

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA OSTERC

**ISKANJE NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE B
S POMOČJO REŠETANJA NA OSNOVI STRUKTURE LIGANDA IN
STRUKTURNO PODPRTEGA VIRTUALNEGA REŠETANJA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA OSTERC

**ISKANJE NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE B
S POMOČJO REŠETANJA NA OSNOVI STRUKTURE LIGANDA IN
STRUKTURNO PODPRTEGA VIRTUALNEGA REŠETANJA**

**DISCOVERY OF NEW POTENTIAL DNA-GYRASE B INHIBITORS
USING LIGAND- AND STRUCTURE-BASED VIRTUAL SCREENING**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču za strokovno pomoč in velikodušne nasvete pri nastajanju diplomske naloge. Iskrena hvala tudi staršema, partnerju, otrokoma in prijateljem, ki so me vsi podpirali ter mi stali ob strani ves čas študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Mateja Osterc

Ljubljana, 2016

VSEBINA

POVZETEK.....	iii
ABSTRACT	iv
SEZNAM OKRAJŠAV	v
1. UVOD	1
1.1. DNA-giraza	3
1.2. Zaviralci DNA-giraze.....	4
1.3. Računalniške metode pri iskanju novih zdravilnih učinkovin	6
1.3.1. Virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda	8
1.3.2. Strukturno podprto virtualno rešetanje– sidranje	10
2. NAMEN DELA.....	14
3. METODE	15
3.1. Pregled znanstvene literature in izbira različnih ligandov za virtualno rešetanje na osnovi liganda.....	15
3.2. Izbira ustrezne baze spojin	16
3.3. Izvedba virtualnega rešetanja na osnovi liganda.....	16
3.4. Pregled in analiza rezultatov ter priprava obogatene knjižnice spojin.....	17
3.5. Izračun knjižnice konformacij za spojine iz obogatene knjižnice.....	17
3.6. Priprava tarčnega proteina.....	17
3.7. Virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče – sidranje	18
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	19
4.1. Izbira spojin za ligande virtualnega rešetanja na osnovi podobnosti	19
4.2. Rezultati in razprava virtualnega rešetanja na osnovi podobnosti z ligandom	21
4.3. Rezultati in razprava strukturno podprtega virtualnega rešetanja	32
5. SKLEP.....	36
6. LITERATURA	39

POVZETEK

Prizadevanja k obvladovanju bakterijskih okužb in razvoju novih tipov protibakterijskih učinkovin so v preteklosti privedla do odkritja izredno obetavne tarče, encima DNA-giraze, ki v bakterijski celici sodeluje pri podvajanju krožne molekule DNA – plazmida. Zaviralci tega encima torej onemogočajo razmnoževanje bakterij in so zelo obetavne spojine tudi z vidika selektivne toksičnosti. Heterotetramerna struktura encima ponuja dve tarčni mesti. Ker se proti v terapiji že uporabljenim zaviralcem podenote A, fluorokinolonom, pojavlja določena stopnja rezistence, je razvoj sedaj usmerjen na zaviranje podenote B. Tako z veliko vnemo iščemo nove strukturne tipe potencialnih zaviralcev DNA-giraze B, pri čemer nam predvsem v začetnih stopnjah razvoja lahko zelo pomagajo različni računalniški programi. V tej diplomski nalogi smo iskanje novih potencialnih spojin vodnic najprej izvedli po metodi virtualnega rešetanju na osnovi liganda. Primerjali smo 3D strukture spojin iz komercialno dostopne baze spojin ZINC s 3D strukturami ligandov, ki že imajo izkazano zaviralno aktivnost na tarčnem encimu, in sicer glede na podobnost volumna in farmakofornih točk. Pri vseh najvišje rangiranih zadetkih je bila prisotna večja podobnost volumna kot podobnost farmakofornih točk, saj so bili izbrani ligandi že močno optimizirane spojine in bi bilo v bazi spojin težko pričakovati spojine s podobnimi farmakofornimi lastnostmi. Tako sta bila med 40 najvišje rangiranimi spojinami (od vsakega liganda deset najboljših) le dva z ustrezno razporeditvijo farmakofornih elementov, ki je nujna za delovanje – v primeru zaviralcev DNA-giraze B je to bližnja pozicija donorja in akceptorja vodikove vezi. Za virtualno rešetanje po drugi metodi, torej na osnovi strukture tarče, smo kot osnovno bazo spojin pripravili obogateno knjižnico iz 400.000 najvišje rangiranih spojin prvega rešetanja. Dodatno pa smo že na začetku v programu nastavili ustrezne farmakoforne zahteve in tako med rezultati dobili le takšne, ki ustrezajo temu pogoju. Tako so se po metodi sidranja vsi najvišje rangirani rezultati izkazali kot primerni kandidati za nadaljnjo analizo. Metoda sidranja se je torej v našem primeru izkazala za boljšo, saj je dala več ustreznih zadetkov. V splošnem pa to ni pravilo, saj sta metodi po učinkovitosti primerljivi. Razlika je bila tokrat najverjetneje posledica različnih izhodnih baz spojin in različne nastavitve farmakofornih zahtev. Najvišje rangirane spojine bi bilo potrebno še biokemijsko vrednotiti v encimskem testu, da bi ovrednotili njihov potencial zaviranja DNA-giraze B.

Ključne besede: DNA-giraza, protibakterijsko delovanje, virtualno rešetanje, zaviralec

ABSTRACT

Efforts to control bacterial infections and the development of new types of antibacterial agents have led to discovery of a highly promising target enzyme DNA gyrase, which is involved in the replication of circular DNA molecule (plasmid) in the bacterial cell. Inhibitors of this enzyme are preventing the reproduction of bacteria and are also very promising compounds in terms of selective toxicity. The heterotetrameric enzyme structure offers two sites for targeting by small molecules. There is already a certain degree of resistance shown to the inhibitors of the subunit A – fluoroquinolones, which are currently used in therapy. The development of novel inhibitors is therefore also focused on the subunit B inhibitors, and currently some promising structural classes are being developed. Computer- aided drug design has become an important method in the early stages of the development. In this thesis, we first checked compounds with virtual screening by similarity. We compared 3D structures of all compounds present in the ZINC database with structures of known inhibitors of the DNA gyrase B based on similarities of volume and pharmacophore features. The results of the screening by similarity to the ligand showed a greater volume similarity than the similarity of the presence of the pharmacophores by all high ranking compounds. The reason is because our ligands were highly optimized molecules and so in database it is difficult to find compounds with similar pharmacophore features. Between 40 highly ranking compounds there were just two compounds with appropriate arrangement of pharmacophore elements, what is necessary for acting on target. For inhibitors of DNA gyrase B this is an adjacent position of hydrogen bond acceptor and hydrogen bond donor. For our next method docking we prepared enriched database with 400.000 highly ranking compounds from the first method. In addition, at the beginning we set hydrogen bond acceptor and donor pharmacophore features to get the results that contain these elements. That is why after docking all high ranking compounds were marked as potential inhibitors. In our case docking was more effective than virtual screening by similarity. In general it is not true, because both methods are comparable in success of screening. Difference was the result of different database and different settings of pharmacophore elements. Highest ranking compounds still have to be biochemically evaluated in an enzyme assay in order to assess their ability of inhibiting DNA gyrase B.

Key words: DNA gyrase, antibacterial activity, virtual screening, inhibitor

SEZNAM OKRAJŠAV

2D	dvodimenzionalen
3D	tridimenzionalen
ADME	Absorpcija, Distribucija, Metabolizem, Eliminacija
AK	aminokislina
Ala	alanin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
Arg	arginin
ATP	adenozin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GyrA	podenota A DNA-giraze
GyrB	podenota B DNA-giraze
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti (angl. High-Throughput Screening)
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, pri kateri je aktivnost encima znižana za 50%
K _i	inhibitorna konstanta
LogP	logaritem porazdelitvenega koeficienta
Lys	lizin
MACCS	Molecular ACcess System
MIC	minimalna zaviralna koncentracija
MIC ₉₀	koncentracija, ki zavre rast 90% bakterij določenega seva
MM	molska masa
NMR	jedrska magnetna resonanca
PDB	Protein Data Bank
PSA	polarna površina molekule
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Sistem
Ti	Tanimotov indeks podobnosti
Thr	treonin
Val	valin
X-ray	rentgenska kristalografija

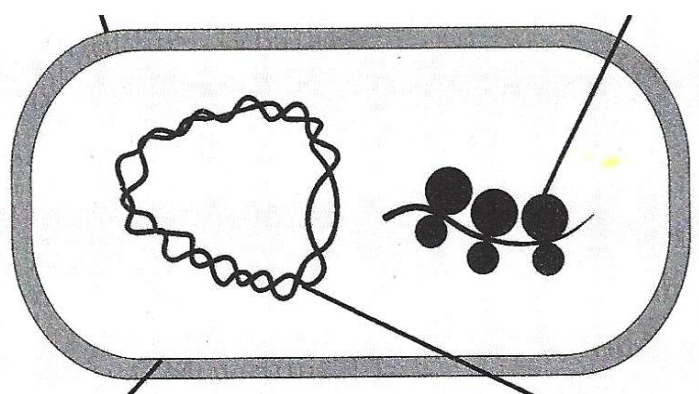
1. UVOD

Bakterije oz. bakterijske okužbe so v svetovnem merilu že od nekdaj eden najresneje ogrožajočih dejavnikov človeškega življenja. Odkritje antibiotikov, učinkovin, ki preprečujejo rast in razmnoževanje bakterij, je tako eden najpomembnejših mejnikov v nenehni bitki človeštva s temi mikroskopsko majhnimi prokariontskimi organizmi. Dandanes glede na mesto oziroma mehanizem delovanja razdelimo protibakterijske učinkovine na 4 skupine (slika 1), in sicer takšne, ki (1):

- preprečujejo sintezo bakterijske celične stene:
 - betalaktami: penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami, zaviralci laktamaz β
 - glikopeptidi: vankomicin in teikoplanin
 - bacitracin
- delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin bakterije: aminoglikozidi (streptomycin), tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi (azitromicin), linkozamidi (klindamicin) in fucidinska kislina.
- vplivajo na sintezo bakterijskih nukleinskih kislin: sulfonamidi, trimetoprim, kinoloni (ciprofloksacin), rifampicin, metronidazol.
- ovirajo sintezo citoplazemske membrane bakterij: polimiksini

bakterijska celična stena

sinteza bakterijskih celičnih beljakovin

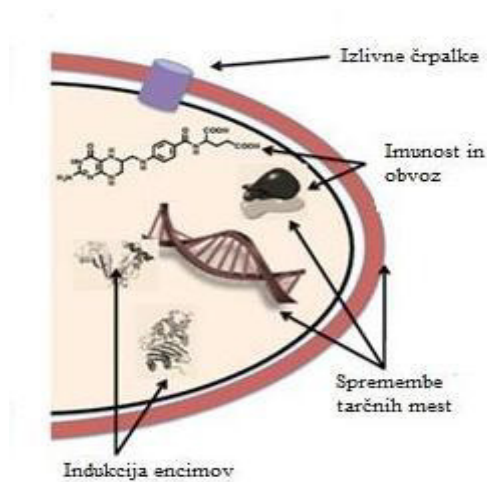


citoplazemska membrana bakterij

bakterijske nukleinske kisline

Slika 1: Ciljna mesta delovanja protibakterijskih učinkovin (prirejeno po 1).

Kljub tem raznovrstnim mehanizmom delovanja protibakterijskih učinkovin pa se je sčasoma, tudi zaradi njihove prekomerne uporabe, pokazala neizmerna prilagodljivost bakterij v stalnem razvijanju odpornosti proti obstoječim protibakterijskim učinkovinom. Ob razvoju rezistence se močno zmanjša koncentracija učinkovine na mestu delovanja in posledično učinkovitost uporabljenega zdravila. Do pojava bakterijske rezistence lahko pride na več načinov: a) s spremembo vezavnega mesta, b) s pojavom encimov, ki razgradijo učinkovino, c) s pojavom črpalk, ki učinkovino odstranijo iz celice, in d) s spremembo metabolnih poti v bakterijskih celicah (slika 2) (1, 2).



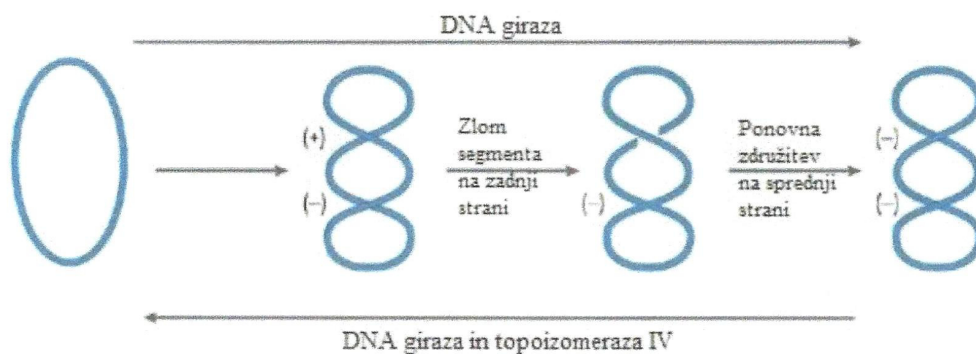
Slika 2: Mehanizmi bakterijske rezistence (prirejeno po 2).

Na ta način nastaja vedno več novih multirezistentnih sevov, kar pa ob podatku, da število na novo odkritih protibakterijskih učinkovin močno upada, privede do dejstva, da nam proti nekaterim bakterijskim sevom že primanjkuje učinkovitih zdravilnih učinkovin (3, 4).

Prizadevanja k razvoju novih razredov protibakterijskih učinkovin in odkrivanju novih načinov za povečanje njihove učinkovitosti so eden največjih izzivov sodobne farmacije. Poglavitne lastnosti dobrih protibakterijskih učinkovin so: širok spekter delovanja, dolg razpolovni čas, dobro prodiranje do mesta delovanja– tarče, možnost peroralne aplikacije ter dobra selektivnost in odsotnost neželenih učinkov (1). V okviru teh lastnosti se je kot zelo zanimiva tarča obstoječih in potencialnih bodočih protibakterijskih učinkovin izkazal encim DNA-giraza. Njegova pomembna prednost je v tem, da se nahaja le v prokariotskih organizmih in je tako z vidika selektivne toksičnosti zelo obetaven za razvoj novih tipov potencialnih protibakterijskih učinkovin in novih mehanizmov delovanja (5).

1.1. DNA-giraza

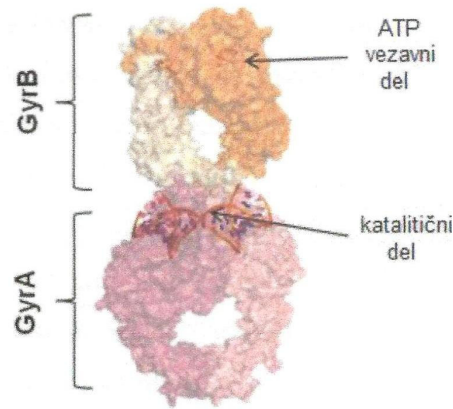
DNA-giraza je bakterijski encim, udeležen pri procesih podvajanja krožne bakterijske molekule DNA imenovane plazmid, ki je nosilec genskega zapisa bakterij. Po razdelitvi prijemališč protibakterijskih učinkovin jo tako uvrščamo med tiste, ki sodelujejo pri sintezi bakterijskih nukleinskih kislin. Po klasifikaciji encimov spada v skupino topoizomeraz, ki katalizirajo spremembe v topologiji DNA. To pomeni, da omogočajo spreminjanje in prilagajanje oblike vijačnice DNA med procesi njenega podvojevanja in popravljanja. Encim DNA-giraza spada skupaj z encimom topoizomerozo IV med bakterijske topoizomerase tipa IIA. Kadar je molekula DNA zvita kot vrv, govorimo o dodatno zviti obliki. Dodatna zvitost je lahko pozitivna ali negativna. Pri pozitivni dodatni zvitosti si bazni pari stojijo bližje in je vijačnica tako bolj napeta kot pri negativni dodatni zvitosti, pri kateri so si bazni pari manj blizu, napetost znotraj verige je tako manjša in veriga se zato lažje razklene. In ravno tukaj je glavna naloga DNA-giraze, saj katalizira uvajanje dodatnih negativnih zavojev v krožno molekulo DNA in tako zmanjša torzijsko napetost znotraj verige dvojne vijačnice. Ta se tako lažje razmakne in omogoči podvojevanje bakterijske DNA (slika 3). Odsotnost ali zaviranje encima DNA-giraze zato pomeni napake v podvojevanju bakterijske DNA in posledično zaustavitev rasti (bakteriostatično delovanje) ali celo smrt (baktericidno delovanje) bakterij (3, 4).



Slika 3: Uvajanje dodatnih negativnih zavojev v vijačnico DNA (prirejeno po 6).

DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot– giraze A (GyrA) in giraze B (GyrB), kar skupaj tvori heterotetramerno strukturo tipa A_2B_2 (slika 4). V enem ciklu se tako v molekulo plazmida vpeljeta dva negativna dodatna zavoja. Podenota A je odgovorna za razklenitev in nato ponovno združitev verig DNA, medtem ko je podenota B odgovorna za hidrolizo molekule ATP, s čimer zagotovi nujno potrebno energijo za katalitični cikel

podenot A (3, 4, 5). Celotna kristalna struktura encima še ni poznana, eksperimentalno pa so določili nekatere dele tako podenote A kot tudi podenote B. Ob upoštevanju homologije s človeško topoizomerozo II so odkrili področja treh vrat: N-vrata, ATP-vrata in C-vrata. Obe podenoti GyrB spadata v področje N-vrat (4).



Slika 4: Model DNA-giraze (prirejeno po 7).

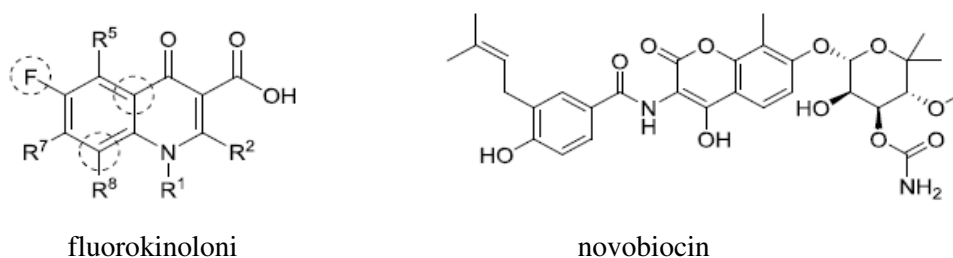
1.2. Zaviralci DNA-giraze

Pri razvoju protibakterijskih učinkovin, ki delujejo kot zaviralci podvojevanja bakterijske molekule DNA, je sicer potrebna previdnost, saj so bakterijski encimi lahko precej homologni človeškim. Hkrati pa se je treba zavedati, da obstaja še veliko drugih encimov, ki imajo podoben mehanizem delovanja (npr. da za svoje delovanje uporabljajo hidrolizo molekule ATP). Zato je treba zelo natančno ciljati na tisto tarčo, ki daje možnost čimvečjega selektivnega uničenja bakterijskih celic, pri čemer pa človeške celice ostanejo nepoškodovane.

Kot zelo obetavna tarča so se v prvi vrsti zaradi prisotnosti le v prokariotskih organizmih (in tako dobrih možnosti za selektivno toksičnost) izkazali encimi bakterijskih topoizomeraz tipa IIA, kamor spadata encima DNA-giraza in topoizomeraza IV. Dodatna prednost je v tem, da njuni zaviralci običajno delujejo hkrati na obeh tarčnih encimih, DNA-girazi in topoizomerazi IV. Jakost zaviranja posameznega encima je odvisna od tipa zaviralca in od bakterijskega seva. Za razvoj odpornosti zaradi spremembe tarčnega mesta proti takemu tipu učinkovin bi morale priti do mutacije na genih za oba encima znotraj iste populacije bakterij, kar je malo verjetno. Prednost dvojnega delovanja, torej zaviranja DNA-giraze in topoizomeraze IV, je lepo razvidna pri fluorokinolonih, za katere je

značilen dokaj počasen razvoj rezistence pri večini bakterij. Nasprotno pa je pri bakteriji *Mycobacterium tuberculosis*, ki ima samo DNA-girazo, ki opravlja funkciji obeh encimov, zato se odpornost proti fluorokinolonom razvije bistveno hitreje. Hkrati imajo spojine z delovanjem na ta dva encima tudi velik potencial za širok spekter delovanja, saj imajo različni sevi bakterij med seboj podobne strukture DNA-giraze in topoizomeraze IV (4, 7).

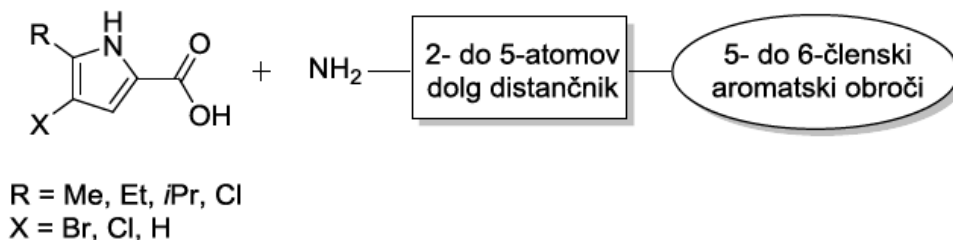
S spojinami, ki zavirajo DNA-girazo lahko delujemo na podenoto A ali na podenoto B. Fluorokinoloni, ki so v klinični uporabi, zavirajo delovanje DNA-giraze in topoizomeraze IV, tako da interagirajo s katalitično podenoto A in stabilizirajo kompleks med DNA in encimom (slika 5 levo) in tako preprečijo ponovno združitev verig. V terapiji jih uporabljamo še danes, a se vsebolj pojavlja rezistenca proti temu tipu učinkovin. Z namenom, da se izognemo navzkrižni rezistenci proti fluorokinolonom, se je razvoj zaviralcev DNA-giraze preusmeril na spojine z vezavo na podenoto GyrB. Te spojine zavirajo encim tako, da tekmujejo z molekulo ATP za vezavo na podenoto B. S tem preprečijo hidrolizo molekule ATP in posledica je nezadostna količina energije za pravilno zvitje vijačnice med podvojevanjem plazmida. Do sedaj odkrite učinkovine tega tipa so aminokumarini (predstavnik novobiocin in klorobiocin), vendar jih v klinični praksi ne uporabljamo več, saj so se zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti in toksičnosti izkazali za premalo varne in zaradi razvoja rezistence za premalo učinkovite (slika 5 desno) (4, 8).



Slika 5: Levo struktura fluorokinolonov (prirejeno po 9) in desno struktura novobiocina (kot predstavnika aminokumarinov) (prirejeno po 10).

Predkratkim so odkrili še nov strukturni tip zaviralcev DNA-giraze, ki so strukturni derivati pirol-2-karboksilne kisline oz. pirolamidi (slika 6). Tudi ti se vežejo na podenoto B, a so po farmakokinetičnih lastnostih veliko boljši od aminokumarinov. Pomembno vlogo za delovanje imajo hidrofobne substituentne pirolnega obroča. Izkazujejo visoko jakost zaviranja in močno protibakterijsko delovanje predvsem proti po Gramu pozitivnim

bakterijam ter učinkovitost tudi na seve, ki so odporni proti drugim protibakterijskim učinkovinam (8, 11). Nekaj spojin tega tipa je že v fazi kliničnih preizkušanj, še naprej pa z veliko vnemo iščemo nove strukturne tipe ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA-giraze B, predvsem takšne, ki bi bili učinkoviti tudi proti po Gramu negativnim bakterijam. Pri tem pa se v začetnih stopnjah razvoja poslužujemo tudi najmodernejših računalniških programov za čimhitrejšje in cenejše odkrivanje novih kakovostnih spojin vodnic.



Slika 6: Strukturni razvoj pirolamidnih zaviralcev DNA-giraze (prirejeno po 12).

1.3. Računalniške metode pri iskanju novih zdravilnih učinkovin

Farmacevtska industrija je že nekaj časa pod vedno večjim pritiskom, da na trg uspešno lansira vedno nova zdravila, vendar je to zelo zahteven, dolgotrajen in drag postopek. Sploh v preteklosti, ko je bilo načrtovanje novih učinkovin bolj naključno in povezano predvsem s predvidljivimi lastnostmi spojin, s starejšimi razvojnimi metodami in klasičnimi analiznimi tehnikami, sta bila trud in denar, vložena za začetno razvojno fazo, velikokrat zaman, saj so se spojine večinoma izkazale za neprimerne za nadaljnji razvoj do zdravilne učinkovine ali pa so bile neučinkovite v kasnejših kliničnih študijah (13). S tem namenom so začeli vse intenzivnejše aktivnosti na področju iskanja metode, ki bi odpravila primanjkljaj novih učinkovitih zdravilnih učinkovin. Razvili so metodo, pri kateri so s pomočjo robota z biokemijskimi reakcijami preverili aktivnost vseh spojin v velikih knjižnicah spojin na določeni tarči, in pričakovanja po velikem številu novih učinkovin so bila velika. Vendar je tudi to rešetanje visoke zmogljivosti (angl. high-throughput screening– HTS) glede na dolgotrajnost takšne analize in velike stroške testiranja žal dalo premalo dobrih spojin vodnic (13, 14).

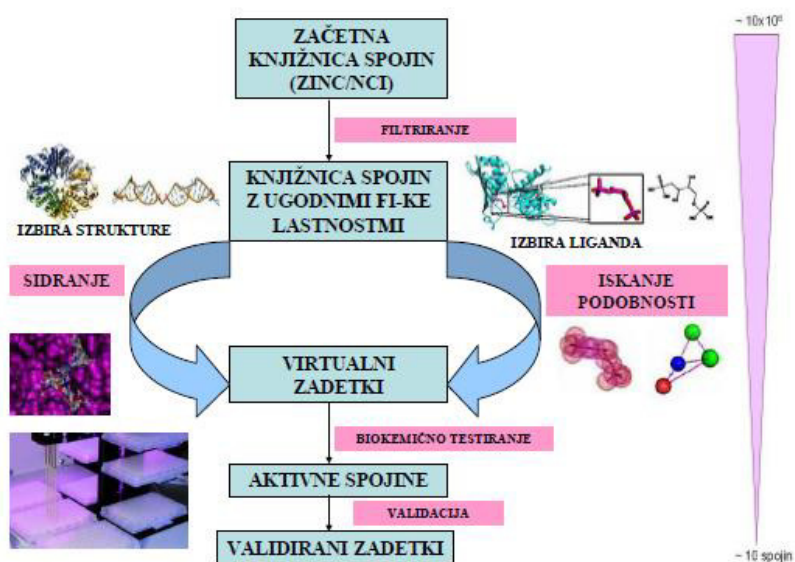
Hkrati z razvojem analiznih tehnik pa se je velik napredek odvijal tudi na področju genomike in identifikacije potencialnih novih bioloških tarč. Razvijali in sintetizirali so

tudi vedno nove spojine, ki so jih skupaj z že znanimi uredili v različnih javno dostopnih bazah oz. knjižnicah spojin. To je dajalo še večje možnosti za nove mehanizme delovanja, a je bil nujen razvoj nove hitrejše in cenejše tehnologije za odkrivanje biološko aktivnih spojin. Kot alternativen pristop so se izkazali računalniki s svojo sposobnostjo hitrega, učinkovitega in poceni obdelovanja velike količine podatkov. Postali so zanesljiv in poceni način iskanja novih spojin vodnic, saj je hitro rastoče računalniško znanje pomagalo k razvoju sodobnih programov, s katerimi lahko na podlagi različnih algoritmov virtualno ocenjujemo potencialno aktivnost določene spojine, ne da bi morali za to dejansko izvajati sintezo in testiranja vseh spojin iz knjižnice. Odkrivanje novih potencialnih zdravilnih učinkovin z računalniškimi metodami imenujemo tudi virtualno rešetanje (ang. virtual screening) (13, 15).

Prva stopnja virtualnega rešetanja je filtriranje vseh spojin iz baze glede na želene fizikalno-kemijske lastnosti. Začetno filtriranje je izredno pomembno, saj je v bazah prisotnih tudi veliko spojin, ki zaradi neugodnih lastnosti ADME (absorpcija, distribucija, metabolizem in eliminacija) zagotovo ne bi bile primerne za nadaljnji razvoj do zdravilne učinkovine. Natančno je primerne vrednosti za te lastnosti učinkovin raziskal in definiral Christopher A. Lipinski in postavil koncept lastnosti, ki so značilne za učinkovine (»drug-like«). Ta določa primerno molsko maso do 500, logP od -2 do 5, število donorjev vodikove vezi, število vrtljivih vezi in število aromatskih obročev do 5, število akceptorjev vodikove vezi pa do 10. Tako so pri začetnem filtriranju upoštevali te vrednosti, a se je kmalu izkazalo, da je pri kasnejši optimizaciji spojine vodnice do učinkovine vedno prišlo še do nekaterih nujno potrebnih modifikacij, po katerih pa te lastnosti niso bile več znotraj sicer definiranih vrednosti za učinkovino. Zato so popravili mejne vrednosti in tako za začetno filtriranje do spojin vodnic uveljavili koncept lastnosti, ki so značilne za spojine vodnice (»lead-like«), po katerem program iz baze izbere spojine z molsko maso do 450, log P med -3,5 in 4,5, s številom donorjev vodikove vezi in številom aromatskih obročev do 4 ter s številom akceptorjev vodikove vezi do 10 (13, 16, 17).

V naslednji stopnji virtualnega rešetanja pa nato ločimo dva različna pristopa: virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda (iskanje po podobnosti) in strukturno podprto virtualno rešetanje– sidranje (slika 7). Vsak sicer temelji na drugačnih principih določanja podobnosti, a v obeh primerih kot rezultat dobimo obogateno knjižnico z do nekaj tisoč spojinami, za katere program predvidi določeno stopnjo aktivnosti, kar zmanjša čas in

stroške nadaljnjega biokemijskega testiranja in poveča možnost za uspešen razvoj nove zdravilne učinkovine. Izbrane spojine nato kupimo ali sintetiziramo in biokemijsko ovrednotimo, pri čemer lahko dobimo spojine zadetke, ki jih je treba optimizirati do spojine vodnice (13).



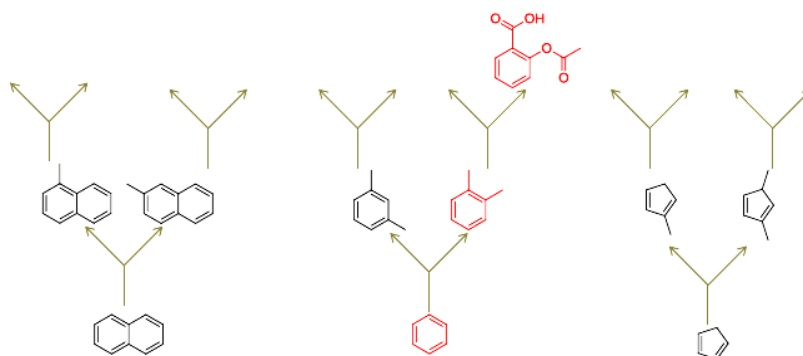
Slika 7: Shema poteka virtualnega rešetanja.

1.3.1. Virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda

Pri tem načinu virtualnega rešetanja kot osnovo uporabimo znano strukturo liganda, ki ima izkazano aktivnost na izbrani tarči. Ta nam služi kot predloga za iskanje novih spojin s podobno strukturo ob predpostavki, da imajo podobne spojine podobno delovanje. Ta princip rešetanja uporabimo predvsem takrat, kadar ne poznamo 3D strukture tarčnega mesta. Računalniški programi tako na podlagi posameznih strukturnih elementov v knjižnici spojin najdejo takšne s podobnimi fragmenti. Vrednotimo lahko podobnost na osnovi 2D strukture, bolj strukturno raznolike spojine pa daje primerjava na osnovi 3D strukture (13, 15).

Za 2D rešetanje na osnovi liganda najpogosteje uporabljamo program MACCS (Molecular ACcess System). Na podlagi množice vprašanj o strukturnih elementih spojine dobi vsaka spojina najprej svoj bitni zapis (angl. fingerprint), sestavljen iz znakov 0 in 1 kot odgovorov na posamezno strukturno lastnost, kjer število 1 pomeni, da je strukturni element prisoten, število 0 pa, da ga v svoji strukturi nima. Nato program primerja bitni

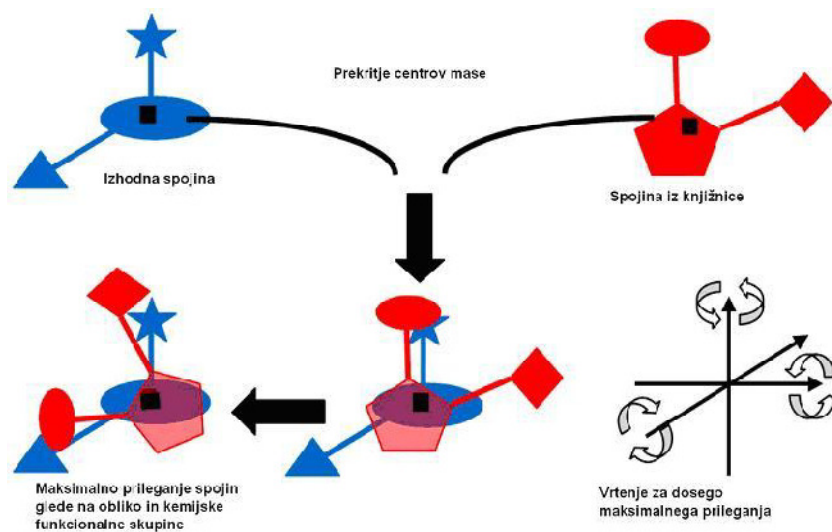
zapis liganda z bitnimi zapisi ostalih spojin v bazi in za vsako izračuna koeficient podobnosti (Tanimotov indeks– Ti) po formuli $Ti = C / (A + B - C)$, kjer je A število prisotnih fragmentov liganda, B število prisotnih fragmentov primerjane spojine, C pa število fragmentov, ki so prisotni pri obeh spojinah hkrati. Vrednosti Tanimotovega indeksa so pri 2D rešetanju lahko med 0 in 1, pri čemer večja vrednost kaže na večjo podobnost med spojinama. Drugi način 2D iskanja ligandu podobnih spojin je s programom Ftrees, kjer so strukturne formule spojin iz knjižnice urejene po principu drevesne strukture. Tako so vse, ki vsebujejo določen fragment, znotraj iste veje, kar omogoča še hitrejše iskanje podobnih spojin (slika 8) (14).



Slika 8: Knjižica spojin v obliki drevesne strukture – Ftrees.

Ker pa so spojine v resnici 3D objekti, ima izredno velik pomen tudi njihova 3D struktura, zato je bistveno bolj racionalno iskanje podobnosti na osnovi upoštevanja le-te. Z računalniškimi programi lahko pregledamo knjižnico spojin na osnovi različnih lastnosti, ki izvirajo iz 3D strukture spojin. Eno takih je rešetanje na osnovi farmakofora iz strukture liganda. Določimo želeno razporeditev za delovanje ključnih elementov in poiščemo spojine, ki vsebujejo takšen farmakofor. Kot rezultate lahko dobimo strukturno različne spojine, a s podobenno razporeditvijo definiranih elementov. Drug način rešetanja na osnovi 3D strukture liganda pa je iskanje na osnovi podobnosti volumna in oblike. Na takšnem principu je zasnovan program ROCS, ki smo ga uporabili tudi pri našem eksperimentalnem delu. Podobnost med ligandom in spojinami iz knjižnice rangira glede na stopnjo prileganja topoloških značilnosti, in sicer tako, da najprej prekrije centra mas, nato pa spojine obrača v vseh treh dimenzijah, dokler ne doseže največjega možnega prekrivanja (slika 9). Za številčno vrednost ocene podobnosti izračuna indekse ShapeTanimoto (kaže na podobnost volumnov med dvema spojinama in ima vrednosti med 0 in 1),

ColorTanimoto (kaže na stopnjo prileganja kemijskih funkcionalnih spojin, kot so položaji donorjev in akceptorjev vodikove vezi, položaji pozitivnih in negativnih nabojev ter obročev in hidrofobnih skupin; pravtako ima vrednosti med 0 in 1) in TanimotoCombo, ki je seštevek prvih dveh (zaseda vrednosti med 0 in 2, pri čemer večja vrednost kaže na večjo stopnjo podobnosti). Rezultati rešetanja s programom ROCS so po kemijski strukturi različne spojine in zadnja odkritja poročajo o tem, da se po uspešnosti iskanja dobrih spojin vodnic lahko povsem enakovredno ali celo še bolje kosa s programi za strukturno podprto virtualno rešetanje– sidranje (19).



Slika 9: Princip določanja podobnosti s programom ROCS.

1.3.2. Strukturno podprto virtualno rešetanje– sidranje

Začetki strukturno podprtega rešetanja (angl. docking) segajo v zgodnja 80. leta prejšnjega stoletja. Ta metoda je že kmalu postala visoko aktivno področje raziskav, saj je zelo uporabna tako za iskanje novih spojin kot tudi za optimiziranje spojin vodnic. Glavni pogoj za njeno uporabo je poznana 3D struktura tarče oz. vezavnega mesta in pa tudi, kje na tarči se nahaja aktivno mesto. Tarča je lahko katerakoli biološka molekula, ki je udeležena pri nekem patološkem procesu (receptor, encim, DNA...). Tako na osnovi poznavanja strukture liganda in strukture tarče s pomočjo računalniških programov ocenimo sposobnost vezave oziroma delovanja posameznih ligandov oziroma spojin iz banke na izbrano tarčo. Sidranje pomeni napovedovanje konformacije liganda in njegove orientacije v vezavnem mestu ter oceno njegove vezavne energije. Kadar odkrivamo prve spojine, ki

bi delovale na novo tarčo, in poznamo le strukturi tarče in vezavnega mesta, nimamo pa še nobenega delujočega liganda, je to metoda izbora za iskanje novih spojin vodnic. Strukturno tarče določamo z različnimi metodami, kot so rentgenska kristalografija (X-ray), jedrska magnetna resonanca (NMR) ali homologno modeliranje. Večina že znanih tarčnih struktur je objavljena v Protein Data Bank (PDB). Strukturno podprto virtualno rešetanje obsega več zaporednih korakov:

- začetna priprava tarčnega proteina in knjižnice spojin,
- postavljanje molekule liganda v strukturo tarče (angl. posing),
- ocena aktivnosti oziroma vezavne energije (angl. scoring),
- rangiranje in priprava izbranih spojin za nadaljnja biokemijska testiranja.

Pri različnih metodah sidranja so različne tudi zahteve, kako naj bosta ligand in tarčni protein predstavljena. Začetna priprava pa pomeni tudi natančno poznavanje in identifikacijo tistih lastnosti molekule, ki so odgovorne za posamezno biološko prepoznavanje (18).

Nadaljnje umeščanje majhnih molekul v vezavno mesto tarče je dinamičen proces, saj imajo razmeroma majhne molekule liganda lahko veliko število različnih konformacijskih stopenj in program mora preveriti med vsemi ter najti tisto orientacijo in konformacijo molekule liganda, ki je najbolj komplementarna vezavnemu mestu (slika 10). Pri tem predpostavimo, da je fleksibilna le molekula liganda, tarča pa rigidna, saj bi bilo upoštevanje fleksibilnosti tarče povezano z mnogo zahtevnejšo računsko obdelavo. Vseeno je stopnja umeščanja dokaj uspešna, saj je ponovljivost rezultatov dobra z uporabo različnih algoritmov. Računalniški programi uporabljajo tri različne metode za postavljanje molekul v tarčno mesto:

- **Sistematične metode** molekulo razdelijo na manjše fragmente, ki jih nato posamično sidrajo v tarčno mesto. Poiskati skušajo vse prostostne stopnje strukture molekule, pri čemer pa lahko naletijo na problem kombinatorne eksplozije. Programi, ki uporabljajo tak način, zato že pred sidranjem s pomočjo različnih algoritmov poskušajo izločiti vse nesmiselne konformacije. Znotraj te skupine se programi razlikujejo glede na to, kako potem molekulo sestavijo nazaj.

- **Naključne ali stohastične metode** delujejo po principu naključnega umeščanja molekule v vezavno mesto, pri čemer pri vsakem položaju ocenijo vezavno energijo. Nato spremenijo translacijo, rotacijo in torzijske kote in ponovno vrednotijo. Tako v več ciklih za vsako spremembo posebej izračunajo vezavno energijo.
- **Simulacijske metode** uporabljajo principa molekulske dinamike in minimizacije energije. Vendar so dokaj redko v uporabi, saj so računsko zelo zahtevne in trajajo predolgo (18).

Po optimalni umestitvi spojine v tarčno mesto sledi napoved oziroma ocena vezavne energije – cenilna funkcija. Program na podlagi prispevkov različnih vezi, kot so van der Waalsove, elektrostatske interakcije, vodikove vezi in solvatacijski prispevki, oceni vezavno energijo para ligand- tarča. Tudi tukaj lahko različni programi uporabljajo različne principe ocene vezavne energije:

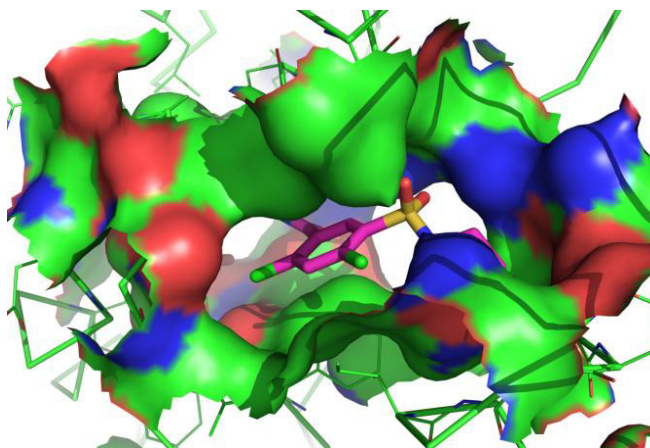
- **Cenilna funkcija na osnovi polja sil:** je seštevek notranje energije liganda in energije interakcije liganda s tarčno molekulo na podlagi van der Waalsovih in elektrostatskih sil. Pomanjkljivost je neupoštevanje solvatacijskih in entropijskih prispevkov.
- **Empirična cenilna funkcija:** je vsota vezavnih energij neodvisnih členov, katerih posamezne prispevke izračunamo iz rezultatov rentgenske kristalografije in z regresijsko analizo eksperimentalno določenih vezavnih energij.
- **»Knowledge-based« cenilna funkcija:** upošteva statistično pridobljene informacije o interakcijah znotraj posameznih kompleksov med ligandom in tarčo, čeprav le-te temeljijo na omejenem številu kristalnih struktur.

Lahko pa cenilno funkcijo obravnavamo tudi kot skupek dveh ali več cenilnih funkcij– to je **cenilna funkcija konsenza** (18).

Po končanem določanju vezavnih energij program iz velikega števila zbranih podatkov z različnimi strategijami pripravi (oz. rangira) seznam spojin, ki so dosegle najboljše rezultate in jih predlaga za nadaljnje vrednotenje. Kot vsaka metoda pa ima tudi virtualno rešetanje na osnovi strukture svoje omejitve, ki izvirajo iz nekaterih že omenjenih poenostavitev in predpostavk. Najpomembnejše so neupoštevanje vpliva topila (vode) in možnosti spremembe konformacije ob vezavi ter povsem naključne napake računalniških

programov. Tudi zato je zelo pomembno, da, preden se lotimo biokemijskih študij, vseeno pregledamo računalniško izbrane molekule in se prepričamo, če je določena konformacija liganda energijsko ugodna in če so interakcije med ligandom in tarčnim proteinom smiselne (14).

Za izvedbo virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče je dandanes dostopnih že veliko različnih programov, ki pa se med seboj razlikujejo glede na algoritme vzorčenja, obravnavanje fleksibilnosti liganda in tarče, načinu ocenjevanja vezavne energije in glede na čas, potreben za analizo. Nekateri najpogostejše uporabljeni programi so: Fred, Dock, FlexX, Glide, Gold, AutoDock. Kljub vsem razlikam med metodami in programi pa so splošno gledano z metodo virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče na novo odkrili že marsikatero novo spojino vodnico. Tako so se močno zmanjšali čas in stroški raziskav ter omogočil hitrejši razvoj vedno novih zdravilnih učinkovin (13, 18, 19).



Slika 10: Primer umeščanja molekule v tarčno mesto v procesu sidranja.

2. NAMEN DELA

V okviru te diplomske naloge želimo prispevati k reševanju problematike pomanjkanja novih protibakterijskih učinkovin zaradi vse večje rezistence bakterij proti že obstoječim učinkovinam. Tako bomo z namenom nujnosti odkrivanja novih tipov protibakterijskih učinkovin v literaturi (člankih) najprej poiskali nekaj do zdaj znanih močnih zaviralcev DNA-giraze B, predvsem takšnih, ki izkazujejo delovanje proti po Gramu negativnim bakterijam (npr. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*). Te zaviralce bomo nadalje uporabili kot ligande za virtualno rešetanje na osnovi 3D podobnosti. Iskali bomo po celotni knjižnici na tržišču dostopnih spojin ZINC. Rezultate bomo pregledali in ob upoštevanju indeksa podobnosti TanimotoCombo z izbranimi zaviralci DNA-giraze B za vsak ligand izbrali 100.000 najbolj podobnih spojin. Tako bomo od vseh skupaj dobili obogateno knjižnico spojin, ki jo bomo nato uporabili kot bazo za virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče (DNA-giraze). Izračunali bomo knjižnico konformacij, izbrali najprimernejšo kristalno strukturo tarčnega proteina, vključili še dodatne farmakoforne zahteve in izvedli sidranje. Najvišje rangirane spojine po tem postopku bomo primerjali s spojinami, ki so dale najboljše rezultate pri rešetanju na osnovi podobnosti z ligandom in tako predstavili nekaj novih potencialnih zaviralcev DNA-giraze B in jih predlagali za nadaljnje biokemijsko vrednotenje.

3. METODE

Glede na način reševanja zastavljenega problema je delo obsegalo predvsem operiranje z naslednjimi računalniškimi programi:

- ChemBioDraw – za risanje 2D strukturnih formul spojin,
- vROCS/ ROCS – za 3D rešetanje na osnovi liganda, OpenEyeInc.,
- OMEGA – za računanje konformacij ligandov, OpenEyeInc.,
- FRED – za sidranje, OpenEyeInc.,
- VIDA – za vizualizacijo (makro) molekul, OpenEyeInc.

Metodologija iskanja novih potencialnih inhibitorjev DNA-giraze pa je po vrsti zajemala:

1. pregled znanstvene literature in izbiro različnih ligandov za virtualno rešetanje na osnovi podobnosti,
2. izbiro ustrezne baze na tržišču dostopnih spojin,
3. virtualno rešetanje na osnovi 3D podobnosti z izbranim zaviralcem DNA-giraze,
4. pregled rezultatov in priprava obogatene knjižnice spojin,
5. izračun knjižnice konformacij za spojine iz obogatene knjižnice,
6. priprava tarčnega proteina DNA-giraze,
7. virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče – sidranje,
8. pregled rezultatov sidranja, primerjava z rezultati rešetanja na osnovi strukture liganda ter predlog izbora spojin za nadaljnje vrednotenje.

3.1. Pregled znanstvene literature in izbira različnih ligandov za virtualno rešetanje na osnovi liganda

Ob prebiranju znanstvenih člankov na temo novejših zaviralcev DNA-giraze in topoizomeraze IV smo iskali spojine, ki izkazujejo močno zaviralno aktivnost na encim DNA-giraza B, da jih bomo lahko uporabili kot ligande za virtualno rešetanje na osnovi podobnosti. Osredotočili smo se predvsem na zaviralce DNA-giraze, ki so izkazovali delovanje proti po Gramu negativnim bakterijam. Želeli smo, da imajo spojine ustrezno minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) na različne seve *Escherichia coli*, in sicer pod 32 µg/mL. Tako smo izbrali štiri spojine in s programom ChemBioDraw narisali njihove

2D strukturne formule, nato pa jih s programsko funkcijo pretvorili v zapis SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Sistem). Gre za enovrstični zapis strukture molekule, kjer so definirane vrste atomov in povezave med njimi. S pomočjo tega zapisa, ki smo ga uporabili v programu vROCS, je računalnik 2D formulo pretvoril v 3D strukturno formulo. Nato smo za vsako spojino izbrali še najustreznejšo konformacijo in farmakoforne elemente ter tako pripravili ligande za virtualno rešetanje na osnovi 3D podobnosti.

3.2. Izbira ustrezne baze spojin

Za iskanje po podobnosti na osnovi liganda smo kot bazo spojin uporabili komercialno dostopno knjižnico spojin ZINC (dostopna na spletnem naslovu <http://zinc.docking.org>), podtip DrugsNow. Ta je ena novejših in vsebuje 10.639.555 spojin. Zajema vse do zdaj poznane spojine, ki ustrezajo kriterijem: $150 \leq MM \leq 500$, $\log P \leq 5$, ploščina polarne površine (PSA) < 150 , število donorjev vodikove vezi ≤ 5 , število akceptorjev vodikove vezi ≤ 10 in število vrtljivih vezi ≤ 7 . Spojine imajo torej lastnosti učinkovin, ki jih je postavil Lipinski. Knjižnica je tako že prefiltrirana po osnovnih molekulskih deskriptorjih, tako da imajo vse spojine v njej predvidoma ustrezne lastnosti LADME za potencialno zdravilno učinkovino.

3.3. Izvedba virtualnega rešetanja na osnovi liganda

Z računalniškim programom ROCS smo nato pognali virtualno rešetanje na osnovi 3D podobnosti in za vsak ligand posebej preiskali celotno knjižnico spojin ZINC DrugsNow. Program primerja 3D strukturo vsake spojine iz baze s 3D strukturo liganda, in sicer po podobnosti volumna in farmakofornih točk. Glede na podobnost obeh parametrov nato za vsako spojino iz baze izračuna indeks podobnosti TanimotoCombo, ki je seštevek Tanimotovega indeksa podobnosti volumna in Tanimotovega indeksa podobnosti farmakofornih elementov strukture. Indeks TanimotoCombo je tako lahko od 0 do 2, pri čemer večja vrednost pomeni večjo stopnjo podobnosti. Po končani primerjavi nam program na osnovi teh izračunov rangira spojine glede na podobnost z izbranim ligandom.

3.4. Pregled in analiza rezultatov ter priprava obogatene knjižnice spojin

Rangirane rezultate rešetanja na osnovi 3D podobnosti smo pregledali in izbrali najboljše spojine. Za vsak ligand smo najprej shranili 100.000 najboljših spojin ter jih od vseh štirih ligandov združili v skupno bazo spojin, ki je tako vsebovala 400.000 najperspektivnejših spojin. Dobili smo takoimenovano obogateno knjižnico spojin, ki je manjša kot začetna izhodna knjižnica in je predvidoma v njej delež aktivnih spojin večji kot v izhodni knjižnici. To obogateno knjižnico smo nadalje uporabili kot osnovno bazo spojin za sidranje. Za predstavitev rezultatov samega rešetanja na osnovi podobnosti pa smo za vsak ligand izbrali 10 najboljših zadetkov, jih predstavili z 2D in 3D formulo, opremili z indeksi podobnosti ter komentirali vrednosti in strukturno podobnost.

3.5. Izračun knjižnice konformacij za spojine iz obogatene knjižnice

Spojine iz dobljene obogatene knjižnice smo nadalje uporabili kot bazo spojin za naslednjo stopnjo – strukturno podprto virtualno rešetanje, vendar jim je bilo pred tem potrebno izračunati knjižnico različnih konformacij. To smo naredili s programom OMEGA, saj program FRED, ki smo ga uporabili za sidranje, spojine pri tem obravnava rigidno.

3.6. Priprava tarčnega proteina

Pred sidranjem je bila potrebna še priprava vezavnega mesta tarče DNA-giraze. Ustrezno strukturo smo poiskali v Protein Data Bank, kjer je za DNA-girazo na voljo 52 različnih kristalnih struktur encima v kompleksu z različnimi ligandi, iz različnih bakterijskih sevov, med seboj pa se razlikujejo tudi glede na ločljivost. Izbrali smo strukturo 4DUH, ker izhaja iz po Gramu negativne bakterije *E. coli* in ima visoko ločljivost 1,5 Å. Tarčni protein smo pripravili s programom MAKE RECEPTOR (OpenEye, Inc.). Za vezavno mesto smo določili kvader z merami 16 Å × 22 Å × 13 Å okrog zaviralca iz kristalne strukture. Pod zavihkom »constraints« smo v programu nastavili še farmakoforne zahteve: Asp73 kot akceptor vodikove vezi, ki tvori vodikovo vez z donorjem liganda, ter kristalna molekula vode kot donor vodikove vezi, ki tvori vodikovo vez z akceptorjem liganda. Glede na položaj v prostoru to zahteva bližnji položaj akceptorja in donorja vodikove vezi na ligandu.

3.7. Virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče – sidranje

Ko smo imeli pripravljeno obogateno knjižnico spojin in tarčni protein, smo s programom FRED izvedli sidranje. Program preveri vsako spojino iz baze, tako da s pomočjo algoritma umesti spojino v vezavno mesto proteina in izračuna vezavno energijo s pomočjo cenilne funkcije. Nato glede na ocenjene vezavne energije določi najugodnejši položaj liganda v vezavnem mestu, na podlagi česar rangira spojine iz knjižnice od tiste z najmanjšo ocenjeno vezavno energijo do tiste z največjo vezavno energijo. Vezavo najvišje rangiranih spojin smo nato še vizualno pregledali v programu VIDA, s čimer smo ocenili, ali spojina ustreza postavljenim farmakofornim zahtevam in katere dodatne interakcije še tvori v vezavnem mestu.

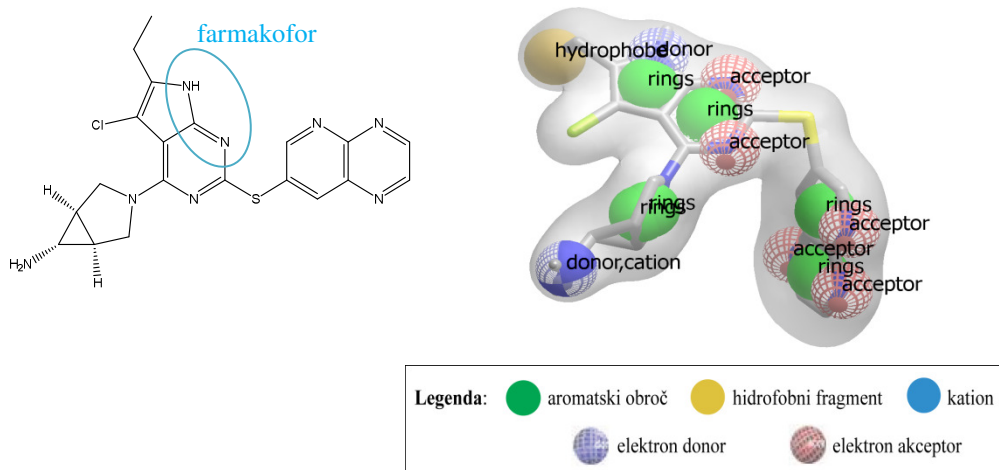
4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Izbira spojin za ligande virtualnega rešetanja na osnovi podobnosti

Po pregledu znanstvenih člankov smo kot najprimernejše ligande zaradi močnega zaviranja DNA-giraze B (IC_{50} ali K_i v nizkem nM območju) in protibakterijskega delovanja na po Gramu negativne bakterije ($MIC \leq 32 \mu g/mL$) izbrali naslednje štiri spojine (slike 11 do 14):

- **Ligand 1** (11):

$MIC_{E. coli} = 8 \mu g/mL$, $K_{i GyrB} < 1 \text{ nM}$



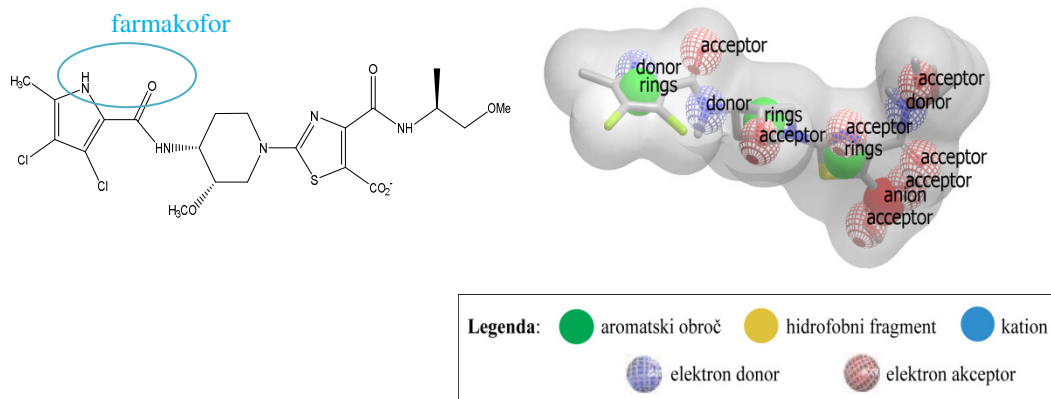
ZAPIS SMILES:

ClC1=C(CC)NC2=NC(SC3=CC(N=CC=N4)=C4N=C3)=NC(N5C[C@@]([C@H]6N)([H])[C@@]6([H])C5)=C21

Slika 11: Za ligand 1: strukturna formula (levo zgoraj), predloga za iskanje s programom ROCS (desno zgoraj) in zapis SMILES (spodaj). Pomen barv na sliki iz programa ROCS: polna kroglja zelene barve kaže na obroč, polna kroglja rumene barve ponazarja hidrofobni fragment, polna kroglja modre barve kaže na kationski center, črtkana kroglja modre barve kaže na elektron donorsko skupino ter črtkana kroglja rdeče barve kaže na elektron akceptorsko skupino.

- **Ligand 2** (7):

MIC *E. coli* 523 = 24 µg/mL, K_{iGyrB} < 10 nM



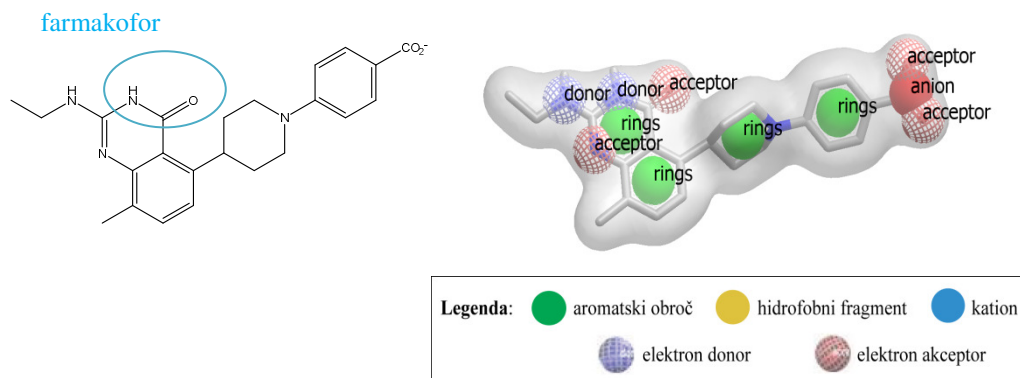
ZAPIS SMILES:

O=C(C1=C(C([O-])=O)SC(N2C[C@H](OC)[C@H](NC(C3=C(Cl)C(Cl)=C(C)N3)=O)CC2)=N1)N[C@@H](C)COC

Slika 12: Za ligand 2: strukturna formula (levo zgoraj), predloga za iskanje s programom ROCS (desno zgoraj) in zapis SMILES (spodaj).

- **Ligand 3** (7):

MIC *E. coli* = 8 µg/mL, K_{iGyrB} < 74 nM



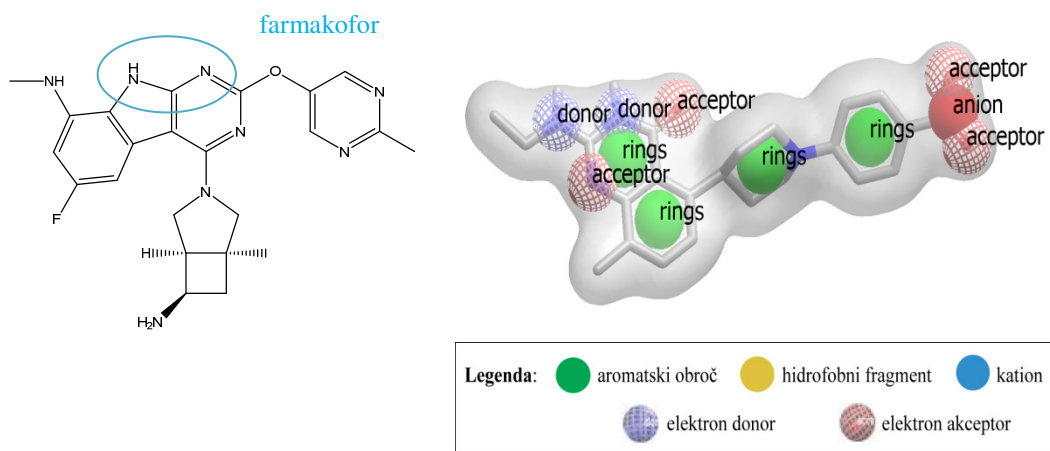
ZAPIS SMILES:

CC1=C2C(C(NC(NCC)=N2)=O)=C(C3CCN(C4=CC=C(C([O-])=O)C=C4)CC3)C=C1

Slika 13: Za ligand 3: strukturna formula (levo zgoraj), predloga za iskanje s programom ROCS (desno zgoraj) in zapis SMILES (spodaj).

- **Ligand 4 (7):**

MIC₉₀ *E. coli*22 = 0,5 µg/mL, K_{iGyrB} = 0,3 nM



ZAPIS SMILES:

C[C@@]1(C2)[C@]([C@H](N)C1)([H])CN2C3=NC(OC4=CN=C(C)N=C4)=NC5=C3C6=C(C(NC)=CC(F)=C6)N5

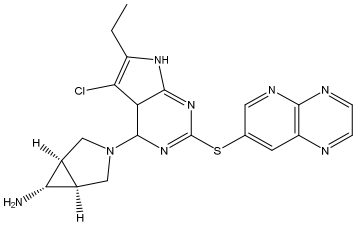
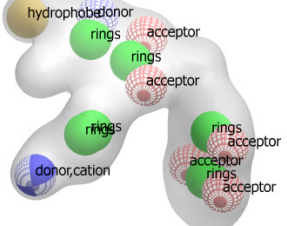
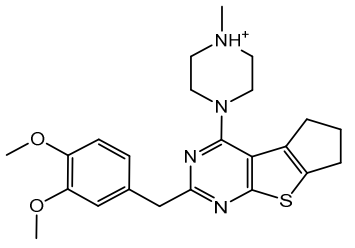
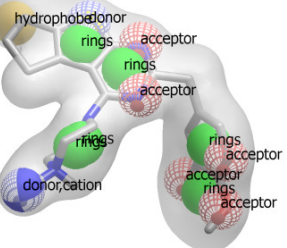
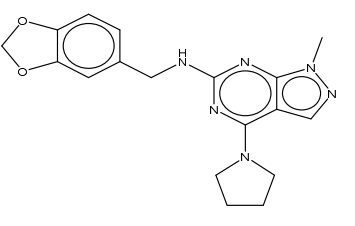
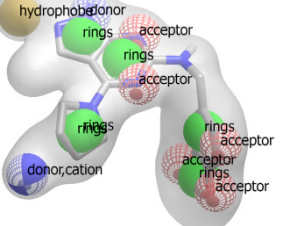
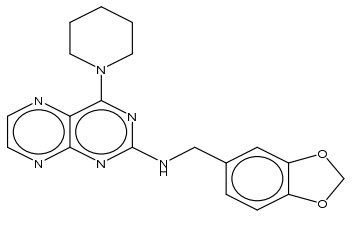
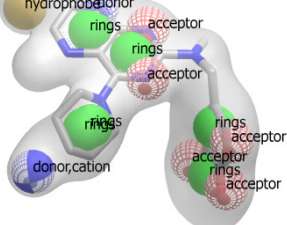
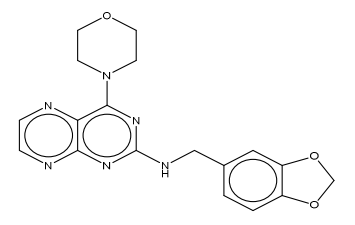
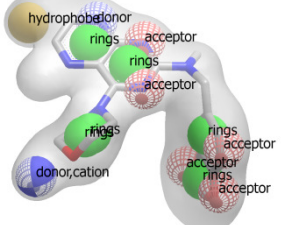
Slika 14: Za ligand 4: strukturna formula (levo zgoraj), predloga za iskanje s programom ROCS (desno zgoraj) in zapis SMILES (spodaj).

4.2. Rezultati in razprava virtualnega rešetanja na osnovi podobnosti z ligandom

Za vsakega od štirih ligandov smo v naslednjih preglednicah kot rezultate virtualnega rešetanja na osnovi 3D podobnosti prikazali 10 najboljših spojin oziroma zadetkov ter zanje poleg strukturne formule podali še vrednosti indeksov podobnosti TanimotoCombo, ShapeTanimoto in ColourTanimoto ter sliko prileganja z ligandom.

- **Rezultati za ligand 1:**

Preglednica 1: Strukturne formule liganda 1 in prvih desetih najvišje rangiranih spojin virtualnega rešetanja na osnovi 3D podobnosti z ligandom 1, pripadajoči indeksi podobnosti ter prostorske slike prileganja najvišje rangiranih spojin z ligandom 1.

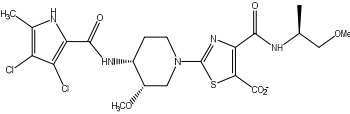
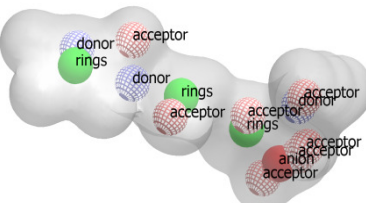
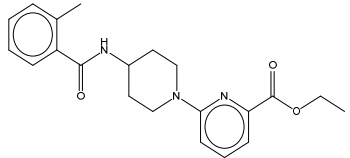
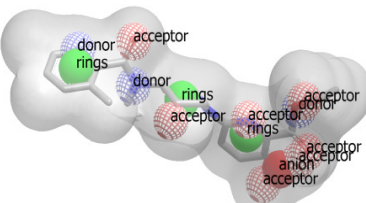
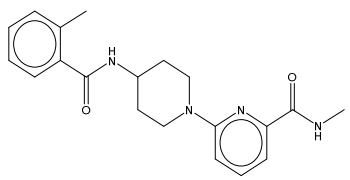
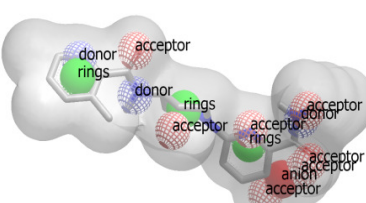
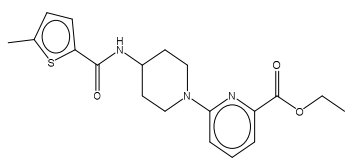
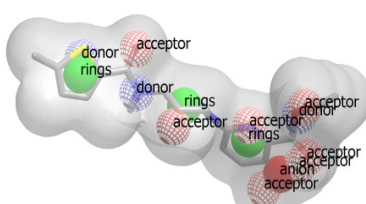
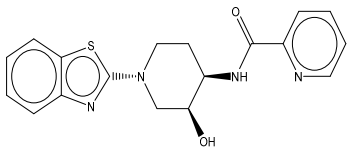
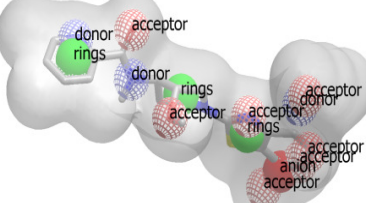
Rang	Strukturna formula	Tanim. Combo	Shape Tanim.	Colour Tanim.	Vizualizacija ujemanja z ligandom
Ligand 1		/	/	/	
1		1,3780	0,8800	0,4980	
2		1,3720	0,8410	0,5310	
3		1,3590	0,8660	0,4920	
4		1,3390	0,8700	0,4690	

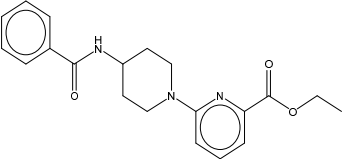
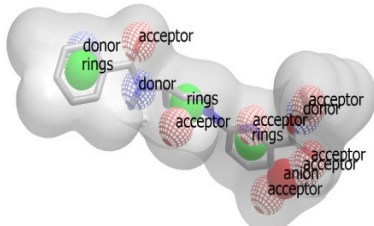
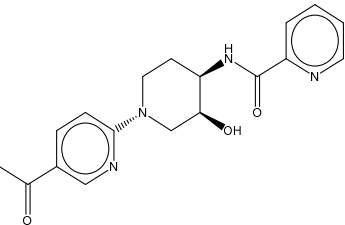
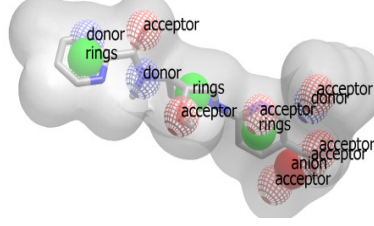
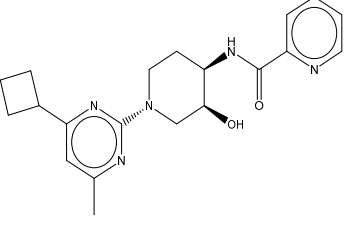
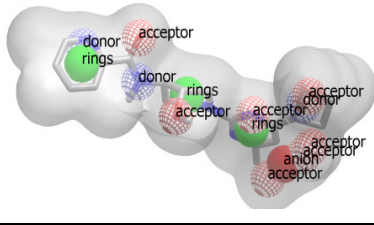
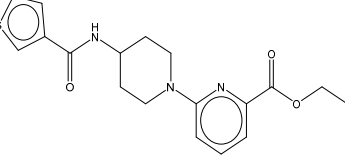
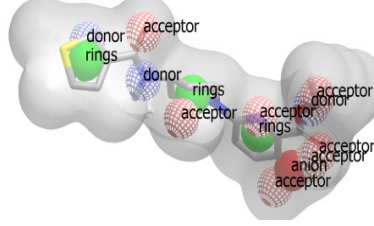
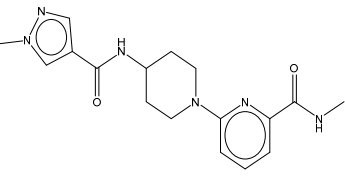
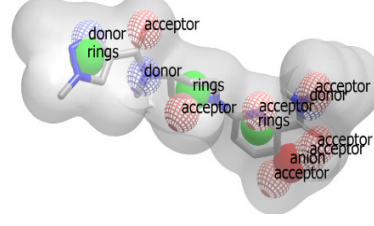
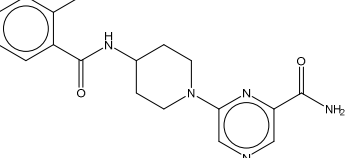
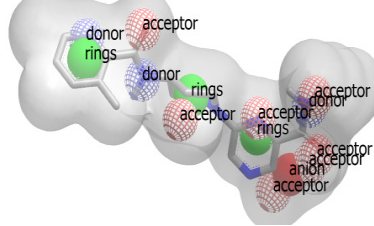
5		1,3240	0,7880	0,5360	
6		1,3230	0,8450	0,4780	
7		1,3210	0,8500	0,4710	
8		1,3150	0,8420	0,4740	
9		1,3130	0,8420	0,4710	
10		1,3120	0,8190	0,4930	

Legenda: aromatski obroč hidrofobni fragment kation
 elektron donor elektron akceptor

- Rezultati za ligand 2:**

Preglednica 2: Strukturne formule liganda 2 in prvih destih najvišje rangiranih spojin virtualnega rešanja na osnovi 3D podobnosti z ligandom 2, pripadajoči indeksi podobnosti ter prostorske slike prileganja najvišje rangiranih spojin z ligandom 2.

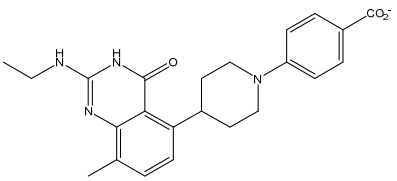
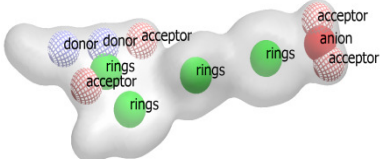
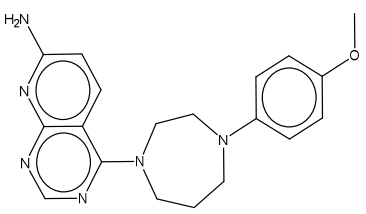
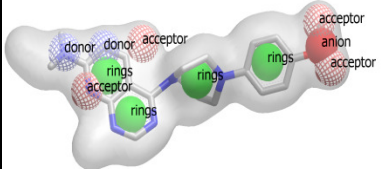
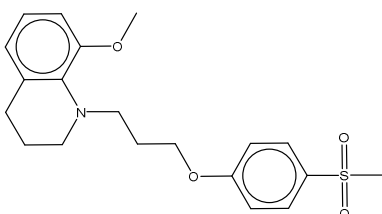
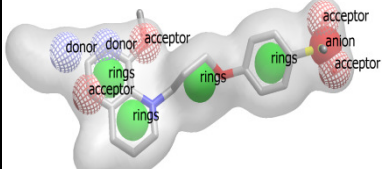
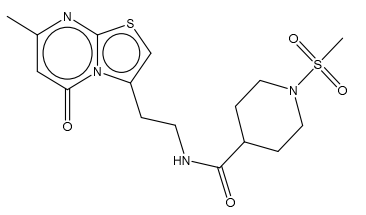
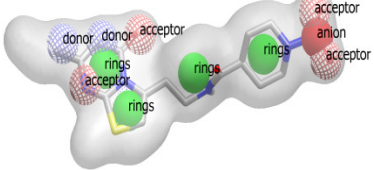
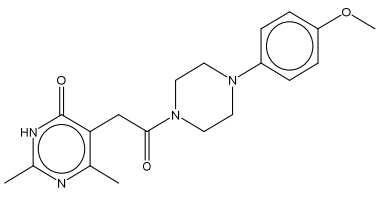
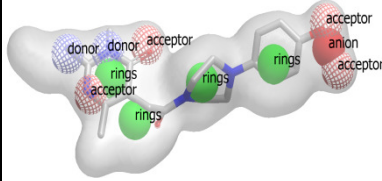
Rang	Strukturna formula	Tanim. Combo	Shape Tanim.	Colour Tanim.	Vizualizacija ujemanja z ligandom
Ligand 2		/	/	/	
1		1,2320	0,7830	0,4500	
2		1,2302	0,7400	0,4850	
3		1,1880	0,7320	0,4560	
4		1,1820	0,7720	0,4100	

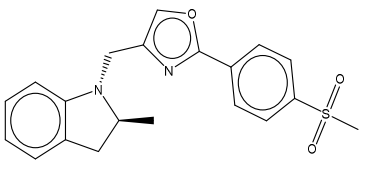
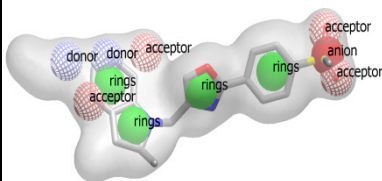
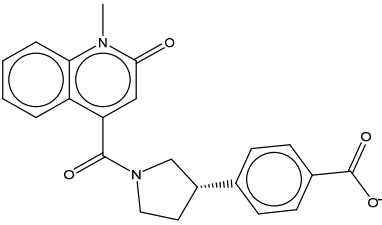
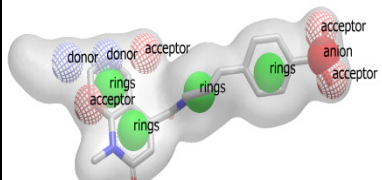
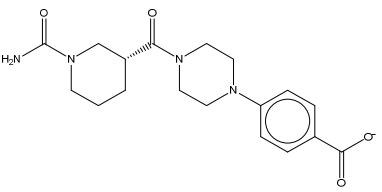
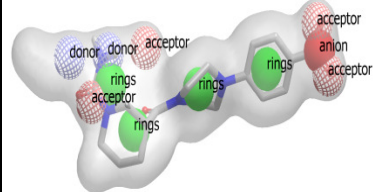
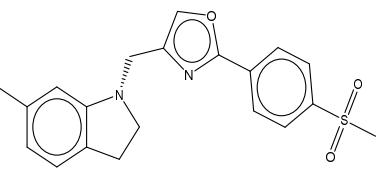
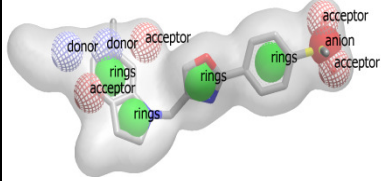
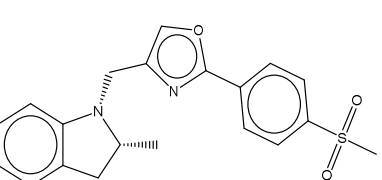
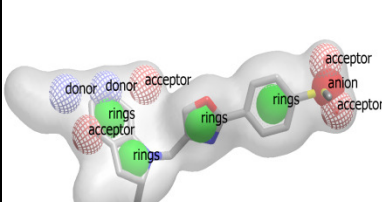
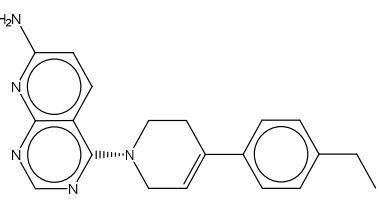
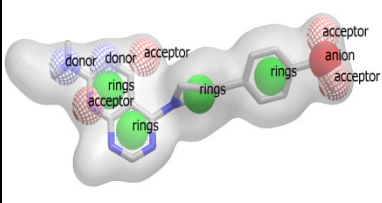
5		1,1810	0,7340	0,4470	
6		1,1800	0,7290	0,4510	
7		1,1770	0,7920	0,3850	
8		1,1760	0,7280	0,4480	
9		1,1750	0,7350	0,4390	
10		1,1700	0,7070	0,4630	

Legenda:  aromatski obroč  hidrofojni fragment  kation
 elektron donor  elektron akceptor

• **Rezultati za ligand 3:**

Preglednica 3: Strukturne formule liganda 3 in prvih desetih najvišje rangiranih spojin virtualnega rešetanja na osnovi 3D podobnosti z ligandom 3, pripadajoči indeksi podobnosti ter prostorske slike prileganja najvišje rangiranih spojin z ligandom 3.

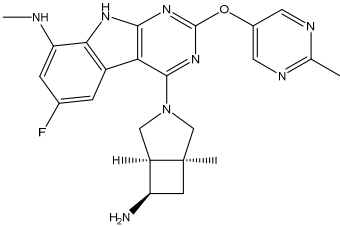
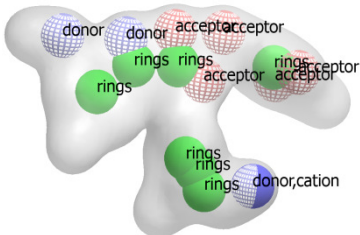
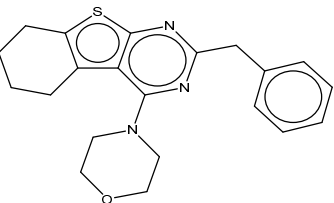
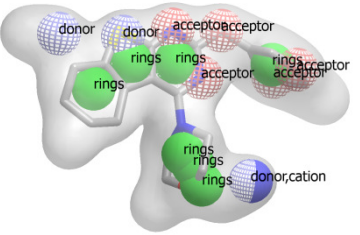
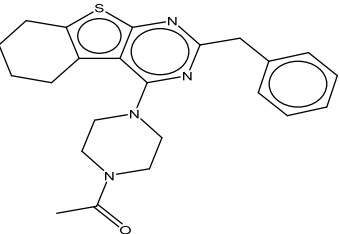
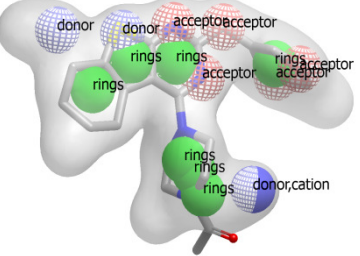
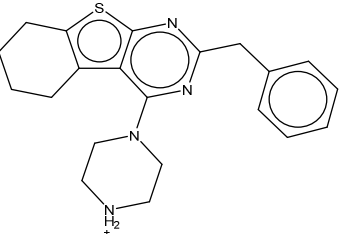
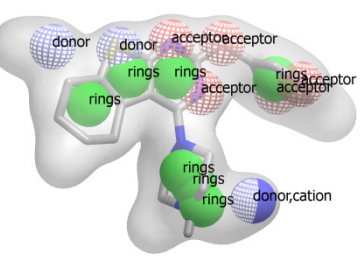
Rang	Strukturna formula	Tanim. Combo	Shape Tanim.	Colour Tanim.	Vizualizacija ujemanja z ligandom
Ligand 3		/	/	/	
1		1,3080	0,8860	0,4220	
2		1,3080	0,8260	0,4810	
3		1,2810	0,8340	0,4470	
4		1,2790	0,8250	0,4540	

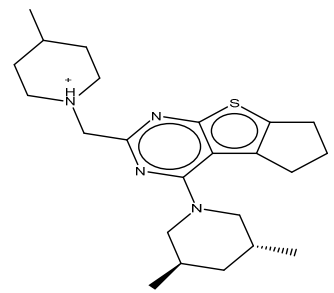
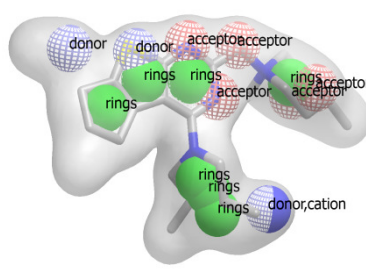
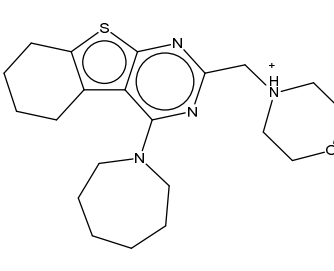
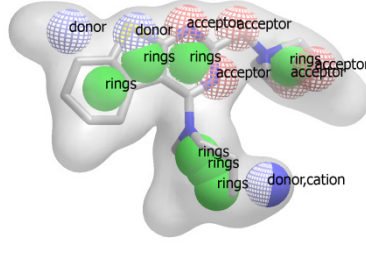
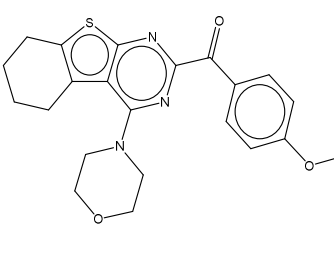
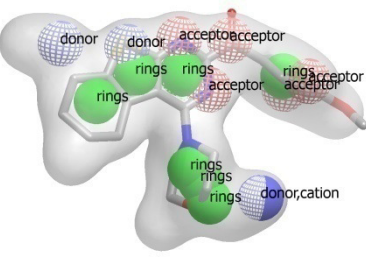
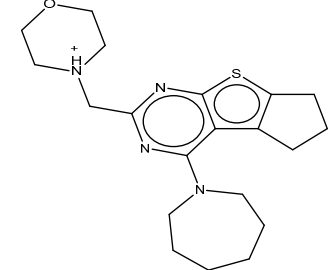
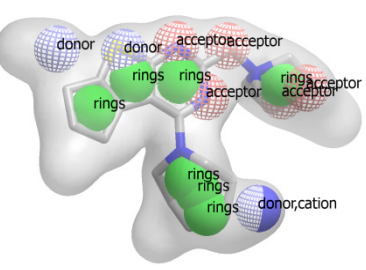
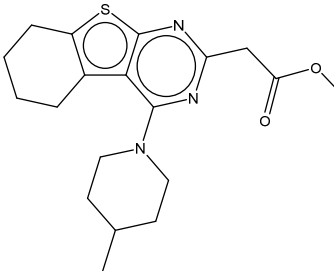
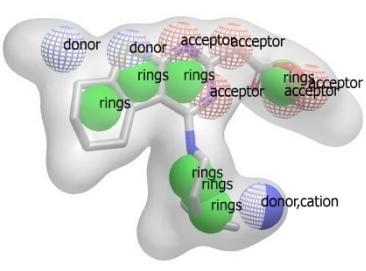
5		1,2750	0,8160	0,4590	
6		1,2700	0,7900	0,4800	
7		1,2590	0,7970	0,4620	
8		1,2580	0,7960	0,4630	
9		1,2550	0,7880	0,4660	
10		1,2540	0,8710	0,3840	

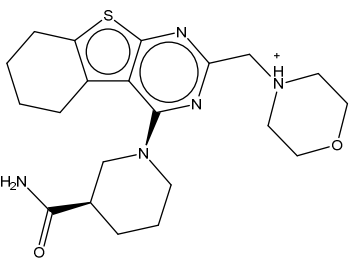
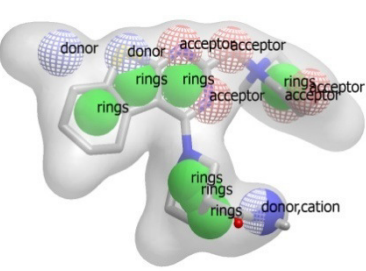
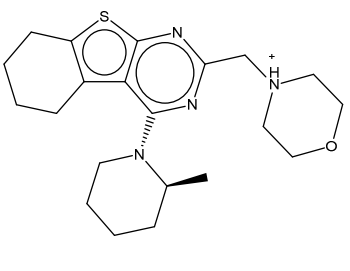
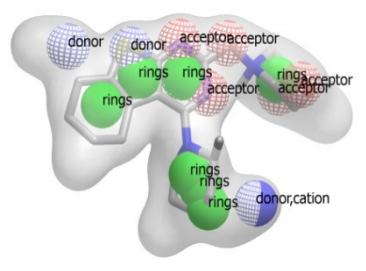
Legenda: ● aromatski obroč ● hidrofobni fragment ● kation
● elektron donor ● elektron akceptor

- **Rezultati za ligand 4:**

Preglednica 4: Strukturne formule liganda 4 in prvih desetih najvišje rangiranih spojin virtualnega rešanja na osnovi 3D podobnosti z ligandom 4, pripadajoči indeksi podobnosti ter prostorske slike prileganja najvišje rangiranih spojin z ligandom 4.

Rang	Strukturna formula	Tanim. Combo	Shape Tanim.	Colour Tanim.	Vizualizacija ujemanja z ligandom
Ligand 4		/	/	/	
1		1,3390	0,8600	0,4780	
2		1,3200	0,8420	0,4770	
3		1,3050	0,8560	0,4490	

4		1,2940	0,8390	0,4550	
5		1,2910	0,8430	0,4470	
6		1,2850	0,8370	0,4480	
7		1,2810	0,8250	0,4560	
8		1,2730	0,8320	0,4410	

9		1,2690	0,8150	0,4540	
10		1,2690	0,8250	0,4440	
Legenda: ● aromatski obroč ● hidrofolni fragment ● kation ● elektron donor ● elektron akceptor					

Pregled rezultatov v obliki indeksov podobnosti za najboljših deset spojin virtualnega rešetanja pri vsakem od štirih ligandov nam pokaže, da je pri vseh teh 40 najvišje rangiranih zadetkih prisotna večja podobnost volumna (ShapeTanimoto) kot podobnost prisotnih funkcionalnih skupin/ farmakoforov (ColourTanimoto). Dobljeni rezultat je pričakovan, saj so izbrani štirje ligandi zelo kompleksni in je njihova struktura optimizirana, tako da je zelo komplementarna vezavnemu mestu DNA-giraze B. Zato težko pričakujemo, da bodo spojine s podobnimi farmakofornimi lastnostmi prisotne v javni bazi na tržišču dostopnih spojin.

Za vsako spojino smo nato po strukturnih formulah in slikah prekrivanja pregledali še, kakšen je položaj posameznih heteroatomov oz. ali nastopajo kot donorji ali akceptorji vodikove vezi, npr. NH in OH skupini sta lahko akceptorja in donorja vodikove vezi, N in O atoma pa samo akceptorja. Znano je, da je nujen pogoj za zaviranje DNA-giraze B prisotnost donorja in akceptorja vodikove vezi v neposredni bližini. Ugotovili smo, da med vsemi 40 najvišje rangiranimi spojinami virtualnega rešetanja po podobnosti (za vsakega od štirih ligandov po deset najboljših) skoraj nobeden ne ustreza temu pogoju oz. farmakoforni zahtevi. Pri rezultatih za ligand 1 je pri skoraj vseh, razen spojini 5, prisotna bližnja pozicija dveh akceptorjev vodikove vezi (preglednica 1). Pri rezultatih za ligand 2 je akceptorska karbonilna skupina sicer prisotna pri vseh zadetkih, a nobena od spojin ne

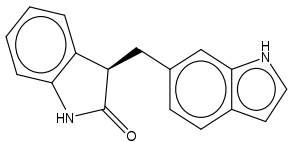
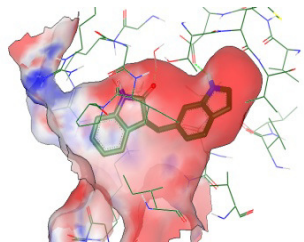
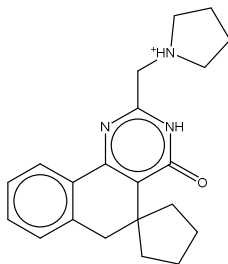
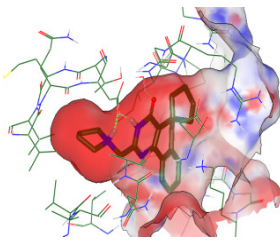
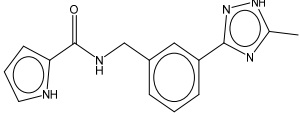
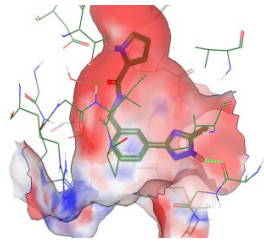
vsebuje donorja vodikove vezi na mestu farmakofora (preglednica 2). Med rezultati za ligand 3 ima bližnjo pozicijo donorja in akceptorja na mestu farmakofora le spojina 4, vsi ostali pa prav tako ne ustrezajo zahtevanemu pogoju (preglednica 3). Tudi pri virtualnem rešetanju z ligandom 4 med najboljšimi desetimi zadetki nobeden ne ustreza želenemu farmakoforu, saj ne vsebuje bližnje pozicije akceptorja in donorja vodikove vezi na istem mestu kot izbrani zaviralec DNA-giraze B. Akceptor vodikove vezi v farmakofornem mestu je pri vseh zadetkih sicer prisoten, a ne vsebuje v neposredni bližini v prostoru še donorja vodikove vezi (preglednica 4). Farmakoforno ustrezni sta torej le spojina 5 iz rešetanja z ligandom 1 in spojina 4 iz rešetanja z ligandom 3, saj v svoji strukturi na istem mestu kot izbrani ligand vsebujeta bližnji položaj donorja in akceptorja vodikove vezi. Pri prvi spojini deluje kot donor vodikove vezi aminska skupina vezana na aromatski obroč, N-atom v aromatskem obroču, ki je od aminske skupine oddaljen le en C-atom, pa kot akceptor vodikove vezi. V drugi ustrezni spojini pa kot donor vodikove vezi na mestu farmakofora nastopa aromatska aminska skupina, kot akceptor pa karbonilna skupina vezana na sosednji ogljikov atom.

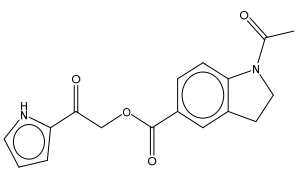
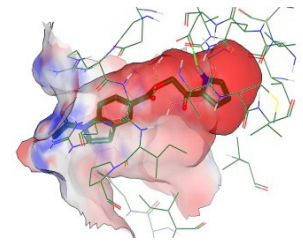
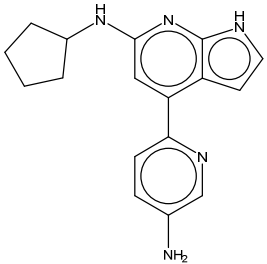
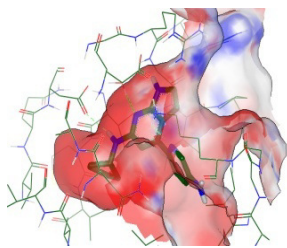
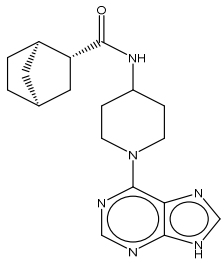
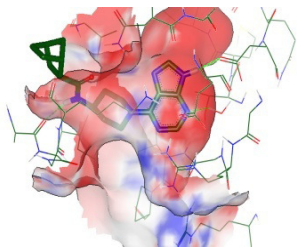
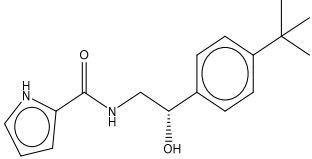
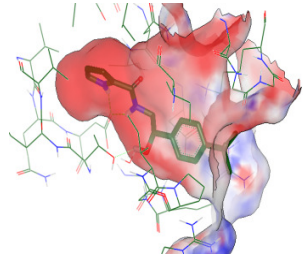
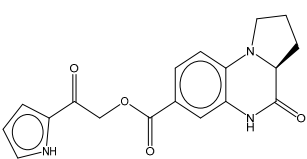
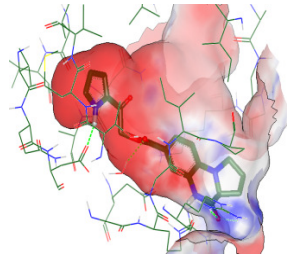
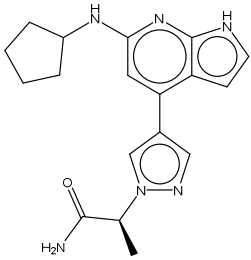
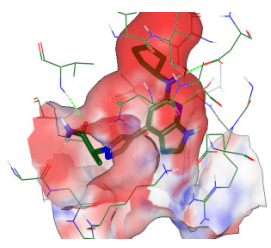
Z virtualnim rešetanjem na osnovi liganda smo tako s štirimi različnimi ligandi izmed najboljših 40 rezultatov po indeksu podobnosti dobili le dva potencialna zadetka, ki ustrezata farmakofornim zahtevam in sta podobna po obliki in volumnu ter tako izpolnjujeta osnovne zahteve za zaviralno delovanje na encim DNA-girazo B. Ostali najvišje rangirani rezultati pa sicer izkazujejo določeno stopnjo podobnosti po obliki, a žal ne ustrezajo farmakofornim zahtevam, saj v svoji strukturi na istem mestu kot ligand nimajo donorja in akceptorja vodikove vezi. Podobno velja za večino od stotih najvišje rangiranih spojin pri vsakem ligandu, vendar vseh njihovih struktur in rezultatov nismo predstavili v nalogi. Razlog je lahko v tem, da so izbrani ligandi že močno optimizirani in je glede na njihovo strukturo v izbrani knjižnici spojin težko najti spojine, ki bi bile tako po volumnu kot tudi po farmakofornih elementih podobne štirim izbranim zaviralcem DNA-giraze B. Večina zadetkov po virtualnem rešetanju na osnovi podobnosti z ligandom torej ni ustrezala našim pričakovanjem, zato smo virtualno rešetanje izvedli še po drugi metodi, in sicer na osnovi strukture tarče– sidranje.

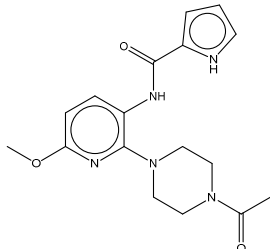
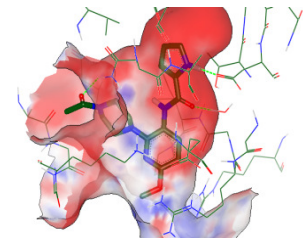
4.3. Rezultati in razprava strukturno podprtega virtualnega rešetanja

V naslednji preglednici so kot rezultati sidranja prikazane strukturne formule prvih desetih najvišje rangiranih spojin glede na ocenjeno jakost vezave v vezavnem mestu DNA-giraze B. Zraven so podane še vrednosti ocene cenilne funkcije Chemgauss ter indeksi podobnosti TanimotoCombo, ShapeTanimoto in ColourTanimoto. Sledijo še slike predvidene vezave posameznih spojin v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze B iz *E.coli*, na katerih so prikazane predvidene vodikove vezi, ki se tvorijo med ligandom in aminokislinskimi ostanki DNA-giraze B.

Preglednica 5: Strukturne formule prvih desetih najvišje rangiranih spojin virtualnega rešetanja na osnovi tarče, pripadajoče vrednosti cenilne funkcije (Chemgauss), indeksi podobnosti ter prostorske slike predvidene vezave posamezne spojine v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze B iz bakterije *E.coli*.

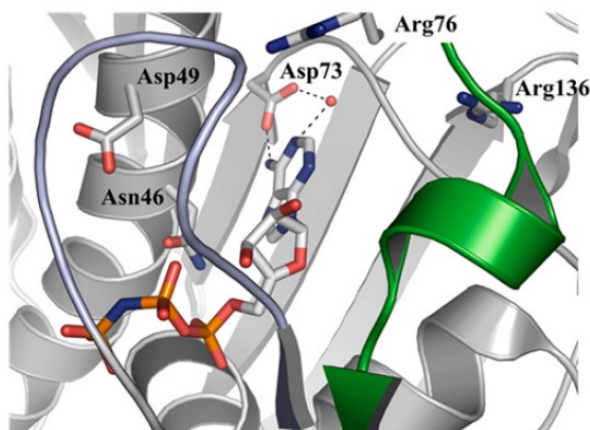
Rang	Strukturna formula	Chem gauss	Tanim. Combo	Shape Tanim.	Colour Tanim.	Predvidena vezava spojine v tarčnem mestu
1		-16,3200	1,0110	0,5820	0,4290	
2		-15,6250	0,9620	0,6920	0,2710	
3		-15,3709	0,9210	0,6050	0,3160	

4		-15,3146	0,8850	0,6710	0,2140	
5		-15,2111	1,0750	0,7000	0,3740	
6		-15,1480	0,9010	0,6400	0,2610	
7		-15,1319	0,8850	0,6130	0,2720	
8		-15,1292	0,9420	0,7070	0,2350	
9		-15,0969	0,9530	0,6300	0,3220	

10		-15,0882	0,9520	0,7380	0,2150	
----	---	----------	--------	--------	--------	---

Znano je, da mora ligand za uspešno kompetitivno zaviranje encima DNA-giraza B tvoriti v vezavnem mestu vsaj dve vodikovi vezi, eno s stransko verigo Asp73 in drugo z bližnjo kristalno vezano molekulo vode, ki pa prav tako tvori vodikovo vez z Asp73. Ta vodikova vez med molekulo vode in aminokislino Asp73 na naših slikah zaradi boljše preglednosti sicer ni prikazana. Z omenjeno mrežo vodikovih vezi posnemamo vezavo adeninskega obroča molekule ATP (slika 15). Ta farmakoforna zahteva je torej nujna, zato smo temu ustrezno nastavili tudi začetne pogoje sidranja. Cilj našega iskanja pa je seveda najti spojine, ki poleg tega tvorijo še dodatne vodikove vezi, kar poveča jakost vezave v vezavnem mestu oz. zaviranje DNA-giraze B in tako možnost odkritja novih še močnejših zaviralcev DNA-giraze B s protibakterijskim delovanjem. Ocena afinitete spojine do encima je cenilna funkcija (Chemgauss), po kateri program rangira spojine. Njena številčna vrednost je negativna, kar pomeni, da manjša vrednost cenilne funkcije kaže na višjo ocenjeno afiniteto. Vseeno pa število dodatnih vodikovih vezi ni edini dejavnik, ki vpliva na afiniteto. Zraven so pomembne še druge interakcije: van der Walsove, hidrofobne, entropijski prispevek in druge. Njihov vpliv je tako velik, da je med našimi rezultati po oceni cenilne funkcije na prvem mestu spojina, ki edina tvori le farmakoforno zahtevani dve vodikovi vezi in nobene dodatne, a ima torej z upoštevanjem še vseh ostalih interakcij najvišjo afiniteto v vezavnem mestu. Najvišje rangirana spojina virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče torej tvori v vezavnem mestu 2 vodikovi vezi, in sicer eno s kristalno vodo in drugo s stransko verigo Asp73. Zadetki sidranja, ki tvorijo poleg teh dveh vodikovih vezi še tretjo vodikovo vez, so spojine 2, 3, 4, 5, 6 in 10. Pri spojini 2 je to še ena vodikova vez s stransko verigo Asp73, kar pomeni, da sta spojina 2 in aminokislina Asp73 v tarčnem mestu povezani z dvema vodikovima vezema. Spojini 3 in 6 tvorita v tarčnem mestu DNA-giraze B tretjo vodikovo vez z aminokislino Ala100. Spojina 4 tvori tretjo vodikovo vez z Arg136, spojina 5 z Lys103 in spojina 10 z Asn46. Osmo

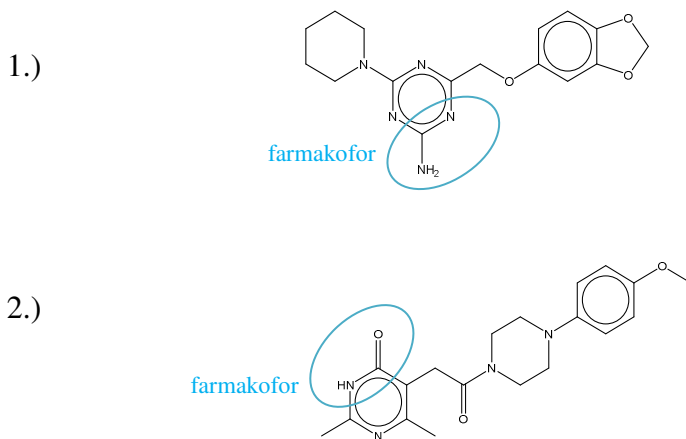
najvišje rangirana spojina virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče, spojina 8, tvori v vezavnem mestu DNA-giraze B štiri vodikove vezi, in sicer eno s kristalno vezano vodo, drugo z Asp73 in tretjo ter četrto z aminokislino Arg136. Največ vodikovih vezi pa med prvimi desetimi rangiranimi spojinami v tarčnem mestu DNA-giraze B tvori spojina 9, in sicer kar pet. Poleg farmakoforno določenih vodikovih vezi s kristalno vezano vodo in stransko verigo Asp73 se ostale tri tvorijo še z aminokislinami Asn46, Val120 in Ala100. Pri sedmem najvišje rangiranem rezultatu, spojin 7, pa programu za vizualizacijo VIDA sicer ne prikaže vodikove vezi s kristalno vezano vodo, a je O iz OH skupine na primerni razdalji do vode, tako da je ta vodikova vez zelo verjetna, in ker je prisotna tudi vodikova vez s stransko verigo Asp73 ter dodatno še vodikova vez s Thr165, je tudi tukaj izpolnjena farmakoforna zahteva za vezavo v tarčnem mestu. Vse zadetke virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče tako lahko označimo kot primerne kandidate za nadaljnja testiranja in morebitne aktivne spojine po *in vitro* vrednotenju za optimizacijo do morebitne nove spojine vodnice.



Slika 15: Prikaz vezave molekule ATP v vezavnem mestu DNA-giraze B iz bakterije *E. coli*. Vodikove vezi med adeninskim obročem molekule ATP in Asp73 ter kristalno molekulo vode so prikazane s črno črtkano črto.

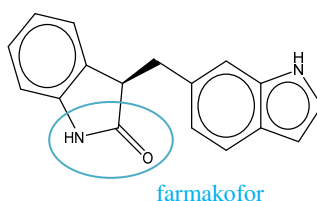
5. SKLEP

Nove strukturne tipe zaviralcev encima DNA-giraza B smo poskušali odkriti na dva različna načina. Najprej smo vse spojine iz knjižnice na tržišču dostopnih spojin ZINC pregledali na osnovi virtualnega rešetanja po podobnosti. Primerjali smo njihove 3D strukture s strukturami ligandov, in sicer glede na podobnost volumna in farmakofornih skupin. Prvih 400.000 najperspektivnejših spojin virtualnega rešetanja na osnovi podobnosti smo vključili v obogateno knjižnico, ki smo jo nadalje uporabili kot osnovno bazo spojin za iskanje po drugi metodi – sidranju oz. virtualnem rešetanju na osnovi strukture tarče. Od vsakega rešetanja smo nato podrobneje analizirali po deset najvišje rangiranih spojin. Pri rezultatih rešetanja po podobnosti z ligandom smo ugotovili, da so imele vse najvišje rangirane spojine večjo podobnost volumna kot podobnost prisotnih funkcionalnih skupin/ farmakoforov. To je najverjetneje posledica tega, da so ligandi vsi že dokaj optimizirane spojine in je v bazi težko najti nov tip spojin s podobno razporeditvijo farmakofornih elementov, ki bi lahko bili kandidati za optimizacijo do nove spojine vodnice. Le ustrezno ujemanje volumnov pa je žal večinoma premalo za podobno delovanje na izbrano tarčo. V našem primeru je znano, da je nujen pogoj za zaviranje DNA-giraze B prisotnost donorja in akceptorja vodikove vezi v neposredni bližini. Ob primerjavi slik prekrivanja smo med 40 najvišje rangiranimi spojinami po tej metodi dobili le dve spojini, ki sta imeli dobre indekse podobnosti in ustrezen položaj donorja in akceptorja vodikovih vezi, kar bi lahko pomenilo potencialno zaviranje DNA-giraze B. Ti dve spojini, ki jih po metodi virtualnega rešetanja po podobnosti predlagamo v nadaljnjo biokemijsko vrednostenje sta:

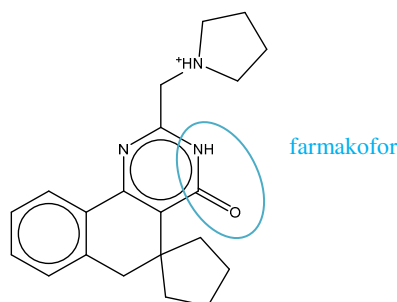


Pri metodi virtualnega rešetanja na osnovi poznane strukture tarče pa smo že pred začetkom sidranja v programu nastavili farmakoforne zahteve in tako iz obogatene knjižnice med najvišje rangiranimi spojinami dobili samo takšne, ki ustrezajo pogoju bližnjega položaja donorja in akceptorja vodikove vezi v 3D strukturi spojine. Vsi zadetki so se tako izkazali za potencialne možne kandidate za zaviralce DNA-giraze in sledečo optimizacijo do nove spojine vodnice. Glede na ocenjeno afiniteto oziroma vezavno energijo bi v nadaljno biokemijsko vrednotenje predlagali prvi dve najvišje rangirani spojin:

1.)



2.)



Glede na te rezultate lahko v našem primeru metodo virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče ocenimo za uspešnejšo od metode virtualnega rešetanja na osnovi podobnosti z ligandom. To sicer ni pravilo, saj sta metodi po uspešnosti odkrivanja novih spojin vodnic primerljivi, a je v našem primeru to lahko posledica začetnega nabora spojin, s katerimi smo izvedli rešetanje, saj je bila knjižnica pri sidranju že obogatena in je zajemala takšne, ki so se že izkazale po ugodnih Tanimotovih indeksih podobnosti. Kljub vsemu pa pri sidranju med prvimi desetimi najboljšimi spojinami glede na ocenjeno vezavno afiniteto do tarčnega mesta DNA-giraze B ni bilo nobene od spojin, ki so bile med desetimi najvišje ocenjenimi zadetki virtualnega rešetanja po podobnosti. To torej pomeni, da se pri sidranju strukturna podobnost s spojinami, ki imajo dokazano delovanje, ne upošteva, kar lahko vodi do manjšega števila odkritih aktivnih spojin. Najboljši zadetki so lahko različnih oblik, le da ustrezajo farmakoforu in imajo sposobnost tvorbe čim

močnejših interakcij v vezavnem mestu encima. Spojine, ki so se torej izkazale kot uspešne pri virtualnem rešetanju, bi tako veljalo uvesti v nadaljnje biokemijsko vrednotenje in tako ovrednotiti njihov potencial za zaviranje DNA-giraze *in vitro* in v primeru odkritih zaviralcev še njihovo protibakterijsko delovanje proti izbranim po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim sevom. Z njihovo optimizacijo pa bi lahko dobili potencialne spojine vodnice za razvoj do novega strukturnega tipa učinkovitih zaviralcev DNA-giraze B.

6. LITERATURA

1. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologijo z mikologijo in imunologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 427-446.
2. <http://www.gustrength.com/health:antibiotic-resistance-questions-and-answers>, dostopano 1. 2. 2016
3. Tomašič T, Katsamakas S, et al: Discovery of 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-d]thiazoles as novel DNA gyrase inhibitors targeting the ATP- binding site. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58: 5501-5521.
4. Tomašič T, Peterlin Mašič L: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014; 14: 130-151.
5. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T: Structure-based discovery of substituted 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 55: 6413-6426.
6. http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n1/fig_tab/nrd2202_F3.html, dostopano 3. 2. 2016
7. Bisacchi S G, Manchester I J: A new-class antibacterial-almost. Lessons in drug discovery and development: a critical analysis of more than 50 years of effort toward ATPase inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV. *ACS Infectious Diseases* 2015; 1: 4-41.
8. Tari W L, Trzos M, et al: Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase B (GyrB) and topoisomerase IV (ParE). Part I: Structure guided discovery and optimization of dual targeting agents with potent, broad-spectrum enzymatic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; 23: 1529-1536.
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3985860>, dostopano 1. 2. 2016

10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675769#section=Top>, dostopano 1. 2. 2016
11. Trzos M, Bensen D C, et al: Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase B (GyrB) and topoisomerase IV (ParE). Part II: development of inhibitors with broad spectrum, Gram-negative antibacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; 23: 1537-1543.
12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294908/figure/F2/>, dostopano 2. 2. 2016
13. Lyne D P: Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today* 2002; 7: 1047-1055.
14. Ripphausen P, Nisius B, Bajorath J: State-of-the-art in ligand-based virtual screening. *Drug Discovery Today* 2011; 16: 372-376.
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360234/>, dostopano 4. 2. 2016
16. http://www.nature.com/nature/journal/v481/n7382/box/481455a_BX1.html, dostopano 4. 2. 2016
17. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X96004231>, dostopano 4. 2. 2016
18. Kitchen B D, Decornez H, Furr J R, Bajorath J: Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004; 3: 935-949.
19. <http://www.eyesopen.com>, dostopano 4. 2. 2016