

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**BORIS BRUS**

**DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Odkrivanje novih inhibitorjev trihidroksinaftalen reduktaze in  
17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 1 z virtualnim rešetanjem**

**Ljubljana, 2011**

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**BORIS BRUS**

**DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Odkrivanje novih inhibitorjev trihidroksinaftalen reduktaze in  
17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 1 z virtualnim rešetanjem**

**Discovery of novel trihydroxynaphthalene reductase and 17 $\beta$ -  
hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors by virtual high-  
throughput screening**

**Ljubljana, 2011**

Diplomsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom asist. dr. Sama Turka.

Inhibitorno aktivnost spojin sta testirala dr. Mojca Brusncole-Švegelj, mag. farm z Medicinske fakultete in dr. Štefan Starčević, mag. farm. s Fakultete za farmacijo.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm in asist. dr. Samu Turku, mag. farm za strokovno pomoč, nasvete ter za prijetno in ustvarjalno okolje pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi dr. Mojci Brusncole-Švegelj, mag. farm in dr. Štefanu Starčeviću za testiranje inhibitorne aktivnosti spojin ter ostalim kolegom na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi diplomske naloge.

Velika zahvala gre moji družini in Petri za vso podporo v času študija.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Sama Turka, mag. farm.

Boris Brus

Ljubljana, september 2011

# KAZALO VSEBINE

1	UVOD .....	1
1.1	Iskanje novih zdravilnih učinkovin z računalniškimi metodami .....	1
1.1.1	Filtriranje in priprava knjižnice .....	3
1.1.2	Virtualno rešetanje na osnovi strukture (sidranje).....	5
1.1.3	Virtualno rešetanje na osnovi liganda .....	11
1.1.4	Vizualizacija spojin in makromolekul .....	13
1.2	Trihidroksinaftalen reduktaza iz glive <i>Culvularia lunata</i> .....	14
1.3	17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 .....	16
2	NAČRT DELA .....	20
2.1	Virtualno rešetanje na 3HNR .....	20
2.2	Virtualno rešetanje na 17 $\beta$ -HSD 1 .....	20
3	MATERIALI IN METODE.....	21
3.1	Računalniške metode .....	21
3.2	Testiranje inhibitorne aktivnosti spojin <i>in vitro</i> .....	21
3.2.1	Spektrofotometrično določanje inhibitorne aktivnosti spojin na 3HNR .....	21
3.2.2	Ugotavljanje vpliva na rast in pigmentiranost glive <i>C. lunata</i> .....	22
3.2.3	Določanje inhibitorne aktivnosti spojin na 17 $\beta$ -HSD 1 in 2 .....	23
3.3	Določanje čistosti in istovetnosti spojin .....	25
3.3.1	Jedrska magnetna resonanca (NMR) .....	25
3.3.2	Masna spektroskopija (MS).....	25
4	POSTOPEK DELA.....	26
4.1	Virtualno rešetanje spojin na 3HNR.....	26
4.1.1	Priprava predlog in knjižnice spojin.....	26
4.1.2	Virtualno rešetanje na osnovi liganda .....	27
4.2	Virtualno rešetanje spojin na 17 $\beta$ -HSD 1 .....	29
4.2.1	Priprava knjižnice spojin za sidranje .....	29
4.2.2	Priprava proteina in izbira programa za sidranje.....	30
4.2.3	Izdelava farmakofornih zahtev in validacija metode.....	31
4.2.4	Prvo sidranje spojin v aktivno mesto encima 17 $\beta$ -HSD 1.....	32

4.2.5	Drugo sidranje spojin v aktivno mesto 17 $\beta$ -HSD 1 .....	33
<b>5</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>34</b>
5.1	Rezultati inhibitorne aktivnosti spojin na 3HNR .....	34
5.1.1	Rezultati spektrofotometričnega določanja inhibicije 3HNR.....	34
5.1.2	Rezultati ugotavljanja vpliva spojin na rast in pigmentacijo <i>C. lunata</i> .....	36
5.2	Rezultati inhibitorne aktivnosti na 17 $\beta$ -HSD 1 .....	38
5.3	Rezultati določanja čistosti in istovetnosti najbolj aktivnih spojin .....	46
5.3.1	Aktivne spojine na 3HNR .....	46
5.3.2	Aktivne spojine na 17 $\beta$ -HSD 1.....	47
<b>6</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>49</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b>	Potek virtualnega rešetanja na osnovi strukture in liganda .....	2
<b>Slika 2:</b>	Struktura kumarinskega inhibitorja 17 $\beta$ -HSD 1 v zapisu 2D in SMILES.....	4
<b>Slika 3:</b>	Algoritem programa eHiTS .....	10
<b>Slika 5:</b>	Predloga za virtualno rešetanje na osnovi liganda s programom ROCS .....	13
<b>Slika 6:</b>	Homologni model encima 3HNR glive <i>C. lunata</i> (3HNR_NID) s kofaktorjem NADP (rdeče) in inhibitorjem 4-nitro-inden-onom (modro).....	15
<b>Slika 7:</b>	Pretvorba estrona v estradiol in obratno, pod vplivom 17 $\beta$ -HSD tipov 1 in 2 .....	17
<b>Slika 8:</b>	Kompleks monomerne enote encima 17 $\beta$ -HSD 1 [PDB: 1EQU] z inhibitorjem ekvilinom (modro) in NADP <sup>+</sup> (rdeče). $\alpha$ -vijačnice (vijolično) in $\beta$ -površine (rumeno) predstavljajo Rosmannovo zvitje.....	18
<b>Slika 9:</b>	Pretvorba spojine DDBO v predlogo za LBVS s programom ROCS .....	28
<b>Slika 10:</b>	Pretvorba estrona v predlogo za rešetanje izključno na podobnosti oblike in volumna molekule.....	30
<b>Slika 11:</b>	Primerjava konformacije inhibitorja ekvilina iz kristalne strukture (rdeče) z napovedano konformacijo programa FlexX (modro). Ujemanje je odlično, RMSD vrednost med strukturama pa znaša 1.759 Å. ....	31

<b>Slika 12:</b> Inhibitor ekvilin v aktivnem mestu encima. Na obeh koncih hidrofobnega kanala so možne polarne interakcije (Ser142 in Tyr155 ter Glu282 in His221), ki smo jih vključili v farmakoforne zahteve. Prikazane so tudi dolžine polarnih interakcij v Å.....	32
<b>Slika 13:</b> Spojina <u>27</u> (modrozeleno) sidrana v homologni model 3HNR <i>C. lunata</i> . Vodikove vezi s Ser149, Thr151, Tyr163, Ile196 in Tyr208 so prikazane z rumenimi črtami.....	36
<b>Slika 14:</b> Vpliv najboljših spojin v testih <i>in vitro</i> na rast in pigmentiranost glive <i>C. lunata</i> ....	37
<b>Slika 15:</b> Osnovni skelet auronov v obliki E in Z.....	38
<b>Slika 16:</b> Spojina <u>31</u> (vijolično), sidrana v aktivno mesto encima 17 $\beta$ -HSD 1 [PDB: 1EQU]. Primerjava mesta vezave z ekvilinom (modro). Interakcije spojine <u>31</u> z aktivnim mestom so prikazane s sivimi prekinjenimi črtami. ....	40
<b>Slika 17:</b> Spojina <u>64</u> , sidrana v aktivno mesto encima 17 $\beta$ -HSD 1. Poleg interakcij določenih v farmakofornih zahtevah, so predvidene tudi polarne interakcije z Arg258 in kofaktorjem. Prikazane so tudi predvidene razdalje polarnih interakcij (siva prekinjena črta) in hidrofobne interakcije (zelena črta).....	44

## Kazalo preglednic

<b>Preglednica I:</b> Znani inhibitorji 3HNR iz glive <i>C. lunata</i> .....	15
<b>Preglednica II:</b> Znani inhibitorji 17 $\beta$ -HSD 1 .....	19
<b>Preglednica III:</b> Najboljše spojine <i>in vitro</i> testiranja na 3HNR.....	34
<b>Preglednica IV:</b> Najboljše spojine testiranja <i>in vitro</i> na 17 $\beta$ -HSD 1, po prvem virtualnem rešetanju .....	38
<b>Preglednica V:</b> Primerjava FlexX score ter aktivnosti spojin ( <u>31-33</u> in <u>49-63</u> ) z auronskim skeletom <i>in vitro</i> . Podana je tudi aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 2.....	41
<b>Preglednica VI:</b> Primerjava FlexX score in aktivnosti spojin <u>64-66</u> z modificiranim benzilidenskim obročem <i>in vitro</i> . Podana je tudi aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 2.....	43

## POVZETEK

Razvoj nove programske opreme, povečanje hitrosti računalniškega procesiranja, identifikacija novih tarč in javno dostopna baza tridimenzionalnih struktur makromolekul so v zadnjem desetletju omogočili, da virtualno rešetanje uspešno dopolnjuje, včasih pa predstavlja celo alternativo visoko-zmoglјivemu rešetanju pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin. Metode lahko v sami osnovi razdelimo na virtualno rešetanje na osnovi strukture in na virtualno rešetanje na osnovi liganda, ki temelji na podobnosti spojin z zanim ligandom.

*Curvularia lunata* je temno pigmentirana gliva, ki je znan rastlinski in človeški patogen. Število razširjenih okužb s temno pigmentiranimi glivami narašča predvsem pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom. 1,8-dihidroksinaftalen-melanin, ki ga najdemo v celični steni *C.lunata*, je pomemben dejavnik virulence temno pigmentiranih gliv. Trihidroksinaftalen reduktaza (3HNR) je encim, ki nastopa v biosintezi poti 1,8-dihidroksinaftalen-melanina in tako predstavlja atraktivno tarčo za razvoj novih fungicidov in antimikotikov. S pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi liganda smo odkrili nove inhibitorje encima 3HNR. Prvotno knjižnico z 11,3 milijoni spojin smo skrčili na 28 spojin, ki so vstopile v proces določanja inhibitorne aktivnosti *in vitro*. Med njimi je 6 spojin izkazalo inhibitorno aktivnost v nizkem mikromolarnem, najboljša med njimi pa celo v nanomolarnem koncentracijskem območju. Pomembno je, da so najboljše spojine vplivale tudi na rast in pigmentiranost *C. lunata*.

Danes predstavlja rak drugi najpogosteji vzrok smrti v zahodnem svetu, takoj za kardiovaskularnimi boleznimi. Kar 40 % vseh rakov je hormonsko odvisnih. Pri ženskah je najpogosteji rak na dojki, zaradi katerega še vedno umre največ rakavih bolnic. Encim 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 (17 $\beta$ -HSD 1) katalizira tvorbo hormona estradiola, ki povzroča celično proliferacijo in je tako udeležen pri hormonsko-odvisnem raku dojke. Zaradi izrazite substratne specifičnosti in znane povezave med prekomernim izražanjem encima in pojavnostjo bolezni, je encim 17 $\beta$ -HSD 1 atraktivna tarča za razvoj novih zdravilnih učinkovin. S pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi strukture smo odkrili nove nesteroidne inhibitorje encima 17 $\beta$ -HSD 1. Začetno banko s 13 milijoni spojin smo skrčili na 19 spojin, ki so vstopile v proces testiranja inhibitorne aktivnosti *in vitro*. Tri spojine z 2-benzilidenbenzofuran-3(2H)-onskim skeletom so izkazale izredno močno inhibitorno delovanje. Najboljša med njimi je imela IC<sub>50</sub> vrednost 45 nM.

## ABSTRACT

High-performance hardware and specialized software, combined with advanced knowledge of 3D macromolecule structure have made virtual-screening a useful complement, and in some cases, a reasonable alternative to high-throughput screening in the past decade. Methods are typically classified as structure-based virtual screening and ligand-based virtual screening methods, which are based on concepts of ligand similarity.

*Curvularia lunata* is a dark pigmented fungus that is the causative agent of several diseases in plants and in both immunodeficient and immunocompetent patients. 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin is found in the cell wall of *C. lunata* and is believed to be an important virulence factor of dematiaceous fungi. Trihydroxynaphthalene reductase is an enzyme of the 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin biosynthetic pathway, and thus represents an emerging target for the development of novel fungicides and antimycotics. In the present study, we describe novel inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase from *C. lunata*, identified by ligand-based virtual screening and subsequent biochemical and antifungal evaluation. The method reduced starting 11,3 million virtual compounds to 28 actually tested. Among them, 6 showed inhibitory activity in micromolar, best of them even in nanomolar concentration range. The best compounds affected pigmentation and growth of the *C. lunata*. Nowadays, cancer represents the second most common cause of death in western countries after cardiovascular diseases. 40% of all cancers are hormone-dependent. The most common cancer in women is breast cancer, which is still the primary cause of cancer mortality. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 $\beta$ -HSD 1) catalyzes the formation of estradiol (E2), a potent proliferation stimulating hormone, and is thus involved in the development of hormone dependent breast cancer. Because of immense substrate specificity and known relationship between overexpression and disease incidence, 17 $\beta$ -HSD 1 is considered as an attractive target for drug development. Here we report that structure-based virtual high-throughput screening was successfully implemented in discovery of potent nonsteroidal 17 $\beta$ -HSD 1 inhibitors. Computational screening of drug-like bank reduced 13 million compounds to 19 tested *in vitro*. Three hits with 2-benzylidenebenzofuran-3(2H)-one scaffold were proved as highly potent 17 $\beta$ -HSD1 inhibitors. The most potent compound in series displayed IC<sub>50</sub> value of 45 nM in 17 $\beta$ -HSD 1.

## SEZNAM OKRAJŠAV

2D	dvodimenzionalen
3D	tridimenzionalen
3HN	1,3,8-trihidroksinaftalen
3HNR	trihidroksinaftalen reduktaza
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza
ADME	Absorpcija, Distribucija, Metabolizem, Ekskrecija
Asn	asparagin
CSD	Cambridge Structural Database
d	dublet
DBO	4,5-dihidroksi-2 <i>H</i> benzopiran-2-on
DDBO	2,3-dihidro-2,5-dihidroksi-4 <i>H</i> -benzopiran-4-on, sintezni substrat 3HNR
DMSO	dimetilsulfoksid
E1	estrон
E2	estradiol
ER $\alpha$	estrogenski receptor $\alpha$
Glu	glutaminska kislina
GnrH	gonadotropin sproščajoči hormon
His	histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HTS	High Throughput Screening, rešetanje visokih zmogljivosti
Hz	hertz
IC <sub>50</sub>	koncentracija inhibitorja, pri kateri je aktivnost encima znižana za 50%
Ile	izoleucin
J	skloplitvena konstanta pri jedrski magnetni resonanci
LBVS	Ligand-Based Virtual Screening, virtualno rešetanje na osnovi liganda
Lys	lizin
M	molarnost (mol/L)
m	multiplet

mRNA	messenger RiboNucleic Acid, obveščevalna RNA
MS	masna spektroskopija
NAD <sup>+</sup>	β-nikotinamid adenin dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat- reducirana oblika
NCI	US National Cancer Institute
nm	nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, jedrska magnetna rezonanca
n.i.	ni inhibicije
n.d.	ni detektirano
PDB	Protein Data Bank
RMSE	Root-Mean-Square Deviation, ocena prileganja modela in dejanske strukture
S	singlet
SAR	Structure Activity Relationship, razmerje med strukturo in delovanjem
SBVS	Structure-Based Virtual Screening, virtualno rešetanje na osnovi strukture
Ser	serin
SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification, linearen zapis za 2D strukturo spojin
T	temperatura
t	triplet
Thr	treonin
Tyr	tirozin
δ	kemijski premik

# 1 UVOD

## 1.1 Iskanje novih zdravilnih učinkovin z računalniškimi metodami

Odkrivanje novih zdravilnih učinkovin je dolgotrajen in drag proces, ki zahteva povezovanje različnih znanj, tako znanstveno-raziskovalnih kot poslovnih. V poznih osemdesetih letih prejšnjega stoletja se je začel agresiven razvoj kombinatorne kemije in visoko-zmogljivega rešetanja (ang. high-throughput screening-HTS) z namenom odpraviti ozko grlo, ki je nastalo v razvoju novih zdravilnih učinkovin. Pričakovanja so bila velika, saj so raziskovalci menili, da bo ta metoda enormno povečala število novih spojin vodnic. Izkazalo pa se je ravno nasprotno, saj je metoda dokaj draga, daje majhno število zadetkov in slabo ponovljivost rezultatov.

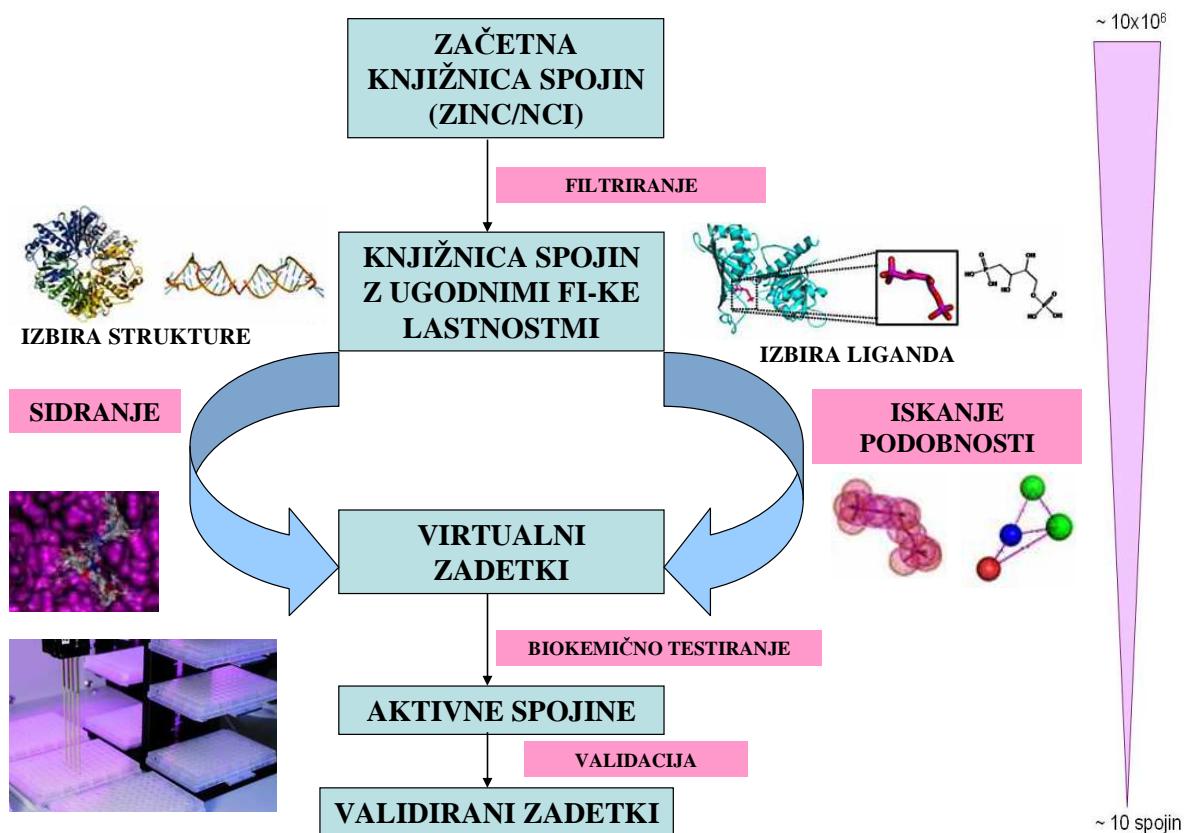
Zaradi nenehnega pritiska po zmanjševanju časa in stroškov za razvoj novih zdravilnih učinkovin je bil potreben premik od naključnega rešetanja k cenejšim in bolj racionalnim metodam. Računalniki in programska oprema omogočajo poceni in učinkovit vir obdelave podatkov, ki pa je bil do nedavnega v procesu iskanja novih zdravil premalo izkoriščen (1).

Razvoj nove programske opreme, povečanje hitrosti računalniškega procesiranja, identifikacija novih tarč in javno dostopna baza tridimenzionalnih struktur makromolekul so v zadnjem desetletju omogočili alternativen pristop k odkrivanju novih zdravilnih učinkovin, imenovan virtualno rešetanje (ang. virtual screening). Z njim skušamo z računalnikom in s pomočjo različnih algoritmov napovedati ter oceniti vezavo spojin v določeno makromolekulo. Z virtualnim rešetanjem izločimo spojine, ki imajo na podlagi algoritma napovedano slabšo aktivnost in tako začetno knjižnico, sestavljeno iz nekaj sto tisoč ali milijonov spojin, skrčimo na nekaj tisoč, lahko tudi manj, pri čemer lahko med temi z večjo verjetnostjo pričakujemo zadetek. Gre za tako imenovano obogatitev knjižnice, saj je odstotek potencialno aktivnih spojin v taki knjižnici precej večji kot v začetni (2). Na ta način skrajšamo čas testiranja, znižamo stroške in povečamo odstotek zadetkov, zaradi česar je metoda postala nepogrešljiva v sodobni farmacevtski kemiji (3). Če primerjamo število objav

v strokovnih revijah opazimo, da je bilo pred letom 2000 manj kot 10 letnih objav, kjer so uporabili računalniške metode, v letu 2009 pa se je ta številka povzpela že na 100 (4).

Omeniti velja nekatere zdravilne učinkovine, ki so bile odkrite s pomočjo računalniških metod, in sicer inhibitorje proteaze HIV (nelfinavir, amprenavir in lopinavir), nevraminidaze (zanamivir in oseltamivir), trombina (ksimelagatran in dabigatran) ter zdravilno učinkovino za zdravljenje kronične mieloidne levkemije, imatinib (5,6).

V sami osnovi ločimo dva načina virtualnega rešetanja, in sicer virtualno rešetanje na osnovi strukture (ang. Structure-based virtual screening-SBVS) in virtualno rešetanje na osnovi liganda (ang. Ligand-based virtual screening-LBVS). Oba načina smo uporabili tudi v naši raziskavi (Slika 1).



**Slika 1:** Potek virtualnega rešetanja na osnovi strukture in liganda.

### 1.1.1 Filtriranje in priprava knjižnice

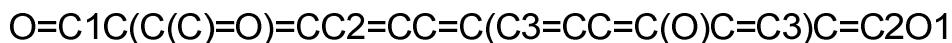
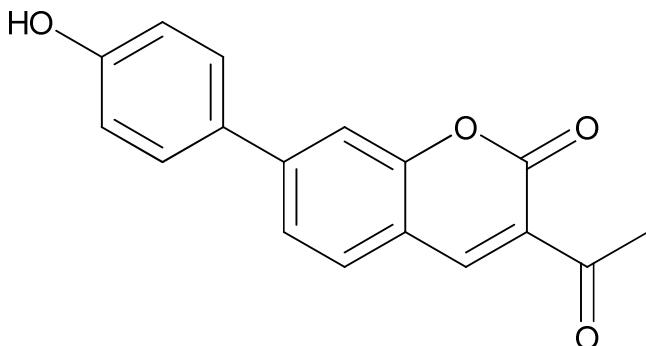
Za izvedbo virtualnega rešetanja potrebujemo ustrezeno knjižnico spojin. V akademskem svetu sta najpogosteje uporabljeni knjižnici ZINC, ki trenutno vsebuje približno 35 milijonov komercialno dostopnih spojin in knjižnica ameriškega inštituta za boj proti raku (US National Cancer Institute-NCI), ki svojih 280.000 spojin v akademske namene nudi brezplačno (7,8). Cene komercialno dostopnih spojin, zbranih v knjižnici ZINC, se gibljejo povprečno med 35 in 100 \$ za nekaj miligramov, odvisno od proizvajalca. V kolikor je sinteza spojine zahtevnejša, se cene povzpnejo tudi preko 500 \$. Teh spojin v našem raziskovalnem delu zaradi omejenega proračuna ponavadi nismo kupili, tudi če so bile visoko rangirane.

Ker knjižnica vsebujejo tudi veliko neželenih spojin, je prva stopnja običajno filtriranje. Potreba po filtriranju se je pojavila najprej v farmacevtski industriji, kjer kljub velikim pričakovanjem HTS ni prinesel želenih rezultatov. Del krivde gre pripisati slabemu načrtovanju knjižnic spojin, saj so velike korporacije na začetku stremele k številčnosti, samim fizikalno-kemijskim lastnostim spojin pa niso posvečali pozornosti. Spojine, ki so se pri rešetanjih izkazale za aktivne, je bilo pogosto težko optimizirati. Prvi premik k bolj racionalnemu načrtovanju knjižnic je bil tako imenovani »drug-like« koncept, katerega temelje je postavil Christopher A. Lipinski. Analiziral je zdravilne učinkovine na trgu in razvil pravilo petice. »Drug-like« spojine naj bi tako imele molekulsko maso pod 500, logP pod 5, število donorjev vodikove vezi pod 5 in število akceptorjev vodikove vezi pod 10. Spojine, ki kršijo ta pravila, imajo neugodne lastnosti ADME (absorpcija, distribucija, metabolizem, ekskrecija) in so kot take manj primerne kot zdravilne učinkovine (9). Potrebno je upoštevati, da se pri optimizaciji zadetkov molekulski masa in logP ponavadi povečata in v kolikor so ti zadetki že »drug-like«, lahko z dodajanjem substituentov kaj hitro izpademo iz želenega območja. Oprea s sodelavci je primerjal 96 parov spojin vodnic in zdravilnih učinkovin, ki so bile razvite iz teh vodnic. Ugotovili so, da so spojine vodnice v povprečju manj kompleksne, imajo nižjo molekulsko maso, nižji logP, manj akceptorjev in donorjev vodikove vezi in manj vrtljivih vezi (10). Uveljavil se je »lead-like« koncept, po katerem naj bi spojine ustrezale naslednjim kriterijem: molekulski masa naj bo nižja od 450, logP med -3,5 in 4,5, število aromatskih obročev naj ne presega 4, število donorjev vodikove vezi naj ne bo višje kot 4 in število akceptorjev vodikove vezi naj ne presega 10.

Pri pripravi knjižnice spojin moramo biti pozorni tudi na spojine s potencialnimi promiskuitetnimi lastnostmi. Te kažejo inhibitorno delovanje na različne tarče in so običajno nespecifične. Tvorijo aggregate, ki se vežejo na tarčo in jo tako navidezno inhibirajo. V mnogih primerih lahko to preprečimo z dodatkom detergenta v testni sistem ali z ustreznimi filtri pri načrtovanju knjižnice spojin (11).

Za filtriranje velike knjižnice spojin je primeren program FILTER, saj ga odlikuje velika hitrost procesiranja (12). Obdela lahko tudi do 400 spojin na sekundo, tako da celotno knjižnico ZINC prefiltira v enem dnevnu. Filtriranje lahko poteka na osnovi vnaprej definiranih filtrov »drug-like« in »lead-like« ali splošno sprejetih pravil. Program ima tudi funkcijo, ki iz knjižnice odstrani znane promiskuitetne inhibitorje in spojine z neželenimi funkcionalnimi skupinami, kot so kislinski halidi, aldehidi in alkilhalidi. Program ponuja tudi možnost ročnega prilagajanja filtra. Z analizo fizikalno-kemijskih lastnosti znanih ligandov neke tarče in pri domnevi, da so te fizikalno-kemijske lastnosti nujne za delovanje na to tarčo, lahko prilagodimo filter tako, da v prefiltrirani knjižnici ostanejo samo spojine s fizikalno-kemijskimi lastnostmi podobnimi znanim ligandom te tarče.

Strukturno formulo spojine lahko prikažemo na več načinov. V računalniškem svetu je zelo uporaben zapis SMILES, ki nam poljubno molekulo v 2D obliki pretvori v tekstovno obliko s končnico \*.smi (Slika 2) (13). Za prikaz 3D strukture spojine je zapis obsežnejši, uporablja pa se predvsem formati \*.sdf; \*.mol2 in \*.oeb. Za pretvarjanje različnih formatov med sabo uporabljam program BABEL (14). Ker deluje v tekstovni obliki, pa je nepogrešljiv tudi za obdelavo velikih knjižnic spojin.



**Slika 2:** Struktura kumarinskega inhibitorja 17 $\beta$ -HSD 1 v zapisu 2D in SMILES.

Večina programov za virtualno rešetanje zahteva, da knjižnica vsebuje spojine, ki imajo vnaprej definirano konformacijo, v določenih primerih tudi več konformacij (program ROCS), saj bi bilo določanje konformacije med samim rešetanjem preveč zamudno. Program OMEGA konstruira konformere izbrane spojine s pomočjo sistematičnega, na pravilih osnovanega pristopa (15). Pravila so pridobljena s pomočjo kristalnih struktur, ki so dostopne v bazah Protein data bank (PDB) in Cambridge structural database (CSD), uporaba Merck Molecular Force Field (MMFF94) pa zagotavlja, da imajo konformeri nizko energijo. Program je zelo učinkovit v reprodukciji konformacije, ki je biološko učinkovita (16).

### 1.1.2 Virtualno rešetanje na osnovi strukture (sidranje)

Pri virtualnem rešetjanju na osnovi strukture (SBVS) s pomočjo računalniškega programa napovemo položaj, konformacijo in jakost vezave spojine iz zasebne ali javne banke spojin, v aktivno mesto makromolekule. Metoda je uporabna tako za identifikacijo novih spojin, kot tudi za optimizacijo spojin vodnic. Pri SBVS je ključnega pomena poznavanje 3D strukture tarče, ki jo ponavadi dobimo s pomočjo rentgenske kristalografije, jedrske magnetne rezonance (NMR) ali homolognega modeliranja. Pomembna je tudi resolucija kristalne strukture, saj je jakost interakcije liganda z aktivnim mestom odvisna od razdalje.

Strukturno-podprto virtualno rešetanje lahko v osnovi razdelimo na: I. natančno strukturno modeliranje, t.j. umeščanje-sidranje (ang. docking) spojine v aktivno mesto encima; in, II. točno napoved aktivnosti s cenilno funkcijo (ang. scoring). Proses sidranja je dokaj uspešen, saj različni algoritmi zelo zadovoljivo ponovijo mesto vezave in konformacijo liganda iz kristalne strukture, medtem ko so uspehi pri napovedi aktivnosti slabi. Le redko namreč obstaja dobra povezanost med napovedano aktivnostjo in aktivnostjo izmerjeno z encimskim testom (17).

Programi za virtualno rešetanje na osnovi strukture uporabljajo za sidranje molekul v aktivno mesto različne metode. Večina jih upošteva fleksibilnost liganda, receptor pa obravnavajo kot rigidno strukturo, čeprav v naravi temu ni tako, a bi bilo upoštevanje fleksibilnosti receptorja računsko preveč zahtevno. Metode lahko v grobem razdelimo na:

- **Simulacijske metode**, kot sta molekulska dinamika in minimizacija energije, ki pa se pri sidranju velikih bank spojin uporablajo redko, saj so časovno potratne in računsko preveč zahtevne.
- **Sistematiche metode**, ki vzorčijo vse možne stopnje prostosti z neko določeno resolucijo, pri tem pa se soočijo s problemom kombinatorne eksplozije. Zato programi uporablajo razne algoritme, ki že na začetku izločijo vse konformacije, ki so nesmiselne. Vsi programi, ki uporablajo sistematiche metode, razdelijo ligande na manjše fragmente in jih potem sidrajo v aktivno mesto encima. Sestavljanje teh fragmentov nazaj v ligand poteka različno. Programi, ki uporablajo sestavljanje po inkrementih (FlexX), najprej sidrajo centralni rigidni del, nato pa na tega vežejo posamezne atome ali večje dele osnovnega liganda. Program eHiTS sidra vsak fragment neodvisno in nato iz vseh možnih kombinacij sestavi nazaj konformacijo liganda, ki je najbolj ugodna.
- **Naključne metode**, ki naključno umestijo ligand v aktivno mesto, nato pa tudi naključno spreminjačjo translacijo, rotacijo in torzijske kote. Po vsaki spremembni cenzilna funkcija oceni vezavno energijo. Proses se ponovi v več ciklih. Med naključne metode spada simulacija Monte Carlo, ki jo uporablja program Autodock. Programa DOCK in GOLD pa uporablja genetski algoritem, ki se zgleduje po Darwinovi teoriji. Konformacije liganda so shranjene v kromosomu, ki ga oceni cenzilna funkcija. Kromosomi se nato lahko reproducirajo in mutirajo. Novonastale kromosome cenzilna funkcija ponovno oceni in odloči ali bo kromosom ostal ali pa se ga zanemari (podobno kot pri naravnji selekciji).

Po umestitvi molekule v aktivno mesto, program s pomočjo cenzilne funkcije napove biološko aktivnost. Tako kot pri sidranju, uporablajo programi različne metode tudi za ocenjevanje. Poznamo tri različne cenzilne funkcije:

- **Cenzilna funkcija na osnovi polja sil** izračuna energijo interakcije ligand-receptor in notranjo energijo liganda. Interakcijo med ligandom in receptorjem izračuna z upoštevanjem van der Waalsovih sil, ki jih obravnava Lennard-Jonesova funkcija in elektrostatskih sil, ki jih obravnava Coulombova cenzilna funkcija. Slabost teh funkcij

je, da ne upoštevajo solvatacijskih in entropijskih prispevkov. Cenilno funkcijo na osnovi polja sil uporablja program Autodock ter D- in G-score cenilni funkciji.

- **Empirična cenilna funkcija** temelji na predpostavki, da lahko vezavno energijo ocenimo z uteženo vsoto številnih neodvisnih členov. Uteži izračunamo s pomočjo regresijske analize eksperimentalno določenih vezavnih energij in iz informacij pridobljenih z rentgensko kristalografijo. Težave lahko nastanejo pri prenosu iz enega sklopa kompleksov na drugega. Empirično cenilno funkcijo uporabljajo funkcije ChemScore, F-score in LUDI.
- **Knowledge-based cenilna funkcija** temelji na osnovi statistično pridobljenih pravil iz kompleksov protein-ligand iz PDB o ugodnih in manj ugodnih interakcijah. Slabost te metode je, da so pravila pridobljena iz omejenega števila kristalnih struktur. Knowledge-based cenilno funkcijo uporabljava funkcija PMF (Potential of Mean Force) in DrugScore.
- **Cenilna funkcija konsenza** upošteva konsenz med dvema ali več cenilnimi funkcijami. Temelji na predpostavki, da je povprečje večih vzorčenj bližje pravi vrednosti kot eno samo. Tako bodo najboljšo oceno dosegle tiste spojine, ki jih bodo vse uporabljene cenilne funkcije visoko ocenile.

Zaradi predpostavk in različnih poenostavitev tako pri procesu sidranja, kot pri ocenjevanju biološke aktivnosti ima strukturno podprtlo virtualno rešetanje naslednje slabosti:

1. Cenilne funkcije v svojem procesu napovedovanja biološke aktivnosti ne upoštevajo vseh fizikalno-kemijskih značilnosti, pomembnih za molekulsko prepoznavanje. Gonilo vezave liganda so spremembe v entalpiji in entropiji, vendar pa večina cenilnih funkcij upošteva le entalpijske vplive, solvatacijske in entropijske prispevke pa zanemari. Razlog za slabo uspešnost pa je tudi dejstvo, da vsi fizikalno-kemijski parametri na molekularnem nivoju še niso poznani.
2. Uspešnost sidranja je velikokrat odvisna od tipa in števila interakcij liganda z vezavnim mestom. Nekateri programi ligande bolje sidrajo v hidrofobna vezavna mesta, nekateri pa so uspešnejši, če so ta hidrofilna. Splošno pa je znano, da programi višje rangirajo večje molekule, ker tvorijo večje število interakcij, čeprav to še ne pomeni, da se zaradi tega tudi dejansko močneje vežejo v aktivno mesto.

3. Programi za sidranje kot potencialne zadetke velikokrat izberejo promiskuitetne inhibitorje, ki zaradi svojih hidrofobnih lastnosti in nagnjenosti k agregaciji nespecifično inhibirajo različne vrste encimov. Rezultat je lažno pozitiven encimski test, zato je priporočljivo, da te spojine odstranimo že v procesu priprave knjižnice.
4. V približno 2/3 vseh kristalnih struktur voda sodeluje pri vezavi liganda v aktivno mesto. Upoštevanje ali zanemarjenje vode v procesu virtualnega rešetanja lahko odločilno vpliva na rezultat. V kolikor so molekule vode v vseh kompleksih danega encima na istem mestu, je to močan indikator njihovega vpliva na samo vezavo liganda. V takem primeru vode ne smemo zanemariti (18).

Kljud vsem pomanjkljivostim pa je bilo z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture doseženih veliko uspehov na področju iskanja novih spojin vodnic. Glavni namen je namreč zmanjšanje zelo velike baze izhodnih spojin (tudi nekaj milijonov) na nekaj deset ali sto spojin, za katere obstaja večja verjetnost, da bodo pokazale aktivnost v testiranju *in vitro*, kot pa pri naključnem izboru. V pred kratkim objavljeni študiji so vzporedno sidrali ter *in vitro* testirali 200.000 spojin. Ugotovili so, da je program DOCK kar 34-krat obogatil knjižnico pri sidranju, v primerjavi z naključnim izborom (19).

Pri svojem delu sem se srečal z dvema programoma za sidranje, ki se razlikujeta glede na algoritem sidranja in cenilno funkcijo, in sicer FlexX in eHiTS. S katerim programom izvedemo virtualno rešetanje, se ponavadi odločimo glede na to, kateri bolje ponovi vezavo liganda iz kristalne strukture.

- **FlexX**

FlexX je program za visoko-zmogljivo virtualno rešetanje. Namenjen je sidranju spojin v biološke makromolekule, s pomočjo inkrementnega konstrukcijskega algoritma. Program razbije vezi z možnostjo rotacije in izbere ključen fragment, ki ima največjo zmožnost interakcije z aktivnim mestom. Tega sidra in določi njegov optimalen položaj, nato pa začne nanj pripenjati preostale fragmente tako, da imajo kar največ interakcij z vezavnim mestom. Postopoma se ponovno zgradi na začetku razbit ligand (20).

Cenilna funkcija FlexX oceni vezavno energijo liganda. Osnovana je na empirični cenilni funkciji, ki vse interakcije (vodikove vezi, nepolarne in ionske interakcije,...) obravnava neodvisno, upošteva pa tudi entropijske in entalpijske prispevke. Glede na način vrednotenja

vezave se cenilna funkcija FlexX najbolje izkaže takrat, ko ima ligand veliko funkcionalnih skupin, zmožnih vezave z aktivnim mestom (21). Warren s sodelavci iz podjetja GlaxoSmithKline je opravil študijo, v kateri je primerjal 10 programov za sidranje. FlexX se je izkazal za najučinkovitejše orodje za napovedovanje aktivnih spojin iz knjižnice, ki vsebuje tako aktivne kot neaktivne spojine. Obogatitveni faktor programa FlexX je bil od ostalih testiranih programov občutno večji (22). Program FlexX odlikuje izjemna hitrost v primerjavi z ostalimi programi za sidranje, saj traja sidranje spojine na povprečno hitrem računalniku le nekaj sekund (program eHiTS za sidranje ene spojine porabi približno minuto).

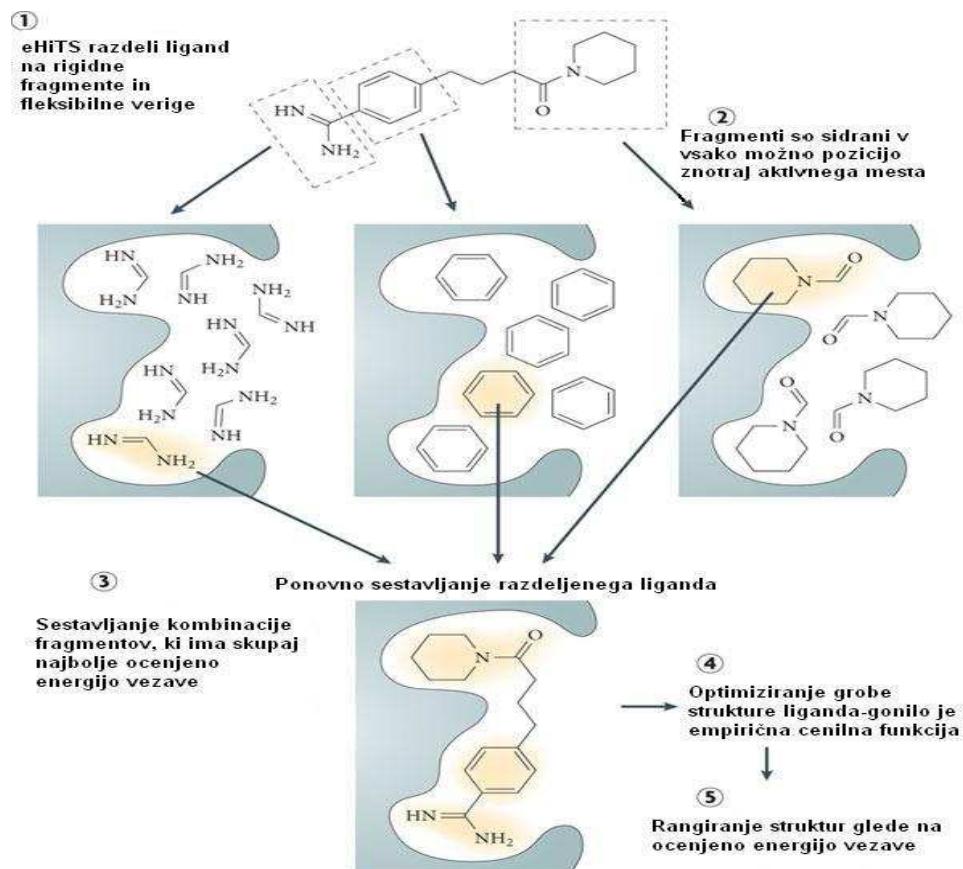
- **eHiTS**

eHiTS je program za visoko zmogljivo virtualno rešetanje. Odlikuje ga inovativen algoritem za sidranje, povsem nova cenilna funkcija in avtomatiziran proces določanja protoniranih stanj (23). Sidranje spojine poteka v več stopnjah. Program najprej razdeli ligand na rigidne fragmente in fleksibilne verige, nato pa neodvisno sidra rigidne fragmente v vse možne pozicije znotraj aktivnega mesta. Te pozicije ovrednoti cenilna funkcija. Od ostalih programov za virtualno rešetanje, ki tudi uporablajo sistematičen algoritem, se eHiTS razlikuje v tem, da obdrži vse možne pozicije rigidnih fragmentov, tudi tiste s predvideno slabšo energijo vezave. Na koncu izbere tisto kombinacijo fragmentov, ki ima skupaj najbolje ocenjeno vezavo (Slika 3). Ostali programi pa izberejo le tisti rigidni fragment, ki je najbolje ocenjen in ga uporabijo kot osnovo, na kateri na koncu zgradijo celotno spojino (program FlexX). Poleg ocenjene vezavne energije rigidnih fragmentov je pomembna tudi njihova medsebojna oddaljenost. Algoritem izbere takšno kombinacijo, ki je najbolj ugodna, da lahko v naslednji stopnji fragmente med sabo poveže s fleksibilnimi verigami. Tako nastalo grobo pozicijo liganda nato še minimizira s pomočjo algoritma, katerega gonilo je empirična cenilna funkcija.

Končni rezultat poda kompleksnejša cenilna funkcija, ki je kombinacija statistične in empirične cenilne funkcije, upošteva pa tudi sterične vplive, pokritost vezavnega mesta, družino receptorja (razlikuje 72 različnih družin receptorjev) in vpliv temperature na kristalno strukturo encima.

Hitrost sidranja se poveča, če sidramo večje število spojin, saj eHiTS vse sidrane rigidne fragmente shrani v bazo podatkov SQL. Ko se že obdelani fragment ponovi pri drugi spojini, se zanj uporabijo podatki iz baze, posledica pa je hitrejše sidranje.

Zsolt Zsoldos in sodelavci so 884 kompleksov ligand-protein razdelili v 72 različnih družin, glede na tip interakcij, da bi izboljšali statistični del cenilne funkcije (Knowledge-based). Validacija te metode je potrdila izboljšanje, saj se je povprečen odmik (ang. root-mean-square deviation RMSD) sidrane spojine glede na spojino iz kristalne strukture znižal za 0,2 Å, in sicer iz 1,89 na 1,69 Å (24). Isti avtor je s sodelavci naredil tudi validacijo programa eHiTS, ki je pokazala, da je ujemanje sidrane konformacije liganda z eksperimentalno določeno strukturo zelo dobro. Validacijo so izvedli na 91 kompleksih z rabičnimi programi za sidranje: eHiTS, GOLD in FlexX. Od vseh se je najbolje odrezal program eHiTS, saj je bil odmik v povprečju 1,47 Å, vrednost RMSD pa je bila v 85 % manjša od največje še sprejemljive, to je 2,5 Å. S program GOLD so dosegli povprečen RMSD 3,11 Å, v 68 % pa je bila vrednost RMSD manjša od 2,5 Å. Program FlexX pa je dosegel povprečen RMSD 3,87 Å, v 56 % pa je bila vrednost RMSD manjša od 2,5 Å (25).



Slika 3: Algoritam programa eHiTS.

### 1.1.3 Virtualno rešetanje na osnovi liganda

Virtualno rešetanje na osnovi liganda temelji na predpostavki, da imajo podobne spojine podobno delovanje. Glavna prednost teh metod je, da ne potrebujemo 3D strukture tarčnega proteina, ampak le strukturo ligandov, ki se vežejo v tarčo. Znani ligandi tako služijo kot predloga za rešetanje banke spojin, program pa s pomočjo algoritmov v banki najde spojine, ki so najbolj podobne predlogi. Nekateri avtorji navajajo, da je za virtualno rešetanje včasih celo bolje poznati strukturo aktivnega liganda, kot pa samo strukturo receptorja (26). Programi za virtualno rešetanje na osnovi liganda uporabljajo različne algoritme:

- Rešetanje na osnovi farmakofora upošteva 3D strukturo spojin, predvsem razporeditev ključnih elementov za aktivnost (farmakoforov). Program preiče knjižnico in prikaže vse spojine, ki najbolje ustrezano izbranemu farmakoforu. Te se sicer lahko strukturno precej razlikujejo od predloge, a imajo zato zelo podobno razporeditev ključnih farmakoforov (27).
- Rešetanje na osnovi binarnih prstnih odtisov je najbolj preprosta metoda in običajno so rezultat spojine, ki so kemijsko zelo podobne predlogi. Podatki o spojinah so shranjeni v tako imenovanih binarnih prstnih odtisih, kjer vsak bit predstavlja neko lastnost (funkcionalno skupino) spojine. Če je ta lastnost pri spojini prisotna, je bit nastavljen na 1, če je ni, pa na 0. Binarne prstne odtise spojin program primerja med sabo in podobnost poda v obliki indeksa podobnosti. Uporabljajo se različni indeksi podobnosti, najbolj popularen pa je Tanimotov (28).
- Rešetanje na osnovi podobnosti volumna in oblike je metoda, ki med sabo primerja molekule na osnovi topoloških značilnosti. Program, ki deluje po tem principu je ROCS, ki smo ga tudi uporabili v naši raziskavi (Slika 4).

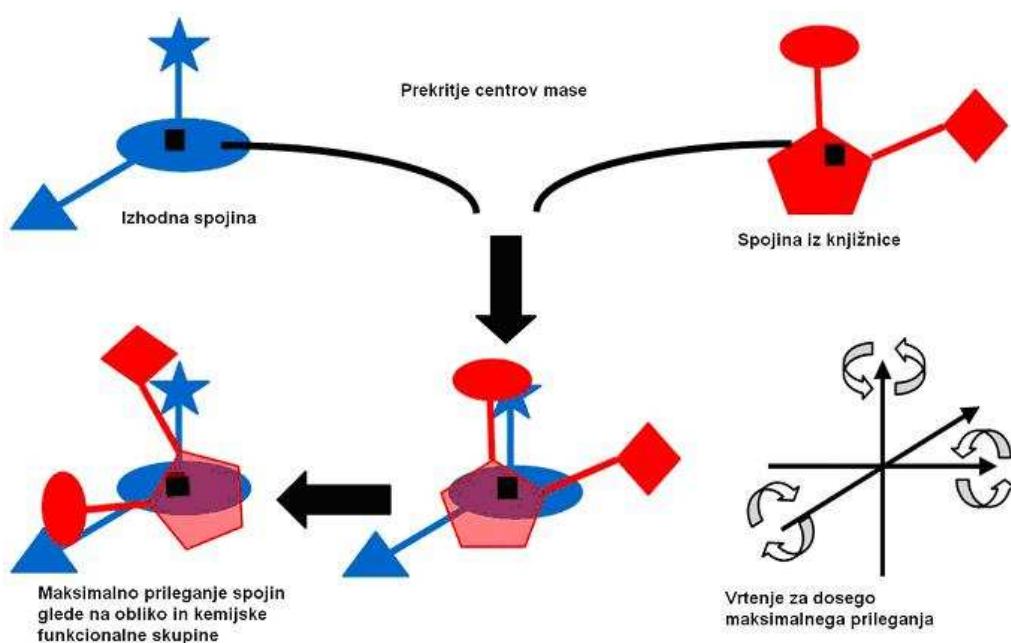
**ROCS** deluje po metodi prileganja, saj primerja spojine iz knjižnice z izbranim aktivnim ligandom (Slika 5) tako, da najprej prekrije centra mase obeh molekul, nato pa jih obrača v vseh treh smereh, da doseže kar največje prileganje (29).

Za oceno podobnost spojin iz knjižnice z izbrano predlogo uporabi naslednje parametre:

- ❖ **ShapeTanimoto**, ki nam izmeri prileganje oblike molekul na osnovi njihovih volumnov. Lahko zavzame vrednosti med 0 in 1, kjer 1 pomeni popolno prileganje aktivnemu

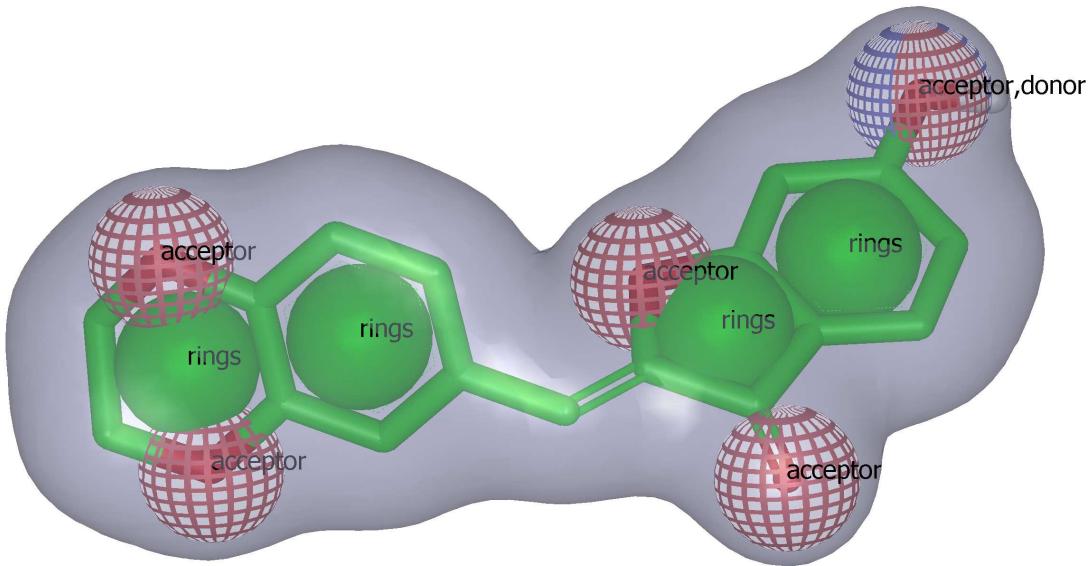
ligandu. Za določanje volumna molekul program uporabi Gaussovo funkcijo za bolj gladko prileganje.

- ❖ **ColourTanimoto**, ki nam izmeri prileganje kemijskih funkcionalnih skupin kot so: donorji in akceptorji vodikove vezi, pozitivni in negativni naboji, obroči in hidrofobne skupine. Lahko zavzame vrednosti med 0 in 1, kjer 1 pomeni popolno prileganje.
- ❖ **TanimotoCombo**, ki pa je seštevek ShapeTanimoto in ColourTanimoto in lahko zavzame vrednosti med 0 in 2, kjer 2 pomeni popolno prileganje



Slika 4: Princip delovanja programa ROCS.

Rezultat virtualnega rešetanja, izvedenega s programom ROCS, so spojine, ki so po svoji kemijski strukturi dokaj drugačne od aktivnega liganda, a na receptor delujejo podobno. Zadnja odkritja kažejo, da se ROCS lahko povsem enakovredno kosa s programi za sidranje, v nekaterih primerih pa je obogatitveni faktor (ang. Enrichment factor) celo večji (30).



**Slika 5:** Predloga za virtualno rešetanje na osnovi liganda s programom ROCS.

#### 1.1.4 Vizualizacija spojin in makromolekul

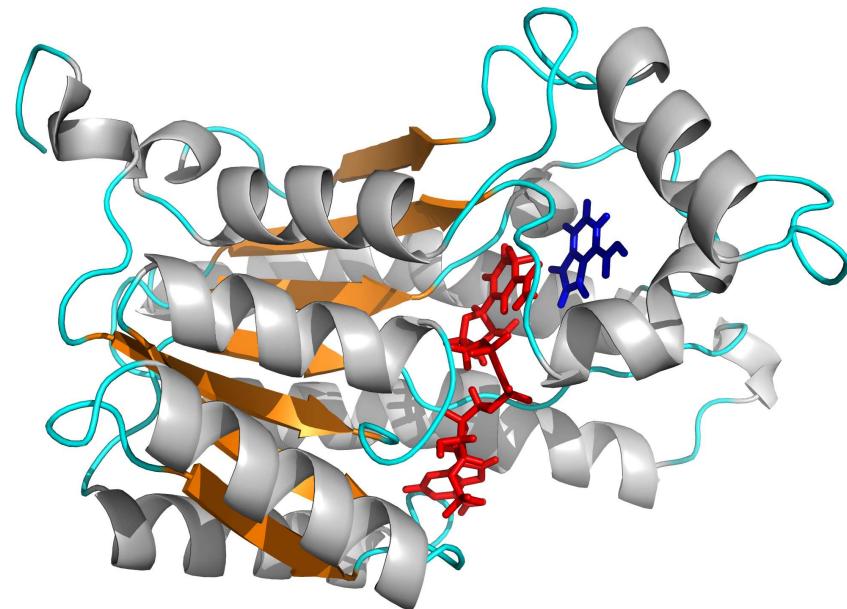
Pomemben del procesa odkrivanja novih spojin vodnic predstavlja tudi vizualni pregled spojin in tarč. Večina programov za virtualno rešetanje namreč deluje v stabilnejšem tekstovnem načinu, ki nam ne omogoča vizualizacije rezultatov. Zato lahko uporabimo program VIDA, ki nam prikaže spojine v 3D obliki, poleg tega pa omogoča tudi urejanje podatkov o spojini in izvoz grafik v druge programe, ki jih uporabljam za predstavitev rezultatov (MS PowerPoint) (31). Za vizualizacijo makromolekul, predvsem proteinov, lahko uporabimo PyMOL, ki je brezplačen, odprtokodni program (32). Omogoča tudi vizualni pregled rezultatov sidranja, saj nam nazorno prikaže napovedano pozicijo sidrane molekule in predvidene interakcije z aktivnim mestom encima.

## 1.2 Trihidroksinaftalen reduktaza iz glive *Culvularia lunata*

*Curvularia lunata* je nitasta gliva, ki prebiva pretežno v zemlji in v svoji celični steni vsebuje temen pigment melanin (33). Je znan rastlinski in človeški patogen. V literaturi je objavljenih veliko primerov, kjer prav *C. lunata* nastopa kot povzročitelj številnih zapletov, kot so alergijski glivni sinusitis, endokarditis, peritonitis, eumicetom, keratitis in alergijska bronhopulmonarna bolezen (34,35,36,37). Število razširjenih okužb s temno pigmentiranimi glivami narašča predvsem pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom. Za zdravljenje teh velikokrat usodnih infekcij (celokupna smrtnost znaša 79%) pa imamo na voljo omejene terapevtske možnosti, zato je nujno potreben razvoj novih zdravilnih učinkovin (38).

Prisotnost melanina v celični steni ščiti glivo pred zunanjimi dejavniki in omogoča njen preživetje tudi v ekstremnih pogojih. Melanizacija je povezana tudi z virulentnostjo in patogenostjo, saj olajša vstop v rastlinsko ali človeško tkivo in ščiti glivo pred obrambnimi mehanizmi gostitelja (39,40). Veliko različnih patogenih temno pigmentiranih gliv proizvaja melanine iz 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melanina po pentaketidni sintezni poti. Gostiteljski organizmi melanina ne sintetizirajo po tej poti, zato so encimi, ki delujejo v njej primerne tarče za razvoj novih fungicidov in antimikotikov. Eden izmed njih je tudi trihidroksinaftalen reduktaza (3HNR), ki reducira 1,3,8-trihidroksinaftalen (3HN) do vermelona (41).

Do sedaj je znanih le nekaj inhibitorjev 3HNR. Med njimi so komercialno dostopni fungicidi (triciklazol, pirokvilon in ftalid), nekateri nesteroidni antirevmatiki, spojine s kromen-4-onskim skeletom in nekatere naravne spojine kot so: flavoni, flavonoidi, izoflavoni in flavanoni (42,43). Kristalna struktura 3HNR iz *C. lunata* še ni poznana. Na osnovi razrešene kristalne strukture 3HNR iz glive *Magnaporthe grisea* in delno razrešene kristalne strukture 17 $\beta$ -HSDCl iz glive *Cochliobolus lunatus* so izdelali tridimenzionalni homologni model 3HNR iz *C. lunata* (Slika 6) (44). Identičnost aminokislinskega zaporedja modelnega encima z encimom 3HNR iz glive *M. grisea* (PDB:1YBV) je 74 %, z encimom 17 $\beta$ -HSD glive *Cochliobolus lunatus* (17 $\beta$ -HSDCl) pa 58% (45, 46). Uporabili so programsko opremo WHAT IF za izdelavo 3D modela in CHARMM za makromolekulske simulacije, RMSD med homolognim modelom 3HNR iz *C. lunata* in kristalno strukturo 3HNR iz *M. grisea* pa je znašal samo 0.75 $\text{\AA}$ .



**Slika 6:** Homologni model encima 3HNR glice *C. lunata* (3HNR\_NID) s kofaktorjem NADP (rdeče) in inhibitorjem 4-nitro-inden-onom (modro).

Leta 2008 so na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani izvedli strukturno-podprtto virtualno rešetanje na osnovi tega homolognega modela. Izmed 19 najbolje ocenjenih spojin jih je 5 inhibiralo delovanje encima 3HNR. Najbolj aktivni sta spojini **1** in **2**, ki zavirata tudi rast in pigmentacijo glive *C. lunata*. Strukture določenih inhibitorjev so prikazane v preglednici I.

**Preglednica I:** Znani inhibitorji 3HNR iz glive *C. lunata*.

Spojina	Apigenin	Etodolak	Spojina <b>1</b>	Spojina <b>2</b>
Struktura				
Aktivnost	IC <sub>50</sub> = 3,1 μM	IC <sub>50</sub> = 17 μM	IC <sub>50</sub> = 14.5 μM	IC <sub>50</sub> = 8.2 μM

### 1.3 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1

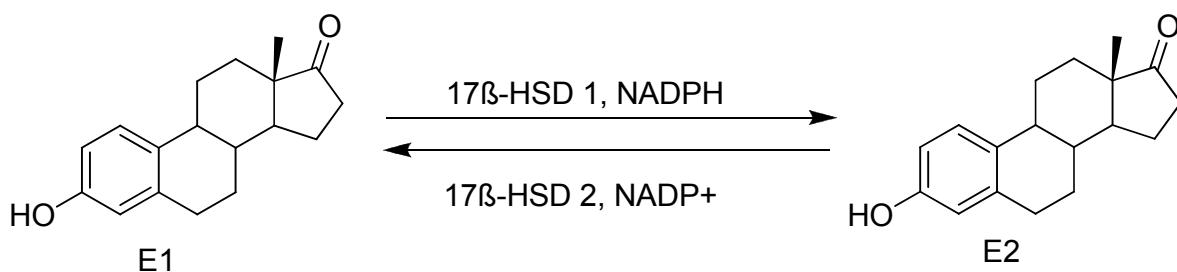
Povečane aktivnosti encimov, ki delujejo v lokalni biosintezi steroidnih hormonov, pomembno vplivajo na razvoj številnih hormonsko-odvisnih bolezni, med katerimi je tudi rak dojk, ki je najpogostejsa vrsta raka pri ženskah v zahodnem svetu. V Sloveniji je pojavnost raka na dojki približno 1/1000 (47). Estrogeni, še posebej pa estradiol (E2), igrajo ključno vlogo pri razvoju in napredovanju bolezni. Trenutno obstajajo tri glavne terapije za zdravljenje raka dojke: I. inhibicija biosinteze estrogena s pomočjo aromataznih inhibitorjev in agonistov/antagonistov gonadotropin sproščajočega hormona (GnrH), II. vpliv na delovanje estrogena preko selektivnih estrogenskih receptorskih modulatorjev (SERM) in III. inhibicija receptorjev s čistimi antiestrogeni. Poleg specifičnih slabosti vsake terapije je vsem trem skupno to, da znižajo raven estrogena sistemsko, kar povzroča ustrezne stranske učinke (48).

Med različnimi skupinami encimov, ki delujejo v končnih stopnjah biosinteze steroidnih spolnih hormonov, imajo precejšnjo vlogo 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (17 $\beta$ -HSD), ki jih uvrščamo v proteinsko naddružino kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR), pri čemer le tip 5 sodi v naddružino aldo-keto reduktaz. SDR je evolucijsko zelo stara naddružina encimov. Vanjo uvrščamo več kot 2000 encimov, ki jih kodira več kot 60 genov. Splošna značilnost naddružine SDR je nizka homologija v zaporedju aminokislin (10-30 %), so si pa 3D strukture posameznih predstavnikov zelo podobne (49). Za encime, ki vežejo nukleotide (kofaktor NAD), med njimi tudi za encime naddružin SDR, je značilen strukturni motiv, ki ga imenujemo Rossmannovo zvitje. Gre za izmenjevanje alfa-vijačnic in beta-ravnin, ki je po zgradbi pri vseh 17 $\beta$ -HSD iz naddružine SDR zelo podobno (50).

17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze so encimi, ki pretvarjajo aktivne oblike androgenov in estrogenov v neaktivne oblike, in obratno, in sicer preko specifične oksido-reduksijske pretvorbe hidroksilne oziroma karbonilne skupine na mestu 17 steroidnega skeleta. 17 $\beta$ -hidroksi oblike androgenov in estrogenov imajo veliko večjo afiniteto do svojih receptorjev. Za svoje delovanje potrebujejo kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP<sup>+</sup> ali NADPH) (51). Kljub imenu pa steroidi niso edine spojine, ki jih ti encimi lahko uporabljajo za substrate, saj so zmožni katalizirati tudi pretvorbe bilirubina, maščobnih kislin, žolčnih kislin, retinoidov in ksenobiotikov. 17 $\beta$ -HSD razdelimo glede na substrat na estrogene in

androgenske, glede na tip reakcije, ki jo katalizirajo, pa na oksidacijske in redukcijske izooblike. Oksidativne 17 $\beta$ -HSD, ki katalizirajo pretvorbo aktivnih oblik hormonov v neaktivne, potrebujejo kot kofaktor pri reakcijah NADP<sup>+</sup>. Mednje sodijo 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 in 14. Redukcijske 17 $\beta$ -HSD pa sodelujejo pri aktivaciji manj aktivnih oblik hormonov. Za delovanje potrebujejo NADPH. To pa so 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 1, 3, 5, 7 in 12. Nekateri encimi lahko v pogojih *in vitro* katalizirajo oksidacijo in redukcijo, smer reakcije pa je odvisna od prisotnosti kofaktorja (NADP<sup>+</sup> ali NADPH). V živih organizmih katalizirajo reakcijo le v eno smer, in sicer zaradi razlike v afinitetah do posameznega kofaktorja.

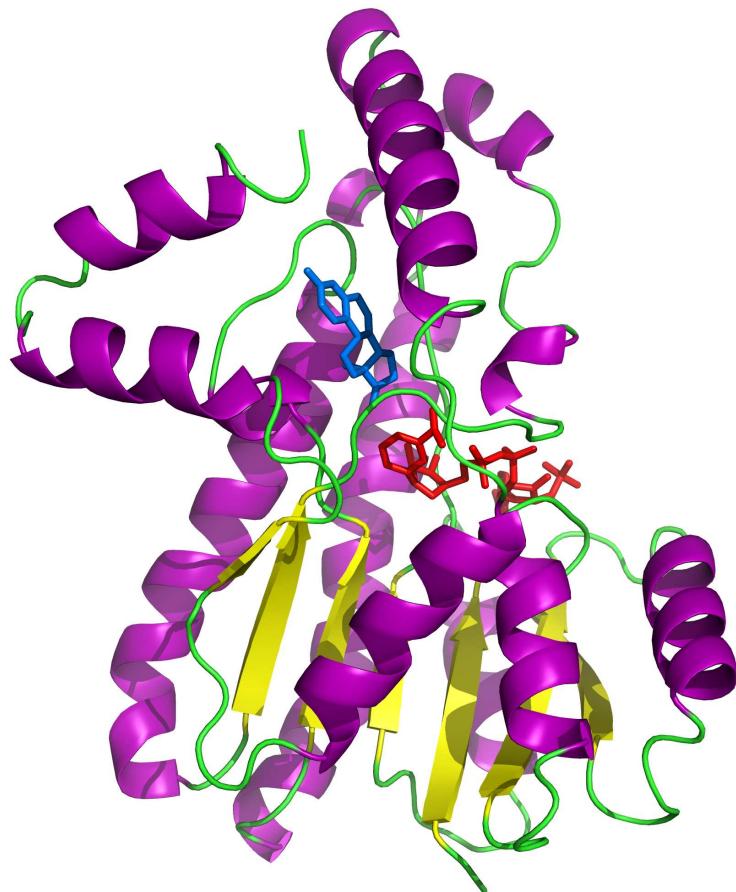
Trenutno je znanih štirinajst sesalskih 17 $\beta$ -HSD, samo tipi 1, 2 in 3 pa delujejo izključno v metabolizmu steroidov. Najbolj intenzivno preučevan encim je 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 (17 $\beta$ -HSD 1), ki sodeluje v zaključnih stopnjah metabolizma estrogenov. Katalizira od NADPH odvisno redukcijo šibko aktivnega estrona (E1) v aktivni estrogen estradiol (E2), ki nato povzroča proliferativne efekte preko estrogenskega receptorja  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), medtem ko tip 2 v prisotnosti NADP<sup>+</sup> katalizira obratno reakcijo, torej pretvorbo estradiola v estron (Slika 7) (52).



**Slika 7:** Pretvorba estrona v estradiol in obratno, pod vplivom 17 $\beta$ -HSD tipov 1 in 2.

Razmerje E2/E1 je povečano v rakavih celicah dojk in jajčnikov, pri endometriозi in endometrijski hiperplaziji (53). Povečane so tudi vrednosti obveščevalne RNA (mRNA) za 17 $\beta$ -HSD 1, kar nakazuje, da gre za povečano ekspresijo (54). Z inhibicijo encima bi lahko selektivno zmanjšali prekomerno nastajanje estradiola samo v obolelih tkivih. Tako bi zmanjšali tudi neželene sistemske stranske učinke, ki se pojavljajo pri obstoječih terapijah. Zaradi naštetih dejstev je 17 $\beta$ -HSD 1 obetavna tarča za razvoj novih učinkovin za zdravljenje estrogensko-odvisnih bolezni.

Encim 17 $\beta$ -HSD 1 je citozolni homodimer. Ena podenota sestavlja 327 aminokislin in ima molekulska maso 34,5 kDa (Slika 8).



**Slika 8:** Kompleks monomerne enote encima 17 $\beta$ -HSD 1 [PDB: 1EQU] z inhibitorjem eklivilinom (modro) in NADP<sup>+</sup> (rdeče).  $\alpha$ -vijačnice (vijolično) in  $\beta$ -površine (rumeno) predstavljajo Rosmannovo zvitje.

Najpomembnejši del encima je katalitična tetrada, ki jo sestavljajo Asn114, Ser142, Tyr155 in Lys159 (55). Predlagani mehanizem redukcije je tak, da najprej hidroksilna skupina Tyr155 aktivira karbonilni kisik na mestu 17, za tem pa se prenese hidridni ion iz kofaktorja NADPH na  $\alpha$ -stran C17 (56). Vezavno mesto za substrat je ozek hidrofobni kanal, na njegovih obeh koncih pa sta po dve polarni aminokislini, Ser142 in Tyr155 ter Glu282 in His221. Za

optimalno vezavo substrata so ključnega pomena vodikove vezi med hidroksilno skupino na mestu 3 steroidnega skeleta substrata in Glu282 ali/in His221 ter keto skupino na mestu 17 ter Ser142 in Tyr155. Pomembne so tudi hidrofobne interakcije med steroidnim skeletom in lipofilnim delom vezavnega mesta.

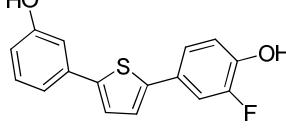
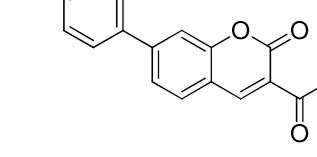
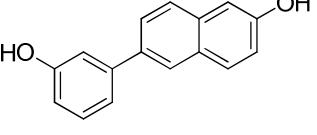
Rosmannovo zvitje sestavlja 7 paralelnih  $\beta$ -površin, ki so na vsaki strani obdane s po 3  $\alpha$ -vijačnicami. 3D struktura tega dela je značilnost naddružine SDR in je pri vseh 17 $\beta$ -HSD iz zelo podobna.

Kljub obetavnosti tarče in razrešeni kristalni strukturi pa še nobena spojina ni vstopila v klinične študije. Potencialna nova spojina vodnica mora ustrezati dvem osnovnim kriterijem: I. spojina ne sme izkazovati afinitete do ER in II. izkazovati mora izrazito selektivnost napram 17 $\beta$ -HSD 2, ki katalizira obratno reakcijo (57). Kljub temu, da je bilo objavljenih veliko inhibitorjev s steroidnim skeletom, z vrednostmi IC<sub>50</sub> v nanomolarnem območju, pa jih večina ni ustrezala zgoraj naštetim kriterijem (58). V zadnjem času je bilo odkritih nekaj nesteroidnih inhibitorjev, z dobro inhibitorno aktivnostjo in selektivnostjo na tip 1. Večinoma gre za rigidne aromatske molekule, ki delujejo kot steroidni mimetiki. Vsebujejo dve polarni skupini v ustrezni poziciji, ki omogočata tvorbo vodikovih vezi s His221/Glu282 in Ser142/Tyr155, lociranimi na nasprotnih koncih večinoma hidrofobnega vezavnega mesta 17 $\beta$ -HSD 1. Znani ne-steroidni inhibitorji encima 17 $\beta$ -HSD 1 so derivati naslednjih spojin:

- Bis (hidroksifenil) substituirani azoli in tiofeni (Spojina A) (59),
- 7-fenil kumarini (Spojina B) (60),
- (Hidroksifenil)nafaleni (Spojina C) (61),
- Substituirani bifeniloli (51).

Strukture nekaterih inhibitorjev so prikazane v spodnji preglednici II.

**Preglednica II:** Znani inhibitorji 17 $\beta$ -HSD 1.

Spojina	Spojina A	Spojina B	Spojina C
Struktura			
Aktivnost	IC <sub>50</sub> =8nM	IC <sub>50</sub> =271nM	IC <sub>50</sub> =116nM

## 2 NAČRT DELA

### 2.1 Virtualno rešetanje na 3HNR

Z izbranimi metodami visoko zmogljivega virtualnega rešetanja bomo poskušali najti nove inhibitorje encima 3HNR iz glive *C. lunata*. Izvedli bomo virtualno rešetanje knjižnice ZINC\_druglike (verzija 2009), ki vsebuje 11.300.000 spojin, na osnovi znanega liganda. Kot izhodna liganda bomo izbrali sintezi substrat 2,3-dihidro-2,5-dihdroksi-4H-benzopiran-4-on (DDBO) in inhibitor 2, ki so ga leta 2008 odkrili na Katedri za farmacevtsko kemijo. Za oceno podobnosti med spojinami iz knjižnice in izbranimi ligandoma bomo uporabili programsko opremo ROCS. Vizualno bomo pregledali nekaj 100 zadetkov, pri dobaviteljih naročili najbolj zanimive in finančno sprejemljive spojine in nato testirali njihovo inhibitorno aktivnost na 3HNR *in vitro*. Določili bomo tudi vpliv najaktivnejših spojin na rast in pigmentacijo glive *C. lunata*.

### 2.2 Virtualno rešetanje na 17 $\beta$ -HSD 1

S pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi strukture bomo skušali najti nove inhibitorje encima 17 $\beta$ -HSD 1. Uporabili bomo kristalno strukturo encima v kompleksu z inhibitorjem ekvilinom in kofaktorjem NADP+ [PDB: 1EQU] (62). Knjižnico ZINC\_druglike (verzija 2010), ki vsebuje 13.000.000 spojin, bomo filtrirali s programom ROCS na osnovi molekulske oblike. Obdržali bomo 30.000 spojin, ki jih bomo nato s farmakofornimi zahtevami sidrali v aktivno mesto encima, in sicer z najustreznejšim programom za sidranje. Vizualno bomo pregledali nekaj 100 zadetkov, pri dobaviteljih naročili najbolj zanimive in finančno sprejemljive spojine in nato testirali inhibitorno aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 1 *in vitro*.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Računalniške metode

Računalnik na Katedri za farmacevtsko kemijo sestavlja naslednje komponente:

- Procesor: štirikrat dvo-jedrni AMD Opteron 2.0 GHz,
- Pomnilnik in trdi disk: 16 GB RAM, štirikrat 320 GB (v diskovnem polju RAID 10),
- Grafična kartica: Nvidia GeForce 7900,
- Operacijski sistem: 64-bit Fedora 7.

Programska oprema:

- Vizualizacija (makro)molekul: programa VIDA 4.0.0, OpenEye Inc. in PyMOL 0.99, Schrödinger, LLC,
- Pretvorba formatov molekul: OpenBabel 2.2.3,
- Izdelava konformacij molekul: program Omega 2.3.2, OpenEye Inc.,
- Filtriranje knjižnic spojin: program Filter 2.0.2, OpenEye Inc.,
- Sidranje: programa FlexX, BiosolveIT GmbH in eHiTS, Simbiosys Inc.,
- Virtualno rešetanje na osnovi 3D-podobnosti: program ROCS 3.0.0, OpenEye Inc.

### 3.2 Testiranje inhibitorne aktivnosti spojin *in vitro*

#### 3.2.1 Spektrofotometrično določanje inhibitorne aktivnosti spojin na 3HNR

Fiziološki substrat 3HN v normalnih pogojih ni stabilen, saj hitro oksidira in tako ni primeren za encimske teste *in vitro*. Zaradi tega v eksperimentalne namene uporabljamo sintezni substrat DDBO, ki ga 3HNR oksidira v 4,5-dihidroksi-2H benzopiran-2-on (DBO). Ob tem se NADP<sup>+</sup> reducira do NADPH, kar zaznamo kot porast absorbance, merjene pri 340 nm. Katalitično aktivnost encima ovrednotimo na podlagi množine nastalega DBO. Potrebno je ustrezeno redčenje, saj je razlika absorbanc prenosorazmerna količini nastalega produkta DBO le v linearinem delu umeritvene krivulje (63). Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, zato je množina nastalega DBO manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja.

Učinkovitost inhibitorja izrazimo kot odstotek inhibicije, ki nam pove, koliko se zmanjša aktivnost encima v njegovi prisotnosti. Učinkovitost najboljših inhibitorjev izrazimo še z vrednostjo IC<sub>50</sub>, ki predstavlja koncentracijo inhibitorja, pri kateri se aktivnost encima zmanjša za 50 %.

**Reagenti:**

- 100 mM fosfatni pufer, pH 8,0 z 0,005 % Tritona X-114,
- substrat: DDBO,
- koencim: NADP<sup>+</sup> v 100 mM fosfatnem pufru pH 8,0,
- encim: 3HNR, c = 0,68 mg/ml,
- spojine: najbolje rangirane in cenovno dostopne spojine, izbrane z virtualnim rešetanjem.

**Postopek določanja:**

Inhibitorno aktivnost spojin merimo v 0,8 mL raztopine 100 mM fosfatnega pufra, ki vsebuje 1 % dimetilsulfoksida (DMSO) in 0,005% Tritona X-114 ter 50  $\mu$ M koncentracijo substrata, 200  $\mu$ M koncentracijo koencima in 50 nM encima. Koncentracija testiranih spojin je 50  $\mu$ M za presejalni test in med 0,25  $\mu$ M in 100  $\mu$ M za določanje IC<sub>50</sub>.

Razliko v absorbanci NADPH merimo s spektrofotometrom Perkin Elmer, Lambda 45, UV/VIS kontinuirano pri 340 nm in 25 °C. Pri rešetjanju izvedemo pet meritev v dveh neodvisnih poskusih in rezultat podamo kot povprečni odstotek inhibicije  $\pm$  standardni odklon. Pri določanju IC<sub>50</sub> vrednosti pri vsaki koncentraciji inhibitorja izvedemo tri meritve.

### **3.2.2 Ugotavljanje vpliva na rast in pigmentiranost glive *C. lunata***

Najboljšim inhibitorjem *in vitro* preverimo tudi njihov vpliv na rast in pigmentiranost glive *C. lunata*. Pripravimo 2 % pivin agar s pH 6,5 z dodatkom 0,5 mM koncentracijo inhibitorja (spojine **2**, **27** in **29**) in brez dodanega inhibitorja (negativna kontrola). Za pozitivno kontrolo uporabimo triciklazol, komercialno dostopen fungicid z delovanjem na 3HNR, in sicer v koncentraciji 0,5 mM. V petrijevko z agarjem precepimo 96 ur staro kulturo glive *C. lunata* in

jo 1 teden inkubiramo pri 30 °C. Vsak poskus izvedemo v treh paralelkah. Primerjamo rast in pigmentiranost kulture v petrijevkah z inhibitorjem, glede na obe kontroli.

### 3.2.3 Določanje inhibitorne aktivnosti spojin na 17 $\beta$ -HSD 1 in 2

Bakterijski homogenat z encimom raztopimo v ustremnem pufru s kofaktorjem in dodamo E1 ter označevalec [2,4,6,7- $^3$ H]-E1, kjer je vodik na ustreznih mestih zamenjan s tricijem. Poteče pretvorba do E2. Z  $\beta$ -razpadom se iz tricija tvori helij, neutrino in elektron, ki medsebojno reagira z molekulo fluora v scintilacijski tekočini. Ta signal ojača in oddaja svetlobo, ki jo lahko detektiramo s scintilacijskim števcem. Tako določimo količino E2 in E1 po koncu reakcije tako v prisotnosti kot odsotnosti testirane spojine. Pretvorbo izračunamo z naslednjo enačbo: % pretvorbe = [% E2 / (% E2 + % E1)] × 100. Inhibitorno aktivnost izrazimo kot odstotek inhibicije, ki ga izračunamo z enačbo: % inhibicije = [(% pretvorbe kontrole - % pretvorbe vzorca) / % pretvorbe kontrole] × 100.

Za določanje inhibitorne aktivnosti na 17 $\beta$ -HSD 2 postopamo enako, le da uporabimo E2 in označevalec [2,4,6,7- $^3$ H]-E2. Pretvorbo izračunamo z naslednjo enačbo: % pretvorbe = [% E1 / (% E2 + % E1)] × 100, odstotek inhibicije pa izračunamo z enako enačbo kot pri tipu 1. Učinkovitost najboljših inhibitorjev izrazimo še z vrednostjo IC<sub>50</sub>.

#### Reagenti:

- 100 mM fosfatni pufer, pH 6,5, pri 37 °C,
- substrat: E1 in označevalec [2,4,6,7- $^3$ H]-E1 (končna koncentracija 67 nM),
- koencim: NADPH c=100  $\mu$ M,
- encim: bakterijski homogenat,
- spojine: najbolje rangirane in cenovno dostopne spojine, izbrane z virtualnim rešetanjem v raztropini DMSO in acetonitrila.

#### Postopek določanja:

Pripravimo reakcijski pufer z opisanimi lastnostmi. Koncentracija testiranih spojin je 0,6  $\mu$ M in 6  $\mu$ M za presejalni test ter v območju od 12 nM do 12  $\mu$ M za določanje vrednosti IC<sub>50</sub>. Delež acetonitrila v končni reakcijski zmesi uravnamo na 1 %. Po 10 minutah reakcijo

ustavimo z dodatkom etilacetata. V tem času se v kontrolni reakciji brez dodanega inhibitorja pretvorí približno 25 % substrata. Vzorce ekstrahiramo z etilacetatom, nato topilo odparimo in steroide raztopimo v acetonitrilu. Sledi njihova izokratska ločba z reverzno fazno HPLC na koloni ODS Hypersil (Thermo Scientific) C18 pri 25 °C in pretoku 1 mL/min mobilne faze acetonitril/voda v razmerju 45:55. Detekcijo in kvantifikacijo radioaktivnih steroidov izvedemo s pomočjo scintilacijske tekočine Quickszint Flow 302 (Zinsser Analytic, Frankfurt, Nemčija) in detektorja Ramona 2000 radioflow (Raytest). Teste izvedemo v 2 paralelah za določanje odstotka inhibicije in v 3 za določanje vrednosti IC<sub>50</sub>. Rezultate podamo v obliki povprečni odstotkov inhibicije ± standardnih odklonov.

Najboljšim inhibitorjem 17 $\beta$ -HSD 1 določimo tudi njihovo aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 2. Testiranje izvedemo tako kot je opisano pri določanju učinkovitosti inhibicije na tip 1, pri čemer uporabimo naslednje modifikacije:

- fosfatni pufer uravnamo na pH 7,5,
- uporabimo E2 in označevalec [2,4,6,7-<sup>3</sup>H]-E2 (končna koncentracija 300 nM),
- koncentracija testiranih spojin za presejalni test znaša 6 µM in 60 µM,
- kot kofaktor uporabimo NAD<sup>+</sup>, c=100 µM,
- reakcijo ustavimo po 5 minutah; v tem času se v kontrolni reakciji brez dodanega inhibitorja pretvorí približno 20% substrata.

### 3.3 Določanje čistosti in istovetnosti spojin

#### Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Glede na število detektiranih kromatografskih vrhov in površin pod njimi določimo čistost spojin, z aparatom Agilent 1100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA), ki vsebuje reverzno-fazno kolono Agilent Eclipse Plus C18, 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm). Spojine raztopimo v 40 % zmesi acetonitril/voda s končno koncentracijo 0,16 mg/mL, in nato 10  $\mu\text{L}$  vzorca vbrizgamo na kolono. Elucijo izvedemo s pretokom 1,0 mL/min, z linearnim gradientom od 30% do 70% acetonitrila v prvih 15 minutah, nato pa 2,5 min pri 70% acetonitrila in nazaj do 30% acetonitrila v 18. minuti. Sledi 7 minuta ekvilibracija med vzorci. Detekcijo izvedemo pri 220 nm.

#### 3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Istovetnost spojin določimo glede na značilne kemijske premike. Spektre posnamemo na NMR spektrometu Bruker AVANCE DPX<sub>300</sub> (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, NMR center). Kot interni standard uporabimo TMS, kot topilo pa CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub> in CD<sub>3</sub>OD. Za reševanje NMR spektrov uporabimo računalniški program Mestrec 4.8.6. proizvajalca MESTRELAB RESEARCH SL.

#### 3.3.2 Masna spektroskopija (MS)

Molsko maso spojin v vzorcu določimo z masnim spektrometrom AutoSpec Q (proizvajalec: Micromass, Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko (Center za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan, Ljubljana).

## 4 POSTOPEK DELA

### 4.1 Virtualno rešetanje spojin na 3HNR

#### 4.1.1 Priprava predlog in knjižnice spojin

S pomočjo spletne aplikacije Molinspiration smo pridobili kode SMILES (\*.smi) DDBO in spojine **2**. Nato smo s programom Omega2 spojini pretvorili v ustrezni 3D format (\*.sdf) in s parametrom *-maxconfs 5* zahtevali, naj za vsako spojino ohrani 5 energijsko najugodnejših konformacij. To smo storili z naslednjim ukazom:

```
omega2 -in DDBO.smi -out DDBO_5conf.sdf -maxconfs 5  
omega2 -in Comp_2.smi -out Comp_2_5conf.sdf -maxconfs 5
```

Zaradi planarnosti molekul in majhnega števila vrtljivih vezi sta možni le 2 konformacijski spojine DDBO in 4 konformacijske spojine **2**.

Na spletu smo pridobili celotno knjižnico ZINC\_druglike (verzija 2009), ki vsebuje 11.300.000 spojin. Spojine v knjižnici ustrezano naslednjim fizikalno-kemijskim lastnostim:

- $x\log P < 5$ ,
- $150 < \text{molekulska masa} < 500$ ,
- število vrtljivih vezi  $< 8$ ,
- celotna polarna površina molekule  $< 150$ ,
- število akceptorjev vodikove vezi  $< 10$ .

Knjižnico smo obdelali s pomočjo programa Omega2 in z naslednjim ukazom generirali vse možne energijsko ugodne konformacije za vsako spojino:

```
omega2 -in ZINC_druglike.sdf -out ZINC_druglike_allconf.sdf
```

V povprečju smo pridobili 152 konformacij na molekulo. Tako obdelano knjižnico spojin smo nato uporabili za virtualno rešetanje na osnovi liganda.

#### 4.1.2 Virtualno rešetanje na osnovi liganda

Virtualno rešetanje smo izvedli s pomočjo programa ROCS. Uporabili smo predlogi in knjižnico spojin, ki smo jih pripravili po postopku, navedenem v poglavju 4.1.1. Za vsak ligand smo izvedli ločeno rešetanje, uporabili pa smo naslednji ukaz:

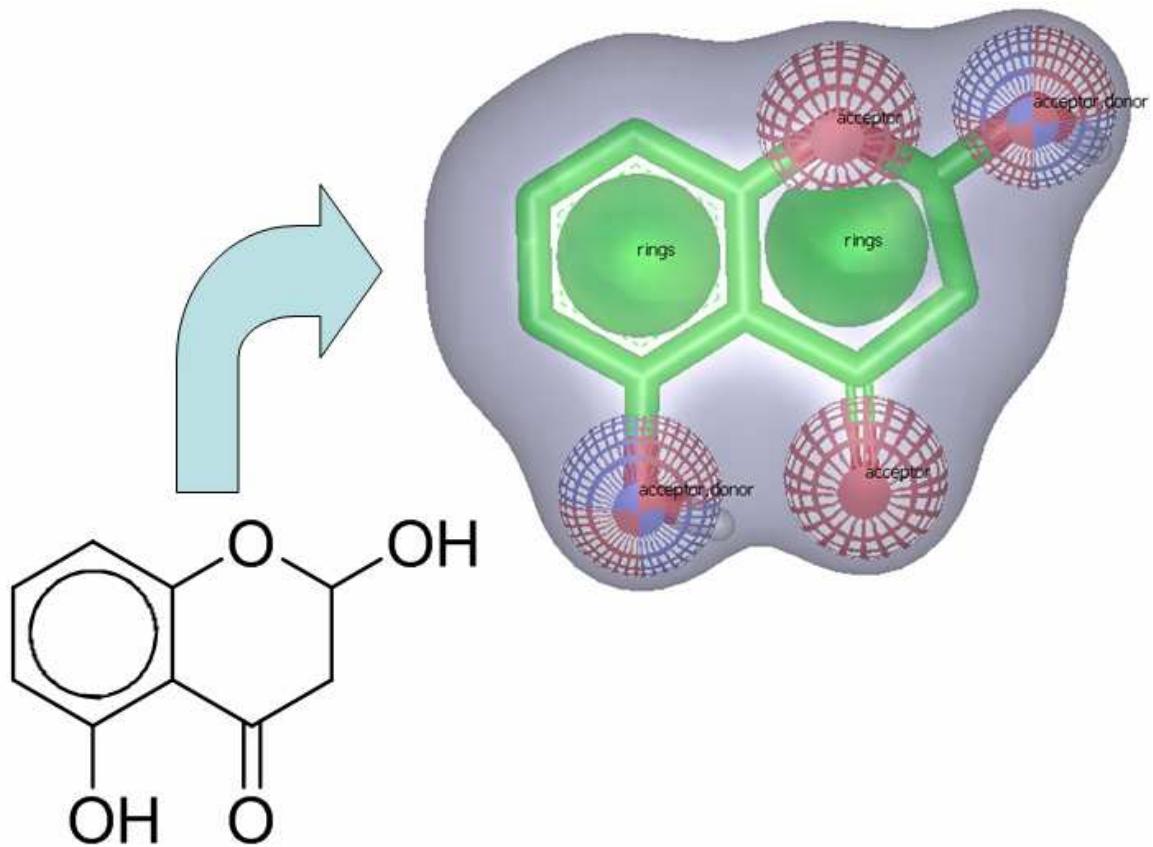
```
rocs -query Comp_2_5conf.sdf -dbase ZINC_druglike_allconf.sdf -mcquery true -rankby TanimotoCombo -besthits 100
```

```
rocs -query DDBO_5conf.sdf -dbase ZINC_druglike_allconf.sdf -mcquery true -rankby TanimotoCombo -besthits 100
```

Razlaga posameznih parametrov:

- *Query*: programu povemo, katero spojino naj vzame za predlogo za virtualno rešetanje; v našem primeru sta bili to spojini 2 in DDBO (Slika 9).
- *Dbase*: programu povemo, katero knjižnico spojin naj primerja z izhodnim ligandom. Uporabili smo ZINC\_druglike knjižnico spojin z vsemi možnimi konformacijami.
- *Mcquery*: programu ukažemo, naj upošteva, da predloga vsebuje več konformacij in da naj vsako izmed njih primerja s spojinami iz knjižnice.
- *Rankby*: programu ukažemo, naj uporabi TanimotoCombo cenilno funkcijo, ki upošteva obliko spojine in razporeditev funkcionalnih spojin.
- *Besthits*: programu ukažemo, naj ohrani le najboljših 100 spojin vsakega virtualnega rešetanja.

Glede na to, da tako obe predlogi kot spojine iz knjižnice vsebujejo več konformacij, bi bil zapis vsake konformacije preveč prostorsko potraten. Program nam zato ohrani le tisto konformacijo spojine, ki je najbolj podobna katerikoli konformaciji izhodnega liganda.



**Slika 9:** Pretvorba spojine DDBO v predlogo za LBVS s programom ROCS.

Po virtualnem rešetjanju smo izvedli vizualni pregled rezultatov s pomočjo programa VIDA. Izločili smo strukturno nezanimive in finančno nesprejemljive spojine. Pri različnih proizvajalcih smo na koncu naročili 28 spojin, od tega jih je bilo 16 podobnih DDBO in 12 spojini **2**.

## 4.2 Virtualno rešetanje spojin na 17 $\beta$ -HSD 1

### 4.2.1 Priprava knjižnice spojin za sidranje

Sidranje celotne knjižnice spojin ZINC\_druglike bi bilo časovno preveč potratno. Glede na značilnosti aktivnega mesta encima 17 $\beta$ -HSD 1 smo se odločili, da bomo v proces sidranja vključili le tiste spojine, ki imajo podoben volumen in obliko kot substrat encima estron (E1). S pomočjo spletne aplikacije Molinspiration smo pridobili kodo SMILES (\*.smi) estrona. Nato smo s programom Omega2 spojino pretvorili v ustrezni 3D format (\*.sdf) in s parametrom *-maxconfs 5* zahtevali, naj ohrani 5 energijsko najugodnejših konformacij. To smo storili z naslednjim ukazom:

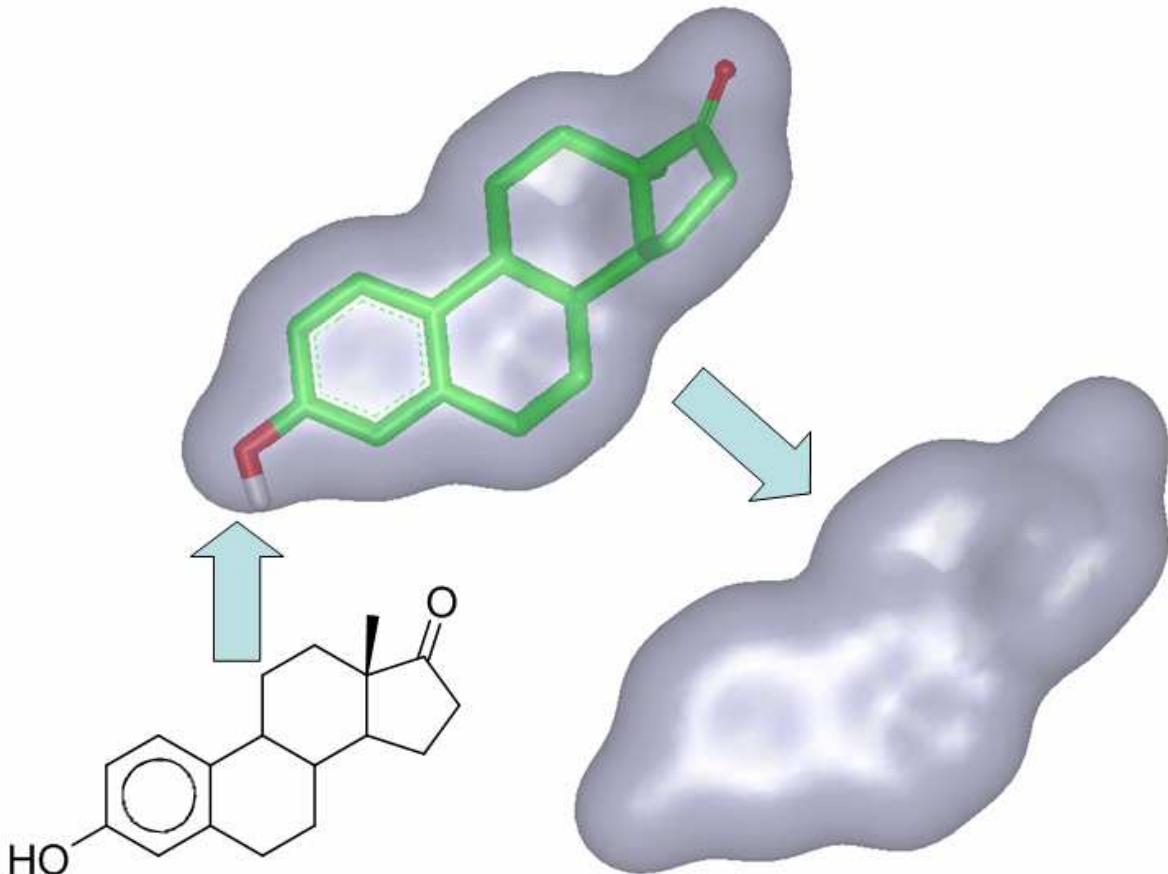
```
omega2 -in estron.smi -out estron_5.sdf -maxconfs 5
```

Zaradi planarnosti molekule je program Omega2 generiral le en konformer estrona.

Knjižnico ZINC\_druglike\_allconf smo pripravili po enakem postopku, kot je opisano v poglavju 4.1.1, le da smo jo pretvorili v format \*.mol2. V tej obliki morajo biti spojine za sidranje v programu FlexX. S programom ROCS smo nato izvedli virtualno rešetanje celotne knjižnice, in sicer z naslednjim ukazom:

```
rocs -query estron_5.sdf -dbase ZINC_druglike_allconf.mol2 -besthits 30000 -shapeonly true  
-prefix rocs_hits_30.mol2
```

S parametrom *-shapeonly true* smo programu ukazali, naj primerja spojine iz knjižnice z izhodnim ligandom izključno na podlagi podobnosti oblike in volumna (Slika 10). Dobili smo novo knjižnico, s 30.000 spojinami, ki smo jo shranili v obliki rocs\_hits\_30.mol2 in jo nato uporabili za sidranje v aktivno mesto encima.

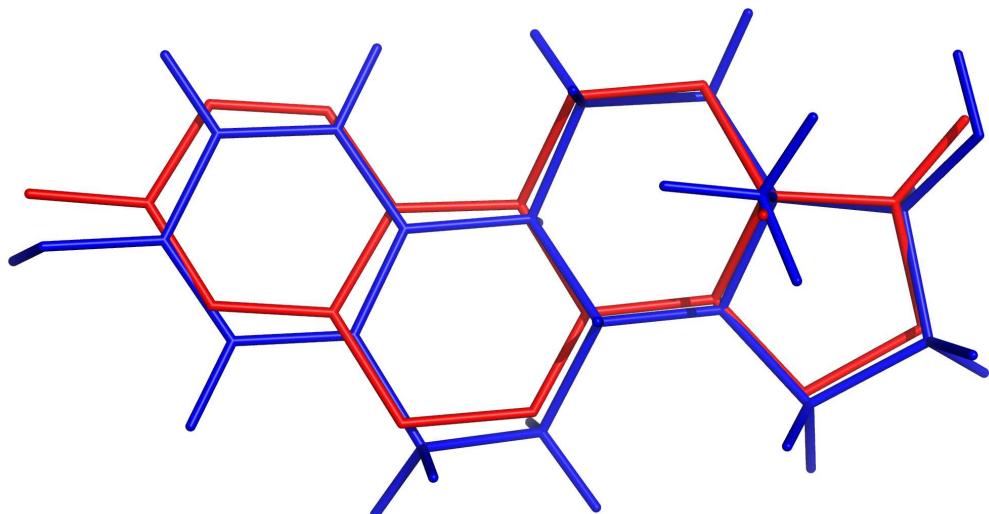


Slika 10: Pretvorba estrona v predlogo za rešetanje izključno na osnovi podobnosti oblike in volumna molekule

#### 4.2.2 Priprava proteina in izbira programa za sidranje

Iz banke proteinov ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) smo izbrali ustrezno kristalno strukturo encima 17 $\beta$ -HSD 1, ki vsebuje inhibitor ekvilin in kofaktor NADP<sup>+</sup> [PDB: 1EQU]. Aktivno mesto smo definirali kot območje, oddaljeno največ 6,5 Å od ko-kristaliziranega ekvilina. Kofaktor smo pustili v modelu. Protoniranost in torzijske kote ključnih aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu smo v programu FlexX definirali tako, da je možna kar najboljša interakcija s ko-kristaliziranim inhibitorjem. Program eHiTS protoniranost in torzijske kote določi samodejno. S pomočjo spletne aplikacije Molinspiration smo pridobili kode SMILES (\*.smi) ekvilina, s programom OMEGA pa smo spojino pretvorili v ustrezen 3D format (\*.sdf). Spojino smo nato sidrali v obdelano aktivno mesto z obema programoma za sidranje, ki ju najbolj pogosto uporabljamo na Katedri za farmacevtsko kemijo. Program FlexX je neprimerno bolje ponovil konformacijo ekvilina iz kristalne strukture, zato smo ga izbrali za izvedbo virtualnega

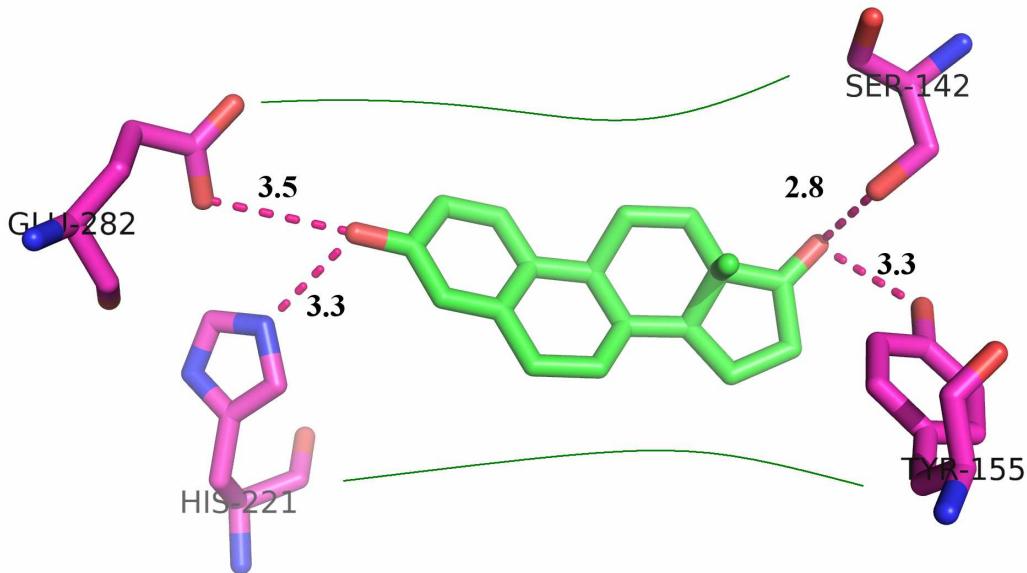
rešetanja (Slika 11). S programom FlexX obdelano aktivno mesto smo shranili kot 1equ\_1.fxx.



**Slika 11:** Primerjava konformacije inhibitorja ekvilina iz kristalne strukture (rdeče) z napovedano konformacijo programa FlexX (modro). Ujemanje je odlično, RMSD vrednost med strukturama pa znaša 1.759 Å.

#### 4.2.3 Izdelava farmakofornih zahtev in validacija metode

Na podlagi značilnosti aktivnega mesta in predvidenih vezav znanih inhibitorjev smo določili ključne interakcije. Zahtevali smo, da program zavrže vse spojine, za katere je v procesu sidranja predvidel nezmožnost tvorbe ključnih polarnih interakcij na nasprotnih straneh aktivnega mesta. Določili smo, da mora sidrana spojina tvoriti interakcije s Ser142 ali Tyr155 na eni strani in s His221 ali Glu282 na drugi strani aktivnega mesta. Farmakoforne zahteve smo shranili kot farm1.phm



**Slika 12:** Inhibitor ekvilin v aktivnem mestu encima. Na obeh koncih hidrofobnega kanala so možne polarne interakcije (Ser142 in Tyr155 ter Glu282 in His221), ki smo jih vključili v farmakoforne zahteve. Prikazane so tudi dolžine polarnih interakcij v Å.

Pred izvedbo virtualnega rešetanja smo metodo validirali z znanimi ligandi 17 $\beta$ -HSD 1. Za spojine s steroidnim skeletom (estrон, ekvilin, estradiol) je program FlexX predvidel slabšo vezavo, medtem ko je vezavo diosmetina, kumarinov in bis(hidroksifenil)tiofenov ocenil veliko bolje (57, 58). Vse izbrane spojine so ustrezale farmakofornim zahtevam.

#### 4.2.4 Prvo sidranje spojin v aktivno mesto encima 17 $\beta$ -HSD 1

Aktivno mesto encima in farmakoforne zahteve smo lahko pripravili z grafičnim vmesnikom programa FlexX. Virtualno rešetanje velike knjižnice spojin pa je preveč zahteven in dolgotrajen proces, da bi sidranje vsake spojine lahko spremljali v grafični obliki, zato smo morali uporabiti tekstovni način. V datoteki 00\_1.bat smo zbrali parametre, ki jih je moral program FlexX upoštevati pri sidranju. Virtualno rešetanje smo z naslednjim ukazom:

```
Flexx -b 00_1.bat -a '$(results)=results.txt; $(project)=1equ_1.fxx; $(pharm)=farm1.phm;
$(ligands)= rocs_hits_30.mol2'
```

Uporabili smo aktivno mesto 1equ\_1.fxx, farmakoforne zahteve farm1.phm in knjižnico spojin rocs\_hits\_30.mol2. Sidranje spojin je trajalo približno 3 tedne. Program FlexX je sidral in na podlagi cenilne funkcije rangiral le 2805 spojin, ostale namreč niso ustrezale farmakofornim zahtevam. Rezultate je program shranil v datoteko results.txt.

S pomočjo programa PyMOL je sledil vizualni pregled sidranih spojin v aktivno mesto 17 $\beta$ -HSD 1. Izločili smo spojine s potencialnim estrogenim delovanjem (steroidi, flavonoidi in ostali fitoestrogeni) ter finančno nesprejemljive spojine. Od preostalih smo pri različnih proizvajalcih naročili 18 najbolje rangiranih spojin.

#### **4.2.5 Drugo sidranje spojin v aktivno mesto 17 $\beta$ -HSD 1**

Da bi pridobili osnovne podatke o odnosu med strukturo in delovanjem (SAR) spojin z benzilidenbenzofuran-3(2H)-onskim skeletom, ki smo jih pridobili z začetnim virtualnim rešetanjem, smo na spletni strani <http://zinc.docking.org/> izvedli preprosto iskanje na osnovi 2D podobnosti. Uporabili smo dve predlogi, in sicer spojini **31** in **32**, ter z vgrajenim ZINC-ovim iskalnikom našli 329 novih spojin z 2-benzilidenbenzofuran-3(2H)-onskim skeletom. Izvedli smo sidranje novih spojin pod enaki pogoji kot smo izvedli prvo virtualno rešetanje, opisano v poglavju 4.2.4. Naročili smo 19 najbolje rangiranih in finančno sprejemljivih spojin.

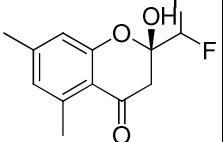
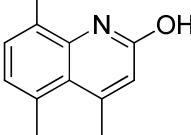
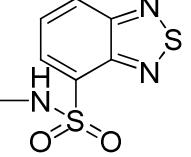
## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

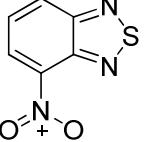
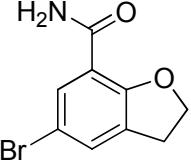
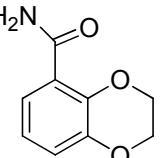
### 5.1 Rezultati inhibitorne aktivnosti spojin na 3HNR

#### 5.1.1 Rezultati spektrofotometričnega določanja inhibicije 3HNR

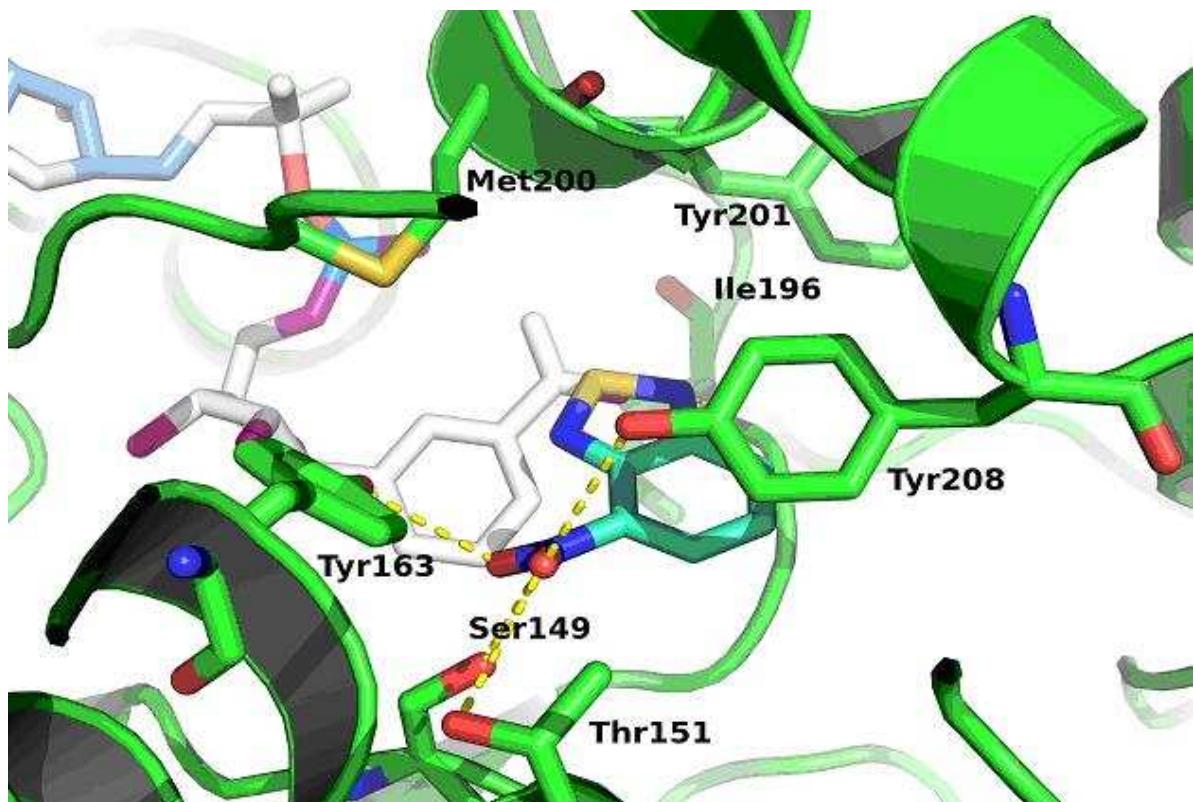
Testirali smo inhibitorno aktivnost 28 spojin, izbranih z virtualnim rešetanjem na osnovi liganda. Najprej smo izvedli presejalni test pri 50  $\mu\text{M}$  koncentraciji inhibitorjev. Spojinam, ki so zavirale delovanje 3HNR za več kot 50 %, smo določili še IC<sub>50</sub> vrednost. Delovanje 3HNR je zaviralo 6 spojin, ostale pa niso kazale inhibitorne aktivnosti. Derivati kroman-4-ona (**6**) in kinolina (**14**) so strukturno podobni DDBO, derivati benzo-1,2,5-tiodiazola (**22** in **27**), 2,3-dihidrobenzofurana (**29**) in 2,3-dihidrobenzo-1,4-dioksina (**30**) pa spojini **2**. Rezultati testiranja so prikazani v preglednici III. Spojine **14**, **27** in **29** so bile še posebej dobri inhibitorji, z IC<sub>50</sub> vrednostmi 29  $\mu\text{M}$ , 0,82  $\mu\text{M}$  in 1,9  $\mu\text{M}$ . V preglednici III so prikazane tudi vrednosti cenilne funkcije TanimotoCombo (TC) in mesto, ki ga je posamezna spojina zasedla po virtualnem rešetjanju glede na to cenilno funkcijo. Neaktivne spojine so prikazane v preglednici v prilogi na koncu diplomskega dela.

**Preglednica III:** Najboljše spojine *in vitro* testiranja na 3HNR.

Spojina	Koda	Predloga	Struktura	(%) INH	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	TC (mesto)
<b>6</b>	CB6886732	DDBO		20.3 ± 3.2		1,694 (15.)
<b>14</b>	NCI109754	DDBO		61.9 ± 2.0	<b>29</b>	1,655 (37.)
<b>22</b>	MP06956	22		33.4 ± 6.1		1,696 (28.)

<u>27</u>	NCI404747	22		> 90	<b>0,82</b>	1,705 (25.)
<u>29</u>	KM07182SC	22		> 90	<b>1,9</b>	1,677 (35.)
<u>30</u>	MO00789SC	22		32.3 ±4.3		1,917 (1.)

Najboljši inhibitor med izbranimi spojinami, spojino 27, smo sidrali v aktivno mesto 3HNR. Pri tem smo uporabili enake pogoje, kot pri virtualnem rešetanju na osnovi strukture homolognega modela, s katerim so pridobili spojino 2. Program FlexX je spojino 27 umestil v aktivno mesto in predvidel nastanek vodikovih vezi z OH skupinami Ser149, Thr151, Tyr163, Tyr208, z NH skupino Ile196 in  $\pi$ - $\pi$  interakcije s Tyr208. Mesti vezave spojin 2 in 27 se ne razlikujeta veliko, vendar pa je pri spojini 27 predvidena ena vodikova vez več (Thr151), kot pri spojini 2, kar je lahko razlog za njeno 10-krat večjo aktivnost.



**Slika 13:** Spojina **27** (modrozeleno) sidrana v homologni model 3HNR *C. lunata*. Vodikove vezi s Ser149, Thr151, Tyr163, Ile196 in Tyr208 so prikazane z rumenimi črtami.

### 5.1.2 Rezultati ugotavljanja vpliva spojin na rast in pigmentacijo *C. lunata*

Preverili smo tudi, kako *in vitro* najbolj aktivne spojine vplivajo na rast in pigmentiranost glive *C. lunata*. Po 71 urah rasti so bile kolonije brez inhibitorja, ki so služile kot negativna kontrola temno-sivo ali črno obarvane, medtem ko so bile tiste z dodanim triciklazolom (pozitvna kontrola) rdeče-rjave barve, pri čemer se je zmanjšal tudi njihov polmer (Slika 14).

Ugotovili smo, da tudi spojine **2**, **27** in **29** vplivajo na rast in pigmentiranost glive *C. lunata*. V prisotnosti spojine **27**, ki je izkazovala največjo aktivnost *in vitro*, se je polmer kolonij zmanjšal na polovico v primerjavi z negativno kontrolo, poleg tega pa so se kolonije skoraj povsem razbarvale. Tudi spojina **29** je zmanjšala rast glive, vendar pa so kolonije ostale temno-rjavo obarvane. Spojina **2** je najmanj vplivala na rast in pigmentiranost glive (Slika 14).

Po nekaj dodatnih dneh rasti so kolonije v petrijevkah s spojinami **2**, **27** in **29** postale temnejše, kolonija v prisotnosti triciklazola pa je ostala rdeče-rjava. To lahko razložimo s tem, da ima triciklazol od 250- do 2500-krat večjo afiniteto do 3HNR kot testirane spojine.



**Slika 14:** Vpliv najboljših spojin v testih *in vitro* na rast in pigmentiranost glive *C. lunata*.

Kljub temu, da opisani test ni kvanitativen, pa je opazen odnos med IC<sub>50</sub> vrednostmi spojin **2**, **27** in **29** ter njihovim vplivom na *C. lunata*. S tem lahko posredno potrdimo, da je vpliv na rast in pigmentiranost zelo verjetno posledica inhibicije 3HNR.

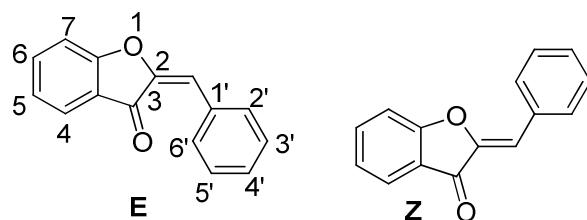
## 5.2 Rezultati inhibitorne aktivnosti na 17 $\beta$ -HSD 1

Testirali smo 18 spojin, ki smo jih pridobili z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture 17 $\beta$ -HSD 1. Kot zadetek smo definirali vsako spojino, ki je izkazovala več kot 70% inhibicijo pri koncentraciji 0,6  $\mu$ M. Tem zahtevam so ustrezale spojine **31-33**, ki so vse derivati benzilidenbenzofuran-3(2H)-ona in so prikazane v preglednici IV. Neaktivne spojine so prikazane v prilogi diplomskega dela.

**Preglednica IV:** Najboljše spojine testiranja *in vitro* na 17 $\beta$ -HSD 1, po prvem virtualnem rešetjanju.

Spojina	Koda	Struktura	(%) INH [0,6 $\mu$ M]	(%) INH [6 $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>31</b>	ZINC16718957		91	100	45±1
<b>32</b>	ZINC16976046		83	100	74±1
<b>33</b>	ZINC09154782		72	93	100±1

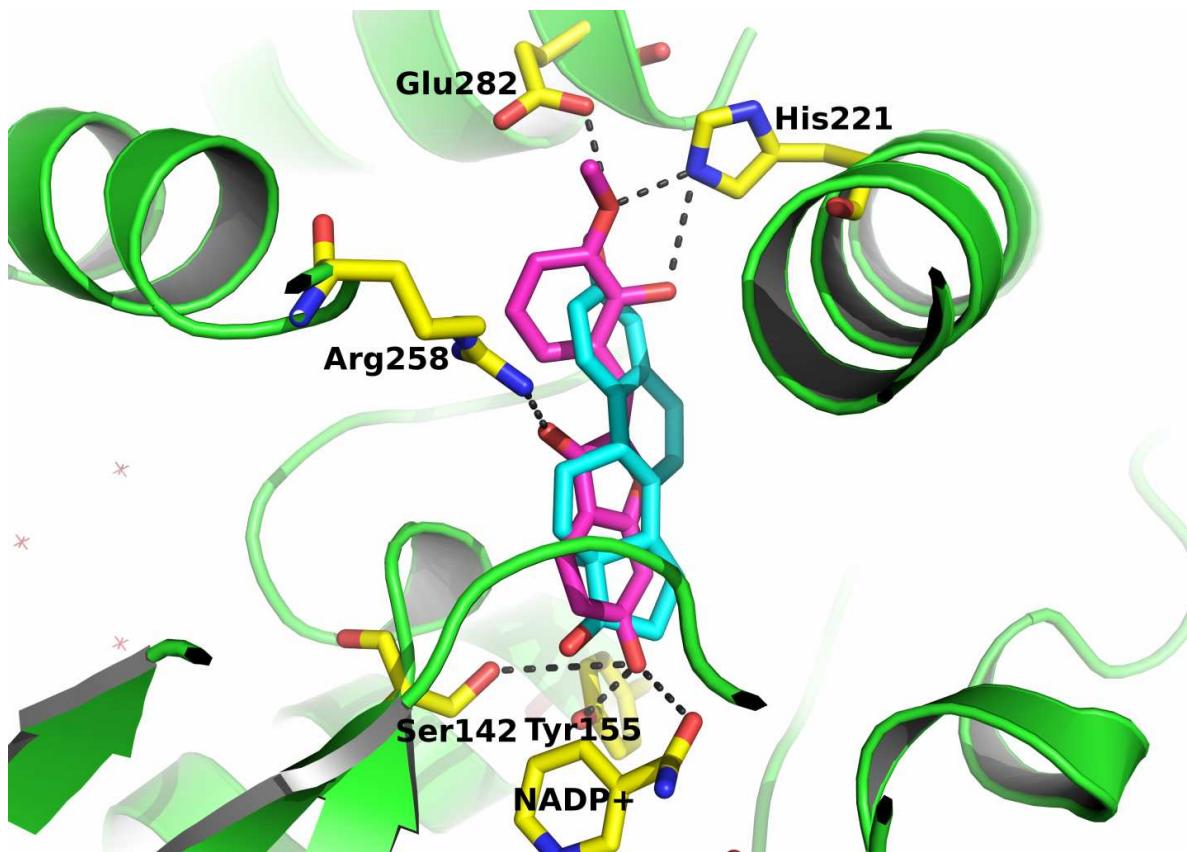
2-Benzilidenbenzofuran-3(2H)-on je osnovni skelet auronov, naravnih produktov, ki imajo protitumorno in protiparazitsko delovanje (64). Naši rezultati so v skladu s patentom, ki spojine s tem skeletom opisuje kot inhibitorje 17 $\beta$ -HSD 1 (65).



**Slika 15:** Osnovni skelet auronov v obliki E in Z.

Kljub patentiranemu osnovnemu skeletu, v literaturi še ni podatkov o biološki aktivnosti naših najboljših spojin **31** in **32**. To je dokaz, da lahko z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture z dodanimi preprostimi farmakofornimi zahtevami odkrijemo učinkovite inhibitorje 17 $\beta$ -HSD 1. Visoko inhibitorno aktivnost spojine **31** lahko razložimo z njeno predvideno vezavo v obliki izomera E v aktivno mesto 17 $\beta$ -HSD 1. Veže se namreč na podobno mesto kot ko-kristalizirani inhibitor ekvilin, kjer se del spojine z benzofuran-3-onskim delom lepo prilega C in D obroču ekvilina. Skupina 6-OH lahko tvori 3 vodikove vezi s Ser142, Tyr155 in karboksamidnim kisikom NADP<sup>+</sup>. Na nasprotnem koncu aktivnega mesta lahko spojina **31** s svojo 3'- metoksi skupino tvori vodikove vezi s His221 in Glu282, ki sta vključena tudi v prepoznavi ekvilina. Predvidena je še dodatna vodikova vez med 2'-OH skupino in His221. Lipofilni auronski skelet, podoben steroidnim ligandom, pa tvori van der Waalsove interakcije s centralnim hidrofobnim delom aktivnega mesta.

Kristalna struktura [PDB:1EQU], ki smo jo uporabili v procesu virtualnega rešetanja, je edina kristalna struktura encima 17 $\beta$ -HSD 1, v kateri je Arg258 usmerjen proti vezavnemu mestu substrata. To nakazuje na možnost spremembe konformacije aktivnega mesta 17 $\beta$ -HSD 1. Sidranje spojine **31** predvideva tvorbo vodikove vezi 3-keto kisika z močnim proton-donorskim ostankom, kar močno stabilizira vezavo. Izbira ustrezne kristalne strukture lahko torej izrazito vpliva na rezultate virtualnega rešetanja, saj dodatna vodikova vez povzroči, da cenilna funkcija *in silico* rangira spojino višje. Če bi uporabili drugo kristalno strukturo, kjer ne bi bila mogoča interakcija z Arg258, bi spojine z auronskim skeletom teoretično lahko izpadle iz širšega izbora najbolje ocenjenih zadetkov po virtualnem rešetjanju, ki jih vizualno pregledamo še pred naročilom spojin.



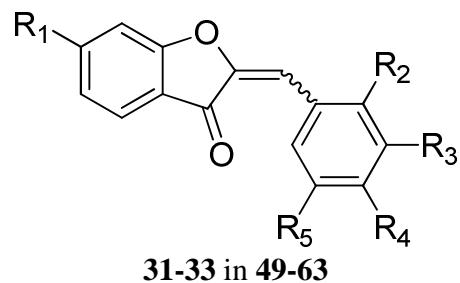
**Slika 16:** Spojina **31** (vijolično), sidrana v aktivno mesto encima 17 $\beta$ -HSD 1 [PDB: 1EQU]. Primerjava mesta vezave z ekvilinom (modro). Interakcije spojine **31** z aktivnim mestom so prikazane s sivimi prekinjenimi črtami.

Testirali smo še 19 spojin (**49-66**), ki smo jih pridobili z ZINC-ovim vgrajenim iskalnikom na osnovi 2D podobnosti s spojinama **31** in **32**. Vse spojine so vsebovale 2-benzilidenbenzofuran-3(2H)-onski skelet in nekaterim izmed njih je bila v že zgoraj omenjenem patentu dokazana inhibitorna aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 1. Kljub temu, da je cenična funkcija programa FlexX za nekaj spojin predvidela boljšo energijo vezave (FlexX score) kot za obe izhodni spojini, pa nobena izmed njih ni bila boljši inhibitor encima 17 $\beta$ -HSD 1 *in vitro* kot spojina **31**. Očitno je, da korelacija med vrednostjo FlexX score in inhibitorno aktivnostjo 2-benzilidenbenzofuranov *in vitro* ni optimalna. Šibko aktivne in celo neaktivne spojine so lahko rangirane bolje kot spojine z dokazanim močnim *in vitro* inhibitornim učinkom na encim 17 $\beta$ -HSD 1. Naše ugotovitve se skladajo z ugotovitvami drugih avtorjev, omenjenih v uvodu. Programi za virtualno rešetanje na osnovi strukture izvedejo sidranje spojin v aktivno

mesto encima zadovoljivo dobro, medtem ko je rangiranje spojin s cenilno funkcijo potrebno še temeljito izboljšati.

Benzilidenbenzofuran-3(2H)-one v splošnem pripravimo z aldolno kondenzacijo med benzofuran-3(2H)-oni in različnimi benzaldehidi (59). Produkte reakcije pogosto dobimo v obliki E/Z izomerne zmesi, čeprav je izomer E teoretično bolj stabilen (66). Točna in nedvoumna določitev konfiguracije auronov je z osnovnimi analitičnimi metodami težko izvedljiva, zato nismo določali konfiguracije naših spojin (67). Program za sidranje je predvidel različne interakcijske energije za vsak izomer. Za spojino **31**, ki se je v naši raziskavi izkazala kot najboljši inhibitor encima 17 $\beta$ -HSD 1, je program predvidel izomer E, medtem ko je za nekatere ostale aktivne spojine (**33**, **51**, **52**, **54** in **66**) predvidel izomer Z. Spojine, izbrane z virtualnim rešetanjem, smo pri različnih proizvajalcih naročili glede na njihovo predvideno interakcijsko energijo ocenjeno s cenilno funkcijo (FlexX Score), neodvisno od tega, ali je bil predviden izomer E ali Z.

**Preglednica V:** Primerjava FlexX score ter aktivnosti spojin (**31-33** in **49-63**) z auronskim skeletom *in vitro*. Podana je tudi aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 2.



Spojina	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$R^5$	FlexX score (kcal/mol) / konfiguracija	inhibicija 17 $\beta$ -HSD 1		inhibicija 17 $\beta$ - HSD 2		
							0.6 $\mu$ M	% inhibicije	$IC_{50}^e$ (nM)	(%)	
<b>31</b>	-OH	-OH	-OMe	-H	-H	-26.82 / E	91	100	45±1	33	91
<b>32</b>	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H	-33.68 / E	83	100	74±1	26	75
<b>33</b>	-OH	-H	-OH	-H	-H	-23.50 / Z	72	93	100±1	11	56
<b>49</b>	-OH	-OH	-H	-H	-H	-21.06 / E	74	96	105±1	41	87
<b>50</b>	-OH	-H	-H	-OEt	-H	-19.10 / E	73	89	168±2	27	46
<b>51</b>	-OH	-H	-OMe	-H	-H	-22.01 / Z	71	92	180±1	29	57
<b>52</b>	-OH	-H	-OMe	-OEt	-H	-18.21 / Z	71	89	183±1	32	79
<b>53</b>	-OH	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	-H	-18.35 / E	65	87	n.d.	n.d.	n.d.

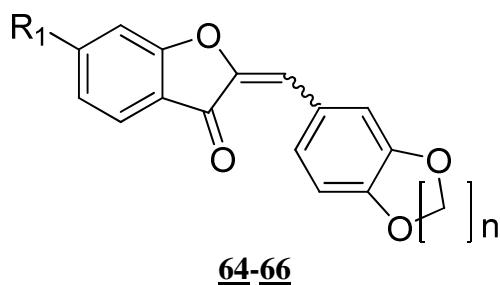
<u>54</u>	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H	-OH	-OMe	-30.22 / Z	65	90	n.d.	n.d.	n.d.
<u>55</u>	-OH	-H	-H	-OMe	-H	-19.15 / E	63	88	n.d.	n.d.	n.d.
<u>56</u>	-OAc	-H	-OMe	-OMe	-H	-23.86 / Z	33	61	n.d.	n.d.	n.d.
<u>57</u>	-OCH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-H	-OMe	-OMe	-H	-23.11 / E	23	82	n.d.	n.d.	n.d.
<u>58</u>	-OMe	-H	-H	-OH	-H	-23.88 / Z	23	75	n.d.	n.d.	n.d.
<u>59</u>	-OCH <sub>2</sub> COOH	-OMe	-OMe	-H	-H	-24.40 / Z	n.i.	61	n.d.	n.d.	n.d.
<u>60</u>	-OCH <sub>2</sub> COOH	-H	-OMe	-H	-H	-26.49 / Z	n.i.	18	n.d.	n.d.	n.d.
<u>61</u>	-OMe	-H	-OH	-H	-H	-23.94 / Z	n.i.	9	n.d.	n.d.	n.d.
<u>62</u>	-OCH <sub>2</sub> COOH	-H	-OMe	-OMe	-H	-26.15 / Z	n.i.	n.i.	n.d.	n.d.	n.d.
<u>63</u>	-OCH <sub>2</sub> CO(4-MeOPh)	-H	-H	-H	-H	-23.80 / Z	n.i.	n.i.	n.d.	n.d.	n.d.

Iz rezultatov testiranja inhibitorne aktivnosti *in vitro* smo lahko razbrali nekaj pomembnih povezav med strukturo in delovanjem (SAR) 2-benzilidenebenzofuran-3(2H)-onskih inhibitorjev encima 17 $\beta$ -HSD 1:

- Prisotnost 6-OH skupine na benzofuranonskem obroču (**R<sup>1</sup>**) je ključnega pomena za močno inhibicijo 17 $\beta$ -HSD 1, njena zamenjava pa void v znatno zmanjšanje inhibitorne aktivnosti (preglednica V in VI). Spojine 31-33, 49-55 in 64, ki imajo prosto 6-OH skupino, vse izkazujejo najmanj 60 % inhibicijo pri koncentraciji 600nM. Zelo verjetno zasedejo idealno orientacijo v vezavnem mestu, s čimer je omogočena tvorba treh vodikovih vezi močne proton-donorske 6-OH skupine s katalitičnimi ostanki Ser142/Tyr155 in proton-akceptorskim kisikom kofaktorja karboksamida, kakor je to predvidel program za sidranje FlexX.
- V seriji spojin s 6-OH skupino sicer ne moremo jasno določiti odnosa med strukturo in delovanjem, povzeli pa smo lahko nekaj osnovnih zaključkov. Najboljši inhibitor, spoojina 31 z IC<sub>50</sub> vrednostjo 45nM, vsebuje na benzilidenskem obroču skupini 2'-OH in 3'-OMe. Obe lahko tvorita vodikove vezi s preostankoma His221/Glu282, ki sta udeležena tudi pri prepoznavi ekvilina. Inhibitorna aktivnost se zmanjša, če odstranimo eno izmed obeh skupin, kar opazimo pri rezultatih spojinama 33 in 49. Iz tega sklepamo, da tvorijo 2',3'-disubstituirane spojine s polarnimi skupinami najoptimalnejše interakcije z aktivnim mestom.

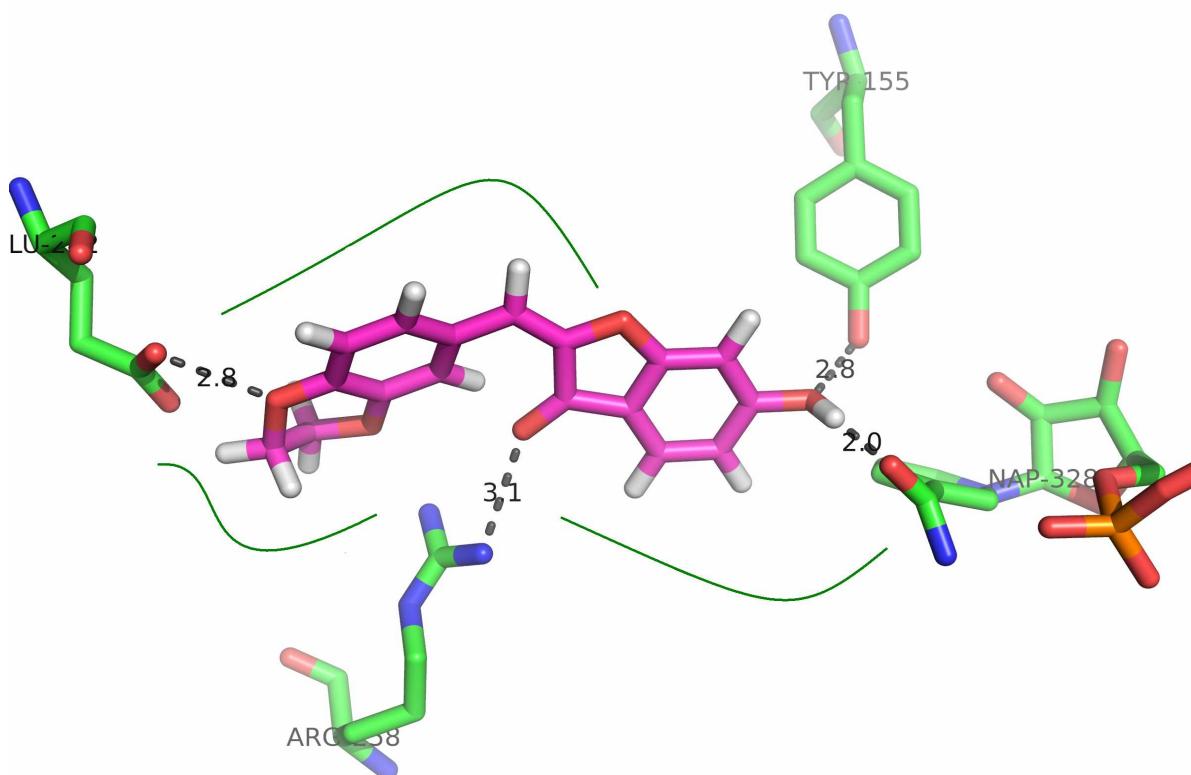
- Prisotnost OH skupine na benzilidenskem obroču ni obvezna. Spojina **32** izkazuje dobro inhibitorno aktivnost z IC<sub>50</sub> vrednostjo 74 nM, čeprav vsebuje na benzilidenskem obroču samo electron-privlačno skupino 2'-NO<sub>2</sub>. Dodatek skupin 4'-OH in 5'-OMe zmanjša inhibitorno aktivnost (spojina **54**), saj substituenti preko resonančnih vplivov zmanjšata interakcijo 2'-NO<sub>2</sub> z aktivnim mestom encima.
- Spojine z izključno alkoxi substituenti na benzilidenskem obroču (**50-53** in **55**) so obdržale visoko aktivnost, vendar pa je to manjša, kot pri spojinah **31**, **33** in **49**, ki na tem obroču vsebujejo OH skupino. Povezava med številom, velikostjo in pozicijo alkoxi substituentov in aktivnostjo ni jasno izražena.
- Spojine **56-63** nimajo proste 6-OH skupine in zato izkazujejo izrazito nižjo inhibitorno aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 1. Spojina **56**, ki ima 6-OH skupino zaestreno z ocetno kislino, ima še ohranjeno rahlo aktivnost, saj je 6-acetyl substituent še vedno dober akceptor protona. Spojine **57-63**, ki imajo na mestu 6 etersko skupino, so bile pri koncentraciji 0,6M večinoma povsem neaktivne. Izjemi sta spojini **57** in **58** s skupinama 6-karboksiamidometileneoksi in 4'-OH, ki sta zmožni tvoriti polarne interakcije z aktivnim mestom.

**Preglednica VI:** Primerjava FlexX score in aktivnosti spojin **64-66** z modificiranim benzilidenskim obročem *in vitro*. Podana je tudi aktivnost na 17 $\beta$ -HSD 2.



Spojina	R <sup>1</sup>	n	FlexX score (kcal/mol) / konfiguracija	inhibicija 17 $\beta$ -HSD 1			inhibicija 17 $\beta$ -HSD 2 (%)	
				0.6 $\mu$ M	6 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> (nM)	6 $\mu$ M	60 $\mu$ M
<b>64</b>	-OH	2	-20.08 / E	79	91	67±1	n.i.	n.i.
<b>65</b>	-OH	1	-23.12 / Z	77	87	79±1	n.i.	n.i.
<b>66</b>	-OMe	2	-23.05 / Z	n.i.	n.i.	n.d.	n.d.	n.d.

Spojini **64** in **65** s 3',4'-etilenedioksi in 3',4'-metilenedioksi skupinama na benzilidenskem obroču, imata prosto skupino 6-OH ter izkazujeta zelo močno inhibicijo encima 17 $\beta$ -HSD 1 pri 0,6  $\mu$ M, in to kljub temu, da na benzilidenskem obroču ne vsebujeta polarnih substituentov (Preglednica VI). Spojina **66** je neaktivna, verjetno zaradi 6-metoksi substituenta. Spojina **64** je drugi najmočnejši inhibitor med spojinami z auronskim skeletom in ima IC<sub>50</sub> vrednost 67 nM. Visoko inhibitorno aktivnost spojin **64** in **65** lahko pripisemo dodatnim hidrofobnim interakcijam rigidnih metilenskih in etilenskih skupin z aktivnim mestom.



**Slika 17:** Spojina **64**, sidrana v aktivno mesto encima 17 $\beta$ -HSD 1. Poleg interakcij določenih v farmakofornih zahtevah, so predvidene tudi polarne interakcije z Arg258 in kofaktorjem. Prikazane so tudi predvidene razdalje polarnih interakcij v Å (siva prekinjena črta) in hidrofobne interakcije (zelena črta).

Najaktivnejšim spojinam na encim 17 $\beta$ -HSD 1 smo določili tudi odstotek inhibicije na 17 $\beta$ -HSD 2, ki katalizira obratno reakcijo (Preglednica V in VI). Spojine s polarnimi skupinami in manjšimi alkoksi substituenti (**31-33** in **49-52**) inhibirajo encim 17 $\beta$ -HSD 2 pri 6  $\mu$ M

konzentraciji, vendar pa je njihov selektivnosti faktor precej velik. Spojini **64** in **65** z večjima 3',4'-etilenedioksi- in 3',4'-metilendioksi skupinama sta povsem selektivni in ne inhibicirata encima 17 $\beta$ -HSD 2 (Preglednica VI). Očitno je torej, da lahko z ustreznou modifikacijo benzilidenskega obroča v večji biciklični sistem dosežemo popolno selektivnost med encimskima tipoma 1 in 2, ob tem pa ohranimo močno inhibicijo encima 17 $\beta$ -HSD 1. To dejstvo bo vodilo pri načrtovanju novih inhibitorjev z 2-benzilidenbenzofuran-3(2H)-onskim skeletom.

### 5.3 Rezultati določanja čistosti in istovetnosti najbolj aktivnih spojin

Spojinam z najboljšo inhibitorno aktivnostjo v testih *in vitro*, smo določili čistost in istovetnost. Čistost smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), istovetnost pa z jedrsko magnetno resonanco (NMR) in z masno spektroskopijo (MS).

#### 5.3.1 Aktivne spojine na 3HNR

Spojina 2:

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$ : 6.13 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-O-); 6.92 (t,  $J = 8$  Hz, 1H, Ar-H); 7.07-7.09 (m, 1H, Ar-H); 7.24-7.27 (m, 1H, Ar-H)

HPLC čistost 100%; Retencijski čas = 2,74 min.

Spojina 14:

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$ : 2.37 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>); 2.64 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>); 2.69 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>); 6.36 (s, 1H, Ar-H); 6.88 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, Ar-H); 7.19 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, Ar-H)

HPLC čistost 100%; Retencijski čas = 6,78 min.

Spojina 27:

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$ : 7.93-7.97 (m, 1H, Ar-H); 8.58-8.60 (m, 1H, Ar-H); 8.68-8.70 (m, 1H, Ar-H)

HPLC čistost 99.6%; Retencijski čas = 7,20 min.

Spojina 29:

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$ : 3.26 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 4.72 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 7.58 (s, 1H, Ar-H); 7.67 (s, 1H, Ar-H)

HPLC čistost 100%; Retencijski čas = 6,36 min.

### 5.3.2 Aktivne spojine na 17 $\beta$ -HSD 1

Spojina 31:

M<sub>r</sub>: 284,26

MS (ESI): 285,08 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC čistost 95,2%; Retencijski čas = 9,07 min

Spojina 32:

M<sub>r</sub>: 283,24

MS (ESI): 284,06 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC čistost 90,2%; Retencijski čas = 11,37 min

Spojina 33:

M<sub>r</sub>: 254,24

MS (ESI): 255,07 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC čistost 95,6%; Retencijski čas = 8,03 min

## 6 SKLEP

Z virtualnim rešetanjem na osnovi liganda smo uspeli najti nove inhibitorje 3HNR iz glive *C. lunata*. Izmed 28 komercialno dostopnih spojin, jih je 6 izkazalo inhibitorno aktivnost, kar je odličen obogatitveni faktor. Odkrili smo spojino **27**, ki ima podobno obliko in razporeditev funkcionalnih spojin kot osnovna spojina **2**, a ima 10-krat večjo inhibitorno aktivnost ( $IC_{50} = 0,82 \mu M$ ). Z odkritjem spojine **14** smo dokazali, da lahko kot predlogo za iskanje novih inhibitorjev uporabimo tudi sintezi substrat encima. Izjemnega pomena je, da spojine **2**, **27** in **29** vplivajo tudi na rast in pigmentiranost glive *C. lunata*. Njihova majhna molekulska masa omogoča veliko manevrskega prostora pri optimizaciji strukture, zato so ti novi inhibitorji obetavne spojine zadetki za razvoj novih fungicidov in antimikotikov. Rezultate našega dela smo objavili v strokovni reviji Journal of Chemical Information and Modeling: Brunscole Švegelj M, Turk S, Brus B, Stojan J, Lanišnik Rižner T, Gobec, S: Novel inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase with antifungal activity identified by ligand-based and structure-based virtual screening. J Chem Inf Model 2011; 51(7):1716-24.

Dokazali smo, da lahko virtualno rešetanje uspešno vključimo tudi v odkrivanje novih inhibitorjev encima 17 $\beta$ -HSD 1. Z ustrezeno obdelavo celotne knjižnice spojin ZINC\_druglike, dodanimi preprostimi farmakofornimi zahtevami in sidranjem v aktivno mesto encima, smo odkrili nove, visoko aktivne nesteroidne inhibitorje z 2-benzilidenbenzofuran-3(2H)-onskim (auronskim) skeletom. Tako smo odkrili spojino **31** z  $IC_{50}$  vrednostjo 45nM. Na osnovi 2D podobnosti smo dokazali, da je auronski skelet ključen za inhibicijo. Odkrili smo tudi spojino **64**, z  $IC_{50}$  vrednostjo 67nM in s tem pokazali, da lahko ustrezeno substituirani auroni ohranijo visoko aktivnost in so hkrati povsem selektivni za 17 $\beta$ -HSD 2. Visoko aktivne spojine z naravnim auronskim skeletom z vrednostjo  $IC_{50}$  v nizkem nanomolarnem območju, ki smo jih odkrili z virtualnim rešetanjem na encim 17 $\beta$ -HSD 1, predstavljajo obetaven začetek razvoja novih zdravilnih učinkovin za lokalno znižanje vrednosti estradiola pri hormonsko odvisnih boleznih. Rezultate dela smo objavili v reviji The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology: Starčević Š, Turk S, Brus B, Cesar J, Lanišnik Rižner T, Gobec S. Discovery of highly potent nonsteroidal 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors by virtual high-throughput screening. (Sprejeto v objavo)

## 7 LITERATURA

1. Klebe G: Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov Today* 2006; 11: 580-94.
2. Bajorath J: Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 882-94.
3. Kapetanović I M: Computer-aided drug discovery and development (CADD): *in silico*-chemico-biological approach. *Chem Biol Interact* 2008; 30: 165–76.
4. Ripphausen P, Nisius B, Peltason L, Bajorath J: Quo Vadis, Virtual Screening? A Comprehensive Survey of Prospective Applications. *J Med Chem* 2010; 53 (24): 8461–7.
5. Ekins S: Computer applications in pharmaceutical research and development; John Wiley and Sons, 2006.
6. Congreve M, Murray C W, Blundell T L: Keynote review: Structural biology and drug discovery. *Drug Discov Today* 2005; 13(1): 895-907.
7. Irwin J, Shoichet B: ZINC-a free database for commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* 2005; 45: 177-82.
8. NCI DTP Discovery Services, <http://www.dtp.nci.nih.gov>.
9. Lipinski C. A, Lombardo F, Dominy B W, Feeny P J: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 23: 3-25.
10. Oprea T I, Davis A M, Teague S J, Leeson P D: Is there difference between leads and drugs? A historical perspective. *J Chem Inf Model* 2001; 41 (5): 1308–15.
11. Wilke, M. S.; Lovering, A. L.; Strynadka, N. C.  $\beta$ -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 525-33.
12. <http://www.eyesopen.com/products/applications/filter.html> april 2011.
13. <http://www.epa.gov/ncct/dsstox/MoreonSMILES.html> november 2010.
14. <http://www.eyesopen.com/docs/pdf/babel.pdf> november 2010.
15. <http://www.eyesopen.com/docs/omega/current/pdf/OMEGA.pdf> april 2011.
16. Boström J, Greenwood J R, Gottfries J: Assessing the performance of OMEGA with respect to retrieving bioactive conformations. *J Mol Graph Model* 2003; 21: 449-62.

17. Guido R, Oliva G, Andricopulo A D: Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Curr Med Chem* 2008; 15: 37-46.
18. Günther J, Bergner A, Hendlich M, Klebe G: Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using Relibase. *J Mol Biol* 2003; 326: 621–36.
19. Ferreira R S, Simeonov A, Jadhav A, Eidam O, Mott B T, Keiser M J, McKerrow J H, Maloney D J, Irwin J J, Shoichet B K: Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *J Med Chem* 2010; 53: 4891-905.
20. <http://www.biosolveit.de/FlexX/> april 2011.
21. [http://trilos.com/data/SYBYL/CSCORE\\_072505.pdf](http://trilos.com/data/SYBYL/CSCORE_072505.pdf) november 2010.
22. Warren G L, Andrews C W, Capelli A, Clarke B, LaLonde J, Lambert M H, Lindvall M, Nevins N, Semus F S, Senger S, Tedesco G, Wall I D, Woolven, J W, Peishoff C E, Head M S: A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem* 2006; 49: 5912-31.
23. [http://www.simbiosys.ca/ehits/ehits\\_overview.html](http://www.simbiosys.ca/ehits/ehits_overview.html) april 2010.
24. Zsoldos Z., Simon A, Reid D, Sadjad B, Johnson A P: eHiTS: An innovative approach to the docking and scoring function problems. *Curr Protein Pept Sci* 2006; 7: 421-35.
25. Zsoldos Z, Simon A, Reid D, Sadjad B, Johnson A P: A new fast, exhaustive flexible ligand docking system. *J Mol Graph Model* 2007; 26: 198-212.
26. Nicholls A, McGaughey G B, Sheridan R P, Good A C, Warren G, Mathieu M, Muchmore S V, Brown S P, Grant A J, Haigh J A, Nevins N, Jain A N, Kelley B: Molecular shape and medicinal chemistry. *J Med Chem* 2011; 53: 3862–86.
27. Mason J S, Good A C, Martin E J: 3-D pharmacophores in drug discovery. *Curr Pharmaceut Des* 2001; 7: 567-97.
28. Miller M A: Chemical database techniques in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1: 220-27.
29. <http://www.eyesopen.com/docs/rocs/3.0.0/pdf/ROCS.pdf> november 2010.
30. Hawkins P C D, Skillman A G, Nicholls A: Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *J Med Chem* 2007; 50: 74-82.
31. [http://www.eyesopen.com/docs/vida/4.0.0/pdf/User\\_Manual.pdf](http://www.eyesopen.com/docs/vida/4.0.0/pdf/User_Manual.pdf) november 2010.

32. <http://www.pymol.org/> april 2011.
33. Rinaldi M G, Phillips P, Schwartz J G, Winn R E, Holt G R, Shagets F W, Elrod J, Nishioka G, Aufdemorte T B: Human *Curvularia* infections. Report of five cases and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 6: 27-39.
34. Bartynski J M, McCaffrey T V, Frigas E: Allergic fungal sinusitis secondary to dermatiaceous fungi - *Curvularia lunata* and *Alternaria*. *Adv Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 103: 32-9.
35. Bryan C S, Smith C W, Berg D E, Karp R B: *Curvularia lunata* endocarditis treated with terbinafine: case report. *Clin Infect Dis* 1993; 16:30-2.
36. Janaki C, Sentamilselvi G, Janaki V R, Devesh S, Ajithados K: Case report. Eumycetoma due to *Curvularia lunata*. *Mycoses* 1999; 42: 345-6.
37. Travis W D, Kwon-Chung K J, Kleiner D E, Geber A, Lawson W, Pass H I, Henderson D: Unusual aspects of allergic bronchopulmonary fungal disease: report of two cases due to *Curvularia* organisms associated with allergic fungal sinusitis. *Hum Pathol* 1991; 22: 1240-48.
38. Revankar S G, Patterson J E, Sutton D A, Pullen R, Rinaldi M G: Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 467-76.
39. Polak A: Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses* 1990; 33: 215-24.
40. Nosanchuk J D, Casadevall A: The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 2003; 5: 203-23.
41. Bell A A, Wheeler M H: Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathology*. 1986: 411-51.
42. Jordan D B, Basarab G S, Liao D I, Johnson W M, Winzenberg K N, Winkler D A: Structure-based design of inhibitors of the rice blast fungal enzyme trihydroxynaphthalene reductase. *J Mol Graph Model* 2001; 19: 434-47, 470-1.
43. Brusko M, Zorko K, Kerbler V, Martens S, Stojan J, Gobec S, Lanišnik Rižner T: Trihydroxynaphthalene reductase of *Curvularia lunata* - a target for flavonoid action? *Chem Biol Interact* 2009; 178: 259-67.
44. Brusko M, Štefane B, Zorko K, Anderluh M, Stojan J, Lanišnik Rižner T, Gobec S: Towards the first inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase from *Curvularia lunata*:

- synthesis of artificial substrate, homology modelling and initial screening. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 5881-9.
45. Anderson A, Jordan D, Schneider G, Lindquist Y: Crystal structure of the ternary complex of 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase from *Magnaporthe grisea* with NADPH and an active-site inhibitor. *Structure* 1996; 4: 1161-70.
46. Cassetta A, Büdefeld T, Lanišnik Rižner T, Kristan K, Stojan J, Lamba D: Crystallization, X-ray diffraction analysis and phasing of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*. *Acta Cryst* 2005; 61: 1032-4.
47. [www.dora.com](http://www.dora.com) April 2011
48. Miller W R, Bartlett J M, Canney P, Verrill M: Hormonal therapy for postmenopausal breast cancer: the science of sequencing. *Breast Canc Res Treat* 2007; 103: 149–60.
49. Lilienkampf A, Karkola S, Alho-Richmond S, Koskimies P, Johansson N, Huhtinen K, Vihko K, Wähälä K: Synthesis and biological evaluation of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 $\beta$ -HSD1) inhibitors based on a thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one core. *J Med Chem* 2009; 52: 6660-71.
50. Day J M, Tutil H J, Purohit A, Reed M J: Design and validation of specific inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis. *Endocr Relat Canc* 2008; 15: 665-92.
51. Laplante Y, Rancourt C, Poirier D: Relative involvement of three 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 7 and 12) in the formation of estradiol in various breast cancer cell lines using selective inhibitors. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 301: 146-53.
52. Meier M, Möller G, Adamski J: Perspectives in understanding the role of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in health and disease. *Ann New York Acad Sci* 2009; 1155: 15-24.
53. Šmuc T, Ribič-Pucejl M, Šinkovec J, Husen B, Thole H, Lanišnik-Rižner T: Expression analysis of the genes involved in estradiol and progesterone action in human ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23 (2): 105–11.

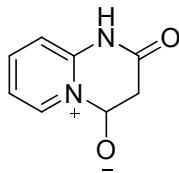
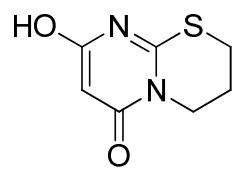
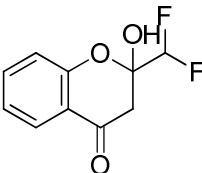
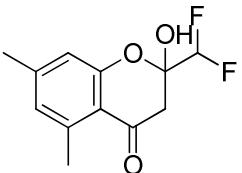
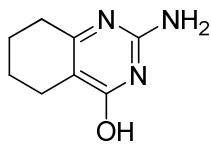
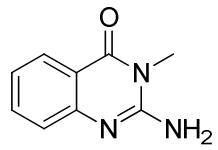
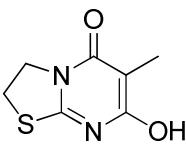
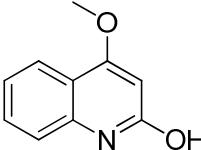
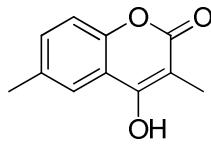
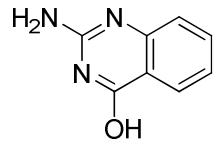
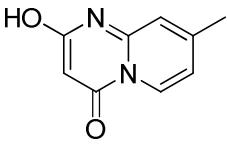
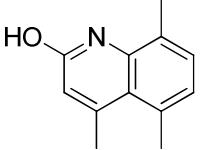
54. Miyoshi Y, Ando A, Shiba E, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S: Involvement of up-regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *Int J Canc* 2001; 94(5): 685–9.
55. Oster A, Klein T, Werth R, Kruchten P, Bey E, Negri M, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Hartmann R W: Novel estrone mimetics with high 17 $\beta$ -HSD 1 inhibitory activity. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 3494–505.
56. Ghosh D, Pletnev V Z, Zhu D W, Wawrzak Z, Duax W L, Pangborn W, Labrie F, Lin S X: Structure of human estrogenic 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure* 1995; 3: 503-13.
57. Kruchten P, Werth R, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Hartmann R W: Development of a biological screening system for the evaluation of highly active and selective 17 $\beta$ -HSD1- inhibitors as potential therapeutic targets. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 301: 154-7.
58. Brožič P, Lanišnik Rižner T, Gobec S: Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Curr Med Chem* 2008; 10: 137-50.
59. Bey E, Marchais-Oberwinkler S, Negri M, Kruchten P, Oster A, Klein T, Spadaro A, Werth R, Frotscher M, Birk B, Hartmann R W: New Insights into the SAR and Binding Mode of Bis(hydroxyphenyl)thiophenes and-bezenes. *J Med Chem* 2009; 51: 6724-43
60. Starčević Š, Brožič P, Turk S, Cesari J.; Lanišnik-Rižner T, Gobec S: Synthesis and biological evaluation of (6- and 7-Phenyl) coumarin derivatives as selective nonsteroidal inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Med Chem* 2011; 54(1) 248-61.
61. Frotscher M, Ziegler E, Marchais-Oberwinkler S, Kruchten P, Neugebauer A, Fetzer L, Scherer C, Müller-Vieira, Messinger J, Thole H, Messinger J, Hartmann R W: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of (Hydroxyphenyl)naphthalene and -quinoline Derivatives: Potent and Selective Nonsteroidal Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *J Med Chem* 2008; 51: 2158-69.
62. Sawicki M W, Erman M, Puranen T, Vihko P, Ghosh D: Structure of the ternary complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1,3,5,7-tetraen-17-one (equilin) and NADP+, *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 1999; 96: 840-45.

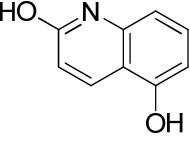
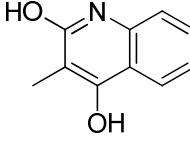
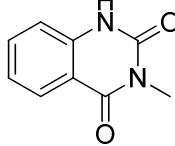
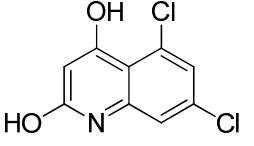
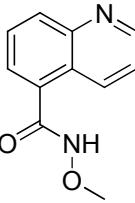
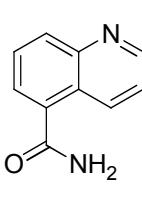
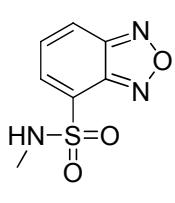
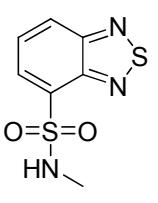
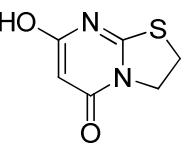
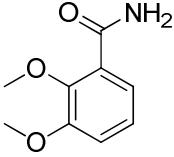
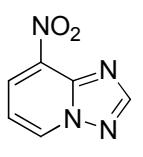
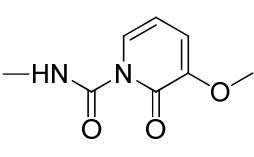
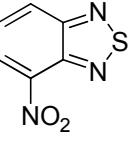
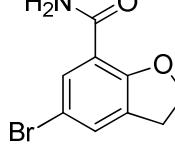
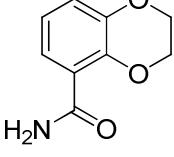
63. Thompson J E, Basarab G S, Pierce J, Hodge C N, Jordan D B: 2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-4H benzopyran-4-one: a nonphysiological substrate for fungal melanin biosynthetic enzymes. *Anal Biochem* 1998; 256: 1-6.
64. Boumendjel A: Aurones: a subclass of flavones with promising biological potential. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2621-30.
65. Yoshihama M, Nakakoshi M, Nakamura J, Nakayama S, Takahashi K: Remedies For Hormone-dependent Diseases. United States Patent, Patent number WO9912540 (A1), date of patent Jul. 16, 1998
- 66 Atta-Ur-Rahman, Choudhary M I, Hayat S, Khan A M, Ahmed A: Two new aurones from marine brown alga *Spatoglossum variabile*, *Chem Pharmaceut Bull* 2001; 49: 105-7.
- 67 Sim H M, Lee C Y, Ee P L R, Go M L: Dimethoxyaurones: Potent inhibitors of ABCG2 (breast cancer resistance protein). *Eur J Pharmaceut Sci* 2008; 35: 293-306.

## Priloga

### 3HNR

Preglednica spojin s strukturami in kodami proizvajalcev, ki smo jih uporabili za testiranje *in vitro* na encimu 3HNR glive *C. lunata*.

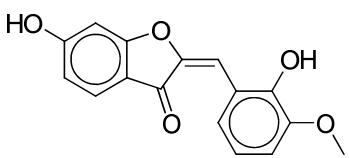
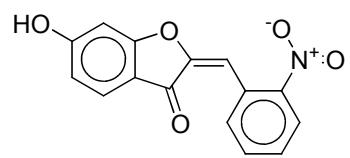
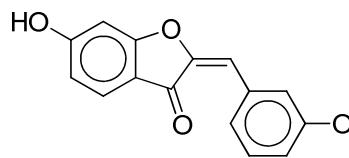
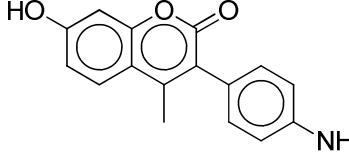
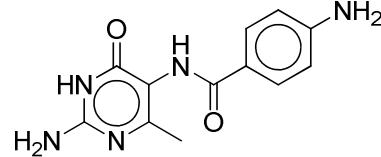
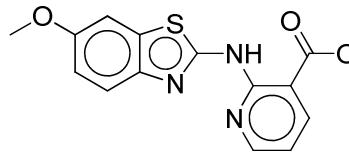
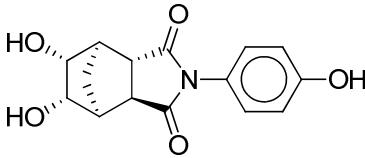
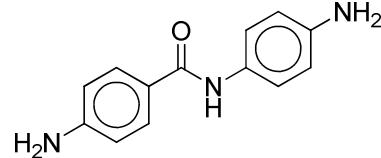
Spojine podobne predlogi DDBO			
			
<b>3</b> ChemBridge 5517757	<b>4</b> ChemBridge 5240510	<b>5</b> ChemBridge 5483149	<b>6</b> ChemBridge 6886732
			
<b>7</b> Apollo Scientific OR8486	<b>8</b> InterBioScreen STOCK2S-98325	<b>9</b> Specs AE-406/41056843	<b>10</b> Specs AE-562/12222666
			
<b>11</b> TimTec ST5308839	<b>12</b> NCI 51782	<b>13</b> NCI 102020	<b>14</b> NCI 109754

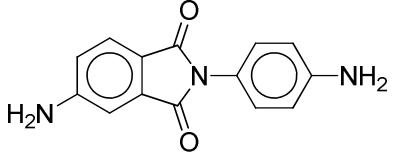
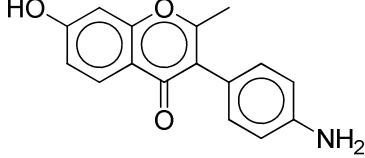
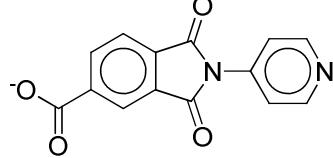
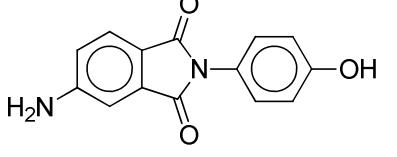
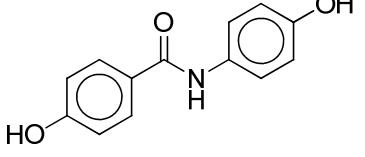
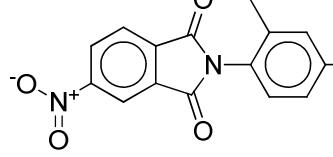
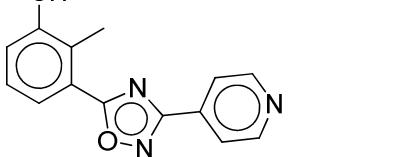
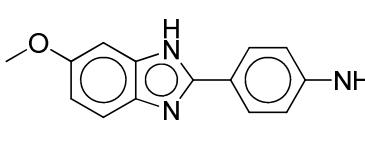
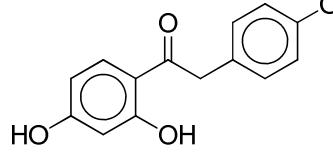
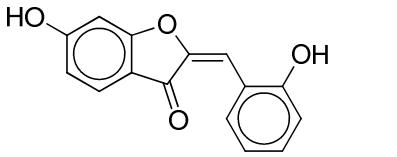
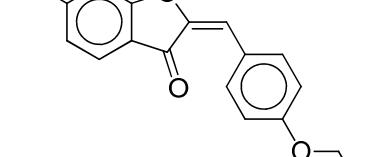
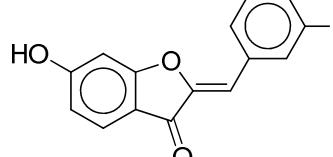
			
<b>15</b> NCI 134652	<b>15</b> NCI 193538	<b>17</b> NCI 401253	<b>18</b> Maybridge RH01004SC
<b>Spojine podobne predlogi 2</b>			
			
<b>19</b> Enamine T6108076	<b>20</b> Enamine T6205275	<b>21</b> Vitas-M STK461264	<b>22</b> InterBioScreen STOCK3S-06956
			
<b>23</b> InterBioScreen STOCK1S-86808	<b>24</b> NCI 40843	<b>25</b> NCI 116466	<b>26</b> NCI 281257
			

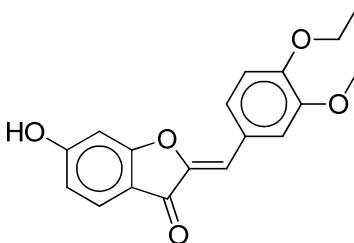
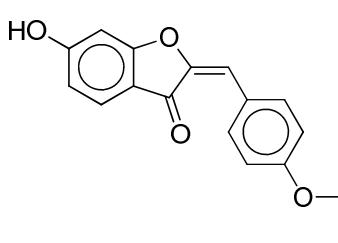
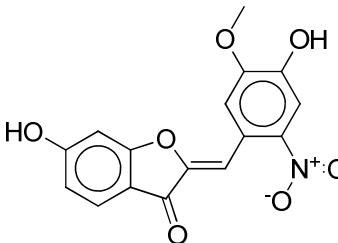
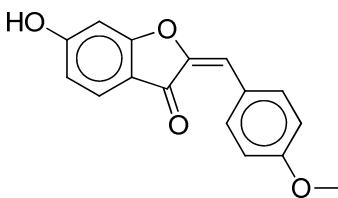
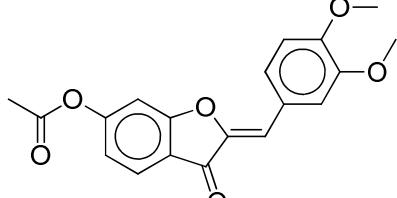
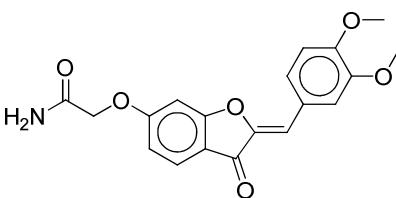
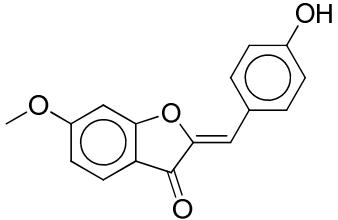
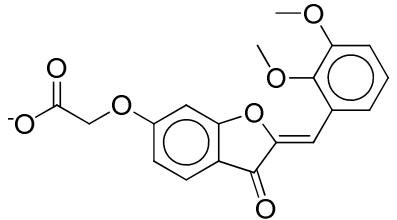
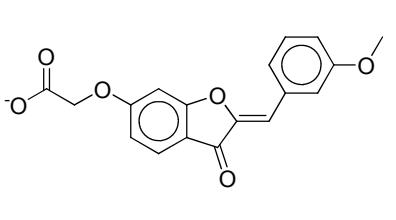
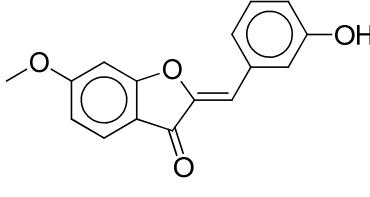
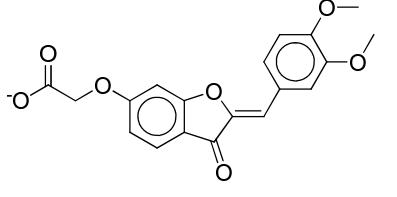
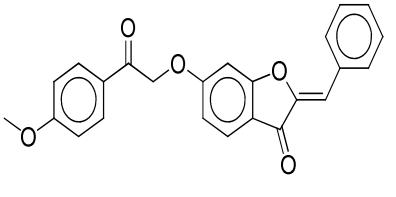
<b>27</b> NCI 404747	<b>28</b> Maybridge CC01418CB	<b>29</b> Maybridge KM07182SC	<b>30</b> Maybridge MO00789SC
-------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

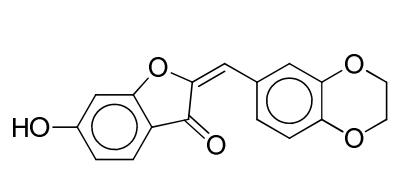
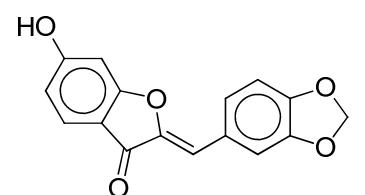
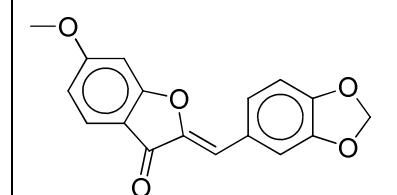
## 17 $\beta$ -HSD 1

Preglednica spojin s strukturami in kodami, ki smo jih uporabili za testiranje *in vitro* na encimu 17 $\beta$ -HSD 1.

Spojine pridobljene s prvim sidranjem					
 <b>31</b> ZINC16718957	 <b>32</b> ZINC16976046	 <b>33</b> ZINC09154782			
 <b>34</b> ZINC01642488	 <b>35</b> ZINC16971326	 <b>36</b> ZINC00382846			
 <b>37</b> ZINC04908511	 <b>38</b> ZINC00057106	 <b>39</b> ZINC00225943			

		
<b>40</b> ZINC00360309	<b>41</b> ZINC05925628	<b>42</b> ZINC00258711
		
<b>43</b> ZINC00240468	<b>44</b> ZINC00552816	<b>45</b> ZINC00066260
		
<b>46</b> ZINC19114215	<b>47</b> ZINC05687042	<b>48</b> ZINC00487423
<b>Spojine pridobljene z drugim sidranjem</b>		
		
<b>49</b> ZINC00935987	<b>50</b> ZINC00490727	<b>51</b> ZINC12862585

		
<b>52</b> ZINC14198548	<b>53</b> ZINC23053397	<b>54</b> ZINC09454464
		
<b>55</b> ZINC145973	<b>56</b> ZINC12662280	<b>57</b> ZINC12371169
		
<b>58</b> ZINC11865133	<b>59</b> ZINC12890127	<b>60</b> ZINC12890113
		
<b>61</b> ZINC11865129	<b>62</b> ZINC12890027	<b>63</b> ZINC05959318

		
<b>64</b> ZINC14198346	<b>65</b> ZINC02160762	<b>66</b> ZINC05960289