دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه ی رساله ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

موتاژنز اشباع مجازی و نظریه تابع چگالی در آنالیز الگوی مقاومت دارویی مهار گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال توسط ارلوتینیب و مشتقات آن به عنوان عوامل ضد سرطان ریه سلول غیر کوچک

استاد راهنما

دکتر نیما رزاقی اصل

نگارش

الهه محمدنژادی

شماره پایان نامه: د-۱۴۵

آذر ۱۴۰۱

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به

مقدس ترین واژه ها در لغت نامه دلم،

مادرم سنگ صبوری که الفبای زندگی به من آموخت...

پدرم کوهی استوار و حامی من در طول تمام زندگی...

و خواهرم همراه همیشگی و پشتوانه زندگیم...

آذر ۱۴۰۱

سپاس خدای بزرگ را که مرا یاری رساند تا بتوانم این مقطع تحصیلی را به پایان رسانده و گامی در راستای اعتلای علم بر دارم. هر چند زبان و قلم برای تشکر از استاد عزیزم قاصر است اما بدین وسیله لازم دانستم از بزرگواری و حمایت بی دریغ استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر نیما رزاقی اصل که شاگردی محضرشان از بزرگترین افتخارات زندگی علمی‌ام می‌باشد، تشکر کرده و برای ایشان طول عمر توام با سربلندی را آرزومندم.

چکیده فارسی

مقدمه: سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) حدود ۸۰ درصد از کل سرطان های ریه را شامل می شود. مطالعات بالینی رابطه نزدیک بین ابتلا به NSCLC و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) نشان می دهد. به همین دلیل مهارکننده های تیروزین کینازی نسل اول گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال نقش مهمی در درمان هدفمند NSCLC ایفا می کنند. علیرغم نتایج موفقیت آمیز اولیه مقاومت دارویی به واسطه جهش ثانویه T790M استفاده از این دارو ها را محدود کرده است. مطالعه in silico حال حاضر، با هدف پیشنهاد مهارکننده های احتمالی با پتانسیل اتصال بالا به $EGFR^{T790M}$ از طریق طراحی منطقی مبتنی بر آنالوگ انجام شد.

روش کار: در این پروژه چهار گروه از آنالوگ های ارلوتینیب شامل ۵۸ مولکول با هسته کینازولینی برای اثر ضد EGFR مورد بررسی قرار گرفتند. این مولکول ها بر اساس رابطه ساختار- فعالیت (SAR) ترکیبات کینازولینی مهارکننده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال و شباهت ساختاری به داروی خط اول ارلوتینیب طراحی و یا انتخاب شدند. ابتدا خواص شبه دارویی مولکول ها با استفاده از سرور SwissADME محاسبه شدند. در ادامه انرژی آزاد اتصال آنالوگ های ارلوتینیب در باندینگ سایت گیرنده wild-type و فرم های جهش یافته توسط مطالعات داکینگ مولکولی و با استفاده نرم افزار Autodock4.2 محاسبه شدند و ساختارهای برتر از نظر پتانسیل اتصال به جایگاه لیگاند کو-کریستالوگرافی مشخص گردیدند. سپس به منظور بررسی پایداری کمپلکس های برتر، شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) به مدت ۵۰ نانو ثانیه در محیط آبی با کمک از نرم افزار Gromacs 5.1.1 انجام گردید. پس از حصول به کمپلکس های پایدار لیگاند-آنزیم، در فاز نهایی مطالعه، قدرت برهمکنش مولکولی در سطح لیگاند-اسید آمینه برای کمپلکس های پایدار حاصل از MD با استفاده از روش تابعیت چگالی الکترونی (DFT) توسط برنامه Gaussian 09 مورد محاسبه قرار گرفتند.

یافته ها: فرم های موتانت G719S، T790M، L858R و دابل موتانت L858R/T790M به عنوان جهش های اصلی در بروز مقاومت در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج مدلسازی مولکولی، دو مولکول طراحی شده **۶a** ($EGFR^{T790M}$ ΔG_b ۸/۴۸- کیلو کالری بر مول) و **۲۲a** ($EGFR^{T790M}$ ΔG_b ۹/۰۳- کیلو کالری بر مول) بیشترین انرژی آزاد اتصال گیبس را در باندینگ سایت گیرنده نشان دادند. تمام پارامتر های مطالعات دینامیک مولکولی از جمله ریشه میانگین انحراف مربع (RMSD)، ریشه میانگین نوسانات مربع (RMSF)، شعاع چرخش (Rg)، برهمکنش های درون مولکولی و بین مولکولی هیدروژنی و مساحت در دسترس حلال (SASA)، توانایی هر دو مولکول **۶a** و **۲۲a** در ایجاد برهمکنش پایدار با فرم موتانت T790M گیرنده را به اثبات رساندند. هم چنین تمام پارامتر ها در تائید یکدیگر نشان دادند که مولکول **۶a**، کمپلکس لیگاند- پروتئینی محکم تر و پایدارتری را القا میکند.

بحث و نتیجه گیری: اگرچه برای اعتبارسنجی مولکول های به‌دست‌آمده، روش های تجربی نیز مورد نیاز است، استراتژی طراحی in silico به کار رفته در این مطالعه، امکان دستیابی به ساختار های جدیدی (**۶a** و **۲۲a**) را فراهم نمود که پتانسیل اتصال بالایی به فرم های جهش یافته مهم گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (از نظر بالینی) نسبت به ارلوتینیب داشتند. لازم به ذکر است مبنای انتخاب دو مولکول **۶a** و **۲۲a** از میان مجموعه ۵۸ عددی آنالوگ های تحت بررسی انرژی آزاد اتصال بالاتر این دو مولکول نسبت به داروی استاندارد (ارلوتینیب) بوده است. همچنین هر دو مولکول دارای اتصال پایدار به فرم موتانت T790M بودند. نتایج این مطالعه علاوه بر تائید اهمیت موقعیت ۶ حلقه کینازولین بر پتانسیل اتصال این ترکیبات، غلبه برهمکنش های هیدروفوبی بر هیدروژنی را نیز نشان داد.

کلید واژه ها: سرطان ریه سلول غیر کوچک، ارلوتینیب، رابطه ساختار-فعالیت، CADD، دینامیک مولکولی

فهرست مطالب

فصل۱- مقدمه ---------- ۱

۱-۱- سرطان ریه ---------- ۲

۱-۲- انواع سرطان ریه ---------- ۵

۱-۲-۱- سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) ---------- ۵

۱-۲-۲- سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) ---------- ۶

۱-۳- سیستم مرحله بندی بین المللی برای سرطان ریه ---------- ۷

۱-۴- تشخیص سرطان ریه ---------- ۸

۱-۵- درمان سرطان ریه سلول غیر کوچک ---------- ۱۱

۱-۶- درمان هدفمند توسط مولکول های کوچک ---------- ۱۳

۱-۶- گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) ---------- ۱۴

۱-۷- جهش های فعال کننده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال ---------- ۱۷

۱-۸- مهار کننده های تیروزین کینازی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال ---------- ۱۸

۱-۸-۱- مهار کننده های نسل اول ---------- ۱۹

۱-۱-۸-۱- جفیتینیب (Iressa ،ZD1839) ---------- ۱۹

۱-۱-۸-۲- ارلوتینیب (OSI-774, CP-358774, Tarceva) ---------- ۲۰

۱-۸-۲- مهار کننده های نسل دوم ---------- ۲۱

۱-۸-۳- مهار کننده های نسل سوم ---------- ۲۳

۱-۹- مقاومت اکتسابی با واسطه جهش T790M ---------- ۲۵

۱-۱۰- ترکیبات هتروسیکل ---------- ۲۶

۱-۱۱- رابطه ساختار- فعالیت مشتقات کینازولین ---------- ۲۸

۱-۱۲- اثرات ضد EGFR ترکیبات واجد کینازولین ---------- ۲۹

۱-۱۳- طراحی محاسباتی دارو ---------- ۳۳

۱-۱۴- اهداف و فرضیات ---------- ۳۴
۱-۱۴-۱- هدف کلی ---------- ۳۴
۱-۱۴-۲- اهداف اختصاصی ---------- ۳۴
۱-۱۴-۳- اهداف کاربردی ---------- ۳۵
۱-۱۴-۴- فرضیات و سوالات تحقیق ---------- ۳۵

فصل۲- مواد و روش ها ---------- ۳۶
۲-۱- انتخاب ماکرومولکول هدف ---------- ۳۷
۲-۲- مطالعات پایداری/ عملکرد پروتئین ---------- ۳۸
۲-۳- طراحی و انتخاب لیگاند ---------- ۳۸
۲-۳- داکینگ مولکولی ---------- ۴۲
۲-۳-۱- آماده سازی فایل گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال ---------- ۴۲
۲-۳-۲- آماده سازی مولکول های دارویی (لیگاند) ---------- ۴۳
۲-۳-۳- اتوگرید ---------- ۴۳
۲-۳-۴- پارامتر های داکینگ ---------- ۴۴
۲-۴- دینامیک مولکولی ---------- ۴۵
۲-۵- تابعیت چگالی الکترونی ---------- ۴۶

فصل ۳- نتایج ---------- ۴۹
۳-۱- انتخاب ساختار PDB ماکرومولکول هدف ---------- ۵۰
۳-۲- مطالعات پایداری/ عملکرد پروتئین ---------- ۵۰
۳-۳- اعتبار سنجی فرایند داکینگ مولکولی ---------- ۵۲
۳-۴- طراحی مهارکننده های احتمالی EGFR ---------- ۵۳

۱-۴-۳- گروه اول: مولکول های طراحی شده ---------- ۵۴
۲-۴-۳- گروه دوم: ترکیبات برگرفته از مقالات علمی ---------- ۵۶
۳-۴-۳- گروه سوم: ترکیبات برگرفته از PubChem ---------- ۵۷
۴-۴-۳- گروه چهارم: ترکیبات برگرفته از فاز های بالینی ---------- ۵۸
۵-۳- نتایج داکینگ مولکولی ---------- ۵۹
۱-۵-۳- آنالوگ های اکسادیازول ---------- ۶۴
۲-۵-۳- آنالوگ های سولفونامیدی ---------- ۶۴
۳-۵-۳- آنالوگ های آمیدین ---------- ۶۵
۶-۳- نتایج دینامیک مولکولی ---------- ۶۵
۱-۶-۳- انحراف ریشه مجذور میانگین (RMSD) ---------- ۶۶
۲-۶-۳- نوسان ریشه مجذور میانگین (RMSF) ---------- ۶۷
۳-۶-۳- شعاع ژیراسیون (R_g) ---------- ۶۹
۴-۶-۳- برهمکنش پیوند های هیدروژنی ---------- ۷۰
۵-۶-۳- آنالیز کنفورماسیون پایدار اتصال ---------- ۷۱
۶-۶-۳- انرژی آزاد اتصال ---------- ۷۳
۷-۶-۳- رفتار سطح پروتئین ---------- ۷۴
۷-۳- نتایج تابعیت چگالی الکترونی (DFT) ---------- ۷۵
۱-۷-۳- جزئیات اتصال کمپلکس ۶a با باندینگ سایت EGFR ---------- ۷۶
۲-۷-۳- جزئیات اتصال کمپلکس ۲۲a با باندینگ سایت EGFR ---------- ۷۹
۸-۳- قدرت اتصال آنالوگ های ارلوتینیب به $EGFR^{C797S}$ ---------- ۸۲

فصل ۴- بحث و نتیجه گیری ---------- ۸۳
۱-۴- بحث و نتیجه گیری ---------- ۸۴

۲-۴- پیشنهادات ---------- ۸۷

منابع ---------- ۸۸

پیوست ها ---------- ۹۹

فهرست علایم، نشانه ها و اختصارات

ADME: Absorption, distribution, metabolism and excretion

CADD: Computer-aided drug design

EGFR: Epidermal-growth factor receptor

HBA: Hydrogen bond acceptor

HBD: Hydrogen bond donor

LIE: Linear interaction energy

MD: Molecular dynamics

NSCLC: Non-small cell lung cancer

PDB: Protein data bank

PLIP: Protein-ligand interaction profiler

PME: Particle-mesh Ewald

RMSD: Root mean square deviation

RMSF: Root mean square fluctuation

Rg: Radius of gyration

RTB: Rotatable bonds

SAR: activity-Structure relationship

SASA: Solvent accessible surface area

SPM: Single point mutation

TKI: Tyrosine kinase inhibitor

فهرست جدول ها

جدول ۱-۱. ساختار شیمیایی مهارکننده های تیروزین کیناز نسل اول ---------- ۲۱

جدول۱-۲. ساختار شیمیایی مهارکننده های تیروزین کیناز نسل دوم ---------- ۲۲

جدول۱-۳. ساختار شیمیایی مهارکننده های تیروزین کیناز نسل سوم ---------- ۲۴

جدول ۲-۱. لیست سرور های استفاده شده در پایاننامه ---------- ۴۷

جدول ۲-۲. لیست نرم افزار های استفاده شده در پایاننامه ---------- ۴۷

جدول ۳-۱. تغییرات پایداری و ساختاری EGFR ناشی از جهش های نقطه ای ---------- ۵۱

جدول ۳-۲. نتایج داکینگ مولکولی آنالوگ های ارلوتینیب. ترکیبات a (۳۰-۱) مربوط به ساختار های طراحی شده، b (8-1)، c (۱۲-۱) و d (۸-۱) به ترتیب نشانگر ترکیبات استخراج شده از مقالات، ترکیبات حاصل از PubChem و ترکیبات فاز بالینی می باشند. ---------- ۵۹

جدول ۳-۳. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های هیدروفوب ترکیب "6a" ---------- ۷۷

جدول ۳-۴. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های هیدروژنی ترکیب "6a" ---------- ۷۷

جدول ۳-۵. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های π-Cation ترکیب "6a" ---------- ۷۸

جدول ۳-۶. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های هیدروفوب ترکیب "22a" ---------- ۸۰

جدول ۳-۷. انرژی محاسبه شده توسط نرم افزار گوسین برای برهمکنش های هیدروژنی ترکیب "22a" ---------- ۸۰

جدول ۳-۸. نتایج داکینگ مولکولی آنالوگ های ارلوتینیب در باندینگ سایت $EGFR^{C797S}$ ---------- ۸۲

فهرست نمودار ها و شکل ها

شکل ۱-۱. تعداد a) موارد جدید ابتلا به سرطان ریه، b) مرگ تخمین زده شده در سال ۲۰۲۰، جهان، هر دو جنس، همه سنین ---------- ۳

شکل ۱-۲. ریسک فاکتور های سرطان ریه ---------- ۴

شکل ۱-۳. هشتمین ویرایش طبقه بندی/ مرحله بندی TNM برای سرطان ریه که در سال ۲۰۱۸ معرفی شده است. - ۷

شکل ۱-۴. گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) فعال شده توسط فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) و مسیر های سیگنالینگ داخل سلولی آن ---------- ۱۶

شکل۱-۵. نمودار دایره ای که فراوانی جهش های EGFR را در NSCLC نشان می دهد. داده ها فیلتر شدند و فقط به جهش های آدنوکارسینوم اشاره شده. جهش های مقاومت رایج T790M و C797S فیلتر شد. ---------- ۱۸

شکل ۱-۶. رابطه ساختار فعالیت آنیلوکینازولین، هسته ی اصلی ترکیبات مهار کننده ی تیروزین کینازی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال ---------- ۲۸

شکل ۱-۷. ۴-آمینوکینازولین. موقعیت های اصلی مولکول ---------- ۲۹

شکل ۱-۸. ساختار شیمیایی ترکیب ۱۲f ---------- ۳۰

شکل ۱-۹. ساختار شیمیایی ترکیب ۱b ---------- ۳۱

شکل ۱-۱۰. ساختار شیمیایی ترکیب ۵b ---------- ۳۱

شکل ۱-۱۱. ساختار شیمیایی ترکیب ۶f ---------- ۳۲

شکل ۱-۱۲. ساختار شیمیایی ترکیب ۱۰b ---------- ۳۳

شکل۲-۱. پارامتر های انتخاب فایل ماکرومولکول ---------- ۳۷

شکل۲-۲. گروه های مختلف مهارکننده احتمالی EGFR و فاکتور های اعمال شده در انتخاب آن ها ---------- ۴۱

شکل۲-۳. تصویری از محیط داخلی نرم افزار AutoDock4.2 ---------- ۴۴

شکل۲-۴. تصویری از محیط داخلی نرم افزار Gauss View 6.0.16 ---------- ۴۶

شکل۲-۵. مراحل انجام پایاننامه ---------- ۴۸

شکل۳-۱. a) الگوی برهمکنش جفتینیب، b) کنفورماسیون باندینگ لیگاند اصلی کد 4wkq در حالت های داک شده (بنفش) و کو-کریستالوگرافی (سبز) در باندینگ سایت پروتئین EGFR با RMSD ۱/۲۹۳ آنگستروم ---------- ۵۲

شکل ۳-۲. نمودار نتایج خواص فیزیکوشیمیایی آنالوگ های ارلوتینیب، ترکیبات a (۳۰-۱) مربوط به ساختار های طراحی شده، b (۸-۱)، c (۱۲-۱) و d (۸-۱) به ترتیب نشانگر ترکیبات استخراج شده از مقالات، ترکیبات حاصل از PubChem و ترکیبات فاز بالینی می باشند. ---------- ۵۳

شکل۳-۳. بیو ایزوستر های اکسادیازول، سولفونامیدی و آمیدین داروی ارلوتینیب ---------- ۵۵

شکل ۳-۴. مهار کننده های بالقوه EGFR با هسته ی کینازولینی که در مقالات گزارش شده اند به همراه IC_{50} مربوط به هریک ---------- ۵۶

شکل ۳-۵. ترکیبات با شباهت ساختاری بالا (Tanimoto threshold= 96%) به ارلوتینیب که از PubChem استخراج شده اند ---------- ۵۷

شکل ۳-۶. مهار کننده های بالقوه EGFR با هسته ی کینازولینی که به فاز های مطالعات بالینی راه یافته اند. ----- ۵۸

شکل ۳-۷. ساختار شیمیایی بهترین آنالوگ های ارلوتینیب ۶a و ۲۲a با بیشترین انرژی اتصال به پروتئین جهش یافته و فرم Wild-type ---------- ۶۲

شکل ۳-۸. برهمکنش های ترکیبات برتر حاصل از داکینگ مولکولی در باندینگ سایت $EGFR^{T790M}$ از سرور Protein Plus (کد فایل پروتئینی 4wkq). ---------- ۶۳

شکل ۳-۹. نمودار a RMSD) اسکلت اصلی $EGFR^{T790M}$; نمودار آبی (کمپلکس ۶a)، قرمز (کمپلکس ۲۲a) و سبز (فرم آپو)، b) تمام اتم های آنالوگ های ارلوتینیب در طول شبیه سازی MD (۵۰-۰ نانو ثانیه); نمودار آبی (کمپلکس ۶a) ، قرمز (کمپلکس ۲۲a) ---------- ۶۷

شکل ۳-۱۰. نمودار RMSF کربن آلفا $EGFR^{T790M}$; نمودار آبی (کمپلکس ۶a)، قرمز (کمپلکس ۲۲a) و سبز (فرم آپو)---------- ۶۸

شکل ۳-۱۱. نمودار Rg بر زمان برای اسکلت اصلی $EGFR^{T790M}$; نمودار آبی (کمپلکس ۶a)، قرمز (کمپلکس ۲۲a) و سبز (فرم آپو) را در طول شبیه سازی MD (۵۰-۰ نانو ثانیه) نشان میدهد ---------- ۶۹

شکل ۳-۱۲. a) تعداد پیوند های هیدروژنی بین مولکولی ($r \leq 0.35$ Å) بین $EGFR^{T790M}$ و ۶a (آبی)، ۲۲a (قرمز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD، b) تعداد پیوند های هیدروژنی درون مولکولی ($r \leq 0.35$ Å) بین $EGFR^{T790M}$ و ۶a (آبی)، ۲۲a (قرمز) و فرم آپو (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD ---------- ۷۱

شکل ۳-۱۳. تصویر سه بعدی الگوی اتصال کنفورماسیون های پایدار a) ۶a و b) ۲۲a در شبیه سازی MD در باندینگ سایت $EGFR^{T790M}$ (کد 4wkq) ---------- ۷۲

شکل ۳-۱۴. انرژی آزاد اتصال آنالوگ های برتر ارلوتینیب a) ۶a و b) ۲۲a با باندینگ سایت $EGFR^{T790M}$ در طول شبیه سازی MD ---------- ۷۴

شکل ۳-۱۵. مساحت سطح وابسته به زمان در دسترس حلال $EGFR^{T790M}$ در اتصال با ۶a (آبی)، ۲۲a (قرمز) و فرم آپو (سبز) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی MD ---------- ۷۵

شکل ۳-۱۶. برهمکنش های کمپلکس ۶a-$EGFR^{T790M}$ حاصل از شبیه سازی MD. خط چین های سیاه ، نارنجی و خط آبی به ترتیب بیانگر برهمکنش های هیدروفوبیک، π - کاتیونی و هیدروژنی هستند ---------- ۷۶

شکل ۳-۱۷. انرژی آزاد اتصال ۶a با اسید آمینه های باندینگ سایت $EGFR^{T790M}$ ---------- ۷۸

شکل ۳-۱۸. برهمکنش های کمپلکس $EGFR^{T790M}$-۲۲a حاصل از شبیه سازی MD. خط چین سیاه و خط آبی به ترتیب بیانگر برهمکنش های هیدروفوبیک و هیدروژنی هستند ---------- ۷۹

شکل ۳-۱۹. انرژی آزاد اتصال ۲۲a با اسید آمینه های باندینگ سایت $EGFR^{T790M}$ ---------- ۸۱

شکل۴-۱. منطق طراحی مهار کننده های تیروزین کینازی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال ---------- ۸۶