

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

**STUDII CHEMOINFORMATICE ȘI STRATEGII DE
DESIGN MOLECULAR UTILIZATE ÎN SCOPUL
IDENTIFICĂRII DE NOI COMPUȘI ANTITUMORALI**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. NIȚULESCU GEORGE MIHAI

Student-doctorand:

ION GEORGE NICOLAE DANIEL

2022

Cuprins

Lucrări științifice publicate	4
Abrevieri.....	5
Introducere.....	7
I. Partea generală.....	11
1. Protein-kinazele ca ținte în terapia antitumorală	11
1.1. Introducere.....	11
1.2. Protein-kinazele.....	12
1.2.1. Structura protein-kinazelor	14
1.3. Inhibitorii de protein-kinaze.....	16
1.3.1. Inhibitori de protein-kinaze aprobați	17
1.3.2. Mecanisme de acțiune și clasificare	21
2. Pim-1 kinaza ca țintă terapeutică în cancer	24
2.1. Introducere	24
2.2. Expresie și producere	26
2.3. Structură și mod de acțiune	28
2.4. Distribuția și roluri în țesuturi	29
2.5. Roluri fiziologice și patologice	30
2.6. Substraturi fiziologice	31
2.7. Implicare în semnalizarea celulară.....	31
2.8. Implicare în tumorigeneză.....	33
2.9. Pim-1 kinaza ca țintă terapeutică	33
3. Inhibitorii de Pim-1 kinază.....	36
3.1. Introducere	36
3.2. Clasificarea inhibitorilor de Pim-1 kinază	37
3.2.1. Clasificarea în funcție de modul de interacțiune	37
3.2.2. Clasificarea în funcție de structura chimică	38
Derivați de imidazopiridazină	39
Derivați de tiazolidin-2,4-dione.....	40
Derivați aminopiridinici	41
Derivați diaminopirazolici.....	42
Derivați oxoindolici.....	43
Derivați de 2-azaindol	44
Pirazolopirimidine	44
Complexe organometallice	45
Compuși naturali	46
II. Contribuții personale	50

4. Investigații privind profilul antiproliferativ al compușilor cu acțiune antitumorală din baza de date NCI-60	51
4.1. Introducere.....	51
4.2. Materiale și metode	53
4.3. Rezultate	58
4.4. Discuții	70
4.5. Concluzii.....	70
5. Investigații structurale asupra compușilor cu acțiune antitumorală	72
5.1. Introducere.....	72
5.2. Materiale și metode	73
5.3. Rezultate	77
5.3. Discuții și concluzii.....	86
6. Optimizarea metodei de docking virtual a inhibitorilor de Pim-1 kinază	88
6.1. Introducere.....	88
6.2. Materiale și metode	89
6.3. Rezultate.....	96
6.4. Discuții	116
6.5. Concluzii	118
7. Identificarea unor potențiali inhibitori de Pim-1 kinază cu efect antiproliferativ pe baza reorientării terapeutice.....	119
10.1. Introducere.....	119
10.2. Materiale și metode	119
10.2.1. Generarea și pregătirea setului de studiu	119
10.2.2. Studiul de docking virtual.....	120
10.3. Rezultate	121
10.3.1. Generarea și pregătirea setului de studiu	121
10.3.2. Analiza structurală	124
10.3.3. Analiza rezultatelor docărilor moleculare.....	129
10.3.4. Optimizarea rezultatelor pe baza scorului predictiv	134
10.4. Discuții	138
Concluzii generale	141
Bibliografie.....	147

Introducere

Conform Organizației Mondiale a Sănătății, patologiiile oncologice reprezintă la ora actuală una dintre afecțiunile cu cel mai mare impact negativ la nivel global, atât din cauza diversității formelor de cancer cât și datorită versatilității modurilor de instalare a rezistenței la tratament, fiind astfel un obiectiv prioritar în domeniul descoperirii de medicamente.

Alegerea temei de doctorat a fost justificată de necesitatea constantă de a descoperi noi inhibitori antitumorali cu eficiență terapeutică ridicată și toxicitate sistemică redusă.

Importanța temei alese este dată de impactul fiziologic al protein-kinazelor în semnalizarea și funcționarea celulară, aceste enzime fiind implicate în reglarea proceselor cruciale ce controlează ciclul celular, proliferarea, supraviețuirea tumorală dar și dezvoltarea mecanismelor de chimiorezistență. Protein-kinazele au un rol important în dezvoltarea tumorală, în majoritatea patologiiilor oncologice fiind raportate diverse disfuncții cantitative sau calitative ale acestora.

O țintă terapeutică intens studiată în prezent este reprezentată de Pim-1 kinaza, o protein-kinază ce fosforilează o mare varietate de substraturi proteice, implicată atât în tumorigeneză și metastazare cât și în instalarea chimiorezistenței. Inhibarea acestei enzime s-a dovedit a fi asociată cu apoptoza tumorală, scăderea proliferării celulare și combaterea rezistenței la chimioterapie în diferite tipuri de cancer.

Obiectivul general al tezei de doctorat este reprezentat de investigarea caracteristicilor inhibitorilor de protein-kinaze existenți, aprobați sau aflați în studiu, cu scopul de a optimiza identificarea și dezvoltarea de noi inhibitori potenți și selectivi ai Pim-1 kinazei, cu aplicabilitate în tratamentul oncologic.

În acest scop cercetarea de față s-a axat pe dezvoltarea unor metode statistice și chemoinformatică de analiză a datelor puse la dispoziție online de către Institutul Național pentru Cancer din Statele Unite ale Americii (NCI) despre numeroși compuși cu activitate antiproliferativă asupra unei colecții de diferite linii celulare canceroase („NCI-60 panel”).

Studiul actual își propune să găsească o întrebuițare datelor furnizate de către NCI, deoarece testele *in vitro* au fost deja efectuate pentru acești compuși, favorizând evitarea unor costuri legate de timp, dar și financiare destul de mari.

Dezvoltarea unor metode de determinare a unei corelații între caracteristicile fizico-chimice, profilul antiproliferativ NCI-60 și mecanismul farmacologic de acțiune al unui compus reprezintă un important element de originalitate al tezei. Această metodă permite

identificarea viitoare de noi inhibitori de Pim-1 kinaze, cu schelete moleculare diferite de cele ale inhibitorilor descriși până acum în literatura de specialitate.

Pentru îndeplinirea obiectivului propus, metodologia cercetării presupune următoarele etape:

- identificarea unui profil antiproliferativ specific pentru inhibitorii de protein-kinaze, util pentru diferențierea altor mecanisme antitumorale ale medicamentelor anticanceroase,
- identificarea unor caracteristici structurale și fizico-chimice specifice moleculelor cu activitate antiproliferativă crescută,
- screening-ul virtual al unor compuși cu potențial inhibitor asupra Pim-1 kinazei, prin studii de docking molecular,
- dezvoltarea și optimizarea unei metode de prezicere a activității *in vitro* pe baza rezultatelor *in silico* din urma docărilor moleculare,
- identificarea unor compuși cu activitate promițătoare de inhibare a Pim-1 kinazei în urma unui studiu de reorientare terapeutică pe baza metodelor dezvoltate.

Teza de doctorat este structurată în două secțiuni, partea teoretică, ce prezintă stadiul actual al cunoașterii în domeniu și partea experimentală, ce prezintă cercetările personale realizate în vederea identificării unor potențiali inhibitori de Pim-1 kinază.

Primele trei capitole realizează o sistematizare a literaturii, descriind protein-kinazele și inhibitorii acestora aprobați în tratamentul oncologic, precum și Pim-1 kinaza ca un caz particular, împreună cu descoperirile recente făcute în sensul inhibării activității acesteia.

Partea experimentală începe în Capitolul 4 cu dezvoltarea unei metode de predicție și de identificare a profilului antiproliferativ specific inhibitorilor de protein-kinaze pentru compușii din baza NCI, pe baza unor metode statistice, comparând 18 inhibitori de protein-kinaze și 80 de medicamente oncologice cu alt mecanism farmacologic cunoscut.

Capitolul 5 descrie explorarea caracteristicilor structurale și fizico-chimice ale compușilor din baza de date și dezvoltarea unei metode de analiză a structurilor de bază pentru peste 90000 compuși, cu obținerea unor informații despre capacitatea anumitor structuri chimice de a inhiba proliferarea celulară mai puternic comparativ cu altele.

Capitolul 6 descrie un studiu de docare moleculară pe un set de inhibitori de protein-kinaze asupra țintei terapeutice alese, Pim-1 kinaza, optimizat pe baza analizei modului de interpretare de către algoritmul de docare a interacțiunilor dintre compuși și proteină. Metoda

dezvoltată reprezintă un important element de originalitate al tezei prin implementarea unui scor de predicție a activității *in vitro* pe baza rezultatelor *in silico* ce țin cont de interacțiile favorabile unei activități inhibitoare crescute.

Ultimul capitol reunește cele trei metode de analiză dezvoltate, prin reorientarea terapeutică (*drug repurposing*) a 22 de medicamente din baza de date DrugBank cu activitate antiproliferativă asupra liniilor celulare canceroase. Screening-ul virtual s-a finalizat cu identificarea unor potențiali inhibitori de Pim-1 kinază, derivați cu nucleu fenotiazinic și butirofenonic, confirmați de rezultate recente din literatura de specialitate.

Studii ulterioare pot fi realizate pentru explorarea amănunțită a potențialului inhibitor asupra Pim-1 kinazei al compușilor NSC177380, NSC186946 și NSC185040, preziși de metoda dezvoltată ca fiind cei mai promițători din punctul de vedere unei inhibări *in vitro* a enzimei. Compușii NSC35949 și NSC1760, medicamente deja aprobate în tratamentul altor patologii, au fost de asemenea identificați ca fiind potriviți pentru reorientarea terapeutică înspre inhibarea Pim-1 kinazei cu efect antitumoral.

Caracterul interdisciplinar al lucrării de doctorat al cercetărilor efectuate reiese din utilizarea metodelor statistice pentru identificarea valorilor outlier (extreme) a efectului antiproliferativ, utilizarea metodelor chemoinformatică pentru caracterizarea structurală a compușilor studiați, utilizarea cunoștințelor din domeniul biochimiei și al biologiei celulare pentru interpretarea datelor colectate din baza NCI disponibile online și utilizarea metodelor de screening *in silico* pentru aprecierea potențialului farmacologic al inhibitorilor studiați și interpretarea relațiilor structură-acțiune relatate în literatură sau obținute în urma docărilor moleculare.

Metodele dezvoltate, aplicabile pentru orice țintă terapeutică implicată în proliferarea celulară, pot fi îmbunătățite pentru creșterea acurateții, prin încorporarea mai multor date despre compușii pe baza cărora au fost generate formulele matematice de predicție a activității, ceea ce se poate realiza în studii ulterioare pentru identificarea mai multor potențiale medicamente anticanceroase.

I. Partea generală

1. Protein-kinazele ca ținte în terapia antitumorală

Cancerul este o boală larg răspândită la nivel global, fiind una dintre primele cauze de deces din lume, cu un impact socioeconomic crescut [1].

Identificarea perturbărilor biomoleculare oncogenice și dezvoltarea terapiei anticanceroase personalizate reprezintă un subiect de actualitate din domeniul medical [2], iar protein-kinazele reprezintă una din cele mai studiate ținte terapeutice, fiind implicate în reglarea proceselor ce controlează ciclul celular, proliferarea, supraviețuirea tumorală, dar și dezvoltarea mecanismelor de chemorezistență [3].

Totalitatea protein-kinazelor codificate la nivelul genomului uman, cunoscută ca și kinomul uman, alcătuiește aproximativ 2% din secvențele codificate în total la nivel genetic și cuprinde 518 protein-kinaze, dintre care 478 prezintă secvențe genetice similare, clasice eucariotelor, iar alte 40 sunt considerate protein-kinaze atipice [3], [4]. În funcție de natura substratului proteic fosforilat, enzimele se împart în tirozin-kinaze și serin-treonin kinaze.

Diverși inhibitori de protein-kinaze aprobați pentru terapia antitumorală și-au dovedit deja eficiența, având rezultate mai bune comparativ cu terapia citotoxică clasică, cu o creștere a supraviețuirii în diverse afecțiuni maligne [5], [6].

Odată cu aprobarea în 2001 a primului inhibitor ce a țintit specific o protein-kinază, imatinib, pentru tratamentul leucemiei mieloide cronice (LMC), a fost deschisă calea dezvoltării acestei clase de medicamente, până la începutul anului 2021 fiind aprobați peste 70 de inhibitori de protein-kinaze [6].

În prezent, dezvoltarea de inhibitori selectivi și potenți de protein-kinaze a evoluat semnificativ de la sinteza analogilor de staurosporină (primul inhibitor cercetat) către metodele de design rațional bazate pe structură ce utilizează numeroase tehnici moderne, precum studiile de docking molecular, cristalografie, spectroscopie cu rezonanță magnetică nucleară, iar de la aprobarea imatinib în 2001 până în prezent au fost depuse peste 10000 de aplicații pentru brevetarea unor inhibitori de protein-kinaze doar la nivelul Statelor Unite ale Americii [7].

În funcție de interacțiunea cu enzima-țintă, inhibitorii de protein-kinaze se pot împărți în clase, pe baza tipului și poziției legării de macromoleculă. Inhibitorii de tip I, I^{1/2} și II se leagă buzunarul format de legăturile de hidrogen dintre adenină și regiunea de tip “balama” a protein-kinazei, în timp ce inhibitorii de tip III și IV sunt inhibitori alosterici, iar tipul V

este reprezentat de inhibitori bivalenți, ce se leagă de două regiuni diferite ale kinazei. Compușii de tip VI sunt inhibitori ireversibili, legându-se covalent de enzimă [5,6].

2. Pim-1 kinaza ca țintă terapeutică în cancer

Familia de protein-kinaze Pim, denumită după oncogenele cu același nume (engl. “*proviral integration site for Moloney murine leukemia virus*”), aparține clasei de serin/treonin kinaze (STPK) și cuprinde trei forme principale, Pim-1, Pim-2 și Pim-3. Reprezentanții acestei familii sunt proteine cu implicare majoră în proliferarea tumorală, jucând roluri importante în apariția diferitor tipuri de cancer [8].

Cele trei oncoproteine fac parte din familia de protein-kinaze dependente de calciu/calmodulină (engl. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*, CAMK), cu încadrarea enzimatică EC (engl. *enzyme classification*) 2.7.11.1 [9]. Poziția Pim-1 kinazei în raport cu grupul CAMK din kinomul uman este evidențiată în Fig. 2.1, cu ajutorul platformei online KinMap (<http://www.kinhub.org/kinmap/>) [10].

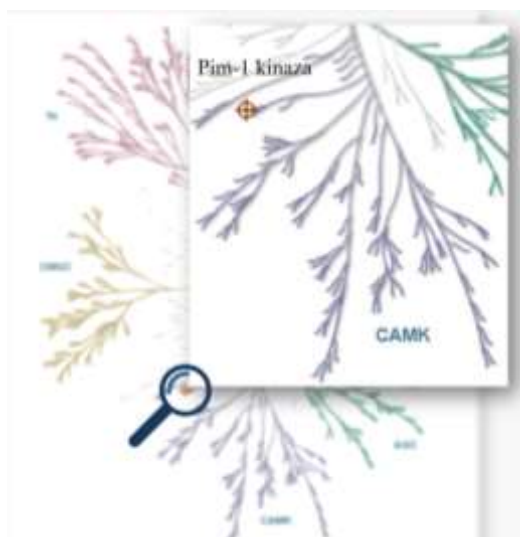


Fig. 2.1 – Clasificarea CAMK kinazelor codificate în kinomul uman. Poziția Pim-1 kinazei umane este evidențiată prin markerul galben cu roșu. Ilustrarea clasificării realizată cu ajutorul platformei online KinMap <http://www.kinhub.org/kinmap/> [10].

Cel mai relevant membru al familiei Pim pentru patologiile tumorale este Pim-1, cu o importanță ridicată în semnalizarea proceselor oncogenice, fiind de asemenea și cea mai larg răspândită. Expresia aberantă a acestei kinaze a fost raportată ca fiind în strânsă legătură cu numeroase patologii maligne, precum cancerul de prostată, cancerul pancreatic, cancerul de colon, leucemia cronică limfocitară, limfomul non-Hodgkin, precum și mielomul multiplu [11].

Oncogena PIM-1 este localizată pe brațul scurt al cromozomului 6 și codifică 313 (izoforma Pim-1S), respectiv 404 aminoacizi (izoforma Pim-1L), secvența fiind împărțită de-a lungul a 6 exoni și 5 introni [12].

În mare parte, proteina Pim-1 prezintă o structură tipică de protein-kinază, cu domeniul kinazic alcătuit din doi lobi, N-terminal și C-terminal, separat de o regiune “balama” (engl. *hinge*). Pim-1 posedă o caracteristică structurală ce diferențiază această proteină de alte protein-kinaze printr-o arhitectură diferită a regiunii “balama” ce unește cei doi lobi și influențează legarea ATP, ceea ce permite obținerea unor inhibitori de Pim-1 kinază cu selectivitate ridicată [11].

Structura tridimensională a proteinei Pim-1 cristalizată cu ligandul staurosporină este prezentată în Fig. 2.2, împreună cu regiunile structurale caracteristice domeniului kinazic, așa cum a fost obținută și descrisă de Arrouchi et al. [11].

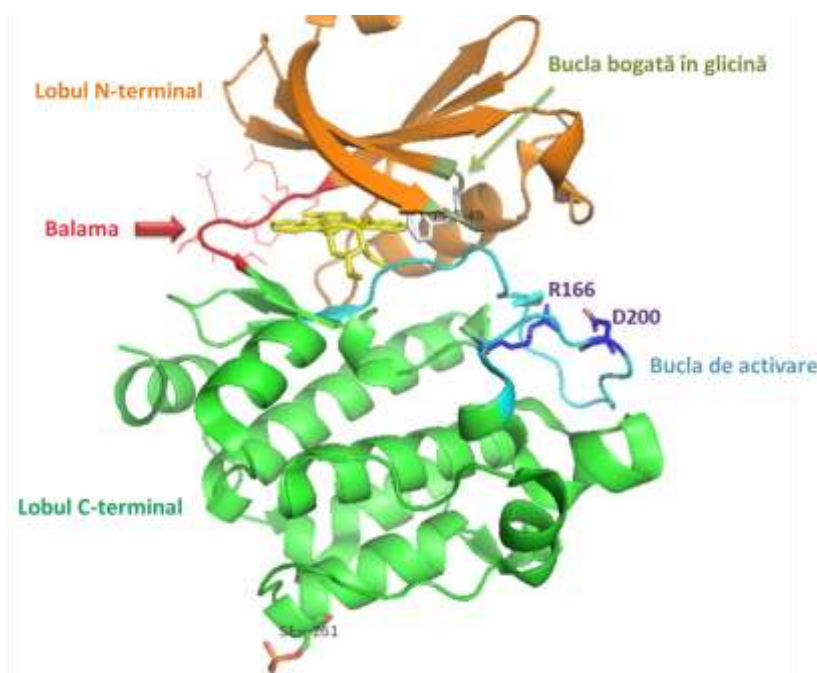


Fig. 2.2 – Structura tridimensională a Pim-1 kinazei (cod PDB: 1YHS) cristalizată cu ligandul staurosporină (evidențiat cu galben). Imagine preluată după Arrouchi et al. [11].

În Fig. 2.3 se pot observa cele mai importante procese mediate de Pim-1 kinază, alături de substraturile sau căile metabolice cu care interacționează și implicarea în toate funcțiile celulare [13].

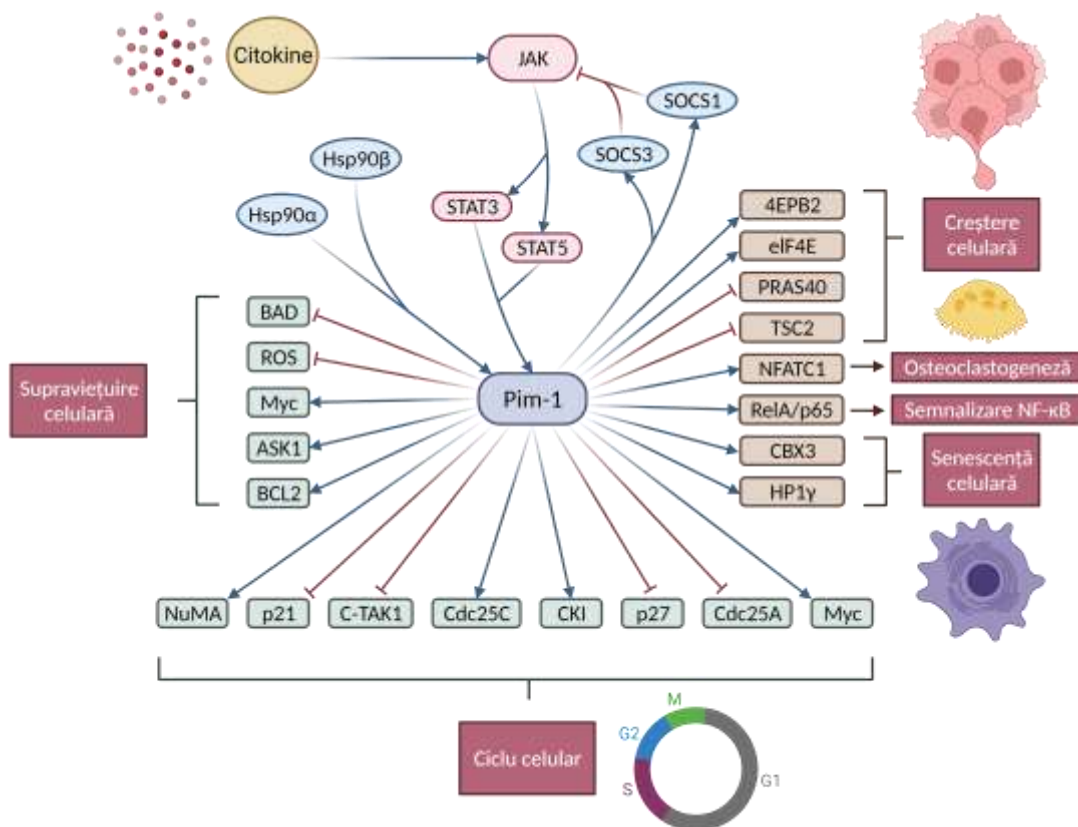


Fig. 2.3 – Reglarea și implicarea Pim-1 kinazei în căile de semnalizare celulară, cu diferitele căi metabolice în care este implicată [13]. Imagine realizată cu ajutorul BioRender

O importanță deosebită a fost atribuită Pim-1 kinazei în apariția rezistenței la chimioterapie în numeroase tipuri de cancer [14] cu principalul mecanism suspectat în rezistența la medicamentele antitumorale reprezentat de inhibarea apoptozei induse de factorul proapoptotic p53.

3. Inhibitorii de Pim-1 kinază

Malignitățile hematologice, dar și cancerul de prostată și cancerul mamar, sunt principalele patologii în care inhibarea Pim-1 kinazei exercită un impact semnificativ asupra evoluției bolii, astfel încât numeroase studii de dezvoltare și testare a unor inhibitori Pim-1 sunt realizate pe aceste tipuri de cancere. Potențialul reducerii rezistenței la chemoterapie prin alăturarea unor inhibitori de Pim-1 kinază la tratamentul oncologic este promițător, ceea ce crește și mai mult valoarea inhibării enzimei în terapia anticanceră.

Deși până la momentul cercetării actuale nu a fost aprobat niciun inhibitor de Pim-1 kinază, în literatura de specialitate sunt descriși numeroși compuși cu activitate inhibitoare asupra acestei ținte terapeutice. Din punct de vedere al legării de proteină, inhibitorii de Pim-1 kinază sunt de tip ATP-competitivi și se împart în inhibitori ATP-mimetici și inhibitori

non-ATP-mimetici. O a treia categorie de inhibitori include liganzii care acționează asupra Pim-1 prin mecanisme de legare caracteristice ambelor grupe.

Având în vedere diversitatea chimică ridicată a inhibitorilor de Pim kinaze raportați în literatură până în prezent, se poate face o împărțire în funcție de structurile de bază. Printre clasele chimice de inhibitori Pim se numără heterocicluri de tipul indolocarbazoli, bisindolilmaleimide, naftiridine, piridazine, izoxazoli, tiazolidin-2-4-dione, tienopirimidinone, piridone, izoxazoloquine, derivați piridinici și pirimidinici, complexe organometalice, dar și alte tipuri de structuri [11], [15].

Există un număr limitat de studii clinice care cercetează inhibiția țintită a Pim kinazelor, majoritatea fiind asupra malignităților hematologice. Câțiva dintre inhibitorii ajunși în studii clinice de fază I sau II cu rezultate promițătoare sunt SGI-1776, SMI-4a, și TP-3654, inhibitori neselectivi Pim cu nucleu imidazopiridazinic, studiați în malignitățile hematologice recidivate sau refractare la tratament, dar și în cancerul mamar HER-2 pozitiv [16]. Totodată, se remarcă derivatul de tiazolidin-2,4-dionă, AZD1208, studiat în cancerul de sân triplu-negativ [17] și derivații aminopiridinici PIM44 [18] și INCB053914 [19], cu potențial în tratamentul malignităților hematologice.

II. Contribuții personale

4. Investigații privind profilul antiproliferativ al compușilor cu acțiune antitumorală din baza de date NCI-60

Obiectivul acestei cercetări este reprezentat de dezvoltarea unei metode simple, dar eficiente, de determinare a unei corelații între “amprenta” antiproliferativă NCI-60 și mecanismul farmacologic de acțiune al unui compus, cu scopul identificării de potențiali inhibitori de protein-kinaze (PKI). În acest scop, au fost colectați din baza NCI un număr de 9137 compuși. După curățarea și filtrarea datelor a fost alcătuit un set de 18 inhibitori de protein-kinaze, ce a constituit grupul PKI, și un set AOD (medicamente oncologice aprobate) conținând 80 medicamente cu alt mecanism de acțiune decât inhibarea de protein-kinaze. Au fost utilizate pentru aprecierea activității antiproliferative rezultatele exprimate ca valori logaritmice din concentrațiile semi-maximale inhibitorii ale proliferării, pGI_{50} , calculate din concentrațiile μM .

Au fost realizate analize descriptive ale întregului set, pentru a putea fi identificate valorile de tip outlier, care au indicat liniile celulare mai sensibile sau mai rezistente la acțiunea unui compus. Un exemplu este reprezentat de compusul identificat cu codul NSC652680, cu 4 valori de tip outlier pentru pIC_{50} ale căror distribuție este prezentată în Fig. 4.1.

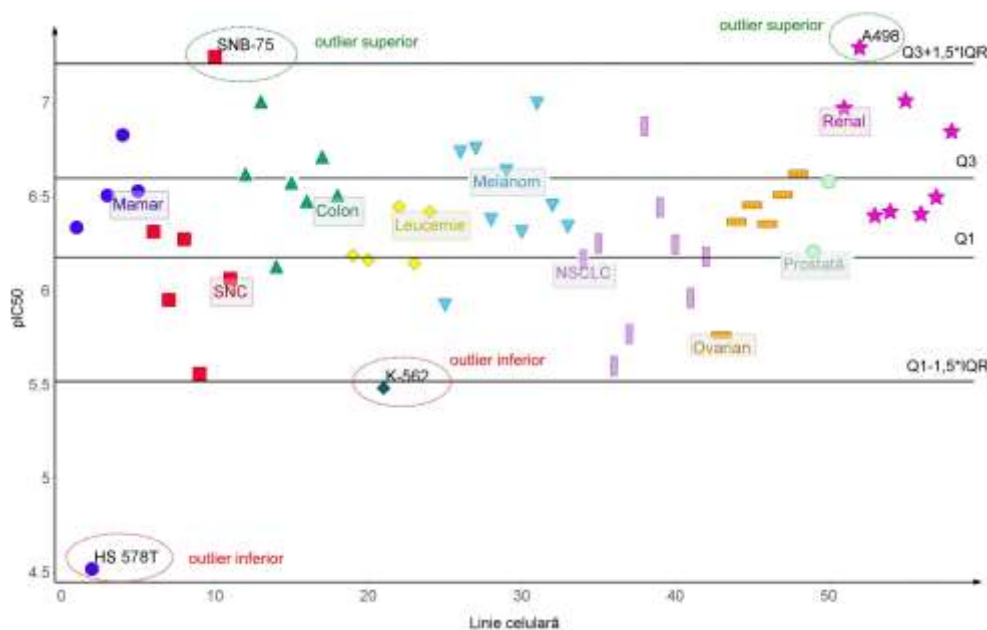


Fig. 4.1 – Distribuția valorilor outlier ale pIC_{50} pe cele 60 de linii celulare din panoul NCI-60 pentru compusul NSC652680

Analiza seturilor studiate din punct de vedere al profilurilor antiproliferative a relevat existența unui tipar de inhibare a creșterii caracteristic setului PKI. Rezultatele au arătat că anumite tipuri de celule din panoul de linii celulare NCI-60 sunt mai sensibile decât restul la acțiunea inhibitorilor de protein-kinază, în raport cu cele 80 de medicamente antitumorale cu care au fost comparați (AOD), lucru exprimat de numărul de valori outlier pentru liniile celulare respective. În urma analizei numărului de valori de tip outlier superior pentru fiecare din cele 60 de linii celulare, a fost dezvoltată o formulă de precizie a mecanismului de acțiune al unui compus, în baza profilului antiproliferativ afișat în baza NCI.

Frecvența valorilor outlier din fiecare dintre grupurile de compuși a fost utilizată pentru a calcula un factor de greutate (denumit în continuare și „coeficient al liniei celulare”). Astfel, pentru fiecare linie celulară, au fost calculate separat frecvențele de apariție a valorilor outlier de tip superior, respectiv inferior, în seturile PKI și respectiv AOD. A fost calculat un coeficient pentru fiecare linie celulară utilizând diferența între frecvența de apariție în setul PKI și respectiv AOD, după formulele matematice:

$$WU_i = \left(\frac{uPKI_i}{nPKI} - \frac{uAOD_i}{nAOD} \right) * 100$$

$$WL_i = \left(\frac{lPKI_i}{nPKI} - \frac{lAOD_i}{nAOD} \right) * 100$$

unde WU_i reprezintă factorul de greutate superior (engl. “*Weight Upper*”), iar WL_i factorul de greutate inferior (engl. “*Weight Lower*”) pentru linia celulară i . Parametrii $uPKI_i$ și $uAOD_i$ reprezintă numărul de valori de tip outlier superior (engl. “*upper*”) decelați în setul PKI, respectiv în setul AOD pentru linia celulară i . Analog pot fi explicați și parametri $lPKI_i$ and $lAOD_i$, cu referire la valorile de tip outlier inferior (engl. “*lower*”). $nPKI$ și $nAOD$ reprezintă numărul total de compuși ce alcătuiesc fiecare dintre cele două seturi.

Astfel, factorul de greutate pentru fiecare linie celulară este echivalent cu probabilitatea unui rezultat pGI50 de a fi o valoare de tip outlier în setul PKI, în defavoarea setului AOD. Pe baza prezenței unei valori outlier, codificată prin valorile 1 (prezent) sau 0 (absent) a variabilelor U_i (“*upper outlier*”), respectiv L_i (“*upper outlier*”), a fost calculat un scor de predicție a potențialului de a inhiba o protein-kinaza, pe baza formulei:

$$S_c = \sum_{i=1}^{60} (WU_i * U_i + WL_i * L_i)$$

Valorile mai mari de 10,21 pentru scorul calculat cu ajutorul formulei predictive au indicat o probabilitate crescută de a inhiba o protein-kinază, în timp ce valori mai mici au

indicat o probabilitate redusă. Scorurile pentru cei 9137 compuși din setul testat au variat între -74,58 și 118,33, iar 409 compuși din setul studiat au fost preziși a acționa prin inhibarea unor protein-kinaze, obținând valori mai mari de 10,21 pentru scorul predictiv. În urma analizei ROC pentru validarea internă, metoda dezvoltată a fost caracterizată ca având o valoare a sensibilității de 0,833 și o valoare pentru 1-specificitate de 0,05.

Primii 10 compuși din punct de vedere al scorurilor predictive calculate sunt prezentați în Fig. 4.3 în funcție de profilurile antiproliferative, în comparație cu setul de 18 PKI folosit pentru stabilirea modelului predictiv.

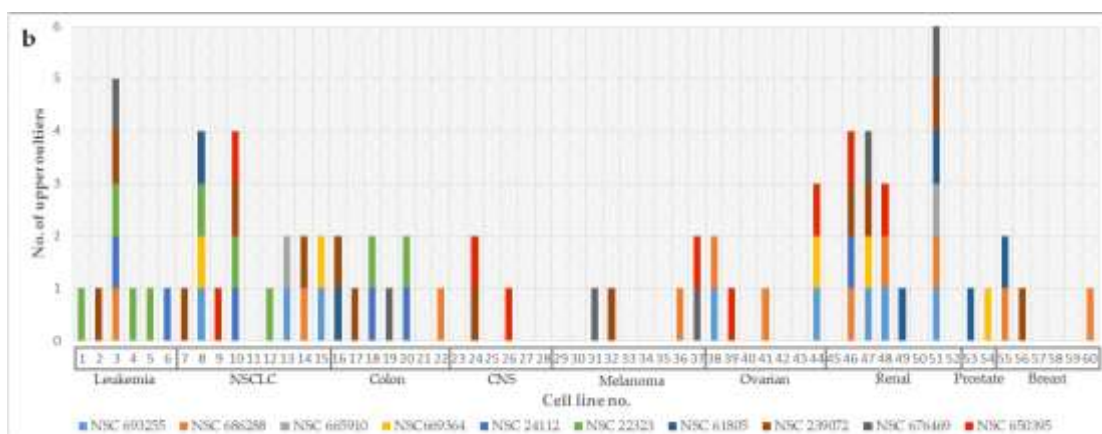


Fig. 4.2 - Distribuția valorilor pGI50 de tip outlier superior obținute pentru liniile celulare canceroase NCI-60 pentru compușii cu cele mai mari 10 punctaje, ilustrați în Tabelul 5. Graficul prezintă bare colorate corespunzătoare unui anumit compus, oriunde valoarea pGI50 a fost identificată ca fiind un outlier superior pentru acel compus. Prin comparație, pot fi observate unele asemănări între profilurile unora dintre inhibitorii din setul predictiv și primii 10 potențiali PKI preziși.

Validarea externă a metodei cu ajutorul algoritmului COMPARE al NCI a arătat valori ale corelației între 0,41 și 0,76 pentru 4 din primii 10 compuși cu cele mai mari valori ale scorului predictiv, afișând amprente antiproliferative similare cu ale inhibitorilor cunoscuți de protein-kinază imatinib, lapatinib, gefitinib, dasatinib și erlotinib, ce au confirmat utilitatea metodei dezvoltate [20].

Diferența între structurile chimice ale compușilor identificați față de structurile tipice ale inhibitorilor de protein-kinaze cunoscuți indică utilitatea acestei metode în orientarea cercetătorilor din domeniul chimiei medicinale către noi spații chimice pentru identificarea de compuși de tip *lead* pentru *design*-ul de PKI. Așa cum se poate observa și în Fig. 4.3, majoritatea compușilor discutați prezintă în structură cicluri aromatice sau heterocicluri diferite de structurile clasice ale inhibitorilor de protein-kinaze cunoscuți.

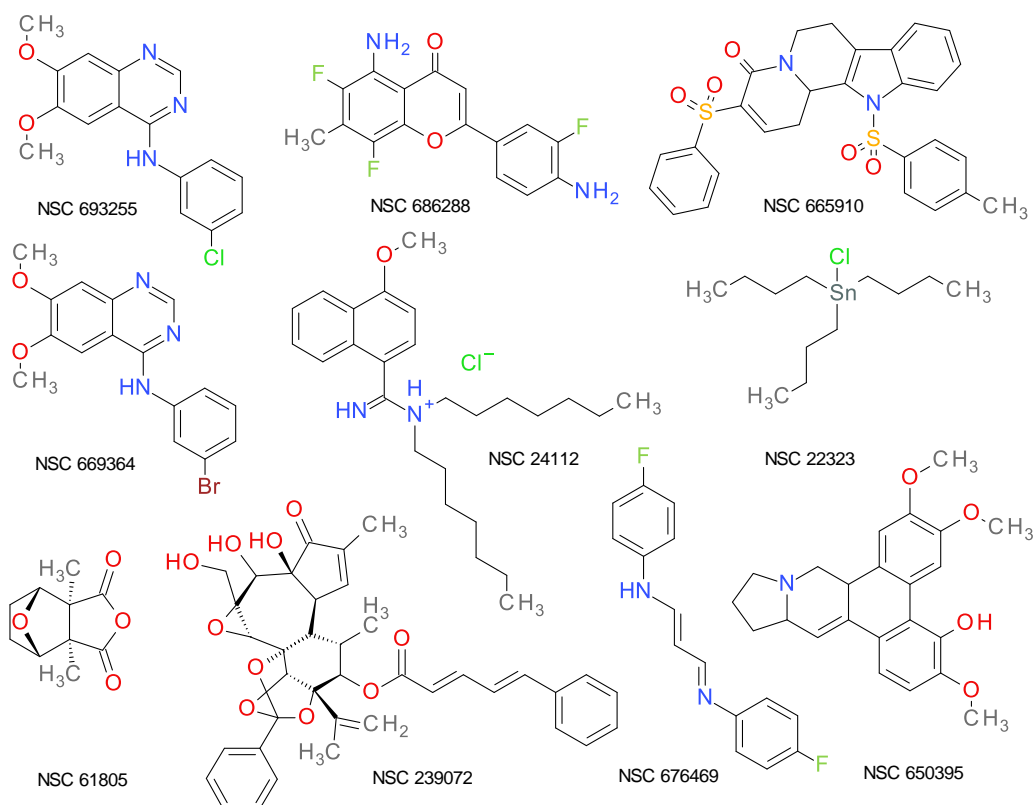


Fig. 4.3 – Structurile chimice ale primilor 10 potențiali inhibitori de protein-kinaze identificați pe baza metodei dezvoltate

Cu ajutorul scorului predictiv au fost identificați 409 compuși din baza NCI care au fost preziși a acționa asupra proliferării celulare prin inhibarea protein-kinazelor. Din primii 10 potențiali PKI identificați, profilele antiproliferative s-au corelat cu cele ale unor PKI deja aprobați în terapia diferitor tipuri de cancer, precum malignitățile hematologice și cancerul pulmonar, pancreatic și mamar, indicând utilitatea metodei pentru depistarea unor compuși deja studiați pentru alte efecte sau reorientarea terapeutică a unor medicamente.

5. Investigații structurale asupra compușilor cu acțiune antitumorală

Pentru creșterea selectivității, etapa următoare a cercetării a presupus realizarea unei analize exhaustive a efectului antiproliferativ al compușilor din baza NCI, atât din punctul de vedere al proprietăților fizico-chimice, cât și din punctul de vedere al structurii chimice, apreciate pe baza unor schelete moleculare ce descriu topologia compușilor analizați. Au fost colectate din baza NCI două seturi diferite de compuși, caracterizând în total 91438 de compuși testați la una sau cinci concentrații asupra liniilor celulare (setul G_{ID} , respectiv setul P_{GI}). Procesul de generare al seturilor este schematizat în Fig. 5.1.

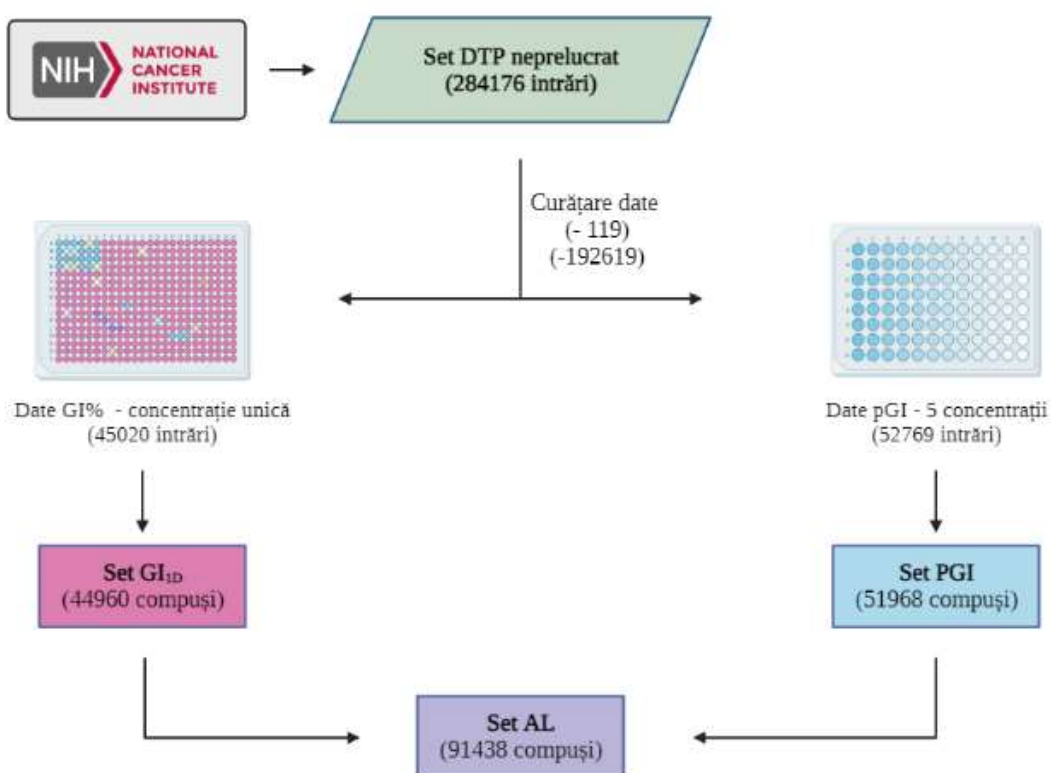


Fig. 5.1 - Schematizarea procesului de generare a seturilor de compuși analizate

Au fost generate două tipuri de schelete moleculare caracteristice (Bemis-Murcko și *plain rings*) pe baza structurilor chimice ale tuturor compușilor din seturile analizate, iar apoi au fost calculate frecvențe, scoruri de selectivitate (O_{ID} , O_{pGI}), scoruri de performanță (P_{ID} , P_{pGI}) și mediile rezultatelor biologice (A_{ID} , A_{pGI}) pentru fiecare schelet molecular.

Analiza acestor scoruri pentru cele 1176 schelete moleculare de tip Bemis-Murcko a evidențiat faptul că cele mai populare 10 structuri sunt puțin promițătoare ca precursori de compuși cu efecte antiproliferative crescute, fiind identificate însă și cele mai eficiente, mult mai complexe din punct de vedere structural, ilustrate în Fig. 5.2.

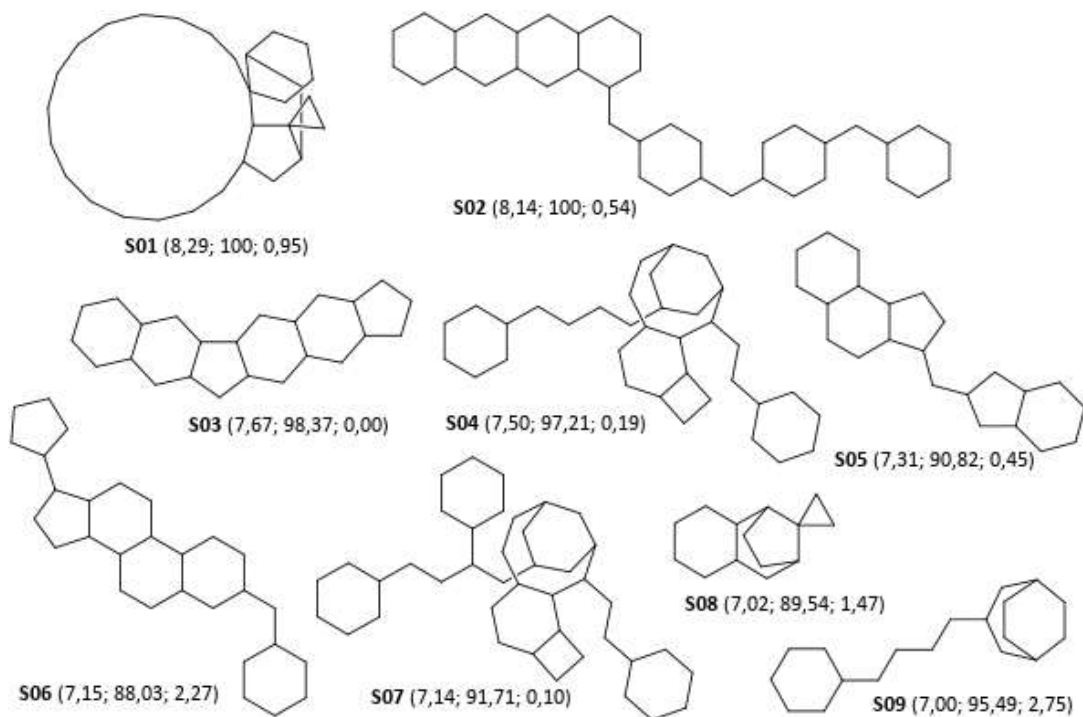


Fig. 5.2 – Scheletele moleculare din setul PGI cu cele mai mari scoruri de performanță, cu scorurile A_{PGI} , P_{PGI} , and O_{PGI} afișate în paranteză.

Analiza similară pentru scheletele moleculare de tip *plain rings* a identificat nucleeele chinolină, tetrahidropiran, benzimidazol, și pirazol cu cele mai mari scoruri de performanță. Diverse structuri și tipare specifice în designul de medicamente antitumorale au fost identificate în urma acestei analize. Rezultatele au indicat faptul că natura scheletului molecular are un impact semnificativ asupra potențialului antiproliferativ. Cele mai promițătoare nucleee de tip *plain rings* identificate sunt prezentate în Fig. 5.3 și Fig. 5.4 [21].

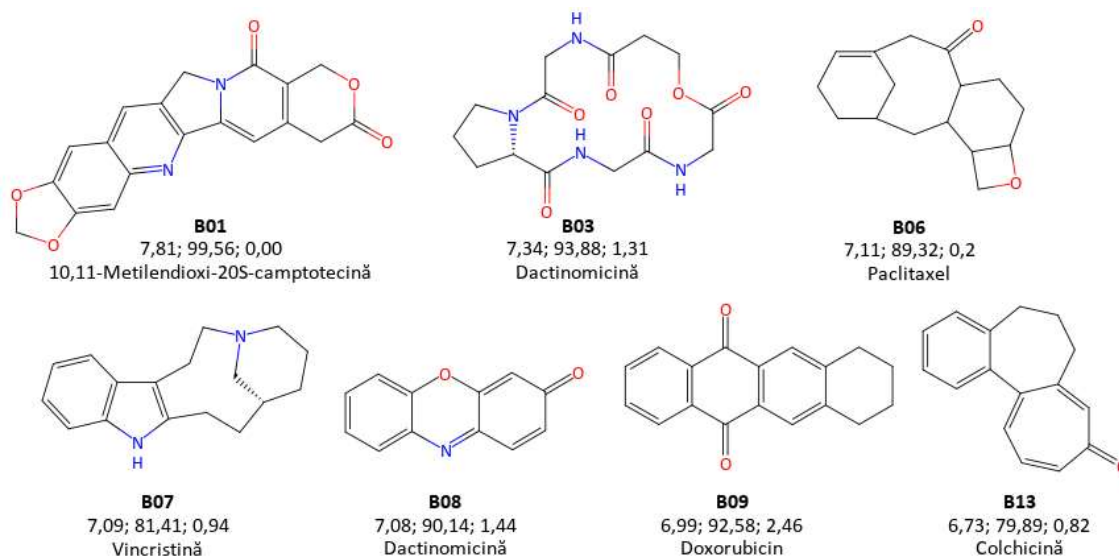


Fig. 5.3 – Nucleeele de bază cu cele mai bune scoruri de performanță, alături de scorurile A_{PGI} , P_{PGI} și O_{PGI} și medicamente bazate pe structurile respective.

Metoda astfel dezvoltată în acest studiu poate fi utilizată pentru analize similare bazate pe datele extrase din baza de date NSC a Institutului Național pentru Cancer. Această metodă poate fi îndreptată asupra unei anume structuri ciclice și folosită pentru identificarea altor structuri cu profiluri de inhibiție asemănătoare. Deși metoda dezvoltată face abstracție de efectul substituenților asupra structurilor ciclice, rezultatele indică evident faptul că natura scheletului molecular are un impact semnificativ asupra potențialului antiproliferativ. De asemenea, metoda poate fi utilizată în cercetări ulterioare pentru a cuantifica influența scheletului molecular în comparație cu poziția sau natura substituenților în ceea ce privește efectul antitumoral.

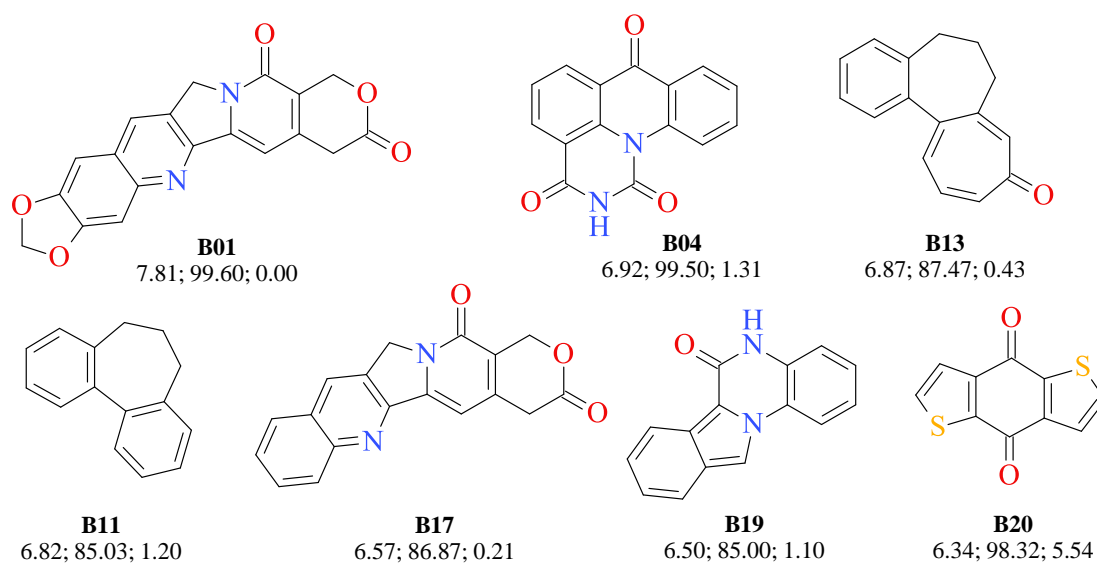


Fig. 5.4 – Cele mai promițătoare 7 nuclee de bază, în funcție de valorile scorurilor A_{pGI} , P_{pGI} și O_{pGI} prezentate pentru fiecare, calculate ca efecte independente asupra moleculei din care fac parte.

6. Optimizarea metodei de docking virtual a inhibitorilor de Pim-1 kinază

Capitolul 6 prezintă studiul de docking molecular, realizat pentru diferențierea structurilor specifice inhibiției Pim-1 din totalul diferiților inhibitori de protein-kinaze. Astfel, au fost colectate date despre 3067 de substanțe testate pentru inhibarea Pim-1 kinazei umane în diferite studii *in vitro* și disponibile în baza de date online ChEMBL. Dintre aceștia 36 de compuși au fost supuși studiului de docare moleculară, pentru determinarea corelației dintre activitatea prezisă *in silico* și valoarea IC_{50} obținută experimental. Cea mai bună energie de legare a fost calculată pentru compusul CHEMBL2037200, prezentat în Fig. 6.1.

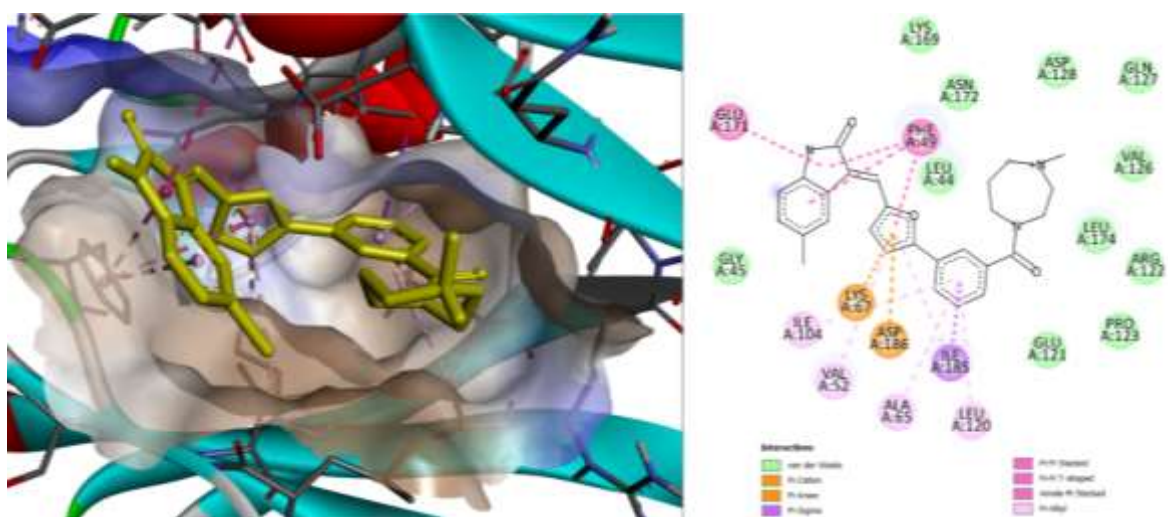


Fig. 6.1 Rezultatele de docare pentru compusul 3 (CHEMBL2037200): (a) vedere 3D a conformației docate (conformația cu cea mai mică energie de legare și fără interacțiuni nefavorabile); (b) Diagrama 2D care arată interacțiunile cu resturile de aminoacizi.

Prin compararea rezultatelor *in vitro* cu cele *in silico* pentru inhibitori deja cunoscuți de protein-kinaze, studiul de docking molecular a descoperit că algoritmul de docare utilizat (Autodock Vina) supraestimează sau subestimează energiile de legare, și prin urmare afinitatea calculată față de enzima Pim-1 kinaza este diferită de afinitatea reală, exprimată de valoarea IC_{50} . Rezultatele docărilor, comparate cu rezultatele testărilor *in vitro*, sunt ilustrate în Fig. 6.2.

Pentru a corecta acest aspect, a fost dezvoltată o metodă de ajustare a afinității calculate pe baza interacțiunilor cu anumiți aminoacizi-cheie. Procesul de analiză al studiului este redat în Fig. 6.3.

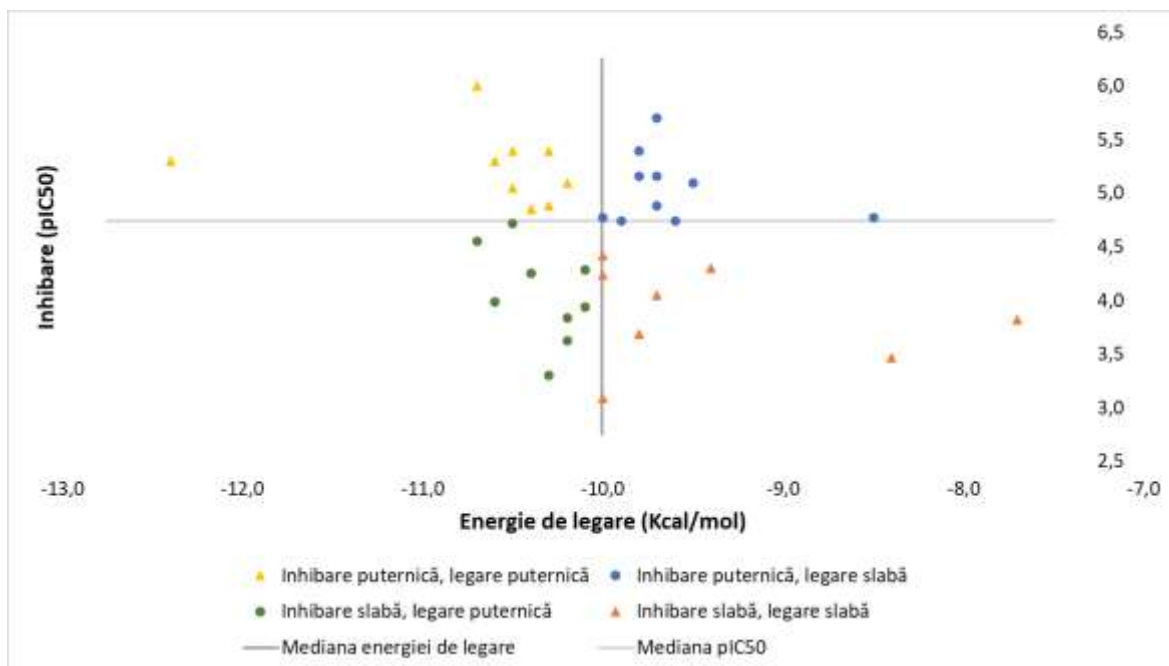


Fig. 6.2 - Distribuția compușilor analizați pe baza pIC₅₀ și a energiei de legare rezultată din docare.

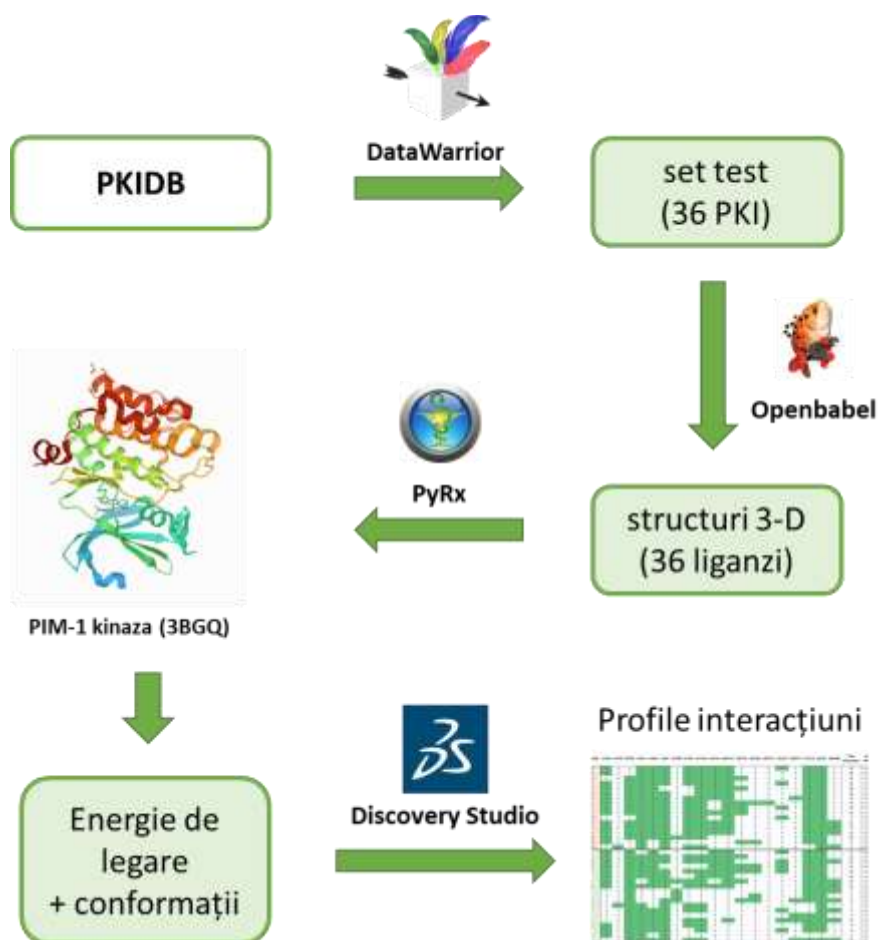


Fig. 6.3 – Schema generală a etapelor studiului desfășurat asupra interacțiunilor compușilor de testat cu Pim-1 kinaza obținute în urma procesului de docare

În urma vizualizării și interpretării rezultatelor docărilor moleculare, pentru fiecare dintre cei 36 de liganzi a fost extrasă manual lista cu interacțiunile specifice conformațiilor viabile. Interacțiunile cu fiecare aminoacid au fost codificate ca un rezultat binar pentru fiecare dintre resturile de aminoacizi participante la interacțiuni iar între cele două seturi a fost evaluată distribuția interacțiunilor. S-au remarcat astfel unele interacțiuni care sunt presupuse a favoriza mai mult legarea unui ligand în situsul de inhibiție decât altele. Pornind de la acest raționament, au fost definite interacțiunile care sunt corelate cu activitate inhibitoare mai mare (valori IC₅₀ mai mici) ca fiind interacțiuni „pozitive”, fiind interacțiuni observate în cea mai mare parte pentru grupul „puternic”, în timp interacțiunile „negative” au fost considerate cele corelate cu o activitate inhibitoare mai scăzută. Au fost identificați aminoacizii Phe49, Val52, Glu89, Arg122, Glu171 și Ile185 din structura enzimei Pim-1 ca fiind resturi-cheie cu care un compus ar trebui să interacționeze pentru a fi un ligand cu afinitate ridicată pentru proteina-țintă.

A fost calculat un coeficient pentru fiecare rest de aminoacid care interacționează cu un ligand, apoi au fost efectuate analize de corelație și regresie pentru fiecare aminoacid participant, precum și pentru fiecare compus, luând în considerare și subgrupul fiecărui ligand. Pe baza unei analize de regresie logistică multifactorială a fost dezvoltat un scor predictiv ce estimează o valoare pIC₅₀ pe baza prezenței sau absenței interacțiunii unui compus cu fiecare rest de aminoacid al proteinei Pim-1. Ecuația de corecție a scorului de docare a fost aleasă ca fiind modelul cu cea mai mare valoare ajustată pentru R² (0,525).

$$\text{scor predictiv} = -0,133 * \text{Energie liberă} + 0,903 * \text{Phe49} - 1,087 * \text{Val52} - 0,619 * \text{Glu89} \\ - 0,479 * \text{Arg122} + 0,247 * \text{Glu171} - 1,055 * \text{Ile185} + 4,762 \quad (R^2 = 0,620)$$

Analiza fizico-chimică a setului curățat, de 2551 inhibitori Pim-1, a evidențiat caracteristici specifice compușilor cu activitate bună asupra Pim-1 kinazei, descrierea întregului grup fiind utilă pentru identificarea descriptorilor moleculari care influențează exercitarea unui efect inhibitor puternic asupra enzimei. Compușii cu masă moleculară mică, sub pragul de 300 g/mol sunt distribuiți aproape exclusiv în setul de inhibitori slabi, iar compușii cu masă moleculară mare sunt inhibitori potenți ai Pim-1 kinazei dacă valoarea LogP nu depășește pragul de 5,5. Rezultatele indică importanța existenței unui schelet molecular suficient de voluminos pentru a interacționa cu enzima. 87,55% din compușii setului puternic au prezentat un număr de acceptori de H cuprins între 5 și 8. Compușii cu cel mult o grupare de tip donor de H au fost asociați cu apartenența la grupul slab de inhibitori. Rezultatele analizei structurale indică de asemenea importanța existenței unor

structuri cu un anumit grad de flexibilitate și faptul că valoarea pIC_{50} crește în medie cu numărul de fragmente ciclice disjuncte. Aceste aspecte sunt ilustrate în Fig. 6.4.

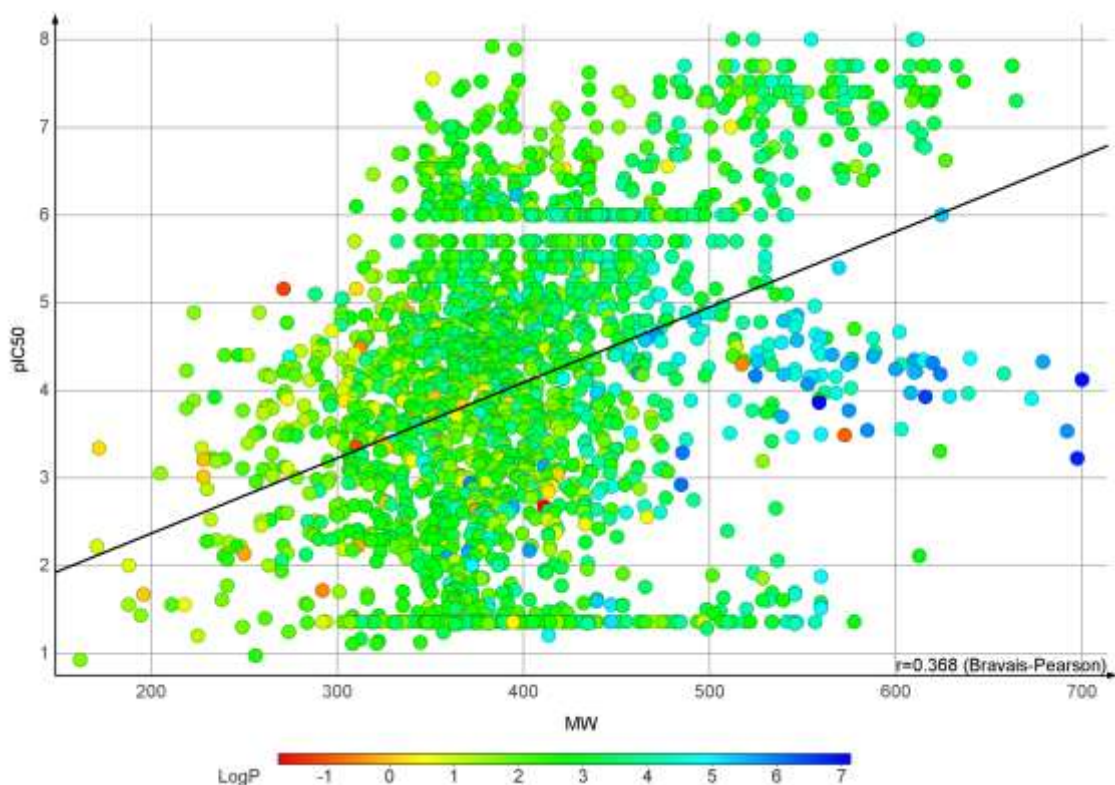


Fig. 6.4 – Distribuția valorilor pIC_{50} ale celor 2551 de compuși din setul inițial în funcție de masa moleculară și coeficientul de partiție n-octanol/apă (LogP).

Deși evidențiază erorile de precizie a afinității unui ligand față de proteina țintă, metoda dezvoltată în capitolul 6 nu este validată propriu-zis, aspect ce poate fi rezolvat însă în studii ulterioare pe o țintă terapeutică cu inhibitori deja cunoscuți și bine caracterizați, cu valori IC_{50} pentru un set mai mare de compuși. Acest lucru ar putea ajuta de asemenea la creșterea puterii predictive a metodei, cu îmbunătățirea preciziei.

7. Identificarea unor potențiali inhibitori de Pim-1 kinază cu efect antiproliferativ pe baza reorientării terapeutice

Capitolul 7 a reunit rezultatele dobândite în cercetările anterioare, fiind coroborate pentru creșterea șanselor de identificare a unor inhibitori de Pim-1 kinază din rândul structurilor aflate în baza de medicamente DrugBank. Studiul de drug repurposing astfel desfășurat a condus la selecția a 22 de compuși ce întrunesc caracteristicile observate în capitolele anterioare ca fiind asociate cu o afinitate mai mare față de Pim-1 și un efect antiproliferativ crescut, cu un profil caracteristic inhibitorilor de protein-kinaze.

Moleculele selectate pe baza metode dezvoltate în capitolul 4 și apoi studiate din punct de vedere structural folosind analiza din capitolul 5 au fost în final testate in silico pentru afinitatea față de Pim-1 kinază prin metoda de docare optimizată în capitolul 6, screening-ul virtual finalizându-se cu identificarea unor potențiali inhibitori de Pim-1 kinază. În Fig. 7.1 este ilustrat compusul NSC35949, cu cea mai bună energie de legare prezisă de algoritmul de docare (AutoDock Vina), -11,1 Kcal/mol, și un scor IC_{50} prezis cu valoare crescută, de 7,3563.

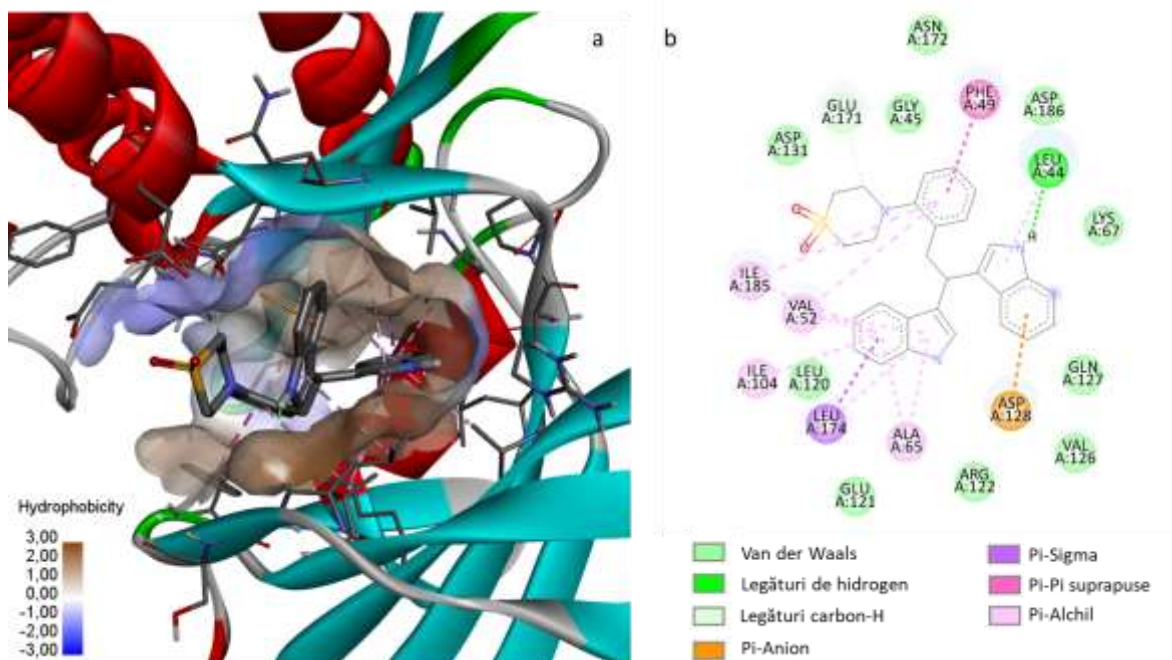


Fig. 7.1 – a) conformația tridimensională a complexului dintre compusul NSC35949 și situsul activ al proteinei cristalizate Pim-1 kinaza (3BGQ); b) diagrama 2D a interacțiunilor dintre ligandul NSC35949 și Pim-1 kinaza

Conform metodei de predicție dezvoltate, o parte din compușii din setul cu afinități calculate ridicate față de proteină au fost supraapreciați de algoritmul de docare, având valori sub medie pentru scorul predictiv. De asemenea, o parte din compușii calculați a avea o afinitate slabă de legare au prezentat scoruri predictive peste medie, indicând faptul că aceștia ar fi inhibitori mai puternici ai enzimei în realitate. Compușii cu scorurile predictive cele mai mari au fost NSC177380, NSC186946 și NSC185040, ceea ce nu a coincis cu rezultatele obținute în urma docării, care a identificat compușii NSC35949, NSC1760 și NSC178249 pe primele trei locuri. Acest lucru subliniază puterea predictivă a factorului de corecție dezvoltat, dar ridică necesitatea confirmării rezultatelor prin teste *in vitro*, aspect realizabil în studii ulterioare.

Tabelul 7.1 – Comparație între compușii cu afinitate crescută și cei cu afinitate scăzută, din estimările algoritmului de docare, comparativ cu clasificarea pe baza scorului predictiv. Valorile colorate cu portocaliu arată compușii supraestimați de algoritmul de docare, conform scorului predictiv calculat, iar valorile colorate cu albastru arată subestimarea afinității reale

Inhibitori cu afinitate crescută (Energie < -8,58 Kcal/mol)			Inhibitori cu afinitate slabă (Energie > -8,58 Kcal/mol)		
NSC	Energie de legare (Kcal/mol)	Scor predictiv	NSC	Energie de legare (Kcal/mol)	Scor predictiv
35949	-11,1	7,3563	177380	-8,5	8,0975
1760	-10,5	6,5505	186946	-8,5	8,0975
178249	-9,8	5,5544	36398	-8,4	5,2282
174923	-9,3	5,9669	11897	-8,2	6,7236
176371	-9,3	6,2509	185040	-8,1	8,0443
186057	-9,3	6,8699	186063	-7,8	6,6704
49733	-9,1	6,8433	325308	-7,8	6,9174
174940	-9,1	6,6113	183519	-7,7	6,8411
84922	-8,9	6,3377	5278	-6,7	7,6111
181099	-8,9	7,9037	167897	-6,6	5,6398
36525	-8,8	7,2344	23615	-6,4	6,9522

Atât compușii identificați de către algoritmul de docare, cât și cei identificați de către scorul predictiv, ca potențiali inhibitori ai Pim-1 kinazei, merită investigați în continuare pentru evaluarea efectului inhibitor *in vitro*, în teste enzimatiche.

Toate aspectele studiate în cercetările prezentate anterior, precum proprietățile fizico-chimice, numărul de valori outlier, scheletele moleculare de tip Bemis-Murcko distribuite în

funcție de valorile energiei de legare din docare și al scorului predictiv calculat sunt coroborate în Fig. 7.2.

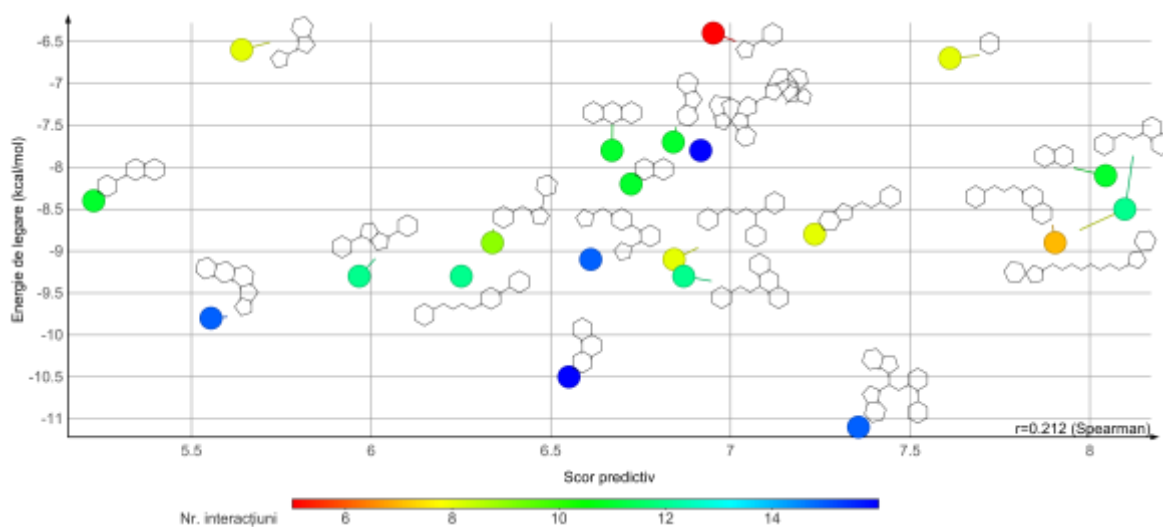


Fig. 7.2 – Analiza corelației între scorul predictiv și energia de legare, în funcție de scheletele moleculare Bemis-Murcko generate pentru cei 22 de compuși studiați

Screening-ul virtual a identificat potențiali inhibitori de Pim-1 kinază, unii dintre aceștia având efecte antiproliferative descrise în literatură. Studii ulterioare pot fi realizate pentru explorarea amănunțită a potențialului inhibitor asupra Pim-1 kinazei al compușilor haloperidolului (NSC176371) și al derivaților de fenotiazină (NSC186067 și NSC 186063), medicamente cunoscute ca agenți neuroleptici.

Metoda dezvoltată și validată de-a lungul celor 4 cercetări independente a fost confirmată prin identificarea unor compuși, care au dovedit activitate confirmată *in vitro* asupra Pim-1 kinazei în studii recente relatate în literatură. Noutatea și scopul acestei cercetări nu sunt reprezentate doar de identificarea în sine a unor potențiali candidați terapeutici, ci și de metoda dezvoltată pentru a realiza acest lucru, metodă care poate fi adaptată pentru diverse ținte terapeutice implicate în proliferarea celulelor tumorale.

Concluzii generale

Obiectivul general al tezei doctorale a fost reprezentat de identificarea de noi inhibitori ai Pim-1 kinazei, utili pentru efectul antiproliferativ și de combatere a rezistenței la chimioterapie în diverse tipuri de cancere, conform literaturii.

O etapă importantă pentru realizarea cercetărilor a fost reprezentată de studiul literaturii actuale de specialitate, ce descrie stadiul actual al cunoașterii în domeniu, punând bazele ipotezei de cercetare și stabilind premisele dezvoltării de inhibitori Pim-1, aspecte detaliate în partea teoretică.

Pentru atingerea obiectivului general, studiile experimentale au avut la bază utilizarea unor date deja existente în baze de date bine caracterizate, puse la dispoziție online de către National Cancer Institute (NCI), despre testarea activității anticanceroase pentru mult de 90.000 de compuși testați privind efectul antiproliferativ asupra diferitor tipuri de cancere, reprezentate de 60 de linii celulare tumorale. Pe baza acestor date au fost dezvoltate metode de identificare a unor tipare ce caracterizează compușii cu selectivitate asupra protein-kinazelor, diferențiind astfel substanțele antitumorale cu alt mecanism de inhibitorii de protein-kinaze.

În urma studiului de *drug repurposing*, au fost identificați și derivați fenotiazinici și butirofenonici, confirmați de rezultate recente din literatura de specialitate, precum haloperidolul (NSC176371) derivații de fenotiazină (NSC186067 și NSC 186063), medicamente cunoscute ca agenți neuroleptici.

Contribuțiile personale din cadrul cercetărilor experimentale sunt reprezentate de metodele de identificare și predicție ale potențialului antiproliferativ, potențialului de inhibare al unei protein-kinaze și respectiv potențialul de inhibare al Pim-1 kinazei, precum și identificarea unor parametri structurali caracteristici inhibitorilor Pim-1, ce pot servi la identificarea ulterioară de noi candidați antitumorali.

În concluzie, obiectivele cercetării au fost îndeplinite în totalitate, fiind identificate caracteristici ale profilului antiproliferativ NCI-60 specifice inhibitorilor de protein-kinază, cu conturarea unui profil structural caracteristic medicamentelor antitumorale și cu identificarea în final a unor potențiali inhibitori ai Pim-1 kinazei, dintre care se remarcă haloperidolul, oxiridazina și tioridazina, ce se pretează pentru desfășurarea de studii ulterioare pentru evaluarea activității *in vitro*.

Bibliografie selectivă

- [1] C. Mattiuzzi și G. Lippi, „Current Cancer Epidemiology.”, *J. Epidemiol. Glob. Health*, vol. 9, nr. 4, pp. 217-222, dec. 2019, doi: 10.2991/jegh.k.191008.001.
- [2] J. E. Debreczeni *et al.*, „Ruthenium half-sandwich complexes bound to protein kinase Pim-1.”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 45, nr. 10, pp. 1580-1585, feb. 2006, doi: 10.1002/anie.200503468.
- [3] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, și S. Sudarsanam, „The protein kinase complement of the human genome.”, *Science*, vol. 298, nr. 5600, pp. 1912-1934, dec. 2002, doi: 10.1126/science.1075762.
- [4] K. C. Duong-Ly și J. R. Peterson, „The human kinome and kinase inhibition.”, *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. Chapter 2, p. Unit2.9, mar. 2013, doi: 10.1002/0471141755.ph0209s60.
- [5] S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, și P. Cohen, „Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.”, *Biochem. J.*, vol. 351, nr. Pt 1, pp. 95-105, oct. 2000, doi: 10.1042/0264-6021:3510095.
- [6] L. Zhong *et al.*, „Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives”, *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, nr. 1, p. 201, 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00572-w.
- [7] K. S. Bhullar *et al.*, „Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions.”, *Mol. Cancer*, vol. 17, nr. 1, p. 48, feb. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
- [8] Y. N. Zhukova, M. G. Alekseeva, N. V Zakharevich, A. A. Shtil, și V. N. Danilenko, „Pim family of protein kinases: Structure, functions, and roles in hematopoietic malignancies”, *Mol. Biol.*, vol. 45, nr. 5, p. 695, 2011, doi: 10.1134/S0026893311040170.
- [9] J. A. Ubersax și J. E. J. Ferrell, „Mechanisms of specificity in protein phosphorylation.”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, nr. 7, pp. 530-541, iul. 2007, doi: 10.1038/nrm2203.
- [10] S. Eid, S. Turk, A. Volkamer, F. Rippmann, și S. Fulle, „KinMap: a web-based tool for interactive navigation through human kinome data”, *BMC Bioinformatics*, vol. 18, nr. 1, p. 16, 2017, doi: 10.1186/s12859-016-1433-7.
- [11] H. Arrouchi, W. Lakhli, și A. Ibrahim, „A review on PIM kinases in tumors”, *Bioinformation*, vol. 15, nr. 1, pp. 40-45, feb. 2019, doi: 10.6026/97320630015040.
- [12] J. Chen și G. Tang, „PIM-1 kinase: a potential biomarker of triple-negative breast cancer.”, *Oncotargets Ther.*, vol. 12, pp. 6267-6273, 2019, doi: 10.2147/OTT.S212752.
- [13] Y. Tursynbay *et al.*, „Pim-1 kinase as cancer drug target: An update”, *Biomed. reports*, vol. 4, nr. 2, pp. 140-146, feb. 2016, doi: 10.3892/br.2015.561.
- [14] M. Isaac, A. Siu, și J. Jongstra, „The oncogenic PIM kinase family regulates drug resistance through multiple mechanisms.”, *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, vol. 14, nr. 4-5, pp. 203-211, 2011, doi: 10.1016/j.drug.2011.04.002.
- [15] A. L. Merkel, E. Meggers, și M. Ocker, „PIM1 kinase as a target for cancer therapy.”, *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 21, nr. 4, pp. 425-436, apr. 2012, doi: 10.1517/13543784.2012.668527.
- [16] B.-W. Wang *et al.*, „Pim1 Kinase Inhibitors Exert Anti-Cancer Activity Against HER2-Positive Breast Cancer Cells Through Downregulation of HER2 ”, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, 2021, [Online]. Valabil la: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.614673>.
- [17] W. Zhao, R. Qiu, P. Li, și J. Yang, „PIM1: a promising target in patients with triple-negative breast cancer”, *Med. Oncol.*, vol. 34, nr. 8, p. 142, 2017, doi: 10.1007/s12032-017-0998-y.
- [18] P. Mondello, S. Cuzzocrea, și M. Mian, „Pim kinases in hematological malignancies: where are we now and where are we going?”, *J. Hematol. Oncol.*, vol. 7, nr. 1, p. 95, 2014, doi: 10.1186/s13045-014-0095-z.
- [19] H. Koblisch *et al.*, „Preclinical characterization of INCB053914, a novel pan-PIM kinase inhibitor, alone and in combination with anticancer agents, in models of hematologic malignancies.”, *PLoS One*, vol. 13, nr. 6, p. e0199108, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0199108.
- [20] G. N. D. Ion și G. M. Nitulescu, „In Search of Outliers. Mining for Protein Kinase Inhibitors

- Based on Their Anti-Proliferative NCI-60 Cell Lines Profile.”, *Molecules*, vol. 25, nr. 8, apr. 2020, doi: 10.3390/molecules25081766.
- [21] G. N. D. Ion *et al.*, „Improving the odds of success in antitumoral drug development using scoring approaches towards heterocyclic scaffolds”, *Oncol Rep*, vol. 44, nr. 2, pp. 589-598, 2020, doi: 10.3892/or.2020.7636.

Lucrări științifice publicate

Rezultatele obținute în cadrul cercetării doctorale au fost diseminate sub forma a două articole de specialitate publicate în reviste indexate ISI și 3 lucrări prezentate sub formă de poster științific la conferințe naționale și internaționale de specialitate.

I. Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Ion, G. N. D.**, Nitulescu, G. M. (2020). In Search of Outliers. Mining for Protein Kinase Inhibitors Based on Their Anti-Proliferative NCI-60 Cell Lines Profile. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(8).
<https://doi.org/10.3390/molecules25081766>. IF = 4,411; Q2
2. **Ion, G. N. D.**, Olaru Tudorel, O., Nitulescu, G., Olaru Ioana, I., Tsatsakis, A., Burykina I, T., Spandidos A., D., & Nitulescu Mihai, G. (2020). Improving the odds of success in antitumoral drug development using scoring approaches towards heterocyclic scaffolds. *Oncol Rep*, 44(2), 589-598.
<https://doi.org/10.3892/or.2020.7636>. IF = 3,906; Q3

II. Postere științifice

1. **Ion, G.**; Nitulescu, G. Application of a target fishing method on antiproliferative agents with pyrazolyl-thiourea structure; 6th Prague-Weizmann Summer School Advances in Drug Discovery; 2–6 September 2019, Prague.
2. **Ion, G.**; Nitulescu, G. Structural And Physicochemical Analysis Of Protein Kinase Inhibitors In Cancer Treatment; Congress of the University of Medicine and Pharmacy Carol Davila, 10-12 October 2019, Bucharest.
3. **Ion, G.**; Nitulescu, G., Drugs and PAINs: A DrugBank analysis of pan-assay interference compounds; Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 November 2019, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/ECMC2019-06378