

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA HORVAT

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

**ISKANJE LIGANDOV TOLL-U PODOBNEGA RECEPTORJA 7 S POMOČJO
VIRTUALNEGA REŠETANJA**

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA HORVAT

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

**ISKANJE LIGANDOV TOLL-U PODOBNEGA RECEPTORJA 7 S POMOČJO
VIRTUALNEGA REŠETANJA**

**THE SEARCH FOR TOLL-LIKE RECEPTOR 7 LIGANDS USING VIRTUAL
SCREENING METHODS**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na katedri za farmacevtsko kemijo ter na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, na Zavodu za transfuzijsko medicino, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Žiga Horvat

Ljubljana, 2012

KAZALO VSEBINE

SEZNAM OKRAJŠAV	V
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
UVOD	1
1. Uporaba računalniških metod pri iskanju novih učinkovin	1
a) Splošno	1
b) Filtriranje knjižnic virtualnih spojin	1
c) Virtualno reševanje na osnovi strukture liganda	3
d) Virtualno reševanje na osnovi strukture tarče – sidranje	6
2. Imunski sistem in Toll-u podobni receptorji	7
a) Imunski sistem	7
b) Toll-u podobni receptorji	9
c) Toll-u podoben receptor 7	11
HIPOTEZA IN NAČRT DELA	14
1. Virtualno reševanje na osnovi strukture liganda	14
2. Testiranje spojin na celicah celične linije HEK-Blue™ hTLR7	14
MATERIALI IN METODE	16
1. Računalniške metode	16
a) Generiranje 3D konformacij ligandov TLR7	16
b) Generiranje 3D konformacij knjižnice spojin ZINC	17
c) Izdelava iskalne predloge za uporabo pri virtualnem reševanju na osnovi strukture liganda	19
d) Virtualno reševanje na osnovi strukture liganda z računalniškim programom ROCS	21
2. Testiranje na celicah celične linije HEK-Blue™ hTLR7	23
a) Priprava celičnega gojišča	23
b) Odmrzovanje celic	23
c) Štetje celic	24
d) Gojenje in priprava celic	26
e) Topnost spojin	27
f) Citotoksičnost	29
g) Test agonistične aktivnosti spojin na TLR7	30
h) Test antagonistične aktivnosti spojin na TLR7	32

<i>i) Določanje IC₅₀</i>	32
REZULTATI IN DISKUSIJA.....	34
1. Rezultat virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda	34
1. Topnost.....	40
2. Citotoksičnost.....	41
3. Preliminarni testi agonistične in antagonistične aktivnosti	43
<i>a) Preliminarni test agonistične aktivnosti</i>	46
<i>b) Preliminarni test antagonistične aktivnosti</i>	46
4. Določanje IC ₅₀	47
<i>a) Prvo določanje IC₅₀</i>	47
<i>a) Drugo določanje IC₅₀</i>	51
SKLEP	60
LITERATURA.....	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Primeri 1D, 2D in 3D deskriptorjev molekul	5
Slika 2: Prikaz signalizacijskih poti nekaterih TLR	12
Slika 3: Iskalna predloga, narejena z računalniškim programom vROCS iz učinkovine imikvimod	20
Slika 4: Iskalna predloga, narejena z računalniškim programom vROCS iz spojine 54 iz članka (32).....	20
Slika 5: Mreža, ki je natisnjena na Bürker-Türker-ovem citometru (40)	25
Slika 6: Struktura morfina, ki je agonist na opioidnih μ -receptorjih	43
Slika 7: Struktura naloksona, ki je kompetitivni antagonist na opioidnih μ -receptorjih	44
Slika 8: Rezultati preliminarnega testiranja spojin za agonistično delovanje.....	45
Slika 9: Rezultati preliminarnega testiranja spojin za antagonistično delovanje.....	45
Slika 10: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojnini 10.....	50
Slika 11: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojnini 11	50
Slika 12: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojnini 27	51

Slika 13: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 3	53
Slika 14: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 22	54
Slika 15: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 10	55
Slika 16: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 11	56
Slika 17: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 27	57
Slika 18: Strukturi spojine 27 (levo) in spojine 54 (desno) iz članka 32.....	58

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Enačba za izračun Tanimotovega koeficienta.....	5
Enačba 2: Enačba za izračun števila celic z uporabo Bürker-Türk-ovega citometra.....	26
Enačba 3: Enačba za izračun volumna DMSO, ki ga je potrebno dodati spojinam, da dobimo končno koncentracijo raztopine 50 mmol/l.....	27
Enačba 4: Enačba za izračun volumna suspenzije celic, ki ga je treba dodati v epruvetko, da dobimo po pripravi predpisano število celic v vsaki vdolbinici v tkivni plošči.....	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz molekulskih mas spojin, mase posamezne dobljene spojine ter volumna DMSO, v katerem smo morali raztopiti spojine za dobljeno koncentracijo 50 mmol/l.....	28
Preglednica II: Prikaz strukture ter vrednosti cenilnih funkcij za spojine, ki smo jih izbrali za testiranje	34
Preglednica III: Prikaz rezultatov testa topnosti spojin v DMSO in pripravljenem celičnem gojišču	40
Preglednica IV: Prikaz deleža preživelih celic v celičnem gojišču z dodanimi spojinami v koncentraciji 250 μ mol/l in 500 μ mol/l	41
Preglednica V: Prikaz izračunane vrednosti IC_{50} , 95 % intervala zaupanja ter vrednosti koeficienta R^2 za podatke, dobljene pri prvem preskusu določanja IC_{50}	47
Preglednica VI: Prikaz izračunane vrednosti IC_{50} , 95 % intervala zaupanja ter vrednosti koeficienta R^2 za podatke, dobljene pri drugem preskusu določanja IC_{50}	52

SEZNAM OKRAJŠAV

AP-1:	Activator Protein 1; transkripcijski faktor AP-1
APC:	Antigen-Presenting Cell; antigene predstavljajoče celice
CD:	Cluster of Differentiation; označevalec pripadnosti, koreceptor
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium; celično gojišče z visoko vsebnostjo vitaminov, aminokislin in glukoze
DMSO:	dimetilsulfoksid
FBS:	Fetal Bovine Serum; serum kravjega ploda
HEK293 cells:	Human Embryonic Kidney 293 celice; celice, ki so jih pridobili iz ledvičnih celic človeškega zarodka.
HTS:	High-Throughput Screening; rešetanje z visoko zmogljivostjo
IC₅₀:	srednja inhibitorna koncentracija; pomeni takšno koncentracijo spojine, pri kateri je zaviralni učinek polovičen glede na spojiniin maksimalen zaviralni učinek
IKK:	I κ B Kinase; encim, ki je del signalne poti pri Toll-u podobnih receptorjih
IL:	Interlevkin
INF:	Interferon
IRAK:	Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase; encim, ki je del signalne poti pri Toll-u podobnih receptorjih
IRF:	Interferon Regulatory Factor; encim, ki je del signalne poti pri Toll-u podobnih receptorjih
LPS:	lipopolisaharid
LRR:	Leucine-Rich Repeat; strukturni element proteinov, kjer se v aminokislinskem zaporedju večkrat zapored ponovi (20 do 30-krat) aminokislina levcin
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase; encim, ki je del signalne poti pri Toll-u podobnih receptorjih
PHK:	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
MyD88:	Myeloid Differentiation primary response gene 88; adapterska molekula, ki je del signalne poti pri TLR

NF-κB:	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; transkripcijski (jedrni) faktor κ B
PAMP:	Pathogen Associated Molecular Pattern; za patogen značilen molekularni vzorec
pDC:	Plasmacytoid Dendritic Cell; plazmacitoidna dendritična celica
PRR:	Pattern Recognition Receptors; receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev
SEAP:	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase; biotehnološko spremenjena placentarna alkalna fosfataza
SMILES:	Simplified Molecular Input Line Entry System; pomeni način zapisa 2D strukture molekul v obliki ene vrstice teksta
TAB:	TAK1 Binding Protein; protein, ki je del signalne poti pri Toll-u podobnih receptorjih
TAK:	TGF- β Activated Kinase; encim, ki je del signalne poti pri Toll-u podobnih receptorjih
TCR:	T-Cell Receptor; receptor limfocita T
TDS:	Technical Data Sheet; podatkovni list
TGF:	Tumor (Transforming) Growth Factor; rastni faktor
Th cell:	T-helper cell; celica T pomagalka
TIR:	Toll/Interleukin-1 Receptor; znotrajcelična domena Toll-u podobnih receptorjev
TLR:	Toll-Like Receptor; Toll-u podoben receptor
TNF:	Tumor Necrosis Factor; tumor nekrotizirajoči dejavnik
TRAF:	TNF Receptor-Associated Kinase; encim, ki je del signalne poti pri Toll-u podobnih receptorjih

POVZETEK

Z delom smo želeli poiskati nove spojine, ki bi delovale na Toll-u podobnem receptorju (TLR) 7. Zaradi dejstva, da že obstajajo spojine z delovanjem na TLR7, hkrati pa kristalna struktura receptorja še ni poznana, smo se odločili, da bomo nove spojine poiskali s pomočjo virtualnega reševanja na osnovi strukture liganda. Iskalno predlogo za virtualno reševanje smo izdelali s pomočjo znanega agonista imikvimoda, ki se uporablja za zdravljenje nekaterih oblik kožnega raka ter genitalnih bradavic, ter spojine **54**, ki so jo odkrili Shukla in sodelavci ter ima glede na navedbe v članku, kar 247-krat močnejše agonistično delovanje kot imikvimod. Obe spojini imata imidazokinolinski skelet. Virtualno reševanje smo izvedli s pomočjo programa ROCS, družbe OpenEye, nove spojine pa smo izbrali iz internetne knjižnice komercialno dostopnih spojin ZINC. Pri izbiri spojin iz knjižnice smo se omejili na spojine, ki imajo glede na pravila Lipinskega, t.i. učinkovini podobne ("drug-like") lastnosti.

Iz spojin, ki so bile rezultat virtualnega reševanja na osnovi strukture liganda smo izbrali 25 spojin, ki so bile takrat na voljo. Pri izbiri smo upoštevali oceno cenilne funkcije programa ROCS, oziroma stopnjo ujemanja strukture spojin z iskalnim nizom ter strukturno raznolikost spojin.

Vse dobljene spojine, ki niso bile zadovoljivo topne ali so bile citotoksične, smo izločili. Tako smo od 25 naročenih dobili 11 spojin, ki smo jih testirali na celicah celične linije HEK-Blue™ hTLR7, družbe InvivoGen. Vse spojine smo preliminarno testirali za agonistično in za antagonistično delovanje ter ugotovili, da so spojine antagonisti na TLR7. Nadalje smo na podlagi rezultatov preliminarnih testov preskušali le antagonistično delovanje in spojinam skušali določiti IC₅₀. Najbolje se je odrezala spojina **27**, katere IC₅₀ je približno 100 μmol/l, pri čemer je ujemanje krivulje dobro (R² je nad 0,97 pri obeh preskusih). Spojina predstavlja odlično izhodišče za nadaljnje delo.

ABSTRACT

In the present work, we set out to find new compounds with activity on the Toll-like receptor (TLR) 7. We have chosen to use the ligand based virtual screening method to find new potential candidates, as there are a number of known compounds, which interact with the TLR 7, and because the crystal structure of the receptor is currently unknown. The search query for the virtual screening was made using known agonist imiquimod, which is currently in use for the treatment of some types of skin cancer and genital warts, and compound **54**, discovered by Shukla et al., which was reported to have 247-times higher agonistic activity than imiquimod. Both compounds have a common imidazoquinoline scaffolds. The virtual screening was made using ROCS from OpenEye and ZINC online database of commercially-available compounds. We have filtered the ZINC database to the subset of "drug-like" compounds, using the Lipinski rule-of-five.

From the results we have chosen 25 compounds, which were available at the time. Our selection of compounds was guided by the fit values from ROCS and the structural diversity of the compounds.

All the compounds which were not adequately soluble or were cytotoxic were excluded from the study. In the end we obtained 11 compounds which were tested on the HEK-Blue™ hTLR7 cells, from InvivoGen. All the compounds were preliminarily tested for agonistic and antagonistic activity and we discovered that all the compounds were antagonists. In latter tests we investigated the antagonistic activity and tried to find the IC₅₀ values for the compounds. Compound **27** had the best results, with an IC₅₀ value of approximately 100 μmol/l. The fit of the results versus the calculated curve was good (R² was above 0,97 for both tests). The compound represents an excellent basis for further discovery of TLR 7 receptor antagonists.

UVOD

1. Uporaba računalniških metod pri iskanju novih učinkovin

a) Splošno

Proces odkrivanja novih učinkovin je zelo zamudno in drago opravilo za farmacevtsko industrijo, zato se smernice v farmacevtski industriji vedno bolj nagibajo k izboljšanju zgodnje faze odkrivanja novih učinkovin, to je iskanje spojine vodnice in optimizacija le-te. To pomeni, da če se izkaže, da je potencialna učinkovina neprimerna za uporabo zaradi kakšnega koli razloga, bodo to v procesu odkrivanja učinkovin ugotovili prej. Posledično bodo stroški na račun raziskovanja manjši in lahko se bodo lotili obravnave drugih spojin hitreje (1).

V farmacevtski industriji se za iskanje novih potencialnih učinkovin v glavnem še vedno uporablja reševanje z visoko zmogljivostjo (HTS – High-Throughput Screening) velikih knjižnic spojin. Ta postopek omogoča izjemno hitro avtomatizirano testiranje spojin za delovanje na določeni tarči. Kljub temu pa je dobivalo virtualno reševanje v procesu odkrivanja novih učinkovin v zadnjem desetletju vedno večjo vlogo. Virtualno reševanje nam namreč omogoča zelo hitro reševanje ne samo knjižnic virtualnih spojin, ki jih ima neko podjetje v lasti, ampak tudi vseh knjižnic virtualnih spojin, ki so na voljo za nakup. Prav tako lahko z virtualnim reševanjem preverimo delovanje takšnih spojin, ki obstajajo le v virtualnem svetu in sintetiziramo le tiste z najboljšimi rezultati cenilne funkcije (1).

b) Filtriranje knjižnic virtualnih spojin

Iskanje novih spojin s pomočjo virtualnega reševanja poteka v več stopnjah in prva izmed teh stopenj je izbira knjižnice virtualnih spojin. Dandanes je na voljo že veliko knjižnic virtualnih spojin, ki so na voljo za nakup in so zato te knjižnice na voljo vsem, ki jih želijo uporabiti. Te knjižnice pa vsebujejo več milijonov virtualnih spojin in jih je treba z uporabo različnih filtrov zmanjšati, da dobimo bolj obvladljivo velikost knjižnic. Ponavadi se omejimo samo na tiste spojine, ki imajo ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti za učinkovanje v telesu. To zagotovimo z upoštevanjem vseh do sedaj zbranih podatkov (npr. podatki o toksičnem delovanju) ter z uporabo pravil, s katerimi lahko do neke mere napovemo farmakokinetične lastnosti spojin (ADME – Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination) (2).

Najpogosteje pri filtriranju izločimo spojine, ki nimajo t.i. učinkovini podobnih ("drug-like") lastnosti. Učinkovini podobne lastnosti se določajo z uporabo pravila petic, ki jih je določil C. Lipinski. Ta pravila je določil tako, da je preveril fizikalno-kemijske lastnosti večine peroralnih učinkovin na trgu. Ugotovil je, da navkljub veliki strukturalni raznolikosti, le redke učinkovine znatno odstopajo od večine v svojih fizikalno-kemijskih lastnostih in iz ugotovljenega sklepal, da morajo imeti učinkovine za peroralno uporabo fizikalno-kemijske lastnosti v točno določenem intervalu. Določil je nekaj pravil, katere je treba upoštevati, če želimo, da se bo učinkovina, ki jo razvijamo, lahko uporabljala peroralno. Gre za t.i. pravilo petic (3, 4). Z uporabo teh pravil omejimo knjižnico virtualnih spojin na tiste, ki imajo:

1. molekulska masa manj kot 500 g/mol,
2. logP manj kot 5,
3. manj kot 5 donorjev vodikove vezi ter
4. manj kot 10 akceptorjev vodikove vezi.

Obstaja tudi več razširitev teh osnovnih pravil, pri katerih se npr. upošteva še število aromatomov v molekuli, število rotirajočih vezi v molekuli itd.

Po zaznavi potencialnih spojin vodnic s pomočjo virtualnega reševanja nastopi faza optimizacije spojin vodnic. V tej fazi postanejo spojine večinoma še kompleksnejše in se jim ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti spremenijo, tudi do te mere, da presežejo omejitve, postavljene s pravilom petic. Zato se za iskanje potencialnih spojin vodnic lahko uporabljajo še strožja pravila, ki določajo t.i. spojini vodnici podobne ("lead-like") spojine. Za uvrstitev spojine med spojini vodnici podobne spojine, mora imeti spojina naslednje fizikalno-kemijske lastnosti:

1. molekulska masa manj kot 350 g/mol,
2. logP manj kot 3,
3. manj kot 3 donorje vodikove vezi,
4. manj kot 8 akceptorjev vodikove vezi,
5. polarno površino molekule manjšo kot 120 \AA^2 ,
6. manj kot 8 rotirajočih vezi ter
7. določene strukturne omejitve (npr. odsotnost reaktivnih funkcionalnih skupin).

Z ustrežno izbiro in pripravo knjižnice, katero bomo uporabili za virtualno reševanje, si zelo olajšamo naslednje korake v procesu. Filtriranje knjižnice virtualnih spojin je namreč najmanj zamuden in računsko zahteven korak v procesu virtualnega reševanja, kar pomeni, da lahko hitreje in učinkoviteje iz testiranja izločimo spojine, katerih lastnosti niso primerne za uporabo v medicini.

c) Virtualno reševanje na osnovi strukture liganda

Metoda virtualnega reševanja na osnovi strukture liganda temelji na principu, da imajo spojine s podobno strukturo tudi podobno delovanje v telesu (5). Ta metoda nam omogoča iskanje ligandov določene tarče, če poznamo strukturo vsaj ene učinkovine, za katero vemo, da deluje na tarči in če imamo na voljo knjižnico virtualnih spojin. Tako pri virtualnem reševanju na osnovi strukture liganda iščemo s pomočjo molekularskih deskriptorjev podobne spojine, kot je že znani ligand. Pri tem ni potrebno, da poznamo strukturo tarče.

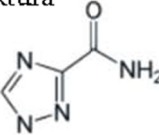
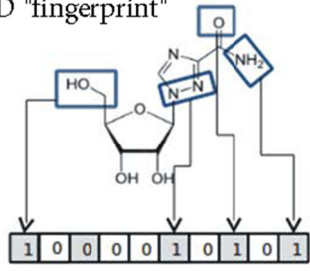
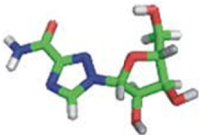
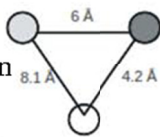
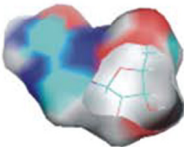
Molekularski deskriptorji so različne lastnosti molekule, ki jih lahko določimo in izmerimo. Deskriptorje lahko razdelimo glede na dimenzije. Molekularska masa ali število atomov v molekuli sta primera 1D deskriptorjev, ker za njihov izračun potrebujemo le najbolj osnovne informacije o molekuli (npr. empirična formula). Takšni deskriptorji pogosto služijo kot grobi filtri za predprocesiranje knjižnice virtualnih spojin, niso pa primerni za uporabo pri izračunu podobnosti med molekulama, saj so preveč splošni.

Na podlagi strukturne formule molekule lahko izdelamo 2D deskriptorje, pri čemer je najosnovnejši 2D deskriptor osnovni skelet molekule. Pri virtualnem reševanju z uporabo takšnega deskriptorja bomo našli le spojine, ki so analogi osnovnega liganda, vendar imajo na skelet vezane drugačne funkcionalne skupine. Pod 2D deskriptorje spadajo tudi vrednosti logP ali število aromatov v molekuli, saj za izračun teh deskriptorjev potrebujemo znano strukturno formulo liganda (1). Zelo pogosta je tudi uporaba 2D prstnih odtisov ("fingerprint"). Tu glede na prisotnost ali odsotnost karakterističnih strukturnih elementov v molekuli pretvorimo molekulo v binarni zapis (vrsta ničel in enic), pri čemer določimo ali je strukturni element prisoten (1 v binarnem zapisu) ali odsoten (0 v binarnem zapisu) v molekuli (6).

Prstni odtisi pa so lahko tudi 3D deskriptorji, če upoštevamo še relativno mesto posameznega strukturnega elementa molekule v prostoru. Tako dobimo farmakoforne

predstavitve molekule, kjer kot strukturni elementi služijo npr. donorji in akceptorji vodikove vezi, negativni in pozitivni naboj ter hidrofobno ali aromatično mesto v molekuli. S farmakofori abstraktno predstavimo molekulo v prostoru, upoštevamo le pomembne strukturne elemente molekule in njihovo mesto v prostoru. Pri virtualnem rešetanju z uporabo farmakoforov lahko najdemo molekule, katerih skelet ni nujno podoben skeletu liganda, ki smo ga uporabili za izdelavo iskalnega niza; gre za koncept t.i. »scaffold-hopping«, kar se lahko v slovenščino prevaja kot iskanje novih strukturnih skeletov molekul (1). Težava pri uporabi 3D deskriptorjev za virtualno rešetanje je, da za optimalne rezultate potrebujemo konformacijo liganda v prostoru v takšnem stanju, kot je takrat, ko je vezan na tarčo. Mnogokrat je namreč konformacija liganda, ko je vezan na tarčo drugačna, kot pa energijsko najugodnejša konformacija (7). Kljub temu pa so ugotovili, da je dodatna vrednost, če poznamo konformacijo liganda v vezanem stanju, nizka in je zato uporaba virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda smiselna tudi v primeru, če vezane konformacije liganda ne poznamo (8). Še en primer 3D deskriptorja je oblika in volumen molekule ter njena ureditev v prostoru. Takšen deskriptor uporablja računalniški program ROCS, družbe OpenEye, ki smo ga tudi mi uporabili pri virtualnem rešetanju na osnovi strukture liganda. Ta računalniški program pri vrednotenju podobnosti, poleg oblike in volumna molekul v prostoru, uporablja še mesto, orientacijo in tip funkcionalnih skupin v molekuli. Tako lahko razlikuje med funkcionalnimi skupinami, ki so donorji ali akceptorji vodikovih vezi, hidrofobnimi funkcionalnimi skupinami, anionskimi in kationskimi funkcionalnimi skupinami ter obroči (ne razlikuje med aromatskimi in nearomatskimi obroči). Računalniški program ROCS deluje tako, da najprej prekrije centre mas iskalnega niza (znanega liganda na tarči) in primerjane spojine, nato pa naključno poskuša najti takšno postavitvev molekul, da se bosta volumen v prostoru ter funkcionalne skupine čim bolj prekrivala (1, 9).

Ker je pri vseh 3D molekulskih deskriptorjih pomembno, kako so molekule in njihove funkcionalne skupine orientirane v prostoru, je predpogoj za uporabo 3D molekulskih deskriptorjev pri virtualnem rešetanju na osnovi strukture liganda, izdelava takšne knjižnice virtualnih spojin, kjer so upoštevane tudi različne konformacije spojin v prostoru. V ta namen lahko uporabljamo računalniške programe, ki so posebej namenjeni generiranju 3D konformacij spojin, kot npr. računalniški program Omega, družbe OpenEye, ki smo ga uporabili tudi mi.

1D	2D	3D
Empirična formula Molekulska masa Število atomov	Osnovna struktura  2D "fingerprint" 	Struktura in orientacija v prostoru  Farmakofor  Oblika in volumen 

Slika 1: Primeri 1D, 2D in 3D deskriptorjev molekul

Podobnost med molekulami lahko ocenimo z različnimi koeficienti. Najpogosteje uporabljeni je Tanimotov koeficient, ki smo ga za vrednotenje podobnosti uporabili tudi mi.

Enačba za izračun Tanimotovega koeficienta:

$$S_{A,B} = \frac{c}{(a + b) - c}$$

Enačba 1: Enačba za izračun Tanimotovega koeficienta

Pri čemer:

$S_{A,B}$ pomeni podobnost med molekulama A in B,

c pomeni število skupnih strukturnih elementov, ki jih imata molekuli A in B,

a pomeni število strukturnih elementov molekule A in

b pomeni število strukturnih elementov molekule B.

Podobnost s pomočjo Tanimotovega koeficienta med dvema hipotetičnima molekulama A in B bi izračunali tako (število 1 pomeni, da molekula vsebuje strukturni element, število 0 pa, da ga ne):

molekula A ima binarni zapis 111000,

molekula B ima binarni zapis 111111.

Vrednost Tanimotovega koeficienta je:

$$S_{A,B} = \frac{3}{(3 + 6) - 3} = 0,5$$

Tanimotov koeficient lahko zasede vrednosti od 0 do 1, pri čemer 0 pomeni, da so si molekule popolnoma različne, 1 pa, da gre za popolno ujemanje med molekulama (10).

Pri virtualnem rešetanju na osnovi strukture liganda imamo torej cilj, da najdemo čim bolj podobne molekule (merjeno s koeficientom podobnosti, npr. zgoraj opisanim Tanimotovim koeficientom) in s čim različnejšim strukturnim skeletom. Tako lahko dobimo strukturno raznolike spojine, ki delujejo na tarčo podobno kot znani ligand. Najlažje je najti takšne spojine z uporabo 3D deskriptorjev, kot je primerjava oblike in volumna molekul, ali pa primerjava farmakoforov molekul.

d) Virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče - sidranje

Za uporabo metode virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče moramo poznati strukturo tarče in vezavno mesto na tarči, ni nam pa potrebno poznati strukturo liganda, ki se na tarčo veže. Princip sidranja je v tem, da računalniški program poskuša umestiti različne spojine iz knjižnice virtualnih spojin v vezavno mesto tarče. Z uporabo virtualnega rešetanja na osnovi strukture tarče, lahko torej ugotovimo, kakšna je konformacija liganda, ko je povezan s tarčo in na katero mesto na tarči se ta ligand veže. Tako mora vsak računalniški program za sidranje s pomočjo algoritmov ugotoviti konformacijo liganda, ko je povezan s tarčo, nato pa še s pomočjo cenilne funkcije oceniti vrednost moči vezave liganda s tarčo (1). Spojine v knjižnici virtualnih spojin računalniški program rangira glede na moč vezave s tarčo.

Ta metoda žal ni primerna za iskanje ligandov, ki delujejo na TLR7, saj kristalna struktura TLR7 trenutno ni poznana.

2. Imunski sistem in Toll-u podobni receptorji

a) Imunski sistem

Eden izmed najpomembnejših pogojev za ohranitev homeostaze in s tem preživetja organizmov je sposobnost uničenja in odstranjevanja škodljivih patogenov, ki okužijo organizem. Tekom evolucije organizmov sta se razvili 2 veji imunskega odziva, ki se med seboj ločita po specifičnosti in hitrosti odziva. Ločimo:

- prirojeni imunski odziv in
- pridobljeni imunski odziv.

Pridobljeni imunski odziv je zelo specifičen, vendar se aktivira počasneje od prirojenega. Pri obrambi človeškega organizma je izredno učinkovit, saj ko je enkrat popolnoma razvit, zelo učinkovito in hitro uniči patogene. Takšen imunski odziv najdemo le pri vretenčarjih. Nadalje ga lahko razdelimo še na:

- humoralno imunost in
- celično imunost.

Humoralno imunost vršijo aktivirani limfociti B, t.i. plazmatke, ki proizvajajo protitelesa, ki se vežejo na točno določeno mesto na antigenu in ga posledično odstranijo preko različnih mehanizmov. Ena vrsta plazmatke proizvaja protitelesa specifična za en sam antigen, ki jih imenujemo tudi monoklonska protitelesa. Mesto na antigenu, kamor se vežejo monoklonska protitelesa, se imenuje epitop. Posamezen antigen pa lahko ima več epitopov, torej več prijemališč za protitelesa.

Celično imunost vršijo limfociti T. Limfocite T delimo na dva osnovna tipa in sicer glede na označevalec pripadnosti (CD; Cluster of Differentiation) na CD4⁺ ter CD8⁺ limfocite T; limfociti T, ki imajo na svoji površini koreceptor CD4, po zaznavi antigena diferencirajo v celice T pomagalke, tisti limfociti T, ki imajo na svoji površini koreceptor CD8, pa v citotoksične limfocite T. Proliferacijo limfocitov T sproži predstavitev antigena s strani antigen predstavljajočih celic (APC), ki ga limfociti T prepoznajo tako, da se s svojim T-celičnim receptorjem (TCR) povežejo z molekulo poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK) razreda I ali II na APC, v kompleksu s katero je vezan antigen. Celice T pomagalke so odgovorne za regulacijo imunskega odziva s pomočjo izločanja raznih citokinov. Glede na tip izločanih citokinov jih lahko razdelimo v več razredov, od katerih

sta zelo dobro preučena 2; celice T pomagalke 1 (Th1; T-helper 1) in celice T pomagalke 2 (Th2). Celice Th1 izločajo predvsem IFN- γ , IL-2 in TNF- α ter so odgovorne za aktivacijo makrofagov, pospešitev proliferacije citotoksičnih T celic in inhibicijo nastanka celic Th2. Celice Th2 izločajo predvsem IL-4, IL-5, IL-10 in IL-13 ter so odgovorne za pospešitev proliferacije limfocitov B, aktivacijo eozinofilcev in inhibicijo nastanka celic Th1 (11, 12). Citotoksični limfociti T so odgovorni za zaznavo in uničenje okuženih celic. Celice, ki so okužene z znotrajceličnimi bakterijami, paraziti ali virusi, na površini izpostavijo tuje peptide v prepoznavo citotoksičnim limfocitom T. Ti na vsaki celici najprej prepoznajo molekulo PHK I in se prek nje povežejo s celico. Šele po tej vezavi lahko citotoksični limfociti T s svojim TCR prepoznajo tuj peptid, ki se nahaja v molekulskem kompleksu s PHK I. Po prepoznavi antigena začnejo citotoksični limfociti T izločati citotoksična zrna proti okuženi tarčni celici. Citotoksična zrna vsebujejo encime in toksične snovi, ki uničijo napadene celice (13).

Druga veja imunskega odziva, ki je značilna tudi za ostale vrste organizmov, pa se imenuje prirojeni imunski odziv. Prednost prirojenega imunskega odziva je predvsem hitrost, s katero se odzove na vdor patogenov. Prirojeni imunski odziv sestavlja veliko različnih procesov, med drugim:

- fagocitoza bakterij in drugih tujih organizmov s strani tkivnih makrofagov,
- uničenje patogenov s kislino in encimi v prebavnem traktu,
- neprepustnost kože za patogene,
- prisotnost spojin v krvi, ki se povežejo s patogeni in jih uničijo; v to skupino sodijo npr.:
 - lizocim - mukolitični polisaharid, ki deluje na celično steno bakterij,
 - sistem komplementa - pomeni skupek približno 20 proteinov, ki se lahko na različne načine aktivirajo in uničijo bakterije in
 - naravne celice ubijalke - predstavljajo tip citotoksičnih limfocitov, ki lahko prepozna in uniči tuje, tumorske in okužene celice (11, 13).

Prepoznavo patogenov pri prirojenem imunskem sistemu poteka s pomočjo t.i. receptorjev za prepoznavo molekularnih vzorcev (PRR; Pattern Recognition Receptors). Ti receptorji prepoznajo molekule, ki jih vsebujejo patogeni, niso pa normalno prisotne v telesu. Takšne molekule imenujemo za patogen značilen molekulski vzorec (PAMP; Pathogen Associated

Molecular Pattern) in gre za del strukture patogenov, ki se iz roda v rod ne spreminja znatno in se pojavlja v celotni vrsti patogenov. Med PAMP na primer štejemo lipopolisaharide (LPS), ki so del celične stene Gram negativnih bakterij, flagelin, globularni protein iz katerega je sestavljen biček pri bakterijah ter molekule DNA in RNA virusov in bakterij. Med PRR sodijo tudi Toll-u podobni receptorji (TLR; Toll-Like Receptors) (14-17).

b) Toll-u podobni receptorji

i) Splošno

TLR so ime dobili po proteinu Toll, ki ga najdemo v vinski mušici, *Drosophila melanogaster*. To je transmembranski protein, ki mušico varuje pred okužbo z glivami. V družino Toll pri mušici spada 9 različnih proteinov (14).

Kmalu so ugotovili, da lahko strukturno podobne receptorje najdemo tudi pri človeku; prvega so odkrili v devetdesetih letih prejšnjega stoletja in sedaj ga poznamo pod imenom TLR1. Dandanes je pri ljudeh poznanih 10 različnih TLR (14). Uvrščamo jih pod prirojeni imunski sistem, njihova vloga pa je zaznava patogenov in regulacija imunskega odziva (15).

TLR so klasificirani kot membranski glikoproteini tipa I, kar pomeni, da enkrat prehajajo celično ali endosomsko membrano in imajo na N-koncu zunajcelično domeno (LRR domena), vmes transmembransko regijo in na C-koncu proteina citoplazemsko domeno (TIR domena). Za TLR je značilna citoplazemska domena, ki je podobna domeni družine receptorjev IL-1, poimenujemo pa jo TIR (Toll/IL-1 Receptor) domena (17).

Zunajcelična domena je namenjena zaznavanju patogenov in se pri TLR, ki se nahajajo na celični membrani nahaja zunaj celice, pri TLR, ki se nahajajo na endosomski membrani pa v lumnu endosoma. Značilno je sestavljena iz več ponovitev (19-25), bogatih z aminokislino levcin, zato se ta domena imenuje tudi LRR (Leucine-Rich Repeat). LRR domena je v obliki podkve ali solenoida (17).

Človeške TLR lahko razdelimo glede na njihovo lokacijo. TLR1, 2, 4, 5, 6 in 10 se nahajajo na površini celice in zaznavajo patogene v okolju celice, TLR3, 7, 8 in 9 pa se nahajajo v intracelularnih razdelkih, najpogosteje v endosomu, in zaznavajo patogene v lumnu endosomov (18).

Ob vezavi liganda vsi TLR tvorijo bodisi homodimere ali heterodimere. Patogene, ki jih prepoznajo TLR, lahko razdelimo v 3 velike skupine:

- lipide in lipoproteine prepoznavajo TLR2/TLR1 (triacilirani lipopeptidi), TLR2/TLR6 (diacilirani lipopeptidi) in TLR4 (lipopolisaharid (LPS)),
- proteine prepoznavata TLR5 (flagelin),
- nukleinske kisline pa prepoznavajo TLR3 (dvojvijačna RNA), TLR7 (enovijačna RNA), TLR8 (enovijačna RNA) in TLR9 (DNA).

Ligand, ki ga prepozna TLR10, še ni poznan (18).

Po vezavi liganda na TLR, pride do dimerizacije in spremembe konformacije receptorjev, pri čemer se združijo znotrajcelične TIR domene, kar vodi v kaskadno aktivacijo različnih proteinov in do signala (18, 19).

Zaznavanje patogenov s TLR povzroči signaliziranje po treh različnih poteh: pot, ki vodi v aktivacijo MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), IRF (Interferon Regulatory Factor) in NF- κ B (Nuclear Factor κ B). IRF 3 in/ali 7 sta odgovorna za začetek izdelave INF tipa I, MAPK pa aktivira AP-1, ki skupaj z NF- κ B omogočita ekspresijo genov za različne citokine (IL-1 β , IL-6, IL-18 in TNF- α), ki omogočijo proces vnetja in aktivirajo pridobljeni imunski odziv (19).

ii) Funkcija TLR v imunskem sistemu

TLR imajo v imunskem sistemu 3 različne funkcije:

➤ Zaznava in klasifikacija patogenov

Patogene zaznavajo v glavnem dendritične celice in makrofagi s pomočjo TLR in tudi drugih PRR, tako da neprenehno preskušajo zunanje in notranje okolje za prisotnost patogenov. Z zaznavo patogenov pa lahko telo, glede na tip receptorja, ki je zaznal patogen, dobi tudi informacije o tem, za kakšen patogen gre (npr. TLR4 aktivirajo le LPS, ki se nahajajo v celični steni Gram-negativnih bakterij) (20).

➤ Zagotavljanje hitrega imunskega odziva

Zaznavi patogenov s strani TLR mora slediti hiter imunski odziv. Z aktivacijo TLR začne celica proizvajati različne citokine (v glavnem INF in TNF- α), ki inducirajo proizvodnjo

kemotaktičnih molekul, ki omogočijo infiltracijo učinkovitih celic imunskega sistema (nevtrofilci, makrofagi, naravne celice ubijalke) na mesto okužbe (21).

➤ Stimulacija pridobljenega imunskega odziva

Dendritične celice (in druge APC) predstavljajo most med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom. Vezava ligandov na TLR spodbudi zorenje APC, ki lahko nato aktivirajo limfocite T. Aktivacija limfocitov T predstavlja prvi korak pri aktivaciji pridobljenega imunskega odziva (14, 22).

c) Toll-u podoben receptor 7

Naloga TLR7 je zaznava virusne RNA. TLR7 zazna oligonukleotide na enovijačni RNA, ki so sestavljeni iz predelov z visoko vsebnostjo gvanozina in uridina. Nahaja se v znotrajceličnih razdelkih (endoplazmatski retikulum (ER), endosomi, lizosomi) plazmacitoidnih dendritičnih celic (pDC) in limfocitov B. pDC so družina dendritičnih celic s plazmacitoidno morfologijo, za katere je značilno, da po zaznavi virusa izločajo različne vrste INF tipa I (19).

i) Signalizacija TLR7

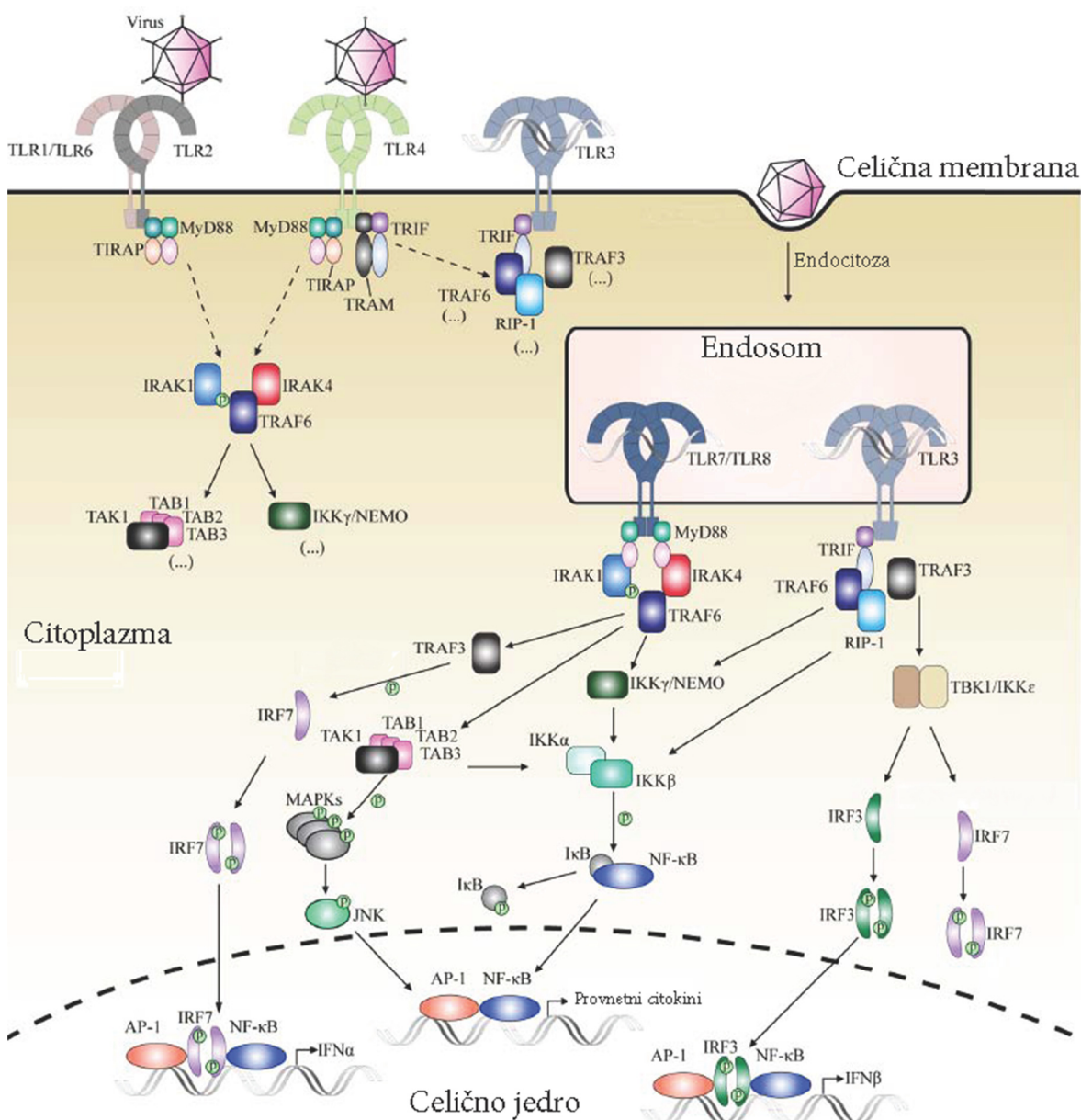
Po vezavi liganda na LRR domeno TLR7, pride do homodimerizacije receptorjev in začetka signala. Preko TIR domene se signal prenese na molekulo MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88), ki se nahaja v citoplazmi. Ta molekula se nato poveže v kompleks z IRAK (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase) 4 in IRAK-1, po vezavi pa IRAK-4 fosforilira IRAK-1 in ga tako aktivira. Aktivirani IRAK-1 se nadalje poveže s TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6), pri čemer kompleks IRAK-1/TRAF6 oddisociira s TLR7. V tej točki se pot razcepi. Kompleks IRAK-1/TRAF6 aktivira molekule TAK1 (TGF- β (Tumor Growth Factor β) Activated Kinase 1), IKK γ (I κ B Kinase) in IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) ter IRF7.

Pri prvi poti se aktivirani IKK γ združi z IKK α in IKK β , katerega fosforilira aktivirani TAK1 v kompleksu z TAB1 (TAK1 binding protein 1), TAB2 in TAB3. Kompleks IKK α , IKK β in IKK γ nato fosforilira I κ B, zaradi česar kompleks I κ B/NF- κ B razpade. V nefosforiliranem stanju je I κ B v citoplazmi povezan z NF- κ B, po razpadu kompleksa pa se NF- κ B sprosti in preide v celično jedro, kjer inducira izražanje genov za vnetne citokine.

Pri drugi poti TAK1 v kompleksu s TAB1, TAB2 in TAB3 aktivira MAPK, kar vodi v nastanek AP-1, ki skupaj z NF- κ B v jedru celice povzroči ekspresijo genov za vnetne citokine.

Pri tretji poti po aktivaciji IRF5 in IRF7 kot dimer preideta v celično jedro. Vloga IRF5 je regulacija indukcije provnetnih citokinov (npr. IL-6), vloga IRF7 pa indukcija izdelave INF tipa I, predvsem INF- α (19).

Celotna signalizacijska pot TLR7 je prikazana na spodnji sliki.



Slika 2: Prikaz signalizacijskih poti nekaterih TLR

ii) Bolezenska stanja, ki so povezana s TLR7

TLR imajo kot PRR v obrambi organizma veliko vlogo, saj so pomembni tako pri zaznavi patogenov in stimulaciji prirojenega imunskega odziva, kot tudi pri pravilni in pravočasni aktivaciji pridobljenega imunskega sistema. Iz navedenega sledi, da mora biti odziv TLR ravno pravi:

- če je prevelik, lahko to vodi do prekomernega nespecifičnega prirojenega imunskega odziva in zato do prekomernega vnetja in poškodbe organizma,
- če je premajhen pa lahko to vodi do prepočasnega in nezadostnega odziva telesa na patogen, kar lahko vodi do hudih obolenj in smrti.

Ne čudi torej podatek, da je prekomerno ali nezadostno delovanje TLR7 povezano z mnogimi bolezenskimi stanji.

S prekomernim delovanjem TLR7 povezujejo nekatere bolezni, med drugim:

- Alzheimerjevo bolezen,
- multiplo sklerozo in
- vnetne avtoimune bolezni (npr. eritematozni lupus) (23-28).

Zaradi nezadostnega imunskega odziva pa je organizem bolj občutljiv na infekcijo z nekaterimi patogeni (29, 30).

Pomembno vlogo TLR7 v imunskem sistemu in zato zanimivo tarčo za raziskave novih zdravil kaže tudi dejstvo, da je v različnih stadijih razvoja kar nekaj učinkovin, ki delujejo na TLR7. Učinkovine, ki delujejo na TLR7 preiskujejo za zdravljenje različnih vrst raka, okužb ter avtoimunskih obolenj (17). Nespecifičen in močan vnetni odziv telesa, ki ga spodbudi aktivacija TLR7, namreč povzroči poškodbo tkiv, tudi rakavega tkiva. Na ta način lahko z agonistom TLR7 zdravimo rakava obolenja. Prav zaradi nespecifičnosti odziva telesa na aktivacijo TLR7 in posledično poškodbo organizma pa žal trenutnih agonistov TLR7 ne moremo uporabljati sistemsko, ampak le topikalno. Na trgu je trenutno odobreno zdravilo, ki vsebuje agonist na TLR7, imikvimod in se uporablja za zdravljenje genitalnih bradavic in bazalnoceličnega karcinoma (31).

HIPOTEZA IN NAČRT DELA

S pomočjo metode virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda bomo poiskali nove spojine, ki delujejo na TLR7.

1. Virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda

Začeli bomo s pripravo iskalne predloge za virtualno rešetanje. Za njeno izdelavo bomo uporabili učinkovino imikvimod ter spojino številka **54** iz literature (32). Nove spojine bomo iskali s pomočjo programa ROCS različice 3.1.1, družbe OpenEye. Za bazo podatkov nam bo služila internetna knjižnica komercialno dostopnih spojin ZINC. Omejili pa se bomo na spojine, ki imajo lastnosti, primerne za učinkovino - t.i. učinkovini podobne lastnosti. Najboljših 100 rezultatov glede na cenilno funkcijo Tanimoto shape in Tanimoto color, dobljenih z iskalno predlogo iz učinkovine imikvimod ter tistih, ki smo jih dobili z uporabo iskalne predloge iz spojine številka **54**, bomo vizualno pregledali. Pri izbiri spojin za nadaljnjo testiranje bomo upoštevali:

- ali so spojine na voljo za nakup,
- kakšna je njihova cena,
- čim večjo raznolikost strukture ter
- vrednost skupne cenilne funkcije (Tanimoto combo).

Tako bomo izdelali skupni seznam približno 25 spojin za nadaljnjo testiranje.

2. Testiranje spojin na celicah celične linije HEK-Blue™ hTLR7

Najprej bomo izbranim spojinam preverili topnost v topilu DMSO v koncentraciji 50 mmol/l. Tiste, ki so popolnoma topne v topilu DMSO, bomo nato poskušali raztopiti še v pripravljenem celičnem gojišču v koncentracijah 100, 300 in 500 $\mu\text{mol/l}$.

Citotoksično delovanje vseh spojin, ki so bile primerno topne v topilu DMSO in v pripravljenem celičnem gojišču, bomo nato preverili s testom privzema propidijevega jodida. Spojin, za katere se bo izkazalo, da delujejo citotoksično, ne bomo uporabili za nadaljnjo testiranje.

Morebitno agonistično in antagonistično delovanje spojin, ki bodo primerno topne v obeh topilih ter ne bodo delovale citotoksično, bomo preverili s preliminarnim testom na celični

liniji s selektivno izraženimi TLR7, HEK-Blue™ hTLR7, družbe InvivoGen. Za preliminarni test aktivnosti bomo uporabili spojine v koncentraciji 250 in 500 $\mu\text{mol/l}$.

Glede na uspešnost preliminarne testa bomo nadaljevali s testiranjem spojin in določanjem EC_{50} ali IC_{50} za agonistično oziroma antagonistično delovanje.

MATERIALI IN METODE

1. Računalniške metode

a) Generiranje 3D konformacij ligandov TLR7

Material:

- Stojna oprema: računalnik s/z
 - procesorjem Intel Core™ i7-2600K,
 - 8 GB DDR3 pomnilnika,
 - trdim diskom velikosti 1 TB,
 - grafično kartico NVIDIA GeForce GTX 570 in
 - operacijskima sistemoma Windows 7, 64-bit in Linux Ubuntu.
- Programska oprema:
 - Omega 2.3.2 (OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, ZDA)

Poznanih je več učinkovin, ki agonistično ali antagonistično delujejo na TLR7 - tudi takšnih, ki so v različnih stopnjah kliničnih preskušanj in takšnih, ki se že uporabljajo za zdravljenje različnih bolezenskih stanj (17). Odločili smo se, da bomo eno takšno učinkovino – imikvimod uporabili za izdelavo iskalne predloge za virtualno reševanje na osnovi liganda z računalniškim programom vROCS. Za izdelavo iskalne predloge pa bomo uporabili tudi učinkovino, za katero so v članku Shukla, N. M. in sodelavci ugotovili, da ima na TLR7 kar 247-krat močnejše agonistično delovanje, kot učinkovina imikvimod (32).

Za izdelavo iskalne predloge moramo 2D strukturo spojin pretvoriti v 3D format. Začeti pa moramo s pretvorbo strukture spojine v ustrezen zapis SMILES. Koda SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) nam omogoča, da s pomočjo nekaj preprostih pravil pretvorimo 2D strukturo spojine v linearen zapis v obliki teksta, katerega lahko uporabimo za delo z računalniškimi programi (33). Za pretvorbo 2D strukture spojin v kodo SMILES smo uporabili internetni program družbe Molsoft, Interactive 2D to 3D Molecular Converter and Viewer at Molsoft, LLC (34).

Ko smo imeli spojine v ustrezni kodi SMILES, smo lahko uporabili računalniški program Omega 2.3.2, da smo pretvorili spojini v ustrezno 3D obliko, ki jo potrebujemo za izdelavo iskalnih predlog. Računalniški program Omega nam omogoča pretvorbo strukture spojine

v več različnih 3D konformacij, s programom pa lahko upravljamo z zapisi strukture spojine v več različnih formatih (*.smi, *.sdf, *.mol itd.) (35).

Za generiranje spojin v 3D formatu smo v računalniškem programu Omega uporabili naslednjo ukazno vrstico:

```
omega2 -in TLR7.smi -out TLR7.sdf -maxconfs 5  
omega2 -in TLR7_54.smi -out TLR7_54.sdf -maxconfs 5
```

pri čemer smo v datoteki TLR7.smi shranili SMILES zapis za učinkovino imikvimod, v datoteki TLR7_54.smi pa SMILES zapis za spojino številka **54**, za katero so v članku Shukla, N. M. in sodelavci ugotovili, da deluje zelo močno agonistično na TLR7 (32). S parametrom *-maxconfs 5* smo omejili število 3D konformacij, ki jih je računalniški program Omega 2.3.2 zgeneriral na 5 energijsko najugodnejših. Ker na TLR7 ni znano vezavno mesto za učinkovino imikvimod, niti za spojino številka **54** iz članka (32) in zato ni znano v kakšni konformaciji se učinkovini vežeta na TLR7, smo za izdelavo iskalne predloge uporabili energijsko najugodnejši konformaciji.

b) Generiranje 3D konformacij knjižnice spojin ZINC

Material:

- Stojna oprema: računalnik s/z
 - 4 osemjedernimi procesorji AMD Opteron 2,0 GHz,
 - 32 GB pomnilnika,
 - 2 trdima diskoma velikosti 1 TB in
 - 64-bitnim operacijskim sistemom Scientific Linux 6.2.
- Programska oprema:
 - Omega 2.3.2 (OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, ZDA)

Internetna knjižnica spojin, ki so na voljo komercialno ZINC, predstavlja bazo spojin, ki so na voljo za nakup. Ureja jo katedra za farmacevtsko kemijo Univerze v Kaliforniji (UCSF). Ob uporabi leta 2011, je knjižnica vsebovala več kot 21 milijonov različnih spojin (36).

Mi smo uporabili le del te knjižnice. Omejili smo se na vse spojine v knjižnici, ki imajo t.i. učinkovini podobne lastnosti. Praktično to pomeni, da smo uporabili le spojine, ki imajo naslednje fizikalno-kemijske lastnosti:

- $\log P \leq 5$,
- $150 \text{ g/mol} \leq \text{Molekulska masa} \leq 500 \text{ g/mol}$,
- število vrtljivih vezi < 8 ,
- celotna polarna površina molekule $< 150 \text{ \AA}^2$,
- število akceptorjev vodikove vezi < 10 .

Podknjižnica spojin, ki imajo te lastnosti je na voljo tudi na internetni strani ZINC, kar pomeni, da so ustrezni filtri že upoštevani in so spojine, ki ne ustrezajo tem pogojem, izločene. Fizikalno-kemijske lastnosti spojin, ki ustrezajo opisu učinkovini podobne, so določene eksperimentalno, z upoštevanjem lastnosti učinkovin, ki so na trgu. Ugotovili so namreč, da spojine, katerih fizikalno-kemijske lastnosti odstopajo od teh omejitev, velikokrat niso ustrezne za uporabo v zdravilih za peroralno uporabo zaradi problematičnih farmakokinetičnih lastnosti. Gre za t.i. pravilo Lipinskega, imenovano po znanstveniku, ki je ta pravila tudi določil (4).

Iz knjižnice ZINC lahko dobimo spojine zapisane v različnih formatih; mi smo se odločili za spojine, zapisane v SMILES formatu. Tako dobimo tekstovno datoteko, ki vsebuje vse spojine v SMILES formatu in poleg vsake spojine napisano še ZINC kodo, ki nam omogoča iskanje spojin po internetni strani ZINC.

Podobno, kot za TLR7 ligande, smo tudi za vse spojine iz internetne knjižnice ZINC morali generirati 3D konformacije. Le tako jih namreč lahko uporabimo za kasnejše reševanje na osnovi strukture liganda. Tudi tokrat smo v ta namen uporabili računalniški program Omega 2.3.2 in ukazno vrstico:

```
omega2 -in ZINC_druglike.smi -out ZINC_druglike_allconf.oeb.gz
```

Drugače, kot pri izdelavi 3D konformacij učinkovine imikvimod in spojine **54** iz članka (32), v tem primeru nismo uporabili parametra *-maxconfs*. Računalniški program nam je tako zgeneriral do 200 možnih 3D konformacij na molekulo in smo povprečno dobili 150 konformacij na molekulo. To je pomembno, saj moramo preveriti vse konformacije spojin

za ujemanje z našim iskalnim nizom; če bi se omejili le na energijsko najugodnejše konformacije, bi namreč lahko izgubili veliko potencialnih zadetkov.

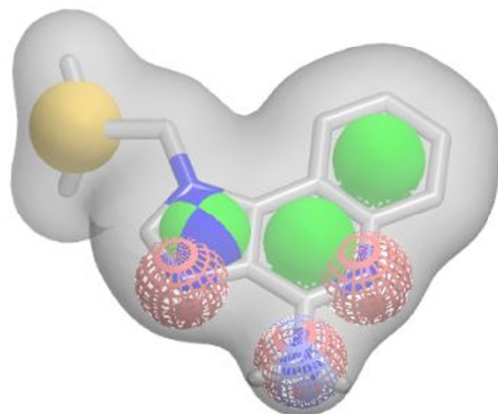
c) Izdelava iskalne predloge za uporabo pri virtualnem reševanju na osnovi strukture liganda

Material:

- Stojna oprema: računalnik s/z
 - procesorjem Intel Core™ i7-2600K,
 - 8 GB DDR3 pomnilnika,
 - trdim diskom velikosti 1 TB,
 - grafično kartico NVIDIA GeForce GTX 570 in
 - operacijskima sistemoma Windows 7, 64-bit in Linux Ubuntu.
- Programska oprema:
 - vROCS 3.1.1 (OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, ZDA)

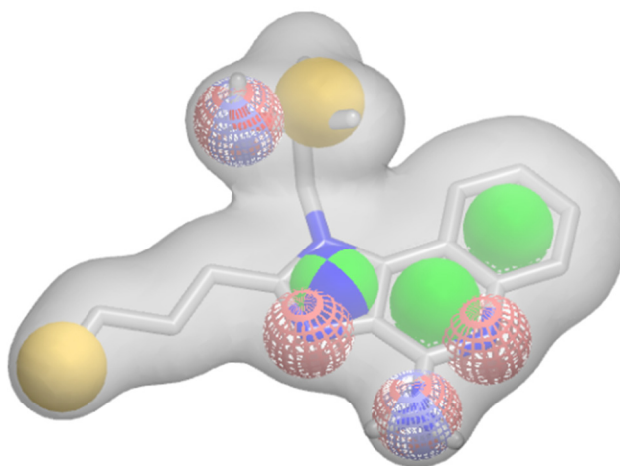
Za reševanje na osnovi strukture liganda bomo uporabili računalniški program vROCS 3.1.1. To je računalniški program družbe OpenEye, ki nam omogoča primerjavo knjižnice spojin z iskalnim predlogom. Stopnjo ujemanja spojine z iskalnim predlogom določi glede na podobnost 3D strukture v prostoru in glede na podobnost in lokacijo funkcionalnih skupin (9).

Za izdelavo iskalnih predlog smo uporabili le energijsko najugodnejši 3D konformaciji učinkovine imikvimod in spojine **54** iz članka (32). Konformacija spojine, ki se veže na TLR7, namreč ni znana, ker tudi 3D struktura receptorja ni znana. Z uporabo učinkovine imikvimod smo tako v računalniškem programu vROCS izdelali naslednjo iskalno predlogo:



Slika 3: Iskalna predloga, narejena z računalniškim programom vROCS iz učinkovine imikvimod

Z uporabo spojine 54 iz članka (32) pa iskalno predlogo:



Slika 4: Iskalna predloga, narejena z računalniškim programom vROCS iz spojine 54 iz članka (32)

Kot vidimo, je iskalna predloga, narejena glede na spojino 54 kompleksnejša, saj ima na imidazokinolinskem skeletu vezano dodatno butilno skupino, kar je v iskalnem predlogu

označeno kot dodatno hidrofobno mesto na molekuli, prav tako pa ima na izobutilni skupini vezano dodatno hidroksilno skupino, kar je v iskalni predlogi označeno kot dodaten akceptor in donor vodikovih vezi.

d) Virtualno reševanje na osnovi strukture liganda z računalniškim programom ROCS

Material:

- Stojna oprema: računalnik s/z
 - štirimi osemjedrnimi procesorji AMD Opteron 2,0 GHz,
 - 32 GB pomnilnika,
 - 2 trdima diskoma velikosti 1 TB in
 - 64-bitnim operacijskim sistemom Scientific Linux 6.2.
- Programska oprema:
 - ROCS 3.1.1 (OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, ZDA)
 - VIDA 4.0.3 (OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, ZDA)

Za virtualno reševanje na osnovi strukture liganda smo uporabili računalniški program ROCS 3.1.1, izdelani iskalni predlogi ter knjižnico 3D konformacij spojin, izdelano iz internetne knjižnice ZINC. S pomočjo računalniškega programa smo primerjali vse konformacije vseh spojin z iskalno predlogo ter tako ocenili podobnost s pomočjo cenilne funkcije Tanimoto combo. Cenilna funkcija Tanimoto combo je v bistvu seštevek cenilnih funkcij Tanimoto shape in Tanimoto color. Cenilna funkcija Tanimoto shape vrednoti podobnost spojin z iskalno predlogo glede na obliko, orientacijo in volumen molekul. Cenilna funkcija Tanimoto color pa vrednoti podobnost spojin z iskalno predlogo glede na lokacijo in tip funkcionalnih skupin, tako da na iskalnem predlogu glede na prisotne kemijske funkcionalne skupine določi področja molekule in jih označi kot hidrofobno območje, akceptor ali donor vodikove vezi, kationsko ali anionsko območje ter območje obrobov. Obe funkciji lahko zasedeta vrednosti od 0 do 1, pri čemer 1 pomeni popolno ujemanje, 0 pa popolno neujemanje. Ker je cenilna funkcija Tanimoto combo seštevek obeh cenilnih funkcij, lahko torej zasede vrednosti od 0 do 2.

V računalniškem programu ROCS smo za izvedbo virtualnega reševanja na osnovi liganda uporabili naslednji ukazni vrstici:

```
rocs -query imiquimod.sq -dbase ZINC_druglike_allconf.oeb.gz -pvmconf -besthits  
1000 -rankby TanimotoCombo -oformat oeb.gz
```

in

```
rocs -query TLR-54.sq -dbase ZINC_druglike_allconf.oeb.gz -pvmconf -besthits  
1000 -rankby TanimotoCombo -offormat oeb.gz
```

Razlaga parametrov, ki smo jih uporabili (37):

- query*: s tem parametrom smo izbrali iskalno predlogo. V prvem primeru smo izbrali iskalno predlogo z imenom imiquimod.sq, ki smo jo naredili iz učinkovine imikvimod, v drugem pa smo izbrali iskalno predlogo z imenom TLR-54.sq, ki smo jo naredili iz spojine **54** iz članka (32).
- dbase*: s tem parametrom smo izbrali knjižnico 3D konformacij spojin, izdelano iz internetne knjižnice ZINC (omejeno na učinkovini podobne spojine), ki jih je računalniški program primerjal z iskalno predlogo. Pri obeh primerih smo uporabili isto knjižnico z imenom ZINC_druglike_allconf.oeb.gz.
- pvmconf*: s tem parametrom smo omogočili, da je računalniški program ROCS za delovanje uporabljal vsa jedra vseh procesorjev v računalniku, ki so bila na voljo.
- besthits 1000*: s tem parametrom smo določili, da nam računalniški program ROCS za nadaljnjo delo shrani le 1000 spojin, ki so se glede na cenilno funkcijo Tanimoto combo najbolj ujemale z iskalno predlogo.
- rankby TanimotoCombo*: s tem parametrom smo določili, da računalniški program ROCS za cenilno funkcijo uporabi Tanimoto combo.
- offormat*: s tem parametrom smo določili v kakšnem formatu nam bo računalniški program ROCS shranil spojine, ki so se najbolj ujemale. Izbrali smo format *.oeb.gz.

Po zaključku virtualnega rešetanja smo s pomočjo računalniškega programa VIDA vizualno pregledali spojine, ki so se najbolj ujemale z našo iskalno predlogo in izbrali 25 spojin za nakup. Pri izboru spojin smo upoštevali:

- ali so spojine na voljo za nakup,
- kakšna je njihova cena,
- čim večjo raznolikost strukture ter
- vrednost skupne cenilne funkcije.

2. Testiranje na celicah celične linije HEK-Blue™ hTLR7

a) Priprava celičnega gojišča

Material: DMEM s koncentracijo glukoze 4,5 g/l (PAA, Linz, Avstrija), FBS (PAA, Linz, Avstrija), Normocin™ (InvivoGen, San Diego, ZDA)

Z živi celicami je potrebno delati previdno, saj so zelo občutljive na dejavnike okolja. Še posebej pa so občutljive evkariontske celice, katere bomo uporabili tudi v tem eksperimentu. Zelo pomembno je torej tudi okolje, oziroma gojišče, v katerem bodo celice rasle. Kakšno gojišče naj uporabimo za delo s temi celicami, je točno predpisano. Podatke o tem proizvajalec predloži na specifikacijskem listu, ki ga dobimo ob dostavi produkta, najdemo pa ga lahko tudi na internetni strani proizvajalca (38).

Celično gojišče smo naredili tako, da smo v 1 l raztopine DMEM s koncentracijo glukoze 4,5 g/l dodali 100 ml FBS ter toliko Normocin™-a, da je bila končna koncentracija 100 µg/ml. Raztopina DMEM vsebuje glukozo ter nekatera hranila in minerale, ki jih celice potrebujejo za neovirano rast. FBS vsebuje razne makromolekulske proteine, nizkomolekularna hranila, hormone in druge faktorje, ki so potrebni za rast celic. FBS ima tudi določeno pufersko kapaciteto, kar pomeni da ohranja celično gojišče v optimalnem pH okolju za učinkovito rast celic (39). Normocin™, kot antibiotik pa je potreben, da preprečimo razrast mikoplazem, bakterij in gliv v celičnem gojišču. Celice, ki jih bomo uporabili, niso občutljive na Normocin™ in jih zato ne ovira pri rasti.

b) Odmrzovanje celic

Material: celice HEK-Blue™ hTLR7 (InvivoGen, San Diego, ZDA), pripravljeno celično gojišče (DMEM + 10 % FBS + Normocin™)

Celice smo prejeli v zamrznjenem stanju in prav tako jih moramo za daljše obdobje shranjevati zamrznjene v tekočem dušiku. Zato jih moramo pred uporabo pravilno odmrzniti.

Ko celice v krioviali vzamemo iz tekočega dušika, postopamo tako, da:

1. kriovialo prenesemo v vodno kopel, ki je ogreta na 37 °C. Celice se morajo odtaliti čim hitreje. Ko odmrznejo, pa jih prenesemo na led;
2. odmrznjene celice iz krioviale prenesemo v 50-ml centrifugirko in jim zelo počasi dodajamo pripravljeno in ohlajeno celično gojišče. Skupno moramo celicam dodati približno 15 ml celičnega gojišča na celokupno vsebnost krioviale (2 ml);
3. pripravljeno suspenzijo celic centrifugiramo v centrifugirki 8 min s 300 obrati na minuto (50 g), kar so zelo mili pogoji, da preprečimo mehanski šok. Na dnu 50-ml centrifugirke nastane t.i. celični pelet, kar je v bistvu skupek celic, ki so se posedle na dno centrifugirke;
4. supernatant odlijemo, celični pelet pa resuspendiramo v pripravljenem celičnem gojišču (38).

c) Štetje celic

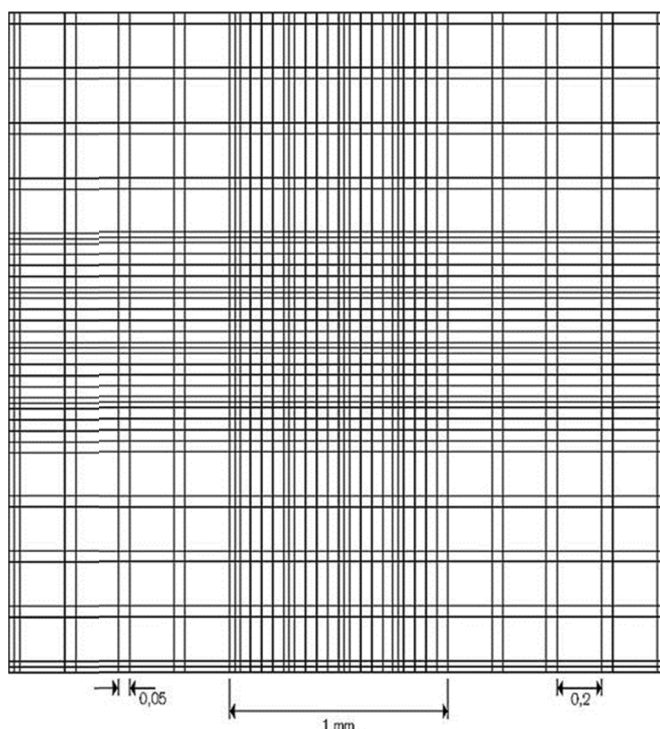
Material: tripansko modrilo (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA), celice HEK-Blue™ hTLR7 (InvivoGen, San Diego, ZDA)

Testiranje spojin poteka na tkivni plošči z ravnim dnom s 96 vdolbinicami. Ker je predpisano, koliko celic potrebujemo v vsaki vdolbinici, da lahko preskušamo delovanje morebitnih ligandov na TLR7, je zelo pomembno tudi, da vemo koliko celic imamo. Število celic v suspenziji, ki jo dobimo po odmrznjenju in suspendiranju celic v celičnem gojišču smo določili s pomočjo Bürker-Türk-ovega citometra.

Na Bürker-Türk-ovem citometru je natisnjena mreža, ki je sestavljena iz 9 kvadratov s stranico dolžine 1 mm. Vsak takšen kvadrat je nadalje razdeljen na 16 manjših kvadratov s stranico dolžine 0,2 mm. Na sredini ploščice pa je še vsak ta manjši kvadrat razdeljen na 16 kvadratov - ti kvadratki imajo stranico dolgo 0,05 mm. Globina med krovnim stekelcem in ploščico je 0,1 mm.

Začnemo tako, da 20 µl suspenzije celic dobro premešamo s 180 µl tripanskega modrila. To barvilo bo prodrlo v citoplazmo mrtvih celic, čez membrano živih pa ne more prehajati. Tako bomo lahko razločevali med živimi in mrtvimi celicami. Žive celice bodo pod svetlobnim mikroskopom bele barve, mrtve pa temno modre barve, zaradi vdora barvila v celice. Nadalje to pripravljeno suspenzijo celic z modrilom s pomočjo pipete iztisnemo pod krovno stekelce, ki smo ga predhodno postavili na Bürker-Türk-ov citometer.

S svetlobnim mikroskopom izostrimo celice na 100x povečavi, nato pa se pomaknemo na območje kvadrata s stranico 0,2 mm, ki se nahaja skrajno levo ter nad kvadratom, ki je razdeljen s še dodatnimi stranicami (10. kvadrant od spodaj navzgor). Nato začnemo od leve proti desni šteti vse žive celice, ki se nahajajo v kvadratih, ter tiste, ki se dotikajo leve ali zgornje stranice kvadratov. Tiste celice, ki se dotikajo desne ali spodnje stranice ne štejemo. Ko smo se pomaknili vse do zadnjega (dvanajstega) kvadrata, preštejemo še celice v kvadratu nad tem zadnjim kvadratom. Nato se pomaknemo po mreži navzdol na skrajno desni kvadrant, ki se nahaja pod kvadratom, ki je razdeljen s še dodatnimi stranicami (4. kvadrant od spodaj navzgor). Sedaj pa, z upoštevanjem enakih pravil, štejemo celice tudi v spodnji vrsti kvadratov in se pomikamo od desne proti levi. Tako nadaljujemo, dokler ne preštejemo celice še v zadnjem, 25. kvadrantu. Število celic, ki smo jih prešteli, si zabeležimo.



Slika 5: Mreža, ki je natisnjena na Bürker-Türker-ovem citometru (40)

Število živih celic v mililitru suspenzije določimo po enačbi:

$$\frac{\text{število prešteti}h \text{ živih celic}}{25 \times 0,1 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm}} \times \frac{180 + 20}{20} \times 1000 = \text{število živih celic} / \text{ml suspenzije}$$

Enačba 2: Enačba za izračun števila celic z uporabo Bürker-Türk-ovega citometra

S prvim ulomkom določimo koncentracijo živih celic, ki smo jih prešteli (v enoti št. živih celic/mm³) v suspenziji celic z barvilom. S faktorjem 200/20, oziroma s faktorjem 10 pomnožimo dobljeno koncentracijo zaradi redčenja, ki smo ga napravili ob mešanju suspenzije celic z barvilom. Faktor 1000 pa predstavlja pretvorbo enot, tako da iz kubičnih milimetrov dobimo mililitre.

d) Gojenje in priprava celic

Material: pripravljeno celično gojišče, celični pufer DPBS brez Ca²⁺ in Mg²⁺ (PAA, Linz, Avstrija), gojilna posoda s površino 75 cm² (Nunc, Roskilde, Danska), TrypLE Express (InvivoGen, San Diego, ZDA), celice HEK-Blue™ hTLR7 (InvivoGen, San Diego, ZDA)

Za nadaljnjo delo je potrebno večje število celic in jih je zato treba namnožiti. To naredimo tako, da celice suspendiramo v približno 10 ml celičnega gojišča, jih prenesemo v gojilno posodo in gojimo približno en teden pri 37 °C in 5 % CO₂, oziroma dokler ne dosežejo 70-80 % konfluentnosti (38).

Po tednu dni smo najprej preverili uspešnost gojenja tako, da smo pregledali dno gojilne posode pod svetlobnim mikroskopom. Če so celice dobro uspevale, je dno premreženo z njimi in tvorijo na dnu gojilne posode film, če pa so celice slabo uspevale, ali sploh niso, pa vidimo pod svetlobnim mikroskopom le posamezne celice, ki med seboj niso povezane, kakor tudi tipične morfološke lastnosti apoptoze celic (celično krčenje ter zaokroženost, razpad celic na apoptotska telesca itd.).

Za nadaljnjo delo je treba celice resuspendirati. Celice odlepimo od dna gojilne posode tako, da iz gojilne posode s pipeto odstranimo celično gojišče in gojilno posodo nekajkrat speremo z 10 ml pufra, ki ne vsebuje Ca²⁺ in Mg²⁺ ionov. Tako celicam odvzamemo ione, ki jih potrebujejo za tvorjenje vezi s posodo preko površinskih adhezijskih molekul. Prav tako pa celicam dodamo približno 5 ml raztopine tripsina (TrypLE Express), ki razdira vezi med celicami. Celice pustimo približno 10 min v takšnem mediju, ob tem pa celice tudi rahlo mešamo. Vezi med celicami počasi popuščajo, kar lahko opazimo kot razdiranje večjih skupkov celic v manjše skupke. Ko so celice odlepljene, jih popolnoma

resuspendiramo s pomočjo 10-ml pipete, tako da jih nekajkrat počasi posesamo in iztisnemo iz pipete.

Dobljeno suspenzijo s pipeto prenesemo v 50-ml centrifugirko in jo centrifugiramo 8 min s 300 obrati na minuto. Tako nastane celični pelet in supernatant, katerega odstranimo s pipeto. Celični pelet nato resuspendiramo v pripravljenem celičnem gojišču in uspešnost gojenja preverimo s štetjem dobljenih celic.

e) Topnost spojin

Material: DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA), pripravljeno celično gojišče, spojine za testiranje (spojine št. **3, 8, 9, 13, 14, 20, 22** - ChemBridge Corporation, San Diego, ZDA; spojina št. **15** - Asinex, Moskva, Rusija; spojini št. **24, 25** - Life Chemicals, Burlington, Kanada; spojine št. **5, 6, 7, 12, 16, 17, 19, 23, 26, 27** - Molport, Riga, Latvija; spojine št. **4, 10, 11** - Princeton BioMolecular Research, New York, ZDA)

Eden od osnovnih pogojev za preskušanje delovanja spojin s pomočjo celičnih linij, je njihova zadostna topnost v celičnem gojišču. Da vidimo rezultate testiranja na celičnih linijah, moramo celice namreč določen čas inkubirati v celičnem gojišču pri določenih pogojih, kar pomeni, da morajo biti v celičnem gojišču topne tudi spojine, katere testiramo.

Najprej smo torej morali dobljenim spojinam določiti topnost. Začeli smo z določanjem topnosti spojin v DMSO. DMSO je topilo, v katerem je topnih precej polarnih in tudi nepolarnih spojin. Vse spojine, ki smo jih naročili, so organske molekule in tudi večinoma nepolarne. Prav tako ni nobena od naročenih spojin v obliki soli, kar pomeni, da bodo spojine boljše topne v DMSO kot v celičnem gojišču. Zato lahko razumno sklepamo, da spojine, ki niso topne v DMSO, ne bodo topne niti v celičnem gojišču.

Glede na maso naročenih spojin in njihovo molekulsko maso smo izračunali v kolikšnem volumnu DMSO (v μl) moramo raztopiti spojine, da dobimo 50 mM koncentracijo spojin v DMSO. Potreben volumen DMSO smo izračunali po formuli:

$$V [\mu\text{l}] = \frac{m [\text{mg}]}{M \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \times 50 \text{ mmol/l}} \times 10^6$$

Enačba 3: Enačba za izračun volumna DMSO, ki ga je potrebno dodati spojinam, da dobimo končno koncentracijo raztopine 50 mmol/l

Podatki za posamezne spojine in izračunani dodatek volumna DMSO je naveden v spodnji preglednici.

Preglednica I: Prikaz molekulskih mas spojin, mase posamezne dobljene spojine ter volumna DMSO, v katerem smo morali raztopiti spojine za dobljeno koncentracijo 50 mmol/l

Številka spojine	Molekulska masa spojine (g/mol)	Masa spojine (mg)	Dodatek DMSO za koncentracijo 50 mmol/l (μ l)
<u>3</u>	242,278	5,3	437
<u>4</u>	227,271	5	440
<u>7</u>	231,255	5	432
<u>8</u>	266,3	5,1	383
<u>9</u>	289,364	5,3	366
<u>10</u>	195,251	5	512
<u>11</u>	288,105	5	347
<u>12</u>	179,183	5	558
<u>13</u>	294,315	5,4	367
<u>14</u>	295,255	5,2	352
<u>15</u>	268,277	5	373
<u>16</u>	268,703	1	74
<u>20</u>	231,275	5,3	458
<u>22</u>	286,355	5,1	356
<u>23</u>	334,379	5	299
<u>24</u>	293,371	5	341
<u>25</u>	311,342	5	321
<u>27</u>	315,378	10	634

Spojnam v epruvetkah smo dodali izračunan volumen DMSO in jih poskušali raztopiti z mešanjem. Spojine smo poskušali raztopiti tudi s pomočjo ultrazvočne kadičke. Pomembno je, da so spojine v želeni koncentraciji popolnoma topne v DMSO, zato smo to preverili tudi pod svetlobnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi. Vse raztopine, pri katerih smo opazili manjše ali večje kristale, smo zavrgli, saj se te spojine niso popolnoma raztopile v DMSO.

Vse spojine, ki so bile popolnoma topne v DMSO, smo nato poskusili raztopiti še v pripravljenem celičnem gojišču. Poskušali smo pripraviti 100, 300 in 500 μM raztopine. To smo naredili tako, da smo s pipeto prenesli izračunan volumen v DMSO raztopljene spojine v 1 ml celičnega gojišča, ter jo s hitrimi iztiski in sesanji pipete vmešali v celično gojišče. Čim hitreje smo poskušali raztopino dodatno premešati še na Vortex mešalniku. Tudi tu smo raztopine preverili za morebitne nastale kristale in takšne spojine izločili iz nadaljnjega testiranja.

f) Citotoksičnost

Material: propidijev jodid (InvitroGen, Carlsbad, ZDA), pripravljeno celično gojišče, v DMSO raztopljene spojine, celice HEK-Blue™ hTLR7 (InvivoGen, San Diego, ZDA), tkivne plošče z ravnim dnom s 96-vdolbinicami (Nunc, Roskilde, Danska)

Zadnji test, ki so ga morale prestati spojine, preden smo lahko začeli s preskušanjem delovanja, je bil test citotoksičnosti. Eden najpomembnejših pogojev za preskušanje delovanja učinkovin na celičnih linijah je, da lahko celice preživijo v okolju, ki vsebuje preskušano spojino. Očitno je namreč, da delovanja spojin ne moremo testirati, če celice testa ne preživijo.

Odločili smo se, da spojine, ki so bile ustrezno topne v DMSO in v celičnem gojišču, testiramo za citotoksično delovanje na uporabljenih celicah. Citotoksično delovanje spojin smo preskusili s testom privzema propidijevega jodida, in sicer smo uporabili spojine koncentracije 250 in 500 $\mu\text{mol/l}$.

Test temelji na tem, da se propidijev jodid, ki je barvilo, vgradi le v DNA mrtvih celic ter fluorescira, kar lahko merimo. Propidijev jodid je barvilo, ki ne prehaja celične membrane živih celic. Vendar je v primeru, da določena spojina deluje citotoksično na celice, lahko moteno tudi delovanje membrane - pride do poškodb na membrani - in v tem primeru barvilo lahko preide v citoplazmo in jedro celic, kjer se vgradi v vijačnico DNA. Vgradnjo

barvila pa lahko izmerimo fluorometrično s pretočno citometrijo ter tako dobimo delež celic, ki so propadle. Gre torej za robusten in enostaven test, s katerim lahko določimo popolnoma mrtve celice. Test pa ima tudi nekaj pomanjkljivosti, saj zgodnjih procesov apoptoze, kjer je celična membrana še funkcionalna, z njim ne moremo zaznati. Kljub temu pa lahko oceno citotoksičnosti spojin zadovoljivo določimo z deležem mrtvih celic (41).

Test smo izvedli tako, da smo v epruvetko prenesli 0,5 ml pripravljenega celičnega gojišča in dodali preračunan volumen v DMSO raztopljenih spojin. Na koncu smo dodali še suspenzijo celic. V vsako epruvetko smo morali dodati tolikšen volumen suspenzije celic, da smo po prenosu 200 µl pripravljene suspenzije (pripravljeno celično gojišče, v DMSO raztopljene spojine ter celice) v vdolbinice na tkivni plošči, v vsaki vdolbinici imeli približno 40.000 celic (38). Volumen suspenzije celic, ki smo ga morali dodati, smo izračunali na podlagi številske koncentracije celic, ki smo jo določili s štetjem celic z Bürker-Türk-ovim citometrom takoj po pripravi celične suspenzije ter s pomočjo formule:

$$V (\text{suspenzije celic})[\mu\text{l}] = \frac{40.000 \times 10^3}{\text{številska koncentracija celic } [\text{št. celic/ml}]} \times \frac{5}{2}$$

Enačba 4: Enačba za izračun volumna suspenzije celic, ki ga je treba dodati v epruvetko, da dobimo po pripravi predpisano število celic v vsaki vdolbinici v tkivni plošči

Test smo za vse koncentracije spojin izvajali v dveh paralelah. Celice smo v takšnem okolju nato gojili 24 ur pri 37 °C in 5 % CO₂. Po pretečenem času smo izmerili fluoresciranje v DNA vgrajenega propidijevega jodida s pomočjo pretočne citometrije.

g) Test agonistične aktivnosti spojin na TLR7

Material: pripravljeno celično gojišče, celice HEK-Blue™ hTLR7 (InvivoGen, San Diego, ZDA), v DMSO raztopljene spojine, tkivne plošče z ravnim dnom s 96 vdolbinicami (Nunc, Roskilde, Danska), kolorimetrični encimski test QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San Diego, ZDA), imikvimod (InvivoGen, San Diego, ZDA)

Celična linija HEK-Blue™ hTLR7 družbe InvivoGen je namenjena za raziskovanje spojin, ki delujejo na TLR7. Celično linijo HEK-Blue™ hTLR7 so dobili tako, da so s transfekcijo prenesli gen za TLR7 in gen za placentarno alkalno fosfatazo (SEAP - Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase) v HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) celice. Gen za SEAP je

pod nadzorom INF- β (Interferon β) promotorja, ki je povezan z NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) in AP-1 (Activator Protein 1) na petih vezavnih mestih. Stimulacija TLR7 aktivira NF- κ B in AP-1, kar inducira ekspresijo in prepis SEAP v celici (38). Delovanje tega encima lahko izmerimo v supernatantu, z dodatkom kromogena, katerega fosfatno vez encim cepi in tako nastane obarvan produkt, ki ga lahko spektrofotometrično določamo.

Določanje agonistične aktivnosti spojin smo izvedli tako, da smo v 0,5 ml celičnega gojišča dodali takšen volumen v DMSO raztopljenih spojin, da smo pri vsaki spojini posebej dobili 500 μ M raztopino. Vsako tako pripravljeno raztopino smo nato zaporedno redčili in dobili še raztopine nižjih koncentracij. Na koncu smo v epruvete dodali še izračunan volumen suspenzije celic. Za posamezno koncentracijo spojine, smo 200 μ l tako pripravljene suspenzije s pipeto prenesli v vdolbinice na tkivni plošči, in sicer v dveh paralelah.

Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C in 5 % CO₂ smo določili agonistično aktivnost spojin s pomočjo encimskega kolorimetričnega testa, kot predpisuje proizvajalec celične linije (38). Za ta namen uporabimo QUANTI-Blue™ kolorimetrični encimski test, ki ga tudi proizvaja družba InvivoGen. Kolorimetrični encimski test QUANTI-Blue™ vsebuje medij za zaznavo in kvantitativno določitev alkalne fosfataze v biološkem vzorcu, kot je na primer supernatant celičnih kultur. Ob prisotnosti alkalne fosfataze medij spremeni barvo iz roza v vijolično-modro.

Najprej smo morali pripraviti test QUANTI-Blue™, tako da smo vsebino (prah) epruvetke, v kateri se nahaja test, raztopili v 100 ml deionizirane vode. Raztopino smo nato filtrirali skozi membrano z velikostjo por 0,2 μ m. Da smo določili aktivnost iz celic izločene alkalne fosfataze, smo v 200 μ l pripravljene raztopine QUANTI-Blue™ dodali 20 μ l supernatanta iz vsake vdolbinice posebej, za vse spojine. Po 15-minutni inkubaciji pri 37 °C smo aktivnost izmerili s pomočjo spektrofotometra pri valovni dolžini 620 nm. Negativno kontrolo je predstavljalo celično gojišče z dodano suspenzijo celic, pozitivno pa zmes celičnega gojišča, suspenzije celic in učinkovine imikvimod v koncentraciji 1 μ g/ml (42). Stimulacijo celične linije lahko dosežemo z učinkovino imikvimod koncentracije 1 μ g/ml - 5 μ g/ml, kakor je navedeno v podatkovnem listu (TDS - Technical Data Sheet) za učinkovino imikvimod družbe InvivoGen (43).

Tukaj opazujemo v kakšni meri so učinkovine v različnih koncentracijah stimulirale TLR7 v primerjavi s stimulacijo učinkovine imikvimod, koncentracije 1 µg/ml.

h) Test antagonistične aktivnosti spojin na TLR7

Material: pripravljeno celično gojišče, celice HEK-Blue™ hTLR7 (InvivoGen, San Diego, ZDA), v DMSO raztopljene spojine, tkivne plošče z ravnim dnom s 96-vdolbinicami (Nunc, Roskilde, Danska), kolorimetrični encimski test QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San Diego, ZDA), imikvimod (InvivoGen, San Diego, ZDA)

Test in postopek določanja antagonistične aktivnosti spojin na TLR7 se je od testa agonistične aktivnosti razlikoval le v tem, da smo poleg spojin k celicam v vdolbinice dodali še učinkovino imikvimod v koncentraciji 1 µg/ml, in sicer smo jo dodali 2 uri po dodatku spojin in suspenzije celic v celično gojišče. Tako smo omogočili, da preiskovane spojine zasedejo mesta na TLR7 pred učinkovino imikvimod.

Postopek določanja antagonistične aktivnosti spojin na TLR7 je potekal po naslednjih korakih:

1. Priprava suspenzije celic in določitev številske koncentracije suspenzije celic.
2. Priprava celičnega gojišča z raztopljenimi spojinami v različnih koncentracijah.
3. Dodatek preračunanega volumna suspenzije celic v raztopino celičnega gojišča s spojinami.
4. Po 2 urah inkubacije, dodatek toliko učinkovine imikvimod, da je njena koncentracija v posamezni vdolbinici znašala 1 µg/ml.
5. Inkubacija celic 24 ur na 37 °C in 5 % CO₂ in zaznava prisotnosti ter merjenje aktivnosti izločene alkalne fosfataze v supernatantu s pomočjo encimskega kolorimetričnega testa QUANTI-Blue™.

Pri testiranju antagonistične aktivnosti učinkovin ugotavljamo v kakšni meri so spojine v različnih koncentracijah zavirale stimulacijo TLR7 s strani učinkovine imikvimod, koncentracije 1 µg/ml.

i) Določanje IC₅₀

Material: računalniški program GraphPad Prism® različice 5.00

IC₅₀ določamo s pomočjo računalniškega programa in rezultatov meritev antagonistične aktivnosti spojin. Uporabili smo računalniški program GraphPad Prism® različice 5.00. V

programu smo uporabili funkcijo analize rezultatov z nelinearno regresijo. Postopek je potekal po naslednjih korakih (44):

1. Z možnostjo "New project file" smo izdelali tabelo in graf z možnostjo "New table & graph → XY" s parametri "Start with an empty data table", "Points only graph" in Y: "Enter 2 replicate values in side-by-side subcolumns".
2. Za vrednosti X smo v tabelo vnesli logaritemske vrednosti koncentracij spojin v $\mu\text{mol/l}$. Za vrednosti Y smo pri posamezni učinkovini za posamezno koncentracijo vnesli absorbanco, ki smo jo določili, za obe paraleli.
3. V okencu "Analysis" smo izbrali možnost "Fit a curve with nonlinear regression" ter v pojavnem okencu izbrali možnost "Dose-response - Inhibition" → "log(inhibitor) vs. response". Vseh ostalih možnosti nismo spreminjali.
4. Program nam je za posamezno učinkovino izračunal parametre v naslednjih sklopih podatkov: "Best-fit values", "Std. Error", "95 % Confidence Intervals", "Goodness of Fit" in "Number of points". Iz dobljenih podatkov tako lahko za vsako spojino med drugim odčitamo izračunani IC_{50} in kako dobro je ujemanje rezultatov meritev z izračunano krivuljo (parameter "R2").
5. Računalniški program nam za vnesene podatke za posamezne spojine izdela tudi graf odziva (absorbance) v odvisnosti od logaritemskih vrednosti koncentracij spojin v $\mu\text{mol/l}$.

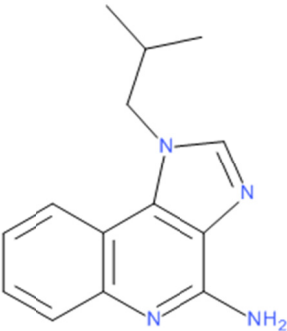
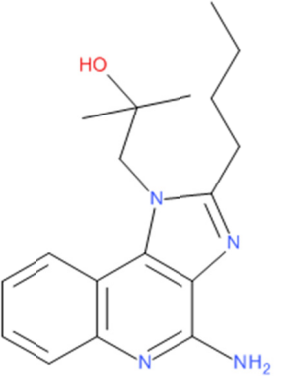
Dobljene rezultate smo pregledali in jih racionalno ocenili glede na vnesene rezultate testiranja. Nekatero spojino so namreč zaviralno delovale na celice, kar pomeni da se celice niso mogle ustrezno razvijati in deliti. Te celice tudi niso izločale encima alkalne fosfataze. Program nam je v tem primeru izračunal precej nizko vrednost IC_{50} , ki pa ni bila realna, saj je spojina zavirala rast celic in ni delovala le na TLR7.

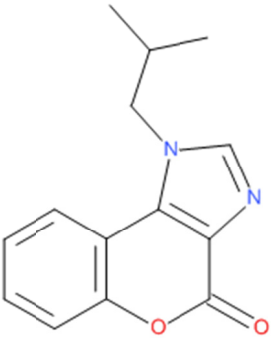
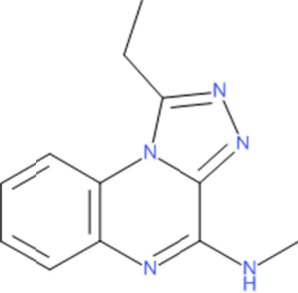
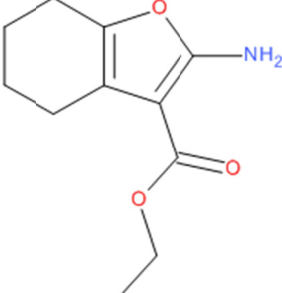
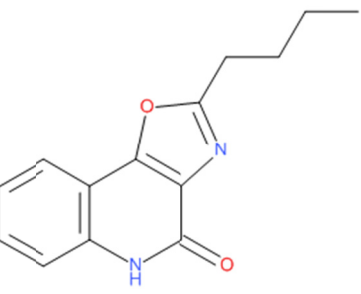
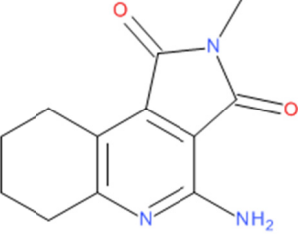
REZULTATI IN DISKUSIJA

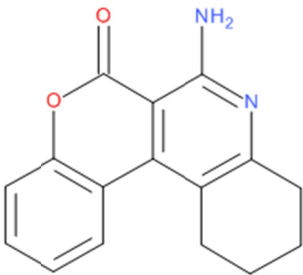
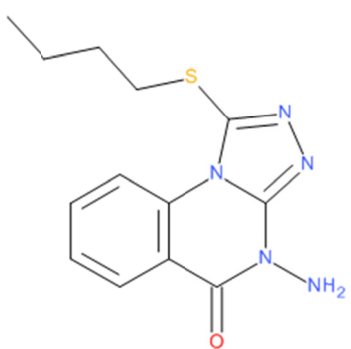
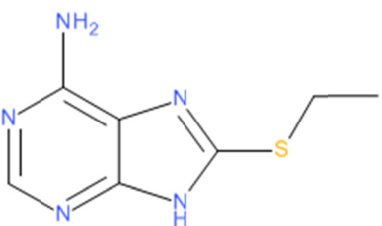
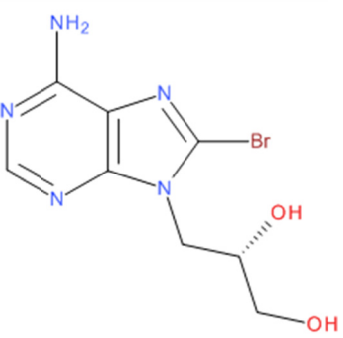
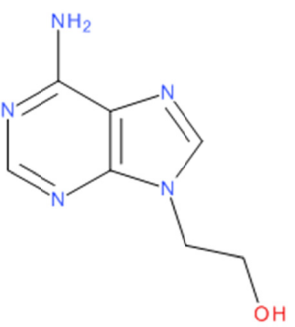
1. Rezultat virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda

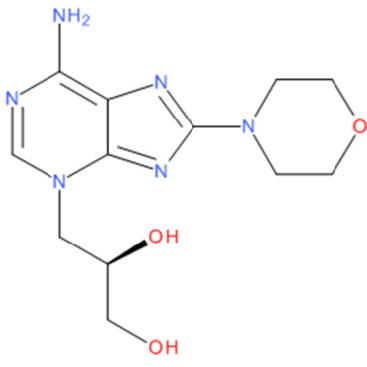
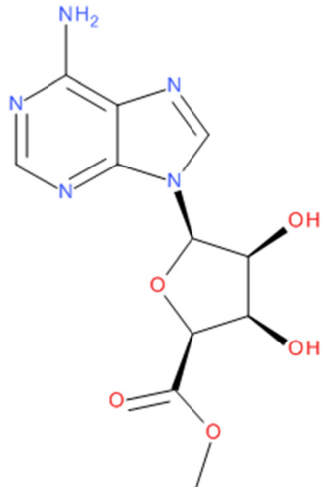
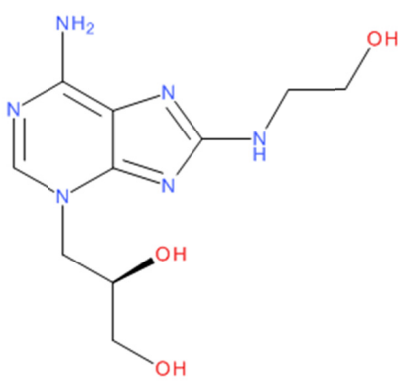
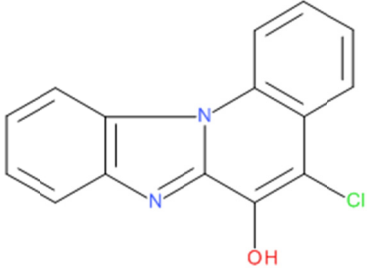
V spodnji preglednici so predstavljene strukture 25 spojin, ki smo jih glede na rezultate virtualnega rešetanja izbrali za testiranje, predstavljeni pa sta tudi strukturi učinkovine imikvimod in spojine **54** iz članka (32), ki smo ju uporabili za izdelavo iskalne predloge v računalniškem programu vROCS. Spojine so v preglednici označene s kodo ZINC ter zaporedno številko, ki smo jo sami določili. V preglednici so predstavljene še vrednosti cenilnih funkcij Tanimoto combo, Tanimoto shape in Tanimoto color.

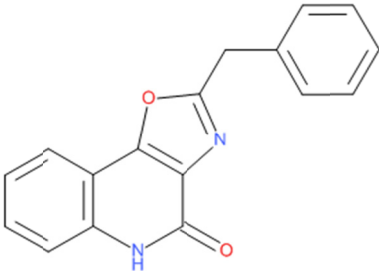
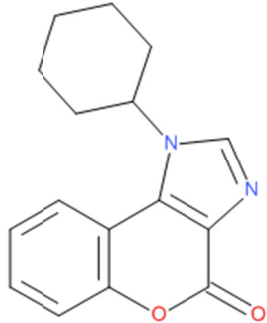
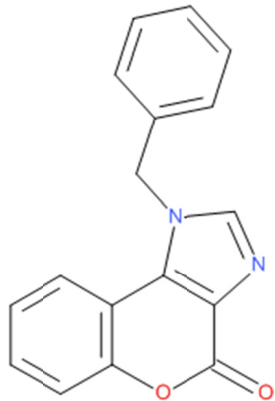
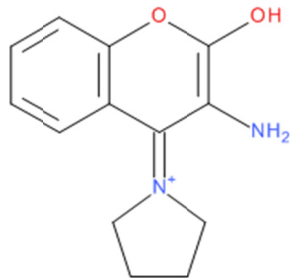
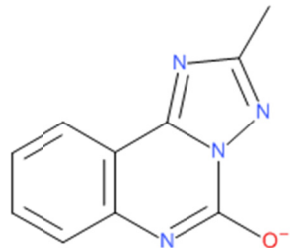
Preglednica II: Prikaz strukture ter vrednosti cenilnih funkcij za spojine, ki smo jih izbrali za testiranje

Struktura	Koda ZINC (zapored. št.)	T. combo (iskalna predloga)	T. shape	T. color
	imikvimod	/	/	/
	spojina 54 iz članka (32)	/	/	/

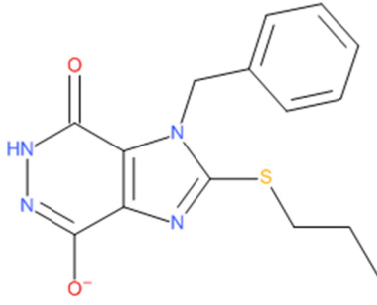
	12382420 (3)	1,776 (imikvimod)	0,999	0,777
	7504136 (4)	1,545 (imikvimod)	0,908	0,637
	4159089 (5)	1,463 (imikvimod)	0,887	0,575
	8772815 (6)	1,462 (imikvimod)	0,893	0,569
	22063278 (7)	1,432 (imikvimod)	0,853	0,579

	19335700 (8)	1,424 (imikvimod)	0,884	0,540
	2841280 (9)	1,413 (imikvimod)	0,896	0,518
	1667204 (10)	1,41 (imikvimod)	0,714	0,696
	39698 (11)	1,268 (TLR-54)	0,721	0,547
	36416 (12)	1,257 (TLR-54)	0,663	0,594

	997139 (13)	/	/	/
	5034289 (14)	/	/	/
	2029050 (15)	/	/	/
	1314836 (16)	1,55 (imikvimod)	0,857	0,693

	2128240 (17)	1,532 (imikvimod)	0,833	0,699
	219199 (18)	1,508 (imikvimod)	0,909	0,599
	260789 (19)	1,459 (imikvimod)	0,860	0,599
	37858724 (20)	1,458 (imikvimod)	0,921	0,537
	8673173 (21)	1,423 (imikvimod)	0,830	0,593

	4756232 (22)	1,419 (imikvimod)	0,874	0,545
	9060637 (23)	1,405 (imikvimod)	0,738	0,667
	12232522 (24)	1,308 (TLR-54)	0,906	0,402
	12232592 (25)	1,297 (TLR-54)	0,880	0,417
	13799895 (26)	1,296 (TLR-54)	0,800	0,496

	8686004 (27)	1,247 (TLR-54)	0,804	0,444
---	------------------------	-------------------	-------	-------

Od 25 naročenih spojin smo dobili dobavljenih 18, ki smo jih uporabili v nadaljnjih testih. Dobavljene so bile spojine **3**, **4**, **7-16**, **20**, **22-25** ter **27**.

1. Topnost

Spodnja preglednica prikazuje rezultate preskušanja topnosti spojin.

Preglednica III: Prikaz rezultatov testa topnosti spojin v DMSO in pripravljenem celičnem gojišču

Številka spojine	Popolnoma se je raztopila v DMSO v koncentraciji 50 mmol/l	Popolnoma se je raztopila v pripravljenem celičnem gojišču v koncentraciji 100 µmol/l	Popolnoma se je raztopila v pripravljenem celičnem gojišču v koncentraciji 300 µmol/l	Popolnoma se je raztopila v pripravljenem celičnem gojišču v koncentraciji 500 µmol/l
<u>3</u>	Da	Da	Da	Da
<u>4</u>	Ne	/	/	/
<u>7</u>	Da	Da	Ne	/
<u>8</u>	Ne	/	/	/
<u>9</u>	Da	Da	Da	Da
<u>10</u>	Da	Da	Da	Da
<u>11</u>	Da	Da	Da	Da
<u>12</u>	Da	Da	Da	Da
<u>13</u>	Da	Da	Da	Da
<u>14</u>	Da	Da	Da	Da

<u>15</u>	Ne	/	/	/
<u>16</u>	Ne	/	/	/
<u>20</u>	Da	Da	Da	Da
<u>22</u>	Da	Da	Da	Da
<u>23</u>	Ne	/	/	/
<u>24</u>	Da	Da	Da	Da
<u>25</u>	Ne	/	/	/
<u>27</u>	Da	Da	Da	Da

Kot lahko razberemo iz preglednice, nam je od 18 dobavljenih spojin po preskušanju topnosti ostalo 11 primernih za nadaljnje delo. Glede na strukture spojin (vse imajo večobročne skelete in so večinoma nepolarne) je popolnoma topnih v izbranih topilih in v izbranih koncentracijah pravzaprav presenetljivo velik delež spojin. Pripravljeno celično gojišče je namreč polarno topilo in se zato nepolarne spojine le stežkoma topijo v njem.

Iz rezultatov preskušanja topnosti spojin lahko ugotovimo, da so za nadaljnje delo primerne spojine 3, 9-14, 20, 22, 24 in 27.

2. Citotoksičnost

Rezultati testa citotoksičnosti spojin so predstavljeni v spodnji preglednici.

Preglednica IV: Prikaz deleža preživelih celic v celičnem gojišču z dodanimi spojinami v koncentraciji 250 $\mu\text{mol/l}$ in 500 $\mu\text{mol/l}$

Spojina	Delež preživelih celic pri koncentraciji spojin 250 $\mu\text{mol/l}$ [%]	Delež preživelih celic pri koncentraciji spojin 500 $\mu\text{mol/l}$ [%]
<u>3</u>	86,4	85,5
<u>9</u>	86,7	86,3
<u>10</u>	88,3	84,4
<u>11</u>	89,4	88,5
<u>12</u>	85,2	89,1
<u>13</u>	86,4	86,4

<u>14</u>	88,2	84,1
<u>20</u>	85,2	61,8
<u>22</u>	86,8	88,3
<u>24</u>	87,3	87,7
<u>27</u>	86,5	87,1
delež preživelih celic v celičnem gojišču brez dodanih spojin [%]	87,4	

Vidimo lahko, da je prav v vsakem primeru odmrli določen delež celic; to velja tudi za slepo določitev. Vzrok temu je velika občutljivost celic, ki lahko odmrejo zaradi mnogih razlogov - najverjetneje pa so v tem primeru odmrle zaradi mehanskega šoka, kateremu so bile izpostavljene med centrifugiranjem in pipetiranjem v procesu gojenja in priprave celic za testiranje. Delež odmrlih celic se torej glede na slepo določitev giblje vse tja do 15 % v vsakem primeru, neodvisno od dodanih spojin. Iz rezultatov lahko sklepamo, da spojine v koncentracijah 250 $\mu\text{mol/l}$ in 500 $\mu\text{mol/l}$ niso citotoksične za celice celične linije HEK-Blue™ hTLR7.

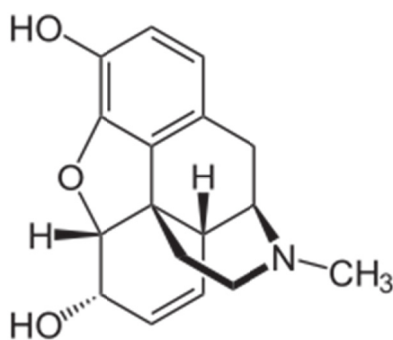
Izjema je le spojina **20**, za katero vidimo, da je pri koncentraciji 500 $\mu\text{mol/l}$ verjetno delovala citotoksično, saj je delež odmrlih celic precej višji od slepe določitve (38 %). Vendar pa je delež odmrlih celic pri koncentraciji spojine 250 $\mu\text{mol/l}$ že padel na približno enako vrednost, kot pri slepi določitvi (15 %), kar pomeni, da spojina verjetno deluje le šibko citotoksično. Prav tako pa so koncentracije spojin, ki smo jih uporabili za določitev citotoksičnosti, zelo visoke in nerealne za morebitno terapevtsko uporabo. Iz tega dejstva, ter iz dejstva, da je citotoksičnost spojine močno upadla ob znižanju koncentracije, smo sklenili, da bomo tudi to spojino uporabili v nadaljnjih testih; spojina lahko namreč deluje (agonistično ali antagonistično) na TLR7 tudi pri precej nižjih koncentracijah.

Glede na rezultate smo se odločili, da bomo v nadaljnjih testih uporabili vse spojine, ki smo jih testirali tudi za citotoksičnost. Ocenili smo, da učinkovine ne delujejo oziroma delujejo le šibko citotoksično.

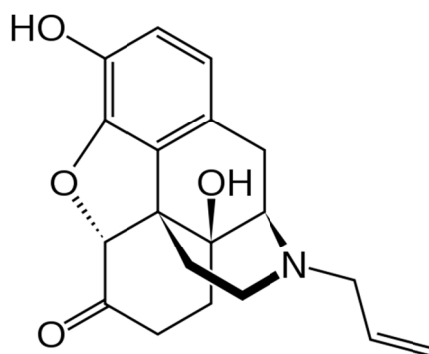
3. Preliminarni testi agonistične in antagonistične aktivnosti

11 spojinam, ki so bile dovolj dobro topne v pripravljenem celičnem gojišču, smo v naslednjem koraku preskusili tako agonistično kot tudi antagonistično delovanje na TLR7. Da bi dobili grobo oceno delovanja spojin, smo preskusili kako delujejo spojine v visokih koncentracijah. Odločili smo se, da bomo preskusili delovanje spojin v koncentraciji 250 $\mu\text{mol/l}$ in 500 $\mu\text{mol/l}$. Delovanje spojin v tako visoki koncentraciji je seveda za potencialno uporabo v zdravih brezpredmetno, saj je takšne koncentracije v plazmi nemogoče dosegati, kljub temu pa takšen test služi namenu, da ugotovimo ali (in katere) spojine na TLR7 delujejo antagonistično ali agonistično.

Čeprav smo z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture liganda izdelali iskalno predlogo iz 2 znanih agonistov na TLR7, je smiselno preveriti tudi antagonistično delovanje spojin. Spojine, ki delujejo kot kompetitivni antagonisti, so namreč strukturno podobni spojinam, ki delujejo kot agonisti na istih receptorjih. Že ena sama različna funkcionalna skupina na istem skeletu lahko pomeni razliko med agonistom in antagonistom na določenem receptorju. Takšen primer sta na primer agonist na opioidnih μ -receptorjih, morfin in kompetitivni antagonist na istih receptorjih, nalokson. Struktura obeh je prikazana na spodnjih slikah.



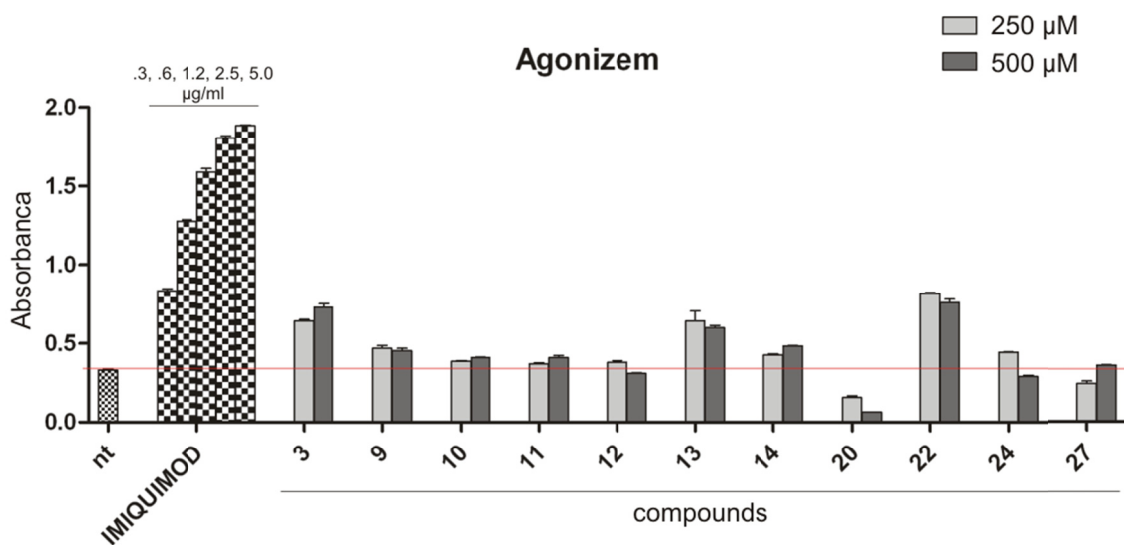
Slika 6: Struktura morfina, ki je agonist na opioidnih μ -receptorjih



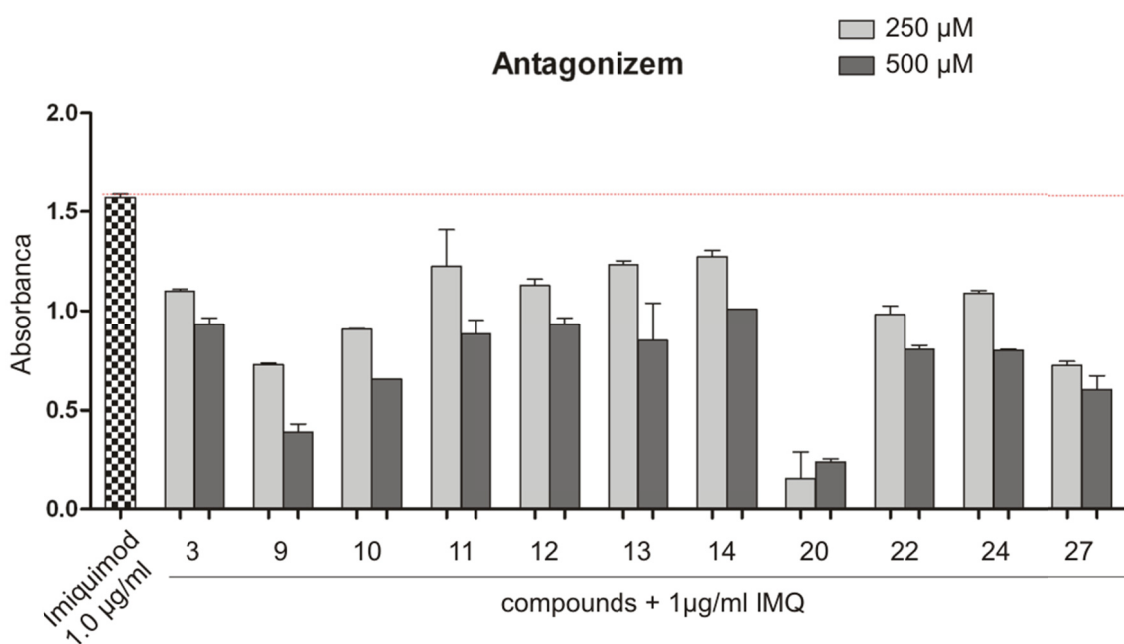
Slika 7: Struktura naloksona, ki je kompetitivni antagonist na opioidnih μ -receptorjih

Mehanizem kompetitivnega antagonizma je namreč takšen, da spojina zasede isto mesto na receptorju, kot agonist, vendar ga pri tem ne aktivira. S tem agonistu onemogoči dostop do receptorskega mesta in tako izniči oziroma zmanjša njegovo delovanje. Zaradi takšnega mehanizma je sicer mogoče z višanjem koncentracije agonista vseeno doseči popolni odziv receptorja, saj agonist izpodriva antagonista iz receptorskega mesta. Za spojine, ki so kompetitivni antagonisti je zaželeno, da imajo veliko afiniteto do receptorja, vendar ne smejo sprožiti odziva (12). Glede na to, da spojine, ki so antagonisti, zasedejo isto mesto na receptorju, kot agonisti, lahko sklepamo, da imajo antagonisti tudi podobno strukturo oziroma ureditev v prostoru, kot agonisti. Tukaj pa je treba poudariti, da je eden od kriterijev ocene cenilne funkcije Tanimoto combo tudi volumen in ureditev molekule v prostoru, kar pomeni, da računalniški program išče podobne spojine, ki bodo zasedle enako mesto na receptorju - ni pa nujno, da bodo receptor te učinkovine tudi aktivirale. Še en argument za smiselnost testiranja antagonistične aktivnosti spojin je tudi ta, da so Shukla in sodelavci v članku (32) ugotovili, da je TLR7 zelo občutljiv na izosterično zamenjavo nekaterih funkcionalnih skupin na imidazokinolinskem skeletu. Tako so na primer ugotovili, da izosterna zamenjava aromatske amino skupine na skeletu učinkovine imikvimod močno zmanjša oziroma praktično povsem izniči agonistično delovanje učinkovine. Iz tega lahko sklepamo, da so za aktivacijo TLR7 zelo pomembne določene strukturne značilnosti, ki jih agonist mora imeti. To pa pomeni, da so lahko spojine, ki smo jih našli s pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda, tudi antagonisti, pa čeprav je vrednost cenilne funkcije Tanimoto combo zelo visoka in smo jih našli z iskalnim nizom, narejenim iz znanih agonistov.

Spodnja histograma predstavljata rezultate preliminarnih testov agonistične in antagonistične aktivnosti spojin na TLR7.



Slika 8: Rezultati preliminarnega testiranja spojin za agonistično delovanje



Slika 9: Rezultati preliminarnega testiranja spojin za antagonistično delovanje

Pri obeh testih smo kot znani agonist na TLR7 uporabili učinkovino imikvimod. Za to učinkovino je znano, da zagotovo povzroči aktivacijo TLR7 v koncentracijskem območju od 1 do 5 μg/ml ($M = 276,8 \text{ g/mol}$, $c = [3,6 \text{ nmol/l do } 18,1 \text{ nmol/l}]$) (43).

Pri interpretiranju teh rezultatov je treba upoštevati, da smo pustili supernatant v kolorimetričnem encimskem testu QUANTI-Blue™ inkubirati precej dalj časa, kot je to potrebno (namesto od 15 min do 60 min na 37 °C smo inkubirali 24 h v hladilniku [2 °C - 8 °C]). To smo naredili, da so bile razlike med delovanjem posameznih spojin bolj izrazite. Izločena alkalna fosfataza lahko tako namreč dalj časa deluje na substratu QUANTI-Blue™ encimskega testa, kar pomeni da bo razlika med odzivom testa pri posameznih spojinah večja, kot bi bila, če bi test uporabili po navodilih. Prav tako pa nas absolutna aktivnost spojin pri preliminarnih testih ne zanima, saj ga uporabimo le kot vodilo za nadaljnje teste. Tako lahko iz večjih razlik in bolj izražene delovanja spojin sklepamo, kako spojine delujejo in katere med njimi so najperspektivnejše.

a) Preliminarni test agonistične aktivnosti

Pri preliminarnem testu agonističnega delovanja spojin nam je za slepo določitev (označeno kot **nt** na histogramu) služilo pripravljeno celično gojišče s celicami celične linije HEK-Blue™ hTLR7, nismo pa dodali spojin ali učinkovine imikvimod. Za kontrolno določitev (označeno kot **IMIQUIMOD** na histogramu) smo pripravljenemu celičnemu gojišču s celicami dodali učinkovino imikvimod v koncentracijah 0,3 µg/ml, 0,6 µg/ml, 1,2 µg/ml, 2,5 µg/ml in 5 µg/ml. Agonistično delovanje vseh spojin (označene z zaporedno številko v razdelku **compounds** na histogramu) smo preskušali v koncentracijah 250 µmol/l in 500 µmol/l.

Na histogramu rezultatov preliminarnega testa agonistične aktivnosti spojin lahko vidimo, da nekaj spojin deluje zelo šibko agonistično na TLR7, večina pa sploh nima agonističnega učinka. Iz rezultatov se zdi, da spojine **3**, **13** in **22** delujejo šibko agonistično in so delni (parcialni) agonisti na TLR7. Kljub temu pa nobena spojina ni aktivirala TLR7 tako močno kot imikvimod v najnižji koncentraciji 0,3 µg/ml (1,1 nmol/l). Če upoštevamo, da gre tukaj za ojačane signale z inkubacijo, ki je trajala precej dlje, kot je predpisano, lahko ugotovimo, da spojine niso dobri kandidati na nadaljnjo testiranje agonistične aktivnosti.

b) Preliminarni test antagonistične aktivnosti

Pri preliminarnem testu antagonističnega delovanja spojin nam je za kontrolno določitev (označeno kot **imiquimod 1.0 µg/ml** na histogramu) služilo pripravljeno celično gojišče s celicami in dodano učinkovino imikvimod v koncentraciji 1 µg/ml. Antagonistično delovanje vseh spojin (označeno z zaporedno številko v razdelku **compounds + 1 µg/ml IMQ** na histogramu) smo preskušali v koncentracijah 250 µmol/l in 500 µmol/l, v isto

vdolbinico na tkivni plošči pa smo dodali tudi učinkovino imikvimod v koncentraciji 1 µg/ml.

Iz histograma lahko razberemo, da so prav vse spojine zmanjšale delovanje učinkovine imikvimod na TLR7. Še posebej izstopata spojini **9** in **20**. Predvsem za spojino **20** se zdi, da je skoraj popolnoma izničila delovanje učinkovine imikvimod, vendar iz rezultatov citotoksičnosti (glejte poglavje "Citotoksičnost" zgoraj) tudi vemo, da je spojina vsaj v koncentraciji 500 µmol/l deloma citotoksična za celice. To pomeni, da je tudi v tem testu verjetno neselektivno zavirala (in ubijala) celice in ni delovala le selektivno antagonistično na TLR7. Rezultati pomenijo, da je računalniški program dobro ocenil in smo za zadetke dobili spojine, ki so vsaj po volumnu in orientaciji v prostoru podobne iskalnima nizoma (narejena iz učinkovine imikvimod in spojine **54** iz članka (32)). Ocenimo torej lahko, da imajo vse spojine določeno afiniteto do TLR7, vendar ga ne aktivirajo in zato delujejo kot kompetitivni antagonisti.

Odločili smo se, da bomo v nadaljnjih testiranjih preizkusili le antagonistično aktivnost spojin. Glede na preliminarnе rezultate agonistične aktivnosti se namreč zdi nesmiselno, da bi spojine še preizkušali za agonistično aktivnost.

4. Določanje IC₅₀

Glede na rezultate preliminarnih testov antagonistične aktivnosti spojin, smo se odločili, da bomo vsem spojinam poskušali določiti vrednosti IC₅₀. V ta namen smo pri vseh spojinah določali antagonistično aktivnosti pri koncentracijah 500 µmol/l, 250 µmol/l, 125 µmol/l, 63 µmol/l, 31 µmol/l, 16 µmol/l, 8 µmol/l in 4 µmol/l, kot je opisano v ustreznih podpoglavjih v poglavju MATERIALI IN METODE. Test smo zaradi čim bolj natančne določitve in čim manjše možnosti napak ponovili dvakrat.

a) Prvo določanje IC₅₀

Pri preskusu prvega določanja IC₅₀ so izračunane vrednosti IC₅₀, koeficienta R² in 95 % intervala zaupanja predstavljene v spodnji preglednici.

Preglednica V: Prikaz izračunane vrednosti IC₅₀, 95 % intervala zaupanja ter vrednosti koeficienta R² za podatke, dobljene pri prvem preskusu določanja IC₅₀

Spojina	IC ₅₀ [µmol/l]	95 % interval zaupanja [µmol/l]	R ²
---------	------------------------------	------------------------------------	----------------

<u>3</u>	218,0	38,79 - 1226	0,8217
<u>9</u>	692,1	85,82 - 5581	0,8981
<u>10</u>	68,62	20,86 - 225,8	0,9129
<u>11</u>	87,01	44,42 - 170,4	0,9784
<u>12</u>	/	/	/
<u>13</u>	775,2	38,27 - 15700	0,7948
<u>14</u>	1767	41,02 - 76092	0,8860
<u>20</u>	26,50	10,65 - 65,94	0,9283
<u>22</u>	282,7	56,69 - 1339	0,8698
<u>24</u>	/	/	/
<u>27</u>	108,8	70,71 - 167,5	0,9852

Pri izračunu parametrov, navedenih v zgornji preglednici, smo nekatere eksperimentalno dobljene podatke zavrgli. Zavrgli smo le tiste podatke, za katere smo določili, da so prekomerno odstopali od pričakovanih.

Ob pogledu na vrednosti IC_{50} se zdi, da je kar nekaj spojin precej učinkovitih antagonistov, z vrednostnimi IC_{50} približno 100 $\mu\text{mol/l}$. Takšne vrednosti imajo namreč kar 4 spojine (10, 11, 20 in 27).

Kljub temu pa je pri interpretaciji podatkov treba biti previden in upoštevati tudi druge izračunane vrednosti. Posebej veliko izvemo iz podatka o 95 % intervalu zaupanja, ki pove kako širok interval vrednosti potrebujemo, da se bo resnični IC_{50} spojine s 95 % zanesljivostjo nahajal znotraj tega intervala. Izračunan je glede na vrednosti standardne deviacije - večja je standardna deviacija podatkov, širši je interval zaupanja. Iz navedenega sledi, da je zaželeno, da je ta interval čim ožji, saj to pomeni, da je izračunana vrednost IC_{50} bolj natančno določena in manjša je verjetnost, da je izračunana vrednost posledica kakšne anomalije pri testiranju ali računanju.

Tudi podatek o determinacijskem koeficientu (R^2) je pomemben. Podatek nam pove v kakšni meri se eksperimentalno določeni podatki ujemajo z izračunano krivuljo. Ta podatek lahko zasede vrednosti od 0 do 1, pri čemer 1 pomeni, da se eksperimentalni podatki popolnoma ujemajo z izračunano krivuljo, 0 pa pomeni, da so eksperimentalni podatki, glede na izračunano krivuljo, razpršeni naključno. Dobro je torej, da je vrednost

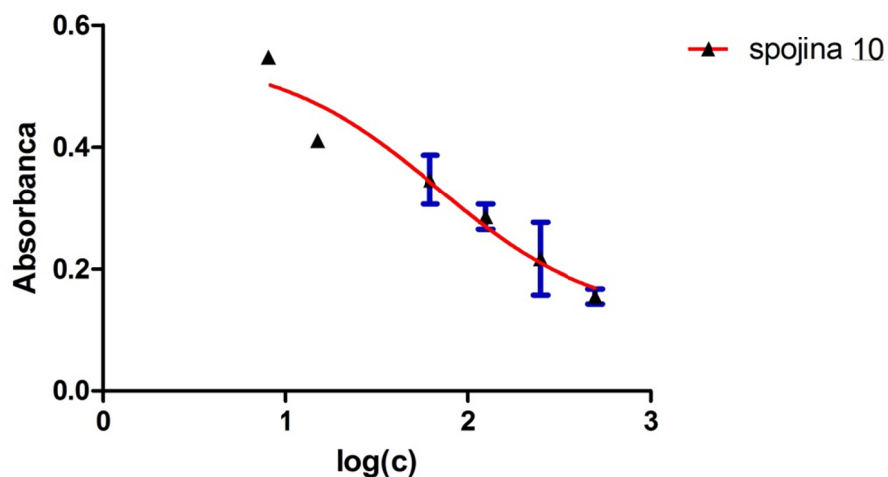
tega koeficienta čim večja, saj to pomeni, da so podatki, pridobljeni v preizkusu, precej dobri in mehanizem antagonizma poteka, kot je predvideno. Manjše vrednosti tega koeficienta lahko pomenijo (tudi ob dobrih vrednostih IC_{50} in 95 % intervala zaupanja), da takšen izračun krivulje ni primeren za predstavitev mehanizma zaviranja TLR7. Velja pa opomniti, da je težko definirati, kje točno je tista meja, pod katero je koeficient R^2 prenizek, sploh pri podatkih, dobljenih pri testiranju na evkariontskih celicah, kjer na rezultate lahko vpliva zelo veliko spremenljivk in na mnogo katere tudi nimamo večjega vpliva. Prav zaradi veliko možnih spremenljivk pri postopku je pri testiranju na evkariontskih celicah v primerjavi z drugimi načini testiranja, težje dobiti dobro ponovljive podatke z nizko standardno deviacijo in visokim determinacijskim koeficientom.

Pozorni moramo biti tudi na vse druge ugotovitve, ki smo jih pridobili tekom testiranja. Zelo pomemben je namreč podatek, da je spojina **20** pri testiranju citotoksičnosti, vsaj pri največji koncentraciji, citotoksično delovala na celice. To lahko pomeni, da bo tudi pri nižjih koncentracijah spojina delovala nespecifično zaviralno na celice, ni pa nujno, da bo spojina celice pobila. Podoben trend lahko pri isti spojini opazimo tudi pri preliminarnem testiranju agonistične in antagonistične aktivnosti spojin, kjer je spojina **20** pri obeh preskušanih koncentracijah, precej bolj zavrla izločanje alkalne fosfataze, kot vse druge spojine in tudi precej bolj kot slepa določitev. Še eno negativno ugotovitev glede delovanja spojine **20** smo opazili pri postopku določanja IC_{50} spojin. Po enodnevni inkubaciji celic skupaj s spojinami je namreč pri vseh ostalih spojinah celično gojišče spremenilo barvo, saj celično gojišče vsebuje pH indikator, ki spremeni barvo, ko je celično gojišče izrabljeno (celice so zaradi metabolne aktivnosti izločile večjo količino kislih produktov). Pri spojini **20** pa je bila opazna sprememba barve celičnega gojišča šele pri koncentraciji spojine 63 $\mu\text{mol/l}$, kar pomeni, da celice niso bile metabolno aktivne - sklepamo lahko, da verjetno spojina **20** neselektivno zavira rast (in metabolno aktivnost) celic. Navkljub zelo dobri vrednosti IC_{50} , 95 % intervala zaupanja in koeficienta R^2 , rezultatov spojine **20** ne bomo upoštevali, saj lahko glede na ugotovljene podatke s precej veliko verjetnostjo zaključimo, da spojina ne deluje selektivno na TLR7 ampak neselektivno zavira rast celic.

Spojine **10**, **11** in **27** imajo prav vse izračunane vrednosti precej dobre. IC_{50} je dokaj nizek, 95 % interval zaupanja ozek in koeficient R^2 visok. Še posebej velja izpostaviti spojino **27**, katere 95 % interval zaupanja je najožji in tudi koeficient R^2 največji, kar pomeni, da se eksperimentalno dobljeni podatki zelo dobro ujemajo z izračunanimi vrednostmi. V

nasprotju s spojino 20 pa pri teh spojinah pri nobenem od prejšnjih testov in niti pri postopku določanja IC_{50} nismo opazili podobnih negativnih lastnosti.

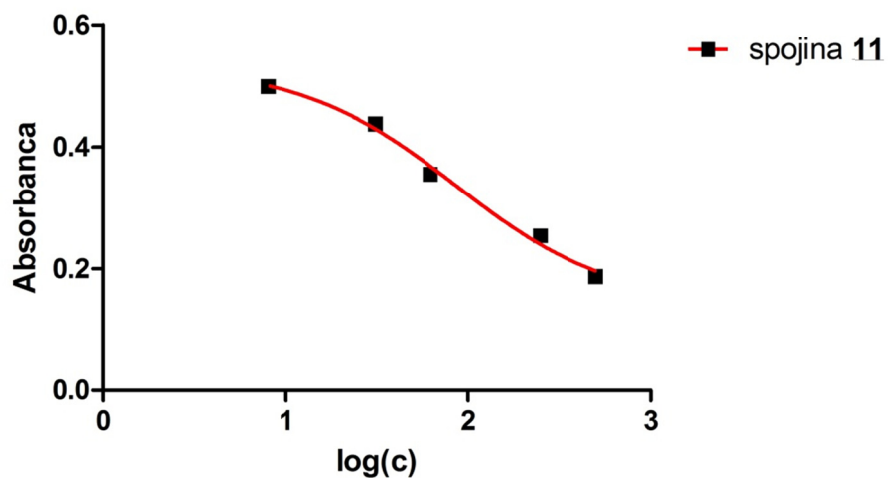
Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 10



Slika 10: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 10

Graf inhibicije odziva TLR7 pri spojini 10 ima za antagonistično delovanje značilno obliko, kjer je nakazan začetek nastanka platojev krivulje. Podatki o odzivu TLR7 so razpršeni, sploh pri nižjih koncentracijah spojine.

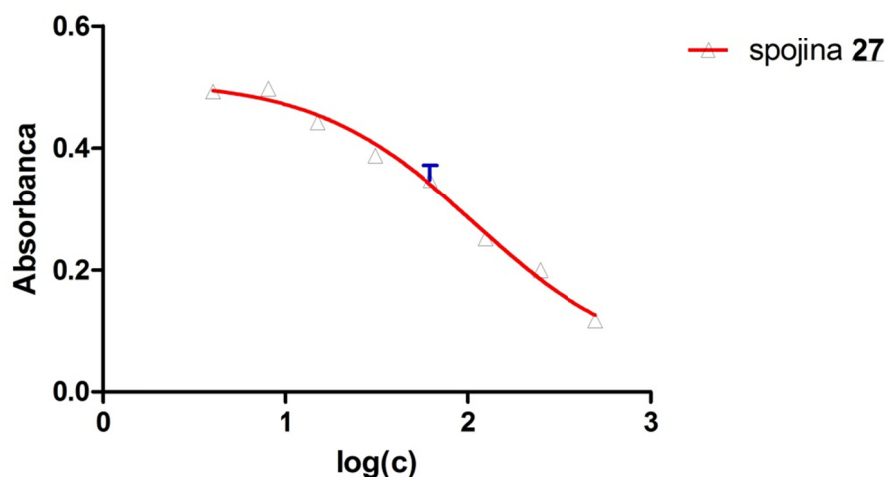
Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 11



Slika 11: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 11

Graf inhibicije odziva TLR7 pri spojini **11** ima za antagonistično delovanje značilno obliko, kjer je nakazan začetek nastanka platojev krivulje. Podatki o odzivu TLR7 niso razpršeni in izračunana funkcija se zelo dobro ujema z eksperimentalno določenimi podatki. Z grafom inhibicije odziva TLR7 lahko potrdimo zelo dobre ugotovitve glede antagonističnega delovanja spojine **11** na TLR7, ki smo jih razbrali že iz izračunanih vrednosti IC_{50} , 95 % intervala zaupanja in koeficienta R^2 .

Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini **27**



Slika 12: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini **27**

Graf inhibicije odziva TLR7 pri spojini **27** ima za antagonistično delovanje značilno obliko, kjer je nakazan začetek nastanka platojev krivulje. Podatki o odzivu TLR7 niso razpršeni in izračunana funkcija se zelo dobro ujema z eksperimentalno določenimi podatki. Z grafom inhibicije odziva TLR7 lahko potrdimo zelo dobre ugotovitve glede antagonističnega delovanja spojine **27** na TLR7, ki smo jih razbrali že iz računanih vrednosti IC_{50} , 95 % intervala zaupanja in koeficienta R^2 . Poleg tega lahko ugotovimo še, da je absolutno zmanjšanje odziva TLR7 pri spojini **27** večje, kot pri spojinama **10** in **11**.

a) Drugo določanje IC_{50}

Pri preskusu drugega določanja IC_{50} so izračunane vrednosti IC_{50} , koeficienta R^2 in 95 % intervala zaupanja predstavljene v spodnji preglednici.

Preglednica VI: Prikaz izračunane vrednosti IC₅₀, 95 % intervala zaupanja ter vrednosti koeficienta R² za podatke, dobljene pri drugem preskusu določanja IC₅₀

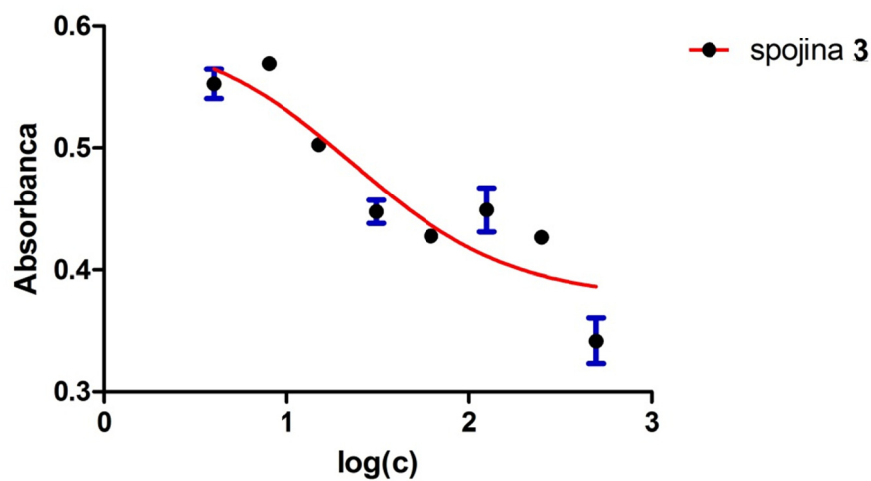
Spojina	IC ₅₀ [μmol/l]	95 % interval zaupanja [μmol/l]	R ²
<u>3</u>	23,14	5,931 - 90,29	0,8229
<u>9</u>	185,6	94,35 - 365,3	0,9584
<u>10</u>	253,1	160,5 - 399,1	0,9834
<u>11</u>	272,7	120,5 - 616,9	0,9507
<u>12</u>	684,3	330,4 - 1417	0,9851
<u>13</u>	/	/	/
<u>14</u>	1484	113,9 - 19348	0,9223
<u>20</u>	/	/	/
<u>22</u>	36,90	13,76 - 98,93	0,9396
<u>24</u>	660,4	128,8 - 3386	0,9223
<u>27</u>	110,5	65,19 - 187,5	0,9769

Pri izračunu parametrov, navedenih v zgornji preglednici, smo nekatere eksperimentalno dobljene podatke zavrgli. Zavrgli smo le tiste podatke, za katere smo določili, da so prekomerno odstopali od pričakovanih.

Tudi pri ponovitvi preskušanja antagonistične aktivnosti spojin, so se nekatere spojine precej dobro odrezale. Tokrat izstopajo spojine 3, 22 in 27, katerih IC₅₀ se giblje okoli 100 μmol/l. Spojini 10 in 11 se nista odrezali tako dobro, kot pri prvem preskušanju, medtem ko so rezultati spojine 27 zelo podobni tistim iz prvega preskušanja.

Ob upoštevanju rezultatov drugih dveh izračunanih vrednosti v preglednici lahko ugotovimo, da je vrednost koeficienta R² pri spojini 3 zelo nizka, medtem ko je pri spojinah 10, 11, 22 in 27 vrednost tega koeficienta zadosti visoka. Ponovno izstopajo spojine 10, 11 in 27, pri katerih je ta vrednost koeficienta R² višja od 0,95, kar kaže na dobro ujemanje eksperimentalno določenih podatkov z izračunano funkcijo. Podobno kot pri prvem preskušanju, imata spojini 10 in 11 precej širok 95 % interval zaupanja, kar kaže na precejšnjo razpršenost podatkov in posledično višjo standardno deviacijo. Pri spojini 27 je podatek o 95 % intervalu zaupanja podoben, kot pri prvem določanju. Zanimivo je, da je ta interval precej ozek tudi pri spojinah 3 in 22.

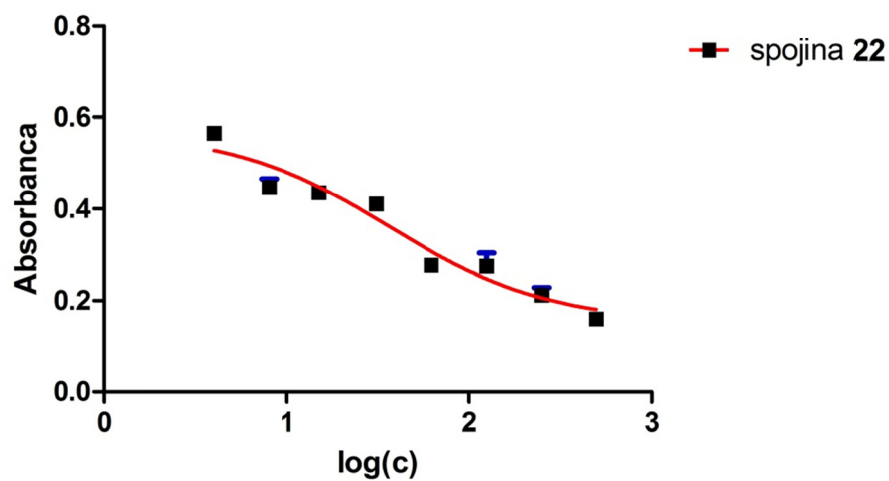
Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 3



Slika 13: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 3

Kot smo lahko razbrali že iz vrednosti koeficienta R^2 pri spojini 3, gre tukaj za precejšnje neujemanje med eksperimentalno določenimi podatki in izračunano krivuljo. Glede na podatke prvega preskušanja, kjer je prav tako bila zelo nizka stopnja ujemanja med izračunano krivuljo in eksperimentalnimi podatki se zdi, da gre v tem primeru za preprosto napačni izračun IC_{50} . Zaradi prevelike razpršenosti podatkov lahko namreč računalniški program napačno umesti krivuljo in posledično napačno izračuna IC_{50} .

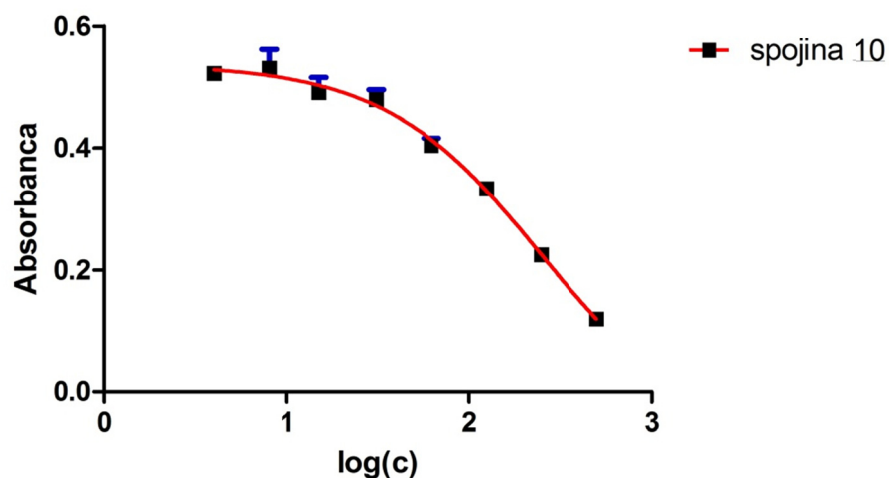
Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 22



Slika 14: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 22

Oblika krivulje na tem grafu ni enaka tisti, ki je značilna za antagonistično delovanje, saj na tem grafu ne vidimo značilnega nastanka platojev. Prav tako se glede na položaj eksperimentalno določenih podatkov na grafu zdi, da bi bila bolj kot nelinearna za te podatke ustrezna linearna regresija. Tudi tukaj, kot v primeru spojine 3, lahko glede na podatke prvega določanja IC_{50} , ter glede na obliko krivulje ocenimo, da gre v tem primeru za napačen izračun računalniškega programa.

Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 10

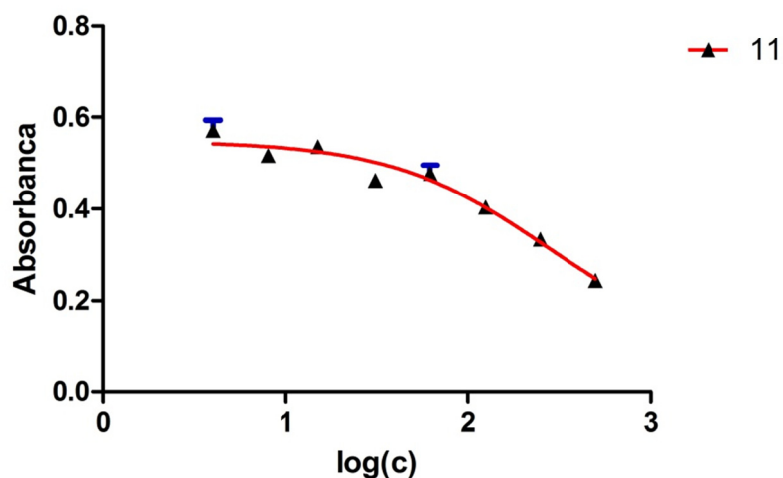


Slika 15: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 10

Glede na podatke prvega preskušanja antagonistične aktivnosti spojin, so tukaj eksperimentalno določeni podatki za spojino 10 precej manj razpršeni. Ujemanje z izračunano krivuljo je tudi zelo dobro. Graf ima lepo nakazano značilno obliko antagonistične krivulje s platoji. Glede na boljšo vrednost koeficienta R^2 ter manjšo razpršenost eksperimentalno določenih podatkov ocenjujemo, da so ti podatki zanesljivejši od tistih, določenih pri prvem preskušanju.

Kljub poslabšanju rezultata lahko glede na značilno obliko krivulje grafa ter drugih izračunanih vrednosti ugotovimo, da spojina 10 deluje antagonistično na TLR7, njen IC_{50} pa je približno 250 $\mu\text{mol/l}$.

Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini **11**

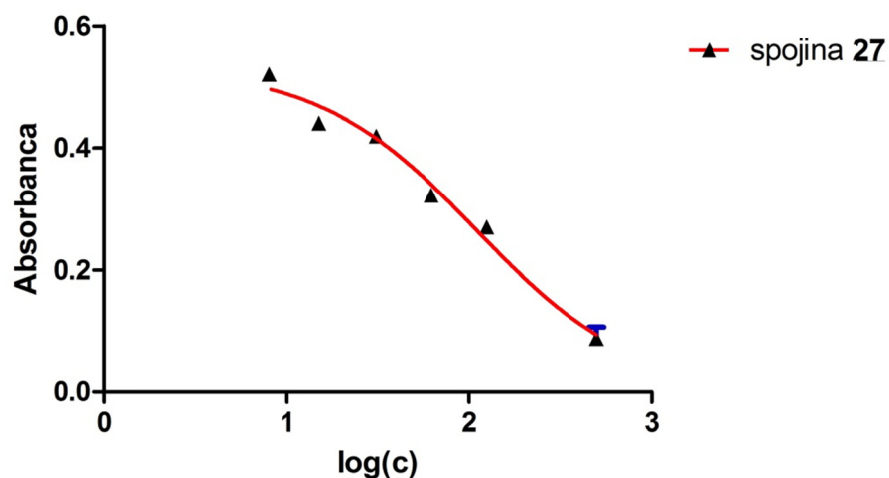


Slika 16: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini **11**

Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od koncentracije spojine **11** tokrat nima značilne oblike antagonistične krivulje. Prav tako so tukaj, v primerjavi s prvim preskušanjem, podatki precej bolj razpršeni in ni tako dobrega ujemanja eksperimentalno določenih podatkov z izračunano krivuljo.

Če upoštevamo podatke tako s prvega, kot tudi z drugega preskušanja lahko ugotovimo, da spojina **11** na TLR7 verjetno deluje antagonistično. Precej težje pa je iz dobljenih podatkov izluščiti kakšen je IC_{50} spojine **11**, saj je interval vrednosti, dobljenih pri obeh preskušanjih, zelo širok.

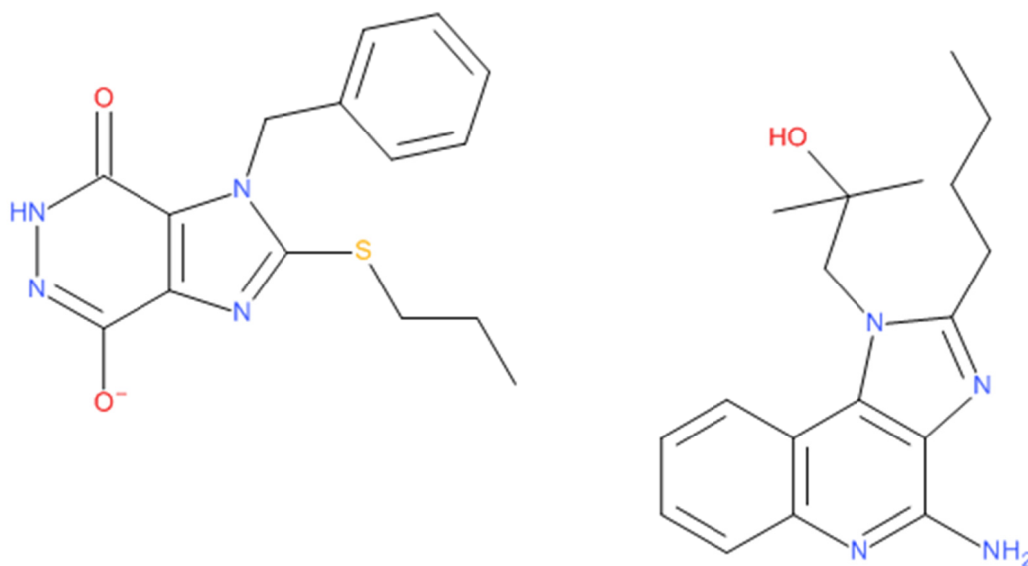
Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 27



Slika 17: Graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije pri spojini 27

Tudi v drugo ima graf inhibicije odziva TLR7 v odvisnosti od koncentracije pri spojini 27 značilno obliko antagonistične krivulje, z nakazanim nastankom platojev. Tako graf, kot tudi izračunane vrednosti IC_{50} , koeficienta R^2 ter 95 % intervala zaupanja so praktično enake tistim, ki smo jih določili pri prvem preskusu. Ponovno se je tudi izkazalo, da je absolutno zmanjšanje odziva TLR7 pri spojini 27 večje, kot pri drugih spojinah.

Zagotovo lahko trdimo, da spojina 27 deluje antagonistično na TLR7, pri čemer ima IC_{50} približno 100 $\mu\text{mol/l}$.



Slika 188: Strukturi spojine 27 (levo) in spojine 54 (desno) iz članka 32

Pri primerjavi strukture spojine 27 s strukturo spojine 54 iz članka (32) lahko opazimo veliko podobnost pri lipofilni verigi, povezani na imidazolnem obroču. Razlika je le v prisotnosti žvepla pri spojini 27. Razlika je tudi pri funkcionalni skupini, vezani na enega od dušikov imidazolnega obroča. Tu je pri spojini 27 vezana benzilna skupina, namesto 2-hidroksi-2-metilpropilske skupine pri spojini 54. Omeniti pa je treba, da so v članku (32) preverjali tudi analoge učinkovine imikvimod, z zamenjano terc-butilne skupine z benzilno skupino na imidazolnem obroču. Ugotovili so, da se s to zamenjavo funkcionalne skupine agonistično delovanje ohrani ali celo poveča. Sklepamo torej lahko, da tudi ta zamenjava ni vzrok antagonističnemu delovanju spojine 27.

V strukturi spojine 27 ni prisotne aromatske aminske skupine, za katero so Shukla, N. M. in sodelavci v članku (32) ugotovili, da je zelo pomembna za agonistično delovanje spojin na TLR7. Vendar te skupine ni prisotne niti v strukturi mnogih drugih spojin, ki smo jih preskušali in se niso tako dobro odrezale, kot spojina 27, torej je malo verjetno, da je le odsotnost te funkcionalne skupine razlog antagonističnemu delovanju te spojine.

Drugi možen razlog antagonističnega delovanja spojine 27 je v zamenjavi osnovnega skeleta spojine iz imidazokinolinskega, kot ga imata učinkovina imikvimod in spojina 54 v imidazopiridazinskega (imidazo-1,2-diazinskega) s prisotnimi karbonilnimi skupinami. Skelet spojine 27 je manjši in bolj polaren od skeleta spojine 54 in sklepamo lahko, da je

za aktivacijo TLR7 torej tudi potrebno, da ima molekula planaren in lipofilen del, ki ga pri spojini 27 zaradi zamenjave osnovnega skeleta ni.

Če predpostavka drži, potem lahko ocenimo, da bi hipotetična spojina, ki bi imela imidazopiridazinski skelet in enake funkcionalne skupine kot spojina 54 iz članka (32), zaradi večje afinitete do TLR7, delovala še močnejše antagonistično kot spojina 27.

SKLEP

V diplomski nalogi smo ugotovili, da je metoda virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda zelo učinkovita pri iskanju znani učinkovini podobnih spojin. Tekom diplomske naloge smo namreč izmed več deset milijonov spojin, ki jih najdemo v knjižnici virtualnih spojin ZINC, s pomočjo uporabe ustreznih filtrov in metod virtualnega rešetanja izbrali le 25 spojin. Od 25 naročenih smo jih prejeli 19, nadaljnjih 8 pa jih je izpadlo še zaradi nezadostne topnosti. Na celicah smo jih torej lahko preskusili le 11 in izmed teh so prav vse imele določeno afiniteto za vezavno mesto na Toll-u podobnem receptorju 7. V principu smo torej dokazali, da je metoda virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda uspešna pri nalogi, za katero je namenjena - zmanjšanju velikosti knjižnic virtualnih spojin. To seveda močno zmanjša potrebne stroške in vložen čas pri razvoju novih učinkovin.

Sicer so spojine, ki smo jih testirali, delovale antagonistično na Toll-u podobnem receptorju 7, pa čeprav smo iskalni predlogi naredili iz spojin, ki na tem receptorju delujeta agonistično. To je vendarle razumljivo, če upoštevamo dejstvo, da računalniški program ROCS, ki smo ga uporabili za virtualno rešetanje, ocenjuje podobnost med molekulama glede na njun volumen in obliko ter glede na mesto funkcionalnih skupin v molekuli. Upoštevati pa je še treba, da se agonistom Toll-u podobnega receptorja 7 agonistično delovanje močno zmanjša, če je odsotna ali zamenjana le ena funkcionalna skupina na imidazokinolinskem skeletu. To pomeni, da je iskanje agonistov s pomočjo virtualnega rešetanja, kjer poskušamo najti čim bolj strukturno različne molekule močno oteženo, saj je receptor zelo specifičen. Z metodo virtualnega rešetanja smo torej našli spojine, ki so precej podobne znanima agonistoma na Toll-u podobnem receptorju 7 in imajo zato določeno afiniteto do vezavnega mesta, vendar pa ne sprožijo odziva po vezavi na receptor. Našli smo torej spojine, ki na receptorju delujejo kompetitivno antagonistično.

Pri tem še posebej izstopa spojina **27**, katere IC_{50} je približno 100 $\mu\text{mol/l}$ in predstavlja odlično izhodišče za nadaljnji razvoj kompetitivnega antagonista na Toll-u podobnem receptorju 7. Prekomerna stimulacija tega receptorja je povezana z več avtoimunskimi bolezenskimi stanji, kar pomeni, da je razvoj antagonistov Toll-u podobnega receptorja 7 tudi medicinsko zanimiv.

LITERATURA

1. Sottriffer, C., Mannhold, R., Kubinyi, H. in Folkers, G. *Virtual Screening: Principles, Challenges, and Practical Guidelines*. Nemčija: WILEY-VCH Verlag & Co., 2011. ISBN 978-3-527-32636-5
2. Vyas, V., Jain, A., Jain, A. in Gupta, A. Virtual Screening: A Fast Tool for Drug Design. *Sci Pharm.*, 2008, št. 76, str. 333-360
3. Bielska, E., Lucas, X., Czerwoniec, A., Kasprzak, J. M., Kaminska, K. H. in Bujnicki, J. M. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications. *BioTechnologia*, 2011, Vol. 92, št. 3, str. 249-264
4. Lipinski, A. C. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, julij-avgust 2000, Vol. 44, št. 1, str. 235-249.
5. Johnson, M. A. in Maggiora, G. M. *Concepts and Applications of Molecular Similarity*. New York: John Wiley & Sons, 1990. ISBN 978-0-471-62175-1
6. Ewing, T., Baber, C. J. in Feher, M. Novel 2D fingerprints for ligand-based virtual screening. *Journal of chemical Information and Modeling*, 2006, št. 46, str. 2423-2431
7. Perola, E. in Charifson, P. S. Conformational analysis of drug-like molecules bound to proteins: an extensive study of ligand reorganization upon binding. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, Vol. 47, št. 10, str. 2449-2510
8. Renner, S., Schwab, C. H., Gasteiger, J. in Schneider, G. Impact of conformational flexibility on three-dimensional similarity searching using correlation vectors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2006, Vol. 46, št. 6, str. 2324-2332
9. *Splošne informacije o računalniškem programu ROCS, družbe OpenEye*. Dostopno prek: <http://www.eyesopen.com/rocs> (13.10.2012)
10. Navodila za izvedbo 2. vaje pri predmetu Načrtovanje in sinteza učinkovin: *Iskanje spojin v kemijskih knjižnicah na osnovi 2D in 3D podobnosti*.
11. Guyton, A. C. in Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology*. 9th. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. ISBN 7216-6773-2
12. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. in Henderson, G. *Rang and Dale's Pharmacology*. 7th. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier, 2011. ISBN 978-1-4377-1933-8

13. Ihan, A. *Dodatek: Cepiva in imunost*. Dostopno prek: http://www.imi.si/pedagoska-dejavnost/datoteke/Cepljenje_knjiga_2.pdf (22.10.2012)
14. Kaisho, T. in Akira, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, Vol. 1598, str. 1-13.
15. Lien, E. in Ingalls, R. R. Toll-like receptors. *Crit Care Med*, 2002, Vol. 30, št. 1
16. Takeda, K. in Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 2005, Vol. 17, št. 1, str. 1-14.
17. Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel E. M. in Coffman, R. L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 2007, Vol. 13, št. 5., str. 552-559.
18. Akira, S., Uematsu, S. in Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, št. 124, str. 783-801
19. Jensen, S. in Randrup Thomsen, A. Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *Journal of Virology*, 2012, str. 2900-2910
20. Iwasaki, A. in Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Natural Immunology*, 2004, št. 5, str. 987-995
21. Hayashi, F., Means, T. K. in Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 2003, št. 102, str. 2660-2669
22. Pulendran, B. in Ahmed, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, 2006, št. 124, str. 849-863
23. Trivedi, S. in Greidinger, E. L. Endosomal Toll-like receptors in autoimmunity: mechanisms for clinical diversity. *Therapy*, 2009, št. 6, str. 433-442
24. Ewald, S. E. in Barton, G. M. Nucleic acid sensing Toll-like receptors in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 2011, št. 23, str. 3-9
25. Guiducci, C., Tripodo, C., Gong, M., Sangaletti, S., Colombo, M., Coffman, R. L. in Barrat, F. J. Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, Vol. 207, št. 13, str. 2931-2942
26. Hundeshagen, A., Hecker, M., Paap, B. K., Angerstein, C., Kandulski, O., Fatum, C., Hartmann, C., Koczan, D., Thiesen, H.-J. in Zettl, U. K. Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *Journal of Neuroinflammation*, 2012, št. 9, str. 140

27. Alzabin, S., Kong, P., Medghalchi, M., Palfreeman, A., Williams, R. in Sacre, S. Investigation of the role of endosomal Toll-like receptors in murine collagen-induced arthritis reveals a potential role for TLR7 in disease maintenance. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, št. 14, str. 142
28. Kielian, T. *Toll-like Receptors: Roles in Infection and Neuropathology*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-3-642-00548-0
29. Joyce, E., Knight, A. K., Radigan, L., Marron, T. U., Zhang, L., Sanchez-Ramon, S. in Cunningham-Rundles, C. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009. št. 124, str. 349-356
30. Caetano, B. C., Carmo, B. B., Melo, M. B., Cerny, A., dos Santos, S. L., Bartholomeu, D. C., Golenbock, D. T. in Gazzinelli, R. T. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for Toll-Like Receptor 7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 2011, št. 187, str. 1903-1911
31. Podatki o zdravilu Aldara[®], ki vsebuje učinkovino imikvimod, na internetni strani Evropske agencije za zdravila (EMA). Dostopno prek: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000179/human_med_000635.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (26.09.2012)
32. Shukla, N. M., Malladi, S. S., Mutz, C. A., Balakrishna, R. in David, S. A. Structure-Activity Relationships in Human Toll-Like Receptor 7-Active Imidazoquinoline Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, št. 53, str. 4450-4465.
33. Splošne informacije o kodi SMILES. Dostopno prek: <http://www.epa.gov/ncct/dsstox/MoreonSMILES.html> (05.10.2012)
34. Internetni program za generiranje SMILES kode iz strukture. Dostopno prek: <http://www.molsoft.com/2dto3d.html> (08.10.2012)
35. Informacije o računalniškem programu Omega, družbe OpenEye. Dostopno prek: <http://www.eyesopen.com/omega> (05.10.2012)
36. Internetna knjižnica spojin, ki so na voljo komercialno ZINC. Dostopno prek: <http://zinc.docking.org/> (05.10.2012)
37. Razlaga parametrov za uporabo v računalniškem programu ROCS, družbe OpenEye. Dostopno prek: <http://www.eyesopen.com/docs/rocs/current/html/usage.html#input-file-preparation> (13.10.2012)

38. *Technical Data Sheet za celično linijo HEK-Blue™ hTLR7 družbe InvivoGen.* Dostopno prek: http://www.invivogen.com/PDF/HEK-Blue-hTLR7_TDS.pdf (12.09.2012)
39. *Osnovne informacije o uporabi in pridelavi FBS, družbe Biological Industries.* Dostopno prek: http://www.bioind.com/media/uploads/serum_info.pdf (30.09.2012)
40. *Primer mreže, natisnjene na Bürker-Türk-ovem citometru.* Dostopno prek: http://www.casatorrecilla.com/index_port.php?plink=aDshdGsU2H22mqljHCemir nP7TV08Kr2/ (17.09.2012)
41. *Priročnik o vrednotenju apoptoze, citotoksičnosti in celične proliferacije družbe Roche.* Dostopno prek: https://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/Apoptosis_Cytotox_Cel Prol_4th_edition.pdf
42. *Technical Data Sheet za encimski kolorimetrični test QUANTI-Blue™ družbe InvivoGen.* Dostopno prek: http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI-Blue_TDS.pdf (12.09.2012)
43. *Technical Data Sheet za učinkovino imikvimod družbe InvivoGen.* Dostopno prek: http://www.invivogen.com/PDF/Imiquimod_TDS.pdf (26.09.2012)
44. *Navodila za uporabo in pomoč pri uporabi računalniškega programa GraphPad Prism® 5.00.* Dostopno prek: http://graphpad.com/guides/prism/5/user-guide/prism5help.html?using_tour_overview.htm (26.09.2012)
45. *Razlaga cenilnih funkcij v računalniškem programu ROCS, družbe OpenEye.* Dostopno prek: http://www.eyesopen.com/docs/rocs/current/html/shape_theory.html#theory (13.10.2012)
46. Srinivas Reddy, A., Priyadarshini Pati, S., Praveen Kumar, P., Pradeep, H. N. in Narahari Sastry, G. Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective. *Current Protein and Peptide Science*, 2007, št. 8, str. 329-351
47. Eckert, H. in Bajorath, J. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug Discovery Today*, 2007, Vol. 12, št. 5/6, str. 225-232
48. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. in Akira, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 2002, Vol. 3, št. 2, str. 196-200

49. Takeda, K. in Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 2005, Vol. 17, št. 1, str. 1-14
50. Lan, T., Dai, M., Wang, D., Zhu, F. G., Kandimalla, E. R. in Agrawal, S. Toll-like Receptor 7 Selective Synthetic Oligoribonucleotide Agonists: Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, št. 52, str. 6871-6879
51. Kawai, T. in Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 2009, Vol. 21, št. 4, str. 317-337
52. Kaufman, E. H., Fryer, A. D. in Jacoby, D. B. Toll-like receptor 7 agonists are potent and rapid bronchodilators in guinea pigs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011, Vol. 127, št. 2, str. 462-469
53. Lenert, P. S. Classification, Mechanisms of Action, and Therapeutic Applications of Inhibitory Oligonucleotides for Toll-Like Receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators of Inflammation*, 2010, Vol. 2010, Article ID 986596, 10 str.
54. Horton, C. G., Pan, Z. in Darise Farris, A. Targeting Toll-Like Receptors for Treatment of SLE. *Mediators of Inflammation*, 2010, Vol. 2010, Article ID 498980, 9 str
55. Kearsley, S. K., Underwood, D. J., Sheridan, R. P. in Miller, M. D. Flexibases: a way to enhance the use of molecular docking methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1994, št. 8, str. 565-582
56. Jorgensen, W. L. Efficient drug lead discovery and optimization. *Accounts of Chemical Research*, 2009, št. 42, str. 724-733
57. Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J. in Corbeil, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*, 2008, št. 152, str. 7-26
58. Ferrara, P., Gohlke, H., Price, D. J., Klebe, G. in Brooks, C. L. Assessing scoring functions for protein-ligand interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, št. 47, str. 3032-3047
59. Leach, A. R., Shoichet, B. K. in Peishoff, C. E. Prediction of Protein-Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, Vol. 49, št. 20, str. 5851-5855