

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
UPORABA METOD MOLEKULSKEGA
MODELIRANJA PRI NAČRTOVANJU IN
OPTIMIZACIJI INHIBITORJEV ČLOVEŠKE DNA
TOPOIZOMERAZE II α

KATJA VALJAVEC

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Uporaba metod molekulskega modeliranja pri načrtovanju in
optimizaciji inhibitorjev človeške DNA topoizomeraze II α**

(Application of molecular modeling methods in design and optimization of
inhibitors of the human DNA topoisomerase II α)

Ime in priimek: Katja Valjavec

Študijski program: Bioinformatika

Mentor: doc. dr. Andrej Perdih

Koper, avgust 2018

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Katja VALJAVEC

Naslov zaključne naloge: Uporaba metod molekulskega modeliranja pri načrtovanju in optimizaciji inhibitorjev človeške DNA topoizomeraze II α

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število listov: 70

Število slik: 27

Število tabel: 9

Število prilog: 7

Št. strani prilog: 6

Število referenc: 73

Mentor: doc. dr. Andrej Perdih

Ključne besede: molekulsko modeliranje, računalniška podprto načrtovanje učinkovin, DNA topoizomeraza II α , katalitični inhibitorji

Izvleček:

Metode molekulskega modeliranja postajajo vedno pomembnejši del kompleksnega racionalnega razvoja novih zdravilnih učinkovin. Znotraj tega procesa običajno uporabljamo podatke o strukturi obravnavanih tarč in aktivnih ligandih. Ciljna biološka tarča naših raziskav je bila človeška topoizomeraza II α , ki je že dobro validirana tarča za razvoj protirakavih zdravilnih učinkovin, vendar učinkovine v terapiji spremljajo tudi hudi stranski učinki. Raziskave zato potekajo v smeri razvoja zaviralcev z alternativnimi mehanizmi delovanja, predvsem t.i. katalitičnih inhibitorjev. Eden izmed možnih mehanizmov je tudi inhibicija encima preko zasedanja vezavnega mesta za ATP.

V zaključni nalogi smo najprej preučili obnašanje izbrane encimske tarče z molekulsko simulacijo njene ATPazne domene in potrdili konformacijsko stabilnost vezavnega mesta za ATP. Nato smo metode molekulskega modeliranja uporabili na dveh različnih stopnjah načrtovanja učinkovin. V prvem primeru smo izhajali iz serije neaktivnih oksadiazolnih derivatov, ki so bili prvotno načrtovani kot inhibitorji sorodne DNA giraze in najverjetneje niso izkazovali aktivnosti zaradi prevelike fleksibilnosti dela molekul. Z strukturno vodeno rigidizacijo smo molekule optimizirali in dobili spojine z inhibitorskimi aktivnostmi. V drugem primeru pa so izhodišče predstavljale že validirane spojine vodnice iz serije triazinonov, katerim smo želeli izboljšati inhibitorsko aktivnost. Na podlagi dostopne sintezne poti smo zgradili usmerjeno kemijsko knjižnico, kjer smo želeli pridobiti dodatne interakcije s fosfatnim in sladkornim delom topo II α ATP žepa. Rezultati meritev so potrdili uspešnost tudi tega pristopa načrtovanja. Za najbolj obetavni molekuli iz obeh serij smo izvedli tudi simulacije molekulske dinamike in nato postavili dinamične modele ter tako pridobili še dinamičen vpogled v interakcijski vzorec medomolekulskega prepoznavanja. Rezultati naloge bodo služili pri nadaljnji optimizaciji obeh serij, kot potencialnih zaviralcev človeške topoizomeraze II α s protirakavim delovanjem.

Key words documentation

Name and SURNAME: Katja VALJAVEC

Title of the final project paper: Application of molecular modeling methods in design and optimization of inhibitors of the human DNA topoisomerase II α

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 70

Number of figures: 27

Number of tables: 9

Number of appendix: 7

Number of appendix pages: 6

Number of references: 73

Mentor: Assist. Prof. Andrej Perdih, PhD

Keywords: molecular modeling, computer aided drug design, DNA topoisomerase II α , catalytic inhibitors

Abstract:

In recent decades, molecular modeling methods have become an increasingly important part of the complex rational development of new drugs. Within this process, structure-based as well as ligand-based data are utilized. Selected target of our research was the human topoisomerase II α , which is already a well-validated target for the development of anticancer drugs, but current drugs are accompanied by several severe side effects, especially cardiotoxicity. Research is therefore directed towards the development of inhibitors with alternative mechanisms of action, especially within the emerging group of catalytic inhibitors. One of the available options is to target the enzyme's ATP binding site. In this work we first investigated the behavior of our target by performing a molecular simulation of its ATPase domain. We also confirmed the conformational stability of the ATP binding site. Then, molecular modeling methods were used at two different stages of inhibitor development. In the first case, we started from a series of inactive oxadiazole derivatives that were originally designed as inhibitors of the related bacterial DNA gyrase. Their observed inactivity was linked to the excessive flexibility of one of the containing moieties. By performing a structure-guided rigidization we were able to design compounds possessing topo II α inhibitory activity. In the second case, our starting point comprised the already validated lead compounds from the triazinone class. Here taking into account the synthetic pathway and proposed ligands binding modes we generated a focused chemical library of triazinones capable of additional interactions with the phosphate and sugar part of the ATP pocket. Synthesized compounds displayed better inhibition. For the most promising compounds from each class molecular dynamics simulations were performed followed by a determination of the dynamic models thus gaining a dynamic insight into the intermolecular interaction pattern. Results of our work will serve in further optimization of both classes as inhibitors of human topoII α with anticancer activity.

ZAHVALA

Velika zahvala gre najprej mentorju, doc. dr. Andreju Perdihu, za ponujeno možnost opravljanja študentskega dela na Kemijsem inštitutu, v sklopu katerega je nastala tudi zaključna naloga. Zahvaljujem se mu za strokovno vodstvo, prijazne nasvete, neprestano dosegljivost, predano znanje in usmerjanje pri izdelavi zaključne naloge.

Hkrati se zahvaljujem tudi vsem ostalim sodelavcem Laboratorija za računsko biokemijo in načrtovanje učinkovin, predvsem mladi raziskovalki Kaji Bergant, za vse podatke, napotke ter ostalo pomoč.

Iskreno se zahvaljujem tudi moji družini, ki mi je omogočila študij in mi vsa leta stala ob strani, ter fantu Petru za vse spodbude in motivacijo.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Proces načrtovanja zdravil	1
1.1.1	Identifikacija in validacija tarče	2
1.1.2	Odkrivanje »zadetkov« (»hit discovery«) in cikel načrtovanja učinkovin.....	2
1.1.3	»Hit-to-lead« faza in optimizacija spojine vodnice.....	5
1.2	Obravnavana biološka tarča v tej nalogi: človeška DNA topoizomeraza II α	8
1.2.1	Vloga topoizomeraz.....	8
1.2.2	Delitev topoizomeraz.....	9
1.2.3	Struktura in delovanje topoizomeraz.....	10
1.2.4	Zaviralci človeške topoizomeraze II α	11
1.2.5	Vezavno mesto za ATP	12
2	NAMEN	14
3	METODE	15
3.1	Načrtovanje in virtualno reševanje na osnovi strukture tarče (SBDD)	16
3.1.1	Molekularno sidranje – iskalni algoritmi	16
3.1.2	Molekularno sidranje – cenilne funkcije.....	17
3.1.3	Uporabljen postopek molekularnega sidranja v zaključni nalogi	18
3.2	Načrtovanje in virtualno reševanje na osnovi ligandov (LBDD)	19
3.2.1	Farmakoforni modeli	19
3.2.2	Uporabljen postopek postavitve farmakofornih modelov	20
3.3	Molekularne simulacije	21
3.3.1	Empirični opis atomov in molekul – molekularna mehanika	21
3.3.2	Molekularna dinamika (MD)	22
3.3.3	Analiza molekularnih simulacij - RMSD, RMSF parametra.....	23
3.3.4	Uporaba metode molekularne dinamike (MD) v zaključni nalogi.....	24
3.3.5	Dinofori	25
3.3.6	Postavitev dinoforov v zaključni nalogi	26
4	REZULTATI	27
4.1	Analiza konformacije ATPaznega dimera z metodo molekularne dinamike.....	27
4.2	Primer I: Identifikacija novih zadetkov topo II α inhibitorjev na osnovi strukturno vodene optimizacije izhodne neaktivne molekule - 3,5-disubstituirani 1,2,4-oksadiazoli .	30
4.2.1	Strukturno podprto načrtovanje in izbor analogov	30
4.2.2	Rezultati biološkega testiranja načrtovanih spojin iz razreda 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov.....	33
4.2.3	Simulacije molekularne dinamike in izračun dinoforov	35
4.3	Primer II: Strukturno podprta optimizacija katalitičnih inhibitorjev topo II α - 4,6-disubstituirani-1,3,5-triazin-2(1 <i>H</i>)-oni	38

4.3.1	Strukturno podprta optimizacija in izdelava usmerjene kemijske knjižnice.	38
4.3.2	Rezultati biološkega testiranja načrtovanih spojin iz razreda 4,6– substituiranih–1,3,5–triazin–2(1 <i>H</i>)-onov.....	41
4.3.3	Simulacije molekulske dinamike in izračun dinoforov	43
5	SKLEP	46
6	LITERATURA IN VIRI.....	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Pregled izbranih racionalno načrtovanih učinkovin v klinični praksi.....	6
Preglednica II: Strukture nekaterih topoizomernih zaviralcev iz klinične prakse	11
Preglednica III: Predstavniki razredov, odkritih v raziskovalni skupni KI.	12
Preglednica IV: Pregled najpogosteje uporabljenih farmakofornih elementov in primer farmakofornega modela pridobljenega s programom LigandScout	20
Preglednica V: Izbrane molekule, za katere so bile izvedene simulacije molekulske dinamike..	25
Preglednica VI: Rezultati biološkega testiranja spojin, ki so bile sintetizirane za DNA girazo in testirane na topoizomerazi II α	31
Preglednica VII: Splošno načrtovana spojina in sintetizirani derivati.	32
Preglednica VIII: Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov	34
Preglednica IX: Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov	42

KAZALO SLIK

Slika 1. Proces načrtovanja novih zdravil.	1
Slika 2. Shema odkrivanja in razvoja novih zdravilnih učinkovin.....	3
Slika 3. Lastnosti rakavih celic.....	7
Slika 4. Topološke spremembe, ki jih katalizirajo topoizomeraze.....	8
Slika 5. Shema mehanizma delovanja encima topoizomeraze tipa I in tipa II.....	9
Slika 6. Model človeške DNA topoizomeraze.	10
Slika 7. Vezavno mesto za ATP v človeški DNA topoizomerazi II α , s prikazanimi interakcijami z molekulo AMP-PNP, določenih s programom LigandScout.	13
Slika 8. Pristop računalniško podprtega načrtovanja učinkovin in virtualnega rešetanja ...	15
Slika 9. Splošna shema molekulskega sidranja	17
Slika 10. Reproduciranje vezavne poze nativnega liganda AMP-PNP.....	19
Slika 11. Prikaz preiskovanja površine potencialne energije z energijsko minimizacijo in molekulsko simulacijo.....	22
Slika 12. Shema generiranja dinofora s programom DynophoreApp	26
Slika 13. RMSD vrednost dimera ATPazne domene; ATPazna domena, ko-kristaliziran ligand AMP-PNP ter aminokislina Asn120; RMSF vrednosti ATPazne domene	28
Slika 14. Začetno in končno stanje 100 ns dolge MD simulacije	29
Slika 15. RMSD vrednost liganda ATP; Razdalja med aminokislino Asn120 in ligandom ATP.....	29
Slika 16. Primer sidranega oksadiazolnega derivata, načrtovanega za bakterijsko DNA girazo	31
Slika 17. Prileganje neaktivnega oksadiazolnega derivata z aktivnim bitiazolom, prilegani neaktivna in novo načrtovana rigidizirana spojina	32
Slika 18. Načrtovana spojina 2 v vezavnem mestu človeške topoizomeraze II α	35
Slika 19. Reprezentativna konformacija spojine 2 tekom simulacije; Graf časovne odvisnosti RMSD; Graf časovne odvisnosti razdalje med Asn120 in dušikom na spojini 2; Tabela pomembnejših interakcij in razdalj.....	36
Slika 20. Pregled interakcijskega vzorca, dobljenega z dinofori.....	37
Slika 21. Aktivni triazinonski derivati uporabljeni v načrtovanju	39
Slika 22. Aktiven triazinon prilegan z ATP analogom AMP-PNP	40
Slika 23. Sintezna shema 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1 <i>H</i>)-onov; Izbrani analogi na osnovi virtualnega rešetanja te knjižnice.....	40
Slika 24. Načrtovan triazinon 10; Farmakoforni vzorec vezavne poze optimiziranega triazinona 10	41
Slika 25. Konformacija triazinonskega inhibitorja 10 tekom simulacije; Graf časovne odvisnosti RMSD; Graf časovne odvisnosti razdalje med Asn120 in dušikom na spojini 10; Tabela pomembnejših interakcij in razdalj.....	43

Slika 26. Pregled interakcijskega vzorca, dobljenega z dinofori; Celoten model dinofora za 20 ns simulacije molekulske dinamike.	44
Slika 27. Sekvenčni in statistični izpis dinofora za posamezen superelement.	45

SEZNAM PRILOG

Priloga A: Atomski tipi in delni naboji za spojino **2** (CHARMM General Force Filed)

Priloga B: Atomski tipi in delni naboji za spojino **10** (CHARMM General Force Filed)

Priloga C: Grafi razdalj med atomi spojine **2** in izbranimi aminokislinami

Priloga D: Grafi razdalj med atomi spojine **10** in izbranimi aminokislinami

Priloga E: Shematski prikaz principa testa določanja relaksacijske encimske aktivnosti

Priloga F: Sekvenčni in statistični izpis dinofornega modela za spojino **2**

Priloga G: Sekvenčni in statistični izpis dinofornega modela za spojino **10**

SEZNAM KRATIC

- ADME** – absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*)
- CADD** – računalniško podprto načrtovanje učinkovin (*Computer-Aided Drug Design*)
- CHARMM-GUI** – spletni vmesnik za CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics - Graphical User Interface*)
- HPC** – visoko zmogljivo računalništvo (*High Performance Computing*)
- HTS** – reševanje visoke zmogljivosti (*High-Throughput Screening*)
- LBDD** – načrtovanje na osnovi ligandov (*Ligand-Based Drug Design*)
- MC** – metoda Monte Carlo (*Monte Carlo*)
- MD** – molekulska dinamika (*Molecular Dynamics*)
- MM** – molekulska mehanika (*Molecular Mechanics*)
- MST** – mikroskalna termoforeza (*MicroScale Thermophoresis*)
- NMR** – jedrska magnetna resonanca (*Nuclear Magnetic Resonance*)
- PBC** – periodični robni pogoji (*Periodic Boundary Conditions*)
- PDB** – baza proteinskih struktur (*Protein Data Bank*)
- PES** – površina potencialne energije (*Potential Energy Surface*)
- REOS** – (*Rapid Elimination of Swill*)
- RMSD** – standardna deviacija izbranih atomskih razdalj med različnimi pari ekvalentnih atomov (*Root-Mean-Square Deviation*)
- RMSF** – fluktuacija posameznega atoma v danem simulacijskem času (*Root Mean Square Fluctuation*)
- ROF** – pravilo petic (*Rule Of Five*)
- SAR** – odnos med strukturo in delovanjem (*Structure-Activity Relationship*)
- SBDD** – načrtovanje na osnovi strukture tarče (*Structure-Based Drug Design*)
- SPR** – površinska plazmonska resonanca (*Surface Plasmon Resonance*)
- VMD** – program za vizualizacijo in analizo molekul (*Visual Molecular Dynamics*)
- VS** – virtualno reševanje (*Virtual Screening*)
- WHO** – svetovna zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

1 UVOD

1.1 Proces načrtovanja zdravil

Do nedavnega so bila zdravila odkrita »po naključju«, običajno preko empiričnega preiskovanja naravnih substanc in kliničnih opažanj. Kljub dokazanim učinkovitostim pri raznih bolezenskih stanjih, pa ima večina tako odkritih zdravil izrazite neželene stranske učinke ali nizko učinkovitost delovanja ter nobenega vpogleda v mehanizem delovanja [29]. Prav tako je tak proces neobhodno povezan s številnimi neuspešnimi poskusi, ki le v majhnem odstotku vodijo do uspešnega rezultata.

Proces uvedbe novega zdravila na trg za učinkovito terapevtsko uporabo kot ga poznamo danes, je zapleten, dolgotrajen in stroškovno zahteven. Ocenjuje se, da na vsakih milijon ustvarjenih molekul le ena na koncu postane terapevtsko uporabna in v povprečju celoten postopek načrtovanja zdravila traja med 10 in 15 let, z vložkom tudi do milijarde evrov [61]. Pri sodobnih pristopih razvoja učinkovin, uporabljenih v farmacevtski industriji in akademskih sferah, je zdravilna učinkovina do velike mere racionalno načrtovana in ne naključno odkrita. S tem povečamo verjetnost, da bomo na koncu dejansko našli ustrezno zdravilno učinkovino. Poudariti pa tudi moramo, da je navkljub bolj mehanističnemu pristopu, ta proces še vedno uspešen le v majhnem odstotku primerov. Vzrok gre iskati v kompleksnosti biološkega sveta, ki je ne moremo obdelati z omejenim številom parametrov, ki jih obravnavamo pri načrtovanju.

Poenostavljena shema celotnega procesa odkrivanja učinkovin s poudarkom na razvoju aktivne molekule je prikazana na Sliki 1 [31]. Ta proces je predvsem uporaben pri načrtovanju zdravilnih učinkovin, kot majhnih molekul, včasih pa ga lahko vsaj delno uporabimo tudi pri načrtovanju bioloških zdravil. V nadaljevanju podrobneje opisujemo posamezne korake tega procesa.



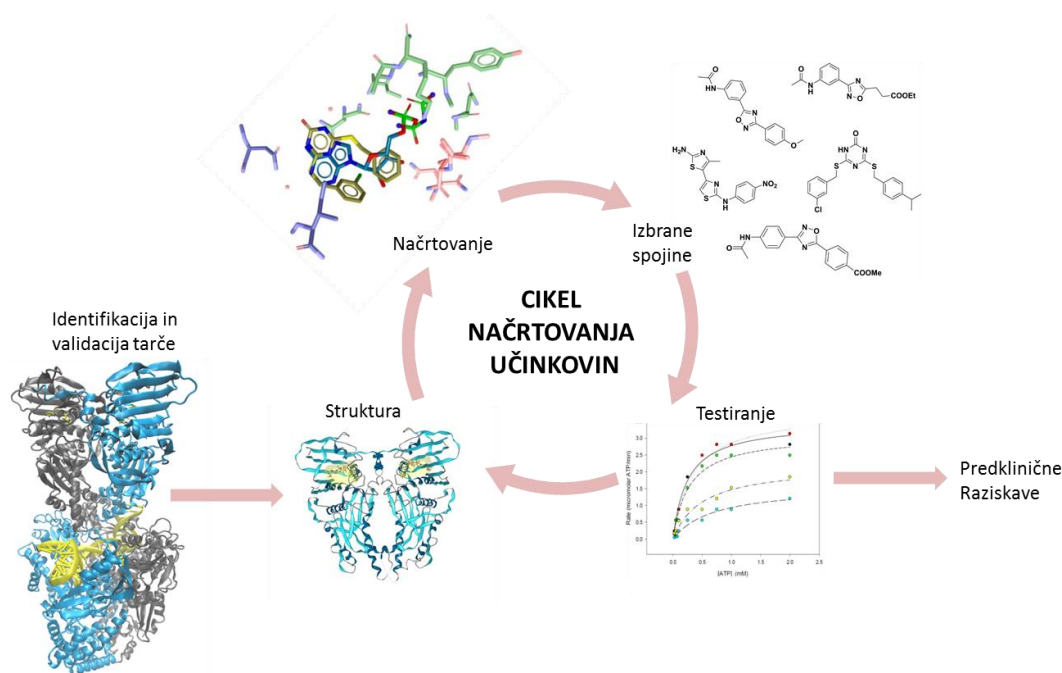
Slika 1. Proces načrtovanja novih zdravil.

1.1.1 Identifikacija in validacija tarče

Začetne raziskave, ki vodijo do identifikacije nove tarče se po navadi pričnejo v akademskih institucijah in okoljih ter omogočijo generiranje prvih eksperimentalnih dokazov, da je določena tarča (npr. encim, receptor, ionski kanal, kompleks protein-protein itd.) dejansko pomembna v preiskovanem patološkem procesu (npr. pri visokem krvnem tlaku, nastanku rakavih celic, sladkorni bolezni itd.), in da bi posledična modulacija tarče potencialno nudila možnost terapevtskega učinka pri tem bolezenskem stanju [48]. Tu se metode molekularne biologije prepletajo s farmakološkimi raziskavami in genetskimi študijami. S temi raziskavami se prepričamo, da bi identificirana makromolekula, najpogosteje protein, v nekaterih primerih pa tudi nukleinske kisline, z učinkovino tvorila ustrezno medmolekulsko interakcijo za zdravljenje patološkega stanja [29]. Po identifikaciji tarče, mora le-ta biti dobro validirana in kazati dovolj zanesljive podatke, da bo ob interakciji z načrtovano molekulo izražala biološki odziv, ki bo lahko ovrednoten v razvitih testih, tako *in vitro* kot tudi *in vivo* [32].

1.1.2 Odkrivanje »zadetkov« (»hit discovery«) in cikel načrtovanja učinkovin

Z dobro validirano tarčo vstopimo v fazo odkrivanja in načrtovanja molekul, ki bi izbrano tarčo modulirale. Ta sovpada s srednjimi tremi koraki predstavljenimi na Sliki 1. Glede na biološko ozadje preiskovane tarče so načrtovane molekule lahko inhibitorji, modulatorji, aktivatorji, agonisti, antagonist z delnim ali polnim učinkom itd [42]. Seveda v prvem koraku načrtovanja še ne bomo odkrili molekul, ki bi bile primerne za uporabo kot zdravilne učinkovine. Razvoj se začne z iskanjem »zadetkov« (ang. *hit molecules*) in uporabe cikličnega procesa načrtovanja in optimizacije zdravilnih učinkovin (ang. *drug design cycle*), ki je poenostavljeno prikazan na Sliki 2. V ciklu preko več korakov in iteracij načrtujemo in optimiziramo nove biološke molekule, da bi izkazovale tako ustrezne vezavne lastnosti na preiskovano tarčo, kot tudi fizikalno-kemijske (npr. topnost) in farmakološko-toksikološke ter farmakokinetične lastnosti (netoksičnost, ustrezne ADME lastnosti, topnost itd.), ki bi omogočile vstop izbrane molekule v kompleksnejše predklinične raziskave, formulacijske študije farmacevtske oblike, biofarmacevtsko ovrednotenje in na koncu tudi v klinične študije na pacientih z diagnozo bolezni, ki naj bi jo te učinkovine zdravile [42].



Slika 2. Shema odkrivanja in razvoja novih zdravilnih učinkovin – aktivne molekule («drug design cycle»).

V prvi iteraciji cikla odkrivamo zadetke - molekule, ki v predhodno razvitih biokemijskih testih uspejo modulirati izbrano tarčo. Pri odkrivanju »zadetkov« uporabljamo kombinacijo eksperimentalnih tehnik (eksperimentalno reševanje) in računalniško podprtih metod (*in silico* reševanje) za preiskovanje predhodno ustvarjenih stvarnih ali virtualnih knjižnic spojin, ki vsebujejo od nekaj deset pa tudi do nekaj milijonov različnih spojin [18]. Poznamo več vrst reševanja – virtualno (ang. *virtual screening*, VS), eksperimentalno reševanje visoke zmogljivosti (ang. *high-throughput screening*, HTS), usmerjeno, fragmentno, NMR itd. [54].

Komplementarna eksperimentalni metodi HTS, kjer so aktivnosti več deset ali sto tisoč spojin iz knjižnic dejansko testirane, je *in silico* metoda virtualnega reševanja (ang. *virtual screening*, VS), s katero iz knjižnic najprej izberemo manjše število potencialno aktivnih spojin (nekaj tisoč, ali celo manj) in le izbrane nato ovrednotimo z biološkimi testi [7]. Proces lahko poimenujemo obogatitev knjižnice, saj je odstotek aktivnih spojin v novi knjižnici v primerjavi z začetno precej višji. Obogatitev (ang. *enrichment*) se nanaša tudi na to, da bo v izbrani podknjižnici spojin, ki jih bodo robni pogoji VS izbrali, več aktivnih spojin, kot bi jih dobili, če bi te spojine v enako veliko knjižnico izbrali naključno.

Robne pogoje *in silico* iskanja »zadetkov« v splošnem lahko postavimo na dva načina, in sicer na osnovi aktivnih ligandov (ang. *ligand-based drug design*, LBDD) ali na osnovi 3D strukture tarče (ang. *structure-based drug design*, SBDD) [28]. Odločitev za eno ali drugo metodo sprejmemo na podlagi dosegljivosti in kvalitete tridimenzionalne strukture tarče,

čeprav se metodi lahko tudi prekrivata in LBDD lahko npr. uporabljamo tudi, ko je struktura tarče znana.

S poznano 3D strukturo proteina se največkrat poslužujemo SBDD metode, saj nam omogoča molekulske sidranje (ang. *molecular docking*) spojin v aktivno mesto in na ta način dobimo začetni vpogled v potrebne elemente medmolekulskega prepoznavanja glede na topologijo in elektrostatiko tarčnega vezavnega mesta, prav tako pa izločimo prevelike in neustrezne molekule [44]. Podatke o strukturi proteina in tarče lahko dobimo s proteinsko rentgensko kristalografijo (X – ray) ali s pomočjo proteinske jedrske magnetne resonance (NMR). Strukturo proteina nato v določenih primerih predvidimo in izračunamo z uporabo homolognega modeliranja, v kolikor je naš protein dovolj soroden drugemu, z že znano 3D strukturo. V primeru, ko pa 3D strukture ne poznamo, imamo pa znane le strukturne lastnosti biološko aktivnih ligandov, pa uporabljamo LBDD metode, najpogosteje farmakoforne modele, s katerimi opišemo splošne lastnosti molekul, pomembne za optimalne interakcije. Na podlagi postavljenega farmakofornega modela nato lahko preiskujemo ujemanje molekul iz virtualnih knjižnic s tako generiranim modelom [44].

Izbor serije »zadetkov« pa ne temelji le na osnovi ustrezne umestitve v aktivno mesto tarče ali na osnovi ujemanja molekul s postavljenim farmakofornim modelom, temveč morajo molekule za prehod v naslednjo fazo imeti tudi ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti [29]. Tako s filtriranjem na podlagi različnih molekulskih deskriptorjev, že v začetnih fazah omejimo kemijski prostor ter bistveno znižamo število preiskovanih spojin v knjižnicah.

Skozi čas se je uveljavilo več razvitih kvantitativnih kriterijev, najpogosteje uporabljeni pa so filter REOS (ang. *Rapid Elimination of Swill*), ki je eden prvih uporabljenih, saj z njim izločimo prevelike in preveč fleksibilne spojine, pogost je tudi filter pravilo petic (ang. *Rule of Five*, ROF), ki sloni na »drug-like« konceptu, ki ga je postavil Christopher A. Lipinski, spojine pa omeji na podlagi molske mase (<500 Da), števila donorjev vodikove vezi (<5), števila akceptorjev vodikove vezi (<10), števila obročev (<5) in vrednosti porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda ($\log P < 5$). Spojine, ki ne ustrezajo navedenim lastnostim, imajo neugodne ADME lastnosti (absorbpcija, porazdrelitev, metabolizem, izločanje), ki sicer niso pomembne za vezavo v aktivno mesto, predstavljajo pa dodaten filter v kasnejših fazah razvoja učinkovin [46].

Spojine, ki zadostijo opisanim filtrom in robnim pogojem rešetanja, imenujemo virtualni zadetki (ang. *hit compounds*) [29]. Te spojine kažejo potencialne aktivnosti na preiskovani tarči, morajo pa biti nadalje testirane in ovrednotene v različnih biofizikalnih testih, kot so NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*), SPR (ang. *Surface Plasmon Resonance*), MST

(ang. *Microscale Thermophoresis*), s katerimi preverimo vezavo, kinetiko in termodinamiko spojin [42]. Poslužujemo se tudi t.i. potrditvenega testiranja, ki ga izvajamo pri istih pogojih, kot prvo testiranje z namenom preverjanja ponovljivosti rezultatov in pa testa, s katerim dobimo krivuljo odziva na odmerek pri različnih koncentracijah (ang. *dose response curve*) oziroma IC₅₀ vrednosti.

1.1.3 »Hit-to-lead« faza in optimizacija spojine vodnice

Dobljeno serijo »zadetkov« je nadalje potrebno še bolj zožiti, da bi dobili selektivne spojine za našo tarčo. Pomembna je kombinacija *in silico* metod in splošnega poznavanja lastnosti kemijskih skupin, saj je glavnina dela na tej stopnji osredotočena na preiskovanje odnosa med strukturo in delovanjem (ang. *structure-activity relationship*, SAR) odkritega kemijskega razreda, s katero skušamo doseči kompromis med aktivnostjo in selektivnostjo spojin in optimizirati nekatere fizikalno-kemijske ter farmakološke lastnosti (npr. topnost, ADME lastnosti) [42].

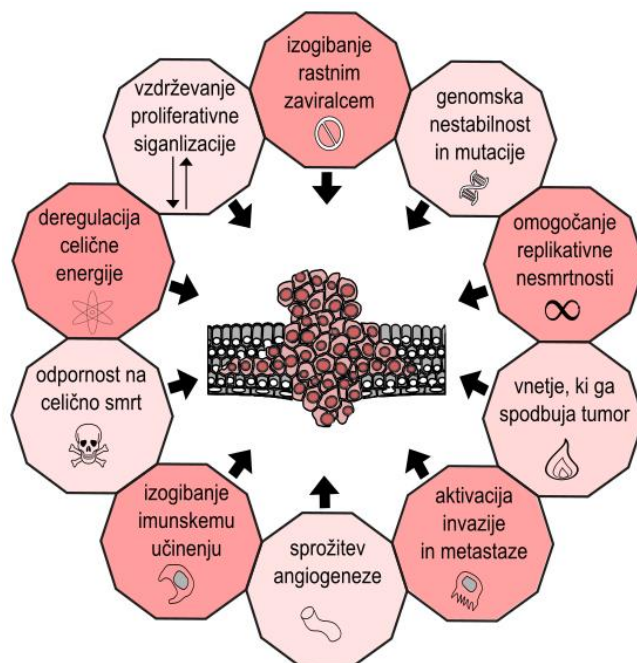
Glavni cilj optimizacije spojine vodnice, ki je zadnja faza procesa načrtovanja, je ohranitev želenih lastnosti spojin vodnic ob sočasni izboljšavi farmakoloških in farmakokinetičnih lastnosti. Spojine so na tej stopnji pripravljene za kompleksnejšo karakterizacijo (npr. biofizikalne meritve, funkcionalne in celične teste), preden so obravnavane kot predklinični kandidati in nadaljujejo pot v klinične faze raziskav. Celoten proces od iskanja »zadetkov« do predkliničnih kandidatov je dolgotrajen in specifičen, ki nikakor ni rutinski, kot bi lahko sklepali iz opisanih korakov [29, 42].

Velik napredek v razvoju računske kemije zadnjih nekaj desetletij je omogočil znatno pohitritev opisanega cikla, uspešne aplikacije te metodologije pa se kažejo v že registriranih zdravilih, katerih učinkovine so bile pridobljene z uporabo naštetih metod. Razviti inhibitorji pokrivajo različna področja terapevtske uporabe, od hipertenzije, virusih in različnih rakavih obolenj, do okužb z virusom HIV. Izbrani inhibitorji, razviti s pomočjo računalniško podprtega načrtovanja učinkovin (ang. *computer-aided drug design*, CADD), so prikazani v Preglednici 1 [61].

Preglednica I: Pregled izbranih racionalno načrtovanih učinkovin v klinični praksi.

IME SPOJINE		TERAPEVTSKA UPORABA	NAČIN DELOVANJA
Kaptopril		Hipertenzija Srčna kap	ACE inhibitor
Zanamivir		Protivirusno delovanje	Inhibitor nevraminidaze
Indinavir Ritonavir Nelfinavir	1. generacija	HIV/ AIDS	Inhibitorji HIV proteaze
Atazanavir Tipranavir Darunavir	1. generacija		
Imatinib		Kronična mieloična levkemija	Inhibitor tirozin kinaze
Sorafenib		Rak jeter Rak ledvic Rak ščitnice	Inhibitor VEGFR kinaze
Lapatinib		Rak dojke	Inhibitor EGFR/ ERBB2

Pomembnost teh metod pa se odraža tudi pri razvoju novih protirakavih zdravilnih učinkovin. Rak je namreč eden najpogostejših vzrokov smrti. Po podatkih svetovne zdravstvene organizacije (ang. *World Health Organization*, WHO) je v letu 2015 približno 8,8 milijona ljudi podleglo različnim tipom rakavih obolenj [1]. Med najpogostejše tipe pri moških sodijo rak pljuč, prostate ter debelega črevesa in danke, pri ženski populaciji pa so najpogostejši rak dojke, rak debelega črevesa in danke ter rak pljuč [14]. Rak je kompleksna bolezen z mnogimi faktorji, ki pogojujejo njegov nastanek. Shematsko so te lastnosti predstavljene na Sliki 3 [27]. Rakave celice so zmožne stimuliranja svoje rasti in upiranja inhibitornim signalom, ki bi lahko zaustavili to nekontrolirano rast. Za svojo rast ne potrebujejo signalnih molekul (npr. hormonov). Rakave celice se lahko neomejeno razmnožujejo, saj manipulirajo encime, ki povečujejo dolžino telomer. Same so zmožne celo tvoriti nove krvne žile za boljšo preskrbo svojega tkiva s kisikom in hranili. Rakave celice so tudi sposobne uničiti lokalno tkivo in se širiti na druga področja v organizmu (metastaziranje) [26].



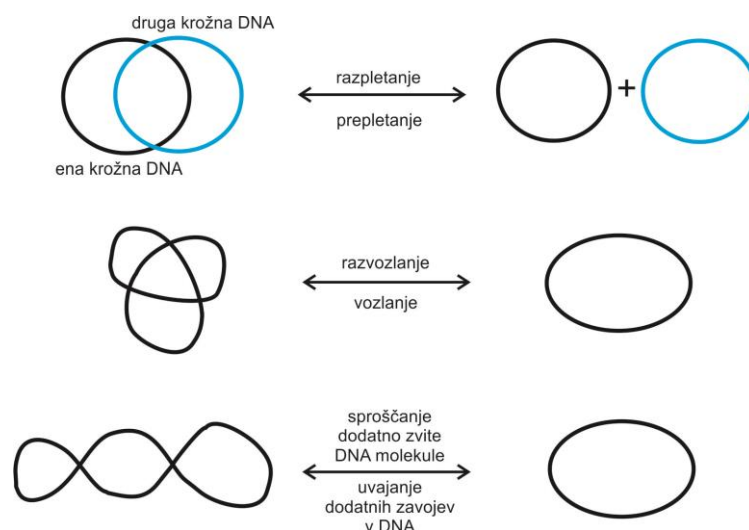
Slika 3. Lastnosti rakavih celic.

Skupna lastnost vseh rakavih celic je zelo hitra in nekontrolirana celična delitev, pri kateri sodelujejo različni encimi. Pomembni encimi v tem procesu so na primer družina DNA topoizomeraz, katerih predstavnica – topoizomeraza II α , bo izbrana biološka tarča v zaključni nalogi. Družina DNA topoizomeraze je že znana in validirana družina tarč mnogih protirakavih zdravilnih učinkovih, uspešno uporabljenih v terapijah številnih karcinomov, saj s prekinitvijo celičnega podvojevanja onemogočimo rast tumorjev [23].

1.2 Obravnavana biološka tarča v tej nalogi: človeška DNA topoizomeraza II α

1.2.1 Vloga topoizomeraz

V zaključni nalogi bomo kot izbrano biološko tarčo, na kateri bomo prikazali nekatere prej opisane korake računalniško podprtega načrtovanja in uporabljene metode, obravnavali človeško DNA topoizomerazo II α [67]. Topoizomeraze so za vsak prokariotski in evkariotski organizem nujno potrebna družina encimov, molekularnih motorjev, saj sodelujejo pri spreminjanju topologije zvite DNA molekule (prepletanje/ razpletanje, vozlanje/ razvozlanje in sproščanje dodatnih zavojev molekule DNA) [23]. Na Sliki 4 so nekateri topološki procesi tudi shematsko prikazani [57].



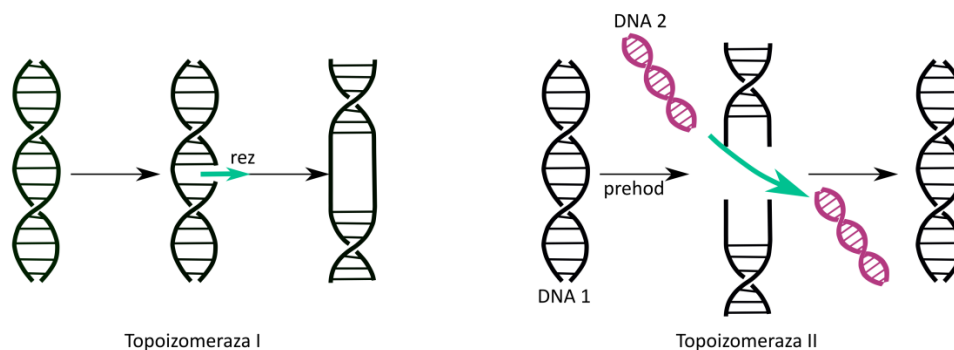
Slika 4. Topološke spremembe, ki jih katalizirajo topoizomeraze.

Med procesom podvojevanja DNA, encim DNA helikaza povzroči ločitev dvovijačne DNA, DNA polimeraza pa ob pomoči drugih encimov in proteinov dodaja komplementarne nukleotide. Med tem odpiranjem DNA verige in potovanjem replikacijskih encimov prihaja v DNA molekuli pred replikacijskimi vilicami do dodatnega zvijanja DNA (t. i. superzvitja) in s tem do povečevanja mehanskega pritiska v molekuli. Če bi se ta proces nadaljeval, bi onemogočil nadaljevanje replikacije DNA zaradi prevelikega superzvitja molekule DNA, kar bi mehansko zaustavilo replikacijo. Za reševanje tega topološkega izziva je narava razvila posebno skupino encimov - DNA topoizomeraze, ki z vezavo na sladkorno fosfatno ogrodje dvovertične DNA molekule omogočajo njeno odprtje in tako topološko sprostitev dodatnih zavojev ter njeno nemoteno replikacijo [3].

1.2.2 Delitev topoizomeraz

Družina DNA topoizomeraz se glede na način delovanja deli v dve veliki skupini, topoizomeraze I in topoizomeraze II. Topoizomeraze tipa I cepijo le eno verigo DNA molekule, tipa II pa obe verigi. Na podlagi natančnejših mehanizmov cepitve, razlik v aminokislinskem zaporedju in glede na organizem, iz katerega so bile izolirane, jih nadalje razdelimo na še ožje družine. Topoizomeraze I razdelimo na tipe IA, IB in IC, med katerimi so razlike predvsem pri načinu vezave encima med katalizo in manjše strukturne razlike, topoizomeraze tipa II pa na dva tipa: IIA in IIB. Skupini topoizomeraz se razlikujeta tudi glede na potrebe po energiji v obliki ATP molekule. Encimi prve skupine (topoizomeraze I) za svoje delo ne potrebujejo energijske ATP molekule, medtem ko so druge (topoizomeraze II) za delovanje odvisne od hidrolize molekul ATP [16]. Ime topoizomeraza se nanaša na delovanje encima, saj se molekulska zgradba DNA med katalizo ne spremeni, dobimo le novo konformacijo DNA molekule, ki je izomer prejšnji.

Predstavnice prve skupine, topoizomeraze tipa I, prekinejo eno verigo DNA in tako omogočijo prehod druge verige skozi odprtino in nato ponovno združijo prosta konca prve verige. Dvojna vijačnica se tako na tem delu odvije, rezultat pa je eno superzvitje DNA molekule manj [11]. Na Sliki 5 je ta proces, ki ga katalizirajo, nazorno prikazan.



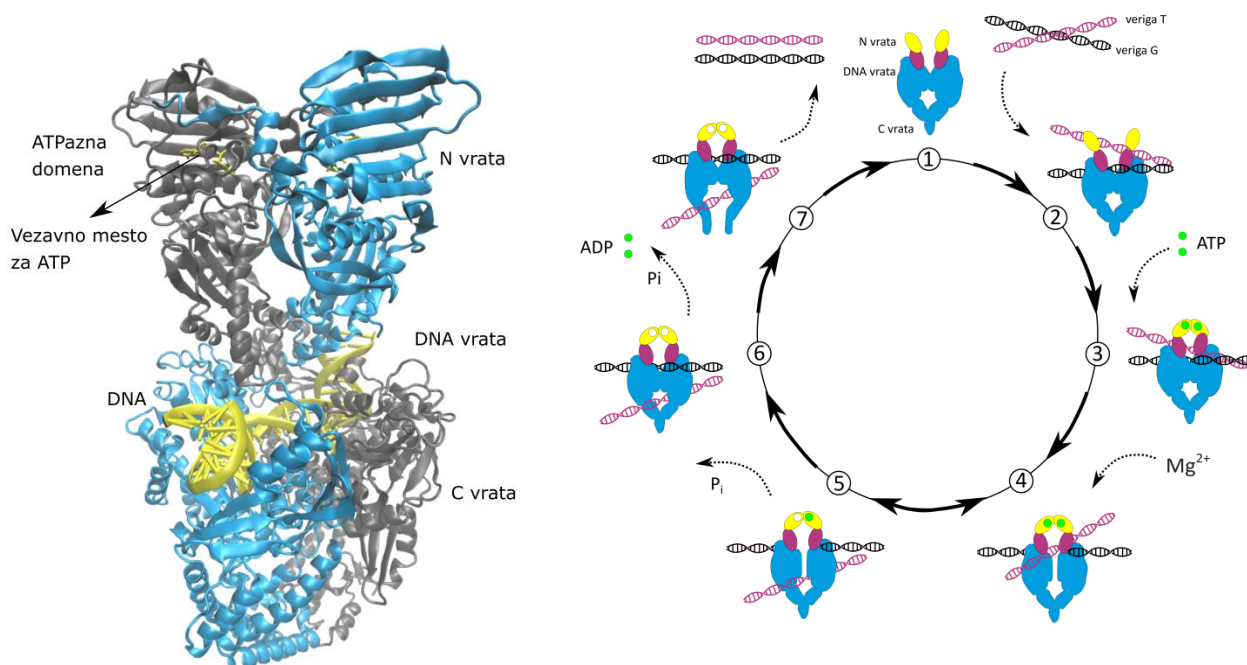
Slika 5. Shema mehanizma delovanja encima topoizomeraze tipa I in tipa II.

Drugo skupino predstavljajo topoizomeraze tipa II, ki se pri ljudeh in ostalih sesalcih pojavljajo v dveh izooblikah, topoizomeraza II α in topoizomeraza II β , ki sta kodirani z dvema različnima genoma. Čeprav sta izoobliki homologa z visoko stopnjo prekrivanja aminokislinskega zaporedja (več kot 70 % ujemanje), sta specifično tkivno izraženi - koncentracija α izooblike je največja v delečih se celicah in ima večjo vlogo pri podvajanju DNA in je s tem primerna tarča za načrtovanje protirakavih učinkovin [8].

1.2.3 Struktura in delovanje topoizomeraz

Celotnega encima človeške topoizomeraze II α v enem kosu sicer še niso uspeli kristalizirati, vendar preko homologije z ostalimi topoizomerazami tipa II lahko sestavimo njen model, ki je prikazan na Sliki 6 (levo). Topoizomeraza je homodimerni encim, ki ga razdelimo na tri proteinske domene oz. vrata, in sicer na N-končno, centralno in C-končno domeno. Za naše delo je še posebej pomembna N-končna domena oziroma ATP-azna domena, saj vsebuje vezavno mesto za ATP. Kristalizacija te domene (PDB: 1ZXM) v kompleksu z molekulo AMP-PNP (nehidolizirajoč ATP analog) za človeško različico topo II α predstavlja pomembno prelomnico pri strukturno podprtem načrtovanju inhibitorjev [10, 11, 59].

Topoizomeraze II delujejo preko kompleksnega večstopenjskega katalitičnega cikla, ki je prikazan na Sliki 6. V katalitičnem ciklu s konformacijskimi spremembami encima povzročijo prehodno prekinitev ene verige DNA (t. i. verige G), kar omogoča prehod druge DNA verige (t. i. verige T) skozi nastalo odprtino, kar poenostavi topologijo DNA. Pri tem sodelujeta dve molekuli ATP in magnezijevi (Mg^{2+}) ioni. Nato pride do ponovne povezave odprte verige G in sprostitve obeh, sedaj manj zvitih DNA molekul skozi zgornja in spodnja vrata topo II encima [12]. Navkljub več raziskavam usmerjenim k razumevanju tega kompleksnega molekulskega motorja je mnogo atomističnih podrobnosti še vedno neznanih.



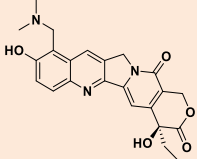
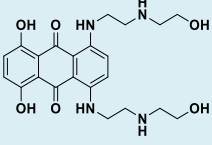
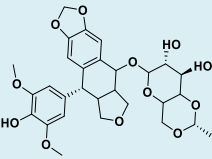
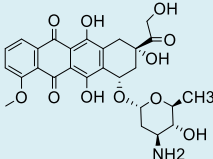
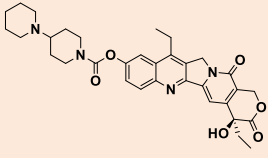
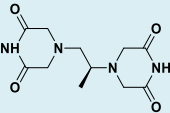
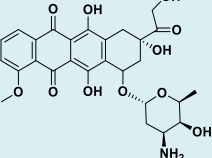
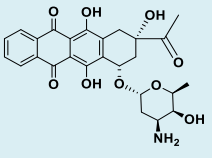
Slika 6. Model človeške DNA topoizomeraze, zgrajen na osnovi glivne topoizomeraze II α (PDB: 4GFH) (levo), Shema katalitičnega cikla delovanja topoizomeraze tipa II (desno) – korak 1: odsek G (dvovijačna DNA molekula) se veže na topoizomerazo; korak 2: na ATP-azno domeno (N vrata) se vežeta dve molekuli ATP, kar povzroči njeno dimerizacijo in ujetje odseka T; korak 3: cepitev odseka G; korak 4: prenos T

odseka skozi nastalo odprtino v odseku G; korak 5: s prenosom T odseka pride do hidrolize ene molekule ATP in odprtja C vrat; korak 6: ponovna združitev obeh koncev G odseka in odcepitev T; korak 7: hidroliza druge molekule ATP, sprostitev obeh molekul ADP ter odseka G in odprtje N vrat. S tem je en cikel zaključen in pripravljen na novega.

1.2.4 Zaviralci človeške topoizomeraze II α

Tako učinkovine, ki zavirajo človeško topoizomerazo I, kot tudi topoizomerazo II, so že uveljavljene protirakave zdravilne učinkovine in pomemben del terapevtskih režimov pri zdravljenju širokega spektra protirakavih obolenj. Strukture nekaterih registriranih zaviralcev, ki se uporabljajo v klinični praksi v Sloveniji, so prikazane v Preglednici II. Med njimi sta topotekan in irinotekan inhibitorja topoizomeraze I, ostali pa zavirajo človeško topoizomerazo II α .

Preglednica II: Strukture nekaterih topoizomeraznih zaviralcev iz klinične prakse

Topoizomeraza I	Topoizomeraza II α		
 <p>TOPOTEKAN</p>	 <p>MITOKSANTRON</p>	 <p>ETOPOZID</p>	 <p>EPIRUBICIN</p>
 <p>IRINOTEKAN</p>	 <p>DEKSRAZOKSAN</p>	 <p>DOKSORUBICIN</p>	 <p>IDARUBICIN</p>

Zaviralce skupine topoizomeraze II α razdelimo v dve skupini. V prvo skupino spadajo že dobro uveljavljene učinkovine, tako imenovani DNA strupi. Celično smrt povzročijo s stabilizacijo kratkoživega kovalentnega kompleksa, ki se tvori med DNA in encimom, ki tako postane celični strup in povzroči smrt rakave celice. Protirakava zdravila iz skupine topoizomeraznih II α strupov zaradi svoje specifične planarne strukture in mehanizma delovanja lahko povzročajo tudi hude stranske učinke (na primer kardiotoksičnost), zato narašča trend identifikacije zaviralcev DNA topoizomeraze II α , ki delujejo po alternativnih mehanizmih [60].

Tako se v zadnjih letih vedno bolj uveljavlja razvoj druge skupine zaviralcev topoizomeraz II α , ki jih imenujemo tudi katalitični inhibitorji. Njihova glavna značilnost je, da ne stabilizirajo kratkoživega kovalentnega kompleksa med DNA in encimom. Kompleksen katalitični cikel človeške topoizomeraze namreč omogoča raznovrstne pristope k inhibiciji in je kljub temu, da je na voljo že precej učinkovin, ki zavirajo različne korake cikla, še

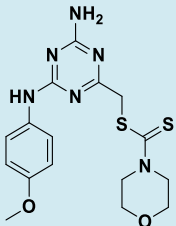
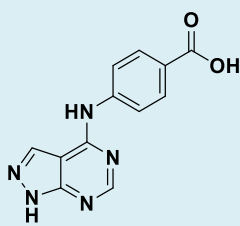
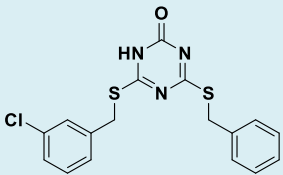
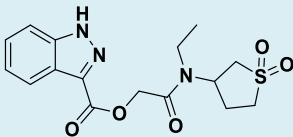
vedno obetavna skupina za nadaljnje raziskave [59]. Najbolj pogosto uporabljena delitev pristopov delovanja katalitičnih inhibitorjev v literaturi je v štiri skupine [57]:

- Spojine, ki preprečijo vezavo DNA na encim,
- Spojine, ki zavirajo cepitev DNA,
- Spojine, ki zasedejo topo II α ATP vezavno mesto in
- Spojine, ki zavirajo hidrolizo ATP.

V praksi se je pokazalo, da je tudi zaviranje preko katalitičnega mehanizma inhibicije terapevtsko uporabno. Molekula deksrazoksan je trenutno edini predstavnik iz družine katalitičnih inhibitorjev topoizomeraze II α , ki se uporablja za zdravljenje v Sloveniji in zavira več korakov v topo II α katalitičnem ciklu [6].

Raziskovalna skupina na Kemijskem inštitutu je usmerjena v načrtovanje spojin, ki zasedejo vezavno mesto topo II α in so v dosedanjih raziskavah že odkrili več razredov inhibitorjev s takšnim pristopom delovanja. V Preglednici III so prikazani posamezni predstavniki.

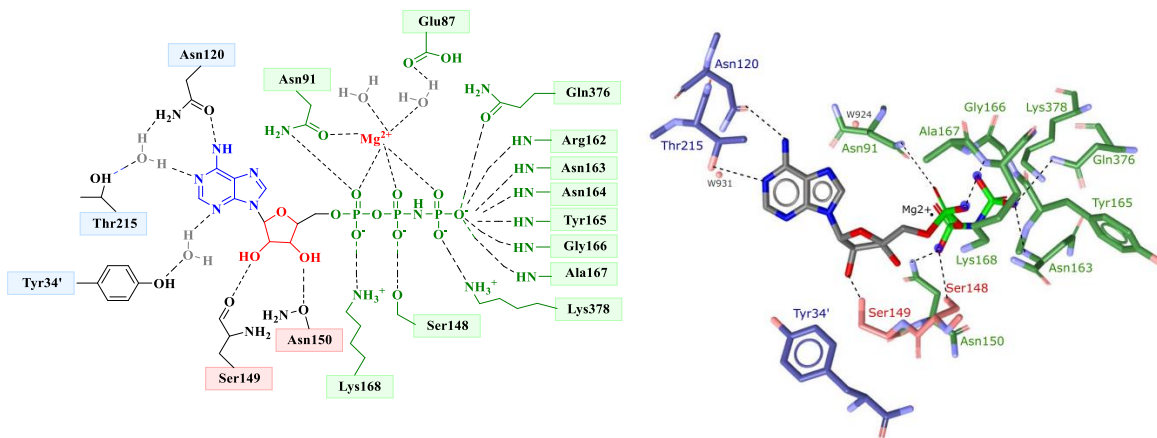
Preglednica III: Predstavniki razredov, odkritih v raziskovalni skupni Kemijskega inštituta.

Struktura predstavnika	Kemijski razred	Struktura predstavnika	Kemijski razred
	Monociklični 4-amino-6-(fenilamino)-1,3,5-triazini [56]		1H-pirazolo[3,4]pirimidini in 9H-purini [55]
	4,6-substituirani-1,3,5-triazin-2(1H)-oni [58]		3-substituirani-1H-indazoli [33]

1.2.5 Vezavno mesto za ATP

Cilj načrtovanja naših katalitičnih inhibitorjev je zasedanje ATP vezavnega mesta, zato je pomembno dobro predhodno poznavanje potencialnih interakcij v ATP žepu. Slika 7 prikazuje najpomembnejše medmolekulske interakcije tako v tridimenzionalni kot v dvodimenzionalni shematski predstavitvi. Adenzinski del molekule tvori neposredno vodikovo vez z Asn120 ter posredne, preko vod z Asn120, Thr215 in Tyr34'. Zadnja

aminokislina se nahaja na drugi domeni dimera. Sladkorni del tvori interakciji z aminokislinama Ser148 in Ser149, največ interakcij pa je identificiranih na fosfatnem delu liganda, in sicer neposredno z Asn91, Asn150, Gln376, Lys378 in aminokislinami Asn163 – Lys167, ki tvorijo t.i. ATP zanko. Posredno, preko koordinacijskih vezi, pa fosfatni del interagira še z Mg²⁺ ioni.



Slika 7. Vezavno mesto za ATP v človeški DNA topoizomerazi II α , s prikazanimi interakcijami z molekulo AMP-PNP, določenih s programom LigandScout. Aminokisliline obarvane modro interagirajo z obročnim delom, zelene s fosfatnim delom in rdeče s sladkornim delom

2 NAMEN

Orodja molekulskega modeliranja tvorijo pomemben del racionalnega in ekonomsko učinkovitega razvoja novih zdravilnih učinkovin. V tem procesu največkrat uporabljamo podatke o strukturi makromolekulskih tarč in/ali podatke o aktivnih ligandih. Z njihovo pomočjo nato postavimo robne pogoje virtualnih rešetanj kemijskih knjižnic, ki določajo lastnosti načrtovanih in/ali optimiziranih biološko aktivnih molekul. Glavnina metod trenutno temelji na uporabi statičnih struktur makromolekulskih tarč in aplikaciji empiričnih metod molekulskega sidranja in različnih farmakofornih modelov. V zadnjih letih se tem uveljavljenim pristopom pridružujejo še fizikalno osnovane metode molekulskih simulacij (npr. molekulska dinamika). Te omogočajo natančnejši vpogled v dinamične lastnosti obravnavane tarče in s tem bolj realno atomistično sliko obravnavanega sistema.

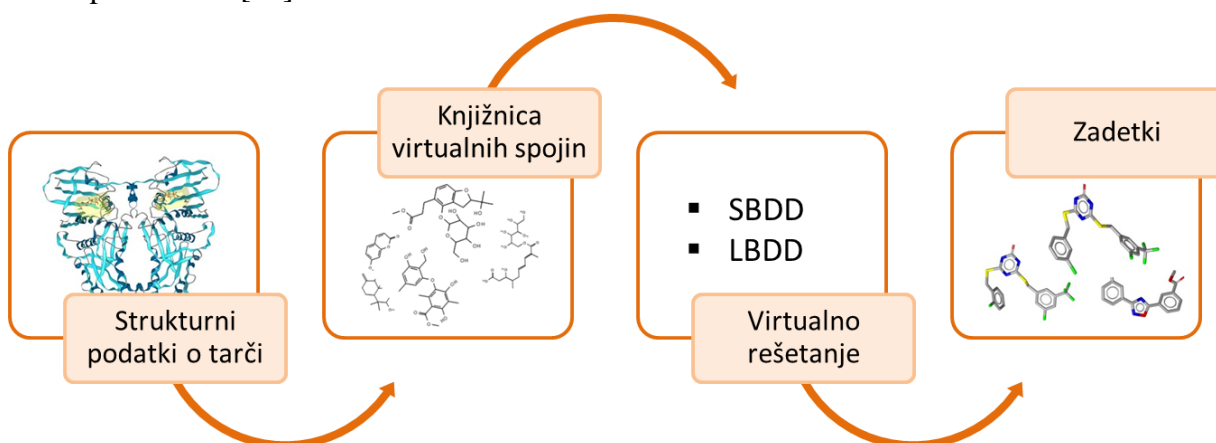
V zaključni nalogi bomo natančneje predstavili uporabo omenjenih orodij računske kemije na primerih načrtovanja in optimizacije inhibitorjev uveljavljene protirakave tarče, encima človeške DNA topoizomeraze II α . Ta kompleksen molekularni motor, ki spreminja topologijo DNA, želimo inhibirati preko alternativnega inhibicijskega mehanizma, kot ga imajo protirakave učinkovine, ki delujejo nanjo in so uvedene v klinično prakso. Najprej bomo z molekularno simulacijo preiskali obnašanje izbrane molekulske tarče. Nato bomo metode računske kemije uporabili na dveh različnih stopnjah načrtovanja učinkovin: identifikaciji novega kemijskega razreda topo II α inhibitorjev iz razreda disubstituiranih oksadiazolov in optimizaciji že obstoječih validiranih spojin vodnic iz razreda triazinonov. Napovedano vezavo načrtovanih spojin bomo študirali tudi z metodami molekulskih simulacij za pridobitev dinamične slike vezave in z dinofori združili statične in dinamične metode načrtovanja za boljše razumevanje medmolekulske prepoznavne. Na osnovi pridobljenih eksperimentalnih rezultatov, ki bodo izvedeni v okviru raziskav Teoretičnega Odseka na Kemijskem Inštitutu v Ljubljani, bomo lahko dobili tudi eksperimentalno ovrednotenje vseh korakov načrtovanja.

Cilji zaključne naloge so:

- Spoznati in naučiti se uporabljati tehnike računske kemije za načrtovanje biološko aktivnih molekul (npr. gradnja virtualnih knjižnic spojin, virtualno rešetanje, farmakoforni modeli, molekularno sidranje, molekularna dinamika, dinoforni modeli, izvajanje molekulskih simulacij na računalniških gručah, analiza rezultatov, itd.) in pripadajoče programe;
- Z uporabo metode molekulske dinamike analizirati dimer tarčne ATPazne domene topoizomeraze II α ;
- Prikazati uporabo teh tehnik na dveh primerih načrtovanja in optimizacije inhibitorjev človeške DNA topoizomeraze II α .

3 METODE

Računalniško podprto načrtovanje učinkovin (ang. *computer – aided drug design*, CADD) je že uveljavljen skupni izraz za računalniško aplikacijo metod molekulskega modeliranja, ki jih uporabljamo v naših raziskavah. Glavno tehniko molekulskega modeliranja predstavlja virtualno reševanje (ang. *virtual screening*, VS), ki se je uveljavilo kot komplementarna *in silico* metoda eksperimentalni predhodnici reševanja visoke zmogljivosti (ang. *high-throughput screening*, HTS) [7]. Pristop *in silico* reševanja je prikazan na Sliki 8 [54]. Za razliko od HTS, kjer rešujemo stvarne knjižnice spojin, pri VS avtomatizirano preiskujemo velike knjižnice virtualnih molekul, z namenom zoženja obstoječega kemijskega prostora na manjši razred aktivnih spojin na določeni tarči [64]. Za uspešno izvedbo pa je najprej ključnega pomena kvalitetna priprava knjižnice spojin, ki jo bomo preiskovali [54].



Slika 8. Pristop računalniško podprtega načrtovanja učinkovin in virtualnega reševanja

Virtualne knjižnice vsebujejo opise molekul v obliki tridimenzionalnih konformacij, pri čemer moramo paziti, da je virtualne molekule sploh možno sintetizirati. Danes se v izogib temu problemu poslužujemo programov, ki omogočajo generiranje 3D struktur, kot so na primer OMEGA, Concord in Corina [66].

Glavna računalniška orodja in algoritme za virtualno reševanje delimo v dve skupini – na načrtovanje na osnovi ligandov, kjer se uporabljajo predvsem farmakoforni modeli in na načrtovanje na osnovi strukture tarč, kjer je glavna metoda molekulskega sidranje. V začetnih fazah, pri identifikaciji zadetkov, odločitev za eno ali drugo metodo običajno sprejmemo na osnovi poznavanja tridimenzionalne strukture tarče, kasneje, v procesu optimizacije spojin vodnic, pa se pristopa lahko med seboj dopolnjujeta [44].

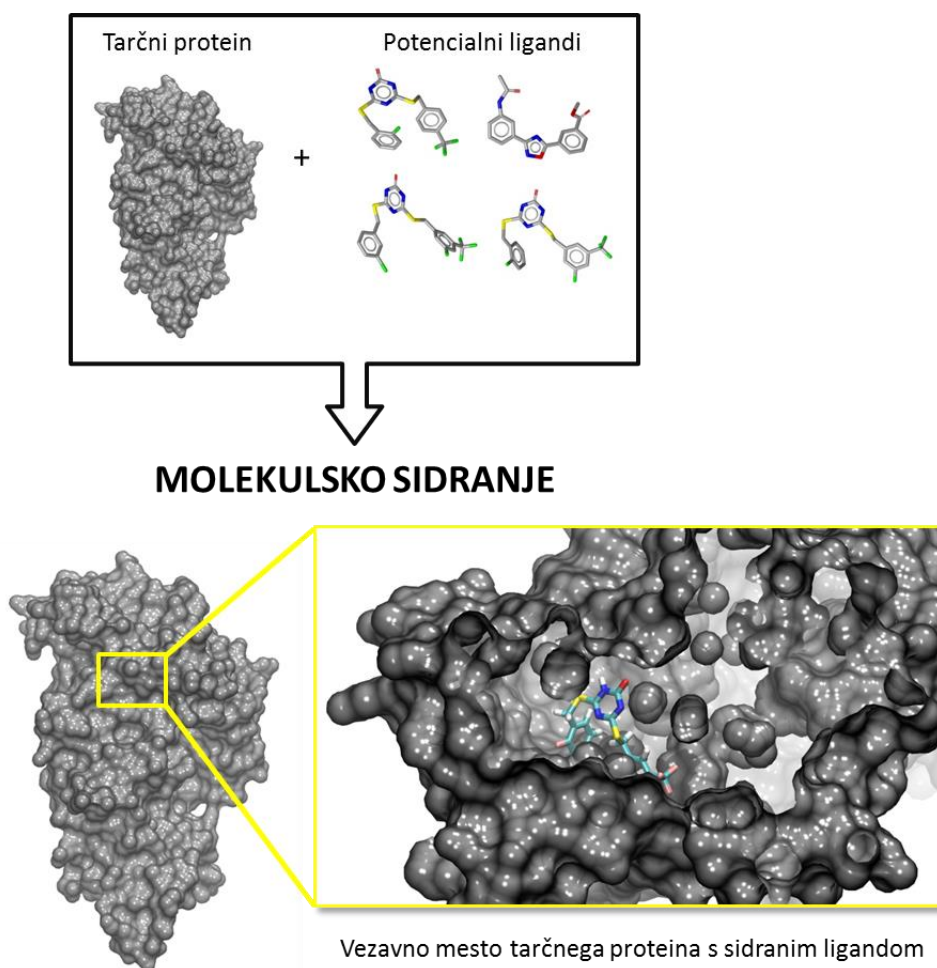
3.1 Načrtovanje in virtualno reševanje na osnovi strukture tarče (SBDD)

Če naše načrtovanje izhaja iz poznane 3D strukture tarče (določene z rentgensko difrakcijo ali pa NMR spektroskopijo), je najpogosteje uporabljena tehnika molekulske sidranje. Sestoji iz dveh delov; prvi del opravi *iskalni algoritem*, ki generira konformacijo liganda v aktivnem mestu tarčnega proteina, drugi del pa je ocena vezavne energije z uporabo *cenilnih funkcij* [40].

3.1.1 Molekulske sidranje – iskalni algoritmi

Z molekulske sidranjem (ang. *molecular docking*) skušamo napovedati 3D strukturo kompleksa med vezanim ligandom (to je ponavadi mala molekula, lahko pa je tudi protein oz. druga makromolekula) in tarčnim proteinom [43]. Glavnina programov zaradi obsežnega konformacijskega prostora makromolekulske tarče obravnava statično, kar predstavlja eno ključno omejitev dobljenih modelov. Zato je bilo razvitih več t.i. iskalnih algoritmov (ang. *search algorithm*), ki omogočajo nekoliko bolj fokusirano konformacijsko analizo [25, 69]. V procesu sidranja tako iskalni algoritem navadno spreminja le stopnje prostosti ligandov (predvsem vrednosti torzijskih kotov okrog katerih je možna rotacija), ki jih skuša kar najbolje umestiti v vezavno mesto. Programi za sidranje se v tem aspektu delijo na simulacijske, naključne oz. stohastične in sistematične. Nekateri programi omogočajo tudi delno ali popolno fleksibilnost molekulske tarče, vendar je ta pristop zaradi slabe možnosti validacije rezultatov bistveno manj v praktični uporabi [5, 25, 70].

Program za molekulske sidranje GOLD [68], ki smo ga uporabljali v naših raziskavah, temelji na naključni oz. stohastični metodi in uporablja t. i. genetski algoritem, ki je osnovan na evolucijski teoriji in je eden najbolj pogostih programov za molekulske sidranje [36]. Genetski algoritem deluje tako, da generira populacijo kromosomov na katerih so zapisane informacije o ligandu (npr. konformacija, torzijski koti itd.), ti pa nato med seboj tekmujejo za reprodukcijo. Njihovo uspešnost oceni cenilna funkcija in je pogojena z izračunano vezavno energijo konformacije, ki jo kromosom hrani. Kromosomi si med seboj lahko izmenjujejo dedne informacije in so podvrženi mutacijam, podobno kot realne populacije. Skozi več generacij tako preživijo boljši kromosomi, kar pomeni tisti, ki hranijo konformacije z najmanjšimi energijami. Genetski algoritem tako predstavlja učinkovito preiskovanje večdimenzionalnega konformacijskega prostora [38]. Program GOLD je tudi eden najpogosteje uporabljenih programov za tak tip računov in pri generiranju konformacij upošteva tudi nekaj eksperimentalnih omejitev o dovoljenih torzijskih kotih za posamezne atomske tipe. Splošna shema molekulskega sidranja je prikazana na Sliki 9.



Slika 9. Splošna shema molekulskega sidranja.

3.1.2 Molekulsko sidranje – cenilne funkcije

S cenilnimi funkcijami (ang. *scoring function*) razvrstimo dobljene konformacije sidranih ligandov glede na izračunano energijo interakcije. Dobljene vrednosti so prvi zelo grobi približek Gibbsove proste energije vezave (ΔG) in omogočajo tudi geometrijski vpogled v izračunano konformacijo medmolekulskega prepoznavanja [45]. Iskalni algoritem in cenilne funkcije delujejo povezano, saj rezultati cenilnih funkcij determinirajo vhodne podatke (izbrane molekule) za ponovni cikel generiranja vezavnih konformacij z iskalnim algoritmom.

Cenilne funkcije, v splošnem razdelimo v tri uveljavljene razrede [39, 54, 66]:

- *Cenilne funkcije, ki temeljijo na polju sil* (»force field – based«) izračunajo dve vrsti energije. Prva je interakcija ligand-receptor, ki jo izračuna z upoštevanjem van der Waalsovih in elektrostatskih sil, druga pa notranja energija proteina (npr. GOLD-score, DOCK-score);

- *Empirične cenilne funkcije*, ki temeljijo na eksperimentalno pridobljenih kompleksih, katerih vezavna energija je izračunana kot utežena vsota različnih členov (H vezi, hidrofobne interakcije ipd.) (npr. ChemScore, FlexX-score, LUDI-score, PLP-score);
- *Cenilne funkcije dobljene s pomočjo statistične mehanike* (»knowledge - based«), ki temeljijo na statistični analizi razdalj med atomi eksperimentalno določenih kompleksov (npr. DSX).

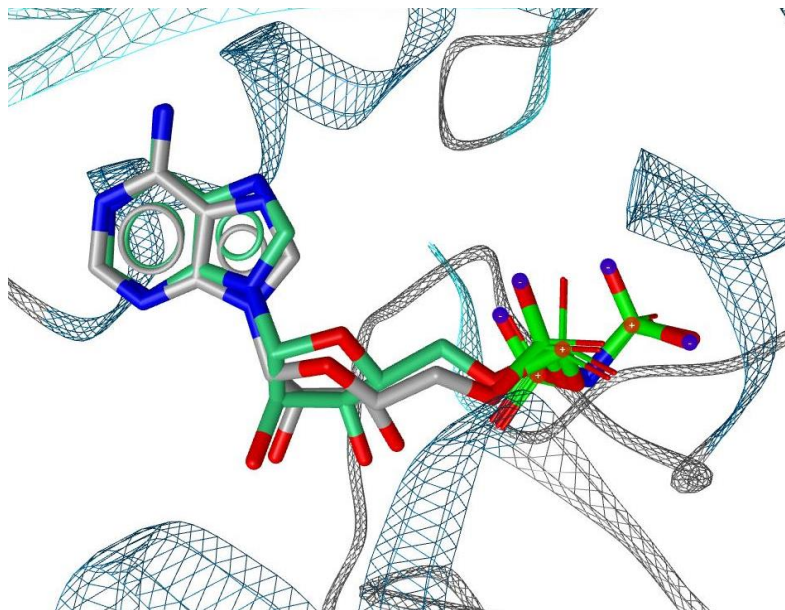
Uveljavljena je tudi sočasna uporaba več cenilnih funkcij, kar imenujemo »ocena na osnovi konsenza« (consensus scoring) (npr. CScore), kjer lahko izberemo tiste molekule, ki izkazujejo najobetavnejše lastnosti z več cenilnimi funkcijami [17].

Poudariti velja, da trenutno še nobena izmed razvitih funkcij iz zgoraj naštetih razredov ne izpolnjuje pogojev idealne funkcije, ki bi bila popolnoma zanesljiva in splošno uporabna. Razlog leži tudi v dejstvu, da je prosta energija vezave termodinamska količina in je kot take ne moremo fizikalno določiti na osnovi računov na statičnih makromolekularnih modelih z uporabo le ene konformacije. V ta namen je namreč potrebno generirati večje družine (oz. ansamble) konformacij, ki so dostopne makromolekularnemu sistemu pri določenih pogojih in nato z metodami statistične termodinamike izračunati te količine [4]. Take metode so npr. metoda pertrubacije proste energije in termodinamska integracija [54]. To je zamuden in računsko zahteven postopek, ki za rutinsko uporabo pri načrtovanju učinkovin ni uporaben.

3.1.3 Uporabljen postopek molekulskega sidranja v zaključni nalogi

Za izračun konformacij molekul v aktivnem mestu tarče z metodo molekulskega sidranja smo uporabili program GOLD [36]. Najprej smo za validacijo programa in naših nastavitvev reproducirali vezavno pozo ko-kristaliziranega referenčnega liganda AMP-PNP v vezavnem mestu za ATP, kot je prikazano na Sliki 10. Uporabili smo sledeče nastavitve genetskega algoritma v programu GOLD: populacija = 100, selekcijski pritisk = 1,1, število operacij = 100 000, število otokov = 5, velikost niše = 2, migracija = 10, mutacija = 95, Crossover = 95. Uporabili smo le 1 protomer (veriga A) tarčne strukture človeške topoizomeraze II α pridobljeno iz PDB banke (1ZXM) [71], kjer smo aktivno mesto definirali kot kroglo premera 10 Å okoli referenčnega liganda ($x = 35,7113$; $y = 0,452$; $z = 40,0306$) in proteinu dodali vodikove atome. Za nastavitvev protonacijskega vzorca smo uporabili prevzete nastavitve. Odstranili smo Mg²⁺ ion in vse vode razen W931 in W924, ki naj bi bili na osnovi predhodnih raziskav pomembni pri vezavi molekule v aktivno mesto [55, 56, 58]. Za primerjavo smo uporabili več različnih cenilnih funkcij (GoldScore, ChemScore, ChemPLP) in dve spinski stanji vod W924 in W931. Z opisanimi nastavitvami smo referenčno molekulo AMP-PNP sidrali desetkrat v vezavno mesto za ATP. Najboljša primerljivost med sidrano in kristalizirano pozo je bila dosežena s cenilno funkcijo GoldScore (RMSD = 0,68 Å) [41]. Za vsako obravnavano načrtovano spojino

predstavljeno v tej študiji smo pri enakih nastavitvah izračunali 10 vezavnih poz v ATP vezavnem mestu topo II α in jih kasneje vizualizirali ter ovrednotili v programu LigandScout.



Slika 10. Reproduciranje vezavne poze nativnega liganda AMP-PNP. Prekrivanje sidrane vezavne poze (zeleni) in eksperimentalno določene (PDB: 1ZXM) (siva).

3.2 Načrtovanje in virtualno reševanje na osnovi ligandov (LBDD)

3.2.1 Farmakoforni modeli

Farmakofor je po IUPAC definiciji zbirka steričnih in elektronskih omejitev, ki jim mora molekula zadostiti, za optimalne medmolekulske interakcije z biološko tarčo in posledično željen biološki odziv [15].









Farmakofor predstavimo s farmakofornimi elementi (npr. donor/akceptor vodikove vezi, hidrofobna interakcija, anionski/kationski center, itd). Farmakoforni elementi so točke v prostoru, obdane s tolerančnim radijem, znotraj katerega mora ležati fragment preiskovane molekule in izkazovati lastnosti, ki jih določa posamezni obravnavani element. Nekateri farmakoforni elementi (npr. donorji ali akceptorji vodikovih vezi) so nadalje tudi prostorsko usmerjeni. Pri farmakoforih tako ne gre za realno molekulo ali funkcionalno skupino, ampak za bolj splošen, generaliziran opis molekularne strukture [47, 52]. V Preglednici IV so zbrani najpogostejši farmakoforni elementi in njihove shematske oznake [5].

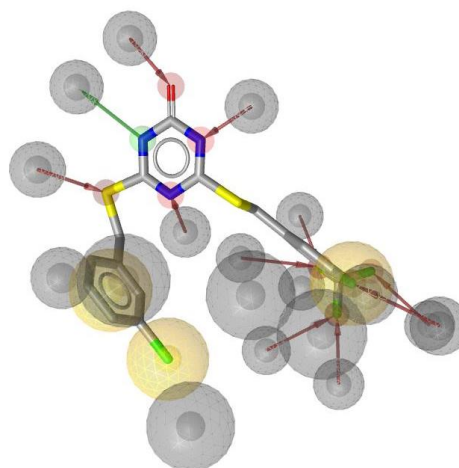
Najpogosteje virtualno reševanje na osnovi ligandov s postavitvijo farmakofornega modela (ang. *ligand – based pharmacophore*) uporabimo v primeru, ko struktura tarče ni poznana,

imamo pa serijo ligandov z znano biološko aktivnostjo. Tako z zgoraj naštetimi farmakofornimi elementi postavimo robne pogoje *in silico* reševanja, preko katerih s t. i. metodami prileganja (ang. *alignment*) ovrednotimo knjižnice spojin. Poslužujemo se dveh kriterijev, s katerima ocenjujemo kvaliteto prileganja. Lahko ocenjujemo točkovno prileganje spojine, takrat uporabimo RMSD parameter, lahko pa ocenjujemo tudi, kako dobro se naše molekule prilegajo lastnostim, določenim s farmakoforjem [22, 73].

Farmakoforni modeli pa niso omejeni izključno na primere, ko imamo poznane le ligande, ampak jih lahko zgradimo v kombinaciji s poznavanjem strukture tarče oziroma strukture kompleksa med tarčo in ligandom, kar imenujemo na strukturi temelječi farmakofori (ang. *structure – based pharmacophore*) [22].

Preglednica IV: Pregled najpogosteje uporabljenih farmakofornih elementov (levo) in primer farmakofornega modela pridobljenega s programom LigandScout (desno). Prirejeno po [72].

Farmakoforni element	Pomen	Farmakoforni element	Pomen
	Donor vodikove vezi		Aromatski obroč
	Akceptor vodikove vezi		Hidrofobna interakcija
	Kationski center		Interakcija s kovinskim ionom
	Anionski center		Sterična omejitev



3.2.2 Uporabljen postopek postavitve farmakofornih modelov

V tej nalogi smo vse na strukturi temelječe farmakoforne modele postavili v programu LigandScout. Pri izgradnji smo uporabili prvotne nastavitve prepoznavanja farmakofornih elementov.

3.3 Molekulske simulacije

Predhodno opisane metode računalniško podprtega načrtovanja omogočajo vpogled v medmolekulsko prepoznavanje, vendar žal ne nudijo slike o dinamičnem obsegu konformacijskega prostora, ki je sistemu (navadno kompleks ligand-receptor) dostopen. Dinamična slika sistema je pogosto nujna za poglobljeno razumevanje obravnavanih sistemov, saj nam v prvem koraku pove, kako stabilna je posamezna konfiguracija sistema na pripadajoči površini potencialne energije kompleksa. Zato se poslužujemo tehnik molekulskih simulacij [21].

3.3.1 Empirični opis atomov in molekul – molekulska mehanika

Za razširitev na dinamično obravnavo sistema se poslužujemo bodisi empiričnih bodisi kvantnomehanskih modelov, ki opisujejo odnose med atomi in molekulami. Fizikalno osnovan kvantnomehanski pristop, ki ga opisuje Shrödingerejva enačba [62], je zaradi računske zahtevnosti neprimeren za obravnavanje bioloških sistemov. Empirični model atomov ali molekulska mehanika (MM), ki je računsko manj zahteven, pa opisuje atome kot nabite kroglice s pripadajočimi masami, ki so med seboj povezane s kovalentnimi vezmi, ki jih obravnava kot prožne vzmeti [46]. Empirično potencialno energijsko funkcijo oz. polje sil (ang. *force field*), ki stoji za molekulsko mehaniko in opisuje celoten sistem podaja spodnja splošna enačba:

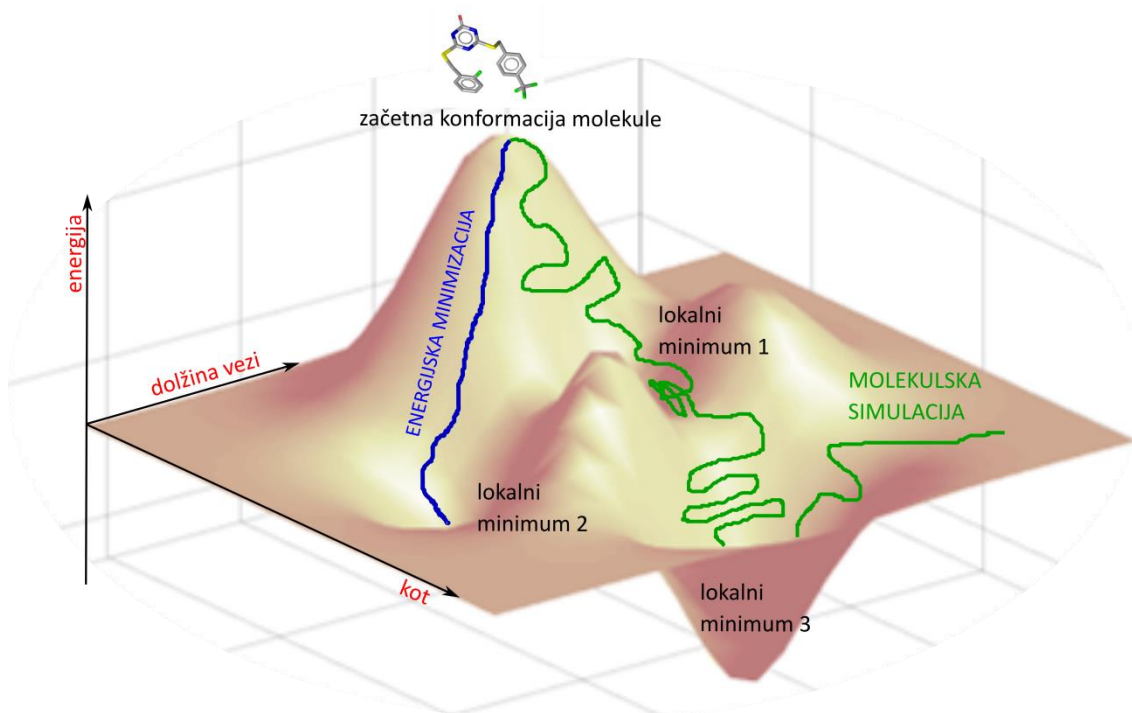
$$E_{skupna} = \sum_i^{vezi} E_i^{def.vezi} + \sum_i^{valenčni\ koti} E_i^{def.val.kotov} + \sum_i^{torzijski\ koti} E_i^{def.tor.kotov} + \sum_i \sum_j^{nevez.\ interakc.} E_{i,j}^{nevez.interakc.}$$

Celotna energija je opisana kot vsota prispevkov, ki so posledica odstopanj od idealnih veznih razdalj (deformacije vezi – prvi člen), valenčnih oz. veznih kotov (deformacije valenčnih kotov – drugi člen), dihedralnih oz. torzijskih kotov (deformacije torzijskih kotov – tretji člen) in prispevkov neveznih interakcij, ki vključujejo Van der Waalove interakcije ter Coulombske oz. elektrostatske interakcije ($E^{nevezne\ interakcije} = E^{Van\ der\ Waals} + E^{Coulombske\ int.}$) [34, 53]. Za zgornjo enačbo torej potrebujemo dobro določene parametre, ki določajo obnašanje posameznega atoma. Za vsak posamezni atom v istem sistemu pa velja, da se lahko obnaša zelo različno (ne obstaja atom dušika, imamo lahko amidnega, aminskega, kvarternega ipd.). Za reševanje tega problema se je vpeljal pojem atomskega tipa, ki posamezni atom natančno določi. Postopek definiranja zgoraj navedenih parametrov pa imenujemo parametrizacija polja sil [50].

Programski paketi, ki vključujejo pogosto uporabljena polja sil, v postopkih molekulskih simulacij so AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) [19], CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) [13], GROMOS (GRoningen Molecular Simulation package) [20], OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations), MMFF (Merck Molecular Force Field) [2] in CVFF (Consistent Valence Force Field) [51]. Za različne molekulske sisteme uporabljamo različne funkcije in parametre, ki sestavljajo omenjena polja sil, kar omogoča natančnejše in kvalitetnejše rezultate.

3.3.2 Molekulska dinamika (MD)

Molekulska dinamika (MD) in Monte Carlo (MC) metoda sta najpogosteje uporabljeni tehniki molekulskih simulacij [53], s katerimi preiskujemo tako imenovano površino potencialne energije (ang. *potential energy surface*, PES), ki ponazarja energijo molekule kot funkcijo vseh njenih možnih konformacij (Slika 11) [41]. Na njej s postopkom energijske minimizacije iščemo stacionarne točke, najpogosteje minimume, v katerih ima molekula najbolj ugodno energijo glede na lokalno okolico začetne konformacije.



Slika 11. Prikaz preiskovanja površine potencialne energije z energijsko minimizacijo in molekulsko simulacijo.

V naših raziskavah smo uporabili metodo molekulske dinamike (MD), pri kateri konfiguracije molekul generiramo preko numeričnega integriranja enačb 2. Newtonovega zakona ($F = ma$). Atomom molekule na začetku določimo naključne hitrosti, ki hkrati določajo tudi temperaturo sistema. Sledi t.i. integracijski korak, ko za kratek časovni interval pustimo, da se atomi enakomerno pospešeno gibljejo v smeri dobljene rezultante

sile, kot opisujejo klasične Newtonove enačbe gibanja. Po pretečenem času, ki mora biti krajši od najhitrejših gibanj v molekuli in je običajno 1 ali 2 fs (10^{-15} s), izračunamo nove koordinate in nato sile na posamezne atome, ter prej opisan postopek ponovimo. Število ponovljenih korakov določi celotni čas MD simulacije [5]. Rezultat simulacije je molekulska trajektorija, v kateri so v binarni obliki zapisani vsi potrebni podatki o konformaciji molekul in jih nadalje uporabljamo za vizualizacijo in analizo.

Simulacijski časi, ki jih omogočajo trenutno dostopni računalniki (v najboljšem primeru nekaj mikrosekund), so še vedno daleč od realnih časov potrebnih za vezavo ligandov ali za konformacijske spremembe tarče, ki znašajo od nekaj ms do nekaj s, ali celo več. Kljub temu pa dobimo pomembno dodatno informacijo o pravilnosti napovedane vezavne poze in pomoč pri usmeritvah za nadaljnje načrtovanje [63].

3.3.3 Analiza molekulkih simulacij - RMSD, RMSF parametra

Kvantitativno smo dobljene trajektorije analizirali predvsem z uporabo dveh parametrov. Prvi izračunani parameter je bil RMSD (ang. *Root-Mean-Square Deviation*), ki nam da prve podatke o stabilnosti molekule, saj predstavlja standardno deviacijo atomskih razdalj med ekvivalentnimi atomi glede na referenčno strukturo, v našem primeru izhodno sidrano pozo liganda [24]. Definiran je kot:

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

kjer je $d_{i,j} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2}$ razdalja med atomoma i in j , s koordinatami x , y , z in N število primerjanih razdalj.

Ko imamo opravka s proteinskimi tarčami, pa si velja zapomniti, da njihova dodatna interna dinamika, kot na primer lokalno premikanje proteinskih zank, vrtenje domen itd. lahko ključno vpliva na stabilnost poze in obstoj interakcij. V takšnih primerih se poleg RMSD parametra dodatno računa še RMSF parameter (ang. *Root-Mean-Square Fluctuation*). Z RMSF parametrom opisujemo premikanje vsakega posameznega atoma v danem simulacijskem času, torej z računanjem lokalnih sprememb v proteinu merimo fleksibilnost njegovih delov [24]. Definiran je kot:

$$RMSF(a) = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=0}^T (a_t - \bar{a})^2}$$

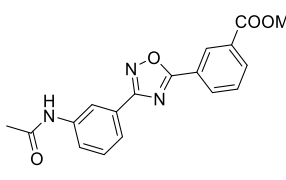
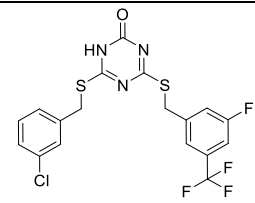
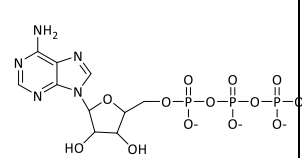
kjer je T število vseh trajektorij simulacije, na katerih je RMSF izračunan, t čas, a pozicija oz. zaporedna številka aminokislina, izraz $(a_t - \bar{a})$ pa predstavlja odmik aminokislina a v času t , glede na njeno povprečno pozicijo.

3.3.4 Uporaba metode molekulske dinamike (MD) v zaključni nalogi

Za simulacije molekulske dinamike smo v primerih načrtovanja in optimizacije spojin uporabili le eno podenoto ATPazne domene človeške topoizomeraze II α , skupaj s sidranim ligandom (eno molekulo iz serije oksadiazolov (**2**) in eno molekulo iz serije optimiziranih triazinonov (**10**); glej Preglednico V). Postopek je bil uspešno razvit v predhodnih študijah katalitičnih inhibitorjev topo II α . Za izgradnjo manjkajočih aminokislin (Lys101, Lys123, Lys176, Asn210, Glu212, Lys265, Lys278, Lys287, Val288, Met303, Lys343 in Lys400) smo uporabili PDB hydro web server, ki jih je avtomatsko zaznal, ter jih zgradil. Nadalje smo s pomočjo spletnega vmesnika CHARMM-GUI [35] pripravili solvatiran kompleks protein–ligand v programskem okolju CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics). Za definiranje atomskih tipov smo uporabili polje sil CHARMM General Force Field (CGenFF) [49] (glej priloge za izračunane delne naboje in določene atomske tipe). Proteinski kompleks smo solvatirali v sfero vodnih molekul tipa TIP3 [37], oktaedrične oblike premera 10 Å in dodali 3 kloridne ione, da je bil sistem elektronevtralen. Ione smo v sfero postavili z Monte Carlo metodo. Periodični robni pogoji (ang. *periodic boundary conditions*, PBC) so bili samodejno ustvarjeni glede na obliko in velikost sistema. Končni sistem je vseboval okrog 73270 atomov (+- 10 glede na obravnavan sidran ligand). Ekvilibracijska faza simulacije, ki je služila postopnemu zmanjševanju steričnih napetosti med posameznimi vezmi, kontroliranemu oddaljevanju atomov, ki so morda preblizu skupaj in urejanju drugih manjših konformacijskih anomalij, je trajala 1 ns. Produkcijska faza MD simulacije, ki je trajala 20 ns (500 000 korakov dolžine 2 fs) je bila izvedena z integracijskim algoritmom leap-frog. Konformacije smo vzorčili vsakih 500 korakov, kar znese končnih 10 000 konformacij sistema za analizo.

Na podoben način smo pripravili in izvedli tudi 100 ns dolgo simulacijo molekulske dinamike dimera ATPazne domene in molekule ATP (Preglednica V). V tem primeru je končni sistem je vseboval 79 998 atomov. Vizualizacije in analize so bile izvedene s programom VMD (Visual Molecular Dynamics) [30]. Račune smo izvajali na HPC gručni računskega centra Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Preglednica V: Izbrane molekule, za katere so bile izvedene simulacije molekulske dinamike. Za molekuli **2** in **10** smo izračunali tudi dinoforna modela.

Spojina	Strukturna formula	Spojina	Strukturna formula	Spojina	Strukturna formula
2		10		ATP	

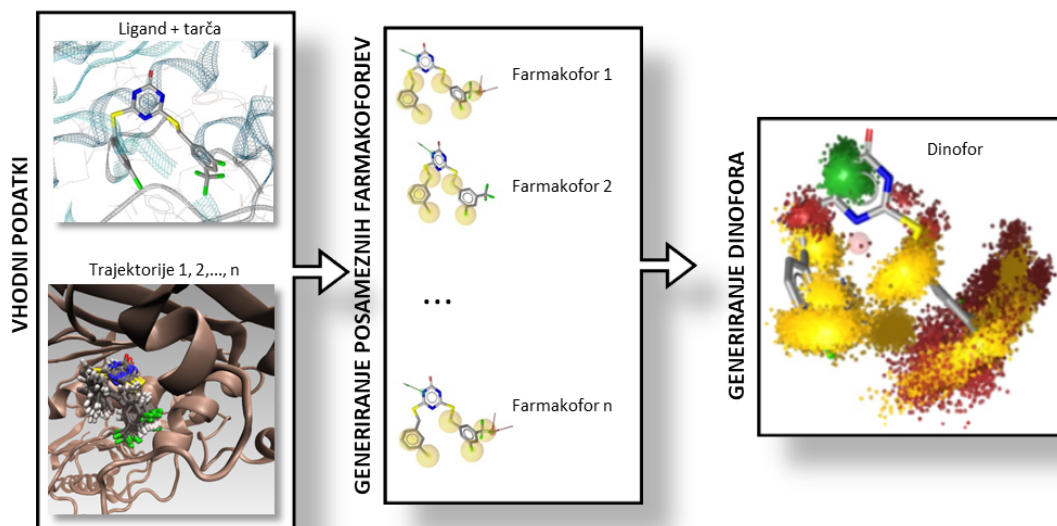
3.3.5 Dinofori – kombinacija farmakofornih modelov in molekulske dinamike

Namen dinoforov oz. dinofornih modelov je razširitev statičnega vpogleda v interakcijski vzorec ligand-tarča, ki ga zagotavlja klasični farmakoforni model, v dinamični vpogled preko vključitve statističnih informacij o konformacijskih spremembah liganda, ki jih pridobimo iz simulacij molekulske dinamike. Farmakoforni model vključuje informacije le ene trajektorije, medtem ko dinofor predstavlja združitev farmakofornih modelov vseh trajektorij. Tako ta pristop predstavlja še eno možnost analize simulacij molekulske dinamike, kot dodatek geometrijsko utemeljenim RMSD in RMSF parametrom ter preprostim merjenjem razdalj med atomi. Koncept dinofornih modelov, kot jih uporabljamo v tej nalogi je bil razvit na Freie Universität (FU) Berlin v laboratoriju prof. Gerharda Wolberja [65].

Gradnja dinofora v programu DynophoreApp [65] poteka tako, da program zgradi farmakofore za vsako ustvarjeno konformacijo v trajektoriji MD simulacije, farmakoforni elementi istega tipa, ki se pojavljajo na istih atomih liganda, pa so združeni v t. i. superelemente (ang. *superfeatures*). Pregleden prikaz koncepta gradnje dinofora prikazuje Slika 11. Za vhodne podatke (Slika 12, »VHODNI PODATKI«) program potrebuje datoteko formata PMZ, ki vsebuje definicije vseh atomov liganda in makromolekule (tarče), vezi in farmakoforov v molekularnem okolju programa LigandScout ter datoteko formata DCD, ki hrani podatke o trajektorijah molekulske dinamike. Nato program DynophoreApp za vsako trajektorijo zgenerira farmakoforni superelement (Slika 12, »GENERIRANJE POSAMEZNIH FARMAKOFORJEV«). Vsak farmakoforni element pa je nadgrajen z informacijo o atomih, vključenih v interakcijo, tovrstni element pa se imenuje superelement. Rezultat generiranja dinofora je datoteka formata PML, ki jo vizualiziramo in analiziramo s programom LigandScout.

3.3.6 Postavitev dinoforov v zaključni nalogi

Na enak način kot opisano zgoraj, smo tudi mi uporabili MD trajektorije spojin **2** in **10** za gradnjo dinofornih modelov. Dinofore smo izračunali na računalniški gruči raziskovalne skupine prof. Wolberja na FU Berlin.



Slika 12. Shema generiranja dinofora s programom DynophoreApp

Grafično dinofor predstavljajo 3D oblaki superelementov, vsaka točka v oblaku pa predstavlja element posamezne trajektorije (Slika 12, »GENERIRANJE DINOFORA«). Prvo, grobo informacijo dobimo že iz vizualizacije dinofora, saj iz gostote oz. razpršenosti oblakov sklepamo na stabilnost poze liganda skozi MD; bolj kompakten oblak kaže na bolj stabilno pozo in močnejše interakcije z aminokislinsko okolico vezavnega mesta, medtem ko razpršeni oblaki s kratko obstojnimi interakcijami, kažejo na večjo dinamiko liganda in premike posameznih delov molekule. Natančneje pa dinofore analiziramo s pomočjo statističnih in sekvenčnih informacij, ki jih DynophoreApp prav tako shrani kot rezultat izračuna. Super elementi so statistično opisani kot frekvence, kako pogosto se pojavljajo tekom MD simulacije in odstotki prispevkov posamezne aminokislinske k interakciji oz. tvorbi super elementa [65]. Natančneje je statistična in sekvenčna analiza dinofornega modela predstavljena na naših primerih v poglavju Rezultati.

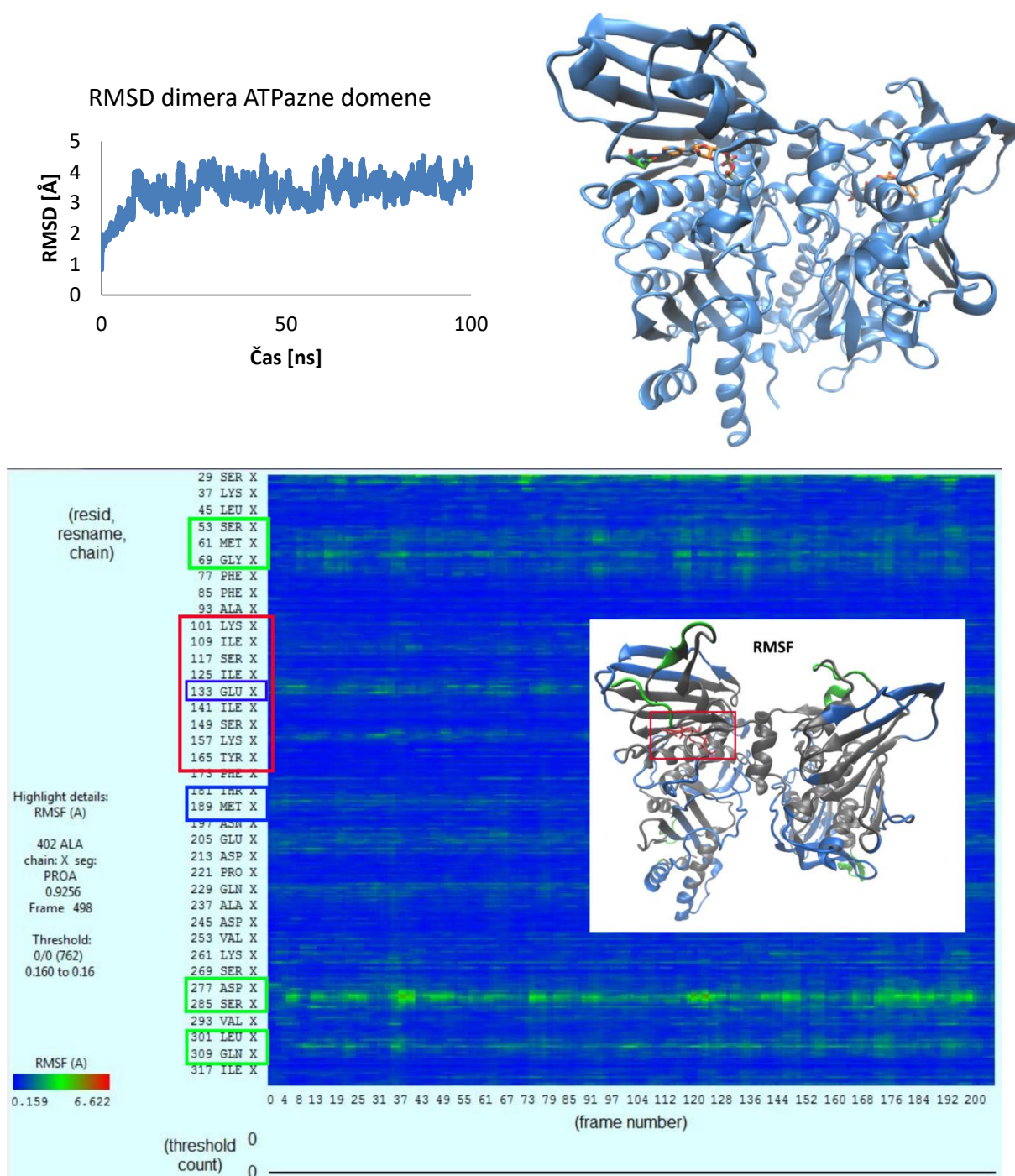
4 REZULTATI

4.1 Analiza konformacije ATPaznega dimera z metodo molekulske dinamike

Dostopni kristalni strukturi posameznih domen človeške topoizomeraze II α (ATPazna domena (PDB: 1ZXM) in centralna domena (PDB: 4FM9)) ter celotna kristalna struktura kvasne topoizomeraze II predstavljajo velik doprinos k razumevanju mehanizma delovanja encima, vendar je za načrtovanje zdravilnih učinkovin ključno razumevanje dinamike obrnvanega proteina, še posebej vezavnega mesta.

Za vpogled v dinamičnost obravnavane tarče topoizomeraze II α , smo pred načrtovanjem izvedli 100 ns dolgo simulacijo molekulske dinamike kristalne strukture ATPazne domene v kompleksu z molekulo ATP in jo analizirali z geometrijskima RMSD in RMSF parametroma.

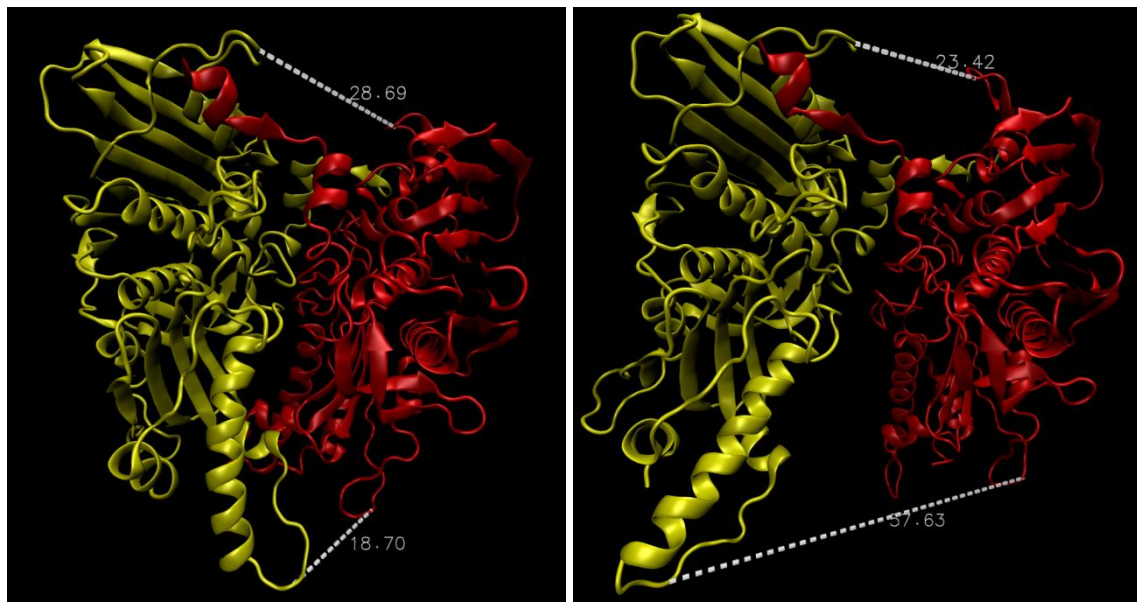
RMSD vrednost dimera ATPazne domene (t.i. N vrat) glede na začetno pozo (Slika 13, graf levo zgoraj) je znašala $3,39 \pm 0,50$ Å. Na Sliki 13 je prikazan še diagram z RMSF vrednostmi ene ATPazne domene iz 100 ns dolge simulacije molekulske dinamike, iz katere je bilo za izračun ekvidistančno vzetih 200 konformacij iz trajektorij (prikazano na abscisni osi). Na ordinatni osi so označene posamezne aminokisliline glede na oznake v PDB datoteki (1ZXM) in njihova RMSF vrednost, ki je predstavljena z barvno lestvico od modre, ki ponazarja najnižje RMSF vrednosti (od 0,159 Å), kar pomeni najbolj stabilen protein, do zelene in na manjših odsekih rdeče (do 6,622 Å), kar predstavlja bolj dinamične oz. fleksibilne dele proteina. Na isti sliki je prikazana tudi celotna ATPazna domena (PDB: 1ZXM), obarvana glede na RMSF. Z zeleno so obarvani najbolj dinamični deli proteina (aminokisliline v zelenih okvirjih; Ser53 – Gly69, Asp277 – Ser285, Leu301 – Gln309), z modro nekoliko manj (aminokisliline v modrih okvirjih; Glu133, Thr181 – Met189), preostanek pa je najbolj stabilen. Kot pričakovano, najbolj dinamičen del predstavljajo proteinske zanke, ker pa nas pri načrtovanju učinkovin najbolj zanima stabilnost vezavnega mesta, je analiza tega najbolj pomembna. Z RMSF izračunom smo potrdili, da je vezavno mesto, kjer se nahaja molekula ATP tekom 100 ns simulacije ostaja v geometrijsko stabilni konformaciji (aminokisliline v rdečem okvirju; Lys101 – Phe173).



Slika 13. RMSD vrednost dimera ATPazne domene (levo zgoraj); ATPazna domena (modra), ko-kristaliziran ligand AMP-PNP (oranžen) ter aminokislina Asn120 (zelena) (desno zgoraj); RMSF vrednosti ATPazne domene tekom 100 ns dolge simulacije molekulske dinamike (spodaj). Posamezni deli so obarvani glede na vrednost RMSF oz. dinamičnost proteina (zelena – najvišje vrednosti oz. najbolj dinamičen protein; modra – nekoliko manjše vrednosti; rdeča – stabilno ATP vezavno mesto).

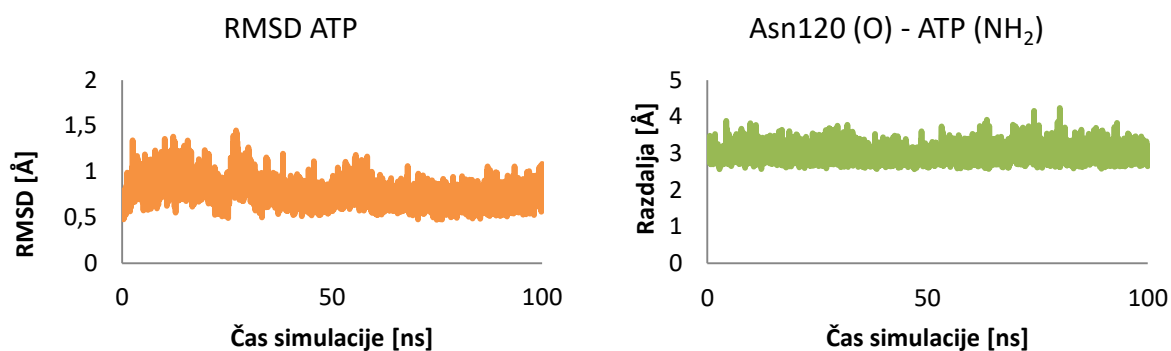
Razmeroma visoka vrednost RMSD parametra je posledica odpiranja in zapiranja obeh koncev dimera ATPazne domene tekom katalitičnega cikla topoizomeraze. Na Sliki 14 je ta sprememba stanj prikazana z razliko med razdaljama obeh koncev. V začetnem stanju je razdalja med naključnima atomoma zgornje zanke 28,69 Å, po 100 ns pa se zmanjša na

23,42 Å. Razdalja med atomoma spodnje zanke pa se iz 18,70 Å poveča na 57,63 Å, kar najverjetneje kaže na olajšano sposobnost proteinskega dimera ATPazne domene za vezavo DNA molekule in C-terminalnega dimera topo II α .



Slika 14. Začetno (levo) in končno (desno) stanje 100 ns dolge MD simulacije kaže na fleksibilnost dimera ATPazne domene.

Preiskali smo tudi obnašanje ATP molekule v aktivnem mestu topoizomeraze. RMSD vrednost simulirane ATP molekule (Slika 15, levo) je znašala $0,76 \pm 0,14$ Å, kar kaže na stabilnost poze, to pa potrjuje tudi povprečna razdalja med ATP in Asn120, ki je ključna interakcijska aminokislina pri našem načrtovanju in je merila $2,96 \pm 0,20$ Å (Slika 15, desno). Tudi večina preostalega interakcijskega vzorca med ATP in aktivnim mestom je ostala stabilna.



Slika 15. RMSD vrednost liganda ATP (levo); Razdalja med aminokislino Asn120 in ligandom ATP (desno).

4.2 Primer I: Identifikacija novih zadetkov topo II α inhibitorjev na osnovi strukturno vodene optimizacije izhodne neaktivne molekule - 3,5-disubstituirani 1,2,4-oksadiazoli

4.2.1 Strukturno podprto načrtovanje in izbor analogov

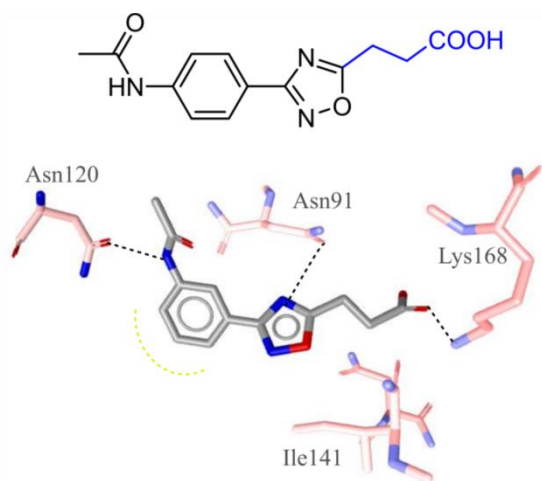
V prvem primeru načrtovanja biološko aktivnih molekul bomo pokazali, kako lahko na osnovi izhodne neaktivne spojine na izbrano tarčo s pomočjo prileganja in molekulskega sidranja načrtujemo nove molekule, za doseganje uspešne inhibitorne aktivnosti na topo II α . Raziskave smo izvajali skupaj z mlado raziskovalko Kajo Bergant (Kemijski inštitut) in doktorskim študentom Matejem Janežičem (RIKEN, Japonska). Naše raziskave, ki so privedle do identifikacije novega razreda inhibitorjev, izhajajo iz serije dostopnih analogov disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov, ki so jih predhodno načrtovali kot inhibitorje bakterijske DNA giraze.

Vezavni mesti DNA giraze in človeške topoizomeraze II α sta zelo podobni, po prileganju ATPaznih domen bakterijske giraze in človeške topo II α , smo namreč ugotovili, da se ujemata v ključnih aminokislinah za vezavo (Asn120 (topo II α) in Asp73 (giraza), Asn91 (topo II α) in Asn46 (giraza), Lys378 (topo II α) in Lys337 (giraza), Gln376 (topo II α) in Gln335 (giraza)). Na podlagi ugotovljene podobnosti obeh vezavnih mest, smo spojine iz disubstituiranega 1,2,4-oksadiazolnega razreda (Preglednica VI) sidrali v ATP vezavno mesto s programom GOLD po validiranem protokolu opisanem v prejšnjem poglavju.

Izbrali smo serijo spojin iz tega razreda, ki so v sidranju izkazovale najboljše teoretične vezavne lastnosti za preizkus zaviralne aktivnosti na človeški topoizomerazi II α . Kriterij izbora so bile vrednosti cenilnih funkcij in geometrijska ustreznost napovedanega interakcijskega vzorca, kar pomeni tiste, ki so se v vezavnem mestu za ATP orientirale podobno kot referenčni ligand AMP-PNP v kristalizirani strukturi.

Na Sliki 16 je prikazan primer sidranega oksadiazolnega derivata in zaznane interakcije z aminokislinsko okolico, ki jih je program LigandScout prepoznal pri tvorbi farmakofora. Amidni dušik na prvem benzenovem obroču glede na oksadiazolni obroč tvori direktno vodikovo vez z Asn120, oksadiazolni obroč in etilenski rep molekule pa sta se, glede na AMP-PNP, sidrala v sladkorni in fosfatni del, ter tvorila interakcije z aminokislinama Asn91 in Lys168. Žal so se te molekule v eksperimentalnih testih izkazale kot neaktivne. Razlog zato lahko leži v neoptimalno napovedani vezavi, ali pa v precenjevanju pomena posameznih prispevkov k dejanski energiji vezave, kar le nakazuje, kako kompleksen proces je vezava liganda na makromolekulo. Po analizi spojin v Preglednici VI, lahko opazimo, da je karboksilna skupina povezana z oksadiazolnim obročem preko

fleksibilnega linkerja. V takih primerih je lahko entropičen pripevek takega strukturnega elementa k vezavi neugoden, tega pa že tako omejene cenilne funkcije težko zadostno obravnavajo. Zato smo se lotili nadaljnega načrtovanja, da bi dobili spojine, ki bi v teoretičnih modelih izkazovale boljše lastnosti za ugodno interakcijo z ATP vezavnim mestom.



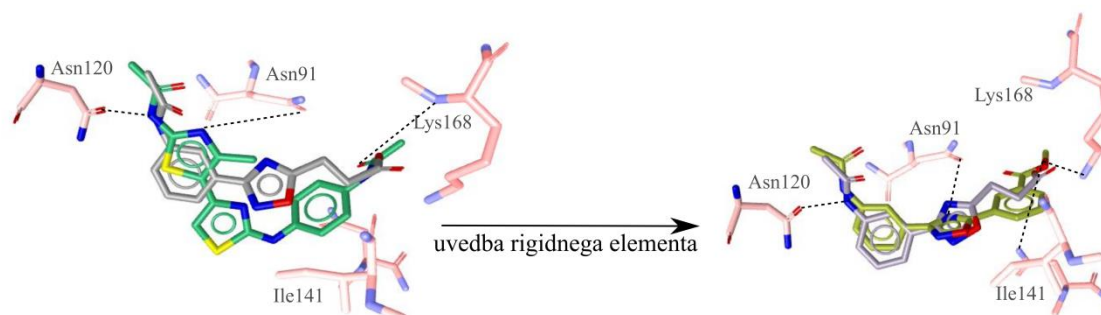
Slika 16. Primer sidranega oksadiazolnega derivata, načrtovanega za bakterijsko DNA girazo, ki se je v bioloških testiranjih izkazal za neaktivnega

STRUKTURA	Mr	logP	IC ₅₀ topoII
	303,31	2,09	//
	303,31	2,09	//
	275,26	1,49	//
	275,26	1,49	//

Preglednica VI: Rezultati biološkega testiranja spojin, ki so bile sintetizirane za DNA girazo in testirane na topoizomerazi II α

Ena od prvih splošnih smernic pri načrtovanju zdravilnih učinkovin je rigidizacija molekul. Razlogi zato so prej omenjeni neugodni prispevki entropije pri vezavi fleksibilnih molekul. Rigidizacija pa entropijo lahko zmanjša in posledično zoži konformacijski prostor, ki ga lahko zaseda molekula oziroma njeni substituenti. Zato smo se odločili poskusiti molekule tega razreda optimizirati v to smer.

Izvedli smo tudi strukturno poravnavo sidranih vezavnih poz neaktivnih 1,2,4-oksadiazolov s pozami drugega kemijskega razreda obetavnih inhibitorjev topoizomeraze II α – substituiranimi bitiazoli, ki jih prav tako razvijajo na Kemijskem Inštitutu. Sliko prileganja prikazuje Slika 17. Na osnovi prileganja smo sklepali, da obstaja možnost zamenjave fleksibilnega dela oksadiazolnih derivatov v fosfatnem delu ATP žepa s substituenti na fenilnem obroču, kar naredi spojine bolj rigidne. Preostali del molekule smo se odločili obdržati nespremenjen zaradi zelo dobre napovedane interakcije oksadiazolnega fragmenta z Asn120, ki je v našem modelu tudi ključna interakcija med adeninskim delom molekule ATP in njegovim vezavnim mestom.



Slika 17. Prileganje neaktivnega oksadiazolnega derivata (siva) z aktivnim bitiazolom (zelena) (levo); prilegani neaktivna (siva) in novo načrtovana rigidizirana spojina (rumena) (desno).

Za tako načrtovan »modelni« analog smo izvedli molekulske sidranje prav tako s programom GOLD in dobljene vezavne poze vizualizirali in izračunali vrednosti cenilnih funkcij. Izračunane vezavne poze smo analizirali s programom LigandScout, ki nam je omogočil tudi generiranje farmakofornega modela, s katerim smo identificirali glavne medmolekulske interakcijske vzorce (Slika 17, desno) vseh treh delov ATP vezavnega mesta. V adeninskem delu ostaja zelena interakcija z Asn120, v sladkornem in fosfatnem pa ponovno opazimo interakcije z Asn91 in Lys168. Dodatno je program identificiral tudi interakcijo z Ile141 v sladkornem delu vezavnega žepa. Iz dobljenih vezavnih poz bi težko ovrednotili, katere pozicije teh substituentov na oksadiazolnem fragmentu bi bile optimalne za aktivnost. Zato smo generirali več možnih spojin, pozicijskih izomerov, ki jih prikazuje Preglednica VII.

Tako smo želeli preiskati, kateri interakcijski vzorec je najoptimalnejši in omogoča najboljšo interakcijo z adeninskim in fosfatnim delom ATP. Prav tako smo se odločili, da bomo poleg kislinskih derivatov testirali tudi estre, saj je, glede na vezavne študije, predvsem en kisikov atom karbonylna skupine v našem vezavnem modelu ključen za interakcije v ATP mestu. Meta- in para- derivate smo variirali na fosfatnem in adeninskem delu aktivnega mesta človeške topoizomeraze II α .

Preglednica VII: Splošno načrtovana spojina in sintetizirani derivati.

	R_1	R_2
	<ul style="list-style-type: none"> -NHCOCH₃ (meta) -NHCOCH₃ (para) 	<ul style="list-style-type: none"> -COOCH₃ (meta) -COOH (meta) -COOCH₃ (para) -COOH (para)

Spojine so bile nato sintetizirane v okviru sodelovanja med Teoretičnim odsekom in Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani v okviru magistrske naloge Sare Bavcon.

4.2.2 Rezultati biološkega testiranja načrtovanih spojin iz razreda 3,5 - disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov

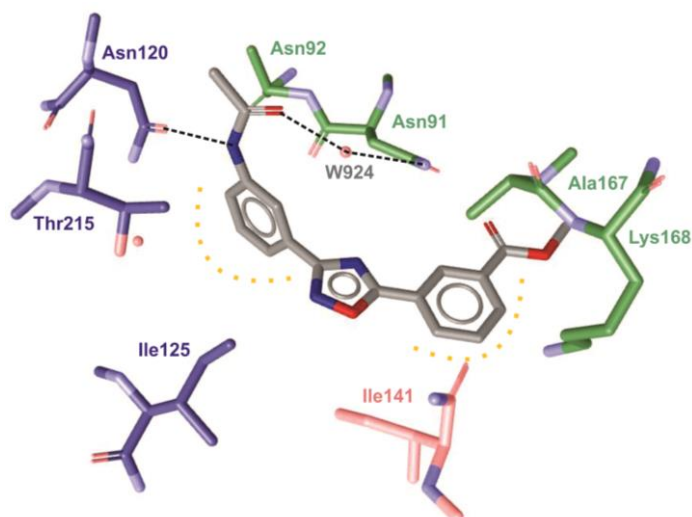
Načrtovane spojine so na Kemijskem Inštitutu testirali na inhibitorno aktivnost z uporabo standardnega HTS testa - *in vitro* test relaksacijske encimske aktivnosti topoizomeraze II α , ki ga razvija podjetje Inspiralis. Test temelji na zaznavi fluorescence, ki je pri aktivni spojini večja, kot pri neaktivni. Na ploščici, kjer poteka reakcija, je sprva imobiliziran biotiniliran oligonukleotid, ki mu, poleg naše spojine, ATP-ja, dodatno zvitega (superzvitega) plazmida in topo II α encima dodamo pufer za tvorbo tripleksa in ustavitev relaksacije. Po končani inkubaciji odlijemo reakcijsko zmes ter na ploščico dodamo barvilo, ki ob vezavi oddaja fluorescenco. V primeru aktivne spojine se barvilo veže na plazmid, saj ta tvori tripleks in je ostal na ploščici, tako je zaznana fluorescenca večja. Medtem ko v primeru neaktivne spojine encim relaksira plazmid, ki po odlitju izgine s ploščice skupaj s preostalo reakcijsko zmesjo in emitirana fluorescenca se posledično zmanjša. Na ta način s testom ugotovimo ali in koliko spojina vpliva na razvijanje dodatno zvitega plazmida, procesa, ki ga katalizira človeška topoizomeraza II α [9].

V Preglednici VIII so zbrani rezultati meritev serije sintetiziranih 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov. Kot standard smo v testu uporabili etopozid, ki se kot zaviralec človeške topoizomeraze II α uporablja v terapiji. Eksperimentalno določena IC₅₀ etopozida je znašala 37,3 μ M, v literaturi opisana IC₅₀ pa je 50 μ M. Tej vrednosti se je pri meritvah najbolj približala spojina **2** (IC₅₀ = 140,2 μ M), ki se je izmed načrtovanih izkazala za najbolj obetavno, saj že kaže zaviralne učinke v spodnjem mikromolarnem območju. Glavna smernica optimizacije je bila rigidizacija oksadiazolnih derivatov v repu molekule, kar se je v meritvah izkazalo za pravilno hipotezo. Kot dodatni obetavni spojini z začetno aktivnostjo sta se izkazali spojini **3** in **6**. Spojina **3** je kislinski analog spojine **2** z izmerjeno IC₅₀ vrednostjo 657,8 μ M, spojina **6** pa se od spojine **2** razlikuje po para substituciji na prvem benzenovem obroču, izmerjena IC₅₀ vrednost pa je znašala 700,6 μ M.

Preglednica VIII: Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih 3,5 - disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov z uporabo HTS relaksacijskega testa.

ŠTEVILKA SPOJINE	STRUKTURA	Mr	logP	IC ₅₀ (μ M)
1		355,34	2,08	>1000
2		337,33	3,11	140,2
3		323,30	2,84	657,8
4		337,33	3,11	>1000
5		323,30	2,84	>1000
6		337,33	3,11	700,6
7		323,30	2,84	>1000
8		337,33	3,11	>1000
9		323,30	2,84	>1000

Vrednosti ostalih načrtovanih spojin pa so bile previsoke, da bi lahko trdili, da imajo zaviralno aktivnost na encim. Na Sliki 18 je prikazana sidrana konformacija najbolj obetavne spojine **2** in njen predviden interakcijski vzorec z aminokislinsko okolico v ATP vezavnem mestu topoizomeraze II α , vizualiziran s programom LigandScout.



Slika 18. Načrtovana spojina **2** v vezavnem mestu človeške topoizomeraze II α (črtkane črne črtice ponazarjajo vodikove vezi, z rumenimi pikicami okoli fenilnih obročev pa so prikazane hidrofobne interakcije).

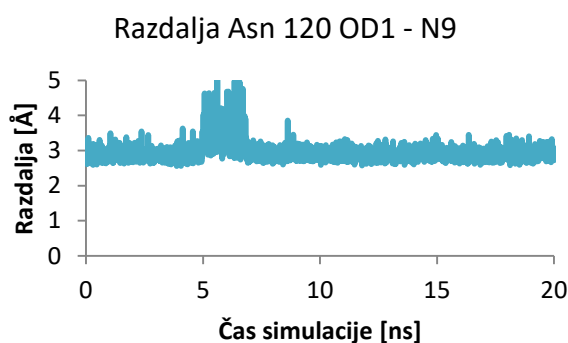
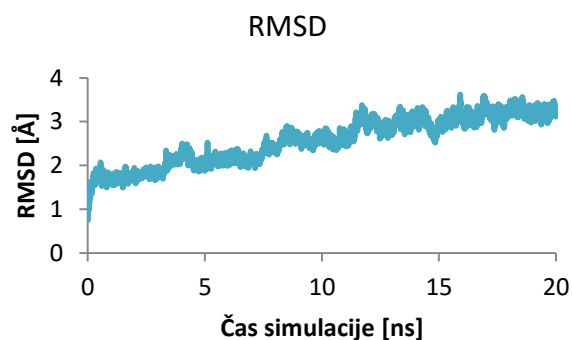
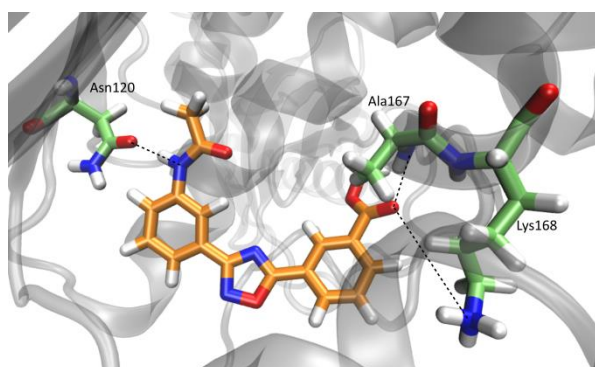
Za nadaljnjo optimizacijo je pomembna natančna analiza odnosa med strukturo in delovanjem (ang. *structure-activity relationship*, SAR), ki jo naredimo na podlagi izmerjenih aktivnosti, iz katerih sklepamo, kateri substituenti in položaji ugodno vplivajo na njihovo delovanje. Za najbolj ugodno se je izkazala meta-meta substitucija benzenovih obročev glede na 1,2,4-oksadiazol, kot jih imata spojini **2** in **3**. Prav tako so spojine z estri na drugem benzenovem obroču (aktivni spojini **2** in **6**) bolj aktivne, kot tiste, ki imajo na tem mestu kislino. Iz analize vezavnih konformacij pridobljenih z molekulskim sidranjem pa ne moremo z gotovostjo razložiti neaktivnosti ostalih spojin, lahko pa predvidevamo, da gre za neoptimalne interakcije substituentov na fenilnem obroču ali pa za usmerjenost vodikovih vezi, ki pogojujejo jakost vezave. Vlogo seveda lahko igrajo tudi različni entropijski prispevki. Ovrednotili smo tudi v uvodu opisane fizikalno-kemijske lastnosti, ki jih morajo spojine imeti, da jih sploh lahko obravnavamo kot potencialne zdravilne učinkovine (ADME lastnosti). Lastnosti, ki jih določa pravilo petic, so ugodne za izbrano serijo. Izračunane vrednosti logP spojin se nahajajo med 2,84 in 3,29 (predvideno < 5), molekulska masa spojin pa se nahaja med 279 in 337 (predvideno < 500).

4.2.3 Simulacije molekulske dinamike in izračun dinoforov za ovrednotenje predvidenega medmolekulskega prepoznavanja ligand-vezavno mesto za ATP

Ker struktura ATPazne domene z inhibitorjem v ATP vezavnem mestu topo II α še ni dostopna, za vse do sedaj znane ATPazne inhibitorje obstajajo le izračunani vezavni modeli. Za razširitev statične obravnave, smo za napovedano vezavno pozo aktivne spojine **2** iz razreda 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov izvedli 20 ns dolgo simulacijo molekulske dinamike po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4. Tako smo lahko bolj natančno ovrednotili tako stabilnost predvidenih interakcij kot tudi potencialno prisotnost

drugih ugodnih vezavnih geometrij na energijski potencialni ploskvi kompleksa topo II α – spojina **2**.

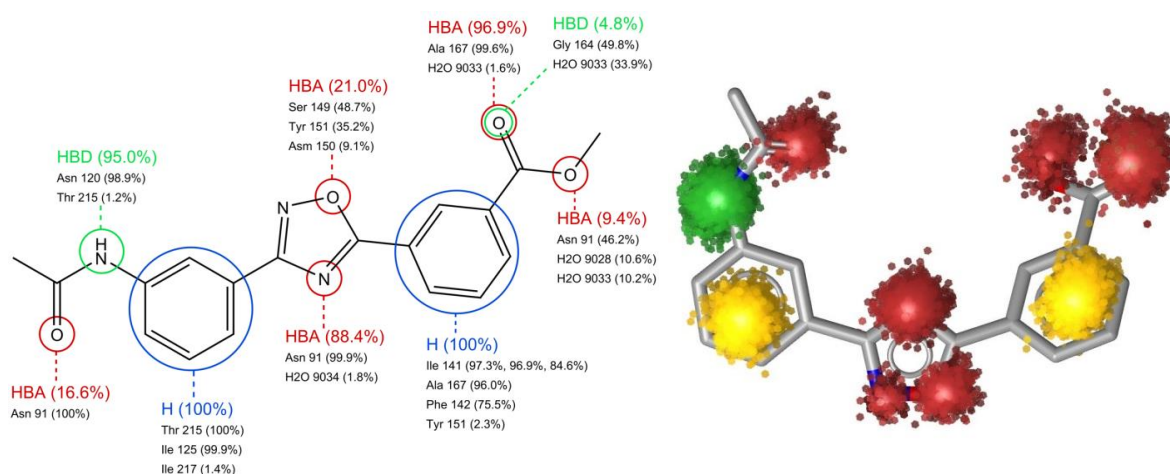
Rezultate smo analizirali najprej z RMSD parametrom. Za referenčno strukturo smo izbrali sidrano pozo spojine **2**, s katero smo pričeli molekulsko dinamiko. Relativno nizka vrednost RMSD parametra ($2,56 \pm 0,54$ Å) kaže na geometrijsko stabilnost predvidene sidrane poze, dodatne analize razdalj med atomi liganda in aminokislinsko okolico, potrjujejo stabilnost v obročnem delu ATP žepa. Najpomembnejša interakcija, ki smo jo opazili pri molekularnem sidranju – med karbonilnim kisikom Asn120 in dušikom v oksadiazolnem obroču ($2,9 \pm 0,3$ Å) je tudi tekom MD simulacije ostala stabilna. Kljub relativno veliki fleksibilnosti etilenskega repa molekule, interakcija z Ala167 ($2,9 \pm 0,2$ Å) ostaja ves čas stabilna. Povprečna razdalja med kisikom in aminokislino Lys168 ($6,1 \pm 0,8$ Å) pa kljub opaženi interakciji pri statični pozi med simulacijo molekulske dinamike ni stabilna, saj se tekom simulacije aminokislina Lys168 oddalji od spojine (Slika 19, pozicija Lys168). Tudi interakcija Asn91se ni izkazala za dovolj stabilno, saj so razdalje za tvorbo vodikove vezi prevelike.



Atomska para	Povprečna razdalja [Å]
Asn120 OD1 – N9	$2,9 \pm 0,3$
Ala167 N – O31	$2,9 \pm 0,2$
Lys168 NZ – O31	$6,1 \pm 0,8$

Slika 19. Reprezentativna konformacija spojine **2** tekom simulacije (levo zgoraj); Graf časovne odvisnosti RMSD (desno zgoraj); Graf časovne odvisnosti razdalje med Asn120 in dušikom na spojini **2** (levo spodaj); Tabela pomembnejših interakcij in razdalj (desno spodaj).

Nadaljnja uporaba dinoforov je potrdila rezultate geometrijske analize simulacije. Poudariti je potrebno, da smo tu medmolekulske interakcije analizirali brez merjenja razdalj, ampak s postavitvijo dinofornih modelov. Ti so statistično obdelani farmakoforni modeli MD trajektorije. Vodikova vez med dušikom v oksadiazolnem obroču in Asn120 je tekom simulacije prisotna kar 95,0 % časa, k čemur glavnikino interakcije prispeva omenjena aminokislina. Prav tako je interakcija med kisikom iz etilenskega repa in aminokislino Ala167 prisotna 96,9 % časa simulacije, k čemur glavnikino prispeva Ala167. Pomembna je še vodikova vez med dušikom oksadiazola in aminokislino Asn91, ki je prisotna 88,4 % časa simulacije, a jo s klasično analizo dinamike nismo zaznali. S tem opazimo dodatno vrednost tega pristopa v primerjavi z enostavno geometrijsko analizo. Dodatno pa je analiza izračunanih dinoforov pokazala na pomembnost hidrofobnih interakcij, ki jih z analizo klasičnih parametrov ni bilo mogoče tako enostavno obravnavati. Opazili smo namreč, da oba benzenova obroča z aminokislinsko okolico tvorita hidrofobno interakcijo, ki je v simulaciji prisotna ves čas. Prvi benzenov obroč interagira z aminokislinama Thr215 in Ile125, ter v majhnem odstotku (1,4 %) še z Ile217. Drugi obroč pa tvori interakcije z Ile14, Ala167, Phe142 ter Tyr151. Prav ta tip interakcij je pri naših derivatih verjetno tudi ključen pri interakciji z vezavnim mestom. Celoten dinoforni model v 2D in 3D reprezentaciji je prikazan na Sliki 20.



Slika 20. Pregled interakcijskega vzorca, dobljenega z dinofori. Na levi je za posamezen superelement izračunan odstotek pojavljanja skozi celotno simulacijo, vsak superelement pa je nadalje razčlenjen na prispevke aminokislin in njihove deleže. Na desni je celoten model dinofora za 20 ns simulacije molekulske dinamike. Z zeleno so prikazani donorji vodikove vezi, z rdečo akceptorji, z rumeno pa hidrofobne interakcije.

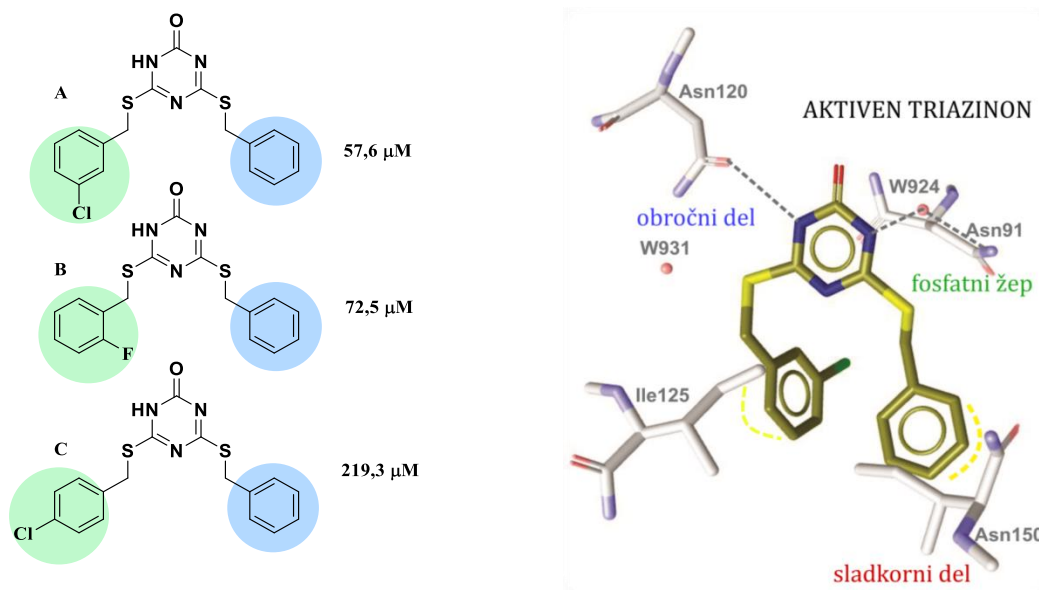
4.3 Primer II: Strukturno podprta optimizacija katalitičnih inhibitorjev topo II α - 4,6-substituirani-1,3,5-triazin-2(1*H*)-oni

V drugem obravnavanem primeru načrtovanja smo bili soočeni z drugačnim načrtovalnim izzivom, saj izhodne molekule iz serije disubstituiranih 1,3,5-triazinonov že izkazujejo inhibitorno aktivnost, le-ta še ni optimalna za vstop v predklinične raziskave, manjka pa jim tudi delovanje na celicah – citotoksičnost. Tu torej izhajamo iz validirane spojine vodnice. Tudi tu smo stopnje načrtovanja izvajali skupaj z mlado raziskovalko Kajo Bergant (Kemijski inštitut) in doktorskim študentom Matejem Janežičem (RIKEN, Japonska).

4.3.1 Strukturno podprta optimizacija in izdelava usmerjene kemijske knjižnice

Cilj te raziskave je bila nadaljnja optimizacija predhodno načrtovanega razreda katalitičnih inhibitorjev 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov, ki so bili prvi identificirani monociklični inhibitorji s potrjeno vezavo na ATPazno domeno.

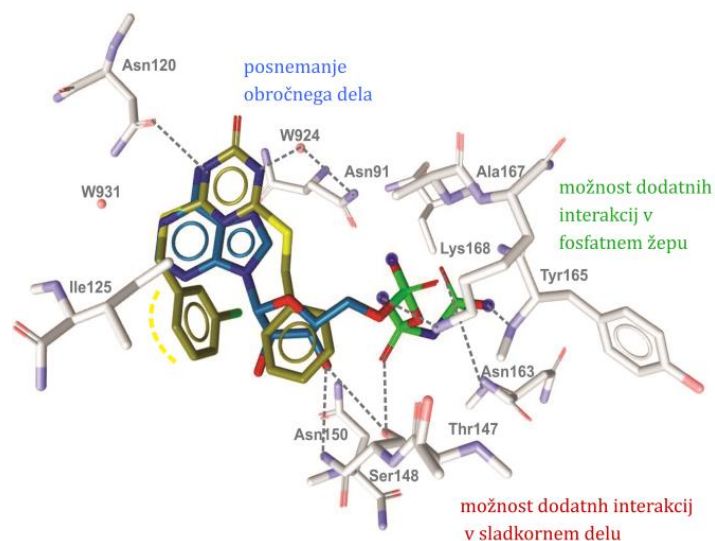
Načrtovanje izhaja iz struktur treh derivatov (**A**, **B** in **C**) iz tega razreda (Slika 21), ki so v encimskih inhibicijskih testih pokazali dobre inhibicijske IC₅₀ vrednosti (57,6 μ M, 72,5 μ M in 219,3 μ M) in njihovi izhajajoči fragmenti so bili komercialno dostopni. Predhodno so tudi že izvedli študijo odnosa med strukturo in delovanjem (SAR) na 6. mestu substitucije triazinonskega obroča in za te molekule je bila s postopkom molekulskega sidranja tudi že izračunana vezavna poza v ATP žepu topo II α . Analiza vezavnih poz najbolj aktivnih spojin **A** in **B** (Slika 21), kot tudi manj aktivne (spojina **C** in ostale) je kazala na stabilno vodikovo vez med NH skupino 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onskega fragmenta in kisikom aminokislina Asn120 in z dušikom aminokislina Asn91. Nesubstituiran fenilni obroč na mestu 4 triazinonskega obroča je bil orientiran v hidrofoben žep, kjer je tvoril interakcije z Ile141, substituiran fenilni obroč na mestu 6 tega obroča pa hidrofobne interakcije z aminokislinami Ile125, Ile141 Thr159 in/ali Ala167. V primeru neaktivnih spojin pa omenjenih interakcij ni bilo. Na drugem substituentu triazinona (mesto 4) je bil vedno prisoten fenilni obroč, ki je bil v študijah sidranja usmerjen proti fosfatnem delu ATP žepa. Zato smo se odločili, da bomo pri optimizaciji s tem strukturnim fragmentom poskušali doseči več interakcij s fosfatnim delom ATP mesta.



Slika 21. Aktivni triazinonski derivati uporabljeni v načrtovanju (levo), sidrana poza spojine **A** (desno); črtkane črne črtice ponazarjajo vodikove vezi, z rumenimi pikicami okoli fenilnih obročev pa so prikazane hidrofobe interakcije.

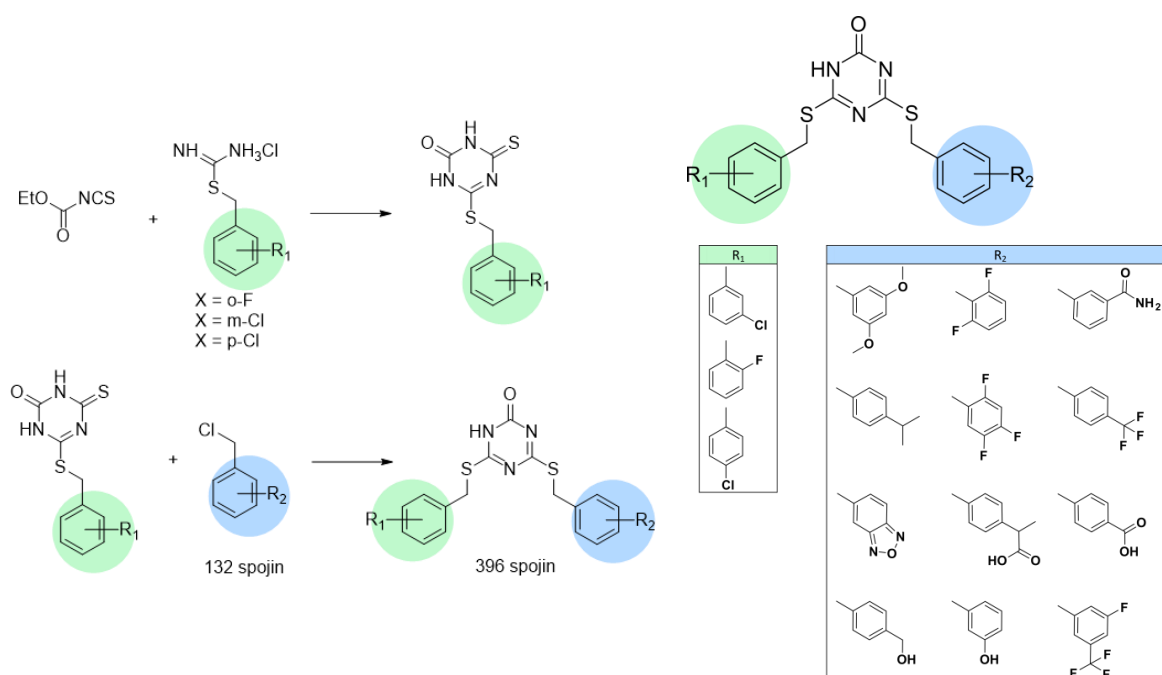
Prileganje aktivnih derivatov **A**, **B** in **C** z referenčnim ligandom AMP-PNP v vezavnem mestu za ATP (Slika 22) je nakazovalo možnosti pridobitve dodatnih interakcij v fosfatnem in sladkornem delu vezavnega žepa z uvedbo novih substituentov na fenilnem obroču prvotnih 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov.

Tako bi poleg že vzpostavljenih hidrofobnih interakcij z Ile125, Ile141 Thr159/ Ala167 v sladkornem in fosfatnem žepu, pridobili interakcije – predvsem vodikove vezi, še z aminokislinami Thr147, Ser148, Asn150, Asn163 in Tyr165. Seveda moramo pri načrtovanju vedno upoštevati, ali so posamezne spojine tudi sintezno dosegljive. Zato smo analizirali sintezno pot do disubstituiranih triazinonov, ki je prikazana na Sliki 23. Le-ta ima le dve stopnji sinteze. V prvi stopnji pride to tvorbe triazinonskega obroča preko kondenzacije ustreznega izotiocianata in substituirane tiosečnine. Nato se z reakcijo nukleofilne substitucije s halogen-arili uvede ustrezen substituiran fenilni obroč.



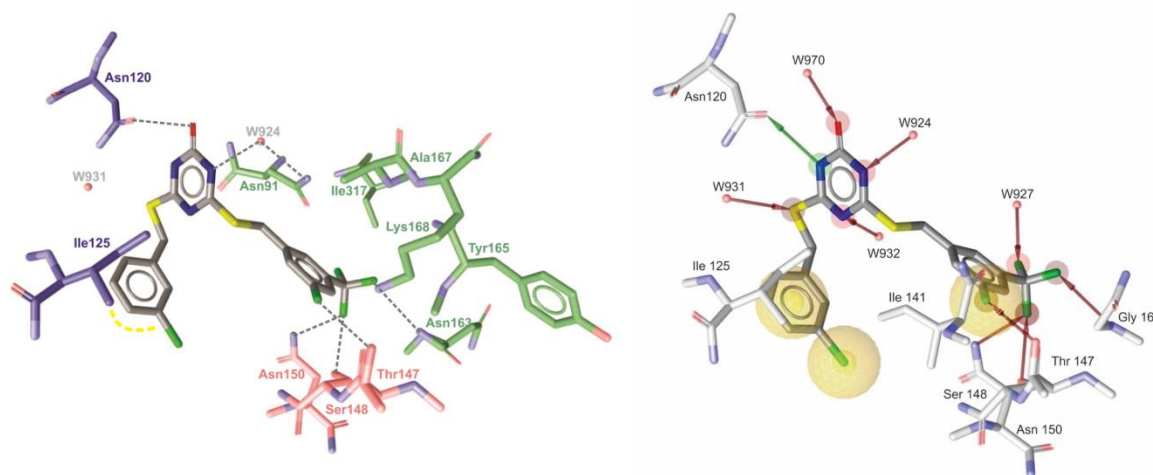
Slika 22. Aktiven triazinon prilegan z ATP analogom AMP-PNP.

Na podlagi znane sintezne poti (Slika 23, levo) in komercialno dostopnih sinteznih fragmentov (3 izhodni analogi tiosečnine in 132 halogen arilov za različne substitucije na mestu 4), smo zgradili usmerjeno kemijsko knjižnico z novimi analogi (skupno 396 spojin), ki smo jih s programom GOLD sidrali v vezavno mesto človeške topoizomeraze II α po prej opisanem postopku. Glede na najboljše vezavne poze z enako orientiranim obročnim delom in s potencialno novimi interakcijami v sladkornem in fosfatnem delu, smo izbrali 12 aril halogenidov ter 3 izotiocianate, ter v sodelovanju s Fakulteto za farmacijo sintetizirali 36 končnih analogov (Slika 23, desno), ki so vsebovali te najboljše komercialno dostopne fragmente. Spojine so bile sintetizirane v okviru magistrske naloge Maruše Klemenčič.



Slika 23. Sinteza shema 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov, ki je služila za izgradnjo usmerjene kemijske knjižnice (levo); Izbrani analogi na osnovi virtualnega reševanja te knjižnice (desno).

Na Sliki 24 je prikazana vezava izbranega načrtovanega triazinona **10** in predviden interakcijski vzorec z dodatnimi interakcijami substituenta na mestu 6 triazinona v ATP vezavnem mestu topoizomeraze II α , ter farmakoforni model pridobljen s programom LigandScout.



Slika 24. Načrtovan triazinon **10** z dodatnimi interakcijami v ATP žepu (levo); Farmakoforni vzorec vezavne poze optimiziranega triazinona **10**, pridobljen s programom LigandScout (desno).

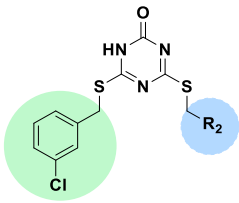
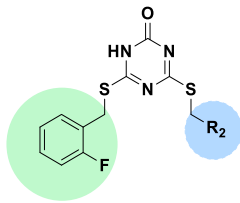
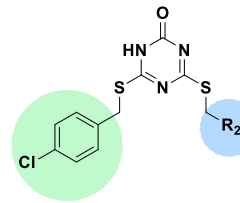
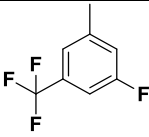
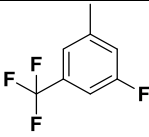
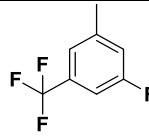
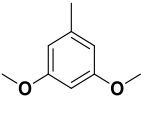
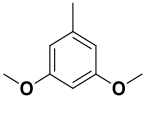
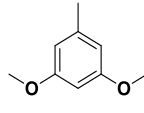
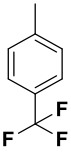
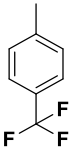
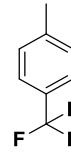
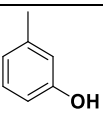
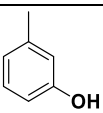
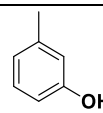
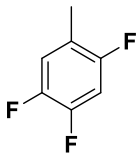
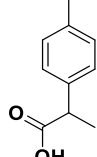
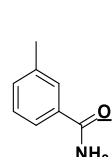
4.3.2 Rezultati biološkega testiranja načrtovanih spojin iz razreda 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov

Tudi tokrat so načrtovane spojine na Kemijskem Inštitutu testirali na inhibitorno aktivnost z uporabo standardnega HTS relaksacijskega testa. V Preglednici IX so zbrani rezultati meritev načrtovanih spojin. Test je bil izveden po enakem postopku, kot v primeru 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov v poglavju 4.2.2.

Rezultati meritev potrjujejo uspešnost načrtovane optimizacije, saj je uvedba substituentov na fenilni obroč usmerjen proti fosfatnem žepu znižala IC₅₀ vrednosti, v primerjavi z izhodnimi spojinami. Inhibitorne aktivnosti sintetiziranih analogov glede na vse tri (**A**, **B** in **C**) izhodne spojine so izboljšane, kar lahko razlagamo z doseženimi dodatnimi interakcijami v sladkornem (aminokislina Asn150, Ser148, Thr147) in fosfatnem (Asn163, Lys168, Gly164) delu in posledično izboljšano vezavno energijo. Najbolj obetavna sta substituenta (2-F, 4-CF₃), oba dodana na fenil na 4. mesto triazinonskega obroča, ki tvorijo spojine **10**, **11** in **12**, saj so glede na vse tri začetne spojine (**A**, **B** in **C**) izkazale nižje IC₅₀ vrednosti. Začetna spojina z meta-Cl substituentom na R1 mestu prvega fenilnega obroča in nesubstituiranim drugim fenilnim obročem je imela IC₅₀ vrednost 57,6 μ M, dodan substituent R2 (spojina **10**), pa je izboljšal inhibitorno aktivnost na IC₅₀ vrednost 34,4 μ M. Še bolj izrazita pa je bila optimizacija začetnih spojin z orto-F R1 in para-Cl substituentoma na R1 mestu prvega fenilnega obroča, kjer je dodan substituent (spojini **11**

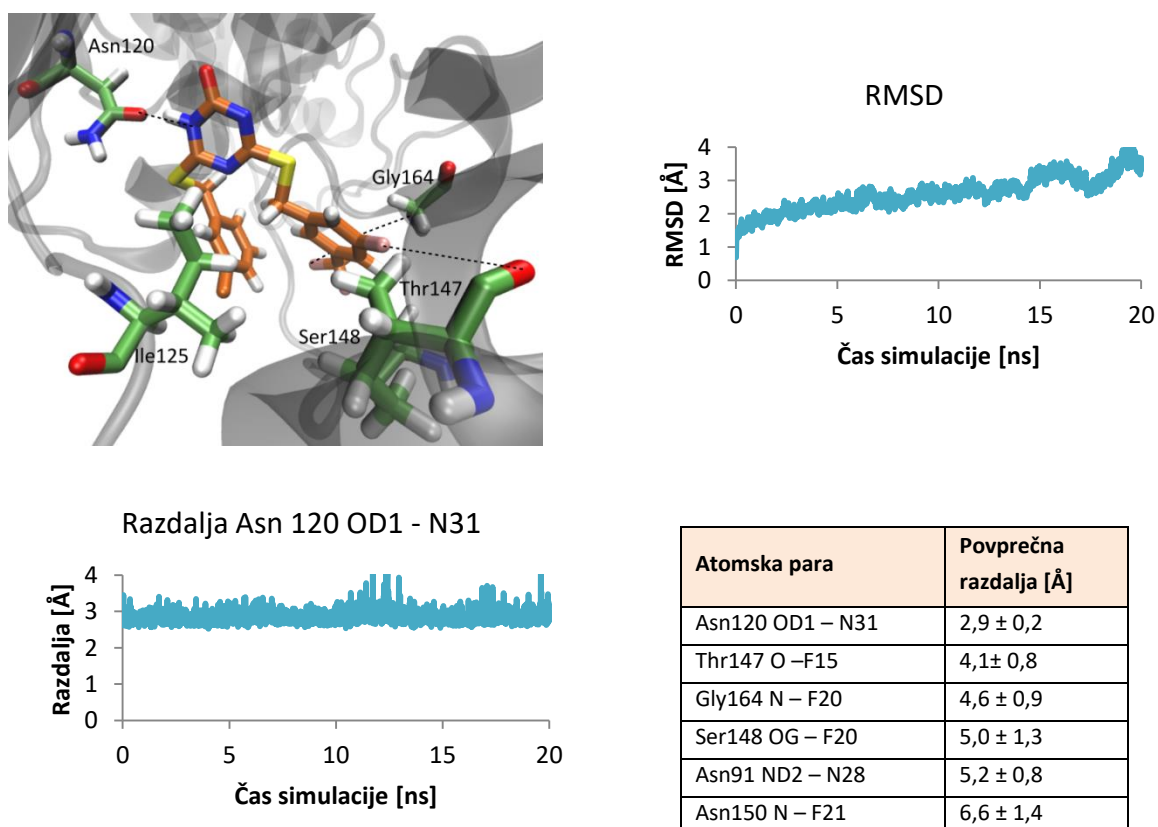
in **12**) izboljšal inhibiciji iz IC₅₀ 72,5 μ M in 219,3 μ M na 8,1 μ M in 8,4 μ M. Za spojine so v nadaljnjih funkcionalnih testih pokazali, da dejansko delujejo preko katalitičnega mehanizma inhibicije topo II α .

Preglednica IX: Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1H)-onov z uporabo HTS relaksacijskega testa

	SPOJINA	IC ₅₀ (μ M)	SPOJINA	IC ₅₀ (μ M)	SPOJINA	IC ₅₀ (μ M)
R1						
R2	 10	34,4	 11	8,1	 12	8,4
R2	 13	54,2	 14	422,1	 15	84,0
R2	 16	36,9	 17	11,1	 18	34,0
R2	 19	45,3	 20	128,4	 21	129,1
R2	 22	36,6	 23	38,7	 24	293,4

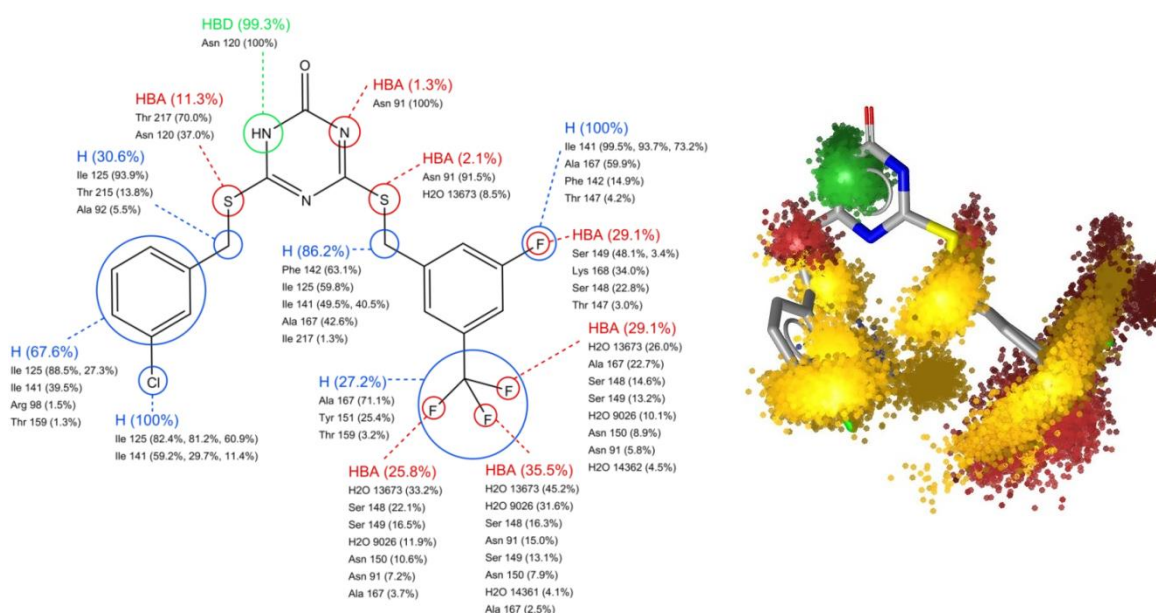
4.3.3 Simulacije molekulske dinamike in izračun dinoforov za ovrednotenje predvidenega medmolekulskega prepoznavanja ligand-vezavno mesto za ATP topo II α

Da bi preverili stabilnost vezave poze in predvidenih interakcij, smo tudi za aktivno spojino **10** iz razreda 4,6-substituiranih-1,3,5-triazin-2(1*H*)-onov izvedli 20 ns dolgo simulacijo molekulske dinamike po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4 in izračunali vrednosti nekaterih geometrijskih parametrov (Slika 25). RMSD vrednost relativno na sidrano pozo je v tem primeru znašala $2,59 \pm 0,50$ Å, kar potrjuje stabilnost simulirane poze. Izračunali smo tudi povprečne medatomske razdalje med aktivnim mestom in spojino **10**. Glavna predpostavljena interakcija z Asn120 se je izkazala za stabilno ($2,9 \pm 0,2$ Å). Medatomske razdalje drugega fenilnega obroča v fosfatnem in sladkornem delu pa so nekoliko večje. Med atomom kisika in Thr147 je razdalja merila $4,1 \pm 0,8$ Å, med atomom dušika in Gly164 $4,6 \pm 0,9$ Å, med atomom kisika in Ser148 $5,0 \pm 1,3$ Å, ter med atomom dušika in Asn150 $6,6 \pm 1,4$ Å). Vodikova vez z Asn91 ($5,2 \pm 0,8$ Å) je bila predpostavljena kot indirektna, preko vodne molekule, ki bi lahko predstavljala »most« med obema atomoma.



Slika 25. Konformacija triazinonskega inhibitorja **10** tekom simulacije (levo zgoraj); Graf časovne odvisnosti RMSD (desno zgoraj); Graf časovne odvisnosti razdalje med Asn120 in dušikom na spojini **10** (levo spodaj); Tabela pomembnejših interakcij in razdalj (desno spodaj).

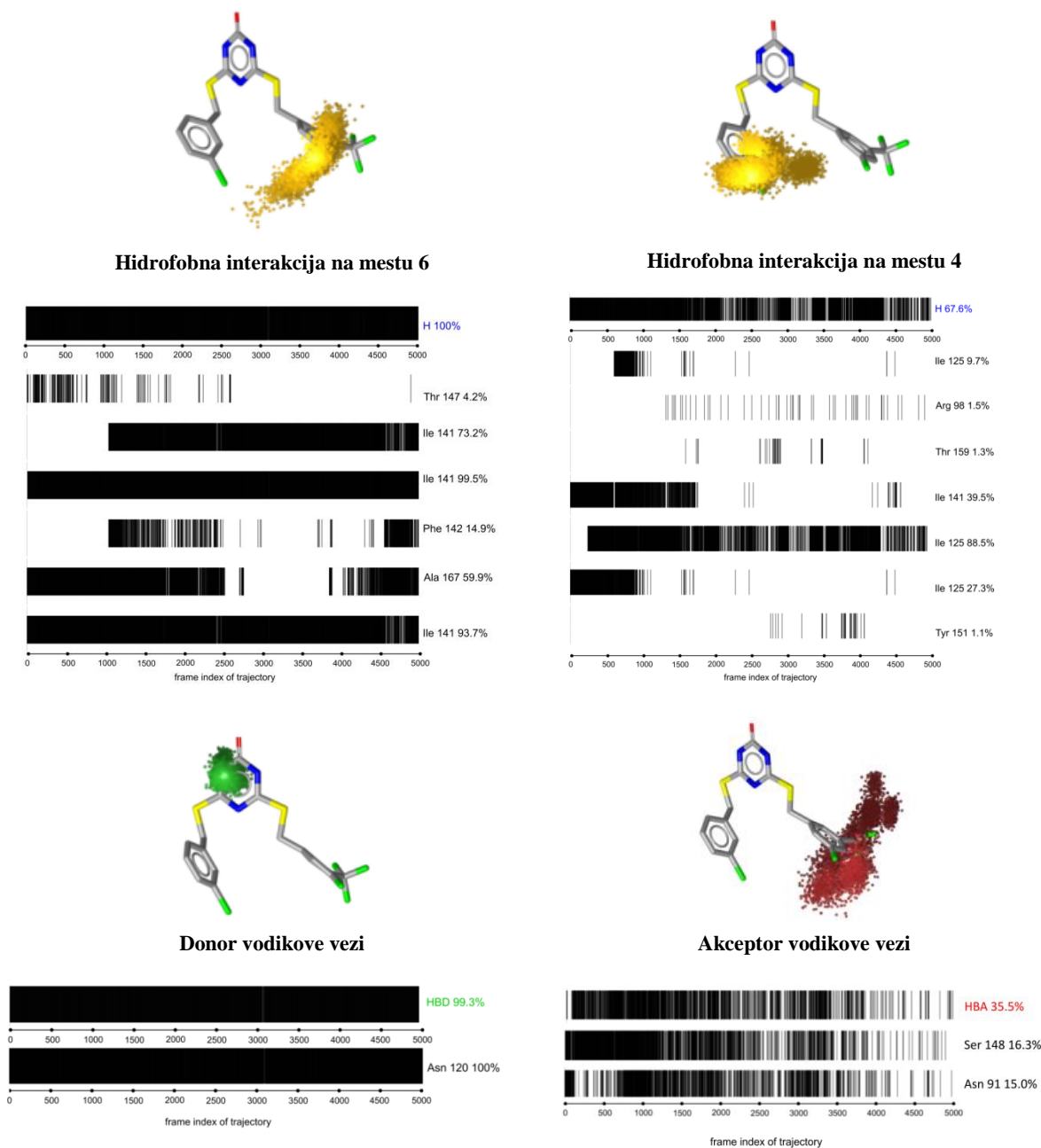
Analizo molekulske dinamike smo tudi v tem primeru razširili z dinofori in dobili še dinamičen vpogled v interakcijski vzorec. Vse predvidene glavne interakcije, ki smo jih želeli obdržati, je potrdil dinoforni model, pokazal pa je tudi nekatere nove interakcije. Vodikova vez med NH skupino 1,3,5-triazin-2(1*H*)-onskega fragmenta in kisikom aminokislina Asn120 je ohranjena in prisotna kar 99,3% časa simulacije. Celoten čas simulacije so prisotne tudi hidrofobne interakcije, ki jih v sladkornem delu tvori prvi substituirani fenilni obroč (meta-Cl substituent na R1) z Ile125 in Ile141 ter interakcije v fosfatnem delu z Ile125, Ile141 Thr159/ Ala167. Dinofor pa je pokazal tudi ugoden vpliv uvedbe substituentov na drugi fenilni obroč (R2), saj iz sheme na Sliki 26 razberemo, da pri CF₃ skupini vsak fluorov atom tretjino časa simulacije tvori interakcije – predvsem vodikove vezi, z aminokislinsko okolico (Thr147, Ser148, Asn150, Asn163 in Tyr165). Dinoforni model tako tudi razloži nekoliko večje povprečne razdalje v fosfatnem delu, saj CF₃ skupina ni ves čas v isti aminokislinski okolici, vendar le-ta rotira in interagira z različnimi aminokisljinami.



Slika 26. Pregled interakcijskega vzorca, dobljenega z dinofori (levo); Celoten model dinofora za 20 ns simulacije molekulske dinamike (desno). Z zeleno so prikazani donorji vodikove vezi, z rdečo akceptorji, z rumeno pa hidrofobne interakcije.

Program DynophoreApp za vsak superelement izračuna odstotek pojavljanja skozi celotno simulacijo ter nadaljnjo razčlenitev na prispevke aminokisljin in njihove deleže. Na Sliki 27 je prikazan sekvenčni in statistični izpis dinofornega vzorca za nekatere superelemente analizirane spojine **10**. Levo zgoraj je prikazan ohranjen hidrofobni interakcijski vzorec drugega fenilega obroča (R2), ki je prisoten ves čas MD simulacije in razčlenitev na prispevke aminokisljin v sladkornem in fosfatnem delu k tej interakciji. Desno zgoraj vidimo ohranjene hidrofobne interakcije prvega fenilnega obroča (R1), pripetega na mesto 6, levo spodaj je prikazana prisotnost vodikove vezi s ključno aminokislino Asn120, desno

spodaj pa interakcije (akceptorji vodikove vezi) optimiziranega drugega fenilnega obroča z R2 substituentom.



Slika 27. Sekvenčni in statistični izpis dinofora za posamezen superelement. Iz 20 ns dolge simulacije molekulske dinamike je ekvidistančno vzetih 5000 trajektorij, za katere je program DynophoreApp zgeneriral farmakoforje in nato dinoforni model.

5 SKLEP

Kompleksnemu in razgibanemu pristopu načrtovanja in razvoja novih zdravilnih učinkovin, ki je v preteklosti temeljil na eksperimentalnih podatkih in naključnih odkritjih, se že nekaj časa pridružujejo in predstavljajo močno podporo metode molekulskega modeliranja. Mednje sodijo molekulsko sidranje in farmakofoni modeli, kot empirična pristopa, ter metode molekulskih simulacij in postavitve dinoforov, kot način za vpogled v dinamično obnašanje kompleksa protein-ligand. Uspešna aplikacija naštetih metod pa se odraža v številnih uvedenih novih učinkovinah za terapijo različnih bolezni. Eno izmed področij aplikacije takega kombiniranega pristopa predstavlja tudi razvoj novih protirakavih zdravilnih učinkovin.

Obravnavana biološka tarča v zaključni nalogi je bila človeška DNA topoizomeraza II α , ki izhaja iz družine DNA topoizomeraz in je že znana in validirana družina tarč v terapijah številnih karcinomov. Učinkovine, ki delujejo na topo II α encim so učinkovite pri zdravljenju številnih karcinomov, so pa povezane tudi z mnogimi stranskimi učinki (npr. kardiotsičnost). To je razlog za raziskovanje, usmerjeno v identificiranje zaviralcev DNA topoizomeraze II α , ki delujejo po alternativnih mehanizmih, kar omogoča njen kompleksen katalitični cikel. Cilj našega dela je bilo načrtovanje in optimizacija inhibitorjev z delovanjem na vezavnem mestu za ATP. V literaturi lahko zasledimo, da je zasedanje ATP vezavnega mesta topoizomeraze, kot način inhibicije terapevtsko uporabno.

Najprej smo izvedli simulacijo molekulske dinamike dimera ATPazne domene topo II α in molekule ATP ter preiskali obnašanje naše tarče in vezavnega mesta. 100 ns dolgo MD simulacijo dimera ATPazne domene smo analizirali z RMSD in RMSF parametroma in kot pričakovano opazili večjo dinamiko proteinskih zank, ter zelo stabilno vezavno mesto za ATP. Tudi nizka RMSD vrednost in izračunane povprečne razdalje med ATP in aminokislinsko okolico kažejo na stabilnost poze in vezavnega mesta.

Metode molekulskega modeliranja smo nato uporabili na dveh različnih stopnjah načrtovanja biološko aktivnih molekul: identifikaciji novega kemijskega razreda topo II α inhibitorjev iz razreda disubstituiranih oksadiazolov in optimizaciji že obstoječih validiranih spojin vodnic iz razreda triazinonov.

V prvem primeru je bilo naše izhodišče dostopna serija neaktivnih spojin iz disubstituiranega 1,2,4-oksadiazolnega razreda, ki so bile prvotno načrtovane kot potencialni inhibitorji sorodne bakterijske DNA giraze. Po ugotovljeni podobnosti vezavnih mest med DNA girazo in človeško DNA topoizomerazo II α , smo se odločili spojine tega razreda s pomočjo molekulskega sidranja umestiti v ATP vezavno mesto

topoizomeraze II α . Najbolj obetavne načrtovane spojine smo preizkusili v inhibicijskem testu. Žal smo ugotovili, da so neaktivne tudi na naši tarči. Po analizi izračunanih vezavnih poz smo ugotovili, da je možen razlog prevelika fleksibilnost dela molekule, ki povezuje karboksilno skupino in oksadiazoni obroč. Zato smo se lotili optimizacije v smeri rigidizacije tega dela. Sidrane vezavne poze iz serije 1,2,4-oksadiazolov smo poravnali s pozami že znanih obetavnih inhibitorjev topo II α , substituiranimi bitiazoli, in fleksibilni linker nadomestili s fenilnim obročem, s čimer smo želeli doseči večjo rigidnost. Po ponovnem molekulske sidranju in analizi interakcijskih vzorcev, smo ugotovili, da je zelena interakcija z Asn120 v adeninskem delu vezavnega mesta ohranjena, dodatno pa smo opazili nove interakcije v fosfatnem in sladkornem delu. Biološko testiranje načrtovanih spojin je potrdilo uspešnost našega načrtovanja in potrdilo hipotezo, da bo rigidizacija izboljšala interakcije v ATP mestu, saj so nekatere spojine izkazale obetavne inhibitorne aktivnosti tarčnega encima.

V drugem primeru smo izvedli optimizacijo validiranih spojin vodnic iz serije disubstituiranih 1,3,5-triazinonov, katerih inhibitorne aktivnosti še niso bile optimalne za nadaljnje faze razvoja učinkovin. Za izhodišče smo vzeli strukture treh derivatov, za katere so v predhodnih testih inhibicije dobili obetavne IC₅₀ vrednosti. Vezavne poze teh derivatov smo primerjali z eksperimentalno določeno vezavo nativnega liganda AMP-PMP v vezavnem mestu za ATP, kar je pokazalo na možnost pridobitve dodatnih interakcij v fosfatnem in sladkornem delu vezavnega žepa. Nesubstituiran fenilni obroč na mestu 4 triazinonskega obroča je bil pri molekulske sidranju vedno ugodno usmerjen proti temu deloma vezavnega žepa, zato smo se odločili spojine optimizirati z uvedbo dodatnih substituentov na ta fenilni obroč. Na podlagi znane sintezne poti in komercialno dostopnih sinteznih fragmentov smo zgradili usmerjeno kemijsko knjižnico z novimi analogi tega razreda, ki smo jih s programom GOLD sidrali v vezavno mesto človeške topoizomeraze II α in izbrali spojine za nadaljno sintezo. Rezultati eksperimentalnih meritev so potrdili uspešnost optimizacije, saj so načrtovane spojine izkazale izboljšane IC₅₀ vrednosti.

Za razširitev in dinamičen vpogled v predvidene interakcije, smo izvedli tudi simulaciji molekulske dinamike izbranih obetavnih spojin iz obeh razredov ter nato postavili dinoforni model, s pomočjo katerega smo ovrednotili prispevke in pomen posameznih aminokislin v medmolekulske prepoznavanju. Identificirali smo tudi nekaj novih interakcij med ligandoma in tarčo. S tem smo statičnemu pristopu molekulskega sidranja dodali dinamično komponento, vedno prisotno pri medmolekulske prepoznavanju.

Rezultati obeh razredov bodo služili kot pomembna izhodišča za nadaljnjo optimizacijo teh potencialnih zaviralcev človeške topoizomeraze II α s protirakavim delovanjem.

6 LITERATURA IN VIRI

1. World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>.
2. A., H.T., *Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94*. Journal of Computational Chemistry, 1996. **17**(5-6): p. 490-519.
3. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology, Fourth Edition*. 2013: Taylor & Francis Group.
4. Allen, M.P. and D.J. Tildesley, *Computer simulation of liquids*. 1989: Clarendon Press. 385.
5. Anderluh, M., et al., *Farmaceutvska kemija III. Vaje in seminarji*. Fakulteta za farmacijo, 2010.
6. Andoh, T., *Bis(2,6-dioxopiperazines), catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, as molecular probes, cardioprotectors and antitumor drugs*. Biochimie, 1998. **80**(3): p. 235-246.
7. Bajorath, J., *Integration of virtual and high-throughput screening*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(11): p. 882-94.
8. Bates, A.D. and A. Maxwell, *DNA topology: Topoisomerases keep it simple*. Current Biology, 1997. **7**(12): p. R778-R781.
9. Bergant, K., M. Janezic, and A. Perdih, *Bioassays and in silico methods in the identification of human DNA topoisomerase IIa inhibitors*. Vol. 25. 2018.
10. Berger, J.M., *Structure of DNA topoisomerases*. Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression, 1998. **1400**(1-3): p. 3-18.
11. Berger, J.M., et al., *Structure and mechanism of DNA topoisomerase II (vol 379, pg 225, 1996)*. Nature, 1996. **380**(6570): p. 179-179.
12. Berger, J.M. and J.C. Wang, *Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism*. Current Opinion in Structural Biology, 1996. **6**(1): p. 84-90.
13. Brooks, B.R., et al., *Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations*. Journal of Computational Chemistry, 1983. **4**(2): p. 187-217.
14. BW, S. and W. CP, *World Cancer Report 2014*. Lyon: IARS Press, 2014.
15. CG, W. and L.P. Ganellin CR, Mitscher, LA, *Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1997)*. Annu Rep Med Chem, 1998. **33**: p. 385-395.
16. Champoux, J.J., *DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism*. Annual Review of Biochemistry, 2001. **70**: p. 369-413.
17. Charifson, P.S., et al., *Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins*. J Med Chem, 1999. **42**(25): p. 5100-9.
18. Congreve, M., C.W. Murray, and T.L. Blundell, *Keynote review: Structural biology and drug discovery*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(13): p. 895-907.
19. Cornell, W.D., et al., *A 2nd Generation Force-Field for the Simulation of Proteins, Nucleic-Acids, and Organic-Molecules*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(19): p. 5179-5197.
20. D., S.L., D. Xavier, and v.G.W. F., *An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase*. Journal of Computational Chemistry, 2001. **22**(11): p. 1205-1218.

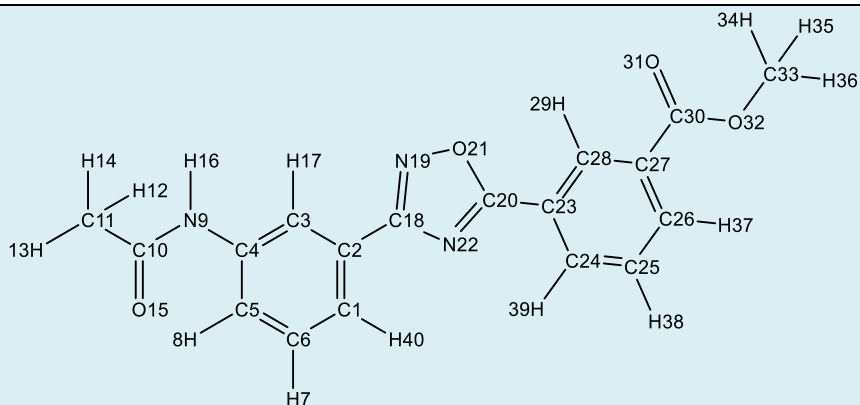
21. Dror, R.O., et al., *Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology*. *Annu Rev Biophys*, 2012. **41**: p. 429-52.
22. Firestine, S.M., *Methods and Principles in Medicinal Chemistry. Volume 22. Chemogenomics in Drug Discovery: A Medicinal Chemistry Perspective* Edited by H. Kubinyi and G. Miller. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KgaA, Weinheim, Germany. 2004. xxiv + 463 pp. 18 × 24.5 cm. ISBN 3-527-30987-X. \$179.00. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005. **48**(11): p. 3935-3936.
23. Fortune, J.M. and N. Osheroff, *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**: p. 221-253.
24. Frenkel, D. and B. Smit, *Understanding molecular simulation : from algorithms to applications*. 2002.
25. Gohlke, H. and G. Klebe, *Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002. **41**(15): p. 2644-76.
26. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
27. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
28. Huang, H.-J., et al., *Current developments of computer-aided drug design*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2010. **41**(6): p. 623-635.
29. Hughes, J.P., et al., *Principles of early drug discovery*. *Br J Pharmacol*, 2011. **162**(6): p. 1239-49.
30. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual molecular dynamics*. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 1996. **14**(1): p. 33-38.
31. Imming, P., C. Sinning, and A. Meyer, *Drugs, their targets and the nature and number of drug targets*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006. **5**: p. 821.
32. Imming, P., C. Sinning, and A. Meyer, *Drugs, their targets and the nature and number of drug targets*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(10): p. 821-34.
33. Janežič, M., et al., *3-substituted-1H-indazoles as Catalytic Inhibitors of the Human DNA Topoisomerase II α* . *ChemistrySelect*, 2017. **2**(1): p. 480-488.
34. JCS, B. and C. P., *Molecular Mechanics: Theoretical basis, rules, scope and limits*. *Coord Chem Reviews in Analytical Chemistry*, 2001. **212**: p. 3-10.
35. Jo, S., et al., *CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM*. *J Comput Chem*, 2008. **29**(11): p. 1859-65.
36. Jones, G., et al., *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. *Journal of Molecular Biology*, 1997. **267**(3): p. 727-748.
37. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water*. *Journal of Chemical Physics*, 1983. **79**(2): p. 926-935.
38. Judson, R.S., E.P. Jaeger, and A.M. Treasurywala, *A genetic algorithm based method for docking flexible molecules*. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 1994. **308**: p. 191-206.
39. Jukič, M., A. Perdih, and T. Šolmajer, *Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod*. *Farm Vestn*, 2012. **63**(1): p. 54-63.
40. Kalyanamoorthy, S. and Y.P. Chen, *Structure-based drug design to augment hit discovery*. *Drug Discov Today*, 2011. **16**(17-18): p. 831-9.
41. Karplus, M. and J. Kuriyan, *Molecular dynamics and protein function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(19): p. 6679-85.

42. Keseru, G.M. and G.M. Makara, *Hit discovery and hit-to-lead approaches*. Drug Discov Today, 2006. **11**(15-16): p. 741-8.
43. Kitchen, D.B., et al., *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 935-49.
44. Klebe, G., *Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations*. Drug Discovery Today, 2006. **11**(13-14): p. 580-594.
45. Kollman, P., *Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena*. Chemical Reviews, 1993. **93**(7): p. 2395-2417.
46. Leach, A.R., *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2001: Prentice Hall.
47. Lin, S.-K., *Pharmacophore Perception, Development and Use in Drug Design*. Edited by Osman F. Güner. Molecules, 2000. **5**(7): p. 987.
48. Lindsay, M.A., *Target discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(10): p. 831-8.
49. MacKerell, A.D., *Developments in the CHARMM all-atom empirical energy function for biological molecules*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1998. **216**: p. U696-U696.
50. MacKerell, A.D., et al., *All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(18): p. 3586-3616.
51. Maple, J.R., U. Dinur, and A.T. Hagler, *Derivation of force fields for molecular mechanics and dynamics from ab initio energy surfaces*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(15): p. 5350-5354.
52. Mason, J.S., A.C. Good, and E.J. Martin, *3-D pharmacophores in drug discovery*. Curr Pharm Des, 2001. **7**(7): p. 567-97.
53. Perdih, A., *Dinamični model encima MurD iz E. coli in in silico načrtovanje novih inhibitorjev*. Ljubljana
54. Perdih, A., et al., *Uporaba računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic*. Farm Vestn, 2010. **61**(4): p. 195-202.
55. Pogorelnik, B., et al., *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**(2): p. 345-359.
56. Pogorelnik, B., et al., *Monocyclic 4-amino-6-(phenylamino)-1,3,5-triazines as inhibitors of human DNA topoisomerase II α* . Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014(0).
57. Pogorelnik, B., M. Janežič, and P. Andrej, *Zaviralci dna topoizomeraze II α - pomembne tarče protirakavih učinkovin*. Farmaceutski vestnik, 2015. **66**: p. 326-333.
58. Pogorelnik, B., et al., *4,6-Substituted-1,3,5-triazin-2(1H)-ones as monocyclic catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II α targeting the ATP binding site*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2015. **23**(15): p. 4218-29.
59. Pogorelnik, B., A. Perdih, and T. Solmajer, *Recent Advances in the Development of Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II alpha As Novel Anticancer Agents*. Current Medicinal Chemistry, 2013. **20**(5): p. 694-709.
60. Pogorelnik, B., A. Perdih, and T. Solmajer, *Recent Developments of DNA Poisons - Human DNA Topoisomerase II alpha Inhibitors - as Anticancer Agents*. Current Pharmaceutical Design, 2013. **19**(13): p. 2474-2488.

61. Prada-Gracia, D., S. Huerta-Yépez, and L.M. Moreno-Vargas, *Application of computational methods for anticancer drug discovery, design, and optimization*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 2016. **73**(6): p. 411-423.
62. Schrödinger, E., *An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules*. Physical Review, 1926. **28**(6): p. 1049-1070.
63. Shaw, D.E., *Millisecond-Long Molecular Dynamics Simulations of Proteins on a Special-Purpose Machine*. Biophysical Journal, 2013. **104**(2): p. 45a-45a.
64. Shoichet, B.K., *Virtual screening of chemical libraries*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 862-865.
65. Sydow, D., *Dynophores: Novel Dynamic Pharmacophores*. 2015, Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät.
66. Štular, T., *Razvoj spletnega uporabniškega vmesnika za program molekularnega sidranja : zaključna naloga*. 2015, [T. Štular]. p. ix, 43 f., 5 f. pril.
67. Valjavec, K., S. Bavcon, and A. Perdih, *DNA topoizomeraze pomembne tarče protirakavih zdravilnih učinkovin*. Kemija v šoli, 2018: p. 1-7.
68. Verdonk, M.L., et al., *Improved protein-ligand docking using GOLD*. Proteins, 2003. **52**(4): p. 609-23.
69. Warren, G.L., et al., *A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. **49**(20): p. 5912-5931.
70. Warren, G.L., et al., *A critical assessment of docking programs and scoring functions*. J Med Chem, 2006. **49**(20): p. 5912-31.
71. Wei, H., et al., *Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(44): p. 37041-37047.
72. Wolber, G. and T. Langer, *LigandScout: 3-d pharmacophores derived from protein-bound Ligands and their use as virtual screening filters*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2005. **45**(1): p. 160-169.
73. Wolber, G., et al., *Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design*. Drug Discov Today, 2008. **13**(1-2): p. 23-9.

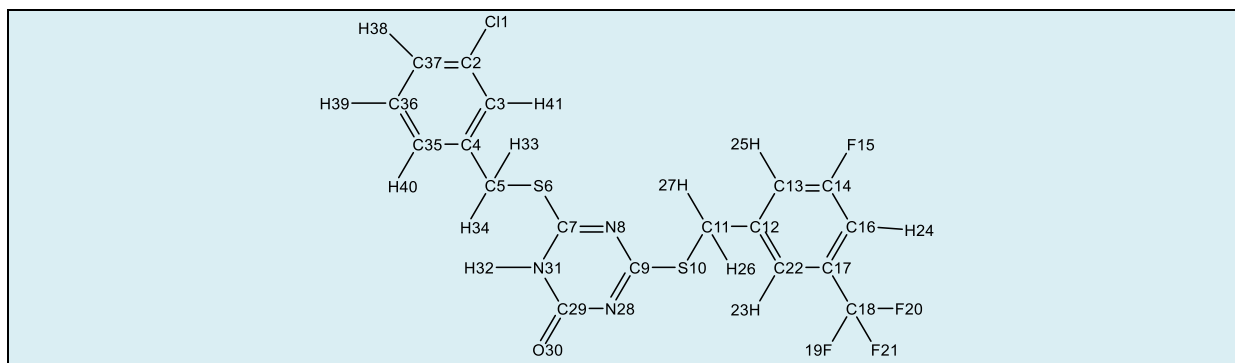
PRILOGE

Priloga A: Atomski tipi in delni naboji za spojino **2** (CHARMM General Force Filed).



Oznaka atoma	Atomski tip	q	Oznaka atoma	Atomski tip	q
C1	CG2R61	-0.115	O21	OG2R50	-0.181
C2	CG2R61	0.219	N22	NG2R50	-0.444
C3	CG2R61	-0.121	C23	CG2R61	0.213
C4	CG2R61	0.142	C24	CG2R61	-0.115
C5	CG2R61	-0.121	C25	CG2R61	-0.115
C6	CG2R61	-0.109	C26	CG2R61	-0.112
H7	HGR61	0.115	C27	CG2R61	0.083
H8	HGR61	0.115	C28	CG2R61	-0.112
N9	NG2S1	-0.466	H29	HGR61	0.115
C10	CG2O1	0.525	C30	CG2O2	0.466
C11	CG331	-0.273	O31	OG2D1	-0.482
H12	HGA3	0.090	O32	OG302	-0.305
H13	HGA3	0.090	C33	CG331	-0.038
H14	HGA3	0.090	H34	HGA3	0.090
O15	OG2D1	-0.523	H35	HGA3	0.090
H16	HGP1	0.325	H36	HGA3	0.090
H17	HGR61	0.115	H37	HGR61	0.115
C18	CG2R53	0.452	H38	HGR61	0.115
N19	NG2R50	-0.682	H39	HGR61	0.115
C20	CG2R53	0.429	H40	HGR61	0.115

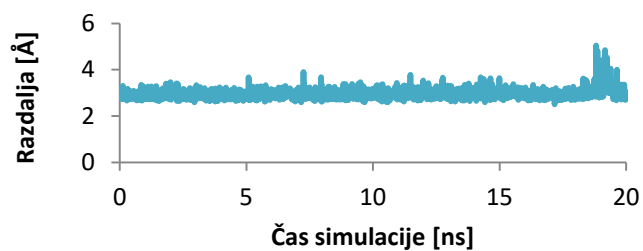
Priloga B: Atomski tipi in delni naboji za spojino **10** (CHARMM General Force Filed).



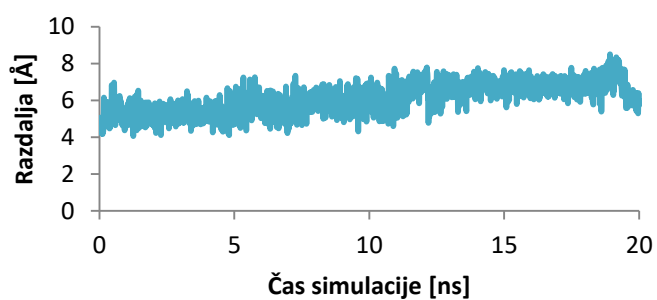
Oznaka atoma	Atomski tip	q	Oznaka atoma	Atomski tip	q
C11	CLGR1	-0.146	C22	CG2R61	-0.242
C2	CG2R61	0.059	H23	HGR61	0.250
C3	CG2R61	-0.179	H24	HGR62	0.321
C4	CG2R61	-0.356	H25	HGR62	0.186
C5	CG321	0.340	H26	HGA2	0.090
S6	SG311	-0.063	H27	HGA2	0.090
C7	CG2R64	0.782	N28	NG2R62	-0.700
N8	NG2R62	-0.899	C29	CG2R63	0.359
C9	CGR64	0.896	O30	OG2D4	-0.457
S10	SG311	-0.061	N31	NG2R61	-0.349
C11	CG321	0.346	H32	HGP1	0.370
C12	CG2R61	-0.409	H33	HGA2	0.090
C13	CG2R61	-0.159	H34	HGA2	0.090
C14	CG2R66	0.133	C35	CG2R61	-0.177
F15	FGR1	-0.211	C36	CG2R61	-0.109
C16	CG2R61	-0.187	C37	CG2R61	-0.114
C17	CGR61	-0.470	H38	HGR62	0.165
C18	CG302	0.803	H39	HGR61	0.115
F19	FGA3	-0.159	H40	HGR61	0.115
F20	FGA3	-0.159	H41	HGR62	0.165
F21	FGA3	-0.159			

Priloga C: Grafi razdalj med atomi spojine 2 in izbranimi aminokislinami.

Razdalja Ala 167 N - O31

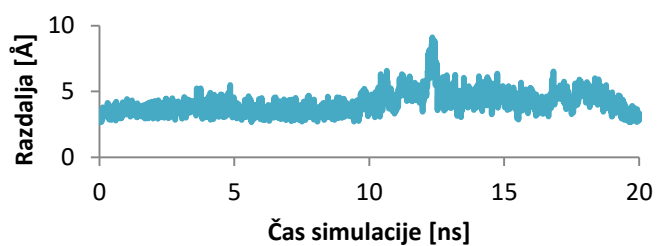


Razdalja Lys 168 NZ - O31

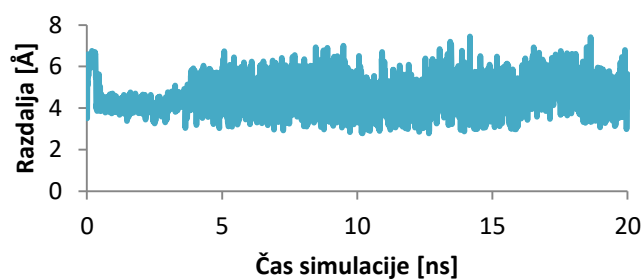


Priloga D: Grafi razdalj med atomi spojine 10 in izbranimi aminokislinami.

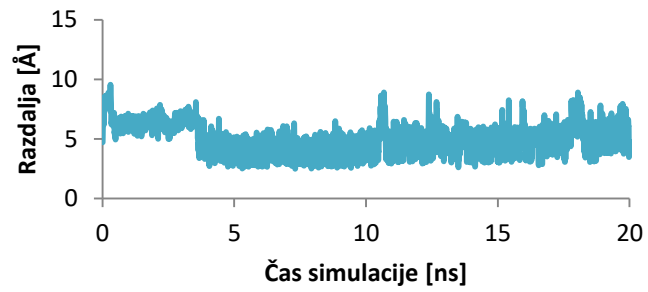
Razdalja Thr 147 O - F15



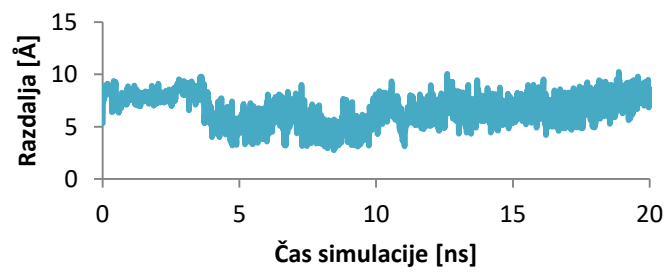
Razdalja Gly 164 N - F20



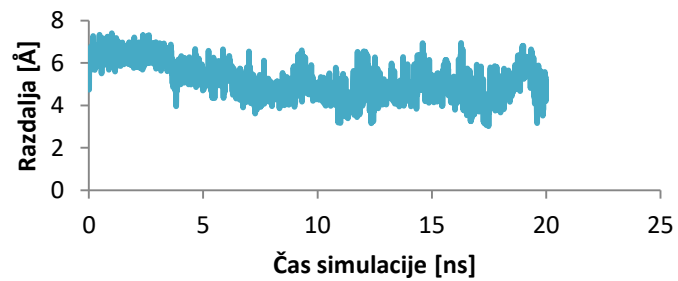
Razdalja Ser 148 OG - F20



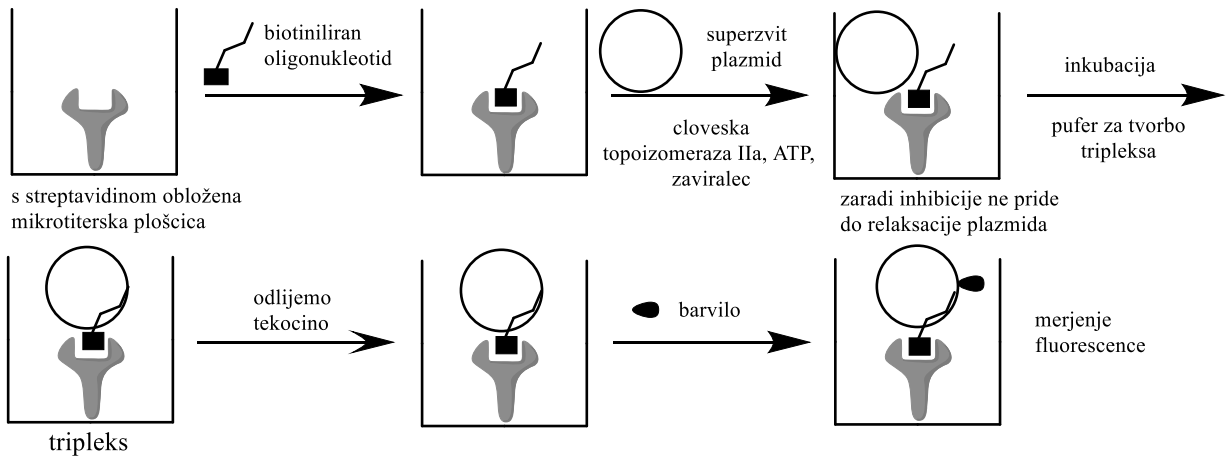
Razdalja Asn 150 N - F21



Razdalja Asn 91 ND2 - N28



Priloga E: Shematski prikaz principa testa določanja relaksacijske encimske aktivnosti.



Priloga F: Sekvenčni in statistični izpis dinofornega modela za spojino 2.



Priloga G: Sekvenčni in statistični izpis dinofornega modela za spojino 10.

