, 2008).

Ένα άλλο πρόβλημα με τα μητρικά διαλύματα σε DMSO είναι οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης όπου η χαμηλή θερμοκρασία μειώνει τη διαλυτότητα της διαλυμένης ουσίας (Hoever and Zbinden, 2004). Η χαμηλή διαλυτότητα ευνοεί τον σχηματισμό κρυστάλλων. Οι σχηματιζόμενοι κρύσταλλοι έχουν μειωμένη διαλυτότητα στο DMSO σε σχέση με την προγενέστερη άμορφη κατάσταση της ένωσης. Για τον λόγο αυτό μετά την



απόψυξη οι κρύσταλλοι δεν επαναδιαλύονται στο DMSO (Lipinski, 2004). Έτσι συστήνεται η συντήρηση του μητρικού διαλύματος σε μονοδόσεις για να αποφεύγονται οι κύκλοι ψύξης-απόψυξης. Επίσης, λόγω της ιδιότητας του DMSO να απορροφά υγρασία από την ατμόσφαιρα είθισται να χρησιμοποιείται διάλυμα 10% νερού/90% DMSO για τη συντήρηση των ενώσεων.

#### *1.5.1.2 Μη ειδική αναστολή από κατακρήμνισμένους αναστολείς*

Βάσει διαφόρων μελετών περίπου το 30% των ανακαλυφθέντων ενώσεων έχουν υδατική διαλυτότητα <10 μM. Αυτή είναι η συνήθης συγκέντρωση στην οποία λαμβάνει χώρα το HTS (Lipinski, 2001) πράγμα που σημαίνει ότι πιθανότατα για ένα μέρος των ουσιών οι μετρούμενες ενεργότητες είναι χειρότερες από τις πραγματικές. Σε άλλες περιπτώσεις η μετρούμενη πρωτεΐνη προσροφάται στο ίζημα και με τον τρόπο αυτό φαίνεται ότι αναστέλλεται. Επίσης, το γεγονός ότι τα συσσωματώματα από 30-400 nm μπορούν να περάσουν μέσα από φίλτρα των 0.22 μm καθιστούν αδύνατη σε αυτές τις περιπτώσεις την απομάκρυνσή τους ακόμα και με φιλτράρισμα. Η δημιουργία συσσωματωμάτων μπορεί να ενεργοποιηθεί κατά τον υπερκορεσμό υδατικού διαλύματος στο οποίο προστίθεται σταδιακά μητρικό διάλυμα σε οργανικό διαλύτη της υπό μελέτης ουσίας (Lipinski, 2004).

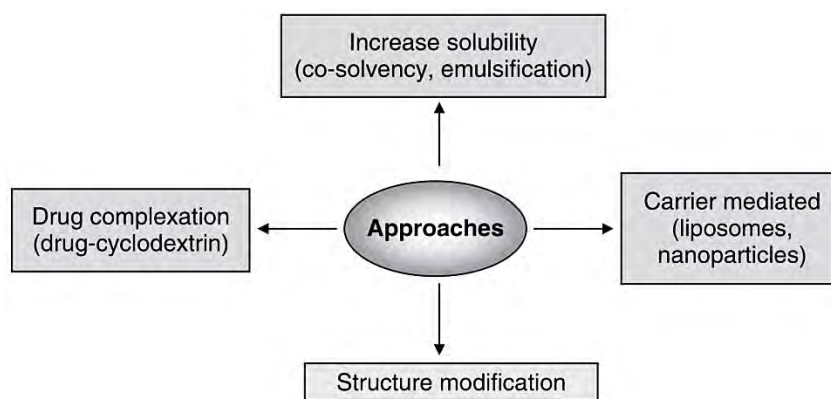
Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά παραδείγματα ψευδών αποτελεσμάτων λόγω κατακρήμνισης των μετρούμενων ουσιών. Για παράδειγμα, σε μια βιβλιοθήκη 1030 ενώσεων το ποσοστό των ψευδώς ενεργών μορίων ήταν 19% όταν οι μετρήσεις γίνονταν στα 30 μM ενώ μειώθηκε στο 1.4% όταν αυτές γίνονταν στα 5 μM όπου ο σχηματισμός συσσωματωμάτων είναι λιγότερο έντονος (Feng et al., 2005). Η μείωση λοιπόν της συγκέντρωσης του αναστολέα στις βιολογικές δοκιμές –όπου και όσο αυτό είναι δυνατό– είναι ακόμα ένας τρόπος να περιοριστούν οι επιπτώσεις της κατακρήμνισης στις μετρούμενες ενεργότητες.

### *1.5.1.3 Το παράδειγμα των μικρομοριακών αναστολέων του TNF*

Οι αναστολείς των πρωτεϊνών που φέρουν ρηχές περιοχές πρόσδεσης με υδρόφοβο χαρακτήρα έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά όπως η αυξημένη υδροφοβικότητα. Ο TNF και οι πιθανοί αναστολείς του είναι μια τυπική περίπτωση αυτής της κατηγορίας (He et al., 2005). Ο βασικός στόχος του προγράμματος RLead -στο οποίο εντάσσεται η παρούσα μελέτη- είναι η ανακάλυψη νέων πιθανών αναστολέων για τον TNF για την ανάδειξη μορίων οδηγών για κλινική μελέτη. Παρόλα αυτά, εξ αρχής εμφανίστηκε το διπλό πρόβλημα της χαμηλής διαλυτότητας των πιθανών αναστολέων καθώς και των επιπτώσεων της προσθήκης οργανικών διαλυτών τόσο στη σταθερότητα της πρωτεΐνης όσο και στη δέσμευση των πιθανών αναστολέων. Για τον λόγο αυτό ένας ενδιάμεσος στόχος στην παρούσα εργασία ήταν η διερεύνηση μεθόδων για την αύξηση της διαλυτότητας που να μην έχουν τις παραπάνω επιπλοκές.

### *1.5.2 Μέθοδοι ενίσχυσης της διαλυτότητας*

Η ενίσχυση της διαλυτότητας μικρών μορίων μπορεί συχνά να πραγματοποιηθεί μέσω δομικών αλλαγών (Εικόνα 1.23) που στοχεύουν στη μείωση της μοριακής επιπεδότητας και συμμετρίας έτσι ώστε να διακόπτεται το πακετάρισμα των κρυστάλλων και επομένως να μειώνεται η ενέργεια πλέγματος του μορίου. Επίσης, μπορεί να βασιστεί στην εισαγωγή ομάδων-διαλυτοποιητών στη βασική δομή της ένωσης τέτοιων που να μην επιβαρύνουν άλλες ιδιότητες του μορίου (όπως τη συγγένεια πρόσδεσης). Ωστόσο αυτές οι αλλαγές δεν είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν στα αρχικά στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών ουσιών όταν οι ενώσεις οδηγοί αναζητούνται μέσα σε ήδη υπάρχουσες συλλογές ουσιών. Επιπλέον, σε αυτό το στάδιο δεν υπάρχουν δομικά δεδομένα ώστε να γίνουν στοχευμένες αλλαγές για την ενίσχυση της διαλυτότητας χωρίς να επηρεάζεται η συγγένεια πρόσδεσης.



**Εικόνα 1.23.** Μέθοδοι ενίσχυσης της διαλυτότητας (Singla et al., 2002).

Η διαλυτότητα επηρεάζεται από τα συστατικά της βιολογικής δοκιμής (π.χ. ρυθμιστικό διάλυμα, οργανικούς διαλύτες, πρωτεΐνη) και το πρωτόκολλο διάλυσης (π.χ. χρόνο, θερμοκρασία). Έτσι μια καλή πρακτική κατά την ανάπτυξη της βιολογικής δοκιμής (bioassay development) είναι η βελτιστοποίηση των συστατικών του διαλύματος όπου γίνεται η δοκιμή, των συγκεντρώσεών τους, της αραιώσης και του πρωτοκόλλου έτσι ώστε όλα να συνδράμουν στην αύξηση της διάλυσης των προς μέτρηση ενώσεων. Επίσης, είναι θεμιτό το διάλυμα του τιλοδοτή να βρίσκεται σε καθαρό οργανικό διαλύτη καθώς προστίθεται στο προς μέτρηση διάλυμα, όπου αυτό είναι δυνατό. Καθώς τιλοδοτείται, λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών, κυτταρικού υλικού ή λιπιδικών μεμβρανών που μπορεί να περιέχει το τιλοδοτούμενο διάλυμα, βοηθάει στη διάλυση των αδιάλυτων ενώσεων. Με τον τρόπο αυτό αν και η συγκέντρωση του διαλύτη στο τελικό διάλυμα είναι πολύ μικρότερη από ό,τι στο πυκνό διάλυμα, η κατακρήμνιση της δραστικής ουσίας μπορεί να περιοριστεί.

#### 1.5.2.1 Προσθήκη συνδιαλυτών και εκδόχων

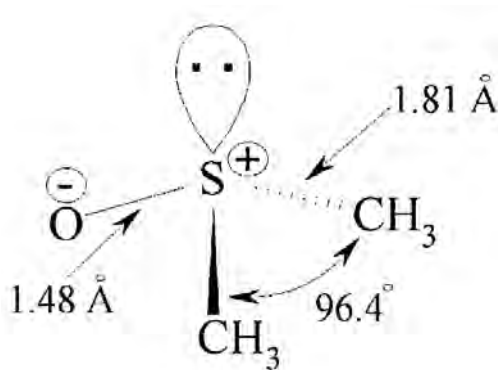
Η χρήση συνδιαλυτών (διαλυτών που προστίθενται σε υδατικό διάλυμα σε ποσοστό  $\leq 10\%$ ) μπορεί να ξεπεράσει τα προβλήματα χαμηλής διαλυτότητας.

Ωστόσο οι διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν δεν πρέπει να επηρεάζουν την σταθερότητα ή την συγγένεια ανάμεσα σε πρωτεΐνη και προσδέτη. Παρόλο που αρκετοί διαλύτες χρησιμοποιούνται για την αύξηση της υδατικής διαλυτότητας φαρμακευτικών ουσιών (EtOH, PEG, DMSO κλπ.) είναι σχετικά περιορισμένες οι μελέτες που διερευνούν κατά πόσο βοηθάει ο κάθε διαλύτης. Δηλαδή δεν διερευνάται σε ποιο ποσοστό αυξάνουν την διαλυτότητα των ουσιών όταν χρησιμοποιούνται ως συνδιαλύτες και συγκριτικά ποιος είναι ο καλύτερος. Για τον λόγο αυτό υπάρχει μεγάλη ανάγκη ανεύρεσης διαλυτών για την διάλυση λιπόφιλων μορίων οι οποίοι να μην επηρεάζουν τις πρωτεΐνες ή τις βιοχημικές δοκιμές. Η παρούσα εργασία (Papanophytou et al., 2013) έρχεται να συνδράμει σε αυτό το πεδίο όπου η βιβλιογραφία είναι αρκετά περιορισμένη και σχεδόν ανύπαρκτη όσο αφορά την περίπτωση μικρομοριακών αναστολέων του TNF.

#### *1.5.2.1.1 Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)*

Το DMSO έχει την εξαιρετική ιδιότητα να διαλύει διαφορετικά είδη μορίων (τόσο πολικά όσο και μη πολικά) γεγονός που του προσδίδει καίριο ρόλο στο HTS αλλά και στον χειρισμό δειγμάτων. Αυτή η ιδιότητα είναι πρωτίστως συνδεδεμένη με την υψηλή διηλεκτρική του σταθερά η οποία ξεπερνά άλλους δίπολους απρωτικούς διαλύτες όπως το διμεθυλοφορμαμίδιο, το N,N-διμεθυλακεταμίδιο κ.ά. (Balakin et al., 2004). Το DMSO αναμειγνύεται πολύ καλά με το νερό και ξεχωρίζει για την αυξημένη συμβατότητά του με τις πρωτεΐνες ανάμεσα σε άλλους συνδιαλύτες (όπως γλυκερόλη και διμεθυλομεθαναμίδιο-DMF) σε ποσοστό 5% (Papanophytou et al., 2013). Ένα άλλο χαρακτηριστικό του DMSO που επηρεάζει την ιδιότητά του σαν διαλύτη είναι η στερεοχημεία του (Εικόνα 1.24). Η δομή του DMSO δεν είναι επίπεδη αλλά σχηματίζει μια τριγωνική πυραμίδα. Υπάρχει ένα μονήρες ζεύγος

ηλεκτρονίων στην κορυφή αυτής της πυραμίδας που υποβοηθάει τη διάλυση των μορίων (Balakin et al., 2004).



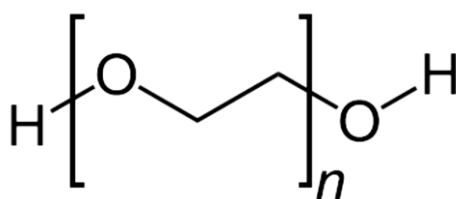
**Εικόνα 1.24.** Στερεοχημικές παράμετροι του μορίου του DMSO (Balakin et al., 2004).

Πολύ σημαντική είναι και η χαμηλή τοξικότητα του DMSO από οποιαδήποτε οδό και αν χορηγηθεί (στόμα, εισπνεόμενα ή διαδερμικά) ενώ παράλληλα δεν είναι ιδιαίτερα τοξικό για το περιβάλλον (Brown, 1971; Murdoch, 1982; Régnier and Richard, 1998). Λόγω των συνδυαστικών ιδιοτήτων που προαναφέρθηκαν, το DMSO αποτελεί μια από τις πρώτες επιλογές διαλύτη για την αποθήκευση και τον χειρισμό των δειγμάτων στην φαρμακευτική βιομηχανία ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια του HTS.

Το DMSO χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή μητρικών διαλυμάτων πράγμα που σημαίνει ότι παραμένει μια μικρή ποσότητα στο τελικό διάλυμα η οποία λειτουργεί σαν συνδιαλύτης. Για τον λόγο αυτό καλό είναι σε τέτοιες περιπτώσεις να προστίθεται ένα σταθερό ποσοστό DMSO ( $\leq 10\%$ ) σαν συνδιαλύτης γιατί με τον τρόπο αυτό εκτός από το ότι ενισχύεται η διαλυτότητα, διατηρείται η ομογένεια των πειραματικών συνθηκών (Alsenz and Kansy, 2007).

### 1.5.2.1.2 Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)

Οι πολυαιθυλενογλυκόλες (PEGs) είναι πολυαιθεροδιόλες με δυο ακραίες υδροξυλικές ομάδες και πολλούς εναλασσόμενους αιθερικούς συνδέσμους (Εικόνα 1.25). Ανάλογα με το μοριακό βάρος μεταβάλλονται και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Για παράδειγμα η PEG200 έχει περισσότερο χαρακτήρα διόλης και είναι πιο διαλυτή στο νερό ενώ η PEG4000 συμπεριφέρεται περισσότερο σαν πολυαιθέρας και η διαλυτότητά της οφείλεται ουσιαστικά στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στα μόρια του νερού και τα ηλεκτρονικά πλούσια οξυγόνα της αλυσίδας του πολυμερούς (Brownstein, 1982).



**Εικόνα 1.25.** Συντακτικός τύπος μονομερούς πολυαιθυλενογλυκόλης.

Είναι ευρέως διαδεδομένη στην κρυσταλλογραφία γιατί λόγω της υγροσκοπικής της ιδιότητας χρησιμοποιείται σαν κατακρημνιστής καθώς δεσμεύει μόρια νερού. Παράλληλα αποτελεί ένα πολύ καλό κρυοπροστατευτικό κατά τις μετρήσεις πρωτεϊνικών κρυστάλλων με ακτίνες-X μειώνοντας τον σχηματισμό πάγου που οδηγεί στους χαρακτηριστικούς δακτυλίους (ice rings) μειώνοντας έτσι την ποιότητα των δεδομένων σκέδασης.

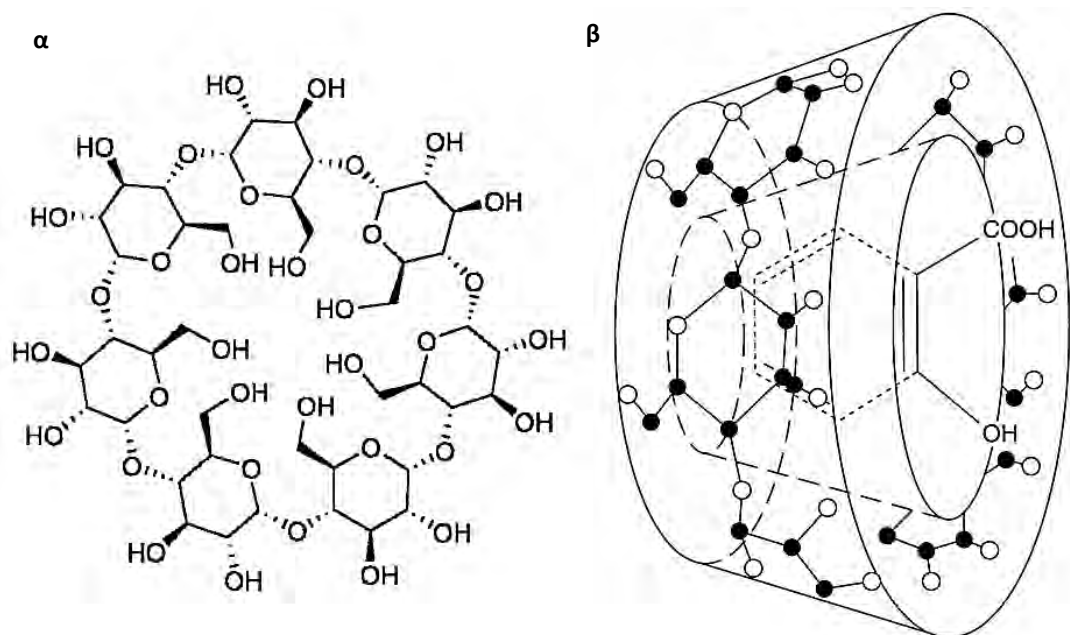
Μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι PEGs μεσαίου μοριακού βάρους (π.χ. 3350) έχουν θετική επίδραση στην πρωτεΐνη καθώς βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση (Cleland and Wang, 1990). Επίσης, συνδράμουν στη διατήρηση της ικανότητας της πρωτεΐνης να φθορίζει και ευνοούν σχετικά πιο

ανοιχτές διαμορφώσεις των υδρόφοβων κοιλοτήτων σε αντίθεση με τις PEGs χαμηλότερου μοριακού βάρους (Wu et al., 2014).

Οι PEGs σε γενικές γραμμές δεν εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα και χρησιμοποιούνται σαν έκδοχα σε καταπόσιμα αλλά και σε ενέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα (Strickley, 2004). Επίσης, βρίσκουν εφαρμογή και σαν υδρόφιλοι φορείς σε διασπορές στερεής φάσης (Savjani et al., 2012; Schafer-Korting et al., 1985; Sharma et al., 2009). Έχουν αναπτυχθεί QSPR μοντέλα διαλυτότητας σε 25-75% PEG400 (Rytting et al., 2005, 2004). Οι PEGs έχουν μελετηθεί και σαν συνδιαλύτες για τη βελτίωση της διαλυτότητας φαρμακευτικών ουσιών όπως η μιρταζαπίνη (Ezealisiji et al., 2015). Η μελέτη της ιδιότητας της PEG3350 ως συνδιαλύτη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5-10%) καθώς και η χρήση της σε μελέτες πρόσδεσης με φασματοσκοπία φθορισμού (Paraneophytou et al., 2013) και ισοθερμική θερμιδομετρία τιτλοδότησης αποτελούν τμήμα της παρούσας εργασίας.

#### *1.5.2.1.3 Κυκλοδεξτρίνη*

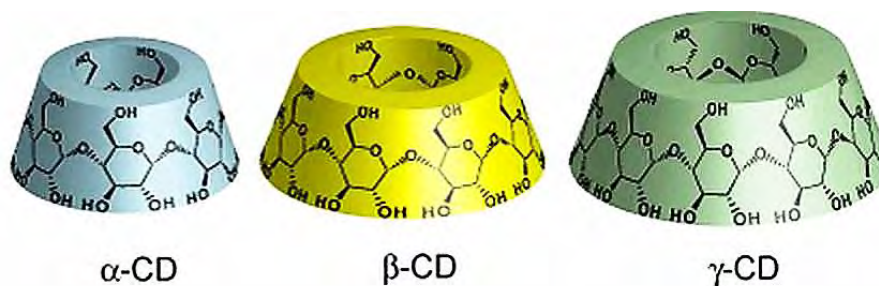
Οι κυκλοδεξτρίνες είναι ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από μονάδες D-γλυκοπιρανόζης με μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και μια υδρόφοβη κεντρική κοιλότητα (Loftsson and Duchêne, 2007). Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να σχηματίζουν υδατοδιαλυτά σύμπλοκα εγκλωβισμού με λιπόφιλες, μη διαλυτές ενώσεις. Ένα παράδειγμα συμπλόκου ξενιζόμενου/ξενιστή με κυκλοδεξτρίνη είναι αυτό με την ασπιρίνη που φαίνεται στην Εικόνα 1.26.



**Εικόνα 1.26.** Δομή **α.** β-κυκλοδεξτρίνης και **β.** συμπλόκου ασπιρίνης με β-κυκλοδεξτρίνη (Loftsson and Masson, 2001).

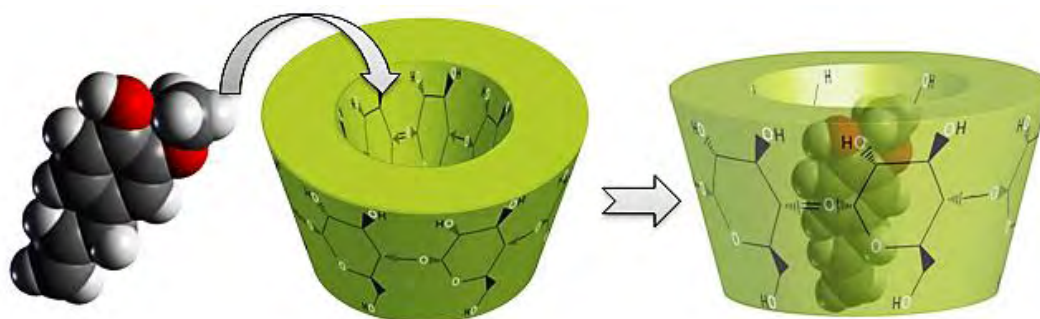
Οι κυκλοδεξτρίνες είναι σχετικά μεγάλα μόρια με μοριακό βάρος από 1000 έως 2000. Οι πιο συνηθεις είναι η α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνες (Εικόνα 1.27) με έξι, επτά και οκτώ μονάδες γλυκοπυρανόζης αντίστοιχα. Από αυτές η β-κυκλοδεξτρίνη είναι ο πιο χρήσιμος φαρμακευτικός παράγοντας εγκλωβισμού λόγω της ιδιότητάς της να δημιουργεί σύμπλοκα, του χαμηλού της κόστους κ.ά. (Loftsson and Masson, 2001). Ο πιο σοβαρός περιορισμός με την κυκλοδεξτρίνη είναι η τοξικότητά της -ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις- που μειώνει την επιτρεπόμενη δοσολογία. Η δημιουργία συμπλόκων με την κυκλοδεξτρίνη απαιτεί συγκεκριμένες ιδιότητες του μορίου ξενιστή και αυτή η μέθοδος μπορεί να μη λειτουργεί για τον εγκλωβισμό ορισμένων ενώσεων.





**Εικόνα 1.27.** Σχηματική αναπαράσταση των τριών βασικών τύπων κυκλοδεξτρίνης (Voncina and Vivod, 2013).

Η δημιουργία του συμπλόκου εξαρτάται από την εφαρμογή του μορίου ξενιστή στην κοιλότητα του ξενιζόμενου μορίου (Muñoz-Botella et al., 1995). Η υδρόφοβη κοιλότητα προσφέρει ένα μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο μπορούν να εισέλθουν μη πολικές ομάδες κατάλληλου μεγέθους προς δημιουργία συμπλόκων (Schneiderman and Stalcup, 2000, Kayaci and Uyar, 2012, Εικόνα 1.28). Δεν παρατηρείται σπάσιμο ή δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου όπου η κύρια κατευθυντήρια δύναμη είναι η απελευθέρωση πλούσιων σε ενθαλπία μορίων νερού από την κοιλότητα. Τα μόρια αυτά εκτοπίζονται από τα πιο υδρόφοβα μόρια του ξενιστή που υπάρχουν στο διάλυμα τα οποία αλληλεπιδρούν με την υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης για να καταλήξουν σε μια κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας.



**Εικόνα 1.28.** Εγκλωβισμός ενός μορίου βανιλίνης στην κοιλότητα ενός μορίου κυκλοδεξτρίνης σε αναλογία 1:1 (Kayaci and Uyar, 2012).

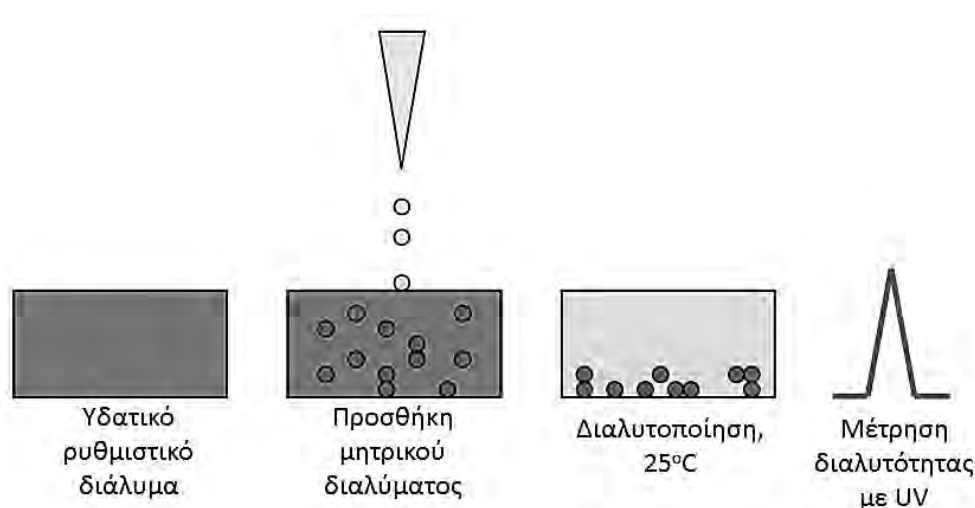
### *1.5.2.2 Πρωτόκολλο διάλυσης*

Η διαδικασία διάλυσης έχει πολύ μεγάλη επιρροή στη διαλυτότητα. Ανάλογα με τη μορφή υπό την οποία η ένωση προστίθεται στο τελικό διάλυμα μπορούν να προκύψουν δυο διαφορετικά είδη διαλυτότητας: η θερμοδυναμική και η κινητική. Σε μια πιο εφαρμόσιμη μελέτη της διαλυτότητας θα πρέπει κατά τη διάλυση της ουσίας να ακολουθούνται οι συνθήκες των βιολογικών δοκιμών. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί όπως προαναφέρθηκε η διαλυτότητα εξαρτάται από τα συστατικά του διαλύματος των βιολογικών δοκιμών καθώς και από το πρωτόκολλο με το οποίο γίνεται η διάλυση και η τιλοδότηση. Έτσι, είναι απαραίτητο το πρωτόκολλο διάλυσης να είναι προσαρμοσμένο στις συνθήκες των βιολογικών δοκιμών. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την μετρούμενη διαλυτότητα και σχετίζονται είτε με το πρωτόκολλο διάλυσης είτε με το πρωτόκολλο μέτρησης της διαλυτότητας είναι: ο χρόνος διάλυσης, η παρουσία διαλυτών από το μητρικό διάλυμα, το φιλτράρισμα των προς μέτρηση δειγμάτων και η μέθοδος μέτρησης.

#### *1.5.2.2.1 Κινητική και Θερμοδυναμική διαλυτότητα*

Η κινητική και η θερμοδυναμική διαλυτότητα είναι δύο διαφορετικοί τύποι διαλυτότητας και η ειδοποιός διαφορά τους είναι η μορφή υπό την οποία η μελετώμενη ουσία προστίθεται στο υδατικό διάλυμα. Όταν η ουσία προστίθεται στο τελικό διάλυμα σε στερεή μορφή τότε μετράται η θερμοδυναμική διαλυτότητα. Εναλλακτικά, η κινητική διαλυτότητα αναφέρεται σε διαλύματα τα οποία έχουν προκύψει από την αραιώση ενός μητρικού διαλύματος της ουσίας σε καθαρό οργανικό διαλύτη (Alsenz and Kansy, 2007). Η κινητική διαλυτότητα χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών όπου η παρασκευή μητρικών διαλυμάτων των ουσιών σε καθαρό

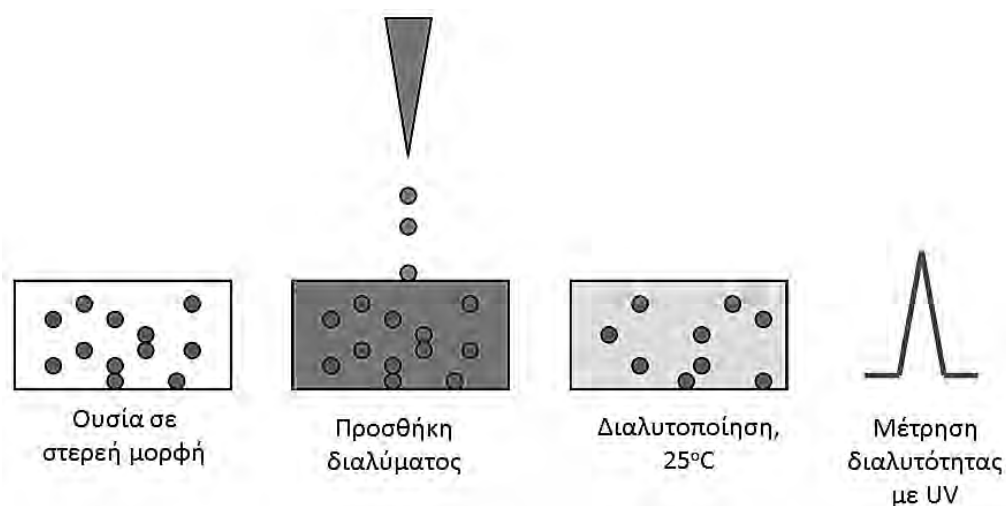
οργανικό διαλύτη -ιδιαίτερα σε DMSO- είναι αρκετά διαδεδομένη (Bevan and Lloyd, 2000; Hoelke et al., 2009; Kerns, 2001). Οι μέθοδοι κινητικής διαλυτότητας αντικατοπτρίζουν τα πρωτόκολλα των βιολογικών δοκιμών περισσότερο από τη θερμοδυναμική διαλυτότητα όπου η ουσία προστίθεται σε στερεή μορφή. Έτσι καθώς είθισται να παρασκευάζονται μητρικά διαλύματα 10 - 20 mM για τις βιολογικές δοκιμές, τα ίδια διαλύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τις μελέτες διαλυτότητας. Επίσης, χρειάζονται μικρές ποσότητες για τη μέτρηση της κινητικής διαλυτότητας (1 - 2 mg) γεγονός πολύ σημαντικό καθώς κατά τα πρώτα στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμακοφόρων οι διαθέσιμες ποσότητες είναι κατά κανόνα περιορισμένες.



**Εικόνα 1.29.** Σχηματική αναπαράσταση παρασκευής του τελικού διαλύματος κατά τη μέτρηση της κινητικής διαλυτότητας (τροποποιημένο σχήμα από Kerns and Di, 2008).

Η τιμή της θερμοδυναμικής διαλυτότητας ποικίλει ανάλογα με την κρυσταλλική μορφή της στερεής ένωσης (άμορφη, κρυσταλλική, διαφορετικά πολύμορφα ένυδρα και ενυδατωμένα). Οι λιγότερο σταθερές κρυσταλλικές μορφές τείνουν να έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα από τις πιο σταθερές μορφές. Για παράδειγμα, το άμορφο υλικό έχει υψηλότερη διαλυτότητα από το κρυσταλλικό υλικό. Όπως προαναφέρθηκε οι βιολογικές δοκιμές στην ανακάλυψη φαρμακευτικών ουσιών δεν ξεκινούν από στερεή ουσία αλλά

χρησιμοποιούν μητρικά διαλύματα σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες, οπότε η σχέση της θερμοδυναμικής διαλυτότητας με τις βιολογικές δοκιμές είναι περιορισμένη. Η χρήση δεδομένων θερμοδυναμικής διαλυτότητας στα πρώτα στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμακοφόρων μπορεί να αποβεί αντιπαραγωγική επειδή: α) οι διαλυτότητες ενώσεων που ανήκουν σε διαφορετικές παρτίδες σύνθεσης μπορεί να διαφέρουν εξαιτίας των διαφορετικών κρυσταλλικών μορφών και β) η θερμοδυναμική διαλυτότητα δεν σχετίζεται με τις άμορφες στερεές ενώσεις που συνήθως συντίθενται σε αυτό το στάδιο. Η θερμοδυναμική διαλυτότητα είναι πιο χρήσιμη στα τελευταία στάδια της ανακάλυψης και στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης φαρμακοφόρων ενώσεων όπου συντίθενται μεγάλες ποσότητες και γίνεται χαρακτηρισμός της κρυσταλλικής μορφής με απώτερο σκοπό την καθοδήγηση της μορφοποίησης (formulation) και της στρατηγικής της ανάπτυξης των νέων φαρμακευτικών ενώσεων κ.ά. (Kerns and Di, 2008).



**Εικόνα 1.30.** Σχηματική αναπαράσταση παρασκευής του τελικού διαλύματος κατά τη μέτρηση της θερμοδυναμικής διαλυτότητας (τροποποιημένο σχήμα από Kerns and Di, 2008).

Η κινητική διαλυτότητα γενικά τείνει να είναι πιο υψηλή από τη θερμοδυναμική. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί με βάση τις διαφορετικές ενδομοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται σε κάθε περίπτωση. Η

θερμοδυναμική διαλυτότητα αναφέρεται στη διάλυση της στερεής φάσης στο τελικό διάλυμα όπου θα μετρηθεί η διαλυτότητα. Με τον τρόπο αυτό συσχετίζεται πολύ με τις αλληλεπιδράσεις των μορίων της διαλυόμενης ουσίας μεταξύ τους αλλά και με τα μόρια του διαλύτη. Στην περίπτωση της κινητικής διαλυτότητας όπου η ουσία έχει προδιαλυθεί σε κάποιον οργανικό διαλύτη, οι διαμοριακές δυνάμεις που παίζουν ρόλο είναι αυτές που αναπτύσσονται ανάμεσα στα μόρια της διαλυόμενης ουσίας και του διαλύτη. Επίσης, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η εξάρτηση της κινητικής διαλυτότητας από το διάλυμα καθώς μικρές μεταβολές του pH, του οργανικού διαλύτη, της ιονικής ισχύος, των συνδιαλυτών, του χρόνου διάλυσης και της θερμοκρασίας μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές μεταβολές της διαλυτότητας των ενώσεων. Η μέτρηση της κινητικής διαλυτότητας μπορεί εκτός των άλλων να στοχεύει και στην ταυτοποίηση ουσιών που δεν έχουν καλή κινητική διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα παρουσία DMSO, στην καθοδήγηση των τροποποιήσεων της δομής με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας και στην επιλογή της κατάλληλης μορφοποίησης για τη δοσολογία στα ζώα (Kerns and Di, 2008).

### *1.5.3 Μοντέλα πρόβλεψης διαλυτότητας*

Είναι χρήσιμο να γίνεται νωρίς μια εκτίμηση της διαλυτότητας των υπό μελέτη ενώσεων. Υπάρχουν αρκετά εμπορικά λογισμικά που προβλέπουν την υδατική διαλυτότητα από τη μοριακή δομή (Delaney, 2005; Jorgensen and Duffy, 2002). Παρόλο που αυτοί οι υπολογισμοί δεν είναι εντελώς ακριβείς (συνήθως διαφέρουν μέχρι και 10 φορές από την πραγματική διαλυτότητα) και οι προβλέψεις αναφέρονται σε κατάσταση ισορροπίας, μπορούν να δώσουν μια έγκαιρη προειδοποίηση για πιθανά προβλήματα διαλυτότητας. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρέχουν τις πιθανές διακυμάνσεις της διαλυτότητας ως προς το

pH έτσι ώστε να μπορεί να γίνει καλύτερος πειραματικός σχεδιασμός (Oprea et al., 2005; van de Waterbeemd and Gifford, 2003). Ωστόσο τα περισσότερα ερευνητικά κέντρα χρησιμοποιούν το HTS για να έχουν μια πιο αξιόπιστη εικόνα για τη διαλυτότητα -σε σχέση με τα μοντέλα πρόβλεψης- και να διαχειριστούν εγκαίρως τυχόν προβλήματα που μπορεί να προκύψουν (Kerns, 2001; Kerns and Di, 2005, 2004).

Τα μοντέλα Ποσοτικής Συσχέτισης Δομής Ιδιότητας (Quantitative Structure Property Relationship, QSPR) χρησιμοποιούνται -μεταξύ διαφόρων άλλων μοντέλων- για την πρόβλεψη της διαλυτότητας. Τα μοντέλα αυτά μπορούν να βασιστούν αποκλειστικά σε δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων σε αντίθεση με άλλα μοντέλα στα οποία είναι απαραίτητο να είναι γνωστά κάποια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως η διηλεκτρική σταθερά, η διαλυτότητα σε καθαρό διαλύτη κλπ. (Jouyban, 2008). Οι μοριακοί δείκτες κωδικοποιούν πληροφορίες σχετικά με τη δομή, τις διακλαδώσεις, τα ηλεκτρονικά φαινόμενα, τις αλυσίδες και τους δακτυλίους των δομοστοιχείων (modules) και επομένως έμμεσα εξηγούν τη συναγωνιστική επίδραση ανάμεσα στις λειτουργικές μονάδες που περιορίζουν ή αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα.

Καθώς οι περιορισμένες φαρμακευτικές ιδιότητες -και κυρίως η χαμηλή υδατική διαλυτότητα- συντελούν στην αύξηση του κόστους και του χρόνου που χρειάζεται για την ανάπτυξη και τη δημιουργία φαρμακευτικών μορίων, τέτοιες θεωρητικές προσεγγίσεις προσελκύουν αυξημένη προσοχή (Faller and Ertl, 2007; He, 2005; Kerns, 2001). Τα μοντέλα πρόβλεψης διαλυτοτήτων μπορούν να καθοδηγήσουν είτε τους φαρμακευτικούς χημικούς κατά την έρευνα νέων φάρμακων, είτε τους βιολόγους κατά την επιλογή των προς μελέτη ουσιών (Xia et al., 2003) και συνδιαλυτών για τη βελτιστοποίηση των βιολογικών δοκιμών. Βάσει της βιβλιογραφίας τα μοντέλα πρόβλεψης συνηθέστερα αναφέρονται είτε στη διάλυση των ουσιών σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες (Tetko et al., 2013),

είτε σε καθαρά υδατικά διαλύματα όπου δεν έχει προστεθεί κανένας συνδιαλύτης (Faller and Ertl, 2007). Στην πρώτη περίπτωση οι προβλεπόμενες διαλυτότητες δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στη διεξαγωγή βιολογικών δοκιμών που πραγματοποιούνται σε υδατικά διαλύματα. Στη δεύτερη περίπτωση, οι προβλεπόμενες τιμές είναι συχνά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις τιμές της διαλυτότητας που προκύπτουν με την προσθήκη συνδιαλύτη. Συνεπώς, τα μοντέλα πρόβλεψης που βασίζονται σε δεδομένα υδατικής διαλυτότητας παρουσία κάποιου συνδιαλύτη (Xia et al., 2003) μπορούν να φανούν χρήσιμα στον σχεδιασμό βιολογικών δοκιμών και να αυξήσουν το ποσοστό των ενώσεων που προβλέπονται σαν διαλυτές, προτείνοντας περισσότερες ενώσεις για περαιτέρω διερεύνηση.

Ένα άλλο κοινό μειονέκτημα των διαθέσιμων μοντέλων πρόβλεψης είναι η χρήση ανομοιογενών δεδομένων διαλυτότητας από διάφορες βάσεις δεδομένων. Τέτοιου είδους δεδομένα συχνά εμφανίζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις -όχι μόνο ως προς τις μεθόδους και τα πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί στις μετρήσεις αλλά ακόμα και στον ορισμό της διαλυτότητας- οι οποίες μπορούν να έχουν μεγάλη επιρροή στις πειραματικές τιμές (Faller and Ertl, 2007; He, 2005). Συνεπώς, είναι επιθυμητή η δημιουργία QSPR μοντέλων πρόβλεψης διαλυτοτήτων βασισμένων σε υψηλής ποιότητας και ομοιογενή πειραματικά δεδομένα τα οποία έχουν μετρηθεί με ένα σταθερό πρωτόκολλο (Xia et al., 2003). Ένα μέρος αυτής της εργασίας επικεντρώθηκε στη δημιουργία δεδομένων διαλυτότητας όπου ακολουθήθηκε αυστηρά ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο. Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός QSPR μοντέλου πρόβλεψης υδατικής διαλυτότητας παρουσία 5% DMSO (Mettou et al., 2017).

## 1.6 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Συνοψίζοντας, οι μικρομοριακοί, διασπαστικοί αναστολείς (disruptive inhibitors) του TNF έχουν σκοπό να προάγουν την αντι-TNF θεραπεία. Οι αναστολείς αυτοί παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της μέχρι τώρα εφαρμοζόμενης αντι-TNF θεραπείας η οποία βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων και υποδοχέων του TNF: αποφεύγεται η ενεσοθεραπεία, δεν εμφανίζουν ανοσογονικότητα, διεισδύουν καλύτερα στους ιστούς κ.ά. Στην παρούσα μελέτη όλες οι ενώσεις που μελετήθηκαν είναι μικρού μοριακού βάρους (530 g/mol κατά μέσο όρο) και προορίζονται για από του στόματος χρήση. Ο σχεδιασμός τους βασίστηκε στο SPD304 και σε μελέτες ελλιμενισμού (docking). Στόχος ήταν τόσο η δημιουργία πιο δραστικών και λιγότερο τοξικών αναλόγων του SPD304 όσο και η ανακάλυψη εντελώς νέων φαρμακοφόρων.

Ωστόσο, ένα βασικό εμπόδιο που έπρεπε να προσπελαστεί ήταν η χαμηλή υδατική διαλυτότητα που οφείλεται στην υδροφοβικότητα των αναστολέων που συνδέεται με την υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσής τους. Το πρόβλημα αυτό στην παρούσα εργασία ήταν ιδιαίτερα σημαντικό καθώς η πλειονότητα των ουσιών ήταν αδιάλυτες στο νερό (το 76% βάσει υπολογισμού) ενώ το 61% δεν ήταν αρκετά διαλυτές σε 5% DMSO για τη διεξαγωγή των *in vitro* δοκιμών. Εκτός από τις *in vitro* βιοχημικές δοκιμές οι τεχνικές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην κρυστάλλωση πρωτεϊνικών συμπλόκων με μικρά φαρμακευτικά μόρια.



## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Όργανα

- Ακίδα υπερήχων (Labsonic M) Sartorius Stedium
- Αναδευτήρας (τύπου «vortex») Mixer Uzusio LMS VTX-3000L
- Βιοαντιδραστήρας STR (Stirred Tank Reactor)
- Επωαστήρας κυττάρων Orbit Shaker Bath (Lab-line)
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας Scaltec SBA 31
- Θερμιδόμετρο ισόθερμης τιτλοδότησης Nano ITC (TA Instruments, USA)
- Μαγνητικός αναδευτήρας Heidolph MR 3001
- pH-μετρο WTW pH 522
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης Bio Rad Mini Protean II
  - Τροφοδοτικό Power Pac 300 (Bio Rad)
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) της εταιρίας Biorad που αποτελείται από τα εξής μέρη:
  - Αντλία (Bio Logic Duo FLOW)
  - Πολυχρωμάτωρα UV - ορατού με 254/280 nm φίλτρα
  - Μετρητή αγωγιμότητας, μετρητή pH, μετρητή πίεσης (Bio Logic Quand Tec UV-Vis Detector)
  - Αυτόματο συλλέκτη κλασμάτων (Biofrac)
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (CBM-20A, Shimadzu) που αποτελείται από τα εξής μέρη:
  - Αντλία (LC-20AD, Shimadzu)
  - Αυτόματος δειγματολήπτης (SIL-20AC, Shimadzu)
  - Θερμοστατούμενος κλίβανος (CTO-20AC, Shimadzu)
  - Ανιχνευτής φωτοδίοδων (SPD-M20A, Shimadzu)
  - Στήλη τύπου C18 (Luna, Phenomenex)

- Υδατόλουτρο Grant Y14
- Φασματοφωτόμετρο (Spectrophotometer UV-VIS) Shimadzu UV-1205
- Φασματοφωτόμετρο φθορισμού Hitachi F-2500 (Hitachi Lts)
- Φυγόκεντρος Biofuge Stratos 75005289R (Heraeus)

## 2.2 Υλικά

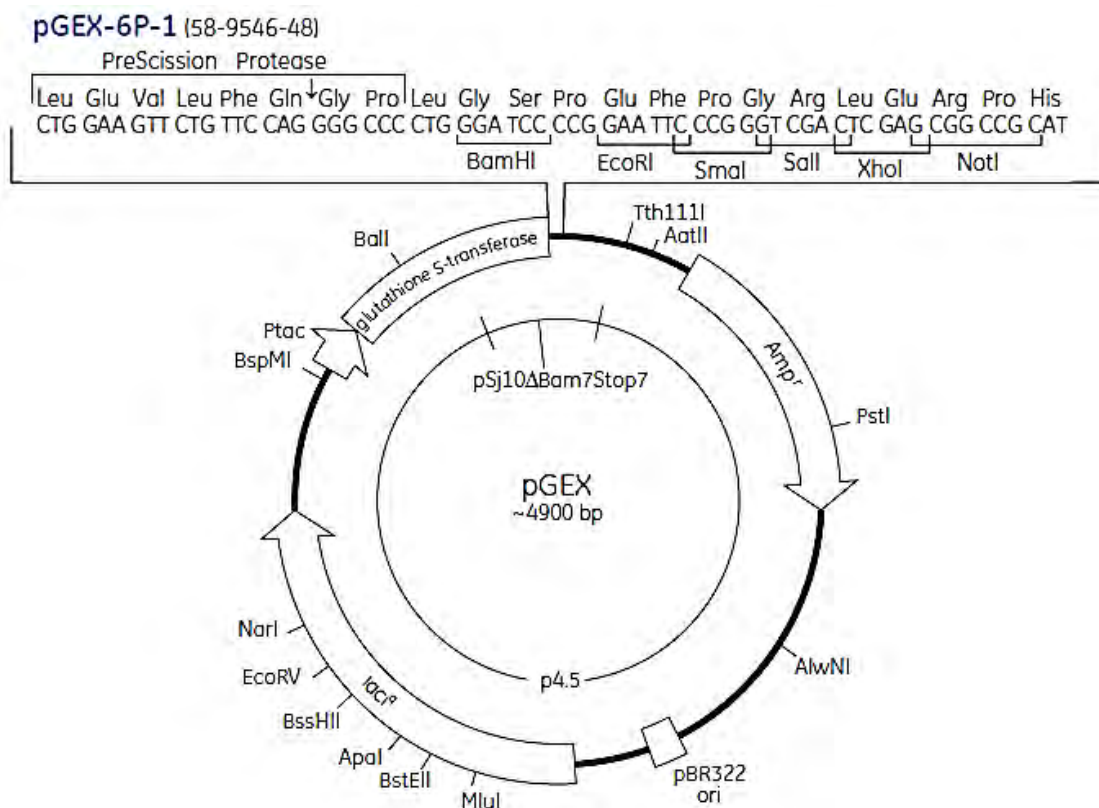
- L-γλουταθειόνη ανηγμένης μορφής (L-Glutathione reduced, Sigma - Aldrich)
- Διαλύτες κατάλληλοι για ανάλυση (analytical grade): Cremophor RH40 (BASF), Dimethyl Sulfoxide (DMSO, HPLC grade, Sigma - Aldrich), β-κυκλοδεξτρίνη (HP β-Cyclodextrin, Sigma - Aldrich), μεθανόλη (HPLC grade, Serva), πολυαιθυλενογλυκόλη 3350 (PEG3350, Molecular Dimensions)
- Λυσοζύμη (Lysozyme chicken egg white, Sigma - Aldrich)
- Μήτρα υγρής χρωματογραφίας συγγένειας γλουταθειόνης-αγαρόζης (GST-agarose matrix, Macherey-Nagel)
- Πιάτα κρυστάλλωσης κρεμαστής σταγόνας (Molecular Dimensions) και καθιστής σταγόνας (Hampton Research)
- Πλασμίδιο pGex-6P-1 (GE Healthcare Life Sciences)
- Σειρές βακτηριακών κύτταρων *E-coli* BL21(DE3) και *E-coli* BL21(DE3)pLysS (GE Healthcare)
- Σει διαλυμάτων κατακρήμνισης για κρυσταλλώσεις πρωτεϊνών των εταιριών Molecular Dimensions, Qiagen-Nextal, Rigaku και Hampton Research
- Συγκεντρωτικοί σωλήνες Amicon 10 kDa cutoff (Merck)
- Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλες αναλυτικής καθαρότητας από τις εταιρίες Serva και Sigma - Aldrich.

## 2.3 Μέθοδοι

### 2.3.1 Πρωτεϊνική έκφραση και καθαρισμός

#### 2.3.1.1 Φορέας έκφρασης TNF

Η πρωτεΐνη TNF εκφράστηκε στη βακτηριακή κυτταρική σειρά *E.coli* BL21(DE3) pLysS σαν πρωτεΐνη σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST fusion protein). Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pGEX-6P-1 (Εικόνα 2.1). Εκφράστηκε το εξωκυττάριο τμήμα της ανθρώπινης TNF από το κατάλοιπο του ασπαρτικού οξέος 86 μέχρι τη λευκίνη 233. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε στο μέσο Luria Bertani (LB) στο οποίο είχαν προστεθεί 100 µg/mL αμπικιλίνης (σε μορφή νατριούχου άλατος) και 34 µg/mL κλωραμφενικόλης.



Εικόνα 2.1. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1.

### *2.3.1.2 Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση*

Κατά την προετοιμασία βακτηριακών δειγμάτων προς μακρά αποθήκευση σε σωλήνες μικροφυγοκέντρησης (1 mL) τοποθετήθηκαν 400  $\mu$ L καλλιέργειας επωασμένης για 16 ώρες και 600  $\mu$ L διαλύματος αποστειρωμένης γλυκερόλης 80% (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης: 30% v/v). Ακολούθησε ψύξη με υγρό άζωτο ή λουτρό αιθανόλης και αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *2.3.1.3 Επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών επισημασμένων με τransφεράση της γλουταθειόνης (GST)*

Για την επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης έγινε εμβολιασμός 10 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB που περιείχε 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  αμπικιλίνη και 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  χλωραμφενικόλη, με 0.5 mL ολονύκτιας καλλιέργειας κυττάρων BL21(DE3) pLysS μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pGEX/TNF. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση μέχρι η τιμή της απορρόφησής της να φτάσει περίπου στο  $\lambda_{600\text{nm}} = 0.6$  που είναι το μέσο της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης των κυττάρων. Στο σημείο αυτό έγινε λήψη δείγματος 1 mL από την καλλιέργεια και κατόπιν φυγοκέντρησης (3500 g, 25') το κυτταρικό ίζημα (μη επαγόμενο δείγμα) τοποθετήθηκε σε πάγο μέχρι το τέλος της επαγωγής. Ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης στους  $24^{\circ}\text{C}$  για 3 ώρες, με προσθήκη ισοπροπυλικής θειογαλακτοσίδης (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Μετά το πέρας της επαγωγής έγινε λήψη ενός ακόμα δείγματος καλλιέργειας 1 mL (επαγόμενο δείγμα), συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση (3500 g για 25'), ξέπλυμα των κύτταρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM, pH= 7.4) και αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Εν συνεχεία το ίζημα

των δύο δειγμάτων επαναδιαλύθηκε σε 100  $\mu\text{L}$  1x διαλύματος Laemmli και μετά από 10 λεπτά βρασμού ηλεκτροφορήθηκαν κατά SDS-PAGE (βλ. § 2.3.1.6.2).

#### *2.3.1.4. Καθαρισμός πρωτεϊνών επισημασμένων με GST υπό φυσικές (native) συνθήκες*

Για τον καθαρισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST/TNF καθώς και της ανθρώπινης Rhinovirus 3C πρωτεάσης (America Pharmacia Biotech), χρησιμοποιήθηκε στήλη γλουταθειόνης/αγαρόζης (Macherey-Nagel). Η GST πρωτεΐνη συνδέεται με το αμινοτελικό άκρο του TNF και χρησιμοποιείται για την απομόνωσή του από το μίγμα του ολικού βακτηριακού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Η δομή της θέσης πρόσδεσης της GST είναι συμπληρωματική με αυτή της γλουταθειόνης του προσροφητικού υλικού οπότε προσδένεται σε αυτό.

Αρχικά έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα PBS όπου είχαν προστεθεί: 1 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), 1 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), 1% w/v Triton. Η λύση πραγματοποιήθηκε παρουσία λυσοζύμης (2 mg/mL) με επώαση στους 4°C για 90' υπό ανάδευση και εν συνεχεία στο μίγμα έγινε εφαρμογή υπερήχων (20 x 20") με πλάτος ανακλάσεων (amplitude) 60%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (15,000 g, 30') για τον διαχωρισμό του διαλυτού κλάσματος και φιλτράρισμα με φίλτρα σύριγγας 0.45  $\mu\text{m}$ . Έγινε φόρτωση του κλάσματος στην στήλη γλουταθειόνης/αγαρόζης (~2 mL) και ακολούθησε πλύσιμο της στήλης με τουλάχιστον 30 mL PBS.

Για την απομάκρυνση της ετικέτας GST από την TNF έγινε ολονύκτια πέψη (~16 ώρες) του συμπλόκου πρωτεΐνης - προσροφητικού υλικού με την απομονωμένη 3C πρωτεάση σε αναλογία πρωτεάσης/πρωτεΐνης 1:20 w/w, στους 4°C, παρουσία 1 mM DTT και 0.5 mM EDTA. Στη συνέχεια συλλέχθηκε

το μη προσροφημένο κλάσμα (flow through) το οποίο περιείχε τον TNF και έγινε έκλυση των προσροφούμενων πρωτεϊνών (κατά βάση GST και λιγότερο GST/TNF) από τη στήλη με το διάλυμα έκλυσης (50 mM Tris-HCl, 10 mM γλουταθειόνη, pH 8). Η στήλη εξισορροπήθηκε με PBS και το μη προσροφημένο κλάσμα του TNF διήλθε και πάλι μέσα από το προσροφητικό υλικό για να δεσμευτούν τυχόν υπολείμματα GST ή άκοπης GST/TNF πρωτεΐνης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση SDS PAGE δειγμάτων από όλα τα στάδια του καθαρισμού όπου διαπιστώθηκε η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Τέλος η πρωτεΐνη ψύχθηκε με υγρό άζωτο ή λουτρό αιθανόλης και αποθηκεύτηκε στους -80°C (χρήση σε μελέτες πρόσδεσης).

#### *2.3.1.5 Διαχωρισμός φυσικών πληθυσμών ολιγομερών TNF με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size Exclusion Chromatography)*

Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε με τη στήλη γλουταθειόνης – αγαρόζης και προοριζόταν για δοκιμές κρυστάλλωσης διήλθε από στήλη μοριακής διήθησης Superdex 75, 16/60, 120 mL, εξισορροπημένη με PBS. Σκοπός του πειράματος αυτού είναι ο διαχωρισμός βάσει μοριακού βάρους των φυσικών πληθυσμών μορίων που υπάρχουν μέσα στο διάλυμα της απομονωμένης πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε με χρήση συγκεντρωτικών σωλήνων Amicon που δεν επιτρέπουν τη διέλευση από τους πόρους μορίων μεγέθους μεγαλύτερου από 10 kDa (10 kDa cutoff). Το δείγμα που είχε όγκο περίπου 0.6 mL φυγοκεντρήθηκε σε 15,000 g και φορτώθηκε στη στήλη με τη χρήση ειδικού υποδοχέα 0.5 mL. Η ροή της κινητής φάσης (PBS) τόσο κατά τη διάρκεια της φόρτωσης όσο και κατά την έκλυση της πρωτεΐνης ήταν 1.0 mL/min ενώ ο όγκος των κλασμάτων που συλλέχθηκαν ήταν 0.75 mL. Κατά την έκλυση της πρωτεΐνης έγινε καταγραφή του χρωματογραφήματος απορρόφησης των εκλουσμάτων σε μήκος κύματος 280 nm. Μετά το πέρας της

διαδικασίας τα εκλούσματα που εμφάνισαν αξιόλογη απορρόφηση ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS PAGE πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12.5% w/v υπό αποδιατακτικές συνθήκες για την ταυτοποίηση της επιθυμητής πρωτεΐνης στους φυσικούς πληθυσμούς που διαχωρίστηκαν.

#### *2.3.1.6 Χειρισμοί πρωτεϊνικών δειγμάτων*

##### *2.3.1.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε διάλυμα*

α) με τη μέθοδο Bradford

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η συγκέντρωση της επιθυμητής πρωτεΐνης σε διάλυμα βάσει της απορρόφησης της σε μήκος κύματος 595 nm και επιλύοντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης. Αρχικά κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης βοείου ορού (BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) με τις μετρήσεις απορρόφησης διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης και με τη χρήση υπολογιστικού προγράμματος (excel των windows). Η εξίσωση της καμπύλης αυτής που έχει σαν τεταγμένες ( $\psi$ ) τις απορροφήσεις των δειγμάτων σε μήκος κύματος 595 nm και σαν τετμημένες ( $x$ ) τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων, επιλύθηκε ως προς  $\psi$  και έτσι υπολογίστηκε η τιμή της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο άγνωστο διάλυμα. Κατά την προετοιμασία των άγνωστων διαλυμάτων πριν τη φωτομέτρηση προστέθηκε απιονισμένο νερό σε 5-20  $\mu\text{L}$  δείγματος μέχρι τα 100  $\mu\text{L}$ . Στο αραιωμένο δείγμα κατόπιν προστέθηκαν 3 mL διαλύματος εργασίας Bradford (4.7% αιθανόλη, 8.5% φωσφορικό οξύ, 0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250). Τα δείγματα αναδεύτηκαν, παρέμειναν για περίπου 25-30' σε σκοτεινό μέρος και μετρήθηκαν σε κατάλληλες πλαστικές κυψελίδες φωτομέτρησης ορατού φάσματος σε μήκος κύματος 595 nm. Ως τυφλό δείγμα

για τον μηδενισμό του οργάνου, χρησιμοποιήθηκαν 2.9 mL διαλύματος εργασίας Bradford και 0.1 mL απιονισμένο νερό.

β) με τη μέθοδο απορρόφησης (A) στα 280nm

Χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$  όπου A η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm,  $\epsilon$  ο συντελεστής απορρόφησης (extinction coefficient) του πρωτεϊνικού μορίου, c η συγκέντρωση του δείγματος και l το μήκος της κυψελίδας. Ο συντελεστής  $\epsilon$  του TNF (Abs 0.1%, 1g/L: 1.166, υποθέτοντας ότι καμία κυστεΐνη δεν βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή) υπολογίστηκε με το πρόγραμμα ProtParam του ExPasy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

#### *2.3.1.6.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE electrophoresis)*

Πρόκειται για μια ακόμη εφαρμογή της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση με SDS χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των μονομερών των πρωτεϊνών σε ένα άγνωστο δείγμα καθώς οι πρωτεΐνες κινούνται μέσα στην πηκτή ως αποδιαταγμένα μονομερή. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στο γεγονός ότι η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου δια την τριβή που αναπτύσσεται ανάμεσα στα μόρια του δείγματος και της πηκτής και εξαρτάται από το σχήμα και το μέγεθός του. Οι τριβές αυτές οδηγούν στον επιθυμητό διαχωρισμό των πρωτεϊνικών μορίων μέσα σε μια μήτρα πηκτής. Κατ' αυτόν τον τρόπο όσο πιο πυκνή είναι μια πηκτή τόσο πιο μεγάλη θα είναι η δυσκολία στην κίνηση των μορίων. Η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο και προσαρμόζεται στο μέγεθος της επιθυμητής πρωτεΐνης. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συμπολυμερισμού μονομερούς ακρυλαμιδίου με N,N μεθυλενο-δισ-



ακρυλαμίδιο. Αυτές οι χημικές ενώσεις είναι σταθερές και πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη αντιδραστηρίων για την δημιουργία ελεύθερων ριζών. Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών ενώ ο καταλύτης TEMED (N,N, - τετραμεθυλοαιθυλενο διαμίνη) πετυχαίνει τη διάδοση ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού (Kingsbury and Masters, 1970).

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι μη συνεχής γιατί χρησιμοποιούνται δύο ζώνες από διαφορετικές πηκτές ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα εισάγονται στην πάνω ζώνη που αποτελείται από μια πηκτική χαμηλής συγκέντρωσης (πηκτική συσσώρευσης, stacking gel). Στη ζώνη αυτή, εκτός των άλλων, τα δείγματα ευθυγραμμίζονται και δημιουργείται ένα κοινό μέτωπο που ορίζεται από μια ευθεία. Τα δείγματα των πρωτεϊνών τοποθετούνται αρχικά εντός της πηκτικής συσσώρευσης η οποία έχει pH 6.8. Ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες που έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα από τα ιόντα γλυκίνης συσσωρεύονται στο μέτωπο που δημιουργείται κατά την ηλεκτροφόρηση. Ακολούθως εισερχόμενες στη δεύτερη πηκτική (πηκτική διαχωρισμού, running gel) με pH 8.8 οι σχηματιζόμενες πλέον ζώνες πρωτεϊνών αρχίζουν να διαχωρίζονται βάση του φορτίου και του μεγέθους τους.

Στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE κατά Laemmli έχουμε πολυμερισμό της πηκτικής σε μορφή πλάκας που σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια. Μετά την ανάμιξη των συστατικών (0.375 M Tris-HCl pH 8,8, 0.15% SDS, 0.15% APS, 0.15% TEMED και 12.5% μείγματος ακρυλαμιδίου: 29% ακρυλαμιδίου και 1% N,N' – μεθυλενοδιαακρυλαμίδιο), το διάλυμα της πηκτικής διαχωρισμού τοποθετείται εντός του συστήματος και αφήνεται να πολυμεριστεί. Η πηκτική συσσώρευσης (5% μείγμα ακρυλαμιδίου, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.15% APS και 0.15% TEMED) παρασκευάζεται στη συνέχεια με τον ίδιο τρόπο. Ο πολυμερισμός στην πηκτική συσσώρευσης γίνεται παρουσία μιας

πτένας που αφήνει τις απαραίτητες κενές αύλακες όπου τοποθετούνται τα πρωτεϊνικά δείγματα. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης Laemmli αποτελείται από 25 mM Tris base, 192 mM Glycine pH 8.3, 0.1% SDS.

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιείται DTT για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό SDS (δωδεκανοθειϊκό νάτριο) ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο αρνητικού φορτίου προς μάζα. Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμειγνύονται σε αναλογία 1:4 με το τετραπλά συγκεντρωμένο διάλυμα φόρτωσης (8% SDS, 40% γλυκερόλη, 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.04 mg/mL bromophenol blue). Ακολουθεί δεκάλεπτος βρασμός των δειγμάτων στους 90°C και μετά από μια σύντομη φυγοκέντρηση (5-10') φορτώνονται στην πηκτική. Η θέρμανση του πρωτεϊνικού δείγματος παρουσία SDS επιταχύνει τη μετουσίωση της πρωτεΐνης καταστρέφοντας τη δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή (όπου υπάρχει). Παρόλα αυτά οι δισουλφιδικοί δεσμοί καθώς είναι ομοιοπολικοί δεν επηρεάζονται από την παρουσία SDS και για τον λόγο αυτό προσθέτουμε DTT ή β-μερκαπτοαιθανόλη που είναι ισχυρά αναγωγικά και καταστρέφουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η πηκτική μετά τη φόρτωση των δειγμάτων ηλεκτροφορείται σε τάση 80 - 120V.

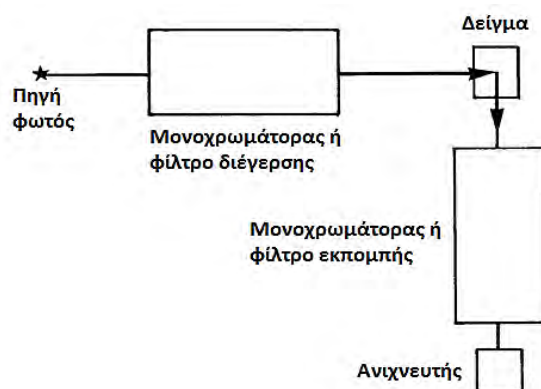
Μετά την ηλεκτροφόρηση, για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης. Για τον σκοπό αυτό η πηκτική τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης (50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 0,1% w/v coomassie brilliant blue R-250) όπου και αφήνεται για 25-30' υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί ανάλογη επώαση σε υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ), για τουλάχιστον 1 ώρα μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά

κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης και αρωματικών αμινοξέων) και έτσι εμφανίζονται οι ζώνες πάνω στην πηκτή.

### 2.3.2 Μελέτες δραστικότητας χημικών μορίων

#### 2.3.2.1 Φασματοσκοπία φθορισμού

Η μέτρηση της σταθεράς διάσπασης  $K_d$  των ουσιών έγινε σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού Hitachi F-2500 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) υπό τις εξής ρυθμίσεις: α. μήκος κύματος διέγερσης: 274 nm, β. μήκος κύματος εκπομπής: 302 nm, γ. εγκοπή διέγερσης: 5 nm, δ. εγκοπή εκπομπής: 20 nm. Η πρωτεΐνη βρισκόταν σε διάλυμα 10 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5, παρουσία συνδιαλύτη μέχρι 5% και τιτλοδοτήθηκε με αναστολέα σε θερμοκρασία 25°C. Ο υπολογισμός της σταθεράς διάσπασης από τις μετρήσεις φθορισμομετρίας περιγράφεται αναλυτικά στη δημοσίευση Paraneophytou et al., 2013.



Εικόνα 2.2 Διάταξη φθορισμόμετρου.

#### 2.3.2.2 Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης

Η Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) είναι μια μέθοδος ευρέως χρησιμοποιούμενη στη μελέτη της

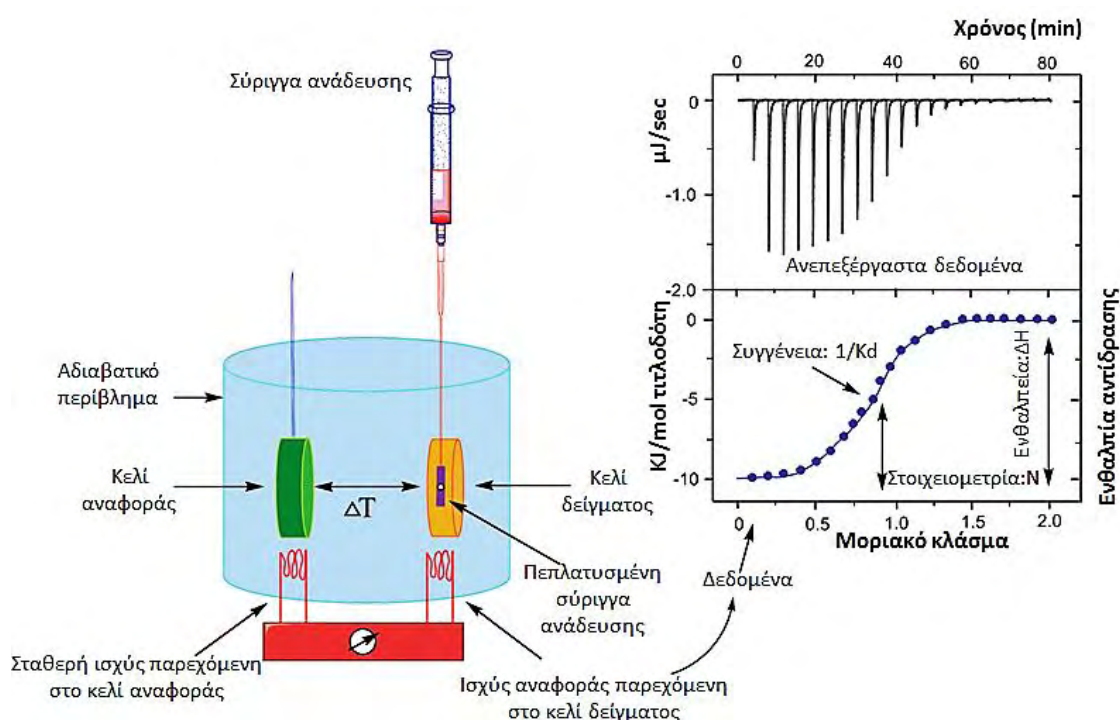
θερμοχημείας μοριακών αλληλεπιδράσεων. Η τεχνική του ITC έχει αναδειχθεί στη μέτρηση των ενεργειών πρόσδεσης διαφόρων αλληλεπιδράσεων βιολογικών μορίων (Wiseman et al., 1989; Freire et al., 1990; Doyle, 1997, El Harrous and Parody-Morreale, 1997; Jelesarov and Bosshard, 1999; Leavitt and Freire, 2001; Ward and Holdgate, 2001; Ladbury, 2001), συμπεριλαμβανομένης της πρόσδεσης: α. προσδέτη σε πρωτεΐνη, β. πρωτεΐνης σε πρωτεΐνη, γ. DNA σε πρωτεΐνη, δ. πρωτεΐνης σε υδατάνθρακα, ε. λιπιδίου σε πρωτεΐνη και στ. αντιγόνου σε αντίσωμα. Επίσης διαθέτοντας τη δυνατότητα ακριβούς μέτρησης της ενθαλπίας και της εντροπίας πρόσδεσης, η μέθοδος ITC έχει αποκτήσει σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη φαρμακευτικών ουσιών. Είναι η μόνη βιοφυσική μέθοδος που προσδιορίζει άμεσα τη μεταβολή της ενθαλπίας ( $\Delta H$ ) πρόσδεσης η οποία δείχνει τη μεταβολή της ενέργειας του συστήματος. Μπορεί επίσης να δώσει μια ολοκληρωμένη εικόνα της θερμοδυναμικής της αντίδρασης συμπεριλαμβανομένης της σταθεράς πρόσδεσης ( $K_a$ ), του αριθμού των σημείων πρόσδεσης ( $n$ ), τη μεταβολή της ενέργειας Gibbs ( $\Delta G$ ) και της εντροπίας ( $\Delta S$ ) η οποία φανερώνει τη μεταβολή της τάξης του συστήματος. Οι θερμοδυναμικές αυτές πληροφορίες σε συνδυασμό με κάποια δομικά στοιχεία από άλλες τεχνικές μπορούν να δώσουν μια ολοκληρωμένη εικόνα της αλληλεπίδρασης δύο ή περισσότερων μορίων.

Το μέγεθος που μετράται είναι η θερμότητα που απορροφάται ή εκλύεται κατά την ανάμιξη δύο διαλυμάτων. Η θερμότητα αυτή εξαρτάται από την ενθαλπία της τιτλοδότησης σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία [ $\Delta H(^{\circ}T)$ ] και από τον αριθμό των γραμμομορίων ( $n$ , moles) του συμπλόκου πρωτεΐνης/ προσδέτη PL (Protein/ Ligand):

$$q = \Delta H(^{\circ}T) * n * [PL]$$

Η συσκευή nano ITC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία έχει μια απλή διάταξη αποτελούμενη από δύο πανομοιότυπα κελιά: το κελί του

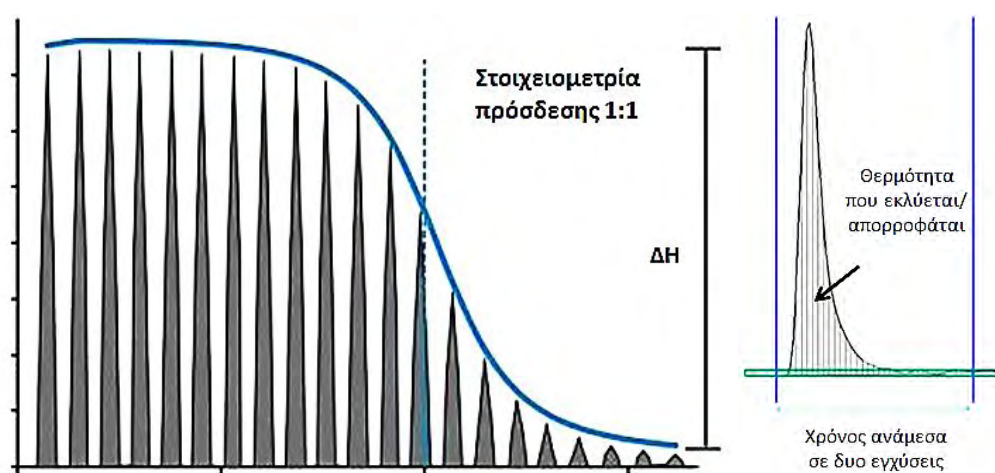
δείγματος, όπου γίνεται η τιλοδότηση των αντιδρώντων μορίων και το κελί αναφοράς που χρησιμεύει σαν σημείο αναφοράς για την καταμέτρηση της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται. Διαθέτει επίσης μια σύριγγα με την οποία ο τιλοδότης τιλοδοτείται στο τιλοδοτούμενο διάλυμα που έχει τοποθετηθεί στο κελί του δείγματος (Εικόνα 2.3).



**Εικόνα 2.3** Διάταξη ITC και μορφή δεδομένων.

Σε ένα τυπικό πείραμα ο τιλοδότης είναι ένας προσδέτης (L, Ligand) και τιλοδοτείται σε ένα πρωτεϊνικό διάλυμα (P, Protein) οπότε από την αντίδραση πρόσδεσης δημιουργείται ένα μοριακό σύμπλοκο (PL). Στην περίπτωση αυτή η ουσία με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (η πρωτεΐνη) τοποθετείται συνήθως στο κελί ενώ ο προσδέτης τοποθετείται στη σύριγγα. Ωστόσο σε περίπτωση χαμηλής διαλυτότητας του προσδέτη η διάταξη των διαλυμάτων μπορεί να αντιστραφεί οπότε και γίνεται τιλοδότηση της πρωτεΐνης στον προσδέτη. Η σύριγγα προσαρμόζεται σε ένα ρομποτικό έμβολο, βυθίζεται στο κελί του δείγματος και

εκτελεί μεγάλης ακρίβειας εγχύσεις όπως έχουν προγραμματιστεί μέσω του λογισμικού της συσκευής. Κατά την τιτλοδότηση παρατηρείται έκλυση ή απορρόφηση θερμότητας ανάλογα με το αν η αντίδραση είναι εξώθερμη ή ενδόθερμη αντίστοιχα. Σε μια τέτοια ισόθερμη τιτλοδότηση η καταγραφόμενη πειραματική μεταβλητή είναι η ισχύς που παρέχεται στα δυο κελιά ώστε αυτά να διατηρούν σταθερή τη θερμοκρασία τους σε συνάρτηση με τον χρόνο. Έτσι η επιφάνεια που ορίζεται από την κορυφή και τον x άξονα είναι η θερμότητα που απορροφάται ή απελευθερώνεται κατά τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο και είναι ανάλογη της ποσότητας του προσδέτη που εγχύθηκε στο κελί του δείγματος (Εικόνα 2.4).



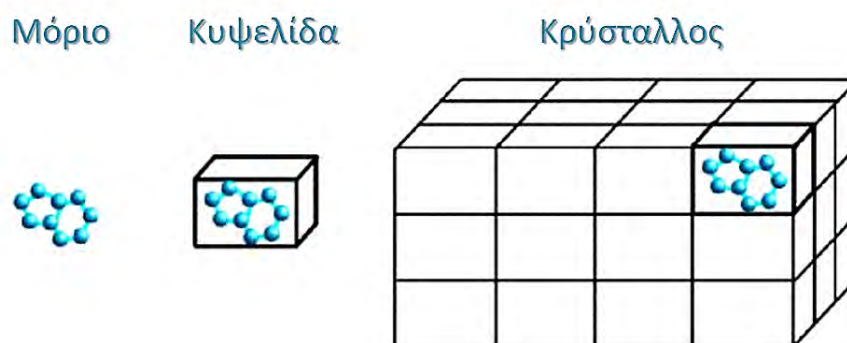
**Εικόνα 2.4** Καμπύλη τιτλοδότησης ITC: η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια έγχυση και η επιφάνεια που ορίζει η κάθε κορυφή με τον άξονα των x ισούται με τη θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται.

Το ποσοστό των μορίων του τιτλοδότη τα οποία αλληλεπιδρούν με τα μόρια του τιτλοδοτούμενου διαλύματος στο κελί αναφοράς καθορίζουν τη θερμότητα που θα εκλυθεί ή θα απορροφηθεί αρά και την παρεχόμενη ισχύ. Στις πρώτες εγχύσεις επειδή όλα τα μόρια του τιτλοδότη αλληλεπιδρούν με τα μόρια της τιτλοδοτούμενης ουσίας, το φαινόμενο έχει τη μέγιστή του ένταση οπότε καταγράφονται οι μεγαλύτερες τιμές παρεχόμενης ισχύος. Καθώς η τιτλοδότηση

συνεχίζεται όλο και λιγότερες θέσεις δέσμησης της τιλοδοτούμενης ουσίας είναι διαθέσιμες και συνεπώς μειώνεται η έκλυση/ απορρόφηση θερμότητας που ορίζεται από το μέγεθος των καταγραφόμενων κορυφών.

### 2.3.3 Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών

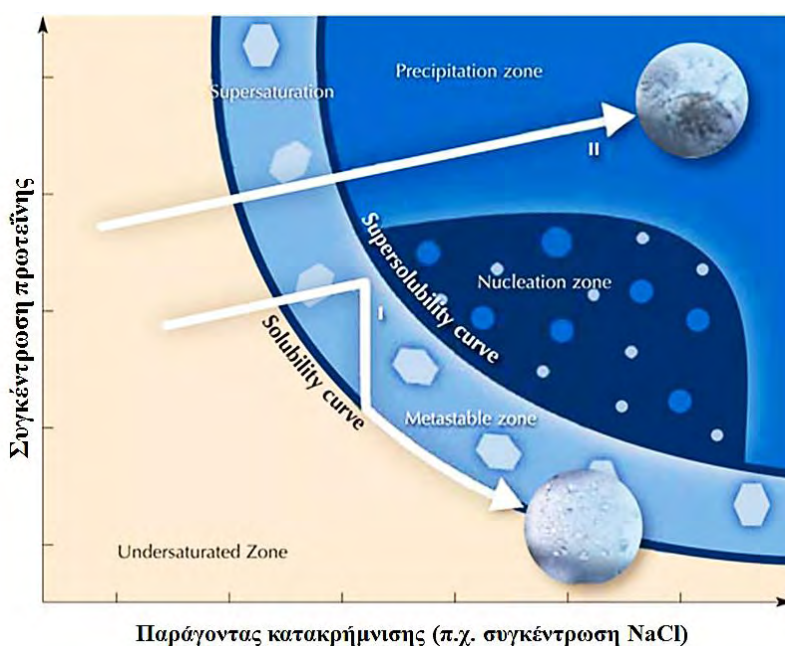
Η κρυσταλλογραφία είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής βιομορίων και βασίζεται στην περίθλαση ακτίνων X των κρυστάλλων τους. Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι μια ειδική περίπτωση κατακρήμνισης βιομορίων. Η κρυσταλλική κατάσταση χαρακτηρίζεται από υψηλή τάξη και συμμετρία στο πακετάρισμα των μορίων ενώ το κρυσταλλικό πλέγμα προϋποθέτει επαναλήψεις όμοιων δομικών μονάδων, των κυψελίδων (Εικόνα 2.5). Συνεπώς, ανομοιογενή δείγματα είναι δύσκολο να κρυσταλλωθούν και για τον λόγο αυτό στην κρυσταλλογραφία είναι απαραίτητη η μέγιστη δυνατή καθαρότητα και ομοιογένεια του δείγματος ( $\geq 90\%$ ).



**Εικόνα 2.5** Ο κρύσταλλος αποτελείται από επαναλαμβανόμενες όμοιες δομικές μονάδες, τις κυψελίδες.

Για να κρυσταλλώσει ένα βιομόριο θα πρέπει το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται να υπερκορεσθεί. Το υπερκορεσμένο διάλυμα ενός βιομορίου είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση της διαλυτότητάς του. Παράγοντες που επηρεάζουν τη

διαλυτότητα των πρωτεϊνών είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η ιοντική ισχύς, το pH, η θερμοκρασία καθώς και η φύση των ουσιών που χρησιμοποιούνται ως κατακρημνιστές. Για τη μελέτη της κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης είναι πολύ χρήσιμα τα δισδιάστατα διαγράμματα διαλυτότητας όπου απεικονίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ως προς έναν από τους παραπάνω παράγοντες όπως για παράδειγμα η συγκέντρωση κατακρημνιστών, το pH, η θερμοκρασία κλπ. ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες παραμένουν σταθεροί (Εικόνα 2.6).



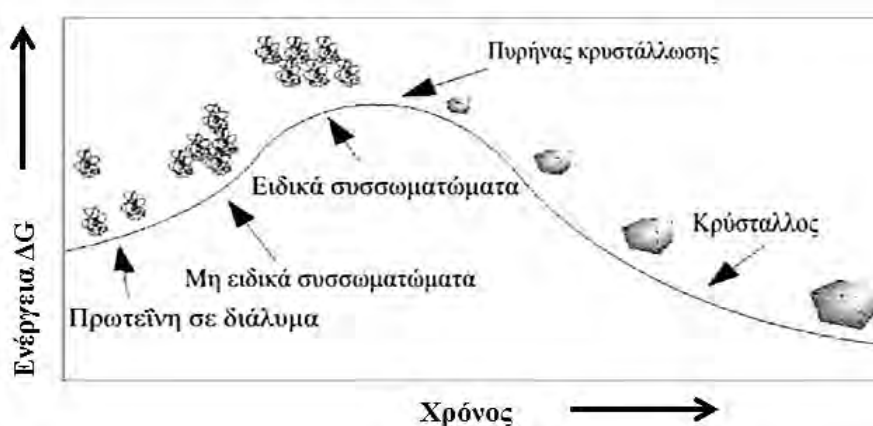
**Εικόνα 2.6** Τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας ενός βιομορίου.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα διαλυτότητας η καμπύλη διαλυτότητας (solubility curve) όπου ξεκινάει ο κορεσμός οριοθετεί τη ζώνη υποκορεσμού (undersaturation zone) και τη ζώνη υπερκορεσμού (supersaturation). Στη ζώνη υποκορεσμού δεν είναι δυνατή η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης λόγω της χαμηλής της συγκέντρωσης. Η ζώνη πυρήνωσης (nucleation zone) είναι η περιοχή όπου υπάρχει περίσσεια πρωτεΐνης και δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης οι οποίοι είναι οι πιο μικρές οργανωμένες μορφές πρωτεϊνικών



συσσωματωμάτων. Η εύρεση αυτής της περιοχής είναι ο πρωταρχικός στόχος στα πειράματα κρυστάλλωσης. Η μετασταθερή ζώνη είναι η περιοχή στην οποία οι ήδη σχηματισμένοι πυρήνες μπορούν να μεγαλώσουν. Ωστόσο, σε αυτή την περιοχή δεν είναι δυνατή η δημιουργία νέων πυρήνων. Η ζώνη κατακρήμνισης (precipitation zone) είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση υπερκορεσμού, κατά την οποία η συγκέντρωση του βιομορίου είναι πολύ υψηλή και η περίσσεια του κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα.

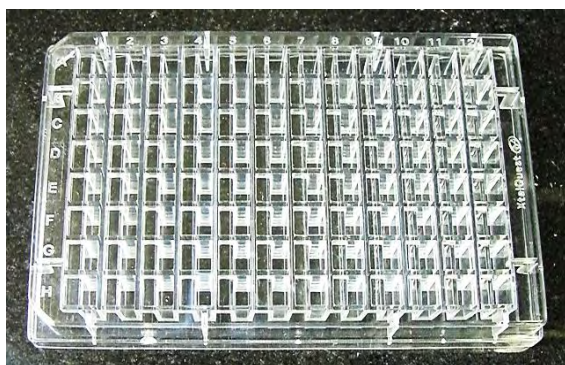
Ο υπερκορεσμός ενός διαλύματος βιομορίου βοηθά το σύστημα να ξεπεράσει το ενεργειακό φράγμα της ενέργειας ενεργοποίησης Gibbs ( $\Delta G$ ). Αυτό σημαίνει ότι οι κατάλληλες συνθήκες υπερκορεσμού μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν την πλειονότητα των βιομορίων του διαλύματος στην κρυσταλλική φάση (δημιουργία πυρήνων) και όχι στην άμορφη φάση (ίζημα), καθώς θα είναι η κρυσταλλική φάση που θα ευνοείται ενεργειακά (Εικόνα 2.7). Η δημιουργία πυρήνων και η ανάπτυξη των κρυστάλλων επηρεάζονται από ποικίλες παραμέτρους όπως η συγκέντρωση και η ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος, το pH του διαλύματος, η φύση των κατακρημνιστών και των αλάτων, καθώς και η θερμοκρασία.



**Εικόνα 2.7** Η πορεία του σχηματισμού κρυσταλλικών μορφωμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο και την ελεύθερη ενέργεια Gibbs.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κρυστάλλωση του συμπλέγματος της πρωτεΐνης με τους αναστολείς της είναι η διάχυση ατμών (vapor diffusion). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο φαινόμενο της τάσης ατμών. Όταν δυο διαλύματα τοποθετηθούν σε ένα αεροστεγώς κλειστό σύστημα, τείνουν να εξισορροπήσουν την τάση ατμών τους μέσω διάχυσης. Το διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη έχει πολύ μικρότερο όγκο σε σχέση με το μητρικό διάλυμα (mother liquor) που βρίσκεται στη δεξαμενή. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση των ουσιών που υπάρχουν στο διάλυμα της πρωτεΐνης επηρεάζεται άμεσα από τη συγκέντρωση των συστατικών της δεξαμενής.

α



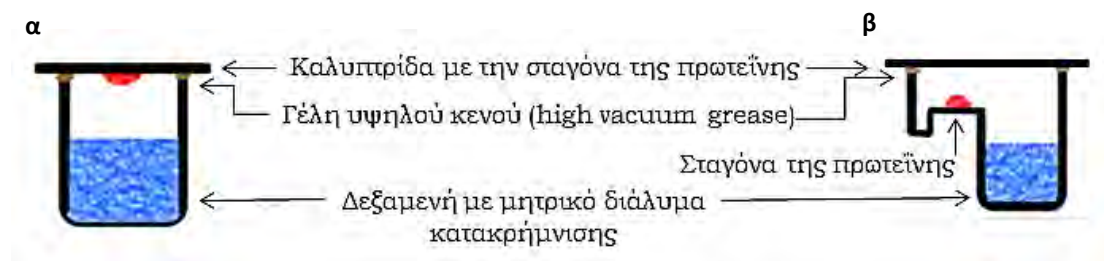
β



**Εικόνα 2.8** Πιάτα κρυστάλλωσης **α.** καθιστής και **β.** κρεμαστής σταγόνας.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική τόσο της κρεμαστής σταγόνας (hanging drop) όσο και της καθιστής σταγόνας (sitting drop) και έγινε χρήση των αντίστοιχων πιάτων κρυστάλλωσης (Εικόνα 2.8). Στις δυο αυτές τεχνικές αρχικά προστίθενται όλα τα απαραίτητα συστατικά του διαλύματος της δεξαμενής (ρυθμιστικό διάλυμα, αλάτι, κατακρημνιστής, νερό κλπ.) και αναμειγνύονται. Ο συνολικός όγκος του μητρικού διαλύματος είναι 1000  $\mu\text{L}$  στην περίπτωση της κρεμαστής σταγόνας και 50  $\mu\text{L}$  στην καθιστή σταγόνα. Κάθε σταγόνα αποτελείται από 0.5-2  $\mu\text{L}$  του διαλύματος της δεξαμενής και 0.5-2  $\mu\text{L}$  πρωτεϊνικού διαλύματος (5-15  $\text{mg}/\text{mL}$ ,  $\text{Abs}_{280\text{nm}}$ ). Στη μέθοδο της

καθιστής σταγόνας η τελική σταγόνα τοποθετείται σε σιλικοναρισμένη καλυπτρίδα η οποία με τη σειρά της εφάπτεται πάνω από το διάλυμα της δεξαμενής και με τη βοήθεια μιας κατάλληλης γέλης δημιουργίας υψηλού κενού (high vacuum grease) η δεξαμενή σφραγίζεται αεροστεγώς (Εικόνα 2.9). Η εξισορρόπηση του συστήματος έγινε στους 20°C.



Εικόνα 2.9. Σχηματική απεικόνιση των τεχνικών α. της κρεμαστής και β. της καθιστής σταγόνας.

#### 2.3.4 Μελέτες διαλυτότητας πιθανών προσδετιών

##### 2.3.4.1 Σύνθεση χημικών προσδετιών

Η σύνθεση των αναλόγων του SPD304 έγινε από την εταιρία Proactina. Οι ενώσεις αυτές στην πλειοψηφία τους ήταν πάνω από 90% καθαρές (εκτίμηση με HPLC) (Alexiou et al., 2014; Mettou et al., 2017; Papanephytou et al., 2015). Το SPD304 που χρησιμοποιήθηκε συντέθηκε από την εταιρία Cayman Chemical. Παράλληλα έγινε επιλογή μιας σειράς 30 χημικών ενώσεων προς σύνθεση, οι οποίες προέκυψαν ύστερα από μελέτες docking ως πιθανοί αναστολείς του TNF. Επίσης συντέθηκαν από την Proactina περίπου 50 ακόμα ενώσεις που βασίστηκαν στις δομές πιθανών αναστολέων που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια του προγράμματος RLead και παρουσίασαν σημαντική βιοδραστικότητα.

#### 2.3.4.2 Πρωτόκολλο διαλυτοποίησης πιθανών προσδετών

Το πρωτόκολλο διαλυτοποίησης προσαρμόστηκε στις *in vitro* βιοχημικές δοκιμές στις οποίες θα υποβάλλονταν οι ενώσεις καθώς επίσης και στις διαθέσιμες ποσότητες που συχνά ήταν σχετικά μικρές (περίπου 1 mg). Αρχικά παρασκευάστηκε ένα πυκνό μητρικό διάλυμα (stock) με συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη των 6 mM σε καθαρό οργανικό διαλύτη (μεθανόλη ή 90% DMSO και 10% νερό). Στη συνέχεια ακολούθησε η κατάλληλη διαδικασία διάλυσης ανάλογα με το είδος της διαλυτότητας που θα προσδιοριζόταν (κινητική ή θερμοδυναμική) όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω. Η διάρκεια της διάλυσης ήταν 10 ώρες και έγινε υπό ανάδευση στο σκοτάδι, στους 25°C δηλαδή σε θερμοκρασία ίδια με αυτή των βιοχημικών δοκιμών. Η μέγιστη συγκέντρωση των πιθανών προσδετών ήταν 0.3 mM οπότε η κατανάλωση ήταν αρκετά μικρή (~0.5 mg/ τριπλέτα μετρήσεων,  $V_{\text{δειγματος}} = 1 \text{ mL}$ ). Βάσει των πειραματικών δεδομένων μας η συγκέντρωση 0.3 mM ήταν αρκετή για να δημιουργηθεί ένα διάλυμα κορεσμένο σε πιθανό προσδέτη. Συγκεκριμένα, μετά τον διαχωρισμό της διαλυτής από την αδιάλυτη φάση, υπήρχε πάντα κατακρημνισμένη ουσία η οποία μετά από επαναδιάλυση σε καθαρή μεθανόλη έδινε μια επαρκώς μετρούμενη απορρόφηση (>0.1) στο  $\lambda_{\text{max}}$  της ουσίας. Ο διαχωρισμός γινόταν με φυγοκέντρηση (15,000 g, 30') η οποία ακολουθούσε αμέσως μετά από τη διάλυση. Σε ορισμένες περιπτώσεις δειγμάτων με μεγάλη κατακρήμνιση η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβανόταν. Ακολουθούσε μέτρηση της διαλυτότητας βάσει του αντίστοιχου πρωτοκόλλου («Πρωτόκολλο μέτρησης διαλυτότητας στο υπεριώδες», Papanophytou et al., 2013).

2.3.4.3 Πρωτόκολλο μέτρησης διαλυτότητας στο υπεριώδες (Papanoerophytou et al., 2013)

Καθώς αρχικά είχε διαπιστωθεί η γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην απορρόφηση στο  $\lambda_{\max}$  και στη συγκέντρωση του προσδέτη (τόσο σε οργανικό διαλύτη όσο και σε υδατικό διάλυμα), η διαλυτότητα του προσδέτη ήταν δυνατό να υπολογιστεί από την εξής σχέση:

$$\frac{\text{Abs}(\lambda_{\max})\text{προσδέτησεοργανικόδιαλύτη}}{300\mu\text{M}} = \frac{\text{Abs}(\lambda_{\max})\text{προσδέτησευδατικόδιάλυμα}}{\text{Διαλυτότηταπροσδέτησευδατικόδιάλυμα}(\mu\text{M})}$$

Επιλύοντας την παραπάνω εξίσωση ως προς την διαλυτότητα προσδέτη:

$$\text{Διαλυτότητα προσδέτη σε υδατικό διάλυμα}(\mu\text{M}) = \frac{\text{Abs}(\lambda_{\max}) \text{ προσδέτη σε άγνωστο υδατικό διάλυμα}}{\text{Abs}(\lambda_{\max}) \text{ προσδέτη σε γνωστό διάλυμα}} * C_{\text{std}}$$

όπου  $C_{\text{std}} = 50 - 200 \mu\text{M}$  ανάλογα με τη διαλυτότητα της ουσίας.

Ένας δεύτερος τρόπος για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας βασίζεται στον προσδιορισμό της ποσότητας της κατακρημνισμένης ουσίας στο τέλος της διαδικασίας διάλυσης κατόπιν φυγοκέντρησης για τον διαχωρισμό της διαλυτής και της αδιάλυτης φάσης. Έτσι το άθροισμα των ποσοτήτων του πιθανού αναστολέα ( $A_{\text{ολικό}}$ ) που βρίσκεται στο διαλυτό ( $A_{\text{υδατικό}}$ ) και στο αδιάλυτο ( $A_{\text{ίζημα}}$ ) κλάσμα θα πρέπει να ισούται με την αρχική ποσότητα πιθανού αναστολέα που προστέθηκε στο διάλυμα:

$$[A_{\text{ολικό}}] = [A_{\text{υδατικό}}] + [A_{\text{ίζημα}}] \quad \text{ή}$$

$$[A_{\text{υδατικό}}] = [A_{\text{ολικό}}] - [A_{\text{ίζημα}}] \quad (\text{II})$$

Βάσει του νόμου Beer –Lambert

$$\text{Abs}_{\text{Αναστολέα}} = \epsilon_{\text{Αναστολέα}} \times l \times C_{\text{Αναστολέα}} \text{ οπότε:}$$

$$\frac{\text{Abs}_{\text{Αολικό}}(\text{σεοργανικόδιαλύτη})}{[A_{\text{ολικό}}](\mu\text{M})} = \frac{\text{Abs}_{\text{Αίζημα}}(\text{σεοργανικόδιαλύτη})}{[A_{\text{ίζημα}}](\mu\text{M})}$$

Τότε:

$$[\text{Αίζημα}](\mu\text{M}) = \frac{\text{AbsΑίζημα}(\text{σεοργανικόδιαλύτη})}{\text{AbsΑολικό}(\text{σεοργανικόδιαλύτη})} * [\text{Αολικό}](\mu\text{M})$$

άρα η εξίσωση (II) γίνεται:

$$[\text{A}_{\text{υδατικό}}] = [\text{A}_{\text{ολικό}}] \times \left(1 - \frac{\text{AbsΑίζημα}(\text{σεοργανικόδιαλύτη})}{\text{AbsΑολικό}(\text{σεοργανικόδιαλύτη})}\right) \quad (\text{III})$$

Επομένως η υδατική διαλυτότητα των πιθανών προσδετών μπορεί να υπολογισθεί με τη μέτρηση της απορρόφησης  $\text{Abs}_{\lambda_{\text{max}}}$  του αδιάλυτου κλάσματος του προσδέτη χρησιμοποιώντας την εξίσωση (III).

Όλες οι μετρήσεις διορθώθηκαν βάσει του κατάλληλου τυφλού διαλύματος.

#### *2.3.4.4 Μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τη διαλυτότητα*

##### *2.3.4.4.1 Επίδραση χρόνου διάλυσης στην κινητική διαλυτότητα*

Η κινητική διαλυτότητα μετρήθηκε σε 10 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5, 5% DMSO, 0.3 mM πιθανού αναστολέα για διαφορετικά χρονικά διαστήματα: 3, 6, 10, 14, 24 ώρες.

##### *2.3.4.4.2 Μέτρηση θερμοδυναμικής και κινητικής διαλυτότητας*

Τα δυο είδη διαλυτότητας μετρήθηκαν σε 10 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5, 5% DMSO, 0.3 mM πιθανού προσδέτη και η διάλυση διήρκησε για 10 ώρες.

##### *Μέτρηση κινητικής διαλυτότητας.*

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα αρχικό πυκνό διάλυμα 6-10 mM σε καθαρό οργανικό διαλύτη. Στη συνέχεια στο διάλυμα αυτό προστέθηκαν τα υπόλοιπα συστατικά του τελικού δείγματος με την εξής

σειρά: i) πιθανός προσδέτης σε οργανικό διαλύτη , ii) οργανικός διαλύτης (έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του στο προς μέτρηση δείγμα να είναι 2, 5 ή 10%), iii) 5x πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5). Με τον τρόπο αυτό ο πιθανός προσδέτης κατακρημνίζεται λιγότερο και η διαλυτότητα αυξάνεται.

#### *Μέτρηση θερμοδυναμικής διαλυτότητας.*

Το τελικό διάλυμα (10 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5, 5% DMSO) προστίθεται κατευθείαν στον πιθανό προσδέτη ο οποίος βρίσκεται σε στερεή μορφή και η συγκέντρωσή του στο τελικό διάλυμα φτάνει σε 0.3 mM. Η στερεή ένωση ανακτήθηκε από υγρό μητρικό διάλυμα σε μεθανόλη με εξάτμιση. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η ζύγιση της ουσίας και αντικαθίσταται με ογκομέτρηση η οποία επιτρέπει την χρήση πολύ μικρότερων ποσοτήτων καθώς και τον περιορισμό του πειραματικού σφάλματος.

#### *2.3.4.4.3 Επίδραση προσθήκης συνδιαλύτη (5%DMSO, 5%PEG3350) στην κινητική διαλυτότητα*

Η κινητική διαλυτότητα μετρήθηκε παρουσία 5% DMSO, 5% PEG3350 και 0% συνδιαλύτη σε 10 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5, 0.3 mM πιθανού προσδέτη, μετά από 10 ώρες διάλυσης υπό ανάδευση.

#### *2.3.4.4.4 Επίδραση φιλτραρίσματος στην κινητική διαλυτότητα*

Η κινητική διαλυτότητα μετρήθηκε σε 10 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5 και 0.3 mM πιθανού προσδέτη. Μετά από 10 ώρες διάλυσης έγινε διαχωρισμός του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα ως εξής: α. απλή φυγοκέντρηση (15,000 g, 20') για τα μη φιλτραρισμένα δείγματα και β. φυγοκέντρηση (15,000 g, 20') και φιλτράρισμα με ανόργανα μεμβρανικά φίλτρα σύριγγας (Anotop 10 IC, 0.2 mm, 10 mm) για τα φιλτραρισμένα δείγματα.

### 3. Συζήτηση αποτελεσμάτων

#### 3.1 Πρωτεϊνική έκφραση και καθαρισμός

Οι πρωτεΐνες TNF (Uniprot: B5BUQ6) και HRV-14-3C-πρωτεάση (GE Healthcare) εκφράστηκαν σε κύτταρα *E-coli* BL21(DE3) pLysS και *E-coli* BL21(DE3) αντίστοιχα σαν πρωτεΐνες σύντηξης με GST σε pGex-6P-1 πλασμίδια.

Για τον σχεδιασμό της κατασκευής του TNF χρησιμοποιήθηκε ένα λογισμικό πρόβλεψης των περιοχών αποδιάταξης (protein disordered regions) το DisEMBL, Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.5 (<http://dis.embl.de/>). Το πρόγραμμα αυτό έδειξε όσο αφορά την αλληλουχία του διαλυτού TNF (V77 – L233) που έχει κρυσταλλωθεί σε σύμπλοκο με το SPD304 (He et al., 2005, Εικόνα 3.1) ότι η αμινοτελική του περιοχή και συγκεκριμένα τα 14 περίπου πρώτα αμινοξέα εμφανίζουν αυξημένη αποδιάταξη η οποία φτάνει τους 2.7 βαθμούς. Έτσι για να υποβοηθηθεί η διαδικασία της κρυστάλλωσης αφαιρέθηκαν τα 9 πρώτα αμινοξέα (V77 – S85) και προέκυψε η κατασκευή του TNF η οποία κατόπιν μελετήθηκε (D86 – L233, Εικόνα 3.2 α).

Η κατασκευή αυτή δείχνει να εμφανίζει σημαντική μείωση στην αποδιάταξη της αμινοτελικής περιοχής η οποία δεν ξεπερνά τους 1.7 βαθμούς (Εικόνα 3.2 α). Παράλληλα με τις μελέτες του TNF σχεδιάστηκε μια δεύτερη κατασκευή αυτής της πρωτεΐνης (TNF new) με σκοπό την περαιτέρω υποβοήθηση της κρυστάλλωσής της. Η ανάγκη αυτή προέκυψε λόγω αυξημένης δυσκολίας στην κρυστάλλωση του TNF με το SPD304 αλλά και με νέους αναστολείς μετά από μια σειρά αρχικών δοκιμών που έγιναν. Στην κατασκευή αυτή έχουν αφαιρεθεί τα έξι πρώτα αμινοξέα (D86 – H91) που φαίνεται να έχουν αυξημένη αποδιάταξη (Εικόνα 3.2 β).

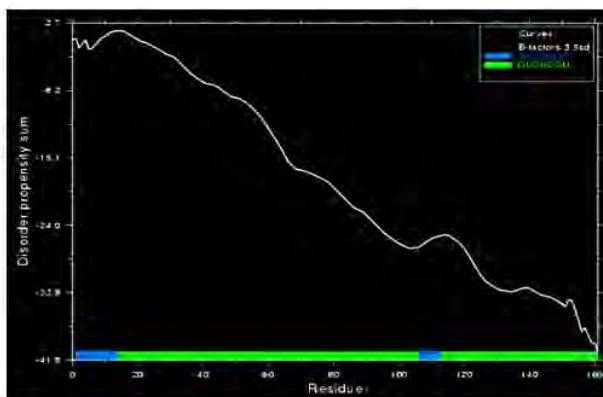


**TNF- $\alpha$**  (He et al.)

```

77 80          90          100
VRSS SRTPSDKPVA  HVVANPQAEG
          110          120          130
QLQWLNRRAN  ALLANGVELR  DNQLVVPSEG
          140          150          160
LYLIYSQVLF  KGQGCPSTHV  LLHTISRIA
          170          180          190
VSYQTKVNLL  SAIKSPCQRE  TPEGAEAKPW
          200          210          220
YEPIYLGGVF  QLEKGDRLSA  EINRPDYLDF
          230  233
AESGQVYFGI IAL

```



**Εικόνα 3.1.** Η αμινοξική αλληλουχία του TNF (He et al., 2005) και το διάγραμμα πρόβλεψης των περιοχών αποδιάταξης της πρωτεΐνης

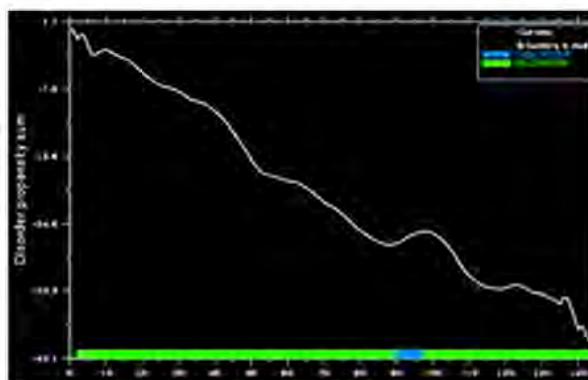
**α**

**TNF- $\alpha$**

```

86 90          100
DKPVA  HVVANPQAEG
          110          120          130
QLQWLNRRAN  ALLANGVELR  DNQLVVPSEG
          140          150          160
LYLIYSQVLF  KGQGCPSTHV  LLHTISRIA
          170          180          190
VSYQTKVNLL  SAIKSPCQRE  TPEGAEAKPW
          200          210          220
YEPIYLGGVF  QLEKGDRLSA  EINRPDYLDF
          230  233
AESGQVYFGI IAL

```



**β**

**TNF- $\alpha$  new**

```

92          100          110          120          130          140          150
VVANPQAEG  QLQWLNRRAN  ALLANGVELR  DNQLVVPSEG  LYLIYSQVLF  KGQGCPSTHV
          160          170          180          190          200          210
LLHTISRIA  VSYQTKVNLL  SAIKSPCQRE  TPEGAEAKPW  YEPIYLGGVF  QLEKGDRLSA
          220          230  233
INRPDYLDF  AESGQVYFGI  IAL

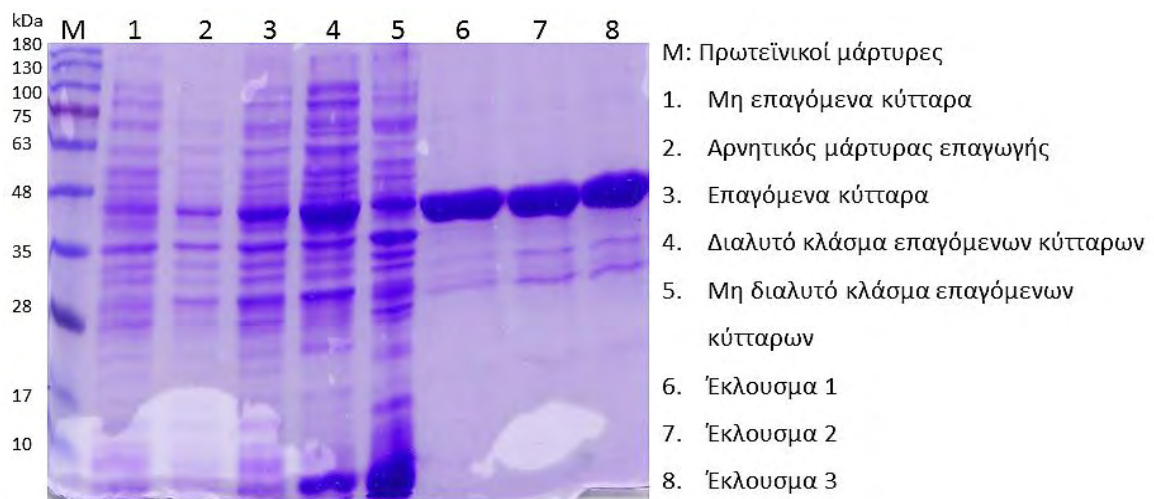
```

**Εικόνα 3.2. α.** Η αμινοξική αλληλουχία της αρχικής κατασκευής που σχεδιάστηκε για τις ανάγκες του προγράμματος RLead και το διάγραμμα πρόβλεψης των περιοχών αποδιάταξης της πρωτεΐνης, **β.** η αμινοξική αλληλουχία της νέας κατασκευής που σχεδιάστηκε για περαιτέρω υποβοήθηση της κρυστάλλωσης της TNF πρωτεΐνης.

Τα πλασμίδια όλων των παραπάνω πρωτεϊνών παρασχέθηκαν από το ινστιτούτο Fleming στα πλαίσια του προγράμματος RLead (Δρ Ελένη Ντούνη).

### 3.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός 3C-πρωτεάσης

Το πρωτόκολλο καθαρισμού του TNF περιλαμβάνει πέψη με 3C πρωτεάση για την αφαίρεση της GST πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό έγινε υπερέκφραση της Human Rhinovirus (HRV) type 14 3C πρωτεάσης σε BL21(DE)3/pGex κύτταρα στις συνθήκες: 24°C/3 ώρες/1 mM IPTG με οπτική πυκνότητα κυττάρων πριν την έναρξη της επαγωγής O.D.:0.6 (Papanophytou, 2014). Στην ηλεκτροφορημένη πηκτή (Εικόνα 3.3) φαίνεται ότι έγινε ικανοποιητική υπερέκφραση της πρωτεΐνης (3<sup>ο</sup> πηγάδι) και ότι η πρωτεΐνη ήταν αρκετά διαλυτή (4<sup>ο</sup> πηγάδι). Ακολούθησε συλλογή και λύση των κυττάρων και απομόνωση της υπερέκφρασμένης πρωτεΐνης με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας γλουταθειόνης-αγαρόζης (glutathione-agarose) που έδωσε αρκετά καθαρά εκλούσματα της 3C πρωτεάσης (Εικόνα 3.3, πηγάδια 6-8).



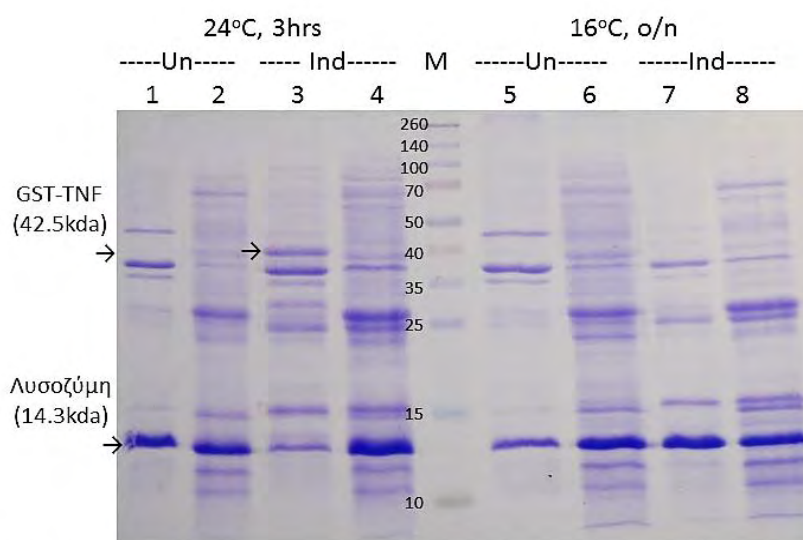
**Εικόνα 3.3.** Πηκτή SDS PAGE ηλεκτροφόρησης δειγμάτων του καθαρισμού της 3C-πρωτεάσης.

### 3.1.2 Διερεύνηση υπερέκφρασης και καθαρισμός του TNF

Διερευνήθηκε η υπερέκφραση της πρωτεΐνης GST-TNF σε BL21(DE)3/pLysS κύτταρα στις συνθήκες: 24°C/3 ώρες/1 mM IPTG και 16°C/ολονύκτια επώαση

(o/n)/1 mM IPTG, με οπτική πυκνότητα κυττάρων πριν την έναρξη της επαγωγής O.D.:0.55-0.60.

Στην ηλεκτροφορημένη πηκτή (Εικόνα 3.4) φαίνεται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στους 24°C/3 ώρες/1 mM IPTG (πηγάδια 3,4) υπερεισχύει της αντίστοιχης υπερέκφρασης στους 16°C/(o/n)/1 mM IPTG (Εικόνα 3.4, πηγάδια 7,8).



24°C, 3 ώρες

1. Μη επαγόμενα κύτταρα - αδιάλυτο κλάσμα
2. Μη επαγόμενα κύτταρα - διαλυτό κλάσμα
3. Επαγόμενα κύτταρα - αδιάλυτο κλάσμα
4. Επαγόμενα κύτταρα - διαλυτό κλάσμα

M: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες

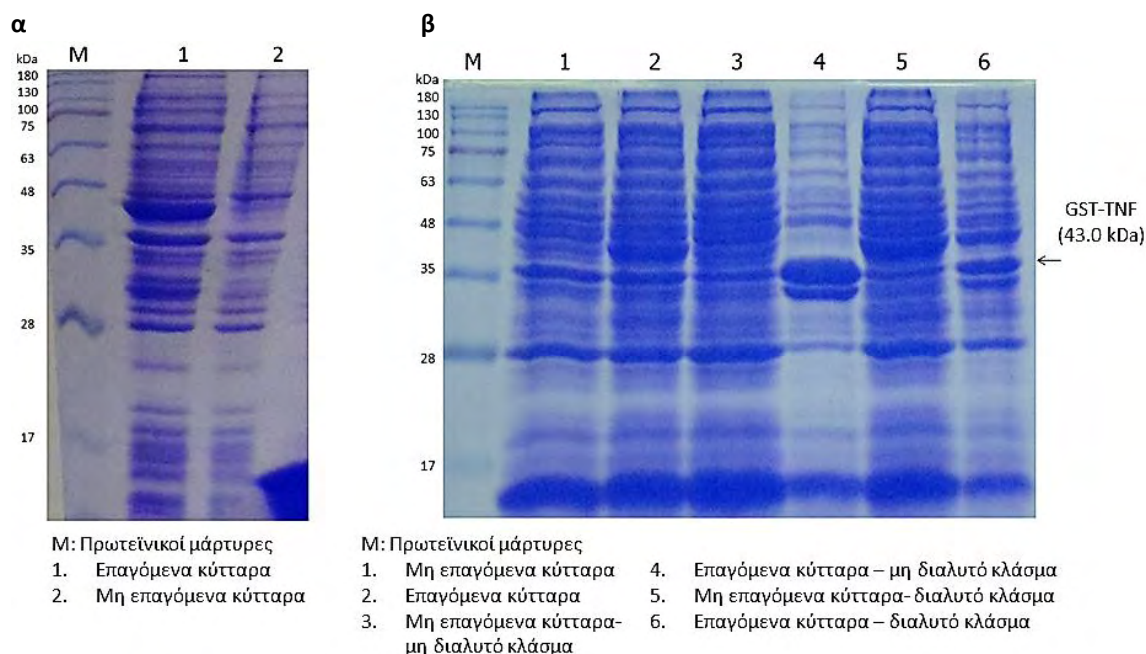
16°C, o/n

5. Μη επαγόμενα κύτταρα - αδιάλυτο κλάσμα
6. Μη επαγόμενα κύτταρα - διαλυτό κλάσμα
7. Επαγόμενα κύτταρα - αδιάλυτο κλάσμα
8. Επαγόμενα κύτταρα - διαλυτό κλάσμα

**Εικόνα 3.4.** Πηκτή SDS PAGE ηλεκτροφόρησης δειγμάτων των μελετών υπερέκφρασης του TNF.

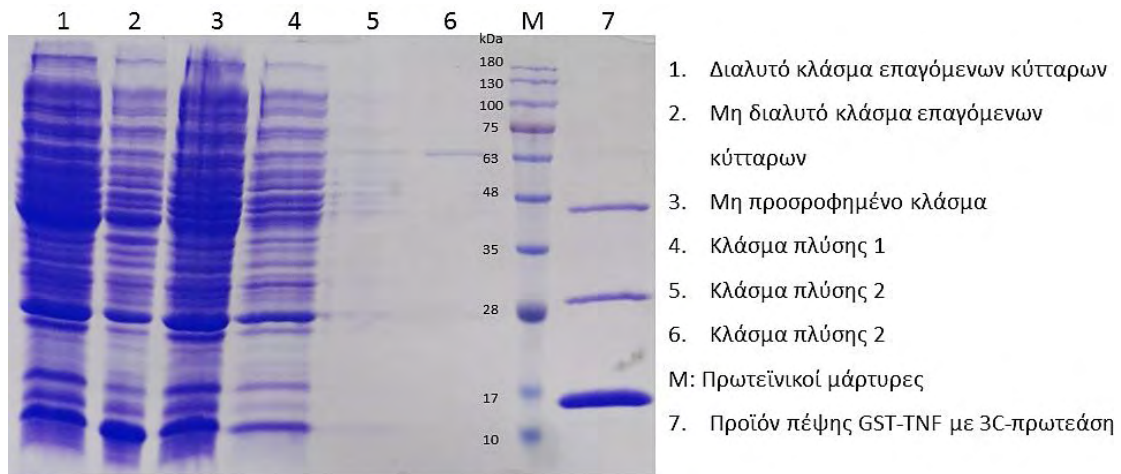
Για την παραγωγή του TNF έγινε υπερέκφραση μεγάλης κλίμακας, σε επωαστήρα κυττάρων, στις προαναφερόμενες συνθήκες (24°C/3 ώρες/1 mM IPTG). Έγινε επίσης πρωτεϊνική υπερέκφραση σε έναν STR βιοαντιδραστήρα. Μετά την αποστείρωση και την εξισορρόπηση του θρεπτικού μέσου μέσα στον βιοαντιδραστήρα έγινε εμβολιασμός. Εκείνη τη χρονική στιγμή το διαλυμένο οξυγόνο έφτανε το 50.3% και κατά τη διάρκεια της επώασης σταδιακά άρχισε να πέφτει λόγω του μεταβολισμού του από τα κύτταρα. Τη στιγμή που έγινε η προσθήκη του IPTG η οπτική πυκνότητα στα 600 nm ήταν O.D.:0.51 και το

διαλυμένο οξυγόνο 1.2%. Η υπερέκφραση έγινε στις συνθήκες: 25.1°C, 3 ώρες, 1 mM IPTG, 400 rpm. Η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε επαρκώς και στις δυο περιπτώσεις (Εικόνα 3.5).



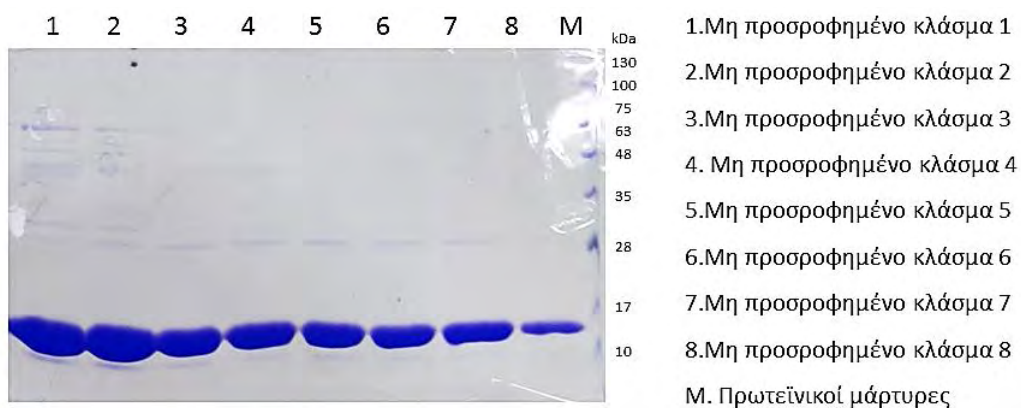
**Εικόνα 3.5.** Πηκτή SDS PAGE ηλεκτροφόρησης δειγμάτων GST-TNF μετά από επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης στους 24°C/3 ώρες/1 mM IPTG **α.** σε επωαστήρα κυττάρων και **β.** σε βιοαντιδραστήρα.

Το μίγμα των σπασμένων κυττάρων φυγοκεντρήθηκε, φιλτραρίστηκε και φορτώθηκε στη στήλη γλουταθειόνης αραρόζης. Η υπερεκφρασμένη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-TNF διέθετε αλληλουχία πέψης (Leu-Glu-Val-LeuPhe-Gln↓Gly) για την 3C-πρωτεάση μεταξύ της ακολουθίας του GST και του TNF. Ακολούθησαν πλύσεις της στήλης με διάλυμα PBS (όγκου τουλάχιστον δεκαπλάσιου του όγκου της στήλης) και έγινε ολονύκτια πέψη της GST-TNF με 3C-πρωτεάση στους 4°C για την αφαίρεση της πρωτεΐνης GST (Εικόνα 3.6, πηγάδι 7) .



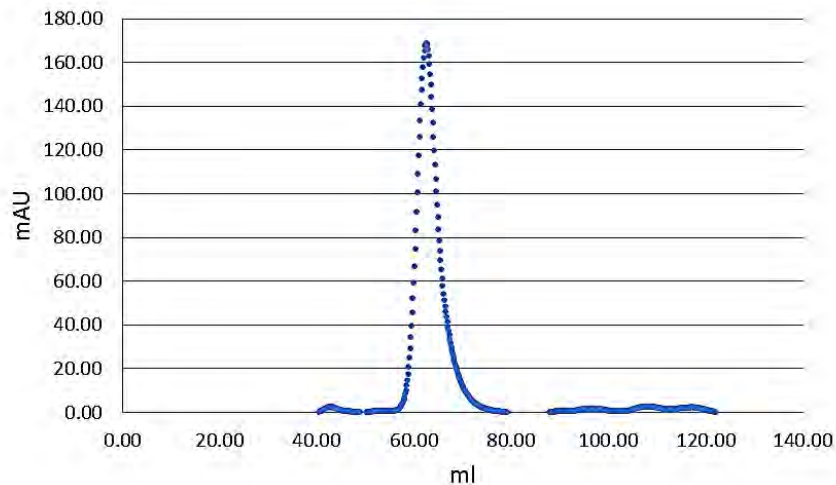
**Εικόνα 3.6.** Πηκτή SDS PAGE ηλεκτροφόρησης δειγμάτων του καθαρισμού του TNF.

Κατόπιν έγινε δεύτερο πέρασμα της κοιμένης πρωτεΐνης μέσα από τη στήλη για να προσροφηθούν μικρές εναπομένουσες ποσότητες GST και GST/3C πρωτεάσης (Εικόνα 3.7).



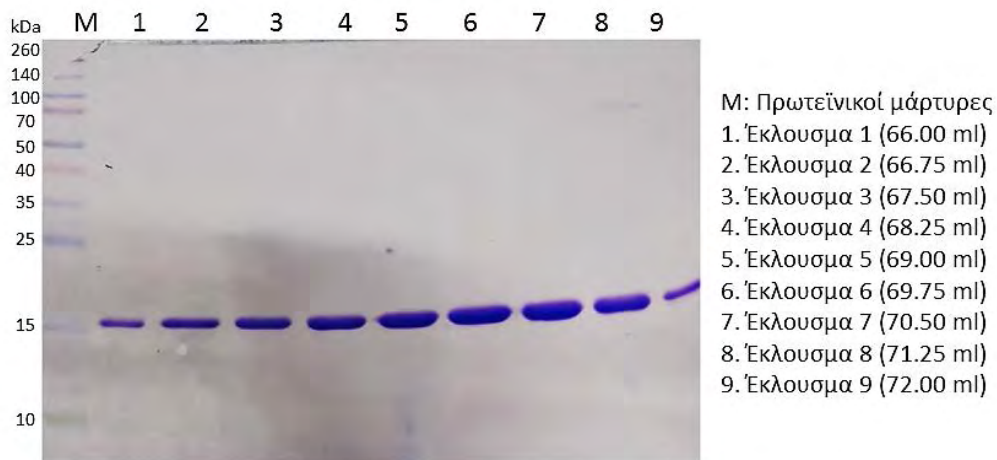
**Εικόνα 3.7.** Πηκτή SDS PAGE ηλεκτροφόρησης των τελικών κλασμάτων του καθαρισμού του TNF με στήλη γλουταθειόνης αφαρόζης.

Το τελικό στάδιο του καθαρισμού περιλάμβανε χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Η καθαρισμένη πρωτεΐνη φορτώθηκε σε μια στήλη S75\_16/60 και εκλούστηκε με ταχύτητα 1 mL/min σε κλάσματα των 0.75 mL. Η βασική κορυφή εμφανίστηκε στα 66 – 72 mL (Εικόνα 3.8).



**Εικόνα 3.8.** Χρωματογράφημα καθαρισμού του TNF με S75 16/60 στήλη μοριακής διήθησης.

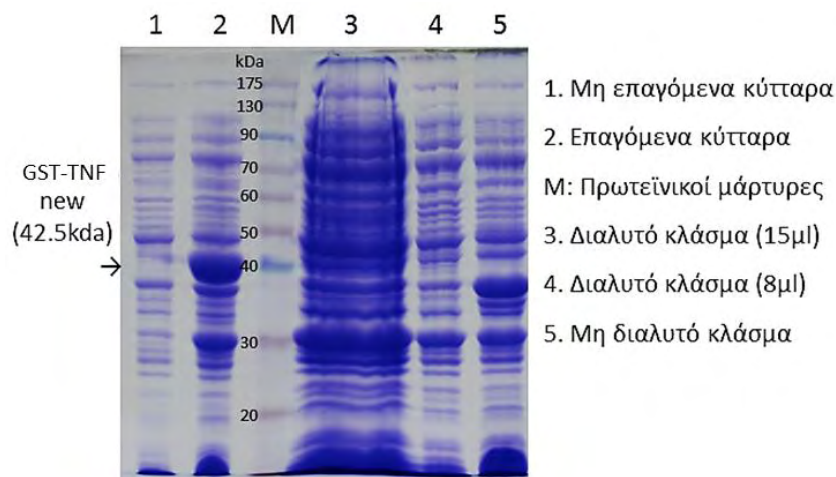
Η καθαρότητα της πρωτεΐνης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου εκτιμήθηκε σε >90% (Εικόνα 3.9).



**Εικόνα 3.9.** Πηκτή SDS PAGE ηλεκτροφόρησης των κλασμάτων έκλουσης της στήλης μοριακής διήθησης.

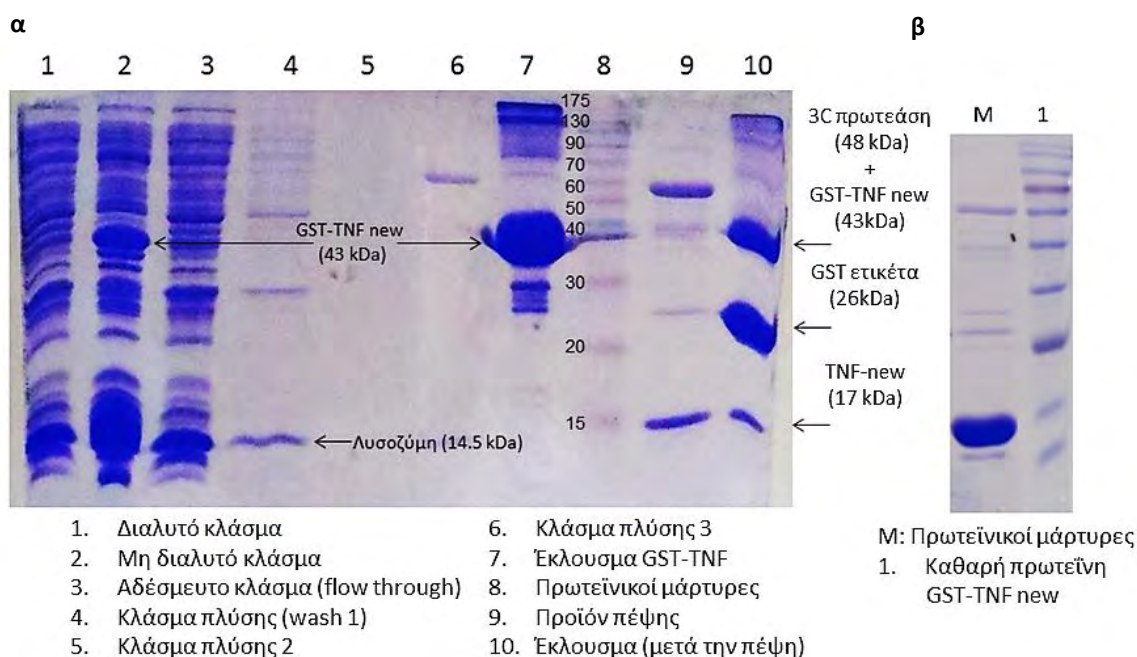
### 3.1.3 Διερεύνηση υπερέκφρασης και καθαρισμός της νέας κατασκευής του TNF

Έγινε υπερέκφραση της νέας κατασκευής του TNF (TNF new) σε κύτταρα BL21(DE3) και καθαρισμός με το ήδη υπάρχον πρωτόκολλο του TNF. Η επαγωγή (24°C/3 ώρες/1 mM IPTG) ήταν ικανοποιητική (Εικόνα 3.10).



**Εικόνα 3.10.** Πηκτή SDS PAGE ηλεκτροφόρησης δειγμάτων του καθαρισμού της νέας κατασκευής του TNF μετά από υπερέκφραση 3 ωρών στους 24°C.

Μετά τον καθαρισμό με στήλη γλουταθειόνης-αγαρόζης το τελικό έκλουσμα του TNF new (Εικόνα 3.11β, πηγάδι 9) φέρει μια επιπλέον ζώνη στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου περίπου στα 60 kDa η οποία φαίνεται να είναι παρούσα στο κλάσμα πλύσης 3. Για την απομάκρυνση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης χρειάστηκε να γίνει πλύση της στήλης με μεγαλύτερο όγκο διαλύματος PBS (Εικόνα 3.11α).

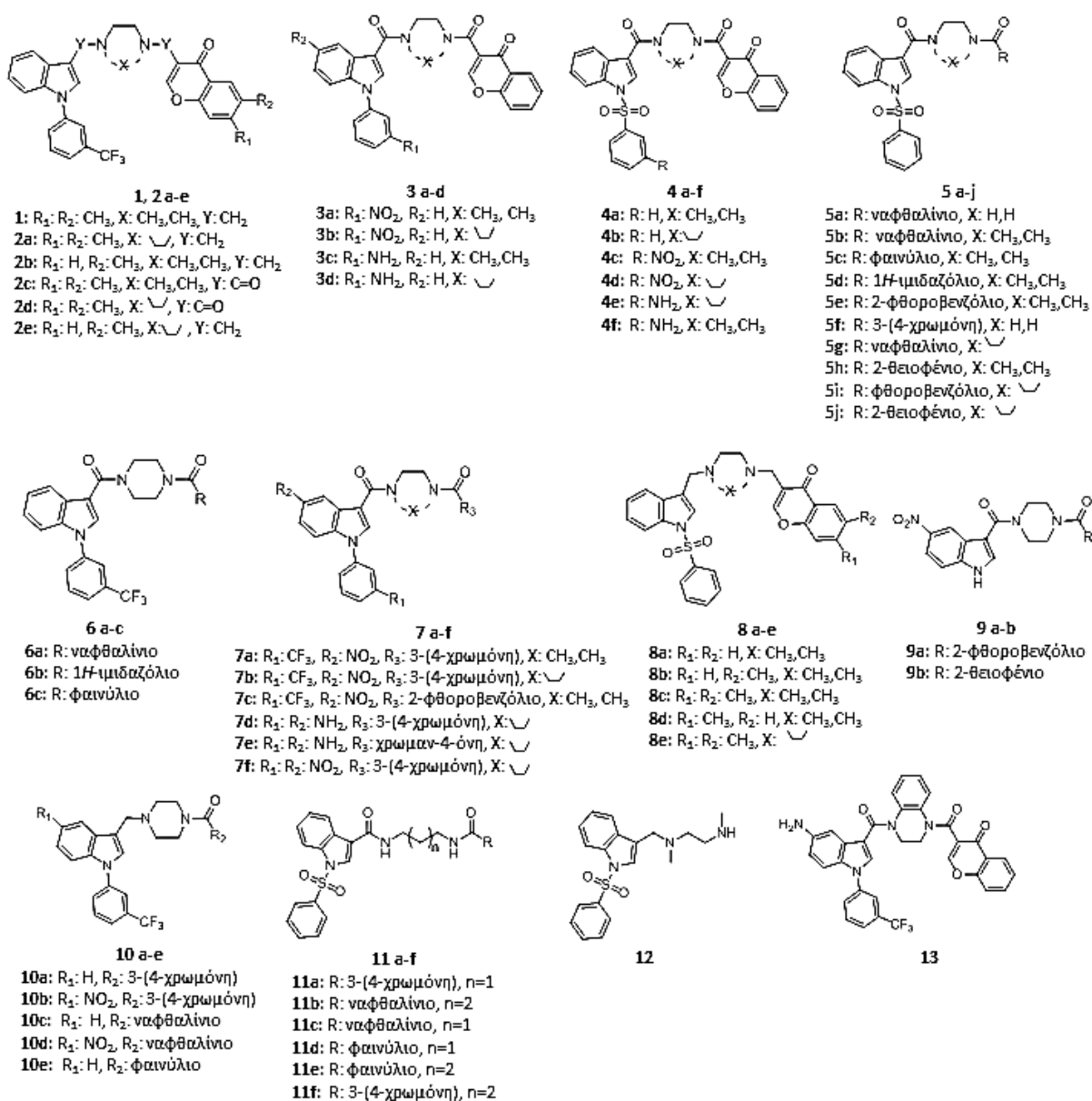


**Εικόνα 3.11.** Πηκτή ηλεκτροφόρησης SDS PAGE **α.** δειγμάτων του καθαρισμού της πρωτεΐνης TNF new, **β.** η τελική πρωτεΐνη TNF new μετά το τέλος του καθαρισμού.

### 3.2 Μελέτες διαλυτότητας πιθανών αναστολέων

Ο σχεδιασμός των ενώσεων που μελετήθηκαν είχε σαν στόχο την πρόσδεσή τους στην περιοχική πρόσδεση του SPD304 στον TNF. Ένα μεγάλο μέρος από αυτές τις ενώσεις σχεδιάστηκαν με βάση τη δομή του SPD304 και για τον λόγο αυτό φέρουν κάποια κοινά δομικά μοτίβα όπως διαφορετικά είδη χρωμονών, ινδόλια και ομάδες διαμινών (Εικόνες 3.17, 3.18).

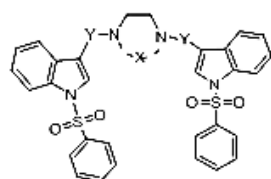
#### Ανάλογα SPD304



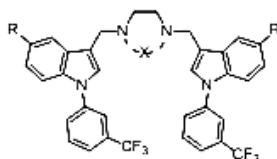
Εικόνα 3.17. Δομές SPD304 αναλόγων 1-13.



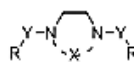
### Ανάλογα SPD304



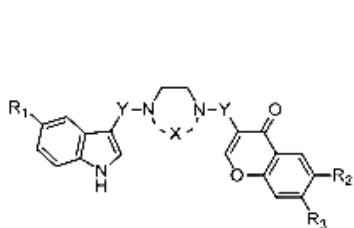
**14 a-e**  
**14a:** X: H, H, Y: CH<sub>2</sub>  
**14b:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: CH<sub>2</sub>  
**14c:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, Y: C=O  
**14d:** X: √, Y: C=O  
**14e:** X: H, H, Y: C=O



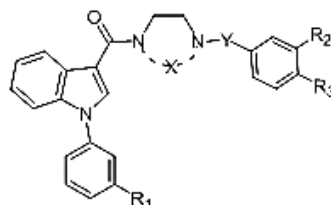
**15 a-d**  
**15a:** R: H, X: H, H  
**15b:** R: NO<sub>2</sub>, X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>  
**15c:** R: NO<sub>2</sub>, X: √  
**15d:** R: H, X: √



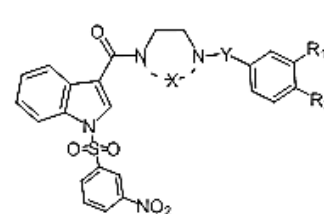
**16 a-e**  
**16a:** R: 1*H*-indole, X: √, Y: CH<sub>2</sub>  
**16b:** R: ναφθαλινο, X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: C=O  
**16c:** R: 3-(4-χρωμόνη), X: H, H, Y: C=O  
**16d:** R: 3-(4-χρωμόνη), X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: C=O  
**16e:** R: 3-(4-χρωμόνη), X: √, Y: C=O



**17 a,b**  
**17a:** R<sub>1</sub>: H, X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: R<sub>3</sub>: CH<sub>3</sub>, Y: CH<sub>3</sub>  
**17b:** R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: R<sub>3</sub>: H, X: √, Y: C=O



**18 a-i**  
**18a:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H  
**18b:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: CN  
**18c:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: F  
**18d:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -(C=O)-SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H  
**18e:** X: √, Y: -(C=O)-SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H  
**18f:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H  
**18g:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: CN  
**18h:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: F  
**18i:** X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H



**19 a-f**  
**19a:** X: CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H  
**19b:** X: CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: CN  
**19c:** X: CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H  
**19d:** X: √, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H  
**19e:** X: √, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: CN  
**19f:** X: √, Y: -SO<sub>2</sub>-, R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H

**Εικόνα 3.18.** Δομές SPD304 αναλόγων 14-19.

Ο σχεδιασμός των αναλόγων του SPD304 προσανατολίστηκε προς τη βελτιστοποίηση του αναστολέα SPD304 στοχεύοντας τόσο στη μείωση της τοξικότητας όσο και στην ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αναστολέα και περιοχής πρόσδεσης (Alexiou et al., 2014, Paraneophytou et al., 2015). Παράλληλα, σχεδιάστηκε από το Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, μια σειρά ενώσεων που βασίστηκαν σε μελέτες προσομοίωσης ελλιμενισμού (docking simulations). Οι ενώσεις αυτές (A1-10, B1-10, C1-10) δεν μοιάζουν δομικά με το SPD304 για αυτό και δεν ανήκουν στην κατηγορία των SPD304 αναλόγων. Καθώς ήταν εμπορικά διαθέσιμες, αγοράστηκαν σε μικρές ποσότητες (1-2 mg). Επίσης,

μελετήθηκαν τρεις ακόμα σειρές πιθανών αναστολέων (**D1-10**, **E1-10**, **F1-10**), οι οποίοι σχεδιάστηκαν μεταγενέστερα από το ίδιο εργαστήριο και βασίστηκαν σε αποτελέσματα που προέκυψαν μέσα από το πρόγραμμα RLead. Οι ενώσεις αυτές συντέθηκαν από την εταιρία ProActina και προέκυψαν επίσης από μελέτες docking όπου χρησιμοποιήθηκαν βάσεις δεδομένων. Τα μόρια των ενώσεων μοιάζουν δομικά με το SPD304 αλλά πολύ λιγότερο από ό,τι τα ανάλογα του SPD304.

Τελικός σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των πιθανών αναστολέων, ο οποίος όμως για να επιτευχθεί χρειάστηκε να ξεπεραστεί πρώτα το πρόβλημα της χαμηλής υδατικής διαλυτότητας. Έτσι ο βασικός στόχος μετατέθηκε στην αύξηση της υδατικής διαλυτότητας των υπο μελέτη μορίων με τρόπο που να μην επηρεάζει τις βιολογικές δοκιμές. Η πλειοψηφία των πιθανών αναστολέων που μελετήθηκαν (76% κατά προσέγγιση) δεν ήταν αρκετά διαλυτή σε υδατικά διαλύματα έτσι ώστε να μετρηθούν οι σταθερές διάστασής τους. Για τους περισσότερους από αυτούς (74%) η διαλυτότητα βελτιώθηκε τόσο ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της σταθεράς διάστασής τους ( $K_d$ ) αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα ανακάλυψης μιας νέας δραστικής ένωσης.

Όσο αφορά τις εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις, το 17% παρέμεινε αδιάλυτο ακόμα και σε καθαρό διαλύτη (DMSO, μεθανόλη) και εμφάνισαν μεγαλύτερα προβλήματα διαλυτότητας σε σχέση με τα έως τότε μελετημένα ανάλογα του SPD304. Επίσης η σειρά ουσιών **D,E** και **F** μαζί με την τελευταία σειρά αναλόγων του SPD304 (**18 a-i**, **19 a-f**) ήταν οι πιο αδιάλυτες σειρές αναστολέων και για αυτό χρειάστηκαν περαιτέρω μελέτες και δοκιμές με νέους συνδιαλύτες για να καταστεί δυνατό να μετρηθεί το  $K_d$ . Η χαμηλή υδατική διαλυτότητα ωστόσο είναι κάτι το αναμενόμενο όταν η στοχευόμενη περιοχή είναι υδρόφοβη όπως στην περίπτωση της περιοχής πρόσδεσης του SPD304 στον TNF.

Συγκεκριμένα, οι μικροί αναστολείς του TNF προσδένονται σε μια αβαθή υδρόφοβη περιοχή του διμερούς η οποία συνεπάγεται υδρόφοβους αναστολείς. Το μόριο SPD304 εμφανίζει χαμηλή υδατική διαλυτότητα (10  $\mu\text{M}$  σε διάλυμα 10 mM κιτρικών/φωσφορικών, pH 6.5) (Papanephytou et al., 2013) όταν για να δοκιμαστεί επιτυχώς με μια βιοχημική μέθοδο μελέτης της πρόσδεσης απαιτείται μια συγκέντρωση τουλάχιστον 30  $\mu\text{M}$ . Το συγκεκριμένο μόριο προσδένεται στην υδρόφοβη «τσέπη» του TNF αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένα αμινοξέα, τα οποία στην πλειοψηφία τους είναι υδρόφοβα (Εικόνα 1.15).

Οι μελέτες διαλυτότητας κατευθύνθηκαν από τους παράγοντες που σχετίζονται με τη μέθοδο προσδιορισμού και επηρεάζουν την υδατοδιαλυτότητα όπως η αρχική κατάσταση της διαλυμένης ουσίας (στερεή/υγρή) και ο χρόνος διάλυσης (Di and Kerns, 2006). Μελετήθηκε επίσης η επιρροή του φιλτραρίσματος των δειγμάτων πριν από τη μέτρηση της διαλυτότητας και επιχειρήθηκε η ενίσχυση της διαλυτότητας με τη χρήση συνδιαλύτη, μια από τις πιο διαδεδομένες προσεγγίσεις για την αύξηση της διαλυτότητας (Hoelke et al., 2009; Savjani et al., 2012).

Οι συνδιαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν (5% DMSO, 5% PEG3350) όπως αποδείχθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν επηρεάζουν τον TNF ούτε τις βιοχημικές δοκιμές που ακολούθησαν (Papanephytou et al., 2013). Από τη διαδικασία διάλυσης προκύπτουν δυο διαφορετικά είδη διαλυτότητας: όταν η ένωση προστίθεται υπό στερεή μορφή στο τελικό διάλυμα τότε μετράται η θερμοδυναμική διαλυτότητα. Όταν η ένωση προστίθεται στο υδατικό μέσο διάλυσης υπό μορφή διαλύματος σε οργανικό διαλύτη, τότε προκύπτει η κινητική διαλυτότητα (Alsenz and Kansy, 2007).

Καθώς η τιμή του pH μπορεί επίσης να επηρεάσει τη διαλυτότητα, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.5 το οποίο είναι αφενός κατάλληλο

για τις βιολογικές δοκιμές που θα ακολουθούσαν και αφετέρου συνηθισμένο για μελέτες πιθανών φαρμακευτικών ουσιών για από του στόματος χορήγηση (oral drugs). Η πρωτογενής περιοχική απορρόφηση των από του στόματος χορηγούμενων φαρμακευτικών ουσιών είναι το λεπτό έντερο το οποίο καλύπτεται εκτεταμένα από τον βλεννογόνο και διαθέτει διάφορους μηχανισμούς μεταφοράς (transport mechanisms) (Charman et al., 1997). Το pH 6.5 είναι μια τιμή pH ενδεικτική του περιβάλλοντος του λεπτού εντέρου (Bergström et al., 2004). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι έχει διερευνηθεί ο ρόλος της χολής στη διάλυση φαρμακευτικών μορίων και έχει βρεθεί ότι λειτουργεί σαν συνδιαλύτης ενισχύοντας τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα φαρμακευτικών ουσιών (Charman et al., 1997). Με τον τρόπο αυτό στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η ενίσχυση της υδατικής διαλυτότητας των πιθανών αναστολέων λαμβάνοντας υπόψη πρωτίστως τις συνθήκες και απαιτήσεις των βιολογικών δοκιμών που θα ακολουθούσαν και δευτερευόντως το χημικό περιβάλλον της περιοχής απορρόφησης των πιθανών αναστολέων. Με την ενίσχυση της υδατικής διαλυτότητας είναι δυνατή η αύξηση του συνόλου των μελετούμενων ενώσεων αυξάνοντας έτσι και την πιθανότητα ανακάλυψης μιας νέας φαρμακευτικής ουσίας.

Εν τέλει συστάθηκε ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο μέτρησης υδατικής διαλυτότητας μικρομοριακών ενώσεων (μοριακού βάρους <700). Επίσης, δημιουργήθηκε ένα QSPR μοντέλο πρόβλεψης διαλυτοτήτων σε 5% DMSO με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα που μετρήθηκαν με το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο παρουσία 5% DMSO (Παράρτημα Α). Το μοντέλο αυτό στηρίζεται στην ταξινόμηση διαχωρίζοντας τις αδιάλυτες από τις διαλυτές ενώσεις (Mettou et al., 2017).

### 3.2.1 Μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τη διαλυτότητα

Δημιουργήθηκαν τέσσερις ομάδες ενώσεων για τη μελέτη κάποιων βασικών παραγόντων που επηρεάζουν τη διαλυτότητα και τη μέτρησή της. Η επιλογή των ενώσεων της κάθε ομάδας έγινε κυρίως βάσει του λογαρίθμου του συντελεστή μερισμού (clogP) και της δομής των ενώσεων αυτών έτσι ώστε κάθε ομάδα να έχει ενώσεις τόσο με χαμηλό (>4.2) όσο και με υψηλό (>4.2) clogP καθώς και να υπάρχει μια ποικιλία δομικών χαρακτηριστικών (ανοικτή/συζευγμένη διαμινική γέφυρα, διαφορετικοί υποκαταστάτες κλπ.). Επίσης, σε κάθε ομάδα συμπεριλήφθηκαν πιθανοί αναστολείς τόσο χαμηλής (<100 μM) όσο και υψηλής (>100 μM) υδατικής διαλυτότητας.

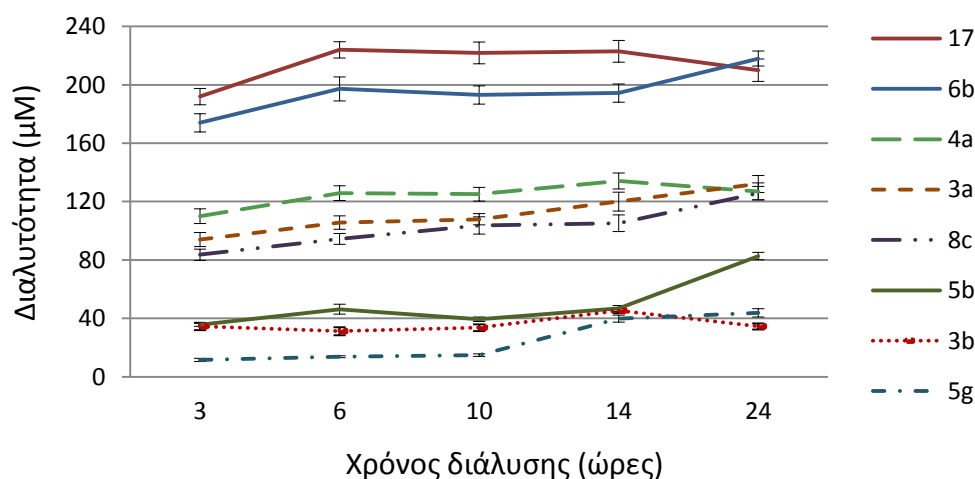
#### 3.2.1.1 Χρόνος διάλυσης

Μετρήθηκε η υδατική διαλυτότητα 8 ενώσεων (**3a**, **3b**, **4a**, **5b**, **5g**, **6b**, **8c**, **17**) για 6 διαφορετικές χρονικές περιόδους διάλυσης (3, 6, 10, 14 και 24 ώρες). Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν διαλυτές αλλά και αδιάλυτες ενώσεις (ενώσεις **5b**, **3b**, **5g** και **16f**, **6b** αντίστοιχα, Εικόνες 3.17, 3.18). Οι τιμές clogP των ενώσεων κυμαίνονται από 2.71 έως 4.87.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19 για όλες τις ενώσεις η συγκέντρωση σταθεροποιήθηκε μετά από 8-10 ώρες. Παρατεταμένη διάλυση (> 14 ώρες) σε ορισμένες περιπτώσεις οδήγησε σε διακύμανση προς είτε υψηλότερες είτε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, για κάποιες ενώσεις όπου δεν έχει γίνει σύζευξη της διαμίνης (**3a** και **5b**) η διάλυσή τους εμφανίζει μια αύξηση μετά το πλάτο στις 10-14 ώρες. Αντίθετα, όταν η ομάδα αυτή είναι συζευγμένη (**3b** και **5g** αντίστοιχα) τότε μετά από το πλάτο αυτό η διάλυση είτε μειώνεται είτε παραμένει σταθερή. Επίσης για τις ενώσεις **5b** και **4a**, όπου μια ναφθυλομάδα έχει αντικατασταθεί από μια ομάδα χρωμόνης, η διάλυση δεν

διαφοροποιείται με τον ίδιο τρόπο μετά το πλατό: στην περίπτωση της **5b** αυξάνεται ενώ για την **4a** μειώνεται.

Είναι φανερό πως μετά από 10–14 ώρες η συγκέντρωση των περισσότερων ενώσεων έχει φτάσει τα 40–50  $\mu\text{M}$  που στη συγκεκριμένη περίπτωση –και σε πολλές άλλες περιπτώσεις ανάλογων μελετών πρόσδεσης– είναι αρκετή για τη διεξαγωγή βιολογικών δοκιμών προς μέτρηση μιας σταθεράς πρόσδεσης της τάξης των 20  $\mu\text{M}$  (μέγιστο). Το συγκεκριμένο όριο για το  $K_d$  σχετίζεται με τον στόχο της συγκεκριμένης μελέτης που είναι η ανακάλυψη ουσιών με βάση το SPD304 ( $K_d = 5.036 \mu\text{M}$ ). Έτσι ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι υπό μελέτη ενώσεις με σταθερές διάσπασης που θα κυμαίνονται στην ευρύτερη περιοχή του  $K_d$  του SPD304 ( $\leq 20 \mu\text{M}$ ). Παρόλο λοιπόν που για κάποιες ενώσεις μετά το πέρας των 14 ωρών αυξήθηκε περαιτέρω η συγκέντρωσή τους (ενώσεις **5b**, **6b**, **8c**), αποφεύχθηκε η παράταση του χρόνου διάλυσης καθώς μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση. Συνεπώς, ο χρόνος διάλυσης των ουσιών πριν τη μέτρηση της διαλυτότητας ορίστηκε στις 10 ώρες.



**Εικόνα 3.19.** Μελέτη επιρροής του χρόνου διάλυσης στην κινητική διαλυτότητα. Οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM φωσφορικών/κιτρικών pH 6.5, παρουσία 5% v/v DMSO στους 25°C.

### 3.2.1.2 Αρχική μορφή ενώσεων (στερεή/ σε υγρό διάλυμα)

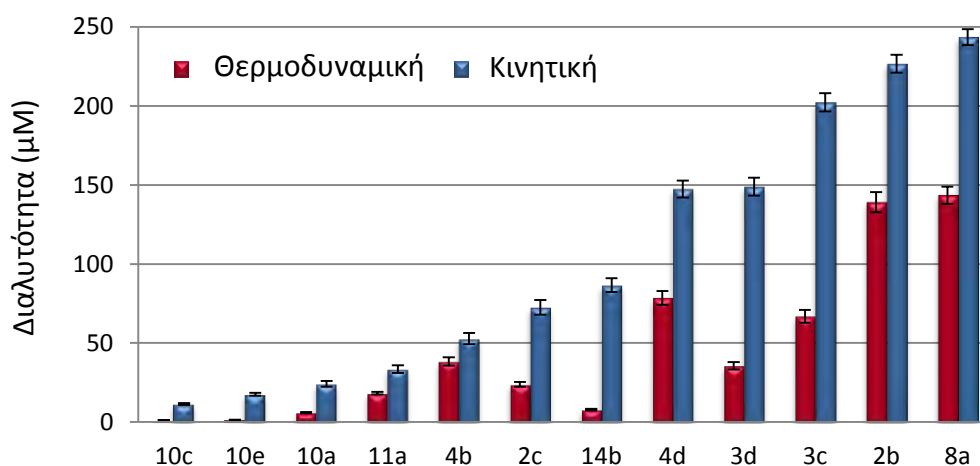
Μελετήθηκε η επιρροή της μορφής των ενώσεων υπό την οποία προστίθενται στο διάλυμα: αν δηλαδή είναι σε στερεή μορφή (θερμοδυναμική διαλυτότητα) ή διαλυμένες σε καθαρό οργανικό διαλύτη (κινητική διαλυτότητα). Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν τόσο διαλυτές όσο και αδιάλυτες ενώσεις οι τιμές  $\log P$  των οποίων κυμαίνονται από 2.41 έως 6.26. Ένα άλλο κριτήριο για την επιλογή των παραπάνω ενώσεων ήταν η παρουσία διαφορετικών υποκαταστατών (ινδόλιο, χρωμόνη, διαμίνη).

Επιλέχθηκαν συνολικά 12 ανάλογα του SPD304 (**2b**, **2c**, **3c**, **3d**, **4b**, **4d**, **8a**, **10a**, **10c**, **10e**, **11a**, **14b**, Εικόνες 3.17, 3.18) και μετρήθηκε η κινητική και η θερμοδυναμική τους διαλυτότητα (Εικόνα 3.20). Τα δεδομένα δείχνουν ότι η αρχική μορφή της ένωσης παίζει σημαντικό ρόλο στη διαλυτότητα, μια διαπίστωση που έρχεται σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες (Alsensz and Kansy, 2007; Hoelke et al., 2009; Saal and Petereit, 2012): οι τιμές της κινητικής διαλυτότητας είναι αρκετά υψηλότερες σε σχέση με αυτές της θερμοδυναμικής διαλυτότητας σε ποσοστό 29-92%. Αυτή η διαπίστωση μπορεί να εξηγηθεί με το γεγονός ότι λόγω της αρχικής διάλυσης της στερεής ουσίας σε καθαρό οργανικό διαλύτη –όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο μέτρησης της κινητικής διαλυτότητας- η ενέργεια πλέγματος παρακάμπτεται. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η ενέργεια διάλυσης προς όφελος της διαλυτότητας (Kerns, 2001).

Η διαφοροποίηση ανάμεσα σε κινητική και θερμοδυναμική διαλυτότητα μεγιστοποιείται για τις ενώσεις **3c**, **10c**, **14b**, **10e** ενώ ελαχιστοποιείται για τις ενώσεις **2b** και **4b**. Η ανοικτή διαμόρφωση της διαμίνης (ένωση **3c**) επίσης οδήγησε σε ενίσχυση τόσο της κινητικής όσο και της θερμοδυναμικής διαλυτότητας σε σχέση με τη συζευγμένη διαμίνη (ένωση **3d**). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να οφείλεται στο ότι η ανοικτή διαμόρφωση προσδίδει στο μόριο

αυξημένη ευλυγισία μια ιδιότητα που σχετίζεται με την αύξηση της διαλυτότητας (Huuskonen et al., 2008). Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγούμαστε με τη σύγκριση ανάμεσα στις τρεις λιγότερο διαλυτές (**10c**, **10e**, **10a**) και τις τρεις πιο διαλυτές ουσίες αυτού του διαγράμματος (**3c**, **2b**, **8a**) όπου η διαμίνη βρίσκεται στη συζευγμένη και την ανοικτή διαμόρφωση αντίστοιχα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαφοροποίηση ανάμεσα στη θερμοδυναμική και την κινητική διαλυτότητα αναμένεται να είναι πιο περιορισμένη για άμορφες σε σχέση με κρυσταλλικές ενώσεις. Επίσης, η κινητική διαλυτότητα τυπικά δίνει αποτελέσματα τα οποία αναφέρονται στην άμορφη κατάσταση μιας ένωσης. Αντίθετα, η μέτρηση της θερμοδυναμικής διαλυτότητας συνηθέστερα αναφέρεται σε κρυσταλλικές μορφές των ενώσεων (Saal and Petereit, 2012). Καθώς οι ουσίες που μελετήθηκαν ήταν όλες σε άμορφη κατάσταση, ήταν ένας ακόμα λόγος που το πρωτόκολλο μέτρησης της κινητικής διαλυτότητας θεωρήθηκε πιο κατάλληλο.

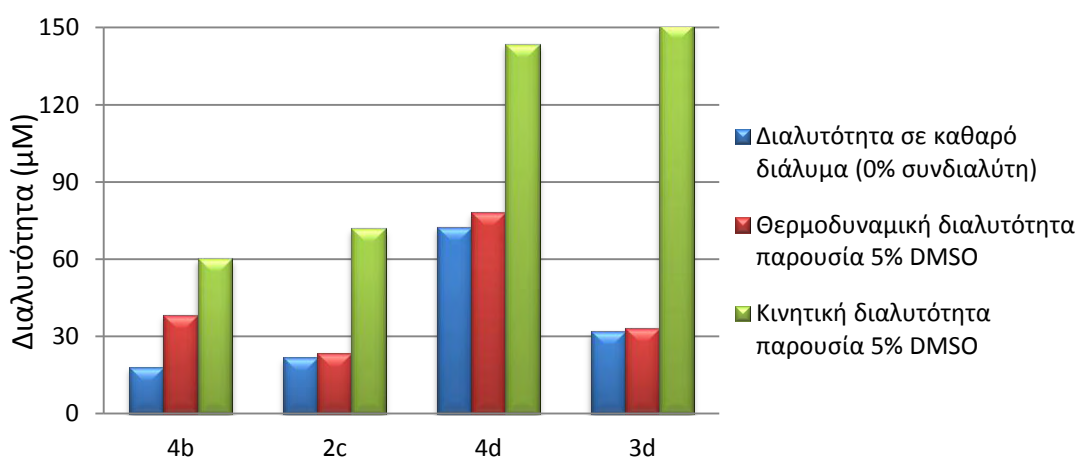


**Εικόνα 3.20.** Μελέτη της επιρροής της αρχικής κατάστασης των ενώσεων (στερεή/σε διάλυμα). Οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM φωσφορικών/κιτρικών pH 6.5 παρουσία 5% v/v DMSO, 25°C.

Η σύγκριση θερμοδυναμικής και κινητικής διαλυτότητας παρουσία 5% DMSO με την αντίστοιχη διαλυτότητα απουσία συνδιαλύτη (Εικόνα 3.21) δείχνει την



επίδραση που μπορεί να έχει το πρωτόκολλο διάλυσης στη διαλυτότητα μιας ουσίας: η θερμοδυναμική διαλυτότητα αυξάνεται μέχρι 2.0 φορές με την προσθήκη 5% DMSO ενώ η κινητική διαλυτότητα έως 4.7 φορές. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι παρόλο που χρησιμοποιείται ο ίδιος συνδιαλύτης είναι δυνατό μια ουσία να γίνει πολύ πιο διαλυτή ακολουθώντας το πρωτόκολλο διάλυσης της κινητικής διαλυτότητας.

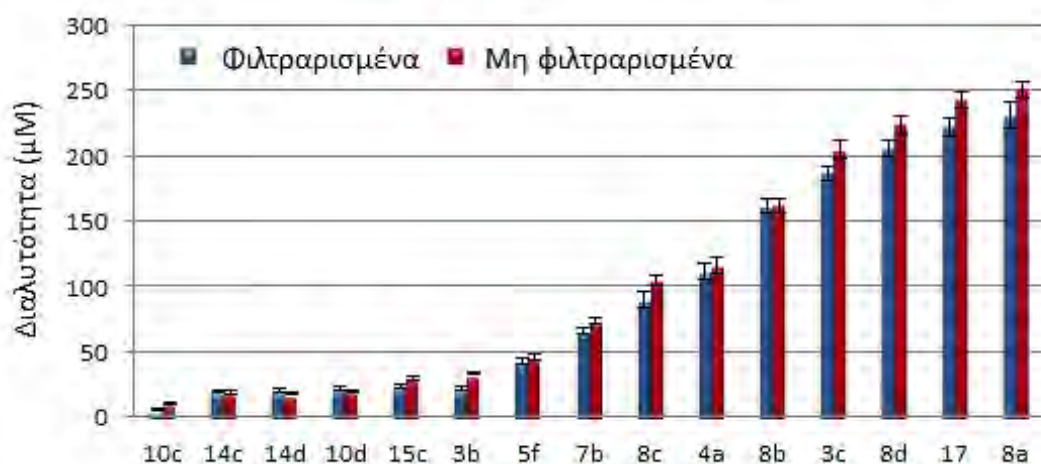


**Εικόνα 3.21.** Σύγκριση διαλυτοτήτων που μετρήθηκαν με διαφορετικά πρωτόκολλα, παρουσία 5% DMSO και απουσία συνδιαλύτη.

### 3.2.1.3 Μέθοδος διαχωρισμού διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος

Η μέθοδος διαχωρισμού του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στη μετρούμενη διαλυτότητα. Το ενδεχόμενο αυτό είναι πιθανό σε ακραίες περιπτώσεις όπως αυτές των πολύ υδρόφοβων ενώσεων οι οποίες είτε συσσωρεύονται στην επιφάνεια του φίλτρου είτε επιπλέουν στην επιφάνεια του δείγματος (Alsenz and Kansy, 2007). Στην παρούσα εργασία η φυγοκέντρηση είναι ένα απαραίτητο κομμάτι του πρωτόκολλου μέτρησης της διαλυτότητας το οποίο περιλαμβάνει τη μέτρηση εκτός του διαλυτού και του αδιάλυτου κλάσματος του κάθε δείγματος (Paraneophytou et al., 2013).

Η σύγκριση ισοδύναμων δεδομένων που βασίστηκαν είτε μόνο στη φυγοκέντρηση (κατηγορία «μη φιλτραρισμένα») είτε στη φυγοκέντρηση και το φιλτράρισμα με φίλτρα 0.22  $\mu\text{m}$  (κατηγορία «φιλτραρισμένα») έδειξε ότι το φιλτράρισμα επιπλέον της φυγοκέντρωσης δεν έδωσε σημαντικές και επαναλήψιμες διακυμάνσεις στη μετρούμενη διαλυτότητα (Εικόνα 3.22). Πιο συγκεκριμένα, για το 83% των ενώσεων που μετρήθηκαν η διαφοροποίηση ανάμεσα στις δυο μεθόδους διαχωρισμού δεν ξεπερνά το 22%. Επομένως, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες η φυγοκέντρηση είναι αρκετά αποτελεσματική για την απομάκρυνση κατακρημνισμάτων και πιθανών μικκυλίων (μεγαλύτερων από 0.22  $\mu\text{m}$ ) και τον επιτυχή διαχωρισμό των δύο κλασμάτων.



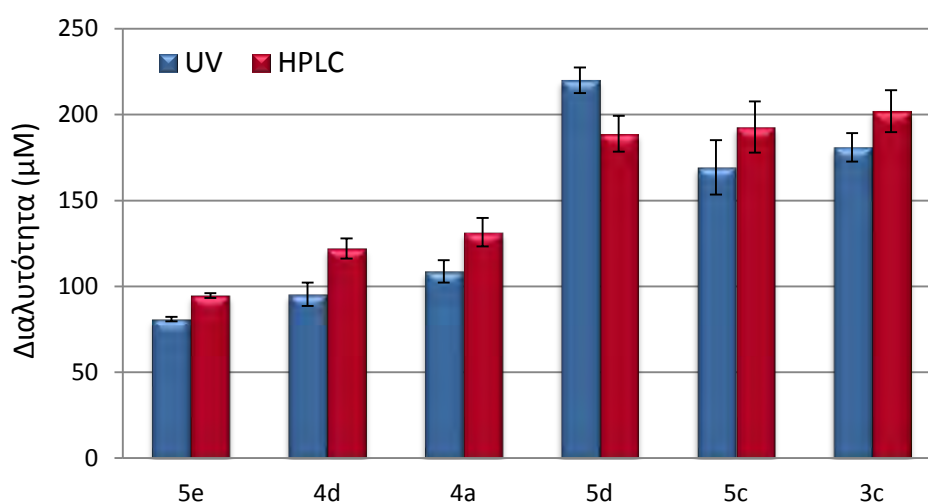
**Εικόνα 3.22.** Μελέτη επιρροής του φιλτραρίσματος των δειγμάτων πριν τη μέτρηση της διαλυτότητας. Οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM φωσφορικών/κιτρικών pH 6.5, παρουσία 5% v/v DMSO στους 25°C.

#### 3.2.1.4 Σύγκριση τεχνικών UV και HPLC για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών

Έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων έξι ουσιών που μετρήθηκαν με τη UV και την HPLC μέθοδο. Τα δεδομένα αυτά αφορούν SPD304 ανάλογα διαλυμένα σε 10 mM φωσφορικών/κιτρικών pH 6.5, σε 5% DMSO. Η προετοιμασία των

δειγμάτων έγινε βάσει του πρωτοκόλλου της κινητικής διαλυτότητας και η διάλυση διήρκησε τρεις ώρες. Ακολούθησε φιλτράρισμα και μέτρηση και με τις δύο μεθόδους.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει αρκετά καλή συμφωνία ανάμεσα στις δύο μεθόδους (Εικόνα 3.23). Η διαφοροποίηση των τιμών που παρατηρείται κυμαίνεται από 11.6% - 28.0% και είναι αρκετά περιορισμένη καθώς σε ανάλογες μελέτες έχουν παρατηρηθεί πολύ μεγαλύτερες διαφορές (Hoelke et al., 2009). Επίσης η HPLC μέθοδος τείνει να δίνει υψηλότερες τιμές από την UV μέθοδο: στο 80% των ενώσεων τα HPLC δεδομένα είναι από 11.6% - 28.0% υψηλότερα από τα UV δεδομένα. Αντίστοιχα στο 20% των περιπτώσεων οι τιμές με την UV μέθοδο είναι κατά 16.5% υψηλότερες από τις αντίστοιχες με την HPLC μέθοδο.



Εικόνα 3.23. Σύγκριση αποτελεσμάτων με τη UV και την HPLC μέθοδο.

### 3.2.2 Ενίσχυση της διαλυτότητας με προσθήκη συνδιαλυτών και εκδόχων

Για την ενίσχυση της διαλυτότητας δοκιμάστηκε η προσθήκη συνδιαλυτών σε ρυθμιστικό διάλυμα (Sanjani et al., 2012). Αρχικά δοκιμάστηκε το DMSO (5% v/v) σαν συνδιαλύτης, ωστόσο, κατά την πορεία του σχεδιασμού νέων

αναστολέων (αναλόγων του SPD304 και μη), προέκυψαν ενώσεις που δεν ήταν ικανοποιητικά διαλυτές σε 5% DMSO. Συνεπώς, για το σύνολο των πιθανών αναστολέων δοκιμάστηκαν και άλλες ουσίες εκτός του DMSO, για την ενίσχυση της υδατικής διαλυτότητας.

### *3.2.2.1 Επιλογή συνδιαλυτών και άλλων προσθέτων*

Κάποιοι αρκετά κοινοί συνδιαλύτες που χρησιμοποιούνται για την αύξηση της υδατικής διαλυτότητας φαρμακευτικών ουσιών τόσο σε επίπεδο βιολογικών δοκιμών όσο και σε επίπεδο σκευασμάτων είναι η γλυκερόλη, η προπυλενογλυκόλη, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η αιθανόλη, το cremophor κ.ά. (Seedher and Kanojia, 2009; Strickley, 2004). Το DMSO είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους συνδιαλύτες ιδιαίτερα όσο αφορά βιολογικές δοκιμές (Alelyunas et al., 2009; Balakin et al., 2004; Di and Kerns, 2006; Kerns et al., 2008; Rowland et al., 1998). Κάτι ανάλογο ισχύει και για την PEG διαφόρων μοριακών βαρών (Paraneophytou et al., 2015; Takahashi et al., 2002; Wu et al., 2014). Υπό αυτό το πρίσμα αξιολογήθηκε η επίδραση μιας σειράς οργανικών συνδιαλυτών οι οποίοι επιλέχθηκαν βάσει της ιδιότητάς τους να αυξάνουν τη διαλυτότητα μικρών φαρμακευτικών μορίων αλλά και να είναι «φιλικοί» προς τις πρωτεΐνες (protein friendly) (Paraneophytou et al., 2013). Ελήφθησαν υπόψη επίσης διαλύτες που χρησιμοποιούνται και σε άλλα πεδία όπως στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών (για παράδειγμα PEG, γλυκερόλη). Τέλος, δοκιμάστηκε και η υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (hydroxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD) η οποία είναι γνωστό ότι μπορεί να εγκλωβίζει είτε ολόκληρα μικρά μόρια ή κάποιες υδρόφοβες περιοχές τους αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους (Stella and He, 2008; Stella and Rajewski, 1997; Valle, 2003).

### 3.2.2.2 Αξιολόγηση επίδρασης συνδιαλυτών στις *in vitro* βιολογικές δοκιμές

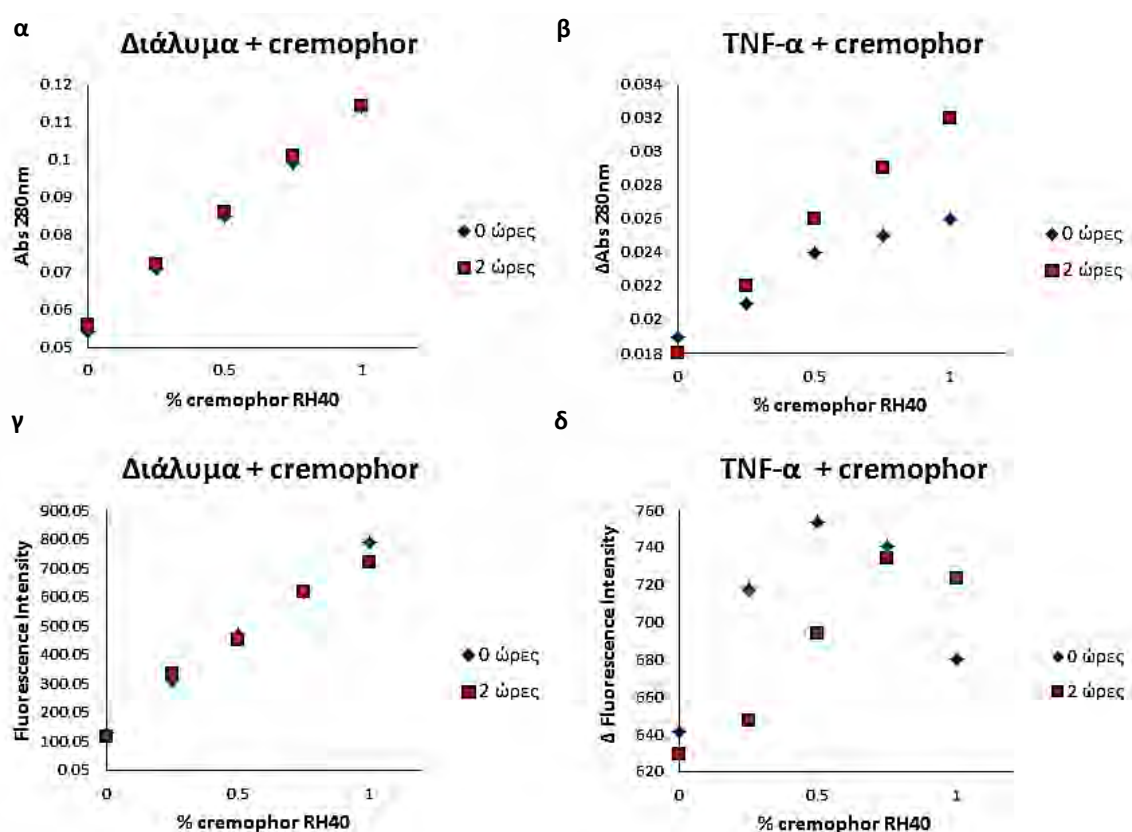
Αρχικά αξιολογήθηκε η επίδραση των συνδιαλυτών (DMSO, PEG3350, β-κυκλοδεξτρίνης, cremophor) στις βιολογικές δοκιμές φασματοσκοπίας φθορισμού. Οι μελέτες είχαν σαν στόχο την εξακρίβωση της καταλληλότητάς τους για τις βιολογικές δοκιμές και βάσει αυτών επιλέχθηκαν οι πιο κατάλληλοι σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Επίσης, σε προγενέστερες μελέτες είχαν δοκιμαστεί κάποιοι επιπλέον συνδιαλύτες όπως DMF, γλυκερόλη, μεθανόλη και PEG5000 (Papanephoytu et al., 2013) οι οποίοι όμως αποδείχτηκαν λιγότερο κατάλληλοι για τις δοκιμές πρόσδεσης σε σχέση με το DMSO και την PEG3350 (Πίνακας 3.1).

Συνδιαλύτης	Πρωτόκολλο	Περιεκτικότητα τιτλοδότη (%)	Περιεκτικότητα τιτλοδοτούμενου διαλύματος (%)	$K_d$ (μM)
DMSO	I	5	5	5.36 ±0.21
PEG3350	I	5	5	6.18 ±0.34
Cremophor	I	1	1	>20
β-κυκλοδεξτρίνη	I	5	5	>20
DMSO	II	50	0	5.71 ±0.42
β-κυκλοδεξτρίνη	II	20	0	5.96 ±0.51

**Πίνακας 3.1.** Μέτρηση  $K_d$  του SPD304 με φασματοσκοπία φθορισμού παρουσία συνδιαλυτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Το cremophor αν και βάσει κάποιων προκαταρκτικών δεδομένων μπορεί να αυξήσει δραστικά τη διαλυτότητα των πιθανών προσδετών, φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά την πρωτεΐνη. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ενεργή πρωτεΐνη παρουσία 1% cremophor και κατόπιν τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα SPD304 σε 1% cremophor. Η κατά τουλάχιστον τέσσερις φορές αύξηση του  $K_d$  (από 5.36 μM σε >20 μM) δείχνει ότι η πρωτεΐνη είναι πλέον ανενεργή (Πίνακας 3.1). Για

τη διερεύνηση του συγκεκριμένου αποτελέσματος, έγιναν μετρήσεις απορρόφησης (σε μήκος κύματος 280 nm) καθώς και φασματοσκοπίας φθορισμού του ρυθμιστικού διαλύματος (Εικόνα 3.24 α,γ) και της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.24 β,δ). Όπως φαίνεται, με την αύξηση της συγκέντρωσης του cremophor αυξήθηκε τόσο η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm όσο και το σήμα φθορισμού του TNF. Μάλιστα η αύξηση της απορρόφησης του TNF ήταν ακόμα μεγαλύτερη μετά το πέρας χρονικού διαστήματος της τάξης των δυο ωρών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει αλλαγές στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην περιοχή των τυροσινών στις οποίες οφείλεται κατά κύριο λόγο το σήμα φθορισμού του TNF.



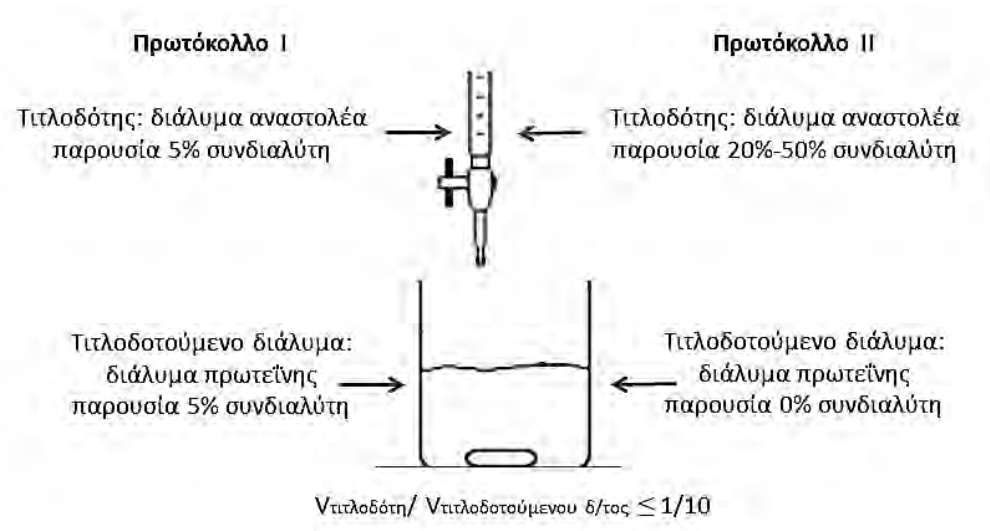
**Εικόνα 3.24.** Μέτρηση απορρόφησης (μήκος κύματος 280 nm) και έντασης φθορισμού παρουσία 1% cremophor σε ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM φωσφορικών/ κιτρικού, pH 6,5) χωρίς πρωτεΐνη (α, γ) και παρουσία TNF (β, δ).

Η παραπάνω μελέτη έδειξε ότι το cremophor είναι ακατάλληλο για χρήση ως συνδιαλύτης καθώς επιδρά στην πρωτεΐνη ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως 0.25% (Εικόνα 3.24 δ). Η διαπίστωση αυτή ήταν ιδιαίτερης σημασίας, καθώς οδήγησε στον αποκλεισμό του cremophor από τη χρήση του στα επόμενα πειράματα που αφορούν τις *in vitro* βιολογικές δοκιμές. Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε η διεξαγωγή λανθασμένων συμπερασμάτων για τη δραστικότητα των ουσιών που επρόκειτο να μετρηθούν με τον συγκεκριμένο συνδιαλύτη.

Δημιουργήθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο τιτλοδότησης (Εικόνα 3.25, Πρωτόκολλο II) όπου ο συνδιαλύτης προστίθεται μόνο στο διάλυμα του τιτλοδότη (δηλ. του πιθανού αναστολέα) ενώ στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα (δηλ. αυτό της πρωτεΐνης) απουσιάζει πλήρως. Με τον τρόπο αυτό καθώς γίνεται η τιτλοδότηση, εκτός από τον συνδιαλύτη και η πρωτεΐνη του τιτλοδοτούμενου διαλύματος ενισχύει τη διαλυτότητα του αναστολέα. Έτσι αν και η συγκέντρωση του συνδιαλύτη στο τελικό διάλυμα είναι πολύ μικρότερη από ό,τι στο πυκνό διάλυμα, η διαλυτότητα του αναστολέα στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα μπορεί να αυξηθεί. Στο τέλος της τιτλοδότησης η συγκέντρωση του συνδιαλύτη στο διάλυμα της πρωτεΐνης βρίσκεται σε χαμηλά ποσοστά (DMSO  $\leq 5\%$  και  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη  $\leq 2\%$ ) που φαίνεται να είναι ανεκτά για την πρωτεΐνη καθώς δεν μεταβάλλουν σημαντικά το  $K_d$  (Πίνακας 3.1).

Όσο αφορά τη  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη, φαίνεται ότι σε ποσοστό 5% ασκεί σημαντική επίδραση στο  $K_d$  του SPD304 το οποίο μειώνει κατά τουλάχιστον τέσσερις φορές (από 5.36  $\mu\text{M}$  σε  $>20 \mu\text{M}$ ). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να συνδέεται τόσο με τη μετουσίωση της πρωτεΐνης όσο και με την αδυναμία απεγκλωβισμού των πιθανών αναστολέων από το σύμπλοκο με τη  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη λόγω του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου. Η τροποποίηση του πρωτοκόλλου των βιολογικών δοκιμών επέτρεψε την αύξηση της συγκέντρωσης του συνδιαλύτη στο διάλυμα

του πιθανού αναστολέα σε έως και 50%. Στην περίπτωση της β-κυκλοδεξτρίνης με το πρωτόκολλο II φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται η δράση του αναστολέα καθώς το  $K_d$  που μετρήθηκε για το SPD304 είναι πολύ κοντά σε αυτό που είχε ήδη μετρηθεί με το πρωτόκολλο I (5.96  $\mu\text{M}$  και 5.36  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα, Πίνακας 3.1).



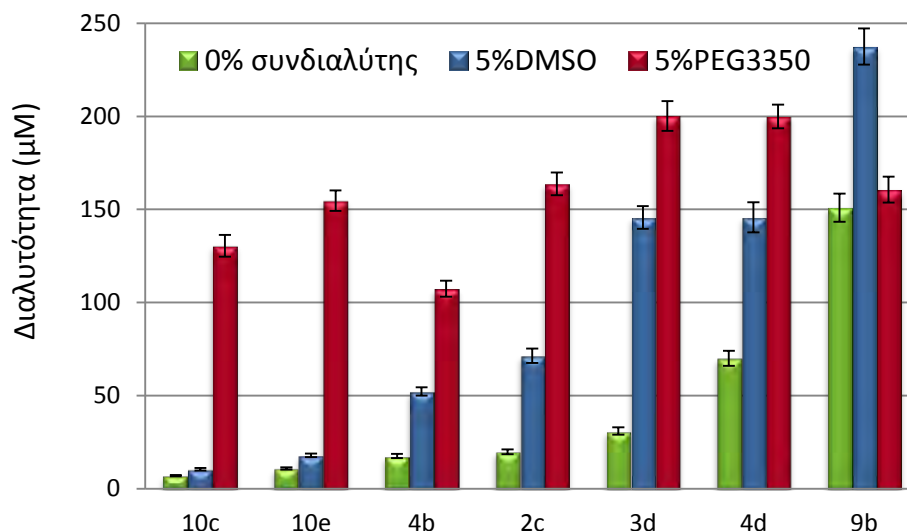
**Εικόνα 3.25.** Πρωτόκολλα μέτρησης  $K_d$  με φασματοσκοπία φθορισμού. Στο πρωτόκολλο I προστίθεται 5% συνδιαλύτης τόσο στον τιτλοδότη (διάλυμα αναστολέα) όσο και στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα (διάλυμα πρωτεΐνης). Στο πρωτόκολλο II προστίθεται συνδιαλύτης μόνο στον τιτλοδότη, σε ποσοστό 20 – 50%.

### 3.2.2.3 Μελέτη ενίσχυσης της διαλυτότητας με προσθήκη συνδιαλυτών

Διερευνήθηκε η επίδραση που έχει η προσθήκη επιλεγμένων συνδιαλυτών (DMSO, PEG3350) στη διαλυτότητα των πιθανών αναστολέων. Οι συγκεντρώσεις συνδιαλύτη που δοκιμάστηκαν είχαν ήδη μελετηθεί και είχε βρεθεί ότι δεν έχουν κάποια επίπτωση ούτε στην πρωτεΐνη ούτε στις βιοχημικές δοκιμές (Πίνακας 3.1). Για να διασαφηνιστεί ο βαθμός στον οποίο οι συνδιαλύτες DMSO και PEG3350 ενισχύουν την διαλυτότητα, επιλέχθηκαν ενώσεις τόσο διαλυτές όσο και αδιάλυτες σε 5% DMSO (**2c**, **3d**, **4b**, **4d**, **9b**, **10c**, **10e**) των οποίων οι τιμές  $\text{clogP}$  κυμαίνονται από 1.97 έως 6.26. Κατόπιν μετρήθηκαν οι



διαλυτότητές τους: α. απουσία συνδιαλύτη (0% συνδιαλύτη), β. σε 5% DMSO και γ. σε 5% PEG3350 (Εικόνα 3.26).



**Εικόνα 3.26.** Μετρήσεις διαλυτότητας α. απουσία συνδιαλύτη, β. παρουσία 5% DMSO και γ. παρουσία 5% PEG3350 σε ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM φωσφορικών/ κιτρικού, pH 6,5).

Συνδιαλύτης	10c	10e	4b	2c	3d	4d	9b
5% DMSO/0% συνδιαλύτη	1.5	11.8	3.0	3.6	4.7	2.1	1.6
5% PEG3350/0% συνδιαλύτη	18.0	14.2	6.1	8.2	6.5	2.8	1.1
5% PEG3350/5% DMSO	12.4	8.6	2.1	2.3	1.4	1.4	0.7

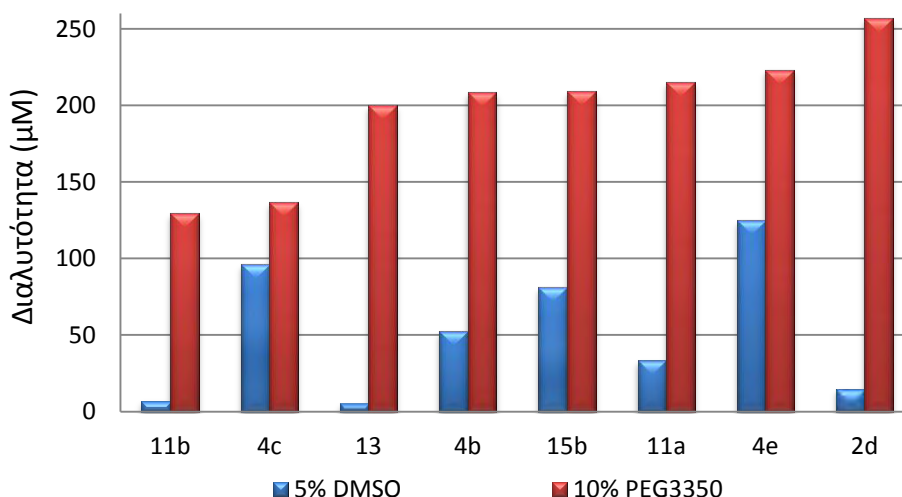
**Πίνακας 3.2.** Αύξηση της διαλυτότητας παρουσία συνδιαλύτη (5% DMSO ή PEG3350) σε σχέση με το καθαρά υδατικό διάλυμα (0% cosolvent).

Η προσθήκη 5% PEG3350 σε σύγκριση με το καθαρά υδατικό διάλυμα (0% συνδιαλύτη) έδειξε μια αξιοσημείωτη αύξηση της διαλυτότητας από 1.1 έως και 18 φορές ενώ η αντίστοιχη αύξηση για το DMSO κυμάνθηκε από 1.4 έως 12.4 φορές (Πίνακας 3.2). Για την ένωση **9b** η προσθήκη 5% PEG3350 δεν επέφερε σημαντική αύξηση της διαλυτότητας και ήταν η μοναδική περίπτωση που το DMSO εμφάνισε μεγαλύτερη διαλυτότητα από την PEG3350 (κατά 1.4 φορές). Για την ένωση **10c** η PEG3350 εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση της διαλυτότητας σε σχέση με την απουσία συνδιαλύτη (κατά 18 φορές) ενώ το

DMSO την μικρότερη (κατά 1.5 φορά). Συνοψίζοντας, στο 87.5% των περιπτώσεων η PEG3350 αποδείχτηκε κατά 86% πιο αποτελεσματική από το DMSO.

Η τάση διαφοροποίησης της διαλυτότητας σε 5% DMSO και απουσία συνδιαλύτη μεταξύ των ενώσεων είναι πολύ παραπλήσια καθώς η σειρά των ενώσεων κατά αυξανόμενη διαλυτότητα είναι η ίδια: **10c<10e<4b<2c<3d<4d<9b**. Αυτή η διαπίστωση θα μπορούσε να οδηγήσει στο εξής συμπέρασμα: αν υποθετικά μια ένωση A είναι πιο διαλυτή στο νερό από μια ένωση B τότε αναμένεται ότι η ένωση A θα είναι πιο διαλυτή από την ένωση B παρουσία DMSO ως συνδιαλύτη. Η αντίστοιχη σειρά για την PEG3350 δεν είναι η ίδια: **4b<10c<10e<9b<2c<4d<3d**. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί βάσει της πολικότητας του DMSO που σαν διαλύτη το κάνει να μοιάζει με το μόριο του νερού περισσότερο σε σχέση με το πιο υδρόφοβο μόριο της PEG3350.

Η σύγκριση δεδομένων κινητικής διαλυτότητας σε 5% DMSO και σε 10% PEG3350 δείχνει -όπως είναι αναμενόμενο βάσει και του προηγούμενου διαγράμματος- μεγάλη αύξηση της διαλυτότητας παρουσία PEG3350 σε σχέση με το DMSO (Εικόνα 3.27). Η διαλυτότητα σε 10% PEG3350 είναι από 1.3 έως 18.7 φορές μεγαλύτερη από ό,τι σε 5% DMSO, ξεπερνώντας κατά πολύ την αντίστοιχη μέγιστη αύξηση (12.4 φορές) κατά τη σύγκριση δεδομένων σε 5% DMSO και 5% PEG3350 (Πίνακας 3.3).



**Εικόνα 3.27.** Μετρήσεις διαλυτότητας παρουσία διαφορετικών συνδιαλυτών (5% DMSO και 10% PEG3350).

Συνδιαλύτης	11b	4c	13	4b	15b	11a	4e	2d
10% PEG3350/5% DMSO	18.7	1.4	37.7	4.0	2.6	6.4	1.8	17.5

**Πίνακας 3.3.** Σύγκριση διαλυτοτήτων παρουσία διαφορετικών συνδιαλυτών (5% DMSO, 10% PEG3350).

Για όλες τις παραπάνω ενώσεις έγινε σύγκριση κάποιων βασικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων: μοριακού βάρους (MB), clogP, logD, HBD, HBA, τοπολογικού εμβαδού πολικής επιφάνειας μορίων (topological Polar Surface Area, tPSA), αριθμού περιστροφικών δεσμών (Rotational Bonds, RB) (Εικόνες 3.26, 3.27). Για τον σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν δυο ομάδες που περιλάμβαναν αφενός τις ενώσεις για τις οποίες παρατηρείται η μεγαλύτερη αύξηση της διαλυτότητας παρουσία 5% και 10% PEG3350 (**2d**, **10c**, **10e**, **11b**, **13**) και αφετέρου εκείνες που παρουσιάζουν τη μικρότερη αύξηση (**3d**, **4c**, **2c**, **4d**, **4e**, **9b**) σε σχέση πάντα με το DMSO 5%. Όπως δείχνουν τα δεδομένα του Πίνακα 3.4 η πρώτη ομάδα παρουσιάζει πιο υδρόφοβο χαρακτήρα από τη δεύτερη με σαφώς αυξημένους μέσους όρους clogP, logD καθώς και μειωμένη πολικότητα βάσει του HBA και του tPSA. Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η PEG3350 είναι πιο αποτελεσματική από το DMSO στη διάλυση μικρών υδρόφοβων μορίων με χαμηλή πολικότητα.

Ένωση	M.B.	cLogP	LogD	HBD	HBA	tPSA	RB
3d	492.5	2.69	2.97	2	8	97.35	3
4c	588.6	3.03	2.96	0	12	163.2	8
2c	575.6	5.12	5.88	0	7	71.33	7
4d	586.6	2.7	2.79	0	9	114.37	5
4e	556.6	1.72	2.02	2	10	140.49	4
9b	384.4	2.29	2.15	1	8	133.48	3
<b>Μέσος όρος</b>	<b>530.7</b>	<b>2.925</b>	<b>3.128</b>	<b>0.833</b>	<b>9</b>	<b>120.04</b>	<b>5</b>
2d	573.6	4.87	5.71	0	7	70.16	4
10c	513.6	6.26	5.86	0	4	27.96	5
10e	463.5	5.26	4.85	0	4	27.96	5
11b	525.6	4.65	4.52	2	7	105.65	9
13	608.6	4.63	5.37	2	8	97.35	4
<b>Μέσος όρος</b>	<b>537.0</b>	<b>5.134</b>	<b>5.262</b>	<b>0.8</b>	<b>6</b>	<b>65.82</b>	<b>5.4</b>

**Πίνακας 3.4.** Πίνακας φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ουσιών για τις οποίες μετρήθηκε η διαλυτότητα σε 5% και 10% PEG3350 (Εικόνες 3.26, 3.27).

### 3.2.2.3.1 Συσχέτιση δεδομένων διαλυτότητας σε 5% PEG3350 με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

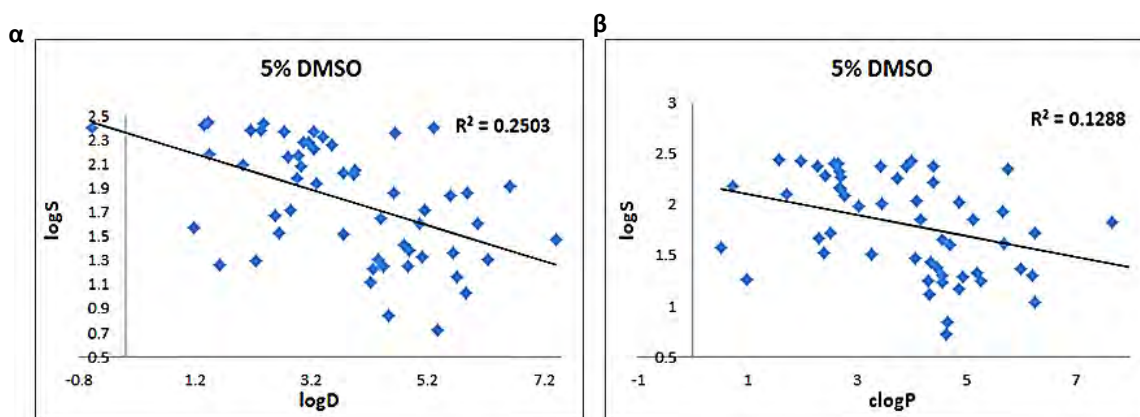
Βάσει των παραπάνω δεδομένων σε 5% PEG3350 και 0% συνδιαλύτη (Εικόνα 3.26) δημιουργήθηκε μια καμπύλη συσχέτισης (Εικόνα 3.29). Στην εξίσωση της καμπύλης έχει συσχετισθεί η διαλυτότητα σε 5% PEG3350 και στο ρυθμιστικό διάλυμα (0% συνδιαλύτη) με τον υπολογισμένο λογάριθμο του συντελεστή κατανομής  $\log D$  και τον αριθμό των περιστροφικών δεσμών (RB). Ο υπολογισμός αυτών των ιδιοτήτων βασίζεται στη δομή των ουσιών. Είναι γνωστό ότι η λιποφιλικότητα, ως μέτρο της οποίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε το  $\log D$  είτε το  $\log P$ , συνδέεται με την υδατική διαλυτότητα. Επίσης είναι σύνηθες ο αριθμός των περιστροφικών δεσμών να χρησιμοποιείται στη συσχέτιση δομής και ιδιοτήτων για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης της υδατοδιαλυτότητας ενώσεων (Chen et al., 2017).

Για τη συσχέτιση των τιμών διαλυτότητας με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά διερευνήθηκε η συσχέτιση των τιμών διαλυτότητας σε 5% PEG3350 με το  $\log^2 D$  η οποία όμως ήταν πολύ χαμηλή ( $R^2:0.072$ ), οπότε εξετάσθηκε το κλάσμα των διαλυτοτήτων σε 5%

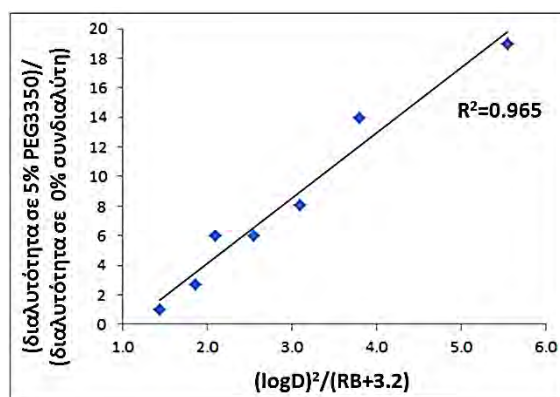
PEG3350/0% συνδιαλύτη (I). Το κλάσμα (I) περιλαμβάνει περισσότερα πειραματικά δεδομένα και παρουσιάζει ομοιότητες με το  $\log D$ . Μάλιστα η συσχέτιση ανάμεσα στο κλάσμα (I) και στο  $\log^2 D$  είναι  $R^2:0.64$ . Ωστόσο σε αυτή τη συσχέτιση μια ένωση (**2c**) απέχει πολύ από την καμπύλη. Μια βασική διαφορά στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ένωσης αυτής σε σχέση με τις υπόλοιπες -τις οποίες η καμπύλη προσομοίωνε πολύ καλύτερα- είναι ο αρκετά μεγαλύτερος αριθμός περιστροφικών δεσμών. Για τις περισσότερες ενώσεις ο αριθμός περιστροφικών δεσμών κυμαίνεται από 0 έως 3 ενώ η συγκεκριμένη ένωση έχει 8. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι ο αριθμός των περιστροφικών δεσμών είναι αντιστρόφως ανάλογος με το κλάσμα των διαλυτοτήτων, οπότε η μεταβλητή  $x$  άλλαξε σε  $\log^2 D / (RB)$ . Καθώς ο αριθμός των περιστροφικών δεσμών δεν μπορεί να μηδενιστεί, το κλάσμα  $\log^2 D / (RB)$  μετατράπηκε σε  $\log^2 D / (RB+A)$ , όπου  $A$  κάποιος θετικός αριθμός. Για τον ορισμό του  $A$  έγιναν μερικές δοκιμές με αριθμούς από το 1 έως το 10 και ο αριθμός που έδωσε την καλύτερη συσχέτιση ήταν το 3.2. Επομένως η τελική εξίσωση ήταν:

$$\text{Error! Digit expected.} = \frac{\log^2 D}{RB+3.2}$$

Να σημειωθεί ότι στα SPD304 ανάλογα η γραμμική συσχέτιση του λογαρίθμου της πειραματικής διαλυτότητας σε 5% DMSO ( $\log S$ ) με τις υπολογισμένες τιμές των  $\log D$  σε pH 6.5 και  $\text{clogP}$  ήταν πολύ χαμηλή (Εικόνα 3.28).



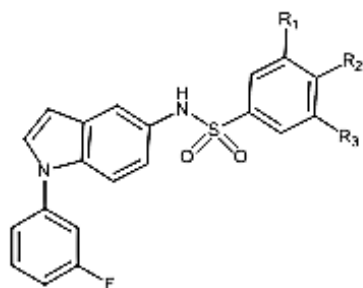
**Εικόνα 3.28.** Γραμμική συσχέτιση της πειραματικής διαλυτότητας σε 5% DMSO ( $\log S$ ) με τις υπολογισμένες τιμές των: **α.**  $\log D$  σε pH 6.5 και **β.**  $\text{clogP}$ .



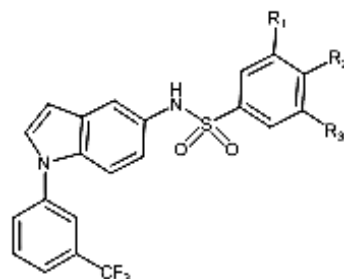
**Εικόνα 3.29.** Συσχέτιση του κλάσματος της πειραματικής διαλυτότητας σε 5% v/v PEG3350 και 0% συνδιαλύτη προς  $\log^2 D/(RB+3.2)$ . Ο υψηλός συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2=0.965$ ) υποδεικνύει ισχυρή συσχέτιση με τις υπολογισμένες τιμές  $\log D$  και τον αριθμό περιστροφικών δεσμών (RB) των ενώσεων (Πίνακας 3.4). Το κλάσμα των διαλυτοτήτων (5% PEG3350)/(0% συνδιαλύτη) είναι ανάλογο του τετραγώνου της λιποφιλικότητας ( $\log^2 D$ ) και αντιστρόφως ανάλογο προς το άθροισμα ( $RB+3.2$ ).

#### 3.2.2.4 Μελέτη ενίσχυσης της διαλυτότητας μέσω εγκλωβισμού με $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη

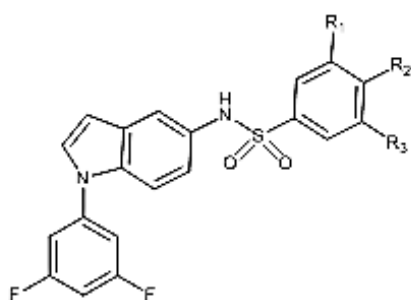
Προκαταρκτικές απόπειρες μέτρησης της διαλυτότητας έδειξαν ότι οι ενώσεις **18a-i**, **19a-f** (τελευταία σειρά αναλόγων του SPD304, Εικόνα 3.18), **D1-10**, **E1-E10** και **F1-F10** (Εικόνα 3.30) ήταν εξαιρετικά αδιάλυτες σε DMSO. Για τον λόγο αυτό αρχικά δοκιμάστηκαν και άλλοι συνδιαλύτες από τους οποίους ξεχώρισε η  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη (Εικόνα 3.31). Στα προκαταρκτικά αυτά δεδομένα μετρήθηκε η θερμοδυναμική και όχι η κινητική διαλυτότητα καθώς δεν ήταν δυνατή η παρασκευή μητρικών (stock) διαλυμάτων των πιθανών αναστολέων σε DMSO, PEG3350 ή γλυκερόλη λόγω της χαμηλής τους διαλυτότητας.



D1: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: NO<sub>2</sub>  
 D2: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>  
 D3: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H  
 D4: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: F  
 D5: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: F, R<sub>2</sub>: H  
 D6: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: F  
 D7: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: CN  
 D8: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: -OCH<sub>3</sub>  
 D9: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: CF<sub>3</sub>  
 D10: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: H

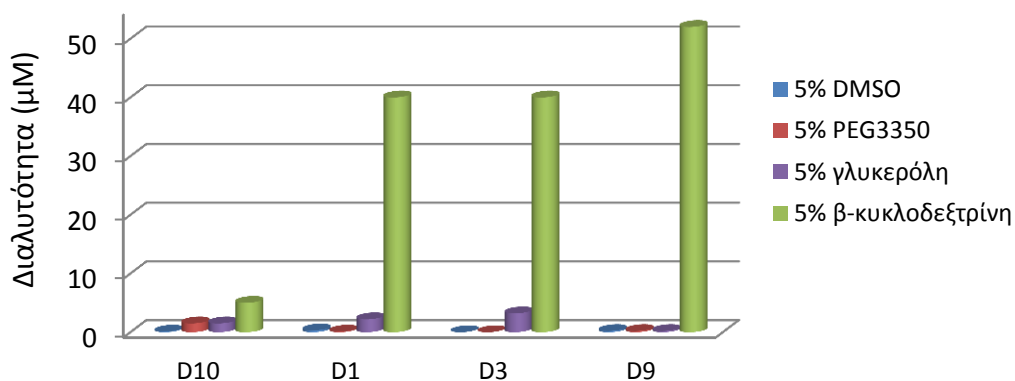


E1: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: NO<sub>2</sub>  
 E2: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>  
 E3: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H  
 E4: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: F  
 E5: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: F, R<sub>2</sub>: H  
 E6: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: F  
 E7: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: CN  
 E8: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: -OCH<sub>3</sub>  
 E9: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: CF<sub>3</sub>  
 E10: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: H



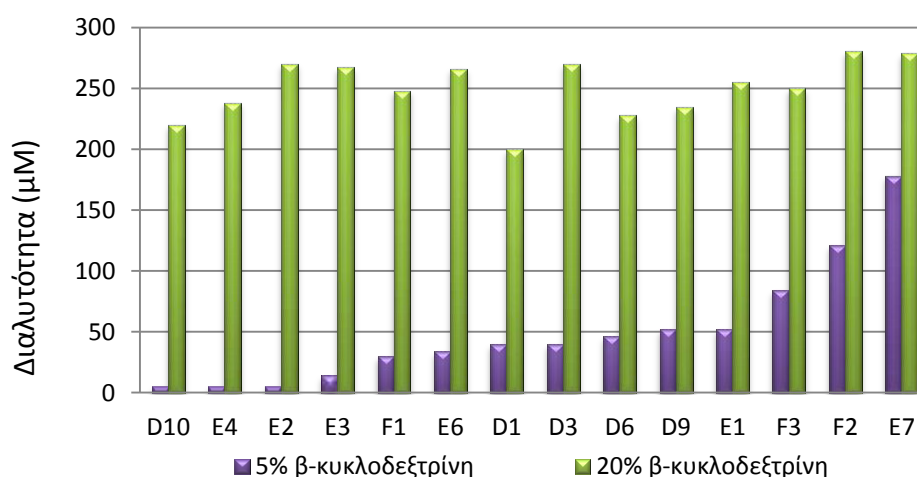
F1 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: NO<sub>2</sub>  
 F2 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>  
 F3 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: H  
 F4 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: F  
 F5 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: F, R<sub>2</sub>: H  
 F6 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: F  
 F7 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: CN  
 F8 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: H, R<sub>2</sub>: -OCH<sub>3</sub>  
 F9 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: CF<sub>3</sub>  
 F10 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>: CF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: H

Εικόνα 3.30. Δομές D, E και F σειρών πιθανών αναστολέων.



Εικόνα 3.31. Διαλυτότητες μετρημένες σε διαφορετικούς συνδυασμούς βάσει του πρωτοκόλλου της θερμοδυναμικής διαλυτότητας.

Ακολούθησε μια σειρά μετρήσεων θερμοδυναμικής διαλυτότητας σε 5% β-κυκλοδεξτρίνη (Εικόνα 3.32). Οι μετρήσεις έδειξαν ότι η β-κυκλοδεξτρίνη είναι ένας αρκετά αποτελεσματικός συνδιαλύτης. Έτσι μετρήθηκε η κινητική διαλυτότητα -το πρωτόκολλο της οποίας ακολουθείται πάντα κατά την προετοιμασία των ενώσεων για τις μετρήσεις πρόσδεσης με φασματοσκοπία φθορισμού- σε 20% β-κυκλοδεξτρίνη (ποσοστό συμβατό με τις βιολογικές δοκιμές- πρωτόκολλο II) και τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα η διαλυτότητα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ξεπέρασε τα 200 μM (Εικόνα 3.32) οπότε ήταν αρκετή για να επιτευχθεί μια συγκέντρωση της τάξης των 20 μM στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα μετά το πέρας της τιτλοδότησης.

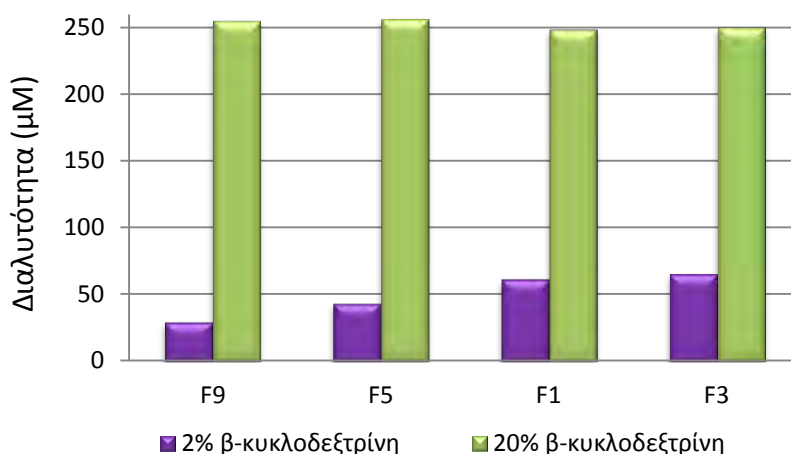


**Εικόνα 3.32.** Θερμοδυναμική διαλυτότητα σε 5% β-κυκλοδεξτρίνη και κινητική διαλυτότητα σε 20% β-κυκλοδεξτρίνη.

Επίσης μετρήθηκε ενδεικτικά για κάποιες ενώσεις η κινητική διαλυτότητα σε 2% β-κυκλοδεξτρίνη (Εικόνα 3.33) η οποία είναι κατά προσέγγιση η μέγιστη συγκέντρωσή της στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα κατά το τέλος της τιτλοδότησης στις μελέτες πρόσδεσης, βάσει του πρωτοκόλλου II (Εικόνα 3.25). Τα αποτελέσματα αυτά παρείχαν μια ένδειξη για την πιθανότητα που έχουν οι τιτλοδοτούμενες ενώσεις να κατακρημνιστούν κατά την πορεία της τιτλοδότησης. Σκοπός σε όλες τις περιπτώσεις είναι η διαλυτότητα του αναστολέα στον



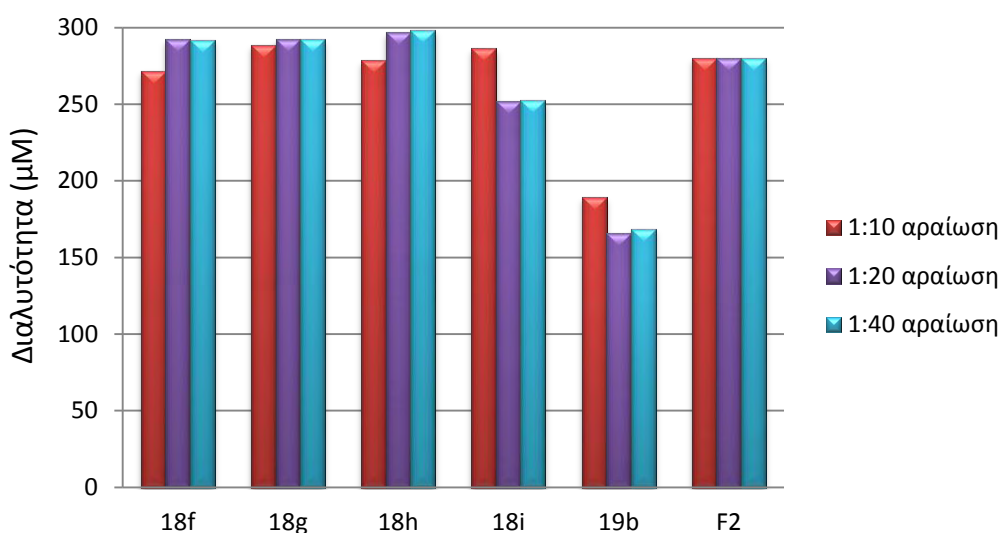
τιτλοδοτή να φτάσει περίπου σε 150  $\mu\text{M}$  και συνεπώς σε 15-20  $\mu\text{M}$  στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα κατά το τέλος της τιτλοδότησης. Ο σκοπός αυτός φαίνεται να επιτεύχθηκε καθώς οι μετρούμενες διαλυτότητες ξεπέρασαν τη συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$  (Εικόνα 3.33).



**Εικόνα 3.33.** Μετρήσεις διαλυτότητας σε 10 mM φωσφορικών/κιτρικών pH 6.5, παρουσία 2% και 20%  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης.

Καθώς η  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη έχει τη δυνατότητα να εγκλωβίζει μικρά μόρια, πριν τη μέτρηση της διαλυτότητας σε διάλυμα 20%  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης, διερευνήθηκε η απελευθέρωση των εγκλωβισμένων μορίων. Όπως προαναφέρθηκε ο βασικός τρόπος για να απελευθερωθεί η εγκλωβισμένη ουσία από το σύμπλοκο με  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη είναι η αραιώση του διαλύματος (Valle, 2003). Σε αυτές τις δοκιμές, για να αποφευχθεί η κατακρήμνιση των ουσιών, η αραιώση δεν έγινε με κάποιο υδατικό διάλυμα αλλά με μεθανόλη όπου όλες οι ουσίες είναι διαλυτές -ακόμα και σε συγκεντρώσεις της τάξεως των mM- έτσι ώστε η ουσία που απελευθερώνεται να παραμένει διαλυτή. Για τον σκοπό αυτό τα προς μέτρηση διαλύματα αραιώθηκαν με μεθανόλη κατά 1:10, 1:20, 1:40 πριν τη μέτρηση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.34 δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στη μετρούμενη διαλυτότητα ανάμεσα στις διαφορετικές αραιώσεις επομένως η αραιώση που επιλέχθηκε ήταν η 1:10. Όσο αφορά τις

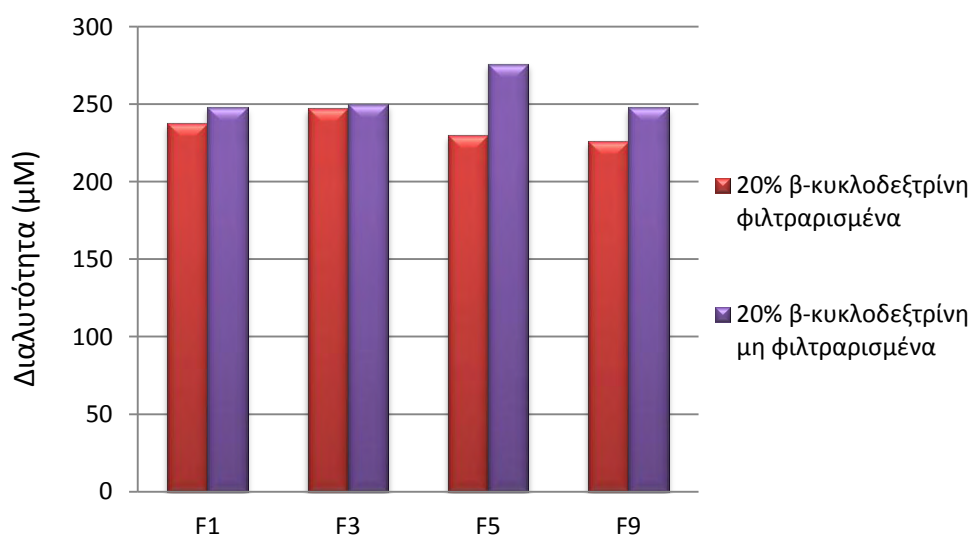
μελέτες πρόσδεσης, δεν χρειάστηκε να γίνουν αντίστοιχες δοκιμές καθώς κατά την τιτλοδότηση του πιθανού αναστολέα στην πρωτεΐνη η αραιώση είναι μεγαλύτερη από 1:10 οπότε είναι δυνατός ο απεγκλωβισμός των πιθανών αναστολέων. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η διάσπαση των συμπλόκων της β-κυκλοδεξτρίνης μπορεί να συμβεί πολύ γρήγορα αυξάνοντας τον αριθμό των μορίων νερού στο περιβάλλον διάλυμα, μια διαδικασία που συμβαίνει κατά την τιτλοδότηση του διαλύματος της β-κυκλοδεξτρίνης στο άνευ συνδιαλυτή πρωτεϊνικό διάλυμα (Valle, 2003).



**Εικόνα 3.34.** Δοκιμές αραιώσης των προς μέτρηση διαλυμάτων σε 20% β-κυκλοδεξτρίνη με μεθανόλη για να απελευθερωθούν πιθανά εγκλωβισμένα μόρια αναστολέα.

Περαιτέρω δοκιμές οι οποίες συμπεριλάμβαναν φιλτράρισμα με φίλτρα 0.22 μm (Εικόνα 3.35) δεν έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση της διαλυτότητας. Επομένως υπό τις συνθήκες μέτρησης δεν υφίστανται σύμπλοκα μεγαλύτερα των 0.22 μm. Όλα τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση της δράσης των πιθανών αναστολέων λόγω της παρουσίας β-κυκλοδεξτρίνης. Το γεγονός αυτό εξηγείται και από τον μηχανισμό του εγκλωβισμού μορίων στην υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης που

κατευθύνεται από την απελευθέρωση μορίων νερού υψηλής ενθαλπίας από την κοιλότητα (Valle, 2003). Τα μόρια νερού εκτοπίζονται από τα πιο υδρόφοβα ξενιζόμενα μόρια (guest molecules) του αναστολέα που υπάρχουν στο διάλυμα για να επιτύχουν μια αλληλεπίδραση μεταξύ μη πολικών περιοχών και τη μείωση της τάσης διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) καταλήγοντας έτσι σε μια πιο σταθερή, χαμηλότερη ενεργειακά κατάσταση (Szejtli, 1998).



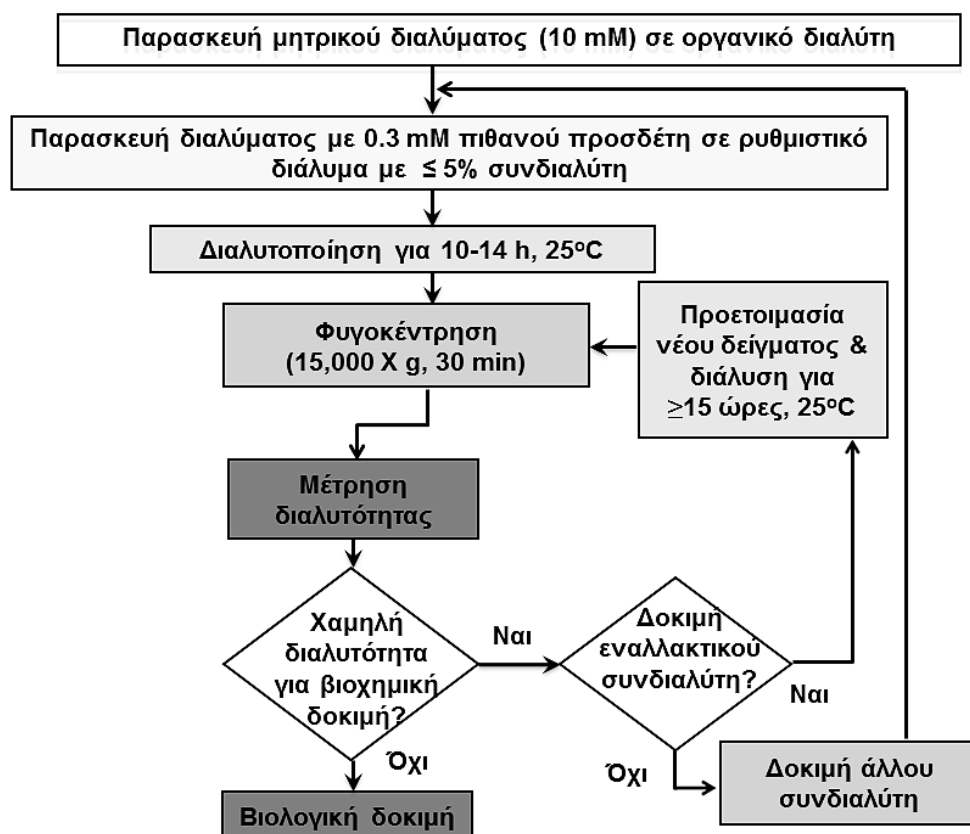
**Εικόνα 3.35.** Μελέτη επίδρασης φιλτραρίσματος (με φίλτρα 0.22 μm) στη μέτρηση της συγκέντρωσης πιθανών αναστολέων σε διάλυμα με 20% β-κυκλοδεξτρίνη

Στο τέλος της τιτλοδότησης γινόταν πάντα οπτικός έλεγχος για κατακρημνισμένη ουσία και αν χρειαζόταν ακολουθούσε φυγοκέντρηση του τιτλοδοτούμενου διαλύματος, επαναδιάλυση της αδιάλυτης φάσης σε μεθανόλη και μέτρηση στο  $\lambda_{\max}$  της ένωσης. Ωστόσο η μέτρηση αυτή δεν έδωσε ποτέ σημαντική απορρόφηση ( $>0.1$ ).

### 3.2.3 Πρωτόκολλο διάλυσης μικρών οργανικών μορίων με τάση προς υδροφοβικότητα

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο διάλυσης παρουσία 5% DMSO που συνίσταται για τη μέτρηση της υδατικής διαλυτότητας μικρών μορίων με τάση προς υδροφοβικότητα (Εικόνα 3.36, Mettou et al., 2017). Το πρωτόκολλο αυτό είναι χρήσιμο για την επαρκή για βιολογικές δοκιμές διάλυση μικρών οργανικών μορίων (μοριακό βάρος  $\leq 700$ ) παρόμοιων ή και διαφορετικών από το SPD304. Επίσης, είναι προσαρμοσμένο στις *in vitro* βιοχημικές δοκιμές φασματοσκοπίας φθορισμού καθώς και στις διαθέσιμες ποσότητες που συχνά ήταν αρκετά μικρές (περίπου 1 mg).

Τα προτεινόμενα βήματα για την αύξηση της διαλυτότητας των μικρών μορίων για μια επιτυχή βιολογική δοκιμή είναι: α. δημιουργία ενός μητρικού διαλύματος (τουλάχιστον 6 mM) σε καθαρό διαλύτη ή στην περίπτωση του DMSO: 90% DMSO/ 10% νερό, β. προετοιμασία του τελικού δείγματος με 0.3 mM πιθανού προσδέτη σε 10 mM φωσφορικών/ κιτρικών pH 6.5 και μέγιστη συγκέντρωση συνδιαλύτη 5% (βλ. «Μέτρηση κινητικής διαλυτότητας», Υλικά και μέθοδοι) και γ. διάλυση της ένωσης για 10-14 ώρες υπό ανάδευση. Σε περίπτωση που μετά από αυτή τη διαδικασία η ένωση δεν είναι αρκετά διαλυτή για την βιολογική δοκιμή της, τότε μπορεί εναλλακτικά να χρησιμοποιηθεί κάποιος άλλος κατάλληλος συνδιαλύτης όπως γλυκερόλη, DMSO ή PEG3350 (Paraneophytou et al., 2013). Για τον ίδιο λόγο μπορεί να δοκιμασθεί μεγαλύτερος χρόνος διάλυσης όπως 15-19 ώρες ή και παραπάνω εάν χρειαστεί.

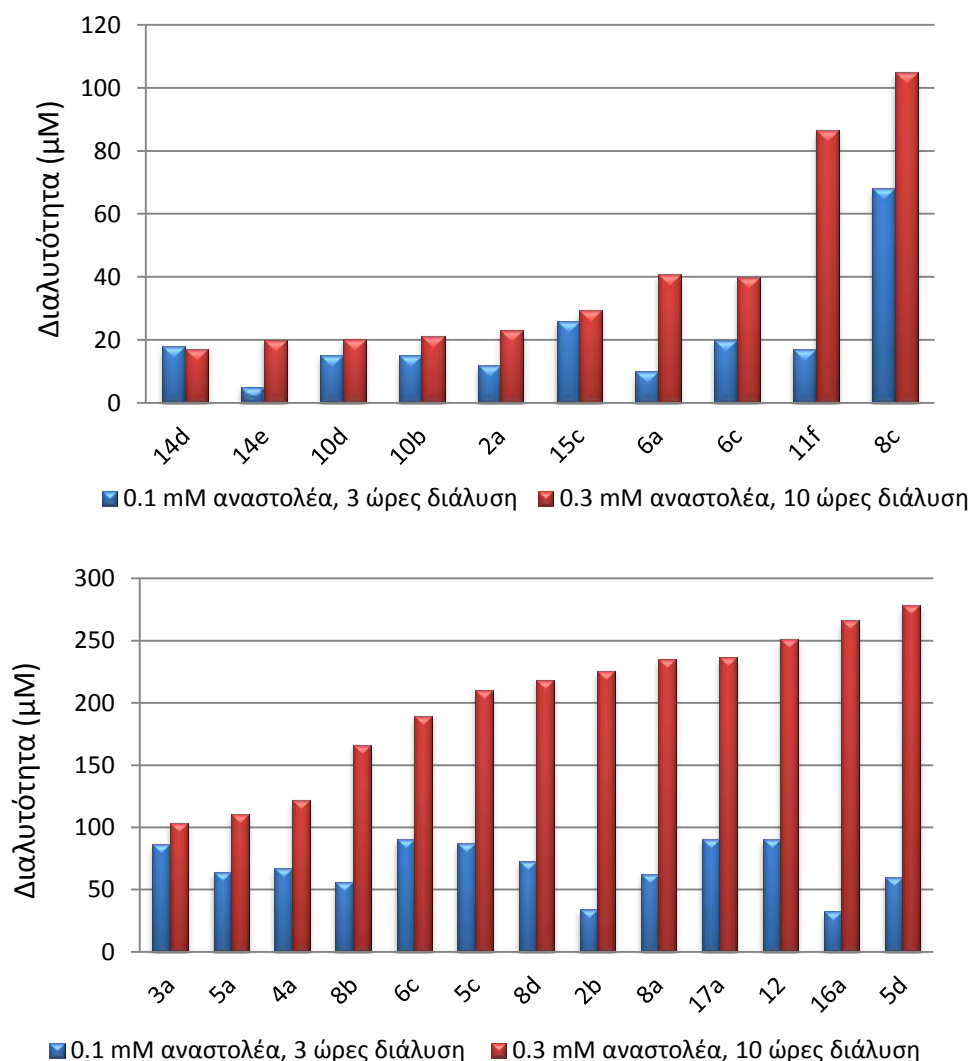


**Εικόνα 3.36.** Πρωτόκολλο διάλυσης μικρών μορίων παρουσία συνδιαλύτη για χρήση σε βιολογικές δοκιμές.

Η θερμοκρασία στην οποία έγιναν οι μετρήσεις διαλυτότητας ήταν οι 25°C, η ίδια δηλαδή με αυτή των δοκιμών φασματοσκοπίας φθορισμού. Γενικά η *in vitro* βιολογική δοκιμή που ίσως ακολουθήσει μετά τη μέτρηση της διαλυτότητας, μπορεί να βασίζεται σε φασματοσκοπία (είτε υπεριώδους είτε φθορισμού), σε θερμοδομετρία ισόθερμης τιλοδότησης ή σε οποιαδήποτε άλλη μέθοδο όπου η χρήση του επιλεγμένου συνδιαλύτη δεν εμφανίζει επιπλοκές. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το προτεινόμενο ποσοστό συνδιαλύτη (έως 5%) αφορά κατά βάσει *in vitro* δοκιμές και θα πρέπει να προσαρμόζεται αναλόγως στην εκάστοτε βιολογική μέθοδο. Για παράδειγμα σε μερικές κυτταρικές δοκιμές το ανεκτό ποσοστό συνδιαλύτη (για παράδειγμα PEG) μπορεί να μην υπερβαίνει το 1-2% (Takahashi et al., 2002). Έτσι θα ήταν λογικό να γίνουν κάποιες προκαταρκτικές δοκιμές με μια ή περισσότερες ήδη μελετημένες ενώσεις που

θα χρησιμοποιηθούν σαν ενώσεις αναφοράς και θα αποτελούν το κριτήριο για την καταλληλότητα κάποιου συνδιαλύτη για συγκεκριμένα κυτταρικά μοντέλα (Ingels and Augustijns, 2003).

Η συγκέντρωση του αναστολέα που δοκιμάστηκε ήταν 0.3 mM οπότε η κατανάλωση ήταν αρκετά μικρή (~0.5 mg,  $V_{\text{δείγματος}}$ : 1 mL). Για αρκετούς αναστολείς δοκιμάστηκε αρχικά ένα πρωτόκολλο με μικρότερη συγκέντρωση (0.1 mM) και συντομότερη διάλυση (3 ώρες) που έδωσε σημαντικά χαμηλότερες διαλυτότητες (Εικόνα 3.37). Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η συγκέντρωση 0.3 mM ήταν αρκετή για να δημιουργηθεί ένα διάλυμα κορεσμένο σε πιθανό αναστολέα.



**Εικόνα 3.37.** Σύγκριση διαλυτότητων σε 5% DMSO μετρημένων με διαφορετικά πρωτόκολλα διάλυσης.

### 3.2.4 Πρωτόκολλο μέτρησης υδατικής διαλυτότητας μικρών οργανικών μορίων που απορροφούν στο υπεριώδες

Αναπτύχθηκε μια απλή και γρήγορη μέθοδος για τη μέτρηση της διαλυτότητας σε υδατικά διαλύματα με χαμηλή συγκέντρωση συνδιαλύτη (<10% v/v) χωρίς τη χρήση HPLC (Paraneophytou et al., 2013). Η μέθοδος αυτή στηρίχθηκε στη φασματοσκοπία υπεριώδους καθώς μετρήθηκε η μέγιστη απορρόφηση στο φάσμα του υπεριώδους ( $\lambda_{max}$ ) των ουσιών (βλ. Υλικά και μέθοδοι).

Ένα βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η μέτρηση τόσο του διαλυτού όσο και του αδιάλυτου κλάσματος του κάθε δείγματος. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε αν θέλουμε να ελέγξουμε εάν οι υπολογισμοί μας είναι σωστοί καθώς το άθροισμα της μάζας της ουσίας στην διαλυτή και την αδιάλυτη φάση θα πρέπει να δίνει τη συνολική μάζα της ουσίας που προστέθηκε αρχικά στο διάλυμα. Επειδή λαμβάνεται υπόψη και η απορρόφηση της κατακρημνισμένης ουσίας, η συγκεκριμένη προσέγγιση είναι πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις ουσιών εξαιρετικά αδιάλυτων ή/και με μικρό συντελεστή απορρόφησης όπου η απορρόφηση στο υπεριώδες θα πλησίαζε τα όρια μέτρησης του φωτόμετρου. Το βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ενώσεις που δεν φέρουν τις κατάλληλες χρωμοφόρες ομάδες.

### 3.2.5 Δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης υδατικής διαλυτότητας παρουσία 5% DMSO

Η χαμηλή συσχέτιση ανάμεσα στα πειραματικά  $\log S$  και τα *in silico* υπολογισμένα  $\log D$  και  $\text{clog}P$  δεδομένα (Εικόνα 3.25), η οποία ήδη έχει τονιστεί στη βιβλιογραφία (Pinsuwan et al., 1995), οδήγησε στην ανάπτυξη ενός επικυρωμένου QSPR μοντέλου (Novamechanics) το οποίο βασίζεται σε δεδομένα και ευρήματα της παρούσας εργασίας. Ο στόχος ήταν να γίνει

διαχωρισμός των διαλυτών ουσιών από τις λιγότερο διαλυτές. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων δημιουργήθηκαν συνολικά δυο κατηγορίες («διαλυτές» και «αδιάλυτες» ενώσεις) έτσι ώστε κάθε κατηγορία να περιλαμβάνει περισσότερα δεδομένα. Οι οριακές τιμές των διαλυτοτήτων των δυο κατηγοριών ορίστηκαν στα 5.3 - 52.3  $\mu\text{M}$  για τις αδιάλυτες ενώσεις και 68 - 278.5  $\mu\text{M}$  για τις διαλυτές ενώσεις. Τα όρια αυτά τέθηκαν βάσει των αναγκών τόσο των βιολογικών δοκιμών (στην προκειμένη περίπτωση χρειάζεται η διαλυτότητα να φτάνει τουλάχιστον τα 50  $\mu\text{M}$ ) όσο και του μοντέλου πρόβλεψης.

### 3.3 Μελέτες πρόσδεσης με φασματοσκοπία φθορισμού

Οι μελέτες πρόσδεσης της πρωτεΐνης TNF αφορούν δυνητικούς προσδέτες που συντέθηκαν από την εταιρία ProActina στα πλαίσια του προγράμματος RLead. Η διαδικασία της ανακάλυψης και ανάπτυξης είχε τις ακόλουθες κατευθύνσεις: i) τη βελτιστοποίηση της ικανότητας πρόσδεσης και ii) τη μείωση της τοξικότητας των ουσιών-αναλόγων της ένωσης SPD304 καθώς και iii) την ανακάλυψη νέων χημικών μορίων οδηγών που να διαφέρουν δομικά από το SPD304 και να στοχεύουν τις πρωτεΐνες TNF και RANKL. Τα αποτελέσματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν εκτός των άλλων και για ανατροφοδότηση των σχεδιαστικών προγραμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον *in silico* σχεδιασμό των δυνητικών προσδετών.

Ο σχεδιασμός και η μελέτη των αναλόγων του SPD304 περιλάμβανε τη μείωση των χημικών ομάδων (μεθυλομάδων) που προκαλούν τοξικότητα διατηρώντας παράλληλα τη συγγένεια πρόσδεσης στον TNF. Με αυτό το σκεπτικό έγινε αντικατάσταση των μεθυλομάδων με καρβονυλομάδες μετατρέποντας τη διαμίνη σε διαμίδιο. Η εισαγωγή δεκτών ηλεκτρονίων μπορεί να μειώσει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του ινδολίου του SPD304 τόσο όσο χρειάζεται για να



αποσταθεροποιηθούν τα ήδη ηλεκτρονιακά πτωκά μεθυλενο-ινδολικά ενδιάμεσα. Για τον λόγο αυτό σε κάποιες υποκατηγορίες αναλόγων έχει εισαχθεί μια σουλφονυλική ομάδα ανάμεσα στο ινδόλιο και τον αρωματικό υποκαταστάτη. Επίσης, σε κάποια ανάλογα έχει αφαιρεθεί η μία ή και οι δυο μεθυλομάδες από τη χρωμόνη οι οποίες αποτελούν ενεργές ομάδες για βιομετασχηματισμό. Οι μελέτες docking έδειξαν ότι οι ενώσεις που περιέχουν μια συζευγμένη διαμινική γέφυρα εμφανίζουν μικρότερη μεταβλητότητα στη δομή με χαμηλότερο κόστος σε εντροπία λόγω του κλειστού δακτυλίου της πιπεραζίνης. Βάσει αυτής της παρατήρησης επιχειρήθηκε η μείωση της ενέργειας πρόσδεσης των προσδετών με τη σύζευξη της διαμινικής γέφυρας (Alexiou et al., 2014; Papaneophytou et al., 2015).

Η πρώτη σειρά SPD304 αναλόγων περιλάμβανε τις ενώσεις **2a-2e**, **3a-3d**, **4a-4f** και **8a-8e** (Εικόνα 3.38, Πίνακας 3.5). Η σύζευξη της διαμινικής γέφυρας του SPD304 οδήγησε στην ένωση **2a** και μειώνοντας τα 7'-CH<sub>3</sub> της χρωμόνης, με ή χωρίς σύζευξη της διαμινικής γέφυρας, προέκυψαν οι ενώσεις **2e** και **2b** αντίστοιχα. Η αξιολόγηση των ουσιών δείχνει ότι παρόλο που οι ενώσεις **2a** και **2b** παρουσιάζουν χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης, η ένωση **2e** εμφάνισε K<sub>d</sub> κοντά σε αυτό του SPD304. Επίσης έγινε μετατροπή του SPD304 σε διαμιδικά ανάλογα (**2c**, **2d**) με στόχο τη μείωση της τοξικότητας που προκαλεί η μεθυλομάδα. Σε σύγκριση με το SPD304, η ένωση **2c** που φέρει διαμινική γέφυρα εμφάνισε περίπου δυο φορές καλύτερο K<sub>d</sub> ενώ η **2d** που φέρει μια πιπεραζίνη, εμφάνισε παρόμοιο K<sub>d</sub>.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε το αποτέλεσμα της διαφοροποίησης των υποκαταστατών στο ινδόλιο του SPD304 σε καρβονυλικές (**3a-3d**, **4a-4f**) και μη καρβονυλικές (**8a-8e**) ενώσεις. Οι ενώσεις **3a-3d** και **4a-4f** συντέθηκαν για να διαλευκανθεί ο ρόλος της *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδας στα καρβονυλικά αυτά ανάλογα του SPD304 σε συνδυασμό με την απομεθυλίωση της χρωμόνης.

Για κάθε υποκατεστημένη ένωση μελετήθηκε επίσης η επίδραση του δακτυλίου της πιπεραζίνης (ή αλλιώς της συζευγμένης διαμινικής γέφυρας).

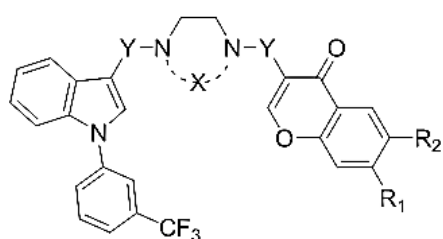
Αρχικά έγινε υποκατάσταση της *m*-τριφθορο-μεθυλομάδας του αρωματικού δακτυλίου με μια νιτρομάδα (**3a** και **3b**) ή μια αμινομάδα (**3c**, **3d**). Η *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα αντικαταστάθηκε από έναν πιο ισχυρό δέκτη ηλεκτρονίων μια φαινυλο-σουλφονυλομάδα στις **4a** και **4b**, με μια *m*-νιτρο-φαινυλο-σουλφονυλομάδα στις **4c** και **4d** και με μια *m*-αμινο-φαινυλο-σουλφονυλομάδα στις **4e** και **4f**. Στις ενώσεις **3a-3d** και **4a-4f** η μετατροπή του SPD304 από διαμίνη σε διαμίδιο και η αντικατάσταση της *m*-τριφθορο-φαινυλομάδας με πιο ισχυρούς δέκτες ηλεκτρονίων οδήγησαν σε μείωση της λιποφιλικότητας *clogP*. Η αντικατάσταση της *m*-τριφθορο-μεθυλομάδας είτε με μια νιτρομάδα (ενώσεις **3a** και **3b**) είτε με μια αμινομάδα (ενώσεις **3c** και **3d**), οδήγησε σε 2.5 με 7 φορές μικρότερη συγγένεια πρόσδεσης.

Στις **4b**, **4d** και **4e** η σύζευξη της διαμινικής γέφυρας είχε αρνητική επίδραση καθώς μείωσε τη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με τις **4a**, **4c** και **4f** αλλά και σε σχέση με το SPD304 για τις **4b** και **4d**. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να συσχετισθεί με την ελαστικότητα που πρέπει να διαθέτει το μόριο του αναστολέα (η οποία μειώνεται σημαντικά με τη σύζευξη της διαμινικής γέφυρας) έτσι ώστε οι δύο ομάδες –το μεθυλενο-ινδόλιο και η χρωμόνη- να μπορέσουν να πάρουν τη διαμόρφωση που απαιτείται για την πρόσδεση. Αυτό είναι εμφανές και στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου TNF/SPD304 όπου φαίνεται ότι το SPD304 έχει καμφθεί κατά 180° παίρνοντας έτσι σχήμα βρόχου (Ενότητα 3.6, Εικόνα 3.55).

Επιπρόσθετα, η εισαγωγή μιας *m*-αμινομάδας στη φαινυλο-σουλφονυλομάδα των **4a** και **4b** αύξησε τη συγγένεια πρόσδεσης κατά 2.4 και 7.4 φορές στις ενώσεις **4e** και **4f**. Αντίστοιχα η εισαγωγή μιας νιτρομάδας στην **4c** όπου δεν έχει γίνει σύζευξη της διαμινικής γέφυρας οδήγησε σε 2.2 φορές καλύτερη

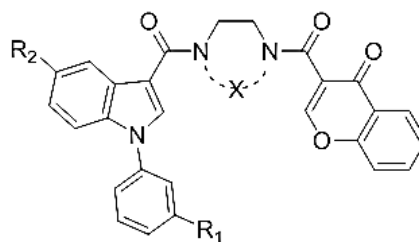
συγγένεια πρόσδεσης (σε σχέση με την **4a**) ενώ στην **4d** όπου η διαμινική γέφυρα έχει μετατραπεί σε πιπεραζίνη, οδήγησε σε μείωση της συγγένειας (συγκριτικά με την **4b**). Είναι εμφανές ότι την καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε αυτή τη σειρά εμφάνισε η ένωση **4f** ( $K_d = 0.95 \mu\text{M}$ ) η οποία φέρει μια *m*-αμινοφαινυλο-σουλφονυλομάδα στο ινδόλιο και μη συζευγμένη διαμινική γέφυρα.

Για τη μελέτη των παραπάνω φαινομένων σε μη καρβονυλικές ενώσεις συντέθηκαν τα ανάλογα **8a-8e**. Αρχικά έγινε αλλαγή του υποκαταστάτη του ινδολίου του SPD304 από μια *m*-τριφθορο-μεθυλομάδα σε μια φαινυλο-σουλφονυλομάδα (ένωση **8c**) που οδήγησε σε μείωση της λιποφιλικότητας κατά 1.3 φορές και ενίσχυση της συγγένειας πρόσδεσης κατά 1.6 φορές. Η αλλαγή αυτή σε συνδυασμό με τη μερική απομεθυλίωση της χρωμόνης οδήγησε στις ενώσεις **8b** (παρουσία 7' μεθυλίου) και **8d** (παρουσία 6' μεθυλίου) στις οποίες παρατηρείται μικρή μείωση της λιποφιλικότητας. Η **8b** εμφανίζει τέσσερις φορές ασθενέστερη συγγένεια πρόσδεσης ενώ η **8d** έχει  $K_d$  παρόμοιο με του SPD304 (5.06  $\mu\text{M}$ ). Η πλήρης απομεθυλίωση της χρωμόνης στην ένωση **8a** οδήγησε σε μείωση της λιποφιλικότητας σε σχέση με τις **8b** και **8d** ενώ το  $K_d$  αυξήθηκε ελαφρώς (7.61  $\mu\text{M}$ ) σε σχέση με του SPD304 (5.36  $\mu\text{M}$ ). Αυτό δείχνει ότι η παρουσία του 6'-μεθυλίου έχει θετική επίδραση στη συγγένεια πρόσδεσης.



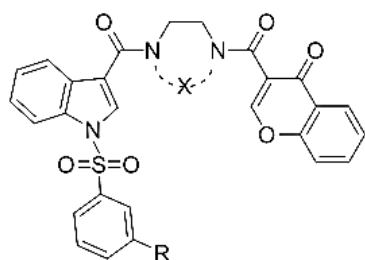
**1, 2 a-e**

- 1:** R<sub>1</sub>: R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>, Y: CH<sub>2</sub>  
**2a:** R<sub>1</sub>: R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X:  $\sphericalangle$ , Y: CH<sub>2</sub>  
**2b:** R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>, Y: CH<sub>2</sub>  
**2c:** R<sub>1</sub>: R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>, Y: C=O  
**2d:** R<sub>1</sub>: R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X:  $\sphericalangle$ , Y: C=O  
**2e:** R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X:  $\sphericalangle$ , Y: CH<sub>2</sub>



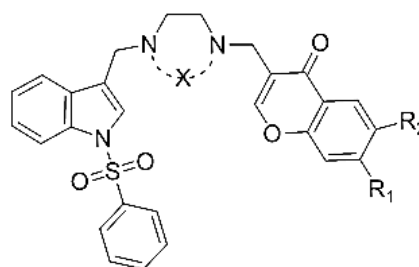
**3 a-d**

- 3a:** R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H, X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>  
**3b:** R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H, X:  $\sphericalangle$   
**3c:** R<sub>1</sub>: NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**3d:** R<sub>1</sub>: NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: H, X:  $\sphericalangle$



**4 a-f**

- 4a:** R: H, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**4b:** R: H, X:  $\sphericalangle$   
**4c:** R: NO<sub>2</sub>, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**4d:** R: NO<sub>2</sub>, X:  $\sphericalangle$   
**4e:** R: NH<sub>2</sub>, X:  $\sphericalangle$   
**4f:** R: NH<sub>2</sub>, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>



**8 a-e**

- 8a:** R<sub>1</sub>: R<sub>2</sub>: H, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**8b:** R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**8c:** R<sub>1</sub>: R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**8d:** R<sub>1</sub>: CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>: H, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**8e:** R<sub>1</sub>: R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, X:  $\sphericalangle$

**Εικόνα 3.38.** Δομές της 1ης σειράς SPD304 αναλόγων

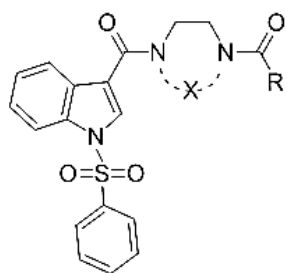
Ένωση	clogP	Kd (μM)	Ένωση	clogP	Kd (μM)	Ένωση	clogP	Kd (μM)
<b>1 (SPD304)</b>	8.0	5.36	<b>3c</b>	3.1	35.23	<b>8a</b>	5.0	7.61
<b>2a</b>	7.9	10.12	<b>3d</b>	3.1	14.12	<b>8b</b>	5.5	20.81
<b>2b</b>	7.5	18.64	<b>4a</b>	3.3	7.00	<b>8c</b>	6.0	8.50
<b>2c</b>	5.9	2.51	<b>4b</b>	3.6	12.81	<b>8d</b>	5.5	5.06
<b>2d</b>	5.7	5.12	<b>4c</b>	3.1	3.16	<b>8e</b>	5.9	Μη διαλυτή
<b>2e</b>	7.4	4.78	<b>4d</b>	3.0	16.82			
<b>3a</b>	3.9	12.22	<b>4e</b>	2.5	5.45			
<b>3b</b>	3.8	25.36	<b>4f</b>	2.4	0.95			

**Πίνακας 3.5.** Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης (K<sub>d</sub>) της 1ης σειράς αναλόγων του SPD304.




Στη δεύτερη σειρά ενώσεων (**5a–5j** και **6a–6c**, Εικόνα 3.39, Πίνακας 3.6) μελετήθηκε η επίδραση που έχει η αντικατάσταση της χρωμόνης με άλλες αρωματικές ομάδες σε καρβονυλικά ανάλογα του SPD304, για να διερευνηθεί η επίδραση του σχήματος και της υδροφοβικότητας των ενώσεων στη συγγένεια πρόσδεσής τους. Στις ενώσεις **5a–5j** έγινε μια επιπλέον αντικατάσταση της *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδας από μια φαινυλο-σουλφονυλομάδα. Η αντικατάσταση της χρωμόνης (**4a**, **4b**) με ένα ναφθαλίνιο στην **5b** οδήγησε σε 7.5 φορές χειρότερη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με την **4a** και σε πλήρη απώλεια της ενεργότητας της **5g** σε σχέση με την **4b** ( $K_d$ : 10.81  $\mu$ M). Αντίστοιχα η μετατροπή της τριτοταγούς διαμίνης σε δευτεροταγή στην **5a** μείωσε τη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με την τριτοταγή διαμίνη **5b**. Η αντικατάσταση της χρωμόνης με μια φαινυλομάδα στην **5c** ( $clogP$ : 5.0) επίσης μείωσε τη συγγένεια πρόσδεσης κατά 2.5 φορές σε σχέση με την **4a**. Η αντικατάσταση της χρωμόνης με ένα 1*H*-ιμιδαζόλιο και ένα *o*-φθοροβενζόλιο στις ενώσεις **5d** και **5e** οδήγησε σε πλήρη απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης. Η παρουσία του μικρότερου -αλλά λιγότερο υδρόφοβου- θειοφαινίου στην **5h** είχε ως αποτέλεσμα μια μικρή μείωση της συγγένειας πρόσδεσης κατά 1.2 φορές σε σχέση με την **4a** και κατά 1.5 φορά σε σχέση με το SPD304. Η εισαγωγή του ναφθαλινίου στην **5g** οδήγησε σε ολοκληρωτική απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης. Η διατήρηση της χρωμόνης στην **5f** με παράλληλη μετατροπή της διαμίνης από τριτοταγή σε δευτεροταγή, οδήγησε στη μείωση της λιποφιλικότητας και στην πλήρη απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης.

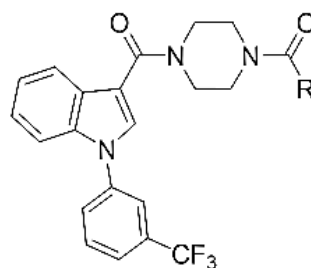
Για την περαιτέρω διερεύνηση της σημασίας της χρωμόνης στη συγγένεια πρόσδεσης διατηρήθηκε η *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα στα τελευταία τρία μέλη αυτής της σειράς (**6a–6c**) με παράλληλη σύζευξη της διαμινικής γέφυρας. Η αντικατάσταση της χρωμόνης με ναφθαλίνιο στην **6a** και με ιμιδαζόλιο στην **6b** είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης. Τελικά η

εισαγωγή μιας φαινυλομάδας στην **6c** οδήγησε σε μείωση της συγγένειας πρόσδεσης κατά 3 φορές ( $K_d = 15.17 \mu\text{M}$ ) σε σχέση με το SPD304. Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι η μετατροπή της διαμίνης από τριτοταγή σε δευτεροταγή καθώς και η αντικατάσταση της χρωμόνης έχουν αρνητική επίδραση στη συγγένεια πρόσδεσης.



**5 a-j**

- 5a:** R: ναφθαλίνιο, X: H,H  
**5b:** R: ναφθαλίνιο, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**5c:** R: φαινύλιο, X: CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>  
**5d:** R: 1*H*-ιμιδαζόλιο, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**5e:** R: 2-φθοροβενζόλιο, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**5f:** R: 3-(4-χρωμόνη), X: H,H  
**5g:** R: ναφθαλίνιο, X:   
**5h:** R: 2-θειοφένιο, X: CH<sub>3</sub>,CH<sub>3</sub>  
**5i:** R: φθοροβενζόλιο, X:   
**5j:** R: 2-θειοφένιο, X: 



**6 a-c**

- 6a:** R: ναφθαλίνιο  
**6b:** R: 1*H*-ιμιδαζόλιο  
**6c:** R: φαινύλιο

**Εικόνα 3.39.** Δομές της 2ης σειράς αναλόγων του SPD304.

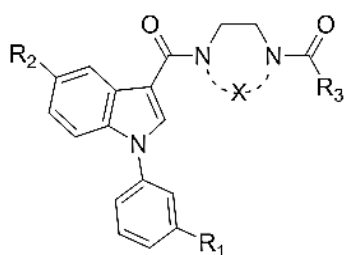
Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)	Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)
<b>5a</b>	5.3	>35	<b>5h</b>	3.7	8.23
<b>5b</b>	5.1	25.03	<b>5i</b>	4.1	Μη διαλυτή
<b>5c</b>	5.0	17.27	<b>5j</b>	3.7	Μη διαλυτή
<b>5d</b>	2.8	Μη ενεργή	<b>6a</b>	6.8	Μη ενεργή
<b>5e</b>	4.2	Μη ενεργή	<b>6b</b>	4.3	>35
<b>5f</b>	3.1	8.22	<b>6c</b>	5.6	15.17
<b>5g</b>	3.9	Μη ενεργή			

**Πίνακας 3.6.** Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης ( $K_d$ ) της 2ης σειράς αναλόγων του SPD304.

Ακολουθως, η τρίτη σειρά ενώσεων (**7a-7f**, **9a,9b** και **17a**, **17b**, Εικόνα 3.40, Πίνακας 3.7) σχεδιάστηκε για να διερευνηθεί κατά πόσο η εισαγωγή μιας αμινο- και μιας νιτρο-ομάδας στη θέση 5' του ινδολίου μπορεί να βελτιώσει τη συγγένεια πρόσδεσης του SPD304. Στις πρώτες τρεις ενώσεις αυτής της σειράς (**7a-7c**) η *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα παρέμεινε ανέπαφη ενώ ένας δέκτης ηλεκτρονίων, η νιτρομάδα, εισήχθη στη θέση 5' του ινδολίου. Τα αποτελέσματα για την ένωση **7a** -στην οποία η χρωμόνη και η διαμινική γέφυρα επίσης παρέμειναν ανέπαφες- αποκάλυψαν πως η εισαγωγή της νιτρομάδας προκάλεσε μείωση της συγγένειας πρόσδεσης κατά 2.5 φορές σε σχέση με το SPD304 και κατά 1.3 φορές σε σχέση με την **2a** η οποία διαφέρει μόνο ως προς τη νιτρομάδα. Η σύζευξη της διαμινικής γέφυρας στην **7a** ( $K_d = 13.28 \mu\text{M}$ ) και η εισαγωγή μιας νιτρομάδας στην **2d** ( $K_d: 5.12 \mu\text{M}$ ) οδήγησαν στην **7b** η οποία εμφάνισε πλήρη απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης. Η αντικατάσταση της χρωμόνης με ένα *o*-φθοροβενζόλιο στην **7c** οδήγησε σε 1.9 φορές ασθενέστερη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με το SPD304 και σε 1.3 φορές καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με την **7a**. Η αντικατάσταση της *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδας από μια *m*-αμινο-φαινυλομάδα και η εισαγωγή μιας αμινομάδας στην θέση 5' του ινδολικού δακτυλίου στην **3d** ( $K_d: 14.12 \mu\text{M}$ ) οδήγησε στην **7d** ( $K_d: 15.61 \mu\text{M}$ ). Η αντικατάσταση της χρωμόνης στην **7d** από μια χρωμαν-4-όνη στην **7e** (μη ενεργή) προκάλεσε μια σημαντική μείωση στη συγγένεια πρόσδεσης. Η αντικατάσταση της *m*-τριφθορο-μεθυλομάδας στην **7b** (μη ενεργή) από μια νιτρομάδα οδήγησε στην **7f** ( $K_d: 0.74 \mu\text{M}$ ).

Η πλήρης εξάλειψη της *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδας στις ενώσεις **9a** και **9b**, σε συνδυασμό με την αντικατάσταση της χρωμόνης με ένα *o*-φθοροβενζόλιο και ένα 2-θειοφαίνιο αντίστοιχα, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της λιποφιλικότητάς τους ( $\text{clogP}$ : 2.5 και 2.0 αντίστοιχα), ακολουθούμενη από

μεγάλη μείωση της συγγένειας πρόσδεσης ( $K_d$ : 17.85 και 10.84  $\mu\text{M}$ ) σε σχέση με το SPD304. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι μεγαλύτεροι υποκαταστάτες, όπως η χρωμόνη και το ναφθαλίνιο, είναι απαραίτητοι για να επιτευχθεί σημαντική αναστολή. Στις **17a** και **17b** εξαλείφθηκε η *m*-τριφθορομεθυλο-φαινυλομάδα που στην περίπτωση της **17a** μείωσε τη λιποφιλικότητα αλλά είχε αρνητική επιρροή στη συγγένεια πρόσδεσης (3.5 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του SPD304).



**7 a-f**

**7a:**  $R_1$ :  $\text{CF}_3$ ,  $R_2$ :  $\text{NO}_2$ ,  $R_3$ : 3-(4-χρωμόνη), X:  $\text{CH}_3, \text{CH}_3$

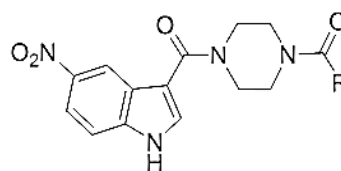
**7b:**  $R_1$ :  $\text{CF}_3$ ,  $R_2$ :  $\text{NO}_2$ ,  $R_3$ : 3-(4-χρωμόνη), X:

**7c:**  $R_1$ :  $\text{CF}_3$ ,  $R_2$ :  $\text{NO}_2$ ,  $R_3$ : 2-φθοροβενζόλιο, X:  $\text{CH}_3, \text{CH}_3$

**7d:**  $R_1$ :  $R_2$ :  $\text{NH}_2$ ,  $R_3$ : 3-(4-χρωμόνη), X:

**7e:**  $R_1$ :  $R_2$ :  $\text{NH}_2$ ,  $R_3$ : χρωμαν-4-όνη, X:

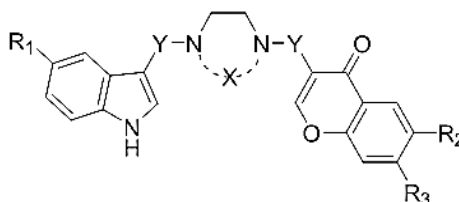
**7f:**  $R_1$ :  $R_2$ :  $\text{NO}_2$ ,  $R_3$ : 3-(4-χρωμόνη), X:



**9 a-b**

**9a:** R: 2-φθοροβενζόλιο

**9b:** R: 2-θειοφένιο



**17 a-b**

**17a:**  $R_1$ : H, X:  $\text{CH}_3, \text{CH}_3$ ,  $R_2$ :  $R_3$ :  $\text{CH}_3$ , Y:  $\text{CH}_2$

**17b:**  $R_1$ :  $\text{NO}_2$ ,  $R_2$ :  $R_3$ : H, X: , Y: C=O

Εικόνα 3.40. Δομές της 3ης σειράς SPD304 αναλόγων

Ένωση	clogP	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	Ένωση	clogP	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>7a</b>	4.8	13.28	<b>7f</b>	3.6	0.74
<b>7b</b>	4.8	Μη ενεργή	<b>9a</b>	2.5	17.85
<b>7c</b>	5.7	10.33	<b>9b</b>	2.0	10.74
<b>7d</b>	2.1	15.61	<b>17a</b>	4.5	18.75
<b>7e</b>	3.3	Μη ενεργή	<b>17b</b>	1.6	Μη διαλυτή

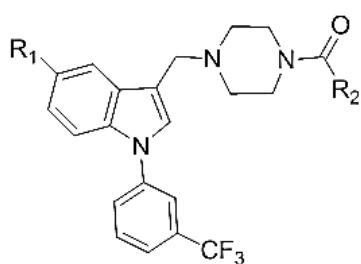
Πίνακας 3.7. Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης ( $K_d$ ) της 3ης σειράς SPD304 αναλόγων.



Στην τέταρτη σειρά ενώσεων (**10a–10e**, Εικόνα 3.41, Πίνακας 3.8), διερευνήθηκε περαιτέρω η σημασία της υποκατάστασης στη θέση 5' του ινδολίου σε συνδυασμό με την αντικατάσταση της χρωμόνης και για τον λόγο αυτό συντέθηκαν ανάλογα με ή χωρίς νιτρομάδα σε αυτή τη θέση. Σε αυτή τη σειρά ενώσεων, η διαμινική γέφυρα κυκλοποιήθηκε σε πιπεραζίνη και η συζευγμένη με τη χρωμόνη αμίνη του SPD304 μετατράπηκε σε αμίδιο. Η ένωση **10a** η οποία διαφέρει από το SPD304 ως προς τη συζευγμένη διαμινική γέφυρα και μια αμίνη που έχει μετατραπεί σε αμίδιο, έδειξε σημαντική αύξηση στη συγγένεια πρόσδεσης κατά 3.3 φορές σε σχέση με το SPD304. Ωστόσο η εισαγωγή της νιτρομάδας στη θέση 5' του ινδολίου της **10a** οδήγησε στην **10b** η οποία εμφάνισε πλήρη απώλεια της συγγένειας δέσμευσης. Στις **10c** και **10d** η χρωμόνη έχει αντικατασταθεί από ένα ναφθαλίνιο. Η ένωση **10c** δεν φέρει κάποιον υποκαταστάτη στην 5'-θέση και εμφάνισε μείωση στη συγγένεια πρόσδεσης κατά 1.5 φορά σε σχέση με το SPD304 και 4.9 φορές σε σχέση με την **10a** που φέρει μια χρωμόνη. Η **10d** που επίσης φέρει ένα ναφθαλίνιο αντί της χρωμόνης και μια νιτρομάδα στη θέση 5' του ινδολίου φαίνεται ανενεργή όπως και η **10b** η οποία αντίστοιχα φέρει μια νιτρομάδα στη θέση 5' του ινδολίου και μια χρωμόνη. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την παρατήρηση ότι η συγγένεια πρόσδεσης μπορεί να μεταβληθεί δραματικά με τη ρύθμιση της ηλεκτρονικής φύσης του υποκαταστάτη του ινδολίου. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι η αντικατάσταση της χρωμόνης της **10a** οδήγησε σε μείωση τόσο στην περίπτωση του ναφθαλινίου στη **10c** (κατά 4.9 φορές) όσο και στην περίπτωση του μικρότερου σε μέγεθος βενζολικού δακτυλίου στη **10e** (κατά 1.3 φορές).

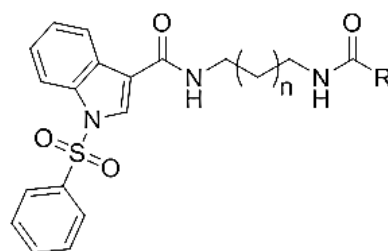
Η 5η σειρά συμπεριλάμβανε τις ενώσεις **11a–11f**, **12** και **13** (Εικόνα 3.41, Πίνακας 3.8). Στις **11a–11f** εισήχθησαν τρεις αλλαγές σε σχέση με το SPD304: α. η *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα του ινδολίου αντικαταστάθηκε από μια

*m*-φαινυλο-σουλφονυλομάδα, β. το μέγεθος της διαμινικής γέφυρας τροποποιήθηκε και γ. η χρωμόνη είτε διατηρήθηκε (**11a**) είτε αντικαταστάθηκε από ένα ναφθαλίνιο (**11b**) ή ένα βενζόλιο (**11d**). Κατά την αντικατάσταση της *m*-τριφορο-μεθυλο-φαινυλομάδας από μια σουλφονυλομάδα στην **11a** παρατηρήθηκε μείωση στη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με το SPD304 (4.6 φορές). Ανάλογη μείωση παρατηρήθηκε και στις **11b** και **11d** όπου τη θέση της χρωμόνης έχει πάρει ένα ναφθαλίνιο και ένα βενζόλιο αντίστοιχα ενώ το μήκος της διαμινικής γέφυρας έχει επεκταθεί κατά 2 και 1 άτομα άνθρακα. Οι ενώσεις **12** και **13** έχουν χαμηλότερη λιποφιλικότητα από το SPD304 αλλά δεν εμφανίζουν κάποια αξιοσημείωτη συγγένεια πρόσδεσης.



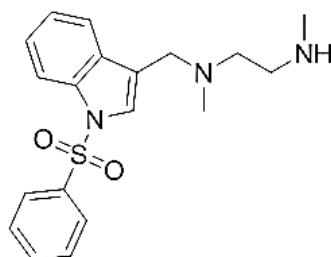
**10 a-e**

- 10a:** R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: 3-(4-χρωμόνη)  
**10b:** R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: 3-(4-χρωμόνη)  
**10c:** R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: ναφθαλίνιο  
**10d:** R<sub>1</sub>: NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>: ναφθαλίνιο  
**10e:** R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: φαινύλιο

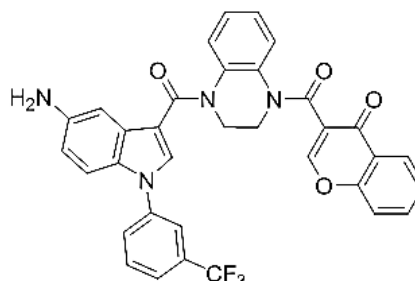


**11 a-f**

- 11a:** R: 3-(4-χρωμόνη), n=1  
**11b:** R: ναφθαλίνιο, n=2  
**11c:** R: ναφθαλίνιο, n=1  
**11d:** R: φαινύλιο, n=1  
**11e:** R: φαινύλιο, n=2  
**11f:** R: 3-(4-χρωμόνη), n=2



**12**



**13**

**Εικόνα 3.41.** Δομές της 4ης και 5ης σειράς SPD304 αναλόγων

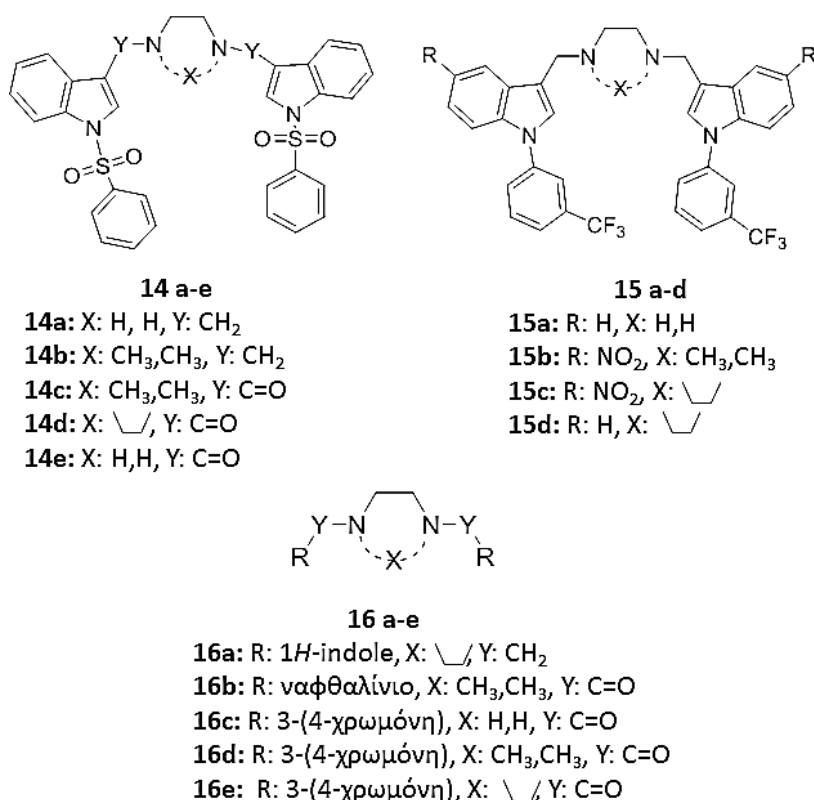
Ένωση	clogP	Kd (μM)	Ένωση	clogP	Kd (μM)	Ένωση	clogP	Kd (μM)
<b>10a</b>	5.9	1.61	<b>11a</b>	4.6	24.40	<b>11f</b>	4.6	Μη διαλυτή
<b>10b</b>	7.4	Μη ενεργή	<b>11b</b>	5.4	>18	<b>12</b>	3.3	Μη ενεργή
<b>10c</b>	7.7	7.82	<b>11c</b>	5.6	Μη διαλυτή	<b>13</b>	5.1	11.90
<b>10d</b>	7.5	Μη ενεργή	<b>11d</b>	4.3	Μη ενεργή			
<b>10e</b>	6.6	2.14	<b>11e</b>	4.2	Μη διαλυτή			

**Πίνακας 3.8.** Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης ( $K_d$ ) της 4ης και 5ης σειράς SPD304 αναλόγων.

Στην 6η σειρά εξετάζεται ο ρόλος της συμμετρίας στη συγγένεια πρόσδεσης των αναλόγων **14a-14e**, **15a-15d** και **16a-16e** (Εικόνα 3.42, Πίνακας 3.9). Στην ομάδα **14a-14e** έγινε αντικατάσταση της *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδας του ινδολίου από μια *m*-φαινυλο-σουλφονυλομάδα και βάσει αυτής της δομικής επικράτειας δημιουργήθηκε μια σειρά συμμετρικών ενώσεων (**14a-14e**). Ωστόσο καμία ένωση αυτής της ομάδας δεν εμφάνισε κάποια ενεργότητα. Στις υπόλοιπες ενώσεις της συγκεκριμένης σειράς (**15a-15d** και **16a-16e**) έγινε σύζευξη της διαμίνης και μετατροπή των δευτεροταγών αμινών είτε σε τριτοταγείς αμίνες είτε σε αμίδια. στις ενώσεις **15a-15d** διατηρήθηκε η ομάδα του ινδολίου και η *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα ενώ παράλληλα η χρωμόνη αντικαταστάθηκε από το *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλο-ινδόλιο έτσι ώστε το μόριο να είναι συμμετρικό. Επίσης στις **15b** και **15c** έγινε υποκατάσταση της 5' θέσης του ινδολίου με μια νιτρομάδα. Οι ενώσεις αυτές ήταν πιο λιπόφιλες από το SPD304 και δεν εμφάνισαν κάποια συγγένεια πρόσδεσης. Εξαιρέση αποτέλεσε η **15c** όπου είχε γίνει σύζευξη της διαμίνης και εισαγωγή μιας νιτρομάδας στα δυο ινδόλια και η οποία ήταν κατά 8.9 φορές πιο ενεργή από το SPD304 ( $K_d$ : 0.6 μM).

Στις ενώσεις **16a-16e** διατηρήθηκε μια μόνο ομάδα του SPD304 ανά ένωση (το ινδόλιο, η χρωμόνη και η τριτοταγής διαμίνη). Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν χαμηλότερη λιποφιλικότητα από το SPD304 από 1.9 φορές (**16b**) έως 11.4

φορές (**16e**). Μετρήσιμη συγγένεια πρόσδεσης εμφάνισαν μόνο οι ενώσεις όπου υπήρχε η χρωμόνη (**16c-16e**). Η **16c** η οποία φέρει δύο δευτεροταγή αμιδία, εμφάνισε συγγένεια πρόσδεσης ελαφρώς καλύτερη από του SPD304 ( $K_d$ : 4.24  $\mu\text{M}$ ) και κατά 3.3 φορές χαμηλότερη λιποφιλικότητα ( $\text{clogP}$ : 2.4). Η **16d** μοιάζει περισσότερο με το SPD304 από τις άλλες δυο (**16c** και **16e**) καθώς εκτός από τη χρωμόνη φέρει και δυο τριτοταγή αμιδία τα οποία δεν σχηματίζουν δακτύλιο. Σε σχέση με τις **16c** και **16e** εμφάνισε την καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης ( $K_d$ : 2.89  $\mu\text{M}$ ) η οποία είναι κατά 1.9 φορές καλύτερη από του SPD304. Στη **16e** η κυκλοποίηση του διαμιδίου οδήγησε σε συγγένεια πρόσδεσης 5 φορές χαμηλότερη σε σχέση με την **16d** και 2.7 φορές χαμηλότερη σε σχέση με το SPD304. Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι η μετατροπή των αναλόγων σε συμμετρικά μείωσε σημαντικά τη συγγένεια πρόσδεσης με εξαίρεση τις ενώσεις **15c**, **16c** και **16d** οι οποίες εμφάνισαν χαμηλότερο  $K_d$  από εκείνο του SPD304 (0.6  $\mu\text{M}$ , 4.24  $\mu\text{M}$  και 2.89  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα) και στις οποίες είχε διατηρηθεί είτε το ινδόλιο με τον αρχικό του υποκαταστάτη (*m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα) είτε η χρωμόνη. Στις **14a-14e** όπου διατηρήθηκε μόνο το ινδόλιο (χωρίς τον αρχικό υποκαταστάτη) σημειώθηκε πλήρης απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης.



Εικόνα 3.42 Δομές της 6ης σειράς SPD304 αναλόγων

Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)	Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)	Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)
<b>14a</b>	6.2	Μη ενεργή	<b>15a</b>	10.2	Μη ενεργή	<b>16a</b>	4.2	Μη ενεργή
<b>14b</b>	7.3	Μη ενεργή	<b>15b</b>	10.9	Μη ενεργή	<b>16b</b>	4.3	Μη ενεργή
<b>14c</b>	5.9	Μη ενεργή	<b>15c</b>	10.8	0.6	<b>16c</b>	2.4	4.24
<b>14d</b>	5.9	Μη ενεργή	<b>15d</b>	11.2	Μη διαλυτή	<b>16d</b>	1.0	2.89
<b>14e</b>	6.3	Μη ενεργή				<b>16e</b>	0.7	14.52

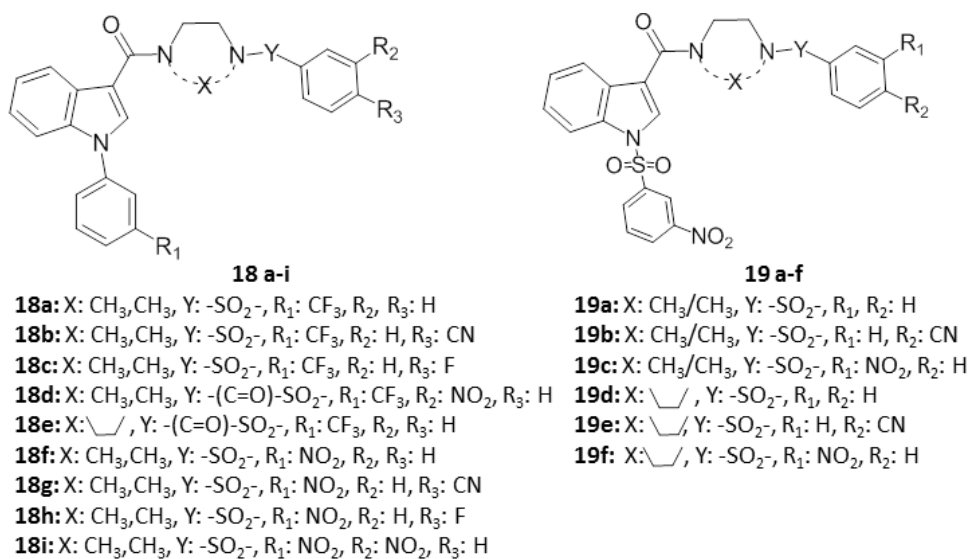
Πίνακας 3.9. Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης (K<sub>d</sub>) της 6ης σειράς SPD304 αναλόγων.

Στην 7η και τελευταία σειρά αναλόγων του SPD304 (ενώσεις **18a-18i**, **19a-19f**, Εικόνα 3.43, Πίνακας 3.10), έχει γίνει αντικατάσταση της χρωμόνης με μια φαινυλομάδα που είναι μικρότερη σε όγκο και η οποία φέρει σαν υποκαταστάτες μια κυανομάδα ή μια νιτρομάδα σε *m*- και *p*- θέσεις. Η λιποφιλικότητα κυμαίνεται από 5.6 έως 6.3 και είναι χαμηλότερη αυτής του SPD304. Στις ενώσεις **18a-18e** έχει διατηρηθεί ο υποκαταστάτης του ινδολίου

(*m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα) ενώ στις **18f-18i** έχει αντικατασταθεί από μια νιτρομάδα. Στη **18a** όπου δεν έχει γίνει καμία υποκατάσταση στη φαινυλομάδα, η συγγένεια πρόσδεσης είναι κατά 1.9 φορές χαμηλότερη από του SPD304 ( $K_d$ : 10.36  $\mu$ M). Στις **18b** και **18c** όπου στη φαινυλομάδα έχει εισαχθεί μια *p*-κυανομάδα και ένα *p*-φθόριο αντίστοιχα, σημειώθηκε πλήρης απώλεια της συγγένειας πρόσδεσης για την **18b** ενώ η **18c** ( $K_d$ : 4.48  $\mu$ M) είναι 2.3 φορές πιο ενεργή από την **18a** όπου η φαινυλομάδα δεν φέρει υποκαταστάτη. Στις ενώσεις **18d** και **18e** έχει εισαχθεί μια καρβονυλομάδα ανάμεσα στη σουλφονυλομάδα και την αμινομάδα. Στη **18d** επιπλέον έχει εισαχθεί μια *m*-νιτρομάδα στη φαινυλομάδα ενώ η **18e** φέρει έναν δακτύλιο πιπεραζίνης. Οι δύο αυτές ενώσεις εμφανίζουν παρόμοια λιποφιλικότητα ( $\text{clogP} \sim 6$ ) και μεγάλη διαφορά στη συγγένεια πρόσδεσης καθώς η **18e** είναι ανενεργή ενώ η **18d** ( $K_d$ : 1.36  $\mu$ M) είναι κατά 7.6 φορές πιο ενεργή από την **18a** η οποία δεν φέρει δεύτερη αμιδομάδα ούτε *m*-νιτρομάδα. Στις **18f-18i** διερευνάται ο ρόλος των *o*- και *m*- υποκαταστατών (-CN και -NO<sub>2</sub>) στη φαινυλομάδα. Η λιποφιλικότητα των ενώσεων αυτών ( $\text{clogP}$ : 4.5-5.2) είναι χαμηλότερη από αυτή της προηγούμενης υποομάδας (**18a-18e**). Η **18f** όπου δεν έχει εισαχθεί κάποιος υποκαταστάτης στη φαινυλομάδα, εμφανίζει συγγένεια πρόσδεσης εφάμιλλη του SPD304 ( $K_d$ : 6.12  $\mu$ M) ενώ όλες οι υπόλοιπες ενώσεις (**18g-18i**) είναι ανενεργές. Αυτό δείχνει ότι η ενίσχυση του αρνητικού επαγωγικού φαινομένου στη φαινυλομάδα με την εισαγωγή δεκτών ηλεκτρονίων έχει αρνητική επιρροή στη συγγένεια πρόσδεσης. Αντίστοιχα η εισαγωγή δεύτερης αμιδομάδας (**18d**) οδήγησε σε σημαντική αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης.

Στην ομάδα **19a-19f** έχει επίσης διατηρηθεί το ινδόλιο ενώ η *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδα έχει αντικατασταθεί από μια *m*-νιτρο-φαινυλο-σουλφονυλομάδα. Η **19a** έχει μεγαλύτερη λιποφιλικότητα από την **19b** ( $\text{clogP}$ :

4.2 και 3.7 αντίστοιχα) και είναι 2 φορές πιο ενεργή ( $K_d$ : 7.80 και 15.2  $\mu$ M). Φαίνεται ότι η εισαγωγή δεκτών ηλεκτρονίων στη φαινυλομάδα επηρεάζει αρνητικά τη συγγένεια πρόσδεσης. Στις ενώσεις **19d-19f** η διαμινική γέφυρα του SPD304 έχει συζευχθεί και διερευνάται ο ρόλος της υποκατάστασης με -NO<sub>2</sub> και -CN σε *m*- και *p*- θέσεις της φαινυλομάδας. Η κυκλοποίηση της διαμίνης στη **19d** σε σχέση με τη **19a** όπου η διαμινική γέφυρα δεν είναι συζευγμένη, δεν επηρέασε τη λιποφιλικότητα (clogP: 4.2) και είχε θετική συνεισφορά στη συγγένεια πρόσδεσης καθώς η **19d** είναι κατά 1.8 φορές πιο ενεργή από τη **19a**. Η εισαγωγή δεκτών ηλεκτρονίων στη φαινυλομάδα στις **19e** και **19f** είχε και πάλι αρνητική επιρροή στην ενέργεια πρόσδεσης όπως και στις **19b, 19c**.



Εικόνα 3.43. Δομές της 7ης σειράς SPD304 αναλόγων

Ένωση	clogP	Kd	Ένωση	clogP	Kd
<b>18a</b>	6.2	10.36	<b>18i</b>	4.8	Μη ενεργή
<b>18b</b>	5.6	Μη ενεργή	<b>19a</b>	4.2	7.80
<b>18c</b>	6.3	4.48	<b>19b</b>	3.7	15.20
<b>18d</b>	5.9	1.36	<b>19c</b>	4.0	Μη διαλυτή
<b>18e</b>	6.0	Μη ενεργή	<b>19d</b>	4.2	4.39
<b>18f</b>	5.1	6.12	<b>19e</b>	3.6	Μη διαλυτή
<b>18g</b>	4.5	Μη ενεργή	<b>19f</b>	4.0	Μη διαλυτή
<b>18h</b>	5.2	Μη ενεργή			

**Πίνακας 3.10.** Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης (K<sub>d</sub>) της 7ης σειράς αναλόγων του SPD304.

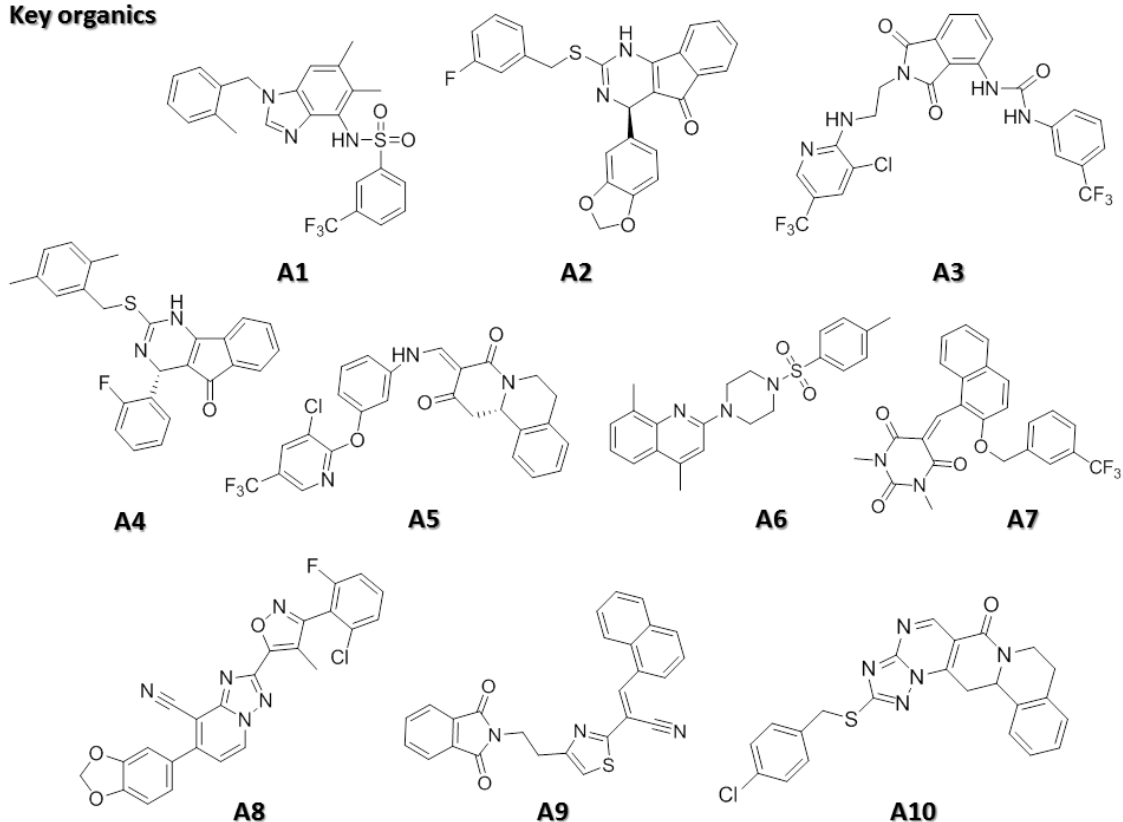
Οι επόμενες δυο σειρές ενώσεων δεν ανήκουν στα ανάλογα του SPD304 και έχουν προκύψει από μελέτες docking που πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γ.Π.Α.

Η 9η σειρά ενώσεων περιλαμβάνει κάποιες εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις και χωρίζεται σε τρεις ομάδες βάσει των συλλογών μορίων από τις οποίες επιλέχθηκαν: α. **A1-A10** (Key Organics, εταιρία: Key Organics), **B1-B10** (Myria Screen, εταιρία: Sigma-Aldrich) και **C1-C10** (Chembridge, εταιρία: Hit2lead). Οι ενώσεις αυτές δεν φέρουν κοινά δομικά μοτίβα (Εικόνες 3.44-3.46).

Στη σειρά Key Organics (**A1-A10**, Εικόνα 3.44) η λιποφιλικότητα των ενώσεων εμφανίζει σημαντική διακύμανση (clogP: 4.0-6.8). Το 30% αυτών δεν είναι διαλυτές και το 60% δεν ακολουθεί τον κανόνα του πέντε του Chris Lipinski. Επίσης, το 40% δεν είναι ενεργές ενώ το 30% αυτών που είναι ενεργές εμφανίζουν συγγένεια πρόσδεσης από 2.6 έως 4.3 φορές καλύτερη του SPD304 (Εικόνα 3.44, Πίνακας 3.11).



**Key organics**



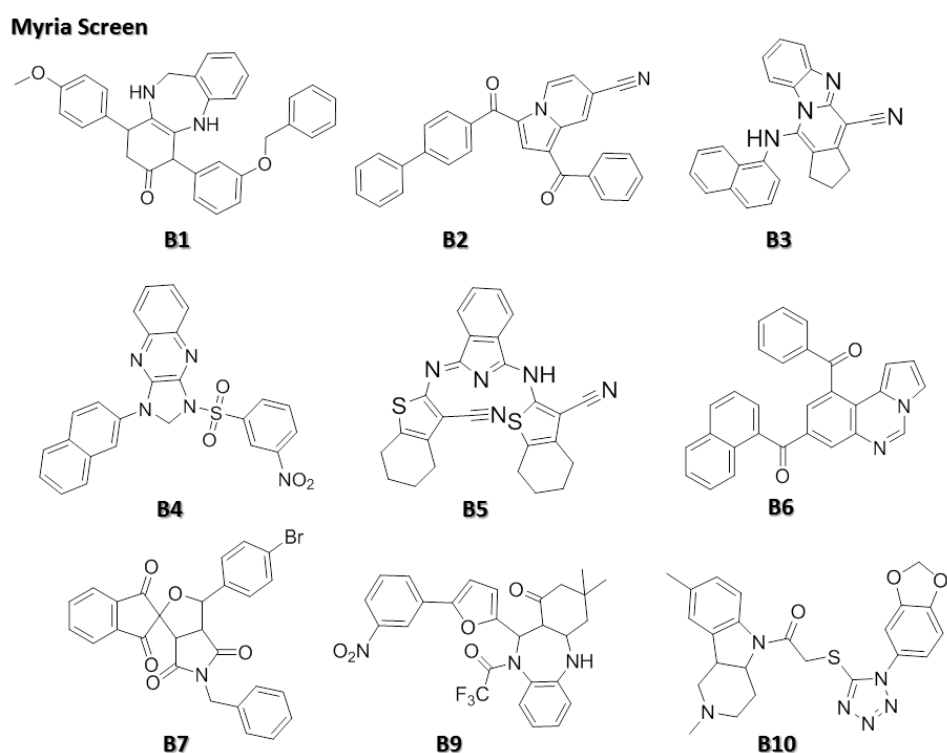
**Εικόνα 3.44.** Δομές των ενώσεων **A1-A10** της 9ης σειράς.

Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)	MW	Lipinski rules
<b>A1</b>	6.2	1.62	473.5	Όχι
<b>A2</b>	4.7	1.24	444.5	Ναι
<b>A3</b>	6.8	Μη ενεργή	571.9	Όχι
<b>A4</b>	5.7	Μη ενεργή	428.5	Όχι
<b>A5</b>	5.7	Μη διαλυτή	513.9	Όχι
<b>A6</b>	5.2	2.06	395.5	Όχι
<b>A7</b>	6.2	Μη διαλυτή	468.4	Όχι
<b>A8</b>	4.5	Μη ενεργή	473.9	Ναι
<b>A9</b>	4.4	Μη διαλυτή	435.5	Ναι
<b>A10</b>	4.0	Μη ενεργή	447.9	Ναι

**Πίνακας 3.11.** Λιποφιλικότητα (clogP), συγγένεια πρόσδεσης (K<sub>d</sub>), μοριακό βάρος (MW) και διατήρηση ή όχι του κανόνα του πέντε για τις ενώσεις **A1-A10**.

Η σειρά Myria Screen περιλάμβανε τις ενώσεις **B1-B10** (Εικόνα 3.45) οι οποίες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στη λιποφιλικότητα ( $clogP$ : 3.3-7.1) σε σχέση με τις άλλες δυο ομάδες.

Το 90% των ενώσεων αυτής της ομάδας δεν ακολουθεί τον κανόνα του πέντε και το 30% είναι αδιάλυτες. Το 40% δεν είναι ενεργές -περίπου μια στις τρεις εμφάνισε κάποια ενεργότητα- ενώ το 20% είναι πιο ενεργές από το SPD304 κατά 2.6 έως 4.3 φορές (Εικόνα 3.45, Πίνακας 3.12).

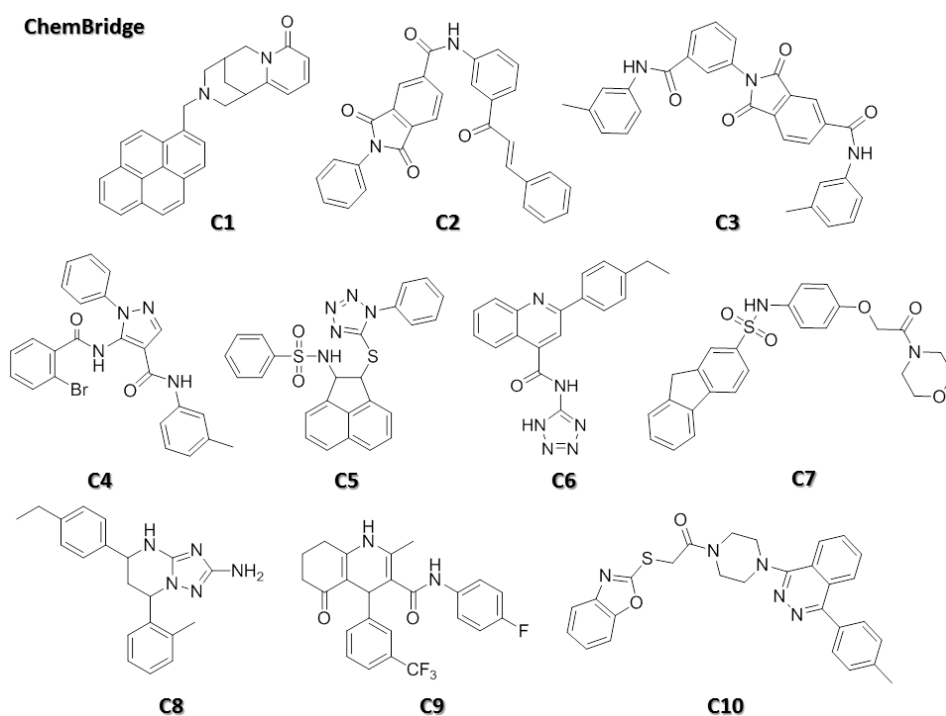


**Εικόνα 3.45.** Δομές των ενώσεων **B1-B10** της 9ης σειράς.

Ένωση	clogP	Kd (μM)	MW	Lipinski rules
<b>B1</b>	6.38	2.14	502.6	Όχι
<b>B2</b>	6.35	Μη διαλυτή	426.5	Όχι
<b>B3</b>	7.06	1.12	374.4	Όχι
<b>B4</b>	6.12	Μη διαλυτή	483.5	Όχι
<b>B5</b>	5.63	7.46	467.6	Όχι
<b>B6</b>	6.47	Μη ενεργή	426.46	Όχι
<b>B7</b>	3.91	Μη ενεργή	516.4	Όχι
<b>B8</b>	5.70	Μη διαλυτή	464.5	Όχι
<b>B9</b>	5.84	Μη ενεργή	525.5	Όχι
<b>B10</b>	3.33	Μη ενεργή	464.6	Ναι

**Πίνακας 3.12.** Λιποφιλικότητα (clogP), συγγένεια πρόσδεσης ( $K_d$ ), μοριακό βάρος (MW) και διατήρηση ή όχι του κανόνα του πέντε για τις ενώσεις **B1-B10**.

Στη σειρά ChemBridge (**C1-C10**, Εικόνα 3.46) η λιποφιλικότητα των ενώσεων εμφανίζει σημαντική διακύμανση (clogP: 3.8-5.5), είναι στην πλειοψηφία τους διαλυτές και το 40% δεν ακολουθεί τον κανόνα του πέντε. Το 50% είναι ανενεργές και το 40% εμφανίζει συγγένεια πρόσδεσης από 1.4 έως 5.4 φορές καλύτερη του SPD304 (Εικόνα 3.46, Πίνακας 3.13).

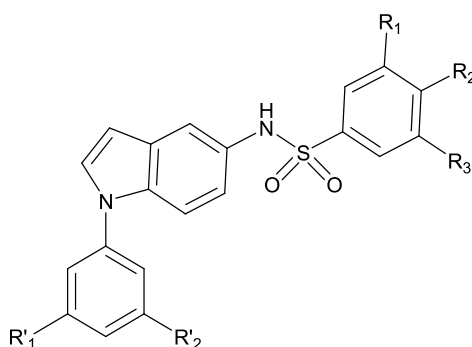


**Εικόνα 3.46.** Δομές των ενώσεων **C1-C10** της 9ης σειράς.

Ένωση	clogP	Kd (μM)	MW	Lipinski rules
<b>C1</b>	5.1	1.63	404.5	Όχι
<b>C2</b>	5.1	3.72	472.5	Όχι
<b>C3</b>	5.1	Μη ενεργή	489.5	Όχι
<b>C4</b>	4.5	6.28	475.3	Ναι
<b>C5</b>	4.8	Μη ενεργή	485.6	Ναι
<b>C6</b>	3.8	Μη ενεργή	344.4	Ναι
<b>C7</b>	3.9	1.8	464.5	Ναι
<b>C8</b>	4.2	0.99	333.4	Ναι
<b>C9</b>	4.2	Μη ενεργή	444.4	Ναι
<b>C10</b>	5.5	Μη ενεργή	495.6	Όχι

**Πίνακας 3.13.** Λιποφιλικότητα (clogP), συγγένεια πρόσδεσης ( $K_d$ ), μοριακό βάρος (MW) και διατήρηση ή όχι του κανόνα του πέντε για τις ενώσεις **C1-C10**.

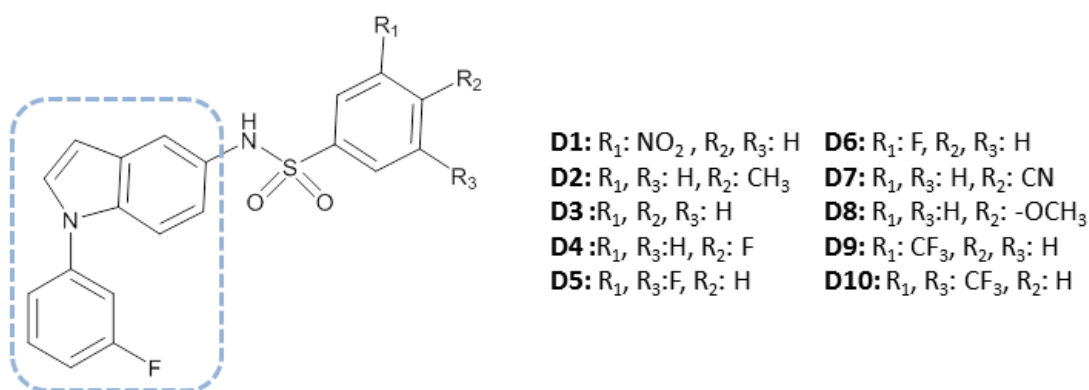
Η 10η σειρά ενώσεων όπως και οι σειρές 1-8 συντέθηκαν από την Proactina. Η σειρά αυτή χωρίζεται σε τρεις ομάδες και ο σχεδιασμός τους βασίστηκε σε ένα αρχικό κοινό δομικό μοτίβο γύρω από το οποίο αναπτύχθηκαν (Εικόνα 3.47).



**Εικόνα 3.47.** Η βασική δομή γύρω από την οποία αναπτύχθηκε ο σχεδιασμός των ομάδων των D, E και F ενώσεων.

Στην πρώτη ομάδα (**D1-D10**) όπου το ινδόλιο φέρει μια *m*-φθορο-φαινυλομάδα, διερευνάται η επίδραση που έχει η υποκατάσταση του φαινολικού δακτυλίου της φαινυλο-σουλφονυλομάδας (Εικόνα 3.48). Στις ενώσεις αυτές ο φαινολικός υποκαταστάτης του ινδολίου φέρει μια ομάδα φθορίου στην *m*-θέση (σε αντιστοιχία με την τριφθορο-μεθυλομάδα που φέρει στο SPD304). Η ένωση **D3**

δεν φέρει κανένα υποκαταστάτη στις θέσεις  $R_1$ ,  $R_2$  και  $R_3$  και εμφανίζει λιποφιλικότητα μειωμένη κατά 1.5 φορές ενώ η συγγένεια πρόσδεσης είναι εφάμιλλη του SPD304 ( $K_d$ : 4.84  $\mu\text{M}$ , Πίνακας 3.14). Οι ενώσεις **D1**, **D6** και **D9** φέρουν έναν υποκαταστάτη στην *m*-θέση της φαινυλο-σουλφονυλομάδας (θέση  $R_1$ ). Οι **D1** και **D6** που φέρουν μια *m*-νιτρομάδα και ένα *m*-φθόριο αντίστοιχα εμφανίζουν ελαφρώς υψηλότερη λιποφιλικότητα ( $\text{clogP}$ : 5.76 και 5.82) σε σύγκριση με την **D3** ( $\text{clogP}$ : 5.47) και είναι κατά περίπου 6.9 φορές πιο ενεργές ( $K_d$ : 0.73  $\mu\text{M}$  και 0.70  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα).



Εικόνα 3.48. Δομές των ενώσεων **D1-D10**.

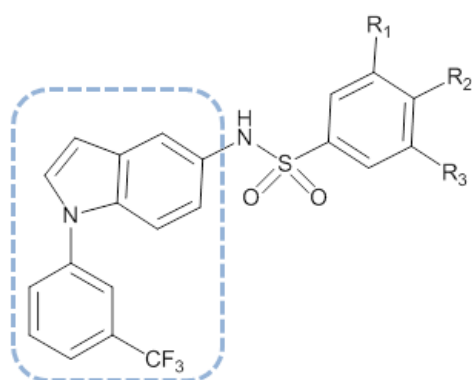
Ένωση	clogP	Kd ( $\mu\text{M}$ )	Ένωση	clogP	Kd ( $\mu\text{M}$ )
<b>D1</b>	5.8	0.73	<b>D6</b>	5.8	0.70
<b>D2</b>	6.0	38.4	<b>D7</b>	5.5	1.42
<b>D3</b>	5.5	4.84	<b>D8</b>	5.7	Μη ενεργή
<b>D4</b>	5.8	Μη διαλυτή	<b>D9</b>	6.8	7.17
<b>D5</b>	6.0	Μη διαλυτή	<b>D10</b>	7.8	5.55

Πίνακας 3.14. Λιποφιλικότητα ( $\text{clogP}$ ) και συγγένεια πρόσδεσης ( $K_d$ ) των ενώσεων **D1-D10**.

Η εισαγωγή της τριφθορο-μεθυλομάδας στη συγκεκριμένη θέση έχει αρνητική επίδραση καθώς η **D9** είναι κατά 10 φορές πιο λιπόφιλη ( $\text{clogP}$ : 6.78) και λιγότερο ενεργή ( $K_d$ : 7.17  $\mu\text{M}$ ) από τις **D1** και **D6** και κατά 1.5 φορά από την **D3**. Στις ενώσεις **D2**, **D4**, **D7** και **D8** έχουν εισαχθεί στην *p*-θέση της φαινυλο-

σουλφονυλομάδας (θέση R<sub>2</sub>) οι υποκαταστάτες: -CH<sub>3</sub>, -F, -CN και -OCH<sub>3</sub> αντίστοιχα. Η λιποφιλικότητα των ενώσεων αυτών έχει μέτρια διακύμανση (clogP: 5.5-6.0) και είναι αρκετά κοντά σε αυτή της **D3**. Όσο αφορά τη συγγένεια πρόσδεσης, οι **D2** και **D8** ουσιαστικά είναι ανενεργές ενώ η **D7** είναι 3.8 φορές πιο ενεργή από τη **D3** (K<sub>d</sub>: 1.42 μM). Αυτό δείχνει ότι η εισαγωγή της *m*-κυανομάδας στη φαινυλο-σουλφονυλομάδα αύξησε σημαντικά τη συγγένεια πρόσδεσης. Η διπλή υποκατάσταση της φαινυλομάδας στις *m*-θέσεις που έγινε στις ενώσεις **D5** (-F) και **D10** (-CF<sub>3</sub>) οδήγησε σε υψηλότερη λιποφιλικότητα (clogP: 6.03 και 7.82) ενώ η συγγένεια πρόσδεσης της **D10** (K<sub>d</sub>: 5.55 μM) είναι παρόμοια με αυτή της **D3**.

Στη δεύτερη ομάδα (**E1-E10**) το ινδόλιο φέρει μια *m*-τριφθορο-μεθυλοφαινυλομάδα όπως και το SPD304 (Εικόνα 3.49). Η ένωση **E3** δεν φέρει κανένα υποκαταστάτη στις θέσεις R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> και R<sub>3</sub> και έχει clogP: 6.26 ενώ η συγγένεια πρόσδεσής της είναι 2.1 φορές καλύτερη από του SPD304 (K<sub>d</sub>: 2.57 μM, Πίνακας 3.15). Στις ενώσεις **E1**, **E6** και **E9** έχουν εισαχθεί στην *m*-θέση της φαινυλο-σουλφονυλομάδας οι υποκαταστάτες -NO<sub>2</sub>, -F και -CF<sub>3</sub> αντίστοιχα. Η εισαγωγή των -NO<sub>2</sub> και -F υποκαταστατών στις **E1** και **E6** οδήγησε σε μειωμένη λιποφιλικότητα (clogP: 6.5 και 6.6) σε σχέση με την **E3** ενώ αντίστοιχα η εισαγωγή του -CF<sub>3</sub> στην **E9** αύξησε τη λιποφιλικότητα (clogP: 7.6).



<b>E1:</b> R <sub>1</sub> : NO <sub>2</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> : H	<b>E6:</b> R <sub>1</sub> : F, R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> : H
<b>E2:</b> R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> : H, R <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub>	<b>E7:</b> R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> : H, R <sub>2</sub> : CN
<b>E3:</b> R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> : H	<b>E8:</b> R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> : H, R <sub>2</sub> : -OCH <sub>3</sub>
<b>E4:</b> R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> : H, R <sub>2</sub> : F	<b>E9:</b> R <sub>1</sub> : CF <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> : H
<b>E5:</b> R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> : F, R <sub>2</sub> : H	<b>E10:</b> R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> : CF <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> : H

**Εικόνα 3.49.** Δομές των ενώσεων **E1-E10**.

Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)
<b>E1</b>	6.5	3.47	<b>E6</b>	6.6	2.42
<b>E2</b>	6.8	8.18	<b>E7</b>	6.3	7.32
<b>E3</b>	6.3	2.57	<b>E8</b>	6.4	0.60
<b>E4</b>	6.6	3.30	<b>E9</b>	7.6	27.58
<b>E5</b>	6.8	8.89	<b>E10</b>	8.6	29.64

**Πίνακας 3.15.** Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης (K<sub>d</sub>) των ενώσεων **E1-E10**.

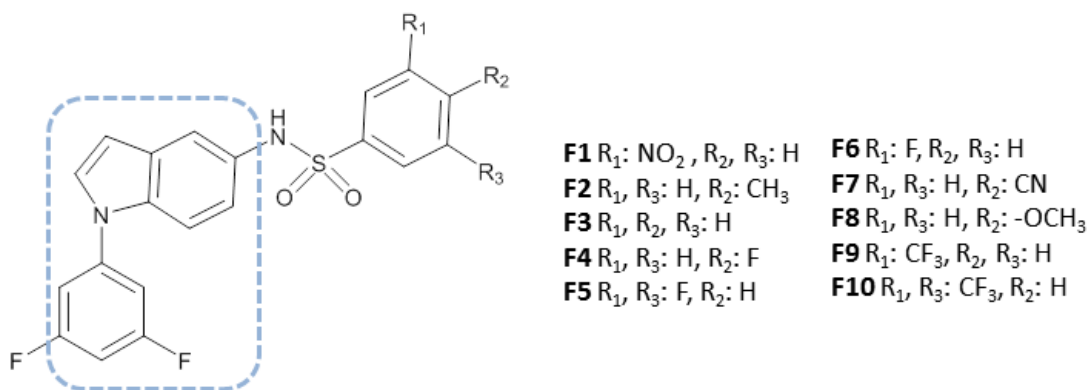
Όσο αφορά τη συγγένεια πρόσδεσης η εισαγωγή του -F στην **E6** δεν έφερε κάποια αλλαγή (K<sub>d</sub>: 2.42  $\mu$ M), η εισαγωγή του -NO<sub>2</sub> στην **E1** επέφερε μικρή μείωση (K<sub>d</sub>: 3.47  $\mu$ M) ενώ η εισαγωγή του -CF<sub>3</sub> στην **E9** οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας κατά 11 φορές σε σχέση με την **E3** (K<sub>d</sub>: 27.58  $\mu$ M). Αυτό σημαίνει ότι η εισαγωγή της *m*-τριφθορο-μεθυλομάδας στη φαινυλο-σουλφονυλομάδα είχε αρνητική επίδραση στη συγγένεια πρόσδεσης. Αντίστοιχα η εισαγωγή των υποκαταστατών -NO<sub>2</sub> και -F δεν επηρέασαν ιδιαίτερα τη λιποφιλικότητα ή τη συγγένεια πρόσδεσης. Στις ενώσεις **E2**, **E4**, **E7** και **E8** έχει γίνει *m*-υποκατάσταση της φαινυλο-σουλφονυλομάδας με -CH<sub>3</sub>, -F, -CN και -OCH<sub>3</sub> αντίστοιχα. Η λιποφιλικότητα των ενώσεων αυτών δεν εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις (clogP: 6.3-6.8) και είναι στα ίδια επίπεδα με αυτή της ένωσης **E3**. Ωστόσο η συγγένεια πρόσδεσης εμφανίζει μεγάλο εύρος: η **E8** είναι η πιο ενεργή (K<sub>d</sub>: 0.6 mM, 4.3 φορές καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης από την **E3**), η αμέσως επόμενη είναι η **E4** (K<sub>d</sub>: 3.3  $\mu$ M, 1.3 φορές λιγότερο ενεργή από την **E3**) και ακολουθούν η **E7** και **E2** (K<sub>d</sub>: 7.32 και 8.18  $\mu$ M). Επομένως σε αυτή την περίπτωση ο υποκαταστάτης -OCH<sub>3</sub> είναι ο πιο αποτελεσματικός. Στις ενώσεις **E5** και **E10** έχει γίνει διπλή υποκατάσταση στις *m*-θέσεις με -F και -CF<sub>3</sub> αντίστοιχα που οδήγησε σε αύξηση της λιποφιλικότητας (clogP: 6.8 και 8.6) σε σύγκριση τόσο με την **E3** όσο και με τις **E6** και **E9** που φέρουν μόνο

τον ένα εκ των δυο υποκαταστατών. Η συγγένεια πρόσδεσης μειώθηκε κατά 3.5 φορές για την **E5** ( $K_d$ : 8.89  $\mu\text{M}$ ) και κατά 11.5 φορές για την **E10** ( $K_d$ : 29.64  $\mu\text{M}$ ) σε σύγκριση πάντα με την **E3**. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι για την **E5** η εισαγωγή ενός επιπλέον υποκαταστάτη *m*-F σε σχέση με την **E6** είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγγένειας πρόσδεσης κατά 3.7 φορές.

Στη τρίτη ομάδα (**F1-F10**) το ινδόλιο φέρει δυο άτομα φθορίου στις *m*-θέσεις της φαινυλομάδας (Εικόνα 3.50). Η ένωση **F3** δεν φέρει κανένα υποκαταστάτη στις θέσεις  $R_1$ ,  $R_2$  και  $R_3$  και έχει  $\text{clogP}$ : 5.62 ενώ η συγγένεια πρόσδεσης είναι 4.5 φορές καλύτερη από του SPD304 ( $K_d$ : 1.2  $\mu\text{M}$ , Πίνακας 3.16). Στις ενώσεις **F1**, **F6** και **F9** έχουν εισαχθεί στην *m*-θέση της φαινυλο-σουλφονυλομάδας οι υποκαταστάτες  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{F}$  και  $-\text{CF}_3$  αντίστοιχα. Οι **F1** και **F6** έχουν παρόμοια λιποφιλικότητα ( $\text{clogP}$ : 5.9 και 6.0) που είναι λίγο υψηλότερη από αυτή της **F3** ενώ αυτή της **F9** ξεπερνάει και τις τρεις προηγούμενες ( $\text{clogP}$ : 6.9). Όσο αφορά τη συγγένεια πρόσδεσης η **F1** έρχεται πρώτη ( $K_d$ : 0.3  $\mu\text{M}$ ) και είναι 4.0 φορές πιο ενεργή από την **F3** και 17.9 φορές από το SPD304. Ακολουθεί η **F9** ( $K_d$ : 9.33  $\mu\text{M}$ ) που είναι 7.8 φορές λιγότερο ενεργή από την **F3**. Αυτό σημαίνει πως ο υποκαταστάτης *m*- $\text{NO}_2$  (ένωση **F1**) είναι ο πιο αποτελεσματικός. Επίσης η **F9** έχει κατά 7.8 φορές χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης από την **F3** που συνεπάγεται ότι η εισαγωγή του *m*-τριφθορο-μεθυλίου στη φαινυλο-σουλφονυλομάδα προκαλεί αύξηση της λιποφιλικότητας και μείωση της συγγένειας πρόσδεσης. Στις ενώσεις **F2**, **F4**, **F7** και **F8** έχει γίνει *m*-υποκατάσταση της φαινυλο-σουλφονυλομάδας με  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{F}$ ,  $-\text{CN}$  και  $-\text{OCH}_3$  αντίστοιχα. Η λιποφιλικότητα των ενώσεων αυτών δεν εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις ( $\text{clogP}$ : 5.7-6.1) και είναι ελαφρώς υψηλότερη από αυτή της ένωσης **F3** ( $\text{clogP}$ : 5.6). Επίσης παρατηρείται μείωση της συγγένειας πρόσδεσης με την **F8** να είναι 5.1 φορές λιγότερο ενεργή από την **F3** και τις **F2**, **F4** και **F7** να μην παρουσιάζουν κάποια ενεργότητα. Στις ενώσεις **F5** και **F10** έχει γίνει



διπλή υποκατάσταση στις *m*-θέσεις (με -F και -CF<sub>3</sub> αντίστοιχα) που οδήγησε σε αύξηση της λιποφιλικότητας σε σύγκριση με την **F3**. Η συγγένεια πρόσδεσης μειώθηκε κατά 10.9 φορές για την **F5** ενώ για την **F10** δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί επειδή δεν είναι διαλυτή.



Εικόνα 3.50. Δομές των ενώσεων **F1-F10**.

Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)	Ένωση	clogP	K <sub>d</sub> (μM)
<b>F1</b>	5.92	0.30	<b>F6</b>	5.98	19.91
<b>F2</b>	6.13	Μη ενεργή	<b>F7</b>	5.67	Μη ενεργή
<b>F3</b>	5.63	1.20	<b>F8</b>	5.81	6.13
<b>F4</b>	5.98	64.25	<b>F9</b>	6.95	9.33
<b>F5</b>	6.19	13.09	<b>F10</b>	7.98	Μη διαλυτή

Πίνακας 3.16. Λιποφιλικότητα (clogP) και συγγένεια πρόσδεσης (K<sub>d</sub>) των ενώσεων **F1-F10**.

Από όλα τα παραπάνω βλέπουμε ότι στη συγκεκριμένη σειρά 10 ενώσεις εμφάνισαν καλύτερη συγγένεια πρόσδεσης από το SPD304 με K<sub>d</sub> από 0.3 μM έως 3.47 μM (ενώσεις **D1**, **D6**, **D7**, **E1**, **E3**, **E4**, **E6**, **E8**, **F1**, **F3**). Από τους υποκαταστάτες που δοκιμάστηκαν ξεχώρισε η *m*-νιτρομάδα καθώς εμφάνισε το καλύτερο K<sub>d</sub> στις ομάδες D και F (0.73 μM και 0.3 μM αντίστοιχα) ενώ στην ομάδα E εμφάνισε παρόμοιο K<sub>d</sub> με τη μη υποκατεστημένη ένωση (**E3**). Οι υποκαταστάτες *m*-F, *p*-CN και *p*-OCH<sub>3</sub> σε ορισμένες περιπτώσεις (στις ομάδες D, D και E αντίστοιχα) βελτίωσαν σημαντικά τη συγγένεια πρόσδεσης. Στον

αντίποδα της *m*-νιτρομάδας βρίσκεται η *p*-μεθυλομάδα η οποία σε όλες τις περιπτώσεις οδήγησε σε σημαντική αύξηση του  $K_d$ .

### *3.4 Μελέτη του μηχανισμού πρόσδεσης με Ισόθερμη Θερμιδομετρία Τιτλοδότησης (ITC)*

Η αναστολή του TNF μέσω διάσπασης με μικρά μόρια δεν έχει μελετηθεί με την τεχνική της Ισόθερμης Θερμιδομετρίας Τιτλοδότησης (ITC) όπως συμβαίνει με την αναστολή από πρωτεϊνικά μόρια (αντισώματα και υποδοχείς) (Hoffmann et al., 2012) ή τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του TNF με άλλες πρωτεΐνες (Ye and Wu, 2000). Στο γεγονός αυτό ίσως να συντελεί και η αυξημένη πολυπλοκότητα της αναστολής του TNF με μικρά μόρια σε σχέση με την αναστολή του με πρωτεϊνικά μόρια. Η αναστολή με μικρά οργανικά μόρια περιλαμβάνει τόσο την ενδόθερμη διάσπαση του τριμερούς σε ένα μονομερές και ένα διμερές (heterodissociation) όσο και την εξώθερμη δημιουργία νέων δεσμών ανάμεσα στον αναστολέα και το διμερές (binding). Αντίθετα, στην αναστολή με αντισώματα ή υποδοχείς του TNF γίνεται μόνο πρόσδεση του αναστολέα στο τριμερές χωρίς αυτό να διασπάζεται.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης TNF και SPD304 με την τεχνική του ITC εστιάζει στην ανάλυση του μηχανισμού πρόσδεσης. Η μελέτη αυτή μπορεί να δώσει συμπληρωματικές πληροφορίες με την τεχνική του φθορισμού όπου ο στόχος είναι ο προσδιορισμός του  $K_d$ . Ο λόγος που για τον προσδιορισμό του  $K_d$  χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία φθορισμού και όχι το ITC ήταν η ευκολία στη χρήση και η εξοικονόμηση χρόνου αλλά και υλικού που η φασματοσκοπία φθορισμού προσφέρει.

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση των διαθέσιμων μοντέλων του προγράμματος Nanoanalyze Data Analysis (Version 2.3.6, NanoAnalyser TA

instruments <http://www.tainstruments.com/nano-itc/>). Καθώς η αναστολή του TNF από το SPD304 περιλαμβάνει τη διάσπαση ενός μονομερούς από το τριμερές και την πρόσδεση του SPD304 στο διμερές (He et al., 2005) δοκιμάστηκαν μοντέλα που σχετίζονται με σπάσιμο διμερούς (Dimer dissociation model), ανταγωνιστική υποκατάσταση (Competitive replacement) καθώς και ένα ανεξάρτητο μοντέλο (Independent model).

Η διαφορετική συνεισφορά που έχουν η ενθαλπία και η εντροπία στη διαμόρφωση του  $\Delta G$  της κάθε αντίδρασης ( $\Delta G = \Delta H - T(^{\circ}K) \cdot \Delta S$ ) αντικατοπτρίζουν τη διαφορετική επίδραση που έχει η δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης/αναστολέα στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs (G). Βασικοί παράγοντες που διαμορφώνουν τη συνεισφορά της ενθαλπίας στο  $\Delta G$  είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι αλληλεπιδράσεις van der Waals (δυνάμεις διπόλου διπόλου και δυνάμεις διασποράς London) και η δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Η συνεισφορά της εντροπίας στο  $\Delta G$  σχετίζεται με αλλαγές στους βαθμούς ελευθερίας του αναστολέα και των πλευρικών ομάδων της πρωτεΐνης και την απελευθέρωση μορίων διαλύτη από τις περιοχές πρόσδεσης. Η μεταβολή της ενθαλπίας ( $\Delta H$ ) οφείλεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια του αναστολέα, των διαλυτών και της πρωτεΐνης και εξαρτάται από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων των μορίων πρωτεΐνης και αναστολέα σε σχέση με τα μόρια του διαλύτη. Η μεταβολή της εντροπίας ( $\Delta S$ ) οφείλεται σε αλλαγές της διαμόρφωσης του αναστολέα, στη μετατόπιση των μορίων του διαλύτη από τις περιοχές πρόσδεσης ή στην απελευθέρωσή τους όταν ο αναστολέας εισέρχεται στη θέση πρόσδεσης.

Κατά τη μελέτη της αναστολής του TNF με τη μέθοδο ITC εμφανίστηκαν σοβαρά προβλήματα χαμηλής διαλυτότητας των μικρομοριακών αναστολέων. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις κατά την προετοιμασία πρωτεϊνικού διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης για τις ανάγκες του πειράματος ο TNF

εμφάνισε κατακρήμνιση η οποία φάνηκε να σχετίζεται με την παρουσία του συνδιαλύτη. Σε αντίθεση με τις μετρήσεις φασματοκοπίας φθορισμού όπου οι απαιτήσεις σε πρωτεΐνη κυμαίνονταν γύρω στο 1 μM, στις μετρήσεις ITC η συγκέντρωση του TNF ήταν πολύ υψηλότερη (έως 51 μM) και για τον λόγο αυτό σε ορισμένες περιπτώσεις εμφάνισε μειωμένη σταθερότητα. Το φαινόμενο αυτό ήταν ιδιαίτερα έντονο παρουσία 5% PEG3350 όπου τουλάχιστον το 50% της πρωτεΐνης κατακρημνίστηκε πριν την έναρξη του πειράματος. Αντίστοιχα η χαμηλή υδατική διαλυτότητα των αναστολέων (SPD304 και **10a**) οδήγησαν σε δοκιμές με ανεστραμμένη διάταξη: ενώ είθισται η πρωτεΐνη να βρίσκεται στο κελί και ο αναστολέας να τιτλοδοτείται σε αυτή, έγιναν πολλές δοκιμές με την αντίστροφη διάταξη για να μη χρειάζεται ο αναστολέας να βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο η τάση της πρωτεΐνης να κατακρημνίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρουσία συνδιαλύτη δεν επέτρεψε την αυξημένη συγκέντρωση αναστολέα στο κελί καθώς έπρεπε να τηρείται κατά προσέγγιση η αναλογία συγκεντρώσεων:

$$[\text{τιτλοδότης}]/[\text{τιτλοδοτούμενο διάλυμα}] = 10:1$$

Προσδιορίστηκαν οι θερμοδυναμικές παράμετροι (σταθερά διάσπασης  $K_d$ , στοιχειομετρία  $n$ , σταθερά σύνδεσης  $K_a$ , εντροπία  $\Delta S$ , ενθαλπία  $\Delta H$ ) είτε τιτλοδοτώντας τον TNF στο SPD304 (Πίνακας 3.17, Εικόνα 3.51) είτε τιτλοδοτώντας το SPD304 στον TNF (Πίνακας 3.18, Εικόνα 3.52).

Αν και στην περίπτωση του πειράματος 5 η αφαίρεση του λεγόμενου «τυφλού» πειράματος (δηλαδή η τιτλοδότηση του διαλύματος στον TNF) δεν είχε επιπτώσεις στην καμπύλη (Εικόνα 3.49B), στα υπόλοιπα πειράματα συνέβη το αντίθετο. Μετά την αφαίρεση του τυφλού τα δεδομένα δεν σχημάτιζαν πια καμπύλη οπότε δεν ήταν εφικτός ο υπολογισμός των φυσικοχημικών σταθερών. Για τον λόγο αυτό σε όλα τα πειράματα η αφαίρεση του «τυφλού» έγινε με την

αφαίρεση του μέσου όρου των τιμών των μετρήσεων που αποτελούν το πλατό της καμπύλης τιλοδότησης.

*ι. Τιλοδότηση TNF στον αναστολέα (SPD304, 10α)*

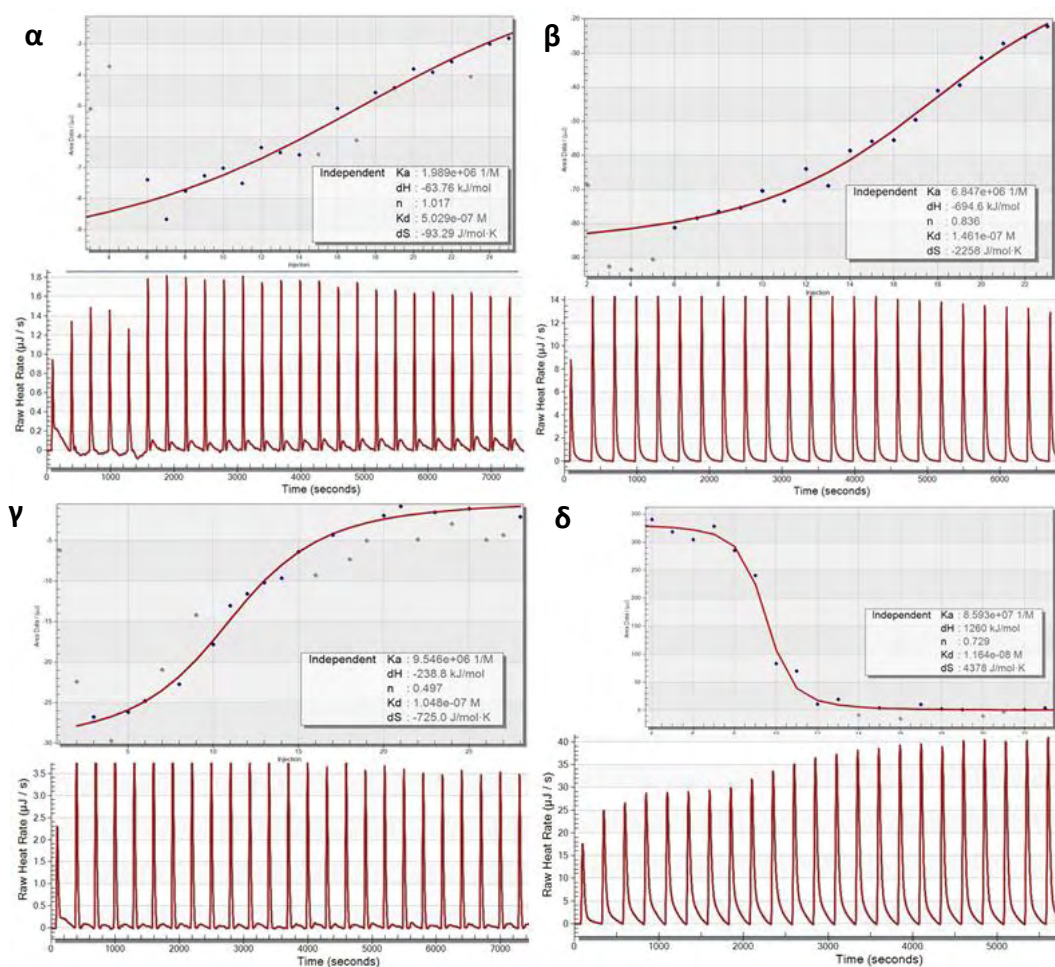
Όπως φαίνεται στον πίνακα υπάρχει διαφοροποίηση στις τιμές του  $K_d$  στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν (5°C, 17.5°C, 25°C). Κάτι τέτοιο δεν είναι περίεργο καθώς η τεχνική ITC μετράει τη μεταβολή της ενθαλπίας ( $\Delta H$ ), ένα μέγεθος που μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία.

Το  $K_d$  που μετρήθηκε για το SPD304 στους 25°C είναι  $5.029 \cdot 10^{-7}$  M (Εικόνα 3.51A, Πίνακας 3.17). Η αντίστοιχη τιμή για την τεχνική της φθορισμομετρίας είναι  $5.360 \cdot 10^{-6}$  M, είναι δηλαδή περίπου 10 φορές μεγαλύτερη. Τέτοιες αλλά και πολύ μεγαλύτερες διαφορές έχουν παρατηρηθεί ξανά κατά τη μέτρηση του  $K_d$  με διαφορετικές τεχνικές (Benyamini and Friedler, 2011). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η μέτρηση με την τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού να δίνει τιμές  $K_d$  μεγαλύτερες κατά 15 φορές από αυτές του ITC (Ranok et al., 2015). Αυτό μπορεί να αντικατροπτρίζει τον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο οι δύο μέθοδοι καταγράφουν τη διάσπαση του μονομερούς και την πρόσδεσης του αναστολέα. Στις μετρήσεις φθορισμού τυροσινικά κατάλοιπα που βρίσκονται στην περιοχική πρόσδεσης αποσβαίνουν εκπέμποντας σήμα φθορισμού κατά την τιλοδότηση με αναστολέα. Από την άλλη μεριά, κατά τις δοκιμές με ITC καταγράφονται όλες οι αλληλεπιδράσεις (Ranok et al., 2015) όπως διάσπαση δεσμών μονομερούς με διμερές, απελευθέρωση μονομερούς στο διάλυμα, δημιουργία δεσμών ανάμεσα σε διμερές και αναστολέα κλπ. Μια ακόμη πολύ σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δυο τεχνικές είναι ότι στην τιλοδότηση φθορισμού γίνεται μια στιγμιαία μέτρηση ανά ένεση αφού έχει επέλθει κάποια ισορροπία στο δείγμα. Στην περίπτωση του ITC η τιλοδότηση γίνεται εντελώς

αυτόματα πράγμα που επιτρέπει τη συνεχή μέτρηση του σήματος καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Πείραμα	$\Theta$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$C_{\text{αναστολέα}}$ ( $\mu\text{M}$ )	TNF ( $\mu\text{M}$ )	$K_d$ (M)	n	$K_a$ (1/M)	$\Delta S$ (kJ/mol*K)	$-T*\Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)
1	25	SPD/3.35	31.0	$5.029*10^{-7}$	1.017	$1.989*10^6$	-0.093	27.820	-63.76	-35.940
2	17.5	SPD/3.35	24.8	$1.461*10^{-7}$	0.836	$6.847*10^6$	-2.258	656.290	-694.6	-38.310
3	5	SPD/3	24.8	$1.048*10^{-7}$	0.497	$9.546*10^6$	-0.725	201.660	-238.8	-37.190
4	25	10a/3.4	51.3	$1.164*10^{-8}$	0.729	$8.593*10^7$	4.378	-1305.300	1260	-45.300

**Πίνακας 3.17.** Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης του SPD304 με τον TNF σε διαφορετικές θερμοκρασίες ( $5^{\circ}\text{C}$ ,  $17.5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ) και του 10a με τον TNF στους  $25^{\circ}\text{C}$  όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ITC τιτλοδοτώντας την πρωτεΐνη στον αναστολέα.



**Εικόνα 3.51.** Τιτλοδότηση TNF σε SPD304 στους  $\alpha$ .  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $\beta$ .  $17.5^{\circ}\text{C}$ ,  $\gamma$ .  $5^{\circ}\text{C}$  και  $\delta$ . σε 10a στους  $25^{\circ}\text{C}$ .

Μετρήθηκε επίσης το  $K_d$  της ένωσης **10a** και βρέθηκε ίσο με  $1.164 \cdot 10^{-8}$  M (Εικόνα 3.51Δ). Η αντίστοιχη τιμή στην ίδια θερμοκρασία με την τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού είναι πολύ μεγαλύτερη:  $1.61 \cdot 10^{-6}$  M.

Βάσει των δεδομένων του Πίνακα 3.17, με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση του  $n$ . Εδώ θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι η τιμή του  $n$  ταυτίζεται με τη στοιχειομετρία της αντίδρασης μόνο όταν οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων είναι σωστές και τα αντιδρώντα 100% ενεργά.

Ένας τρόπος να εκφραστεί το  $n$  είναι ο εξής:

$$n = St \times AF_{\text{κυψελίδα}} / AF_{\text{σύριγγα}} \text{ (I)}$$

AF: [ενεργό]/[συνολικό]

St: στοιχειομετρία (αριθμός περιοχών πρόσδεσης)

$AF_{\text{κυψελίδα}}$ : κλάσμα ενεργής ουσίας στην κυψελίδα

$AF_{\text{σύριγγα}}$ : κλάσμα ενεργής ουσίας στη σύριγγα

Καθεμία από τις τρεις αυτές τιμές ( $St$ ,  $AF_{\text{κυψελίδα}}$  και  $AF_{\text{σύριγγα}}$ ) μπορεί να αλλάξει το  $n$  πράγμα που σημαίνει ότι στο  $n$  αντικατοπτρίζεται τόσο η στοιχειομετρία όσο και η ενεργότητα-διαλυτότητα των δειγμάτων. Δυο από τις παραπάνω τιμές πρέπει να είναι γνωστές (ή να θεωρηθούν γνωστές) έτσι ώστε να βρεθεί η τρίτη τιμή ( $St$ ,  $AF_{\text{κυψελίδα}}$ ,  $AF_{\text{σύριγγα}}$ ). Έτσι λαμβάνοντας υπόψη για παράδειγμα το πείραμα 1, οι δοθείσες συγκεντρώσεις των αντιδρώντων είναι 31  $\mu$ M μονομερούς της πρωτεΐνης (σύριγγα), 3.35  $\mu$ M αναστολέα (κελί) και  $n=1.017$ . Θεωρητικά η στοιχειομετρία της αντίδρασης (αναστολέας : πρωτεΐνη) θα μπορούσε να είναι είτε 1:1 ( $n=1$ ) είτε 2:1 ( $n=2$ ) αλλά δεν θα μπορούσε να πάρει κάποια ενδιάμεση τιμή (1.017). Στο πείραμα 1 προφανώς η μια ή και οι δυο συγκεντρώσεις δεν είναι απόλυτα ακριβείς ή τα αντιδρώντα δεν είναι 100% ενεργά. Αυτό πρακτικά σημαίνει είτε ότι η πρωτεΐνη δεν είναι 100% ενεργή είτε ότι κάποια ποσότητα των αντιδρώντων έχει κατακρημνιστεί. Καθώς οι

υπολογισμένες συγκεντρώσεις [SPD304] και [TNF] ήταν παρόμοιες για όλα τα πειράματα του Πίνακα 3.17, η μείωση του  $n$  πιθανώς να οφείλεται σε κάποια μείωση της συγκέντρωσης του SPD304 με τη θερμοκρασία. Η μείωση της συγκέντρωσης του αναστολέα εξηγείται από την ενδεχόμενη διαφορά ανάμεσα στη μετρούμενη συγκέντρωση SPD304 στους 25°C, λίγο πριν την έναρξη του πειράματος ITC και τη συγκέντρωσή του κατά τη διάρκεια της συλλογής των δεδομένων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπου πιθανότατα να μειώνεται η διαλυτότητα του αναστολέα και να κατακρημνίζεται μερικώς.

Στα πειράματα 1 έως 3 η αλληλεπίδραση του SPD304 με τον TNF είναι αυθόρμητη ( $\Delta G < 0$ ) και εξώθερμη ( $\Delta H < 0$ ). Η εντροπία μειώνεται ( $\Delta S < 0$ ) πιθανότατα εξαιτίας της μείωσης των βαθμών ελευθερίας του SPD304 σαν αποτέλεσμα της πρόσδεσής του στον TNF. Επίσης σε όλες τις περιπτώσεις η συνεισφορά της ενθαλπίας στο  $\Delta G$  είναι μεγαλύτερη από τη συνεισφορά της εντροπίας ( $|\Delta H| > |-T*\Delta S|$ ) και επομένως η αντίδραση καθοδηγείται από την ενθαλπία.

Η πρόσδεση του αναστολέα **10a** στον TNF είναι αυθόρμητη ( $\Delta G < 0$ ) και ενδόθερμη ( $\Delta H > 0$ ). Η εντροπία αυξάνεται ( $\Delta S > 0$ ) πράγμα που ίσως οφείλεται στην κάλυψη υδρόφοβων ομάδων του αναστολέα στην πρωτεϊνική τσέπη καθώς και στην απελευθέρωση μορίων διαλυτή από τον αναστολέα. Η αντίδραση καθοδηγείται από τη συνεισφορά της εντροπίας ( $|\Delta H| < |-T*\Delta S|$ ).

#### *ii. Τιτλοδότηση αναστολέα (SPD304) στον TNF*

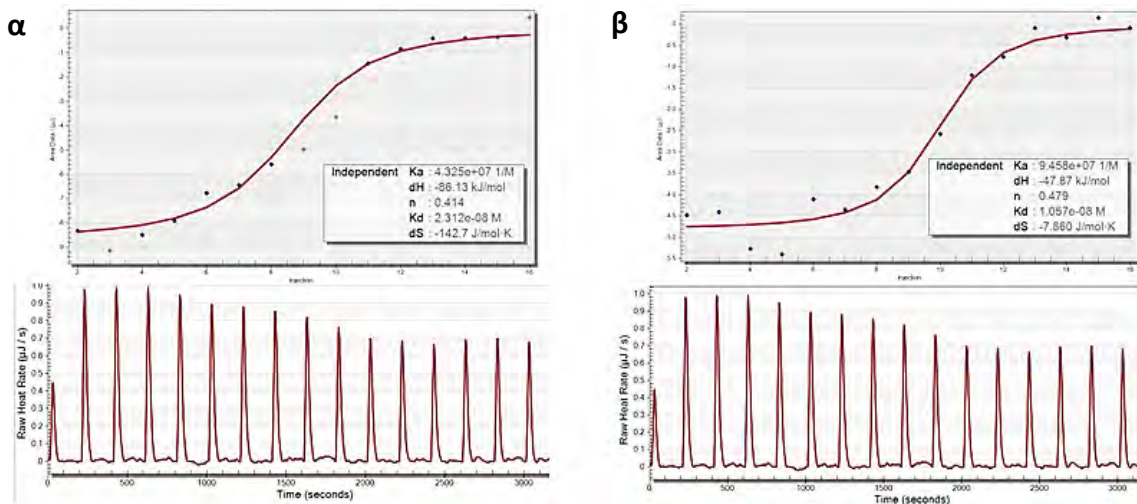
Έγινε τιτλοδότηση του SPD304 στον TNF στους 25°C. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με δυο τρόπους: α. χωρίς την αφαίρεση του πειράματος του τυφλού (τιτλοδότηση SPD304 σε διάλυμα) και β. με την αφαίρεση του πειράματος του τυφλού (Πίνακας 3.18, Εικόνα 3.52).



Πείραμα	[SPD] ( $\mu\text{M}$ )	[TNF] ( $\mu\text{M}$ )	Πείραμα τυφλού	$K_d$ (M)	n	$K_a$ (1/M)	$\Delta S$ (kJ/mol*K)	$-T*\Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)
5 (α)	20	2	Όχι	$2.312*10^{-8}$	0.414	$4.325*10^7$	-0.143	42.640	-86.130	-43.490
5 (β)	20	2	Ναι	$1.057*10^{-8}$	0.479	$9.458*10^7$	-0.0079	2.344	-47.870	-45.526

**Πίνακας 3.18.** Θερμοδυναμικές παράμετροι της πρόσδεσης του SPD304 στον TNF σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ITC.

Στο πείραμα 5 η αντίδραση είναι αυθόρμητη ( $\Delta G < 0$ ) και εξώθερμη ( $\Delta H < 0$ ). Η εντροπία μειώνεται ( $\Delta S < 0$ ) και στις δυο περιπτώσεις επεξεργασίας τυφλού (5α και 5β) ενδεχομένως λόγω της μείωσης των βαθμών ελευθερίας του SPD304 και η αντίδραση καθοδηγείται από την ενθαλπία ( $|\Delta H| > |-T*\Delta S|$ ). Η διαφοροποίηση του  $K_d$  δεν είναι μεγάλη ( $1.057*10^{-8}$  -  $2.312*10^{-8}$ ).



**Εικόνα 3.52.** Τιτλοδότηση SPD304 σε TNF σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στους 25°C: α. 20  $\mu\text{M}$ , β. 20  $\mu\text{M}$  με αφαίρεση του τυφλού πειράματος.

### iii. Επεξεργασία δεδομένων

Παρακάτω φαίνεται η επιρροή που είχαν διάφοροι παράγοντες στην προσαρμογή της καμπύλης στα δεδομένα:

1. Επιρροή τιμής n. Κατά την επεξεργασία των δεδομένων ITC υπάρχουν δυο προσεγγίσεις όσο αφορά την τιμή του n:

α. Ο ορισμός του  $n$  από τον χρήστη στις αναμενόμενες θεωρητικές τιμές ( $n=0.5$  και  $n=2$  για τιτλοδότηση SPD304 σε TNF και TNF σε SPD304 αντίστοιχα) πριν την επεξεργασία των δεδομένων οδήγησε σε κακή προσομοίωση της καμπύλης.

β. Ο ορισμός του  $n$  από το λογισμικό. Αντίθετα, όταν το ίδιο το λογισμικό υπολόγιζε τις τιμές του  $n$  βάσει των μετρήσεων, η καμπύλη είχε καλύτερη προσαρμογή.

2. Επιρροή υπολογιστικού μοντέλου. Δοκιμάστηκαν τα εξής υπολογιστικά μοντέλα:

α. Independent

β. Competitive replacement

γ. Dimer dissociation

Από τα παραπάνω μοντέλα μόνο το Independent έδωσε καμπύλες ικανοποιητικά προσαρμοσμένες στα δεδομένα για την πλειοψηφία των πειραμάτων. Αντίθετα η προσαρμογή των καμπυλών που έδωσαν τα μοντέλα Competitive replacement και Dimer dissociation δεν ήταν καλή.

3. Επιρροή διάταξης. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στη διάταξη της τιτλοδότησης (δηλ. αν ο τιτλοδότης είναι η πρωτεΐνη ή ο αναστολέας) και την προσαρμογή των καμπυλών. Αμφότερες οι διατάξεις έδωσαν καμπύλες αρκετά καλά προσαρμοσμένες στα δεδομένα (Εικόνες 3.51, 3.52).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακες 3.17, 3.18), το εύρος τιμών του  $K_d$  είναι:

A. Για τιτλοδότηση του TNF στο SPD304 σε διαφορετικές θερμοκρασίες:

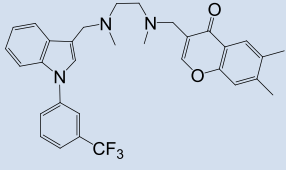
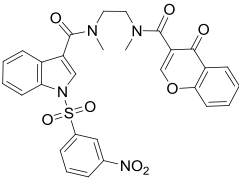
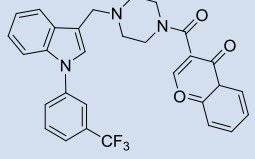
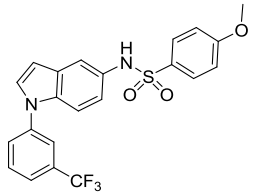
$1.048 \cdot 10^{-7} \text{ M} - 5.029 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

B. Για τιτλοδότηση του SPD304 στον TNF:  $2.312 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

Συνολικά το εύρος τιμών του  $K_d$  κυμαίνεται από  $2.312 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  έως  $5.029 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  δηλαδή 23 nM – 503 nM.

### 3.5 Κρυστάλλωση συμπλόκου TNF με αναστολείς

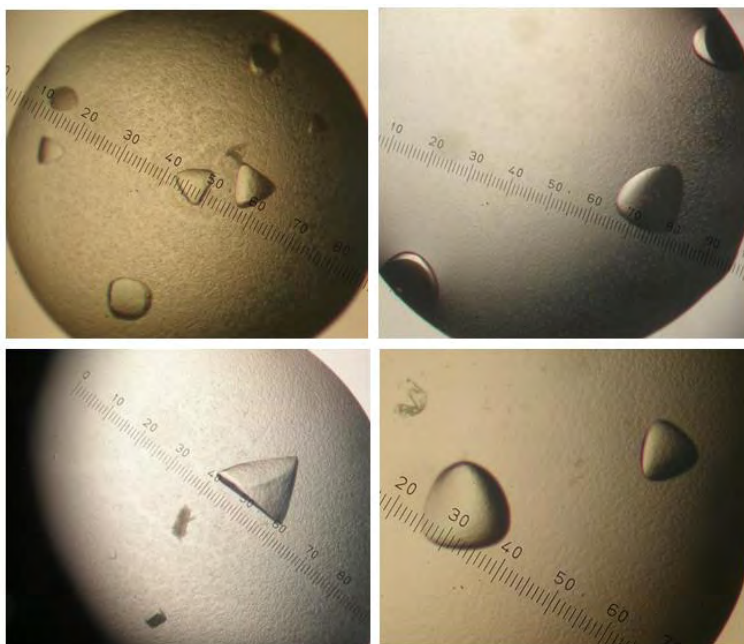
Σκοπός των κρυσταλλογραφικών δοκιμών είναι η διερεύνηση του τρόπου πρόσδεσης των αναστολέων στο μόριο του TNF. Οι ενώσεις **4c**, **10a** και **E8** που χρησιμοποιήθηκαν ως προσδέτες στις συγκρυσταλλώσεις με τον TNF αναδείχθηκαν μέσα από μελέτες πρόσδεσης και τοξικότητας (Paraneophytou et al., 2015) που προηγήθηκαν (Πίνακας 3.19).

Ένωση	Δομή	Συγγένεια πρόσδεσης στον TNF ( $K_d$ , $\mu\text{M}$ )	Αναστολή του TNF* (IC50, $\mu\text{M}$ ) <small>*κυτταρικός θάνατος σε L929 κύτταρα επαγόμενος από τον TNF</small>
SPD304		$5.36 \pm 0.21$	$5.0 \pm 1.5$
4c		$3.16 \pm 0.21$	$20.0 \pm 1.6$
10a		$1.61 \pm 0.15$	$10.0 \pm 0.9$
E8		$0.6 \pm 0.1$	-

**Πίνακας 3.19.** Αποτελέσματα των μελετών πρόσδεσης ( $K_d$ ) και τοξικότητας (IC50) των ενώσεων που επιλέχθηκαν για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Αρχικά έγιναν δοκιμές κρυστάλλωσης (συνολικά 130 συνθήκες) γύρω από τις συνθήκες κρυστάλλωσης που έχουν δημοσιευτεί (He et al., 2005). Στις συνθήκες αυτές δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις Sodium Formate (2.0-

3.0 M) σε διαφορετικά pH (7.0-7.5). Η συγκέντρωση του διμερούς του TNF ήταν 0.438 mM (μέτρηση με NanoDrop™, Thermofisher). Η υπολογισμένη συγκέντρωση του αναστολέα SPD304 ήταν 0.875 mM πράγμα που σημαίνει ότι ο αναστολέας ήταν σε περίσσεια σε σχέση με το διμερές. Στις περισσότερες σταγόνες του screen εμφανίστηκαν κρύσταλλοι μετά από περίπου τρεις εβδομάδες και έφτασαν στο τελικό τους μέγεθος το οποίο έφτανε μέχρι και τα 600 μm, περίπου στις τέσσερις εβδομάδες. Το σχήμα τους ήταν είτε σφαιρικό είτε τριγωνικό (Εικόνα 3.53). Κάθε σταγόνα περιείχε 1-1.5 μL συμπλόκου TNF/SPD304 και 0.5-1.0 μL μητρικού υγρού.



**Εικόνα 3.53.** Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι του TNF με το SPD304 μεγέθους 200-600 μm που προέκυψαν από το αναλυτικό screen των συνθηκών κρυστάλλωσης (2.5 M Sodium Formate, pH 7.5).

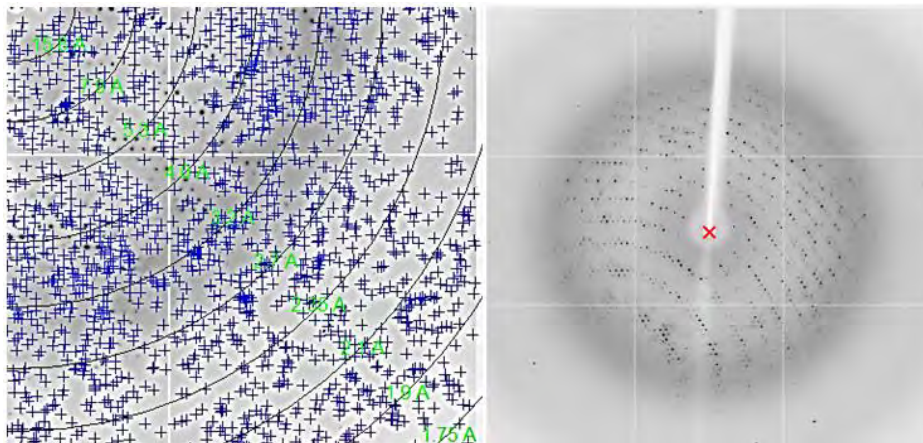
Κατόπιν μέτρησης με περιθλάση ακτίνων X διαπιστώθηκε ότι οι κρύσταλλοι είναι πρωτεϊνικοί και σκεδιάζουν ικανοποιητικά σε ευκρίνεια 1.9-2.0 Å (Εικόνα 3.54). Για την ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υπολογιστικά προγράμματα: α) CCP4 για τη μοριακή αντικατάσταση (molecular replacement), β) Phenix και γ) Refmac για τη βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού μοντέλου έναντι των δεδομένων

περίθλασης ακτίνων X ενώ για την προβολή και την μη αυτοματοποιημένη επεξεργασία των ηλεκτρονιακών χαρτών έγινε χρήση του Coot molecular graphics.

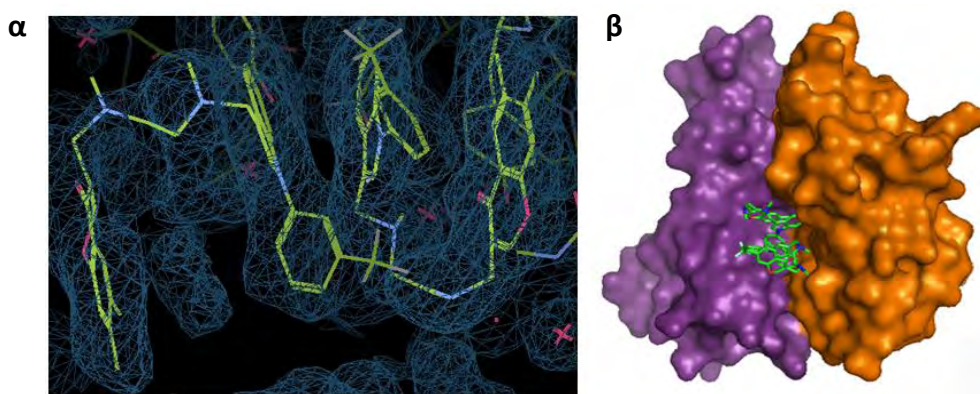
Η ανάλυση των δεδομένων που συλλέχθηκαν έδειξε ότι η δομή του συμπλόκου TNF/SPD304 είναι ταυτόσημη με την ήδη δημοσιευμένη (Pdb ID: 2AZ5). Ωστόσο όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.55 δίπλα στο πρώτο μόριο του SPD304 -το οποίο παρουσιάζεται και στην 2AZ5 δομή (He et al., 2005)- εμφανίζεται επιπλέον ηλεκτρονιακή πυκνότητα η οποία ήταν κενή και στην οποία τοποθετήθηκε ένα δεύτερο μόριο SPD304. Το δεύτερο μόριο του SPD304 φαίνεται να αλληλεπιδρά κυρίως με το έτερο μόριο SPD304 και λιγότερο με την πρωτεΐνη. Η επεξεργασία των δεδομένων έδωσε τα παρακάτω χαρακτηριστικά (Πίνακας 3.20, Στήλη «Δομή TNF/SPD304»):

	Δομή TNF/SPD304	Δομή TNF/SPD304 (He et al.)
Ανάλυση	1.9 Å	2.1 Å
Ομάδα συμμετρίας χώρου (spacegroup)	R 3 2 :H	H 3
Μοναδιαία κυψελίδα (unit cell)	166.17, 166.17, 64.14 (Å)	165.25, 165.25, 63.73(Å)
	90, 90, 120 (°)	90, 90, 120 (°)
R-Value Free	0.253	0.278
R-Value Work	0.201	0.220
RMS (angles)	1.180	1.396
RMS (bonds)	0.007	0.008

**Πίνακας 3.20.** Χαρακτηριστικά μεγέθη των δομών του συμπλόκου TNF/SPD304.



**Εικόνα 3.54.** Εικόνες περίθλασης κρυστάλλων του συμπλόκου TNF/SPD304.



**Εικόνα 3.55. α.** Τα δυο μόρια του SPD304 στον ηλεκτρονικό χάρτη που προέκυψε από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν και **β.** η δομή του συμπλόκου βάσει του χάρτη αυτού.

Οι κρύσταλλοι που προέκυψαν από τα αναλυτικά screens κρυσταλλώσεων του TNF με το SPD304 υπεβλήθησαν σε μελέτες εμποτισμού (soaking studies) που στόχευαν στην αντικατάσταση του αναστολέα SPD304 με τους νέους αναστολείς του TNF μέσα στον ήδη σχηματισμένο κρύσταλλο. Έγιναν εκτεταμένες προσπάθειες που περιλάμβαναν παραμονή των κρυστάλλων σε διαλύματα των νέων αναστολέων για διαφορετική χρονική διάρκεια: 0', 30', 16 ώρες, 1 μέρα και 5 μέρες στους 20°C (Πίνακας 3.21).

Αναστολέας	Χρόνος soaking κρυστάλλου	Προσθήκη κρυσπροστατευτικού	Σκέδαση
<b>4c</b>	0'	-	Καλή
<b>10a</b>	0'	-	Κακή
<b>4c</b>	30'	20% γλυκερόλη	Καλή
<b>4c</b>	30'	-	Μέτρια
<b>10a</b>	30'	-	Καλή
<b>4c*</b>	16 ώρες	-	Καλή
<b>4c</b>	16 ώρες	20% αιθυλενογλυκόλη	Μέτρια
<b>4c</b>	24 ώρες	20% γλυκερόλη	Μέτρια
<b>4c</b>	24 ώρες	20% γλυκερόλη	Κακή
<b>4c</b>	24 ώρες	20% γλυκερόλη	Κακή
<b>4c</b>	5 μέρες	-	Καλή
<b>10a*</b>	5 μέρες	20% αιθυλενογλυκόλη	Μέτρια
<b>4c</b>	5 μέρες	20% αιθυλενογλυκόλη	Κακή
<b>10a</b>	5 μέρες	-	Κακή

**Πίνακας 3.21.** Σύνοψη μελετών εμποτισμού των κρυστάλλων TNF/SPD304 με τους νέους αναστολείς.

Κατά τις δοκιμές εμποτισμού οι κρύσταλλοι τοποθετήθηκαν αρχικά σε σταγόνες του μητρικού υγρού (mother liquor) όπου παρέμειναν για μια ώρα. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι μεταφέρθηκαν σε σταγόνες με έως και 3.3 mM επιθυμητού αναστολέα όπου και παρέμειναν για τα χρονικά διαστήματα που προαναφέρθηκαν. Σε ορισμένες περιπτώσεις πριν την κατάψυξη των κρυστάλλων σε υγρό άζωτο προστέθηκε 20% v/v γλυκερόλη ή αιθυλενογλυκόλη. Για τους αναστολείς **4c** και **10a** έγινε επίσης προσθήκη διαλύματος αναστολέα (τελική συγκέντρωση 0.3 mM) σε σταγόνες κρυστάλλων του συμπλόκου TNF/SPD304 σε 2.5 M Sodium Formate, pH 7.5. Οι κρύσταλλοι παρέμειναν στο διάλυμα για 24 ώρες και μετρήθηκαν παρουσία 20% v/v γλυκερόλης αλλά δεν έδωσαν καλή σκέδαση.

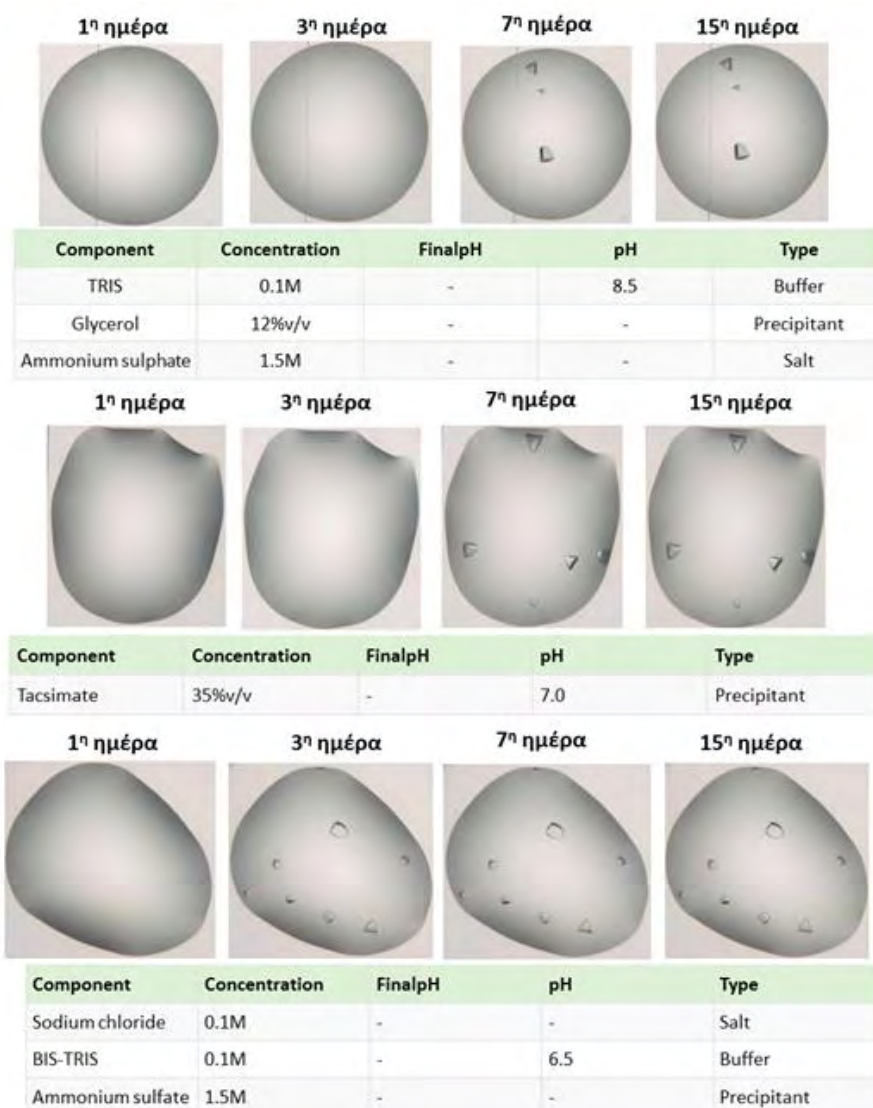
Στη συνέχεια μια σειρά εμποτισμένων κρυστάλλων μετρήθηκαν με συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων X στον σταθμό FIP-BM30A του ESRF. Στις επισημασμένες περιπτώσεις (\*) του Πίνακα 3.20, έγινε συλλογή

δεδομένων. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι εν τέλει το SPD304 παρέμενε προσδεμένο στον TNF χωρίς ο νέος αναστολέας να έχει εισχωρήσει στους κρυστάλλους, ούτε ακόμα και σε μικρούς πληθυσμούς καθώς η προκαταρκτική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι υπήρχε ένας μόνο πληθυσμός. Συνεπώς η δομή που προέκυψε ήταν ταυτόσημη με εκείνη που μετρήθηκε για τους κρυστάλλους που δεν είχαν υποβληθεί σε εμποτισμό.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.20, ο χρόνος επώασης δεν παίζει κάποιο ρόλο στην ποιότητα της σκέδασης. Ωστόσο, η χρήση κρυστοπροστατευτικού (20% αιθυλενογλυκόλη ή 20% γλυκερόλη) στο 50% των περιπτώσεων δίνει κακή σκέδαση, στο 37.5% μέτρια και μόνο στο 12.5% των περιπτώσεων δίνει καλή σκέδαση. Έγινε επίσης προσθήκη μικροκρυστάλλων TNF/SPD304 σε διαλύματα των νέων αναστολέων (crystal microseeding) έτσι ώστε να δράσουν σαν πυρήνες κρυστάλλωσης, χωρίς όμως επιτυχία.

Παράλληλα έγιναν δοκιμές συγκρυστάλλωσης του SPD304 και των αναστολέων **4a**, **10a** και **E8**, όπου δοκιμάστηκαν συνολικά έξι screens έτοιμων διαλυμάτων των 96 συνθηκών έκαστο (συνολικά 576 συνθήκες): Index HT (Hampton Research), JCSG plus και The Pact – premier (Molecular Dimensions), Wizard Classic (Rigaku), The Classics suite και The PEGs suite (Qiagen/Nextal). Οι συγκρυσταλλώσεις έδωσαν κάποιες νέες συνθήκες για την κρυστάλλωση του συμπλόκου TNF/SPD304 (Εικόνα 3.56). Οι κρύσταλλοι αυτοί άρχισαν να εμφανίζονται μετά από 3-7 μέρες και η μέτρησή τους με ακτίνες-X έδειξε ότι ήταν πρωτεϊνικοί και σκέδαζαν μέχρι τα 2.5 Å.





**Εικόνα 3.56.** Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι του συμπλόκου TNF/SPD304 που προέκυψαν από τις συγκρυσταλλώσεις σε νέες συνθήκες με τη χρήση έτοιμων διαλυμάτων.

Τέλος κρυσταλλικό μόρφωμα εμφανίστηκε σε μια από τις δοκιμές συγκρυστάλλωσης του αναστολέα **10a** με τον TNF (1.9M malonate, pH 6.0). Λόγω του πολύ μικρού μεγέθους του κρυστάλλου και του εκτεταμένου διαχωρισμού φάσεων που υπήρχε στη σταγόνα δεν ήταν δυνατή η τοποθέτησή του σε βρόχο για να γίνει συλλογή μιας πλήρους σειράς δεδομένων. Ο κρύσταλλος μετρήθηκε *in situ* (δηλαδή μέσα στο πιάτο κρυσταλλώσεων) με ακτίνες X και τα δεδομένα έδειξαν ότι ήταν πρωτεϊνικός. Έγινε προσπάθεια για αναπαραγωγή των συνθηκών. Δοκιμάστηκαν περίπου 48 συνθήκες γύρω από τη

συνθήκη κρυστάλλωσης και 48 επιπλέον συνθήκες με έτοιμα πρόσθετα διαλύματα που υποβοηθούν τη διαδικασία της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνικών μορίων (Additive Screen HR2-428, Hampton Research) χωρίς όμως επιτυχία.

## *Συμπεράσματα*

Στο πλαίσιο της ανακάλυψης νέων μικρομοριακών αναστολέων για τον TNF εξετάστηκαν συνολικά επτά σειρές αναλόγων του SPD304 (συνολικά 86 ενώσεις), μια σειρά εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων (30 ενώσεις) και μια σειρά βασισμένη σε ένα νέο δομικό μοτίβο (30 ενώσεις). Περίπου το 76% των ενώσεων αυτών εμφάνισε από μέτρια έως σοβαρά προβλήματα διαλυτότητας σε υδατικά διαλύματα με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να υποβληθούν σε μελέτες πρόσδεσης.

Οι μελέτες για την ενίσχυση της διαλυτότητας που ακολούθησαν βασίστηκαν στην προσθήκη συνδιαλυτών και τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου διάλυσης με αποτέλεσμα το παραπάνω ποσοστό να μειωθεί σε 20%. Όσο αφορά το πρωτόκολλο διάλυσης, η μελέτη των βασικών παραγόντων που επηρεάζουν τη διαλυτότητα (αρχική κατάσταση ουσίας και συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας, χρόνος διάλυσης και φιλτράρισμα δειγμάτων) έδειξαν ότι: α. μέσα σε 10-14 ώρες διάλυσης η συγκέντρωση των περισσότερων ενώσεων είχε φτάσει σε ικανοποιητικά επίπεδα (40–50  $\mu\text{M}$ ), β. σε όλες τις περιπτώσεις η κινητική διαλυτότητα ήταν υψηλότερη από τη θερμοδυναμική από 1.4 έως 12.6 φορές και το DMSO (5%) ήταν πιο αποτελεσματικό στην ενίσχυση της κινητικής από ό,τι της θερμοδυναμικής διαλυτότητας, γ. το φιλτράρισμα επιπλέον της φυγοκέντρωσης δεν έδωσε σημαντικές και επαναλήψιμες διακυμάνσεις στη μετρούμενη διαλυτότητα. Έγινε σύγκριση των τεχνικών UV και HPLC για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών όπου φάνηκε ότι τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων ήταν σε αρκετά καλή συμφωνία και ότι η HPLC μέθοδος τείνει να δίνει ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές από την UV μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στις υπόλοιπες μελέτες.

Οι συνδιαλύτες που δοκιμάστηκαν ήταν το DMSO, η PEG3350, το cremophor και η β-κυκλοδεξτρίνη. Ωστόσο η αξιολόγηση της επίδρασης των συνδιαλυτών στις *in vitro* βιολογικές δοκιμές έδειξε ότι το cremophor επηρεάζει την πρωτεΐνη και δεν είναι κατάλληλο για αυτή τη χρήση. Αντίθετα οι υπόλοιποι συνδιαλύτες (DMSO, PEG3350, και β-κυκλοδεξτρίνη) βρέθηκε ότι δεν επηρεάζουν σημαντικά την πρωτεΐνη ούτε τις βιολογικές δοκιμές και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες ενίσχυσης διαλυτότητας. Επίσης τροποποιήθηκε το πρωτόκολλο των μελετών πρόσδεσης έτσι ώστε το ποσοστό του συνδιαλύτη να μπορεί να φτάνει μέχρι και 50% στο διάλυμα του τιλοδοτή και μέχρι 5% στο τιλοδοτούμενο διάλυμα. Οι μελέτες αξιολόγησης και ενίσχυσης της διαλυτότητας ανέδειξαν το DMSO (5%) σαν ένα πολύ καλά ανεκτό διαλύτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πρώτα βήματα ενίσχυσης της διαλυτότητας. Για λιγότερο διαλυτές ουσίες η PEG3350 (5%) ήταν αρκετά αποτελεσματική καθώς στο 87.5% των περιπτώσεων αποδείχτηκε κατά 86.0% πιο αποτελεσματική από το DMSO (5%). Τέλος για τις εξαιρετικά αδιάλυτες ενώσεις έγινε χρήση της β-κυκλοδεξτρίνης η οποία σε ποσοστό 5% βρέθηκε έως και 260 φορές πιο αποτελεσματική από το DMSO (5%) και την PEG3350 (5%). Ωστόσο δεν είναι το ίδιο συμβατή με την πρωτεΐνη και τις βιολογικές δοκιμές. Για τον λόγο αυτό κατόπιν δοκιμών το ασφαλές ποσοστό της στο τιλοδοτούμενο διάλυμα κατά το τέλος της τιλοδοτήσεως ορίστηκε στο 2%.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο διάλυσης παρουσία 5% DMSO που συνίσταται για τη μέτρηση της υδατικής διαλυτότητας μικρών μορίων με τάση προς υδροφοβικότητα. Ακολούθησε μέτρηση της διαλυτότητας του SPD304 και 54 αναλόγων του σε 5% DMSO ακολουθώντας το βελτιστοποιημένο αυτό πρωτόκολλο και στα δεδομένα αυτά βασίστηκε η ανάπτυξη ενός επικυρωμένου QSPR μοντέλου πρόβλεψης υδατικής διαλυτότητας παρουσία 5% DMSO (Novamechanics).

Για τις μελέτες πρόσδεσης σχεδιάστηκε και παράχθηκε μια νέα κατασκευή του TNF (D86-L233) που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μελέτες που ακολούθησαν. Οι μελέτες πρόσδεσης έδειξαν ότι 30 από τις ενώσεις που μελετήθηκαν εμφάνισαν δραστικότητα καλύτερη εκείνης του SPD304 (<5μM) και 20 ενώσεις εφάμιλλη του SPD304 δραστικότητα. Οι δομικές αλλαγές που έγιναν στα ανάλογα του SPD304 επέτρεψαν κάποιες συσχετίσεις ανάμεσα στη δομή και τη συγγένεια πρόσδεσης. Η αντικατάσταση της *m*-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλομάδας με έναν πιο ισχυρό δέκτη ηλεκτρονίων στο ινδόλιο του SPD304 οδήγησε σε μια σημαντική αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης. Συνεπώς, η ενσωμάτωση ομάδων δεκτών ηλεκτρονίων μπορεί να βελτιώσει τη δραστικότητα των SPD304 αναλόγων στην αναστολή του TNF. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την παρατήρηση ότι η συγγένεια πρόσδεσης μπορεί να μεταβληθεί δραματικά με την αλλαγή του υποκαταστάτη του ινδολίου. Αξιοσημείωτο γεγονός είναι ότι η σύζευξη της διαμινικής γέφυρας οδήγησε σε χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στο 67% των περιπτώσεων. Η μετατροπή των αναλόγων σε συμμετρικά μείωσε σημαντικά τη συγγένεια πρόσδεσης πλην ελάχιστων εξαιρέσεων. Η αντικατάσταση της χρωμόνης με μικρότερους σε μέγεθος υποκαταστάτες (βενζολίο, φθοροβενζόλιο, ιμιδαζόλιο) στις περισσότερες περιπτώσεις οδήγησε σε μείωση της συγγένειας πρόσδεσης. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι μεγαλύτεροι υποκαταστάτες, όπως το ναφθαλίνιο και κυρίως η χρωμόνη είναι πολύ σημαντικοί στην αναστολή του TNF. Επίσης κάποιες μελέτες docking που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στη συμπληρωματικότητα της διαμόρφωσης μέσα την κοιλότητα πρόσδεσης του SPD304 και την ενεργότητα ορισμένων από τους πιο ισχυρούς αναστολείς.

Η μελέτη με ITC της αναστολής του TNF από το SPD304 έδειξε ότι ανεξαρτήτως διάταξης η αντίδραση είναι αυθόρμητη ( $\Delta G < 0$ ) και η εντροπία μειώνεται ( $\Delta S < 0$ )

πιθανότητα εξαιτίας της μείωσης των βαθμών ελευθερίας του SPD304 σαν αποτέλεσμα της πρόσδεσής του στον TNF. Σε όλες τις περιπτώσεις η αντίδραση καθοδηγείται από την ενθαλπία ( $|\Delta H| > |-T^*\Delta S|$ ). Αντίστοιχα η μελέτη της αναστολής του TNF από τον **10a** είναι μια διαδικασία αυθόρμητη ( $\Delta G < 0$ ) και ενδόθερμη ( $\Delta H > 0$ ). Η εντροπία αυξάνεται ( $\Delta S > 0$ ) πράγμα που ίσως οφείλεται στην κάλυψη υδρόφοβων ομάδων του αναστολέα στην πρωτεϊνική τσέπη καθώς και στην απελευθέρωση μορίων διαλυτή από τον αναστολέα. Η αντίδραση καθοδηγείται από τη συνεισφορά της εντροπίας ( $|\Delta H| < |-T^*\Delta S|$ ).

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες ανέδειξαν νέες συνθήκες κρυστάλλωσης του TNF (αμινοξέα D86 - L233) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη με το SPD304 και τον **10a**. Η έκθεση των κρυστάλλων σε ακτίνες-X έδειξε ότι οι κρύσταλλοι που προέκυψαν ήταν πρωτεϊνικοί και σκέδαζαν μέχρι τα 2.5 Å. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκαν οι ήδη δημοσιευμένες συνθήκες κρυστάλλωσης του SPD304 με τον TNF. Η συλλογή δεδομένων στα 1.9 Å αποκάλυψε ηλεκτρονιακή πυκνότητα δίπλα από το μόριο του SPD304 όπου τοποθετήθηκε ένα δεύτερο μόριο αναστολέα. Το δεύτερο μόριο του SPD304 φαίνεται να αλληλεπιδρά κυρίως με το έτερο μόριο SPD304 και λιγότερο με την πρωτεΐνη. Η επεξεργασία των δεδομένων έδωσε ικανοποιητικά R-Values και RMS και σαφώς βελτιωμένα σε όλα τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα ( $R_{work}$ ,  $R_{free}$ , RMSD bonds, RMSD angles, resolution) σε σχέση με την ήδη δημοσιευμένη δομή (He et al., 2005). Για τη συγκρυστάλλωση των νέων αναστολέων θα μπορούσαν να γίνουν δοκιμές με υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστολέα, επιπλέον συλλογές έτοιμων διαλυμάτων, υψηλότερες θερμοκρασίες συγκρυστάλλωσης καθώς και με την πρωτεΐνη TNF new.

## Αναφορές

- Aggarwal, B.B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745–756.
- Alelyunas, Y.W., Liu, R., Pelosi-Kilby, L., Shen, C., 2009. Application of a Dried-DMSO rapid throughput 24-h equilibrium solubility in advancing discovery candidates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 37, 172–182.
- Alexiou, P., Papakyriakou, A., Ntougkos, E., Papaneophytou, C.P., Liepouri, F., Mettou, A., Katsoulis, I., Maranti, A., Tsiliouka, K., Strongilos, A., Chaitidou, S., Douni, E., Kontopidis, G., Kollias, G., Couladouros, E., Eliopoulos, E., 2014. Rationally designed less toxic SPD-304 analogs and preliminary evaluation of their TNF inhibitory effects. *Arch Pharm* 347, 798–805.
- Alsenz, J., Kansy, M., 2007. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 546–567.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S., Neurath, M.F., 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* 6, 583–588. doi:10.1038/75068
- Balakin, K., Savchuk, N., Tetko, I., 2006. In Silico Approaches to Prediction of Aqueous and DMSO Solubility of Drug-Like Compounds: Trends,

Problems and Solutions. *Curr. Med. Chem.* 13, 223–241.

doi:10.2174/092986706775197917

- Balakin, K. V, Ivanenkov, Y.A., Skorenko, A. V, Nikolsky, Y. V, Savchuk, N.P., Ivashchenko, A.A., 2004. In silico estimation of DMSO solubility of organic compounds for bioscreening. *J. Biomol. Screen.* 9, 22–31.
- Bandgar, B.P., Patil, S.A., Korbadi, B.L., Nile, S.H., Khobragade, C.N., 2010. Synthesis and biological evaluation of beta-chloro vinyl chalcones as inhibitors of TNF-alpha and IL-6 with antimicrobial activity. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 2629–2633. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.050
- Benyamini, H., Friedler, A., 2011. The ASPP interaction network: electrostatic differentiation between pro- and anti-apoptotic proteins. *J. Mol. Recognit.* 24, 266–274. doi:10.1002/jmr.1048
- Berg, T., 2003. Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 2462–2481. doi:10.1002/anie.200200558
- Bergström, C. a S., Luthman, K., Artursson, P., 2004. Accuracy of calculated pH-dependent aqueous drug solubility. *Eur. J. Pharm. Sci.* 22, 387–398. doi:10.1016/j.ejps.2004.04.006
- Bevan, C.D., Lloyd, R.S., 2000. A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates. *Anal. Chem.* 72, 1781–1787. doi:10.1021/ac9912247
- Bighley, L.D., Berge, S.M., Monkhouse, D.C., 1995. Salt forms of drugs and absorption, in: J. Swarbrick & J. C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. pp. 453–499.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N.,



- Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., Cerretti, D.P., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729–733. doi:10.1038/385729a0
- Blasko, E., Glaser, C.B., Devlin, J.J., Xia, W., Feldman, R.I., Polokoff, M.A., Phillips, G.B., Whitlow, M., Auld, D.S., McMillan, K., Ghosh, S., Stuehr, D.J., Parkinson, J.F., 2002. Mechanistic studies with potent and selective inducible nitric-oxide synthase dimerization inhibitors. *J. Biol. Chem.* 277, 295–302. doi:10.1074/jbc.M105691200
- Brown, J.H., 1971. A double-blind clinical study--DMSO for acute injuries and inflammations compared to accepted standard therapy. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 13, 536–540.
- Brownstein, A., 1982. The Chemistry of Polyethylene Glycol In book. , 15-18 Septem, in: Proceedings of the ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference: Ottawa 15-18 September 1981. pp. 279–287.
- Brustolim, D., Ribeiro-dos-Santos, R., Kast, R.E., Altschuler, E.L., Soares, M.B.P., 2006. A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: the antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in mice. *Int. Immunopharmacol.* 6, 903–907. doi:10.1016/j.intimp.2005.12.007
- Brynskov, J., Foegh, P., Pedersen, G., Ellervik, C., Kirkegaard, T., Bingham, A., Saermark, T., 2002. Tumour necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 51, 37–43. doi:10.1136/gut.51.1.37
- Burke, J.R., Pattoli, M.A., Gregor, K.R., Brassil, P.J., MacMaster, J.F., McIntyre, K.W., Yang, X., Iotzova, V.S., Clarke, W., Strnad, J., Qiu, Y., Zusi, F.C., 2003. BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I kappa B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-

- kappa B-dependent transcription in mice. *J. Biol. Chem.* 278, 1450–1456. doi:10.1074/jbc.M209677200
- Capps, K.J., Humiston, J., Dominique, R., Hwang, I., Boger, D.L., 2005. Discovery of AICAR Tfase inhibitors that disrupt requisite enzyme dimerization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 2840–2844. doi:10.1016/j.bmcl.2005.03.094
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3666–3670.
- Chan, D.S., Lee, H.M., Yang, F., Che, C.M., Wong, C.C., Abagyan, R., Leung, C.H., Ma, D.L., 2010. Structure-based discovery of natural-product-like TNF-alpha inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 2860–2864.
- Chan, F.K.-M., Lenardo, M.J., 2002. Tumor necrosis factor family ligands and receptors in the immune system: Targets for future pharmaceuticals. *Drug News Perspect.* 15, 483–490. doi:10.1358/dnp.2002.15.8.840068
- Charman, W.N., Porter, C.J.H., Mithani, S., Dressman, J.B., 1997. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. *J. Pharm. Sci.* 86, 269–282. doi:10.1021/js960085v
- Chatzantoni, K., Mouzaki, A., 2006. Anti-TNF-alpha antibody therapies in autoimmune diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 6, 1707–1714.
- Chen, G., Goeddel, D. V., 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634–1635. doi:10.1126/science.1071924
- Chen, X., Cho, S.J., Li, Y., Venkatesh, S., 2017. Prediction of aqueous solubility of organic compounds using a quantitative structure–property relationship. *J. Pharm. Sci.* 91, 1838–1852.

doi:10.1002/jps.10178

Cheng, J.-F., Ishikawa, A., Ono, Y., Arrhenius, T., Nadzan, A., 2003. Novel chromene derivatives as TNF- $\alpha$  inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3647–3650.

Clark, M.P., Laughlin, S.K., Laufersweiler, M.J., Bookland, R.G., Brugel, T.A., Golebiowski, A., Sabat, M.P., Townes, J.A., VanRens, J.C., Djung, J.F., Natchus, M.G., De, B., Hsieh, L.C., Xu, S.C., Walter, R.L., Mekel, M.J., Heitmeyer, S.A., Brown, K.K., Juergens, K., Taiwo, Y.O., Janusz, M.J., 2004. Development of orally bioavailable bicyclic pyrazolones as inhibitors of tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J. Med. Chem.* 47, 2724–2727. doi:10.1021/jm049968m

Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., Siebenlist, U., 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- $\kappa$ B2 in maturing B cells. *Nat. Immunol.* 3, 958–965. doi:10.1038/ni842

Cleland, J.L., Wang, D.I., 1990. Cosolvent assisted protein refolding. *Biotechnology.* (N. Y.) 8, 1274–1278.

Coope, H.J., Atkinson, P.G.P., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M.J., Klaus, G.G.B., Johnston, L.H., Ley, S.C., 2002. CD40 regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 to p52. *EMBO J.* 21, 5375–5385. doi:10.1093/emboj/cdf542

Davis, J.M., Colangelo, J., 2013. Small-molecule inhibitors of the interaction between TNF and TNFR. *Future Med. Chem.* 5, 69–79. doi:10.4155/fmc.12.192

Delaney, J.S., 2005. Predicting aqueous solubility from structure. *Drug Discov. Today* 10, 289–295.

Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., Liu, Z., 2000. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2

- recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419–429.
- Di, L., Fish, P. V, Mano, T., 2012. Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discov. Today* 17, 486–495.  
doi:10.1016/j.drudis.2011.11.007
- Di, L., Kerns, E.H., 2006. Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization. *Drug Discov. Today* 11, 446–451. doi:10.1016/j.drudis.2006.03.004
- Ding, T., Deighton, C., 2007. Complications of Anti-TNF Therapies. *Fut. Rheumatol.* 2, 587–597.
- Eck, M.J., Beutler, B., Kuo, G., Merryweather, J.P., Sprang, S.R., 1988. Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin). *J. Biol. Chem.* 263, 12816–12819.
- Ecks, M.J., Sprang, S.R., 1989. The Structure of Tumor Necrosis Factor-cr at 2.6 Resolution. *J. Biol. Chem.* 264, 17595–17605.
- Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Kalden, J.R., Antoni, C., Smolen, J.S., Leeb, B., Breedveld, F.C., Macfarlane, J.D., Bijl, H., 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* 344, 1105–1110.
- Essayan, D.M., 2001. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 671–680. doi:10.1067/mai.2001.119555
- Ezealisiji, K., Mbah, C., Osadebe, P., 2015. Aqueous Solubility Enhancement of Mirtazapine: Effect of Cosolvent and Surfactant. *Pharmacol. Pharm.* 6, 71–476.
- Faller, B., Ertl, P., 2007. Computational approaches to determine drug solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 533–545.

- Feldmann, M., 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2, 364–371.
- Feng, B.Y., Shelat, A., Doman, T.N., Guy, R.K., Shoichet, B.K., 2005. High-throughput assays for promiscuous inhibitors. *Nat Chem Biol* 1, 146–148.
- Gravestien, L.A., Borst, J., 1998. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin. Immunol.* 10, 423–434.  
doi:10.1006/smim.1998.0144
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793–802. doi:10.1016/0092-8674(95)90192-2
- Gruss, H.J., Dower, S.K., 1995. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378–3404.
- Hajishengallis, G., Chavakis, T., 2013. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. *Trends Immunol.* 34, 1–6.  
doi:10.1016/j.it.2012.08.003
- Haraguchi, S., Day, N.K., Kamchaisatian, W., Beigier-Pompadre, M., Stenger, S., Tangsinmankong, N., Sleasman, J.W., Pizzo, S. V, Cianciolo, G.J., 2006. LMP-420, a small-molecule inhibitor of TNF-alpha, reduces replication of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis in human cells. *AIDS Res. Ther.* 3, 1–9. doi:10.1186/1742-6405-3-8
- He, M.M., Smith, A.S., Oslob, J.D., Flanagan, W.M., Braisted, A.C., Whitty, A., Cancilla, M.T., Wang, J., Lugovskoy, A.A., Yoburn, J.C., Fung, A.D., Farrington, G., Eldredge, J.K., Day, E.S., Cruz, L.A., Cachero, T.G.,

- Miller, S.K., Friedman, J.E., Choong, I.C., Cunningham, B.C., 2005. Small-molecule inhibition of TNF-alpha. *Science* 310, 1022–1025. doi:10.1126/science.1116304
- Hehlgans, T., Pfeffer, K., 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x
- Hoelke, B., Gieringer, S., Arlt, M., Saal, C., 2009. Comparison of nephelometric, UV-spectroscopic, and HPLC methods for High-throughput determination of aqueous drug solubility in microtiter plates. *Anal. Chem.* 81, 3165–3172. doi:10.1021/ac9000089
- Hoever, M., Zbinden, P., 2004. The evolution of microarrayed compound screening. *Drug Discov. Today* 9, 358–365. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03037-5
- Hoffmann, A., Kovermann, M., Lilie, H., Fiedler, M., Balbach, J., Rudolph, R., Pfeifer, S., 2012. New Binding Mode to TNF-Alpha Revealed by Ubiquitin-Based Artificial Binding Protein. *PLoS One* 7, e31298.
- Huuskonen, J., Livingstone, D.J., Manallack, D.T., 2008. Prediction of drug solubility from molecular structure using a drug-like training set. *SAR QSAR Env. Res* 19, 191–212. doi:10.1080/10629360802083855
- Ingels, F.M., Augustijns, P.F., 2003. Biological, Pharmaceutical, and Analytical Considerations with Respect to the Transport Media Used in the Absorption Screening System, Caco-2. *J. Pharm. Sci.* 92, 1545–1558. doi:http://dx.doi.org/10.1002/jps.10408
- Jackson, R.W., Gelinas, R., Baughman, T.A., Cox, T., Howbert, J.J., Kucera, K.A., Latham, J.A., Ramsdell, F., Singh, D., Darwish, I.S., 2002. Benzobicyclooctanes as novel inhibitors of TNF-alpha signaling. *Bioorg.*

- Med. Chem. Lett. 12, 1093–1097.
- Jackson, R.W., Tabone, J.C., Howbert, J.J., 2003. Identification of TNF- $\alpha$  inhibitors from a split-pool library based on a tyrosine-proline peptidomimetic scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 205–208.
- Jorgensen, W.L., Duffy, E.M., 2002. Prediction of drug solubility from structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 355–366.
- Jouyban, A., 2008. Review of the Cosolvency Models for Predicting Solubility of Drugs in Water-cosolvent Mixtures. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 11, 32–58.
- K. Horie, K.U., 2012. Inhibition of canonical NF- $\kappa$ B and suppression of inflammation and cancer growth by designed inhibitor DHMEQ.
- Kayaci, F., Uyar, T., 2012. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chem.* 133, 641–649. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.040>
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslari, E., Kioussis, D., Kollias, G., 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10, 4025–4031.
- Kerns, E.H., 2001. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *J. Pharm. Sci.* 90, 1838–1858.
- Kerns, E.H., Di, L., 2008. Chapter 40 Effects of Properties on Biological Assays, in: *Drug-like Properties Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. p. 440.
- Kerns, E.H., Di, L., 2005. Automation in Pharmaceutical Profiling. *JALA J. Assoc. Lab. Autom.* 10, 114–123. doi:10.1016/j.jala.2004.11.002
- Kerns, E.H., Di, L., 2004. Physicochemical profiling: overview of the screens. *Drug Discov. Today Technol.* 1, 343–348.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.08.011>

Kerns, E.H., Di, L., Carter, G.T., 2008. In vitro solubility assays in drug discovery. *Curr. Drug Metab.* 9, 879–85.

doi:10.2174/138920008786485100

Kim, J.H., Scialli, A.R., 2011. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol. Sci.* 122, 1–6.

doi:10.1093/toxsci/kfr088

Kingsbury, N., Masters, C.J., 1970. On the determination of component molecular weights in complex protein mixtures by means of disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 36, 144–158.

doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90342-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(70)90342-8)

Kramer, Ij.M., 2016. Chapter 14 - Chemokines and Traffic of White Blood Cells BT - Signal Transduction (Third Edition). Academic Press, Boston, pp. 777–812. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394803-8.00014-0>

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S.D., 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45–53.

Kumar, K.S., Kumar, P.M., Kumar, K.A., Sreenivasulu, M., Jafar, A.A., Rambabu, D., Krishna, G.R., Reddy, C.M., Kapavarapu, R., Shivakumar, K., Priya, K.K., Parsa, K.V.L., Pal, M., 2011. A new three-component reaction: green synthesis of novel isoindolo[2,1-a]quinazoline derivatives as potent inhibitors of TNF- $\alpha$ . *Chem. Commun. (Camb)*. 47, 5010–5012. doi:10.1039/c1cc10715a

Lee, M.R., Dominguez, C., 2005. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38 $\alpha$  protein. *Curr. Med. Chem.* 12, 2979–2994.



- Leung, C.-H., Grill, S.P., Lam, W., Gao, W., Sun, H.-D., Cheng, Y.-C., 2006. Eriocalyxin B inhibits nuclear factor-kappaB activation by interfering with the binding of both p65 and p50 to the response element in a noncompetitive manner. *Mol. Pharmacol.* 70, 1946–1955. doi:10.1124/mol.106.028480
- Leung, C.-H., Zhong, H.-J., Yang, H., Cheng, Z., Chan, D.S.-H., Ma, V.P.-Y., Abagyan, R., Wong, C.-Y., Ma, D.-L., 2012. A metal-based inhibitor of tumor necrosis factor-alpha. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51, 9010–9014. doi:10.1002/anie.201202937
- Levin, J.I., Du, M.T., DiJoseph, J.F., Killar, L.M., Sung, A., Walter, T., Sharr, M.A., Roth, C.E., Moy, F.J., Powers, R., Jin, G., Cowling, R., Skotnicki, J.S., 2001. The discovery of anthranilic acid-based MMP inhibitors. Part 1: SAR of the 3-position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 235–238.
- Lipinski, C.A., 2004. Solubility in water and DMSO: issues and potential solutions. *Pharm. Profiling Drug Discov. Lead Sel.* 93–125.
- Lipinski, C.A., 2001. Avoiding investment in doomed drugs. *Curr Drug Discov* 1.
- Lipinski, C.A., 2000. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 235–249.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3–26. doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0
- Liz-Graña, M., Gómez-Reino, J.J., Carnota, 2001. Tumour Necrosis Factor. Genetics, cell action mechanism and involvement in inflammation. *Alergol Inmunol Clin* 16, 140–149.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF Receptor

- Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 104, 487–501.  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Loftsson, T., Duchêne, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329, 1–11.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>
- Loftsson, T., Masson, M., 2001. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.* 225, 15–30.  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00761-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00761-X)
- Maličková, K., 2016. Immunopatological complications of anti-TNF- $\alpha$  biological treatment. *Gastroenterol. Hepatol.* 70, 45–50.  
doi:[10.14735/amgh2016csggh.info02](https://doi.org/10.14735/amgh2016csggh.info02).
- Mancini, F., Toro, C.M., Mabilia, M., Giannangeli, M., Pinza, M., Milanese, C., 1999. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)/TNF-alpha receptor binding by structural analogues of suramin. *Biochem. Pharmacol.* 58, 851–859.
- Maradit-Kremers, H., Nicola, P.J., Crowson, C.S., Ballman, K. V, Gabriel, S.E., 2005. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum.* 52, 722–732. doi:[10.1002/art.20878](https://doi.org/10.1002/art.20878)
- Marques, L.J., Zheng, L., Poulakis, N., Guzman, J., Costabel, U., 1999. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 508–511.  
doi:[10.1164/ajrccm.159.2.9804085](https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.2.9804085)
- Martin, C.A., Dorf, M.E., 1990. Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774A.1: Stimulation requirements and kinetics. *Cell. Immunol.* 128, 555–568. doi:[10.1016/0008-8749\(90\)90048-V](https://doi.org/10.1016/0008-8749(90)90048-V)
- McGeary, R.P., Bennett, A.J., Tran, Q.B., Cosgrove, K.L., Ross, B.P., 2008.

- Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 1384–1394.
- McGovern, S.L., Helfand, B.T., Feng, B., Shoichet, B.K., 2003. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J Med Chem* 46, 4265–4272. doi:10.1021/jm030266r
- McInnes, I.B., Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 429–442. doi:10.1038/nri2094
- McMillan, K., Adler, M., Auld, D.S., Baldwin, J.J., Blasko, E., Browne, L.J., Chelsky, D., Davey, D., Dolle, R.E., Eagen, K.A., Erickson, S., Feldman, R.I., Glaser, C.B., Mallari, C., Morrissey, M.M., Ohlmeyer, M.H., Pan, G., Parkinson, J.F., Phillips, G.B., Polokoff, M.A., Sigal, N.H., Vergona, R., Whitlow, M., Young, T.A., Devlin, J.J., 2000. Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1506–1511.
- Mettou, A., Papanephytous, C., Melagraki, G., Maranti, A., Liepouri, F., Alexiou, P., Papakyriakou, A., Couladouros, E., E., E., Afantitis, A., Kontopidis, A., 2017. Aqueous solubility enhancement for bioassays for insoluble inhibitors and QSPR analysis: a TNF- $\alpha$  study. *SLAS Discov.* in press.
- Monaco, C., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., Foxwell, B., Cheshire, N., Paleolog, E., Feldmann, M., 2004. Canonical pathway of nuclear factor  $\kappa$ B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5634–5639. doi:10.1073/pnas.0401060101
- Moreira, A.L., Sampaio, E.P., Zmuidzinas, A., Frindt, P., Smith, K.A., Kaplan, G., 1993. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.*

177, 1675–1680.

Moreira, A.L., Tsenova-Berkova, L., Wang, J., Laochumroonvorapong, P., Freeman, S., Freedman, V.H., Kaplan, G., 1997. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber. Lung Dis.* 78, 47–55.

Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshikawa, M., Yoshioka, Y., Tsunoda, S., Nakagawa, S., Yamagata, Y., Tsutsumi, Y., 2010. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci. Signal.* 3, ra83.  
doi:10.1126/scisignal.2000954

Muñoz-Botella, S., del Castillo, B., y Martín, M.A., 1995. Cyclodextrins: properties and applications of inclusion complex formation. *Ars Pharm.* 36, 187–98.

Murdoch, L., 1982. Dimethyl sulfoxide (DMSO)--an overview. *Can. J. Hosp. Pharm.* 35, 79–85.

Niwayama, S., Loh, C., Turk, B.E., Liu, J.O., Miyachi, H., Hashimoto, Y., 1998. Enhanced potency of perfluorinated thalidomide derivatives for inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  production is associated with a change of mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1071–1076.

Niwayama, S., Turk, B.E., Liu, J.O., 1996. Potent inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production by tetrafluorothalidomide and tetrafluorophthalimides. *J. Med. Chem.* 39, 3044–3045.  
doi:10.1021/jm960284r

Oprea, T.I., Bologa, C.G., Edwards, B.S., Prossnitz, E.R., Sklar, L.A., 2005. Post-High-Throughput Screening Analysis: An Empirical Compound Prioritization Scheme. *J. Biomol. Screen.* 10, 419–426.  
doi:10.1177/1087057104272660

- Palladino, M.A., Bahjat, F.R., Theodorakis, E.A., Moldawer, L.L., 2003. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 736–746. doi:10.1038/nrd1175
- Papaneophytou, C., Alexiou, P., Papakyriakou, A., Ntougkos, E., Tsiliouka, K., Maranti, A., Liepouri, F., Strongilos, A., Mettou, A., Couladouros, E., Eliopoulos, E., Douni, E., Kollias, G., Kontopidis, G., 2015. Synthesis and biological evaluation of potential small molecule inhibitors of Tumor Necrosis Factor. *Med. Chem. Commun.* doi:10.1039/c5md00023h
- Papaneophytou, C., Mettou, A., Rinotas, V., Douni, E., Kontopidis, G., 2013. Solvent selection for insoluble ligands, a challenge for biological assay development: A TNF- $\alpha$ /SPD304 study. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 137–141. doi:10.1021/ml300380h
- Papaneophytou, C.P., Kontopidis, G., 2014. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expr. Purif.* 94, 22–32. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016
- Partida-Sanchez, S., Favila-Castillo, L., Pedraza-Sanchez, S., Gomez-Melgar, M., Saul, A., Estrada-Parra, S., Estrada-Garcia, I., 1998. IgG antibody subclasses, tumor necrosis factor and IFN-gamma levels in patients with type II lepra reaction on thalidomide treatment. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116, 60–66.
- Pfeffer, K., 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 185–191.
- Pinsuwan, S., Li, A., Yalkowsky, S.H., 1995. Correlation of Octanol/Water Solubility Ratios and Partition Coefficients. *J. Chem. Eng. Data* 40, 623–626. doi:10.1021/je00019a019
- Popa-Burke, I.G., Issakova, O., Arroway, J.D., Bernasconi, P., Chen, M.,

- Coudurier, L., Galasinski, S., Jadhav, A.P., Janzen, W.P., Lagasca, D., Liu, D., Lewis, R.S., Mohney, R.P., Sepetov, N., Sparkman, D.A., Hodge, C.N., 2004. Streamlined system for purifying and quantifying a diverse library of compounds and the effect of compound concentration measurements on the accurate interpretation of biological assay results. *Anal. Chem.* 76, 7278–7287. doi:10.1021/ac0491859
- Ranok, A., Wongsantichon, J., Robinson, R.C., Suginta, W., 2015. Structural and Thermodynamic Insights into Chitooligosaccharide Binding to Human Cartilage Chitinase 3-like Protein 2 (CHI3L2 or YKL-39). *J. Biol. Chem.* 290, 2617–2629. doi:10.1074/jbc.M114.588905
- Rasmussen, H.S., McCann, P.P., 1997. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol. Ther.* 75, 69–75.
- Régnier, J.F., Richard, J., 1998. Lack of developmental toxicity in rats treated with dimethylsulfoxide (DMSO). *Am. Soc. Toxicol. Vol. Toxicol.* 42, 256–257.
- Rowland, T.L., McHugh, S.M., Deighton, J., Dearman, R.J., Ewan, P.W., Kimber, I., 1998. Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology* 40, 11–20.
- Rowland, T.L., McHugh, S.M., Deighton, J., Ewan, P.W., Dearman, R.J., Kimber, I., 1999. Selective down-regulation of T cell- and non-T cell-derived tumour necrosis factor alpha by thalidomide: comparisons with dexamethasone. *Immunol. Lett.* 68, 325–332.
- Rytting, E., Lentz, K.A., Chen, X.-Q., Qian, F., Venkatesh, S., 2005. Aqueous and cosolvent solubility data for drug-like organic compounds. *AAPS J.* 7, E78–E105. doi:10.1208/aapsj070110

- Rytting, E., Lentz, K.A., Chen, X.-Q., Qian, F., Venkatesh, S., 2004. A Quantitative Structure-Property Relationship for Predicting Drug Solubility in PEG 400/Water Cosolvent Systems. *Pharm. Res.* 21, 237–244. doi:10.1023/B:PHAM.0000016237.06815.7a
- Saal, C., Petereit, A.C., 2012. Optimizing solubility: Kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 589–595. doi:10.1016/j.ejps.2012.07.019
- Sampaio, E.P., Sarno, E.N., Galilly, R., Cohn, Z.A., Kaplan, G., 1991. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 173, 699–703.
- Savjani, K.T., Gajjar, A.K., Savjani, J.K., 2012. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* 2012, 1–10. doi:10.5402/2012/195727
- Schafer-Korting, M., Korting, H.C., Mutschler, E., 1985. Human plasma and skin blister fluid levels of griseofulvin after its repeated administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 29, 351–354.
- Scheinfeld, N., 2004. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J. Dermatolog. Treat.* 15, 280–294. doi:10.1080/09546630410017275
- Schneiderman, E., Stalcup, A.M., 2000. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 745, 83–102.
- Seedher, N., Kanojia, M., 2009. Co-solvent solubilization of some poorly-soluble antidiabetic drugs. *Pharm. Dev. Technol.* 14, 185–192. doi:10.1080/10837450802498894
- Sharma, D., Soni, M., Kumar, S., Gupta, G.D., 2009. Solubility Enhancement-Eminent Role in Poorly Soluble Drugs. *Res. J. Pharm.*

Tech 2, 220–224.

- Shen, Q., Chen, J., Wang, Q., Deng, X., Liu, Y., Lai, L., 2014. Discovery of highly potent TNF $\alpha$  inhibitors using virtual screen. *Eur. J. Med. Chem.* 85, 119–126. doi:<http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.091>
- Singla, A.K., Garg, A., Aggarwal, D., 2002. Paclitaxel and its formulations. *Int. J. Pharm.* 235, 179–192. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00986-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00986-3)
- Stanczyk, J., Ospelt, C., Gay, S., 2008. Is there a future for small molecule drugs in the treatment of rheumatic diseases? *Curr. Opin. Rheumatol.* 20, 257–262. doi:[10.1097/BOR.0b013e3282fa13ee](https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3282fa13ee)
- Stella, V.J., He, Q., 2008. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 36, 30–42. doi:[10.1177/0192623307310945](https://doi.org/10.1177/0192623307310945)
- Stella, V.J., Rajewski, R.A., 1997. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* 14, 556–567.
- Strickley, R.G., 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* 21, 201–230.
- Sun, H., Yost, G.S., 2008. Metabolic activation of a novel 3-substituted indole-containing TNF- $\alpha$  inhibitor: dehydrogenation and inactivation of CYP3A4. *Chem Res Toxicol* 21, 374–385.
- Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., Herrmann, N., 2010. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* 68, 930–941. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.012>
- Szejtli, J., 1998. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 98, 1743–1754.
- Takahashi, Y., Kondo, H., Yasuda, T., Watanabe, T., Kobayashi, S.-I., Yokohama, S., 2002. Common solubilizers to estimate the Caco-2



- transport of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 246, 85–94.
- Tang, P., M-C, H., Klostergaard, J., 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35, 8216–8225. doi:10.1021/bi952182t
- Taoufik, E., Tseveleki, V., Chu, S.Y., Tselios, T., Karin, M., Lassmann, H., Szymkowski, D.E., Probert, L., 2011. Transmembrane tumour necrosis factor is neuroprotective and regulates experimental autoimmune encephalomyelitis via neuronal nuclear factor-kappaB. *Brain* 134, 2722–2735. doi:10.1093/brain/awr203
- Tetko, I. V., Novotarskyi, S., Sushko, I., Ivanov, V., Petrenko, A.E., Dieden, R., Lebon, F., Mathieu, B., 2013. Development of Dimethyl Sulfoxide Solubility Models Using 163 000 Molecules: Using a Domain Applicability Metric to Select More Reliable Predictions. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1990–2000. doi:10.1021/ci400213d
- Toogood, P.L., 2002. Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *J. Med. Chem.* 45, 1543–1558.
- Valle, E.M.M. Del, 2003. Cyclodextrins and their uses : a review. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9
- van de Waterbeemd, H., Gifford, E., 2003. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* 2, 192–204.
- van Horssen, R., Ten Hagen, T.L.M., Eggermont, A.M.M., 2006. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 11, 397–408. doi:10.1634/theoncologist.11-4-397
- van Vollenhoven, R.F., 2011. Unresolved issues in biologic therapy for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 205–215. doi:10.1038/nrrheum.2011.22
- Victor, F.C., Gottlieb, A.B., 2002. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J. Drugs Dermatol.* 1, 264–

275.

- Vidal, P.M., Lemmens, E., Dooley, D., Hendrix, S., 2013. The role of “ anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 1–12. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.08.008
- Voncina, B., Vivod, V., 2013. Cyclodextrins in Textile Finishing, in: Günay, M.B.T.-E.-F.T.D. and F. (Ed.), . InTech, Rijeka, p. Ch. 03.  
doi:10.5772/53777
- Wajant, H., 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635–1636. doi:10.1126/science.1071553
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45–65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189
- Wu, J., Li, J., Cai, Y., Pan, Y., Ye, F., Zhang, Y., Zhao, Y., Yang, S., Li, X., Liang, G., 2011. Evaluation and Discovery of Novel Synthetic Chalcone Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. *J. Med. Chem.* 54, 8110–8123. doi:10.1021/jm200946h
- Wu, J., Zhao, C., Lin, W., Hu, R., Wang, Q., Chen, H., Li, L., Chen, S., Zheng, J., 2014. Binding characteristics between polyethylene glycol (PEG) and proteins in aqueous solution. *J. Mater. Chem. B* 2, 2983–2992. doi:10.1039/c4tb00253a
- Xia, X., Maliski, E., Cheetham, J., Poppe, L., 2003. Solubility Prediction by Recursive Partitioning. *Pharm. Res.* 20, 1634–1640.
- Yang, J.S., Chun, K., Park, J.E., Cho, M., Seo, J., Song, D., Yoon, H., Park, C.-H., Joe, B.-Y., Choi, J.-H., Kim, M.-H., Han, G., 2010. Structure based optimization of chromen-based TNF-alpha converting enzyme (TACE) inhibitors on S1' pocket and their quantitative structure-activity relationship (QSAR) study. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 8618–8629. doi:10.1016/j.bmc.2010.10.006

Ye, H., Wu, H., 2000. Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8961–8966. doi:10.1073/pnas.160241997

Παράρτημα Α: Πίνακες διαλυτοτήτων

- DMSO

Ένωση	Διαλυτότητα σε 5% DMSO ( $\mu\text{M}$ )	Ένωση	Διαλυτότητα σε 5% DMSO ( $\mu\text{M}$ )	Ένωση	Διαλυτότητα σε 5% DMSO ( $\mu\text{M}$ )	Ένωση	Διαλυτότητα σε 5% DMSO ( $\mu\text{M}$ )
<b>1</b>	52.0	<b>5j</b>	Μη διαλυτή	<b>11e</b>	Μη διαλυτή	<b>A6</b>	191.0
<b>2a</b>	23.1	<b>6a</b>	40.7	<b>11f</b>	Μη διαλυτή	<b>A7</b>	Μη διαλυτή
<b>2b</b>	225.3	<b>6b</b>	189.0	<b>12</b>	250.5	<b>A8</b>	17.0
<b>2c</b>	72.0	<b>6c</b>	40.0	<b>13</b>	5.3	<b>A9</b>	Μη διαλυτή
<b>2d</b>	14.7	<b>7a</b>	26.7	<b>14a</b>	19.6	<b>A10</b>	51.2
<b>2e</b>	34.0	<b>7b</b>	72.0	<b>14b</b>	86.6	<b>B1</b>	11.2
<b>3a</b>	103.1	<b>7c</b>	253.0	<b>14c</b>	17.9	<b>B2</b>	Μη διαλυτή
<b>3b</b>	32.8	<b>7d</b>	Μη διαλυτή	<b>14d</b>	17.1	<b>B3</b>	8.7
<b>3c</b>	192.0	<b>7e</b>	Μη διαλυτή	<b>14e</b>	102.0	<b>B4</b>	Μη διαλυτή
<b>3d</b>	146.4	<b>8a</b>	235.1	<b>15a</b>	68.0	<b>B6</b>	31.0
<b>4a</b>	121.4	<b>8b</b>	166.0	<b>15b</b>	81.3	<b>B7</b>	5.1
<b>4b</b>	52.3	<b>8c</b>	105.1	<b>15c</b>	29.3	<b>B8</b>	Μη διαλυτή
<b>4c</b>	96.0	<b>8d</b>	218.2	<b>15d</b>	Μη διαλυτή	<b>B9</b>	56.4
<b>4d</b>	143.6	<b>8e</b>	Μη διαλυτή	<b>16a</b>	266.0	<b>B10</b>	82
<b>4e</b>	124.7	<b>9a</b>	270.0	<b>16b</b>	20.1	<b>C1</b>	40.2
<b>4f</b>	Μη διαλυτή	<b>9b</b>	239.5	<b>16c</b>	37.7	<b>C2</b>	72.5
<b>5a</b>	110.2	<b>10a</b>	24.0	<b>16d</b>	18.2	<b>C3</b>	87.5
<b>5b</b>	44.8	<b>10b</b>	21.2	<b>16e</b>	151.2	<b>C4</b>	30.6
<b>5c</b>	210.3	<b>10c</b>	10.8	<b>17a</b>	236.4	<b>C5</b>	16.1
<b>5d</b>	278.5	<b>10d</b>	20.1	<b>17b</b>	Μη διαλυτή	<b>C6</b>	268.0
<b>5e</b>	180.0	<b>10e</b>	17.8	<b>A1</b>	40.2	<b>C7</b>	11
<b>5f</b>	46.3	<b>11a</b>	33.5	<b>A2</b>	154.2	<b>C8</b>	171
<b>5g</b>	13.1	<b>11b</b>	6.9	<b>A3</b>	8.1	<b>C9</b>	137.4
<b>5h</b>	Μη διαλυτή	<b>11c</b>	Μη διαλυτή	<b>A4</b>	133.0	<b>C10</b>	82.0
<b>5i</b>	Μη διαλυτή	<b>11d</b>	6.7	<b>A5</b>	Μη διαλυτή		

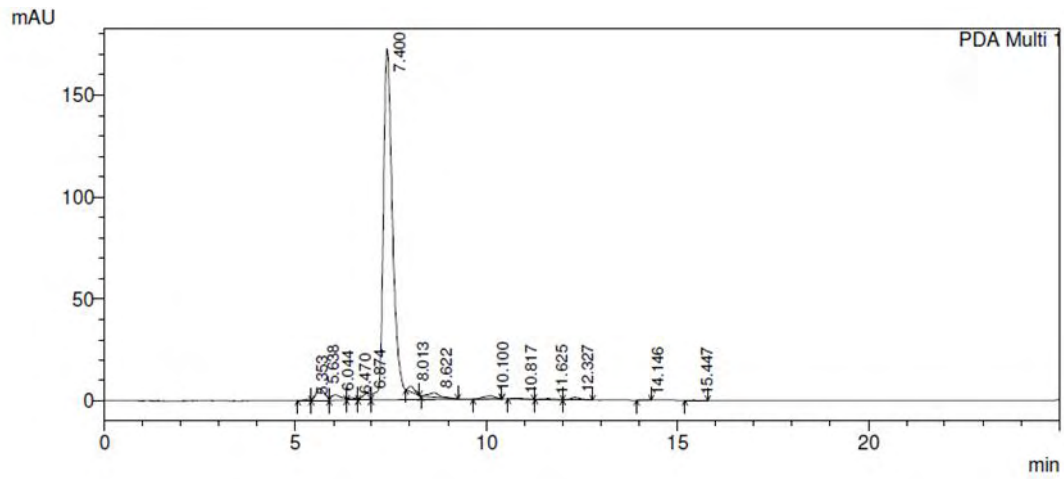
- PEG3350

Ένωση	Διαλυτότητα σε 5% PEG3350 ( $\mu\text{M}$ )	Ένωση	Διαλυτότητα σε 10% PEG3350 ( $\mu\text{M}$ )
<b>2c</b>	163.8	<b>2d</b>	257.1
<b>3d</b>	200.2	<b>3c</b>	145.2
<b>4b</b>	107.4	<b>4b</b>	208.5
<b>4d</b>	199.9	<b>4c</b>	136.8
<b>9b</b>	160.7	<b>4e</b>	223.6
<b>10c</b>	130.5	<b>4f</b>	247.1
<b>10e</b>	154.7	<b>5h</b>	80.7
		<b>7d</b>	61.7
		<b>7e</b>	239.4
		<b>9a</b>	238.8
		<b>9b</b>	247.8
		<b>10a</b>	110.9
		<b>11a</b>	215.0
		<b>11b</b>	129.3
		<b>13</b>	200.0
		<b>15b</b>	209.2
		<b>A3</b>	51.3
		<b>B1</b>	40.5
		<b>B3</b>	51.5
		<b>B7</b>	65.6
		<b>C1</b>	200.3
		<b>C4</b>	120.5
		<b>C7</b>	40.9

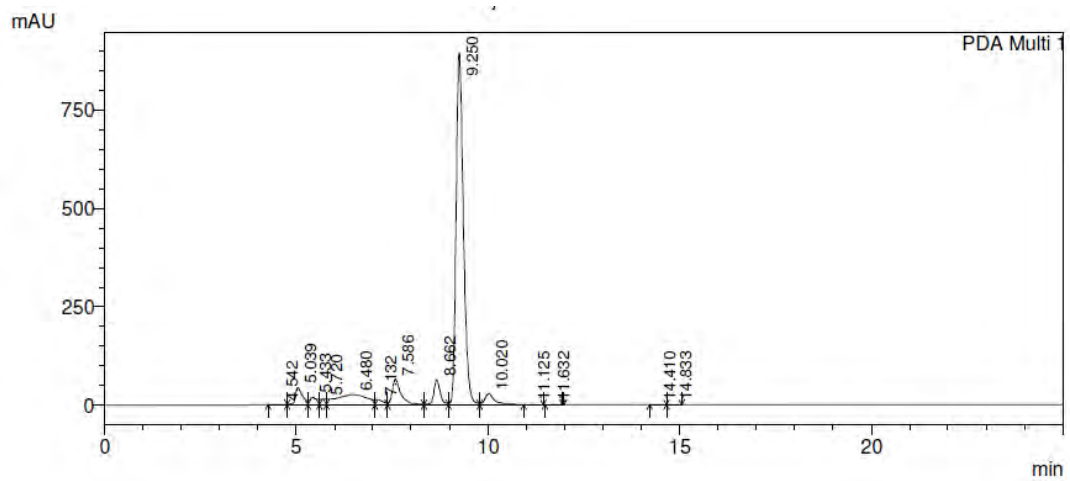
- β-κυκλοδεξτρίνη

Ένωση	Διαλυτότητα σε 20%β-CD (μM)	Ένωση	Διαλυτότητα σε 20%β-CD (μM)	Ένωση	Διαλυτότητα σε 20%β-CD (μM)	Ένωση	Διαλυτότητα σε 20%β-CD (μM)
<b>D1</b>	200.0	<b>E1</b>	225.8	<b>F1</b>	248.7	<b>18a</b>	271.5
<b>D2</b>	274.0	<b>E2</b>	270.2	<b>F2</b>	280.4	<b>18b</b>	244.7
<b>D3</b>	270.0	<b>E3</b>	267.4	<b>F3</b>	250.1	<b>18c</b>	263.0
<b>D4</b>	Μη διαλυτή	<b>E4</b>	238.8	<b>F4</b>	286.8	<b>18d</b>	214.6
<b>D5</b>	Μη διαλυτή	<b>E5</b>	289.6	<b>F5</b>	256.3	<b>18e</b>	297.4
<b>D6</b>	228.4	<b>E6</b>	274.1	<b>F6</b>	246.2	<b>18f</b>	285.8
<b>D7</b>	231.8	<b>E7</b>	279.7	<b>F7</b>	243.7	<b>18g</b>	291.1
<b>D8</b>	264.3	<b>E8</b>	52.3	<b>F8</b>	245.0	<b>18h</b>	281.0
<b>D9</b>	234.9	<b>E9</b>	106.0	<b>F9</b>	255.9	<b>18i</b>	263.6
<b>D10</b>	220.2	<b>E10</b>	260.7	<b>F10</b>	Μη διαλυτή	<b>19a</b>	217.7
						<b>19b</b>	174.8
						<b>19c</b>	Μη διαλυτή
						<b>19d</b>	122.0
						<b>19e</b>	Μη διαλυτή
						<b>19f</b>	Μη διαλυτή

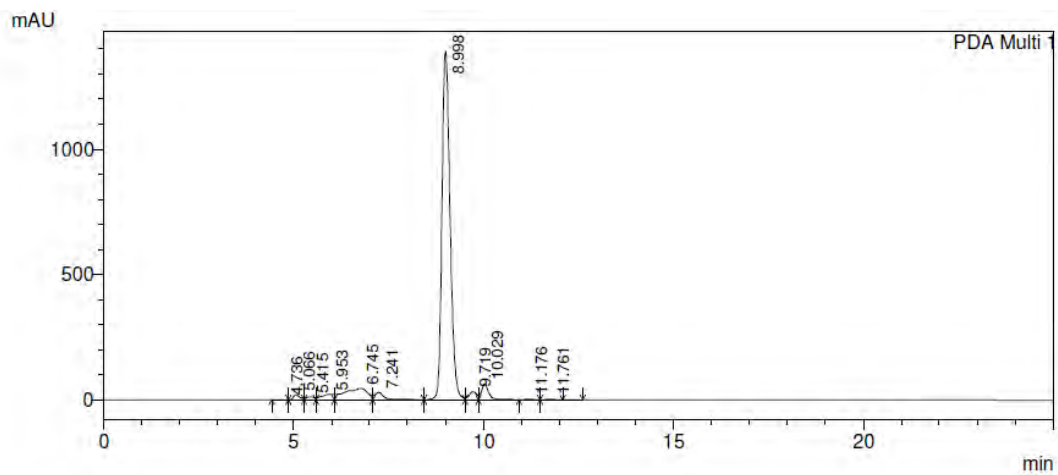
Παράρτημα Β: Χρωματογραφήματα και πρότυπες καμπύλες HPLC



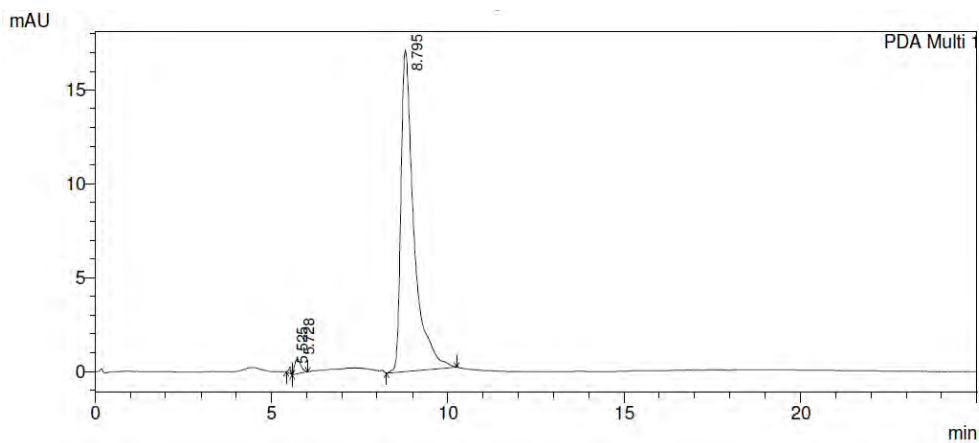
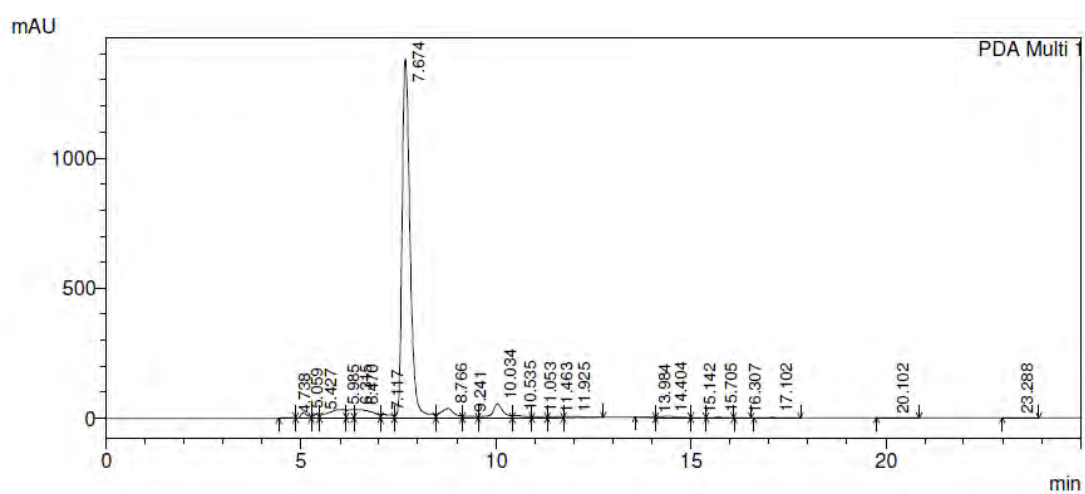
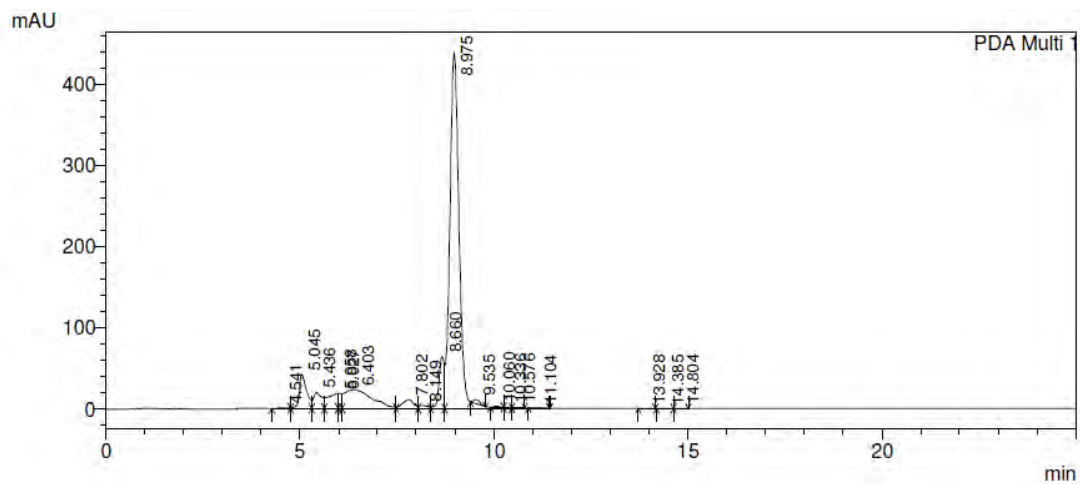
A



B



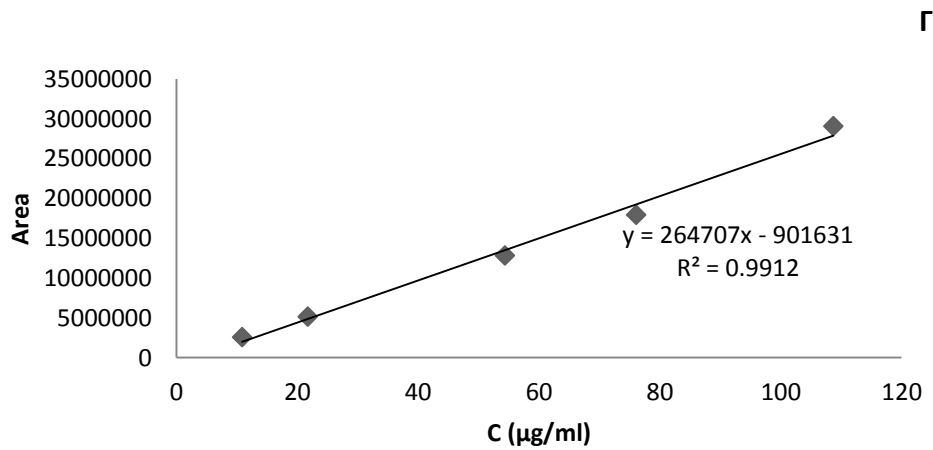
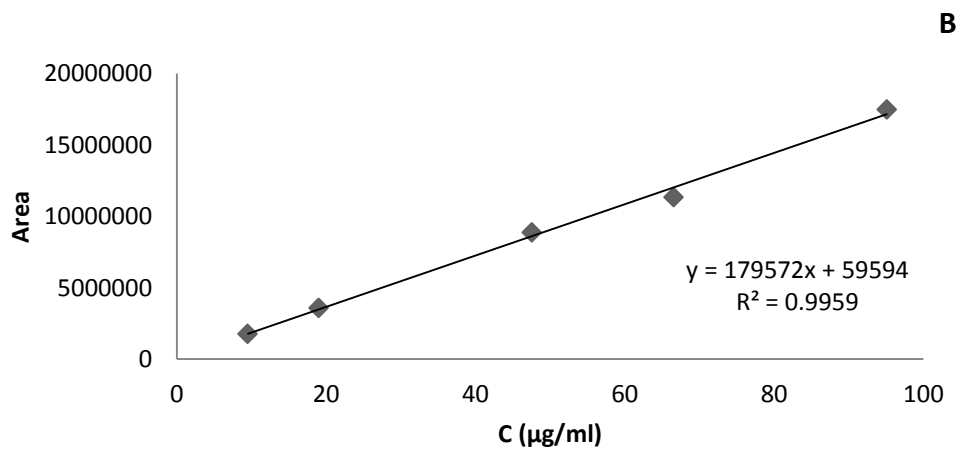
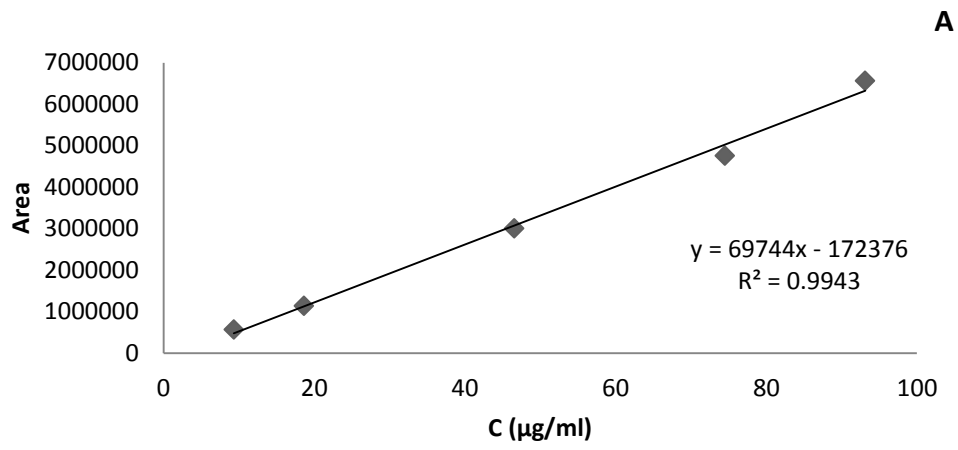
Γ

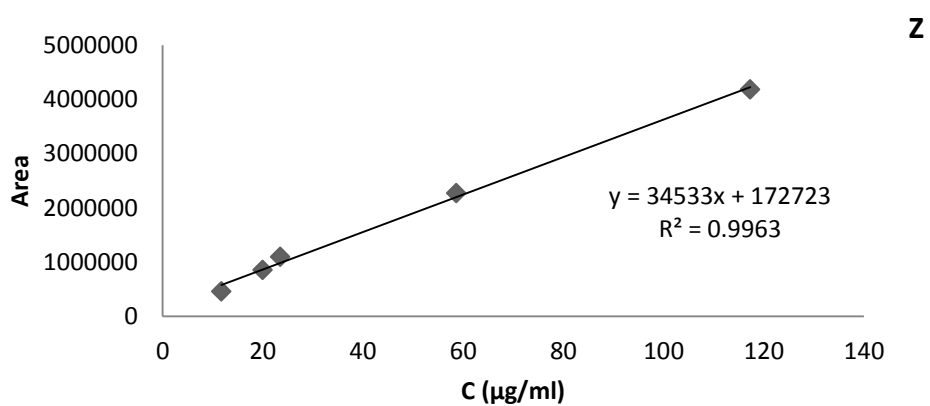
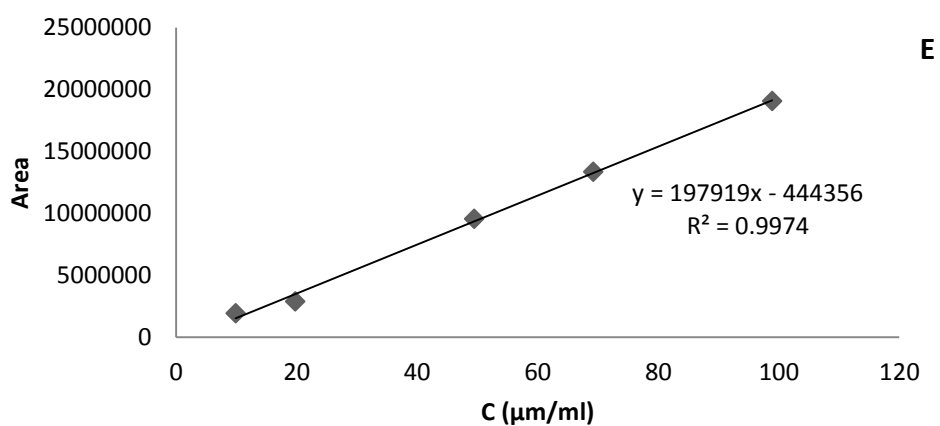
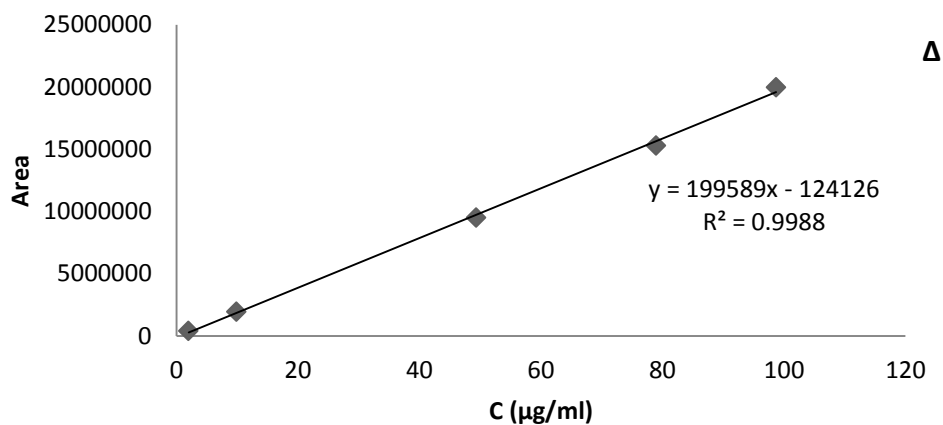


**Z**

**Εικόνα P1.** Χρωματογραφικός προσδιορισμός ενώσεων: **A.** 5d, **B.** 5c, **Γ.** 4a, **Δ.** 5e, **E.** 3c και **Z.** 4d.







Εικόνα P2. Πρότυπες καμπύλες ενώσεων: **A.** 5d, **B.** 5c, **Γ.** 4a, **Δ.** 5e, **E.** 3c και **Z** 4d.