



University of Ljubljana
Faculty of Pharmacy

Gimnazija Vič

NOVI ZAVIRALCI PROTEINA TOPLOTNEGA ŠOKA 90 ZA ZDRAVLJENJE RAKA

Področje: KEMIJA

Mentorja:

izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm,
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Alenka Mozer, Gimnazija Vič

Avtorja:

Jakob Golubič, Matija Derganc

Ljubljana

September 2021 – April 2023

Podatki o avtorju in nalogi

Sva dijaka četrtega letnika Gimnazije Vič v Ljubljani. Naloga je bila izdelana na gimnaziji Vič v sodelovanju z Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani. Mentorja naloge sta Alenka Mozer iz gimnazije Vič in pa Tihomir Tomašič iz Fakultete za Farmacijo.

Povzetek

Rak je drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu. Obstoječe metode zdravljenja so povezane z mnogimi neželenimi stranskimi učinki, zato je ključen razvoj novih tarčnih učinkovin. Protein toplotnega šoka 90 ali stresni protein 90 (Hsp90) je šaperon, ki je v visoki meri odgovoren za neregulirano celično rast in posledično rakava obolenja. Razvili so že veliko različnih zaviralcev Hsp90 in nekatere vrednotili tudi v kliničnih testiranjih. Obstaja več načinov zaviranja Hsp90, pri čemer smo se v raziskovalni nalogi posvetili razvoju zaviralcev C-končne domene, ki v nasprotju z do sedaj najbolj raziskanimi zaviralci N-končne domene ne sprožijo odziva toplotnega šoka. Z uporabo različnih pristopov molekulskega modeliranja smo najprej ustvarili knjižnico potencialnih zaviralcev na osnovi spojine TZS-36, ki je že znan zaviralec Hsp90. Nato smo celotno knjižnico z različnimi programi za molekulsko sidranje sidrali v C-končno domeno Hsp90. Po pregledu rezultatov sidranja smo oblikovali preglednico najbolje ocenjenih zaviralcev in jih sintetizirali. Nato smo jih testirali na različnih rakavih celičnih linijah in nekateri (TMM-7, TSF-15) so pokazali obetavne rezultate in veliko izboljšanje v primerjavi z začetno spojino TZS-36.

Zahvale

Najprej bi se rada zahvalila mentorjev, brez katerih raziskovalna naloga ne bi bila mogoča: Alenka Mozer, magistrica znanosti iz Gimnazije Vič, in pa izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm. iz Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Posebej bi se zahvalila tudi prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm., za vzpostavitev povezave z dr. Tomašičem in za pomoč pri raziskovanju.

Iskrene zahvale tudi doktorskim študentom Fakultete za farmacijo na Univerzi v Ljubljani: Jaka Dernovšek, mag. farm., Svit Ferjančič Benetik, mag. farm., za pomoč pri eksperimentalnem delu naloge v laboratoriju in pa tudi Živi Zajec, mag. farm., za testiranje spojin na rakavih celičnih linijah.

Kazalo

Vsebina

Področje: KEMIJA.....	0
Podatki o avtorju in nalogi.....	1
Povzetek.....	2
Zahvale.....	3
Kazalo.....	4
Vsebina.....	4
Kazalo slik.....	5
1. Uvod.....	6
2. Hipoteze in raziskovalni cilji.....	7
3. Struktura in biološke funkcije Hsp90.....	7
a. Regulacijski mehanizmi šaperona Hsp90.....	9
b. Odziv toplotnega šoka.....	10
c. Zaviralci Hsp90.....	10
i. Zaviralci N-končne domene Hsp90.....	10
ii. Selektivni zaviralci izoforme Hsp90 β	11
iii. Zaviralci C-končne domene Hsp90.....	12
4. Molekulsko sidranje.....	14
a. Iskalni algoritmi.....	14
i. Iskalni algoritmi za toga telesa.....	15
ii. Iskalni algoritmi za fleksibilna telesa.....	15
b. Cenilne funkcije.....	17
i. Cenilne funkcije na podlagi polja sil.....	17
ii. Empirične cenilne funkcije.....	18
iii. Cenilne funkcije na podlagi znanja.....	18
iv. Ocenjevanje konsenza.....	18
5. Eksperimentalno delo.....	19
a. Materiali in Metode.....	19
i. Strojna oprema.....	19
ii. Molekulsko sidranje.....	19
b. Načrtovanje knjižnice spojin z programom MarvinSketch.....	20
c. Sinteza spojin – splošne metode.....	21
d. Sinteza spojin – sintezni postopki.....	22

6.	Rezultati	24
a.	Način vezave Hsp90 CTD zaviralca TZS-36	24
i.	Molekulsko sidranje	24
b.	Molekulska dinamika in farmakoforno modeliranje.....	26
c.	Načrtovanje analogov TZS-36	29
d.	Farmakoforno modeliranje	29
e.	Rezultati molekulskega sidranja	30
f.	Sinteza v laboratoriju	34
i.	Sinteza spojin	34
ii.	Biološko vrednotenje	35
7.	Diskusija	37
8.	Zaključek	40
	Viri.....	42

Kazalo slik

Slika 1: Struktura dimera Hsp90 celotne dolžine (PDB: 5FWK (Verba et al., 2016); en protomer je prikazan sivo, drugi pa svetlo modro).....	9
Slika 2: Regulacijski mehanizem Hsp90 (prirejeno po (Li et al., 2020)).	10
Slika 3: Shematski prikaz strukture dimera Hsp90 (NTD – N-končna domena; MD – srednja domena; CTD – C-končna domena). Vezavno mesto liganda N-končne domene je prikazano zeleno (LIG – ligand).....	11
Slika 4: Strukture reprezentativnih zaviralcev Hsp90 vseh štirih izoform (pan-inhibitorji Hsp90) in nedavno razkriti selektivni zaviralci izoforme Hsp90 β	11
Slika 5: Shematski prikaz strukture dimera Hsp90 (NTD – N-končna domena; MD – srednja domena; CTD – C-končna domena). Vezavno mesto liganda C-končne domene je prikazano zeleno (LIG – ligand).....	13
Slika 6: Novobiocin in reprezentativni zaviralec Hsp90 CTD KU-135.....	13
Slika 7: Različni algoritmi za molekulsko sidranje	15
Slika 8 Shematski prikaz ustvarjanja knjižnice spojin s spremembo substituenta na položaju 2 (group R1).	21
Slika 9 Shematski prikaz ustvarjanja knjižnice spojin s spremembo substituenta na položaju 6 (group R2).	21
Slika 10: Struktura izhodiščne spojine TZS-36	24
Slika 11: Način vezave TZS-36 na Hsp90 CTD, kot je predvidel AutoDock.....	25
Slika 12. Način vezave TZS-36 na Hsp90 CTD, kot je predvidel AutoDock Vina.....	25
Slika 13: Način vezave TZS-36 na Hsp90 CTD, kot je predvidel FRED	26
Slika 14: Prikaz najpogostejših farmakofornih modelov, izpeljanih iz MD simulacije Hsp90 CTD v kompleksu s TZS-36 . Številke pod črtami označujejo število interakcij, opaženih med simulacijo molekulske dinamike za farmakoforne modele.	27
Slika 15: Najpogosteje opažen farmakoforni model.....	27
Slika 16 Drugi najpogosteje opažen farmakoforni model.	27
Slika 17: Graf interakcij, dobljen z analizo interakcij spojine TZS-36 z vezavnim mestom Hsp90 v trajektoriji 200 ns simulacije MD. Ime in oštevilčenje aminokislin je prikazano na osi x, tip	

farmakoforne lastnosti na levi osi y (AR – aromatski, H – hidrofoben, HBA – akceptor vodikove vezi, HBD – donor vodikove vezi, PI – pozitivno ionizirajoč, XBD – halogena vez), % videz na desni osi y.	28
Slika 18: Strategija načrtovanja za optimizacijo izhodiščne spojine TZS-36	29
Slika 19: Reprezentativni zadetek, usklajen z najpogosteje pojavljajočim se strukturnim farmakofornim modelom.	30
Slika 20: Predviden način vezave reprezentativne spojine A1 iz knjižnice A.	33
Slika 21: Predviden način vezave reprezentativne spojine B1 iz knjižnice B.	33
Slika 22: Predviden način vezave reprezentativne spojine C4 iz knjižnice C.	33
Slika 23: Shema; Reagenti in pogoji. a) EDC, HOBt, N-metilmorfolin, N,N-dimetilformamid, 25 °C, 18 h; b) 3-((terc-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanojska kislina, EDC, HOBt, N-metilmorfolin, N,N-dimetilformamid, 25 °C, 16 h; c) 4M HCl(g) v 1,4-dioksanu, 1,4-dioksan, 25 °C, 6 h.	35
Slika 24 Načini vezave, ki so jih predvideli različni algoritmi.	38
Slika 25 Struktura TMM-7.	39
Slika 26 Struktura TSF-15.	39

1. Uvod

Rak je trenutno po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu. V letu 2020 je zaradi raka umrlo več kot 10 milijonov ljudi in z višanjem pričakovane življenjske dobe se bo najverjetneje ta številka v prihodnosti še povečala. To pomeni, da bodo milijoni ljudi po svetu prisiljeni živeti z boleznijo in težkimi neželenimi stranskimi učinki zdravljenja. ("World Cancer Report – IARC," 2020).

Velik del zdravljenja raka je še vedno kemoterapija, pri kateri se uporabljajo citotoksične učinkovine z namenom uničenja rakavih celic. Vendar pa večina teh spojin povzroči škodo tudi zdravim celicam, kot so na primer celice imunskega sistema, kar vodi v slabšo odpornost pacientov z rakom. Poleg tega kemoterapija prinese tudi druge stranske učinke kot so bruhanje, izguba las, anemija, izguba apetita in še mnogi drugi. Vse to je izjemno naporno za paciente, ki ob kemoterapiji pogosto ne morejo živeti samostojno. Zato je razvoj novih učinkovin za boj proti raku nujen.

Sva dijaka Gimnazije Vič v Ljubljani. Naša šola je dosegla že veliko rezultatov na znanstvenih tekmovanjih po svetu, dijake pa spodbuja k delovanju v skupini raje kot individualnemu pristopu. Ker sva želela delati znanstveno nalogo, sva se povezala s Fakulteto za farmacijo na Univerzi v Ljubljani. Skupaj smo našli temo, kjer imajo lahko raziskave pomen za svetovno znanost in ki jo lahko razumeva s srednješolskim znanjem.

2. Hipoteze in raziskovalni cilji

Z naraščanjem števila primerov raka po svetu med ljudmi vseh starosti so nujno potrebni novi mehanizmi in metode zdravljenja te zahrbtni bolezni. Naš cilj je bil raziskati potencial proteina toplotnega šoka 90 (Hsp90) za zdravljenje otroških rakov, osteosarkoma in Ewingovega sarkoma, ter raka dojke. Želeli smo uporabiti različne metode molekulskega modeliranja, kot sta molekulske sidranje in farmakoforno modeliranje, za razvoj novih zaviralcev Hsp90. Z uporabo teh metod bi predvideli jakost vezave različnih spojin v C-končno domeno Hsp90. Različne spojine bi zasnovali na osnovi že preizkušanih, znanih zaviralcev Hsp90. Nato bi na rezultatih molekulskega modeliranja najboljše ocenjene spojine sintetizirali v laboratoriju, nato pa bi končne spojine testirali na rakavih celičnih linijah. Vse to bi nam dalo veliko povratnih informacij o učinkovitosti različnih programov za molekulske sidranje in njihovo uporabnost za prihodnje raziskave.

Zadali smo si dva raziskovalna cilja:

(i) Oceniti različne metode molekulskega modeliranja in programov za molekulske sidranje (nekaterih prosto dostopnih) za načrtovanje novih zaviralcev Hsp90.

(ii) Načrtovati, sintetizirati in vrednotiti nove spojine ter jih primerjati z znanimi zaviralci Hsp90.

Hipoteze:

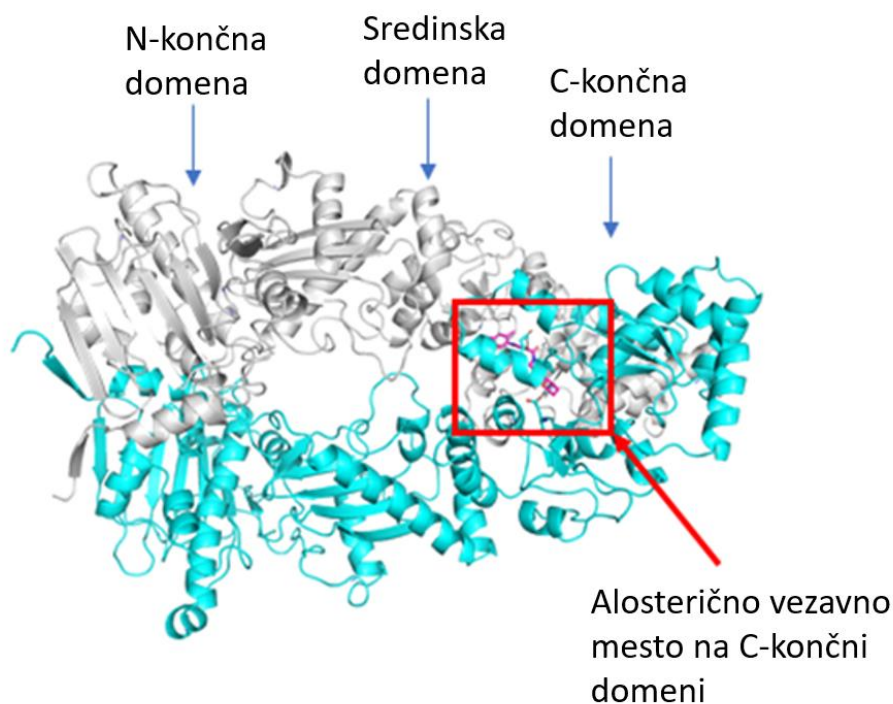
- I. Naša prva hipoteza je, da bodo vse metode molekulskega modeliranja in vsi programi za molekulske sidranje pokazali enake rezultate ob analizi knjižnice spojin.
- II. Naša druga hipoteza je, da bodo modeli sidranja in farmakoforni modeli najboljše ocenili enake spojine.
- III. Naša tretja hipoteza je, da bodo spojine, ki jih bodo programi za molekulske sidranje najboljše ocenili, pokazale izboljšano aktivnost na rakavih celičnih linijah v primerjavi z že znanimi zaviralci Hsp90.

3. Struktura in biološke funkcije Hsp90

Osteosarkom in Ewingov sarkom sta najpogostejša maligna tumorja kosti in mehkih tkiv pri otrocih in mladostnikih. Kljub napredku pri zdravljenju teh sarkomov je prognoza še vedno slaba in stopnje preživetja bolnikov z metastazami ali ponovitvijo bolezni so nesprijemljivo nizke (20–30 %) (Gill in Gorlick, 2021; Grünwald et al., 2018). Rak dojke je najpogostejši rak pri ženskah. Čeprav se je zdravljenje v zadnjih letih znatno izboljšalo, je zaradi odpornosti rakavih celic na trenutno terapijo in neželenih stranskih učinkov zdravil še zmeraj prisotna potreba po izboljšanih možnostih zdravljenja.

Šaperoni so vseprisotni proteini, ki vzdržujejo homeostazo proteinov z neprekinjenim spreminjanjem konformacijskega stanja polipeptidov z različnimi celičnimi procesi, ki segajo od ko-translacijskega in post-translacijskega zvijanja nastajajočih polipeptidov, razgradnje polipeptidov in razgradnje proteinov. (Li et al., 2020). Hsp90 je molekularni šaperon, ki je tesno povezan z različnimi vrstami raka, kot so osteosarkom, Ewingov sarkom, rak dojke, rak prostate in drugi. Odgovoren je za pravilno zvijanje več kot 400 različnih beljakovin, od katerih so mnogi ključni dejavniki pri napredovanju raka (Birbo et al., 2021). Na primer, nekateri od teh proteinov so receptorji tirozin kinaze (receptor epidermalnega rastnega faktorja (EGFR), receptor za človeški epidermalni rastni faktor 2 (Her2) in receptor vaskularnega endotelnega rastnega faktorja (VEGFR)), proteini za prenos signala (kot je Bcr -Abl, anaplastična limfomska kinaza (Alk), B-Raf in protein kinaza B ali Akt). Poleg tega sodijo med substrate Hsp90 tudi transkripcijski faktorji (kot so androgeni receptorji in faktor 1α , ki ga povzroča hipoksija (HIF1 α)), regulatorni proteini celičnega cikla (kot je od ciklina odvisna kinaza (Cdk)-4, retinoblastom in ciklin D) in anti-apoptotični proteini (kot sta B-celični limfom 2 (Bcl2) in survivin) (Li et al., 2020; Serwetnyk in Blagg, 2021).

Hsp90 obstaja v štirih različnih izoformah v celicah sesalcev: v citosolu kot inducibilni Hsp90 α in konstitutivni Hsp90 β , v endoplazemskem retikulumu kot Grp94 in v mitohondrijih kot Trap1. Slednji ima mitohondrijsko signalno zaporedje, ki se nahaja na N-koncu, v primerjavi s Hsp90 α/β pa ima Grp94 pet dodatnih preostankov na N-koncu (QEDGQ) (Johnson, 2012). Druga razlika je opažena v C-končni domeni Hsp90 α/β , ki se konča z dobro ohranjenim pentapeptidom MEEVD, specializiranim za interakcijo s košaperoni, ki vsebujejo tetratrikopeptidne ponovitve. Poleg tega ima Grp94 dodatno mesto, kjer se veže ATP na C-končni domeni. Na molekularni ravni je Hsp90 homodimer, sestavljen iz N-končne domene (NTD) z aktivnostjo ATPaze, srednje domene (MD) in C-končne domene (CTD), kjer poteka dimerizacija (Johnson, 2012) (slika 1).



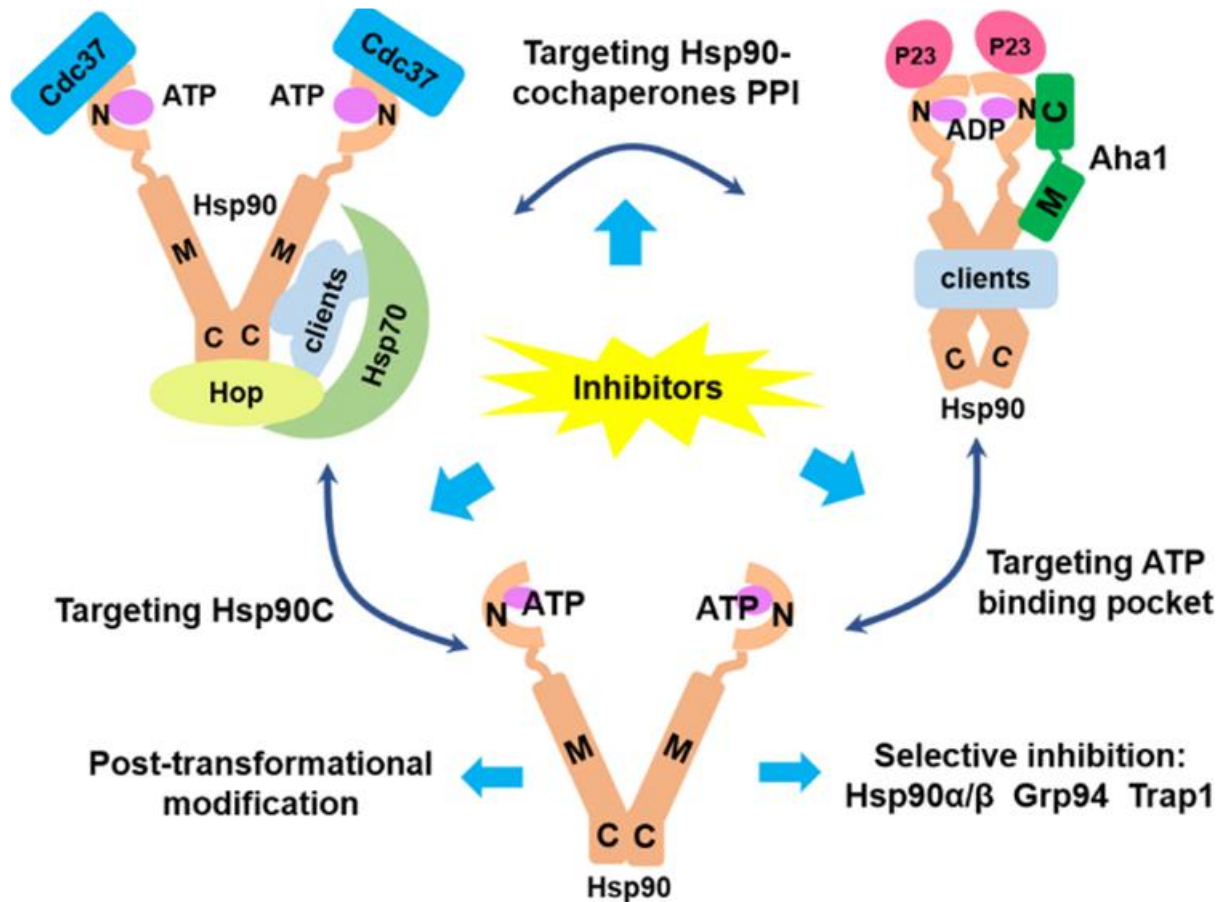
Slika 1: Struktura dimera Hsp90 celotne dolžine (PDB: 5FWK (Verba et al., 2016); en protomer je prikazan sivo, drugi pa svetlo modro).

V zdravih somatskih celicah Hsp90 deluje kot nepogrešljivi regulator celičnega cikla, proliferacije, prenosa signalov in regulacije transkripcije. Vendar pa je v posebnih razmerah v rakavih celicah vključen v zvijanje proteinov, kot so Tau, od ciklina odvisne kinaze 4/6, EGFR, Akt, Her2 (proteini substrati Hsp90 α/β), Toll-u podobni receptorji, z receptorji lipoproteinov nizke gostote povezan protein 6 (LRP6)(proteini substrati Grp94). Na splošno regulacija Hsp90 vodi do prekomerne agregacije proteinov substratov, celične proliferacije in angiogeneze, pospeševanja celičnega cikla ter celične migracije in invazije. Vsi ti procesi so značilni za rakave celice (Li et al., 2020).

a. Regulacijski mehanizmi šaperona Hsp90

Hsp90 v splošnem deluje kot spona (slika 2). Ko-šaperoni v interakcijah z različnimi domenami Hsp90 uravnavajo njegovo funkcijo in nadzorujejo njegovo konformacijsko stanje. Mehanizem Hsp90 za zorenje proteinov substratov se začne tako, da Hsp70 identificira nezvite ali nepravilno zvite proteinske substrate in jih posreduje Hsp90, kjer jih prepoznajo ko-šaperoni. Nato ATPazno aktivnost Hsp90 aktivira Hsp90 ATPaza-1 (Aha1) skupaj z disociacijo Hsp70 in Hop (organizirajoči protein Hsp70 – Hsp90), kar vodi do zaprtja homodimera Hsp90. Posledično se na N-končni domeni Hsp90 katalizira hidroliza ATP, kar vodi do zvijanja proteina substrata in odpiranja N-končne domene, sproščanja proteina substrata v zreli obliki s pravilno konformacijo in obnavljanja začetne

konformacije Hsp90. Poznavanje tega mehanizma je zelo pomembno pri iskanju in razvoju zaviralcev aktivnosti Hsp90 (Johnson, 2012; Li et al., 2020; Serwetnyk in Blagg, 2021).



Slika 2: Regulacijski mehanizem Hsp90 (prirejeno po (Li et al., 2020)).

b. Odziv toplotnega šoka

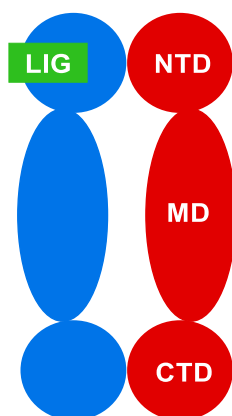
Odziv toplotnega šoka je proces, ki ščiti celice pred raznoraznimi okoliškimi in patološkimi pogoji, ki bi lahko poškodovani celične proteine z aktivacijo faktorja toplotnega šoka (HSF1). Odziv toplotnega šoka se sproži tudi v nekaterih primerih, ko je Hsp90 že inhibiran z zaviralci. V tem primeru se sproži povečana ekspresija genov za Hsp70, Hsp40 in Hsp27, kar lahko močno omeji aktivnost zaviralcev Hsp90. Še posebej je ta problem prisoten pri zaviranju Hsp90 z vezavo zaviralcev v N-končno domeno (slika 3). Po drugi strani pa zaviralci, ki se vežejo v C-končno domeno, kot na primer novobiocin in njegovi analogi, ne sprožijo HSF1 v takšni meri. Razloga za to še zmeraj ne poznamo (Li et al., 2020; Serwetnyk and Blagg, 2021).

c. Zaviralci Hsp90

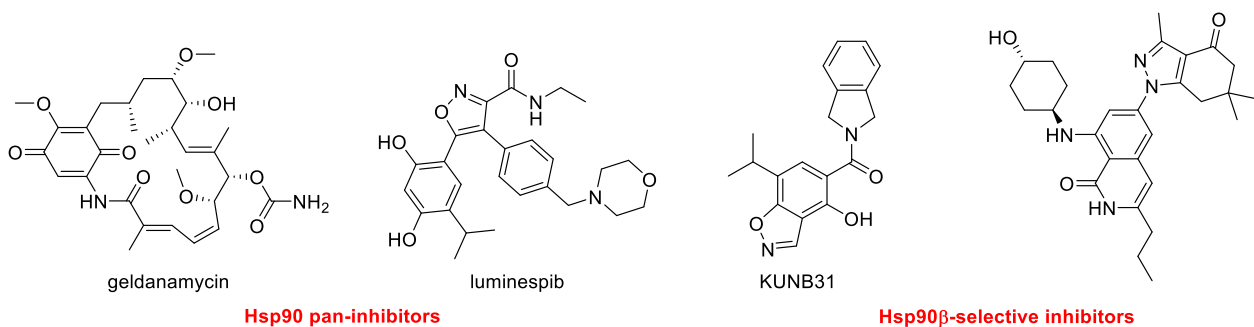
i. Zaviralci N-končne domene Hsp90

Od odkritja naravnega zaviralca Hsp90 geldanamicina (slika 4) se je farmakološka inhibicija encimske aktivnosti Hsp90 osredotočila predvsem na N-končno domeno (slika 3). Razvili so veliko

različnih spojin na osnovi geldanamicina in mnoge tudi preizkusili v kliničnih študijah, vendar je bil njihov razvoj prekinjen zaradi neželenih stranskih učinkov (kardiotoksičnost, hepatotoksičnost, očesna toksičnost itd.), vprašljive učinkovitosti in odpornosti tumorjev. Klinično je bilo testiranih 17 različnih zaviralcev Hsp90, ki se vežejo v N-končno domeno Hsp90, kot je luminespib (slika 4), vendar noben med njimi ni pokazal klinične učinkovitosti in/ali varnosti. Glavna omejitev učinkovitosti teh zaviralcev je prej omenjena indukcija odziva toplotnega šoka, ki poveča potrebni odmerki danega zdravila za doseganje enaka učinka v terapiji. Višji zahtevani odmerki zdravila vodijo do pojava toksičnosti in sčasoma je treba zdravljenje z določenim zaviralcem Hsp90 N-končne domene prekiniti (Neckers in Workman, 2012; Trepel et al., 2010; Yuno et al., 2018).



Slika 3: Shematski prikaz strukture dimera Hsp90 (NTD – N-končna domena; MD – srednja domena; CTD – C-končna domena). Vezavno mesto liganda N-končne domene je prikazano zeleno (LIG – ligand).



Slika 4: Strukture reprezentativnih zaviralcev Hsp90 vseh štirih izoform (pan-inhibitorji Hsp90) in nedavno razkriti selektivni zaviralci izoforme Hsp90β.

ii. Selektivni zaviralci izoforme Hsp90β

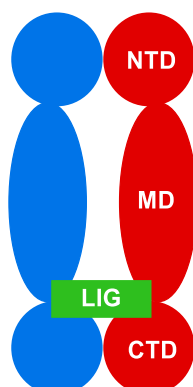
Ker so domene različnih izoform Hsp90 podobne, je večina zaviralcev Hsp90 N-končne domene neselektivnih in zavira vse od Hsp90 odvisne procese v citoplazmi, endoplazemskem retikulumu in mitohondrijih (tako imenovani pan-zaviralci Hsp90). Vse štiri izoforme so si približno 85 % podobne v zaporedju aminokislin v ATP-vezavnem mestu na N-končni domeni. Najbolj edinstvena izoforma

je Grp94, kar je privedlo do razvoja selektivnih zaviralcev Grp94 (Que et al., 2018). Hsp90 α in Hsp90 β sta si 95 % identična v mestu vezave ATP, zaradi česar je razvoj selektivnih zaviralcev Hsp90 α ali Hsp90 β velik izziv. S skrbno analizo kristalnih struktur Hsp90 α in Hsp90 β so ugotovili pomembne strukturne razlike, ki jih je mogoče uporabiti za načrtovanje selektivnih zaviralcev Hsp90 β . Spojina KUNB31 (slika 4) je bila prvi selektivni zaviralec Hsp90 β , za katerega je bilo dokazano, da povzroča razgradnjo proteinov substratov Hsp90 β , ne da bi povzročil indukcije odziva toplotnega šoka (Khandelwal et al., 2018). Kasneje so izvedli dve dodatni študiji, ki podpirata razvoj selektivnih zaviralcev Hsp90 β kot varnejših alternativ v primerjavi s pan-zaviralci Hsp90 (Chaudhury et al., 2021; Mishra et al., 2021).

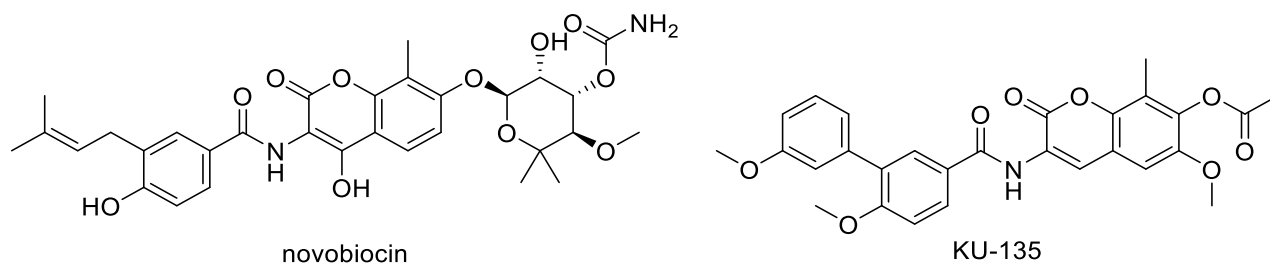
iii. Zaviralci C-končne domene Hsp90

Prve zaviralce C-končne domene Hsp90 (CKD) (slika 5) je odkrila skupina Neckersa s sodelavci, ki je ugotovila, da antibiotik novobiocin (slika 6) zniža nivoje proteinov substratov Hsp90 v celičnih linijah človeškega raka dojke. V kasnejših študijah so ugotovili, da lahko Hsp90 CKD veže novobiocin, ne pa tudi zaviralca Hsp90 NKD geldanamicina (glejte Zaviralci N-končne domene). Poleg tega novobiocin ni povzročil indukcije odziva toplotnega šoka, kar je ena od glavnih pomanjkljivosti zaviralcev NKD Hsp90 (M. G. Marcu in sod., 2000; Monica G. Marcu in sod., 2000). V prihodnjih raziskavah so zasnovali veliko različnih zaviralcev na osnovi novobiocinskega skeleta, ki so pokazali zaviranje Hsp90, antiproliferativno delovanje v rakavih celicah in brez indukcije odziva toplotnega šoka. Vendar pa način zaviranja CKD za te ligande ni bil v celoti pojasnjen. Z obsežnim razvojem novih analogov so bila določena domnevna vezavna mesta na Hsp90 CKD in ligandi optimizirani za doseganje antiproliferativnega delovanja v nanomolarnem območju (slika 6) (Ferraro et al., 2019). Vendar imajo mnogi od teh ligandov neugodne fizikalno-kemijske lastnosti, kot je na primer zelo nizka topnost v vodi. Kljub tem omejitvam pa so raziskave na tem področju obetavne, zato smo se tudi odločili, da svoje raziskave osredotočimo na nove zaviralce CKD Hsp90 za zdravljenje raka dojke ter otroškega osteosarkoma in Ewingovega sarkoma. Ker do sedaj še niso rešili nobene kristalne strukture kompleksa Hsp90 z zaviralcem CKD, bomo uporabili kombinacijo pristopov molekulskega modeliranja (na primer načrtovanje knjižnice, molekulske sidranje, farmakoforno modeliranje, simulacije molekulske dinamike) za razvoj novega

strukturnega razreda zaviralcev C-končne domene Hsp90 (Dernovšek et al., 2021; Tomašič et al., 2020).



Slika 5: Shematski prikaz strukture dimera Hsp90 (NTD – N-končna domena; MD – srednja domena; CTD – C-končna domena). Vezavno mesto liganda C-končne domene je prikazano zeleno (LIG – ligand).



Slika 6: Novobiocin in reprezentativni zaviralec Hsp90 CTD KU-135.

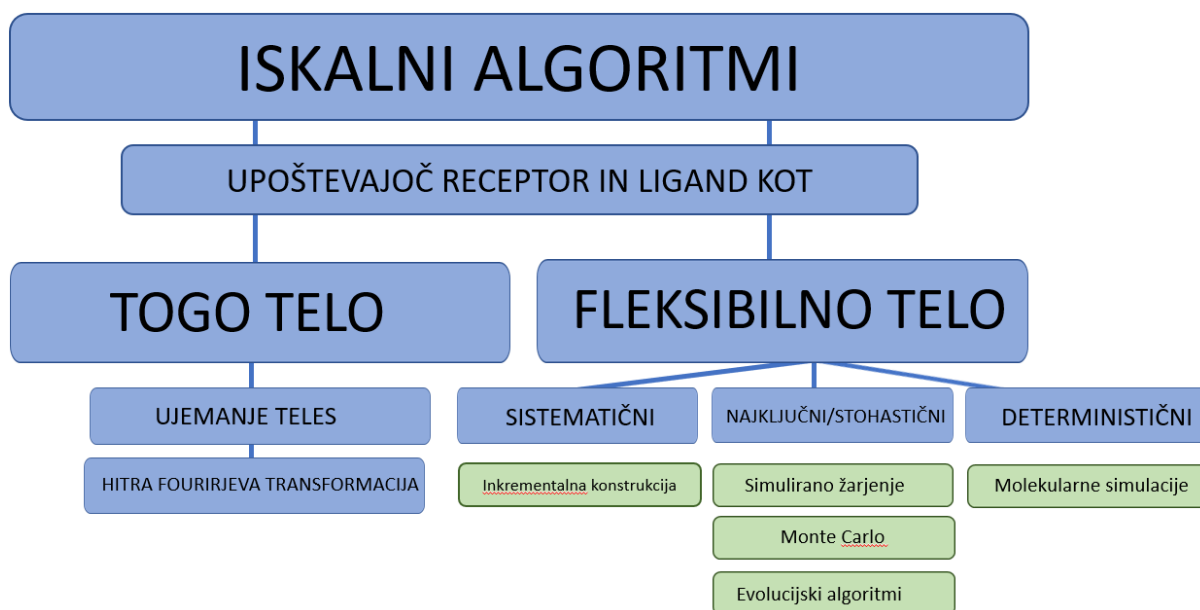
4. Molekulsko sidranje

Molekulsko sidranje (znano tudi kot sidranje ligandov) je računalniška metoda za napovedovanje interakcij med proteinom in ligandom. Omogoča nam, da predvidimo način vezave in afiniteto majhne molekule v vezavnem mestu tarče, ne da bi morali uporabiti drage, dolgotrajne in ne vedno izvedljive eksperimentalne metode. Zaradi tega ima molekulsko sidranje pomembno vlogo na vseh področjih sodobnega razvoja zdravil. Molekulsko sidranje, razvito v osemdesetih letih prejšnjega stoletja, temelji na hitro naraščajoči količini razpoložljivih strukturnih podatkov in številnih prebojih na področju računalništva. Leta 2014 je število struktur v Protein Data Bank (PDB) preseglo 100.000, vsako leto pa se še naprej dodaja več kot 10.000 struktur. Trenutno število beljakovinskih struktur v bazi podatkov PDB je več kot 188.000, zaradi česar so računalniške metode vedno pomembnejše. Trenutno obstaja več kot 50 programov za molekulsko sidranje, ki vsi delujejo podobno, vendar se močno razlikujejo po natančnosti, hitrosti in algoritemskih pristopih (Novič idr., 2016).

V splošnem so programi za molekulsko sidranje sestavljeni iz dveh osnovnih korakov: (i) določanje konformacije in orientacije z iskalnimi algoritmi in (ii) ocena učinkovitosti sidranja z uporabo cenilnih funkcij. Iskalni algoritmi lahko delujejo na principu sidranja togega telesa ali pa fleksibilnega telesa, kjer je upoštevana vrtljivost vezi. Algoritmi za toga telesa so po navadi hitrejši in uporabnejši za velike knjižnice ligandov, a pri tem žrtvujejo nekaj natančnosti. V nasprotju pa algoritmi za fleksibilna telesa porabijo več časa in procesorske moči, a pri tem dobijo bolj natančne rezultate. Cenilne funkcije pa se delijo na tri kategorije: empirične, tiste na podlagi polja sil in pa tiste na podlagi prejšnjega znanja. Vse tri se razlikujejo v hitrosti, natančnosti in metodah ocenjevanja (Novič idr., 2016).

a. Iskalni algoritmi

Iskalni algoritmi izvirajo iz študij računalniške analize interakcij med molekulami. Prvi in najpreprostejši algoritmi so obravnavali ligande in receptorje kot toga telesa z geometrijskimi lastnostmi in so se zato imenovali algoritmi ujemanja oblike. Ko pa so računalniki postali močnejši, so razvili bolj izpopolnjene iskale algoritme. Ti ligandov in receptorjev niso več obravnavali kot toga telesa, ampak kot fleksibilna telesa z več svobode. Optimalno bi upoštevali fleksibilnost tako liganda kot receptorja, vendar zaradi računskih omejitev večina fleksibilnih algoritmov sidranja upošteva le fleksibilnost liganda, hkrati pa ohranja togost receptorja (slika 7) (Novič et al., 2016).



Slika 7: Različni algoritmi za molekulske sidranje

i. Iskalni algoritmi za toga telesa

Togo telo je idealno trdno telo, ki se ne deformira in katerega položaj določa njegovo središče mase. Ima šest prostostnih stopenj, od tega tri rotacijske in tri translacijske. Vsi algoritmi za ujemanje oblik temeljijo na ujemanju oblik in pa hitri Fourierjevi transformaciji. Ujemanje oblike vključuje ustvarjanje negativne slike vezavnega mesta in poskus prekrivanja centrov vezavnih mest na atome liganda, da bi našli geometrijsko izvedljive poravnave med ligandom in receptorjem. Hitra Fourierjeva transformacija je bila razvita deset let pozneje in vključuje atomske koordinate, ki ločijo površino od notranjosti molekule. Algoritem izračuna prekrivanje in medsebojno prodiranje molekularne površine. V primerjavi z ujemanjem oblik ta algoritem hitreje oceni možne poravnave (Novič in sod., 2016).

ii. Iskalni algoritmi za fleksibilna telesa

Ker so fleksibilna telesa bolj realna predstava molekul, je molekulske sidranje s fleksibilnimi ligandi in proteini najbolj natančen približek določanja kompleksov protein-ligand. Fleksibilno sidranje telesa je razdeljeno na sidranje z upoštevanjem fleksibilnosti liganda in sidranje z upoštevanjem fleksibilnosti proteina, odvisno od tega, katera molekula se dojema kot fleksibilna. Pri fleksibilnem sidranju liganda se upošteva le fleksibilnost liganda, pri fleksibilnem sidranju proteinov pa sta ligand in del proteina fleksibilna (Novič in sod., 2016).

1. Sistematične metode

Primer ene najpogosteje uporabljenih sistematičnih metod je pristop "anchor and grow" (zasidraj in rasti). Pri tem pristopu so ligandi razdeljeni na posamezne fragmente, ločeno sidrani in nato spet povezani skupaj, da tvorijo ligand. V naši raziskavi smo uporabili program za molekulske sidranje FRED (McGann, 2012, 2011), ki uporablja ta pristop, skupaj s programom OMEGA (Hawkins et al., 2010), ki generira knjižnico konformacijskih izomerov ali konformerov za sidranje (Novič et al., 2016).

2. Naključne ali stohastične metode

Najpogostejši naključni pristopi vključujejo metodo Monte Carlo, evolucijske algoritme, genetske algoritme in roj delcev. Metoda Monte Carlo ustvarja naključne spremembe v konformaciji liganda v iskanju skupnega energijskega minimuma. Raziskuje termodinamično različna stanja in izbira energetsko ugodna stanja za ustvarjanje stabilnejših kompleksov protein-ligand. Metoda Monte Carlo je standardna metoda minimizacije, ki pa se lahko ujame v lokalni minimum. Temu problemu se lahko izognemo s simuliranim žarjenjem (Novič et al., 2016)

Evolucijski algoritmi so pri ustvarjanju in optimizaciji konformacij z nizko energijo in orientacij zelo podobni metodi Monte Carlo. Vendar pa imajo možnost, da hkrati s populacijo potencialnih rešitev, ki jih predstavljajo umetni geni, raziskujejo prostor in oblikujejo nove rešitve s kombiniranjem obstoječih rešitev. Temeljijo na načelih biološke evolucije.

Genetski algoritmi posnemajo proces evolucije z manipuliranjem zbirke podatkovnih struktur, imenovanih kromosomi. Kromosomi predstavljajo naključno generirano populacijo, sestavljeno iz različnih položajev vezave liganda, kjer je za vsako pozico liganda značilen niz spremenljivk stanja, ki opisujejo translacijo, orientacijo in konformacijo liganda glede na protein. Vsaka spremenljivka stanja ustreza genu, stanje liganda ustreza genotipu, atomske koordinate liganda pa ustrezajo fenotipu. Vsakemu od kromosomov je dodeljena ocena ustreznosti, kjer ustreznost predstavlja celotno interakcijsko energijo med ligandom in proteinom. Genetski operatorji, kot so mutacije in križanja, se uporabljajo za generiranje potomcev populacije ali, v primeru molekulskega sidranja, za preizkušanje prostora. Izbor potomcev iz sedanje generacije poteka na podlagi ustreznosti posameznika. Najboljši kromosomi se shranijo, kromosomi z dobrimi rezultati se izberejo za razmnoževanje v novo generacijo, kromosomi s slabimi rezultati pa propadejo. Preživetje najboljših kromosomov omogoča evolucijo optimalnih rešitev, ki predstavljajo pravilen način vezave. AutoDock uporablja hibrid iskanja genetskega algoritma in lokalne iskalne metode, imenovane Lamarckov genetski algoritem (Morris et al., 1998), ki deluje bolje kot genetski algoritem sam. To je posledica koncepta lokalnega iskanja med optimizacijo, ki lahko prepreči, da

se algoritem ujame v lokalnem minimumu. Čeprav je ta metoda boljša od standardnega genetskega algoritma, je še vedno potrebnih več milijonov ocenjevalnih korakov za napovedovanje zanesljive poze protein-ligand (Novič et al., 2016).

Optimizacija rojev je biološko navdihnjena metoda, ki posnema inteligenco rojev. Simulira družbeno vedenje med posamezniki (delci), pri čemer se populacija (roj) giblje skozi večdimenzionalni iskalni prostor. Vsak delček roja predstavlja možno rešitev, ki jo opisuje njen položaj v iskalnem prostoru. Ko delci med seboj izmenjujejo znanje o svojem najboljšem položaju, se roj premika proti najboljši splošni rešitvi. Vsak delec v roju predstavlja posamezno pozo liganda. Ta metoda je implementirana v programu AutoDock (PSO@AutoDock), ker po hitrosti, robustnosti in natančnosti napovedanega kompleksa protein-ligand prekaša standardni Lamarckov genetski algoritem in standardni genetski algoritem (Namasivayam in Günther, 2007; Novič etn. sod., 2016).

3. *Deterministične metode*

Molekularne simulacije so v primerjavi s prejšnjimi metodami veliko bolj podrobne. Upoštevajo gibanje posameznih delcev kot funkcijo časa. Na primer, simulacije molekulske dinamike številčno rešujejo Newtonovo enačbo gibanja in tako omogočajo opazovanje strukturnih nihanj s funkcijo časa (Novič et al., 2016).

b. *Cenilne funkcije*

Potem ko so iskalni algoritmi ustvarili različne položaje ligandov, jih je treba ovrednotiti s cenilno funkcijo. Cenilne funkcije izračunajo energijo in ocenijo afiniteto vezave med proteinom in ligandom, da ločijo pravilne od nepravilnih vezavnih konformacij. Cenilne funkcije morajo izpolnjevati več meril, da so primerne za molekulske sidranje. Poleg hitrosti in časovne učinkovitosti morajo biti sposobne oceniti interakcijo med ligandom in proteinom sorazmerno s prosto energijo vezave, pravilno razvrstiti vezavne konformacije, razlikovati aktivne spojine od neaktivnih spojin, vse v primerjavi z eksperimentalno določenimi 3D strukturami kompleksov protein-ligand (Novič et al., 2016).

i. *Cenilne funkcije na podlagi polja sil*

Cenilne funkcije na podlagi polja sil izračunajo elektrostatske in van der Waalsove interakcije. Elektrostatski člen je ocenjen s Coulombovo formulacijo, van der Waalsov pa z Lennard-Jonesovo potencialno funkcijo. Poleg neveznih sil obstajajo tudi sile, ki se pojavijo med vezavo proteina in liganda, kot so ionske interakcije in vodikove vezi, ter tudi konformacijske spremembe po vezavi liganda, ki jih je treba upoštevati pri ocenjevanju proste energije vezave. AutoDock na primer uporablja semiempirični hibridni pristop, ki uporablja termodinamični model procesa sidranja, ki vključuje intramolekularne člen za oceno proste energije (Novič et al., 2016).

ii. Empirične cenilne funkcije

Približek proste vezavne energije je vsota različnih energijskih členov, kot so van der Waalsova energija, elektrostatika, desolvatacija, vodikova vez, entropija in drugi. Empirične cenilne funkcije so na splošno enostavnejše od funkcij, ki temeljijo na polju sil, zato so izračuni rezultatov sidranja hitrejši. Ker so te funkcije odvisne od eksperimentalnih podatkov, uporabljenih za parametrizacijo, ni nujno, da bo afiniteta vezave pravilno predvidena za strukturno drugačne ligande od tistih, ki se uporabljajo v začetnem setu, na osnovi katerega je bila cenilna funkcija razvita. Ker se število kompleksov protein-ligand z znanimi 3D strukturami povečuje, je mogoče razviti funkcije z večjim številom znanih vezavnih afinitet, kar vodi v razvoj cenilnih funkcij, primernih za strukturno raznolike ligande. Empirične cenilne funkcije so na voljo tudi v programski opremi FRED, ki smo jo uporabili v naši raziskavi (Novič idr., 2016).

iii. Cenilne funkcije na podlagi znanja

Cenilne funkcije na podlagi znanja so izpeljane iz informacij o eksperimentalno določenih atomskih strukturah. Ta pristop ocenjuje moč vezave na podlagi pojava specifičnih atomskih interakcij (elektrostatične, van der Waalrove, kation- π interakcije). Te cenilne funkcije zagotavljajo dobro ravnovesje med natančnostjo in hitrostjo, ker je izračun razmeroma preprost, potenciali pa so določeni na podlagi znanih struktur kompleksov protein-ligand. Te funkcije lahko tudi implicitno zajamejo učinke sidranja, ki jih je težko eksplicitno modelirati (npr. kation- π interakcije). Pomanjkljivost teh funkcij pa je natančnost referenčnega stanja. Tukaj je bilo razvitih več metod za reševanje tega problema, na primer prilagajanje potencialov parov z iterativnimi metodami (Novič et al., 2016).

iv. Ocenjevanje konsenza

Ocenjevanje konsenza združuje rezultate različnih cenilnih funkcij. S tem lahko izboljša hitrost in natančnost operacij. Izboljšanje je odvisno od izbranih metod, stanja uporabljenih podatkov in aplikacij. Treba pa je omeniti, da naključen izbor različnih cenilnih funkcij ne vodi nujno do boljših rezultatov (Novič et al., 2016).

5. Eksperimentalno delo

a. Materiali in Metode

i. Strojna oprema

Izdelava knjižnice, molekulske sidranje in generacija farmakofornih modelov je bila izvedena na računalniku z AMD Ryzen 7 3700X 8-core processor at 3.59 GHz CPU, 16 GB RAM in Nvidia GeForce RTX 2070 SUPER 8GB GPU. Simulacijo molekulske dinamike pa smo izvedli na računalniku z AMD Ryzen 7 5800X 8-core processor at 3.80 GHz, 32 GB RAM in Nvidia GeForce RTX 3070 8GB GPU.

ii. Molekulske sidranje

Kot prvi del raziskave smo želeli ugotoviti kateri izmed programov je najprimernejši za molekulske sidranje ligandov v C-končno domeno Hsp90. Zato smo začeli s sidranjem spojine **TZS-36** v omenjeno vezavno mesto (Tomašič et al., 2020). Uporabili smo 3 različne programe. Prvi program, ki smo ga uporabili, je brezplačno dostopne, odprtokoden algoritem AutoDock Vina 1.1. Uporabljali smo verzijo, ki je vključena v LigandScout 4.4 Expert (Wolber and Langer, 2005). Uporabili smo naslednje nastavitve: exhaustiveness: 8, maximum number of modes: 9, maximum energy difference: 3. Sidranje je trajalo približno minuto na Ryzen 7 3600X CPU.

Naslednji program, ki smo ga uporabili, je prav tako brezplačno dostopen program AutoDock. Tudi v tem primeru smo uporabili verzijo vključeno v programsko opremo LigandScout 4.4 Expert. Uporabili smo naslednje nastavitve: genetic algorithm runs: 20, RMSD cluster tolerance: 2.0 Å, number of individuals in population: 150, maximum number of energy evaluations 2500000, maximum number of generations: 27000. AutoDock je odprtokoden genetski algoritem.

Za sidranje s programsko opremo FRED (OEDOCKING 4.1.0.1: OpenEye Scientific Software, <http://www.eyesopen.com>) (McGann, 2012, 2011), smo predvideno vezavno mesto na Hsp90β CTD pripravili s programom MAKE RECEPTOR (Verzija 4.1.0.1, OpenEye Scientific Software)(Tomašič et al., 2020) (PDB entry: 5FWK). Mreža okoli zaviralca Hsp90 CTD je bila generirana avtomatsko in je bila neprilagojena. Iz tega smo dobili škatlo naslednjih dimenzij: 21.7 Å × 24.7 Å × 16.0 Å in prostornino 8551 Å³. Za "Cavity Detection", smo uporabili počasno in učinkovito "Molecular" metodo za zaznavo vezavnih mest. Notranji in zunanji obris mreže sta bila prav tako avtomatično izračunana z "Balanced" nastavitvijo za "Site Shape Potential" izračun. Notranji obris smo onemogočili. Ligande smo pripravili s programom OMEGA (Verzija 4.1.1.1., OpenEye Scientific Software) (Hawkins et al., 2010). Ligande smo nato sidrali v prej pripravljeno Hsp90 CTD vezavno mesto s programom FRED (standardna nastavitve) Rezultate smo vizualno analizirali s programom VIDA (version 5.0.0., OpenEye Scientific Software).

Molekulska dinamika

MD paket NAMD (različica 2.14) (Phillips et al., 2005) in polje sile CHARMM36m (Vanommeslaeghe et al., 2010) smo uporabili za simulacije MD Hsp90 β v kompleksu s **TZS-36**. Najprej smo izvedli minimizacije energije z metodo molekulske mehanike, da bi odstranili atomske trke in optimizirali atomske koordinate kompleksa Hsp90 β -**TZS-36**. Struktura energijsko minimiziranega kompleksa za simulacijo MD je bila pripravljena z uporabo psfgen v VMD (različica 1.9.1.) (Humphrey et al., 1996). Kompleks protein-ligand je bil postavljen v škatlo vodnih molekul TIP3P in sistem nevtraliziran z dodatkom NaCl. Za simulacije MD smo uporabili ansambel NPT, ki uporablja periodične robne pogoje. Temperaturo (300 K) in tlak (1 atm) smo nadzorovali z uporabo Langevinove dinamike oziroma Langevinove batne metode. Sile kratkega so bile izračunane vsak korak in sile dolgega dosega pa vsak drugi časovni korak s časovnim intervalom 2,0 ps. Elektrostatske interakcije smo izračunali z Ewaldovo metodo z gladko mrežo delcev (Essmann et al., 1995). Za interakcije kratkega dosega smo določili mejo 12 Å. Simulacije MD so bile izvedene na časovni skali 200 ns.

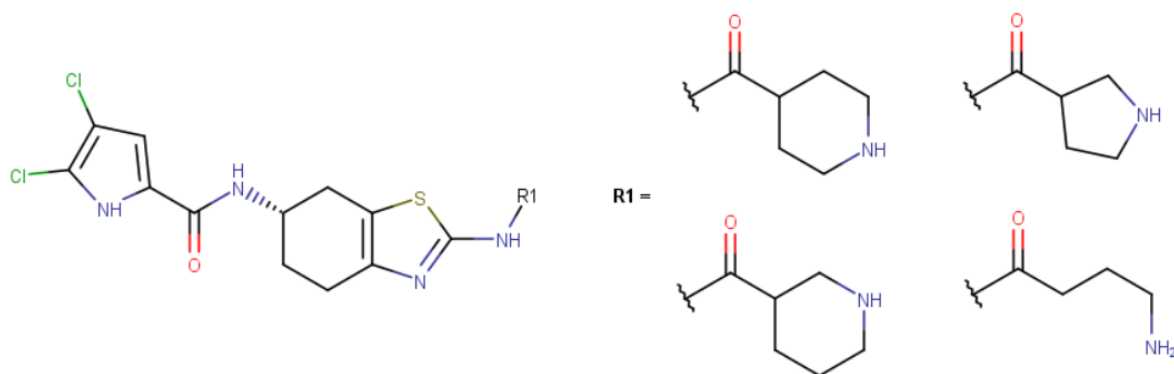
Farmakoforno modeliranje

Simulacija MD kompleksa Hsp90 β -**TZS-36** smo uporabili za analizo medmolekulskih interakcij z uporabo LigandScout 4.4 Expert (Wolber in Langer, 2005). Začetno stanje simulacije (v formatu PDB) in datoteka trajektorije simulacije MD (format DCD) sta potrebna kot vhodna podatka za ustvarjanje niza farmakofornih modelov. LigandScout 4.4 Expert smo uporabili za generiranje 1000 farmakofornih modelov iz 200 ns simulacije MD.

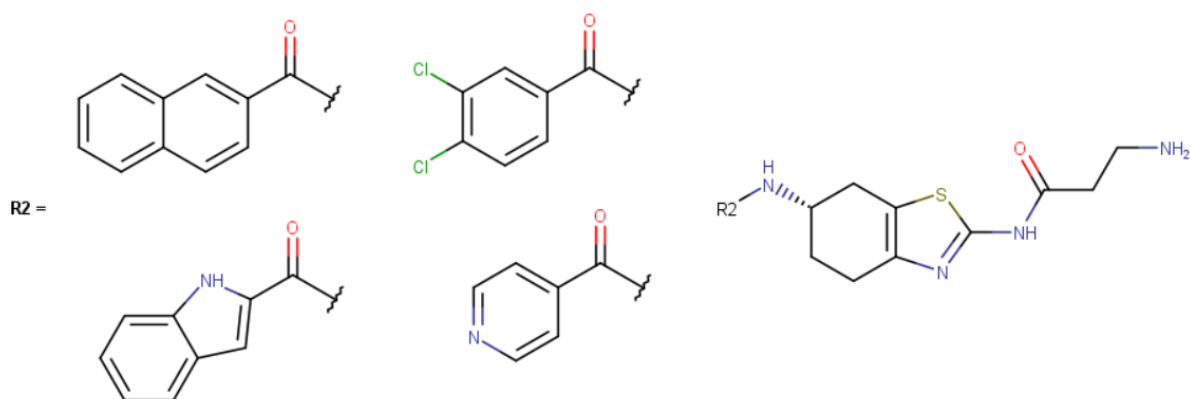
b. Načrtovanje knjižnice spojin z programom MarvinSketch

Knjižnico potencialnih zaviralcev Hsp90 CTD na osnovi izhodne spojine **TZS-36** smo generirali v MarvinSketch (ChemAxon Ltd.). Program omogoča samodejno številčenje spojin na osnovi Markushevih struktur in se lahko uporablja za ustvarjanje velikih knjižnic spojin. Naša knjižnica potencialnih zaviralcev Hsp90 CTD je bila ustvarjena s spreminjanjem substituentov R1 in R2 na ogrodju 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazola **TZS-36** (sliki 8 in 9). Na podlagi preliminarnega odnosa med strukturo in delovanjem smo uvedli različne alifatske amine, ki jih je mogoče uvesti na 2-amino skupino s spajanjem s karboksilno skupino (skupine R1 modifikacije, slika 8). Pri amino skupini na položaju 6 smo uvedli različne karboksilne kisline, ki nosijo lipofilne, aromatske substituentne (skupina R2 modifikacija, slika 9). Zahtevane aromatske karboksilne kisline oziroma alifatske amine, ki vsebujejo karboksilne kisline smo pridobili iz baze kemikalij, ki so na voljo na Fakulteti za farmacijo. Ustvarjene knjižnice spojin so bile pretvorjene v 3D-strukture v formatu OEB z uporabo OMEGA (OpenEye Scientific Software; ustvarjenih je bilo največ 250 konformerov) za sidranje s

FRED ali v format LDB za farmakoforno modeliranje v LigandScout z uporabo iCon z nastavitvami BEST (največ 200 konformerov) (Poli et al., 2018; Wolber in Langer, 2005).



Slika 8 Shematski prikaz ustvarjanja knjižnice spojin s spremembo substituenta na položaju 2 (group R1).



Slika 9 Shematski prikaz ustvarjanja knjižnice spojin s spremembo substituenta na položaju 6 (group R2).

c. Sinteza spojin – splošne metode

Reagente in topila za sintezo smo kupili pri Enamine Ltd. (Kijev, Ukrajina), Apollo Scientific Ltd. (Stockport, Združeno kraljestvo), Sigma-Aldrich (MO, ZDA) in TCI (Tokio, Japonska), in niso bili dodatno prečiščeni. Analitsko tankoplastno kromatografijo smo izvedli na silikagelnih aluminijastih ploščah (0,20 mm; 60 F254; Merck, Darmstadt, Nemčija). Kolonsko kromatografijo smo izvedli z uporabo silikagela 60 (velikost delcev, 230-400 mesh). Posneli smo ^1H in ^{13}C NMR spektre na 400 MHz NMR spektrometru (Bruker Advance 3, Bruker, MA, ZDA). Vzorce cepitve smo označili kot: s, singlet; d, dublet; dd, dublet dubleta; td, triplet dubleta; t, triplet; dt, dublet tripleta; ddd, dublet dubleta dubleta; q, kvartet; p, pentet and m, multiplēt. Čistoto pripravljenih spojin smo spremljali s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo, ki smo jo izvajali z uporabo metode A (glej spodaj) na 1260 Infinity II LC sistem (Agilent Technologies, CA, ZDA), ki je bil opremljen s kvartarno črpalko in UV detektorjem. Sistem je bil povezan z masnim spektrometrom

(Expression CMSL; Advion Inc., NY, ZDA). Masni spektri visoke ločljivosti (HRMS) so bili posneti na masnem spektrometru Exactive Plus Orbitrap (Thermo Scientific Inc., MA, ZDA).

Metoda A: Uporabili smo kolono C18 (Waters xBridge BEH; 4,6 mm × 150 mm, 3,5 μm) pri 40 °C. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 1,5 mL/min, volumen injiciranja je bil 10 μL, produkti pa smo detektirali pri 254 nm. Topilo A je bilo sestavljeno iz 1 % CH₃CN in 0,1 % HCOOH v dvojno destilirani H₂O; Topilo B je bilo sestavljeno iz CH₃CN. Uporabili smo naslednji elucijski gradient: 0→1 min, 25 % B; 1→6 min, 25 %→98 % B; 6→6,5 min, 98 % B; 6,5→7 min, 98 %→25 % B; 7→10 min, 25 % B.

d. Sinteza spojin – sintezni postopki

(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-3,4-diklorobenzamid (3). Raztopino 3,4-diklorobenzojske kisline (3,39 g, 17,8 mmol) v *N,N*-dimetilformamidu (30 mL) smo ohladili na 0 °C in nato dodali EDC (21,4 mmol) in HOBt (23,1 mmol). pH smo naravnali na 8 z *N*-metilmorfolinom in reakcijsko zmes mešali 20 minut pri 0 °C. Nato smo dodali 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazol-2,6-diamin (3,00 g, 17,8 mmol) in reakcijsko zmes mešali čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo uparili v vakuumu in oljnat ostanek raztopili v etil acetatu (100 mL) in zaporedoma sprali z 10 % citrsko kislino (2 × 50 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 50 mL) in slanico (100 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Izkoristek: 53%; bela amorfna trdna snov; R_f (DCM:MeOH = 9:1) = 0,27; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,64 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-CO-NH-Btz), 8,10 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, Ar-*H*), 7,84 (dd, *J*₁ = 8,4 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H, Ar-*H*), 7,76 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Ar-*H*), 6,68 (s, 2H, Btz-NH₂) 4,24 – 4,10 (m, 1H, Ar-CO-NH-CH), 2,81 (dd, *J*₁ = 14,9 Hz, *J*₂ = 5,4 Hz, 1H, CH₂-H_A), 2,00 – 1,90 (m, 1H, CH₂-H_B), 1,85 – 1,73 (m, 1H, CH₂-H_C) ppm. Signali za preostale CH₂ protone so se prekrivali z DMSO-*d*₅ in signali za vodo; MS (ESI+) C₁₄H₁₄Cl₂N₃OS *m/z*: 342,4 [M-H]⁺.

terc-Butil ((1*R*)-3-((6-(3,4-diklorobenzamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-il)amino)-3-okso-1-fenilpropil)karbammat (4). Raztopino (*R*)-3-((terc-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanojske kisline (0,119 g, 0,585 mmol) v *N,N*-dimetilformamidu (5 ml) smo ohladili na 0 °C in nato dodali EDC (0,700 mmol) in HOBt (0,760 mmol). pH smo naravnali na 8 z *N*-metilmorfolinom in reakcijsko zmes mešali 20 minut pri 0 °C. Nato smo dodali spojino **3** (0,200 g, 0,585 mmol) in reakcijsko zmes mešali čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo uparili v vakuumu in oljnat ostanek raztopili v etil acetatu (30 ml) in zaporedoma sprali z 10 % citrsko kislino (2 × 20 ml), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 20 ml) in slanico (30 ml). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surovi produkt smo očistili s hitro kolonsko kromatografijo ob uporabi diklorometana/metanola = 20:1 kot eluenta. Izkoristek: 40%; umazano bela brezoblična trdna snov; R_f (DCM:MeOH = 9:1) = 0,43; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)

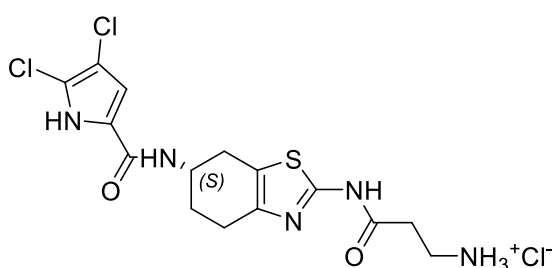
δ 11,91 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, Btz-NH-CO), 8,67 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, NH-Boc), 8,11 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, Ar-CO-NH), 7,85 (dd, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (dd, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,54 – 7,46 (m, 1H, Ar-H), 7,36 – 7,26 (m, 4H, 4 \times Ar-H), 7,21 (ddd, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 5,7$ Hz, $J_3 = 2,5$ Hz, 1H, Ar-H), 5,03 (q, $J = 7,9$ Hz, 1H, CH-NH-Boc), 4,22 (s, 1H, Ar-CO-NH-CH), 2,99 (dd, $J_1 = 15,7$ Hz, $J_2 = 5,3$ Hz, 1H, CH_2-H_A), 2,85 – 2,76 (m, 2H, Btz-NH-CO- CH_2), 2,73 – 2,63 (m, 3H, CH_2 in CH_2-H_B), 2,07 – 1,97 (m, 1H, CH_2-H_C), 1,92 – 1,81 (m, 1H, CH_2-H_D), 1,33 (s, 9H, C(CH_3)₃) ppm; MS (ESI+) C₂₈H₃₁Cl₂N₄O₄S m/z : 589,8 [M-H]⁺.

(1R)-3-((6-(3,4-Diklorobenzamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]tiazol-2-il)amino)-3-okso-1-fenilpropan-1-aminijev klorid (TSF-15). Spojino **4** (0,060 g, 0,102 mmol) smo raztopili v brezvodnem 1,4-dioksanu in na ledeni kopeli dodali 4 M HCl (25,5 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Nato smo topilo odstranili in posušili v vakuumu. Dobitek: 84%; bela trdna snov; R_f (DCM:MeOH = 9:1) = 0; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,16 (s, 1H, Btz-NH-CO), 8,69 (dd, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 3,0$ Hz, 1H, Ar-CO-NH), 8,50 (s, 3H, CH-NH₃⁺), 8,10 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,84 (ddd, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, $J_3 = 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (dd, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,54 – 7,46 (m, 2H, 2 \times Ar-H), 7,41 (dq, $J_1 = 12,7$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, 3H, 3 \times Ar-H), 4,72 – 4,68 (m, 1H, Ar-CH-NH₃⁺), 4,25 – 4,16 (m, 1H, Ar-CO-NH-CH), 3,15 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, NH-CO- CH_2), 2,99 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, CH_2-H_A), 2,72 – 2,61 (m, 3H, CH_2 in CH_2-H_B), 2,05 – 1,98 (m, 1H, CH_2-H_C), 1,94 – 1,83 (m, 1H, CH_2-H_D) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,45, 164,08, 155,42, 143,83, 137,31, 137,29, 135,25, 134,40, 131,61, 131,08, 129,74, 129,25, 129,14, 128,24, 128,06, 128,03, 120,06, 51,41, 46,62, 46,59, 28,87, 28,55, 25,14; HRMS (ESI+) za C₂₃H₂₄Cl₂N₄O₂S [M+H]⁺: izračunano: 489,0913, eksperimentalno: 489,0907; HPLC: retencijski čas: 5,17 min, čistota: 97 % (254 nm).

6. Rezultati

a. Način vezave Hsp90 CTD zaviralca TZS-36

Spojina **TZS-36** (Slika 10) je zaviralec CTD Hsp90, ki so ga nedavno razvili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. To spojino smo uporabili kot izhodišče, ker je pokazala antiproliferativno delovanje v celični liniji raka dojke MCF-7 z vrednostjo IC_{50} 12 μ M. Ker je osrednji 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolni skelet komercialno dostopen, se nam je ta serija spojin zdela primerna tudi za načrtovanje in sintezo za dijake srednje šole. Za začetek optimizacije te uspešne spojine smo se odločili raziskati njen način vezave v Hsp90 CTD s kombinacijo molekulskega sidranja, simulacij molekulske dinamike in farmakofornih modelov.

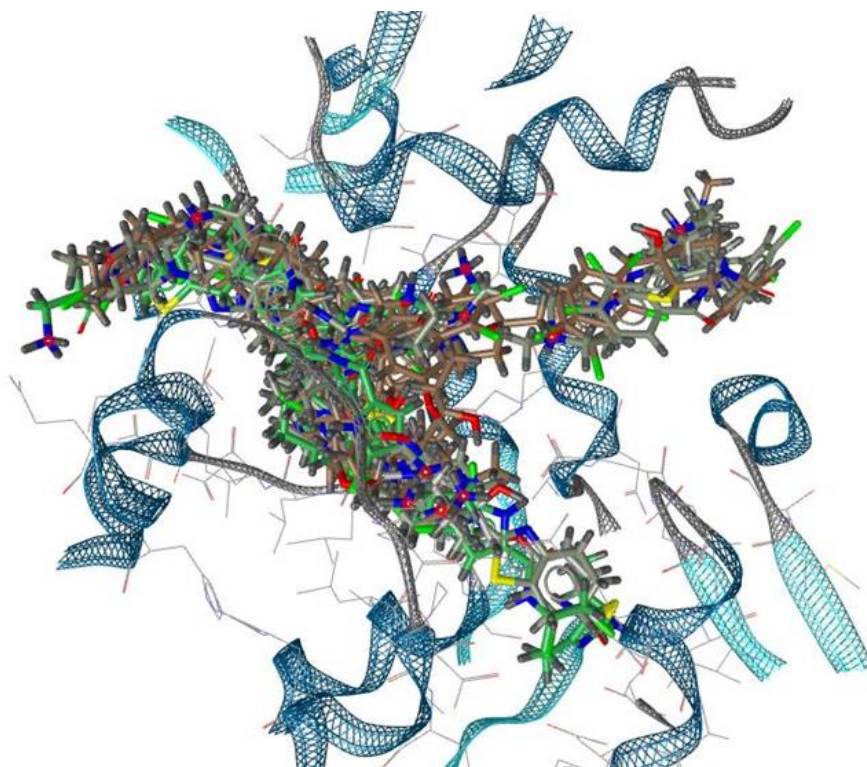


starting compound: TZS-36
MCF-7 IC_{50} = 12 μ M

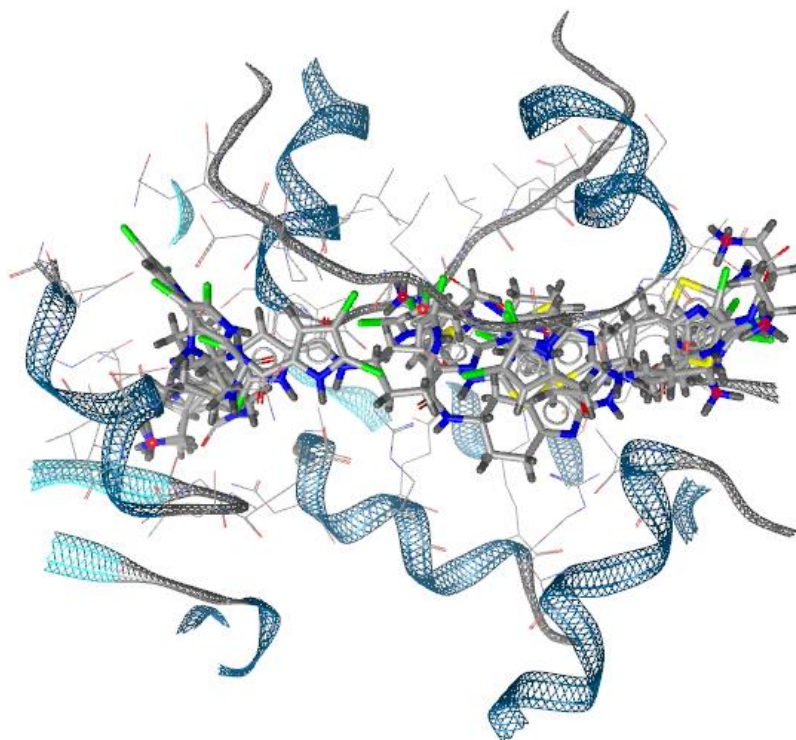
Slika 10: Struktura izhodiščne spojine TZS-36.

i. Molekulsko sidranje

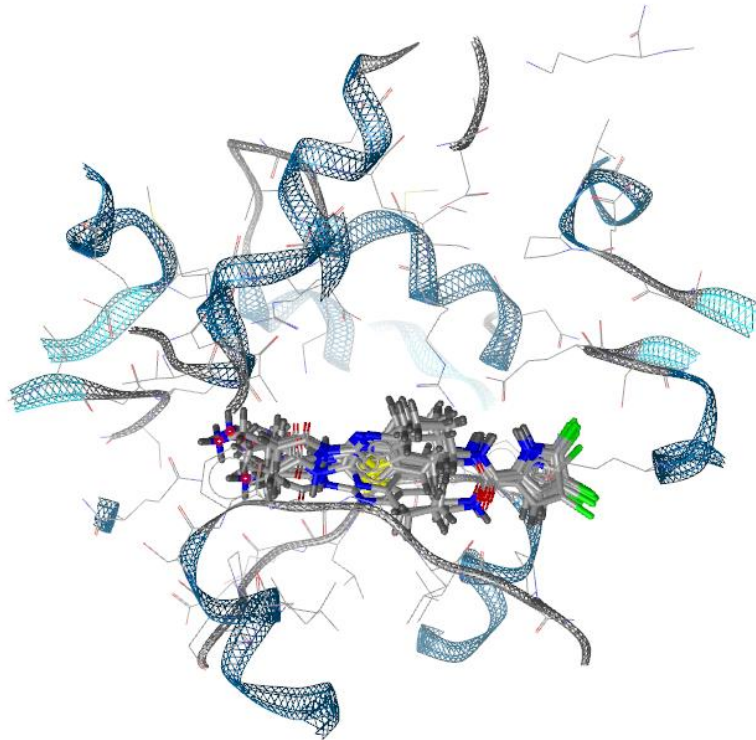
Za raziskavo načina vezave spojine **TZS-36** v vezavnem mestu Hsp90 CTD smo uporabili molekulsko sidranje. Uporabili smo različne programe in algoritme za sidranje, kot so genetski algoritem v AutoDock-u, algoritem za optimizacijo gradientov v AutoDock Vina in algoritem za sidranje z več konformerji v FRED (OEDOCKING, OpenEye Scientific Software Inc.). Vsi trije programi molekulskega sidranja so brezplačno dostopni akademskim ustanovam. Uporabili smo AutoDock in AutoDock Vina, ki sta implementirana v komercialno dostopnem paketu za molekulsko modeliranje LigandScout 4.4 Expert (Inte:Ligand GmbH) (Wolber in Langer, 2005). Sidranje spojine **TZS-36** s tremi navedenimi programi je dalo zelo različne rezultate, kot je prikazano na slikah 11-13. FRED je napovedal vezavo, ki se je skladala s predhodno opaženim odnosom med strukturo in delovanjem zaviralcev Hsp90 CTD (Dernovšek in sod., 2021; Tomašič in sod., 2020). AutoDock in AutoDock Vina sta zagotovila nedosledne rezultate, ki niso bili v skladu s predvidenimi podatki (sliki 11 in 12). V teh dveh algoritmih je bil zaviralec vezan zelo daleč od želenega vezavnega mesta in njegov položaj se je drastično spreminjal v različnih konformacijah. Iz tega razloga smo se odločili, da v naših prihodnjih raziskavah ne bomo uporabljali AutoDock in AutoDock Vina ter da bomo kot glavni algoritem za sidranje uporabili FRED.



Slika 11: Način vezave **TZS-36** na Hsp90 CTD, kot je predvidel AutoDock.



Slika 12. Način vezave **TZS-36** na Hsp90 CTD, kot je predvidel AutoDock Vina.

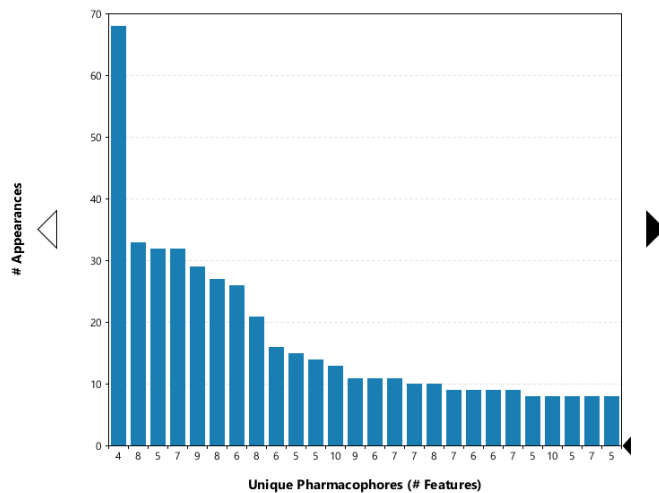


Slika 13: Način vezave TZS-36 na Hsp90 CTD, kot je predvidel FRED

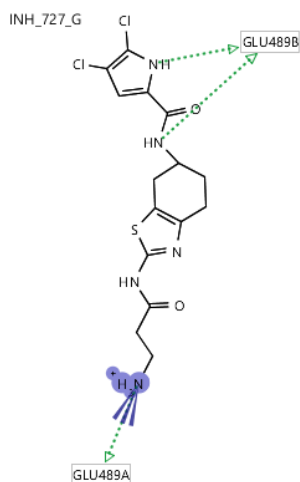
b. Molekulska dinamika in farmakoforno modeliranje

Način vezave **TZS-36**, kot ga je napovedal FRED, je bil uporabljen v simulaciji molekularne dinamike (MD) za proučevanje stabilnosti kompleksa Hsp90-**TZS-36** in medmolekulskih interakcij med simulacijo MD. MD simulacije so bile izvedene v odprtokodni programski opremi NAMD (Phillips et al., 2005). Kompleks za MD simulacijo je bil pripravljen v VMD (Humphrey et al., 1996). Hsp90 v kompleksu s **TZS-36** je bil vstavljen v škatlo vodnih molekul. Sistem je bil nato nevtraliziran z dodatkom Na⁺ in Cl⁻ ionov. Po predhodno objavljenem MD protokolu (Tomašič et al., 2020) je bilo izvedene 200 ns simulacije MD.

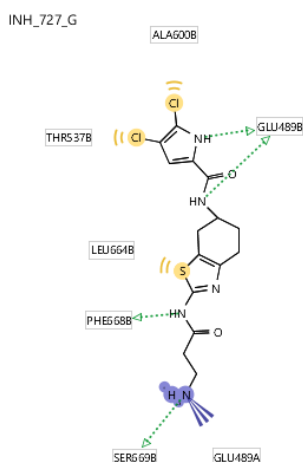
Trajektorijo MD smo nato uporabili za izračun ansambla farmakofornih modelov v LigandScout. Slika 14 prikazuje graf najpogosteje pojavljajočih se farmakofornih modelov. Najpogostejši model (opažen 68-krat) je pokazal štiri interakcije, tri donorje vodikove vezi in pozitivno ionizirajočo skupino (slika 15). Drugi, ki se najpogosteje pojavlja, ima osem farmakofornih elementov, in sicer štiri donorje vodikove vezi, tri hidrofobne interakcije in pozitivno ionizirajočo skupino (slika 16). Analiza interakcij med **TZS-36** in Hsp90 je predstavljena na sliki 17. Ključne interakcije, ki povzročijo močno vezavo **TZS-36**, so ionska interakcija s stransko verigo Glu489A, ki je prisotna v 91 % časa simulacije, vodikove vezi z Glu489A (64 % časa simulacije) in Glu489B (98 % časa simulacije) ter hidrofobne interakcije z Ala600B (79 % časa simulacije).



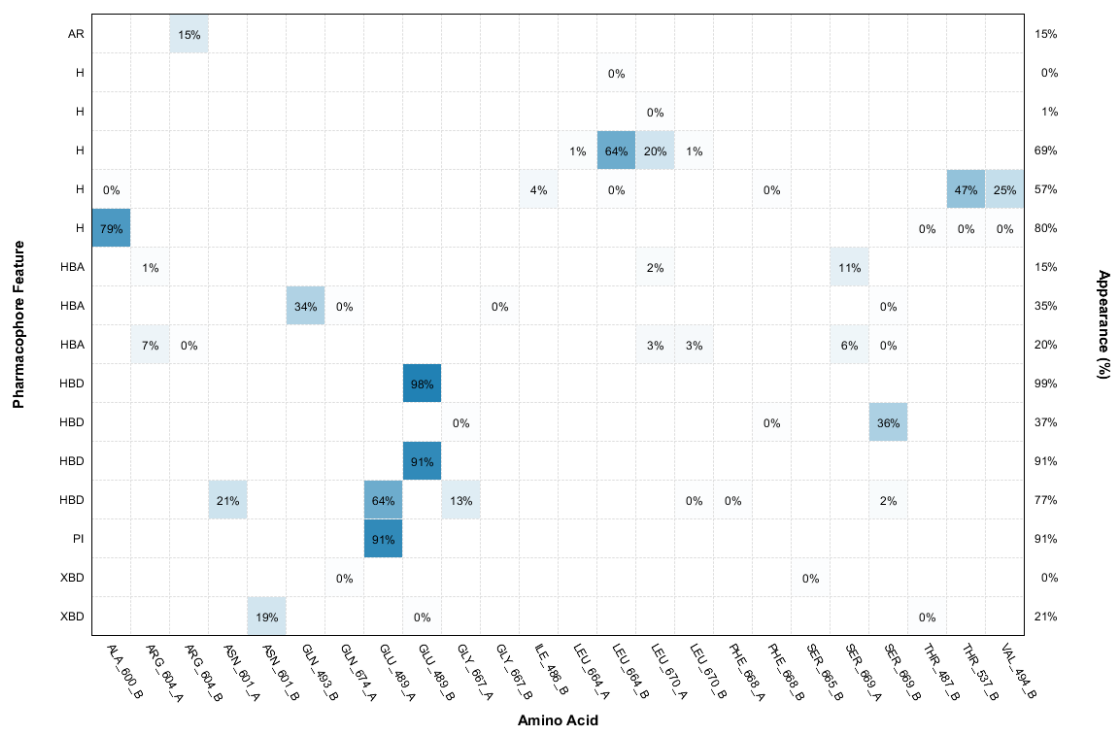
Slika 14: Prikaz najpogostejših farmakofornih modelov, izpeljanih iz MD simulacije Hsp90 CTD v kompleksu s TZS-36. Številke pod črtami označujejo število interakcij, opaženih med simulacijo molekulske dinamike za farmakoforne modele.



Slika 15: Najpogosteje opažen farmakoforni model.



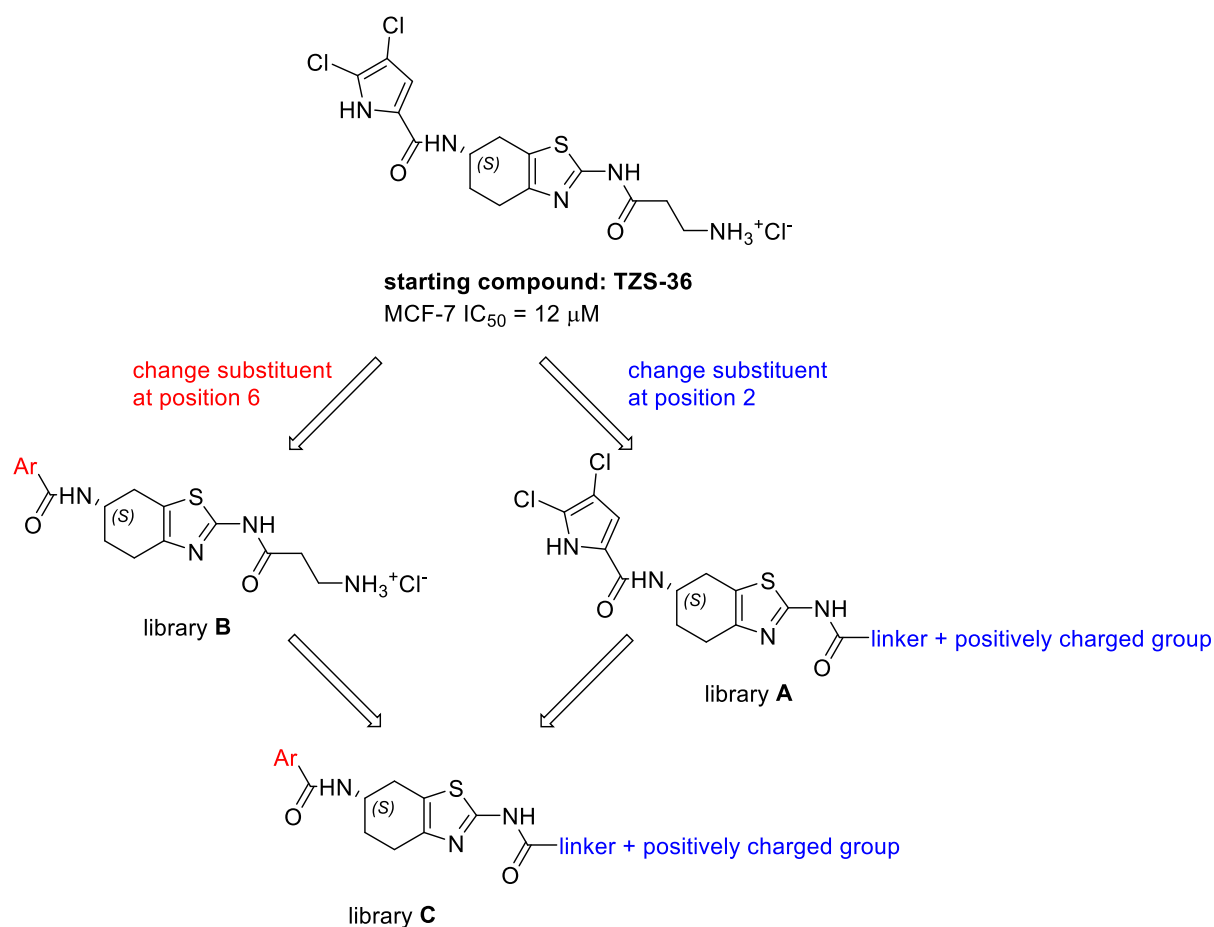
Slika 16 Drugi najpogosteje opažen farmakoforni model.



Slika 17: Graf interakcij, dobljen z analizo interakcij spojine TZS-36 z vezavnim mestom Hsp90 v trajektoriji 200 ns simulacije MD. Ime in oštevilčenje aminokislin je prikazano na osi x, tip farmakoforne lastnosti na levi osi y (AR – aromatski, H – hidrofoben, HBA – akceptor vodikove vezi, HBD – donor vodikove vezi, PI – pozitivno ionizirajoč, XBD – halogena vez), % videz na desni osi y.

c. Načrtovanje analogov TZS-36

Spojina **TZS-36** na osnovi 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazola ponuja več možnosti za optimizacijo. Najbolj enostavne so spremembe na mestih 2 in 6, kot je prikazano na sliki 18.



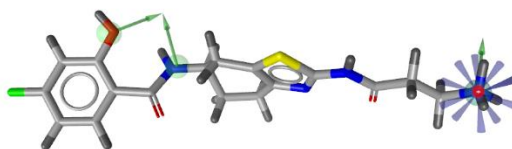
Slika 18: Strategija načrtovanja za optimizacijo izhodiščne spojine **TZS-36**.

Knjižnico spojin potencialnih zaviralcev Hsp90 CTD smo pripravili z MarvinSketch (glejte Metode). Prvotna knjižnica karboksilnih kislin z alifatsko aminsko skupino je vsebovala 154 spojin, ki so bile spojene z osnovnim skeletom, kot je prikazano na sliki 18. Pred sidranjem smo želeli odstraniti tiste z visoko molekularno maso (<500 g/mol) in visoko lipofilnostjo (porazdelitveni koeficient logP <4,5). Dobljena knjižnica A je vsebovala 134 spojin. Prvotna knjižnica aromatskih karboksilnih kislin je vsebovala 277 spojin, vendar jih je po uporabi istih filtrov kot v prejšnjem koraku ostalo le 234 (knjižnica B). Knjižnica C je vsebovala spojine z modifikacijami na mestih 2 in 6.

d. Farmakoforno modeliranje

Za virtualno reševanje smo najprej uporabili zgoraj opisane farmakoforne modele MD. Reševanje z uporabo petih najpogostejše pojavljajočih se farmakofornih modelov je imelo za rezultat le nekaj virtualnih zadetkov, saj so bile geometrijske značilnosti donorjev vodikove vezi zelo restriktivne in le nekaj spojin se je dobro prilegalo s farmakofornimi modeli. Ko je bil uporabljen najpogostejši

model, je bilo pridobljenih le 11 virtualnih zadetkov sidranja. Reprezentativni zadetek, prilegan z modelom, je prikazan na sliki 19. Uporaba drugih štirih modelov z večjim številom farmakofornih elementom ni dala nobenih virtualnih zadetkov. Zato je bil naš naslednji cilj uporaba molekulskega sidranja za razvrščanje spojin za sintezo.




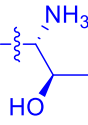
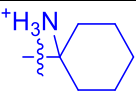
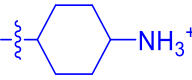
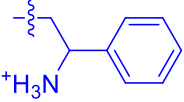
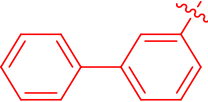
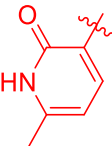
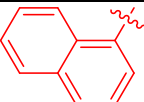
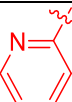
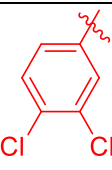

Slika 19: Reprezentativni zadetek, usklajen z najpogosteje pojavljajočim se strukturnim farmakofornim modelom.

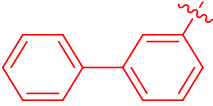
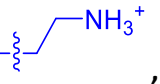
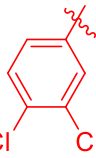
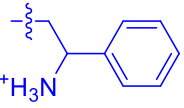
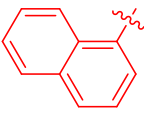
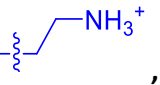

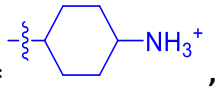
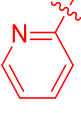
e. Rezultati molekulskega sidranja

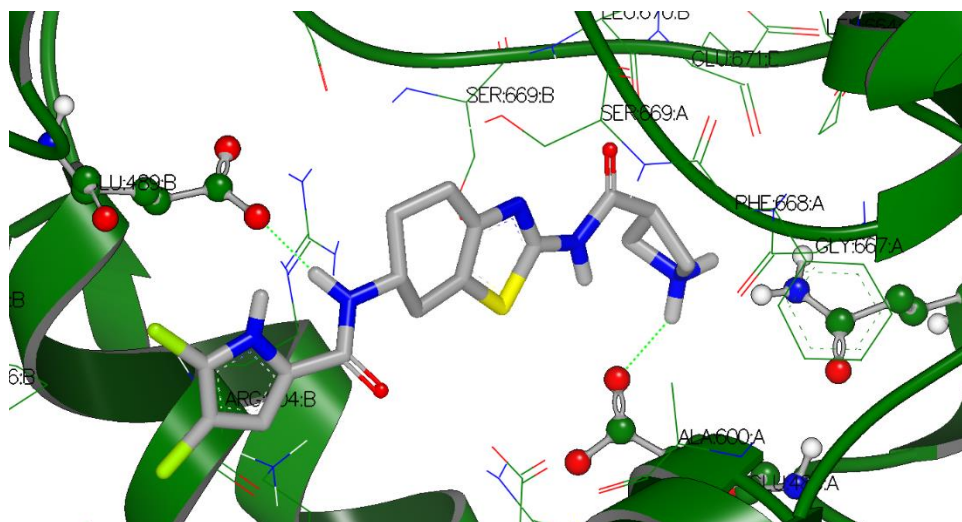
Sidranje vseh treh knjižnic ligandov **A-C** s FRED nam je pokazalo, da je imelo veliko na novo ustvarjenih spojin podobne rezultate sidranja v primerjavi s **TZS-36** (tabela 1). Modifikacija substituenta R1 je dala podobne rezultate sidranja, z izjemo spojine **A1** s konformacijsko omejenim azetidinskim obročem, ki je dala nekoliko boljši rezultat sidranja. V nasprotju s tem je imela modifikacija skupine R2 pomembnejše učinke na predvideno vezavno afiniteto. Kaže, da je zadrževanje dveh atomov klora na levi strani **TZS-36** (skupina R2) vodilo do nekoliko boljših rezultatov sidranja, kar poudarja pomen hidrofobnih interakcij in/ali halogenskih vezi v vezavnem žepu. Na splošno uvedba različnih aromatskih substituentov ni izboljšala predvidene vezavne afinitete v primerjavi s **TZS-36**.

Preglednica 1 Splošne strukture spojin v knjižnicah A-C z izbranimi predstavniki iz vsake knjižnice in njihovimi rezultati Chemgauss4 iz izračunov sidranja.

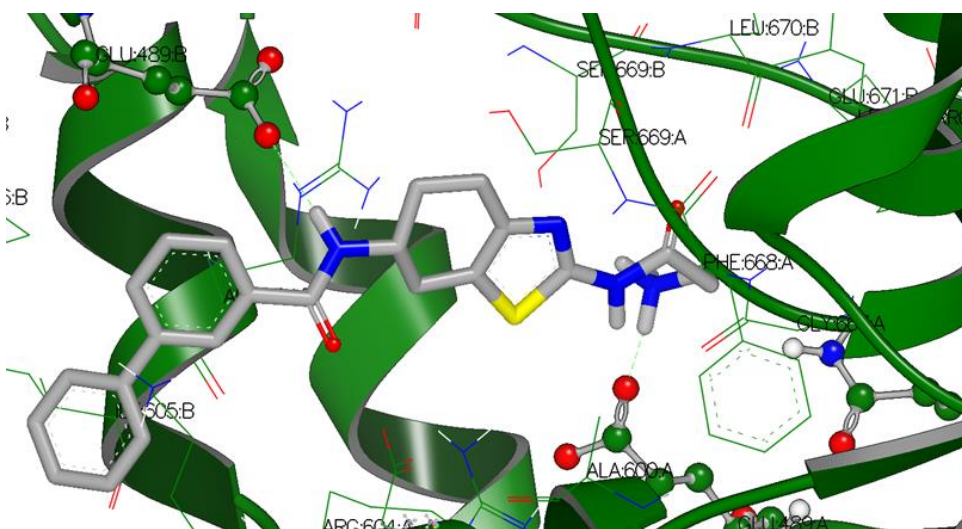
<p>Library A</p>		<p>Library B</p>		<p>Library C</p>	
Knjižnica	Spojina	Položaj	Chemgauss4 rezultat (nižji je boljši)		
/	TZS-36	/	-12.9		

A	A1: R ₁ = 	1	-13.0
A	A2: R ₁ = 	2	-12.8
A	A3: R ₁ = 	3	-12.1
A	A4: R ₁ = 	11	-11.8
A	A5: R ₁ = 	27	-11.2
B	B1: R ₂ = 	1	-12.5
B	B2: R ₂ = 	2	-11.8
B	B3: R ₂ = 	3	-11.6
B	B4: R ₂ = 	11	-11.0
B	B5: R ₂ = 	90	-9.7
C	C1: R ₁ =  ,	/	-10.6

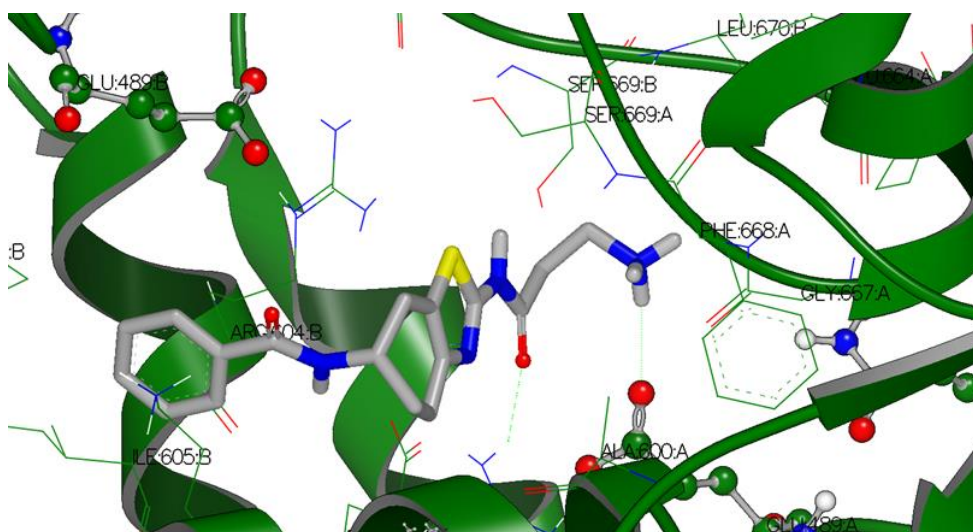
	$R_2 =$ 		
C	$C2: R_1 =$  , $R_2 =$ 	/	-9.6
C	$C3: R_1 =$  , $R_2 =$ 	/	-11.5
C	$C4: R_1 =$  , $R_2 =$ 	/	-9.3
C	$C5: R_1 =$  , $R_2 =$ 	/	-8.6



Slika 20: Predviden način vezave reprezentivne spojine A1 iz knjižnice A



Slika 21: Predviden način vezave reprezentivne spojine B1 iz knjižnice B



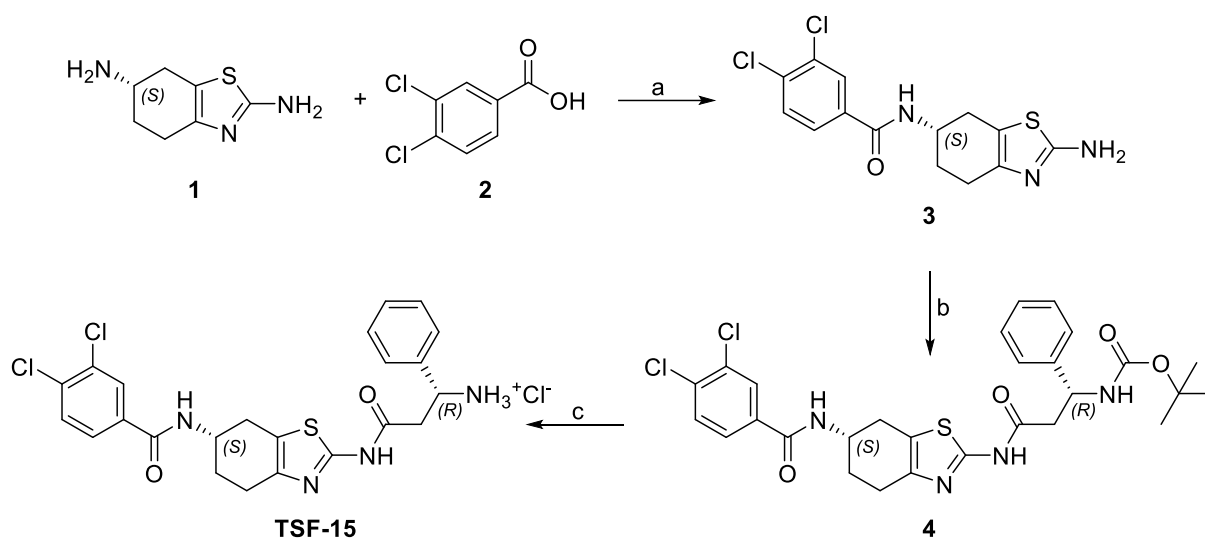
Slika 22: Predviden način vezave reprezentivne spojine C4 iz knjižnice C

Analiza vezavnih interakcij izbranih spojin iz preglednice 1 lahko pojasni opažene razlike v rezultatu cenilne funkcije. Poleg tega je analiza predvidenih načinov vezave pokazala, da lahko večina zasnovanih spojin zavzame podobno orientacijo v vezavnem mestu. Spojina **A1** tvori več vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij v vezavnem mestu C-končne domene Hsp90 (slika 20). Pirolamidni del spojine **A1** tvori vodikovo vez s stransko verigo Glu489B, medtem ko pozitivno nabita amino skupina tvori vodikovo vez in močno ionsko interakcijo z negativno nabito stransko verigo Glu489A. Podobno interakcijo lahko opazimo tudi za spojino **B1** iz knjižnice B (slika 21), kar prav tako vodi do podobnih rezultatov Chemgauss4 (tabela 1) za **A1** in **TZS-36**. Spojina **C4** (slika 22) ne tvori interakcije s stransko verigo Glu489B, kar vodi do nižjega rezultata Chemgauss4 (preglednica 1).

f. Sinteza v laboratoriju

i. Sinteza spojin

Po fazi načrtovanja projekta smo izbrali več spojin za sintezo. Sintezo te knjižnice spojin še vedno izvajajo magistrski in doktorski študenti Fakultete za farmacijo, vendar smo tudi mi lahko aktivno sodelovali pri sintezi spojine **TSF-15**, ki smo jo pripravili, kot je prikazano na shemi na sliki 23. Izhodni 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazol-2,6-diamin (**1**) smo najprej acilirali s 3,4-diklorobenzojsko kislino (**2**) z uporabo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC)/1-hidroksibenzotriazola (HOBt), ki aktivirata karboksilno skupino za sklopitev z aminom do amida **3**. Ta reakcija je potekala selektivno na položaju 6 spojine **1**, ker je alifatska primarna amino skupina bistveno bolj nukleofilna kot aromatska 2-amino skupina. V naslednjem koraku smo spojino **3** acilirali na 2-amino skupini z uporabo 3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanojske kisline, da smo dobili spojino **4**. *t*-Butiloksikarbonil (Boc) zaščito spojine **4** smo odstranili z acidolizo, da smo dobili končno spojino **TSF-15**.



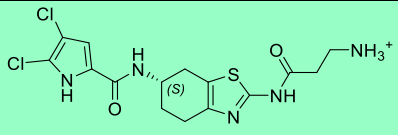
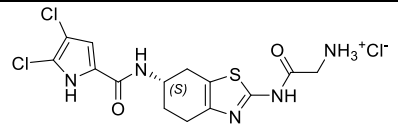
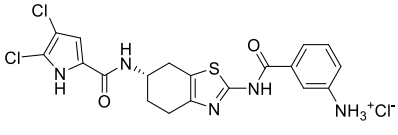
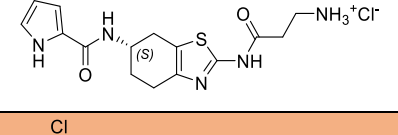
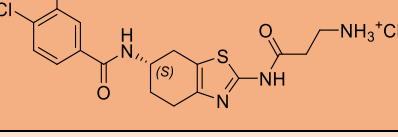
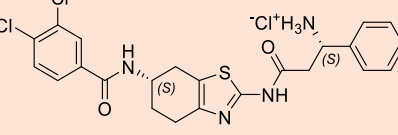
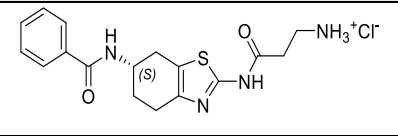
Slika 23: Shema; Reagenti in pogoji. a) EDC, HOBT, *N*-metilmorfolin, *N,N*-dimetilformamid, 25 °C, 18 h; b) 3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanojska kislina, EDC, HOBT, *N*-metilmorfolin, *N,N*-dimetilformamid, 25 °C, 16 h; c) 4M HCl(g) v 1,4-dioksanu, 1,4-dioksan, 25 °C, 6 h.

ii. Biološko vrednotenje

Knjižnico najboljše ocenjenih spojin izbranih iz virtualnega rešetanja (več kot 50) je sintetiziral in testiral njihovo antiproliferativno delovanje v različnih rakavih celičnih linijah s kolorimetričnim testom MTS sodelavec naše raziskovalne skupine, doktorski študent na Fakulteti za farmacijo. Uporabili smo celično linijo osteosarkoma in Ewingovega sarkoma, ki predstavljata težko ozdravljiva rakava obolenja pri otrocih, ter celično linijo raka dojke. Po predhodnem rešetanju pri koncentraciji 50 μM so bile vrednosti IC_{50} določene v testih odziva na odmerke z uporabo osmih koncentracij zaviralcev. Vrednost IC_{50} je koncentracija spojine, ki zmanjša sposobnost preživetja celic za 50 %. Rezultati testov so predstavljeni v preglednici 2. Ugotovljeno je bilo, da je spojina **TSF-31** brez kloro substituentov na pirolnem obroču šibkejša kot izhodiščna spojina **TZS-36** v celični liniji raka dojke MCF-7. Spojini **TMM-7** in **TSF-15** sta pokazali močno antiproliferativno aktivnost v nizkem mikromolarnem območju proti vsem testiranim rakavim celičnim linijam. Pomen klorovih atomov na aromatskem obroču je bil dodatno potrjen s primerjavo s **TSF-39**, ki je imela znatno šibkejše delovanje od kloro substituiranega analoga **TMM-7**. Pomen kloro substituiranega aromatskega obroča za močno antiproliferativno delovanje je v skladu z rezultati sidranja (preglednica 1).

Zaviranje Hsp90 s **TSF-15** smo proučevali z uporabo testa ponovnega zvijanja luciferaze v celični liniji PC3 MM2 raka prostate. Pri segrevanju celic se luciferaza napačno zvije in denaturira. Hsp90 kot šaperon inducira konformacijske spremembe in pravilno ponovno zvije luciferazo. Z dodatkom **TSF-15** je ta proces zavrt zaradi interakcije spojine s Hsp90. Vrednost IC_{50} spojine **TSF-15** v tem testu je bila $47,4 \pm 13,4 \mu\text{M}$ (preglednica 2).

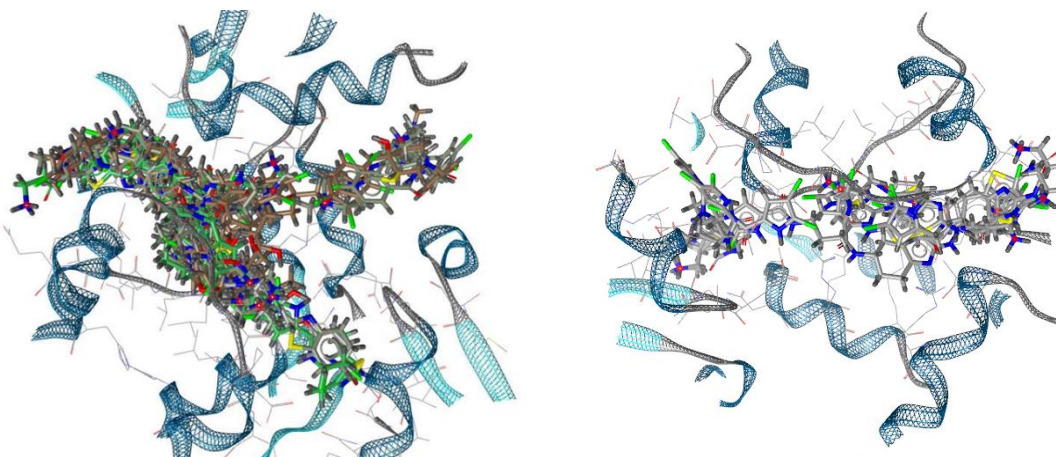
Tabela 2 Antiproliferativna aktivnost izbranih spojin v rakavih celičnih linijah.

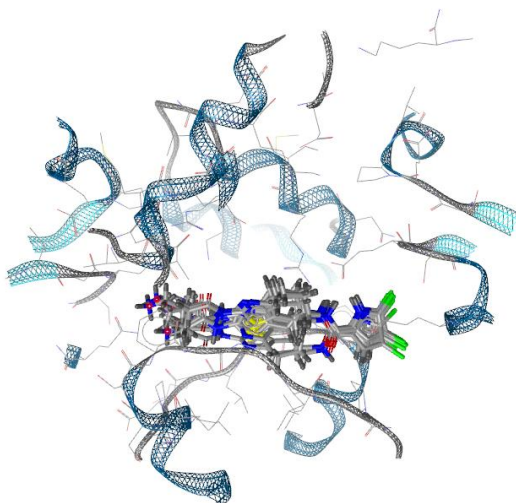
Ime	Struktura	MCF-7 ^a IC ₅₀ [μM]	SK-N-MC ^b IC ₅₀ [μM]	OS143B ^c IC ₅₀ [μM]	PC3 MM2 ^d test ponovnega zvižanja luciferaze IC ₅₀ [μM]
TZS-36		12.0	n.d.	n.d. ^e	n.d.
TZS-27		>50	n.d.	n.d.	n.d.
TZS-26		23.7	n.d.	n.d.	n.d.
TSF-31		>50	n.d.	n.d.	n.d.
TMM-7		2.1 ± 0.7	10.75	2.6 ± 0.9	n.d.
TSF-15		6.2 ± 0.6	3.28	3.9 ± 0.7	47.4 ± 13.4
TSF-39		39 ± 6	n.d.	n.d.	n.d.

^aMCF-7 – celična linija raka dojke
^bSK-N-MC – celična linija Ewingovega sarkoma
^cOS143B – celična linija osteosarkoma
^dPC3 MM2 – celična linija raka prostate
^en.d. – ni definirano

7. Diskusija

Naša prva hipoteza je, da bodo vse metode molekulskega modeliranja in vsi programi za molekulsko sidranje pokazali enake rezultate ob analizi knjižnice spojin; v naši raziskavi smo uporabili tri različne programe za molekulsko sidranje. AutoDock in AutoDock Vina 1.1, ki sta zelo podobna odprtokodna algoritma, vgrajena v LigandScout 4.4 Expert, in programsko opremo FRED, kot del programske opreme OpenEye. Vsi trije programi so brezplačno dostopni za akademske ustanove, čeprav sta verziji AutoDock in AutoDock Vina, ki smo ju uporabili mi, komercialno dostopni kot del programa LigandScout 4.4 Expert. Vse tri programe smo testirali, da bi preverili njihovo učinkovitost pri naši raziskavi. To smo preverili tako, da smo sidrali našo izhodiščno spojino **TZS-36** v predhodno raziskano vezavno mesto C-končne domene Hsp90. Uporabili smo spojino **TZS-36**, ker ima že dokazano antiproliferativno delovanje na celični liniji raka dojke MCF-7. Rezultati programov AutoDock in AutoDock Vina so se izkazali za nezanesljive, saj je bil ligand pogosto vezan daleč od želenega in predhodno raziskanega vezavnega mesta. Program FRED je podal konsistentne rezultate, v skladu s predhodnimi raziskavami. Zaradi tega lahko ovržemo našo prvo hipotezo, saj niso bili vsi programi za molekulsko sidranje enako učinkoviti in niso podali enakih rezultatov za našo raziskavo.



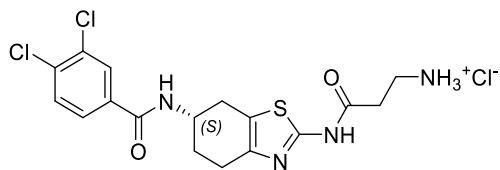


Slika 24 Načini vezave, ki so jih predvideli različni algoritmi

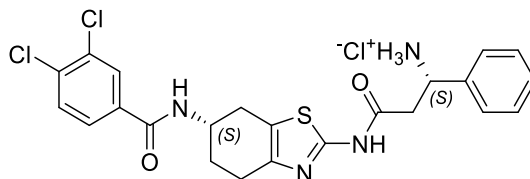
Naša druga hipoteza je, da bodo modeli sidranja in farmakoforni modeli najboljše ocenili enake spojine. Poleg molekulskega sidranja smo izvedli simulacijo molekulske dinamike za spojino **TZS-36** v kompleksu z Hsp90 β z uporabo paketa NAMD (verzija 2.14) in polje sile CHARMM36m. Iz 200 ns simulacije MD smo ustvarili 1000 farmakofornih modelov in jih uredili glede na pogostost pojavljanja v simulaciji. Prvih pet najpogosteje ponavljajočih farmakofornih modelov smo uporabili za virtualno rešetanje (drugačna verzija molekulskega sidranja za obsežne knjižnice spojin). Iz rešetanja vseh petih farmakofornih modelov smo dobili zelo malo zadetkov, ker so njihove geometrijske značilnosti zelo restriktivne in se je le malo spojin lepo ujemalo z njimi. Ko smo ponovili rešetanje z kompleksnejšimi farmakofornimi modeli nismo dobili nobenega zadetka. Zato smo se odločili, da ne bomo uporabili rešetanja s farmakofornimi modeli kot glavne metode za razvrščanje spojin za sintezo. S tem lahko ovržemo našo drugo hipotezo, saj je molekulsko sidranje napovedalo ugodno vezavo za mnogo več molekul v primerjavi z virtualnim rešetanjem s farmakofornimi modeli.

Naša tretja hipoteza je, da bodo spojine, ki jih bodo programi za molekulsko sidranje najboljše ocenili, pokazale izboljšano aktivnost na rakavih celičnih linijah v primerjavi z že znanimi spojinami. S pomočjo molekulskega sidranja in farmakofornega modeliranja smo ustvarili ciljano knjižnico najboljše ocenjenih spojin, ki so bile kasneje sintetizirane v laboratoriju. Sintezo sta vodila doktorski in magistrski študent Fakultete za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Kljub temu smo lahko tudi mi aktivno sodelovali pri sintezi spojine **TSF-15**. Spojine so bile nato testirane na različnih rakavih celičnih linijah (celična linija raka dojke, celična linija Ewingovega sarkoma, celična linija osteosarkoma). Z primerjavo rezultatov na rakavih celičnih linijah smo dalje potrdili pomembnost klorovih atomov na aromatskem obroču (**TSF-39**, **TMM-7**). Dve izmed novo pridobljenih spojin (**TMM-7** in **TSF-15**, Sliki 25 in 26) sta izkazali izboljšane rezultate na rakavih celičnih linijah v

primerjavi z izhodiščno spojino. To potrdi našo tretjo hipotezo, saj smo odkrili spojine, ki imajo izboljšano antiproliferativno delovanje v primerjavi z izhodiščno spojino.



Slika 25 Struktura TMM-7



Slika 26 Struktura TSF-15

8. Zaključek

Naša raziskava je bila osredotočena na iskanje novih ligandov za C-končno domeno Hsp90. Naš cilj je bil ustvariti novo knjižnico spojin zasnovano na podlagi izhodiščne spojine **TZS-36** z že potrjenim delovanjem, nato spojine sidrati z uporabo različnih programov za molekulsko sidranje, nazadnje pa najboljše ocenjene spojine sintetizirati v laboratoriju in preveriti njihovo delovanje ne rakavih celičnih linijah.

Knjižnico ligandov smo ustvarili s spreminjanjem spojine **TZS-36** na obeh straneh. Tako smo ustvarili na stotine novih spojin, ki smo jih filtrirali s sidranjem v vezavno mesto Hsp90 CTD. Uporabili smo programe FRED, AutoDock in AutoDock Vina, ampak sta se AutoDock in AutoDock Vina hitro izkazala za neprimerna. Zato smo uporabili samo FRED za nadaljnjo raziskavo. Celotno knjižnico smo razvrstili glede na izračun Chemgauss4 funkcije v programu FRED. Nato smo sintetizirali več kot 50 najboljše uvrščenih spojin v laboratoriju in jih testirali na različnih rakavih celičnih linijah (celična linija raka dojke, celična linija Ewingovega sarkoma, celična linija osteosarkoma, celična linija raka prostate).

Naša raziskava pokaže, da so programi za molekulsko sidranje zelo učinkoviti za filtriranje obsežnejših knjižnic spojin, saj je sinteza v laboratoriju zelo drag in dolgotrajen postopek. Od več kot 400 spojin smo jih sintetizirali samo 50 in nato testirali na celičnih linijah, katerih rezultati so presegli naša pričakovanja.

Uporaba takšnih metod je še posebej fleksibilna saj je lahko izvedena tudi od doma. Glede na to, da je bila v času naše raziskave razglašena pandemija je bil dostop do laboratorija velikokrat omejen, zaradi česar je kakršen koli del raziskave, ki je bil lahko narejen od doma veliko pripomogel.

Spojini **TSF-15** in **TMM-7** sta izkazali boljše rezultate na testiranjih kot izhodiščna spojina **TZS-36**. Na primer spojina **TMM-7** se je izkazala za 6-krat močnejšo od dokazano delujoče izhodiščne spojine **TZS-36** na celični liniji raka dojke. Poleg tega pa sta ti dve spojini izkazali izboljšano delovanje tudi na celični liniji Ewingovega sarkoma in celični liniji osteosarkoma in imata velik potencial za zdravljenje teh smrtonosnih rakavih obolenj.

Edina razlika med spojinama je to da ima spojina **TMM-7** na desni strani fenilno skupino, medtem ko ima **TZS-36** pirol. Iz tega lahko sklepamo, da ima dodatna hidrofobna interakcija na desni strani spojine velik učinek na C-končno domeno hsp90, saj močno poveča učinek spojine.

Iz raziskave lahko prav tako sklepamo, da sta klorova atoma vezana na fenilni obroč ključna za protirakavo delovanje spojine. Spojina **TSF-39**, ki se od spojine **TMM-7** razlikuje samo po odsotnosti

klorovih atomov, se je izkazala za znatno slabšo v testiranjih na celičnih linijah. Iz tega je razvidna pomembnost hidrofobnih interakcij ali/in halogenskih vezi ki se tvorijo med spojino in C-končno domeno Hsp90.

V prihodnjih raziskavah se lahko osredotočimo na lastnosti spojin **TMM-7** in **TSF-15**, saj je njuna učinkovitost večja kot so jo predvideli programi za molekulsko sidranje. Prav tako zanimivo je dejstvo, da ima spojina **TMM-7** podobno jakost delovanja v obeh enantiomerih. Ta pojav bo raziskan v prihodnosti saj imata ti dve spojini velik potencial za zdravljenje rakavih obolenj.

Viri

- Birbo, B., Madu, E.E., Madu, C.O., Jain, A., Lu, Y., 2021. Role of HSP90 in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 10317. <https://doi.org/10.3390/ijms221910317>
- Chaudhury, S., Narasimharao Meka, P., Banerjee, M., Kent, C.N., Blagg, B.S.J., 2021. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Hsp90 β -Selective Inhibitors. *Chem. – Eur. J.* 27, 14747–14764. <https://doi.org/10.1002/chem.202102574>
- Dernovšek, J., Zajec, Ž., Durcik, M., Mašič, L.P., Gobec, M., Zidar, N., Tomašič, T., 2021. Structure-Activity Relationships of Benzothiazole-Based Hsp90 C-Terminal-Domain Inhibitors. *Pharmaceutics* 13, 1283. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081283>
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L.G., 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103, 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Ferraro, M., D'Annessa, I., Moroni, E., Morra, G., Paladino, A., Rinaldi, S., Compostella, F., Colombo, G., 2019. Allosteric Modulators of HSP90 and HSP70: Dynamics Meets Function through Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.* 62, 60–87. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00825>
- Gill, J., Gorlick, R., 2021. Advancing therapy for osteosarcoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 18, 609–624. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00519-8>
- Grünewald, T.G.P., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D., Tomazou, E.M., de Álava, E., Kovar, H., Sorensen, P.H., Delattre, O., Dirksen, U., 2018. Ewing sarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 4, 5. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0003-x>
- Hawkins, P.C.D., Skillman, A.G., Warren, G.L., Ellingson, B.A., Stahl, M.T., 2010. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J. Chem. Inf. Model.* 50, 572–584. <https://doi.org/10.1021/ci100031x>
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Johnson, J.L., 2012. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.020>
- Khandelwal, A., Kent, C.N., Balch, M., Peng, S., Mishra, S.J., Deng, J., Day, V.W., Liu, W., Subramanian, C., Cohen, M., Holzbeierlein, J.M., Matts, R., Blagg, B.S.J., 2018. Structure-guided design of an Hsp90 β N-terminal isoform-selective inhibitor. *Nat. Commun.* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02013-1>
- Li, L., Wang, L., You, Q.-D., Xu, X.-L., 2020. Heat Shock Protein 90 Inhibitors: An Update on Achievements, Challenges, and Future Directions. *J. Med. Chem.* 63, 1798–1822. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00940>
- Marcu, M. G., Chadli, A., Bouhouche, I., Catelli, M., Neckers, L.M., 2000. The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J. Biol. Chem.* 275, 37181–37186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003701200>
- Marcu, Monica G., Schulte, T.W., Neckers, L., 2000. Novobiocin and Related Coumarins and Depletion of Heat Shock Protein 90-Dependent Signaling Proteins. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 92, 242–248. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.3.242>
- McGann, M., 2012. FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26, 897–906. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9584-8>
- McGann, M., 2011. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 578–596. <https://doi.org/10.1021/ci100436p>
- Mishra, S.J., Liu, W., Beebe, K., Banerjee, M., Kent, C.N., Munthali, V., Koren, J., Taylor, J.A., Neckers, L.M., Holzbeierlein, J., Blagg, B.S.J., 2021. The Development of Hsp90 β -Selective Inhibitors to Overcome Detriments Associated with pan-Hsp90 Inhibition. *J. Med. Chem.* 64, 1545–1557. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01700>

- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Namasivayam, V., Günther, R., 2007. pso@autodock: a fast flexible molecular docking program based on Swarm intelligence. *Chem. Biol. Drug Des.* 70, 475–484. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00588.x>
- Neckers, L., Workman, P., 2012. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 64–76. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1000>
- Novič, M., Tibaut, T., Anderluh, M., Borišek, J., Tomašič, T., 2016. The Comparison of Docking Search Algorithms and Scoring Functions: An Overview and Case Studies [WWW Document]. *Methods Algorithms Mol. Docking-Based Drug Des. Discov.* <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-0115-2.ch004>
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Poli, G., Seidel, T., Langer, T., 2018. Conformational Sampling of Small Molecules With iCon: Performance Assessment in Comparison With OMEGA. *Front. Chem.* 6, 229. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00229>
- Que, N.L.S., Crowley, V.M., Duerfeldt, A.S., Zhao, J., Kent, C.N., Blagg, B.S.J., Gewirth, D.T., 2018. Structure Based Design of a Grp94-Selective Inhibitor: Exploiting a Key Residue in Grp94 To Optimize Paralog-Selective Binding. *J. Med. Chem.* 61, 2793–2805. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01608>
- Serwetnyk, M.A., Blagg, B.S.J., 2021. The disruption of protein–protein interactions with co-chaperones and client substrates as a strategy towards Hsp90 inhibition. *Acta Pharm. Sin. B* 11, 1446–1468. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.015>
- Tomašič, T., Durcik, M., Keegan, B.M., Skledar, D.G., Zajec, Ž., Blagg, B.S.J., Bryant, S.D., 2020. Discovery of Novel Hsp90 C-Terminal Inhibitors Using 3D-Pharmacophores Derived from Molecular Dynamics Simulations. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6898. <https://doi.org/10.3390/ijms21186898>
- Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., Neckers, L., 2010. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 537–549. <https://doi.org/10.1038/nrc2887>
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., Mackerell, A.D., 2010. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* 31, 671–690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
- Verba, K.A., Wang, R.Y.-R., Arakawa, A., Liu, Y., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Agard, D.A., 2016. Atomic structure of Hsp90-Cdc37-Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase. *Science* 352, 1542–1547. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5023>
- Wolber, G., Langer, T., 2005. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 160–169. <https://doi.org/10.1021/ci049885e>
- World Cancer Report – IARC [WWW Document], 2020. URL https://www.iarc.fr/cards_page/world-cancer-report/ (accessed 3.19.20).
- Yuno, A., Lee, M.-J., Lee, S., Tomita, Y., Rekhtman, D., Moore, B., Trepel, J.B., 2018. Clinical Evaluation and Biomarker Profiling of Hsp90 Inhibitors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1709, 423–441. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_29