

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA KLEMENČIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA
FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA KLEMENČIČ

**SINTEZA IN VREDNOTENJE 4,6-SUBSTITUIRANIH-1,3,5-
TRIAZIN-2(1*H*)-ONOV KOT KATALITIČNIH
ZAVIRALCEV ČLOVEŠKE DNA TOPOIZOMERAZE II α**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF 4,6-SUBSTITUTED-
1,3,5-TRIAZIN-2(1*H*)-ONES AS CATALYTIC INHIBITORS
OF HUMAN DNA TOPOISOMERASE II α**

MASTER'S STUDY PROGRAMME INDUSTRIAL PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Izidorja Sosiča in somentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha.

Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani, načrtovanje spojin in testiranje encimske aktivnosti pa na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se svojim mentorjema, doc. dr. Izidorju Sosiču in doc. dr. Andreju Perdihi, da sta mi s svojimi nasveti, znanjem in izkušnjami pomagala pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi Kaji Bergant in Katji Valjavec za vse podatke, izračune ter slike. V veselje mi je bilo sodelovati z vami. Neizmerno hvaležna sem za vse informacije in znanje, ki sem ga pridobila tekom izdelave magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Izidorja Sosiča in somentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha.

Maruša Klemenčič

Predsednik komisije: prof. dr. Janez Kerč

Član komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Kazalo vsebine

Kazalo slik	IX
Kazalo preglednic	X
Povzetek	XI
Abstract.....	XIII
Seznam uporabljenih okrajšav	XV
1. Uvod	1
1.1. Rak.....	1
1.2. Pregled protirakavih učinkovin	2
1.2.1. Sintezne protirakave učinkovine	2
1.2.2. Protirakave učinkovine naravnega izvora	4
1.2.3. Ostale protirakave učinkovine.....	6
1.2.4. Biološka zdravila kot protirakave učinkovine.....	7
1.3. Encimi družine topoizomeraz - pomembne tarče protirakavih učinkovin	9
1.4. Struktura topoizomeraze $II\alpha$ in vezavno mesto za ATP.....	10
1.5. Mehanizem delovanja topo $II\alpha$ – katalitični cikel.....	11
1.6. Zaviralci topoizomeraze $II\alpha$ – pomembne protirakave učinkovine	13
1.6.1. Topoizomerazni strupi.....	13
1.6.2. Katalitični zaviralci topoizomeraze $II\alpha$	14
1.7. Razvoj monocikličnih zaviralcev topoizomeraze $II\alpha$	14
2. Namen.....	17
3. Materiali in metode.....	21
3.1. Topila in reagenti.....	21
3.2. Aparature in laboratorijska oprema	21
3.3. Programska oprema.....	21
3.4. Analizne metode.....	22
3.4.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)	22
3.4.2. Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	22
3.4.3. Masna spektroskopija visoke ločljivosti (HRMS)	22
3.4.4. Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)	22
3.4.5. <i>In vitro</i> test topo $II\alpha$ relaksacijske encimske aktivnosti	23
3.4.6. Test spodbujanja cepitve (human topoisomerase $II\alpha$ -mediated cleavage assay)	24

3.4.7.	Test aktivnosti razpletanja človeške topo II α (human topo II α -mediated decatenation assay)	25
3.4.8.	Molekulsko sidranje spojine 9 v vezavno mesto za ATP človeške topo II α ..	26
4.	Ekspperimentalno delo	29
4.1.	Sinteza	29
4.1.1.	Sintezi 6-((3-klorobenzil)tio)-4-tiokso-3,4-dihidro-1,3,5-triazin-2(1 <i>H</i>)-ona (1) in 6-((4-klorobenzil)tio)-4-tiokso-3,4-dihidro-1,3,5-triazin-2(1 <i>H</i>)-ona (2)	29
4.1.2.	Sinteze 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1 <i>H</i>)-onov (3-26).....	31
5.	Rezultati in razprava.....	45
5.1.	Komentar uporabljenih sinteznih postopkov	45
5.2.	Biološko testiranje in odnos med strukturo in delovanjem sintetiziranih 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1 <i>H</i>)-onov	46
5.3.	Preiskovanje mehanizma delovanja in predpostavljen vezavni model aktivne spojine 9	50
6.	Sklep.....	55
7.	Viri in literatura.....	57

Kazalo slik

Slika 1: Pomembni dejavniki, ki omogočajo nastanek raka, prirejeno po viru 6.	2
Slika 2: Glavne skupine alkilirajočih citostatikov s predstavniki in kemijskimi strukturami	3
Slika 3: Podskupine antimetabolitov z glavnimi predstavniki in njihovimi kemijskimi strukturami	4
Slika 4: Najpomembnejši predstavniki skupine protirakavih učinkovin naravnega izvora	6
Slika 5: Kemijski strukturi protirakavih učinkovin bortezomiba in cisplatina.	7
Slika 6: Glavne skupine bioloških zdravil in njihovi predstavniki, ki so že registrirani za zdravljenje rakavih obolenj.	8
Slika 7: Prekinitev verige DNA, ki jo katalizira encim topoizomeraza	9
Slika 8: Struktura celotne DNA topoizomeraze II α in glavne interakcije nativnega liganda AMP-PNP v ATP vezavnem mestu človeške topo II α	11
Slika 9: Shematski prikaz katalitičnega cikla topo II α , povzeto po 24.	12
Slika 10: Strukturi protirakavih učinkovin etopozida (levo) in doksorubicina (desno).	13
Slika 11: Skupine katalitičnih zaviralcev topo II α , izbrani predstavniki ter njihove kemijske strukture.	14
Slika 12: Shema razvoja monocikličnih zaviralcev človeške topo II α iz 9H-purinov.	15
Slika 13: Izbrani spojini 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov za optimizacijo na mestu 4 z namenom izboljšanja interakcij s sladkornim in fosfatnim delom ATP žepa.	17
Slika 14: Proces načrtovanja in optimizacije ter splošna formula načrtovanih spojin, ki jih bomo sintetizirali.	18
Slika 15: Shematski prikaz testa topo II α relaksacijske encimske aktivnosti (41).....	23
Slika 16: (a) princip testa spodbujanja cepitve. (b) razvoj gela pri topoizomeraznih strupih in katalitičnih zaviralcih (41).	25
Slika 17: (a) princip testa razpletanja. (b) tipičen razvoj gela (41).	26
Slika 18: Prikaz najpomembnejših zaključkov SAR študije naših spojin: substituenti, ki izboljšajo oz. ne izboljšajo aktivnosti vezave v aktivno mesto topo II α	49
Slika 19: Rezultat testa spodbujanja cepitve za izbrano aktivno spojino 9.	50
Slika 20: Rezultat testa aktivnosti razpletanja (dekantenacije) za izbrano aktivno spojino 9.	51

Slika 21: Predpostavljen vezavni model aktivne spojine 9 v vezavno mesto za ATP na ATPazni domeni človeške topo II α določen z metodo molekulskega sidranja (uporabljena kristalna struktura PDB:1ZXM).....	52
Slika 22: Primerjava vezave sidrane konformacije aktivne spojine 9 in eksperimentalno določene konformacije nehidrolizirajoče molekule ANP-PNP v vezavno mesto za ATP (uporabljena kristalna struktura PDB:1ZXM).....	53

Kazalo preglednic

Preglednica I: Rezultati biološkega testiranja sposobnosti zaviranja topoiyomeraze II α z uporabo HTS relaksacijskega testa sintetiziranih spojin <u>3-26</u> in njihove izračunane fizikalno-kemijske lastnosti.....	47
--	----

Povzetek

Rak je skupno ime za veliko številno različnih bolezenskih stanj, ki prizadenejo človeka. Trenutni razvoj stremi k odkrivanju novih protirakavih učinkovin, ki bi ta obolenja učinkovito pozdravile in bile čimbolj prijazne do bolnikov. Ena izmed dobro uveljavljenih tarč protirakavih učinkovin je encim človeška DNA topoizomeraza II α , ki ima pomembno vlogo pri podvajanju celic. Če encim, ki je bolj izražen v hitro delečih celicah, zaviramo, pride do ustavljenega procesa celične delitve in posledično celične smrti. V terapiji rakavih obolenj je že nekaj dobro uveljavljenih učinkovin (npr. etopozid, doksorubicin), ki zavirajo omenjen encim. Problem teh zdravilnih učinkovin je, da delujejo kot topoizomerazni strupi in povzročajo hude neželene učinke. Zato je razvoj novih zaviralcev topoizomeraze II α usmerjen k odkrivanju učinkovin, ki delujejo po drugih mehaniznih kot katalitični zaviralci in ne povzročajo hudih neželenih učinkov. V sklopu takih raziskav so odkrili tudi serijo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov, ki delujejo kot katalitični zaviralci topoizomeraze II α preko vezave na ATPazno domeno encima.

Na podlagi predhodnega strukturno podprtega načrtovanja, ki je pokazalo, da umestitev nesubstituiranega tiobenzilnega fragmenta na mestu 4 v izvorni seriji triazinonov omogoča tvorbo še dodatnih potencialnih interakcij v fosfatnem žepu in sladkornem delu vezavnega mesta za ATP, smo v sklopu magistrske naloge sintetizirali optimizirano serijo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov. Osnovni 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onski obroč smo pripravili s kondenzacijo, nato pa smo nanj z nukleofilno substitucijo pripeli različne substituentne. Sintetizirali smo 24 končnih spojin, ki smo jih eksperimentalno ovrednotili s spektroskopskimi metodami ter določili zaviralno aktivnost z *in vitro* testom topo II α relaksacijske encimske aktivnosti.

Najboljše spojine so izkazale vrednosti IC₅₀ pod 10 μ M, s čimer smo izboljšali aktivnost glede na predhodno serijo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov, pri kateri je imela najboljša spojina IC₅₀ vrednost 57,6 μ M. Na podlagi analize odnosa med strukturo in delovanjem smo ugotovili, da so za tvorbo novih interakcij v vezavnem mestu topo II α pomembni predvsem uvedeni fluorovi substituenti, npr. 3-CF₃, 5-F; 2,4,5-F in 4-CF₃. Za nadaljnje preiskovanje mehanizma zaviranja smo izbrali spojino **9** (6-((3-klorobenzil)tio)-4-((3-fluoro-5-(trifluorometil)benzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1*H*)-on) in jo ovrednotili s testom spodbujanja cepitve ter testom aktivnosti razpletanja. Z rezultati testa spodbujanja cepitve

smo potrdili, da spojina deluje kot katalitični zaviralec in ne kot topoizomerazni strup. S testom razpletanja smo tudi vizualno pokazali, da spojina **9** zavira delovanje topoizomeraze II α pri nižjih koncentracijah kot etopozid, ki ga trenutno uporabljamo v klinični praksi. Naši rezultati so dobro izhodišče za nadaljnji razvoj in optimizacijo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov kot katalitičnih zaviralcev topoizomeraze II α .

Ključne besede: rak, topoizomeraza II α , katalitični zaviralci, 4,6-substituirani-1,3,5-triazin-2(1*H*)-oni

Abstract

Cancer is a common term for a wide range of very different diseases. Current developments in anticancer drug discovery aim to provide more efficient and patient friendly drugs. One of the established anticancer targets is the human DNA topoisomerase II α , which plays an important role in cell division. By inhibiting the enzyme, which is expressed more in fast proliferating cells, the cell proliferation cycle is stopped, and cells undergo apoptosis. Currently some well-known agents in cancer treatment such as etoposide and doxorubicin target this enzyme. These inhibitors act as topoisomerase poisons and are despite their efficiency associated with several severe adverse effects. Therefore, the development of novel topoisomerase II α inhibitors is directed to the development of new group of agents - catalytic inhibitors - that target alternative sites of the topoisomerase II α catalytic cycle. As a part of these research endeavours, 4,6-substituted-1,3,5-triazin-2(1*H*)-ones were discovered as catalytic inhibitors of topoisomerase II α , that target its ATPase domain.

In this work, based on the previously performed structure-based design we synthesized an optimized series of the 4,6-substituted-1,3,5-triazin-2(1*H*)-ones. Our design assumption was that by introducing new substituents on the thiobenzyl substituent located on the position 4 of the triazin-2(1*H*)-one core we would gain novel favourable interactions with the phosphate and sugar part of the ATP binding site. We prepared 1,3,5-triazin-2(1*H*) core scaffold via a condensation reaction, subsequently attaching different substituents on its position 4 utilizing the nucleophilic substitution reaction. We synthesized 24 final compounds and evaluated them with spectroscopic methods and then determined their inhibitor activity utilizing the *in vitro* topo II α DNA relaxation assays.

Results of the inhibition assay demonstrated improvement of the topo II α inhibition properties compared to the starting series. The best determined IC₅₀ values were well below 10 μ M, which is better than the best compound from the original series with the IC₅₀ of 57,6 μ M. The structure-activity relationship study (SAR) showed that fluorine-containing substituents, such as 4-CH(CH₃)₂; 3-CF₃, 5-F; 2,4,5-F and 4-CF₃, are the most favourable for the new interactions with the target binding site. We also further investigated the inhibition of selected compound **9** (6-((3-chlorobenzyl)thio)-4-((3-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzyl)thio)-1,3,5-triazin-2(1*H*)-one) in DNA cleavage and

decatenation assays. With the DNA cleavage assay, we confirmed that compound **9** acts as a catalytic inhibitor and not as topoisomerase poison. With decatenation assays we further visually showed that compound **9** inhibits topoisomerase II α at lower concentrations than etoposide, which is currently used in clinical practice. Our results represent a good starting point for further optimization and development of 4,6-substituted-1,3,5-triazin-2(1*H*)-ones as catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II α .

Key words: cancer, topoisomerase II α , catalytic inhibitors, 4,6-substituted-1,3,5-triazin-2(1*H*)-ones

Seznam uporabljenih okrajšav

Okrajšava	Pomen
AMP-PNP	adenozin 5'-(β,γ -imido)trifosfat
ATP	adenozin trifosfat
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamid tetraacetna kislina
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti
IC ₅₀	koncentracija zaviralca, ki zmanjša odziv za 50 %
logP	porazdelitveni koeficient
MST	mikrotermoforeza
NMR	jedrska magnetna resonanca
PDB	baza proteinskih struktur (Protein Data Base)
R _f	retencijski faktor
SAR	odnos med strukturo in delovanjem
TLC	tankoplastna kromatografija
topo II α	topoizomeraza II α
UV	ultravijolično

1. Uvod

1.1. Rak

Rak je splošen izraz za skupino več kot 200 različnih bolezni, ki lahko prizadenejo skoraj katerikoli del telesa (1). Je drugi najpogostejši vzrok smrti, ki je leta 2015 terjal 8,8 milijonov življenj po celem svetu. Najpogostejši vzroki smrti za rakom so rak pljuč, rak jeter, rak debelega črevesa, rak na želodcu ter rak dojke (2).

Skupna lastnost vseh rakavih obolenj je nekontrolirana rast in širitev celic, ki lahko vdrejo v okoliška tkiva in tvorijo metastaze na oddaljenih mestih. Rak nastane v večstopenjskem procesu iz normalnih celic. Rakave celice so rezultat interakcij različnih dejavnikov. Mednje spadajo npr. genetske spremembe protoonkogenov, tumor supresorskih genov ter genov, ki sodelujejo pri popravljanju DNA. Med pomembnimi dejavniki so tudi različni kemični (komponente tobačnega dima), fizikalni (UV-sevanje, ionizirajoče sevanje) in biološki (virusi) dejavniki (2,3,4,5). Kljub temu da so rakava obolenja med seboj zelo različna, imajo rakave celice določene skupne lastnosti, ki so shematsko prikazane na sliki 1. Vse so samozadostne za lastno proliferacijo, poleg tega pa so neodzivne na signale, ki uravnavajo število celičnih delitev in na signale, ki sprožajo apoptozo. Sposobne so neomejenega razmnoževanja, saj lahko tvorijo nove krvne žile (angiogeneza), ki omogočajo boljšo preskrbo s kisikom in hranili. Celice so genomsko nestabilne, sposobne so prehoda v limfni in krvni obtok ter rasti v drugih organih (metastaziranje). Sposobne so reguliranja celične energije ter tvorbe citokinov in izražanja celičnih antigenov, s čemer se izognejo imunskemu sistemu, lahko pa povzročajo tudi vnetja, ki spodbujajo nastanek tumorja (1,4,5,6,7).

Zdravljenje raka temelji na odstranitvi ali uničenju rakavega tkiva. Pri tem je potrebno še posebej paziti na vsa zdrava tkiva, ki obdajajo rakavo tkivo, da jih ne poškodujemo v preveliki meri. Glavni pristopi zdravljenja raka so (4):

- kirurška odstranitev
- radioterapija
- kemoterapija
- hormonska terapija
- imunoterapija
- tarčna zdravila
- genska terapija



Slika 1: Pomembni dejavniki, ki omogočajo nastanek raka, prirejeno po viru 6.

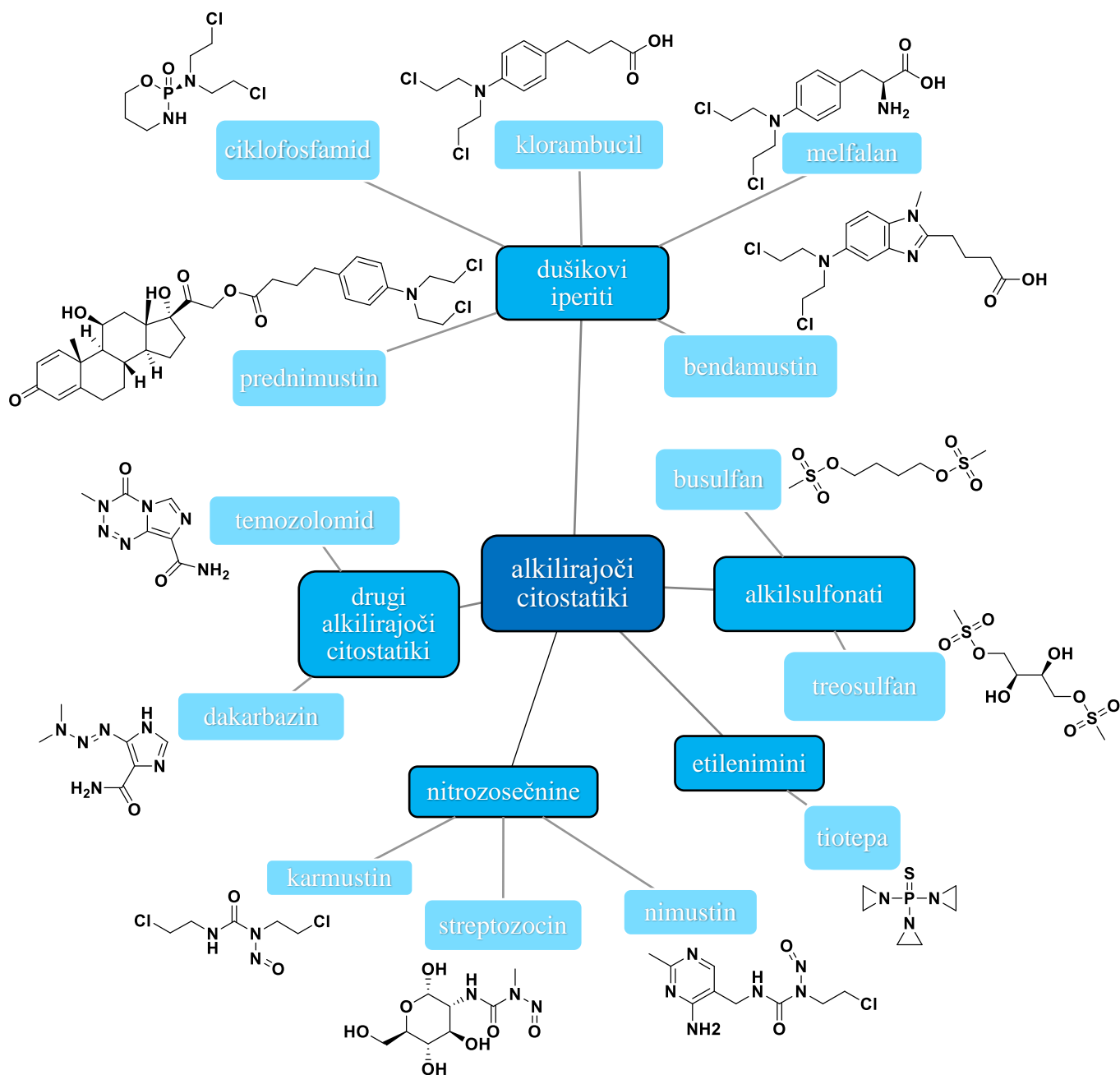
1.2. Pregled protirakavih učinkovin

Protirakave učinkovine lahko v grobem razdelimo na sintezne učinkovine, učinkovine naravnega izvora, ostale protirakave učinkovine ter biološka zdravila. V kratkem pregledu so v nadaljevanju predstavljene samo najpomembnejše skupine učinkovin.

1.2.1. Sinteze protirakave učinkovine

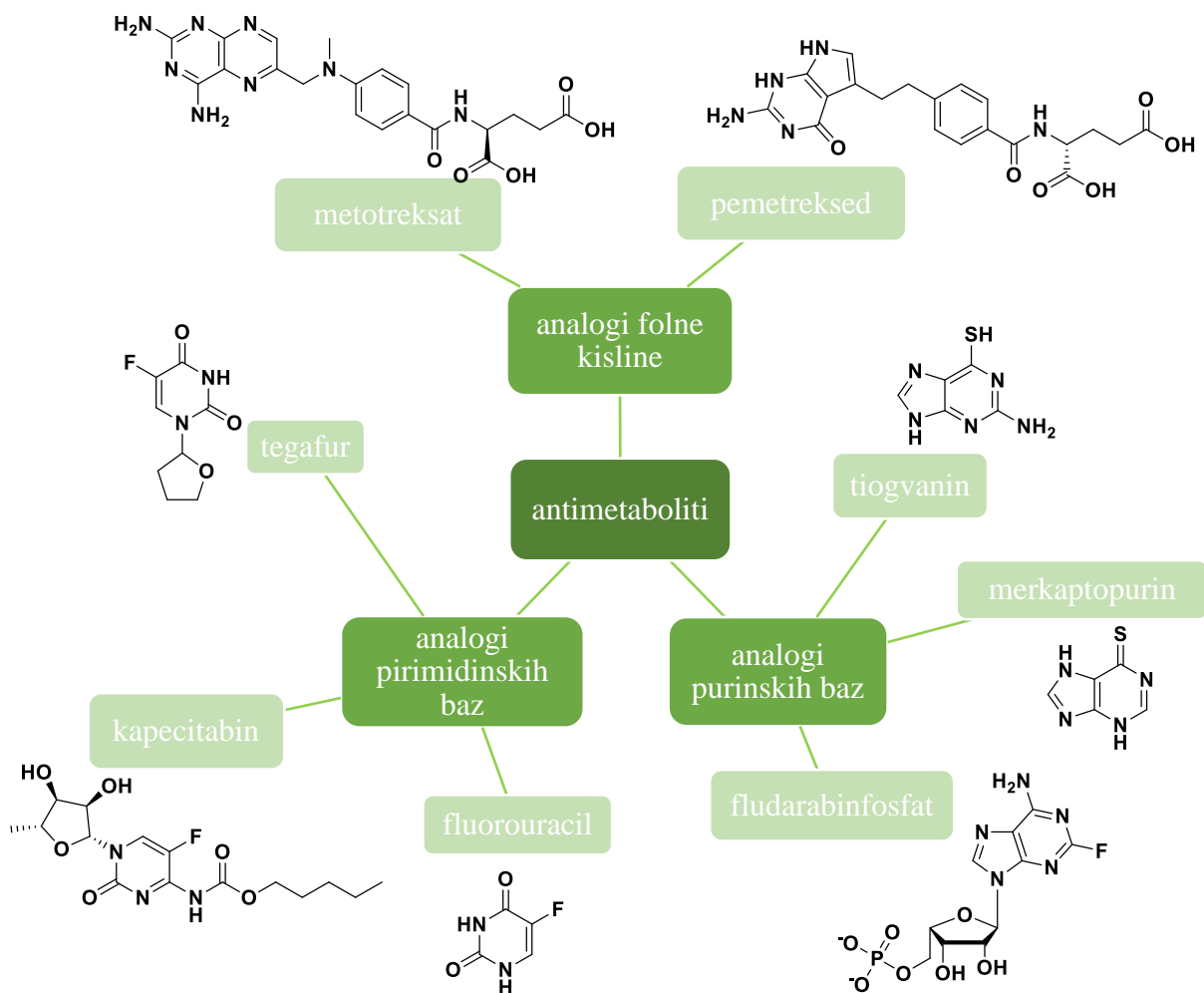
Med glavne skupine sinteznih učinkovin spadajo alkilirajoči citostatiki in antimetaboliti (8).

Alkilirajoči citostatiki so skupina zelo različnih spojin, katerih skupna lastnost je reaktivna elektrofilna skupina, sposobna vezave z različnimi molekulami. Njihov citotoksični učinek je povezan s sposobnostjo alkiliranja molekule DNA (5, 8). V skupino spadajo: dušikovi iperiti, alkilsulfonati, etilenimini, nitrozosečnine in drugi alkilirajoči citostatiki. Glavni predstavniki skupin so prikazani na sliki 2.



Slika 2: Glavne skupine alkilirajočih citostatikov s predstavniki in kemijskimi strukturami

Med antimetabolite spadajo spojine, ki zavirajo biosintezo ali celično presnovo in posledično upočasnijo celično rast ali delitev. Imajo podobno strukturo kot pravi celični metaboliti, zato lahko vstopajo v iste biokemijske reakcije ter tako delujejo kot encimski zaviralci ali zaviralci teh biokemijskih procesov (5, 8). Najpomembnejši antimetaboliti so analogi folne kisline ter pirimidinskih in purinskih baz. Strukturne formule glavnih predstavnikov so predstavljene na sliki 3.



Slika 3: Podskupine antimetabolitov z glavnimi predstavniki in njihovimi kemijskimi strukturami

1.2.2. Protirakave učinkovine naravnega izvora

Protirakave učinkovine naravnega izvora razdelimo na učinkovine rastlinskega izvora in antibiotike s citotoksičnim delovanjem (8). Med učinkovine rastlinskega izvora uvrščamo vinka alkaloide, derivate podofilotoksina, kamptotekine, kolhicinove derivate ter taksane.

Vinka alkaloidi izvirajo iz tropske rastline rožnati zimzelen (lat. *Catharanthus roseus*). V to skupino spadata sorodna alkaloida vinblastin (prikazan na sliki 4) in vinkristin ter njuna polsintezna derivata vindesin in vinorelbin. Navedene spojine se vežejo na tubulin in preprečijo polimerizacijo mikrotubulov. Posledica tega je ustavljena celična delitev in apoptoza (5, 8, 9, 10).

Podofilotoksin je spojina, izolirana iz korenike ščitastega majskega jabolka (lat. *Podophyllum peltatum*). Za klinično uporabo sta pomembna njegova polsintezna derivata etopozid in tenipozid (slednji je prikazan na sliki 4). Glavni mehanizem njunega protirakavega delovanja je zaviranje DNA topoizomeraze II. Spojini sta t. i. strupa topoizomeraze II in stabilizirata kompleks encim-učinkovina, kar vodi v nabiranje teh kompleksov v celici in nato sprožitev mehanizmov apoptoze (5, 8).

Podobno delujejo kamptotekini, predstavnika katerih sta irinotekan (prikazan na sliki 4) in topotekan, ki so ju izolirali iz drevesa sreče oz. življenja (lat. *Camptotheca acuminata*). Spojini zavirata DNA topoizomerozo I tako, da se vežeta na kompleks encim-DNA in preprečita ponovno povezovanje verig DNA, kar vodi v apoptozo (5,8).

Podobno kot vinka alkaloidi pa delujejo tudi kolhicinovi derivati. Glavni predstavnik je kolhicin, ki je prikazan s svojo kemijsko strukturo na sliki 4. Prisoten je v jesenskem podlesku (lat. *Colchicum autumnale*). Deluje tako, da se veže na tubulin in preprečuje polimerizacijo mikrotubulov (8, 11).

Taksani so spojine, ki izvirajo iz kanadske tise (lat. *Taxus canadensis*). Delujejo tako, da stabilizirajo mikrotubule, preprečijo njihovo depolimerizacijo in oblikovanje v delitveno vreteno. Na ta način je moten proces celične delitve. Glavna predstavnika skupine sta paklitaksel (prikazan na sliki 4) in docetaksel (5, 8).

V skupino učinkovin naravnega izvora spadajo še citostatični antibiotiki. Gre za veliko skupino, v katero spadajo naravne in polsintezne spojine. Delujejo neposredno na molekulo DNA ali pa zavirajo različne encime, ki so nujno potrebni za normalno celično delovanje (8). Pomembne skupine so:

- Antraciklinski antibiotiki

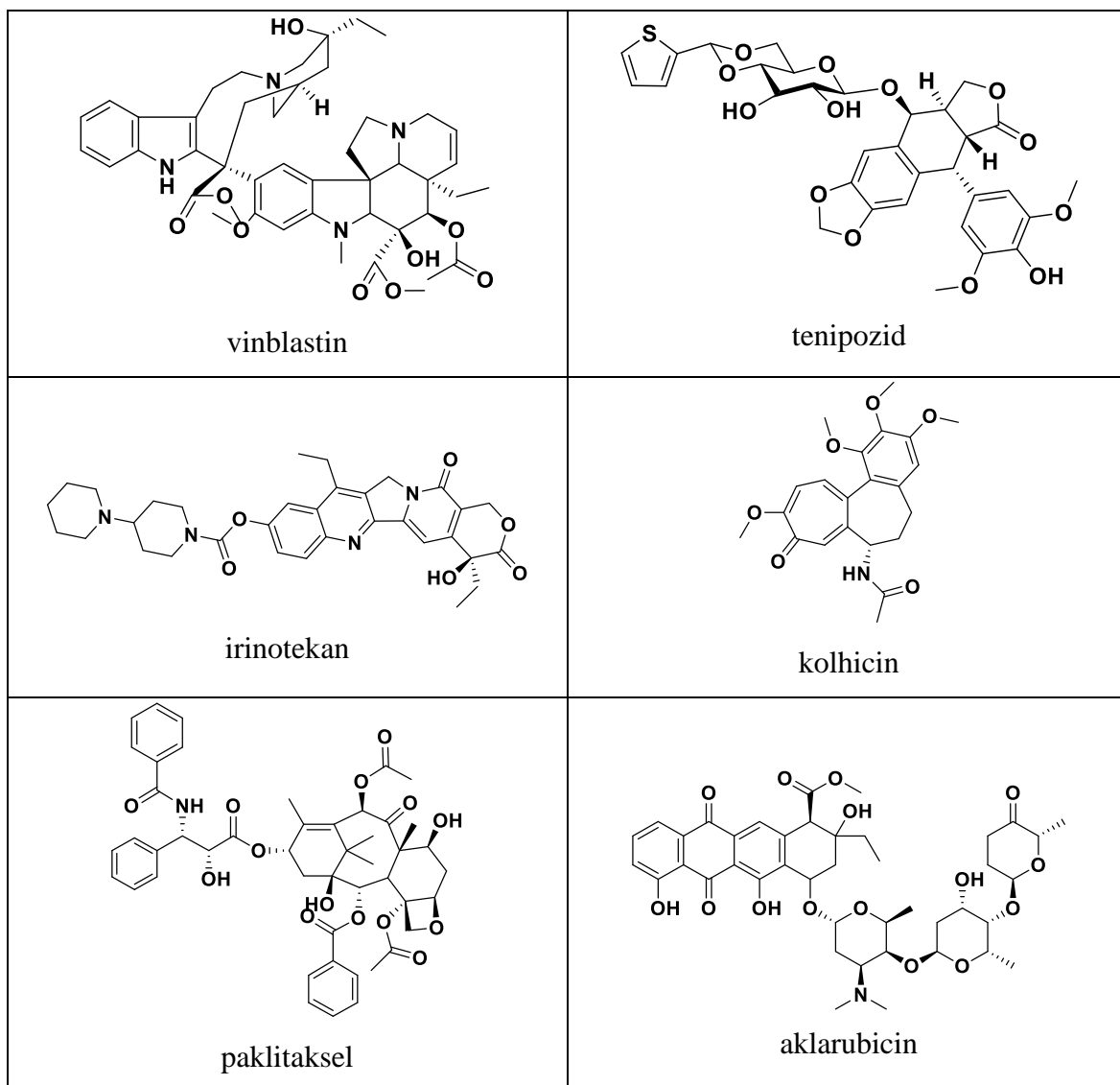
Predstavniki skupine (npr. akklarubicin (prikazan na sliki 4), doksorubicin, epirubicin,...) delujejo kot zaviralci topoizomeraze II, poleg tega pa se vgrajujejo tudi med bazne pare (8).

- Aktinomicini

Predstavnika skupine daktinomicin in plikamicin imata podoben mehanizem delovanja. Vrivate se med bazne pare, povečujeta razdaljo med njimi in posledično deformirata molekulo DNA. S tem sta motena procesa replikacije in transkripcije (8, 12).

- Mitomicini

Učinkovine v tej skupini so sposobne bodisi pretvorbe v radikale bodisi kelacije kovinskih ionov, ki katalizirajo nastanek radikalov. Radikali so izjemno reaktivne spojine, ki reagirajo z molekulo DNA in povzročijo njeno pretrganje in posledično smrt rakavih celic (8, 12).

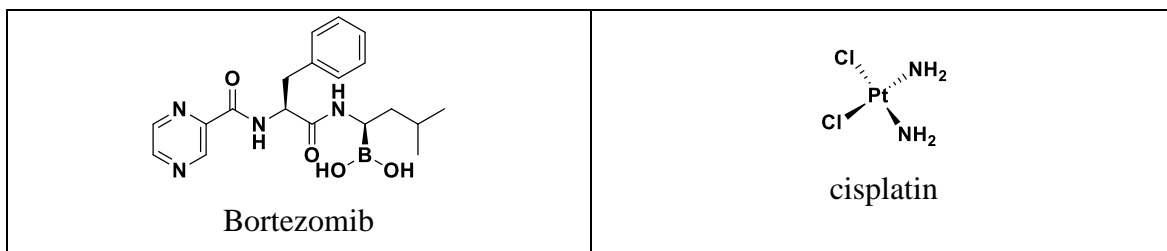


Slika 4: Najpomembnejši predstavniki skupine protirakavih učinkovin naravnega izvora

1.2.3. Ostale protirakave učinkovine

Med ostale protirakave učinkovine spadajo platinove (II) koordinacijske spojine (npr. cisplatin (prikazan na sliki 5) in transplatin), metilhidrazini (npr. prokarbazin), zaviralci tirozin-kinaze (npr. gefetinib, erlotinib, lapatinib) ter ostale strukturno in po mehanizmu

delovanja različne učinkovine (npr. bortezomib (prikazan na sliki 5), ki je zaviralec proteasoma) (5, 8).



Slika 5: Kemijski strukturi protirakavih učinkovin bortezomiba in cisplatina.

1.2.4. Biološka zdravila kot protirakave učinkovine

Vedno večji del novih protirakavih učinkovin predstavljajo biološka zdravila. Njihova glavna značilnost je tarčno delovanje. Preprosto jih lahko razdelimo na tradicionalna in sodobna biološka zdravila. Med tradicionalna spadajo zdravila, pridobljena s klasičnimi biotehnološkimi postopki, ali pa zdravila, izolirana iz rastlin, živali oz. človeške krvi. Med sodobna biološka zdravila pa uvrščamo zdravila, pridobljena s tehnologijo rekombinantne DNA, moderne celične biologije in usmerjene kemijske sinteze. Najpogostejša biološka zdravila so protitelesa, hematopoezni dejavniki, interlevkini in interferoni. Najpomembnejši že registrirani predstavniki bioloških zdravil so prikazani na sliki 6 (13).

Protitelesa ciljajo tarčne antigene, ki so izrazito izraženi na rakavih celicah. Spodbudijo telesni imunski odziv in aktivacijo celic ubijalk, ki napadejo rakavo tkivo (5). Protitelesa proti receptorjem epidermalnega ravnega dejavnika blokirajo rast in diferenciacijo rakavih celic, s čimer se ustavi rast tumorja. Za zdravljenje levkemij so zelo primerna protitelesa, ki so usmerjena proti označevalcem na površini limfocitov. Po vezavi na antigen se aktivirajo obrambne celice ali pa komplement, kar rezultira v lizi rakavih celic. Protitelesa proti žilnemu endotelijskemu rastnemu dejavniku preprečujejo njegovo vezavo na receptorje in posledično zavirajo rast tumorskega žilja. S tem je zmanjšana hitrost rasti tumorja ter možnost metastaziranja. Protitelesa proti specifičnemu membranskemu antigenu so uporabna samo za tumorje prostate, saj specifično prepoznajo omenjeni antigen, ki je izražen na tkivu prostate (5, 13, 14).

Rekombinantni eritropoetini se uporabljajo za zdravljenje anemij po kemoterapiji. Delujejo na prekurzorje eritrocitov in nadzirajo njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje. Prav

tako za zdravljenje po kemoterapiji uporabljamo granulocitne kolonije stumulirajoči dejavnik in granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik. Uporabljata se za zdravljenje nevtropenij. Granulocitne kolonije stumulirajoči dejavnik spodbuja diferenciacijo granulocitnih nevtrofilcev, ki so pomembni del obrambe imunskega sistema pred patogeni, granulocitne/makrofagne kolonije stumulirajoči dejavnik pa spodbuja proliferacijo granulocitne makrofagne linije (13).

Citokini so biokemični prenašalci, ki inducirajo imunski odziv. Mednje spadajo tudi interlevkini in interferoni. Z vidika zdravljenja rakavih obolenj so pomembni predvsem interlevkin 2, interlevkin 11 ter interferon alfa 2 (13, 15).

Protitelesa	Hematopoezni dejavniki	Interlevkini in interferoni
<ul style="list-style-type: none"> ○Terapevtska monoklonska protitelesa proti receptorjem epidermalnega rastnega dejavnika HER-1 in HER-2: trastuzumab, certuksimab ○Terapevtska monoklonska protitelesa proti limfocitnim označevalcem CD20, CD32 in CD52: ritukdimab, ibritumomab, tiuksetan, tosimumomab, alemtuzumab ○Protitelesa proti vaskularnem endotelijskem rastnem dejavniku: bevacizumab ○Terapevtska monoklonska protitelesa proti prostatnem specifičnem membranskem antigenu: capromab pendetide 	<ul style="list-style-type: none"> ○Eritropoetin ○Granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik ○Granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik 	<ul style="list-style-type: none"> ○Interlevkin 2 ○Interlevkin 11 ○Interferon alfa 2

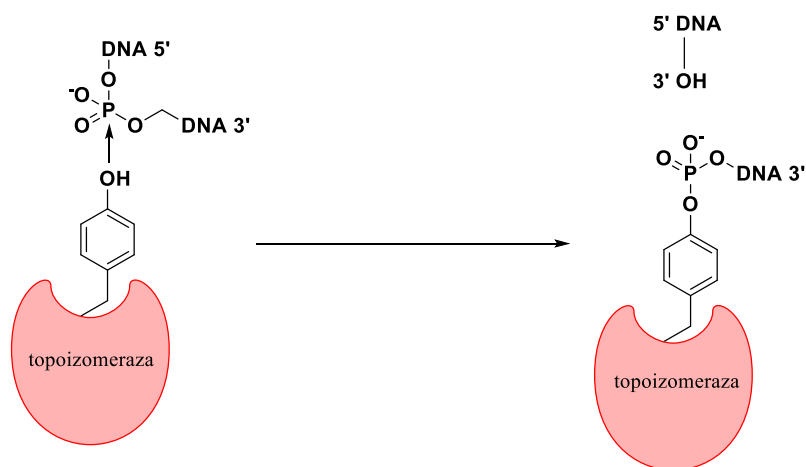
Slika 6: Glavne skupine bioloških zdravil in njihovi predstavniki, ki so že registrirani za zdravljenje rakavih obolenj.

1.3. Encimi družine topoizomeraz - pomembne tarče protirakavih učinkovin

Prenašanje genetske informacije zahteva odvijanje in ponovno zvijanje DNA. Dvojno zvitja struktura DNA predstavlja velik topološki problem med odvijanjem in odpiranjem verige, saj med replikacijo prihaja do dodatnega zvitja DNA (16, 17). Rešitev, ki jo je razvila narava, so encimi topoizomeraze, molekularni motorji, ki katalizirajo spremembo topološke strukture DNA. Ti encimi so sposobni sproščanja zvite verige DNA oz. dodatnega zvijanja, (raz)vozlanja, sklepanja in razčlenjevanja verige (18, 19).

Glede na strukturo in mehanizem topoizomeraz jih razdelimo v dve skupini: topoizomeraze tipa I in topoizomeraze tipa II. Encimi tipa I katalizirajo reakcije, pri katerih prekinejo in spremenijo zvitje ene verige DNA. V nasprotju z encimi tipa I, so encimi tipa II od ATP odvisni in lahko hkrati prekinejo dve verigi DNA (16).

DNA topoizomeraze opravljajo svojo nalogo zelo preprosto in elegantno s transesterifikacijo. Oba tipa encima imata v aktivnem mestu tirozin. Pri prekinitvi verige DNA hidroksilna skupina tirozina napade fosfor v verigi DNA. Tvorijo se kovalentna povezava med fosforjem in tirozinom, hkrati pa se prekine fosfodiesterska vez v verigi DNA. Shema reakcije je prikazana na sliki 7. Ponovno združenje verige DNA se zgodi z drugo esterifikacijo, ki je obratna prvi. Hidroksilna skupina na DNA, ki je nastala ob prvi reakciji, napade fosfor iz vezi fosfor-tirozin in prekine kovalentno vez med proteinom in DNA. Tako se veriga DNA ponovno sklence in njeno zaporedje glede na prvotno verigo ostane nespremenjeno (17, 20-22).



Slika 7: Prekinitev verige DNA, ki jo katalizira encim topoizomeraza

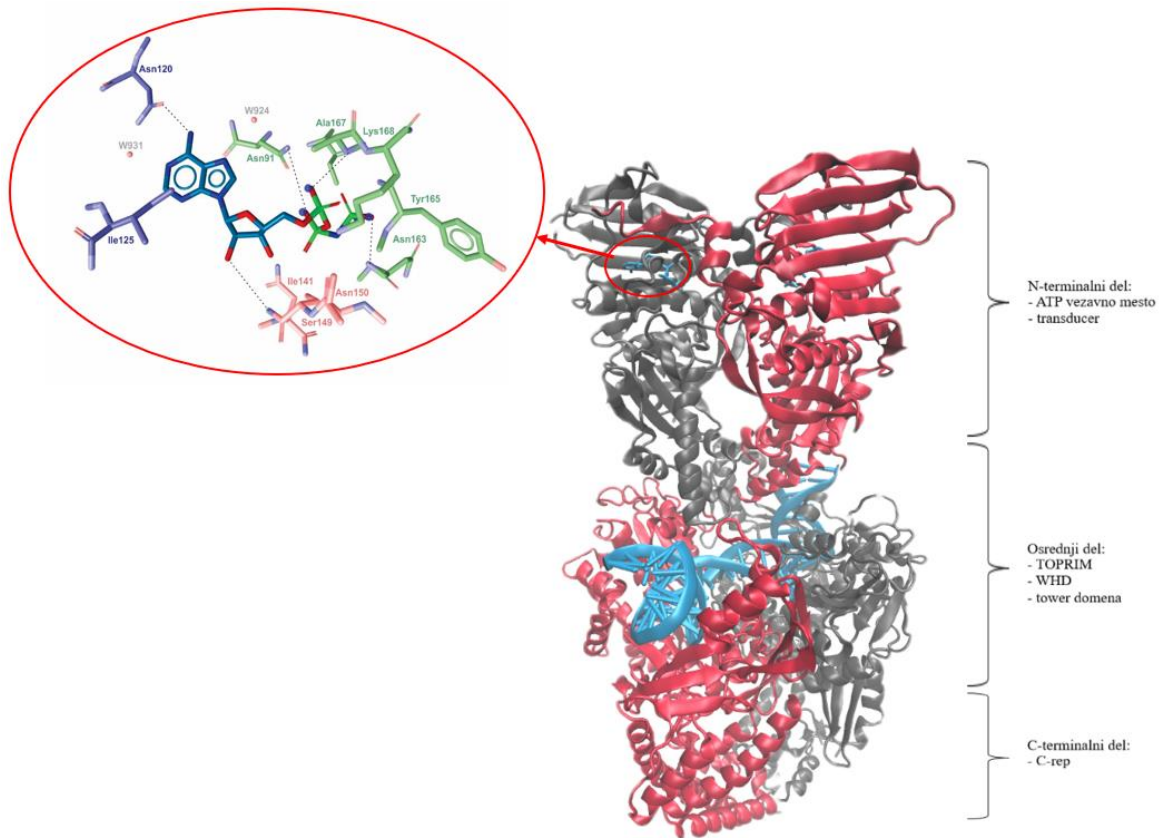
Topoizomerazi tipa I in tipa II se lahko do neke mere nadomeščata pri veliko nalogah, vendar pa je za preživetje celice nujno potreben encim tipa II, saj encim tipa I ni sposoben popolnoma ločiti dvojne verige molekule DNA. V takem primeru je celica podvržena smrti (16, 20).

Obstajata dve izoobliki človeške topoizomeraze tipa II: α in β . Najpomembnejša razlika med oblikama je v njunem izražanju v celicah. β oblika je izražena sistemsko in njena količina se med potekom celičnega cikla ne spreminja, medtem ko količina α oblike variira glede na stopnjo celične proliferacije ter stopnjo celičnega cikla. Količina topoizomeraze II α (topo II α) je dva- do trikrat višja med mitozo, v hitreje delečih se celicah pa je količina višja za en velikostni razred (20). Ta lastnost topo II α pomeni, da jo lahko izkoriščamo kot tarčo za načrtovanje protirakavih zdravilnih učinkovin, saj so z delovanjem nanjo te učinkovine bolj smrtonosne za celice, ki se hitreje delijo in imajo prisotne večje količine encima (16).

1.4. Struktura topoizomeraze II α in vezavno mesto za ATP

O celotni strukturi človeške topo II α sklepamo na podlagi homologije z ostalimi DNA topoizomerazami tipa II, saj točna tridimenzionalna struktura za človeški encim še ni znana. Trenutno je bila rešena le struktura celotne DNA topoizomeraze II iz *Saccharomyces cerevisiae* z vezano eno verigo DNA (23, 24).

Encim topoizomeraza II je heterodimer, sestavljen iz dveh parov identičnih podenot, ki sta pravokotni ena na drugo. Razdelimo ga na tri dele: N-končni del, centralni del ter C-končni del, ki so prikazani na sliki 8. N-končni del, imenovan tudi ATPazna domena, sestavlja ATP vezavno mesto ter transducer. ATP vezavno mesta spada pod skupino encimov GHKL (DNA giraze, Hsp90, histidin kinaze ter proteini MutL). Centralni del sestavljajo tri domene: TOPRIM (Topoisomerase/Primase), WHD (winged helix domain) in domena tower. C-končni del pa sestavlja C-rep (23, 24).



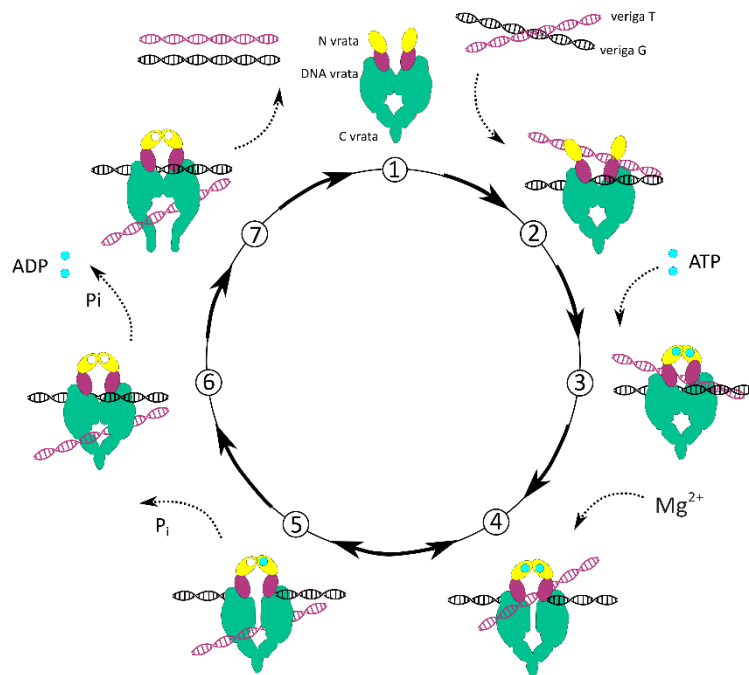
Slika 8: Struktura celotne DNA topoizomeraze II α in glavne interakcije nativnega liganda AMP-PNP v ATP vezavnem mestu človeške topo II α .

Glavna tarča naših raziskav je vezavno mesto za ATP na ATPazni domeni topo II α . Za ATPazno domeno iz človeške topo II α so raziskovalci na Univerzi Harvard rešili tudi kristalno strukturo z nehidrolizirajočim derivatom ATP, AMP-PNP. Glavne opažene interakcije, ki jih AMP-PNP tvori z vezanim mestom, so prikazane na sliki 8. Adenozinski obroč tvori vodikove vezi z Asn120 ter Ile125. Sladkorni del je stabiliziran z vodikovimi vezmi s Ser149, Asn150 ter Ile141. Fosfatni del tvori interakcije z Lys168, Asn91, Ala 167, Asn163 ter Tyr165, poleg tega pa tvori koordinacijsko vez z Mg²⁺ ionom, ki na sliki 8 ni prikazana (25).

1.5. Mehanizem delovanja topo II α – katalitični cikel

Katalitični cikel topoizomeraze II α je zapleten večstopenjski proces. Trenutno razumevanje tega procesa je prikazano na sliki 9. Topo II α deluje kot heterodimer in za svoje delovanje potrebuje Mg²⁺ ione. Dva dela verige DNA, na katera deluje encim, označujemo kot verigi G in T. Verigo G encim odpre in tako lahko mimo potuje veriga T. S tem se zmanjša konformacijska napetost zvitja DNA. V prvem koraku morajo biti N-

vrata odprta, da se v drugem koraku veriga G veže na DNA-vrata. Po pripetju molekule ATP na ATP vezavno mesto, pride v tretjem koraku do konformacijske spremembe pri $\text{topo II}\alpha$, kar rezultira v zaprtju N-vrat, ki imobilizirajo verigo T. V četrtem koraku ob prisotnosti Mg^{2+} ionov dva katalitična tirozinska preostanka, vsak iz svoje monomerne enote encima, napadeta kot nukleofila fosfodiestersko vez v DNA štiri bazne pare narazen vsak na svoji strani verige G in se kovalentno povežeta s 5' koncem prekinjene DNA. V petem koraku veriga T DNA potuje skozi nastalo odprtino v verigi G. Pod normalnimi pogoji je ta razcepljen kovalentni kompleks med verigo G in $\text{topo II}\alpha$ kratkoživ. V šestem koraku poteče hidroliza ene molekule ATP do ADP, kar povzroči odprtje C-vrat. Veriga T se v sedmem koraku sprosti iz encima. Prekinjena dela verige G se spet združita s pomočjo encima. Hidroliza druge molekule ATP nato pretvori kompleks nazaj v odprto stanje z odprtjem N-vrat in s sprostitvijo verige G. Encim je tako pripravljen na nov cikel (18, 20, 26, 27).



Slika 9: Shematski prikaz katalitičnega cikla $\text{topo II}\alpha$, povzeto po 24.

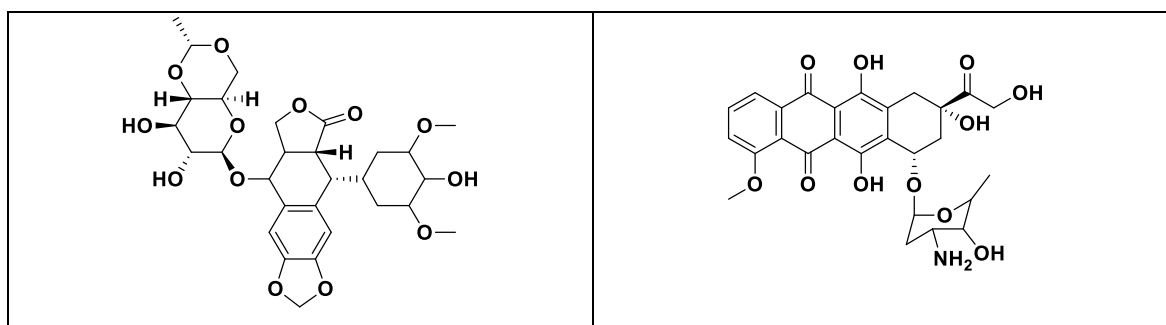
1.6. Zaviralci topoizomeraze II α – pomembne protirakave učinkovine

Človeška DNA topoizomeraza IIa je dobro uveljavljena tarča za zdravljenje številnih oblik rakavih obolenj. Učinkovine lahko glede na mehanizem delovanja razdelimo v dve skupini. Topoizomerazni strupi so starejša skupina in so že dobro uveljavljeni, medtem ko so katalitični zaviralci novejša in zelo obetavna skupina zaviralcev (24).

1.6.1. Topoizomerazni strupi

Topoizomerazni strupi stabilizirajo kompleks, ki nastane med DNA in topoizomerazo II med cepitvijo verige DNA. Encim spremenijo v celični toksin, saj mora biti ta kompleks pod fiziološkimi pogoji kratkoživ. Posledično pride do trajnih prekinitev DNA, kar vodi v celično smrt (28).

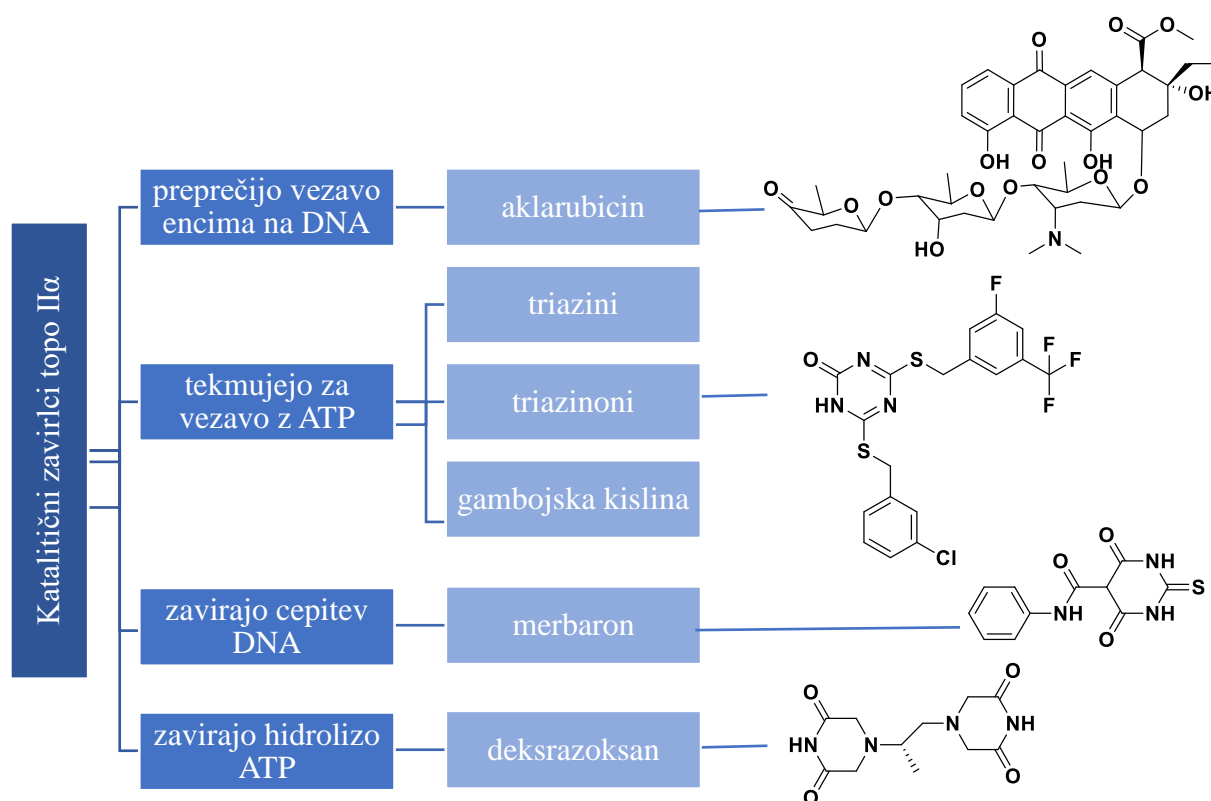
Topoizomerazne strupe razdelimo na kovalentne in nekovalentne strupe. Kovalentni strupi se kovalentno vežejo na encim in poškodujejo celice. Mednje spadajo kinonski metaboliti in biflavonoidi, na tržišču pa še ni učinkovin, ki bi delovale po opisanem mehanizmu. Pomembnejša skupina so nekovalentni strupi. Razdelimo jih na interkalatorje ter neinterkalirajoče spojine. Interkalatorji delujejo tako, da z vrivanjem med bazne pare DNA otežujejo religacijo, neinterkalirajoče spojine pa se vežejo na topoizomerazo in ovirajo njeno delovanje. Med najbolj znane interkalatorje spadata doksorubicin (prikazan na sliki 10) in daunorubicin ter njuni analogi: epirubicin, idarubicin in pirarubicin. Ena najbolj znanih neinterkalirajočih spojin pa je etopozid, ki je prav tako prikazan na sliki 10. Gre za polsintezni derivat podofilotoksina, ki se uporablja za zdravljenje širokega spektra rakavih obolenj. Indiciran je pri rakah pljuč, testisov, akutni mielocitni levkemiji, Hodgkinovem in ne-Hodgkinovem limfomu ter horiokarcinomu (24, 28-30).



Slika 10: Strukturi protirakavih učinkovin etopozida (levo) in doksorubicina (desno).

1.6.2. Katalitični zaviralci topoizomeraze II α

Katalitični zaviralci so novejša skupina zaviralcev DNA topoizomeraze II α , razvoj katerih se je razmahnil zaradi hudih neželenih učinkov topoizomeraznih strupov in sicer predvsem zaradi kardiotoksičnosti, pojava anemij ter tudi pojava sekundarnih tumorjev. Spojine, ki spadajo v to skupino, topoizomerazo II α zavirajo na eni izmed stopenj katalitičnega cikla, ki je prikazan na sliki 9. Znale so predvsem štiri skupine, ki lahko (1) preprečijo vezavo encima na DNA, (2) tekmujejo za vezavo z ATP, (3) zavirajo cepitev DNA ali (4) zavirajo hidrolizo ATP. Izbrani predstavniki teh skupin in njihove kemijske strukture so predstavljene na sliki 11 (24, 30).

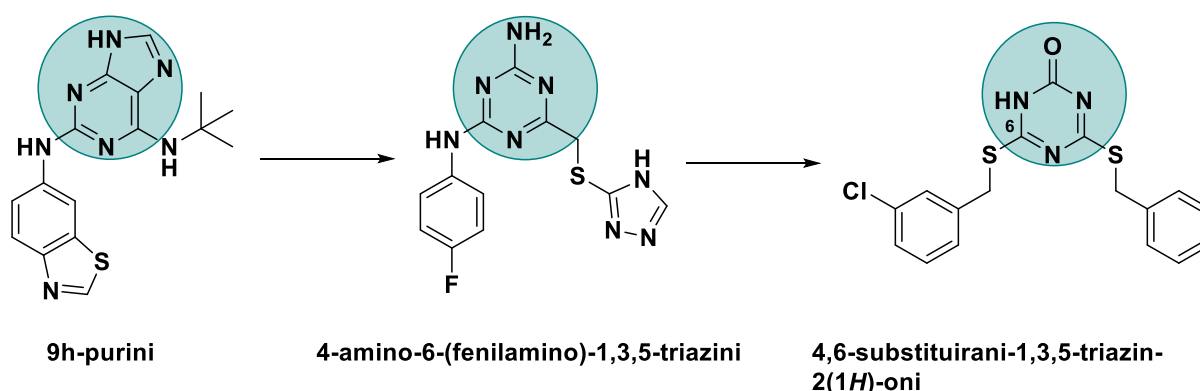


Slika 11: Skupine katalitičnih zaviralcev topo II α , izbrani predstavniki ter njihove kemijske strukture.

1.7. Razvoj monocikličnih zaviralcev topoizomeraze II α

Zaradi neželenih učinkov topoizomeraznih strupov, razvoj stremi k nadaljnjemu odkrivanju novih zaviralcev, ki naj bi imeli bolj specifično delovanje in manj neželenih učinkov.

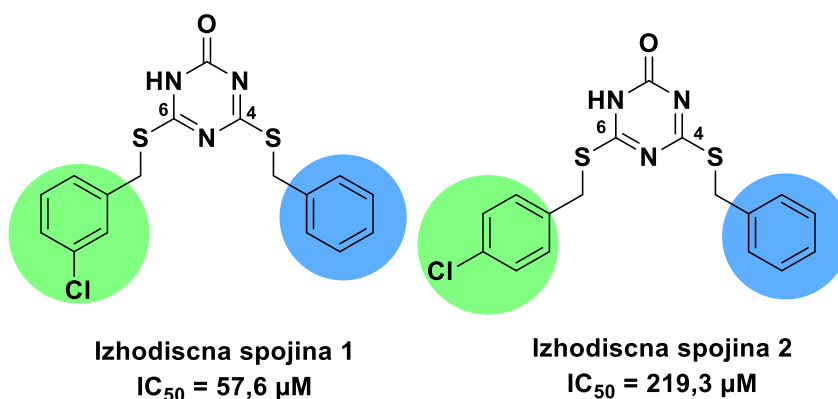
V predhodnih raziskavah so raziskovalci na Kemijskem Inštitutu v Ljubljani razvoj zaviralcev človeške topo II α pričeli izhajajoč iz 9*H*-purinskega razreda spojin, ki so jih razvili v raziskovalnih laboratorijih farmacevtske družbe Novartis in so dokazano katalitični zaviralci z vezavo v ATP-vezavno mesto topo II α (31). Na podlagi teh spojin so rekonstruirali njihov predpostavljen model vezave v ATP-vezavno mesto. Nato so s pomočjo programa LigandScout generirali farmakoforna modela na osnovi strukture tarče vezane z 9*H*-purini in tudi neodvisno na osnovi strukture ligandov tega razreda. Z obema farmakofornima modeloma so reševali interno knjižnico komercialno dostopnih spojin. Kot potencialne zaviralce, ki bi namesto bicikličnega mimetika adeninske interakcije vsebovali ustrezen monocikel, so s pomočjo *in vitro* testa relaksacijske encimske aktivnosti topo II α identificirali razred triazinov, ki niso izkazovali najboljših fizikalno kemijskih lastnosti, so pa bili selektivno toksični do človeške jetrne rakave celične linije HepG2 (32). Po optimizaciji farmakofornega modela in ponovnem reševanju spojin manjše usmerjene kemijske knjižnice so kot boljše potencialne zaviralce prepoznali 4,6-substituirane-1,3,5-triazin-2(1*H*)-one (33). Najobetavnejše so eksperimentalno ovrednotili z *in vitro* testom relaksacijske encimske aktivnosti topo II α , testi cepitve, ATPaznim testom in meritvami z mikrotermoforezo (MST). Glede na dostopne spojine so postavili tudi odnos med strukturo in delovanjem (SAR) substituentov mesta 6 glede na 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onski obroč. Kot najugodnejše so se izkazale spojine, ki so vsebovale na tem mestu fluoro ali kloro substituiran tiobenzilni fragment. Te spojine so imele tudi boljše zaviralne lastnosti kot izhodni triazini, primerljive z IC₅₀ vrednostmi topoizomernega strupa etopozida, zato so jih izbrali za nadaljnjo optimizacijo. Shematski prikaz razvoja katalitičnih zaviralcev topo II α je prikazan na sliki 12.



Slika 12: Shema razvoja monocikličnih zaviralcev človeške topo II α iz 9*H*-purinov.

2. Namen

Cilj magistrske naloge je optimizirati zaviralno aktivnost 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov kot monocikličnih katalitičnih zaviralcev topo II α . Kot izhodišče smo izbrali spojini, prikazani na sliki 13, ki sta plod predhodno izvedene študije SAR, pri kateri je šlo za spreminjanje substituentov na mestu 6 (33).



Slika 13: Izbrani spojini 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov za optimizacijo na mestu 4 z namenom izboljšanja interakcij s sladkornim in fosfatnim delom ATP žepa.

Na Kemijskem inštitutu v Ljubljani so po strukturi primerjavi predvidene vezave aktivnih spojin iz triazinonskega razreda v ATP-vezavno mesto glede na referenčni ligand AMP-PNP, prisotnen v kristalni strukturi človeške ATPazne domene, opazili, da umestitev nesubstituiranega fenilnega obroča na mestu 4 omogoča tvorbo še dodatnih interakcij v fosfatnem žepu in sladkornem delu vezavnega mesta za ATP. Tako so se odločili, da bo ostal levi del (mesto 6) triazinonske molekule, na sliki 13 označen z zeleno, nespremenjen in da bo predmet optimizacije le desni del molekule, ki je na sliki 13 označen z modro.

Na podlagi poznane sintezne poti za pripravo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov in komercialno dostopnih fragmentov so virtualno zgradili usmerjeno kemijsko knjižnico in spojine sidrali v vezavno mesto človeške topoizomeraze II α (34). Glede na najboljše dobljene sidrane vezavne poze z enako orientiranim obročnim delom in s potencialno novimi interakcijami v sladkornem in fosfatnem delu so izbrali 12 najobetavnejših substituentov za mesto 4, ki so tvorili ugodne interakcije ter so bili komercialno in cenovno dostopni. Proces načrtovanja in optimizacije spojin ter splošna formula načrtovanih spojin

1,3,5-Triazin-2(1*H*)-onski obroč bomo pripravili s kondenzacijo (3-klorobenzil oziroma 4-klorobenzil)izotiouronijevega bromida in etoksikarbonil izotiocianata. Na obročno mesto 4 obeh 1,3,5-triazinonov bomo nato pripeli različne substituentne, ki so na sliki 14 označeni z R₂. Tako bomo sintetizirali 24 spojin, katerih strukturo bomo eksperimentalno potrdili s pomočjo spektroskopskih metod, njihovo zaviralno delovanje pa bomo ovrednotili z uporabo *in vitro* testa topa IIa relaksacijske encimske aktivnosti.

Izbrali bomo tudi spojino z najboljšimi lastnostmi in jo dodatno ovrednotili s testom spodbujanja cepitve ter testom aktivnosti razpletanja ter izračunali njen vezavni model z metodo molekulskega sidranja. Tako bomo dobili dodatne podatke o zaviralni aktivnosti spojin ter o njihovem mehanizmu delovanja. Proučevali bomo tudi SAR dobljenih spojin in ovrednotili, katere interakcije so bolj oziroma manj ugodne za vezavo molekule v aktivno mesto.

3. Materiali in metode

3.1. Topila in reagenti

Pri delu smo uporabili topila in reagente različnih proizvajalcev: EvoBlocks, Sigma Aldrich, Fluorochem, Acros, Merck in Apollo Scientific.

3.2. Aparature in laboratorijska oprema

- Analizna tehtnica: Mettler Toledo PM400, Švica
- Precizna tehtnica: Mettler Toledo AG245, Švica
- Rotavapor: Büchi 461 Water Bath, Švica
- UV svetilka: Camag, Švica
- Magnetno mešalo: Ika RCT basic, Nemčija
- Pipete: Brand, Schott

3.3. Programska oprema

Kemijske strukture in reakcije smo narisali z računalniškim programom ChemDraw Professional 16.0, tridimenzionalne strukture pa s programom Chem 3D proizvajalca CambridgeSoft (35). S tem programom smo prav tako izračunali molekulske mase in vrednosti logP spojin ter jih poimenovali.

Za risanje grafov in analizo rezultatov testa relaksacijske encimske aktivnosti smo uporabili program GraphPad Prism 7 proizvajalca GraphPad Software (36). S tem programom smo izračunali tudi IC₅₀ vrednosti.

Aktivne molekule smo sidrali v ATP-vezavno mesto ATPazne domene topo II α s programom GOLD proizvajalca The Cambridge Crystallographic Data Centre (37). Primerjavo sidranih konformacij in vizualizacijo smo nato opravili s programom LigandScout proizvajalca Inte:Ligand (38).

3.4. Analizne metode

3.4.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)

Za TLC analizo smo uporabili Merckove kromatografske ploščice TLC Silica gel 60 F₂₅₄. Spojine smo detektirali s pomočjo UV svetilke pri valovni dolžini 254 nm.

3.4.2. Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H in ¹³C NMR spektre smo posneli na Fakulteti za farmacijo z Bruker Avance III 400 MHz spektrometrom pri 295 K. Kot topilo smo uporabili devteriran DMSO. Spektre smo analizirali s programom MestReC 4.9.9.9. podjetja Mestrelab Research (39). Kemijske premike smo zapisali v delih na milijon (angl. *parts per million*, ppm), sklopitvene konstante (J) pa v Hz. Sklopitve med protoni smo označili kot: s (singlet), br s (širok singlet), d (dublet), dd (dublet dubleta), ddd (dublet dubleta dubleta), t (triplet), dt (dublet tripleta), q (kvartet), sept (septet) in m (multiplet).

3.4.3. Masna spektroskopija visoke ločljivosti (HRMS)

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru z ionizacijo z razprševanjem elektronov (ESI) VG-Analytical AutoSpec Q (Micromass) v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.4.4. Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)

Čistoto spojin smo določali s sistemom HPLC Thermo Scientific DIONEX UltiMate 3000, uporabljali smo kolono XBridge C18 3,5 μm in dimenzij (4.6 mm × 150 mm). Mobilna faza je bila sestavljena iz topil voda/acetonitril/mravljična kislina v razmerju 990/10/1 (A) in acetonitril/voda/mravljična kislina v razmerju 990/10/1 (B), pri ločbi smo uporabili gradient: 80% (A) 20% (B) do 10% (A) 90% (B) v 25 minutah pri pretoku 1,0 mL/min. Injicirali smo po 10 μL raztopine vzorca raztopljenega v mešanici acetonitril/voda (1/1).

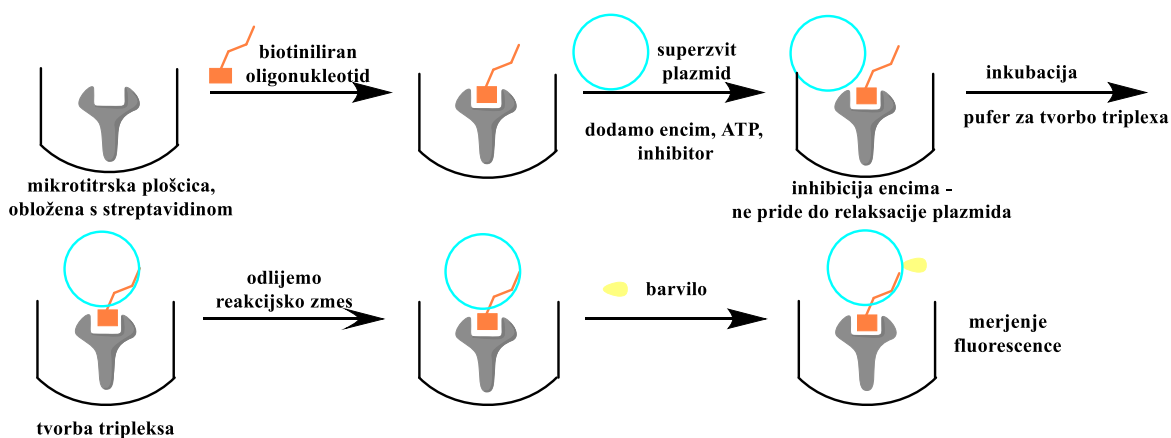
3.4.5. *In vitro* test topo II α relaksacijske encimske aktivnosti

Testni komplet smo kupili pri podjetju Inspiralis (Velika Britanija). Teste relaksacijske encimske aktivnosti smo izvedli na Kemijskem Inštitutu v Ljubljani po standardnem protokolu (40). Kot standard oz. pozitivno kontrolo smo uporabili znan zaviralec topo II α uveden v terapijo, tj. etopozid. Meritve smo izvedli pri štirih koncentracijah preiskovanih spojin: 500 μ M, 125 μ M, 31,3 μ M in 7,8 μ M. Test relaksacijske encimske aktivnosti temelji na tvorbi tripleksa med dodatno zvitim plazmidom, biotiniziranim oligonukleotidom in barvilom SybrGOLD, ki bolj fluorescira, če je vezano na plazmid (41).

Princip testa je prikazan na sliki 15. Na mikrotitrsko ploščico s streptavidinom imobiliziramo biotiniziran oligonukleotid. Nato dodamo reakcijsko zmes: zaviralec, ATP, dodatno zvit plazmid in encim. Po poteku zaviranja dodamo pufer TF (angl. *triplex forming*), ki ustavi reakcijo relaksacije in spodbudi tvorbo tripleksa. Po inkubaciji reakcijsko zmes odlijemo in speremo mikrotitrsko ploščico.

- Če smo dodali močnejši zaviralec, se plazmid v veliki meri ni relaksiral in tvoril se je tripleks. Zaznana fluorescenca je bila večja, ker se je barvilo vezalo na plazmid.
- Če smo dodali šibkejši zaviralec, se je nekaj plazmida relaksiralo in tripleks se ni tvoril v taki meri kot pri močnejših zaviralcih. Tako je bila zaznana fluorescenca manjša.

Z merjenjem fluorescence in grafično obdelavo podatkov smo izračunali IC₅₀ vrednosti za posamezno spojino.



Slika 15: Shematski prikaz testa topo II α relaksacijske encimske aktivnosti (41).

Izvedba testa topo II α relaksacijske encimske aktivnosti

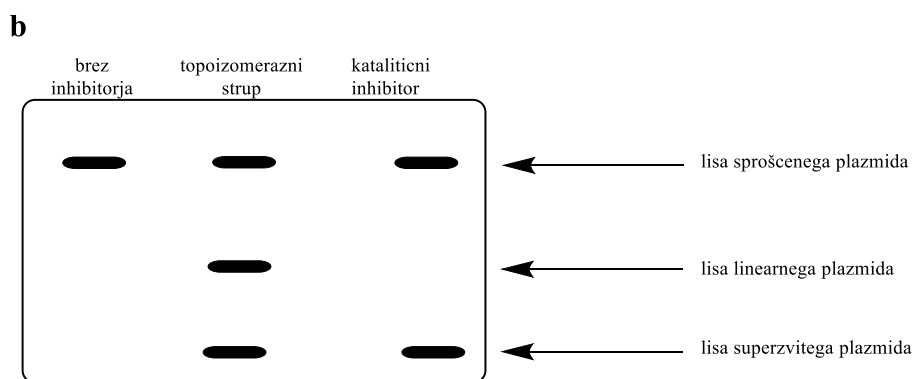
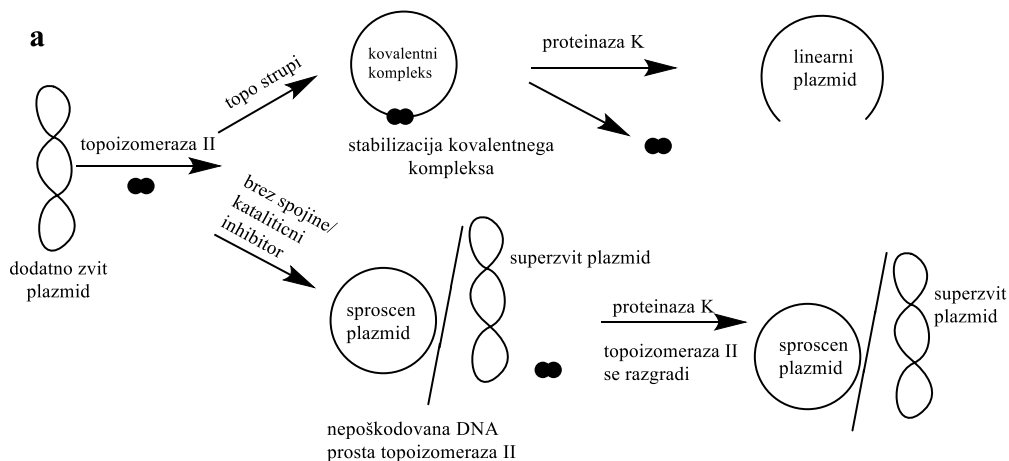
S streptavidinom obloženo ploščico smo najprej rehidrirali tako, da smo jo trikrat sprali z 200 μ L pufra za spiranje (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 137 mM NaCl, bis(trimetilsilil)acetamid (BSA) (0,01 % (w/v), Tween-20® 0,002 % (v/v)). Nato smo imobilizirali biotiniziran oligonukleotid (TFO1), tako da smo v vsako vdolbinico dali 100 μ L pufra za spiranje s 500 nM TFO1 in inkubirali pet minut pri sobni temperaturi. Vsebino smo nato odlili in trikrat sprali s pufrom za spiranje. Ostanke pufra smo odstranili s pipeto. V vsako jamico smo dodali 27 μ L vodne raztopine: 0,008 % Tween-20®, 1 mM ATP in 0,75 μ g dodatno zvitega plazmida pNO1. Dodali smo 0,3 μ L preiskovanega zaviralca, raztopljenega v 100 % DMSO. Nato smo dodali še ustrezno količino encima v 3 μ L pufra za redčenje (50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 50 % (v/v) glicerol, 50 μ g/mL albumin) ter inkubirali 30 minut pri 37 °C.

Po inkubaciji smo v vsako vdolbinico dodali 100 μ L pufra za tvorbo tripleksa (50 mM NaOAc (pH = 5.0), 50 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) ter ponovno inkubirali pri sobni temperaturi 30 minut. Nato smo vsebino jamic odlili in trikrat sprali s pufrom za tvorbo tripleksa.

Dodali smo 200 μ L barvila SybrGOLD v pufu T10 (10 mM Tris-HCl (pH = 8), 1 mM EDTA) ter inkubirali od 10 do 20 minut. Fluorescenco smo pomerili s fluorescenčnim čitalnikom (ekscitacija pri 495 nm in emisija pri 537 nm). Pred meritvijo smo vsebino jamic premešali s pipeto. Obvezno smo uporabljali samo visoko prečiščeno vodo (milli-q). Teste smo opravili na Kemijskem inštitutu v okviru tekočih raziskav doktorske disertacije mlade raziskovalke Kaje Bergant.

3.4.6. Test spodbujanja cepitve (human topoisomerase II α -mediated cleavage assay)

Test spodbujanja cepitve nam omogoča delitev spojin na topoizomerazne strupe in katalitične zaviralce. Kovalentni kompleks topo II α -DNA je zelo kratkoživ in komaj opazen. Ker je za topoizomerazne strupe značilno, da ta kompleks stabilizirajo, jih lahko na ta način ločimo od katalitičnih zaviralcev. Princip testa je prikazan na sliki 16a. V primeru delovanja molekule kot strup se poveča koncentracija linearne (precepljene) DNA, kar lahko spremljamo in kvantificiramo na elektroforeznem gelu. Tipičen razvoj gela za obe skupini spojin je prikazan na sliki 16b (41).



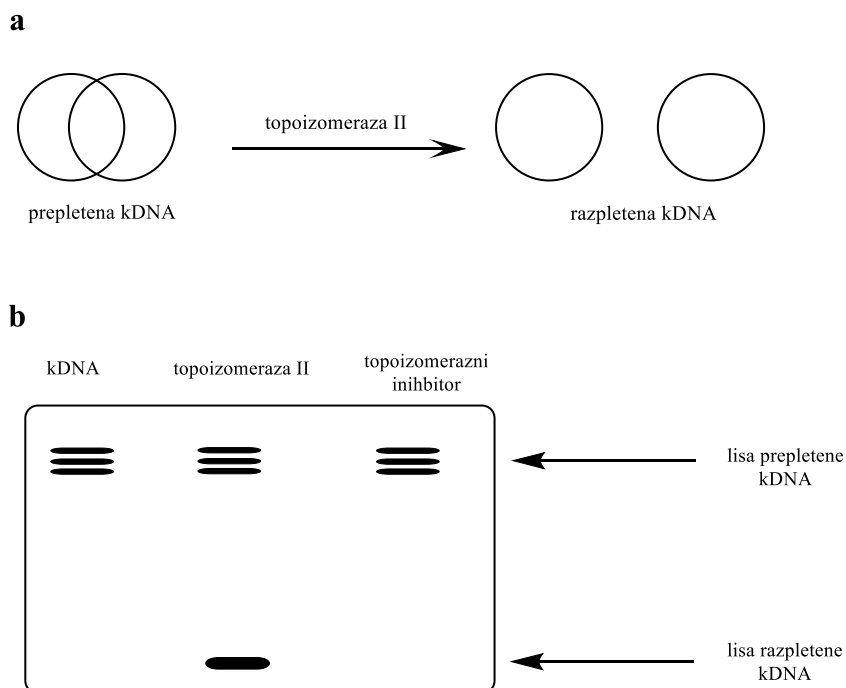
Slika 16: (a) princip testa spodbujanja cepitve. (b) razvoj gela pri topoizomeraznih strupih in katalitičnih zaviralcih (41).

Test so v dveh ponovitvah po protokolu izvedli v podjetju Inspiralis (40). Aktivnost zaviralca, pripravljenega v okviru te naloge, so izmerili pri štirih koncentracijah (500 μM , 125 μM , 31,5 μM , 3,9 μM), kot standard so uporabili etopozid. Izvedli so pozitivno (+, encim brez zaviralca) in negativno (-, brez encima) kontrolo ter preverjen zaviralni učinek DMSO.

3.4.7. Test aktivnosti razpletanja človeške topo II α (human topo II α -mediated decatenation assay)

Test aktivnosti razpletanja topo II α uporabljamo za določevanje ali spojine zavirajo encim in s tem preprečujejo razpletanje zvite DNA. Test predstavlja bolj realno situacijo za oceno delovanja zaviralca kot relaksacijski test, saj lahko neposredno spremljamo vpliv na topološke spremembe DNA.

Kot substrat pri tem testu uporabljamo kinetoplastno DNA (kDNA), katere mreža je sestavljena iz malih krožnih DNA (velikosti 2,5 kb) in velikih krožnih DNA (velikost 37 kb) (40, 41). Če je topo II α prisotna, razplete kDNA, kar je na gelu vidno kot lisa, ki potuje navzdol. Če pa je encim zavrt, je kDNA prevelika in ne more potovati po gelu, zato ostane na začetku. Princip reakcije in tipičen razvoj gela sta prikazana na sliki 17.



Slika 17: (a) princip testa razpletanja. (b) tipičen razvoj gela (41).

Test so v dveh ponovitvah po protokolu izvedli v podjetju Inspiralis (40). Aktivnost zaviralca, pripravljenega v okviru te naloge, so izmerili pri štirih koncentracijah (500 μ M, 125 μ M, 31,5 μ M, 3,9 μ M), kot standard so uporabili etopozid. Izvedli so tudi pozitivno (+, encim brez zaviralca) in negativno (-, brez encima) kontrolo.

3.4.8. Molekulsko sidranje spojine **9** v vezavno mesto za ATP človeške topo II α

Stopnje načrtovanja spojin ter eksperiment molekulskega sidranja so izvedli na Kemijskem inštitutu v okviru raziskav doktorske disertacije mlade raziskovalke Kaje Bergant. S programom Chem 3D smo najprej narisali tridimenzionalno strukturo liganda **9** in jo minimizirali z uporabo polja sil MMF94. Za izračun konformacij molekul v aktivnem mestu tarče z metodo molekulskega sidranja smo uporabili program GOLD (37). Najprej

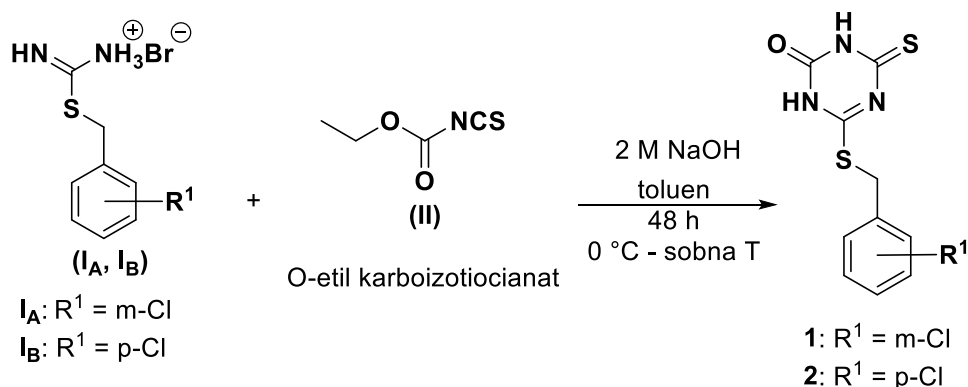
smo za validacijo reproducirali vezavno pozo ko-kristaliziranega referenčnega liganda AMP-PNP v vezavnem mestu za ATP. Uporabili smo le 1 protomer (veriga A) tarčne strukture človeške topo II α , pridobljeno iz PDB (oznaka 1ZXM), odstranili Mg²⁺ ion in vse vode razen za vezavo pomembni vodi W931 in W924, ter proteinu dodali vodikove atome s privzetimi nastavitvami. Dodali smo omejitev o tvorbi vodikove vezi med ligandom in karbonilnim kisikom Asn120. Aktivno mesto smo definirali kot kroglo premera 10 Å okoli referenčnega liganda (x = 35,7113; y = 0,452; z = 40,0306). Za nastavitev protonacijskega vzorca smo uporabili privzete nastavitve. Tudi sledeče nastavitve genetskega algoritma v programu GOLD so bile privzete: populacija = 100, selekcijski pritisk = 1,1, število operacij = 100 000, število otokov = 5, velikost niše = 2, migracija = 10, mutacija = 95, Crossover = 95). Najprej smo za validacijo reproducirali vezavno pozo ko-kristaliziranega referenčnega liganda AMP-PNP v vezavnem mestu za ATP. Dobljena RMSD vrednost med sidrano in eksperimentalno pozo AMP-PNP je bila 0.68 Å, kar nakazuje dobro sposobnost programa, da pravilno napove vezavne poze. Potem pa smo sidrali pri identičnih nastavitvah še sintetizirano spojino **9**. Izračunali smo 10 vezavnih poz v ATP vezavnem mestu topo II α in jih kasneje vizualizirali ter primerjali konformacije v programu LigandScout (38). Za oceno vezave liganda **9** smo uporabili cenilno funkcijo GoldScore, saj je izkazala najboljšo primerljivost med sidrano in kristalizirano pozo.

4. Eksperimentalno delo

4.1. Sinteza

4.1.1. Sintezi 6-((3-klorobenzil)tio)-4-tiokso-3,4-dihidro-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**1**) in 6-((4-klorobenzil)tio)-4-tiokso-3,4-dihidro-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**2**)

Splošna shema in splošen postopek sinteze spojin **1** in **2**:



V 100 mL bučko smo natehtali spojino **I_A** ali **I_B** (845 mg, 3 mmol, 1 ekv). Dodali smo vodo (9 mL) in toluen (15 mL) ter raztopino mešali pri 0 °C. Nato smo izmenično dodajali NaOH (2 M, 12 mL) ter raztopino spojine **II** (496 μL, 551 mg, 4,2 mmol, 1,4 ekv) v toluenu (6 mL). Raztopina se je obarvala rahlo rumeno. Po 15 minutah smo dodali NaOH (2 M, 6 mL). Raztopino smo nato mešali pri sobni temperaturi 48 h (za sintezo spojine **1**) ali 24 h (za sintezo spojine **2**). Organsko in vodno fazo smo ločili z lijem ločnikom, vodno fazo pa previdno pri 0 °C nakisali do pH = 1 s koncentrirano H₂SO₄. Belo-rumeno oborino, ki je nastala, smo odfiltrirali z odsesavanjem. Identiteti produktov **1** in **2** smo potrdili s tankoplastno kromatografijo (TLC), ¹H-NMR ter masno (HRMS) spektroskopijo. Spojino **2** smo dodatno očistili s prekrizalizacijo iz CH₃CN (35 mL).

Lastnosti spojine **1**:

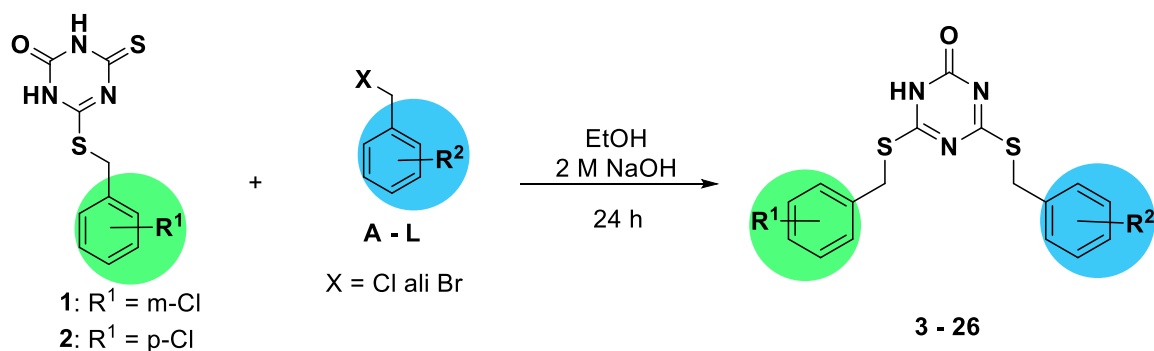
Masa produkta	857 mg
Izkoristek	85 %
Izgled	Rumena amorfna snov
Rf	0,075 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.38 (s, 2H, SCH ₂), 7.32-7.42 (m, 3H, Ar-H), 7.50-7.54 (m, 1H, Ar-H), 12.57 (s, 1H, CONH), 13.70 (br s, 1H, CONH)
HRMS (ESI) za C ₁₀ H ₉ N ₃ OS ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 285,9876 Dobljena: 285,9881

Lastnosti spojine **2**:

Masa produkta	326 mg
Izkoristek	38 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,053 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 7.36-7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.42-7.48 (m, 2H, Ar-H), 12.57 (s, 1H, CONH), 13.68 (br s, 1H, CONH)
HRMS (ESI) za C ₁₀ H ₉ N ₃ OS ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 285,9876 Dobljena: 285,9881

4.1.2. Sinteze 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov (3-26)

Splošna shema in splošen postopek za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov:



A		G	
B		H	
C		I	
D		J	
E		K	
F		L	

Spojina	R ¹	R ²	Spojina	R ¹	R ²
3	m-Cl	3,5-OMe	15	p-Cl	3,5-OMe
4	m-Cl	4-CH(CH ₃) ₂	16	p-Cl	4-CH(CH ₃) ₂
5	m-Cl	3,4-	17	p-Cl	3,4-
6	m-Cl	3-CONH ₂	18	p-Cl	3-CONH ₂
7	m-Cl	2,6-F	19	p-Cl	2,6-F
8	m-Cl	3-COOH	20	p-Cl	3-COOH
9	m-Cl	3-CF ₃ , 5-F	21	p-Cl	3-CF ₃ , 5-F
10	m-Cl	2,4,5-F	22	p-Cl	2,4,5-F
11	m-Cl	4-CH(CH ₃)(COOH)	23	p-Cl	4-CH(CH ₃)(COOH)
12	m-Cl	4-CH ₂ OH	24	p-Cl	4-CH ₂ OH
13	m-Cl	3-OH	25	p-Cl	3-OH
14	m-Cl	4-CF ₃	26	p-Cl	4-CF ₃

V 25 mL bučko smo natehtali spojino 1 ali 2 (1 ekv), dodali etanol (3 mL) in NaOH (2 M, 2 mL). Med mešanjem smo dodali še ustrezno količino spojino A – L (1,1 ekv). Po 24 h smo v raztopino dodali vodo (2,5 mL) in koncentrirano H₂SO₄ dokler ni bila dosežena vrednost pH 1. Dobljen produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem in ga ustrezno očistili.

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((3,5-dimetoksibenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (3)

Spojino **3** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (100 mg, 0,350 mmol, 1 ekv) in spojine **A** (71,8 mg, 0,385 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekrizalizacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine **3**:

Masa produkta	49 mg
Izkoristek	42 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,37 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 3.71 (s, 6H, 2 × OCH ₃), 4.28 (s, 2H, SCH ₂), 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 6.39 (dd, J ₁ = 2.4 Hz, J ₂ = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.58 (d, J = 2.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.31-7.39 (m, 3H, Ar-H), 7.48-7.50 (m, 1H, Ar-H), 13.03 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 436,0553 Dobljena: 436,0553
Čistost s HPLC	98.78 % (t _R = 15,987 min)

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((4-izopropilbenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (4)

Spojino **4** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **B** (41,02 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **4**:

Masa produkta	44 mg
Izkoristek	60 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,32 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1.17 (d, J = 7.0 Hz, 6H, Ar-CH(CH ₃) ₂), 2.80-2.91 (sept, J = 7.0 Hz, 1H, Ar-CH(CH ₃) ₂), 4.33 (s, 2H, SCH ₂), 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 7.16-7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.28-7.39 (m, 5H, Ar-H), 7.48-7.50 (m, 1H, Ar-H), 11.17 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₃ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 418,0815 Dobljena: 418,0808
Čistost s HPLC	97,85 % (t _R = 20,713 min)

Sinteza 4-((benzo[c][1,2,5]oksadiazol-5-ilmetil)tio)-6-((3-klorobenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (5)

Spojino **5** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **C** (41 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekristalizacijo iz CH₃CN (10 mL).

Lastnosti spojine **5**:

Masa produkta	35 mg
Izkoristek	48 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,25 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 4.50 (s, 2H, SCH ₂), 7.28-7.37 (m, 3H, Ar-H), 7.45-7.48 (m, 1H, Ar-H), 7.62 (dd, J ₁ = 9.3 Hz, J ₂ = 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.98-8.00 (m, 1H, Ar-H), 8.02 (dd, J ₁ = 9.3 Hz, J ₂ = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₃ N ₅ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 418,0199 Dobljena: 418,0192
Čistost s HPLC	98,84 % (t _R = 15,420 min)

Sinteza 3-(((6-((3-klorobenzil)tio)-4-okso-4,5-dihidro-1,3,5-triazin-2-il)tio)metil)benzamida (6)

Spojino **6** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **D** (32,7 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekristalizacijo iz CH₃CN (25 mL).

Lastnosti spojine **6**:

Masa produkta	8 mg
Izkoristek	11 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,40 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 5/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 4.41 (s, 2H, SCH ₂), 7.30-7.43 (m, 5H, Ar-H and CONH ₂), 7.47-7.50 (m, 1H, Ar-H), 7.52-7.56 (m, 1H, Ar-H), 7.76 (dt, J ₁ = 7.7 Hz, J ₂ = 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.90 (t, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.97 (br s, 1H, CONH ₂), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 419,0403 Dobljena: 419,0399
Čistost s HPLC	85,24 % (t _R = 10,357 min)

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((2,6-difluorobenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**7**)

Spojino **7** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **E** (39,9 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **7**:

Masa produkta	41 mg
Izkoristek	57 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,31 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.38 (s, 2H, SCH ₂), 4.43 (s, 2H, SCH ₂), 7.09-7.18 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.48 (m, 4H, Ar-H), 7.49-7.51 (m, 1H, Ar-H), 13.10 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₃ N ₃ OF ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 412,0157 Dobljena: 412,0151
Čistost s HPLC	98,39 % (t _R = 17,710 min)

Sinteza 4-(((6-((3-klorobenzil)tio)-4-okso-4,5-dihidro-1,3,5-triazin-2-il)tio)metil)benzojske kisline (**8**)

Spojino **8** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **F** (32,7 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekrizalzacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine **8**:

Masa produkta	31 mg
Izkoristek	42 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,22 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/AcOH = 15/1/0,1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 4.43 (s, 2H, SCH ₂), 7.30-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.45 (dd, J ₁ = 7.7 Hz, J ₂ = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.47-7.49 (m, 1H, Ar-H), 7.62-7.67 (m, 1H, Ar-H), 7.83 (dt, J ₁ = 7.8 Hz, J ₂ = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.98-8.00 (m, 1H, Ar-H), 13.03 (br s, 2H, COOH and NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₃ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 420,0243 Dobljena: 420,0242
Čistost s HPLC	98,18 % (t _R = 12,163 min)

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((3-fluoro-5-(trifluorometil)benzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**9**)

Spojino **9** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **G** (49,4 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **9**:

Masa produkta	61 mg
Izkoristek	76 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,25 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.35 (s, 2H, SCH ₂), 4.44 (s, 2H, SCH ₂), 7.29-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.46-7.48 (m, 1H, Ar-H), 7.55-7.63 (m, 2H, Ar-H), 7.66-7.69 (m, 1H, Ar-H), resonanca za NHCO manjka
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 32.46, 32.76, 111.70 (dq, ² J _{F,C} = 24.9 Hz, ³ J _{F,C} = 3.7 Hz), 120.15 (d, ² J _{F,C} = 22.0 Hz), 122.0 (q, ³ J _{F,C} = 3.7 Hz), 123.20 (qd, ¹ J _{F,C} = 272.2 Hz, ⁴ J _{F,C} = 2.2 Hz), 127.26, 127.62, 128.78, 132.85, 130.78 (qd, ² J _{F,C} = 32.3 Hz, ³ J _{F,C} = 8.8 Hz), 130.32, 139.48, 142.07 (d, ³ J _{F,C} = 5.9 Hz), 148.81, 153.04, 161.75 (d, ¹ J _{F,C} = 247.2 Hz), 172.74
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₃ N ₃ OS ₂ ClF ₄ [M+H] ⁺	Izračunana: 462,0125 Dobljena: 462,0127
Čistost s HPLC	96,17 % (t _R = 18,823 min)

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((2,4,5-trifluorobenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**10**)

Spojino **10** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **H** (43,2 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **10**:

Masa produkta	44 mg
Izkoristek	59 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,23 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.33 (s, 2H, SCH ₂), 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 7.30-7.39 (m, 3H, Ar-H), 7.47-7.49 (m, 1H, Ar-H), 7.52-7.64 (m, 2H, Ar-H), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₂ N ₃ OS ₂ ClF ₃ [M+H] ⁺	Izračunana: 430,0062 Dobljena: 430,0060
Čistost s HPLC	98,20 % (t _R = 17,423 min)

Sinteza 2-(4-(((6-(3-klorobenzil)tio)-4-okso-4,5-dihidro-1,3,5-triazin-2-il)tio)metil)fenil)propanojske kisline (**11**)

Spojino **11** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (100 mg, 0,345 mmol, 1 ekv) in spojine **I** (93,4 mg, 0,384 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Za stacionarno fazo smo uporabili Silica Gel 20 z velikostjo delcev od 0,040 do 0,063, proizvajalca Merck. Kot mobilno fazo smo uporabili CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 20/1/0,1.

Lastnosti spojine **11**:

Masa produkta	57 mg
Izkoristek	36 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,20 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/AcOH, 15/1/0,1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1.33 (d, J = 7.2 Hz, 3H, Ar-(CH)CH ₃), 3.65 (q, J = 7.2 Hz, 3H, Ar-(CH)CH ₃), 4.34 (s, 2H, SCH ₂), 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 7.20-7.26 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.39 (m, 5H, Ar-H), 7.48-7.51 (m, 1H, Ar-H), 12.33 (br s, 2H, COOH and NHCO)
HRMS (ESI) za C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃ S ₂ Cl [M-H] ⁻	Izračunana: 446,0400 Dobljena: 446,0403
Čistost s HPLC	55,25 % (t _R = 13,357 min)

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((4-hidroksimetil)benzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (12)

Spojino **12** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **J** (30,1 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **12**:

Masa produkta	53 mg
Izkoristek	75 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,20 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.35 (s, 2H, SCH ₂), 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 4.46 (s, 2H, Ar-CH ₂ OH), 7.21-7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.39 (m, 5H, Ar-H), 7.48-7.50 (m, 1H, Ar-H), 11.17 (br s, 1H, CH ₂ OH), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 406,0451 Dobljena: 406,0441
Čistost s HPLC	88,83 % (t _R = 11,757 min)

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((3-hidroksibenil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (13)

Spojino **13** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **K** (27,4 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekrizalizacijo iz CH₃CN (10 mL).

Lastnosti spojine **13**:

Masa produkta	24 mg
Izkoristek	35 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,30 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.28 (s, 2H, SCH ₂), 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 6.66 (ddd, J ₁ = 8.0 Hz, J ₂ = 2.4 Hz, J ₃ = 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 6.77-6.81 (m, 2H, Ar-H), 7.02-7.13 (m, 1H, Ar-H), 7.31-7.39 (m, 3H, Ar-H), 7.48-7.50 (m, 1H, Ar-H), 9.47 (br s, 1H, Ar-OH), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 392,0294 Dobljena: 392,0295
Čistost s HPLC	95,16 % (t _R = 13,043 min)

Sinteza 6-((3-klorobenzil)tio)-4-((4-(trifluorometil)benzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (14)

Spojino **14** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **1** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **L** (45,9 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **14**:

Masa produkta	58 mg
Izkoristek	75 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,39 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 4.44 (s, 2H, SCH ₂), 7.30-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.46-7.49 (m, 1H, Ar-H), 7.59-7.64 (m, 2H, Ar-H), 7.65-7.70 (m, 2H, Ar-H), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₄ N ₃ OS ₂ ClF ₃ [M+H] ⁺	Izračunana: 444,0219 Dobljena: 444,0226
Čistost s HPLC	97,75 % (t _R = 18,620 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((3,5-dimetoksibenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (15)

Spojino **15** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **A** (35,8 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekrizalizacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine **15**:

Masa produkta	17 mg
Izkoristek	22 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,35 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 3.71 (s, 6H, 2 × OCH ₃), 4.28 (s, 2H, SCH ₂), 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 6.39 (dd, J ₁ = 2.4 Hz, J ₂ = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.57 (d, J = 2.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.36-7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.40-7.44 (m, 2H, Ar-H), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 436,0556 Dobljena: 436,0558
Čistost s HPLC	98,89 % (t _R = 16,530 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((4-izopropilbenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**16**)

Spojino **16** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **B** (41 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **16**:

Masa produkta	50 mg
Izkoristek	68 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,25 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1.17 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H, Ar-CH(CH ₃) ₂), 2.85 (sept, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H, Ar-CH(CH ₃) ₂), 4.33 (s, 2H, SCH ₂), 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 7.16-7.21 (m, 2H, Ar-H), 7.27-7.31 (m, 2H, Ar-H), 7.35-7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.40-7.44 (m, 2H, Ar-H), 13.02 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₂₀ H ₂₁ N ₃ OS ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 418,0815 Dobljena: 418,0821
Čistost s HPLC	97,87 % (t _R = 20,987 min)

Sinteza 4-((benzo[c][1,2,5]oksadiazol-5-ilmetil)tio)-6-((4-klorobenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**17**)

Spojino **17** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **C** (41 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekrizalzacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine **17**:

Masa produkta	13 mg
Izkoristek	18 %
Izgled	Bela kristlinična snov
Rf	0,32 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.35 (s, 2H, SCH ₂), 4.49 (s, 2H, SCH ₂), 7.32-7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.37-7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.61 (dd, <i>J</i> ₁ = 9.4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.97-8.00 (m, 1H, Ar-H), 8.02 (dd, <i>J</i> ₁ = 9.3 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 13.13 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₃ N ₅ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 418,0199 Dobljena: 418,0192
Čistost s HPLC	96,18 % (t _R = 15,643 min)

Sinteza 3-(((6-((4-klorobenzil)tio)-4-okso-4,5-dihidro-1,3,5-triazin-2-il)tio)metil)benzamida (18)

Spojino **18** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (200 mg, 0,700 mmol, 1 ekv) in spojine **D** (130,6 mg, 0,770 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili z zaporednim raztapljanjem v etanolu (20 mL), metanolu (20 mL) in acetonu (30 mL), ki mu je vsakič sledila filtracija.

Lastnosti spojine **18**:

Masa produkta	48 mg
Izkoristek	16 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,41 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 4.41 (s, 2H, SCH ₂), 7.35-7.45 (m, 6H, Ar-H and CONH ₂), 7.53 (dt, J ₁ = 7.8 Hz, J ₂ = 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.76 (dt, J ₁ = 7.9 Hz, J ₂ = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.90 (t, J = 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.97 (br s, 1H, CONH ₂), 13.03 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 419,0403 Dobljena: 419,0414
Čistost s HPLC	75,32 % (t _R = 10,630 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((2,6-difluorobenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (19)

Spojino **19** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **E** (40 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekrizalizacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine **19**:

Masa produkta	17 mg
Izkoristek	24 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,40 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.37 (s, 2H, SCH ₂), 4.43 (s, 2H, SCH ₂), 7.10-7.18 (m, 2H, Ar-H), 7.36-7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.41-7.48 (m, 3H, Ar-H), 13.09 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₃ N ₃ OS ₂ ClF ₂ [M+H] ⁺	Izračunana: 412,0157 Dobljena: 412,0162
Čistost s HPLC	99,44 % (t _R = 17,060 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-okso-4,5-dihidro-1,3,5-triazin-2-il)tio)metil benzojske kisline (20)

Spojino 20 smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine 2 (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine F (33 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekristalizacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine 20:

Masa produkta	14 mg
Izkoristek	19 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,24 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/AcOH = 15/1/0,1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 4.43 (s, 2H, SCH ₂), 7.35-7.47 (m, 5H, Ar-H), 7.64 (dt, J ₁ = 7.8 Hz, J ₂ = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.83 (dt, J ₁ = 7.8 Hz, J ₂ = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.97-8.00 (m, 1H, Ar-H), 13.03 (br s, 2H, COOH and NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₃ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 420,0243 Dobljena: 420,0242
Čistost s HPLC	99,46 % (t _R = 12,447 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((3-fluoro-5-(trifluorometil)benzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (21)

Spojino 21 smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine 2 (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine G (49,4 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v *n*-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine 21:

Masa produkta	49 mg
Izkoristek	61 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,28 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.34 (s, 2H, SCH ₂), 4.44 (s, 2H, SCH ₂), 7.34-7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.55-7.62 (m, 2H, Ar-H), 7.66-7.69 (m, 1H, Ar-H), 13.07 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₃ N ₃ OS ₂ ClF ₄ [M+H] ⁺	Izračunana: 462,0125 Dobljena: 462,0138
Čistost s HPLC	97,67 % (t _R = 19,080 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((2,4,5-trifluorobenzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (**22**)

Spojino **22** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **H** (43,2 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekristalizacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine **22**:

Masa produkta	32 mg
Izkoristek	43 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,37 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.33 (s, 2H, SCH ₂), 4.35 (s, 2H, SCH ₂), 7.35-7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.40-7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.52-7.64 (m, 2H, Ar-H), 13.08 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₂ N ₃ OS ₂ ClF ₃ [M+H] ⁺	Izračunana: 430,0062 Dobljena: 430,0062
Čistost s HPLC	97,63 % (t _R = 17,703 min)

Sinteza 2-(4-(((6-((4-klorobenzil)tio)-4-okso-4,5-dihidro-1,3,5-triazin-2-il)tio)metil)fenil)propanojske kisline (**23**)

Spojino **23** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **I** (46,7 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s prekristalizacijo iz CH₃CN (5 mL).

Lastnosti spojine **23**:

Masa produkta	20 mg
Izkoristek	26 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Rf	0,22 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/AcOH = 15/1/0,1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1.33 (d, J = 7.1 Hz, 3H, Ar-(CH)CH ₃), 3.65 (q, J = 7.1 Hz, 1H, Ar-(CH)CH ₃), 4.33 (s, 2H, SCH ₂), 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 7.20-7.25 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.40 (m, 4H, Ar-H), 7.41-7.45 (m, 2H, Ar-H), 12.34 (br s, 1H, COOH), 13.00 (br s, 1H, NHCO)
HRMS (ESI) za C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 448,0556 Dobljena: 448,0550
Čistost s HPLC	98,27 % (t _R = 13,627 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((4-hidroksimetil)benzil)tio-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (24)

Spojino **24** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **J** (30,1 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v n-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **24**:

Masa produkta	43 mg
Izkoristek	61 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,23 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.34 (s, 2H, SCH ₂), 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 4.46 (s, 2H, Ar-CH ₂ OH), 7.23-7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.35 (m, 2H, Ar-H), 7.35-7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.40-7.45 (m, 2H, Ar-H), resonanci za OH in NHCO manjkata
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 406,0451 Dobljena: 406,0454
Čistost s HPLC	97,33 % (t _R = 12,027 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((3-hidroksibenil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (25)

Spojino **25** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **K** (27,4 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v n-heksanu (30 mL) in filtracijo.

Lastnosti spojine **25**:

Masa produkta	37 mg
Izkoristek	54 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,45 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.28 (s, 2H, SCH ₂), 4.36 (s, 2H, SCH ₂), 6.66 (ddd, J ₁ = 8.0 Hz, J ₂ = 2.4 Hz, J ₃ = 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 6.76-6.81 (m, 2H, Ar-H), 7.07-7.13 (m, 1H, Ar-H), 7.35-7.45 (m, 4H, Ar-H), 9.46 (br s, 1H, Ar-OH), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₂ S ₂ Cl [M+H] ⁺	Izračunana: 392,0294 Dobljena: 392,0302
Čistost s HPLC	76,77 % (t _R = 13,280 min)

Sinteza 6-((4-klorobenzil)tio)-4-((4-(trifluorometil)benzil)tio)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona (26)

Spojino **26** smo sintetizirali po *splošnem postopku za sintezo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov* iz spojine **2** (50 mg, 0,175 mmol, 1 ekv) in spojine **L** (45,9 mg, 0,192 mmol, 1,1 ekv). Dobljen produkt smo očistili s suspendiranjem v n-heksanu (30 mL) in filtracijo.

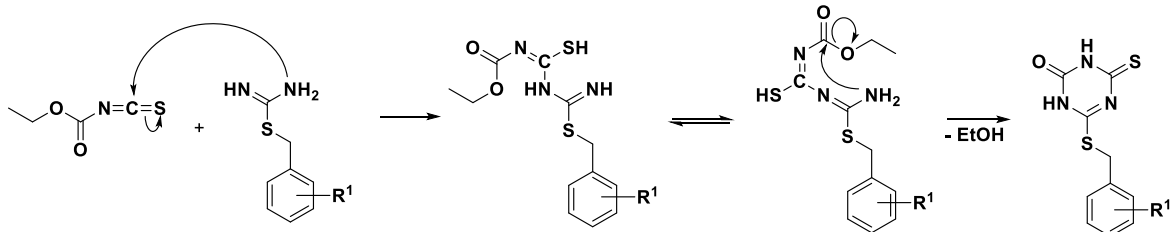
Lastnosti spojine **26**:

Masa produkta	34 mg
Izkoristek	44 %
Izgled	Bela amorfna snov
Rf	0,45 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 15/1)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 4.35 (s, 2H, SCH ₂), 4.44 (s, 2H, SCH ₂), 7.34-7.38 (m, 2H, Ar-H), 7.38-43 (m, 2H, Ar-H), 7.59-7.63 (m, 2H, Ar-H), 7.66-7.70 (m, 2H, Ar-H), resonanca za NHCO manjka
HRMS (ESI) za C ₁₈ H ₁₄ N ₃ OS ₂ ClF ₃ [M+H] ⁺	Izračunana: 444,0219 Dobljena: 444,0217
Čistost s HPLC	95,03 % (t _R = 18,803 min)

5. Rezultati in razprava

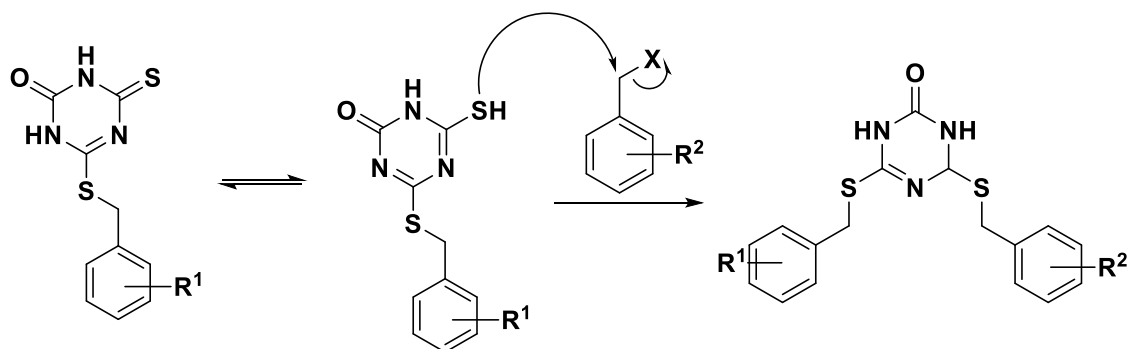
5.1. Komentar uporabljenih sinteznih postopkov

1.del: Tvorba 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onskega obroča



1,3,5-Triazin-2(1*H*)-onski obroč smo sintetizirali s kondenzacijo (3-klorobenzil oziroma 4-klorobenzil)izotiouronijevega bromida in etoksikarbonil izotiocianata ob prisotnosti 2 M vodne raztopine NaOH in toluena (42). Gre za intermolekularno kondenzacijo, pri čemer se omenjeni molekuli združita, pri tem pa se eliminira molekula etanola. Sinteza je v obeh primerih potekala dobro, imeli smo tudi dobre izkoristke. V kolikor spojini nismo dodatno čistili s prekristalizacijo, je bil izkoristek reakcije 85 %, če pa smo jo, pa je bil izkoristek primerno nižji, in sicer 38 %. Za izboljšanje izkoristka prekristalizacije bi bilo potrebno optimizirati tako količino uporabljenega topila (acetonitril) kot tudi preizkusiti druga topila oziroma kombinacije topil. Za nadaljnjo sintezo naših spojini izhodnih spojini **1** in **2** nismo potrebovali dodatno čistiti, z izjemo sinteze spojine **18**. Ključni del uspešne sinteze je bil zadosten čas poteka reakcije, ki je moral biti vsaj 24 ur. V tem času sta reagenti zreagirala v želen produkt.

2.del: Nukleofilna substitucija



Po tvorbi obroča smo na nastali 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onski obroč z nukleofilno substitucijo na mesto 4 pripenjali različne substituentne. Reakcije so potekale ob prisotnosti baze (NaOH), ki poveča nukleofilnost SH skupine, ki je tako pretežno v ionizirani obliki S⁻.

Večina sintez je potekala dobro in dobili smo čiste produkte, čas poteka reakcije pa je bil 24 ur. Izkoristki reakcij so bili precej odvisni od načina izolacije spojin. V kolikor smo spojine čistili s prekrystalizacijo, so bili izkoristki nižji (približno 30 %), v kolikor pa smo se poslužili postopka suspendiranja v *n*-heksanu pa so bili višji (približno 60 %). To je bilo razumljivo, saj je imel postopek prekrystalizacije več korakov (raztapljanje v topilu, segrevanje na oljni kopeli, ohlajanje in izpadanje produkta, vakuumaska filtracija) in so bile možnosti izgube na več možnih stopnjah. Pri sintezi spojine **11** in **18** pa smo imeli več težav pri izolaciji čistih spojin. Pri spojini **11** smo zaradi neuspešnega izobarjanja ali prekrystalizacije dovolj čist produkt dobili z uporabo kolonske kromatografije. Izkoristek reakcije je bil sicer med nižjimi (36 %), vendar smo dobili zadostno količino končnega produkta za nadaljnje delo.

Pri sintezi spojine **18** pa so težave poleg čiščenja nastopile tudi pri sintezi, zato smo morali reakcijski čas iz 24 ur podaljšati na 72 ur. Tudi poskus dodajanja kalijevega jodida v reakcijsko zmes (le-ta namreč *in situ* pretvori alkil halide v ustrezne alkil jodide, ki so po naravi bolj elektrofilni) ni doprinesel k višjemu izkoristku reakcije. Pri izolaciji smo se poslužili postopka, pri katerem smo surovo suspenzijo po končani reakciji (in odparevanju reakcijskega topila) zaporedno segreli do vrenja v acetonu, etanolu in metanolu ter pri vsakem takem koraku uporabili le matičnico po filtriranju. Razlogi za slab potek reakcije in težave pri izolaciji po vsej verjetnosti ležijo v zelo omejeni topnosti karboksamidne izhodne spojine ter produkta v različnih topilih.

5.2. Biološko testiranje in odnos med strukturo in delovanjem sintetiziranih 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov

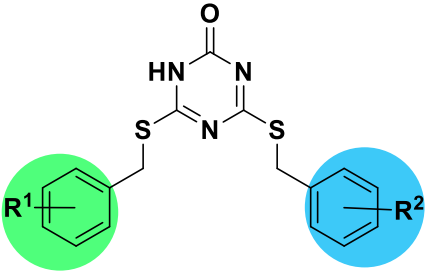

Biološko aktivnost vseh sintetiziranih spojin smo določili z *in vitro* testom topo II α relaksacijske encimske dejavnosti. Vrednosti IC₅₀ spojin so podane v preglednici I. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili etopozid, ki je znan zaviralec človeške topo II α . Eksperimentalno smo etopozidu določili vrednost IC₅₀ 37,3 μ M, kar je primerljivo z v literaturi navedeno vrednostjo 60,3 μ M (43).


Spojini, predstavljeni na sliki 13, ki sta predstavljal izhodišče za naše delo sta imeli izmerjeni vrednosti IC₅₀ (26):

- Izhodiščna spojina 1 = 57,6 μ M
- Izhodiščna spojina 2 = 219,3 μ M

Glede na te vrednosti smo učinkovitost izboljšali pri sedmih spojinah, ki smo jih sintetizirali iz spojine **1** (spojine: **3**, **4**, **5**, **9**, **10**, **13** in **14**) ter desetih spojinah, ki smo jih sintetizirali iz spojine **2** (spojine: **15**, **16**, **17**, **19**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25** in **26**). Skupno smo pri desetih spojinah vrednosti IC₅₀ dobili pod 50 µM, kar predstavlja veliko izboljšanje glede na prejšnjo generacijo 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov.

Preglednica I: Rezultati biološkega testiranja sposobnosti zaviranja topoisomerase IIα z uporabo HTS relaksacijskega testa sintetiziranih spojin **3-26** in njihove izračunane fizikalno-kemijske lastnosti.

					
Spojina	R ¹	R ²	LogP	Molekulska masa [g/mol]	IC ₅₀ [uM]
Izhodiščna spojina 1	m-Cl	/	6,29	375,89	57,6
3	m-Cl	3,5-OMe	6,03	435,94	54,2
4	m-Cl	4-CH(CH ₃) ₂	7,52	417,97	36,7
5	m-Cl	3,4- 	5,88	417,89	55,3
6	m-Cl	3-CONH ₂	5,19	418,91	451,4
7	m-Cl	2,6-F	6,6	411,87	165,6
8	m-Cl	3-COOH	5,84	419,90	388,1
9	m-Cl	3-CF ₃ , 5-F	7,37	461,88	34,4
10	m-Cl	2,4,5-F	6,76	429,86	36,6
11	m-Cl	4-CH(CH ₃)(COOH)	6,35	447,95	145,1
12	m-Cl	4-CH ₂ OH	5,71	405,92	126,6
13	m-Cl	3-OH	5,9	391,89	45,3
14	m-Cl	4-CF ₃	7,21	443,89	36,9

Izhodiščna spojina 2	p-Cl	/	6,29	375,89	219,3
<u>15</u>	p-Cl	3,5-OMe	6,03	435,94	84,0
<u>16</u>	p-Cl	4-CH(CH ₃) ₂	7,52	417,97	9,2
<u>17</u>	p-Cl	3,4- 	5,88	417,89	55,5
<u>18</u>	p-Cl	3-CONH ₂	5,19	418,91	293,4
<u>19</u>	p-Cl	2,6-F	6,6	411,87	43,2
<u>20</u>	p-Cl	3-COOH	5,84	419,90	>1000
<u>21</u>	p-Cl	3-CF ₃ , 5-F	7,37	461,88	8,4
<u>22</u>	p-Cl	2,4,5-F	6,76	429,86	38,6
<u>23</u>	p-Cl	4-CH(CH ₃)(COOH)	6,35	447,95	161,4
<u>24</u>	p-Cl	4-CH ₂ OH	5,71	405,92	154,9
<u>25</u>	p-Cl	3-OH	5,9	391,89	129,1
<u>26</u>	p-Cl	4-CF ₃	7,21	443,89	34,0

Substituenti, s katerimi smo aktivnost najbolj izboljšali, so bili:

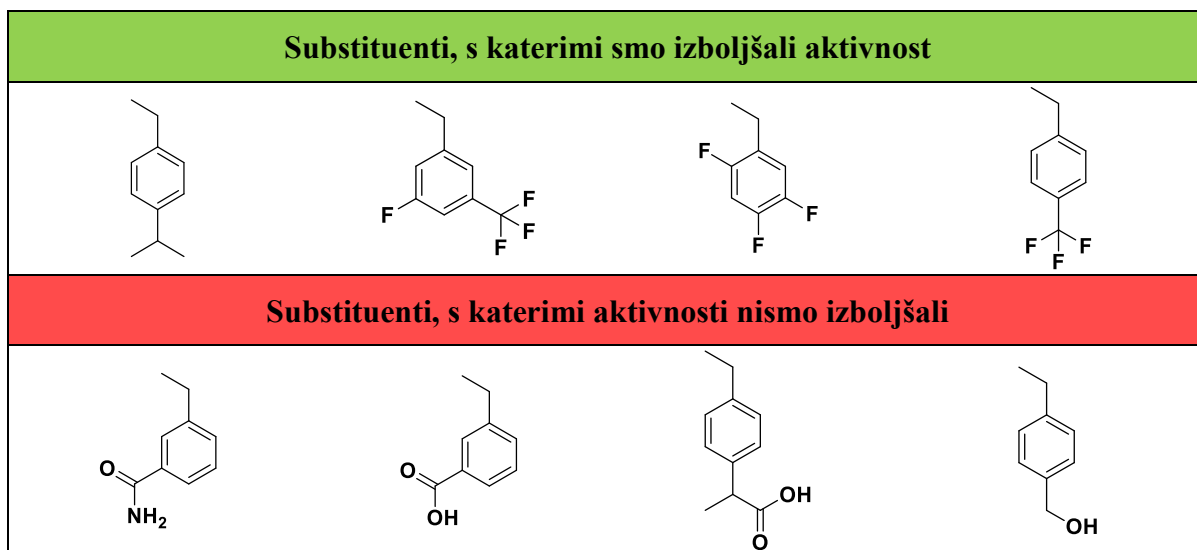
- **4-CH(CH₃)₂**
- **3-CF₃, 5-F**
- **2,4,5-F**
- **4-CF₃**

Substituenti, s katerimi aktivnosti nismo izboljšali, so bili:

- **3-CONH₂**
- **3-COOH**
- **4-CH(CH₃)(COOH)**
- **4-CH₂OH**

Iz rezultatov lahko ugotovimo, da so prisotni substituenti z uvedenimi fluorovimi atomi ter izopropilni substituent boljši za tvorbo ugodnejših interakcij v sladkornem in fosfatnem delu ATP žepa topo II α , medtem ko zelo polarni substituenti (npr. amid in karboksilna kislina) teh interakcij ne tvorijo tako ugodno in posledično ne izboljšajo aktivnosti. Vsi omenjeni substituenti so prikazani na sliki 18. Kot najboljše spojini sta se izkazali spojini 16 in 21 z vrednostma IC₅₀ 9,2 μ M in 8,4 μ M. Obe spojini imata na mestu R¹ (4-

klorobenzil)tio fragment, na mestu R² pa ima spojina **16** (4-izopropilbenzil)tio fragment, spojina **21** pa (3-trifluorometil-5-fluorobenzil)tio fragment.



Slika 18: Prikaz najpomembnejših zaključkov SAR študije naših spojin: substituenti, ki izboljšajo oz. ne izboljšajo aktivnosti vezave v aktivno mesto topo IIa.

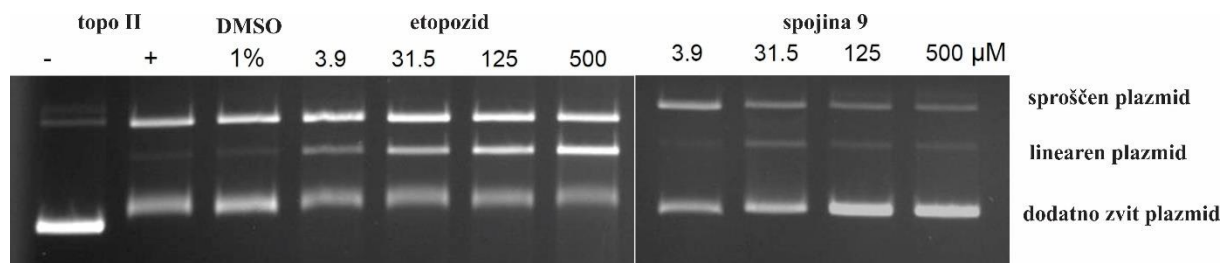
HTS test relaksacijske encimske aktivnosti smo zaradi stroškov povezanih z njegovo izvedbo izvedli le enkrat. Sam test je razvit za hitro reševanje in grobo identifikacijo zadetkov in ne za natančnejšo karakterizacijo zaviranja. Začetna primerjava identičnih substituentov na mestu 4, tako v primeru meta- kot tudi para-(klorobenzil)tio substituenta na mestu 6 triazinonskega obroča, je pokazala primerljive trende zaviranja (Preglednica I, npr. pari spojin **5** in **17**, **6** in **18**, **14** in **26**, itd.). Vendar samo na osnovi HTS testa še ne moremo podati popolnih zaključkov o učinkovitosti zaviralcev in moramo izvesti še dodatne eksperimente. Le-te smo izvedli za izbrano spojino **9**.

Fizikalno kemijske lastnosti sintetiziranih spojin lahko ocenimo glede na izračunane logP vrednosti podane v preglednici I. Vse naše spojine imajo logP vrednosti v območju od 5 do 8, kar pomeni da so pretežno lipofilne. Glede na pravilo Lipinskega, ki pravi, da potencialne spojine vodnice za razvoj peroralno uporabnih zdravilnih učinkovin ne smejo imeti vrednosti logP nad 5 (44), so naše spojine na robu sprejemljivosti z vidika lipofilnosti. Posledično bo najverjetneje potrebna nadaljnja optimizacija te fizikalno-kemijske lastnosti. Spojine so zaradi višje lipofilnosti slabše topne v vodi, kar lahko povzroči neoptimalno absorpcijo in hitro izločanje ali pa skladiščenje v maščobnem tkivu. Za povečanje hidrofilnosti, bi morali v spojino uvesti bolj hidrofilne substituentne, a glede

na določene IC₅₀ vrednosti, bi morali z dodatnimi študijami vezave teh spojin natančno preučiti, na katera mesta v strukturi bi jih lahko uvedli. To pomeni tudi, da bo za nadaljnjo optimizacijo potrebno najverjetneje spremeniti še kakšen drug substituent na mestu 6, ne le substituenta R².

5.3. Preiskovanje mehanizma delovanja in predpostavljen vezavni model aktivne spojine **9**

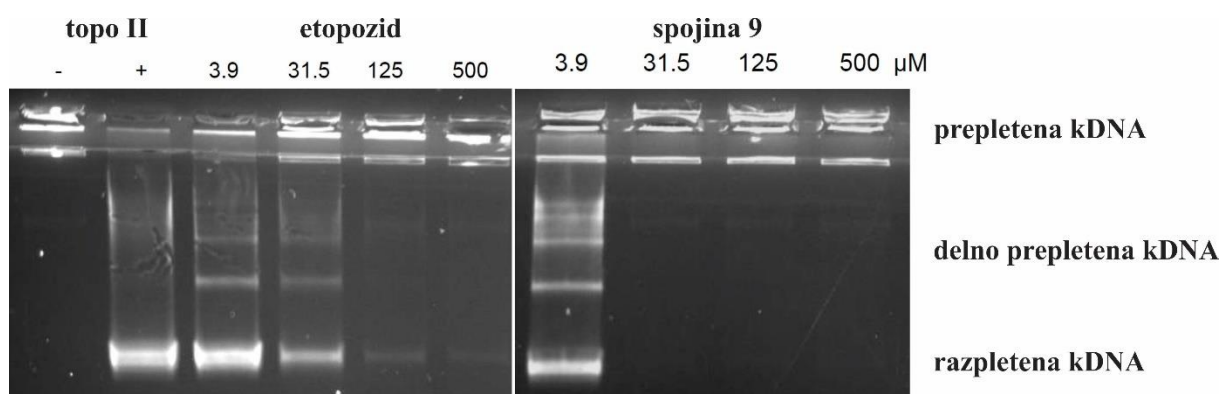
Kot smo omenili v uvodu, je topoizomeraza II kompleksen molekularni motor in molekule, ki izkazujejo zaviralne lastnosti, lahko vplivajo nanj preko več zelo raznolikih mehanizmov. Glavna pristopa zaviranja sta vpletanje v katalitični mehanizem encima ali pa zaviranje prek stabilizacije kratkoživega kompleksa, kot je to v primeru DNA strupov (24, 25). Zato moramo, če želimo ugotoviti, kako te spojine delujejo, izvesti dodatne biofizikalne teste, ki omogočajo vpogled v mehanizem zaviralnega delovanja. Mehanizem delovanja tekom tega dela pripravljenih spojin smo preučevali s testom spodbujanja cepitve. Za ta test smo izbrali spojino **9**, ki sicer ni bila najbolj aktivna, je pa izkazovala ugodne fizikalno-kemijske lastnosti (topnost)A. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili etopozid, rezultati dobljenega gela so prikazani na sliki 19.



Slika 19: Rezultat testa spodbujanja cepitve za izbrano aktivno spojino **9**.

Dobljen gel pri etopozidu, predvsem pri višjih koncentracijah, nam pokaže močno liso, ki predstavlja linearen plazmid, ki je posledica stabilizacije kratkoživega kovalentnega kompleksa med DNA in topo II α . Ta lisa pri spojini **9** ni vidna, kar potrjuje, da naša spojina ne deluje kot topoizomerazi strup, saj ne stabilizira tega kompleksa in ne omogoča nastanka linearnega plazmida. Tako lahko sklepamo, da spojina **9** deluje kot katalitični zaviralec topo II α .

Test aktivnosti razpletanja (dekantenacije) topo II α smo prav tako izvedli s spojino **9**. Pri tem testu ovrednotimo vpliv spojine na sposobnost topo II α encima, da razplete mrežo cikličnih DNA molekul, imenovano tudi kDNA. Ta test predstavlja alternativno možnost za določitev vpliva delovanja spojin na encimsko katalitično aktivnost topoizomeraze II α v primerjavi z začetnim relaksacijskim testom HTS, rezultate delovanja pa lahko tudi vizualiziramo na gelu, kar nam da dodaten pogled v zaviralne lastnosti spojine. Aktivnost spojine **9** smo pomerili pri koncentracijah 500 μ M, 125 μ M, 31,5 μ M ter 3,9 μ M. Rezultati so prikazani na sliki 20.

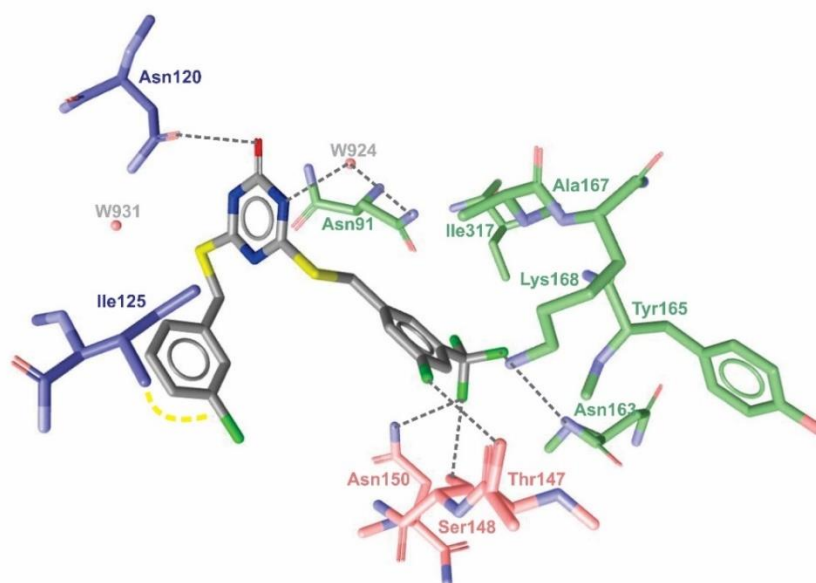


Slika 20: Rezultat testa aktivnosti razpletanja (dekantenacije) za izbrano aktivno spojino **9**.

Dobljen gel pri etopozidu nam pokaže, da je z višanjem njegove koncentracije aktivnost encima vedno manjša. To povzroči, da se kDNA ne razplete in je prevelika, da bi potovala po gelu navzdol. Enako velja tudi za spojino **9**. Z višanjem koncentracije spojine se namreč aktivnost encima zmanjšuje in opazimo močno liso kDNA na vrhu gela. Med koncentracijama 125 μ M in 31,5 μ M etopozid popolnoma ustavi proces razpletanja. Opazimo lahko, da spojina **9** zavira encim že pri nižjih koncentracijah kot etopozid, saj med koncentracijama 31,5 μ M in 3,9 μ M popolnoma ustavi proces razpletanja. Dobljeni rezultat je primerljiv z določeno IC₅₀ vrednostjo HTS testa za spojino **9** (34,4 μ M), kjer smo ovrednotili sposobnost spojine za zaviranje procesa relaksacije dodatno zvitega plazmida. Test razpletanja je tudi dodatni neodvisni eksperiment, ki potrjuje zaviralno delovanje naše spojine. Pokazali pa smo tudi, da je spojina močnejši zaviralec encima kot etopozid, kar predstavlja zelo obetavno lastnost spojine za nadaljnje delo in optimizacije.

Predpostavljen vezavni model aktivne spojine **9** v vezavno mesto za ATP človeške topoizomeraze II α

Vezavni model spojine **9** v ATP vezavno mesto človeške ATPazne domene topo II α , izračunan z metodo molekulskega sidranja, je predstavljen na sliki 21. Spojina **9** tvori interakcije z aminokislinskimi preostanki Ile125, Asn120, Asn91 v adeninskem in sladkornem delu ATP žepa, poleg tega pa novo uvedena substituenta na fenilnem obroču trifluorometil in fluor (3-CF₃, 5-F) tvorita interakcije še z Asn163, Thr147, Ser148 ter Asn150, ki se nahajajo predvsem v fosfatnem delu, deloma pa tudi v sladkornem delu ATP žepa. Rumene črtkane črte okrog fenilnega obroča predstavljajo hidrofobne interakcije, črne črtkane črte pa vodikove vezi. S tem vezavnim modelom lahko razložimo, da smo z uvedbo novih substituentov na tiobenzen obroč, substituiran na mestu 4 triazinonskega obroča, tvorili dodatne interakcije v sladkornem delu in fosfatnem žepu ATP vezavnega mesta topo II α in posledično izboljšali zaviralno sposobnost sintetiziranih spojin.

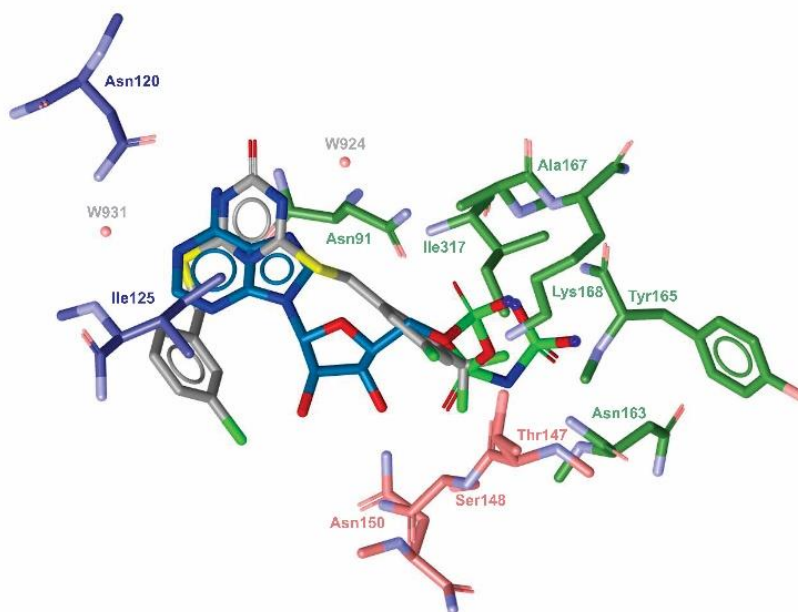


Slika 21: Predpostavljen vezavni model aktivne spojine **9** v vezavno mesto za ATP na ATPazni domeni človeške topo II α določen z metodo molekulskega sidranja (uporabljena kristalna struktura PDB:1ZXM).

Na sliki 22 je prikazana še primerjava vezave sidrane konformacije spojine **9** in eksperimentalno določene konformacije nehidrolizirajoče molekule ANP-PNP v vezavno

mesto za ATP človeške topo II α (uporabljen PDB 1ZXM). Adeninski del ATP molekule je v primeru spojine **9** nadomeščen s triazinonskim obročem in metaklorotiobenzenom na mestu R¹, ki tvorita hidrofobne interakcije in vodikove vezi v tem delu ATP vezavnega mesta. Na novo uvedena substituenta na mestu R² trifluorometil in fluor (3-CF₃, 5-F) pa delujeta namesto fosfatnega dela ATP molekule in tvorita vodikove vezi v tem delu vezavnega mesta.

Iz pridobljenih podatkov in primerjave vezave spojine **9** smo pridobili veliko informacij o pomembnosti posameznih substituentov za vezavo v ATP vezavno mesto topo II α . Ugotovili smo, da so za vezavo izrednega pomena uvedeni fluoro substituenti, ter da ostaja še nekaj možnosti izboljšav na mestu R¹, pri katerem smo v našem primeru spreminjali zgolj meta in para mesto Cl atoma. Vse informacije so dobra osnova za nadaljnjo optimizacijo in razvoj katalitičnih zaviralcev topo II α 1,3,5-triazinonskega strukturnega razreda.



Slika 22: Primerjava vezave sidrane konformacije aktivne spojine **9** in eksperimentalno določene konformacije nehidrolizirajoče molekule ANP-PNP v vezavno mesto za ATP (uporabljena kristalna struktura PDB:1ZXM).

6. Sklep

Na podlagi strukturno podprtega načrtovanja in SAR analize smo v nalogi želeli izboljšati zaviralno aktivnost katalitičnih zaviralcev človeške topoizomeraze II α - 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov. Uvedli smo dodatne substituentne na mesto 4, kjer se je v predhodni seriji spojin tega razreda nahajal nesubstituiran fenilni obroč. Z uvedbo novih substituentov smo želeli doseči tvorbo novih ugodnih interakcij z sladkornim in fosfatnim delom ATP žepa encima.

Z intermolekularno kondenzacijo smo tako najprej pripravili dva različna 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onska obroča, na katera smo nato z nukleofilno substitucijo pripeli 12 različnih substituentov, izbranih na osnovi virtualnega rešetanja zgrajene usmerjene kemijske knjižnice. Vseh 24 pripravljenih disubstituiranih triazinonov smo eksperimentalno ovrednotili z metodami TLC, NMR, HRMS, HPLC, njihovo zaviralno delovanje pa smo določili z *in vitro* HTS testom topo II α relaksacijske encimske aktivnosti. Vsem spojinam smo določili vrednosti IC₅₀ in na podlagi tega sklepali o SAR spojin.

Večina sintetiziranih spojin je izkazovala nižje vrednosti IC₅₀ kot izhodni spojini, najbolj aktivne spojine (npr. spojini **16** in **21**) pa so imele vrednosti IC₅₀ zaviranja topo II α pod 10 μ M. Ugotovili smo, da predvsem substituenti z vsebovanimi fluorovimi atomi uvedeni na benzilno fragment na mestu 4 1,3,5-triazinonskega skeleta (npr., 3-CF₃, 5-F, 2,4,5-F in 4-CF₃) boljši za tvorbo novih interakcij v sladkornem in fosfatnem delu ATP žepa topo II α kot sintetizirane spojine z zelo polarnimi/nabitimi substituenti (npr. 3-CONH₂, 3-COOH, 4-CH(CH₃)(COOH), 4-CH₂OH).

Zaradi ugodnih fizikalno-kemijskih lastnosti, predvsem topnosti, smo za nadaljnje natančnejše preiskovanje mehanizma delovanja izbrali spojino **9**. To spojino smo ovrednotili še s testom spodbujanja cepitve ter testom aktivnosti razpletanja. S testom spodbujanja cepitve smo potrdili, da spojina **9** ne deluje kot topoizomerazni strup in je katalitični zaviralec topo II α . S testom aktivnosti razpletanja smo dodatno vizualno pokazali, da spojina **9** uspešno zavira encim. Pokazali smo tudi, da ga zavira pri nižjih koncentracijah kot etopozid, ki je že v klinični uporabi. S predpostavljenim sidranim vezavnim modelom spojine **9** smo tudi razložili, zaradi katerih dodatnih interakcij v sladkornem in fosfatnem delu encima je izboljšana zaviralna aktivnost. Naši rezultati predstavljajo dobro osnovo za nadaljevanje razvoja razreda 1,3,5-triazin2(1*H*)-onov kot katalitičnih zaviralcev topo II α .

7. Viri in literatura

- 1) Novakovič S: Onkologija. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 1-26.
- 2) World Health Organization. <http://www.who.int/cancer/en/> (dostopano: 12.08.2018).
- 3) National cancer institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer> (dostopano: 12.08.2018).
- 4) Serša G: Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. Farmaceutski vestnik 2009; 60: 43-47.
- 5) Graham P: An Introduction to Medicinal Chemistry 5th edition. Oxford University, 2013.
- 6) Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of Cancer: the next generation. Cell 2011; 144 (5): 646-674.
- 7) Valjavec K, Bavcon S, Perdih A: DNA topoizomeraze pomembne tarče protirakavih zdravilnih učinkovin. Kemija v šoli in družbi 2018, št. 1.
- 8) Obreza A: Sintezne zdravilne učinkovine v onkologiji. Farmaceutski vestnik 2009; 60: 48-60.
- 9) Mendelson J: The molecular basis of cancer 2nd edition. Saunders, 2001.
- 10) Martino E, et al: Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2018; 28 (17):2816-2826.
- 11) Abdulah A, et al: Colchicine prodrugs and codrugs: Chemistry and bioactivities. European Journal of Medicinal Chemistry 2018; 144: 229-242.
- 12) Baldev K V: Genetic toxicology of mitomycin C, actinomycins, daunomycin and adriamycin. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology 1977; 39 (2): 189-238.
- 13) Kos J: Biološka zdravila pri raku. Farmaceutski vestnik 2009; 60: 61-66.
- 14) Redman J M, Hill E M, AlDeghather D, Weiner L M: Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. Molecular Immunology 2015; 67 (2): 28-45.
- 15) Kumar S, Saini R V, Mahindroo N: Recent advances in cancer immunology and immunology-based anticancer therapies. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017; 96: 1491-1500.
- 16) Cortes F, Pastor N, Mateos S, Dominguez I: Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 2003; 543 (1): 59-66.
- 17) Hsieh T, Plank J L: Reverse Gyrase Functions as a DNA Renaturase. The Journal of Biological Chemistry 2006; 281: 5640-5647.

- 18) Bates A D, Maxwell A: DNA topology: Topoisomerases keep it simple. *Current Biology* 1997; 7 (12): R778-R781.
- 19) Zuma A A, et al: Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011; 37 (5): 449-456.
- 20) Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C: DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chemistry & Biology* 2010; 17 (5): 421-433.
- 21) Ghilarov D A, Shkundina I S: Cellular roles of DNA topoisomerases. *Molecular Biology* 2012; 46 (1): 47-57.
- 22) Pommier Y: DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition. *Chemical reviews* 2009; 109 (7): 2894-2902.
- 23) Wendorff T, et al: The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *Journal of Molecular Biology* 2012; 424 (3-4): 109-124.
- 24) Pogorelčnik B, Janežič M, Perdih A: Zaviralci DNA topoizomeraze II α -pomembne tarče protirakovih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2015; 66: 326-333.
- 25) Pogorelčnik B, Perdih A, Solmajer T: Recent advances in the Development of Catalytic Inhibitors of Human DNA topoisomerase II α as Novel Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry* 2013; 20: 694-709.
- 26) Wang J C: Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quarterly reviews of biophysics* 1998; 31 (2): 107-144.
- 27) Roca J: Topoisomerase II: a fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucleic Acids Research* 2009; 37 (3): 721-730.
- 28) Thakur D S: Topoisomerase II inhibitors in Cancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 2011; 3 (4): 1173-1181.
- 29) Baldwin E L, Osheroff N: Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents* 2005; 5: 363-372.
- 30) Bailly C: Contemporary Challenges in the Design of Topoisomerase II Inhibitors for Cancer Chemotherapy. *Chemical Reviews* 2012; 112 (7): 3611-3640.
- 31) Furet P, Schoepfer J, Radimerski T, Chene P: Discovery of a new class of catalytic topoisomerase II inhibitors targeting the ATP-binding site by structure based design. Part I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19 (15): 4014-4017.

- 32) Pogorelčnik B, Brvar M, Zajc I, Filipič M, Solmajer T, Perdih A: Monocyclic 4-amino-6-(phenylamino)-1,3,5-triazines as inhibitors of human DNA topoisomerase II α . *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24 (24): 5762-5768.
- 33) Pogorelčnik B, et al: 4,6-substituted-1,3,5-triazin-2(1h)-ones as monocyclic catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II α targeting the ATP binding site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2015; 23 (15): 4218-4229.
- 34) Sosič I, et al: The Synthesis of Novel 2,4,6-Trisubstituted 1,3,5-Triazines : A Search for Potential MurF Enzyme Inhibitors. *Heterocycles* 2010; 81 (1): 91-115.
- 35) ChemOffice.
http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/details/Default.aspx?fid=16
 (dostopano: 12.08.2018).
- 36) GraphPad. <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/> (dostopano 12.08.2018).
- 37) Jones G, Willett P, Glen R C, Leach A R, Taylor R: Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible docking. *Journal of Molecular Biology* 1997; 267: 727-748.
- 38) Wolber G, Langer T: LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2005; 45: 160-169.
- 39) Mnova, Mestrelab Research. <http://mestrelab.com> (dostopano: 12.08.2018).
- 40) Osheroff N, Bjornsti M: DNA Topoisomerase Protocols Part II: Enzymology and Drugs. *Methods in Molecular Biology* 2001.
- 41) Bergant K, Janežič M, Perdih A: Bioassays and In Silico Methods in the Identification of Human DNA Topoisomerase II α Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 2018; 25: 1-33.
- 42) Goerdeler J, Neuffer J: Umsetzung von Amidino- Verbindungen mit Äthoxycarbonylsenfö, *Chemical Berichte*, 1971; 104: 1606-1610.
- 43) Huang Z S, et al.: Synthesis and evaluation of mansonone F derivatives as topoisomerase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 3339-3347.
- 44) Lipinski C A: Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* 2004; 1: 337-341.