

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC PROJ
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MATIC PROJ

**SINTEZA IN VREDNOTENJE NOVIH ZAVIRALCEV INDOLAMIN
2,3-DIOKSIKSENAZE 1, ODKRITIH S POMOČJO VIRTUALNEGA
REŠETANJA NA OSNOVI STRUKTUR LIGANDA IN ENCIMA**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF NOVEL INDOLEAMINE
2,3-DIOXYGENASE 1 INHIBITORS DISCOVERED BY LIGAND-
AND STRUCTURE-BASED VIRTUAL SCREENING**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Virtualno rešetanje sem izvajal na Kemijskem inštitutu v Ljubljani pod somentorstvom izr. prof. dr. Janeza Konca, mag. farm.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za vse nasvete, usmeritve in strokovno pomoč pri laboratorijskem delu ter pisanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se somentorju izr. prof. dr. Janezu Koncu, mag. farm., in dr. Samu Lešniku, mag. farm., za pomoč pri izvedbi virtualnega rešetanja in pisanju magistrske naloge.

Hvala asist. dr. Damijanu Knezu, mag. farm., in asist. Ani Dolšak, mag. farm., za pomoč pri biokemijskem vrednotenju spojin.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm., in somentorstvom izr. prof. dr. Janeza Konca, mag. farm.

Matic Proj

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Robert Roškar

Članica komisije: asist. dr. Jasna Omersel

Ljubljana, 2018

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	i
KAZALO SLIK.....	iii
KAZALO PREGLEDNIC.....	iii
POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1 UVOD.....	1
1.1 IMUNOTERAPIJA RAKA	1
1.2 KINURENINSKA PRESNOVNA POT IN MEHANIZEM IMUNOSUPRESIJE	3
1.3 INDOLAMIN 2,3-DIOKSIGENAZA 1	5
1.3.1 Strukturni podatki	5
1.3.2 Zaviralci IDO1 v kliničnih testiranjih	6
1.3.3 Težave pri načrtovanju novih zaviralcev IDO1	9
2 NAČRT DELA	10
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Reagenti in topila.....	12
3.1.2 Knjižnica spojin.....	12
3.1.3 Strojna oprema.....	12
3.2 METODE.....	12
3.2.1 Program LiSiCA	12
3.2.2 Program ProBiSdock	13
3.2.3 Ostala programska oprema	15
3.2.4 Biokemijsko testiranje	15
3.2.5 Kromatografske metode	16
3.2.6 Spektroskopske metode	17
3.2.7 Določanje talilnega intervala	17
4 EKSPERIMENTALNO DELO.....	18
4.1 RAČUNALNIŠKO NAČRTOVANJE.....	18
4.1.1 2D virtualno reševanje na osnovi liganda (LiSiCA)	18
4.1.2 3D virtualno reševanje na osnovi liganda (LiSiCA)	18
4.1.3 Virtualno reševanje na osnovi strukture znanih ligandov in strukture encima (ProBiSdock)	19
4.2 SINTEZA.....	24

4.2.1	Sinteza 5-feniltieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (1)	24
4.2.2	Sinteza 5-feniltieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (2)	25
4.2.3	Sinteza 5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (3).....	25
4.2.4	Splošni postopek <i>N</i> -alkiliranja	26
4.2.4.1	Sinteza <i>N</i> -(4,5-dimetoksi-2-metilfenil)-2-(4-okso-5-feniltieno[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)acetamida (4)	27
4.2.4.2	Sinteza <i>N</i> -(4,5-dimetoksi-2-metilfenil)-2-(4-okso-5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)acetamida (5)	28
4.2.4.3	Sinteza 3-(2-(3,4-dihidrokinolin-1(2H)-il)-2-oksoetil)-5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (6)	29
4.2.4.4	Sinteza metil 4-(2-(4-okso-5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)acetamido)benzoata (7)	30
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
5.1	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	31
5.1.1	<i>N</i> -aciliranje s kloroacetilkloridom	32
5.1.2	Ciklizacija do tienopirimidinona	32
5.1.3	<i>N</i> -alkilacija.....	33
5.2	REZULTATI IN KOMENTAR BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA	33
5.2.1	Virtualni zadetki s programom LiSiCA.....	33
5.2.2	Virtualni zadetki s programom ProBiSdock.....	34
5.2.3	Analogi zadetka 5	38
5.2.4	Sintezno pridobljene spojine	40
5.2.5	Odnos med strukturo in delovanjem.....	41
6	SKLEP	42
7	LITERATURA	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Kinureninska presnovna pot.	3
Slika 2: Mehanizem vzpostavitve imunosupresivnega mikrookolja tumorja kot posledica povečane ekspresije IDO1.....	4
Slika 3: Različni ligandi kokristalizirani z IDO1.	6
Slika 4: Strukture zaviralcev IDO1 v kliničnih testiranjih.	7
Slika 5: Načrt dela, ki prikazuje vhodne podatke, računalniško načrtovanje, biokemijsko vrednotenje in kemijsko sintezo.....	11
Slika 6: Princip delovanja programa ProBiSdock.....	14
Slika 7: Princip določevanja aktivnosti encima	15
Slika 8: Epacadostat	18
Slika 9: Superponirani ligandi v aktivnem mestu encima IDO1	20
Slika 10: Celotna reakcijska shema sinteznih postopkov.....	31
Slika 11: Mehanizem <i>N</i> -aciliranja s kloroacetilkloridom.....	32
Slika 12: Ciklokondenzacija β -aminoestra in formamida do tienopirimidinona	32
Slika 13: Mehanizem <i>N</i> -alkilacije	33
Slika 14: Grafa odvisnosti RA od logaritma koncentracije.....	37
Slika 15: Predpostavljen način vezave spojin 5 (levo) in 9 (desno).....	38
Slika 16: Graf odvisnosti RA od logaritma koncentracije spojine 29	39
Slika 17: Predpostavljeni farmakoforni model na primeru zadetka 5	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Referenčni spojin za virtualno reševanje na osnovi liganda.....	19
Preglednica II: Strukture ligandov, uporabljenih za pripravo polja ligandov.	20
Preglednica III: Ožji izbor spojin iz rezultatov virtualnega reševanja s programom ProBiSdock....	22
Preglednica IV: Rezultati biokemijskega testiranja za virtualni zadenek s programom LiSiCA.....	34
Preglednica V: Rezultati biokemijskega testiranja za virtualne zadetke s programom ProBiSdock	34
Preglednica VI: Rezultati biokemijskega testiranja za analoge zadetka 5	39
Preglednica VII: Rezultati biokemijskega testiranja za sintezno pridobljene spojine.....	40

POVZETEK

Kinureninska presnovna pot je udeležena v enem izmed najpomembnejših mehanizmov prikritja rakavih celic imunskemu sistemu. Začetno in omejujočo stopnjo oksidacije L-triptofana do *N*-formil-L-kinurenina katalizira hem-vsebujoči encim indolamin 2,3-dioksigenaza 1 (IDO1). Zaradi deregulacije in posledično prekomerne ekspresije IDO1 v mikrookolju tumorja pride do pomanjkanja L-triptofana in kopičenja njegovega presnovka L-kinurenina, kar oboje prispeva k zaviranju imunskega odziva. Trenutno potekajo klinična preizkušanja za vsaj sedem različnih zaviralcev IDO1. Študije kažejo na sinergistično delovanje v kombinaciji z uveljavljenimi načini zdravljenja raka.

V sklopu magistrske naloge smo izvedli 2D virtualno reševanje na osnovi strukture liganda epacadostata, 3D virtualno reševanje na osnovi strukture ligandov 5PF in PKL ter virtualno reševanje na osnovi strukture ligandov in strukture encima. Slednje se je izkazalo kot najuspešnejše. Za vhodni podatek smo uporabili okrog 16 milijonov spojin iz prosto dostopne knjižnice ZINC, ki smo ji pred začetkom reševanja odstranili spojine s promiskuitetnimi lastnostmi. Od različnih proizvajalcev smo naročili 22 najobetavnejših *in silico* zadetkov ter jim ovrednotili zaviralno delovanje s pomočjo biokemijskega testa na osnovi merjenja fluorescence. Odkrili smo dva nova zaviralca IDO1, ki imata vrednost IC_{50} nižjo od 100 μ M (spojini **5** in **9**).

Za nadaljnjo optimizacijo smo izbrali zadetek **5** ($IC_{50} = 41,5 \mu$ M). V celotni knjižnici spojin ZINC smo poiskali 4231 analogov zadetka z minimalno 70 % podobnostjo in jih uporabili kot vhodni podatek za novo virtualno reševanje. Na podlagi rezultatov reševanja smo naročili in biokemijsko ovrednotili pet spojin, od tega sta dve (spojini **29** in **30**) izkazali močnejše zaviralno delovanje od zadetka **5**. Hkrati smo zadetek pripravili s tristopenjsko kemijsko sintezo in sintetizirali tri njegove analoge z razlikami v stranskih skupinah. S sintezo analogov nismo uspeli izboljšati zaviralnega delovanja, zato bi bilo potrebno poiskati bolj optimalne spremembe v strukturi. Zadetek **5** in njegovi strukturni analogi omogočajo tvorbo koordinacijske vezi z železovim ionom hema, vezavo v lipofilni žep A in lipofilni žep B. Z našim delom smo postavili temelje za nadaljnjo sintezo analogov zadetka **5** in optimizacijo njegovega zaviralnega delovanja.

KLJUČNE BESEDE: indolamin 2,3-dioksigenaza, zaviralci IDO1, virtualno reševanje, imunoterapija raka

ABSTRACT

The kynurenine pathway plays a vital role in one of the most important mechanisms evolved by tumor cells to escape the immune surveillance. The initial and rate limiting step is oxidation of L-tryptophan to *N*-formyl-L-kynurenine catalysed by a heme-containing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). The deregulation and consequently excessive IDO1 expression in tumor microenvironment lead to L-tryptophan depletion and accumulation of its metabolite L-kynurenine, both responsible for immunosuppression. Currently, there are at least seven small-molecule IDO1 inhibitors under clinical development. The studies have demonstrated a synergistic effect when combining IDO1 inhibitors with other well-established cancer treatments.

In this Master's thesis we adopted 2D ligand-based virtual screening (reference compound epacadostat), 3D ligand-based virtual screening (reference compounds 5PF and PKL) and combined ligand- and structure-based virtual screening approaches. The latter was found to be the most efficient. Roughly 16 million commercially available compounds from a free public ZINC database were used as an input. The chemical library was filtered before use to eliminate promiscuous compounds. We ordered 22 most promising *in silico* hits from various vendors. The inhibitory activity was evaluated using fluorescence-based biochemical assay leading to a discovery of two novel IDO1 inhibitors with IC₅₀ value below 100 μM (compounds **5** and **9**).

Hit compound **5** (IC₅₀ = 41,5 μM) was selected for further optimization. A number of 4231 hit compound analogues from the ZINC library with at least 70 % similarity was selected for further virtual screening. Based on these findings, five compounds were purchased and biochemically evaluated, two of them exhibiting stronger inhibitory activity than hit **5** (compounds **29** and **30**). Moreover, we developed a three-step synthetic pathway for the hit compound and synthesized three analogues with structural modifications in the side chain. Synthesised analogues did not exhibit stronger inhibitory activity. Thus, more optimal structural changes should be further explored. Hit compound **5** and its structural analogues enable coordinate bonding with heme iron and binding into lipophilic pockets A and B. The Master's thesis outcomes represent important starting points for further structural optimization to improve the inhibitory activity of the hit compound **5**.

KEY WORDS: indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO1 inhibitors, virtual screening, cancer immunotherapy

SEZNAM OKRAJŠAV

2D	dvodimenzionalno
3D	trodimenzionalno
AhR	receptor za arilne ogljikovodike (angl. <i>Aryl hydrocarbon receptor</i>)
APC	antigen predstavitvene celice
ATR	tehnika oslABLJENE popolne odbojnosti (angl. <i>Attenuated total reflection</i>)
BTEAC	benziltriethylamonijev klorid (angl. <i>Benzyltriethylammonium chloride</i>)
CAR	himerni receptor antigena (angl. <i>Chimeric antigen receptor</i>)
CTLA-4	s citotoksičnimi limfociti T povezan antigen 4 (angl. <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
CypP450	citokrom P450
DC	dendritične celice
DKM	diklorometan
DMSO	dimetilsulfoksid
δ	kemijski premik
eIF-2 α	translacijski faktor (angl. <i>Eukaryotic initiation factor 2α</i>)
ekv.	množinski ekvivalent
ESI	elektrozapršilna ionizacija (angl. <i>Electrospray ionisation</i>)
GCN2	proteinska kinaza (angl. <i>General control nonderepressible 2</i>)
GLK1	proteinska kinaza (angl. <i>Master amino acid-sensing kinase 1</i>)
GM-CSF	granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (angl. <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>High-performance liquid chromatography</i>)
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (angl. <i>High-resolution mass spectrometry</i>)
IC ₅₀	koncentracija zaviralca, pri kateri je zavrte 50 % aktivnosti encima (angl. <i>The half maximal inhibitory concentration</i>)
IDO	indolamin 2,3-dioksidgenaza
IL-10	interlevkin 10
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta

Kyn	kinurenin
MDSC	mieloidne supresorske celice (angl. <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>)
MS	masna spektrometrija
mTOR	tarča rapamicina pri sesalcih (angl. <i>Mammalian target of rapamycin</i>)
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
PAINS	spojine, ki interferirajo z biokemijskimi testnimi sistemi (angl. <i>Pan Assay Interference Compounds</i>)
PD-1	receptor programirane celične smrti 1 (angl. <i>Programmed cell death protein 1</i>)
PDB	proteinska baza podatkov (angl. <i>Protein data bank</i>)
PD-L1	ligand za receptor programirane celične smrti 1 (angl. <i>Programmed death-ligand 1</i>)
ppm	Število delcev na milijon (angl. <i>Parts per million</i>)
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
RT	sobna temperatura (angl. <i>Room temperature</i>)
TDO	triptofan 2,3-dioksigenaza
TFA	trifluoroocetna kislina
TGF- β	transformirajoči rastni dejavnik beta (angl. <i>Transforming growth factor beta</i>)
TLC	tankoplastna kromatografija (angl. <i>Thin-layer chromatography</i>)
t_r	retencijski čas
T_{reg}	regulatorni limfociti T
Trp	triptofan
ZINC	prosto dostopna baza komercialno dostopnih spojin za virtualno reševanje

1 UVOD

Za rakave celice je značilna nenadzorovana celična delitev in sposobnost prodiranja v druga tkiva z neposrednim vraščanjem v sosednja tkiva ali z metastaziranjem na oddaljena mesta. Rakava celica nastane s spremembo genskega zapisa, kar povzročajo spontane mutacije, proces pa pospešijo ionizirajoče sevanje, kemični karcinogeni, nekateri virusi, bakterije in fizikalni agensi, poleg tega so lahko mutacije že podedovane. Kljub temu, da smo neprestano podvrženi mutacijam, se iz mutiranih celic le v redkih primerih razvije rak. Večina spremenjenih celic preprosto odmre, od preživelih pa ima večina še vedno mehanizme, ki preprečijo nenadzorovano rast. Zaobidejo jih potencialno rakave celice, vendar so te izpostavljene imunskemu sistemu. Zaradi spremenjenega dednega zapisa izražajo spremenjene proteine, ki jih prepozna imunski sistem in takšne celice uniči. Za nadaljnje razmnoževanje se morajo celice prikriti imunskemu sistemu (1).

1.1 IMUNOTERAPIJA RAKA

Povezavo med imunskim sistemom in rakom je že pred 150 leti predpostavil Rudolf Virchow, ki je pri svojih bolnikih opazil prekomerno količino belih krvničk. Nekaj desetletij kasneje je William Coley svojim bolnikom povzročil okužbo z živimi bakterijami kot imunostimulant pri zdravljenju raka. Danes smo priča izjemnemu napredku v razumevanju mehanizmov, kako se rakave celice izognejo imunskemu sistemu (2). Vsa ta nova odkritja predstavljajo temelje za razvoj sodobnih oblik zdravljenja. Dobro uveljavljeni kemoterapevtiki, radioterapija in biološka zdravila delujejo neposredno na tumor, imunoterapevtiki pa spodbudijo bolnikov imunski sistem, da se učinkoviteje bojuje proti rakavim celicam (3).

Rakave celice izražajo mnogo imunogenih antigenov, a se kljub temu izognejo imunski zavrnitvi preko vzpostavitve lokalnega imunosupresivnega mikrookolja (4). Glavni mehanizmi imunosupresije so: zaviranje antigenske predstavitve, proliferacija imunosupresorskih celic (regulatorni limfociti T, mieloidne supresorske celice MDSC in s tumorjem povezani makrofagi), ekspresija imunosupresivnih faktorjev (TGF- β , IL-10) in povečano izražanje ligandov, ki zavirajo aktivnost limfocitov T (PD-L1) (5). Vsi omenjeni mehanizmi predstavljajo potencialne tarče za razvoj imunoterapevtikov, v nadaljevanju pa predstavljamo nekaj primerov zdravljenj, ki že imajo odobritev regulatornih agencij.

Citotoksični limfociti T lahko prepoznajo in uničijo rakave celice. Pri tem je CTLA-4 negativni regulator aktivnosti. Protitelo **ipilimumab** z vezavo na receptor CTLA-4 izključi nadzorno stikalo, kar omogoči aktivacijo citotoksičnih limfocitov T (6).

Receptor PD-1 se nahaja na površini limfocitov T. Interakcija liganda PD-L1 z receptorjem PD-1 v zdravih tkivih omogoča toleranco do lastnih antigenov, kar prepreči avtoimunske reakcije. To imunsko stikalo izkoristijo rakave celice, ki imajo povišano ekspresijo liganda PD-L1, kar zavrže aktivnost limfocitov T. Zato so razvili monoklonska protitelesa (**pembrolizumab** in **nivolumab**), ki z vezavo na receptor PD-1 preprečijo interakcijo z njegovim ligandom. Limfociti T tako ostanejo aktivni (7,8). Po drugi strani pa protitelesa **atezolizumab**, **avelumab** in **durvalumab** vežejo ligand PD-L1, kar prav tako onemogoči interakcijo ligand-receptor in inaktivacijo limfocitov T (9).

Sipuleucel-T je prvo odobreno terapevtsko cepivo proti raku prostate. Gre za personalizirano zdravljenje, kjer bolniku odvzamejo dendritične celice in jih inkubirajo s fuzijskim proteinom. Rekombinantni fuzijski protein je sestavljen iz encima prostatične kisle fosfataze (ki je prisoten pri več kot 95 % rakov prostate) in iz aktivatorja imunskih celic GM-CSF. Z gojenjem celic zunaj telesa se izognejo imunosupresivnemu mikrookolju rakavih celic, fuzijski protein pa zagotovi uspešno aktivacijo in dozorevanje dendritičnih celic, ki jih na koncu preko infuzije vrnejo bolniku (10,11). Podoben pristop zdravljenja z avtolognimi celicami uporabijo pri CAR limfocitni T terapiji. Bolniku odvzamejo limfocite T in jim dodajo genski zapis za specifični receptor CAR, ki se veže na točno določen antigen, značilen za bolnikove rakave celice. Spremenjene limfocite T pomnožijo *ex vivo* okolju in nato vrnejo bolniku. V telesu limfociti T poiščejo in uničijo rakave celice, ki izražajo izbrani antigen (12).

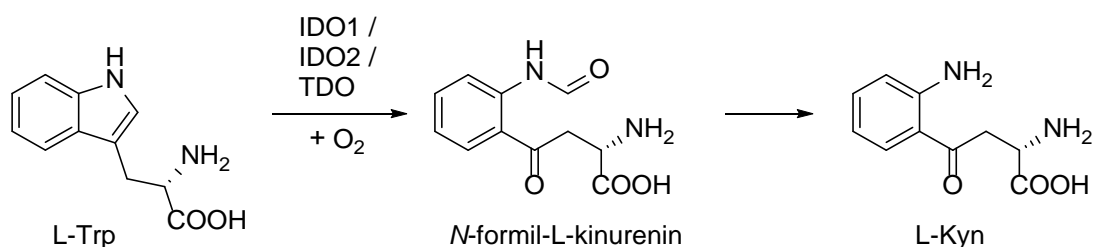
V kompleksni mehanizem imunske odpornosti rakavih celic so vključene tudi tarče, ki so zanimive za razvoj **malih molekul** (npr. encimi in transportni proteini, ki sodelujejo v kinureninski presnovni poti). Pred biološkimi zdravili imajo male molekule nekatere prednosti. Farmakokinetične lastnosti malim molekulam omogočajo peroralno aplikacijo in boljše prehajanje fizioloških pregrad (npr. krvno-možganska pregrada). Z njimi lahko ciljamo tudi znotrajcelične tarče, ki so velikim biološkim molekulam nedostopne. Lažji je razvoj kliničnih študij, saj so načini formulacije in režimov odmerjanja že dobro uveljavljeni. Slabost bioloških zdravil je imunogenost – sprožijo nastanek protiteles (angl. *Anti-drug antibodies*), kar vodi v hude neželene učinke. Zdravljenje z malimi molekulami je za bolnike

po celem svetu mnogo bolj dostopno zaradi nižje cene. K temu prispevajo cenejši razvoj, cenejše surovine in proizvodnja zdravil. Pri malih molekulah tudi ni potrebe po hladni verigi pri distribuciji in shranjevanju, tudi način aplikacije v obliki tablet namesto infuzij v bolnišnicah je enostavnejši. Pomanjkljivost malih molekul oziroma glavna prednost bioloških zdravil je tvorba visokospecifičnih interakcij z receptorji in visoka jakost delovanja (2,13,14).

1.2 KINURENINSKA PRESNOVNA POT IN MEHANIZEM IMUNOSUPRESIJE

Kinureninska presnovna pot je udeležena v enem izmed najpomembnejših mehanizmov prikritja rakavih celic imunskemu sistemu (15). Zaradi visoke konstitutivne ekspresije v rakavih celicah predstavlja encim indolamin 2,3-dioksigenaza 1 (IDO1) obetavno terapevtsko tarčo za razvoj malih molekul (16). V mikrookolju tumorja se encim nahaja pretežno v rakavih celicah in antigen predstavitevni celicah, natančneje v makrofagih in dendritičnih celicah (2). Poleg tega ima pomembno vlogo tudi v placenti, kjer materi zagotavlja imunsko toleranco do antigenov fetusa (17). Pri bolnikih visoka ekspresija IDO1 korelira s slabo prognozo številnih rakavih obolenj (18).

Začetno in omejujočo stopnjo katabolizma L-triptofana (Trp) katalizirajo hem-vsebujoče dioksigenaze: IDO1, indolamin 2,3-dioksigenaza 2 (IDO2) in triptofan 2,3-dioksigenaza (TDO). Poteče cepitev dvojne vezi v indolnem obroču in vezava molekularnega kisika na mesto cepitve. V drugem koraku sledi hitra hidroliza do L-kinurenina (Kyn), ki poteče spontano ali s pomočjo encima formamidaze (slika 1) (14,19).



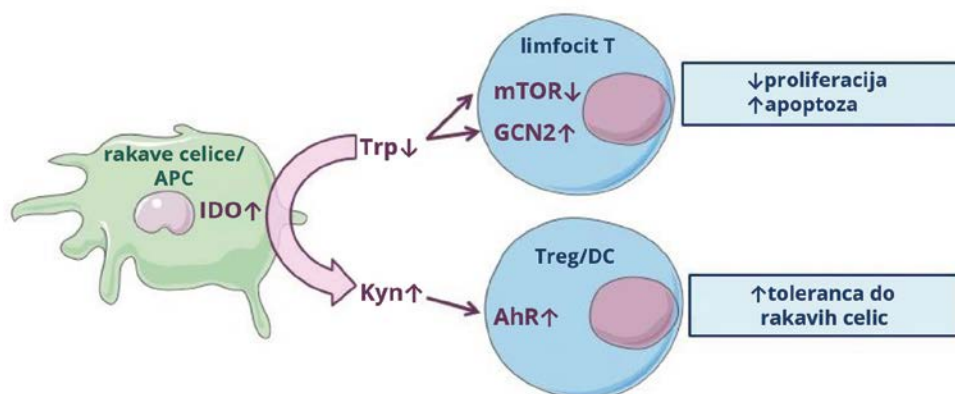
Slika 1: Kinureninska presnovna pot. Prirejeno po (14).

Čeprav vse tri dioksigenaze katalizirajo isto pretvorbo, imajo zelo omejeno strukturno podobnost, različno zastopanost po tkivih in različno substratno specifičnost. Izoformi IDO1 in IDO2 imata zgolj 43 % identičnost zaporedja aminokislin. Pri razvoju encimskih zaviralcev je zato navzkrižno zaviranje vseh encimov redko (20).

Zaradi deregulacije in posledično prekomerne ekspresije IDO1 v mikrookolju tumorja pride do pomanjkanja Trp in povišanja koncentracije presnovka Kyn, kar oboje prispeva k zmanjšanju imunskega odziva. Mehanizem nastanka imunosupresije je mogoč preko treh signalnih poti v efektorskih celicah (17,21).

1. **Aktivacija GCN2:** limfociti T se na znižano koncentracijo Trp v okolici odzovejo z aktivacijo kinaze GCN2, ki v nadaljevanju fosforilira translacijski faktor eIF-2 α . Fosforilirana oblika omeji translacijo proteinov v celici, zaradi česar se limfociti T ustavijo v fazi celičnega cikla G1 in postanejo bolj dovzetni za apoptozo. Vse to vodi v zmanjšan imunski odziv (18).
2. **Zaviranje mTOR:** znižana koncentracija Trp v okolici zavira kinazo GLK1, kar zmanjša delovanje regulatornega proteina mTOR v limfocitih T. To povzroči autofagijo in uničenje limfocitov T (21).
3. **Aktivacija AhR:** ob povišani koncentraciji Kyn v mikrookolju tumorja se le-ta veže na transkripcijski faktor AhR, kar povzroči diferenciacijo naivnih limfocitov T v regulatorne limfocite T (T_{reg}). Te celice so pomembna komponenta v pridobitvi tolerance do rakavih celic (4). V dendritičnih celicah sproži aktivacija AhR nastanek tolerogenih dendritičnih celic z motenim prikazom antigenov na površini (21).

Na sliki 2 so shematsko prikazani vsi trije mehanizmi.



Slika 2: Mehanizem vzpostavitve imunosupresivnega mikrookolja tumorja kot posledica povečane ekspresije IDO1. APC – antigen predstavitvene celice, Treg – regulatorni limfociti T, DC – dendritične celice. Prirejeno po (22).

1.3 INDOLAMIN 2,3-DIOKSIGENAZA 1

1.3.1 Strukturni podatki

Razrešitev prve kristalne strukture leta 2006 je omogočila začetek strukturno podprtega načrtovanja zaviralcev IDO1. V proteinski podatkovni bazi PDB (angl. *Protein Data Bank*) so objavili kristalno strukturo encima v kompleksu z dvema ligandoma, in sicer s 4-fenilimidazolom (PIM, 4PI; PDB ID: 2D0T) in cianidnim ionom (CN^- ; PDB ID: 2D0U) (23). Aktivno mesto encima sestavlja velik **lipofilni žep A** s prostetično skupino **hem**, ključno za katalitično delovanje. Vhod v aktivno mesto predstavlja **lipofilni žep B** (24). V zadnjem desetletju je načrtovanje zaviralcev večinoma osnovalo na strukturi s kokristaliziranim 4-fenilimidazolom, ki pa je umeščen samo v žep A.

Od leta 2014 so na voljo strukturni podatki z vezanimi večjimi ligandi, ki zavzamejo oba vezavna žepa: Amg-1 (PKJ, PDB ID: 4PK5) in imidazotiazol (PKL, PDB ID: 4PK6). Ti strukturi imata večji žep A in različne velikosti ter oblike žepa B, kar nakazuje na fleksibilnost aktivnega mesta (25).

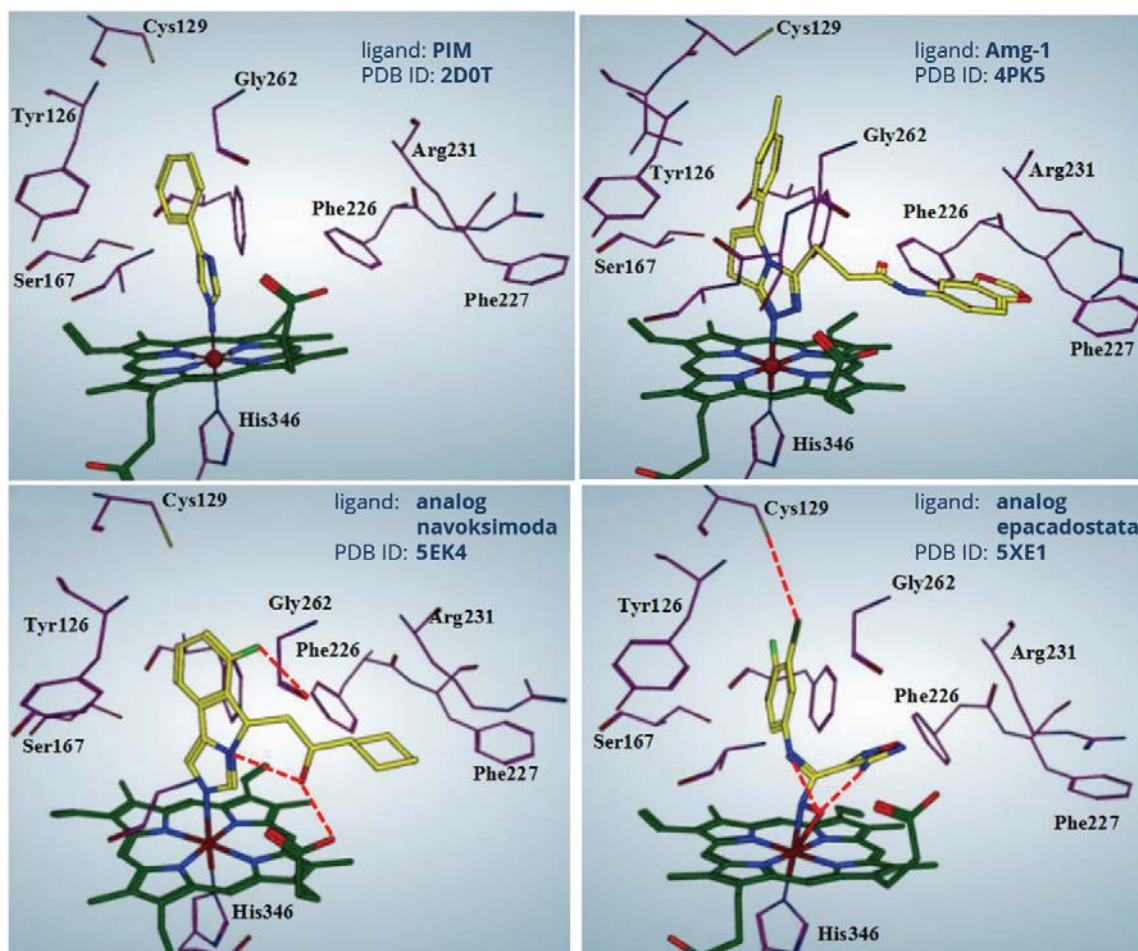
Sledila je objava struktur encima v kompleksu z analogi navoksimoda leta 2016 (PDB ID: 5ETW, 5EK2, 5EK3 in 5EK4). Objava je omogočila identifikacijo ključnih mest za tvorbo vodikovih vezi – močnih medmolekulskih interakcij (26). Pomembni ugotovitvi na tej točki sta, da se **vezavna žepa prilagodita obliki in velikosti zaviralca** ter da je za delovanje pomembna **koordinacijska vez z železovim ionom** hema (20). S primerjavo vseh znanih zaviralcev je bil ob pomoči kristalografskih podatkov postavljen farmakoforni model, po katerem naj bi idealni zaviralec vseboval naslednje elemente:

- aromatski obroč z vsaj dvema obročema za vezavo v žep A,
- atom s prostim elektronskim parom, ki lahko tvori koordinacijsko vez z železovim ionom hema (najpogosteje dušik iz heterocikla ali hidroksilamin),
- skupine, ki tvorijo Van der Waalove interakcije in vodikove vezi v žepu B (27).

Vsi ti podatki so bili na voljo do začetka našega *in silico* načrtovanja zaviralcev. Ker gre za področje intenzivnega raziskovanja, je bilo do zaključka pisanja magistrske naloge objavljenih še več kristalnih struktur, ki prinašajo nova spoznanja o lastnostih vezavnega mesta. Dostopne so strukture s kokristaliziranimi zaviralci, ki so že v fazi kliničnih preizkušanj: epacadostat (PDB ID: 5WN8), ki še dodatno potrjuje pomen vodikovih vezi za vezavo zaviralcev (28) in PF-06840003 (PDB ID: 5WHR), ki kot eden redkih zaviralcev ne tvori interakcije s hemom (29). Najnovejša študija pa raziskuje nov tip zaviralcev, ki se

vežejo na apoencim (encim brez kofaktorja hema) oziroma izpodrinejo hem iz aktivnega mesta ter tako preprečijo delovanje encima (PDB ID: 6AZU, 6AZV, 6AZW) (30).

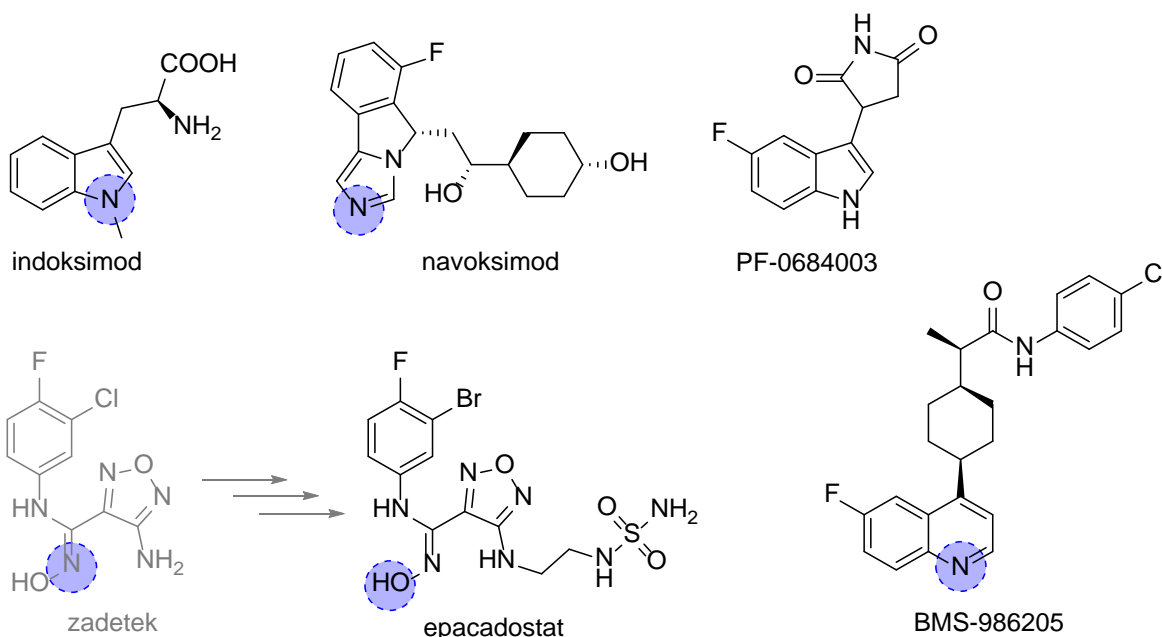
Glavna lastnost encima – konformacijska fleksibilnost je predstavljena na sliki 3 s primerjavo kristalnih struktur encima v kompleksu z različnimi ligandi.



Slika 3: Različni ligandi kokristalizirani z IDO1. Rumena - ligandi, vijolična - ključne aminokisliline, zelena - hem. Prirejeno po (20).

1.3.2 Zaviralci IDO1 v kliničnih testiranjih

Z načrtovanjem zaviralcev IDO1 se ukvarjajo tako v akademskem svetu kot tudi v farmacevtski industriji. Z biokemijskimi testiranjimi je bilo odkritih že več tisoč zaviralcev, ki pa se slabše izkažejo v nadaljnjih *in vivo* testiranjih (20). Kljub temu trenutno potekajo klinična preizkušanja za vsaj sedem različnih spojin, od tega je razkrita struktura petih spojin (31). Vsi ustrezajo zgoraj omenjenemu farmakofornemu modelu, tvorijo pa različne skelete. Njihove strukture so predstavljene na sliki 4.



Slika 4: Strukture zaviralcev IDO1 v kliničnih testiranjih. Z modro je označena skupina, ki tvori koordinacijsko vez z železovim ionom hema. Spojina PF-0684003 ne tvori interakcije z železovim ionom. Predhodnik v razvoju epacadostata je v sivi barvi (ni v kliničnih testiranjih). Prirejeno po (4,31).

Indoximod (1-metil-D-triptofan, D-1MT, NLG-8189), faza II/III, NewLink Genetics. Kot enega prvih zaviralcev IDO1 so uporabili racemno zmes D in L izomerov 1-metiltriptofana. Levosučni izomer je analog substrata Trp in je močnejši zaviralec IDO1. Presenetljivo pa se je desnosučni enantiomer (indoximod) izkazal bolje pri celičnih ter *in vivo* testiranjih, čeprav ima zanemarljivo nizko zaviralno delovanje na IDO1 (32). Mehanizem delovanja še ni v celoti razrešen, med drugimi pa deluje na transport Trp v celice in tako utiša signal za pomanjkanje Trp preko regulatornega proteina mTOR (21,33).

Epacadostat (INCB24360), faza III, $IC_{50} = 72$ nM (34). Podjetje Incyte je s pomočjo rešetanja visoke zmogljivosti svoje knjižnice spojin odkrilo zadetek (slika 4) s skupino hidroksiamidin (ta skupina tvori interakcijo z železovim ionom hema). Zadetek je že imel jakost zaviralnega delovanja na biokemijskih in celičnih testiranjih v nano območju, ampak slabo biološko uporabnost pri peroralni aplikaciji. Nadaljevali so s študijami odnosa med strukturo in delovanjem z namenom izboljšanja farmakokinetike ob ohranjeni jakosti delovanja. Tako so razvili spojino epacadostat z veliko ugodnejšimi farmakokinetičnimi lastnostmi od prvotnega zadetka (35). Z analizo fizikalno-kemijskih lastnosti ugotovimo, da spojina ni klasična “*drug-like*”. Ima 6 donorjev ter skupno 11 donorjev in akceptorjev vodikovih vezi, kar krši pravila Lipinskega (do 5 donorjev in skupno do 10 donorjev in akceptorjev) (36). Poleg tega ima visoko vrednost polarne površine – 163 \AA^2 , kar krši Vebrovo pravilo (do 140 \AA^2) (37). Kljub temu ima spojina dobro permeabilnost in biološko

uporabnost, saj tvori dve intramolekularni vodikovi vezi (35). Zaradi obsežne mreže vodikovih vezi spojina izkazuje visoko selektivnost do IDO1 v primerjavi z drugimi hemvsebujočimi encimi (IDO2, TDO, CypP450) (4). Presenetljiva je ugotovitev, ki izhaja iz kristalnih struktur, da zadetek tvori koordinativno vez z N atomom, epacadostat pa z O atomom hidrosiamidina. Čeprav sta si strukturno zelo podobna, ta razlika v vezavi še ni pojasnjena (28,38).

Navoksimod faza I, $IC_{50} = 13$ nM (39), NewLink Genetics, Genetech in Roche. Spojina je bila razvita s strukturno podprtim načrtovanjem na osnovi kristalne strukture z ligandom 4-fenilimidazolom (PDB ID: 2D0T). Izboljšanje vezave so dosegli z razširitvijo liganda v žep B (31).

PF-0684003 (EOS-200271), faza I, $IC_{50} = 410$ nM (40), iTeos Therapeutics in Pfizer. Na podlagi kristalne strukture so pokazali, da spojina ne tvori interakcije z železovim ionom hema. Tvori vodikovo vez s propionatom hema, kar pomaga poravnati spojino vzporedno s hemom (29).

BMS-986205 (ONO-7701), faza I/II, $IC_{50} = 2$ nM, Flexus in Bristol-Myers Squibb. V primerjavi z epacadostatom in navoksimodom ima še izboljšane farmakokinetične lastnosti (4). To je tudi eden izmed razlogov, zakaj je pomembno razvijati nove zaviralce z drugačnimi skeleti.

Poleg omenjenih sta v fazi I kliničnih preizkušanj še spojini **KHK2455** in **HTI-1090**, katerih struktura ni razkrita (31).

Še posebej dobro so se zaviralci IDO1 izkazali v kombinacijah z drugimi načini zdravljenja rakavih obolenj. Sinergistično delujejo z radioterapijo in citostatiki, ki določene rakave celice uničijo, določene pa samo poškodujejo. Na površini poškodovanih celic se pojavi mnogo antigenov, ki v normalnih okoliščinah aktivirajo imunski odziv. Zaradi imunosupresivnega mikrookolja pa imunske celice veliko počasneje odstranjujejo poškodovane tumorske celice. Z zaviranjem IDO1 premagamo toleranco do rakavih celic in izboljšamo učinkovitost kemoterapije. Prav tako so opazili sinergistične učinke v kombinaciji z drugimi imunoterapevtiki. Rakave celice se namreč zelo hitro prilagodijo in poiščejo nove poti za doseganje lokalne imunosupresije. Pri tem so mnogo manj uspešne, če hkrati delujemo na dve tarči (17).

1.3.3 Težave pri načrtovanju novih zaviralcev IDO1

Glavna težava pri odkrivanju novih zaviralcev so lažno pozitivni rezultati biokemijskih vrednotenj, saj veliko spojin dosega zaviralno delovanje na IDO1 preko nespecifičnih mehanizmov. Za uspešen prehod iz *in vitro* na *in vivo* nivo raziskav se je potrebno takšnim spojinam izogibati (41).

Težave povzročajo spojine s promiskuitetnimi lastnostmi, za katere je zaradi kemijske reaktivnosti značilna nespecifična vezava na različne makromolekule in interferenca pri biokemijskih testnih sistemih. Izognemo se jim s filtriranjem knjižnice pred začetkom virtualnega rešetanja. Težje pa se izognemo spojinam, ki oksidirajo železo iz Fe^{2+} v Fe^{3+} (angl. *Redox cycling compounds*). Takšne spojine dajejo pri biokemijskih testih lažno pozitivne rezultate, saj za zaviranje delovanja encima ni potrebna specifična vezava v aktivno mesto, ampak je dovolj že oksidacija železa. Encim IDO1 je občutljiv na redoks potencial in aktiven le v primeru, ko je železov ion v reducirani (Fe^{2+}) obliki (41).

Za izogibanje lažnim rezultatom je pomembna zasnova testa za biokemijsko vrednotenje. Z dodatkom detergenta preprečimo agregacijo spojin, slabo topnost premagamo z dodatkom topila DMSO, s pomočjo reducentov pa preprečimo avtooksidacijo hema. Test na osnovi merjenja fluorescence omogoča bolj specifično kvantifikacijo produkta encimske reakcije kot test na osnovi merjenja absorbance (42,43).

Nekateri programi za strukturno podprto načrtovanje makromolekulo obravnavajo rigidno in ne upoštevajo fleksibilnosti aktivnega mesta, ki je dokazana s kristalografskimi podatki za encim IDO1 (41). Boljše rezultate virtualnega rešetanja lahko pričakujemo pri uporabi programov, ki fleksibilno obravnavajo ligand in makromolekulo.

Epacadostat je kazal izvrstne rezultate v fazi II kliničnih študij, najnovejši rezultati kliničnih študij na večjem številu bolnikov (faza III) pa kažejo razočaranje in opuščanje študij. Sočasno klinične študije opuščajo tudi za učinkovini BMS-986205 in indoksimod. O tarči IDO1 in natančnejšem mehanizmu imunske odpornosti rakavih celic obstaja še veliko neznank, kar nakazuje na potrebe nadaljnjih bazičnih raziskav (44,45).

2 NAČRT DELA

Namen našega dela je načrtovanje, sinteza in biokemijsko vrednotenje novih zaviralcev IDO1. Čeprav je bilo odkritih že več tisoč zaviralcev IDO1, je potreben razvoj novih zaviralcev z drugačnimi skeleti in bolj ugodnimi farmakokinetičnimi lastnostmi, kar bi lahko omogočilo še zadnji preboj od kliničnih študij do terapevtske uporabe. Naša hipoteza je, da bomo s pomočjo virtualnega načrtovanja odkrili vsaj en nov zaviralec IDO1.

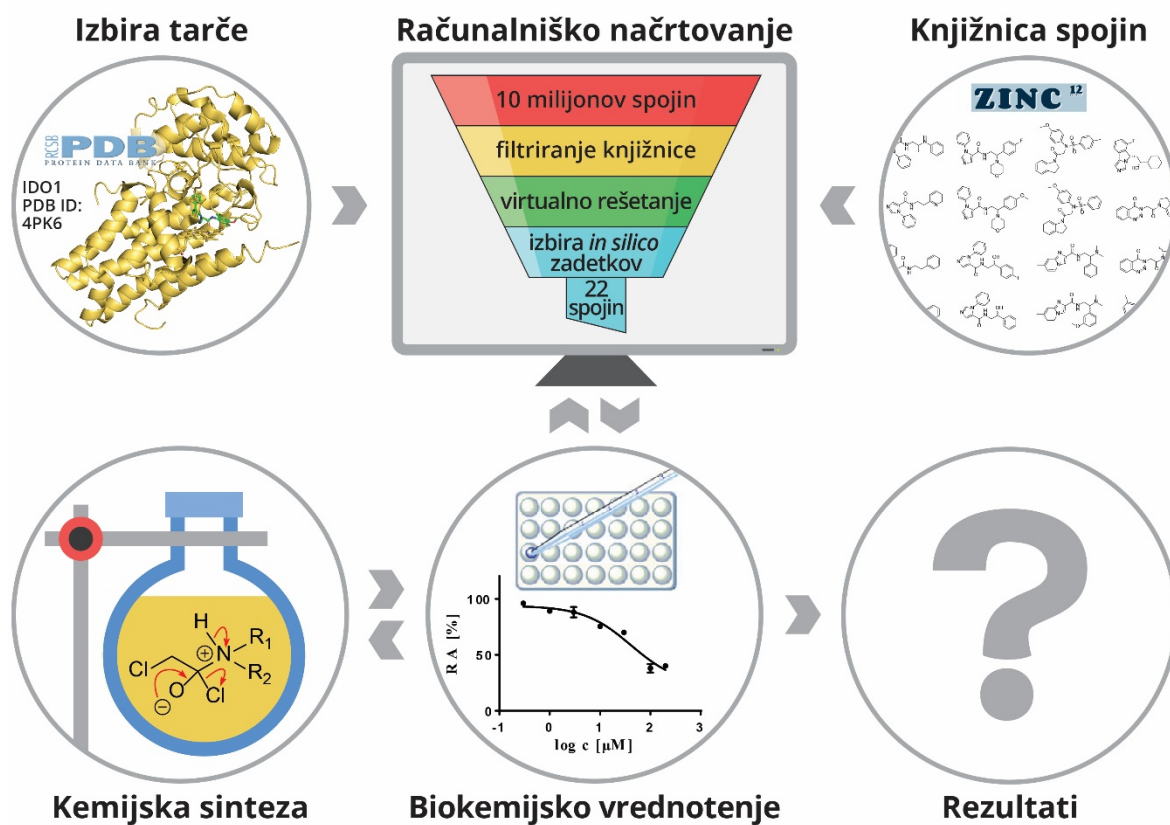
Izhodišče za naše delo bodo znane kristalne strukture v kompleksu z ligandi (PDB ID: 4PK6, 4PK5, 2D0T, 5EK2, 5EK4, 5EK3, 5ETW) in najobetavnejša spojina iz kliničnih preizkušanj, epacadostat. Uporabili bomo prosto dostopno knjižnico spojin ZINC, ki jo bomo obogatili na tri načine:

1. 2D virtualno reševanje na osnovi strukture liganda epacadostata (35),
2. 3D virtualno reševanje na osnovi strukture ligandov 5PF in PKL (25,26) in
3. virtualno reševanje na osnovi strukture ligandov in strukture encima.

Reševanje bomo izvedli s programoma LiSiCA in ProBiSdock, razvitima na Kemijskem inštitutu Ljubljana.

Vizualno bomo pregledali prvih 200 *in silico* zadetkov in pri proizvajalcih naročili najobetavnejše spojine. Njihovo zaviralno delovanje bomo preverili s pomočjo biokemijskega testa na osnovi merjenja fluorescence. Vsem spojinam bomo določili rezidualno aktivnost, najmočnejšim zaviralcem pa še vrednost IC_{50} .

Za nadaljnjo optimizacijo bomo izbrali najmočnejši zaviralec in zanj poizkušali razviti ustrezen sintezni postopek. Postopek bomo uporabili tudi za sintezo analogov. Hkrati bomo analoge izbranega zaviralca poiskali z računalniško optimizacijo. Vse spojine bomo biokemijsko ovrednotili in na podlagi rezultatov opredelili odnos med strukturo in delovanjem. Načrt dela je grafično ponazorjen na sliki 5.



Slika 5: Načrt dela, ki prikazuje vhodne podatke, računalniško načrtovanje, biokemijsko vrednotenje in kemijsko sintezo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

Pri biokemijskem testiranju in sintezi smo uporabljali spojine, reagente in topila različnih proizvajalcev (Sigma-Aldrich, Merck, Enamine, Ambinter, Vitas-M, ChemBridge, Acros Organics, TCI Europe, Carlo Erba, Apollo Scientific, Maybridge, Alfa Aesar) brez predhodne predpriprave.

3.1.2 Knjižnica spojin

Za virtualno reševanje smo uporabili prosto dostopno knjižnico spojin ZINC oziroma njeni podskupini *Drugs Now* (10 milijonov spojin) in *All Clean* (16 milijonov spojin) (46).

3.1.3 Strojna oprema

Delo s programoma LiSiCA in ProBiSdock je potekalo na visoko zmogljivih računalniških grah Kemijskega inštituta Ljubljana z nameščenim operacijskim sistemom Ubuntu.

3.2 METODE

3.2.1 Program LiSiCA

LiSiCA (angl. *Ligand Similarity using Clique Algorithm*) je program za virtualno reševanje na osnovi liganda (47,48).

Za 2D virtualno reševanje potrebujemo strukturo referenčne spojine (v formatu .mol2) in knjižnico spojin (.mol2). Vhodni podatki za 3D virtualno reševanje pa so vsaj ena konformacija referenčne spojine (.mol2) in knjižnica različnih konformacij spojin (.mol2) (47).

Na vsakem koraku program primerja referenčno spojino z eno spojino iz knjižnice oziroma z eno konformacijo spojine iz knjižnice pri 3D reševanju. Spojini najprej prevede v molekulska grafa, kjer vsako oglišče predstavlja natanko en atom. V primeru 2D reševanja stranice predstavljajo kovalentne vezi, pri 3D reševanju pa stranice nimajo pomena. S pomočjo algoritma za iskanje maksimalne klike (angl. *Maximum clique algorithm*) poišče podstrukturo z največ atomi, ki so skupni referenčni spojini in spojini iz knjižnice. Pri tem upošteva tudi vrsto atoma (npr. sp^2 hibridiziran C-atom loči od aromatskega C-atoma). Gre torej za primerjavo podobnosti dveh spojin na nivoju atomov (47).

Podobnost med spojinama izrazi s Tanimotovim koeficientom $T(R, K) = NS / (NR + NK - NS)$, pri čemer je NS število skupnih atomov, NR število atomov, ki sestavljajo referenčno spojino in NK število atomov, ki sestavljajo spojino iz knjižnice. V primeru 3D rešetanja za vsako spojino izbere samo eno konformacijo z najvišjim Tanimotovim koeficientom. Na koncu spojine razvrsti po padajočih vrednostih Tanimotovega koeficienta (47).

Glavna prednost rešetanja na osnovi liganda pred strukturno podprtim rešetanjem je pridobivanje virtualnih zadetkov z različnimi skeleti (angl. *Scaffold hopping*). Program je že bil uspešno eksperimentalno preizkušen pri odkrivanju zaviralcev butirilholinesteraze in zaviralcev encima InhA bakterije *Mycobacterium tuberculosis* (47,48).

3.2.2 Program ProBiSdock

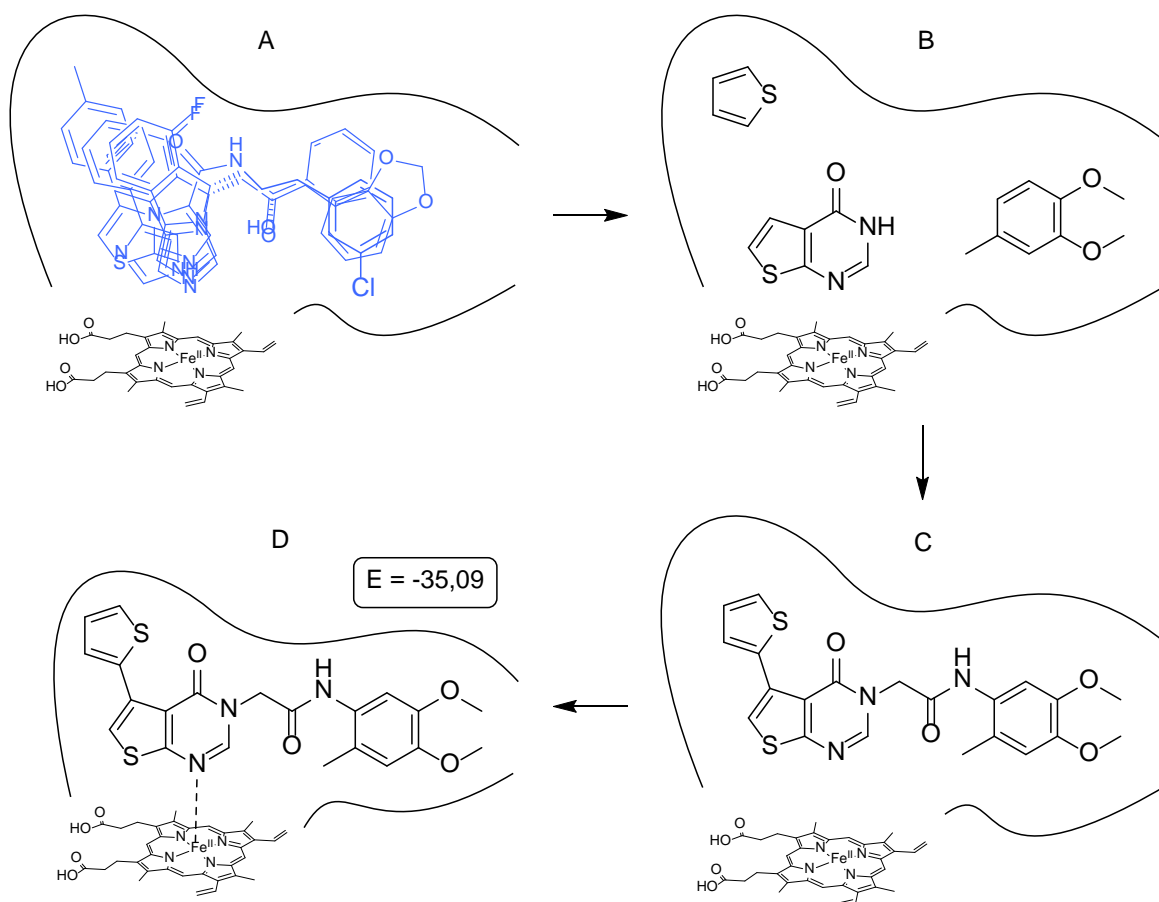
ProBiSdock (angl. *Protein Binding Sites Docking*) je program za virtualno rešetanje na osnovi strukture znanih ligandov iz podobnih vezavnih mest in strukture encima, razvit na Kemijskem inštitutu Ljubljana. Za namen virtualnega načrtovanja novih zaviralcev je bil prvič uporabljen na tarči IDO1 (49).

Vhodni podatki so 3D struktura proteina (v formatu .pdb), velikost in oblika vezavnega mesta proteina (.cent) in knjižnica spojin (.mol2 ali .mol2.gz). Princip delovanja je ponazorjen na sliki 6 (49).

Za izbrani protein program najprej primerja njegovo vezavno mesto z ostalimi vezavnimi mesti proteinov v celotni podatkovni bazi PDB. Iz podobnih vezavnih mest prenese kokristalizirane ligande in jih poravna v vezavno mesto izbranega proteina. Tako pripravi polje ligandov, ki ga predstavljajo koordinate posameznih atomov v prostoru, za katere ni pomembno, kateremu ligandu so v osnovi pripadali in s kakšnimi kemijskimi vezmi so bili povezani (49).

Iz vhodne knjižnice spojin, ki jo želimo sidrati, pripravi fragmente s cepitvijo vrtljivih vezi na vsaki spojin. Rigidne fragmente, daljše od treh atomov, sidra v vezavno mesto in njihove poze oceni na osnovi prekrivanja z atomi polja ligandov. Fragmente z največjim prekrivanjem med sabo poveže s pomočjo povezovalnih elementov (fragmenti krajši od štirih atomov) nazaj do izhodnih spojin iz knjižnice. Nato izvede minimizacijo energije spojine in področja proteina v okolici 8 Å od vezavnega mesta, torej obravnava fleksibilno tako spojino kot makromolekulo. Na koncu oceni vezavno energijo minimizirane konformacije spojine z enako cenilno funkcijo kot za fragmente (prekrivanje atomov spojine

z atomi polja ligandov). Kot izhodni podatek dobimo seznam spojin, razvrščenih po minimiziranih vezavnih energijah, in 3D strukturo minimiziranih kompleksov spojina-makromolekula (49).



Slika 6: Princip delovanja programa ProBiSdock. A: Poravnava obstoječih kokristaliziranih ligandov iz podobnih vezavnih mest in priprava polja ligandov (modra). B: Sidranje rigidnih fragmentov in ocena ujemanja s poljem ligandov. C: Povezava fragmentov s povezovalnimi elementi do izhodnih spojin iz knjižnice. D: Minimizacija energije spojine in proteina ter konča ocena vezavne energije.

Program upošteva fleksibilnost aktivnega mesta, kar je za encim IDO1 ključnega pomena, saj se velikost in oblika vezavnega mesta prilagodita ligandu. To dokazujejo kristalne strukture s kokristaliziranimi različnimi ligandi.

3.2.3 Ostala programska oprema

PyMOL Molecular Graphics System, 2.1.0: program smo uporabili za pripravo 3D slik makromolekule z vezanimi ligandi.

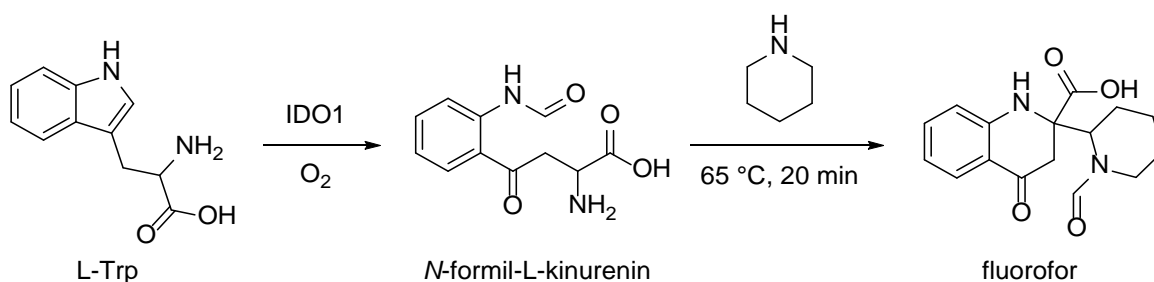
ChemBioDraw Ultra 14.0: program smo uporabili za poimenovanje in risanje spojin. Pri risanju smo uporabili stil oblikovanja *ACS Document 1996*.

GraphPad Prism 6.01: program smo uporabili za nelinearno regresijo in določanje vrednosti IC_{50} rezultatom biokemijskega testiranja.

3.2.4 Biokemijsko testiranje

Kupljenim zadetkom virtualnega rešetanja in sintezno pridobljenim spojinam smo biokemijsko določili zaviralno delovanje na encimu rhIDO1 z uporabo modificirane metode opisane v literaturi (42). V primerjavi z ostalimi ima visoko občutljivost in je preprosta za izvedbo.

Metoda temelji na razgradnji L-Trp do *N*-formil-L-kinurenina, ki nato reagira s piperidinom do fluorofora, kot je ponazorjeno na sliki 7. Aktivnost encima je proporcionalna izmerjeni intenziteti fluorescence (42,50).



Slika 7: Princip določevanja aktivnosti encima s pomočjo merjenja intenzitete fluorescence (prirejeno po (42,50)).

Za izvedbo testa smo v vdolbinice mikrotitrne plošče odmerili:

- natrijev askorbat (10 μ L, 10 mM, nevtraliziran z NaOH),
- metilensko modrilo (10 μ L, 10 μ M),
- govejo katalazo (10 μ L, 100 μ g/mL),
- raztopino spojine v DMSO (2 μ L, 100 μ M, 2 % DMSO),
- raztopino encima rhIDO1 (50 μ L, 5 nM, *Vinci Biochem*) in
- substrat L-Trp (18 μ L, 80 μ M).
- Ploščo smo pokrili in inkubirali 30 min pri 37 °C, da nastane *N*-formilkinurenin.
- Encimsko reakcijo smo ustavili z dodatkom 100 μ L piperidina (80 μ M).

- Ploščo smo znova pokrili in inkubirali 20 min pri 65 °C, da iz *N*-formilkinurenina in piperidina nastane ustrezen fluorofor (slika 7).
- Po 2 h na sobni temperaturi smo izmerili intenziteto fluorescence ($\lambda_{\text{ekscitacije}} = 400$ nm, $\lambda_{\text{emisije}} = 500$ nm).

Aktivna oblika encimaIDO vsebuje železov ion hema v reducirani fero obliki (Fe^{2+}). V katalitskem ciklu se oksidacijsko stanje ne spreminja. Vloga reducentov (natrijev askorbat in metilensko modrilo) je v ohranjanju encimske aktivnosti, saj je encim podvržen avtooksidaciji in posledično spremembi oksidacijskega stanja železovega iona (41).

Vse raztopine smo pripravili v 50 mM fosfatnem pufru (pH 6,5) z dodatkom 0,01 % solubilizatorja Tween 20, ki prepreči tvorbo agregatov spojin in posledično lažno pozitivne rezultate. Slabo topnost in obarjanje nekaterih spojin smo izboljšali z dodatkom DMSO. Meritev za vsako spojino smo izvajali v dveh paralelah. V slepem preizkusu smo namesto raztopine spojine v DMSO dodali samo DMSO. Za pozitivno kontrolo smo uporabili znani zaviralec 4-fenilimidazol.

Rezidualno aktivnost (RA) smo izračunali iz razmerja intenzitete fluorescence v vdolbinici s spojino proti vdolbinici kontrolne raztopine z DMSO. Spojinam z nizko RA pri 100 μM smo v nadaljevanju določili RA pri 7 ali 8 različnih koncentracijah v razponu od 300 μM do 0,1 μM . S pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism smo z nelinearno regresijo določili vrednost IC_{50} .

3.2.5 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): s pomočjo metode TLC smo spremljali potek reakcij, čistost spojin in izbirali primerno mobilno fazo za kolonsko kromatografijo. Uporabili smo plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck, ki imajo 0,20 mm debelo plast silikagela nanešenega na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm in dodan fluorescenčni indikator. Mobilne faze so navedene pri posamezni spojini. Prisotnost spojin smo detektirali s pomočjo UV svetlobe valovnih dolžin $\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm.

Kolonska »flash« kromatografija: kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje končnih spojin in vmesnih produktov. Za stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm. Mobilne faze so navedene pri posamezni spojini. Pretok mobilne faze smo po potrebi povečali z zračnim nadtlakom.

Reverznofazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): s pomočjo metode HPLC smo določali čistost končnih spojin. Na napravi Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 System (proizvajalec: Thermo Fisher Scientific Inc.) smo uporabili kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 \times 150 mm) pri temperaturi 25 °C. Injicirali smo 5 μL raztopine vzorca, raztopljenega v acetonitrilu, s koncentracijo 0,2 mg/mL, hitrost pretoka smo nastavili na 1,0 mL/min in spojine detektirali pri valovni dolžini 280 nm. Mobilna faza A je bila sestavljena iz 0,1 % TFA (V/V) v vodi, mobilna faza B pa iz acetonitrila. Uporabili smo gradientno elucijo (delež mobilne faze B): 0–12 min, 10 %–90 %; 12–14 min, 90 %; 14–15 min, 90 %–10 %.

3.2.6 Spektroskopske metode

Jedrski magnetna resonanca (NMR): metodo NMR smo uporabili za identifikacijo in preverjanje čistosti spojin. Uporabili smo spektrometer Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranem topilu DMSO- d_6 ali CDCl_3 z dodanim internim standardom (tetrametilsilan). Kemijske premike (δ) smo podali v ppm, relativno na interni standard. Oblike vrhov smo opisali s standardnimi izrazi za singlet (s), dublet (d), dublet dubleta (dd), triplet (t) in multiplet (m). Za obdelavo spektrov smo uporabili program MestRe-C 4.5.6.0 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

Masna spektrometrija (MS): metodo smo uporabili za potrditev identifikacije spojin. Vmesnim spojinam smo posneli masni spekter s tehniko ESI na spektrometru Advion Expression CMSL na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Končnim spojinam pa smo posneli masni spekter s tehniko ESI HRMS na spektrometru ExactiveTM Plus Orbitrap Mass Spectrometer na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Infrardeča spektroskopija (IR): delež odbite svetlobe v srednjem IR območju smo uporabili za potrditev identifikacije. Končnim spojinam smo s tehniko ATR posneli IR spekter na spektrofotometru FT-IR Thermo Nicolet, model Nexus s programsko opremo Omnic E.S.P. 5.2. na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.2.7 Določanje talilnega intervala

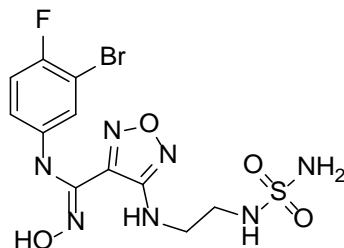
Talilni interval smo za končne spojine določevali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico. S pomočjo mikroskopa smo določili tudi izgled spojin (obliko kristalov oziroma amorfnost).

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 RAČUNALNIŠKO NAČRTOVANJE

4.1.1 2D virtualno rešetanje na osnovi liganda (LiSiCA)

Kot referenčno spojino smo izbrali epacadostat (slika 8), najbolj obetaven zaviralec IDO1 v kliničnih študijah (28).



Slika 8: Epacadostat

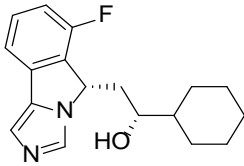
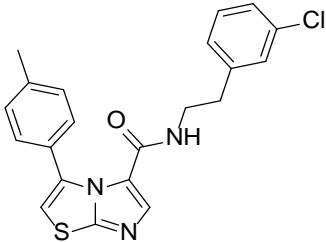
Uporabili smo prosto dostopno knjižnico spojin *ZINC Drugs Now*, ki je na začetku vsebovala okrog 10 milijonov spojin. Iz knjižnice smo s filtriranjem odstranili spojine s promiskuitetnimi lastnostmi. Zanje je značilna nespecifična vezava na različne makromolekule in interferenca pri biokemijskih testnih sistemih. Znane so pod imenom PAINS (angl. *Pan Assay Interference Compounds*) (43).

Po koncu rešetanja smo rezultate s pomočjo Python skripte pretvorili v tabelo, ki vsebuje ZINC ID in strukture spojin, razvrščenih po padajočem Tanimotovem koeficientu. Rezultate smo vizualno pregledali, vendar se nismo odločili za naročilo in biokemijsko vrednotenje nobene spojine.

4.1.2 3D virtualno rešetanje na osnovi liganda (LiSiCA)

V proteinski bazi podatkov PDB smo poiskali vse ligande, kokristalizirane z encimom IDO1 (objavljene do septembra 2016). Izmed njih smo za referenčno spojino virtualnega rešetanja izbrali liganda 5PF z nižjo vrednostjo IC₅₀ in PKL z višjo vrednostjo vendar z drugačnim skeletom in večjo pokritostjo vezavnega mesta (preglednica I).

Preglednica I: Referenčni spojini za virtualno rešetanje na osnovi liganda in njuni vrednosti IC₅₀

Struktura in koda liganda	<p>5PF</p> 	<p>PKL</p> 
PDB ID	5EK4	4PK6
IC ₅₀	19 nM (26)	1900 nM (25)

Iz kristalne strukture smo s programom PyMOL izvozili vsak ligand posebej v obliki .pdb in datoteko pretvorili v obliko .mol2 z uporabo programa Open Babel 2.4.0. Vsako od tako pripravljenih bioaktivnih konformacij ligandov smo uporabili kot referenčno spojino v programu LiSiCA.

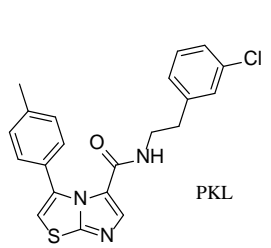
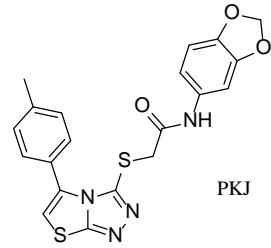
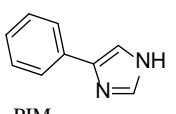
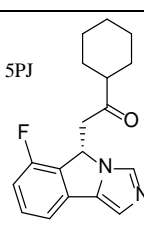
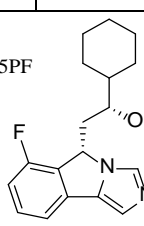
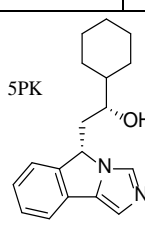
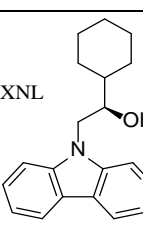
Knjižnico ZINC *All Clean*, ki je vsebovala okrog 16 milijonov spojin, smo filtrirali na podlagi prisotnosti težkih kovin, molske mase, porazdelitvenega koeficienta, topnosti, tvorbe agregatov in vsebnost promiskuitetnih funkcionalnih skupin. Nato smo za vsako spojino pripravili do največ 300 konformacij, z vključenimi različnimi stereoizomeri. Dobljena knjižnica je vsebovala okrog 10,5 milijonov različnih spojin, s povprečno 228 konformacijami na spojino. Zaradi velikosti smo jo razdelili na 20 delov in jo sočasno reševali na 20 različnih strežnikih.

Po koncu smo vse rezultate iz različnih strežnikov združili in jih s pomočjo Python skripte pretvorili v tabelo, ki vsebuje ZINC ID in strukture spojin, razvrščenih po padajočem Tanimotovem koeficientu. Vizualno smo pregledali po 100 najvišje uvrščenih spojin za vsako rešetanje posebej. Med rezultati rešetanja na osnovi liganda 5PF nismo našli spojin z možnostjo vezave na hem in zato nismo izbrali nobene spojine. Pri rešetanju na osnovi liganda PKL pa smo izbrali 8 strukturno najbolj raznolikih spojin. Le eno od teh pa je bilo mogoče naročiti pri proizvajalcu in biokemijsko ovrednotiti njeno zaviralno delovanje.

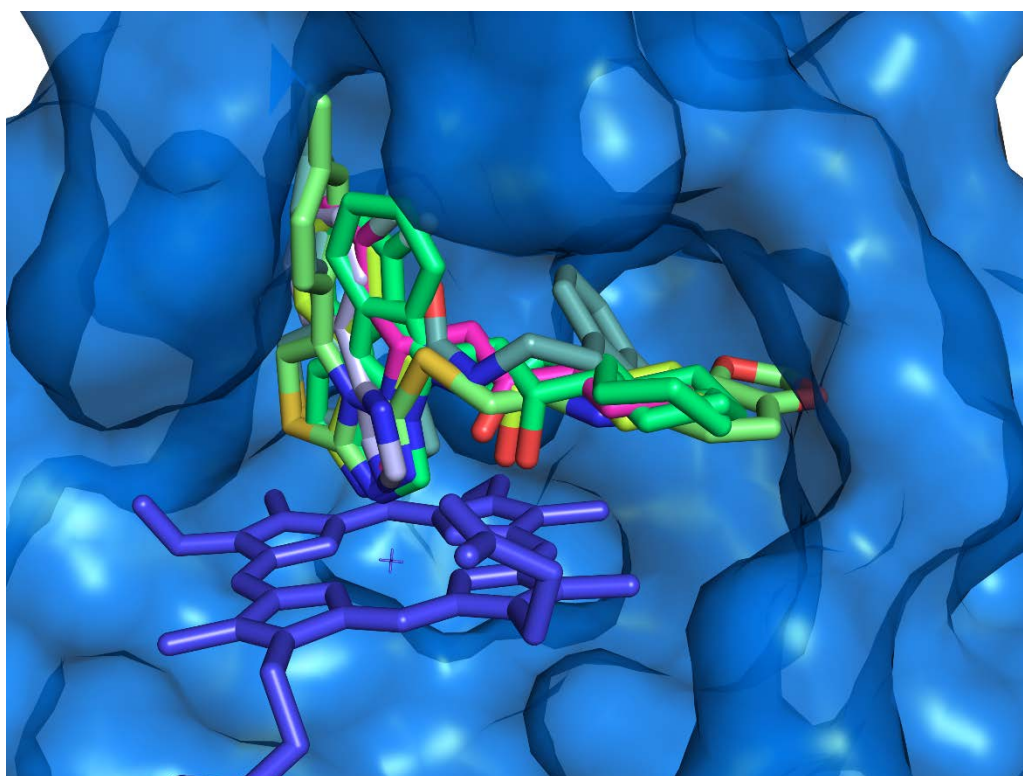
4.1.3 Virtualno rešetanje na osnovi strukture znanih ligandov in strukture encima (ProBiSdock)

Uporabili smo verigo A encima 4PK6 iz proteinske baze PDB. S pomočjo programa smo iz podobnih vezavnih mest v celotni bazi PDB poiskali še ostale kokristalizirane ligande. Vsi izbrani ligandi so bili kokristalizirani z encimom IDO1 (preglednica II).

Preglednica II: Strukture ligandov, uporabljenih za pripravo polja ligandov.

Struktura in koda liganda	 PKL	 PKJ	 PIM	
PDB ID	4PK6	4PK5	2D0T	
Struktura in koda liganda	 5PJ	 5PF	 5PK	 XNL
PDB ID	5EK2	5EK4	5EK3	5ETW

V nadaljevanju smo ligande prenesli in poravnali v vezavno mesto encima (PDB ID: 4PK6). Na ta način smo pripravili polje ligandov – referenco za cenilno funkcijo programa ProBiSdock (slika 9).



Slika 9: Superponirani ligandi v aktivnem mestu encima IDO1 (PDB ID: 4PK6). Del površine encima je predstavljen z modro barvo, prostetična skupina hem je palični model v temno modri barvi, ligandi pa so palčke v različnih barvah odvisnih od tipa atoma.

Iz knjižnice konformacij spojin, ki smo jo že uporabili kot vhodno knjižnico pri 3D rešetanju s programom LiSiCA, smo naključno izbrali približno en milijon različnih spojin. Zadostovala je zgolj ena konformacija za vsako spojino, saj smo konformacijski prostor raziskali med sidranjem. Spojine smo nato reševali s programom ProBiSdock. Za hitrejši potek računanja smo knjižnico razdelili na 10 delov in sočasno zagnali program na 10 strežnikih.

Značilnost encima IDO1 je fleksibilnost vezavnega mesta, ki se prilagodi obliki in velikosti liganda. Pri načrtovanju zaviralcev smo se zato osredotočili na program ProBiSdock, ki pri minimizaciji energije upošteva dvoje: fleksibilnost liganda in vezavnega mesta encima.

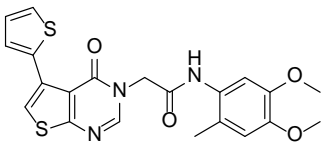
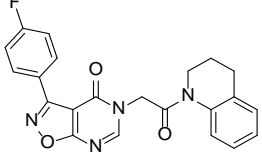
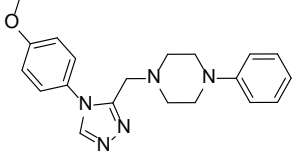
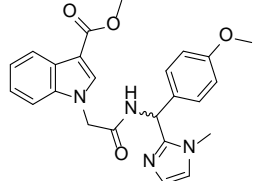
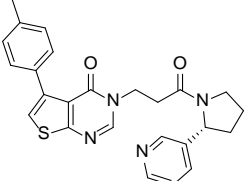
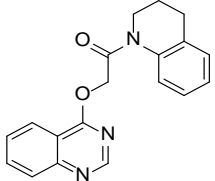
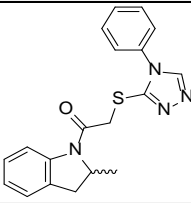
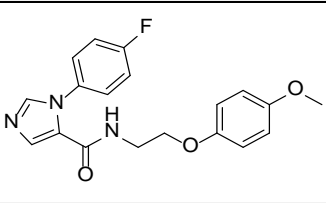
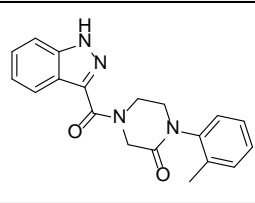
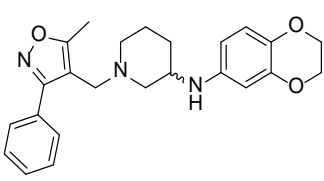
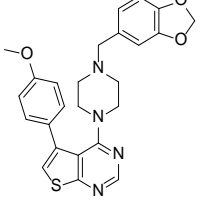
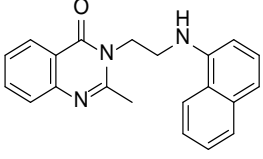
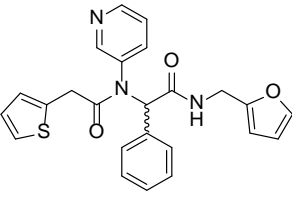
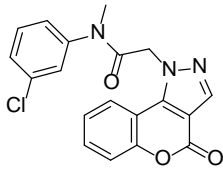
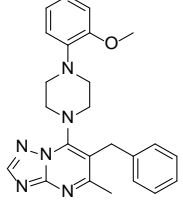
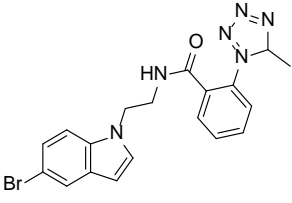
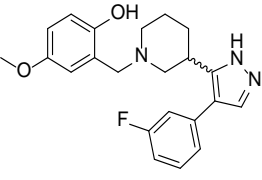
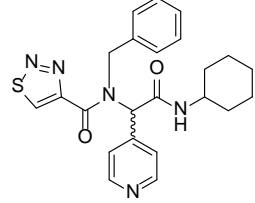
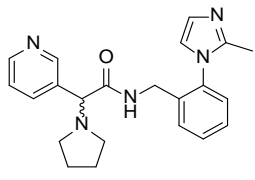
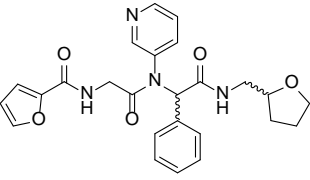
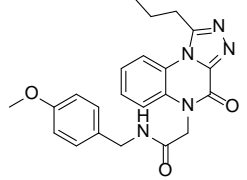
Po koncu računanja smo združili rezultate iz vseh desetih strežnikov in jih pretvorili v tabelo, ki vsebuje ZINC ID, strukturo spojine in vezavno energijo. Spojine smo razporedili po naraščajoči energiji in za naslednji korak uporabili prvih 200 spojin z najnižjo vezavno energijo. Poleg energije smo kot končni rezultat dobili tudi minimizirano 3D konformacijo vsake spojine. Tako smo vizualno pregledali način sidranja v aktivno mesto encima s pomočjo programa PyMOL za prvih 200 *in silico* zadetkov. Pri pregledu spojin smo upoštevali, da:

- spojina vsebuje skupino, ki omogoča interakcije s hemom,
- spojina vsebuje aromatsko jedro, ki omogoča π - π interakcije v žepu B,
- spojina ni problematična z vidika topnosti (npr. ima bazično skupino) – pomembno pri biokemijskem testiranju,
- imajo izbrane spojine različne skelete in da
- sinteza spojine ni prezapletena ter je izvedljiva v nekaj stopnjah.

S stališča kemijske sinteze smo kot nezaželeno skupino označili tioeter, ki je bila med zadetki relativno pogosta. Referenčni ligandi so namreč skupaj vsebovali tri žveplove atome, algoritem programa pa spojine ocenjuje na podlagi ujemanja vrste in koordinat atomov.

Izbor spojin smo z upoštevanjem navedenih kriterijev skrčili iz 200 na 57, od česar so imeli proizvajalci na zalogi 34 spojin (zalogo smo preverili na njihovih spletnih straneh). Končno smo uspešno naročili in prejeli 21 spojin (preglednica III), katerim smo biokemijsko ovrednotili zaviralno delovanje.

Preglednica III: Ožji izbor spojin iz rezultatov virtualnega rešavanja s programom ProBiSdock. Za vsako spojino je navedena koda proizvajalca, pri katerem smo spojino naročili za potrebe biokemijskega testiranja.

		
Enamine Z63812922	Mcule E898-0045	ChemBridge 25459728
		
Enamine Z169829172	Enamine Z167460886	Enamine Z18537775
		
Enamine Z18847349	Enamine Z109753668	ChemBridge 8201995
		
ChemBridge 26961881	Ambinter Amb1205454	ChemBridge 5789137
		
Ambinter Amb9103248	Ambinter Amb20580783	Ambinter Amb800067
		
Ambinter Amb19147306	ChemBridge 39387219	Ambinter Amb9111919
		
ChemBridge 96162353	Ambinter Amb9101568	Vitas-M STL084642

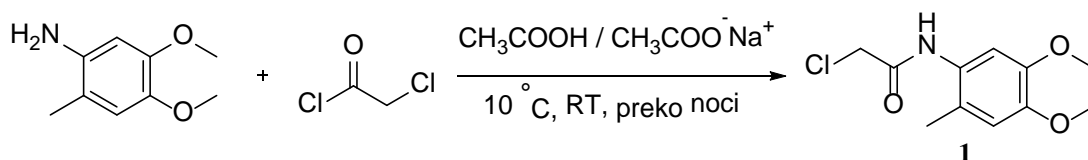
Tekom računalniškega načrtovanja smo spreminjali nastavitve programa. Največ pozornosti smo posvetili nastavitvi *probis_level*, ki definira delovanje cenilne funkcije za oceno vezave fragmentov in spojin. Pri vrednosti 1 uporabi cenilno funkcijo na osnovi polja referenčnih ligandov, ki oceni spojine z upoštevanjem ujemanja njihovih atomov z atomi referenčnih ligandov v vezavnem mestu. Ob nastavitvi 0 pa program uporabi na znanju temelječo cenilno funkcijo (angl. *Knowledge-based scoring function*). Ta oceni vezavno energijo na podlagi statistično pridobljenih informacij o ugodnosti interakcij med ligandi in makromolekulami v celotni bazi PDB.

Pri virtualnem rešetanju smo poleg vrednosti *probis_level* 1.0 z manj uspeha uporabili tudi vrednosti 0.5 in 0.0. V zadnjih dveh primerih smo med najvišje ocenjenimi spojinami dobili zelo različne skelete, ki so vsebovali zanemarljivo malo aromatskih obročev. Glavna težava se je pojavila pri pregledovanju tridimenzionalnih rezultatov sidranja v aktivno mesto, saj so se vse spojine nahajale v vhodnem delu aktivnega mesta in v žepu B, nič pa v žepu A in z možnostjo tvorjenja interakcij s hemom.

4.2 SINTEZA

Na podlagi zadetka biokemijskega testiranja (Enamine Z63812922, spojina **5**) smo se odločili za sintezo te spojine in njenih analogov.

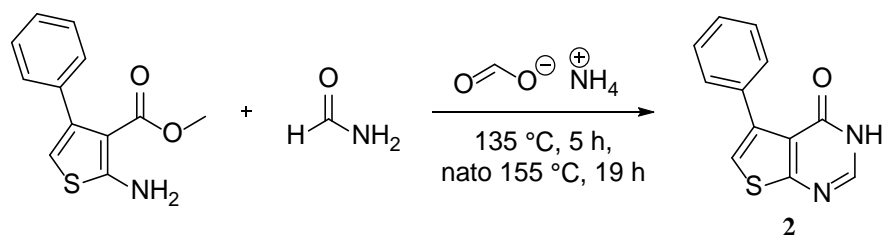
4.2.1 Sinteza 5-feniltieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (**1**)



Sintezni postopek smo prilagodili po literaturi (51). V 100 mL bučko smo natehtali 4,5-dimetoksi-2-metilanilin (420 mg, 2,5 mmol, 1 ekv.) in dodali 10 mL oetne kisline. Zmes smo ohladili na vodni kopeli (10 °C) in med mešanjem po kapljicah dodajali kloroacetilklorid (250 µL, 354 mg, 3,14 mmol, 1,25 ekv.). Po koncu dodajanja smo mešali še 30 minut, nato smo dodali NaOAc (759 mg, 25 mmol, 3,7 ekv.), raztopljen v 10 mL vode. Ob tem se je suspenzija zbistrila. Pri sobni temperaturi (RT) smo mešali še preko noči. Zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z Et₂O (3 x 25 mL). Združene organske faze smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in delno odparili topilo pri znižanem tlaku. Preostanku smo dodali petroleter, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odnučali in posušili z vakuumsko črpalko. Dobljeni produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

Izgled	beli kristali
Molska masa	243,69 g/mol
Tališče	108-111 °C
Izkoristek	79,3 %
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan = 1/1, V/V) = 0,24
MS (ESI+)	m/z za C ₁₁ H ₁₅ ClNO ₃ ⁺ [M+H] ⁺ : izmerjeno 244,1; izračunano 244,1
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ(ppm) = 2,24 (s, 3H, CH ₃); 3,87 (s, 3H, CH ₃); 3,87 (s, 3H, CH ₃); 4,23 (s, 2H, CH ₂); 6,71 (s, 1H, Ar-H); 7,40 (s, 1H, Ar-H); 8,10 (s, 1H, NH)

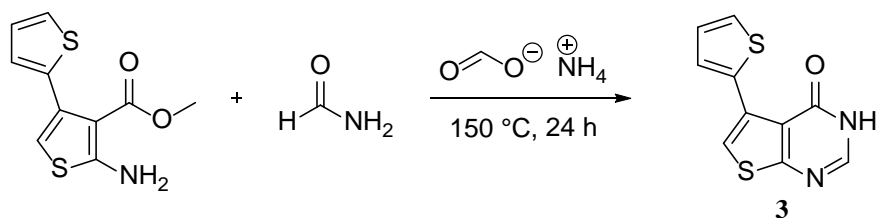
4.2.2 Sinteza 5-feniltieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (2)



Sintezni postopek smo prilagodili po literaturi (52). Metil 2-amino-4-feniltiofen-3-karboksilat (467 mg, 2 mmol, 1 ekv.) in amonijev format (189 mg, 3 mmol, 1,5 ekv.) smo natehtali v 10 mL stekleni reaktor. Dodali smo 3 mL formamida, zatesnili stekleni reaktor in zmes segrevali na oljni kopeli, najprej 5 ur pri 135 °C in nato 19 ur pri 155 °C. Ko smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo, so se izoborili rumeno-rjavi kristali. Dodali smo 10 mL vode, odnučali kristale in jih spirali še s heksanom. Produkt smo prekristalizirali iz etanola in ga uporabili v naslednji stopnji.

Izgled	bledo rumeni kristali
Molska masa	228,27 g/mol
Tališče	192-196 °C
Izkoristek	47,8 %
TLC	R _f (DKM/MeOH = 9/1, V/V) = 0,47
MS (ESI-)	m/z za C ₁₂ H ₇ N ₂ OS ⁻ [M-H] ⁻ : izmerjeno 227,0; izračunano 227,0
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ(ppm) = 7,33-7,42 (m, 3H, Ar-H); 7,53-7,55 (m, 3H, Ar-H); 8,16 (s, 1H, Ar-H); 12,49 (s, 1H, NH)

4.2.3 Sinteza 5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (3)

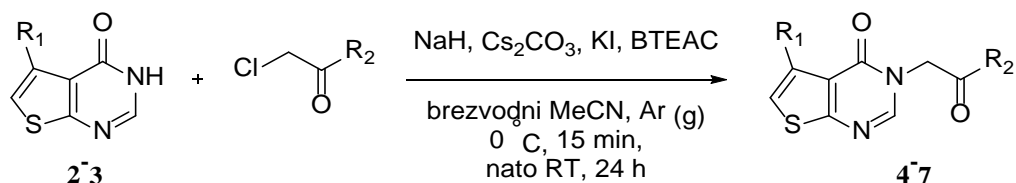


Metil 5'-amino-[2,3'-bitiofen]-4'-karboksilat (479 mg, 2 mmol, 1 ekv.) in amonijev format (189 mg, 3 mmol, 1,5 ekv.) smo natehtali v 10 mL stekleni reaktor. Dodali smo 3 mL formamida, zatesnili stekleni reaktor in zmes segrevali 24 ur na oljni kopeli pri 150 °C.

Reakcijsko zmes smo ohladili, prenesli v lij ločnik, dodali 30 mL vode in ekstrahirali z EtOAc (3 x 30mL). Združene organske frakcije smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in pripravili suhi nanos za kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V.

Izgled	rumeni kristali
Molska masa	234,29 g/mol
Tališče	174-1776 °C
Izkoristek	71,8 %
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V) = 0,20
MS (ESI-)	m/z za C ₁₀ H ₅ N ₂ OS ₂ ⁻ [M-H] ⁻ : izmerjeno 233,0; izračunano 233,0
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ(ppm) = 7,10 (dd, J ₁ = 5,1, J ₂ = 3,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,54 (dd, J ₁ = 5,1, J ₂ = 1,1 Hz, 1H, Ar-H); 7,64-7,65 (m, 2H, Ar-H); 8,16 (s, 1H, Ar-H); 12,56 (s, 1H, NH)
HPLC	t _r = 6,58 min, 95,8 % čistost

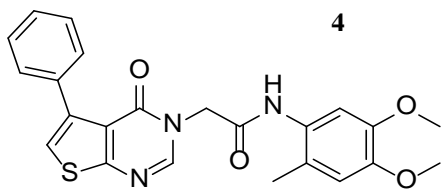
4.2.4 Splošni postopek N-alkiliranja



Spojino 2 oziroma 3 (1 ekv.) smo natehtali v 50 mL bučko in vsebino prepihali z argonom. Pod inertnimi pogoji smo dodali 20 mL brezvodnega MeCN ter suspenzijo hladili na ledeni kopeli. Postopoma smo dodajali disperzijo NaH v mineralnem olju (1,2 ekv.) in za konico spatule katalizatorja faznega prehoda BTEAC (benziltriethylamonijev klorid). Pustili smo mešati še 15 min pri 0 °C, nato pa smo ledeno kopel odstavili in mešali pri sobni temperaturi. Dodali smo KI (1,1 ekv.), derivat 2-kloroacetamida (1,2 ekv.) in Cs₂CO₃ (2,0 ekv.). Po 10 minutah se pojavi bela oborina. Vsebino smo pod inertnimi pogoji pustili mešati čez noč nato pa smo topilo odparili pri znižanem tlaku. Ekstrakcija v liju ločniku in nadaljnje čiščenje je bilo izvedeno specifično za vsako spojino.

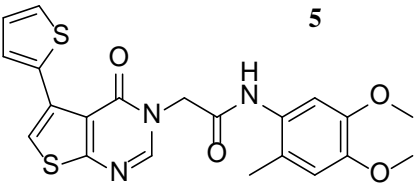
4.2.4.1 Sinteza *N*-(4,5-dimetoksi-2-metilfenil)-2-(4-okso-5-feniltieno[2,3-*d*]pirimidin-3(4*H*)-il)acetamida (**4**)

Sintezo smo izvedli po splošnem postopku *N*-alkiliranja iz spojine **2** (200 mg, 0,88 mmol, 1 ekv.), NaH (25 mg, 1,05 mmol, 1,2 ekv.), KI (160 mg, 0,96 mmol, 1,1 ekv.), spojine **1** (256 mg, 1,05 mmol, 1,2 ekv.) in Cs₂CO₃ (571 mg, 1,75 mmol, 2 ekv.). Pri ekstrakciji smo uporabili 50 mL vode in vodno fazo spirali z EtOAc (2 x 30 mL). V vodni fazi se je oboril produkt, pri katerem nismo zaznali nečistot s pomočjo NMR. Kljub temu smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/*n*-heksan = 2/1, V/V, proti koncu pa smo dodali še 10 % metanola.

Izgled	beli igličasti kristali	
Molska masa	435,50 g/mol	
Tališče	229-233 °C	
Izkoristek	62,1 %	
TLC	R _f (EtOAc/ <i>n</i> -heksan = 9/1, V/V) = 0,31	
HRMS (ESI+)	m/z za C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄ S [M] ⁺ : izmerjeno 435,12436; izračunano 435,12473	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ(ppm) = 2,14 (s, 3H, CH ₃); 3,64 (s, 3H, CH ₃); 3,71 (s, 3H, CH ₃); 4,90 (s, 2H, CH ₂); 6,79 (s, 1H, Ar-H); 6,95 (s, 1H, Ar-H); 7,34- 7,40 (m, 3H, Ar-H); 7,51 (dd, <i>J</i> ₁ = 7,6, <i>J</i> ₂ = 1,3 Hz, 2H, Ar-H); 7,56 (s, 1H, Ar-H); 8,49 (s, 1H, Ar-H); 9,82 (s, 1H, NH)	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ(ppm) = 17,32; 48,23; 55,45; 55,51; 109,35; 113,57; 119,96; 121,59; 123,74; 127,34; 127,46; 128,14; 129,26; 135,13; 138,39; 146,16; 146,23; 149,16; 156,61; 164,86; 165,35	
IR (ATR)	3266, 3040, 1695, 1659, 1616, 1577, 1538, 1519, 1489, 1456, 1401, 1351, 1283, 1225, 1173, 1112, 1036, 1015, 1003, 965, 899, 852, 793, 744, 964, 673, 628, 552, 531 cm ⁻¹	
HPLC	t _r = 8,41 min, 98,9 % čistost	

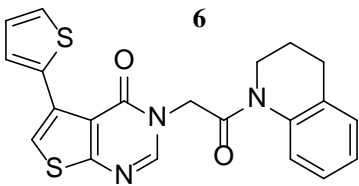
4.2.4.2 Sinteza *N*-(4,5-dimetoksi-2-metilfenil)-2-(4-okso-5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-3(4*H*)-il)acetamida (**5**)

Sintezo smo izvedli po splošnem postopku *N*-alkiliranja iz spojine **3** (183 mg, 0,78 mmol, 1 ekv.), NaH (23 mg, 0,94 mmol, 1,2 ekv.), KI (143 mg, 0,86 mmol, 1,1 ekv.), spojine **1** (220 mg, 0,94 mmol, 1,2 ekv.) in Cs₂CO₃ (510 mg, 1,57 mmol, 2 ekv.). Ekstrakcijo in dodatno čiščenje s kolonsko kromatografijo smo izvedli po enakem postopku kot pri spojini **4**, le da smo uporabili mobilno fazo EtOAc, ki smo ji proti koncu dodali še 10% metanola.

Izgled	beli igličasti kristali	
Molska masa	441,52 g/mol	
Tališče	206-209 °C	
Izkoristek	26,0 %	
TLC	R _f (EtOAc) = 0,32	
HRMS (ESI+)	m/z za C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₄ S ₂ [M] ⁺ : izmerjeno 441,08072; izračunano 441,08115	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ(ppm) = 2,16 (s, 3H, CH ₃); 3,66 (s, 3H, CH ₃); 3,71 (s, 3H, CH ₃); 4,89 (s, 2H, CH ₂); 6,80 (s, 1H, Ar-H); 6,97 (s, 1H, Ar-H); 7,09 (dd, J ₁ = 5,1, J ₂ = 3,7 Hz, 1H, Ar-H); 7,55 (dd, J ₁ = 5,1, J ₂ = 1,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,56-7,59 (m, 1H, Ar-H); 7,69 (s, 1H, Ar-H); 8,48 (s, 1H, Ar-H); 9,73 (s, 1H, NH)	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ(ppm) = 17,31; 48,31; 55,47; 55,51; 109,38; 113,58; 119,49; 121,22; 123,77; 126,25; 127,18; 128,10; 128,12; 130,74; 136,03; 146,21; 146,26; 149,32; 156,66; 165,07; 165,31	
IR (ATR)	3258, 3052, 2934, 1691, 1665, 1612, 1579, 1548, 1519, 1491, 1440, 1397, 1378, 1358, 1242, 1219, 1200, 1177, 1150, 1112, 999, 967, 855, 814, 787, 740, 705, 663, 616, 552, 521 cm ⁻¹	
HPLC	t _r = 8,32 min, 97,7 % čistost	

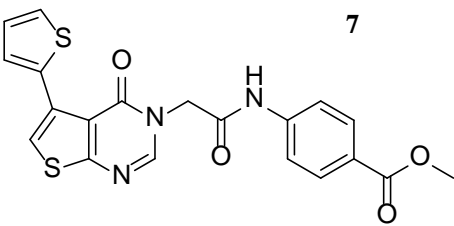
4.2.4.3 Sinteza 3-(2-(3,4-dihidrokinolin-1(2H)-il)-2-oksoetil)-5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (**6**)

Sintezo smo izvedli po splošnem postopku *N*-alkiliranja iz spojine **3** (283 mg, 0,78 mmol, 1 ekv.), NaH (23 mg, 0,94 mmol, 1,2 ekv.), KI (143 mg, 0,86 mmol, 1,1 ekv.), 2-kloro-1-(3,4-dihidrokinolin-1(2H)-il)etan-1-ona (197 mg, 0,94 mmol, 1,2 ekv.) in Cs₂CO₃ (510 mg, 1,57 mmol, 2 ekv.). Pri ekstrakciji smo uporabili 40 mL vode in vodno fazo spirali z EtOAc (2 x 30 mL). Združene organske frakcije smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s pomočjo kolonske kromatografije z mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V. Čisti frakciji smo odstranili topilo pri znižanem tlaku, produkt raztopili v acetonu in postopoma dodajali petroleter, da je zmes postala motna. Ohladili smo jo pri -18 °C in odnučali nastale kristale.

Izgled	beli kristali	
Molska masa	407,51 g/mol	
Tališče	136-140 °C	
Izkoristek	34,5 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V) = 0,35	
HRMS (ESI+)	m/z za C ₂₁ H ₁₈ N ₃ O ₂ S ₂ [M+H] ⁺ : izmerjeno 408,08322; izračunano 408,08349	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ(ppm) = 1,93 (m, 2H, CH ₂); 2,76 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂); 3,76 (m, 2H, CH ₂); 5,04 (m, 2H, CH ₂); 7,08 (t, <i>J</i> = 4,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,16-7,24 (m, 3H, Ar-H); 7,51-7,58 (m, 1H, Ar-H); 7,54 (d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 2H, Ar-H); 7,69 (s, 1H, Ar-H); 8,40 (s, 1H, Ar-H)	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ(ppm) = 23,26; 26,16; 47,98; 59,74; 119,49; 121,33; 121,37; 124,12; 125,96; 126,28; 127,23; 128,17; 128,75; 130,74; 135,96; 137,64; 149,22; 156,55; 165,07; 165,99	
IR (ATR)	3672, 2955, 1683, 1642, 1575, 1492, 1401, 1371, 1273, 1244, 1206, 1179, 1118, 1077, 1002, 948, 849, 816,758, 716, 656, 556 cm ⁻¹	
HPLC	t _r = 10,44 min, 97,0 % čistost	

4.2.4.4 Sinteza metil 4-(2-(4-okso-5-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)acetamido)benzoata (**7**)

Sintezo smo izvedli po splošnem postopku *N*-alkiliranja iz spojine **3** (200 mg, 0,88 mmol, 1 ekv.), NaH (25 mg, 1,05 mmol, 1,2 ekv.), KI (160 mg, 0,96 mmol, 1,1 ekv.), spojine **1** (256 mg, 1,05 mmol, 1,2 ekv.) in Cs₂CO₃ (571 mg, 1,75 mmol, 2 ekv.). Pri ekstrakciji smo dodali 50 mL EtOAc in 5 mL metanola ter organsko fazo spirali z vodo (3 x 15 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in pripravili suhi nanos za kolonsko kromatografijo. Uporabljena mobilna faza je bila EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V.

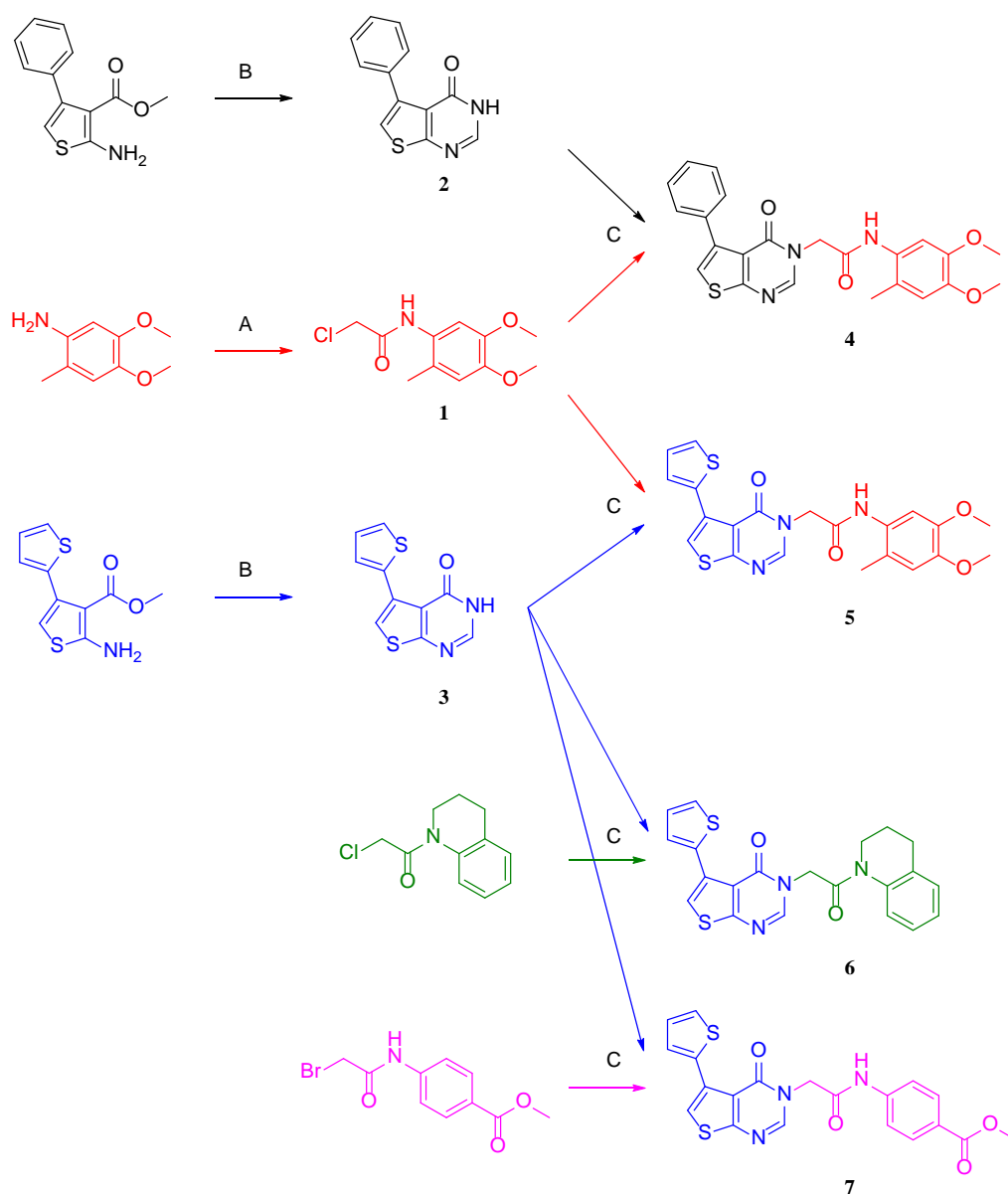
Izgled	belo-rumeni igličasti kristali	
Molska masa	425,48 g/mol	
Tališče	221-224 °C	
Izkoristek	34,4 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V) = 0,25	
HRMS (ESI⁻)	m/z za C ₂₀ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₂ ([M-H] ⁻): izmerjeno 424,04355; izračunano 424,04202	
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ(ppm) = 3,82 (s, 3H, CH ₃); 4,91 (s, 2H, CH ₂); 7,07 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,12, <i>J</i> ₂ = 3,63 Hz, 1H, Ar-H); 7,53 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,12, <i>J</i> ₂ = 1,19 Hz, 2H, Ar-H); 7,56 (dd, <i>J</i> ₁ = 3,61, <i>J</i> ₂ = 1,19 Hz, 2H, Ar-H); 7,72 (d, <i>J</i> = 9,31 Hz, 3H, Ar-H); 7,94 (d, <i>J</i> = 8,85 Hz, 2H, Ar-H); 8,49 (s, 1H, Ar-H); 10,83 (s, 1H, NH)	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ(ppm) = 48,99; 51,90; 118,49; 119,49; 121,43; 124,28; 126,29; 127,21; 128,20; 130,41; 130,75; 135,92; 142,88; 149,19; 156,67; 165,15; 165,71; 165,90	
IR (ATR)	3263, 3062, 2953, 1706, 1673, 1598, 1576 1531, 1488, 1431, 1408, 1373, 1291, 1258, 1207, 1175, 1150, 1112, 1017, 1002, 954, 888, 852, 820, 788, 766, 694, 617, 554, 531 cm ⁻¹	
HPLC	t _r = 9,25 min, 95,8 % čistost	

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

Končne spojine smo sintetizirali iz komercialno dostopnih reagentov (metil 5'-amino-[2,3'-bitiofen]-4'-karboksilat in metil 2-amino-4-feniltiofen-3-karboksilat) v zgolj dveh oziroma treh korakih. Celotna reakcijska shema sinteznih postopkov je predstavljena na sliki 10. Izvajali smo tri različne reakcije:

- *N*-aciliranje s kloroacetilkloridom (A),
- ciklizacijo do tienopirimidinona (B) in
- *N*-alkilacijo (C).



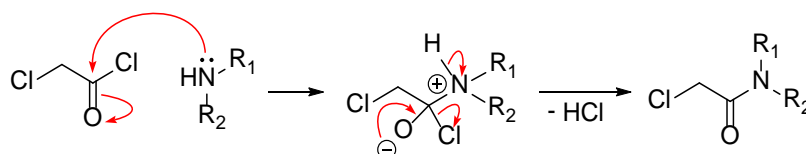
Slika 10: Celotna reakcijska shema sinteznih postopkov. Reakcije so označene s črko.

5.1.1 N-aciliranje s kloroacetilkloridom

V prvi stopnji smo izvedli reakcijo *N*-aciliranja oziroma nukleofilno substitucijo na sp^2 hibridiziranem C-atomu kloroacetilklorida s primarnim ali sekundarnim aminom. Pri tem lahko nastane neželeni stranski produkt tako, da poteče reakcija na sp^3 hibridiziranem C-atomu kloroacetilklorida. Za usmerjanje reakcije na sp^2 hibridiziran atom uporabimo več ukrepov:

- topilo očetna kislina – zmanjša nukleofilnost amina (delno v protonirani, delno v neprotonirani obliki), ki zato reagira z bolj reaktivnim sp^2 C-atomom,
- razmerje med reagenti – v prebitku je kloroacetilklorid, s čimer preprečimo tudi nastanek »dimerov«,
- nižja temperatura – poteče nukleofilna substitucija z bolj reaktivnim sp^2 C-atomom (51).

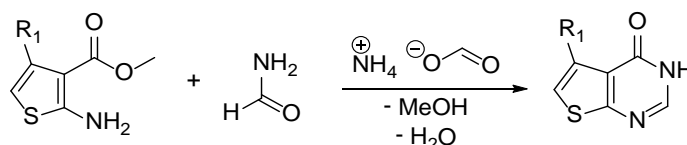
Pri reakciji nastaja močnejša kislina HCl, ki tvori sol s preostalim aminom, kar bi ustavilo reakcijo. Po 30 minutah zato dodamo vodno raztopino NaOAc, da dobimo puferski sistem, ki ohranja ustrezen pH kljub nadaljnjemu sproščanju HCl (51). Na sliki 11 je predstavljen mehanizem reakcije.



Slika 11: Mehanizem *N*-aciliranja s kloroacetilkloridom (prirejeno po (51)).

5.1.2 Ciklizacija do tienopirimidinona

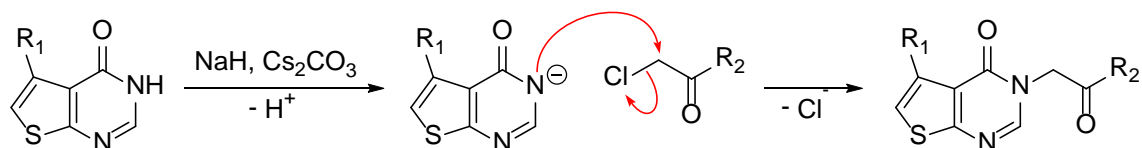
Sintezni postopek smo priredili po literaturi (52). Reakcijo smo izvajali v zatesnjenem steklenem reaktorju tako, da smo komercialno dostopnemu reagentu dodali amonijev format in formamid ter zmes segrevali 24 ur. Pri reakciji smo dobili izkoristka 47,8 in 71,8 %. Predpostavljamo, da gre za reakcijo ciklokondenzacije (53–55), kjer iz β -aminoestra in formamida nastane pirimidinonski obroč (slika 12). Pri reakciji izstopita metanol in voda, amonijev format pa ima verjetno vlogo katalizatorja.



Slika 12: Ciklokondenzacija β -aminoestra in formamida do tienopirimidinona

5.1.3 N-alkilacija

V zadnji stopnji smo izvedli nukleofilno substitucijo (slika 13).



Slika 13: Mehanizem N-alkilacije

Reakcijo izvajamo v brezvodnih pogojih pod argonovo atmosfero, kot topilo uporabimo brezvodni acetonitril. Voda je namreč močnejši nukleofil od pirimidinonskega dušika in bi reagirala z alkilirajočim reagentom do alkohola. Jakost nukleofila povečamo z dodatkom anorganskih baz (NaH, Cs₂CO₃), ki tudi nevtralizirajo nastajajočo HCl. Pred dodatkom NaH zmes ohladimo, ker je reakcija eksotermna. Na reagentu nastane natrijeva sol, ki je slabše topna v acetonitrilu. Zato uporabimo katalizator faznega prehoda BTEAC za pretvorbo v amonijevo sol in tako izboljšamo topnost v organskem topilu. V prebitku imamo derivat 2-kloroacetamida.

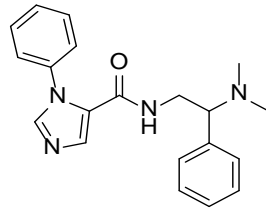
Potrebna bi bila optimizacija reakcije – najprej bi se lotili iskanja najprimernejše baze, ki bi nadomestila trenutno kombinacijo. Poleg tega so izkoristki reakcij dokaj nizki (26,0; 34,3; 34,5 in 62,1 %), v reakcijski zmesi pa smo po zaključku reakcije z metodo TLC še vedno zaznali izhodne reagente.

5.2 REZULTATI IN KOMENTAR BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA

5.2.1 Virtualni zadetki s programom LiSiCA

Izmed rezultatov 3D virtualnega rešetanja na osnovi liganda PKL smo med izbranimi spojinami naročili in biokemijsko vrednotili spojino **8**. V preglednici IV sta poleg proizvajalca in strukture navedena mesto in Tanimotov koeficient – rezultata rešetanja s programom LiSiCA. Z biokemijskim testom na osnovi merjenja fluorescence smo določili rezidualno aktivnost (RA). Merilo za natančnost testa je standardni odklon (SD), ki je bil izračunan na podlagi dveh meritev. RA je bila določena pri koncentraciji spojine 100 μM.

Preglednica IV: Rezultati biokemijskega testiranja za virtualni zadetek s programom LiSiCA

Spojina	Proizvajalec	Struktura	Mesto	Ocena	RA \pm SD [%]
8	Enamine Z68202257		12.	0,625 Tanimotov koeficient	67,6 \pm 0,0

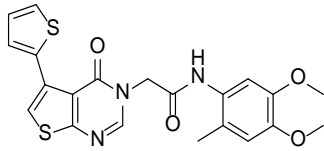
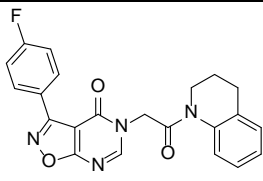
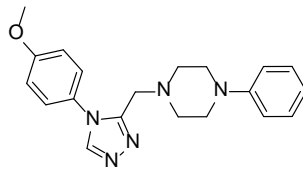
5.2.2 Virtualni zadetki s programom ProBiSdock

Od različnih proizvajalcev smo naročili in biokemijsko ovrednotili 21 spojin. V preglednici V so razvrščene po naraščajoči RA. Mesto in ocena sta rezultata reševanja s programom ProBiSdock.

Spojini **5** in **9** imata pri koncentraciji 100 μ M RA nižjo od 50 %, zato smo jima v naslednjem koraku določili vrednost IC₅₀. Zaradi obetavnih rezultatov smo se odločili za nadaljnjo optimizacijo zadetka **5**.

Pri testiranju se pokaže težava avtofluorescence spojin, kar daje lažno negativne rezultate. Spojine **26-28** imajo RA višjo od 100 % (kar pomeni, da je prišlo do pospešene pretvorbe Trp ali avtofluorescence – zadnje bolj verjetno). Problem bi lahko rešili z izvedbo testa, ki temelji na osnovi merjenja absorbance.

Preglednica V: Rezultati biokemijskega testiranja za virtualne zadetke s programom ProBiSdock

Spojina	Proizvajalec	Struktura	Mesto	Ocena	RA \pm SD [%] IC ₅₀ \pm SD [μ M]
5*	Enamine Z63812922		24.	-35,09	38,0 \pm 8,8 41,5 \pm 2,0
9	Mcule E898-0045		67.	-33,98	46,4 \pm 2,8 30,9 \pm 1,4
10	ChemBridge 25459728		185.	-32,83	57,6 \pm 0,1

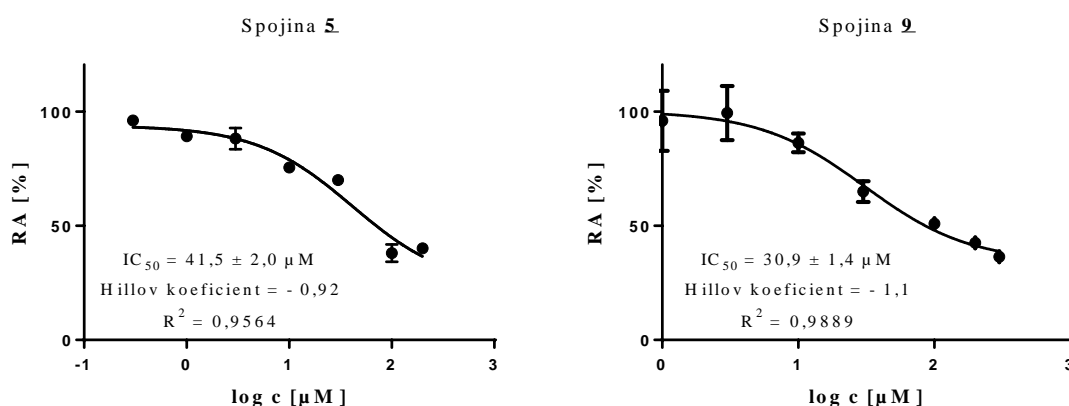
<u>11</u>	Enamine Z169829172		194.	-32,77	63,6 ± 2,6
<u>12</u>	Enamine Z167460886		5.	-36,83	65,9 ± 4,9
<u>13</u>	Enamine Z18537775		66.	-33,99	65,9 ± 6,3
<u>14</u>	Enamine Z18847349		93.	-33,54	73,6 ± 5,5
<u>15</u>	Enamine Z109753668		176.	-32,88	77,9 ± 1,6
<u>16</u>	ChemBridge 8201995		160.	-33,02	84,7 ± 2,2
<u>17</u>	ChemBridge 26961881		89.	-33,58	88,0 ± 6,1
<u>18</u>	Ambinter Amb1205454		123.	-33,24	89,3 ± 5,0

<u>19</u>	ChemBridge 5789137		57.	-34,11	92,9 ± 6,9
<u>20</u>	Ambinter Amb9103248		39.	-34,56	94,7 ± 5,3
<u>21</u>	Ambinter Amb20580783		48.	-34,29	95,3 ± 6,3
<u>22</u>	Ambinter Amb800067		158.	-33,03	95,8 ± 6,2
<u>23</u>	Ambinter Amb19147306		184.	-32,83	97,8 ± 5,7
<u>24</u>	ChemBridge 39387219		98.	-33,49	97,1 ± 7,4
<u>25</u>	Ambinter Amb9111919		8.	-36,29	99,7 ± 4,9
<u>26</u>	ChemBridge 96162353		53.	-34,21	104,09 ± 2,87 avtofluorescenza

<u>27</u>	Ambinter Amb9101568		99.	-33,50	106,0 ± 5,6 avtofluorescenca
<u>28</u>	Vitas-M STL084642		41.	-34,52	125,3 ± 2,0 avtofluorescenca

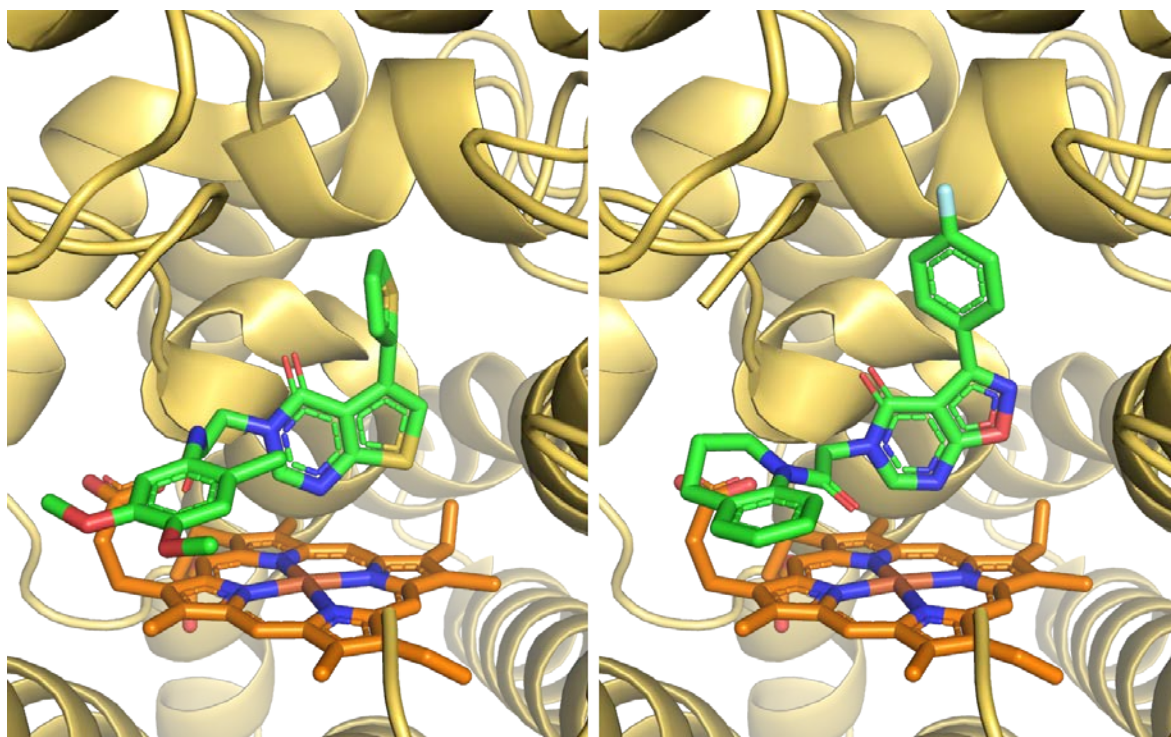
* Spojina 5, uporabljena za prvo testiranje, je bila kupljena pri proizvajalcu Enamine. Istovetnost smo preverili z metodo NMR (ustreza) in čistost z metodo HPLC ($t_r = 8,46$ min, 95,8 % čistost). Kasneje smo isto spojino sintetizirali sami ter jo ponovno biokemijsko ovrednotili (preglednica VII).

Način prilaganja krivulje in določitev vrednosti IC_{50} je predstavljen na sliki 14. Uporabljeni model je bila štiri parametrična logistična krivulja (angl. *Four-parameter dose-response curve*).



Slika 14: Grafa odvisnosti RA od logaritma koncentracije za spojini 5 (levo) in 9 (desno).

Slika 15 prikazuje predpostavljeno vezavo spojin 5 in 9 v aktivno mesto encima. Konformacija spojin je rezultat minimizacije s programom ProBiSdock, struktura encima je pridobljena iz kristalne strukture IDO1 (PDB ID: 4PK6).



Slika 15: Predpostavljen način vezave spojin **5** (levo) in **9** (desno) s programom ProBiSdock. Sekundarna struktura encima je predstavljena z rumeno barvo (PDB ID: 4PK6), hem z oranžno in spojini z zeleno.

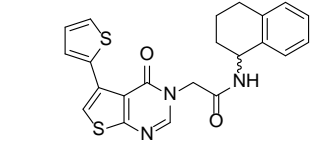
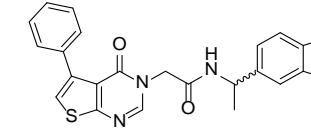
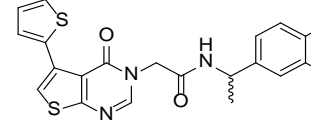
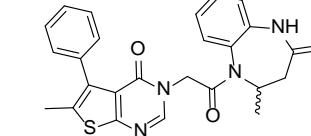
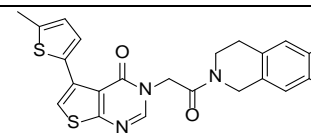
5.2.3 Analogi zadetka **5**

Pri prvem biokemijskem testiranju smo odkrili zadetek **5**, ki je imel vrednost IC_{50} v mikromolarnem območju. Znani zaviralci iz kliničnih preizkušanj imajo vrednost IC_{50} v nanomolarnem območju, zato smo se lotili optimizacije zadetka, in sicer na dva načina:

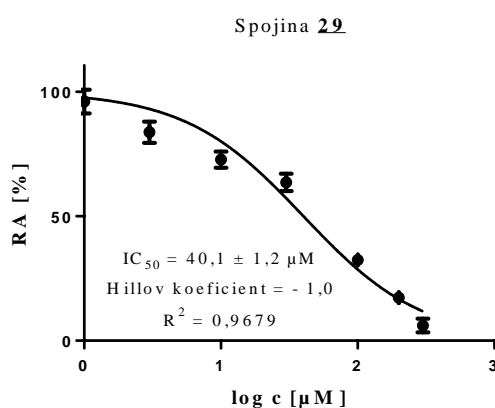
- sintezno – sintetizirali smo različne analoge (rezultati v poglavju 5.2.4),
- računalniško – v celotni knjižnici spojin ZINC smo poiskali analoge spojine **5** z minimalno 70 % podobnostjo in jih prenesli v obliki .mol2 (4231 spojin). To datoteko smo uporabili kot vhodni podatek za novo virtualno reševanje s programom ProBiSdock.

Rezultate novega reševanja smo ponovno vizualno pregledali in naročili 5 spojin (**29-33**). Zaradi delovanja cenilne funkcije programa mesto in ocena nista primerljiva s preglednico V. Uporabili smo namreč drugačno knjižnico spojin, ki je tokrat vključevala samo analoge zadetka **5**. Glede na rezultate spojini **29** in **30** izkazujeta močnejše zaviralno delovanje od zadetka **5** (preglednica VI).

Preglednica VI: Rezultati biokemijskega testiranja za analoge zadetka **5**

Spojina	Proizvajalec	Struktura	Mesto	Ocena	RA \pm SD [%] IC ₅₀ \pm SD [μ M]
29	Enamine Z79606358		36.	-38,68	26,8 \pm 12,2 40,1 \pm 1,2
30	Enamine Z87697953		26.	-39,02	27,8 \pm 10,9
31	Enamine Z64824846		16.	-39,40	51,0 \pm 5,0
32	Enamine Z51263008		123.	-37,12	77,9 \pm 9,7
33	Enamine Z98357314		47.	-38,39	82,7 \pm 7,0

Nelinearna regresija in določitev vrednosti IC₅₀ sta predstavljena na sliki 16. V tem primeru smo izbrali model s standardnim naklonom, ki definira Hillov koeficient = -1.



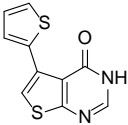
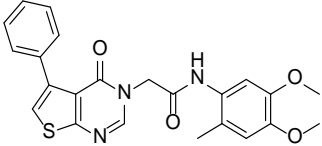
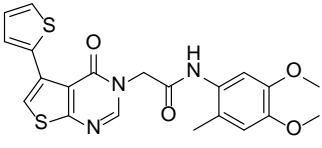
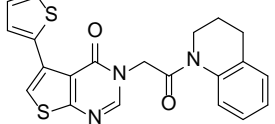
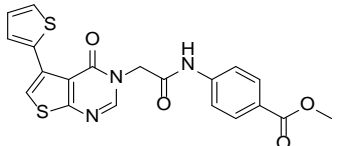
Slika 16: Graf odvisnosti RA od logaritma koncentracije spojine **29**.

5.2.4 Sintezno pridobljene spojine

Odločili smo se za razvoj sintezne poti zadetka **5**. Preverjene in optimizirane reakcije smo uporabili za sintezno pridobivanje različnih analogov in raziskovanje odnosa med strukturo in delovanjem. V preglednici VII so prikazani rezultati biokemijskega testiranja za sintezno pridobljene spojine.

- Spojina **3** predstavlja fragment zadetka **5**, natančneje del, ki tvori interakcije s hemom in se veže v žep A.
- Spojina **4** se od zadetka **5** razlikuje v bioizosterni zamenjavi tiofena za fenil. Za to zamenjavo smo se odločili, ker je bil izhodni reagent cenejši in smo ga uporabili na začetku za preverjanje in optimizacijo reakcij.
- Zadelek **5** smo sicer že naročili pri proizvajalcu in biokemijsko vrednotili, vendar smo s sintezo glede na rezultate HPLC pridobili čistejšo spojino.
- Vežavo v žep B smo raziskovali s spojinama **6** in **7**. Pri spojnini **6** smo spremenili amski del, da je enak kot pri zadetku **9**.

Preglednica VII: Rezultati biokemijskega testiranja za sintezno pridobljene spojine

Spojina	Struktura	RA \pm SD [%]	IC ₅₀ \pm SD [μ M]
3		82,0 \pm 1,1	381,9 \pm 1,4
4		71,6 \pm 5,2	201,1 \pm 1,2
5		71,8 \pm 4,4	§
6		75,9 \pm 5,8	293,3 \pm 1,2
7		65,1*	152,6 \pm 1,5

* Za rezultat smo upoštevali samo eno meritev in SD ni bilo mogoče izračunati.

§ Vrednosti IC_{50} iz meritev ni bilo mogoče določiti. Za spojino **5** bi bilo potrebno ponoviti biokemijsko testiranje, kjer bi sočasno ovrednotili zaviralno delovanje za sintezno pridobljeno in kupljeno spojino, ki je v prvotnem testiranju izkazala močnejše zaviralno delovanje (preglednica V).

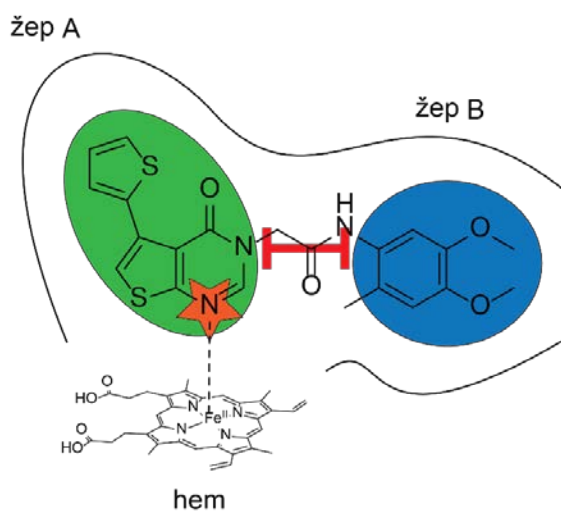
S sintezo analogov zadetka **5** nismo dosegli izboljšanja zaviralnega delovanja, zato bi bilo potrebno poiskati bolj optimalne spremembe v strukturi.

5.2.5 Odnos med strukturo in delovanjem

Zavedamo se, da bi bile potrebne obsežnejše študije z biokemijskim vrednotenjem večjega števila spojin, kar presega obseg te magistrske naloge. Način vezave spojin v aktivno mesto encima bi najbolj nedvoumno potrdili z metodo rentgenske kristalografije. Kljub vsemu lahko potegnemo nekaj zaključkov in preslikamo podatke iz literature (27) na naše rezultate.

Omejimo se na spojine, ki imajo pri koncentraciji 100 μ M RA nižjo od 50 % oziroma na spojine z vrednostjo IC_{50} nižjo od 100 μ M (**5**, **9**, **29** in **30**). Spojine ustrezajo farmakofornemu modelu, ki ga sestavljajo naslednji elementi (slika 17):

- atom s prostim elektronskim parom, ki lahko tvori koordinacijsko vez z železovim ionom hema (oranžna),
- aromatsko jedro, ki se veže v žep A (zelena) – tiofen, benzen in p-fluorobenzen, vezani na osrednji obroč,
- acetamidni distančnik, ki je lahko podaljšan za en C-atom (rdeča),
- substituirani aromatski obroč, ki se veže v žep B (modra).



Slika 17: Predpostavljeni farmakoforni model na primeru zadetka **5** (razlaga v besedilu).

6 SKLEP

Z namenom odkrivanja novih zaviralcev IDO1 smo obogatili prosto dostopno knjižnico spojin ZINC na tri načine: z 2D virtualnim rešetanjem na osnovi strukture liganda epacadostata, s 3D virtualnim rešetanjem na osnovi strukture ligandov 5PF in PKL ter z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture ligandov in strukture encima. Izmed rezultatov virtualnega rešetanja smo izbrali 22 komercialno dostopnih spojin in biokemijsko ovrednotili njihovo zaviralno delovanje. Odkrili smo dva nova zaviralca IDO1, ki imata vrednost IC_{50} nižjo od $100 \mu M$ (spojini **5** in **9**), kar že potrjuje našo hipotezo. Kot uspešnejša metoda se je izkazalo virtualno rešetanje na osnovi strukture znanih ligandov in strukture encima s programom ProBiSdock. Rezultati našega dela bodo objavljeni v znanstveni reviji.

Znani zaviralci iz kliničnih preizkušanj imajo vrednost IC_{50} v nanomolarnem območju, naši zaviralci pa v mikromolarnem območju, zato smo za zadetek **5** izvedli nadaljnjo optimizacijo z računalniškim in sinteznim pristopom. S ponovnim virtualnim rešetanjem analogov zadetka **5** z minimalno 70 % podobnostjo smo odkrili dve spojini (**29** in **30**), ki izkazujeta močnejše zaviralno delovanje od zadetka **5**. Uspešno smo postavili sintezno pot, s katero smo sintetizirali zadetek in tri njegove analoge, vendar z analogi nismo dosegli izboljšanja zaviralnega delovanja. Potrebna bi bila optimizacija kemijskih reakcij, ki imajo dokaj nizke izkoristke. Naslednji korak bi bila sinteza večjega števila analogov zadetka z bolj optimalnimi strukturnimi spremembami, s čimer bi natančneje opredelili odnos med strukturo in delovanjem. Tip spojin na osnovi zadetka **5** omogoča tvorbo koordinacijske vezi z železovim ionom hema, vezavo v lipofilni žep A in lipofilni žep B.

Pri metodi biokemijskega vrednotenja smo naleteli na težavo avtofluorescence spojin, kar je povzročalo lažno negativne rezultate. Problem bi lahko rešili z vpeljavo novih metod vrednotenja zaviralnega delovanja, ali pa bi dobljene rezultate dopolnili z biokemijskim testom na osnovi merjenja absorbance. V nadaljevanju bi lahko najobetavnejšim zaviralcem ovrednotili potencialne protitumorne učinke s celičnimi funkcijskimi testi.

7 LITERATURA

1. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th ed. Elsevier Health Sciences; 2010 40-41.
2. Adams JL, Smothers J, Srinivasan R, Hoos A. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(9):603–21.
3. Hoos A. Development of immuno-oncology drugs—from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(4):235–47.
4. Prendergast GC, Malachowski WP, DuHadaway JB, Muller AJ. Discovery of IDO1 Inhibitors: From bench to bedside. *Cancer Res.* 2017;77(24):6795–811.
5. Yang Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3335–7.
6. Hoos A, Ibrahim R, Korman A, Abdallah K, Berman D, Shahabi V, et al. Development of ipilimumab: Contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin Oncol.* 2010;37(5):533–46.
7. Poole RM. Pembrolizumab: First Global Approval. *Drugs.* 2014;74(16):1973–81.
8. Wang C, Thudium KB, Han M, Wang X-T, Huang H, Feingersh D, et al. In Vitro Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and In Vivo Toxicology in Non-Human Primates. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(9):846–56.
9. American Cancer Society. Cancer Immunotherapy. [Datum dostopa: 21. 5. 2018]; Dostopno na: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy.html>
10. Graff JN, Chamberlain ED. Sipuleucel-T in the treatment of prostate cancer: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid.* 2014;1.
11. Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3520–6.
12. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science (80-).* 2018;359(6382):1361–5.
13. Baker MP, Reynolds HM, Lumicisi B, Bryson CJ. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self/Nonself - Immune Recognit Signal.* 2010;1(4):314–22.
14. Weinmann H. Cancer Immunotherapy: Selected Targets and Small-Molecule Modulators. *ChemMedChem.* 2016;11(5):450–66.
15. Munn DH. Indoleamine 2, 3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(2):220–5.
16. Godin-Ethier J, Hanafi L-A, Piccirillo CA, Lapointe R. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):6985–91.
17. Qian S, Zhang M, Chen Q, He Y, Wang W, Wang Z. IDO as a drug target for cancer immunotherapy: recent developments in IDO inhibitors discovery. *RSC Adv.* 2016;6(9):7575–81.
18. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003;9(10):1269–74.
19. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, et al. The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy. *Front Immunol.* 2018;9(JAN):1–8.
20. Weng T, Qiu X, Wang J, Li Z, Bian J. Recent discovery of indoleamine-2,3-dioxygenase 1 inhibitors targeting cancer immunotherapy. *Eur J Med Chem.* 2017;143:656–69.
21. Platten M, von Knebel Doeberitz N, Oezen I, Wick W, Ochs K. Cancer immunotherapy by targeting IDO1/TDO and their downstream effectors. *Front Immunol.* 2015;6(JAN):1–7.

22. Brochez L, Chevolet I, Kruse V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2017;76:167–82.
23. Sugimoto H, Oda S -i., Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(8):2611–6.
24. Dolušić E, Frédérick R. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors: a patent review (2008 – 2012). *Expert Opin Ther Pat*. 2013 Oct 1;23(10):1367–81.
25. Tojo S, Kohno T, Tanaka T, Kamioka S, Ota Y, Ishii T, et al. Crystal structures and structure-activity relationships of imidazothiazole derivatives as IDO1 inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2014;5(10):1119–23.
26. Peng YH, Ueng SH, Tseng CT, Hung MS, Song JS, Wu JS, et al. Important Hydrogen Bond Networks in Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Design Revealed by Crystal Structures of Imidazoleisoindole Derivatives with IDO1. *J Med Chem*. 2016;59(1):282–93.
27. Röhrig UF, Awad L, Grosdidier A, Larrieu P, Stroobant V, Colau D, et al. Rational design of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *J Med Chem*. 2010;53(3):1172–89.
28. Lewis-Ballester A, Pham KN, Batabyal D, Karkashon S, Bonanno JB, Poulos TL, et al. Structural insights into substrate and inhibitor binding sites in human indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Nat Commun*. 2017;8(1):1693.
29. Crosignani S, Bingham P, Bottemanne P, Cannelle H, Cauwenberghs S, Cordonnier M, et al. Discovery of a Novel and Selective Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO-1) Inhibitor 3-(5-Fluoro-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (EOS200271/PF-06840003) and Its Characterization as a Potential Clinical Candidate. *J Med Chem*. 2017;60(23):9617–29.
30. Nelp MT, Kates PA, Hunt JT, Newitt JA, Balog A, Maley D, et al. Immune-modulating enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apo-form. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;(10):201719190.
31. Cheong JE, Ekkati A, Sun L. A patent review of IDO1 inhibitors for cancer. *Expert Opin Ther Pat*. 2018;28(4):317–30.
32. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res*. 2007;67(2):792–801.
33. Metz R, Rust S, DuHadaway JB, Mautino MR, Munn DH, Vahanian NN, et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology*. 2012;1(9):1460–8.
34. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*. 2010;115(17):3520–30.
35. Yue EW, Sparks R, Polam P, Modi D, Douty B, Wayland B, et al. INCB24360 (Epcadostat), a Highly Potent and Selective Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor for Immuno-oncology. *ACS Med Chem Lett*. 2017;8(5):486–91.
36. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44(1):235–49.
37. Veber DF, Johnson SR, Cheng H, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem*. 2002;45:2615–23.
38. Wu Y, Xu T, Liu J, Ding K, Xu J. Structural insights into the binding mechanism of IDO1 with hydroxylamide based inhibitor INCB14943. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(2):339–43.
39. Mautino MR, Metz RA, Jaipuri F, Waldo J, Kumar S, Marcinowicz-Flick A, et al. Novel specific- and dual- tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors for tumor

- immunotherapy. *Cancer Res.* 2014;74(19 Supplement):1633.
40. Manfred K, Sandra C, Stefano C, Gregory D. Combinations Comprising A Pyrrolidine-2,5-dione IDO1 Inhibitor And An Anti-body. Patent WO2016/181349, 2016.
 41. Röhrig UF, Majjigapu SR, Vogel P, Zoete V, Michielin O. Challenges in the Discovery of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors. *J Med Chem.* 2015;58(24):9421–37.
 42. Tomek P, Palmer BD, Flanagan JU, Fung SPS, Bridewell DJA, Jamie JF, et al. Formation of an N-formylkynurenine-derived fluorophore and its use for measuring indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activity. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(8):2515–24.
 43. Baell JB, Holloway GA. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem.* 2010;53(7):2719–40.
 44. Garber K. A new cancer immunotherapy suffers a setback. *Science (80-).* 2018 May 11;360(6389):588 LP-588.
 45. Vinluan F. Bristol-Myers Latest to Drop IDO Studies in Wake of Incyte Failure [Internet]. [Datum dostopa: 16. 5. 2018]. Dostopno na: <https://www.xconomy.com/new-york/2018/04/30/bristol-myers-latest-to-drop-ido-studies-in-wake-of-incyte-failure/>
 46. Sterling T, Irwin JJ. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model.* 2015;55(11):2324–37.
 47. Lešnik S, Štular T, Brus B, Knez D, Gobec S, Janežič D, et al. LiSiCA: A Software for Ligand-Based Virtual Screening and Its Application for the Discovery of Butyrylcholinesterase Inhibitors. *J Chem Inf Model.* 2015;55(8):1521–8.
 48. Dilip A, Lešnik S, Štular T, Janežič D, Konc J. Ligand-based virtual screening interface between PyMOL and LiSiCA. *J Cheminform.* 2016;8(1):1–5.
 49. Konc J, Lešnik S, Škrlić B, Sova M, Proj M, Knez D, et al. PROTEUS: An Algorithm for Flexible Docking using Protein-Specific Knowledge from the Protein Data Bank. V pripravi.
 50. Tomek P, Palmer BD, Kendall JD, Flanagan JU, Ching LM. Formation of fluorophores from the kynurenine pathway metabolite N-formylkynurenine and cyclic amines involves transamidation and carbon-carbon bond formation at the 2-position of the amine. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2015;1850(9):1772–80.
 51. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S. Farmacevtska kemija III: Vaje in seminarji. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana; 2010 43-47.
 52. Sasmal P, Jaleel M, Rao P, Munikumar M, Bhattacharya M, Kumar N, et al. Novel 4-Oxothienopyrimidinyl Propanoic Acid Derivatives as AMPActivated Protein Kinase (AMPK) Activators. *Lett Drug Des Discov.* 2014;11(6):778–85.
 53. Zhou J. *Synthetic Communications : An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry Facile One-Pot , Multicomponent Synthesis of Pyridines Under Microwave Irradiation.* 2009;(September 2012):1443–50.
 54. Yang J, Shi D, Zhang K, Zhao Z, Qiu F, Bi Y, et al. Efficient Constructions of The Four Different Thienopyrimidinone Skeletons via Various Cyclocondensation of O-Aminothienonitrile with Carbonyl Compounds. *Heterocycles.* 2016;92(5):866–85.
 55. Sendai Fukusokan Kagaku Kenkyūjo. J, Nihon Fukusokan Kagaku Kenkyūjo. D, Zhang K, Zhao Z, Qiu F, Bi Y, et al. *Heterocycles. Vol. 92, Heterocycles : an international journal for reviews and communications in heterocyclic chemistry. Sendai Institute of Heterocyclic Chemistry; 2016 866-885.*