

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



MATEJ JANEŽIČ

***IN SILICO* NAČRTOVANJE IN OVREDNOTENJE 1H-INDAZOLNIH
ZAVIRALCEV ČLOVEŠKE TOPOIZOMERAZE II α**

MAGISTRSKA NALOGA

EMŠ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



MATEJ JANEŽIČ

***IN SILICO* NAČRTOVANJE IN OVREDNOTENJE 1*H*-INDAZOLNIH
ZAVIRALCEV ČLOVEŠKE TOPOIZOMERAZE II α**

***IN SILICO* DESIGN AND EVALUATION OF 1*H*-INDAZOLE INHIBITORS OF
THE HUMAN TOPOISOMERASE II α**

EMŠ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in Kemikalnem inštitutu, Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha, mag. farm.

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.

Meritve masne spektroskopije (HRMS) je opravil dr. Dušan Žigon na Inštitutu Jožef Štefan, Ljubljana.

Test spodbujanja cepitve in test ATPazne aktivnosti človeške topoizomeraze II α smo opravili v sodelovanju s podjetjem Inspiralis d.d., Norwich, Velika Britanija.

MTT test citotoksičnosti so izvedli v sodelovanju z raziskovalno skupino prof. dr. Žanete Nikolovske Čoleske, na University of Michigan, Ann Arbor. ZDA.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki so mi pomagali pri izvedbi magistrske naloge. Posebej bi izpostavil sodelavko Barbaro Pogorelčnik, ki je bila nepogrešljiva podpora v eksperimentalnih in strokovnih vsebinah, ter somentorja Andreja Perdiha, ki je natančno spremjal celoten potek in ponudil prenekateri nasvet.

Raziskave predstavljene v tem delu so bile izvedene v okviru laboratorija L01 za računalniške bioznanosti in bioinformatiko na Kemikalnem Inštitutu v Ljubljani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha, mag. farm.

Matej Janežič

Vsebina

Povzetek	1
Abstract	3
Seznam Krajšav.....	5
1. Uvod.....	6
1.1. Delitev in vloga topoizomeraz	6
1.2. Struktura topoizomeraze II α	9
1.1.1. Vezavno mesto za ATP na tpII α ATPazni domeni	10
1.3. Mehanizem delovanja DNA Topoizomeraze II α	12
1.4. Izbrani predstavniki zaviralcev človeške topoizomeraze II α	13
1.4.1. Topoizomerazni strupi.....	13
1.4.2. Katalitični zaviralcji človeške topoizomeraze II α	15
2. Namens dela.....	16
3. Materiali in metode	18
3.1. Računalniška kemija in načrtovanje zdravilnih učinkovin.....	18
3.1.1. Farmakoforno modeliranje in virtualno rešetanje z uporabo farmakofornega modela	20
3.1.1.1. Uporabljen postopek farmakoformega modeliranja in virtualnega rešetanja	21
3.1.2. Iskanje komercialno dostopnih analogov	22
3.1.3. Molekulske sidranje (molecular docking).....	22
3.1.3.1. Uporabljen postopek molekulskega sidranja.....	24
3.1.4. Molekulska dinamika (MD) in molekulske simulacije	24
3.1.4.1. Opis simulacije molekulske dinamike (MD) aktivnega liganda 19	25
3.2. Biološki testi – eksperimentalni del	27
3.2.1. <i>In vitro</i> test tpII α relaksacijske encimske aktivnosti na ploščici (Human Topo II α Relaxation Plate Assay)	27
3.2.1.1. Izvedba testa topoII α relaksacijske encimske aktivnosti.....	29
3.2.2. Test spodbujanja cepitve (human topoisomerase II α -mediated cleavage assay)	29
3.2.3. Test ATPazne aktivnosti (ATPase assay)	31
3.2.4. Študij vezave z mikrotermoforezo (Microscale thermophoresis, MST)	32
3.2.5. Test citotoksičnosti (MTT test)	34
4. Rezultati in razprava.....	35
4.1. Izgradnja farmakofornega modela na osnovi znanih ligandov in virtualno rešetanje	35

4.2. Eksperimentalno ovrednotenje zaviralne aktivnosti spojin iz $1H$ indazolnega razreda in iskanje analogov	38
4.3. Ovrednotenje zaviralnega učinka izbranih analogov $1H$ -indazolov na DNA topoizomerazi II α	41
4.4. Biofizikalna karakterizacija najobetavnejših spojin $1H$ -indazolnega razreda.....	45
4.4.1. Eksperimenti vezave na ATPazno domeno z Mikrotermoforezo (MicroScaleThermophoresis - MST)	45
4.4.2. Test spodbujanja cepitve – Cleavage assay.....	47
4.4.3. Test zaviranja ATPazne aktivnosti $1H$ -indazolov	48
4.4.4. Citotoksičnost spojin $1H$ -indazolnega razreda	49
4.4.5. Ovrednotenje sidrane vezavne poze $1H$ -indazola 19 z metodo klasične molekulske dinamike (MD).....	50
5. Sklep	53
6. Literatura	55
7. Dodatek	58
7.1. HRMS Masni spektri za izbrane spojine	58
7.2. Atomski tipi in delni naboji za spojino 19.....	66

Povzetek

Človeška DNA topoizomeraza II α je del družine topoizomeraz; skupine encimov, ki so sposobni spremenjati topologijo DNA molekule. Topoizomeraza II α je nujna za nemoteno celično delitev, saj sodeluje pri sproščanju in razpletanju DNA med procesom prepisovanja in podvojevanja. Zaradi specifičnega izražanja (višje koncentracije v hitro delečih se celicah in celicah v fazi delitve) je primerna in validirana tarča za protirakave učinkovine. Zapleten katalitični cikel omogoča številne pristope k inhibiciji in na voljo je že precej zdravil z različnimi mehanizmi delovanja. Žal so jim še vedno skupni nekateri resni neželeni učinki, ki so navadno povezani s protirakovimi zdravili (npr. kardiotoksičnost). To je še posebej problematično v skupini t.i. topoizomeraznih strupov, prvih klinično uporabljenih zavircih človeške topoizomeraze II α . Zato smo se v tem delu osredotočili na iskanje katalitičnih inhibitorjev, nove, obetavne skupine učinkovin, ki delujejo v drugih delih katalitičnega cikla; v našem primeru interagirajo z vezavnim mestom za ATP na ATPazni domeni topo II α .

Osnova naših raziskav je bilo računalniško podprtlo načrtovanje novih zaviralcev topoizomeraze II α z vezavo v vezavnem mestu za ATP. V prvi fazi našega dvostopenjskega načrtovanja smo z virtualnim rešetanjem z uporabo farmakofornega modela postavljenega na osnovi znanih aktivnih ligandov preiskali interna knjižnico spojin Kemijskega inštituta. Izbrane molekule smo nato biološko ovrednotili z validiranim *in vitro* testom relaksacijske encimske aktivnosti in identificirali nov razred zaviralcev topoII α , ki je vseboval 1*H*-indazolni fragment z aktivnostjo v nizkem mikromolarnem območju.

V drugi fazi načrtovanja smo sestavili ciljano knjižnico komercialno dostopnih analogov aktivnih spojin s 1*H*-indazolnim fragmentom iz prve faze in jih sidrali v vezavno mesto za ATP. S pomočjo zbranih podatkov in uporabo omejitvenih kriterijev smo izločili večino analogov, preostale izbrane spojine pa smo ovrednotili v *in vitro* testu relaksacijske encimske aktivnosti in pridobili prve podatke o odnosu med strukturo in delovanjem tega strukturnega razreda. Najboljši zavirali so izkazali boljšo *in vitro* zaviralno aktivnost kot klinično uveljavljena učinkovina etopozid. Z mikrotermoforezo smo opravili vezavne

študije nekaterih aktivnih spojin in potrdili vezavo na ATPazno domeno. Opravili smo tudi testa ATPazne aktivnosti in (kompetitivni) test spodbujanja cepitve DNA s katerimi smo potrdili, da so naše spojine katalitični inhibitorji tpII α in da je naš predpostavljeni mehanizem verjeten. Predpostavljeni vezavni model aktivnih spojin na ATPazno domeno smo natančneje ovrednotili s 30 ns simulacijo klasične molekulske dinamike za aktivno spojino **19** in ugotovili pomembnost aminokislinskega preostanka Asn120 za uspešno medmolekulske prepoznavanje. Naši rezultati tako predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in razvoj katalitičnih zaviralcev tpII α .

Ključne besede: topoizomeraza II α , računalniško podprto načrtovanje učinkovin

Abstract

The human DNA topoisomerase II α is part of the family of topoisomerases, a group of enzymes that are able to induce topological changes in the DNA. It is essential for cell proliferation as it helps to relax and decatenate DNA during the transcription and replication process. Due to the nature of its expression (increased concentrations in rapidly proliferating cells and dividing cells) it is a viable and validated target for anti-cancer research. The complex catalytic cycle of the human topoisomerase II α allows for many different inhibition steps and there are several drugs targeting this enzyme with differing modes of action already on the market. Unfortunately, they still share the severe side effects that are typically present in treatments with anticancer medication. This is especially problematic for the group known as topoisomerase poisons, which were the first clinically used human DNA topoisomerase II α inhibitors. Thus, we focused our research on the discovery of human DNA topoisomerase II α catalytic inhibitors, specifically those that bind to the ATP binding site, as a promising new group of inhibitors.

The basis of our research was computer-aided drug design in order to discover novel inhibitors that bind to the ATP binding site. We devised a two stage virtual screening campaign. In the first phase we screened our internal library using a ligand based pharmacophore that was based on our previously discovered active compounds. We then assayed the obtain hits using a validated assay for determining human DNA topoisomerase II α relaxation activity and identified a novel class of 1*H*-indazole inhibitors with IC₅₀ values in the lower micromolar range.

In the second phase we compiled a focused library of commercially available analogues of the active compounds from the first phase and docked them into the htII α ATP binding site. By using the obtained *in silico* data we greatly reduced the number of analogues and assayed them as before, thus expanding our structure activity relationship data with several new active compounds. Our most potent inhibitors exhibited lower IC₅₀ values when compared to the clinically established drug etoposide. The MicroScale Thermophoresis method was used to confirm their binding to the ATPase domain. With cleavage, competitive cleavage and ATPase activity assays we were able to further elucidate the mechanism of action; we proved that our compounds are catalytic inhibitors and the test

results support our proposed mechanism of action used in the design steps. Furthermore, we performed a 30ns long molecular dynamics simulations for compound **19** to evaluate our proposed binding mode in the ATP binding site and identified Asn120 as a key residue for binding. Our results represent a promising starting point for future development and improvement of human DNA topoisomerase II α catalytic inhibitors.

Key Words; topoisomerase II α , computer aided drug design

Seznam Krajšav

LBDD - načrtovanje na osnovi ligandov (ligand-based drug design)

LS – Ligand Scout

MD – molekulska dinamika

MST – mikrotermoforeza (Microscale thermophoresis)

PES - površina potencialne energije (Potential Energy Surface)

RMSD - standardna deviacija izbranih atomskih razdalj med različnimi pari ekivalentnih atomov (Root-Mean-Square deviation)

SAR - informacije o povezavi med strukturo in delovanjem (structure activity relationship)

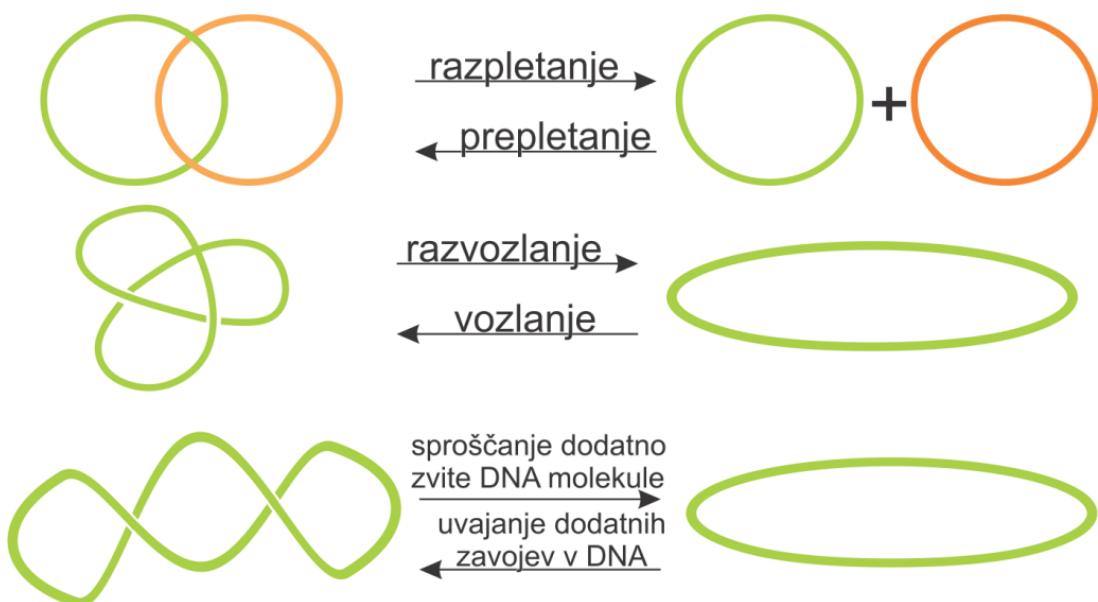
SBDD - načrtovanje na osnovi strukture tarče (structure-based drug design)

tpII α – človeška DNA topoizomeraza II α

1. Uvod

1.1. Delitev in vloga topoizomeraz

Topoizomeraze so skupina encimov, ki v DNA uvajajo topološke spremembe; sposobne so prepletanja/razpletanja (catenation/decatenation), vozlanja/razvozlanja (knotting/unknotting) in sproščanja dodatno zvite molekule DNA. Slika 1 shematsko prikazuje te procese. Bakterijska giraza je edinstvena v tem, da lahko uvaja negativne zavoje [1], medtem ko je reverzna giraza edina predstavnica, ki lahko uvaja pozitivne zavoje [2].



Slika 1. Ponazoritev topoloških sprememb, ki so jih topoizomeraze sposobne katalizirati. Pritejeno po referenci [1].

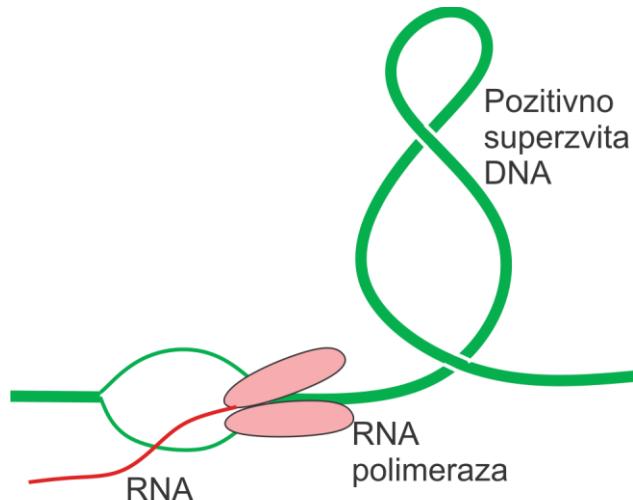
Na splošno razdelimo topoizomeraze na 2 veliki skupi; tip I in tip II. Prve cepljo le eno verigo dvovijačne DNA in za delovanje ne potrebujejo ATP, druge pa cepljo obe verigi dvovijačne DNA in so odvisne od ATP. Nadalje so ti encimi razdeljeni še v več podskupin, odvisno od podrobnejšega mehanizma katalize, razlik v aminokislinskem zaporedju in organizma iz katerega so bile izolirane (glej preglednico I).

Preglednica I. Znane topoizomeraze (povzeto in pripojeno po referenci [3]).

Skupina in podskupina	Ime topoizomeraze	Izolirano iz:
IA	Bakterijska DNA topoizomeraza I	<i>Escherichia coli</i>
	Bakterijska DNA topoizomeraza III	<i>Escherichia coli</i>
	Kvasna DNA topoizomeraza III	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Človeška DNA topoizomeraza III α	<i>Homo sapiens</i>
	Človeška DNA topoizomeraza III β	<i>Homo sapiens</i>
	Bakterijska in arhejska reverzna DNA giraza	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
	Bakterijska reverzna DNA giraza	<i>Methanopyrus kandleri</i>
IB	Evkarijantska DNA topoizomeraza I	<i>Homo sapiens</i>
	Poksivirus topoizomeraza	<i>Vaccinia</i>
	Bakterijska DNA topoizomeraza V	<i>Methanopyrus kandleri</i>
IC	Arhejska DNA topoizomeraza V	<i>Methanopyrus kandleri</i>
IIA	Bakterijska DNA giraza	<i>Escherichia coli</i>
	Bakterijska DNA topoizomeraza IV	<i>Escherichia coli</i>
	Kvasna DNA topoizomeraza II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Človeška DNA topoizomeraza II α	<i>Homo sapiens</i>
	Človeška DNA topoizomeraza II β	<i>Homo sapiens</i>
IIB	Arhejska DNA topoizomeraza VI	<i>Sulfolobus shibatae</i>
	Rastlinska DNA topoizomeraza VI	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Topoizomeraze so nujne za nemoteno prepisovanje in podvojevanje DNA saj se pri teh procesih DNA pred replikacijskimi vilicami začne pozitivno zvijati. Če je topoizomeraze ne bi sproti sproščale, bi se v DNA nabralo toliko napetosti, da bi se proces ustavil (slika 2).

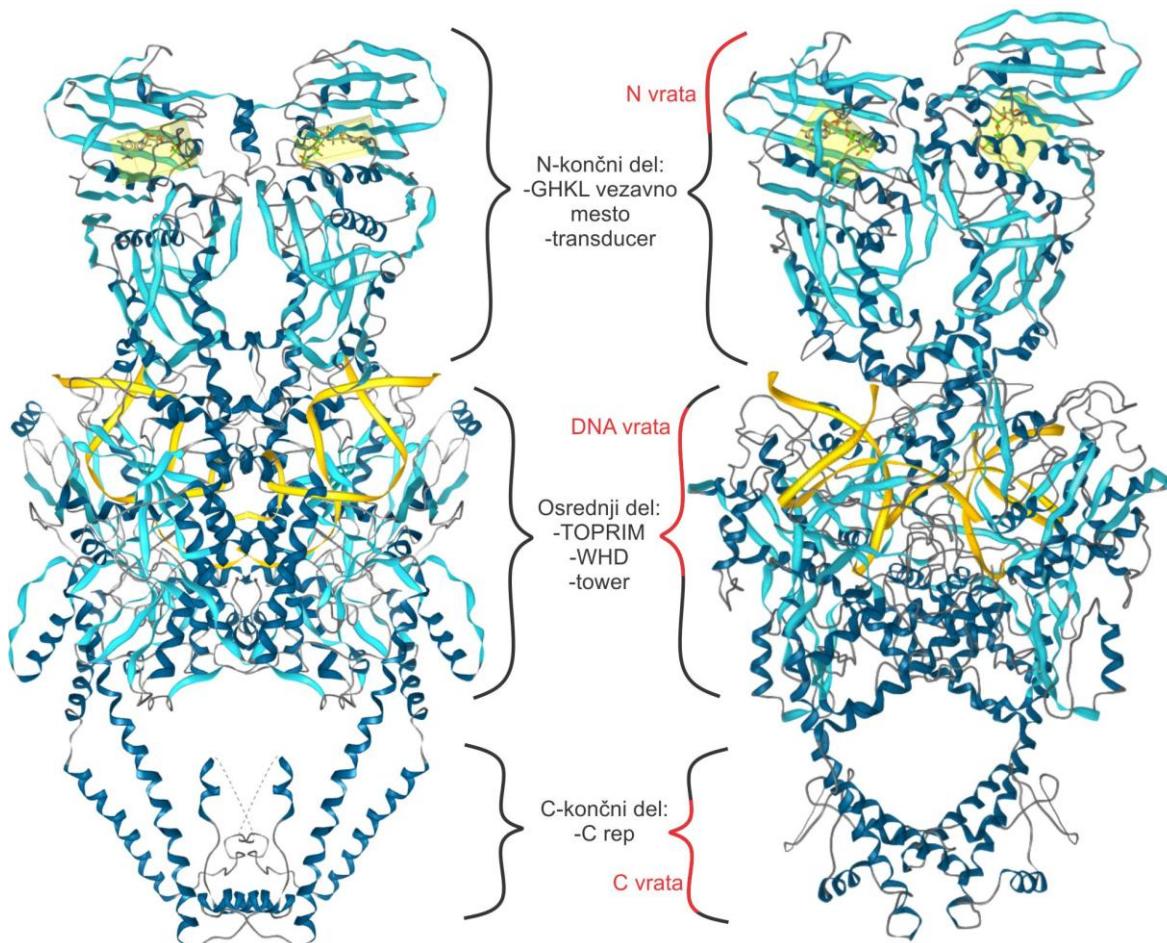
Pri človeku se najdemo 2 izobliko topozomeraze tipa II; α in β . α izoblika (tpII α) je bolj izražena v hitro delečih se celicah in ima večjo vlogo pri podvojevanju DNA, β izoblika pa je prisotna bolj sistemsko in igra večjo vlogo pri prepisovanju DNA [1]. Mehanizem delovanja je enak; cepitev molekule DNA preko tvorbe prehodnega kovalentnega kompleksa in iztis ene verige molekule DNA skozi prehodno odprtino [4].



Slika 2. Vloga tpII α med prepisovanjem in podvojevanjem DNA. Ob razvijanju DNA se še neprebrana DNA začne pozitivno super zvijati. Brez tpII bi napetost toliko narasla, da bi se proces na silo vstavil (prirejeno po referenci [5]).

1.2. Struktura topoizomeraze II α

Kristalna struktura človeškega encima v enem kosu še ne obstaja, so pa uspeli kristalizirati posamezne dele, kar nam skupaj s homologi ostalih topoizomeraz tipa II omogoča predstavo 3D strukture celotnega encima. Encim je homodimer in ga v grobem razdelimo na 3 dele, ki vsebujejo več funkcionalnih enot (slika 3).



Slika 3. Struktura človeške (levo) in kvasne (desno) topoizomeraze tipa II. TpII α je prikazana s kombinacijo dveh javno dostopnih kristalnih struktur; N-končni del (pdb 1ZXM) ter osrednji in-C končni del (pdb 4FM9). Kvasna je predstavljena s celovitim modelom (pdb 4GFH). Na sliki so označeni posamezni deli in funkcionalne podenote; N-končni, osrednji in - končni del. Označena so tudi t.i. vrata.

N-končni del (ATPazna domena) sestoji iz vezavnega mesta za ATP, ki sodi pod GHKL skupino encimov (giraza, Hsp90, histidin-kinaza in MutL protein) in t.i. transducer domene. Slednja je pomembna za vezavo ATP in prenos signala ob hidrolizi ter vezavi ATP, z drugimi besedami, sodeluje pri dinamičnem obnašanju N-končnega dela[6].

V osrednjem delu, ki je homologen z bakterijsko girazo, se nahajajo podenote TOPRIM (**Topoisomerase/Primase**), WHD (**winged helix domain**) in tower. TOPRIM podenota je pomembna za vezavo magnezijevega iona. WHD podenota vsebuje katalitični tirozin in skupaj s TOPRIM igra pomembno vlogo pri cepitvi in religaciji molekule DNA. Sorodna je proteinskim aktivatorjem katabolitov (Carbolite Activation Protein, CAP) pri *E. Coli*. Tower podenota pomaga pri vezavi DNA [7].

C-končni del vsebuje C-rep, ki tvori t.i. C vrata in se odpira in zapira v skladu s cepljenjem in vezavo DNA na encim. Točna vloga še ni znana, a domneva se da naj bi sodeloval pri fosforilaciji in igrал pomembno vlogo pri stabilnosti kompleksa DNA-encim [8].

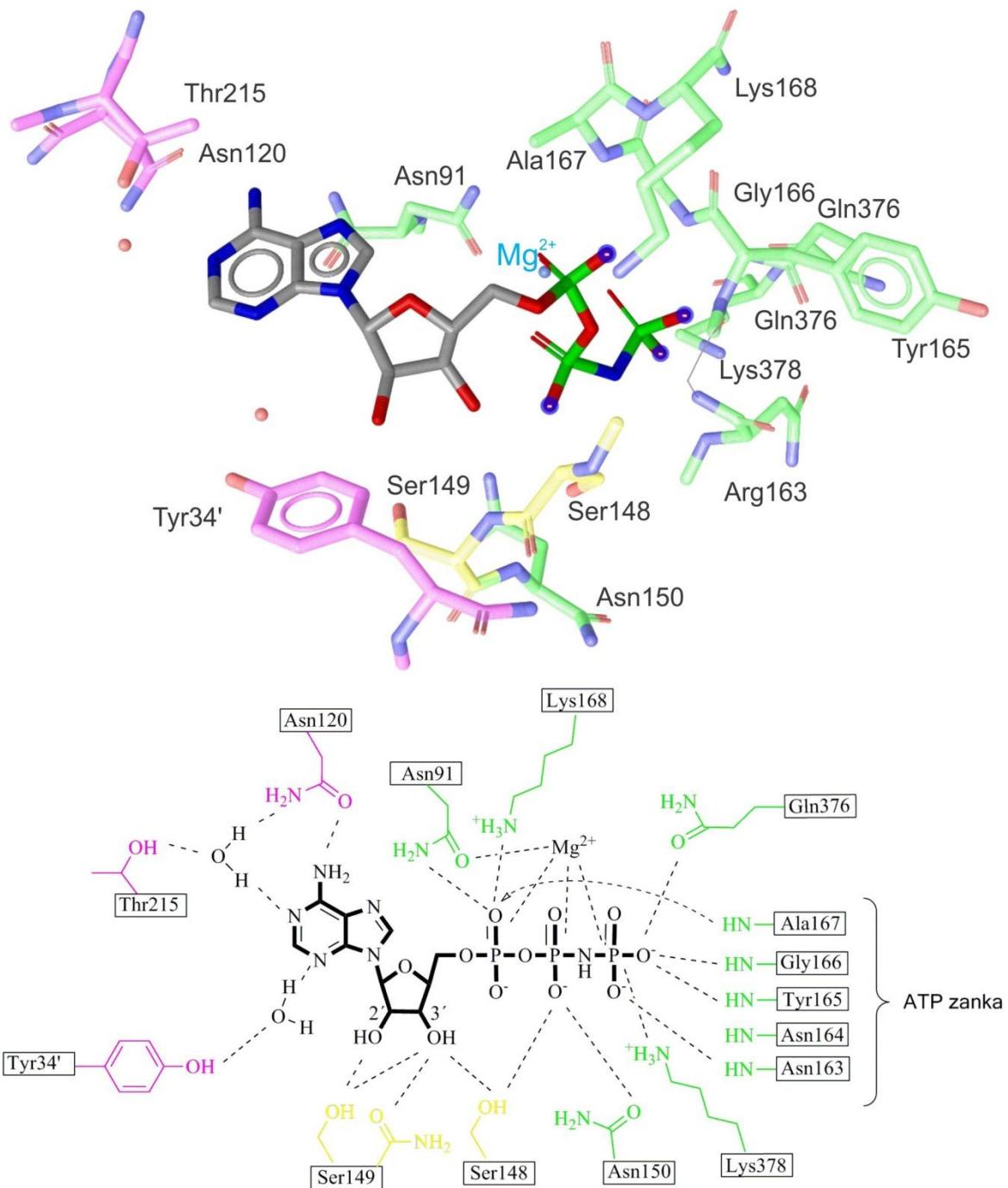
Topoizomerazo lahko razdelimo tudi na 3 funkcionalne enote, t.i. vrata. To so deli proteina, ki se tekom katalitičnega cikla razpirajo in zapirajo, da "ujamejo" molekule DNA in jih potisnejo skozi začasni precep v verigi.(slika 5) [7].

1.1.1. Vezavno mesto za ATP na tpII α ATPazni domeni

Tarča naših raziskav je bilo vezavno mesto za ATP, zato si ga velja pogledati malo bolj podrobno (slika 4). Sledče so interakcije, ki jih je program Ligand Scout (LS) [9] zaznal pri tvorbi farmakofora za nativni ligand (adenozin 5'-(β,γ -imido)trifosfat, AMP-PNP) v dostopni kristalni strukturi pdb 1ZXM.

Adenozinski obroč tvori direktno vodikovo vez z Asn120 in indirektne, preko vod (W924, W933), z Asn120, Thr215 in Tyr34'. Sladkorni del interagira z aminokislinsama Ser148 in Ser149. Fosfatni del, ki tvori največ interakcij, pa direktno interagira z Asn91, Asn150, Gln376, Lys 378 in t.i. ATP zanko (Asn163-Lys167). Vsi trije fosfati tvorijo tudi koordinacijsko vez z magnezijevim ionom. Magnezijev ion interagira tudi s karbonilno skupino Asn91.

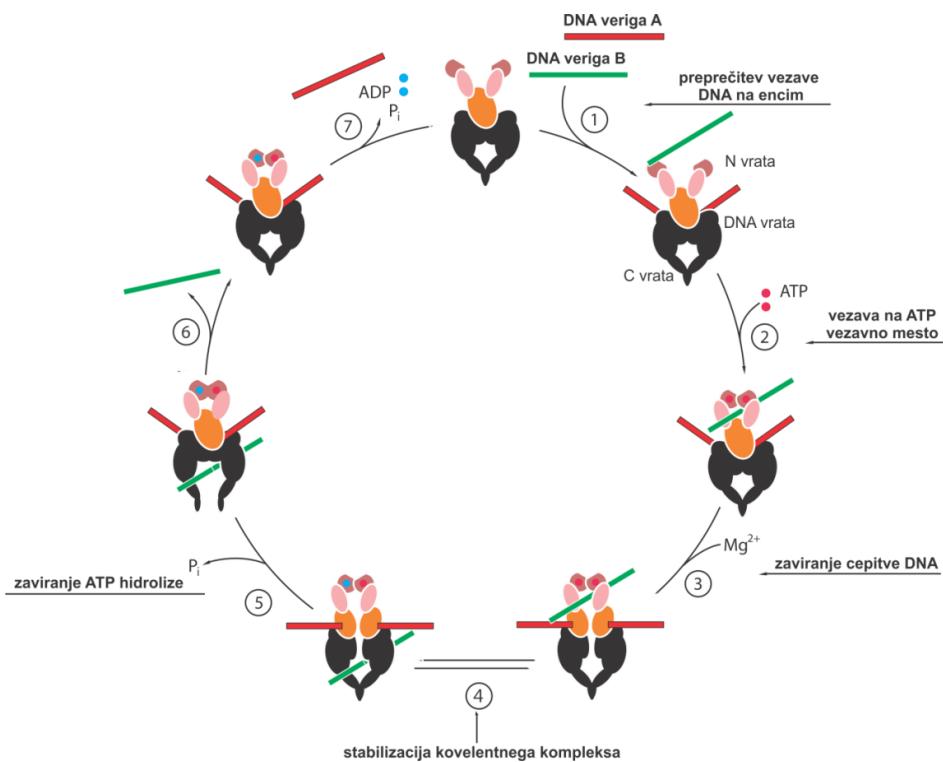
Mutacijske študije (Gly164 v izolevcin) so pokazale, da za katalizo procesa zadošča zgolj eno nepoškodovano vezavno mesto, a v tem primeru je aktivnost encima manjša; pride to težav pri prenosu informacij iz N-končnega v osrednji del [10].



Slika 4. Podrobnejši prikaz vezavnega mesta za ATP v človeški tpII α (pdb 1ZXM, veriga A). 3D prikaz (zgoraj), 2D shema interakcij (spodaj). Amino kisline (AK) so obarvane glede na to s katerim delom AMP-PNP interagirajo; vijolična za obroč, rumena za sladkorni del in zelena za fosfatni del. Črtkane črte predstavljajo H-vezi ozziroma koordinacijske v primeru magnezijevega iona.

1.3. Mehanizem delovanja DNA Topoizomeraze II α

Katalitični cikel človeške topoizomeraze II α (tpII α) je zapleten, večstopenjski proces pri katerem ena veriga dvovijačne DNA preide čez drugo preko cepitve fosfodiestrskih vezi in nadzorovane asociacije ter disociacije podenot tpII α . Na sliki 5 je prikazana shema katalitičnega cikla [11].

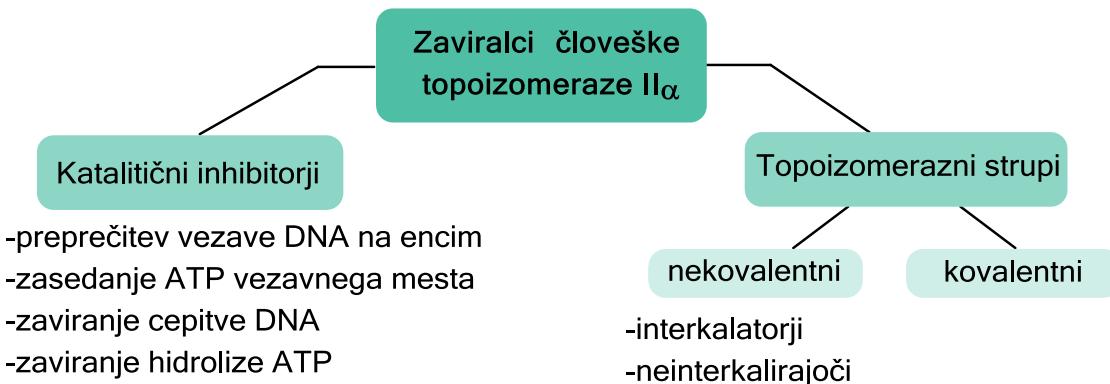


Slika 5. Shema mehanizma tpII α z označenimi koraki v katerih delujejo znani inhibitorji. Pirejeno po [11].

V prvem koraku se ena dvovijačna molekula DNA (odsek A, fragment) veže na tpII α . V drugem koraku se dve molekuli ATP vezeta na ATPazno domeno (N vrata), kar povzroči dimerizacijo le-te in ujetje druge dvovijačne molekule DNA (odsek B, fragment). V tretjem koraku pride do cepitve obeh verig odseka A; tirozinska ostanka v WHD delu tpII α nukleofilno napadeta 5' in 3' fosfatni skupini in tvorita fosfotirozinski vezi. Mg $^{2+}$ sodeluje kot kofaktor. V četrtem koraku se ena molekula ATP hidrolizira in stimulira prehod odseka B skozi ravnokar nastalo odprtino v odseku A. V petem koraku pride do religacije odseka A in C vrata se odprejo. V šestem koraku se odsek B sprosti in C vrata se zaprejo. V sedmem koraku pride do hidrolize preostale molekule ATP, sprostitev obeh molekul ADP ter odseka A in odprtja N vrat. S tem se proces zaključi in encim je pripravljen na nov cikel [10-12].

1.4. Izbrani predstavniki zaviralcev človeške topoizomeraze II α

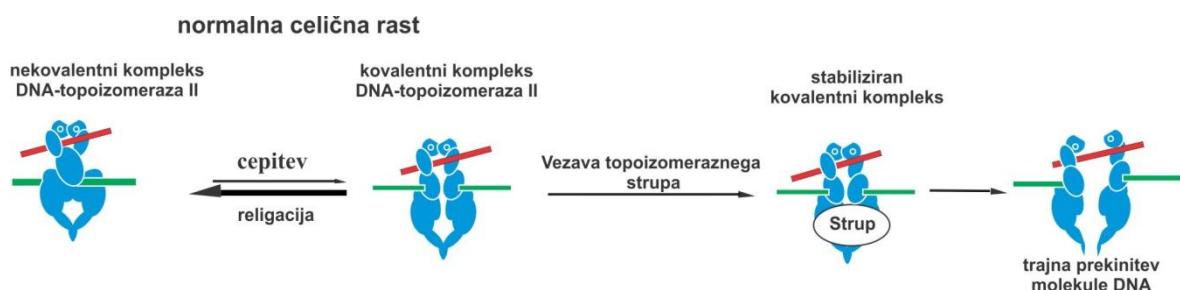
TpII α je že dolgo znan in preučevan encim in je kot tak tarča širokega spekta zdravilnih učinkovin. Zaviralce v grobem razdelimo na t.i. topoizomerazne strupe in katalične inhibitorje [13].



Slika 6. Ena izmed možnih razdelitev učinkovin, ki ciljajo na človeško tpII α . Prirejeno po [14].

1.4.1. Topoizomerazni strupi

V normalnih razmerah je kovalentni kompleks med DNA verigo in encimom, ki je nujen za cepitev, kratkoživ in prisotnost komajda zaznavna. Topoizomerazni strupi delujejo tako, da ta kompleks stabilizirajo in ga spremenijo v celični toksin (od tod ime strupi); pride do trajnih prekinitev DNA, kar vodi v kromosomske premestitve in celično smrt. Od tod izhaja poimenovanje topoizomerazni strupi [15]. Slika 7 shematsko predstavlja njihovo delovanje.



Slika 7. Shema delovanja topoizomeraznih strupov. Prijeto po [13].

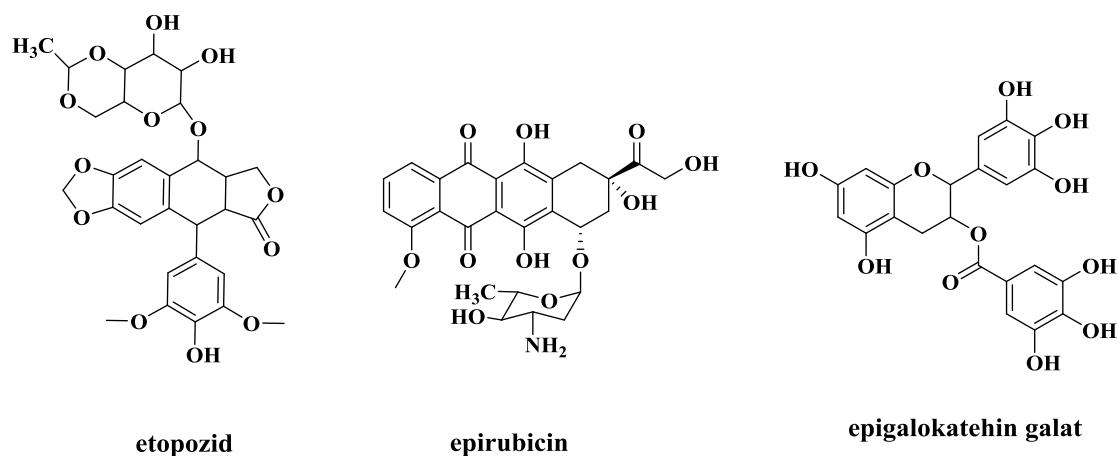
Predstavnike te skupine delimo na kovalentne in nekovalente, ki so nadalje razdeljeni še na interkalirajoče in neinterkalirajoče. Slednji se vežejo na encim in s tem ovirajo njegovo

delovanje oz. se vrivajo med bazne pare DNA in otežujejo religacijo, prvi pa se udeleženi v redoks reakcijah in direktno poškodujejo tako encim kot celice same [13].

Preglednica II. Topoizomerazni strupi, ki so v klinični uporabi v Sloveniji.

Učinkovina	Ime zdravila	Indikacije
Etopozid	Vepesid®, Ebeposid®, Eposin®	Rak na testisih, limfom, horiokarcinom, rak na pljučih, akutna mielotična levkemija pri odraslih in otrocih [16]
Etopozid - fosfat	Etopophos®	Vodotopno predzdravilo etopozida [16]
Idarubicin	Zavedos®	akutna limfoblastična levkemija, akutna nelimfoblastična levkemija pri odraslih [17]
Doksorubicin	Adriblastina®	različni raki mehkih tkiv, limfom, levkemije, sarkom [16]
Mitoksantron	Novantrone®	rak dojke, levkemije, multipla skleroza [17]
Epirubicin	Epirubicin Ebewe®	različni raki mehkih tkiv, limfom, levkemije, sarkom, hormonsko neodvisni rak prostate [17]

Etopozid je neinterkalirajoči, polsintežni derivat podofilotoksina, ki se uporablja za zdravljenje limfoma, raka testisov in raka pljuč [16, 18]. Epirubicin je interkalator, predstavnik antraciklinov, ki se uporablja proti akutni nelimfoblastni levkemiji pri odraslih in akutni limfoblastni levkemiji [17]. Kovalentnih topoizomeraznih stupov še ni na tržišču; sem lahko uvrstimo epigalokatehin galat [19].

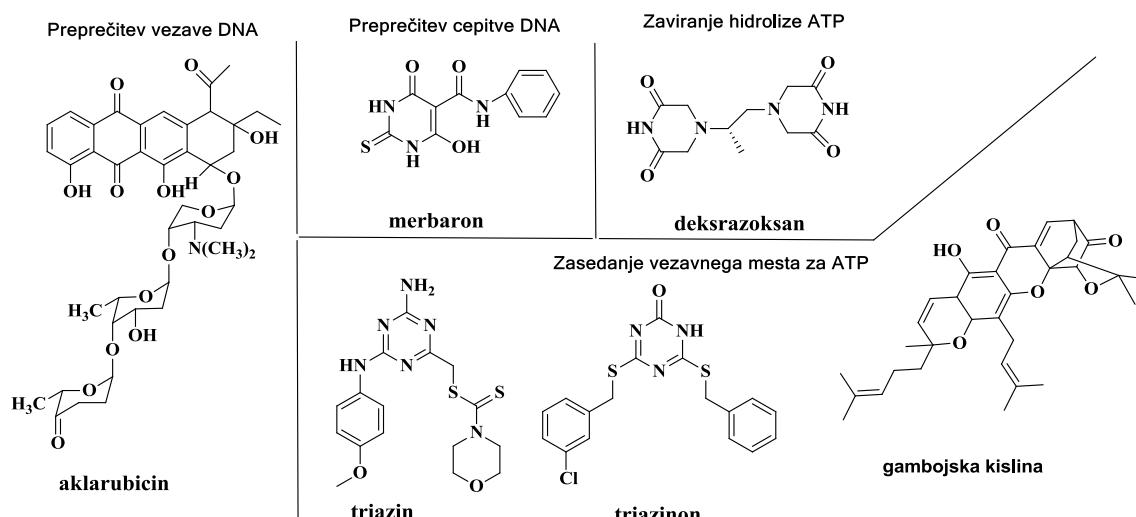


Slika 8. Kemijske strukture izbranih topoizomeraznih stupov.

1.4.2. Katalitični zaviralci človeške topoizomeraze II α

To je novejša in posledično manj uveljavljena skupina učinkovin, katere razvoj so spodbudili neželeni učinki topoizomeraznih stupov; kardiotoksičnost in anemije [13]. Predstavniki imajo širok nabor mehanizmov delovanja [20]:

- preprečitev vezave DNA na encim,
- zaviranje cepitve DNA,
- zasedanje ATP vezavnega mesta,
- zaviranje hidrolize ATP

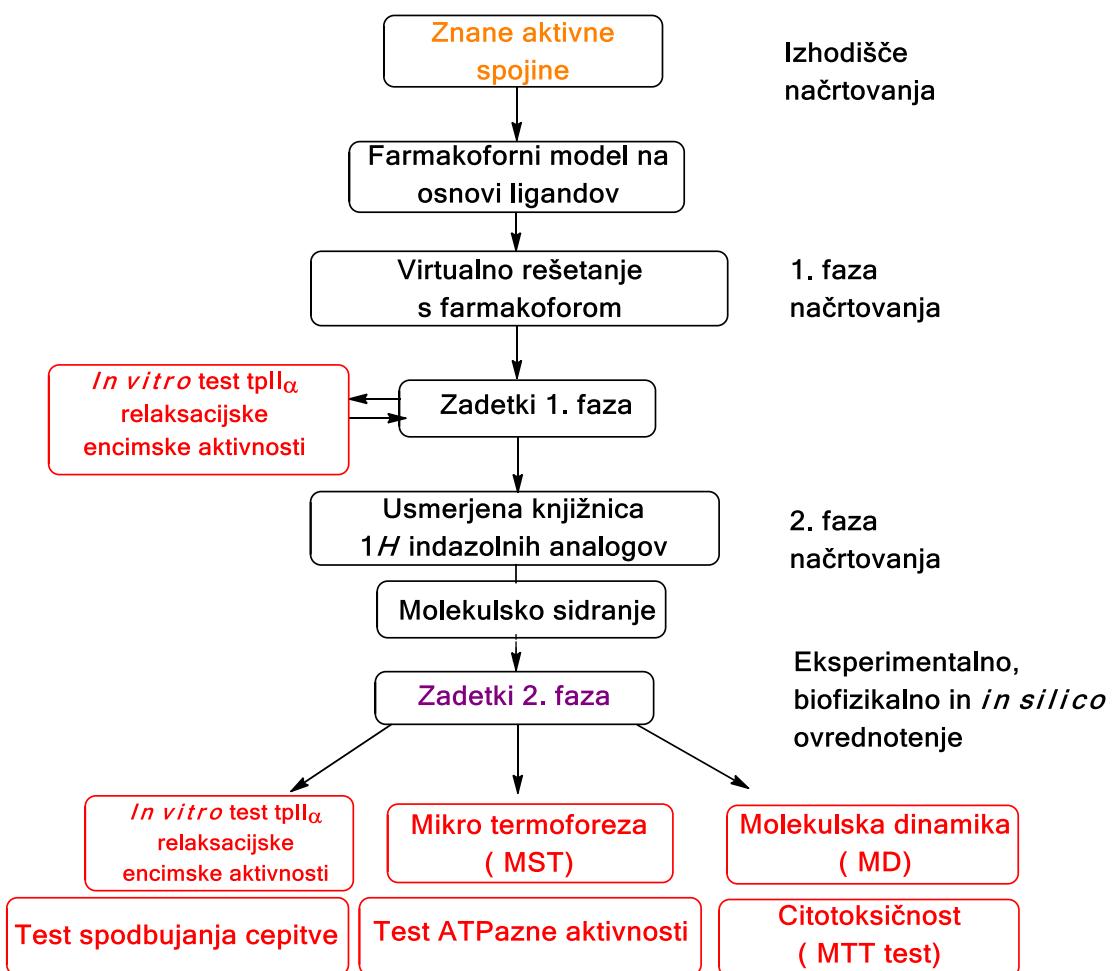


Slika 9. Izbrani katalitični zaviralci topoizomeraze II α .

Akclarubicin, predstavnik antraciklinov, ki je že na tržišču, indirektno zavira encim s tem da se veže na DNA in s slatkornim delom prepreči dostop encimu. Spojina je hkrati tudi strup za topoizomerazo I [21, 22]. Merbaron, tiobarbituratni analog, prepreči cepitev verige DNA ne da bi oviral vezavo DNA na encim [23]. Zasedanje vezavnega mesta za ATP se poslužuje precej spojin, a do danes ni še nobene v klinični uporabi. Nekateri predstavniki so gambojska kislina, triazini, triazinoni, etc. [24-26]. Dekrazoksan preprečuje hidrolizo ATP in s tem onemogoči encimu, da bi prešel v nov cikel. Je edini katalitični zaviralec registriran v Sloveniji in je indiciran kot kardioprotektiv pri zdravljenju z antraciklini [27].

2. Namen dela

Zaradi neželenih učinkov uveljavljenih topoizomeraznih strupov je pomemben nadaljnji razvoj zaviralcev, ki za svoje delovanje izkoriščajo alternativne mehanizme. Cilj našega raziskovalnega dela bo odkritje in začetno ovrednotenje novih zaviralcev $\text{tpII}\alpha$. Osredotočili se bomo na katalitične zaviralce in v okviru teh na podskupino, ki zavira encim preko interakcije z vezavnim mestom za ATP, ki se nahaja na ATPazni domeni. Slika 10 vsebuje shematični prikaz našega dvostopenjskega načrta raziskovalnega dela.



Slika 10. Shematični prikaz poteka našega raziskovalnega dela in uporabljenih eksperimentalnih ter teoretičnih metod.

Naše izhodišče za načrtovanje bodo predstavljale aktivne spojine **1-5** (slika 21), ki smo jih odkrili v naših predhodnih raziskavah [28]. Spojine izhajajo iz kemijskih razredov purinov in pirazolopirimidinov. Na osnovi teh spojin bomo generirali tridimenzionalni farmakoforni model na osnovi ligandov, ga validirali, in z njim rešetali našo internou knjižnico spojin. Aktivnost obetavnih zadetkov bomo ovrednotili z *in vitro* testom

encimske tpII α aktivnosti. Nato bomo poiskali tržno dostopne analoge aktivnih zadetkov in generirali usmerjeno knjižnico za razširitev informacij o povezavi med strukturo in delovanjem (structure activity relationship, SAR). Glede na obsežnost knjižnice bomo število spojin skrčili in jih študirali z uporabo molekulskega sidranja v vezavno mesto za ATP tpII α , pregledom interakcij in upoštevanjem splošnih smernic za izbor biološko aktivnih spojin [29].

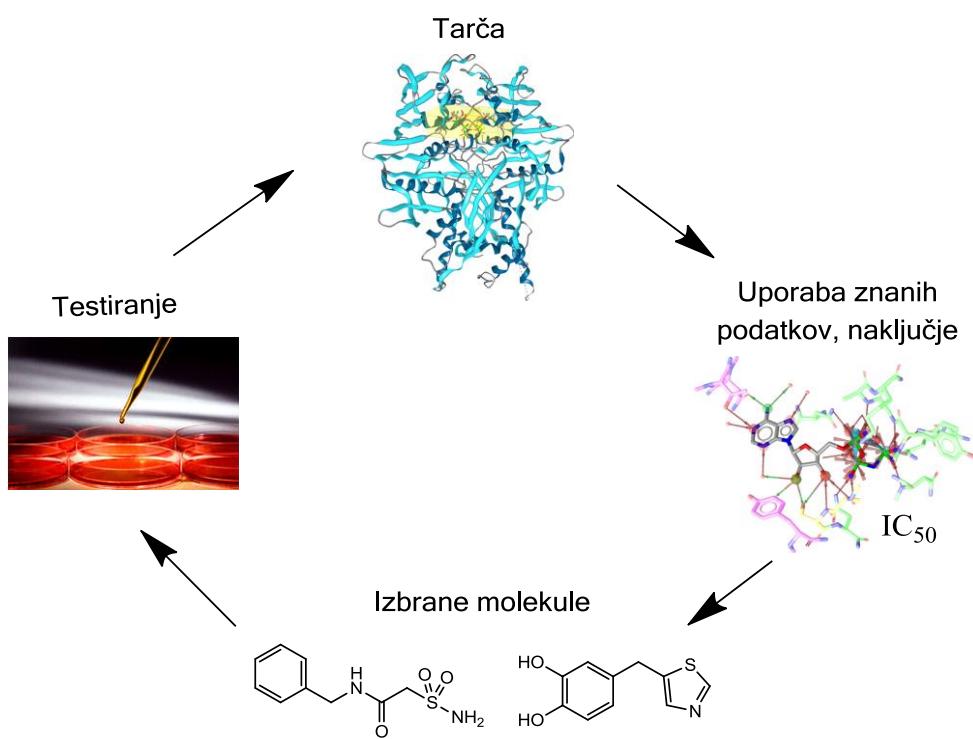
Tako izbrane analoge bomo najprej eksperimentalno ovrednotili z *in vitro* testom relaksacijske encimske aktivnosti tpII α . Mehanizem najbolj obetavnih molekul bomo še dodatno ovrednotili z metodo mikrotermoforeze (microscale thermophoresis, MST), testom ATPazne aktivnosti, testom spodbujanja cepitve in kompetitivnim testom spodbujanja cepitve. Spojine bomo ovrednotili tudi z MTT testom citotoksičnosti in s tem ocenili njihov potencial za inhibicijo celične rasti izbranih rakavih celičnih linij. Tako bomo dobili vpogled v inhibicijski mehanizem spojin in potrditev, če spojine delujejo preko predlaganega mehanizma. S pomočjo simulacije molekulske dinamike (Molecular Dynamics, MD) za izbrano aktivno spojino bomo tudi ovrednotili predpostavljeni vezavni model v vezavnem mestu za ATP in pripadajoče interakcije medmolekulskega prepoznavanja.

3. Materiali in metode

3.1. Računalniška kemija in načrtovanje zdravilnih učinkovin

Odkrivanje novih učinkovin je časovno in finančno velik zalogaj, zato skušamo razviti postopke in orodja, ki bi pocenila, pohitrlila in povečala uspešnost raziskav. Tako na računalniškem (*in silico*) kot eksperimentalnem (*in vitro*, *in vivo*) področju [30, 31]. Postopek odkrivanja učinkovin je cikličen proces, ki je shematsko ponazorjen na sliki 11.

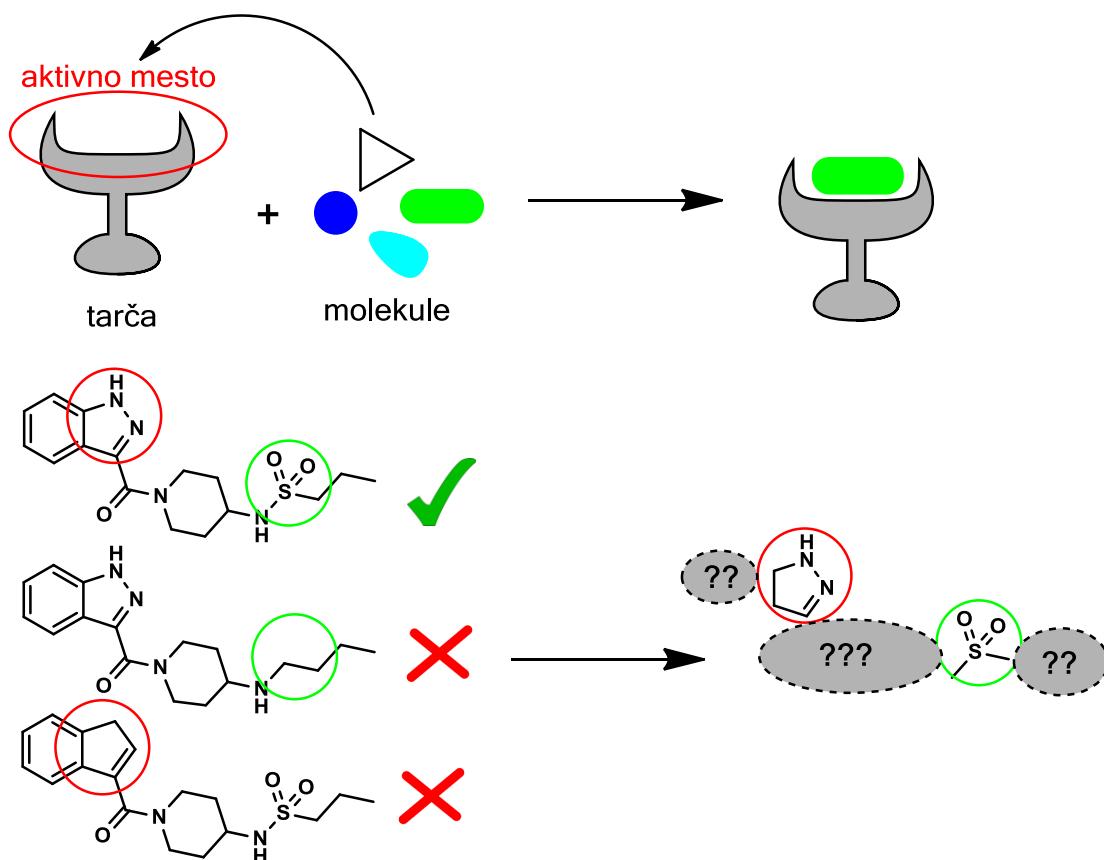
Naše raziskovalno delo se prvenstveno uvršča med t.i. računalniško podprtvo načrtovanje biološko aktivnih molekul. Rešetanje visoke zmogljivosti (High Throughput Screening ali HTS) nam omogoča preučevanje velikega števila molekul v kratkem času, toda zaradi velikosti kemijskega prostora [32] in omejenih sredstev za eksperimentalno evalvacijo, ta metodologija pogosto ni najbolj učinkovita. V izogib prekomernemu in pogosto neučinkovitemu testiranju velikega števila spojin se je konec devetdesetih pojavilo t.i. virtualno rešetanje (virtual screening, VS); tu z uporabo računalniških (*in silico*) metod skušamo zmanjšati nabor molekul, ki jih testiramo, a hkrati vseeno ohraniti aktivne molekule. Lahko jih uporabimo tudi za napovedovanje obnašanja molekul. *In silico* metode je, enako kot eksperimentalne, vedno potrebno predhodno validirati [30, 31, 33].



Slika 11. Shema odkrivanja novih učinkovin (drug design cycle).

Računskih metod in njihovih uporab je v literaturi veliko, a v grobem razdelimo tovrstne pristope na: načrtovanje na osnovi ligandov (ligand-based drug design, LBDD) in pa načrtovanje na osnovi strukture tarče (structure-based drug design, SBDD) [30, 34].

Tarčo definiramo kot makromolekulo, običajno z validiranim prijemališčem za učinkovine. SBDD uporabimo, ko je struktura tarče (deloma) znana (proteinski NMR, rentgenska žarkovna kristalografija) oz. jo sami zmodeliramo s teoretičnimi pristopi (npr. s homolognim modeliranjem). Homologno modeliranje se je sprva uporabljalo pri proteinih iste družine (znana struktura celotne verige s podobnim aminokislinskim zaporedjem), a danes poznamo tudi pristop, ko protein "sestavimo" iz krajsih fragmentov z istim oz. podobnim aminokislinskim zaporedjem [34]. V obeh primerih se zanašamo na znane eksperimentalne strukturne podatke. Poznamo pa tudi čisto *ab initio* modeliranje proteina, a slednje je manj zanesljivo. Pri SBDD našo molekulo sidramo v tarčo in skušamo preko napovedi vezave in obnašanja izbrati najoptimalnejše spojine za nadaljnje biološko testiranje[34].



Slika 12. Shematski prikaz SBDD (zgoraj) in LBDD (spodaj) pristopov.

LBDD načeloma uporabimo, ko še nimamo podatkov o strukturi tarče, poznamo pa molekule, ki na to tarčo delujejo. V tem primeru skušamo razvozlati, kateri deli molekule oz. katera razporeditev teh delov v prostoru je odgovorna za aktivnost in poiskati nove molekule z ugodnejšo razporeditvijo teh oz. novih elementov [35]. Omenimo še, da se LBDD lahko uporabi tudi v primeru, ko je struktura vezave že znana, kot komplementarni pristop pri razumevanju medmolekulskih interakcij. Najpogosteji pristop pri LBDD je farmakoferno modeliranje [9, 35].

3.1.1. Farmakoferno modeliranje in virtualno rešetanje z uporabo farmakofornega modela

Farmakofor je definiran kot razporeditev prostorskih in elektronskih lastnosti, ki v interakciji s tarčno molekuljo optimalno sproži ali zavre biološki odgovor. Ne gre za specifične molekule ali funkcionalne skupine marveč za prostorsko razporeditev t.i. farmakofornih elementov (glej preglednico III za nekatere najpomembnejše farmakoforne elemente) [36].

Preglednica III. Najpogosteje uporabljeni farmakoforni elementi. Prirejeno po [9].

Grafični prikaz	Farmakoforni element	Grafični prikaz	Farmakoforni element
	Usmerjen donor H vezi		Anionski center
	Neusmerjen donor H vezi		Kationski center
	Usmerjen akceptor H vezi		Π - Π interakcije
	Neusmerjen akceptor H vezi		Interakcija s kovinskim ionom
	Hidrofobna interakcija		Prostorska omejitev

Ločimo dve vrste farmakoforov:

- Farmakofor zgrajen na osnovi strukture (structure-based pharmacophore): potrebujemo strukturo kompleksa tarča-molekula.
- Farmakofor zgrajen na osnovi ligandov (ligand-based pharmacophore): potrebujemo aktivne molekule, ki se vežejo na našo tarčo.

Validacija farmakofornih modelov je nujna in jo opravimo s tem, ko preverimo, ali je farmakofor sposoben prepoznati spojine, na podlagi katerih je bil zgrajen, oziroma ali je sposoben ločiti med že znanimi aktivnimi in neaktivnimi spojinami. Učinkovitost farmakofora lahko ocenimo z ROC (Receiver Operating Characteristic) krivuljo; na X os nanašamo 1-specifičnost (kako dobro zavračamo neaktivne spojine), na Y os pa občutljivost (kako dobro izbiramo aktivne spojine) in skušamo doseči čim večjo površino pod krivuljo, ki je povezana z boljšo kvaliteto modela [37].

Preden se lotimo virtualnega rešetanja, je potrebno ustrezeno pripraviti knjižnice spojin; potrebno je generirati 3D strukture molekul. Program nato z vgrajeno cenilno funkcijo prilega 3D konformacije farmakofornemu modelu in oceni, ali je prileganje dovolj dobro; znotraj tolerančnega radia farmakofornih elementov mora ležati del molekule, ki ima enake lastnosti. [38].

3.1.1.1. Uporabljen postopek farmakoformega modeliranja in virtualnega rešetanja

Našo študijo smo začeli z izgradnjo farmakofornega modela na osnovi ligandov. Izbrane aktivne molekule **1-5** iz prejšnjih študij (slika 21) smo najprej narisali v programu ChemBioDraw in nato pretvorili v 3D konformacijo s programom ChemBio3D. Molekule smo nato naložili v Ligand Scout 3.1 (LS) [9] in uporabili nastavitev "BEST settings" za generacijo konformacij. Generiranih je bilo do 500 konformerov za vsako molekulo in leta smo potem združili v manjšo molekulske knjižnice. Za prileganje konformerov in izgradnjo farmakofora smo uporabili cenilno funkcijo, ki je vgrajena v LS in privzete nastaviteve, edino število neskladnih elementov (number of omitted features) smo povečali iz 4 na 8, da smo dobili farmakofore z več elementi. LS je generiral 10 različnih farmakofrov in mi smo vzeli tistega z najvišjo oceno (Score = 0,8473).

Začetni farmakofor smo potem nadalje preoblikovali na podlagi izkušenj iz prejšnjih raziskav na človeški topoizomerazi II α [24, 25, 28]. Osnovne modifikacije so zaobjemale izbris, združitev in sprememba usmerjenosti elementov. Osredotočili smo se na aromatski obroč z donorjem H-vezi in pa lipofilno interakcijo ter akceptorjem H-vezi na primerni razdalji. Te elemente smo izbrali, ker so naše prejšnje raziskave nakazale na velik pomen Asn120 (pdb:1ZXM) in ker smo želeli posnemati interakcije fosfatov v ATP molekuli.

Končni reducirani farmakoforni model smo validirali; prepoznaš je vseh 5 izhodnih spojin v pravilni orientaciji.

Končni farmakoforni model smo nato uporabili za virtualno rešetanje naše interne knjižnice kemijskih spojin (410 spojin) v LS. Knjižnica spojin je bila predhodno pripravljena v LS; uporabili smo vgrajeni ibgen modul sparjen z OMEGA [39] programskim paketom. Uporabili smo nastavitev "high quality settings" in zmanjšali maksimalno število izbranih konformerov iz 500 na 100; RMS meja za ločitev konformerov = 0,8 Å, maksimalno število generiranih konformerov = 30000, maksimalno število vmesnih konformerov = 4000. V 60 zadetkih smo opazili 1H-indazolni razred in izbrali par predstavnikov za začetno biološko ovrednotenje.

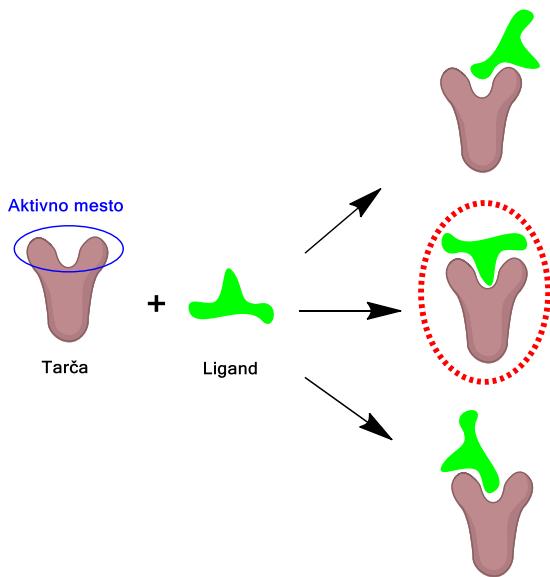
3.1.2. Iskanje komercialno dostopnih analogov

Na spletni strani e-molecules [40] smo z uporabo funkcij "similarity search" in "substructure search" poiskali analoge aktivnih spojin; spojine z 1H-indazolnim in sulfatnim fragmentom. Najdene spojine (303 spojin) smo izvozili v 2D formatu in jih pretvorili v 3D konformacije s programom ChemBio3D. Odstranili smo tiste, ki niso ustrezale pravilom Lipinskega [41].

3.1.3. Molekulska sidranje (molecular docking)

To je SBDD metoda računalniške kemije, s katero izračunamo prednostno konformacijo liganda v aktivnem mestu tarče, ob predpostavki da ligand in tarča lahko tvorita stabilen kompleks [42]. Shematsko je sidranje prikazano na sliki 13.

Metoda molekulskega sidranja temelji na dveh vrstah algoritmov. Iskalni algoritmi generirajo vezavne konformacije nato pa cenalne funkcije ovrednotijo te konformacije; ocenijo intenziteto interakcij v kompleksu preko izračuna energije afinitete, ki predstavlja prvi grobi približek proste energije vezave. Tako ligand kot tarča sta lahko obravnavana kot rigidna ali (deloma/popolnoma) fleksibilna. Pogoje sidranja validiramo tako, da skušamo reproducirati eksperimentalno določene poze [34], lahko pa študiramo tudi obnašanje cenalne funkcije za serijo ligandov z znanimi aktivnostmi.



Slika 13. Shematski prikaz metode molekulskega sidranja.

Pri izgradnji kompleksa poznamo 2 glavna principa. Pri inkrementni konstrukciji v aktivno mesto sidramo večji del molekule in nato do konca izgradimo preostali del molekule z uporabo geometrijskih in energijskih omejitev [43]. Genetski algoritmi, drugi pogosto uporabljen princip pri molekulskemu sidranju, pa skušajo posnemati evolucijske in selekcijske principe; npr. mutacije, cross-over [44].

Cenilne funkcije pri molekulskemu sidranju razdelimo v tri skupine [30, 34].

- Cenilne funkcije, ki temeljijo na polju sil: ocena interakcije je vsota elektrostatskih, in neveznih Van der Waalsovih členov ter empirično izračunanih solvatacijskih prispevkov.
- Empirične cenilne funkcije: te temeljijo na eksperimentalno pridobljenih podatkih. Ocena interakcije je vsota s koeficienti utežnih členov (H vez, hidrofobne interakcije...).
- Cenilne funkcije dobljene s pomočjo statistične mehanike: osnovni princip je, da so med-atomske razdalje, ki so bolj pogoste v eksperimentalno določenih kompleksih, bolj ugodne.

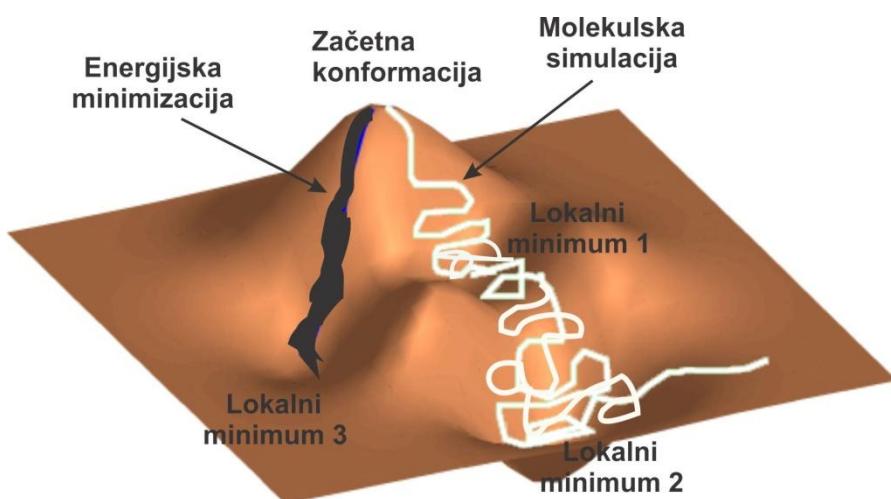
Možna je tudi uporaba več cenilnih funkcij skupaj (t.i. consensus scoring) [36, 45]. Vsak pristop ima svoje prednosti in slabosti, trenutno pa ni še idealne cenilne funkcije, ki bi bila natančna, zanesljiva, fizikalno osnovana in splošno uporabna.

3.1.3.1. Uporabljen postopek molekulskega sidranja

Za eksperimente molekulskega sidranja smo uporabili program GOLD [44]. Strukturo tarče je predstavljala struktura pdb 1ZXM [12]; uporabili smo zgolj 1 protomer (veriga A) in odstranili ione, ligande in vse vode razen W931 in W924, ker sta se izkazali kot potencialno pomembni v naših prejšnjih raziskavah. Za protonacijo smo uporabili privzeto GOLD nastavitev in preverili njeno ustreznost za AK v definiranem aktivnem mestu za ATP. Aktivno mesto smo definirali kot kroglo s premerom 10 Å okoli vezavnega mesta referenčnega liganda (AMP-PNP); $x = 35.7113$, $y = 0.452$, $z = 40.0306$. Dodana je bila omejitev, da mora ligand tvoriti vodikovo vez s karbonilnim kisikom Asn120. Izbrana cenilna funkcija je bila GoldScore [46]. Za vsako spojino je bilo izračunanih 10 sidranih konformacij. Ostale nastavitev sidranja so bile privzete (populacija = 100, selekcijski pritisk = 1.1, število operacij = 100,000, število otokov = 5, velikost niše = 2, migracija = 10, mutacija = 95, Crossover = 95). Ti pogoji sidranja so bili izbrani, ker so se izkazali kot optimalni v naših prejšnjih raziskavah na tej tarči [24, 25, 28]. Za validacijo smo sprva sidrali AMP-PNP - referenčni ligand iz pdb 1ZXM in primerjali sidrano pozno z eksperimentalno.

3.1.4. Molekulska dinamika (MD) in molekulske simulacije

Površina potencialne energije (Potential Energy Surface, PES) je večdimenzionalna površina, ki prikazuje energijo molekule v odvisnosti od vseh možnih razporeditev atomov molekule (vseh njenih konformacij) [46].



Slika 14. PES in razlika v preiskovanju le-te z metodo energijske minimizacije ter metodo molekulske simulacije (molekulsko dinamiko MD). Prirejeno po [36].

Pri energijski minimizaciji (imenovani tudi geometrijska optimizacija) matematično poiščemo tako konformacijo molekule, ki ima v lokalni okolici naključno izbrane začetne konformacije najnižjo energijo. To nam prikaže zgolj idealizirano statično sliko, ki je zelo odvisna tudi od začetnega stanja. Za opazovanje dinamičnega obnašanja molekul moramo uporabiti molekulske simulacije (slika 14) [46]. Z njimi lahko bolj temeljito preiščemo PES preko generiranja več sistemu dostopnih konformacij, ki so odvisne od pogojev simulacije. Matematični formalizmi statistične mehanike nam omogočijo, da lahko povežemo strukturo molekul (konformacije) in njihove makroskopske lastnosti, ki jih lahko izmerimo. Monte Carlo in molekulska dinamika (MD) sta najpogostejše uporabljeni metodi molekulskega simulacij [47].

V našem delu smo uporabili simulacijsko metodo molekulske dinamike (MD). Pri tej metodi generiramo nove konformacije z uporabo klasičnih Newonovih enačb gibanja; za molekule in atome rešujemo enačbe 2. Newtonovega zakona. Za j -ti delec tako velja:

$$(1) \quad F_j = m_j * a_j$$

Pri čemer je F_j sila na j -ti delec in m_j ter a_j masa in pospešek j -tega delca.

Delcem v sistemu sprva pripisemo naključne hitrosti in nato pustimo, da se gibajo za kratek časovni interval, t.i integracijski korak. Nato za novi položaj atomov izračunamo nove rezultante sil na posamezne delce in zopet premaknemo delce sistema za enak kratek časovni interval v smeri delovanja tako izračunanih sil. Tako dobimo časovno sosledje konformacij sistema – molekulsko trajektorijo. Časovni intervali v MD simulaciji morajo biti krajsi od najhitrejših gibanj v molekuli; običajno 1 ali 2 fs [36].

3.1.4.1. Opis simulacije molekulske dinamike (MD) aktivnega liganda 19

Simulirali smo 1 (A) podenoto ATPazne domene tpII α iz pdb 1ZXM skupaj s sidrano konformacijo liganda **19**. Za izgradnjo manjkajočih AK smo uporabili PDB hydro Web server; manjkajoče AK in stranske verige so bile avtomatsko zaznane in nato zgrajene. Pregledali smo dobljeno strukturo in jo obdelali še z drugim modulom, da smo za vsako manjkajočo AK dobili konformacijo z najnižjo Van Der Wallsovo energijo [48]. Sidrano pozno liganda **19** smo, kot je zgoraj opisano, pridobili s programom GOLD. Za pripravo solvatiranega kompleksa protein-ligand za nadaljnje simulacije v programskega okolju

CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) [49] smo uporabili spletni vmesnik CHARMM-GUI [50]. Za polje sil smo uporabili CHARMM General Force Field (CGenFF) [51], tako za definiranje atomskih tipov AK kot tudi atomskih tipov simuliranega liganda **19** (glej dodatek za parametre). Kompleks je bil potopljen v oktaeder s premerom 10Å; TIP3 model vode [52], dodali pa smo tudi 6 kloridnih ionov za elektronevtralnost sistema. Za postavitev ionov smo uporabili metodo Monte Carlo. Periodični robni pogoji so veljali za obliko in velikost sistema. Končni sistem za simulacijo je vseboval 73278 atomov.

Ekvilibracijska faza simulacije, ki je služila postopnemu zmanjševanju napetosti med posameznimi vezmi, kontroliranemu oddaljevanju atomov, ki so morda preblizu skupaj in urejanju drugih manjših konformacijskih anomalij, je trajala 350 ps (350000 korakov dolžine 0,1 fs), produkcijska faza MD simulacije pa 30 ns (15000000 korakov dolžine 0,002 fs). Referenčna temperatura je bila 300K. Da smo lahko vzeli daljši simulacijski korak smo se poslužili algoritma SHAKE. Vseskozi smo tudi pazili, da so bili parametri simulacije (celokupna energija, standardna deviacija razdalj) stabilni. Pri MD simulaciji smo vzorčili konformacije vsakih 1000 MD korakov; skupno torej 15000 konformacij, ki smo jih analizirali s programom Visual Molecular Dynamics (VMD) [53]. Kot referenca za izračun RMSD (Root-mean-square deviation) liganda je bila vzeta začetna poza liganda **19**.

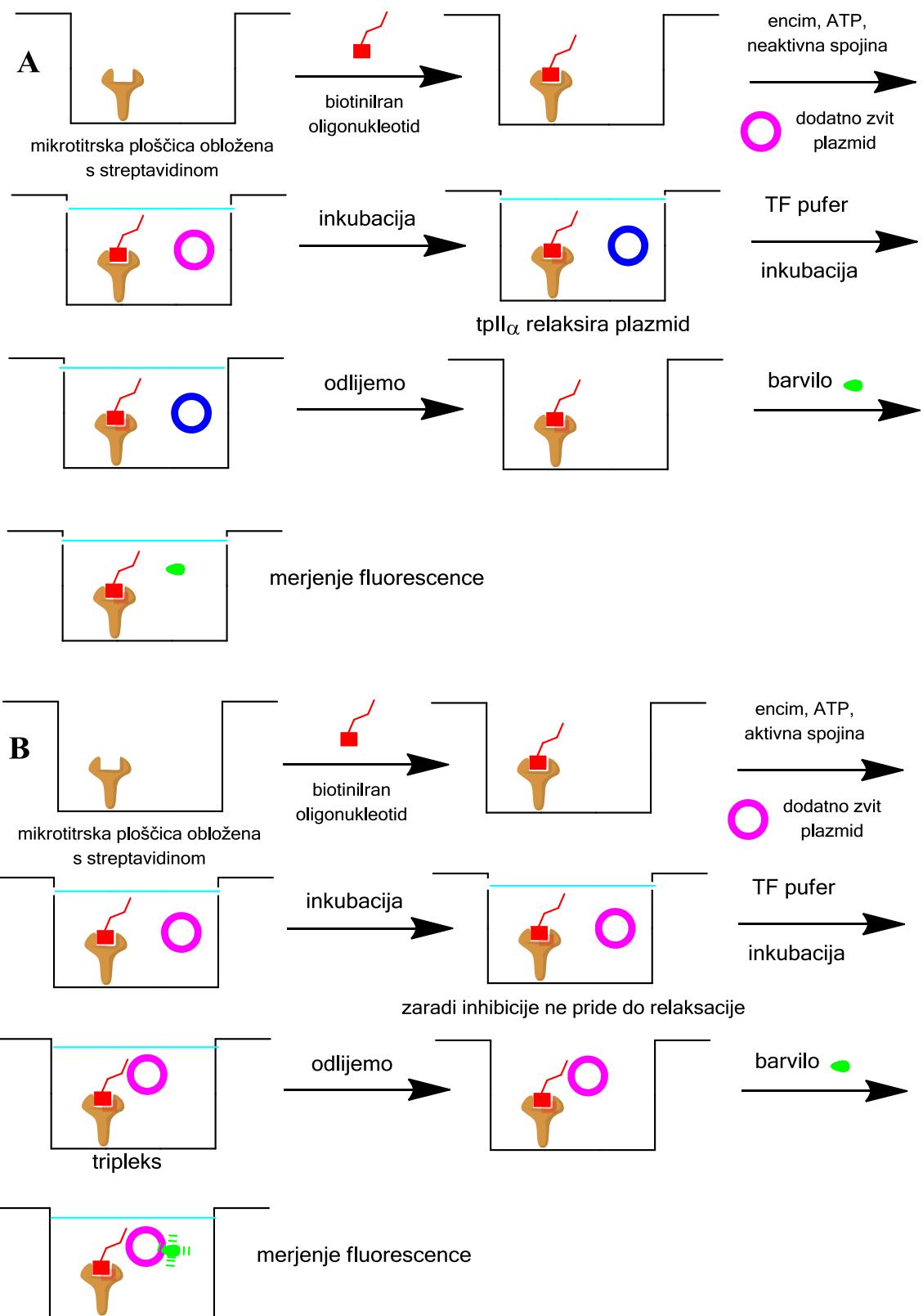
3.2. Biološki testi – eksperimentalni del

3.2.1. *In vitro* test tpII α relaksacijske encimske aktivnosti na ploščici (Human Topo II α Relaxation Plate Assay)

Testni komplet smo kupili pri podjetju Inspiralis, visoko tehnološkem raziskovalnem podjetju, ki se tudi ukvarja z raziskavami družine encimov topoizomeraz. Teste relaksacijske encimske aktivnosti smo izvedli po pripadajočem standardnem protokolu [54] z dodatkom 0,002 % (v/v) Tweena-20[®], da smo preprečili agregacijo in nespecifično inhibicijo [55]. Etopozid je bil uporabljen kot standard z znano aktivnostjo 60,3 μM [56]. Začetne meritve smo izvedli pri 4 koncentracijah (500 μM , 125 μM , 31,3 μM in 7,8 μM) in spojine, ki so izkazale kaj aktivnosti, smo nato pomerili pri osmih koncentracijah (500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,3 μM , 15,6 μM , 7,8 μM in 3,9 μM). Test temelji na tvorbi tripleksa med dodatno zvitim plazmidom in biotiniliranim oligonukleotidom in dejstvu, da barvilo SybrGOLD bolj fluorescira, če je vezano na plazmid.

Princip testa je prikazan na Sliki 15. Na ploščico obloženo s streptavidinom imobiliziramo biotiniliran oligonukleotid. Nato dodamo reakcijsko zmes; (ne)aktivno spojino, ATP, dodatno zvit plazmid in encim. Po poteku inkubacije dodamo TF (triplex forming) pufer, ki ustavi reakcijo relaksacije in spodbudi tvorbo tripleksa. Po inkubaciji reakcijsko zmes odlijemo in speremo ploščico.

- Če smo dodali neaktivno spojino, bo tpII α relaksirala plazmid; sproščena oblika plazmida skorajda ne tvori tripleksa zato plazmida po odlitju in izpiranju praktično ne bo več v luknjicah. Posledično bo zaznana fluorescenza manjša, ker se barvilo ne bo moglo vezati na plazmid.
- Če smo dodali aktivno spojino, ne bo prišlo do relaksacije. Tvoril se bo tripleks med biotiniliranim nukleotidom in dodatno zvitim plazmidom. Plazmid bo ostal v luknjicah tudi po odlitju reakcijske zmesi in spiranju ploščice. Zaznana fluorescenza bo večja, ker se bo barvilo vezalo na plazmid.



Slika 15. Shematski prikaz testa pri neaktivni (A) in aktivni (B) spojnini.

3.2.1.1. Izvedba testa topoII α relaksacijske encimske aktivnosti

S streptavidinom obloženo ploščico najprej rehidriramo; 3-krat spiramo z 200 μ l Wash pufra (20 mM Tris-HCL, (pH 7,6), 137 mM NaCl, BSA (0,01 % (w/v), Tweena-20[®] 0,002 % (v/v)). Nato imobiliziramo biotiniliran oligonukleotid (TFO1); v vsako vdolbinico damo 100 μ L Wash pufra z 500 nM TFO1 in inkubiramo 5 minut na sobni temperaturi. Vsebino nato zlijemo stran in 3-krat speremo z Wash pufrom. Ostanke pufra posrkamo s pipeto.

V vsako jamico dodamo 27 μ l vodne raztopine; 0,008 % Tweena-20[®], 1 mM ATP in 0,7 5 μ g superzvitega plazmida pNO1. Dodamo 0,3 μ l spojine raztopljeni v 100 % DMSO. Dodamo 1,5 U encima v 3 μ l Dillution pufer (50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 50 % (v/v) glicerol, 50 μ g/ml albumin). Inkubiramo 30 minut pri 37°C.

V vsako jamico dodamo 100 μ l TF pufra (50 mM NaOAc (pH = 5.0), 50 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). Inkubiramo pri sobni temperaturi 30 minut. Vsebino jamic odlijemo stran in trikrat speremo s TF pufrom.

Nato dodamo 200 μ l barvila SybrGOLD v T10 pufru (10 mM Tris-HCl (pH = 8), 1 mM EDTA). Inkubiramo 10-20 minut in odčitamo fluorescenco; ekscitacija pri 495 nm in emisija pri 537 nm. Pred meritvijo vsebino jamic premešamo s pipeto. Obvezno uporabljamo samo visoko prečiščeno vodo (milli-q).

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

Test nam omogoča opredelitev ali spojina spodbuja cepitev DNA molekule - inhibicijski mehanizem, ki je značilen za DNA strupe - ali ga zavira.

Pripravimo običajno reakcijo relaksacije superzvitega plazmida in nato na hitro denaturiramo tpII α , tako da s tem ohranimo prehodni kompleks precepljena DNA-encim. Po odstranitvi encima s proteinazo K, reakcijsko mešanicoobarvamo in nanesemo na elektroforezni. Če je učinkovinastrup, bomo opazili izrazito liso linearne (precepljene) DNA, sicer pa zgolj superzvit in relaksiran plazmid (slika 16).



Slika 16. Tipičen razvoj gela zastrup (levo) in katalitični inhibitor (desno). Pri strupu je izrazito viden pas linearnega plazmida.

Test so po protokolu izvedli v podjetju Inspiralis [57]. Vsaka spojina je bila izmerjena pri 4 koncentracijah ($500 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $31,5 \mu\text{M}$, $3,9 \mu\text{M}$), etopozid je služil kot standard, izvedena je bila pozitivna (+, encim brez inhibitorja) in negativna (-, brez encima) kontrola ter preverjen inhibitorni učinek DMSO.

1U tpII α , $0,5\mu\text{M}$ super zvitega plazmida pBR322 in ustrezno koncentracijo spojine v 100 % DMSO (končna koncentracija DMSO 1 % (v/v).) inkubiramo 60 minut v reakcijskem volumnu $30 \mu\text{l}$; 20 mM Tris HCl ($\text{pH} = 7.5$), 200 mM NaCl, 0.25 mM EDTA in 5% glicerol.

Dodamo 0,2 % SDS in $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteinaze K, da ustavimo reakcijo, inkubiramo 30 minut.

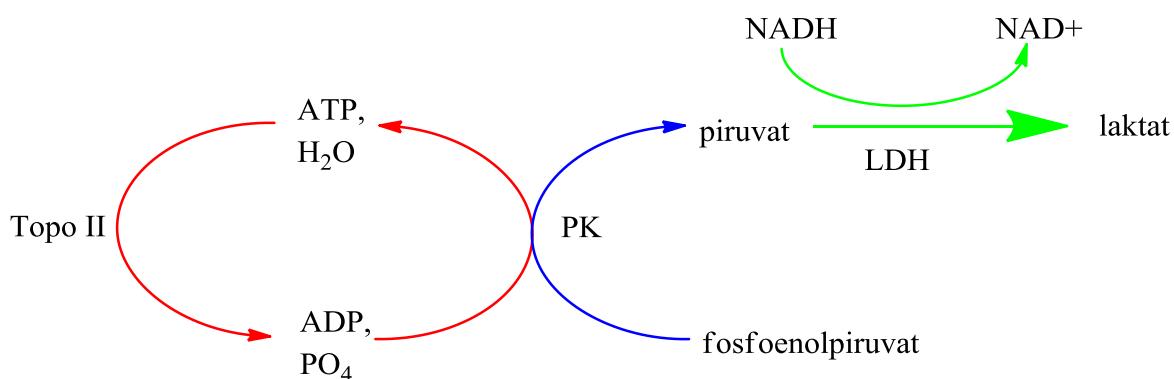
Dodamo $30 \mu\text{l}$ kloroform/izo-amil alkohol (26 : 1) in $30\mu\text{l}$ Stop Dye (sukroza 40 % (w/v), 100 mM Tris.HCl ($\text{pH} = 7.5$), 10 mM EDTA, $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ bromfenol modro in nanesemo na gel. Elektroforeza poteka 2 uri, 80 V, na 1 % TAE gel.

Izvedli smo tudi kompetitivni test, kjer smo fiksni koncentraciji etopozida ($62,5 \mu\text{M}$) dodali naraščajoče koncentracije naše spojine (($500 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $31,5\mu\text{M}$, $3,9 \mu\text{M}$)), da bi preverili, ali naše spojine zavirajo spodbujanje cepitve s strani etopozida. Ta koncentracija etopozida povzroči maksimalno količino cepitve (najintenzivnejši pas linearnega plazmida) in je bila določena s titracijo. Postopek je potekal kot prej, le da je bila končna koncentracija DMSO 2 % (v/v), ker smo hkrati dodali etopozid in našo spojino.

Če spojine zavirajo delovanje etopozida, je pas linearnega plazmida manj intenziven oziroma odsoten v primerjavi z etopozidom samim.

3.2.3. Test ATPazne aktivnosti (ATPase assay)

Gre za sklopljen test pri katerem indirektno opazujemo aktivnost tpII α preko količine hidroliziranega ATP. TpII α pri delovanju hidrolizira ATP do ADP. Piruvat kinaza (PK) nato prenese fosfat iz fosfoenolpiruvata na ADP, tako da nastaneta piruvat in ATP. Laktat dehidrogenaza (LDH) nato reducira piruvat do laktata in oksidira nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) do NAD $^+$. Slednje zaznamo kot padec absorbance pri 340 nm v odvisnosti od časa.



Slika 17. Shema reakcij pri testu ATPazne aktivnosti.

Test smo izvedli v sodelovanju s podjetjem Inspiralis. Vsaka spojina je bila izmerjena pri 4 koncentracijah (500 μ M, 125 μ M, 31,5 μ M, 3,9 μ M v 100 % DMSO), 60 min za meritev pri posamezni koncentraciji. Etopozid je služil kot standard. Končna koncentracija DMSO je bila 2 % (v/v).

V testu zmešamo 5 μ l pufra (200 mM tris-HCl, 50 mM magnezijev acetat, 1250 mM kalijev acetat, 20 mM DTT, pH 7,9)) 1,5 μ l 1 mg/ml linearnega plazmida pBR322, 0,5 μ l 80 mM fosfoenolpiruvata, 0,75 μ l piruvat kinaza/laktat dehidrogenaza, 1 μ l 2 mM NADH, 33,35 μ l vode; skupaj 40,6 μ l na jamico. V vsako jamico dodamo 1 μ l spojine raztopljene v 100 % DMSO. Dodamo 5 μ l tpII α raztopljene v dilution pufru (50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM NaCl, 1mM DTT, 0,5 mM EDTA, 50% (v/v) glicerol, 50 μ g/ml albumin); končna koncentracija encima 11 nM. 15 min merimo OD340 in opazujemo, če opazimo obarjanje. Če se spojina ne obarja, dodamo 3,4 μ l 30 mM ATP in spremljamo OD340 60 minut pri 37 °C.

3.2.4. Študij vezave z mikrotermoforezo (Microscale thermophoresis, MST)

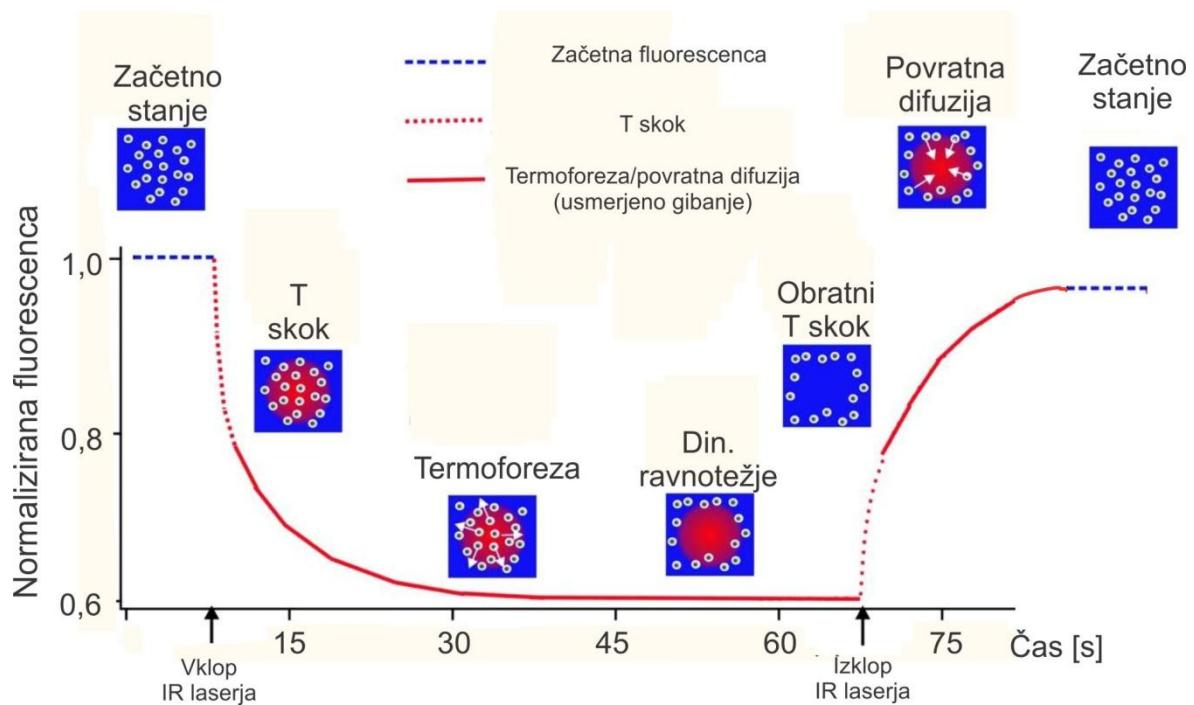
Gre za relativno novo metodo za študij medmolekulskeih interakcij s katero lahko opazujemo vezavo majhnih molekul, micelizacijo, vezavo med proteini, itd. Termoforeza je fizikalni pojav gibanja molekul v temperaturnem gradientu. Osnovni princip MST metode je, da vezava male molekule zaradi spremembe velikosti, naboja, površine dostopne topilu in/ali konformacije spremeni termoforetsko mobilnost kompleksa protein-molekula v primerjavi s prostim proteinom [58, 59].

V eksperimentu pripravimo serijsko razredčitev male molekule in jo dodamo konstantni koncentraciji označenega proteina. Vzorce nato posrkamo v toplotno dobro prevodne kapilare, jih damo na držalo in ustavimo v MST aparatu. Aparat nato z majhnim laserjem kratkotrajno segreje vsako kapilaro posebej in spremlja nihanje fluorescence v odvisnosti od časa. Fluorescencija je normalizirana na začetno vrednost in jo opišemo z enačbo 2:

$$(2) \quad F_{norm} = (1 - x)F(nevezano) + xF(vezano)$$

Pri čemer je x delež proteina z vezanim ligandom. Nihanje fluorescence ima značilne faze (slika 18).

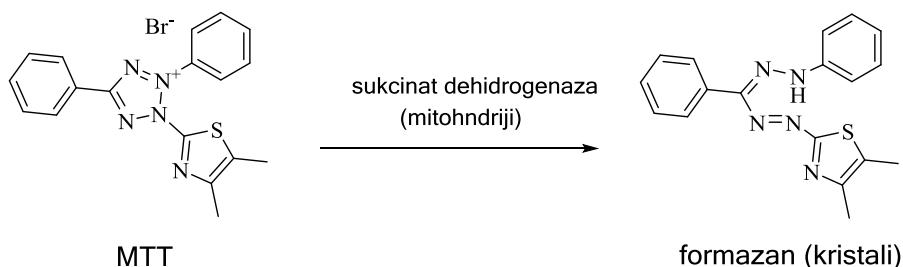
Naše meritve so potekale na komercialno dostopni ATPazni domeni tpII α (AK 1-453), ki smo jo dobili od podjetja Inspiralis, in jo označili z RED-MELEIMIDE kompletom za barvanje po priloženem protokolu [60]. Koncentracija označenega proteina je bila konstantna (20 nM) in koncentracije spojin so segale od 1000 μ M do 0,03 μ M v MST pufru (50 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05 % Tween-20), koncentracija DMSO je bila 2 % (v/v). MST meritve smo izvedli na aparaturi Monolith NT 115 na Kemijskem Inštitutu, Ljubljana: 50 % jakost LED, 20 % jakost MST, 25 °C, 5s/30s/5s izklop/vklop/izklop laserja. Uporabili smo hidrofilne kapilare. Podatki so bili analizirani v programu NT Analysis software 1.5.41.



Slika 18. Spreminjanje fluorescence pri običajni meritvi. Na začetku imamo ravovesno stanje; koncentracija označene molekule je povsod enaka, fluorescencija je konstantna. Ob vklopu laserja pride do temperaturnega (T) skoka; barvilo je topotno občutljivo in zato fluorescencija hitro pada. Temperaturni gradient povzroči termoforetsko gibanje molekul; molekule se premikajo stran od segretega območja in fluorescencija pada dokler se ne vzpostavi dinamično ravnotežje in je fluorescencija zopet konstantna. Ob izklopu laserja pride do obratnega T skoka in fluorescencija naraste. Ker temperaturni gradient pade, se označene molekule začnejo vračati zaradi koncentracijskega gradiента in fluorescencija narašča dokler se ne vzpostavi začetno stanje. Polne črte grafa označujejo usmerjeno gibanje, črtkane črte pa neusmerjeno gibanje. Prirejeno po [58]

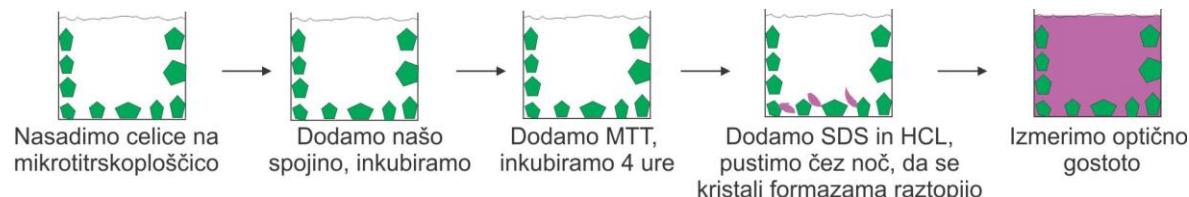
3.2.5. Test citotoksičnosti (MTT test)

Pri testu spremljamo pretvorbo šibko rumeno obarvanega 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromida (MTT) v intenzivno vijolični in v vodi slabo topen formazan.



Slika 19. Shema kemične pretvorbe MTT.

Celice naprej nasadimo na mikrotitrsko ploščico in inkubiramo. Nato zamenjamo medij in dodamo naše spojine in ponovno inkubiramo. Potem dodamo MTT, ki je v vodi dobro topen in ga žive celice v mitohondrijih z sukcinat dehidrogenazo pretvorijo v formazan, ki kristalizira. Ko kristale raztopimo, se optična gostota poveča. Izmerimo optično gostoto; število živih celic je sorazmerno optični gostoti pri 570nm. V kolikor so spojine citotksične, ne pride do pretvorbe v formazan in optična gosta je nižja.



Slika 20. Shema MTT testa.

Testi smo izvedli v sodelovanju z raziskovalno skupino prof. Žanete Nikolovske Čoleske na University of Michigan, Ann Arbor, ZDA.

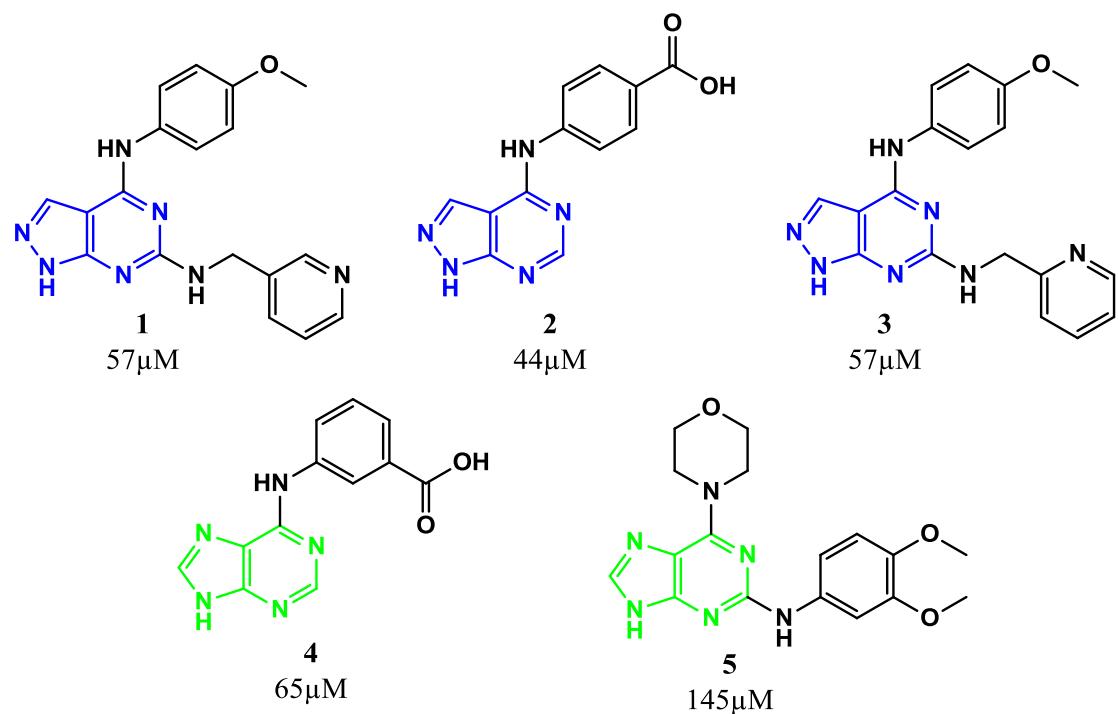
Rakave celične linije MDA-MB-468 (rak dojke, črnka) in MDA-MB-231 (rak dojke, belka) smo nasadili na ploščico; gostota 5,000 celic/luknjica/100 ul. Nato smo dodali naše spojine (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM oziroma 250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,6 µM, 7,8 µM) in inkubirali 72 ur. Celicam smo potem dodali MTT reagent, inkubirali 4 ure. Dodamo še 100 µl 10% (w/v) SDS in 0,01 M HCl in pustimo čez noč. Naslednji dan smo ploščico stresali 10 minut in nato izmeril optično gostoto.

4. Rezultati in razprava

4.1. Izgradnja farmakofornega modela na osnovi znanih ligandov in virtualno rešetanje

Za farmakoforni model na osnovi liganda (ligand-based drug design) smo se odločili, ker kristalna struktura kompleksa zaviralec-ATP vezavno mesto trenutno še ni poznana. S tem metodološkim pristopom se osredotočimo pri načrtovanju na skupne lastnosti serije aktivnih spojin brez upoštevanja morebitno še ne popolnoma natančnega in eksperimentalno potrjenega vezavnega modela za aktivne spojine. Pri tem pristopu je ključna tudi validacija modela, ki nam potrdi, da je naš model dejansko sposoben identificirati aktivne spojine, ki so bile uporabljene v izgradnji modela.

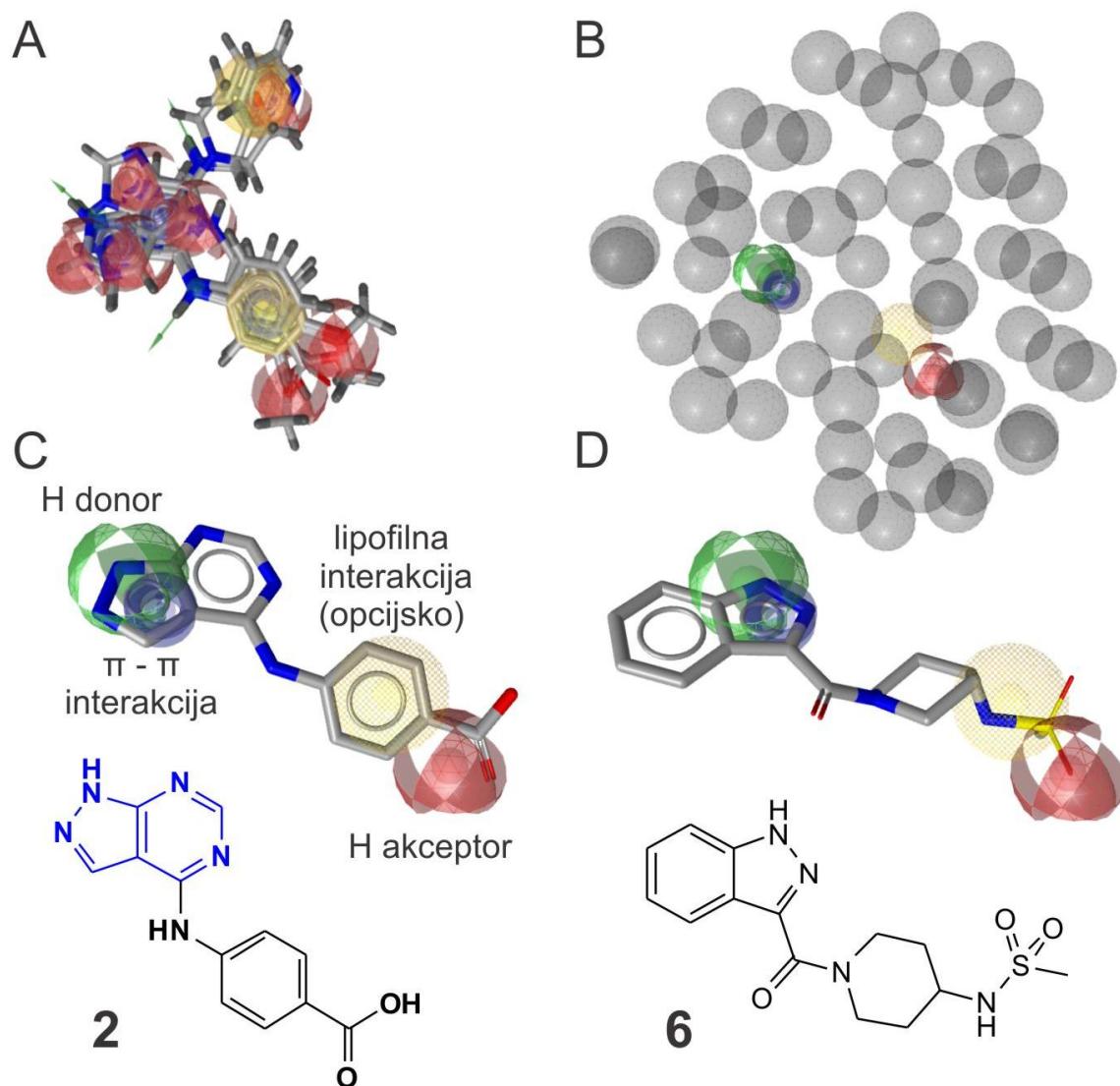
Za izhodišče načrtovanja smo vzeli aktivne spojine **1-5** (slika 21), iz razredov purinov in pirazolopirimidinov, ki smo jih odkrili in okarakterizitali v prejšnjih raziskavah in eksperimentalni rezultati (vezavne študije in SPR meritve) potrjujejo, da predstavniki oba interagirajo z ATPazno domeno tpII α [28].



Slika 21. Izhodne spojine, ki smo jih uporabili za postavitev farmakofornega modela na osnovi aktivnih ligandov in pripadajoče izmerjene IC₅₀ vrednosti za tpII α .

Začetni dobljeni farmakoforni model na osnovi ligandov (ligand-based pharmacophore) smo dobili na osnovi fleksibilnega prileganja največ 500 začetnih generiranih konformacij vsake posamične molekule **1-5** v programu LigandScout. Začetni generirani farmakoforni model, ki je bil najbolje ocenjen z interno cenilno funkcijo, smo potem ustrezno reducirali z upoštevanjem predhodnih rezultatov študij na tpII α [24, 25, 28]. Farmakoforni model, ki ga dobimo na osnovi serije aktivnih ligandov, namreč navadno vsebuje preveč farmakofornih elementov in je tako preveč omejujoč za rešetanje novih molekul. V končnem reduciranem modelu smo se osredotočili na aromatski obroč z donorjem H-vezi in pa lipofilnim delom ter H-akceptorjem vodikove vezi na primerni razdalji (slika 22). Farmakoforni model smo ustrezno validirali; prepoznał je vseh 5 izhodnih spojin.

S postavljenim farmakofornim modelom smo potem izvedli eksperiment virtualnega rešetanja; preiskali smo našo interno knjižnico spojin (425 spojin) in izmed prisotnih 60 zadetkov identificirali več virtualnih zadetkov iz kemijskega razreda 1H-indazolov kot nov obetavni razred spojin. Indazolni obroč se je v farmakofornem prileganju postavil na mesto II-II farmakofornega elementa in donorja H-vezi, akceptorski del pa je zasedla sulfonska oziroma karbonilna skupina, odvisno od dolžine stranske verige. Med zadetki je bilo prisotnih še nekaj drugih razredov spojin, s katerimi se v našem delu nismo ukvarjali na nivoju eksperimentalne validacije.



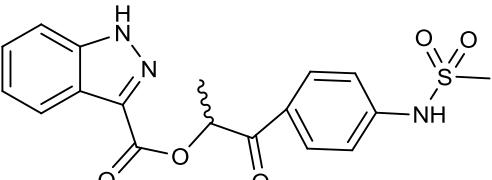
Slika 22. Rezultati farmakofornega modeliranja in virtualnega rešetanja z uporabo farmakofornih modelov: **(A)** Začetni farmakofor na osnovi strukture aktivnih ligandov s prileganimi izhodnimi spojinami, ki vsebuje vse identificirane farmakoforne elemente. **(B)** Končni reducirani farmakofor, ki smo ga uporabili za virtualno rešetanje, skupaj z eksluzijskimi volumni, ki predstavljajo približek steričnih omejitev proteinske okolice. **(C)** Prikaz validacije modela; farmakofor uspešno prepozna pravilno orientacijo spojine **2**. **(D)** Prikaz virtualnega zadetka iz *1H*-indazolnega razreda (**6**) prileganega na farmakoforni model.

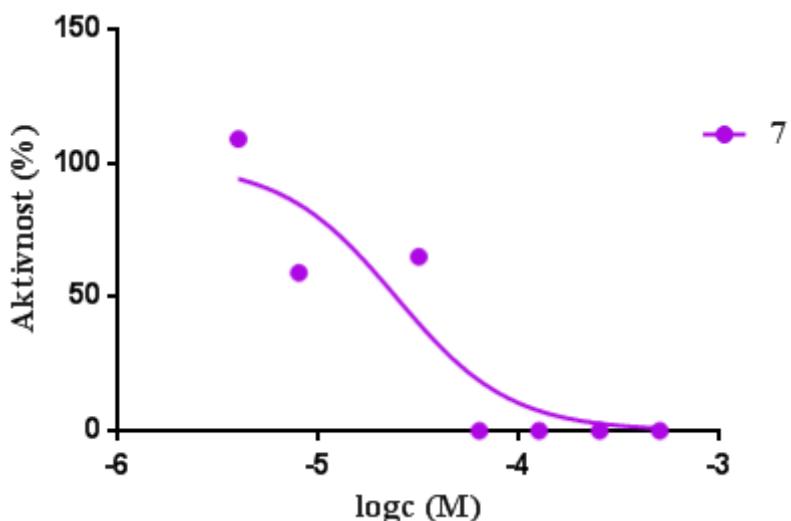
4.2. Eksperimentalno ovrednotenje zaviralne aktivnosti spojin iz 1-H indazolnega razreda in iskanje analogov

Zaviralno aktivnost izbranih 5 spojin iz 1H-indazolnega kemijskega razreda, ki smo jih identificirali v naših eksperimentih virtualnega rešetanja in so bile dostopne v naših kemijskih knjižnicah smo ovrednotili z *in vitro* testom relaksacijske encimske aktivnosti tpIIa na mikrotitrski ploščici. Najprej smo eksperimente izvedli pri 4 različnih koncentracijah spojine ($500 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $31,3 \mu\text{M}$ in $7,8 \mu\text{M}$) in nato smo eksperiment ponovili še pri 8 koncentracijah ($500 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $62,5 \mu\text{M}$, $31,3 \mu\text{M}$, $15,6 \mu\text{M}$, $7,8 \mu\text{M}$ in $3,9 \mu\text{M}$), razen pri spojni **9**, ki se je izkazala za neaktivno v prvem eksperimentu. Spojine so v testih pokazale koncentracijsko odvisno inhibicijo in zato smo lahko izračunali inhibicije z upoštevanjem ustreznih modelov s programom Graph Pad Prism [61]. Za standard etopozid smo izmeril $\text{IC}_{50} 70 \mu\text{M}$ v primerjavi z vrednostjo $60,3 \mu\text{M}$ podano v literaturi [56].

Preglednica IV. Izbrane spojine iz razreda 1H-indazolov iz interne knjižnice spojn identificirane s pomočjo virtualnega rešetanja in pripadajoče IC_{50} vrednosti določene v testu relaksacijske encimske aktivnosti.

Številka spojine	Koda spojine	Struktorna formula	$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$	clogP
6	T6057697		25,1	-0,27
7	T5236265		28,9	-0,22
8	T5811059		26,8	2,43

9	T6105893		>1000	1,55
10	T6244805		25,6	1,09



Slika 23. Inhibicijska krivulja v odvisnosti od logaritma koncentracije za spojino 7.

Začetni rezultati so nakazali na pomen proste sulfonske skupine in možnost različno dolgega povezovalnega dela med 1*H*-indazolnim obročem in sulfonsko skupino. Sklepali smo, da 1*H*-indazolni obroč posnema adenozinski obroč v ATP, med tem ko se sulfonska skupina umešča na mesto enega izmed fosfatov, odvisno od dolžine stranske verige.

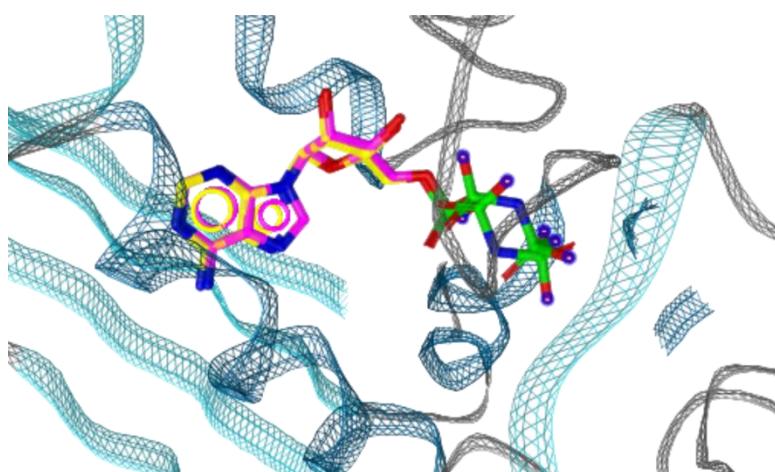
S prvimi 5 spojinami smo dobili vpogled v začetni SAR novo identificiranega 1*H*-indazolnega razreda zaviralcev. V naslednjem koraku smo želeli ovrednotiti manjšo nadaljnjo serijo spojin iz istega razreda, da bi razširili kemijski prostor in lažje podati smernice za nadaljnjo optimizacijo spojin.

Glede na podatke inhibicijskih študij prve serije inhibitorjev smo se osredotočili na 1*H*-indazolni obroč in sulfonsko skupino prisotno v vseh aktivnih spojinah. S pomočjo ukaznih nizov "similarity search" in "substructure search" na portalu komercialno dostopnih molekul

e-molecules [40] smo preiskali tržno dostopne spojine. Izmed začetnih dobljenih 303 zadetkov smo izločili spojine, ki niso ustrezale pravilom Lipinskega [29]. Izbrane molekule so imele ugoden clogP; od -0,27 do 2,43. Odstranili smo tudi molekule, ki so se nam na podlagi izkušenj s predhodnimi inhibitorji tpII α [24, 25, 28] zdele prevelike oziroma premajhne za ugodno interakcijo z vezavnim mestom za ATP in tako zmanjšali število molekul na polovico (150 spojin). Te spojine so predstavljale ciljano kemijsko knjižnico.

Da bi lahko nadalje racionalno skrčili nabor, smo za vse molekule generirali njihove tridimensionalne konformacijske modele (tako za začetnih 5 spojin kot tudi za 150 analogov iz ciljane knjižnice), jih sidrali v vezavno mesto za ATP in dobljene poze vizualizirali ter analizirali dobljene interakcijske vzorce.

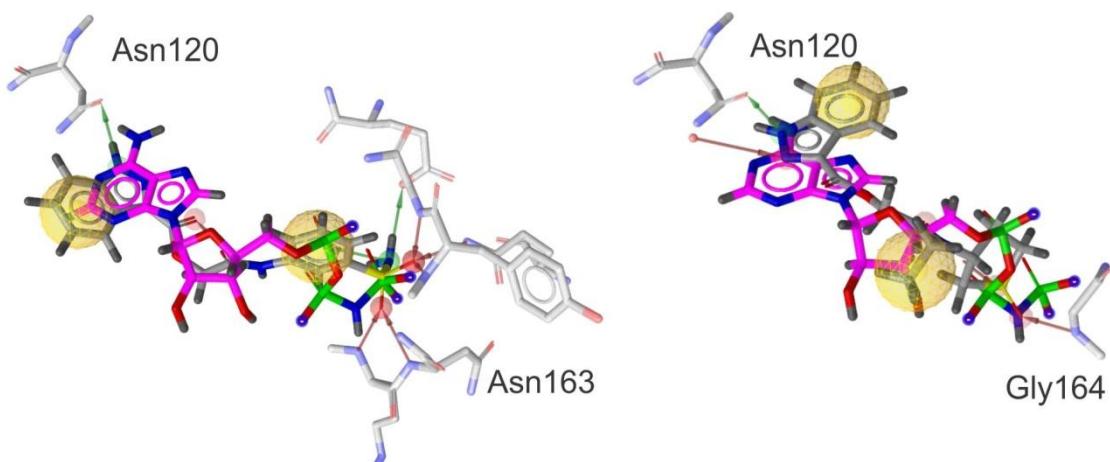
V skladu z uveljavljenimi smernicami računske kemije smo najprej sidrali v aktivno mesto nehidrolizirajoč ATP analog (AMP-PNP), ki je prisoten v uporabljeni 1ZXM kristalni strukturi ATPazne domene tpII α . S tem smo preverili, ali naši pogoji sidranja uspejo reproducirati eksperimentalne rezultate (slika 24).



Slika 24. Validacija metode molekulskega sidranja: Prekrivanje sidrane (rumena) in eksperimentalno (vijolična) določene poze AMP-PNP (pdb 1ZXM). RMSD je znašal 0,68 Å.

Spojine **6-10** so se pri sidranju obnašale po pričakovanjih; 1*H*-indazolni obroč se je prekrival z adenozinskim delom in tvoril interakcijo z Asn120 in sulfonska skupina s fosfati. Podobno je tudi pri neaktivni spojini **9**, a tam je opaziti slabše prekrivanje fosfatnega dela.

Ko smo računsko ovrednotili kako se v ATP žep vežejo *1H*-indazoli, za katere smo že določili zaviralno aktivnost, smo ovrednotili še sidrane konformacije ciljane knjižnice. Prednost smo dali tistim molekulam, katerih *1H*-indazolni obroč se je orientiral podobno kot adenozinski obroč v AMP-PNP (referenčni ligand v pdb: 1ZXM) in tvoril interakcijo z Asn120 in katerih sulfonska skupina se je postavila na mesto fosfatnega dela AMP-PNP ter tvorila potencialne interakcije z aminokislinskimi preostanki ATPazne zanke (Asn163-Lys167) (slika 25). Na tak način smo izbrali 14 molekul, ki smo jih eksperimentalno ovrednotili v testu relaksacijske encimske aktivnosti..

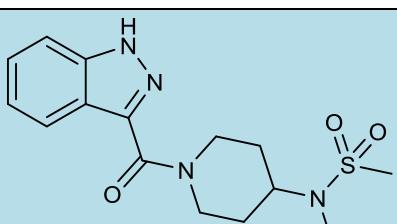
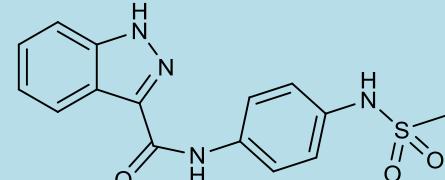
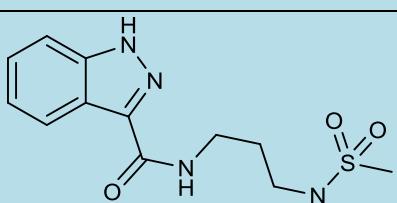
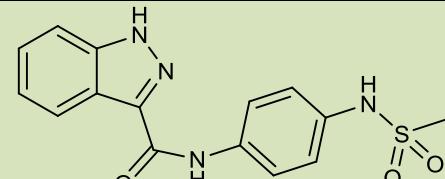
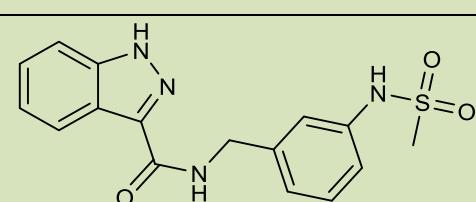
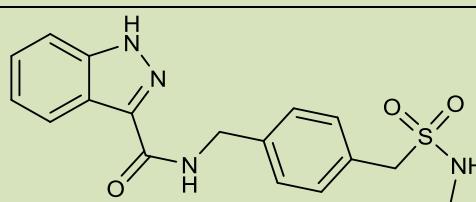
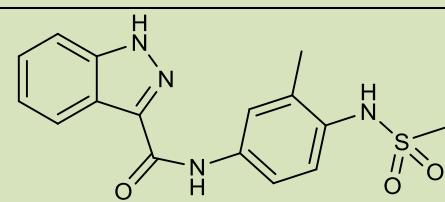


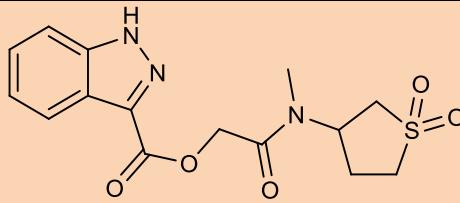
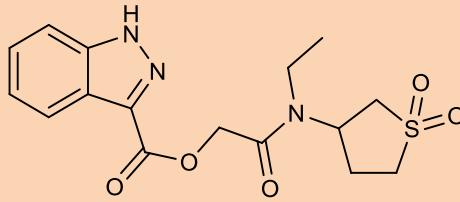
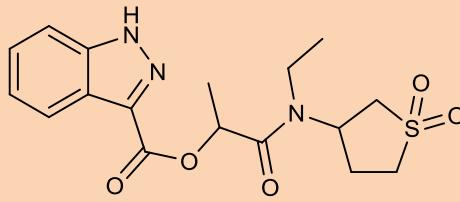
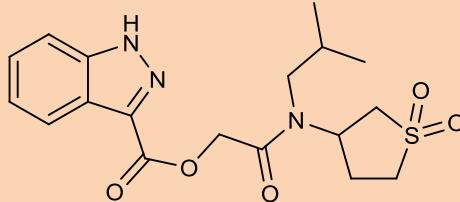
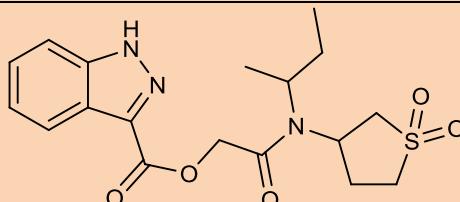
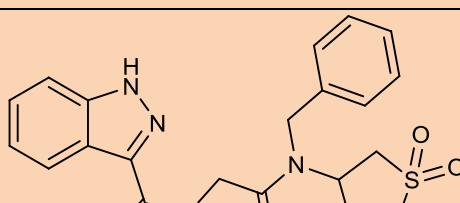
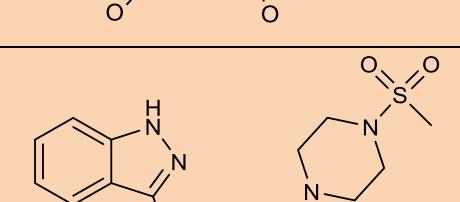
Slika 25. Primerjava sidrane poze spojine **10** (levo) in spojine **19** (desno). Eksperimentalno določena poza AMP-PNP je obarvana vijolično.

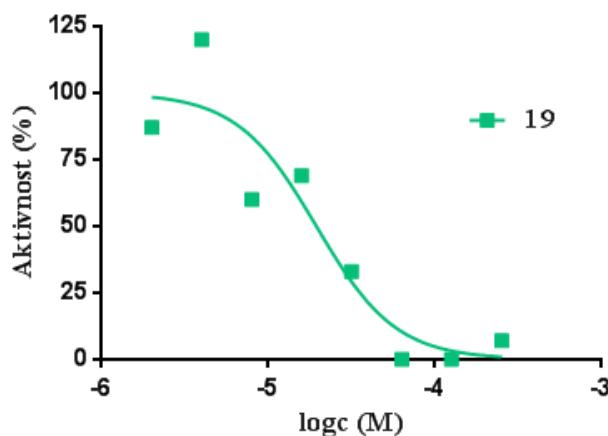
4.3. Ovrednotenje zavirnalnega učinka izbranih analogov *1H*-indazolov na DNA topoizomerazi II α

Analogno s prvo serijo *1H*-indazolov smo aktivnost izbranih analogov iz ciljanje knjižnice spojin ovrednotili z *in vitro* testom relaksacijske encimske aktivnosti tpIIa na mikrotitrski ploščici. Test smo najprej izvedli pri 4 koncentracijah(500 μM , 125 μM , 31,3 μM in 7,8 μM) in pri spojinah, ki so izkazale inhibicijsko delovanje, smo meritve nato ponovili še pri 8 koncentracijah(500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,3 μM , 15,6 μM , 7,8 μM in 3,9 μM). Tudi v tem primeru smo opazili koncentracijsko odvisno zaviranje encima (slika 26) Uspeli smo identificirati 9 novih inhibitorjev: 5 dodatnih spojin z IC_{50} vrednostmi pod 100 μM in 4 spojine z inhibicijskimi vrednostmi med 100 in 500 μM (preglednica V). Identificirali smo tudi spojino **11**, z določeno IC_{50} vrednostjo 13,9 μM , kar je najboljša inhibicijska aktivnost celotne serije.

Preglednica V. Analogi 1*H*-indazolov iz ciljane knjižnice izbrani v drugi stopnji načrtovanja in pripadajoče izmerjene IC₅₀ vrednosti.

Številka spojine	Koda spojine	Struktura formula	IC ₅₀ [μM]	clogP
11	Z872937926		13,9	-0,01
12	Z383955126		>500	1,81
13	Z333471496		381,9	1,04
14	Z236092486		45,8	1,81
15	Z236023762		>500	1,99
16	Z195413970		>500	1,81
17	Z306531102		>500	1,75

18	Z18544409		196,3	0,32
19	Z18544422		24,2	0,85
20	Z112016268		476,7	1,16
21	Z18544585		214,6	1,78
22	Z18544593		>1000	1,69
23	Z18544423		23,6	1,98
24	Z167807570		64,54	1,29



Slika 26. Inhibicijska krivulja v odvisnosti logaritma koncentracije za spojino **19**.

Naše spojine lahko v grobem razdelimo na 3 strukturne podrazrede glede na povezovalec (linker) med 1*H*-indazol-karbaldehidnim obročem in sulfonsko skupino. Najboljši zaviralcji izkazujejo nižjo *in vitro* IC₅₀ vrednost kot uveljavljena učinkovina etopozid (60,3μM) [56].

Spojine **6,11-13** (modro obarvane v preglednicah) imajo piperazin (**6**, 25,1 μM, **11**, 13,9 μM) oziroma analog. Rezultati kažejo, da odprtje piperazinskega obroča (**13**, 381,9 μM) in zamenjava z benzenom (**12**, >500 μM) manj ugodno vplivata na zaviranje. Pri **13** je pri sidranju opaziti več poz kjer sulfonska skupina štrli izven fosfatnega dela.

Spojine **7-9, 18-24**. (oranžno obarvane v preglednicah) vsebujejo amidni fragment, ki je z estrskim delom povezan prek metilena. Neaktivnost spojine **9** nakazuje na pomen sulfonske skupine. Spojini **19** (24,2 μM) in **20** (476,7 μM) nakazujeta na pomen zadostne fleksibilnosti stranske verige; dodatna metilna skupina pri **20** omeji gibljivost in oteži prileganje sulfatne skupine na mesto fosfatov. Etilna (**19**) in benzilna (**23**, 23,6 μM) substitucija na amidnem dušiku pozitivno vplivata na aktivnost, med tem ko manjši (**18**, 196,3 μM) ali vmesni substituenti (**21**, 214,6 μM **22**, neaktivna) zmanjšajo aktivnost. Benzilni del je dovolj velik, da lahko tvori interakcije z lipofilnimi AK v aktivnem mestu(Ile141, Ile125), med tem ko sta 2-butil in izobutil premajhna in zgolj prispevata k prekomerni fleksibilnosti molekule.

Spojine **14-17** (zeleno obarvane v preglednicah) imajo v svoji strukturi aromatski povezovalec. Neaktivnost spojin **15-17** kaže, da je nesubstituiran benzen nujen za aktivnost pri tej podskupini.

4.4. Biofizikalna karakterizacija najobetavnejših spojin $1H$ -indazolnega razreda

V želji po boljšem mehanističnem razumevanju, smo nekatere obetavne spojine iz odkritega $1H$ -indazolnega razreda okarakterizirali še z drugimi metodami; tako eksperimentalnimi kot teoretičnimi. S tem smo želeli dobiti podroben vpogled v delovanje spojin in potrditi katalitični mehanizem inhibicije in vezavo na ATPazno domeno (ter indirektno s tem tudi vezavno mesto za ATP).

4.4.1. Eksperimenti vezave na ATPazno domeno z Mikrotermoforezo (MicroScale Thermophoresis - MST)

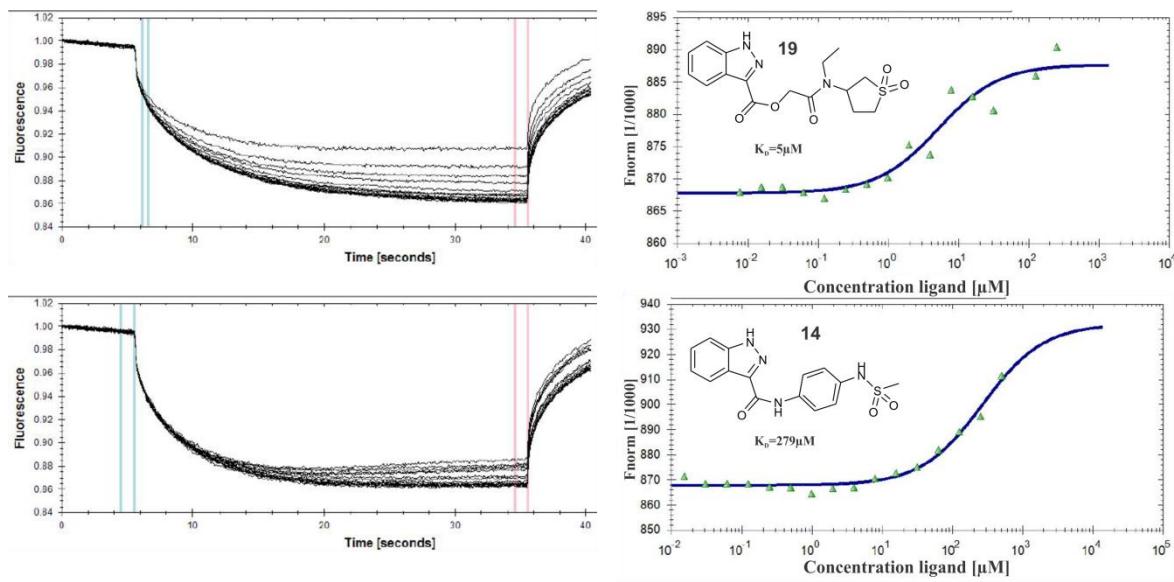
Z metodo mikrotermoforeze (MicroScale Thermophoresis, MST) smo preverili vezavo spojin **7**, **14**, **19** in **23** na ATPazno domeno. Ker tpII α nudi več potencialnih vezavnih mest in mehanizmov inhibicije (glej sliko 5), smo uporabili reduktionističnim pristop; vezavo nismo študirali na celiem encimu ampak zgolj na ATPazni domeni, kjer se nahaja vezavno mesto za ATP, ki je načeloma edino vezavno mesto na tej domeni [12].

Zaradi nezadostne topnosti smo nasičenje uspeli doseči zgolj pri spojini **19**, a tudi pri ostalih spojinah je bila jasno vidna koncentracijska odvisnost vezave. Na sliki 27 prikazujemo vezavo za **19** in **14**. Podobnost izračunanih Kd in IC₅₀vrednosti nakazuje, da se naše spojine vežejo na ATPazno domeno, in da je ta vezava odgovorna za inhibitorni učinek, saj ima ta domena zgolj eno vezavno mesto (vezavno mesto za ATP). Zato MST eksperiment predstavlja tudi posredni dokaz, da se naše spojine vežejo vanj, tako kot smo prvotno načrtovali.

Preglednica VI. Primerjava IC₅₀vrednosti in izmerjenih Kd z metodo MST.

Številka spojine	IC ₅₀ [μM]	Kd [μM]
7	28,9	126*
14	45,8	279*
19	24,2	5
23	23,6	81*

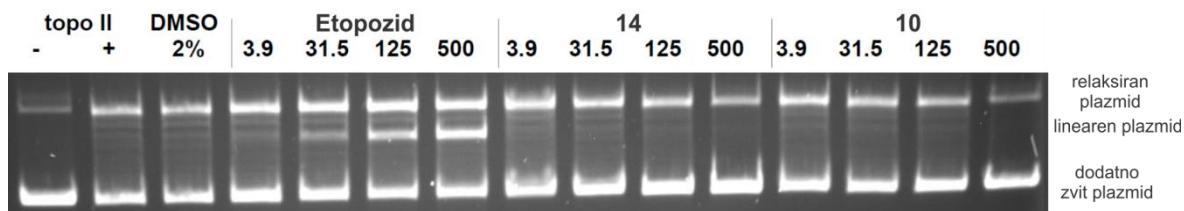
* zaradi nezadostne topnosti ni prišlo do nasičenja.



Slika 27. Dobljen termogram in MST vezavna krivulja za spojini **19** (zgoraj) in **14** (spodaj). Pri spojini **14** ne pride do popolnega nasičenja zaradi slabe topnosti pri višjih koncentracijah.

4.4.2. Test spodbujanja cepitve – Cleavage assay

V prvi stopnji smo okarakterizirali spojine **10** in **14** v klasičnem testu cepitve, ki smo ga opisali v poglavju Materiali in metode. Vsako spojino smo pomerili pri 4 koncentracijah ($500 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $31,3 \mu\text{M}$ in $7,8 \mu\text{M}$) in izvedli ustrezne pozitivne in negativne kontrole. Za validacijo nam je služil znanistrup etopozid. Rezultati dobljenega gela so prikazani na sliki 28.



Slika 28. Običajni test cepitve; pozitivna in negativna kontrola, etopozid, spojina **14**, spojina **10**. Pri spojinah **10** in **14** ni vidnega pasa linearne DNA, kar potrjuje da nistastrup.

Pri višjih koncentracijah etopozida je izrazito viden pas linearne DNA, ki pa je odsoten pri naših spojinah, kar potrjuje, da nobena izmed njih ni strup; ne spodbujajo cepitev in s tem nastanek linearnega plazmida. Pri višjih koncentracijah spojin **10** in **14** je pas relaksiranega plazmida manj intenziven in pas z dodatno zvitim plazmidom bolj intenziven, kar je še en dokaz, da spojini inhibirata tpII α ; preprečita relaksacijo dodatno zvitega plazmida.

S kompetitivnim testom cepitve smo tudi preverili ali naše spojine zavirajo etopozid pri spodbujanju cepitve DNA (slika 29). Fiksni koncentraciji etopozida ($62,5 \mu\text{M}$) smo dodali različne koncentracije spojin **10** in **14** ($500 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $31,3 \mu\text{M}$ in $7,8 \mu\text{M}$).

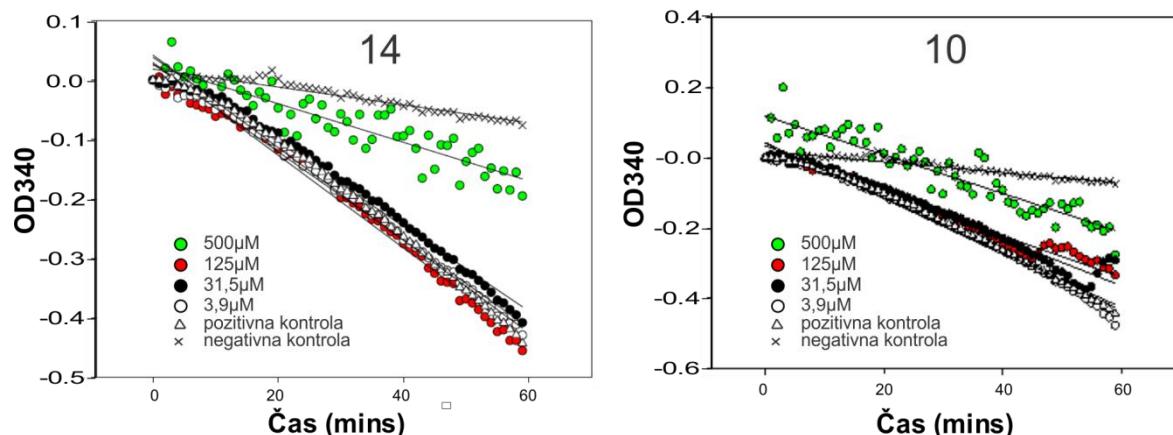


Slika 29. Kompetitivni test spodbujanja cepitve; fiksni koncentraciji etopozida ($62,5 \mu\text{M}$) smo dodali naraščajoče koncentracije spojin **10** in **14**, da bi preverili ali naše spojine zavirajo cepitev DNA, ki jo spodbuja etopozid.

Spojina 10 je uspešno zavirala spodbujanje cepitve s strani etopozida; pas linearne DNA je šibkeje obarvan že pri koncentraciji $31,5 \mu\text{M}$. Spojina 14, ki ima slabši IC_{50} od 10, pa je zgolj šibko zavirala etopozid pri koncentraciji $500 \mu\text{M}$.

4.4.3. Test zaviranja ATPazne aktivnosti **1H-indazolov**

Za spojini 10 in 14 smo tudi preverili ali zavirata hidrolizo ATP. Obe spojini sta bili pomerjeni pri 4 koncentracijah ($500 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $31,3 \mu\text{M}$ in $7,8 \mu\text{M}$) in etopozid je služil kot kontrolna spojina (slika 30). Test zaviranja ATPazne aktivnosti služi še kot en indikator, da gre za inhibitorje tpII α in da spojine delujejo po predpostavljenem mehanizmu; zasedanje vezavnega mesta za ATP. Rezultati meritev so predstavljeni na grafih na sliki 30.



Slika 30. (Levo) Rezultati meritev za 14 in (desno) za 10.

Spojina 14 je zavirala hidrolizo pri visokih koncentracijah ($500 \mu\text{M}$), hidroliza ATP je počasnejša, zato je tudi padec optične gostote počasnejši – bolj položen naklon krivulje skozi zelene točke. Spojina 10 pa se je pri tej koncentraciji že začela obarjati, zato so točke bolj raztresene in je učinek težje presoditi.

Sinteza rezultatov iz vseh testov nam omogoča, da zanesljivo trdimo, da so naši zaviralcji katalitične narave in velika verjetnost je, da drži naš predpostavljen mehanizem zaviranja; zasedanje vezavnega mesta za ATP, saj je na ATPzni domeni, na katero smo Z MST potrdili vezavo, zgolj 1 predpostavljenou vezavno mesto.

4.4.4. Citotoksičnost spojin 1*H*-indazolnega razreda

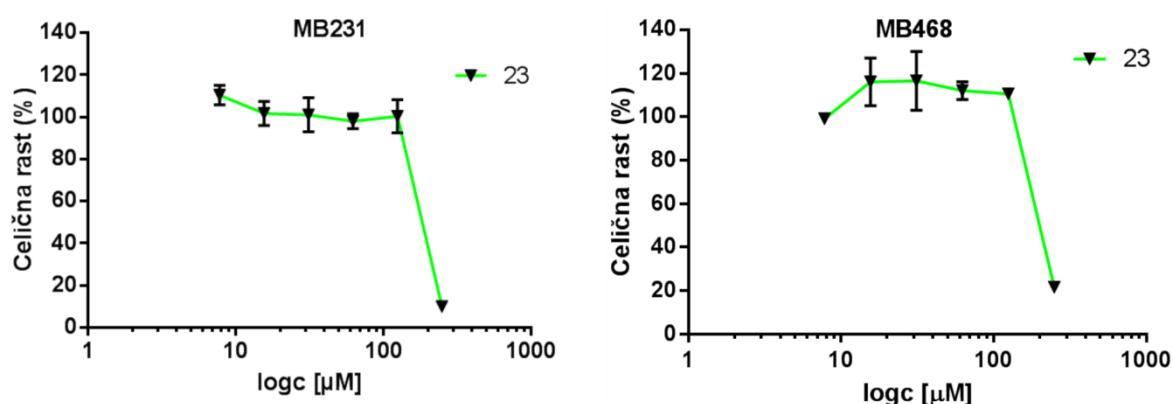
Zato, da bi ovrednotili citotoksične lastnosti 1*H*-indazolnega razreda, smo se poslužili standardnega MTT testa. Testirali smo spojine **6**, **7**, **11**, **14**, **19**, **23** na dveh celičnih linijah raka dojke MDA-MB-468 in MDA-MB-231 (preglednica VII).

Preglednica VII. Povzetek dobljenih EC₅₀ vrednosti izbrane serije 1*H*-indazolov na izbranih rakavih celičnih linijah.

Številka spojine	MDA-MB-468 EC ₅₀ [μM]	MDA-MB-231 EC ₅₀ [μM]
6	251,8	>500
7	352,2	>500
11	>500	>500
14	BM	273,5
19	>500	>500
23	236,4	221,8

BM = brez meritve

Nekatere spojine iz 1*H*-indazolnega razreda so pokazale začetno celično aktivnost, a je nedvomno potrebna še nadaljnja optimizacija teh spojin, da bi lahko govorili o uporabnih citotoksičnih spojinah. Glavni razlog za naša opažanja je verjetno prenizka afiniteta do izbrane tarče.



Slika 31. Celična rast v odvisnosti od logaritma koncentracije za spojino **23** na celičnih linijah linijah MDA-MB-468 in MDA-MB-231.

4.4.5. Ovrednotenje sidrane vezavne poze *1H*-indazola **19** z metodo klasične molekulske dinamike (MD)

Da bi bolje preučili predpostavljen statični vezavni model *1H*-indazolov, ki smo ga dobili s pomočjo molekulskega sidranja, smo se odločili tudi za vpogled v dinamično obnašanje naše molekule. V ta namen smo pripravili in analizirali 30 ns dolgo klasično simulacijo molekulske dinamike (MD) predpostavljene vezavne poze spojine **19** v vezavnem mestu za ATP z uporabo polja sil CHARMM [49].

Po končani MD simulaciji smo se v analizi dobljenih rezultatov osredotočili na dva ključna parametra, ki sta nam podala podatke o obnašanju vezavne poze v generiranem molekulskem ansamblu, ki je v omejenem obsegu opisoval fazni prostor dostopen sistemu. Poudariti moramo, da so naši simulacijski časi (nekaj 10 ns) še vedno relativno kratki v primerjavi z realističnim faznim prostorom, ki bi ga morali opisati za dani sistem, da bi dobili popolno sliko vezave in medmolekulskega prepoznavanja. Realistični časi so namreč na nivoju nekaj milisekund (ms) in so trenutno dostopni le redkim superračunalniškim centrom po svetu [62]. Navkljub temu pa je vzorčenje v tej študiji dober prvi približek, ki potrjuje uporabnost predvidene vezavne poze tega razreda za nadaljnje načrtovanje.

Prvi parameter, ki smo ga izračunali, je bil RMSD (Root-Mean-Square Deviation) parameter, ki predstavlja standardno deviacijo izbranih atomskih razdalj med različnimi pari ekivalentnih atomov (enačba 3). V našem primeru za referenčno strukturo izberemo sidrano konformacijo **19** in nato opazujemo časovni potek RMSD parametra skozi čas relativno glede na izhodno sidrano konformacijo.

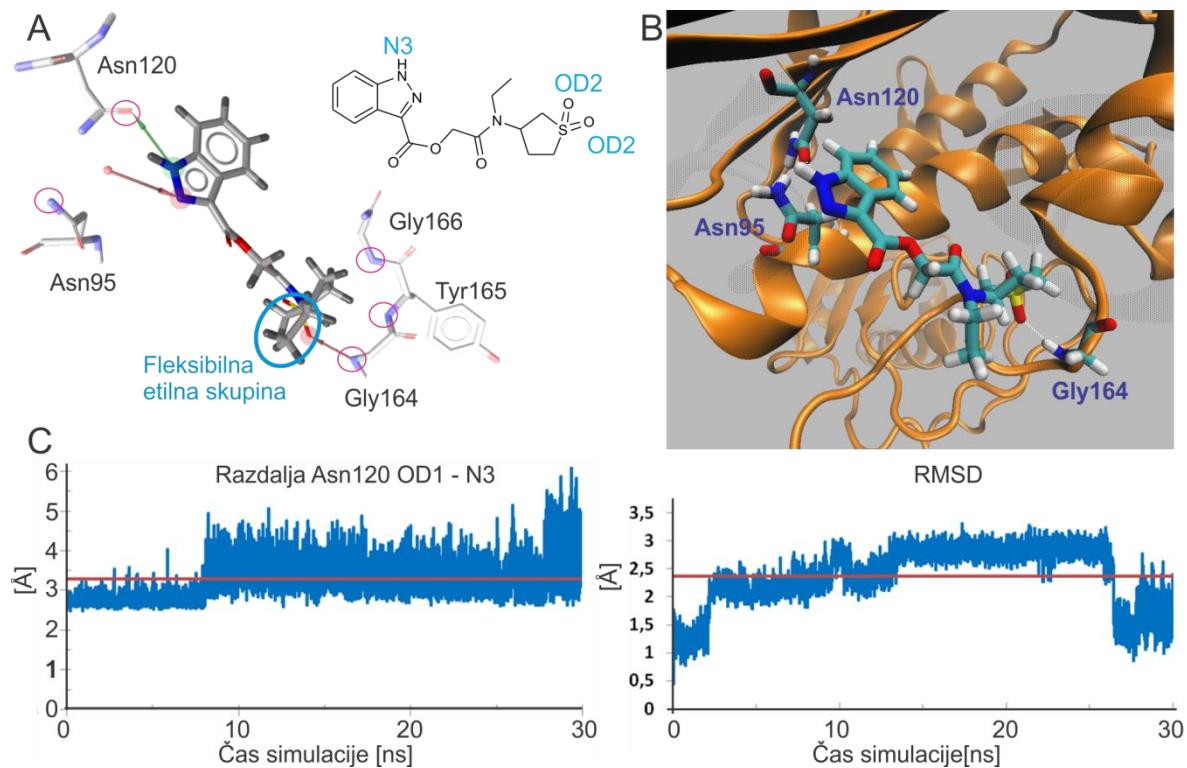
$$(3) \quad RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i,j=1}^N d_{i,j}^2}{N}}$$

Pri čemer je d_{ij} razdalja med istima atomoma v različni konformaciji in N število opazovanih atomskih parov.

Spojina **19** je tekom MD simulacije ostala dokaj stabilna, a fleksibilna stranska veriga (etilenska skupina na amidnem dušiku) je prispevala k nekoliko višjemu povprečnemu RMSD ($2,4 \pm 0,5 \text{ \AA}$) (slika 32, C). Po približno 26 ns simulacije se stranska veriga spojine

19 reorientira v konformacijo podobno kot pri začetni pozicii in RMSD vrednost se zopet zmanjša.

Drugi opazovani parameter analize MD simulacije, pa so bile nekatere medatomske razdalje, ki smo jih merili tukaj med MD simulacijo med aktivnim mestom in spojino **19**. Glavna predpostavljena interakcija, ki smo jo opazili v molekulskega sidranju (karbonilni kisik Asn120 - hidrogeniran dušik v indazolnem obroču), se je izkazala za dokaj stabilno ($3,3 \pm 0,5$ Å). Druga predpostavljena interakcija med ogrodnim dušikom Gly164 in sulfatnim kisikom pa je bila manj stabilna ($4,8 \pm 0,8$ Å) in zgleda manj prispeva k celokupni vezavi. Vodikova vez z Asn95 ($3,9 \pm 0,5$ Å) je bila predpostavljena kot indirektna, preko vodne molekule, in tukaj celotne simulacije se v bližini atomskega para zadržuje voda, ki bi lahko služila kot "most" med obema atomoma.



Slika 32. (A) Začetna sidrana vezava po spojini **19**; z vijolično so obkroženi proteinski atomi, med katerimi smo analizirali možnost tvorbe H-vezi. (B) Konformacija spojine **19** po 30 ns MD simulacije. (C) Analiza molekulske dinamike; na levi je časovna odvisnost razdalje med karbonilnim atomom stranske verige Asn120 in N3 dušikom na **19**, na desni pa časovna odvisnost RMSD za spojino **19**.

Analizirali smo tudi nekatere druge interakcije, ki jih sidranje ni predvidelo za to spojino, a so bile verjetne zaradi bližine AK. Nobena od teh interakcij se ni izkazala kot dovolj stabilna, da bi jo lahko obravnavali kot ugodno (preglednica VIII).

Preglednica VIII. Interakcije med sidrano konformacijo spojine **19** in ATP vezavnim mestom, ki smo jih analizirali tekom 30 ns simulacije molekulske dinamike.

Atomska para	Povprečna razdalja [Å]
Asn120 OD1 – N3	3,4 ±0,5
Gly164 N – O2	4,8±0,8
Asn95 ND2 – N3	3,9 ±0,5
Gly166 N – O2	6,8±0,9
Tyr165 N – O1	4,5±0,8

5. Sklep

Kljub temu, da je tpII α že dolgo znana in validirana tarča protirakavih zdravilnih učinkovin, so neželeni učinki (predvsem kardiotoksičnost) in breme do pacientov še vedno problematični in kličejo po razvoju novih učinkovin. Kompleksni katalitični cikel encima tpII α omogoča obstoj mnogih alternativnih inhibicijskih mehanizmov, ki, za razliko od topoizomeraznih strupov, ne povzročijo nastanka terciarnega kompleksa, ki deluje kot celični strup. Zato smo si v našem delu zadali za nalogu razširitev kemijskega prostora znanih katalitičnih inhibitrojev tpII α z delovanjem na vezavnem mestu za ATP in naredili korak naprej do novih zdravilnih učinkovin, ki bi izkoriščale alternativni mehanizem na tej uveljavljeni tarči.

Z uporabo validiranega farmakofornega modela na osnovi aktivnih ligandov smo uspešno izvedli virtualno rešetanje naše interne knjižnice spojin in odkrili novi obetavni razred 1H-indazolov kot zaviralcev tpII α . V drugi stopnji načrtovanja smo z uporabo molekulskega sidranja in naših prejšnjih izkušenj z načrtovanjem inhibitorjev tpII α uspešno razširili serijo in pridobili nadaljnje podatke o povezavi med strukturo in delovanjem (SAR) za obravnavani razred. Najboljši zaviralci so izkazali boljšo in vitro zaviralno aktivnost kot klinično uveljavljena učinkovina etopozid. Postavili smo tudi predviden vezavni model teh spojin v vezavnem mestu za ATP.

Nadalje smo z dodatnimi eksperimenti natančno preiskali zaviralni učinek naših molekul in opisali mehanizem delovanja. S testom spodbujanja cepitve smo dokazali, da naše spojine niso strupi in da zavirajo delovanje znanega strupa, etopozida. Test ATPazne aktivnosti je tudi potrdil naš inhibicijski učinek in predpostavljeni mehanizem zaviranja. Z metodo Mikrotermoforeze (MST) smo potrdili vezavo spojin na ATPazno domeno in s tem indirektno tudi v predpostavljeni vezavno mesto (vezavno mesto za ATP), ki je bilo predmet načrtovanja. Predpostavljeni vezavno pozno za izbranega predstavnika 1H-indazolnega razreda smo študirali tudi s pomočjo molekulske dinamike (MD) in ugotovili pomen Asn120 za uspešno medmolekulsko prepoznavanje. Spojine so pokazale šibko citotoksičnost; vendar ta lastnost kot tudi še ne optimalna afiniteta do izbrane tarče predstavlja dva pomembna cilja nadaljnje optimizacije. Naše raziskave kažejo na to, kako plodovita je združitev *in silico* ter *in vitro* metod in avtorji si bodo prizadevali, da bo takega sodelovanja v prihodnosti še čim več.

6. Literatura

1. Bates AD, and Maxwell A. DNA topology: Topoisomerases keep it simple. *Curr Biol* 1997; 7: R778-R781.
2. Hsieh TS, and Plank JL. Reverse gyrase functions as a DNA renaturase - Annealing of complementary single-stranded circles and positive supercoiling of a bubble substrate. *J Biol Chem* 2006; 281: 5640-5647.
3. Champoux JJ. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 369-413.
4. Fortune JM, and Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 64 2000; 64: 221-253.
5. Jeppsson K, Kanno T, Shirahige K, and Sjogren C. The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2014; 15: 601-614.
6. Dutta R, and Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 24-28.
7. Wendorff TJ, Schmidt BH, Heslop P, Austin CA, and Berger JM. The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *J Mol Biol* 2012.
8. Roca J. Topoisomerase II: a fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 721-730.
9. Wolber G, and Langer T. LigandScout: 3-d pharmacophores derived from protein-bound Ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2005; 45: 160-169.
10. Skouboe C, Bjergbaek L, Oestergaard VH, Larsen MK, Knudsen BR, and Andersen AH. A human topoisomerase II alpha heterodimer with only one ATP binding site can go through successive catalytic cycles. *J Biol Chem* 2003; 278: 5768-5774.
11. Pogorelčnik B, Perdih A, and Solmajer T. Recent developments of DNA poisons--human DNA topoisomerase IIalpha inhibitors--as anticancer agents. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 2474-2488.
12. Wei H, Ruthenburg AJ, Bechis SK, and Verdine GL. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 2005; 280: 37041-37047.
13. Pogorelčnik B, Perdih A, and Solmajer T. Recent Developments of DNA Poisons - Human DNA Topoisomerase II alpha Inhibitors - as Anticancer Agents. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 2474-2488.
14. Pogorelčnik B, Janežič M, and Andrej P. Zaviralci dna topoizomeraze II α - pomembne tarče protirakovih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2015; 66: 326-333.
15. Baldwin EL, and Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5: 363-372.
16. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1514-1521.
17. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, and Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185-229.
18. Lin HW, Kwok KH, and Doran PM. Production of podophyllotoxin using cross-species coculture of *Linum flavum* hairy roots and *Podophyllum hexandrum* cell suspensions. *Biotechnol Progr* 2003; 19: 1417-1426.
19. Bandele OJ, and Osheroff N. Epigallocatechin gallate (EGCG), a major constituent of green tea, poisons human type II topoisomerases. *Environ Mol Mutag* 2007; 48: 565-565.

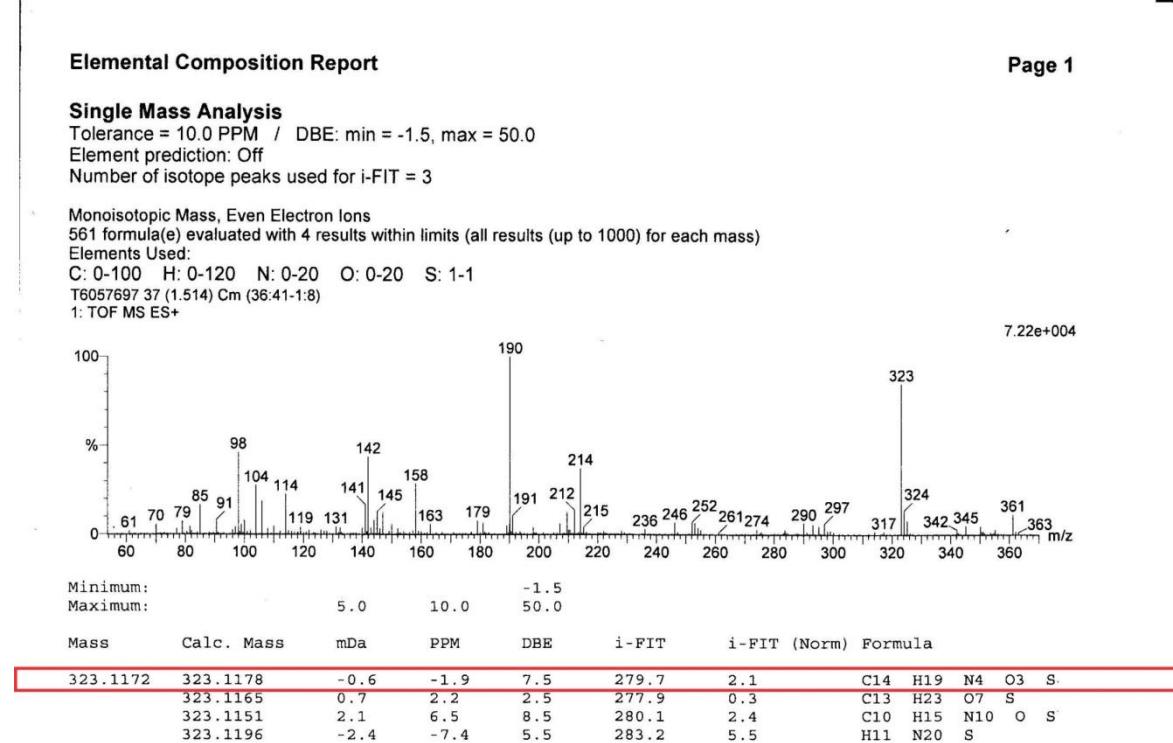
20. Pogorelčnik B, Perdih A, and Solmajer T. Recent Advances in the Development of Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II alpha As Novel Anticancer Agents. *Curr Med Chem* 2013; 20: 694-709.
21. Nitiss JL, Pourquier P, and Pommier Y. Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes. *Cancer Res* 1997; 57: 4564-4569.
22. Case DC, Ervin TJ, Boyd MA, Bove LG, Sonneborn HL, and Paul SD. Phase-II Study of Aclarubicin in Acute Myeloblastic-Leukemia. *Am J Clin Oncol* 1987; 10: 523-526.
23. Larsen AK, Eseargueil AE, and Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 167-181.
24. Pogorelčnik B, Janežič M, Sosič I, Gobec S, Solmajer T, and Perdih A. 4,6-Substituted-1,3,5-triazin-2(1H)-ones as monocyclic catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase IIalpha targeting the ATP binding site. *Bioorg Med Chem* 2015; 23: 4218-4229.
25. Pogorelčnik B, Brvar M, Zajc I, Filipič M, Solmajer T, and Perdih A. Monocyclic 4-amino-6-(phenylamino)-1,3,5-triazines as inhibitors of human DNA topoisomerase IIα. *Bioorg Med Chem Lett* 2014.
26. Qin Y, Meng L, Hu C, Duan W, Zuo Z, Lin L, Zhang X, and Ding J. Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIα by binding to its ATPase domain. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2429-2440.
27. Andoh T. Bis(2,6-dioxopiperazines), catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, as molecular probes, cardioprotectors and antitumor drugs. *Biochimie* 1998; 80: 235-246.
28. Pogorelčnik B, Brvar M, Zegura B, Filipič M, Solmajer T, and Perdih A. Discovery of Mono- and Disubstituted 1H-Pyrazolo[3,4]pyrimidines and 9H-Purines as Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II alpha. *ChemMedChem* 2015; 10: 345-359.
29. Abad-Zapatero C. Ligand efficiency indices for effective drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2007; 2: 469-488.
30. Perdih A, Kotnik M, Oblak M, and Šolmajer T. Uporaba računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farm Vestn* 2010; 61: 195-202.
31. Jukič M, Perdih A, and Šolmajer T. Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod. *Farm Vestn* 2012; 63: 54-63.
32. <https://www.cas.org/content/counter>. Dostopano: 15.2.2016
33. Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 2004; 432: 862-865.
34. Klebe G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov Today* 2006; 11: 580-594.
35. Vuorinen A, and Schuster D. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. *Methods* 2015; 71: 113-134.
36. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, and Pečar S. Farmacevtska kemija III. Vaje in seminarji. Fakulteta za farmacijo 2010.
37. Triballeau N, Acher F, Brabet I, Pin JP, and Bertrand HO. Virtual screening workflow development guided by the "receiver operating characteristic" curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. *J Med Chem* 2005; 48: 2534-2547.
38. Langer T, and Hoffmann RD. (2006) Pharmacophores and Pharmacophore Searches, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, Weinheim.
39. Hawkins PCD, Skillman AG, Warren GL, Ellingson BA, and Stahl MT. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2010; 50: 572-584.
40. www.emolecules.com. Dostopano: 10.2.2016
41. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, and Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del Rev* 1997; 23: 3-25.

42. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, and Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 935-949.
43. Rarey M, Kramer B, Lengauer T, and Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* 1996; 261: 470-489.
44. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, and Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible ligand docking. *Abstr Pap Am Chem S* 1997; 214: 154-COMP.
45. Clark RD, Strizhev A, Leonard JM, Blake JF, and Matthew JB. Consensus scoring for ligand/protein interactions. *J Mol Graphics Model* 2002; 20: 281-295.
46. Karplus M, and McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 646-652.
47. Perdih A. Dinamični model encima MurD iz *E. coli* in *in silico* načrtovanje novih inhibitorjev, Ljubljana
48. http://lorentz.immstr.pasteur.fr/pdb/frozen_submission.php. Dostopano: 15.2.2016
49. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, and Karplus M. CHARMM - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem* 1983; 4: 187-217.
50. Jo S, Kim T, Iyer VG, and Im W. Software news and updates - CHARNIM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* 2008; 29: 1859-1865.
51. MacKerell AD. Developments in the CHARMM all-atom empirical energy function for biological molecules. *Abstr Pap Am Chem S* 1998; 216: U696-U696.
52. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, and Klein ML. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J Chem Phys* 1983; 79: 926-935.
53. Humphrey W, Dalke A, and Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph Model* 1996; 14: 33-38.
54. Maxwell A, Burton NP, and O'Hagan N. High-throughput assays for DNA gyrase and other topoisomerases. *Nucleic Acids Res* 2006; 34.
55. Ryan AJ, Gray NM, Lowe PN, and Chung CW. Effect of detergent on "promiscuous" inhibitors. *J Med Chem* 2003; 46: 3448-3451.
56. Wu WB, Ou JB, Huang ZH, Chen SB, Ou TM, Tan JH, Li D, Shen LL, Huang SL, Gu LQ, and Huang ZS. Synthesis and evaluation of mansonone F derivatives as topoisomerase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 3339-3347.
57. Osheroff Neil, and Mary-Ann B (2000) *DNA Topoisomerase Protocols* Vol. II: Enzymology and Drugs.
58. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, and Duhr S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* 2011; 9: 342-353.
59. Duhr S, and Braun D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 19678-19682.
60. pHrodo® Red Maleimide (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P35371>). Dostopano: 2.2016
61. www.graphpad.com. Dostopano: 2.2016
62. Pan AC, Borhani DW, Dror RO, and Shaw DE. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics. *Drug Discov Today* 2013; 18: 667-673.

7. Dodatek

7.1. HRMS Masni spektri za izbrane spojine

Spojina 6



Spojina 7

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

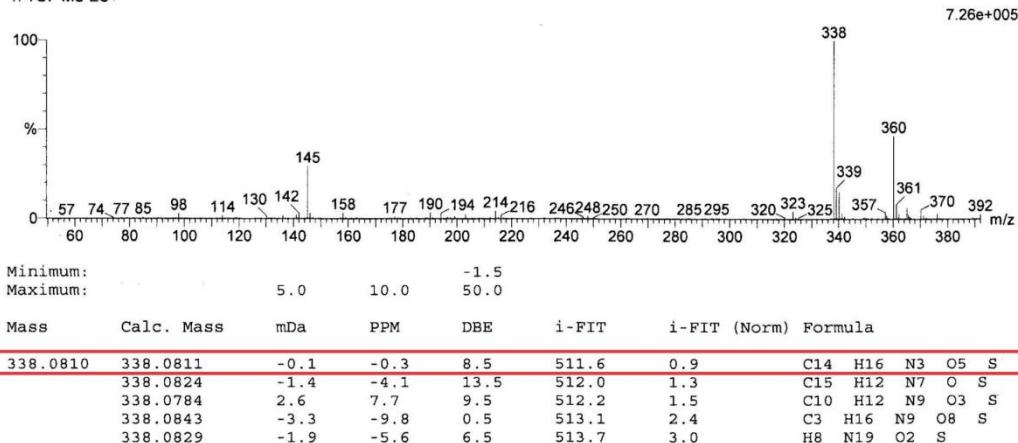
617 formula(e) evaluated with 5 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z18544208 17 (0.702) Cm (14:17)

1: TOF MS ES+



Spojina 10

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

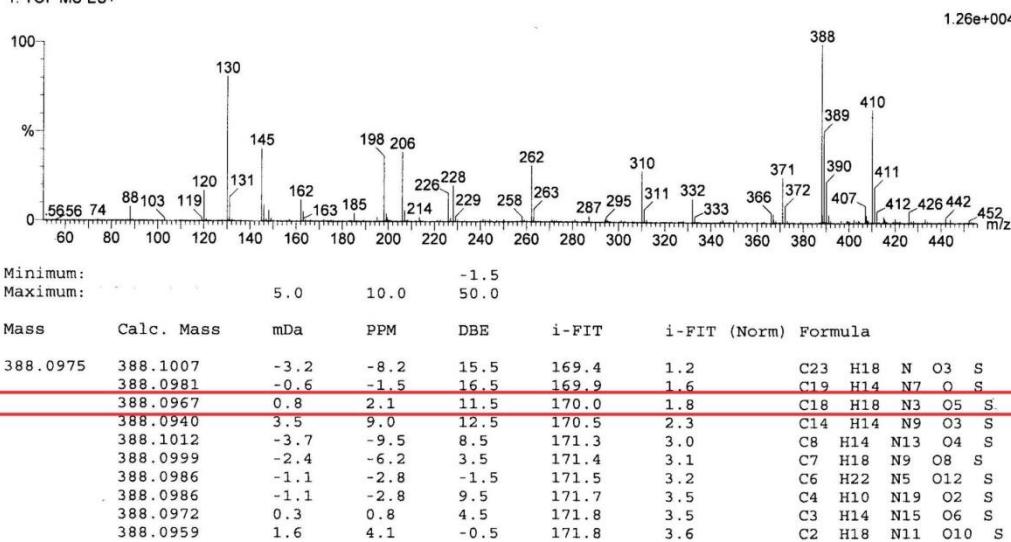
880 formula(e) evaluated with 10 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

T6244805 20 (0.813) Cm (18:20:3:12)

1: TOF MS ES+



Spojina 11

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

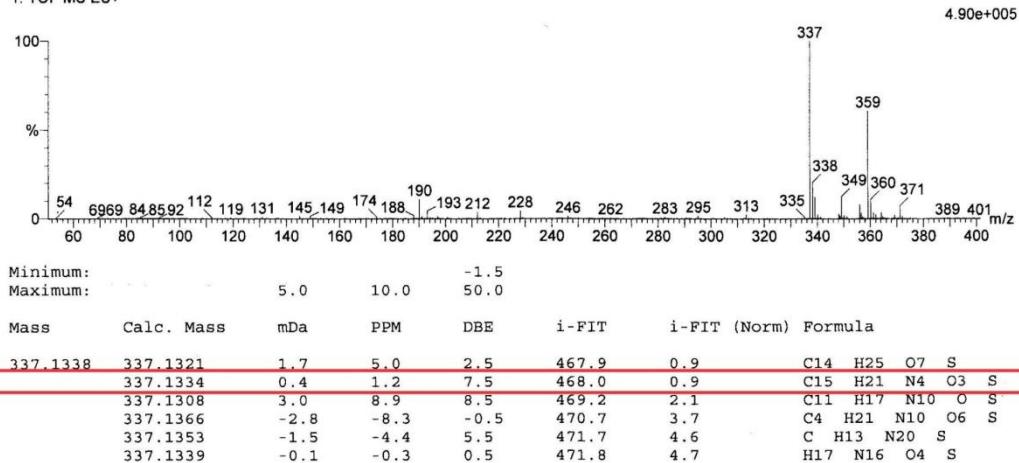
627 formula(e) evaluated with 6 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z872937926 24 (0.978) Cm (24.25-54.60)

1: TOF MS ES+



Spojina 13

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

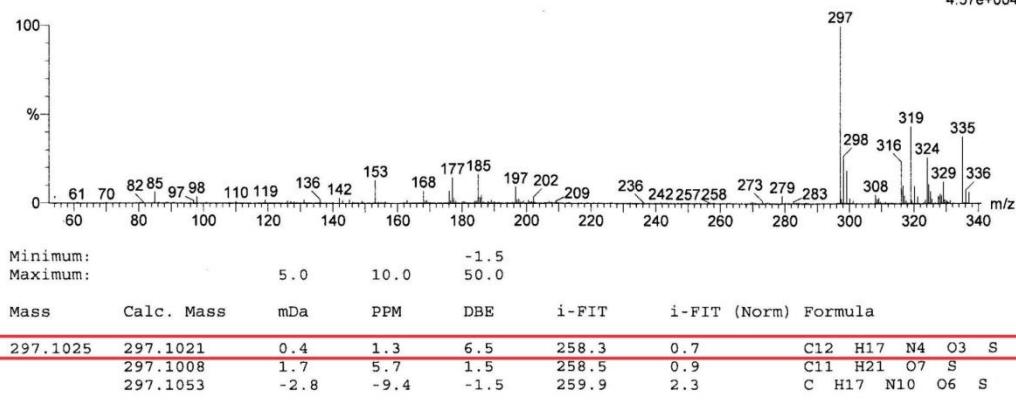
445 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z333471496 47 (1.920) Cm (46.50-4.15)

1: TOF MS ES+



Spojina 14

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

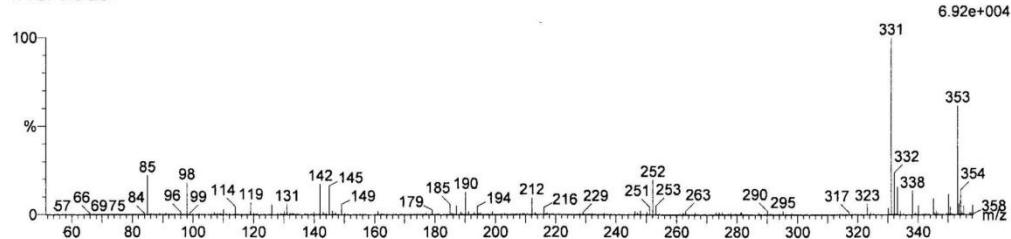
599 formula(e) evaluated with 6 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z236092486 33 (1.347) Cm (32:35-1:8)

1: TOF MS ES+



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
331.0868	331.0865	0.3	0.9	10.5	346.2	1.0	C15 H15 N4 O3 S
	331.0852	1.6	4.8	5.5	346.4	1.1	C14 H19 O7 S
	331.0838	3.0	9.1	11.5	347.0	1.8	C11 H11 N10 O S
	331.0897	-2.9	-8.8	2.5	348.0	2.8	C4 H15 N10 O6 S
	331.0883	-1.5	-4.5	8.5	348.5	3.3	C H7 N20 S
	331.0870	-0.2	-0.6	3.5	348.8	3.5	H11 N16 O4 S

15

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

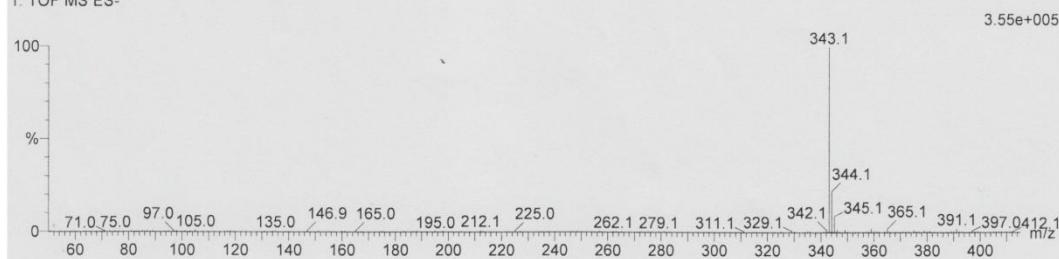
661 formula(e) evaluated with 8 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z236023762 28 (1.144) Cm (26:29)

1: TOF MS ES-



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
343.0863	343.0865	-0.2	-0.6	11.5	491.1	0.2	C16 H15 N4 O3 S
	343.0852	1.1	3.2	6.5	492.5	1.6	C15 H19 O7 S
	343.0838	2.5	7.3	12.5	495.7	4.9	C12 H11 N10 O S
	343.0883	-2.0	-5.8	-1.5	499.2	8.3	C4 H19 N6 O10 S
	343.0897	-3.4	-9.9	3.5	499.2	8.4	C5 H15 N10 O6 S
	343.0883	-2.0	-5.8	9.5	501.4	10.5	C2 H7 N20 S
	343.0870	-0.7	-2.0	4.5	501.7	10.8	C H11 N16 O4 S
	343.0857	0.6	1.7	-0.5	502.3	11.5	H15 N12 O8 S

61

Spojina 16

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

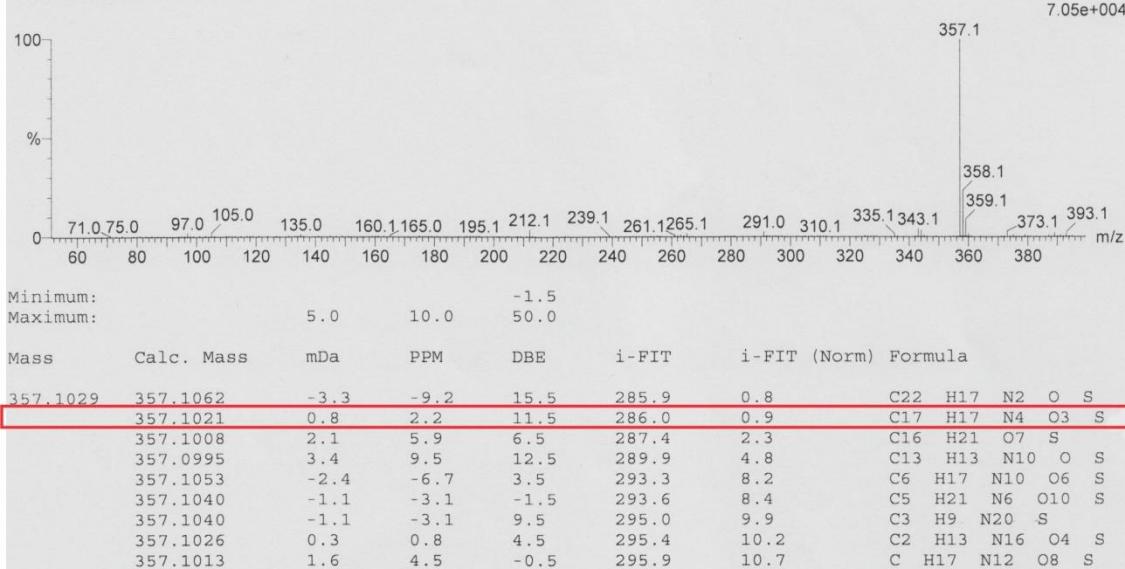
733 formula(e) evaluated with 9 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z195413970 25 (1.016) Cm (25.26)

1: TOF MS ES-



Spojina 17

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

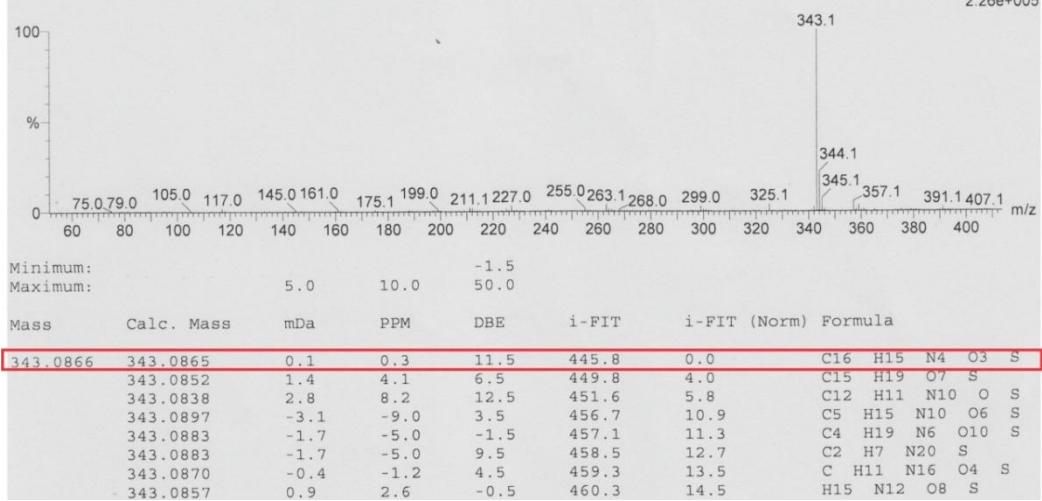
661 formula(e) evaluated with 8 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z306531102 27 (1.109) Cm (26.29)

1: TOF MS ES-



Spojina 18

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

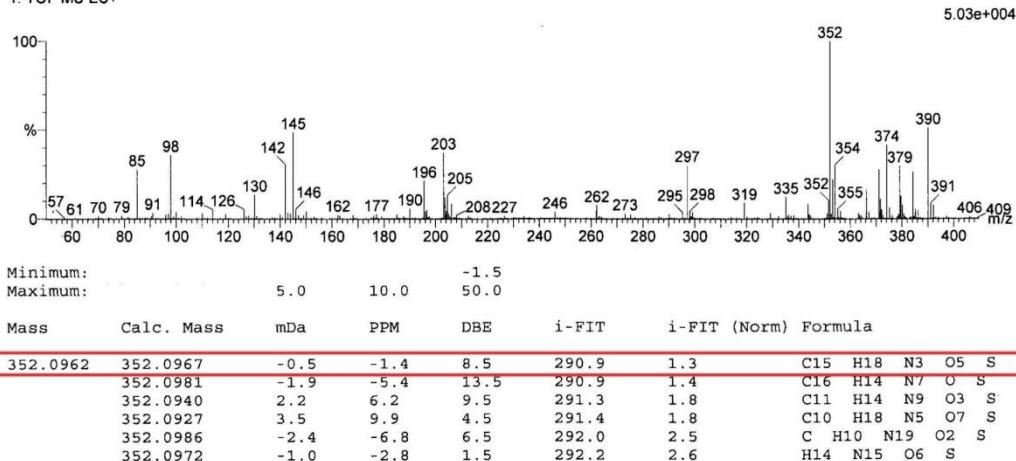
689 formula(e) evaluated with 6 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z18544409 54 (2.196) Cm (51:55-20:31)

1: TOF MS ES+



Spojina 19

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

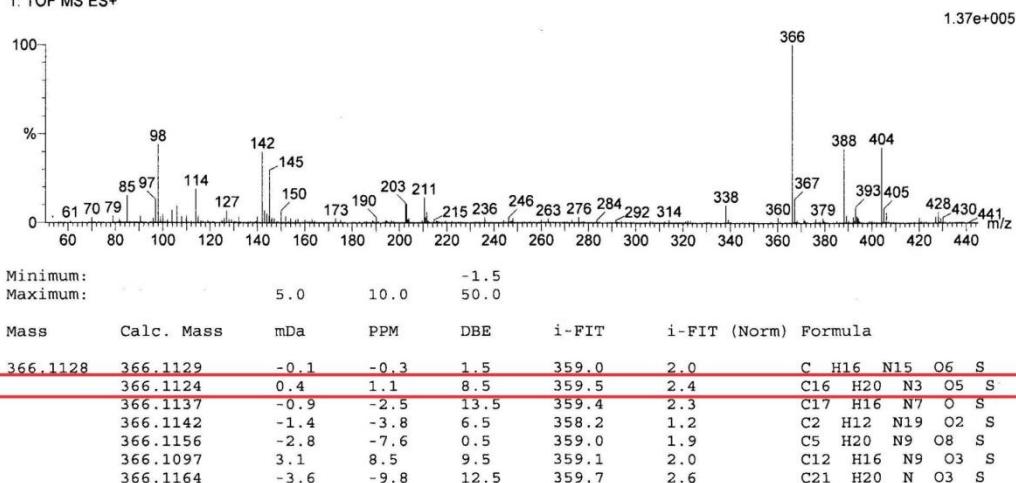
759 formula(e) evaluated with 7 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1

Z18544422 42 (1.717) Cm (42:46-4:11)

1: TOF MS ES+



Spojina 20

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

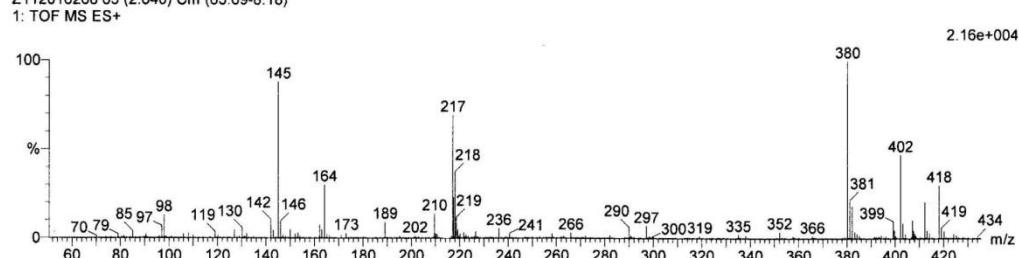
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

835 formula(e) evaluated with 7 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1
 Z112016268 65 (2.640) Cm (63.69:8.18)
 1: TOF MS ES+



Minimum: -1.5
 Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
380.1284	380.1320	-3.6	-9.5	12.5	193.6	1.3	C22 H22 N O3 S
	380.1280	0.4	1.1	8.5	193.7	1.4	C17 H22 N3 O5 S
	380.1294	-1.0	-2.6	13.5	193.9	1.6	C18 H18 N7 O S
	380.1253	3.1	8.2	9.5	194.2	2.0	C13 H18 N9 O3 S
	380.1312	-2.8	-7.4	0.5	194.9	2.6	C6 H22 N9 O8 S
	380.1299	-1.5	-3.9	6.5	195.4	3.1	C3 H14 N19 O2 S
	380.1285	-0.1	-0.3	1.5	195.6	3.3	C2 H18 N15 O6 S

Spojina 21

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

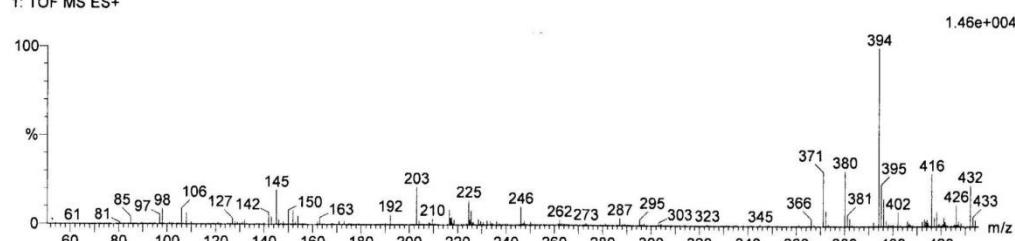
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

909 formula(e) evaluated with 7 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1
 Z18544585 58 (2.363) Cm (56.61:5.18)
 1: TOF MS ES+



Minimum: -1.5
 Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
394.1438	394.1477	-3.9	-9.9	12.5	169.6	1.0	C23 H24 N O3 S
	394.1437	0.1	0.3	8.5	169.9	1.3	C18 H24 N3 O5 S
	394.1450	-1.2	-3.0	13.5	170.3	1.6	C19 H20 N7 O S
	394.1410	2.8	7.1	9.5	171.0	2.3	C14 H20 N9 O3 S
	394.1469	-3.1	-7.9	0.5	172.1	3.4	C7 H24 N9 O8 S
	394.1455	-1.7	-4.3	6.5	173.0	4.4	C4 H16 N19 O2 S
	394.1442	-0.4	-1.0	1.5	173.1	4.5	C3 H20 N15 O6 S

Spojina 23

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

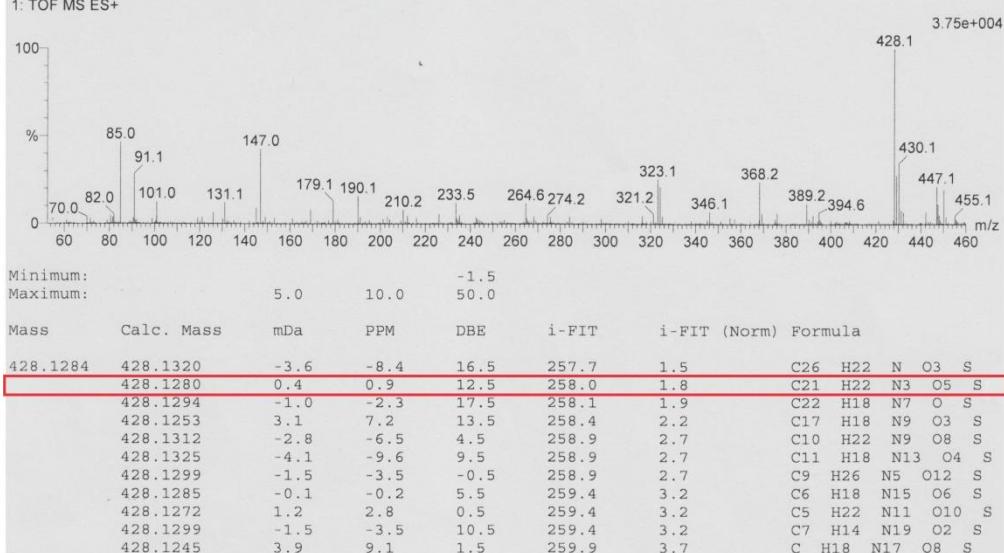
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

1106 formula(e) evaluated with 11 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1
Z18544423 15 (0.609) Cm (12:15:2:9)
1: TOF MS ES+



Spojina 24

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

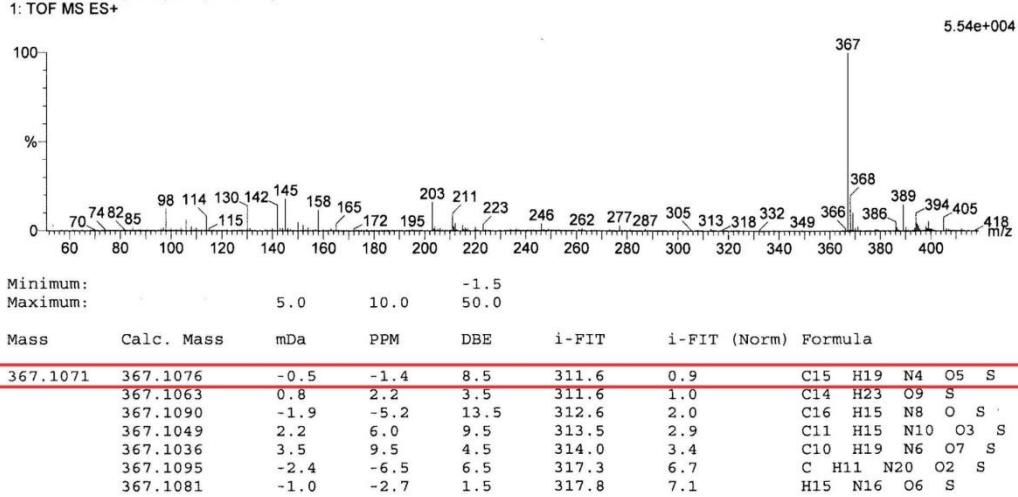
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

787 formula(e) evaluated with 7 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-120 N: 0-20 O: 0-20 S: 1-1
Z167907570 45 (1.828) Cm (45:47:3:7)
1: TOF MS ES+



7.2. Atomski tipi in delni naboji za spojino 19

Oznaka atoma	Atomski tip	q	Oznaka atoma	Tip	q
S	SG3O2	0.234	H2	HGR61	0.197
O1	OG2P1	-0.373	H3	HGR61	0.197
O2	OG2P1	-0.373	H4	HGR61	0.300
C1	CG3C52	0.083	H5	HGP1	0.295
C2	CG3C51	0.010	H6	HGA2	0.090
N1	NG2S0	-0.337	H7	HGA2	0.090
C3	CG2O1	0.445	C13	CG321	0.049
O3	OG2D1	-0.523	C14	CG331	-0.270
C4	CG321	0.140	H8	HGA3	0.090
O4	OG302	-0.293	H9	HGA3	0.090
C5	CG2O2	0.334	H10	HGA3	0.090
O5	OG2D1	-0.480	H11	HGA2	0.090
C6	CG2R52	0.480	H12	HGA2	0.090
N2	NG2R50	-0.558	C15	CG3C52	-0.185
N3	NG2R51	-0.058	C16	CG3C52	0.079
C7	CG2RC0	0.390	H13	HGA2	0.090
C8	CG2RC0	-0.066	H14	HGA2	0.090
C9	CG2R61	-0.396	H15	HGA2	0.090
C10	CG2R61	-0.379	H16	HGA2	0.090

C11	CG2R61	-0.196	H17	HGA1	0.090
C12	CG2R61	-0.199	H18	HGA2	0.090
H1	HGR61	0.193	H19	HGA2	0.090