

# Racionalni dizajn, sinteza i biološko profiliranje novih JMJD2C inhibitora

---

**Leftus, Vatroslav**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:405367>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Vatroslav Letfus

**RACIONALNI DIZAJN, SINTEZA I  
BIOLOŠKO PROFILIRANJE NOVIH  
JMJD2C INHIBITORA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Vatroslav Letfus

**RACIONALNI DIZAJN, SINTEZA I  
BIOLOŠKO PROFILIRANJE NOVIH  
JMJD2C INHIBITORA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanja Koštrun

Rijeka, 2020.

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Vatroslav Letfus

**RATIONAL DESIGN, SYNTHESIS AND  
BIOLOGICAL PROFILING OF NEW JMJD2C  
INHIBITORS**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2020

Mentor rada: izv. prof.dr.sc. Sanja Koštrun

Doktorski rad obranjen je dana **9. studenoga 2020. godine,**

pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Karlo Wittine (predsjednik komisije)
2. prof. dr. sc. Marta Žuvić (članica komisije)
3. doc. dr. sc. Jelana Ban (članica komisije)
4. izv. prof. dr. sc. Sanja Koštrun, mentorica

Ovaj rad je izrađen u Fidelta d.o.o. u sklopu doktorskog studija „Medicinska kemija“ pri  
Odjelu za Biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci

## SAŽETAK

JMJD2 je enzimska obitelj humanih histon demetilaza koje su povezane s bolestima kao što su karcinom dojke i prostate. Ti enzimi smatraju se onkogenima i njihova selektivna inhibicija mogla bi biti pristup za tretiranje spomenutih karcinoma. Literaturno poznati inhibitori imaju nisku staničnu permeabilnost i selektivnost, zbog čega su daljnja istraživanja usmjerena napoboljšanje aktivnosti, selektivnosti i ADME svojstava.

U ovom istraživanju korišteni su dostupni literaturni podaci o poznatim inhibitorima kao kristalne strukture enzima JMJD2A/JMJD2C u kompleksu s malim molekulama. Analizom literaturno dostupnih kristalnih struktura proučene su interakcije između proteina i liganda te su metodama molekuskog modeliranja dizajnirani i zatim sintetizirani novi potencijalni inhibitori s toksoflavinskim strukturnim motivom.

Kroz biološko profiliranje supstanci u *in vitro* pokusima određena je njihova inhibicijska aktivnost na JMJD2C enzimu, zatim stanična permeabilnost i metabolička stabilnost molekula, te utjecaj na viabilnost stanica.

**Ključne riječi:** Epigenetika, JMJD2C enzim, inhibitor, dizajn lijekova, računalna kemija

## SUMMARY

JMJD2 is human histone demethylase family of enzymes that are linked to diseases such as prostate and breast cancer. These enzymes are considered oncogenes and their selective inhibition might be a therapeutic approach to treat the cancer. Currently known inhibitors have low permeability and low selectivity, so the further investigation is focused on optimizing activity, selectivity and ADME data.

In my thesis I used available literature data on known inhibitors and x-ray structures of JMJD2C complexes with small molecules. A computational analysis of protein-ligand interactions was applied using structure based drug design tools to design potential JMJD2C inhibitors with a toxoflavin motif. Chemical synthesis of designed compounds was developed.

New compounds were profiled *in vitro* on JMJD2C enzyme inhibition, membrane permeability and microsomal stability as well as their influence on cell viability.



## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 14 |
| 1.1. UVOD .....   | 15 |
| 1.2. CILJ i SVRHA RADA .....  | 18 |
| 1.3. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....  | 20 |
| 2. LITERATURNI PREGLED .....  | 21 |
| 2.1. Proces razvoja lijekova .....  | 22 |
| 2.1.1. Identifikacija i validacija biološke mete .....                                | 24 |
| 2.1.2. Identifikacija i validacija molekule pogotka (hit) .....                       | 27 |
| 2.1.3. Od molekule pogotka do vodeće molekule .....                                   | 30 |
| 2.1.4. Optimizacija vodeće molekule .....   | 33 |
| 2.2. Epigenetika .....  | 35 |
| 2.2.1. DNA struktura .....  | 35 |
| 2.2.2. Epigenetika .....  | 36 |
| 2.2.3. Epigenetičke modifikacije .....  | 38 |
| 2.2.3.1. Metilacija DNA .....   | 38 |
| 2.2.3.2. Modifikacije na histonima .....  | 40 |
| 2.2.3.2.1. Acetiliranje histona .....   | 40 |
| 2.2.3.2.2. Metilacija histona .....   | 40 |
| 2.2.3.2.3. Fosforilacija histona .....  | 41 |
| 2.2.3.2.4. Ubikvitinacija histona .....   | 42 |
| 2.2.3.2.5. Sumoilacija histona .....  | 42 |
| 2.3. Histon demetilaze – JMJD2 obitelj enzima .....                                   | 43 |
| 2.4. Biološka funkcija histon demetilaza .....  | 45 |
| 2.5. JMJD2C – struktura i funkcija .....  | 45 |
| 2.6. Epigenetika i bolesti .....  | 47 |
| 2.7. Povezanost JMJD2C enzima s karcinomom .....                                      | 48 |
| 2.8. Toksoflavin .....  | 50 |
| 2.9. ELISA biokemijski pokus .....  | 54 |
| 2.9.1. Određivanje IC <sub>50</sub> vrijednosti – mjera inhibicijske aktivnosti ..... | 57 |
| 2.10. ADME svojstava .....  | 58 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.10.1. Fizikalno-kemijska svojstva .....  | 60  |
| 2.10.2. Apsorpcija i distribucija supstance .....  | 61  |
| 2.10.3. Metabolizam i eliminacija supstance .....  | 62  |
| 2.10.4. Određivanje koeficijenta permeabilnosti .....  | 64  |
| 2.10.5. Određivanje supstrata za P-glikoprotein .....  | 65  |
| 2.10.6. Vezanje na proteine plazme.....  | 66  |
| 2.11. Računalna kemija u otkrivanju novih lijekova.....  | 68  |
| 2.11.1. Računalne metode kod dizajna lijekova zasnovanog na strukturi (SBDD).....  | 70  |
| 2.11.2. Pristupi SBDD-a temeljeni na polju sila .....  | 71  |
| 2.11.3. Virtualni probir i molekulsko uklapanje kod otkrivanja lijekova.....   | 73  |
| 2.11.4. Računalni <i>de novo</i> dizajn molekula sličnih lijeku .....  | 75  |
| 2.11.5. Kvantna mehanika (QM) u dizajnu temeljenom na strukturi (SBDD) .....   | 77  |
| 2.11.6. Dizajn lijekova temeljen na ligandu (LBDD) .....   | 80  |
| 2.11.7. Preklapanje i analiza molekula na temelju molekulskih polja .....  | 83  |
| 2.12. PLS analiza .....  | 93  |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....   | 95  |
| 3.1. Opće napomene .....   | 96  |
| 3.2. Kemijske sintetske metode .....   | 97  |
| 3.2.1. Priprava necikličkih spojeva, 3a-3m .....   | 98  |
| 3.2.1.1. (6 - [[(E) -benzilideneamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, (3a), FID1685-001A1): .....                         | 98  |
| 3.2.1.2. 4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-dioekso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] – benzonitril, 3b .....                            | 98  |
| 3.2.1.3. (6 - [[(E) - (4-hidroksifenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3c .....                             | 99  |
| 3.2.1.4. 4(6 - [[(E) - (4-metoksifenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3d.....                              | 100 |
| 3.2.1.5. (4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-dioekso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] benzensulfonamid, 3e .....                        | 100 |
| 3.2.1.6. (metil l- [4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-dioekso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] fenil] ciklopropankarboksilat, 3f ..... | 101 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.1.7. (3-metil-6- [metil - [(E) -2-feniletideneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3g.....  | 101 |
| 3.2.1.8. 8 (6 - [[(E) -1 H-indol-3-ilmetileneamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3h .....  | 102 |
| 3.2.1.9. (3-metil-6- [metil - [(E) -1 H-pirol [2,3-b] piridin-3-ylmethyleneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3i.....                           | 103 |
| 3.2.1.10. (3-metil-6- [metil - [(E) -4-piridilmetileneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3j.....  | 103 |
| 3.2.1.11. (3-metil-6- [metil - [(E) - (1-metil-2-okso-4-piridil) metilenamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3k .....                             | 104 |
| 3.2.1.12. (6 - [[(E) - [2- (dimetilamino) fenil] metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3l.....                                | 104 |
| 3.2.1.13. (6 - [[(E) - (4-fluorofenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3m .....   | 105 |
| 3.2.2. Priprava cikličkih spojeva, 4a-4m .....  | 105 |
| 3.2.2.1. (1,6-dimetil-3-fenil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4a.....  | 106 |
| 3.2.2.2. (4- (1,6-dimetil-5,7-diokso-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-3-il) benzonitril, 4b .....   | 106 |
| 3.2.2.3. (3- (4-hidroksifenil) -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4c .....   | 107 |
| 3.2.2.4. (3- (4-metoksifenil) -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4d .....  | 107 |
| 3.2.2.5. 4- (1,6-dimetil-5,7-diokso-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-3-il) benzonsulfonamid, 4e .....   | 108 |
| 3.2.2.6. (metil l- [4- (l, 6-dimetil-5,7-diokso-pirimido [5,4-e] [l, 2,4] triazin-3-il) fenil] ciklopropankarboksilat, 4f.....                      | 109 |
| 3.2.2.7. (3-benzil-1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4g .....  | 109 |
| 3.2.2.8. (1,6-dimetil-3- (4-piridil) pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4j .....  | 110 |
| 3.2.2.9. (5-hydroxy-2,8-dimethyl-4- (1-methyl-2-oxo-4-pyridyl) -2,3,5lambda5,8,10-pentazabicyclo [4.4.0] deca-1 (10), 3,5-triene-7,9-dione, 4k..... | 110 |
| 3.2.2.10. (3- [2- (dimetilamino) fenil] -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4l.....   | 111 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.2.11. (3- (4-fluorofenil) -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4m<br>..... | 112 |
| 3.3. BIOLOŠKE METODE.....   | 112 |
| 3.3.1. Biokemijski pokus – <i>in vitro</i> određivanje inhibicijskog djelovanja.....              | 112 |
| 3.3.2. Određivanje permeabilnosti spojeva na MDCKII-hMDR1 stanicama .....                         | 116 |
| 3.3.3. Metabolička stabilnost u jetrenim mikrosomima .....  | 118 |
| 3.3.4. Utjecaj spojeva na vijabilnost stanica HepG2 i A549 staničnih linija .....                 | 120 |
| 3.3.5. LC-MS/MS analiza uzoraka iz <i>in vitro</i> pokusa.....                                    | 121 |
| 3.4. Računalne metode .....   | 123 |
| 3.4.1. Molekulsko uklapanje .....   | 123 |
| 3.4.2. Hibridne kvantno-mehaničke / molekulske-mehaničke (QM/MM) metode.....                      | 123 |
| 3.4.3. Metode molekularnih polja.....   | 124 |
| 3.4.4. PLS (engl. Partial least squares) analiza .....  | 124 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....   | 126 |
| 4.1. Priprava spojeva .....   | 127 |
| 4.2. Optimiranje računalnih metoda – studija JMJD2A enzima.....                                   | 129 |
| 4.3. Opis aktivnog mjesta JMJD2C proteina.....  | 136 |
| 4.4. Analiza poznatih JMJD2C inhibitora .....   | 138 |
| 4.5. Ispitivanje interakcija JMJD2C enzima s derivatima toksoflavina.....                         | 141 |
| 4.5.1. Studije molekularnog uklapanja.....  | 141 |
| 4.5.2. MM/GBSA i QM/MM studije.....   | 142 |
| 4.6. <i>In vitro</i> biološko profiliranje .....  | 145 |
| 4.6.1. Inhibicijska aktivnost na JMJD2C enzimu.....   | 145 |
| 4.7. ADME svojstva .....  | 151 |
| 4.7.1. <i>In silico</i> profiliranje .....  | 151 |
| 4.7.2. <i>In vitro</i> profiliranje.....  | 156 |
| 4.7.2.1. Test permeabilnosti na MDCKII-MDR1 stanicama.....  | 156 |
| 4.7.2.2. Metabolička stabilnost .....   | 157 |
| 4.7.3. Redoks potencijal derivata toksoflavina .....  | 157 |
| 4.8. Utjecaj na proliferaciju staničnih linija HepG2 i A549.....                                  | 162 |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 5. ZAKLJUČAK.....          | 169 |
| 6. LITERATURNI IZVORI..... | 173 |
| 7. DODACI.....             | 182 |
| 7.1. Popis slika .....     | 183 |
| 7.2. Popis tablica .....   | 185 |
| 7.3. Popis shema .....     | 186 |
| 7.4. Popis jednadžbi ..... | 187 |
| 7.5. Popis kratica .....   | 188 |
| 8. ŽIVOTOPIS.....          | 191 |

## **1. UVOD**

## 1.1. UVOD

Haploidni ljudski genom saždan od aproksimativno 3 milijarde parova baza pakira se u 23 kromosoma. To čini ukupno 6 milijardi parova baza po stanici. Budući da je svaki par baza duga cca. 0,34 nm, svaka diploidna stanica sadrži oko 2 metra molekule DNA. Da bi takva molekula DNA stala u nukleus stanice potrebno je vrlo kompaktno pakiranje. Zbog toga se molekula DNA omata oko proteina te nastaje kompleks molekule DNA i proteina – kromatin. Proteini oko kojih se DNA namata nazivaju se histonima. Histoni su obitelj malih, pozitivno nabijenih proteina koji se dijele u skupine H1, H2A, H2B, H3 i H4. Sama DNA negativno je nabijena zbog fosfatnih grupa u okosnici te dolazi do snažnog vezanja između DNA i histona. Na samim histonima dolazi do kemijskih promjena, post-translacijskih modifikacija, koje utječu na ekspresiju gena. Enzimi koji modificiraju histone igraju vrlo važnu ulogu u regulaciji gena tako što kemijski mijenjaju aminokiseline na N-terminusu histona. Te modifikacije i njihove kombinacije konstituiraju epigenetički kod. Za enzime koji modificiraju histone pokazano je da sudjeluju u epigenetičkoj regulaciji i reprogramiranju eukariotskih stanica.

N-metilacija lizinskih ostataka histona epigenetička je modifikacija koja može biti transkripcijski aktivirajuća ili deaktivirajuća, ovisno o poziciji lizina, njegovom metilacijskom stanju i prisutnosti drugih modifikacija. Najveća obitelj demetilaza, JmjC demetilaze, koriste 2-oksoglutarat (2OG) kao kofaktor. Postoji 5 JmjC podskupina demetilaza koje ciljaju lizine na histonima (H3K = lizinski ostatak na histonu 3) uključujući H3K4, H3K9, H3K27 i H3K36. Faktori koji određuju selektivnosti pojedinih podskupina sve se više pojavljuju u literaturi, a oni uključuju katalitičku, ali i nekatalitičku domenu enzima. Iako su literaturno poznati JmjC inhibitori, za sada je poznato samo nekoliko inhibitora koji pokazuju selektivnost na određenu KDM podskupinu.



Istraživanja su pokazala da su metilacije pojedinih aminokiselinskih ostataka usko povezane s raznim bolestima kao što su karcinom dojke i prostate. Također, u kliničkoj je studiji pokazano da suberoilanolidhidroksamska kiselina (SAHA) kao inhibitor histon deacetilaze može biti terapija za limfom T-stanica te je tako dokazano da utjecanje na epigenetičke procese može biti uspješna strategija za tretiranje karcinoma. Od tada mnoge su male molekule sintetizirane i objavljene kao inhibitori histon demetilaza. Točnije, unazad nekoliko godina objavljene su molekule koje djeluju kao supstrati za mete KDM1A (LSD1), JMJD2C (KDM4C) te JMJD2A i JMJD2E. 2008. godine Schofield i suradnici reportirali su piridin-2,4-dikarboksilnu kiselinu (2,4-PDCA) kao potentni KDM4E inhibitor s aktivnosti od 914 nM. Također, uspjeli su pokazati da je 2,4-PDCA u interakciji s  $Fe^{2+}$  ionom koji se nalazi u aktivnom mjestu i to na način da ga bidentatno koordinira. S obzirom da i SAHA i 2,4-PDCA ispoljavaju svoju inhibicijsku aktivnost zahvaljujući koordinaciji metalnog iona, dizajnirane su i sintetizirane nove molekule imajući na umu njihov potencijal da koordiniraju  $Fe^{2+}$  ion.

Iako se navedeni spojevi odlikuju relativno dobrom inhibicijskom aktivnošću, imaju nekoliko nedostataka. Naime, radi se o malim i nespecifičnim strukturama koje pogađaju različite biološke mete. Osim toga, riječ je o strukturama koje sadrže slobodne karboksilne kiseline za koje je poznato da je imaju nisku staničnu permeabilnost. Uzevši sve navedeno u obzir, poznati inhibitori ne predstavljaju dobru polaznu točku za dodatni razvoj. Daljnjim pregledom literature dolazimo do toksoflavinskog strukturnog motiva. Toksoflavin je literaturno poznat kao inhibitor JMJD2C enzima s aktivnošću od 541 nM. Radi se o specifičnom strukturnom motivu koji je također pogodan i za dodatne strukturne modifikacije. Osim toga, toksoflavin se odlikuje i dobrom staničnom permeabilnošću. Nedostatak predstavlja njegova citotoksičnost kao posljedica reduktivno-oksidacijskog potencijala.

Nove molekule dizajnirane su na način da su na toksoflavinski motiv uvedeni supstituenti različitih electron-donorskih i electron-akceptorskih svojstava ne bi li se umanjio redoks

potencijal, a samim time i nespecifična citotoksičnost. Pri modeliranju samih molekula vodilo se računa o fizikalno-kemijskim i ADME svojstvima koja su za dizajnirane molekule izračunana koristeći Percepta programski paket. Novosintetizirani spojevi s toksoflavinskom funkcionalnošću dizajnirani su na temelju *in silico* eksperimenata koristeći se Schroedinger Maestro 11.1 programskim paketom i kristalnim strukturama kompleksa literaturno dostupnih inhibitora i proteina JMJD2C (PDB: 2XML, 5FJH, 5FJK). Molekulskim uklapanjem (dokiranjem) molekula u aktivno mjesto enzima određene su geometrijske karakteristike kompleksa i glavne međumolekulske interakcije. Energije interakcija između enzima i liganada računale su se spojem kvantno-mehaničkih i molekulsko-mehaničkih metoda (QM/MM) kako bi se došlo do kvantitativnih vrijednosti za korelaciju s rezultatima bioloških testiranja. Samo aktivno mjesto kompleksne je prirode budući da sadrži željezo kao metalni ion koji stvara bidentatnu koordinativnu vezu s inhibitorom. Osim toga tu su lizinski (Lys208), tirozinski (Tyr134) i asparaginski (Asn200) aminokiselinski ostaci pogodni za ostvarivanje vodikove veze. Na samom ulazu u aktivno mjesto enzima nalazi se solni most koji je odgovoran za održavanje konformacije enzima.

Sinteza spojeva provedena je iz komercijalno dostupnih intermedijera. Reakcijom nukleofilne adicije amina na aldehid uvedeni su supstituenti različitih elektron-akceptorskih odnosno elektron-donirajućih svojstava. U posljednjem koraku sinteze u kiselim uvjetima, u prisutnosti natrij nitrita, dolazi do ciklizacije u toksoflavinski biciklični sustav.

Sintetizirani spojevi testirani su u ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) testu gdje su kemoluminescentni odzivi za pojedine molekule preračunati u  $IC_{50}$  vrijednosti. U *in vitro* ADME eksperimentima određen je utjecaj različitih supstituenata na permeabilnost i metaboličku stabilnost, te na staničnu aktivnost spojeva na HepG2 i A549 staničnim linijama. Statistička analiza prikupljenih podataka provedena je kako bi se dobio uvid u glavne čimbenike koji utječu na staničnu aktivnost ispitivanih spojeva.

## 1.2. CILJ I SVRHA RADA

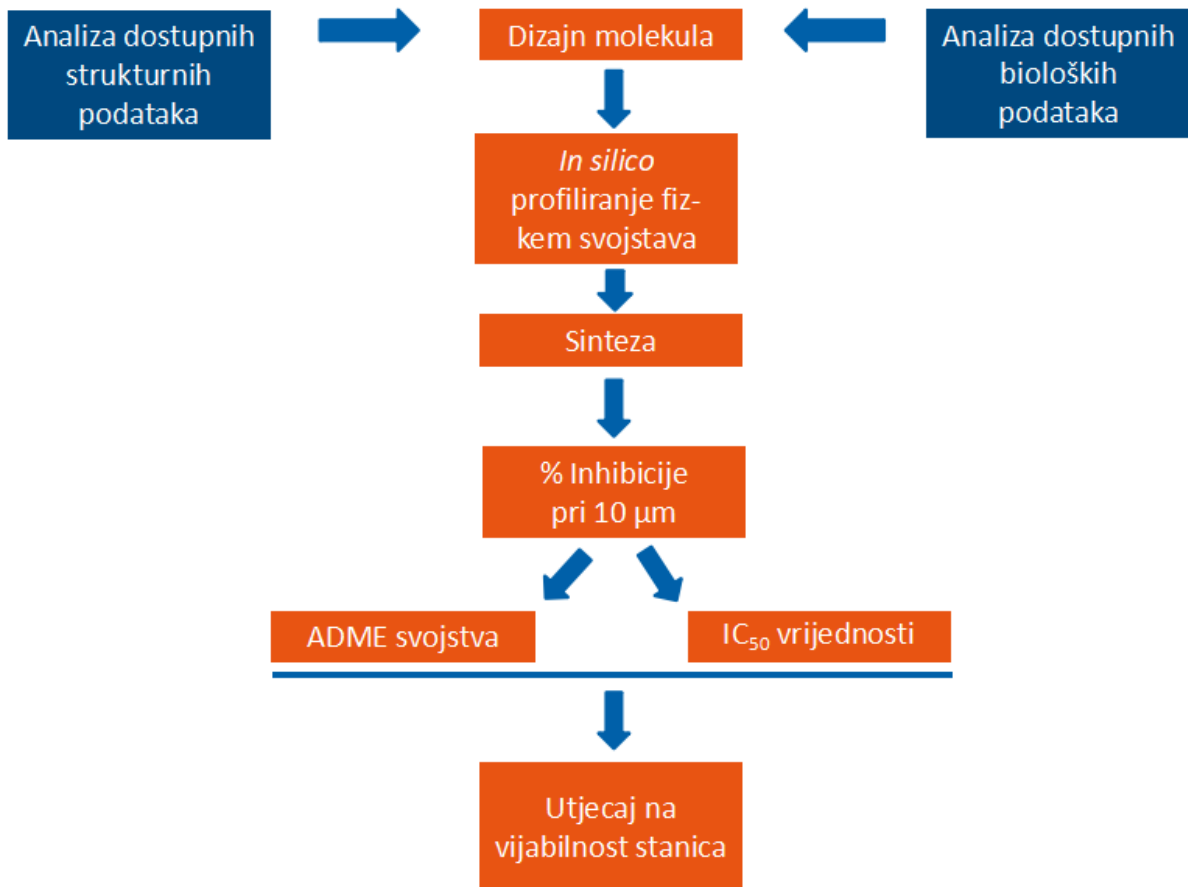
Cilj rada je sintetizirati nove spojeve koji po svojoj učinkovitosti neće zaostajati za poznatim JMJD2C inhibitorima, ali će biti poboljšanih ADME svojstava, te će imati smanjenu nespecifičnu citotoksičnost.

Pretraživanjem literature odabrat će se strukturni motivi pogodni za daljnu optimizaciju strukture i bioloških svojstava.

Racionalnim pristupom temeljenom na strukturnim osnovama, koristeći literaturno dostupne kristalne strukture enzima JMJD2 klase, dizajnirat će se fokusirana biblioteka novih kemijskih spojeva, a prioriteti u sintezi će se odrediti daljnjim *in silico* ADME profiliranjem. Za predviđanje interakcija između liganada i enzima koristit će se moderne metode računalne kemije poput molekuskog uklapanja (engl. docking) koristeći Maestro Schroedinger programski paket. Također će se koristiti hibridne kvantno-mehaničke i molekulske metode za kvantifikaciju interakcija i njihovo koreliranje s rezultatima bioloških ispitivanja.

Dizajnirani spojevi bit će pripremljeni modernim metodama sintetske organske kemije i okarakterizirani ADME svojstvima u vidu stanične permeabilnosti i metaboličke stabilnosti. U biokemijskom pokusu bit će određena inhibicijska aktivnost na JMJD2C enzimu te iskazana kroz  $IC_{50}$  vrijednosti. Također će se odrediti i utjecaj nosintetiziranih spojeva na viabilnost HepG2 i A549 staničnih linija. Prikaz plana rada pokazan je na slici 1.1.

Prikupljeni podaci bit će obrađeni multivarijantnim statističkim metodama u svrhu razvoja mehanističkih modela koji će doprinijeti razumijevanju osnovnih faktora koji utječu na staničnu aktivnost i predviđanje aktivnosti i ADME svojstava budućih ciljnih molekula.



Slika 1.1. Shematski prikaz plana rada pri izradi dizertacije

### 1.3. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

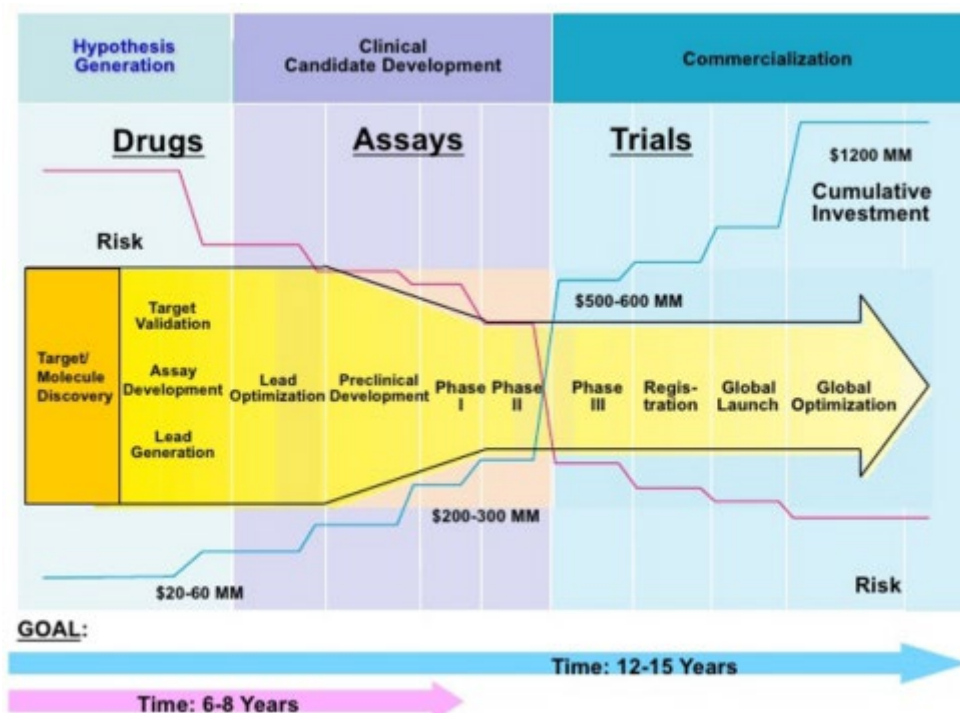
- *In silico* dizajnirane molekule temeljene na toksoflavinskom strukturnom motivu mogu biti inhibitori JMJD2C enzima s poboljšanim svojstvima u odnosu na literaturno poznate inhibitore
- Metodama molekuskog uklapanja (engl. docking) pokazat će se ključne interakcije inhibitora s JMJD2C enzimom, uključujući koordinativnu vezu s metalnim ionom u aktivnom mjestu
- Energije interakcija između enzima i liganada računat će se hibridnim kvantno-mehaničkim i molekulsko-mehaničkim metoda (QM/MM) kako bi se došlo do kvantitativnih vrijednosti za korelaciju s rezultatima bioloških testiranja
- Na toksoflavinski strukturni motiv bit će uvedeni supstituenti različitih elektron-donorskih i elektron-akceptorskih svojstava ne bi li se umanjio redoks potencijal, a samim time i utjecaj na vijabilnost stanica
- Među novosintetiziranim molekulama očekuje se odabir molekule koja će imati poboljšanu biološku aktivnost i *in vitro* ADME svojstva te poslužiti kao potencijalna molekula pogodak (engl. hit molecule) za daljnju optimizaciju prema učinkovitom protutumorskom lijeku

## **2. LITERATURNI PREGLED**

## 2.1. Proces razvoja lijekova

Otkrivanje i razvoj novih lijekova proces je s dugom povijesti koja datira još od ranih dana ljudske civilizacije. Kroz povijest, ljudi su istražujući prirodu tragali za lijekovima kako bi se borili protiv bolesti ili tegoba. Na ovaj su način otkrivani novi lijekovi iz prirode, a kasnije, razvojem čovječanstva dolazi do uporabe znanstvenih metoda u tu svrhu.

Otkrivanje lijekova danas je složen i interdisciplinarni proces kojim se identificiraju potencijalni novi terapijski entiteti, koristeći kombinaciju računalnih, kemijskih, biokemijskih, bioloških i kliničkih znanstvenih metoda. Unatoč napretku u svim navedenim znanstvenim granama, otkriće lijekova i dalje je dugotrajan, skup i težak proces s visokim rizikom za neuspjeh. Istraživanje i razvoj novog lijeka u prosjeku traje oko 12–15 godina (Slika 2.1) i košta preko milijardu američkih dolara[1, 2].



**Slika 2.1.** Shematski prikaz razvoja novog lijeka po fazama. Prikazan je vremenski tijek trajanja razvoja (12-15 godina) kao i količina investiranog novca (~ 1,2 milijarda USD)[3].

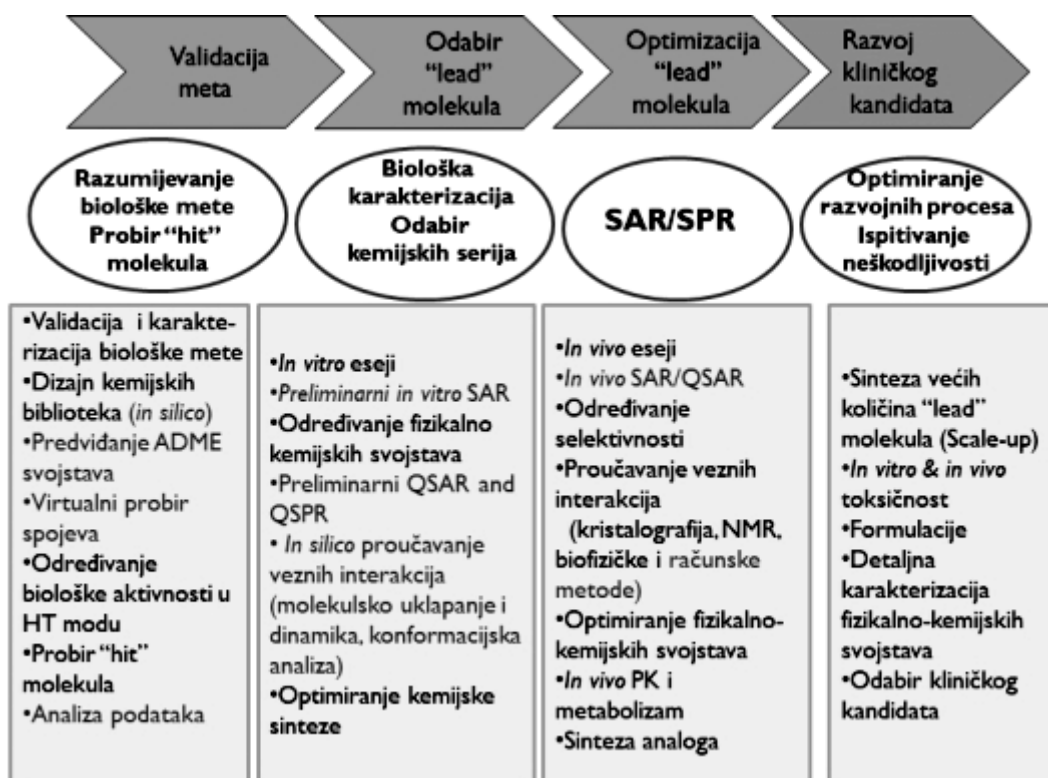
Razvoj lijekova kao osnovni cilj ima donijeti pacijentima novi lijek za bolest ili kliničko stanje za koje ne postoji adekvatni tretman na tržištu. Upravo ta neispunjena medicinska potreba osnovna je pokretačka motivacija istraživanja.

Početni stadij istraživanja, koji se često događa u akademskoj zajednici, generira podatke za razvoj hipoteze da će inhibicija, aktivacija ili modulacija određenog proteina ili biokemijskog puta rezultirati terapijskim djelovanjem u bolesnom stanju. Ishod ove aktivnosti je odabir biološke mete koja zahtijeva daljnju validaciju prije ulaska u glavnu fazu istraživanja.

Tijekom istraživanja potrebno je optimirati brojna svojstva molekule kako bi ona zadovoljila kriterije da postane lijek. Ta svojstva, između ostalih, uključuju odgovarajuća fizikalno kemijska svojstva, biološku aktivnost i selektivnost prema određenoj biološkoj meti, (*in vivo*) efikasnost, neškodljivost (sigurnost) te zadovoljavajuće ADME parametre (engl. apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija; apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje). Tek kada zadovolji sve te uvjete molekula može preći u pretklinički razvoj, i ukoliko on bude uspješan, u klinički razvoj, te postati lijek koji se prodaje.

Proces istraživanja odvija se u nekoliko uzastopnih faza. One su identifikacija i validacija biološke mete, identifikacija i validacija molekule pogotka, zatim faza prijelaza od molekule pogotka do vodeće molekule te na kraju optimizacija vodeće molekule. Svaka od ovih faza detaljnije je opisana u nastavku i sadrži niz aktivnosti kao što je prikazano na Slici 2.2.





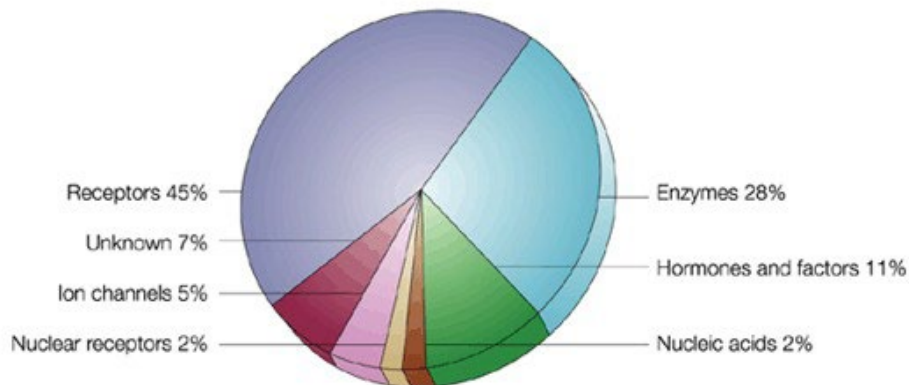
**Slika 2.2.** Faze istraživanja lijeka od validacije biološke mete do razvoja kliničkog kandidata. Za svaku fazu navedene su karakteristične sastavne komponente

### 2.1.1. Identifikacija i validacija biološke mete

Identifikacijom i validacijom biološke mete započinje postupak otkrivanja lijekova. Prirodno prisutne biokemijske strukture u stanici, poput enzima ili GPCR receptora (engl. G-protein-coupled receptors), za koje se pretpostavlja da obavljaju važnu ulogu u patofiziologiji ili progresiji bolesti obično su terapijska meta za lijekove. Biološke mete mogu pripadati različitim grupama biokemijskih struktura. Najčešće mete pri istraživanju novih lijekova prikazane su na Slici 2.3.

Dobra meta treba biti učinkovita i podložna djelovanju molekule lijeka (engl. druggable). Njena modulacija ne smije izazvati škodljive efekte te mora ispuniti kliničke potrebe pacijenata.

Nakon identifikacije biološke mete, treba pristupiti validaciji načina djelovanja potencijalnih aktivnih molekula za ocjenu učinkovitosti. Sam pristup ovisi o terapijskom području, ali sastoji se od nekoliko općenitih načela koja uključuju asocijaciju s određenom bolesti, predkliničke dokaze u stanicama od interesa, predkliničke dokaze u intaktnim sustavima (npr. transgeničnim životinjama) te literaturne podatke kao što je ilustrativno prikazano na slici 2.4.



**Slika 2.3.** Udio najčešćih bioloških meta pri istraživanju lijekova podijeljenih u biokemijske grupe

Postoji mnogo tehnika validacije bioloških meta. One mogu varirati od upotrebe različitih *in vitro* tehnika pa sve do korištenja životinjskih modela. Iako je svaki pristup valjan sam po sebi, pouzdanost seznatno povećava multi-validacijskim pristupom. Neke od najkorištenijih uključuju upotrebu genetički modificiranih životinja (engl. Knock-out) i *in vitro* "anti-sense" tehnike.

Genetski modificirane životinje kod kojih su biološke mete prekomjerno eksprimirane (engl. overexpressed) ili uopće nisu eksprimirane (engl. gene knock-out) izuzetno su korisne u postupcima validacije bioloških meta. Ovi su modeli najbolji alat za ispitivanje složenih interakcija koje uzrokuju patološke promjene. Kada je cilj pojedinačni gen, validacija mete često će uključivati transgenične životinje koje nose divlji tip gena ili njegov mutirani oblik kako bi se pokazalo da ova životinja prekomjerno eksplicira gen divljeg tipa ili da mutirani gen ima

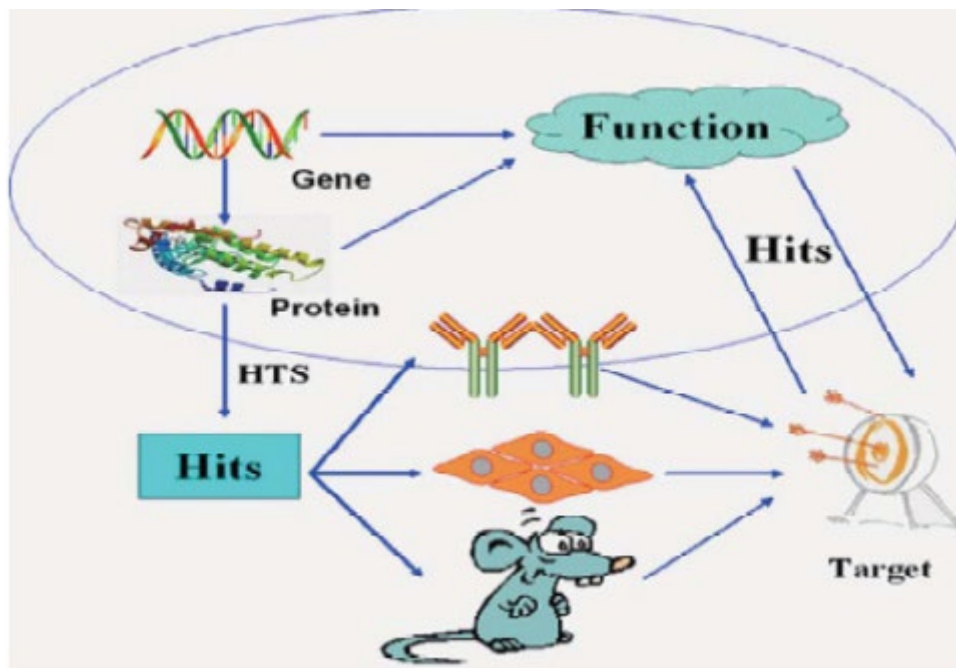
fenotip koji oponaša određeni aspekt bolesti. Primjenom potencijalnog lijeka kod ovakve životinje može se pokazati da modulacija transgenične ekspresije ima terapijski učinak.

Anti-sense tehnologija koristi kemijski modificirane oligonukleotide slične molekuli RNA koji su dizajnirani tako da budu komplementarni regiji ciljane mRNA molekule [4]. Vežanje anti-sense oligonukleotida na ciljanu mRNA molekulu sprječava vežanje translacijskog aparata i na taj način blokira sintezu kodiranog proteina.

Za razliku od "gene knock-out" pristupa, efekti anti-sense oligonukleotida su reverzibilni i potrebna je njihova stalna prisutnost za inhibiciju ciljanog proteina [5]. Međutim, sintetizirani oligonukleotidi pokazali su nisku bioraspoloživost kao i moguće toksične efekte što ograničava njihovu *in vivo* upotrebu.

Bioinformatika se sve više koristi pri validaciji bioloških meta dajući prediktivne informacije o njihovoj funkcionalnosti. Podaci o DNA sekvencama, zatim o proteinskim strukturama i biokemijskim putevima obrađuju se različitim računalnim alatima te se dovode u vezu s određenom funkcijom ili bolesti. Prediktivna snaga ovih pristupa najjača je kada se koriste komplementarno, odnosno kada se kombiniraju rezultati dobiveni obradom različitih grupa podataka.

Osim pri identifikaciji i validaciji bioloških meta, bioinformatička analiza koristi se i pri odabiru i određivanju prioriteta potencijalnih bioloških meta povezanih s određenom bolesti [6]. Dostupni podaci u bazama mogu potjecati iz različitih izvora, a uključuju publikacije, podatke iz патената, podatke o ekspresiji gena, podatke koji proizlaze iz proteomike, transgeničnog fenotipiziranja kao i podatke o profiliranju spojeva. Validacija biološke mete izrazito je složen proces koji uključuje brojne znanstvene discipline i tehnike.



**Slika 2.4.** Validacija biološke mete multidisciplinarnan je proces u kojem se međusobno nadopunjavaju različite tehnike i grane znanosti poput probira molekula visoke propusnosti (engl. HTS; high throughput screening), proteomike, genomike i različitih *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* eksperimenata

### 2.1.2. Identifikacija i validacija molekule pogotka (hit)

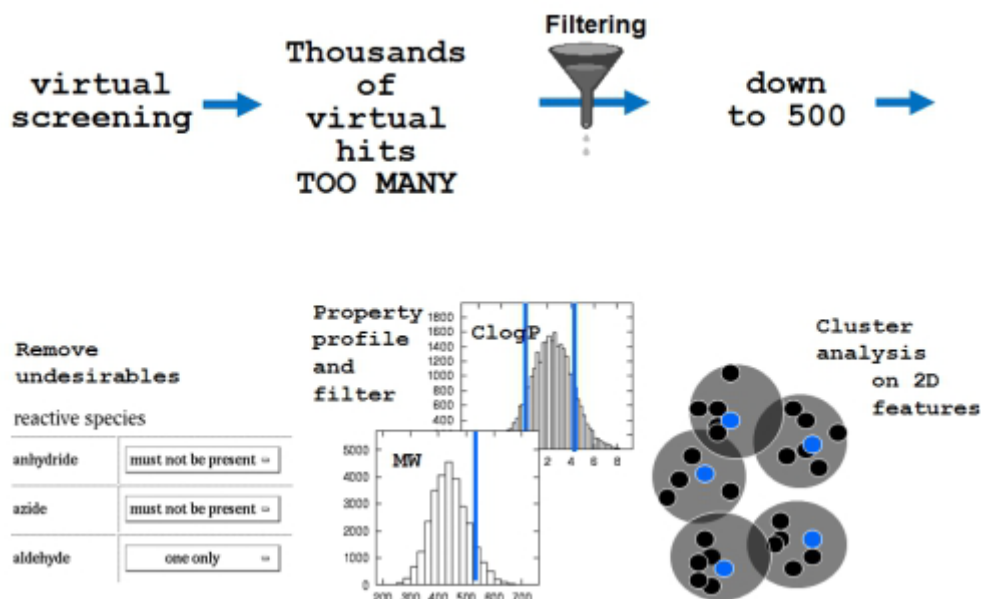
Nakon postupka validacije biološke mete, potrebno je identificirati molekule pogotke. U tu svrhu razvijaju se različiti testovi kojima bi se potvrdila aktivnost molekula pogodaka na određenoj biološkoj meti. Ti testovi mogu imati niz različitih pristupa. Neki od najzastupljenijih su probir visoke propusnosti (engl. HTS; high-throughput screening), virtualni probir, fokusirani probir zasnovan na znanju, odnosno literaturno dostupnim informacijama te probir zasnovan na molekulskim fragmentima (engl. FBDD; fragment based drug discovery).

Molekula pogotka definira se najčešće kao spoj koji ima željenu (najčešće  $\mu\text{M}$ ) aktivnost u odabranom biološkom testu, i čija se aktivnost može potvrditi ponovnim testiranjem.

Cilj ovog koraka je ustanoviti imaju li odabrane molekule željeno djelovanje na identificirane biološke mete. Potrebno je jednako tako napraviti i validaciju pogodaka.

Probir visoke propusnosti (HTS) uključuje provjeru čitave biblioteke spojeva izravno naspram biološke mete, ili u složenijem sustavu ispitivanje na stanicama, no rezultati staničnih testova će tada zahtijevati i dodatne eksperimente kako bi se potvrdilo djelovanje na točno određenu metu[7]. Ovakav način testiranja uključuje uporabu složene laboratorijske automatizacije, ali s druge strane ne zahtijeva prethodno znanje o kemotipu ili strukturi spoja koji bi mogao djelovati na metu.

Fokusirani probir, odnosno probir temeljen na znanju uključuje odabir spojeva iz kemijske biblioteke za koje je vjerovatno da imaju aktivnost na proteinu meti na temelju poznavanja strukture ciljnog proteina kao i podataka iz literature i patenata[8]. Porast dostupnih podataka potaknuo je razvoj računalnih pristupa, poput koncepta farmakofora i molekuskog uklapanja, kako bi se proveo virtualni probir spojeva iz baza podataka [9]. U virtualni probir spojeva često se uključuje i filtriranje prema izračunatim fizikalno-kemijskim i ADME svojstvima, te odabir strukturno reprezentativnih molekula (engl. clustering) kao što je prikazano na slici 2.5.



**Slika 2.5.** Prikaz filtriranja spojeva prema svojstvima pri virtualnom probiru

Probir zasnovan na molekulskim fragmentima (FBDD) također je jedna od metoda koja se koristi za pronalazak molekula pogodaka. Fragmenti su male organske molekule s niskom molarnom masom[10]imaju slabi afinitet vezanja za biološku metu. Analogno pravilima Lipinskoga (opisano u ADME poglavlju), idealni fragmenti trebali bi slijediti "pravilo broja tri" što znači da bi molekulska masa trebala biti manja od 300 g/mol, ClogP bi trebao biti manji od 3, broj donora, odnosno akceptora vodikove veze treba biti manji od 3, i broj rotirajućih veza manji od 3[11]. Budući da fragmenti imaju relativno nizak afinitet za svoje biološke mete, oni moraju imati visoku topljivost u vodi kako bi mogli biti testirani u visokim koncentracijama. Vežanje fragmenata na biološku metu dodatno se potvrđuje biofizikalnim tehnikama poput kristalografije, NMR spektroskopije ili SPR metode.

### 2.1.3. Od molekule pogotka do vodeće molekule

Nakon što su identificirani različiti kemotipovi molekula pogodaka, potrebno je optimirati pogodak sa stanovišta njegove biološke aktivnosti i fizikalno kemijskih svojstava kako bi se unaprijedio ka vodećoj molekuli. Istodobno, bit će potrebno unaprijediti i ADME svojstva molekule poput bioraspoloživosti i metabolizma.

U fazi razvoja od molekule pogotka do vodeće molekule potrebno je uspostaviti odnos strukture i aktivnosti (SAR; engl. structure - activity relationship), tj. definirati strukturne elemente molekule koji pridonose biološkoj aktivnosti. Istraživanje je usmjereno na ispitivanje odnosa strukture i biološke aktivnosti priređenih spojeva, pri čemu se u biokemijskim testovima vrše mjerenja utvrđivanja potentnosti i selektivnosti svakog spoja.

Za određivanje odnosa strukture i aktivnosti koriste se dva osnovna pristupa: dizajna lijekova zasnovan na strukturi (engl. SBDD; structure based drug discovery) i dizajn lijekova temeljen na ligandima (engl. LBDD – ligand based drug design). Dizajn lijekova temeljen na strukturi (SBDD) oslanja se na poznavanje trodimenzionalne strukture biološke mete. Ona se dobiva metodama rentgenske kristalografije ili NMR spektroskopije[12]. Ako eksperimentalno određena struktura mete nije dostupna, možda će biti moguće razviti homologni model na temelju eksperimentalne strukture srodnog proteina. Koristeći trodimenzionalnu strukturu biološke mete mogu se dizajnirati molekule za koje se predviđa vezanje s visokim afinitetom i selektivnosti za metu koristeći različite računalne metode (opisano u poglavlju 2.11.), ali i intuiciju medicinskog kemičara.

Dizajn lijekova temeljen na ligandima (engl. LBDD; ligand based drug design) oslanja se na informacije o drugim molekulama koje se vežu za biološku metu od interesa. Te se molekule mogu upotrijebiti za dobivanje farmakofornog modela koji definira potrebne strukturne karakteristike koje molekula mora imati da bi se povezala na biološku metu[13]. Drugim

riječima, model biološke mete može se graditi na temelju saznanja o tome što se na nju veže. Tako stvoreni model mete može se zauzvrat koristiti za dizajn novih molekula koje stupaju u interakciju s metom.

Nakon što su pronađene optimalne interakcije između molekule pogotka i mete, potrebno je sintetizirati njene analoge koji mogu održavati ključne interakcije, ali ujedno i poboljšati farmakodinamičku aktivnost.

U ovoj se fazi također provodi profiliranje fizikalno-kemijskih i *in vitro* ADME svojstava (opisano u poglavlju 2.10.). Ispitivanja se provode paralelno, pri čemu se najbolji spojevi odabiru za daljnji razvoj.

Ključna svojstva za daljnji razvoj vodeće molekule su topljivost i permeabilnost. Lijekovi se najčešće administriraju intravenoznim ili oralnim putem. Ukoliko molekula nema oba parametra u optimalnom rasponu, neće imati izgleda za daljnji razvoj.

Stabilnost u mikrosomima također je vrlo važno svojstvo koje opisuje kako će metabolizirajući enzimi modificirati, a zatim i eliminirati spoj. U takvim se istraživanjima koriste i hepatociti, koji će dati potpunije informacije o metabolizmu, ali se ne koriste rutinski, jer ih je potrebno redovito svježe pripremati.

Jednako tako, ispituje se i hoće li spoj biti inhibitor ili supstrat za različite izoforme enzima citokrom P450 (CYP450). CYP450 enzimi su neophodni za metabolizam mnogih lijekova. Iako se ova klasa enzima sastoji od više od 50 izoformi, njih šest metabolizira 90 posto lijekova, pri čemu su dva najznačajnija enzima CYP3A4 i CYP2D6[14]. Ovi su enzimi pretežno eksprimirani u jetri, ali se javljaju i u tankom crijevu, plućima, placenti i bubrezima.

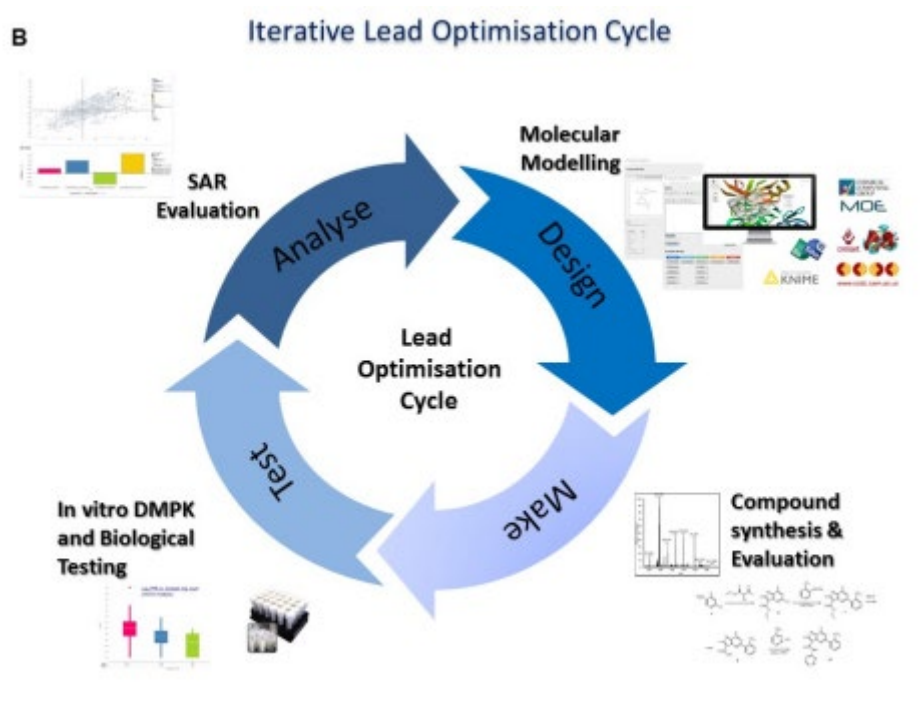


Inhibicija enzima CYP450 ispituje se, između ostalog, jer je važan prediktor hoće li novi spoj utjecati na metabolizam drugih lijekova (engl. drug-drug interaction) koje bi potencijalni pacijent mogao istodobno uzimati.

Vodeći spojevi koji zadovoljavaju ciljanu aktivnost i selektivnost, kao i većinu fizikalno-kemijskih i ADME svojstava, testiraju se zatim u farmakokinetičkim studijama u glodavcima, najčešće miševima i štakorima. Optimalno vrijeme poluživota je veće od 60 minuta kada se spoj daje intravenozno, a udio apsorbirane doze (bioraspoloživost) veća od 20% nakon oralne administracije. Ovo su općeniti okviri i različiti projekti mogu zahtijevati vrlo različite farmakokinetičke profile.

U ovoj fazi se također određuje aktivnost spoja na hERG kanalu (engl. **h**uman **E**ther-à-go-go-**R**elated **G**ene). hERG kanal ionski je kanal za kalij te je od velike važnosti za srčanu funkciju, a njegova inhibiciju može prouzročiti smetnje u radu srca. U idealnom slučaju cilja se na inhibicijsku aktivnost na hERG-u veću od 30  $\mu$ M ili barem 1000 puta manju selektivnost nego za biološku metu.

## 2.1.4. Optimizacija vodeće molekule



**Slika 2.6.** Prikaz cikličkog procesa optimizacije vodeće molekule

U ovoj fazi cilj je zadržati željena svojstva vodećih spojeva uz istovremeno poboljšanje mogućih nedostataka s ciljem stvaranja predkliničkog kandidata za potencijalni lijek. U ovom stadiju istraživanja potrebno je utvrditi kako se i gdje u organizmu supstanca metabolizira te postoje li neželjene nuspojave koje supstanca izaziva.

Za ovu fazu istraživanja preporuča se integrirani iterativni pristup kao što je prikazano na slici 2.6. Kombinacija ekspertize u računalnoj kemiji, medicinskoj kemiji, farmakologiji, farmakokinetici i drugim područjima može pružiti jedinstven uvid u kasnijoj fazi istraživanja.

Smatra se da su spojevi na kraju ove faze ispunili zadane uvjete optimizacije vodeće molekule i spremni su za finalnu karakterizaciju prije nego što budu proglašeni predkliničkim kandidatima. Međutim, istraživanje ne prestaje ovdje. Nastavlja se kako bi se istražile moguće druge kemijske serije (engl. back-up series), u slučaju da spoj u daljnjem pretkliničkom ili kliničkom razvoju ne uspije.

Nadalje, molekule trebaju biti ispitivane na modelima genotoksičnosti poput Amesovog testa i u *in vivo* modelima poput Irwinova testa. Do kraja ove faze također treba provesti i farmakologiju visokih doza, farmakokinetička i farmakodinamička ispitivanja, ispitati linearnost doze te ponavljano doziranje u potrazi za metabolizmom uzrokovanim lijekovima kao i identifikaciju metabolita potencijalnog lijeka. Treba uzeti u obzir i pitanje kemijske stabilnosti i eventualni odabir soli za spoj ukoliko je to potrebno.

Prije progresije vodeće molekule prema pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima, ispituje se također farmakološka sigurnost vodeće molekule. Zanemari li se ova faza, vjerojatno će se u kasnijim fazama razvoja lijeka pojaviti problemi u učinkovitosti, farmakokinetici ili sigurnosti lijeka.

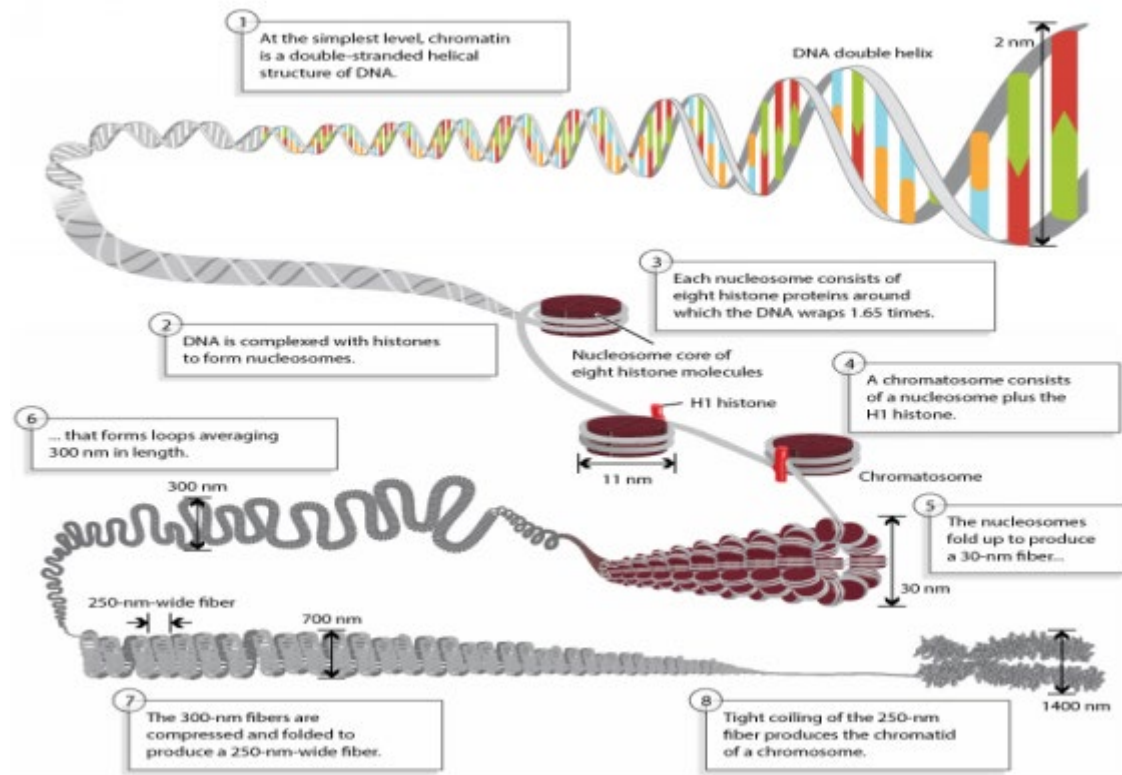
Optimizacija sigurnosti tj. ne-toksičnosti, ključna je faza. Cilj su probrati molekule s najboljim ukupnim sigurnosnim profilom (engl. safety profile) te ukloniti one koje pokazuju toksična svojstva kako bi se omogućili daljnji *in vitro* testovi.

Statistike pokazuju da tek 1 od 10 kliničkih kandidata uspije doći na tržište, a u ovoj su fazi financijske posljedice neuspjeha kudikamo veće.

## 2.2. Epigenetika

### 2.2.1. DNA struktura

Haploidni ljudski genom sadrži približno 3 milijarde parova baza DNA pakiranih u 23 kromosoma. Većina stanica u tijelu (osim ženske jajne stanice i muškog spermija) je diploidna, s 23 para kromosoma. To čini ukupno 6 milijardi parova baza DNA po stanici. Budući da je svaki par baza dugačak oko 0,34 nanometara svaka diploidna stanica sadrži oko 2 metra molekule DNA. Štoviše, ljudsko tijelo sadrži oko 50 trilijuna stanica što ukupno čini 100 trilijuna metara molekula DNA po čovjeku. Kako bi kromosomska molekula DNA stala u mikroskopski prostor eukariotske jezgre dolazi do komprimiranja molekule DNA pomoću određenih proteina. Ti se proteini nazivaju histonima. To su pozitivno nabijeni proteini koji se snažno vežu za negativno nabijenu DNA te tako stvaraju komplekse nazvane nukleosomima. DNA je negativno nabijena zbog fosfatnih skupina u svojoj osnovnoj strukturi tako da je vezanje između histona i DNA vrlo snažno. Histon oktamer sastoji se od dvije kopije svakog od histonskih proteina H2A, H2B, H3 i H4. Svaki nukleosom sastoji se od DNA koja je omotana 1,65 puta oko osam histona. Nukleosomi se nadalje zamataju tvoreći 30 nanometarska kromatinska vlakana koja zatim prave petlje prosječne duljine od 300 nanometara. Vlakna od 300 nm su komprimirana i namotana kako bi se proizvela vlakna širine 250 nm. Ona su pak opet čvrsto zavijena u kromatid kromosoma. Pakiranje kromosoma grafički je prikazano na slici 2.7.



Slika 2.7. Prikaz strukture kromatina [15].

## 2.2.2. Epigenetika

Epigenetika je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem nasljednih promjena u ekspresiji gena koje ne uključuju promjene u sekvenci DNA. Epigenetičke promjene najčešće označavaju promjene koje utječu na aktivnost i ekspresiju gena, ali se mogu koristiti i za opisivanje nasljednih fenotipskih promjena. Takvi učinci na stanične i fiziološke fenotipske osobine mogu proizaći iz vanjskih čimbenika ili biti dio uobičajenog razvoja. Standardna definicija epigenetike zahtijeva da ove promjene budu nasljedne, bilo u stanicama ili organizmima nove generacije[16].

Termin se također odnosi na same promjene. To su funkcionalno relevantne promjene u genomu koje ne uključuju promjenu sekvence nukleotida. Primjeri mehanizama koji proizvode takve promjene su metilacija molekule DNA i modifikacije histona.

Ekspresija gena može se kontrolirati djelovanjem proteina represora koji se vežu na (eng. silencer) područja DNA odgovorna za „utišavanje“. Ove epigenetičke promjene mogu potrajati nekoliko ciklusa replikacije stanica, a mogu trajati i nekoliko generacija, iako one ne uključuju promjene u osnovnom DNA slijedu organizma. Umjesto toga, ne-genetički čimbenici uzrokuju da se geni organizma ponašaju odnosno eksprimiraju drugačije.

Epigenetičke promjene redovite su prirodne pojave koje mogu biti pod utjecajem nekoliko čimbenika uključujući dob, okoliš, način života i zdravstveno stanje. Epigenetičke modifikacije određuju diferencijaciju stanica u stanice kože, stanice jetre, moždane stanice itd. Pod utjecajem stresa, ubrzanog načina življenja, zagađenja okoliša te nepravilne prehrane, epigenetičke promjene mogu imati i puno štetnije učinke koji mogu dovesti do bolesti poput karcinoma.

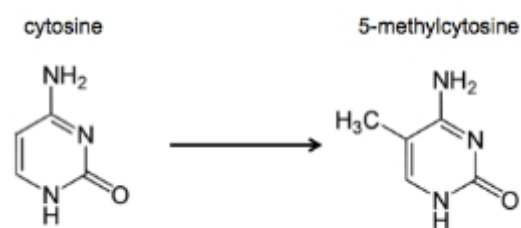
Pojam epigenetika nastao je početkom 1940-ih, kada ga je britanski embrijolog Conrad Waddington koristio za opisivanje interakcije između gena i genskih produkata koji upravljaju razvojem stanica ali i fenotipa organizma. Od tada, epigenetske studije značajno su utjecale na područja genetike i razvojne biologije. Naime, istraživači su otkrili niz mogućih kemijskih modifikacija deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i proteina nazvanih histonima koji su čvrsto vezani s DNA u jezgri stanice. Te modifikacije mogu odrediti hoće li se i kada gen eksprimirati u stanici ili organizmu.

### 2.2.3. Epigenetičke modifikacije

Postoje dvije vrste epigenetičkih modifikacija: metilacija DNA i modifikacije na histonima.

#### 2.2.3.1. Metilacija DNA

Metilacija molekule DNA reakcija je kojom se dodaje metilna skupina na DNA, a kataliziraju je enzimi poznati kao DNA metiltransferaze. Pojavljuje se na položaju 5 (C5) citozinskih nukleotida kada se on nalazi pored gvaninskog nukleotida u DNA sekvenci. Citozin i gvanidin povezani su s fosfatnom skupinom da bi se formirao CpG dinukleotid. Tada se pod djelovanjem metiltransferaze citozin prevodi u 5-metil-citozin (Shema 2.1.).



**Shema 2.1.** Strukturni prikaz metilacije citozina

Ova modifikacija djeluje kao signal za vezanje proteina koji čitaju modifikaciju i onda sami ili povezani s drugim proteinima mogu modificirati histone.

Ova modifikacija odvija se prvenstveno u regijama koje sadrže CpG dinukleotid, često u regulacijskim sekvencama koje suprimiraju ekspresiju gena. CpG metilacija je važna za transkripcijsku represiju transpozona i ponavljajućih elemenata, za utiskivanje (engl. imprinting) i inaktivaciju X-kromosoma te za tkivno ograničenu ekspresiju gena tijekom razvoja i diferencijacije[17]. Također se mogu pojaviti metilacije citozina koje nisu unutar CpG

sekvenci. Takve metilacije važne su za regulaciju ekspresije gena u embrionalnim matičnim stanicama[18]. Prisutnost metiliranog citozina može potisnuti transkripciju inhibicijom vezanja faktora transkripcije ili može potaknuti vezanje drugih transkripcijskih represora, uključujući proteine koji modificiraju histone. Metilacije citozina na CpG dinukleotidima provodi obitelji enzima, DNA metiltransferaze (DNMTs), koji uključuju *de novo* metiltransferaze DNMT3a i DNMT3b, te DNMT1 koje prepoznaju i metiliraju nemetilirani lanac-kćer tijekom DNA replikacije[19]. Pravila za spajanje parova baza dopuštaju održavanje recipročne metilacije tijekom sljedećih ciklusa DNA replikacije što zauzvrat daje mehanizam za prenošenje negenetskih obilježja od stanice do stanice. Na taj se način metilacija DNA smatra dugoročnim, stabilnim epigenetskim obilježjem.

Iako je poznato da je demetilacija bitan proces koji se javlja tijekom određenih faza razvoja, mehanizam demetilacije DNA manje je razumljiv od metilacije. Demetilacija može imati mnoge važne uloge kao na primjer kod razvoja mozga ili kod transkripcijskih odgovora na hormone, a ciljani ili općeniti gubitak metilacije povezan je s karcinomom, kardiovaskularnim i drugim bolestima. Opće smanjenje DNA metilacija može biti uzrokovano supresijom DNMT1 metil transferaze. Nedavni dokazi upućuju na to da se demetiliranje može dogoditi djelovanjem drugih enzimskih mehanizama koji se oslanjaju na popravljavanje izrezivanja (engl. excision-repair) što dovodi do zamjene metil-citozina s citozinom nakon deaminacije. Ovi mehanizmi mogu promicati opće ili ciljane promjene u metilaciji. Jedan od mogućih puteva za demetiliranje uključuje oksidaciju metiliranih citozina u hidrosimetil-citozin pomoću deset-jedanaest translokacijskih (Tet) enzima. Sve više dokaza upućuje na činjenicu da je stvaranje hidrosimetil-citozina posredni stupanj demetilacije DNA. To je moguće zbog njegove povećane sklonosti prema deaminaciji[19]. U ovom trenutku još nije jasno može li 5 hidrosimetil citozin imati i druge bitne funkcije kao epigenetski marker koji je sposoban regulirati ekspresiju gena i strukturu kromatina.



### **2.2.3.2. Modifikacije na histonima**

Histoni prolaze kroz različite posttranslacijske modifikacije, uključujući aciliranje, metilaciju, fosforilaciju i ubikvitinaciju, što dovodi do promjene strukture kromatina, a posljedično i do promjena u ekspresiji gena. Hipoteza "histonskog koda" sugerira da različiti tipovi modifikacija i njihove kombinacije različito mijenjaju strukturu kromatina i transkripcijski potencijal[20].

#### **2.2.3.2.1. Acetiliranje histona**

Acetiliranje je jedna od najčešće proučavanih histonskih modifikacija. Ujedno je jedna od prvih modifikacija koja je opisana i dovedena u vezu s transkripcijskom regulacijom. Acetiliranje na lizinskim ostacima dovodi do relaksacije strukture kromatina čime omogućuje vezanje transkripcijskih faktora te značajno povećava ekspresiju gena. Enzimi odgovorni za regulaciju acetiliranja histonskih repova su histon acetiltransferaze (HAT) i deacetilaze (HDAC). Iako se svi histoni mogu acetilirati, lizinski ostaci na histonima H3 i H4 su preferirana meta za HAT komplekse. Acetiliranje histona uglavnom je usmjereno na promotorske regije.

Acetiliranje  $\epsilon$ -amino skupine lizinskih ostataka u aminoterminalnim repovima histona H3 i H4 najbolje je karakterizirana modifikacija histona za koju je pokazano da promovira transkripciju. Acetiliranje histona katalizirano je histon-acetil-transferazama, koje dolaze na položaje za acetiliranje pomoću potrebnih kofaktora transkripcije[21]. Deacetiliranje histona povezano je s CpG metiliranjem i neaktivnom strukturom kromatina. Četiri klase histon deacetilaza kataliziraju deacetiliranje, a oni sami regulirani su posttranslacijskim modifikacijama[22, 23].

#### **2.2.3.2.2. Metilacija histona**

Za razliku od acetilacije, metilacija histona ne mijenja naboj modificiranih ostataka pa je stoga manje vjerojatno da će izravno promijeniti interakcije potrebne za sklapanje kromatina. Stoga metilacija histona može ili potisnuti ili aktivirati transkripciju ovisno o lokaciji. Metilacija arginina na histonima H3 i H4 potiče transkripcijsku aktivaciju, dok je metilacija lizina na

histonima H3 i H4 vezana uz aktivaciju i represiju transkripcije ovisno o mjestu metilacije. Dodatno, lizinski ostaci mogu biti mono-, di- ili tri-metilirani pružajući tako svakom mjestu metilacije daljnju funkcionalnu raznolikost. Na primjer, tri-metilacija na lizinu 4 histona H3 (H3K4me3) općenito je povezana s transkripcijskom aktivacijom, dok je tri-metilacija na K9 i K27 histona H3 (H3K9me3; H3K27me3) povezana s transkripcijskom represijom. Dugi niz godina smatralo se da je metilacija histona ireverzibilna jer je to stabilna modifikacija koja se prenosi kroz višestruke podjele stanica. Međutim, nedavno je pokazano da, slično histon acetiliranju, metiliranje je aktivno reguliran i reverzibilan proces. Postoje dvije vrste histon metiltransferaza: lizin-specifične histon-metiltransferaze, koje mogu sadržavati SET domenu i arginin-specifične histon-metiltransferaze koje pripadaju PRMT (protein arginin metiltransferaza) obitelji. Histon demetilaze također se mogu klasificirati na osnovi ostataka koji oni modificiraju: KDM1 / LSD1 (lizin-specifična demetilaza 1) uključena je u demetiliranje mono- i di-metiliranih lizina, dok JmJc histon demetilaza koja sadrži Jumonji domenu može demetilirati mono-, di- ili tri-metilirane lizine.

Metilacija lizina na repovima histona predstavlja drugu važnu klasu modifikacija histona koja mijenja ekspresiju gena, premda su determinante ekspresije (represije ili promocije) vrlo složene. Oni ovise o samom položaju lizina i stupnju njegove metilacije te nisu još potpuno razjašnjeni. Slično kao i kod acetiliranja histona, metilacija histona je također reverzibilna. Poznate su mnoge histon-lizin-metiltransferaze i demetilaze koje ciljaju specifične lizine u specifičnim mono-, di- ili trimetiliranim stanjima[24-26].

#### 2.2.3.2.3. Fosforilacija histona

Nedavno je pokazano da su svi histoni nukleosomske jezgre fosforilirani i da je ova modifikacija ključna kao posredni korak pri regulaciji transkripcije, popravku oštećenja DNA,

ali i kondenzaciji kromosoma tijekom diobe stanica. Suprotno acilaciji i metilaciji, čini se da fosforilacija histona djeluje tako što uspostavlja interakcije između drugih modifikacija histona i služi kao platforma za efektorske proteine, što pokreće nizvodnu kaskadu događaja. Poznati markeri za mitozu su fosforilacija serina 10 na histonu H3 koja je uključena u slaganje kromatina i fosforilacija treonina 120 na histonu H2A koja je povezana s regulacijom kromatinske strukture tijekom mitoze. S druge strane, fosforilacija H2AX na serinu 139 identificirana je kao jedan od najranijih događaja koji se javlja nakon razdvajanja dvostrukog lanca DNA i služi kao signal za proteine koji popravljaju oštećenja na DNA.

#### 2.2.3.2.4. Ubikvitinacija histona

Histoni H2A i H2B dva su histona najčešće ubikvitinirana u jezgri, iako su opisani i ubikvitinirani histoni H3 i H4. Najzastupljeniji oblici ubikvitiniranih histona su monoubikvitiniran histon H2A na lizinu 119 i monoubikvitiniran H2B na lizinu 123 kod kvasaca, odnosno lizinu 120 kod kralježnjaka. Također su opisani poliubikvitilirani histoni kao na primjer histon H2A na lizinu 63. Za razliku od H2A, monoubikvitinirani H2B uglavnom je povezan s transkripcijom aktivacijom. Poput ostalih modifikacija histona, monoubikvitinacija H2A i H2B je reverzibilan proces koji je reguliran histonskim ubikvitinskim ligazama i deubikvitinizacijskim enzimima. Ubikvitinacija histona također igra glavnu ulogu u odgovoru na oštećenja DNA.

#### 2.2.3.2.5. Sumoilacija histona

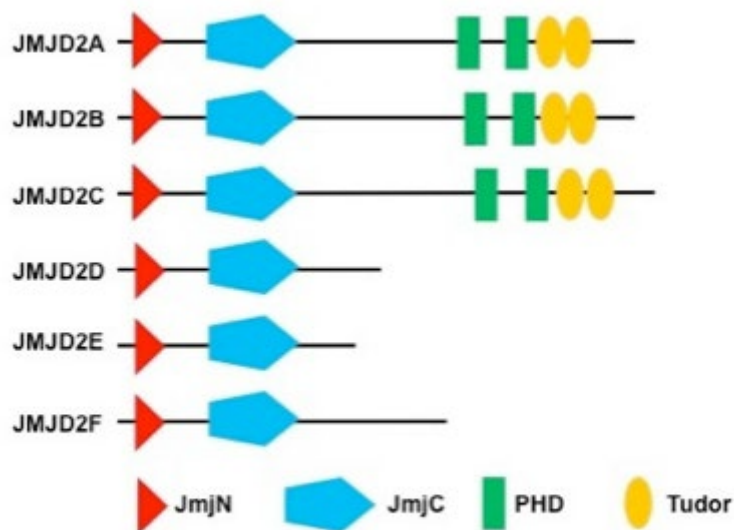
Sumoilacija je modifikacija koja je srodna ubikvitinaciji[27], a uključuje kovalentno vezivanje malih molekula sličnih ubikvitinu na lizine histona djelovanjem enzima E1, E2 i E3. Sumoilacija je pronađena na sva četiri histona jezgre i čini se da djeluje na način da antagonizira acetilacije i ubikvitinaciju koja bi se inače mogla dogoditi na istom lizinskom bočnom lancu

[28, 29]. Slijedom toga, uglavnom je povezana s represivnim funkcijama, ali potrebno je još istražiti i razjasniti molekularne mehanizme kojima sumoilacija djeluje na kromatin.

### 2.3. Histon demetilaze – JMJD2 obitelj enzima

Promjene u strukturi kromatina usko su povezane s tumorima, budući da uvelike utječu na ekspresiju gena, što upućuje na to da neuobičajene epigenetske regulacije mogu biti uzrok karcinoma. Modulacija kromatina može se regulirati pomoću nekoliko mehanizama, a posttranslacijske modifikacije histona jedan su od njih. Te modifikacije (acetilacija, metilacija, fosforilacija, ADP-ribozilacija, ubikvitinacija, sumoilacija) pojavljuju se na histonskim repovima kako bi promicale ili suzbijale transkripciju gena, ovisno o njihovim učincima na strukturu kromatina[30, 31]. Za razliku od ostalih modifikacija, za metilaciju histona dugo se mislilo da je trajna i ireverzibilna. Sve do identifikacije histonskih demetilaza, koje ovu modifikaciju čine reverzibilnom i dinamičnom[32-34]. Različito od ostalih posttranslacijskih modifikacija, metilacija ima više stupnjeva i stanja složenosti, a svaki stupanj može imati različit učinak na ukupnu biologiju kromatina[35, 36]. Iako je labilnija nego što je prethodno pretpostavljeno, obrazac metilacije histona mora biti pravilno uspostavljen radi ispravnog razvoja embrija i prevencije bolesti poput karcinoma. To podupire ideju da modifikatori histona kao što su metilaze i demetilaze igraju ključnu ulogu u održavanju normalnih bioloških procesa i moraju biti strogo regulirani[37]. Do danas su identificirane dvije evolucijski očuvane klase histon demetilaza, LSD (engl. lysine-specific histone demethylase) i JMJC (engl. Jumonji-C histone demethylase). U usporedbi s LSD, koja je bila prva otkrivena klasa histon demetilaza, JMJC klasa je mnogo veća i koristi drugi mehanizam demetilacije od LSD1 [38]. Ime JMJC potječe od činjenice da svi ti enzimi sadrže Jumonji C katalitičku domenu (JmJC). JMJC klasa demetilaza može se dalje podijeliti u sedam evolucijski očuvanih skupina na temelju

homologija njihovih JmjC domena[39]. Među tim skupinama, ističe se JMJD2 obitelj koja je privukla mnogo pozornosti zbog svog specifičnog djelovanja i istaknute uloge kod karcinoma. Obitelj JMJD2 sadrži šest članova demetilaze, JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C, JMJD2D, JMJD2E i JMJD2F[40]. Iako su JMJD2A, JMJD2B i JMJD2C strukturno slični i dijele istu specifičnost, JMJD2B pokazuje mnogo nižu katalitičku aktivnost od ostalih članova demetilaza, a "knock out" miševi nisu pokazali nikakve razlike u fenotipu. Zanimljivo, čini se da JMJD2A-C enzimi dijele slične fiziološke funkcije kod karcinoma, što sugerira da bi proteini JMJD2 obitelji mogli imati preklapajuće uloge te da se mogu međusobno zamijeniti u svojim funkcijama[41]. Za razliku od JMJD2A-C, enzimu JMJD2D nedostaju i PHD i Tudor domena (Slika 2.8.). Također ima različitu specifičnost za supstrate. Iako se čini da JMJD2D ima neke funkcije kod karcinoma, Jmjd2d "knockout" miševi isto tako nemaju očite razlike u fenotipovima[42]. Preostala dva člana JMJD2 obitelji, JMJD2E i JMJD2F nemaju ni promotore ni introne te se smatraju pseudogenima. Do sada, ostaje nejasno jesu li oni funkcionalni geni [43].



**Slika 2.8.** Demetilaze JMJD2 obitelji sadrže samo jednu JmjN domenu, koja stabilizira katalitičku domenu JmjC. JmjC je najviše evolucijski očuvana domena među ostalim. PHD i

Tudor domene prisutne su samo u demetilazama JMJD2A-C. Pretpostavlja se da su one važne za prepoznavanje veznog mjesta i za vezanje supstrata.

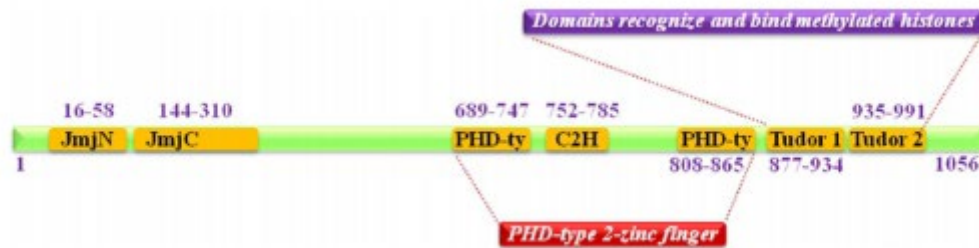
## 2.4. Biološka funkcija histon demetilaza

Metilacija lizina učestala je modifikacija koja se uglavnom javlja na histonima H3 i H4. Za razliku od drugih histonskih modifikacija, metilacija je jedinstvena jer može dovesti do različitih odgovora ovisno o tome koji je aminokiselinski ostatak metiliran (mjesto) i u kojoj mjeri (mono-, di- ili trimetilacija u slučaju lizina)[44, 45]. Na primjer, metilacija H3K4 često je povezana s transkripcijskom aktivacijom, a metilacija H3K36 povezana je s izduženim oblikom RNA polimeraze II. Nasuprot tome, metilacija H3K9 i H3K27 dovodi se u vezu s tihim genima i heterokromatinom[46]. Slično kao i mjesto i stupanj metilacije može biti signal za različite ishode. Na primjer, tri i dimetilacija H3K9 ograničava represirane gene i heterokromatin dok se monometilacija istog mjesta veže uz aktivnu transkripciju gena [47]. Ti različiti učinci često su uzrokovani različitim molekulama "čitatelja" koje prepoznaju modifikacije. One su visoko osjetljive na položaj i stupanj metilacije. Na primjer, jedan od čitatelja H3K4me3 je inhibitor proteina rasta ING3-5. Ovi proteini čine dio kompleksa histon acetil transferaze i pojačavaju aktivaciju transkripcije preko acetilacije histona.

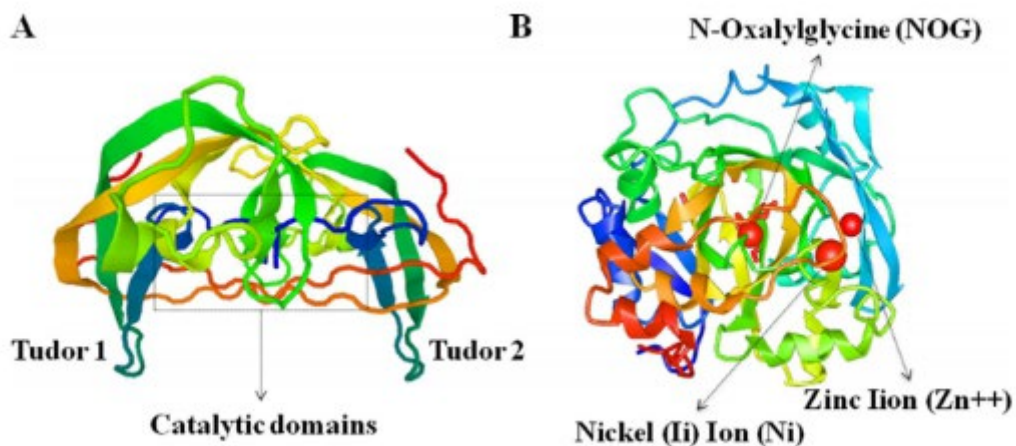
## 2.5. JMJD2C – struktura i funkcija

JMJD2C (Jumonji domena 2C), također poznat i kao KDM4C (Histon lizin demetilaza 4C) mapiran je na ljudskom kromosomu 9p24.1 i kodiran kao protein s 1054 aminokiselina. Sadrži jednu JmjN domenu (N-terminalna Jumonji N domena), jednu JmjC domenu, dvije PHD

domene (engl. plant homeodomain) i dvije Tudor domene (Slika 2.9.)[48, 49]. Kristalna struktura katalitičke i tudor domene ljudskog JMJD2C enzima određena je difrakcijom X-zraka (Slika 2.10.)[50-52].



**Slika 2.9.** Shematski prikaz domena JMJD2C enzima. JMJD2C sadrži jednu JmjN (N-terminalnu Jumonji N), jednu JmjC domenu, dvije PHD i dvije Tudor domene koje prepoznaju i vežu se na metilirane histone [53]



**Slika 2.10.** Kristalna struktura humanog JMJD2C enzima dobivena difrakcijom rendgenskih zraka. **A)** Prikaz katalitičke domene i dviju Tudor domena koje prepoznaju i vežu se na metilirane histone; **B)** Prikaz položaja kofaktora  $\alpha$ -ketoglutarata te iona cinka i nikla[53].

Pokazano je da je JMJD2C demetilaza za H3K9 te da djeluje na način da katalizira demetilaciju H3K9me3 /me2 (poznati represivni markeri regulacije gena), histonski marker koji se nalazi u heterokromatinu, a povezan s eukromatinskim transkripcijskim utišavanjem i formiranjem heterokromatina[54]. JMJD2C također katalizira demetiliranje H3K36me3 (drugi metilirani histonski supstrat JMJD2C) [50]. Osim toga, opisano je da JMJD2C demetilira H3K9me3 s dvije uzastopne reakcije: uklanjanje metilnih skupina s metiliranih lizina histona H3, a zatim odvajanje s lizinskog dušika[43]. Pokazalo se da JMJD2C ima različite funkcije kako u normalnoj biologiji tako i u razvoju tumora. Početkom 2007. godine se utvrdilo da je JMJD2C uključen u razvoj embrija i u regulaciju matičnih stanica[55-58], i djeluje kao pozitivni regulator za Nanog (ključni transkripcijski čimbenik za samoobnavljanje u embrionalnim matičnim stanicama) preokretanjem H3K9Me3 oznaka na Nanog promotorskoj regiji i time sprečava vezanje transkripcijskog represora HP1 (heterokromatin protein 1) i KAP1 (Krüppel-associated box (KRAB) domain-associated protein 1).

## 2.6. Epigenetika i bolesti

Dok su epigenetske promjene potrebne za normalan razvoj i zdravlje, one također mogu biti odgovorne za neke bolesti. Poremećaj bilo kojeg od sustava koji pridonose epigenetskim promjenama može uzrokovati abnormalnu aktivaciju ili utišavanje gena. Takvi poremećaji povezani su s karcinomom, sindromima koji uključuju kromosomske nestabilnosti i mentalnu retardaciju.

Prva ljudska bolest koja je povezana s epigenetikom bila je karcinom. 1983. godine istraživači su otkrili da je oboljelo tkivo bolesnika s karcinomom debelog crijeva imalo manje DNA



metilacije od normalnog tkiva istih pacijenata [59]. Budući da se metilirani geni obično isključuju, gubitak DNA metilacije može uzrokovati abnormalno visoku aktivaciju gena mijenjanjem stukture kromatina. S druge strane, previše metiliranja može poništiti rad zaštitnih gena koji supresiraju tumore. Kao što je ranije spomenuto, DNA metilacija događa se na CpG mjestima, a većina CpG citozina kod sisavaca je metilirana. Međutim, postoje područja DNA u blizini promotorskih regija koja imaju veće koncentracije CpG mjesta (poznatih kao CpG otoci) koji nisu metilirani u normalnim stanicama. Ovi CpG otoci postaju prekomjerno metilirani u stanicama karcinoma što uzrokuje utišavanje gena koji ne bi trebali biti utišani. Ova abnormalnost je tipična epigenetska promjena koja se javlja u tumorima, a događa se u ranoj fazi razvoja karcinoma.

## **2.7. Povezanost JMJD2C enzima s karcinomom**

Deregulacija JMJD2C enzima otkrivena je kod različitih vrsta karcinoma, uključujući skvamozni karcinom jednjaka[60], akutnu mijeloidnu leukemiju (AML)[61], primarni medijastinalni limfom B stanica, Hodgkinov limfom[62], meduloblastom[63]. Naročito je to naglašeno kod karcinoma prostate [64] i karcinoma dojke[65]. Kod ovih karcinoma JMJD2C enzim može modulirati transkripcijske faktore poput androgenskih i estrogenskih receptora [66], superfamiliju nuklearnih receptora kao glukokortikoidne receptore (GR) i progesteronski receptor [67], zatim faktore koji uzrokuju hipoksiju kao što je HIF-1 $\alpha$  (engl. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) [68], i druge.

Ye je sa suradnicima[69] prethodno pokazao da je JMJD2C enzim prekomjerno eksprimiran u agresivnom bazalnome sličnom karcinomu (engl. basal-like cancer) dojke te je funkcionirao kao onkogen. Kasnije, koristeći opsežne baze podataka za genomiku raka, potvrdili su da je JMJD2C visoko eksprimiran u 12,4% bazalnih tumora te da je ekspresija značajno veća kod

agresivnog bazalnog karcinoma dojke u usporedbi s ne-bazalnim karcinomom dojke. Kad je JMJD2C bio prekomjerno eksprimiran u netransformiranim MCF10A epitelnim stanicama dojke, promovirao je proliferaciju nezavisno od faktora rasta te uzrokovao promjenu morfogeneze u Matrigelu i utjecao na sposobnost formiranja mamosfere. Štoviše, JMJD2C enzim mogao je regulirati ekspresiju gena koji su ključni za samoobnavljanje matičnih stanica poput NOTCH1, i bio je usko povezan s fenotipovima matičnih stanica u karcinomu dojke[70]. U narednim studijama, Ye i suradnici također su pokazali da JMJD2C enzim može funkcionirati kao transformirajući onkogen.

Genetska modifikacija koja utišava ekspresiju (engl. knockdown) JMJD2C enzima uzrokovala je inhibiciju proliferacije stanica karcinoma dojke *in vitro* i *in vivo*. Još važnije, u usporedbi s ostalim članovima JMJD obitelji, JMJD2C imao je najveću učestalost (13,4%) genetskih promjena, uključujući mutaciju, homozigotnu deleciju, visoku amplifikaciju i deregulaciju mRNA.

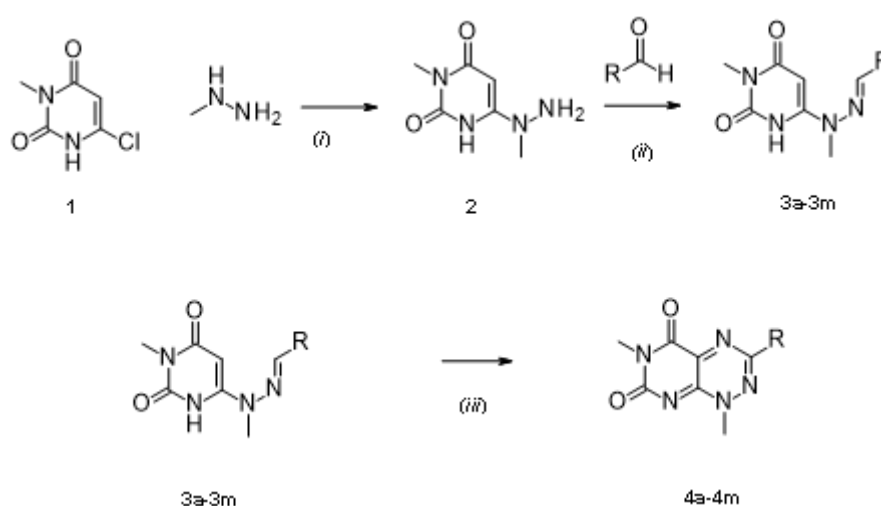
Rezultati Loua i suradnika[71] sugeriraju da pojačana ekspresija JMJD2C enzima u stanicama karcinoma dojke aktivira HIF-1 (engl. hypoxia-inducible factor 1) transkripcijski faktor koji je nužan za progresiju karcinoma. Nadalje, genetska modifikacija koja utišava ekspresiju (engl. knockdown) JMJD2C enzima kod miševa ne samo da je inhibirala rast tumora dojke već je i blokirala metastaziranje na pluća. Ovi rezultati otkrivaju važnu epigenetsku ulogu JMJD2C enzima kod karcinomu dojke koaktivacijom i stimuliranjem HIF-1 posredovane transaktivacije. Jednaki ili slični rezultati dobiveni su i za karcinom prostate[72] kao i za osteosarkom [73].

Budući da su epigenetske promjene reverzibilne, JMJD2C histon demetilaza obećavajuća je terapijska meta za različite tumore [69].

## 2.8. Toksoflavin

Alkaloid toksoflavin prvi je put izoliran 1933. godine iz bakterije *Pseudomonas cocovenenans*, [74]. Pokazalo se da posjeduje antimikrobno djelovanje i bio je meta mnogih totalnih sinteza [74-77]. Derivati toksoflavina, također opisani u navedenim radovima, isto su tako pokazali različita biološka djelovanja.

Budući da je toksoflavin centralni strukturni motiv ovog rada bilo je potrebno prirediti niz 3- aril-pirimido[5,4-e][1,2,4]triazine-5,7(1H,6H)-diona za biološka ispitivanja i kao rezultat toga, odabran je sintetski plan prikladan za stvaranje biblioteke derivata toksoflavina opisan od strane Todorovica i suradnika [78] kao što je prikazano na Shemi 2.2.



**Shema 2.2.** Sintetski put za pripremu fokusirane biblioteke toksoflavinskih derivata; (i): metilhidrazin, EtOH,  $\mu$ W, 100 ° C, 10 min; (ii): aldehid, EtOH,  $\mu$ W, 100 ° C, 10 min,  $y = 26-89\%$ ; (iii): NaNO<sub>2</sub>, octena kiselina / voda, 0 ° C do RT,  $y = 15-78\%$ .

Sinteza potrebnog hidrazona (**3**) uključivala je reakciju uracil-klorida (**1**) sa metil-hidrazinom koji je korišten kao slobodna baza, pri uvjetima mikrovalnog zračenje na 100 °C tijekom 10 minuta u etanolu. Dobiveni amin (**2**) nije izoliran, već je u reakciji s aldehidom u mikrovalnom reaktoru dodatnih 5 min na 50 °C preveden u odgovarajući imin (**3**). Hidrazoni (**3**) sintetizirani na ovaj način precipitirali su iz etanola i lako su izolirani filtracijom i sušenjem u vakuum sušnici. Konačno, hidrazon (**3**) u prisutnosti natrijeva nitrita u octenoj kiselini miješa se 18 sati kako bi se omogućilo zatvaranje prstena. Dodavanjem dietil-etera taloži željeni derivata toksoflavina (**4**) i njegov N-oksid. Nakon filtriranja slijedilo je njihovo razdvajanje kromatografijom na koloni. Ova sintetska metoda omogućila je sintezu fokusirane biblioteke derivata toksoflavina. Potvrda konačnih struktura napravljena je tehnikama nuklearne magnetne rezonancije i masene spektrometrije.

Da bi identificirali nove KDM4 inhibitore, Altucci i suradnici[79] napravili su 3D virtualni probir putem "mcule.com" internet stranice, u kojem su predviđene 3D strukture malih molekula uklapane (engl. docked) u aktivno mjesto vezanja proteina KDM4A čija je struktura objavljena u Protein Data Bank (PDB: 2Q8D) bazi podataka. Virtualno je pregledano preko pet milijuna 3D struktura, a oko tisuću struktura odabrano je za biološko testiranje. Nakon analize bioloških podataka, autori su odabrali molekulu PKF118-310, odnosno toksoflavin.

Za ovaj spoj prijavljeno je da je TCF4 (transcription factor 4) /  $\beta$ -kateninski signalni antagonist. Toksoflavin uništava TCF4 /  $\beta$ -kateninski kompleks i mijenja ekspresiju gena koji odgovaraju na TCF4. Pored toga, toksoflavin može inhibirati ekspresiju survivina i inducira apoptozu u karcinomu debelog crijeva, ljudskim stanicama osteosarkoma i staničnim linijama limfocitne leukemije[80-82].

Kemijska struktura toksoflavina korištena je pri tzv. inverznom *in silico* probiru na biblioteci od gotovo 10 000 struktura proteina (1-CLICK DOCKING) iz sc-PDB baze podataka [83]. sc-PDB baza je podataka koja sadrži strukture veznih mjesta proteina u koja se mogu vezati ligandi (ligandable). Rezultati istraživanja ukazali su na aktivno mjesto KDM4A enzima kao potencijalno mjesto vezanja za toksoflavin. Kako bi se potvrdio virtualni probir, Altucci i suradnici proveli su *in vitro* enzimski test na KDM4A enzimu. Naime, KDM4A djeluje na demetilaciju supstrata proizvodnjom formaldehida. Kombinacija formaldehida, amonijaka i acetoacetanilida stvara fluorescentni spoj koji apsorbira pri valnoj duljini od 370 nm i emitira pri valnoj duljini od 470 nm. Kad je promatrani spoj inhibitor, aktivnost KDM4A enzima je blokirana, a konačni koncentracija fluorescentnog spoja je smanjena u odnosu na kontrolu. Na temelju literature poznato je da su H3K9me3, H3K9me2 i H3K36me3 mete za KDM4A enzim [84, 85]. Kao supstrati za enzimsku aktivnost KDM4A korišteni su H3K9me3 i H3K36me3 peptidi. Toksoflavin je inkubiran s rekombinantnim KDM4A enzimom, kofaktorima i supstratom te je izmjerena aktivnost enzima. U usporedbi s kontrolom (DMSO), toksoflavin je pokazao snažnu inhibicijsku aktivnost na KDM4A enzim kod oba supstrata. Izrađene su i koncentracijske krivulje za inhibicijsku aktivnost toksoflavina. Potvrđeno je da je inhibicija toksoflavinom ovisna o koncentraciji i o vremenu. Aktivnost KDM4A enzima pala je na 50% pri koncentraciji toksoflavina od 10  $\mu$ M.

Čitači, pisači i brisači posrednici su epigenetskih mehanizama u normalnim fiziološkim uvjetima, ali i u bolesti. Fina regulacija njihove aktivnosti cilj je istraživanja epigenetskih lijekova te neprestano dolazi do novih pomaka i otkrića. Iako su inhibitori HDAC (histon deacetilaza) enzima već u kliničkom istraživanju, razumijevanje regulatora za metilaciju pomalo zaostaje. Znanstvena zajednica dijeli mišljenje da je metilacija histona jedna od ključnih točaka u ekspresiji i regulaciji gena. Istraživanja su stoga usmjerena na detaljna ispitivanja mehanizama regulacije, te na male molekule kojima bi mogli modulirati aktivnost

ove obitelji enzima. JMJD2A, jedan od članova porodice enzima demetilaze trenutno je jedan od glavnih meta za otkrivanje lijekova.

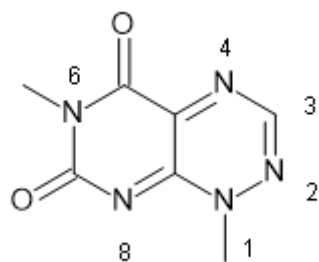
Polazeći od *in silico* probira, Altucci i suradnici odabrali su nekoliko potencijalnih inhibitora, a od njih toksoflavin nije prethodno opisan kao KDM4 inhibitor. Povrh toga, budući da je toksoflavin opisan kao TCF4 /  $\beta$ -kateninski modulator, analizirana je njegova histon-demetilaznu modulaciju na H3K9me3 i H3K9me2. I *in vitro* i *ex vivo* eksperimenti pokazali su inhibicijsko djelovanje na KDM4A enzim.

Do sada je literaturno opisano samo nekoliko inhibitora KDM skupine enzima, od kojih većina djeluje putem koordinacije iona metala u aktivnom mjestu[86]. Većina poznatih inhibitora su analozi kofaktora 2-oksoglutarata (2-OG), poput N-oksalil glicina, 2,4-piridin dikarboksilne kiseline ili se sastoje od jakih metalnih kelatara poput 2,2-bipiridina ili hidrosikinolina[87].

Iako ovi spojevi mogu imati snažno inhibicijsko djelovanje u biokemijskim testovima, njihova fizikalno-kemijska svojstva ograničavaju ADME svojstva, posebno staničnu permeabilnost. Dva rada iz GlaxoSmithKline-a izvijestila su o inhibitorima s poboljšanim fizikalno-kemijskim svojstvima i staničnom permeabilnošću, ali ti spojevi i dalje imaju značajnu inhibicijsku aktivnost na srodnim histon demetilaza[88, 89]. Kombinacija umjerene biokemijske aktivnosti i ograničene stanične permeabilnosti ostavlja prostor za daljnja istraživanja i dizajn novih spojeva kao kemijskih proba ili potencijalnih kandidata za lijekove.

Toksoflavin je literaturno opisan kao KDM4A[79] ( $IC_{50} = 2,5 \mu M$ ) i KDM4C [90] inhibitor ( $IC_{50} = 0,5 \mu M$ ). Primjećuje se petostruko povećanje aktivnosti za KDM4C enzim, što toksoflavin čini dobrom molekulom pogotkom za daljnji razvoj i dizajn novih inhibitora KDM4C enzima.

Zabilježena je antikancerogena aktivnost u tekućim i u čvrstim tumorskim stanicama, s učinkom koji ovisi o koncentraciji i vremenu[79]. Međutim, redoks potencijal toksoflavina, zbog sposobnosti stvaranja otrovnih peroksida, ograničava njegovu upotrebu[91].



**Shema 2.3.** Numeracija položaja kod toksoflavina

U ovom radu toksoflavin je korišten kao početni strukturni motiv za dizajn i sintezu fokusirane biblioteke sa strukturnom različitosti na položaju 3 (Shema 2.3.). Ispitivan je učinak različitih aromatskih supstituenata na inhibicijsku aktivnost na KDM4C enzimu. Osim toga, promatran je i utjecaj na proliferaciju kod dviju različitih staničnih linija i konačno utjecaj na redoks potencijal i ADME svojstva.

## 2.9. ELISA biokemijski pokus

ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) je test koji koristi protutijela i promjenu boje za identifikaciju i kvantifikaciju tvari. Koristi se kao dijagnostički alat u medicini, biologiji i kemiji, ali i za kontrolu kvalitete u različitim industrijama. ELISA testovi djeluju na sličnim načelima kao i kod drugih tehnika imunološkog ispitivanja. ELISA se oslanja na vezanje specifičnih antitijela za ciljani antigen te sustav detekcije koji pokazuje prisutnost i količinu vezanja antigena. Da bi se povećala osjetljivost i preciznost ispitivanja, antitijela moraju imati

visoki afinitet i specifičnost. ELISA se tipično izvodi u polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 (ili 384) jažica na čije se dno pasivno vežu protutijela ili proteini. Upravo svojstvo vezanja i imobilizacije reagensa čini ELISA-u lakom za dizajniranje, ali i izvođenje. Imobilizacija reaktanata na dnu jažica mikrotitarske pločice olakšava odvajanje vezanog od nevezanog materijala tijekom analize. Ova mogućnost ispiranja supstanci koje nisu specifično vezane čini ELISA-u moćnim sredstvom za mjerenje specifičnih analita unutar nepročišćenog uzorka.

Ukoliko se ne koristi komercijalna mikrotitarska pločica koja je prethodno obložena protutijelom, ELISA počinje s korakom nanošenja ciljnog antigena ili antitijela na polistirensku pločicu. Potom slijedi korak blokiranja u kojem su sva nevezana mjesta prekrivena blokirajućim agensom. Nakon niza ispiranja, pločica se inkubira s protutijelom koje je konjugirano s enzimom. Druga serija ispiranja uklanja sva nevezana antitijela. Zatim se dodaje supstrat što uzrokuje stvaranje analitičkog signala te se pločica može očitati.

ELISA se može izvesti s nekoliko preinaka u osnovnom postupku. Zato postoje različite vrste ELISA-e: izravna, neizravna, sendvič ili kompetitivna. Ključni korak, imobilizacija antigena, može se postići izravnom adsorpcijom na pločicu za ispitivanje ili posredno preko antitijela za hvatanje koje je pričvršćeno na ploču. Antigen se zatim detektira bilo izravno (enzimom obilježeno primarno protutijelo) ili posredno (enzimom obilježeno sekundarno antitijelo). Antitijela se detektiraju tako što su obično obilježena alkalnom fosfatazom (AP) ili peroksidazom hrena (HRP). Dostupan je veliki izbor supstrata za provođenje ELISA s HRP ili AP konjugatom. Izbor supstrata ovisi o potrebnoj osjetljivosti ispitivanja i instrumentaciji dostupnoj za detekciju signala (spektrofotometar, fluorometar ili luminometar).

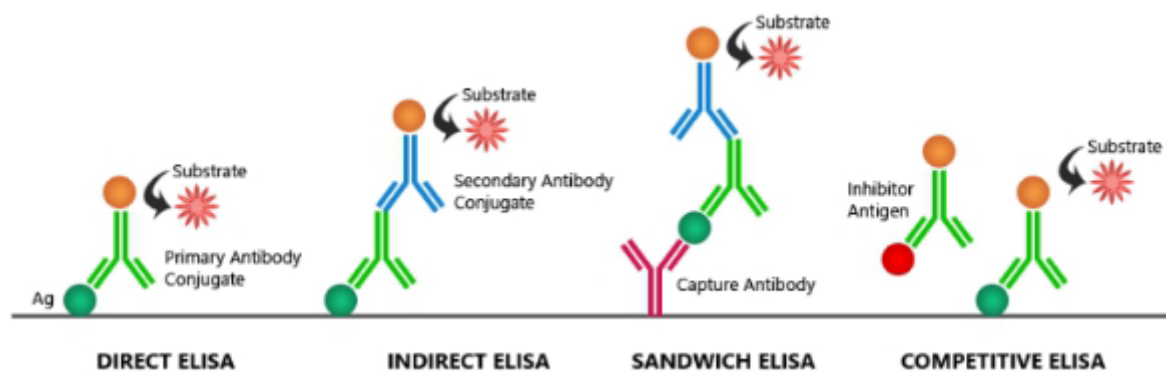
Kod izravne detekcije, antigen nanesen na pločicu veže antitijelo koje je izravno konjugirano s enzimom. Ova metoda detekcije dobra je opcija ako ne postoje komercijalno dostupni ELISA kompleti za ciljani protein.



Kod neizravne ELISA-e detekcija antigena nanesenog na pločicu izvodi se u dvije faze. Prvo se veže neoznačeno primarno protutijelo, koje je specifično za antigen. Zatim se sekundarno antitijelo obilježeno enzimom veže za prvo antitijelo. Indirektna analiza koja je najpopularniji oblik ELISA-e, ima nekoliko prednosti. Mnogobrojna obilježena sekundarna antitijela komercijalno su dostupna. Osim toga, maksimalna imunoreaktivnost primarnog antitijela je zadržana budući da ono nije označeno.

Sendvič ELISA obično zahtijeva upotrebu odgovarajućih parova antitijela, gdje je svako antitijelo specifično za drugi, ne preklapajući dio (epitop) molekule antigena. Prvo protutijelo, poznato kao antitijelo za hvatanje, nanese se na pločicu. Otopina uzorka s antigenom zatim se dodaje u jažice. Nakon toga, na vezani antigen veže se drugo protutijelo (poznata kao protutijelo za detekciju) kako bi se izmjerila koncentracija uzorka. Sendvič ELISA-u odlikuje visoka selektivnost zbog specifičnog hvatanja i detekcije antigena. Prikladna je za složene ili sirove uzorke, stoga antigen ne zahtijeva pročišćavanje.

Kod kompetitivne ELISA-e pločica je obložena antitijelima koja reagiraju na molekulu od interesa. U obložene jažice dodaje se uzorak koji sadrži ispitivanu molekulu i protein konjugiran s rekombinantnim enzimom (kompetitivna molekula). Budući da je količina konjugirane molekule u svakoj jažici konstantna, koncentracija native molekule u uzorku odredit će omjer vezanja konjugirane molekule prema nativnoj molekuli.



**Slika 2.11.** Grafički prikaz različitih izvedbi ELISA biokemijskog pokusa: a) izravna ELISA, b) neizravna ELISA, c) „sendvič“ ELISA, d) kompetitivna ELISA

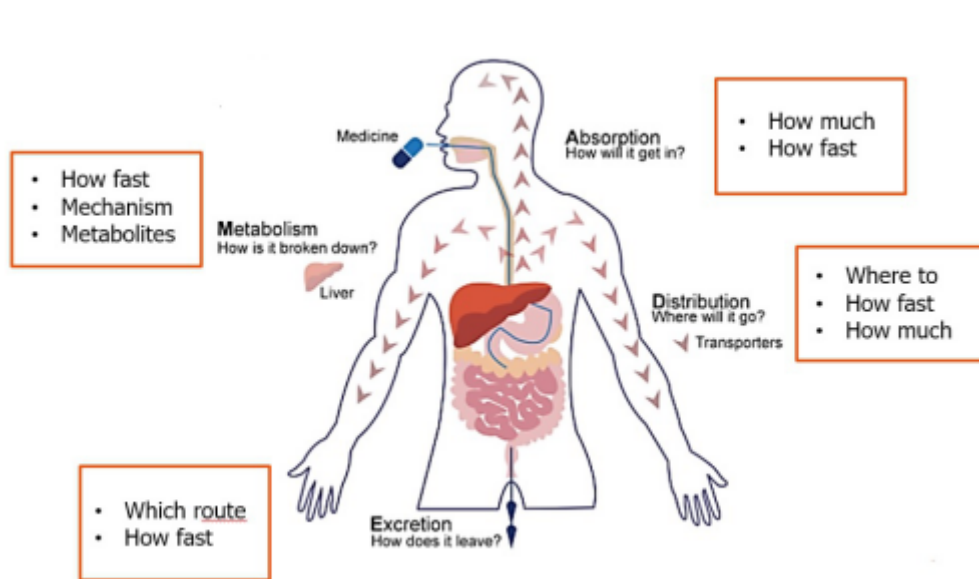
Rezultati ELISA-e obično se prikazuju grafikonom s fluorescencijom nasuprot koncentracije kako bi se dobila sigmoidna krivulja. Poznate koncentracije antigena koriste se za dobivanje standardne krivulje, a zatim se ti podaci upotrebljavaju za očitavanje koncentracije nepoznatih uzoraka u linearnom dijelu standardne krivulje. Upravo zbog relativno dugog linearnog područja krivulje rezultati ELISA-e smatraju se točnim i reproducibilnim.

### **2.9.1. Određivanje $IC_{50}$ vrijednosti – mjera inhibicijske aktivnosti**

$IC_{50}$  vrijednost definirana je kao koncentracija inhibitora koja smanjuje biotransformaciju supstrata u jednoj, određenoj koncentraciji za 50%. Ova kvantitativna mjera pokazuje pri kojoj koncentraciji ispitivanog spoja dolazi do inhibicije biološkog procesa za pola.  $IC_{50}$  vrijednost spoja najčešće se može odrediti izradom krivulje koja će prikazivati učinak različite koncentracije inhibitora na aktivnost enzima.  $IC_{50}$  vrijednosti mogu se tada izračunati za dani inhibitor određivanjem koncentracije potrebne za inhibiciju polovice maksimalnog biološkog odgovora inhibitora [92].  $IC_{50}$  vrijednosti mogu se koristiti za usporedbu potentnosti dvaju inhibitora, no značajno ovise o uvjetima u kojima se mjerenje provodi. Općenito, što je veća koncentracija inhibitora, to će aktivnost enzima biti manja. Ovisno o vrsti inhibicije, drugi čimbenici također mogu utjecati na  $IC_{50}$  vrijednost. Za enzime ovisne o ATP-u  $IC_{50}$  vrijednost ima međusobnu ovisnost s koncentracijom ATP-a, osobito ako je inhibicija kompetitivna.

## 2.10. ADME svojstava

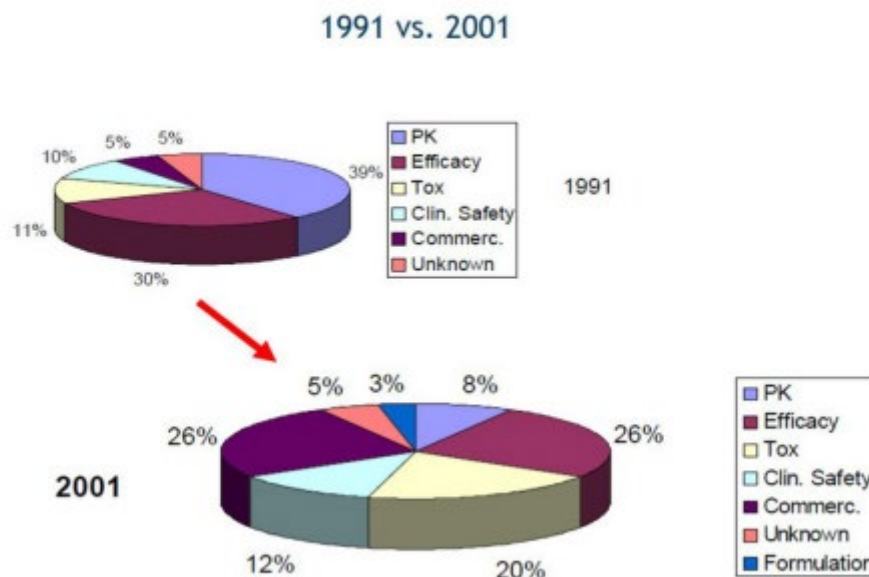
U farmaceutskim kompanijama poznata je činjenica da se samo 10% novih kemijskih supstanci koje uđu u kliničke studije razvije u proizvod koji se može plasirati na tržište lijekova. Statističke analize regulatornih agencija ukazuju na to da ih 28% otpadne zbog loše



Slika 2.12. ADME svojstva

učinkovitosti, 20% zbog pretjerane toksičnosti, 5% zbog tržišnih problema, a čak 37% zbog neadekvatnih farmakokinetičkih svojstava[93-95]. U zadnjih nekoliko desetljeća svjedoci smo ubrzanog znanstvenog i tehnološkog napretka, posebno na području kemije, molekularne biologije, automatizacije i analitičke tehnologije što je nepovratno promijenilo farmaceutske procese razvoja novih lijekova. Istraživanjem ADME svojstava nastoji se što bolje razumjeti ponašanje lijeka u ljudskom organizmu, odnosno pokušava se odgovoriti na pitanja: 1) kako lijek ulazi u organizam (apsorpcija, A), 2) kamo lijek odlazi u organizmu i koliko se tamo zadržava (distribucija, D), 3) je li lijek kako promijenjen u organizmu

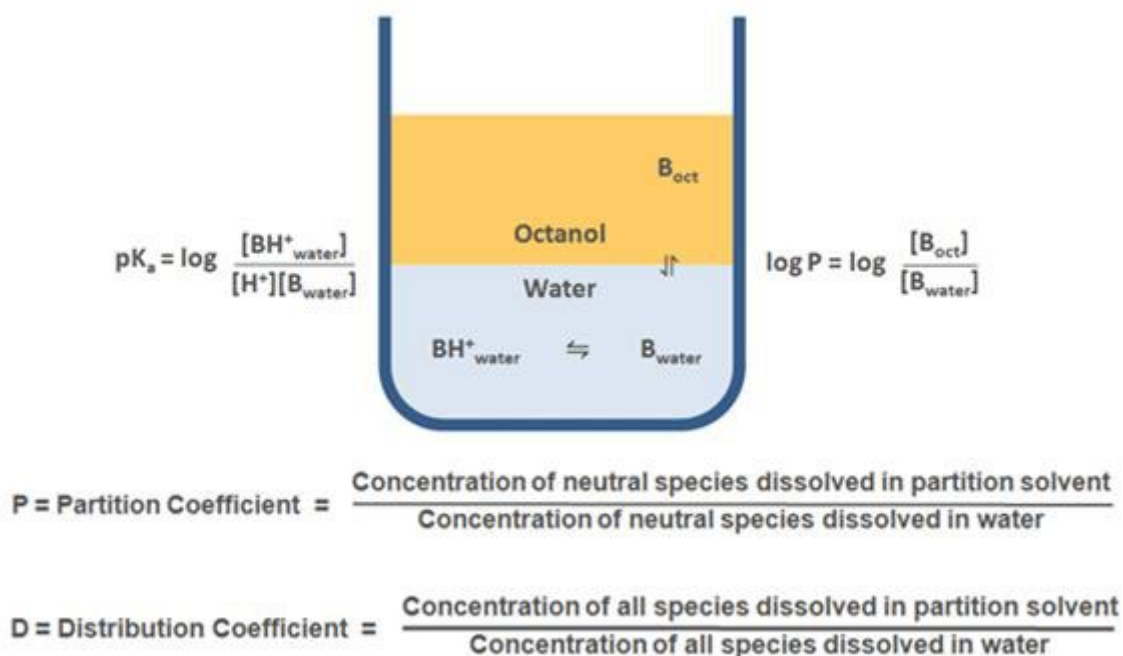
(metabolizam, M), te 4) kako lijek izlazi iz organizma (eliminacija, E) [96, 97]. Ovaj koncept opisuje utjecaj spomenutih čimbenika na postizanje dovoljno visoke koncentracije lijeka u krvi ili tkivu tijekom dovoljno dugo vremena za postizanje željenog farmakološkog učinka. U prošlosti su se ADME svojstva mahom istraživala na validiranim životinjskim modelima u relativno kasnoj fazi razvoja programa. Farmaceutska industrija godinama nastoji pomaknuti ova istraživanja u što ranije faze razvoja lijeka. Zbog napretka u razvoju *in vitro* eksperimenata kojima se određuju ADME svojstva smanjen je i broj nepotrebnih *in vivo* eksperimenata na životinjama. Osim toga, na taj se način povećava učinkovitost razvoja novih lijekova jer se sprječava da supstanca zbog ADME svojstava bude odbačena u kasnom stadiju razvoja. Na slici 2.13. vidljivo je da je udio neuspješnosti lijekova zbog loših ADME svojstava, smanjen sa 39% na 8% 2001. u odnosu na 1991. godinu.



**Slika 2.13.** Razlozi za neuspjeh kliničkih kandidata 1991. i 2001. godine

### 2.10.1. Fizikalno-kemijska svojstva

Da bi se odredila fizikalno-kemijska svojstva kemijskog spoja potrebno je definirati pojam hidrofobnosti i lipofilnosti. Hidrofobnost je svojstvo nepolarnih molekula ili funkcionalnih skupina da se grupiraju zajedno te odbijaju vodu što uzrokuje da se s njom ne miješaju. Lipofilnosti je, pak, svojstvo koje opisuje sklonost molekula ili dijelova molekula prema lipidnom okruženju. Lipofilnost se izražava kao raspodjela molekula u dvofaznom sustavu, najčešće n-oktanol – voda, a računa se kao logaritam partijskog koeficijenta između n-oktanola i vode ( $\log P$ ). Postupak određivanja  $\log P$  parametra prikazan je na slici 2.14. Kako bi se supstanca mogla apsorbirati ona mora biti dovoljno hidrofilna da bi se otopila u vodenom mediju probavnog trakta, no isto tako mora biti dovoljno lipofilna da prođe kroz membranski fosfolipidni dvosloj.



Slika 2.14. Određivanje lipofilnosti;  $\log P$  parametra

## 2.10.2. Apsorpcija i distribucija supstance

Apsorpcija je proces u kojem supstanca nepromijenjena prolazi od mjesta ulaska u organizam do tkiva u kojem se mjeri koncentracija supstance. Lijekovi dizajnirani tako da budu sistemski aktivni trebaju biti apsorbirani kako bi mogli pokazati terapijsku djelotvornost. Proces apsorpcije dakako ovisi i o načinu administracije, odnosno načinu unosa lijeka u organizam (oralno, intravenozno, inhalatorno). Neovisno o načinu njegova unosa, da bi supstanca postigla svoju terapijsku efikasnost ona mora prijeći niz fizioloških barijera, što kod apsorpcije podrazumijeva prolazak kroz membranu stanice. Najveći dio procesa prolaska kroz staničnu membranu kontroliran je fizikalno-kemijskim svojstvima molekula koje ulaze u organizam te sastavom same membrane. Apsorbirana supstanca ulazi u krv kojom se distribuira do ciljanog tkiva, tj. mjesta gdje treba djelovati. Supstanca koji je apsorpcijom ili direktnom aplikacijom dospjela u krvotok biva razrijeđena ukupnim volumenom krvi. Njena daljnja distribucija po organizmu ovisi o nizu faktora kao što su prokrvljenost pojedinih tkiva, sposobnost lijeka da prolazi kroz membrane, odnos njegove topljivosti u vodi i u mastima, njena adsorpcija na velike molekule kao što su proteini i sposobnost nekih organa da specifično vežu određene tvari. Supstance se u krvi u većoj ili manjoj mjeri vežu na proteine plazme, naročito na albumin. Sklonost supstanci ka takvom vezivanju, odnosno omjer slobodnog udijela i udijela vezanog za proteine u plazmi, važna je karakteristika lijekova. Samo se nevezani dio lijeka može slobodno širiti organizmom van sistemskog krvotoka i tako doći do svog ciljanog odredišta, do organa i tkiva. Tamo može izraziti svoju farmakološku efikasnost te može biti metaboliziran i na kraju izlučen iz organizma.

Apsorbirana frakcija supstance onaj je postotak primjenjene doze koji iz lumena crijeva ulazi u portalnu venu. Permeabilnost supstance, njena topljivost i probavni metabolizam u mnogome utječu na apsorbiranu frakciju.

### 2.10.3. Metabolizam i eliminacija supstance

Supstance unesene u organizam nakon apsorpcije podliježu metaboličkim procesima. Metabolizam, odnosno biotransformacija, predstavlja glavni put eliminacije većine supstanci iz organizma. Metabolizam je zapravo mehanizam kojim se organizam rješava supstanci na način da ireverzibilnom biokemijskom transformacijom supstancu pretvara u neki drugi oblik, njen metabolit, koji organizam onda može lakše izlučiti. Farmakološki gledano, metaboliti su najčešće neaktivni, ali isto tako mogu biti i terapijski efikasni, a ponekad i toksični. Proces se načelno odvija u dvije faze. Faza I podrazumijeva metaboličko djelovanje endogenih enzima kao što su citokrom P450 (CYP), monooksigenaza, esteraza, amidaza i alkoholdehidrogenaza, pri čemu se njihova aktivnost očituje kao nastajanje oksidiranog, reduciranog ili hidroliziranog oblika početne supstance. Najistaknutija skupina enzima faze I su CYP enzimi koji su smješteni na endoplazmatskom retikulumu stanica različitih organa (tanko crijevo, jetra, bubrezi, pluća, mozak). Postoji nekoliko različitih izoformi citokroma P450, a najvažnije su CYP3A4 (3 označava genetsku porodicu; A označava genetsku podporodicu; 4 označava specifičan gen) koji je odgovoran za metabolizam približno 50% danas poznatih lijekova [98], zatim CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 i CYP2E1). Faza II metabolizma u većini slučajeva uključuje uridin difosfat-glukuronozil transferazu (UGT), estrogen sulfotransferazu (EST), glutation-S-transferazu (GST) i fenol sulfotransferazu (PST) čijim djelovanjem nastaju novi spojevi - konjugati između supstance i endogenog supstrata.

Eliminacija odnosno izlučivanje odnosi se na svako nestajanje supstance iz krvi i organizma, a samim time i prestanak njene farmakološke aktivnosti. Metabolizam primjenjene supstance ili njena biotransformacija proces je u kojem se supstanca izlučuje kemijski promijenjena, što znači da biotransformacijama nastaju polarnije, manje lipofilne, topljivije i bolje disocirane supstance koji se zatim eliminiraju iz organizma. Izlučivanje iz organizma može se dogoditi na nekoliko načina, a najjednostavniji svakako je izlučivanje nepromijenjenog oblika supstance.

Farmakokinetika lijeka s gledišta metabolizma ovisi o njegovoj metaboličkoj stabilnosti, ali i međudjelovanju s drugim lijekovima. Lijek koji se brzo biotransformira, odnosno lijek koji je metabolički nestabilan, trebat će češće doziranje kako bi se koncentracija u krvi održala unutar granica gdje je lijek farmakološki aktivan. Glavni uzrok međudjelovanja jednog lijeka s drugim često je njihova kompeticija s jednim od metaboličkih enzima, čime se mijenja farmakološka aktivnost lijekova. U najvećem broju slučajeva takvo međudjelovanje uključuje CYP enzime.

Budući da je kod *in vivo* tehnika često teško razaznati kojim metaboličkim putem je supstanca biotransformirana, prednost imaju *in vitro* modeli (perfuzirani organi, izolirane stanice, presjeci tkiva, subcelularne frakcije stanica ili organa, rekombinantni enzimi). Postoje različiti *in vitro* modeli kojima se može utvrditi metabolizam supstanci, a neki od najvažnijih su mikrosomi, S9 frakcija i mikrosomi. Mikrosomi su subcelularna frakcija nastala iz fragmentiranih vezikula endoplazmatskog retikula stanica tkiva. S9 frakcija smjesa je mikrosoma i citosola homogeniziranih stanica tkiva. Hepatociti su funkcionalne stanice jetre koje i u organizmu obavljaju svoju metaboličku i endokrinu funkciju.

Kako bi se istražio metabolizam prvog prolaza *in vitro* koji ovisi o djelovanju metaboličkih enzima, supstance se inkubiraju u navedenim sustavima te im se određuje metabolička



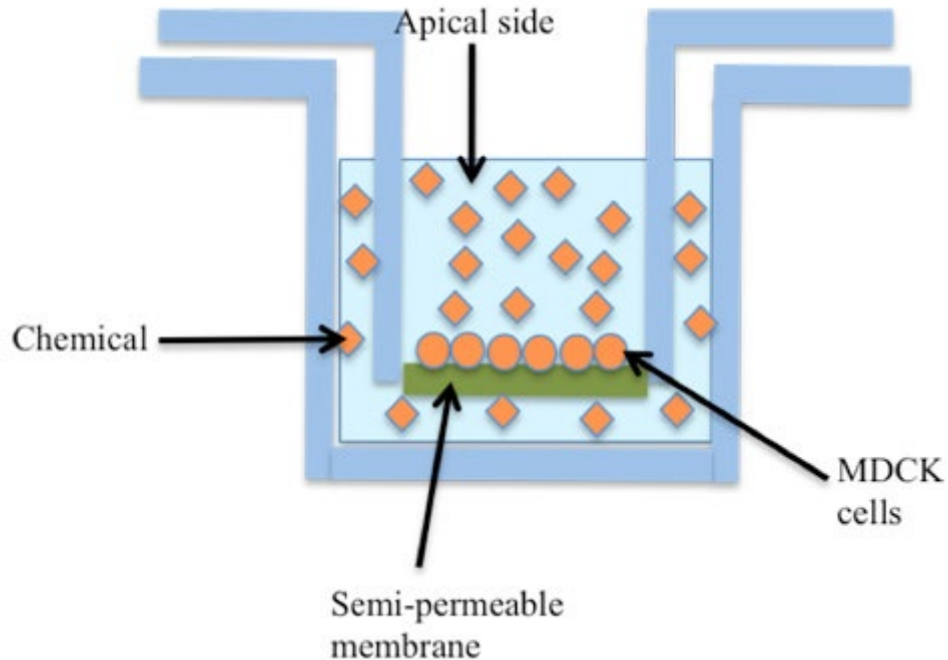
stabilnost. Ovi postupci koriste se za određivanje intrinzičnog klirensa *in vitro* kako bi se predvidjela brzina metaboličkerazgradnje jetri *in vivo*.

#### 2.10.4. Određivanje koeficijenta permeabilnosti

Permeabilnost supstance u organizmu igra ključnu ulogu u njenoj apsorpciji, a samim time i u njenoj bioraspoloživosti. Prijelaz kroz fiziološku barijeru u vidu stanične membrane kontroliran je fizikalno-kemijskim svojstvima supstance koja ulazi u organizam, ali i sastavom membrane stanica.

Kako bi se odredila permeabilnost kroz membranu supstanca se stavlja u odjeljak davatelja (A), a brzina prolaska u odjeljak primatelja (B) mjeri se kroz vrijeme. Ovakav pokus simulacija je prolaska supstance iz lumena crijeva u krvotok (smjer apikalno-bazolateralno, AB). Supstanca isto tako može biti stavljena u odjeljak B (davatelj). U tom slučaju mjeri brzina prolaska u odjeljak A (primatelj) što predstavlja bazolateralno-apikalni (BA) smjer. Iz izmjerenih vrijednosti koncentracija računa se prividni koeficijent prodornosti Papp. Grafički prikaz postupka određivanja koeficijenta permeabilnosti nalazi se na slici 2.15. Kako bi se utvrdilo podliježe li supstanca efluksu potrebno je odrediti omjer koeficijenata permeabilnosti u oba smjera [Papp(BA/AB)]. Ukoliko su Papp vrijednosti jednake u oba smjera, radi se isključivo o pasivnoj difuziji. Kada je brzina prijelaza supstance iz apikalnog u bazolateralni prostor veća od smjera bazolateralno-apikalno,  $Papp(AB) > Papp(BA)$ , pretpostavlja se da se radi o aktivnom transportu. Ukoliko je  $Papp(BA) > Papp(AB)$ , pretpostavlja se da se efluks odvija pomoću P-glikoproteina. Drugim riječima, ukoliko omjer iznosi oko 1 to ukazuje da supstanca prolazi pasivnom difuzijom. Omjer  $> 2$  (ovisno o staničnoj liniji i uvjetima pokusa) ukazuje da se radi o uključenosti efluks mehanizma

u transport molekule. Da bi se isti potvrdio, neophodni su daljnji pokusi sa i bez specifičnog inhibitora P-glikoproteina kao što je Amprenavir.



**Slika 2.15.** Određivanje permeabilnosti

### 2.10.5. Određivanje supstrata za P-glikoprotein

U Caco-2 stanicama izraženost MDR1 proteina varira ovisno o rednom broju pasaže stanica pa je model hMDR1-MDCK II trenutno najbolji izbor za utvrđivanje hoće li supstanca biti supstrat P-glikoproteina. Uloga P-glikoproteina ispituje se koristeći poznate inhibitore P-glikoproteina, kao što su npr. verapamil ili GF120918A[99, 100]. Ukoliko je neka supstanca supstrat za prethodno inhibiran P-glikoprotein, njezina Papp vrijednost će se povećati zbog inhibiranog efluksa. Kao što je ranije opisano, efluks omjer  $Papp(BA/AB)$  koristi se za utvrđivanje je li supstanca supstrat P-glikoproteina ili nije. Efluks omjer veći od

2 u stanicama hMDR1-MDCK II sugerira da transport supstance kroz staničnu membranu ima efluks komponentu. Ovaj omjer opada u prisutnosti standardnog inhibitora.

Poznato je da je P-glikoprotein važna barijera u testisima, mozgu, crijevima, te važan eliminacijski mehanizam u jetri, bubrezima i crijevima. Za razliku od krvno-moždane barijere (engl. blood-brain barrier) utjecaj P-glikoproteina na intestinalnu apsorpciju nešto je manje jasan. U literaturi je opisana i mogućnost pojave međudjelovanja dvaju lijekova koja uključuje P-glikoprotein te je naglašena važnost prepoznavanja tog međudjelovanja u što ranijoj fazi razvoja novog lijeka [101]. Dakle, ima mnogo čimbenika koji utječu na oralnu bioraspoloživost i afinitet za P-glikoprotein je samo jedan, no nikako eliminacijski kriterij za odabir budućeg lijeka.

#### **2.10.6. Vežanje na proteine plazme**

Vežanje na proteine plazme odnosi se na mjeru u kojoj se potencijalni lijekovi vežu za proteine u krvi, odnosno krvnoj plazmi. Taj stupanj vežanja može imati veliki utjecaj na učinkovitost lijeka. Što je lijek manje vežan, to će lakše prolaziti kroz stanične membrane. Uobičajeni proteini u krvi na koje se lijekovi vežu su humani serumski albumini, lipoprotein, glikoprotein te  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  globulini.

Lijek u krvi postoji u dva oblika, vežanom i nevežanom. Ovisno o specifičnom afinitetu lijeka za proteine u plazmi, dio doze lijeka može se vezati za proteine u plazmi, a ostatak ostaje nevežan. Ako je to vežanje na proteine reverzibilno, postojat će kemijska ravnoteža između vežanog i nevežanog oblika:



Značajno je napomenuti da samo nevezana frakcija ima farmakološki učinak. To je ujedno i frakcija koja se može metabolizirati i izlučiti. Na primjer, vezana frakcija antikoagulantnog

varfarina je 97%. To znači da se od ukupne količine varfarina u krvi 97% veže na proteine plazme. Preostalih 3% je nevezana frakcija koja je zapravo farmakološki aktivna i podložna metabolizmu i izlučivanju iz organizma..

Vežanje na proteine plazme može utjecati na vrijeme kojeg lijek provede u organizmu. Vežani dio može djelovati kao spremište iz kojeg se lijek polako otpušta kao nevezani oblik. Budući da se nevezani oblik metabolizira i/ili izlučuje iz tijela, vežana frakcija se oslobađa kako bi se održala ravnoteža.

Budući da je albumin protein s bazičnim fizikalno-kemijskim svojstvima, kiseli i neutralni lijekovi prvenstveno će se za njega vezati. Ako albumin postane zasićen, tada će se ovi lijekovi vezati za lipoprotein. Bazični lijekovi vezat će se za kiseli glikoprotein. Ovo je važno jer različita zdravstvena stanja mogu utjecati na razinu albumina, glikoproteina i lipoproteina.

## 2.11. Računalna kemija u otkrivanju novih lijekova

Računalna kemija koristi računala i algoritme za izračunavanje kemijskih svojstava atoma i molekula kao i za simulaciju različitih kemijskih događaja. Pri otkrivanju novih lijekova koriste se različiti aspekti računalne kemije prilikom dizajniranja potencijalnih novih lijekova, ali i za predviđanje događaja poput vezanja lijeka za biološku metu.

Računalne metode rutinski se danas koriste za ubrzavanje i usmjeravanje dugog i skupog postupka otkrivanja lijekova. Kada se odabere biološka meta, aktivnosti razvoja novog lijeka obično se dijele na nekoliko faza. Prva je faza identifikacije molekule pogotka, u kojoj je cilj pronaći kemijske spojeve s obećavajućom aktivnosti naspram mete. Potom slijedi faza pronalaska vodeće molekule, u kojoj se spojevi pogodci unaprijeđuju u biološkoj aktivnosti. Zatim dolazi faza optimizacije vodeće molekule u kojoj se dizajniraju i sintetiziraju molekule sa svojstvima slične lijekovima (engl. Drug-like molecules), a koje u konačnici pokazuju farmakološki učinak na pacijentima.

Računalna kemija može pomoći u svim tim aktivnostima otkrivanja lijekova, od identifikacije biološke mete lijeka, obično receptora ili enzima, do dizajna i optimizacije novog spoja sličnog lijeku. Iako se računalne metode za identifikaciju meta uglavnom oslanjaju na računalne discipline poput bioinformatike i računalne genomike, različiti se računalni pristupi primjenjuju nakon što je meta identificirana i krene se u potragu za malim molekulama inhibitorima, počevši od faze identifikacije molekule pogotka, pa dalje prema fazama pronalaska i optimizacije vodeće molekule.

Danas se rutinski primjenjuju metode računalne kemije kao što su dizajn lijeka zasnovan na strukturi (SBDD; engl. structure based drug design), kada su dostupni strukturni podaci

proteina mete i dizajn lijeka koji se temelji na ligandu (LBDD; engl. ligand based drug design), kada nedostaju strukturni podaci ili nisu u potpunosti pouzdani. Ove metode olakšavaju identifikaciju odgovarajućih kemijskih strukturnih motiva koji doprinose aktivnosti naspam biološke mete te izazivaju povoljan farmakološki učinak. Eksperimentalni farmakološki i biokemijski podaci o novim spojevima, poput njihove *in vitro* inhibicijske aktivnosti i *in vivo* djelotvornosti, mogu se upotrijebiti za provjeru računalnih predviđanja, istovremeno dajući osnovu za izradu boljih modela, što naposljetku dovodi do dizajna aktivnijih spojeva [102].

Utjecaj računalne kemije na istraživanje lijekova raste u zadnjih nekoliko desetljeća zbog razvoja bržih računala i boljih algoritama za brže rješavanje zahtjevnih proračuna. Nekoliko teorijskih metoda koje se nekad nisu mogle koristiti za učinkovito dizajniranje lijekova sada se sve više koristi za identifikaciju pogodaka i optimiranje vodećih molekula. Nedavno su, na primjer, primijenjeni vrlo zahtjevni izračuni perturbacije slobodne energije (engl. FEP, free-energy perturbation) kako bi se precizno procijenila energija vezanja strukturno sličnih kemijskih analoga u aktivno mjesto, dajući obećavajuće rezultate za optimizaciju vodećih molekula[103].

Također, klasična molekulska dinamika (MD, engl. Molecular dynamics) može biti praktični računalni alat za proučavanje energije i kinetike liganada koji se vežu za protein metu što igra veliku ulogu pri optimizaciji vodeće molekule. Konačno, zbog razvoja računala u posljednjem desetljeću, kvantna mehanika (QM, engl. quantum mechanics) postala je sve pristupačnija za provođenje dizajna lijeka na temelju strukture. Kvantnomehaničke (QM) i hibridne QM / MM (kvantna mehanika/ molekulska mehanika) metode sve se više koriste za studije interakcija inhibitora s ciljanim proteinom.

Izazovna je zadaća pronaći savršeno pristajanje između novog spoja i njegove mete kako bi se optimirao inhibitorni učinak, što je cilj tijekom faze stvaranja vodeće molekule. Međutim, postoji još nekoliko izazovnih zadataka tijekom faze optimizacije vodećih molekula. Snažni

inhibitor još nije lijek. Postoje i druga fizikalno-kemijska svojstva koja određuju farmakokinetiku (PK, engl. pharmacokinetics) svakog spoja, koja utječu na sličnost svojstvima lijeka te na njihovu djelotvornost i sigurnost *in vivo*. Predikcija ADMET svojstava u ranoj fazi istraživanja, ključna je za sprečavanje kasnijih neuspjeha u vrlo skupim kliničkim istraživanjima. S tog aspekta, računalne metode s kemometrijskim pristupom i kvantitativni odnos strukture i svojstava (QSPR, engl. quantitative structure–property relationship) igraju značajnu ulogu u razvoju prediktivnih modela za selekciju i prioritizaciju sinteze spojeva tijekom faze optimizacije vodeće molekule.

Svaka metoda računalne kemije može doprinijeti bržem odvijanju određene faze procesa otkrivanja lijeka, od molekuskog uklapanja i molekulske dinamike za identifikaciju pogotka i stvaranja vodeće molekule do QSAR-a za optimizaciju fizikalno-kemijskih i ADMET svojstava. Detaljni metodološki opis svake metode može se naći u mnogim izvrsnim preglednim člancima i knjigama koji su usredotočeni na teorijsku pozadinu računalne kemije[104, 105].

Pojedini računalni pristup bolje odgovara određenoj fazi istraživanja novih lijekova, od SBDD-a za fazu pronalaska molekule pogotka i fazu stvaranja vodeće molekule do QSAR metoda za optimizaciju vodeće molekule gdje se podešavaju fizikalno-kemijska i ADMET svojstva kako bi molekula bila što bolji kandidat za novi lijek.

U ovom radu namjera je prikazati primjenjivost računalnih kemijskih metoda i pristupa koji se danas koriste za ubrzavanje dizajniranja i otkrivanja lijekova, s posebnim naglaskom na dizajn zasnovan na strukturi (SBDD) i i hibridnim QM/MM metodama.

### **2.11.1. Računalne metode kod dizajna lijekova zasnovanog na strukturi (SBDD)**

Računalni pristup dizajnu lijekova temeljenog na strukturi (SBDD) zasniva se na poznavanju strukture proteina mete, što se obično dobiva tehnikama rendgenske kristalografije visoke rezolucije ili NMR analizama. Detaljnom analizom interakcija između strukture ciljanog proteina mete i liganda, SBDD pristup omogućuje donošenje racionalnih odluka u dizajniranju aktivnijih i selektivnih spojeva. Stoga se ove metode uglavnom koriste za identifikaciju molekule pogotka kao i tijekom faza otkrivanja i optimizacije vodeće molekule.

Široki spektar metoda računalne kemije može se primijeniti na dizajn temeljen na strukturi, uključujući metode temeljene na polju sila, poput molekuskog uklapanja (engl. docking), klasične simulacije zasnovane na molekulskoj dinamici ili Monte Carlo (MC) simulacije, ali i računski zahtjevnije metode temeljene na kvantnoj mehanici[106]. Novi, racionalno dizajnirani spojevi moraju se u konačnici eksperimentalno ispitati da bi se potvrdilo jesu li doista potentni inhibitori. Eksperimentalno testiranje svakog spoja pokazuje interdisciplinarnu prirodu učinkovitog procesa otkrivanja novih lijekova. Jednako tako, eksperiment je ključan za procjenu prediktivne moći računalnog pristupa u procesu istraživanja i stvaranja dobrih kandidata za lijekove.

### **2.11.2. Pristupi SBDD-a temeljeni na polju sila**

Računalne metode temeljene na molekulskoj mehanici (MM; engl. molecular mechanics) omogućuju izračunavanje energije vezanja, ali i nekoliko drugih svojstava molekulskih sustava [107]. Osnovna funkcija polja sila opisuje potencijalnu energiju sustava koja se izražava kao zbroj različitih doprinosa koji su parametrizirani za reprodukciju eksperimentalnih ili *ab initio* podataka. Interakcije su podijeljene na vezne i nevezne.



Jednadžba polja sila (jednadžba 2.1) sastoji se od veznih (označenih crvenom bojom) i neveznih (označenih plavom bojom) interakcija. Detaljnije, vezni dio opisuje kemijske veze dva susjedna atoma, kutove veze između tri atoma i dihedralne kutove između četiri atoma. Kvadratnom funkcijom opisane su veze i kutevi, dok se dihedralni kutevi opisuju trigonometrijskim funkcijama.

U jednadžbi polja sila  $R$  je udaljenost između dva atoma  $i$  i  $j$  koji su povezani kovalentnom vezom,  $\theta$  je kut veze,  $R_{eq}$  i  $\theta_{eq}$  odnose se na ravnotežne duljine i kutove veze, a  $K_R$  i  $K_\theta$  su vibracijske konstante.  $V_n$  je torzijska barijera koja odgovara  $n$ -toj barijeri zadanog torzijskog kuta s fazom  $\gamma$ . Posljednji dio tipične jednadžbe polja sila odnosi se na nevezne interakcije, koje su sastavljene od Lennard-Jonesova potencijala za van der Waalove interakcije i Coulombovog potencijala za elektrostatske interakcije između atoma  $i$  i  $j$ .

$$\begin{aligned}
 V = & \sum_{\text{bonds}} K_R (R - R_{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
 & \text{bonded interactions} + \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \\
 & \text{non-bonded interactions} \qquad \qquad \qquad \downarrow \\
 & \text{Lennard-Jones term} \qquad \qquad \qquad \text{Coulomb term} \\
 & \text{(van der Waals interactions)} \qquad \qquad \text{(electrostatic interactions)} \\
 & V_{vdW} = \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] + V_{el} = \sum_{i < j} \left[ \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]
 \end{aligned}$$

**Jednadžba 2.1.** Osnovna jednadžba polja sila

Polja sile poput GROMOS, CHARMM, AMBER i OPLS uvelike se koriste za proučavanje interakcija kod biomolekularnih sustava poput proteina, DNK i RNA. Korekcije i proširenja polja sila za molekule od biološkog interesa, uključujući potencijalne lijekove, konstantno se razvijaju. Posebno relevantni pri dizajniranju lijekova su generalizirano AMBER sile polje (GAFF; engl. Generalized AMBER force field), CHARMM opće sile polje (CgFF; engl. CHARMM general force field) OLPS (Optimized Potentials for Liquid Simulations) koji daju prikladne parametre za računanje organskih molekula sličnih lijekovima. Glavna prednost upotrebe polja sila njihova je brzina u usporedbi s metodama temeljenim na kvantnoj mehanici. Iz tog razloga, daleko se najviše primjenjuju računalne metode zasnovane na polju sila. One uključuju molekulsko uklapanje, virtualni probir milijuna novih spojeva kako bi se identificirali potencijalni novi inhibitori, zatim *de novo* dizajn kao i klasične molekulsko-dinamičke simulacije.

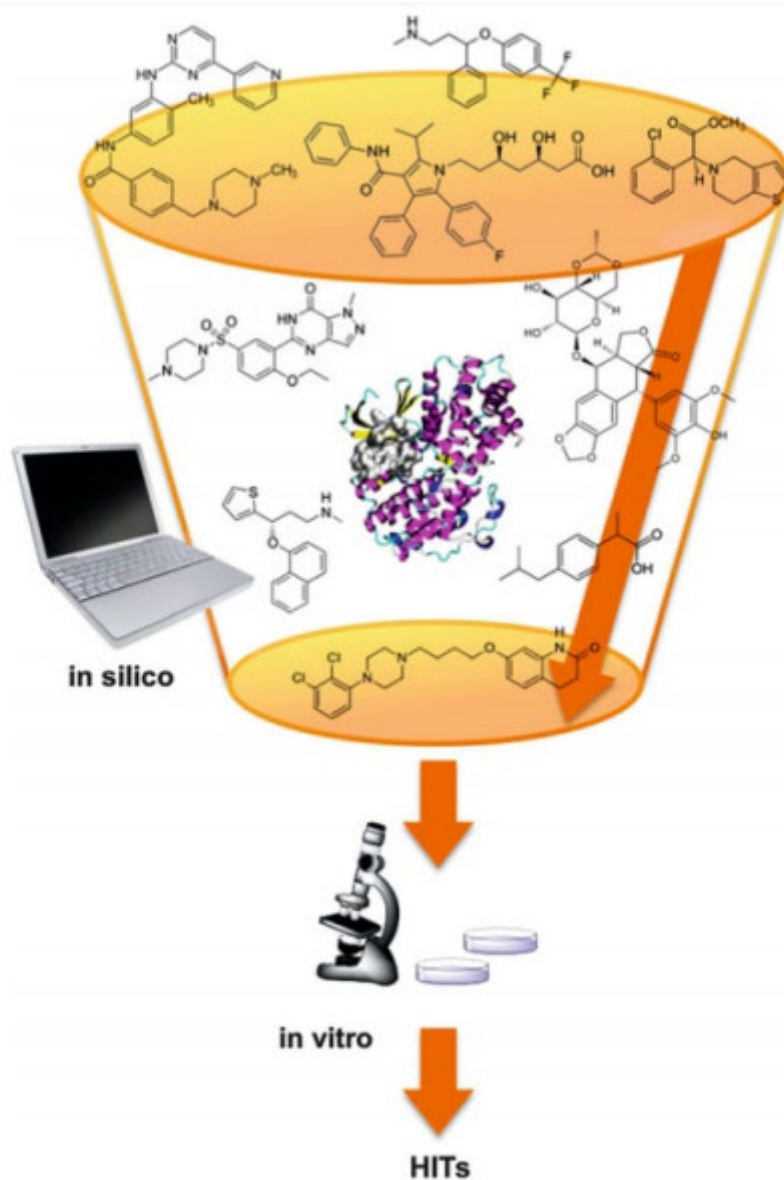
### **2.11.3. Virtualni probir i molekulsko uklapanje kod otkrivanja lijekova**

Virtualni probir (VS; engl. virtual screening) i molekulsko uklapanje široko su primijenjene računalne metode u dizajnu temeljenom na strukturi. Krajnji je cilj ovih metoda prepoznati spojeve koji dobro pristaju unutar aktivnog mjesta proteina. Ovi računalni pristupi većinom se koriste za identifikaciju molekula pogodaka i dizajn novih vodećih molekula. Spoj koji se može uklopiti u aktivno mjesto proteina vjerojatno će inhibirati njegovo djelovanje, te će tako pokazati povoljan kemijski motiv za daljnji dizajn novog lijeka.

GLIDE, GOLD, AUTODOCK i DOCK neki su od najkorištenijih računalnih programa za molekulsko uklapanje. Svi oni koriste se za identifikaciju novih bioaktivnih molekula iz mnoštva malih

molekula koje se mogu virtualno pregledati. Polazeći od velikih virtualnih biblioteka spojeva, koje se mogu sastojati od milijuna različitih malih molekula, protokoli virtualnog probira filtriraju te zbirke i grupiraju ih u manje setove spojeva s povoljnom predviđenom aktivnosti u odnosu na biološku metu.

Zatim se molekule pogodci koriste kao početna točka za razvoj vodećih molekula, tj. snažnijih inhibitora sa svojstvima sličnim lijeku. Molekulama pogodcima tada se eksperimentalno određuje inhibicijska aktivnost u vidu  $IC_{50}$  vrijedosti.  $IC_{50}$  vrijedost je koncentracija inhibitora potrebna za inhibiciju 50% aktivnosti proteina mete. U konačnici, molekule pogodci će se optimirati prema vodećim molekulama koje su snažniji inhibitori (slika 2.16.). Za molekule pogotke raspon  $IC_{50}$  vrijednosti obično iznosi 10–100  $\mu$ M, dok vodeći spojevi imaju  $IC_{50}$  u nanomolarnom rasponu.



**Slika 2.16.** Tipični protokol započinje virtualnim probiranjem velike biblioteke spojeva naspram zadanog proteina mete.

#### 2.11.4. Računalni *de novo* dizajn molekula sličnih lijeku

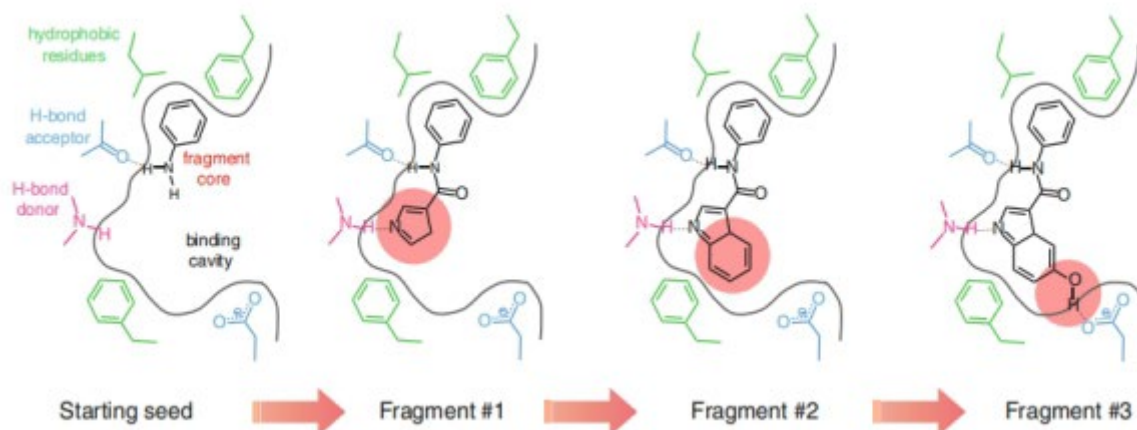
Računalni *de novo* dizajn novoga lijeka znači dizajnirati nove spojeve potpuno ispočetka, graditi ih izravno u veznom mjestu proteina. Kao i kod molekuskog uklapanja i virtualnog probira, krajnji je cilj istražiti kemijsku raznolikost i prepoznati spojeve pogotke koji se dobro

uklapaju u aktivno mjesto i potencijalno inhibiraju funkciju biološke mete. Računalni programi za *de novo* dizajn uključuju BOMB, GenStar, BUILDER, CONCERT i nekoliko drugih [108].

Proces dizajna novog liganda gradi molekulu izravno u veznom mjestu. Tada se pristupa rastu liganda ili povezivanju više malih fragmenata u jedan ligand kako bi se dobila molekula s dobrim predviđenim afinitetom naspram proteina mete. Metodom rasta liganda na centralni strukturni motiv dodaju se funkcionalne skupine koje mogu ostvariti interakciju s proteinom (slika 2.17.).

Suprotno tome, metoda povezivanja liganada koriste funkcionalne skupine za povezivanje dva ili više fragmenata, tvoreći tako jednu molekulu sličnu lijeku. U oba se postupka gradnja liganda provodi dodavanjem uobičajenih fragmenata lijeka. Na kraju se dobiveni spojevi testiraju na isti način kao kod virtualnog probira ili molekuskog uklapanja.

Glavna prednost *de novo* pristupa, kada se uspoređi s virtualnim probiranjem i molekuskim uklapanjem, je mogućnost istraživanja gotovo beskonačnog prostora kemijske raznolikosti. Procjenjuje se molekula sličnih lijeku ima između  $10^{60}$  i  $10^{100}$ . U ovom izuzetno velikom kemijskom prostoru, metoda *de novo* dizajniranja omogućuje korisniku i da se usredotoči na interesantne strukture, i brzo usmjeri prema obećavajućim strukturnim motivima koji se mogu dalje optimirati. Glavni problem je kombinatorna eksplozija zbog velikog broja mogućih kombinacija i potencijalnih novih spojeva. Osim toga, kemijski je prostor ograničen mogućnošću sinteze potencijalno zanimljivih spojeva. Oni lako mogu postati previše kompleksni da bi se sintetizirali u laboratoriju. Da bi se to izbjeglo, ograničenja u vidu mogućnosti sinteze često su uključena u protokole za *de novo* dizajn. Također se preporuča i bliska suradnja računalnih i sintetskih kemičara.



**Slika 2.17.** *De novo* oblikovanje liganda izvodi se izgradnjom svakog spoja unutar aktivnog mjesta. Odabrani centri za interakciju prikazani su: zelenom bojom (hidrofobni ostaci), plavom (akceptori H-veze) i ljubičasto (donori H-veze).

### 2.11.5. Kvantna mehanika (QM) u dizajnu temeljenom na strukturi (SBDD)

Kvantnomehantičke (QM) metode računalno su najzahtjevnije metode koje se koriste za karakterizaciju strukture, dinamike, reaktivnosti i energetike molekula. QM metode se uglavnom mogu podijeliti na *ab initio* metode i metode temeljene na teoriji funkcionala gustoće (DFT; engl. density functional theory). *Ab initio* QM metode temelje se na rješavanju Schrödingerove jednadžbe, tj. valne funkcije sustava. Razvijene su razne *ab initio* metode, od najjednostavnije Hartree-Fock (HF) teorije do složenije Møller-Plesset (MP) teorije perturbacije koja uključuje korelacijske elektronske efekte putem perturbacije na HF rješenje.

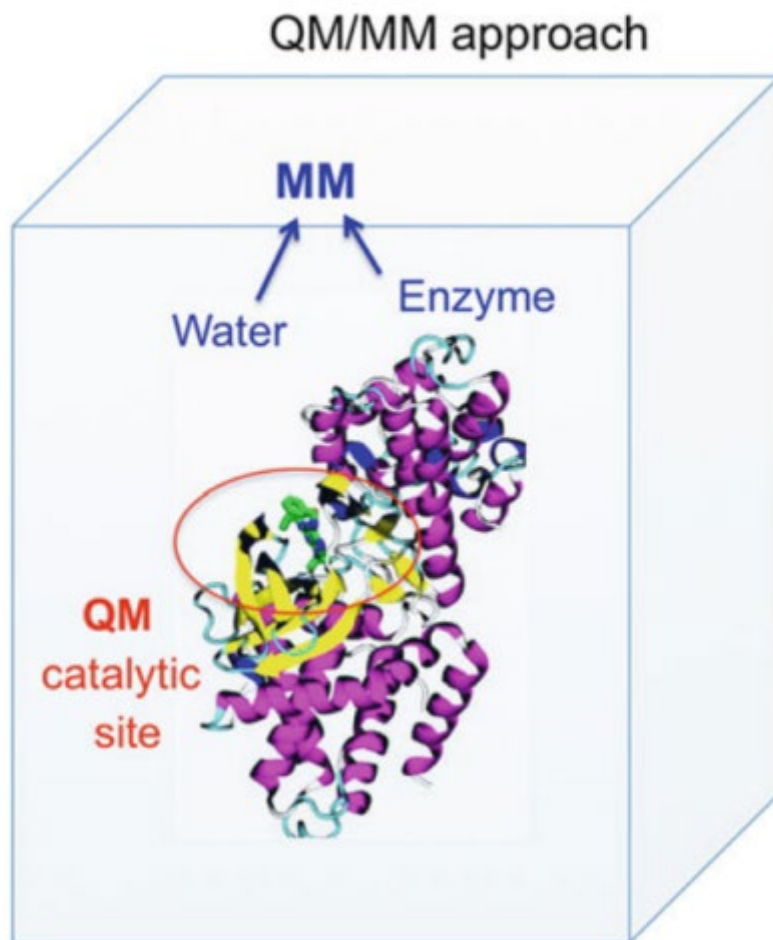
U teoriji funkcionala gustoće (DFT) središnja je ideja koju su 1964. godine predložili u svom teoremu Hohenberg i Kohn da je energija osnovnog stanja sustava koji sadrži elektrone u međudjelovanju jedinstven funkcional njegove elektronske gustoće. Danas su proračuni na

temelju teorije funkcionala gustoće metoda izbora za proučavanje elektronske strukture realnih biokemijskih sustava, zbog prilično dobre ravnoteže između točnosti i računalne složenosti. Pristup zasnovan na DFT teoriji u dizajniranju lijekova koristi se za uvid u svojstva sustava koja snažno ovise o elektronskoj strukturi, poput površine elektrostatskih potencijala koje se koriste za karakterizaciju veznog mjesta proteina ili za izračunavanja najvjerojatnijeg stanja protoniranja ključnih aminokiselinskih ostataka smještenih u veznom mjestu.

Funkcije bodovanja (engl. scoring functions) koje se koriste za procjenu afiniteta vezanja pri izračunu molekuskog uklapanja još je jedno područje primjene kvantne mehanike kod dizajna novih lijekova. Kvantna mehanika također je ključna i za razvoj parametara u molekuskjoj mehanici (MM)[109].

Kvantna mehanika se kod dizajna temeljenog na strukturi najčešća upotrebljava za proučavanje katalitičkih i inhibicijskih mehanizama kod farmakološki relevantnih enzima. Razumijevanje inhibicijskog mehanizma na atomskoj razini i njegove energetike može pružiti važan uvid i informacije za dizajn novih, snažnijih inhibitora kao poboljšanja postojećih lijekova.

Ipak, primjenjivost većine kvantnomehaničkih metoda ograničena je na proučavanje relativno malih molekuskjih sustava u plinskoj fazi, dok biološki sustavi u realnom solvatiranom okruženju obično sadrže okvirno 20.000 do 100.000 atoma. Ova slika postaje još daleko složenija kada se radi o membranskim proteinima, gdje lipidni dvosloj utječe na konformaciju biološke mete i vezivanje liganada. U ovom slučaju modelni se sustav može sastojati od 250 000 ili više atoma, čineći kvantnu mehaniku neprimjenjivom[110, 111]. Da bi se prevladao takav problem, kvantnomehaničke metode obično su uparene s klasičnom molekuskjom mehanikom te tako čine hibridni QM / MM pristup.



**Slika 2.18.** QM / MM pristup. Mali dio enzima i ligand opisuju se kvantnom mehanikom, dok se ostatak sustava, opisuje molekulskom mehanikom.

Takav pristup omogućava da se ključni dio sustava (aktivno mjesto proteina i ligand), u kojem se odvija interakcija, tretira na razini kvantne mehanike, dok je ostatak sustava opisan klasičnim poljem sila molekulske mehanike. Od svog pojavljivanja 1976. godine, QM/MM pristup postaje sve više korišten u proučavanju mehanizama enzimskih reakcija[112]. U suvremenoj računalnoj kemiji bio je od najvećeg značaja jer je omogućio modeliranje velikih i složenih kemijskih sustava. Znanstveni značaj QM/MM pristupa prepoznat je i Nobelovom nagradom za kemiju koju su Arieh Warshel, Michael Levitt i Martin Karplus za svoj rad primili 2013. godine.

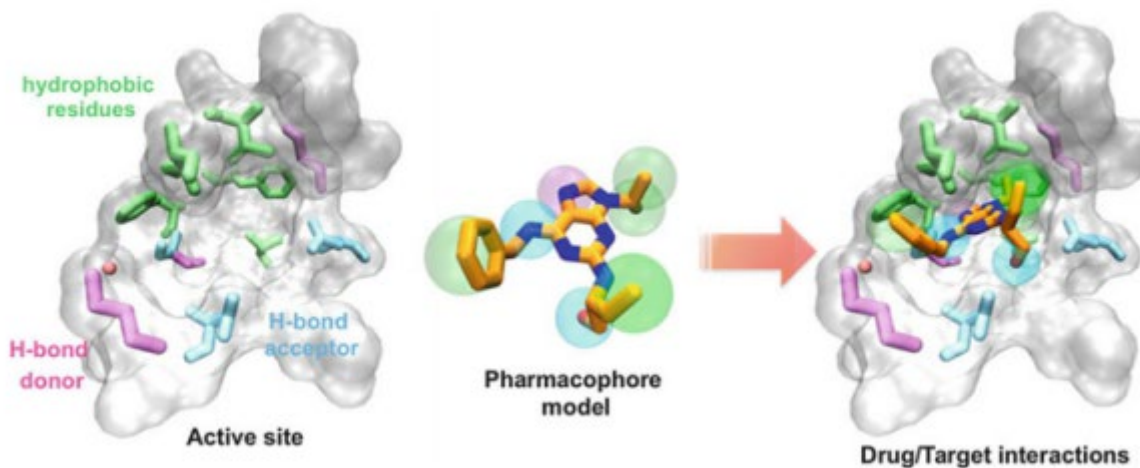


Za proučavanje bioloških sustava, QM/MM hibridna teorija uspješno je spojena s *ab initio* metodama molekulske dinamike, kao kod Car-Parrinellove ili Born-Oppenheimerove molekulske dinamike. Na taj se način simuliraju modelni sustavi s nekoliko stotina atoma (aktivno mjesto proteina i ligand) uključujući entropijske efekte i utjecaj otapala. Car-Parrinellova metoda molekulske dinamike široko se koristila za proučavanje brojnih farmakološki važnih biološkihmeta, uključujući fosfataze, hidrolaze i laktamaze[106, 110].

*Ab initio* molekulska dinamika omogućava razumijevanje katalitičkih i inhibicijskih mehanizama u biološkom sustavu na atomskoj razini, pružajući rezultate koji se izravno mogu usporediti s eksperimentalnima. Praktična upotreba tih izračuna na visokoj razini čini se primjenjivijom u fazi optimizacije vodeće molekule, dok se mnogo šira primjena metoda temeljenih na kvantnoj mehanici očekuje za dizajn temeljen na strukturi[109, 112].

#### **2.11.6. Dizajn lijekova temeljen na ligandu (LBDD)**

Pristup dizajniranju lijekova zasnovan na ligandu (LBDD; engl. ligand based drug design) primjenjuje se kada trodimenzionalna struktura proteina mete nije poznata ili kad nije potpuno pouzdana (npr., homologni modeli)[102]. U ovom se slučaju obično podaci o eksperimentalnim aktivnostima spojeva koriste za izradu farmakofornog modela. Ovi modeli uključuju zbir steričkih i elektronskih značajki - deskriptora za koje se smatra da su dogovorni za aktivnost.



**Slika 2.19.** Primjer farmakofornog modela. Ključni aminokiselinski ostaci obojani su: u zelenoj boji (hidrofobni ostaci), plavoj boji (akceptori H-veze) i ljubičasto (donori H-veze). Regije liganda koje odgovaraju tim vrstama interakcije označene su istom bojom

Tipični deskriptori su fizikalno-kemijska svojstva kao što su molekulska masa, geometrija, dostupna površina, elektronegativnost, polarizabilnost, indeks aromatičnosti i solvatacija. Općenito, pogodan skup deskriptora trebao bi pokriti široku kemijsku raznolikost. Na taj će način lakše biti prepoznati značajni deskriptor za izgradnju farmakofornog modela. On se tada koristi za identifikaciju novih aktivnih spojeva u virtualnoj biblioteci molekula sličnih lijekovima. Isti principi vrijede za metode molekulske sličnosti, gdje se određena geometrijska ili fizikalno-kemijska svojstva koriste za prepoznavanje novih aktivnih spojeva. Koeficijent sličnosti, kao što su Tanimoto ili euklidski koeficijent koristi se tada da bi se utvrdilo mogu li novi spojevi djelovati na zadanu metu[105].

Geometrijski i elektronski deskriptori koriste se za izradu kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (QSAR; engl. quantitative structure-activity relationship), što daje matematički

model koji može predvidjeti biološku aktivnost novih spojeva. Na primjer, podaci o aktivnosti molekula mogu se koristiti za izgradnju matematičkih modela za ranu predikciju aktivnosti ili na primjer, metaboličkih svojstava koja bi mogla kasnije stvoriti probleme s toksičnošću. 3D QSAR modeli uzimaju u obzir skup konformacija, orijentacija, tautomera, stereoizomera i stanja protoniranosti početnog skupa liganada.

Također se razvijaju i multidimenzionalni 4D ili 5D QSAR modeli koji uzimaju u obzir i energetske doprinose vezanja liganda, uključujući energiju solvatacije i konformacijsku entropiju. Obično se linearna regresija i analiza glavnih komponenti (PCA; engl. principal component analysis) mogu kombinirati za djelomičnu analizu najmanjih kvadrata (PLS; engl. partial least square) koja izravno povezuje reducirani skup deskriptora s biološkom aktivnosti. No često je veza između deskriptora i biološke aktivnosti nelinearna. Stoga su razvijeni i nelinearni regresijski modeli koji koriste algoritme strojnog učenja, poput algoritma umjetnih neuronskih mreža (engl. Neural network methods)[113].

Apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost (ADMET) ključni su parametri koji se mogu optimirati QSPR pristupom kako bi se dobio kandidat za lijek s pogodnim farmakokinetičkim (PK) profilom. ADMET i PK svojstva presudna su za uspjeh razvoja novih lijekova. Loš PK profil može rezultirati brzim metabolizmom i eliminacijom spoja iz tijela. Supstanca slična lijeku trebala bi biti okarakterizirana određenim fizikalno-kemijskim svojstvima, koja su opisana pravilima Lipinskog koja kažu da bi optimalni oralno bioraspoloživi lijekovi trebali imati molekulsku masu manju od 500, manje od 5 donora vodikove veze i manju od 10 akceptora vodikove veze, dok bi logP (koeficijent razdvajanja u sustavu oktanola i voda) trebao biti ispod 5. Usprkos svojoj praktičnoj primjeni za brzu evaluaciju spojeva, danas je jasno da ovo pravilo može procijeniti spoj samo isticanjem potencijalno nepovoljnih fizikalno-kemijskih svojstava[114]. Zapravo, mnogi odobreni lijekovi, poput makrolidnih antibiotika s molekulskom masom većom od 1000 odstupaju u jednom ili više deskriptora od pravila

Lipinskoga, dok zadržavaju povoljna fizikalno-kemijska svojstva. Ostale karakteristike također mogu jako utjecati na PK profil. Za idealnu apsorpciju i distribuciju preporuča se topljivost u vodi iznad  $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>. Transportna svojstva, poput stanične permeabilnosti i hoće li supstanca biti supstrat za P-glikoproteinsku crpku ili neki drugi membranski transporter također se moraju uzeti u obzir.

Uz to, metabolički enzimi poput citokroma P450 (CYP) mogu u velikoj mjeri utjecati na krajnje terapijsko djelovanje te interakciju s njima treba razmotriti u ranim fazama programa. Za određenu molekulsku strukturu izračunavaju se svojstva poput topljivosti, stanične permeabilnosti, koeficijenta particije, prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, vezivanja na proteine u plazmi i stvaranja metabolita, te se uspoređuju s bazom podataka poznatih lijekova. Računalni alati i metode za predviđanje ADMET svojstava stvaranje prediktivnih statističkih modela su stoga vrijedni važni za odabir, prioritizaciju sinteze i optimizaciju perspektivnih vodećih molekula.

### **2.11.7. Preklapanje i analiza molekula na temelju molekulskih polja**

Analiza i preklapanje molekula na temelju molekulskih polja primjenjena je u Cresset računalnom paketu. Cresset tehnologija koristi XED polja sila u dizajnu bioaktivnih molekula. XED pristup poboljšava tradicionalnu molekularnu mehaniku korištenjem složenog opisa atoma koji naboj stavlja van atomskih centara. To omogućava detaljniji opis elektrostatskih polja i bolje predviđanje intermolekularnih interakcija. XED polje sila dobro modelira utjecaj supstituenata na aromatske sustave, promjenu gustoće naboja kod složenih aromata i intermolekularne interakcije malih molekula, proteina i molekula vode.

Najvažniji faktor koji utječe na molekularno prepoznavanje su elektrostatske interakcije, ali također i oblik molekule i njena hidrofobnost. U Cresset računalnom paketu, elektrostatsko okruženje oko liganda ili proteina opisano je kao potencijal molekulske interakcije (MIP; engl. molecular interaction potential), odnosno polje. Potencijal molekulske interakcije opisuje sve energetske važne interakcije liganda s proteinom te može dati jasan uvid zašto se neki ligandi vežu jače od drugih. Opisivanje molekula molekulskim poljima, a ne 2D ili 3D strukturom, blisko je kemijskoj intuiciji te omogućava uspoređivanje molekula iz različitih kemijskih serija.

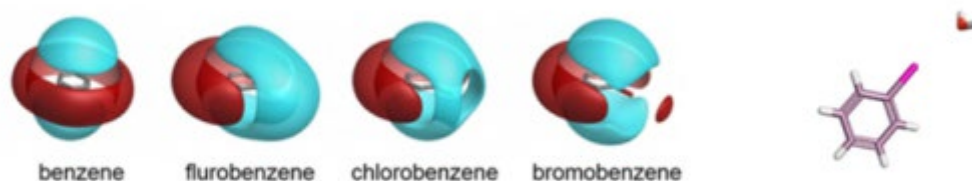
Za točan prikaz molekulskih polja, potrebno je i točno izračunavanje elektrostatskih potencijala. Kvantnomehanički izračuni mogu dati vrlo precizne elektrostatske potencijale, ali su u većini slučajeva još uvijek računalno zahtjevni i prespori. Zato je potrebna točna metoda izračunavanja elektrostatskih potencijala metodama molekularne mehanike.

Većina standardnih polja sila upotrebljava aproksimaciju naboja u centru atom (ACC; engl. atom-centred charge). Elektrostatski potencijal molekule aproksimira se skupom djelomičnih točkastih naboja na jezgri. Dostupne su mnoge metode za izračunavanje tih djelomičnih naboja (Gasteiger-Hückel, AM1-BCC, itd.), ali temeljni je model je jedan točkasti naboj po atomu. Ova metoda može biti dobra za izračun elektrostatskog potencijala na većim udaljenostima (npr., dipolni moment), ali loše opisuje elektrostatski potencijal u blizini molekulske površine. To je zato što atomi nisu nabijene sfere nego imaju i nepodijeljene elektronske parove,  $\pi$  orbitale,  $\sigma$  rupe i tako dalje. Pored toga, atomi i molekule su polarizabilni i mijenjaju svoju elektrostatiku kao odgovor na vanjska električna polja. ACC model ne pokriva niti jedan od ovih efekata. Novija polja sila poput AMOEBA-e rješavaju ovaj problem postavljanjem eksplicitnih multipola i polarizacijskih funkcija na atome, što daje mnogo realniji elektrostatski potencijal. Ova polja sila dobro opisuju proteine, ali su uglavnom neprikladna za modeliranje liganada.

XED polje sila bio je prvi pomak točnijem izračunavanju elektrostatskih potencijala, i to ne postavljanjem eksplicitnih multipola na atome, već postavljanjem dodatnih monopola oko njih.

Dodatne monopolske točke, ili XED (eXtended Electron Distribution), tretiraju se unutar polja sila kao atomi s nulnim van der Waalsovom radijusom. One nisu u rigidnom geometrijskom odnosu sa svojim roditeljskim atomom. Umjesto toga, one dolaze s potencijalima istezanja veze i savijanja kuta i mogu se kretati pod utjecajem vanjskih (i intramolekularnih) elektrostatskih potencijala, omogućujući izravno modeliranje polarizabilnosti.

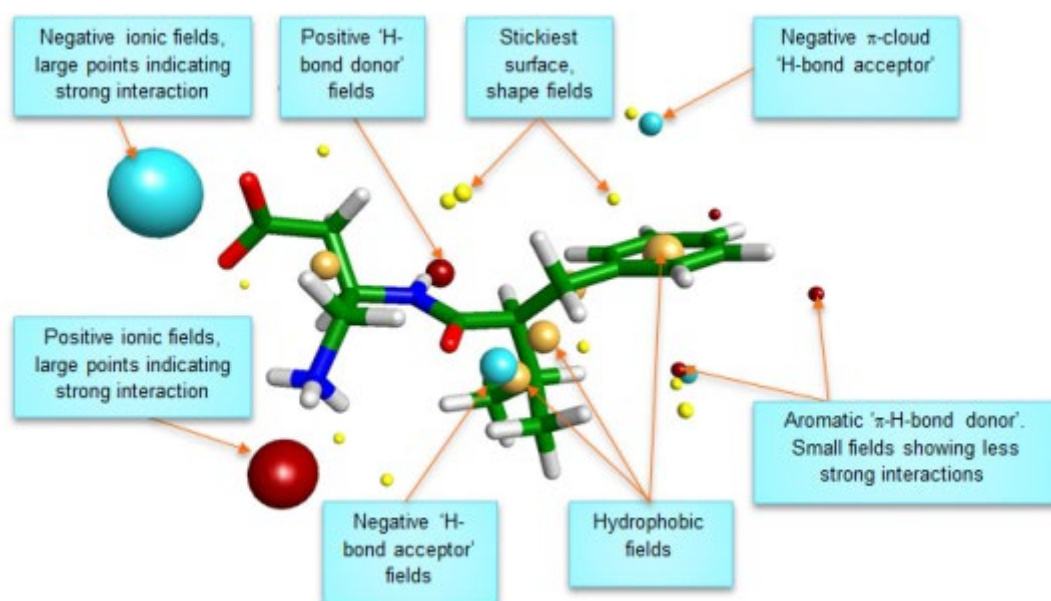
Tijekom posljednjih 20 godina XED polje sila dobilo je brojna poboljšanja. Za razliku od većine drugih polja sile, XED polje sile je parametrizirano gdje je to moguće na osnovu eksperimentalnih podataka te se ne oslanja isključivo na *ab initio* proračune.



**Slika 2.20.** Primjeri XED polja za različito supstituiran benzenski sustav

Radi računalne učinkovitosti, Cressetova tehnologija polja kondenzira molekularna polja u set točaka oko molekule koje se nazivaju točkama polja. Točke polja su lokalni ekstremi elektrostatskih, van der Waalsovih i hidrofobnih potencijala molekule. Oni se mogu smatrati produženim farmakoforima, s time što se njihov položaj izravno izračunava iz fizikalnih

svojstva molekule, a s njima su povezane i informacije o njihovoj veličini i jakosti. Na primjer, nisu svi donori vodikovih veza isti, neki čine jače veze od drugih. Određivanje točaka polja detaljno je opisano u literaturi[115]. Četiri tipa polja polja koriste se za opisivanje svih potencijalnih interakcija koje ligand u određenoj 3D konformaciji može imati s proteinom kao što je prikazano na slici 2.21.



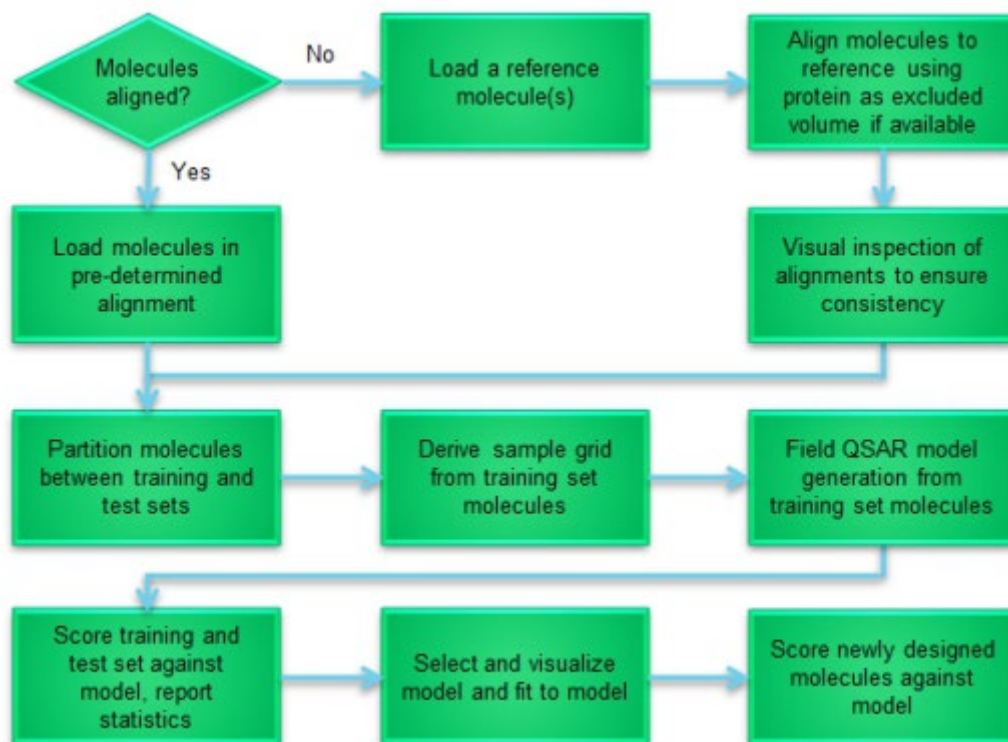
**Slika 2.21.** Vrste polja u Cresset programskom paketu za opisivanje potencijala liganada: pozitivno elektrostatsko polje (crveno), negativno elektrostatsko polje (plavo), polje van der Waalsovog potencijala (žuto), hidrofobno polje (narančasto). Veličina sfere ukazuje na snagu potencijala za ostvarivanje interakcije.

Cresset računalni paket skup je alata koji se koristi za dizajn molekula na temelju struktura poznatih liganada (engl. Ligand-based drug design), te (SAR , engl. structure – activity relationship) za istraživanje odnosa između strukture i aktivnosti koristeći molekulska polja.

Radi na način da izračunava i koristi preklapanja molekulskih polja za usporedbu molekula unutar kemijskih serija. Ovaj alat može pomoći u dizajnu kemijskih biblioteka i za određivanje prioriteta pri sintezi spojeva.

3D QSAR modeli razvijeni na raznovrsnom skupu aktivnih molekula doprinose razumijevanju čimbenika potrebnih za inhibiciju enzima, te na taj način pomaže medicinskom kemičaru u dizajniranju novih aktivnih molekula.

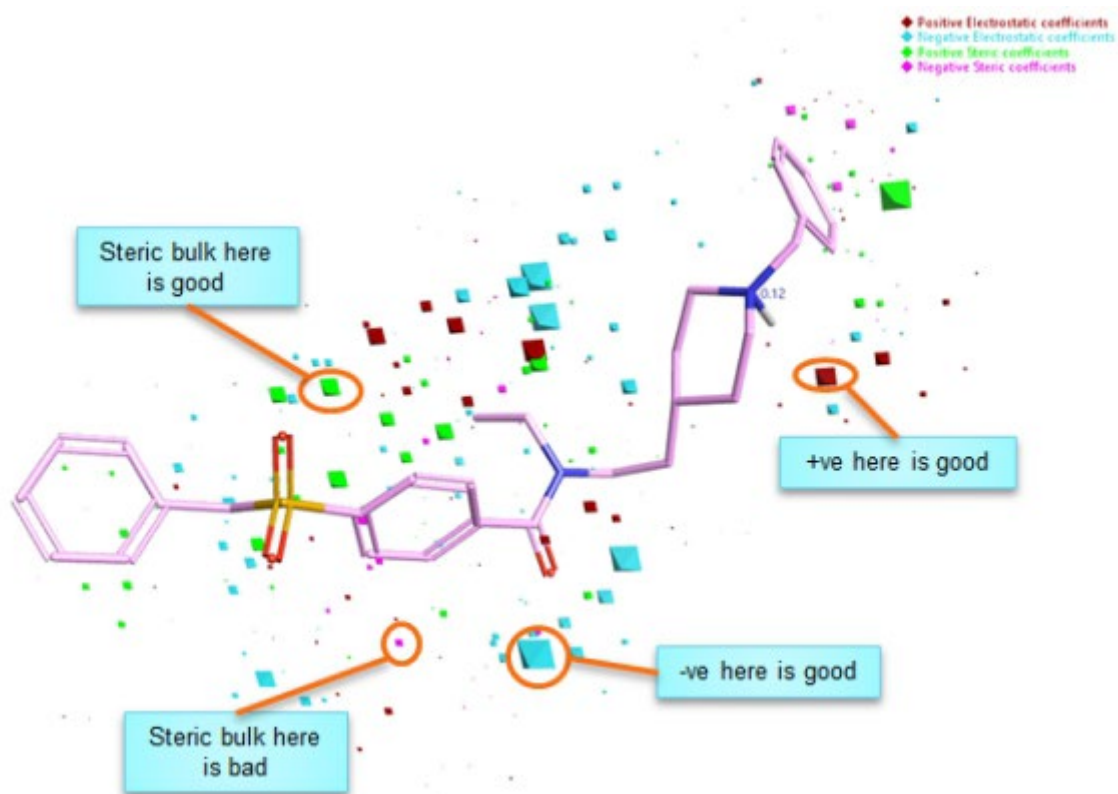
Za izgradnju 3D QSAR modela u Forge računalnom programu potrebno je 30-40 molekula čiji se raspon aktivnosti proteže preko optimalno 3 reda veličine. QSAR model znatno je lakše razviti i razumjeti kada je izveden iz jedne kemijske serije, ili nekoliko strukturno sličnih kempotipova koji se mogu jednoznačno preklopiti. Diagram razvoja 3D QSAR modela prikazan je na slici 2.22.



Slika 2.22. Shematski prikaz tijeka rada za izradu 3D QSAR modela



Nakon izračuna QSAR modela temeljenog na poljima, korisni podaci se mogu dobiti pregledom u 3D obliku.



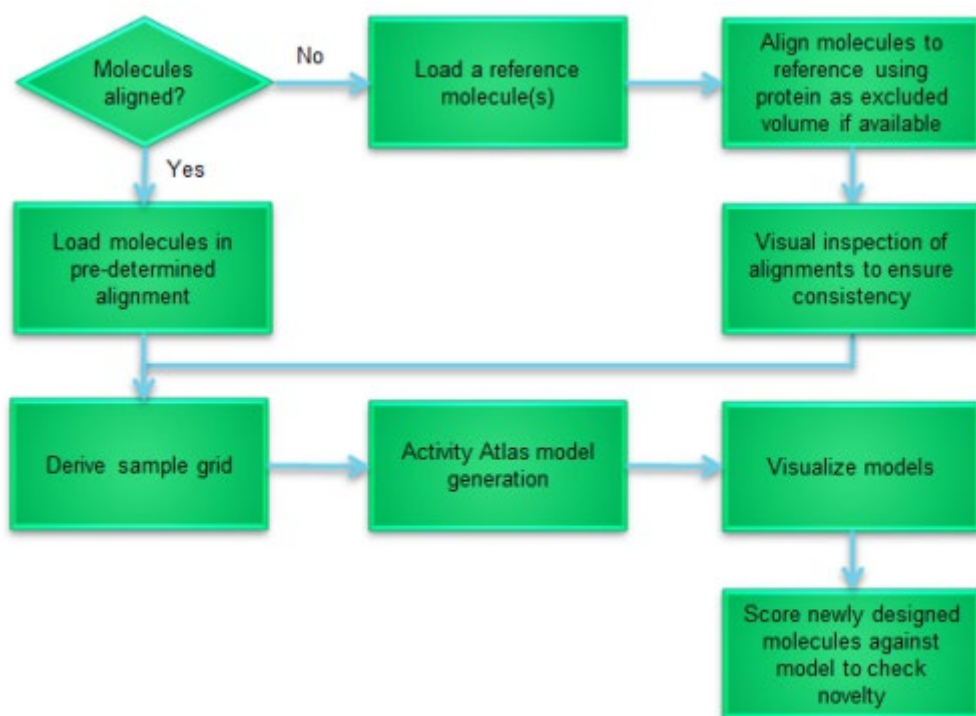
| Field kind  |  | Name                   | Meaning  |
|---|--|------------------------|--|
| Field QSAR Model coefficients.<br>Press Ctrl-1 or Ctrl-2 to toggle on/off.  |  | Positive               | More positive/less negative electrostatic potential leads to higher activity                               |
|   |  | Negative               | More negative/less positive electrostatic potential leads to higher activity                               |
|   |  | Sterics+               | More steric bulk leads to higher activity  |
|   |  | Sterics-               | More steric bulk leads to lower activity (excluded region)   |
| Field QSAR Model variance.<br>Press Ctrl-Shift-1 or Ctrl-Shift-2 to toggle, or press and hold 'v' while model coefficients are shown. |  | Electrostatic variance | Larger points mean more difference in the electrostatic potential in this position across the training set |
|   |  | Steric variance        | Larger points mean more difference in the steric potential in this position across the training set        |

**Slika 2.23.** Primjer interpretacije 3D QSAR modela

Ove točke modela pokazuju područje u kojem QSAR model na temelju polja smatra da lokalna polja imaju snažan utjecaj na aktivnost. Na primjer, velika pozitivna elektrostatska točka

ukazuje da je model pronašao jaku povezanost između pozitivnog elektrostatskog polja na tom položaju i veće vrijednosti aktivnosti. Pritom treba imati na umu da se "pozitivniji" podjednako može interpretirati i kao "manje negativan". To može značiti da stavljanje snažnih donora vodikove veze u tu regiju poboljšava aktivnost, ili jednako tako može značiti da stavljanje snažnih akceptora H-veze pogoršava aktivnost.

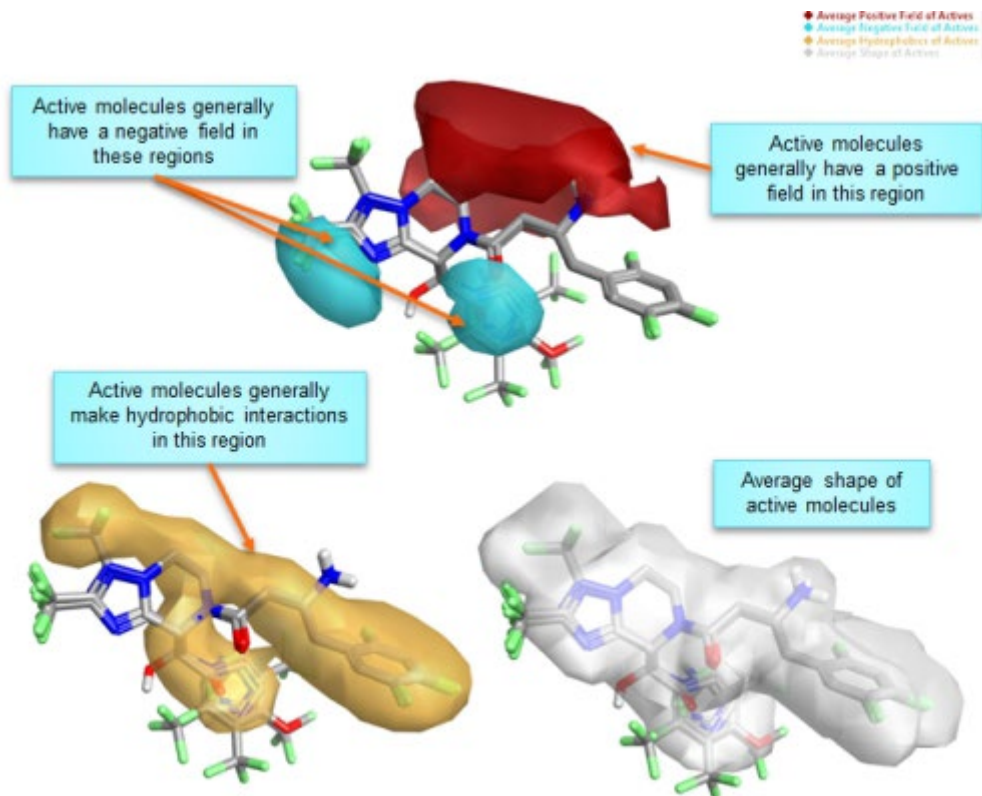
U slučajevima kada set podataka ne omogućava razvoj kvantitativnog modela koristi se protokol pod nazivom "Activity atlas" za razvoj kvalitativnog modela kao što je prikazano na slici 2.24.



**Slika 2.24.** Shematski prikaz tijeka rada za izradu kvalitativnog modela „Activity atlas“ protokolom

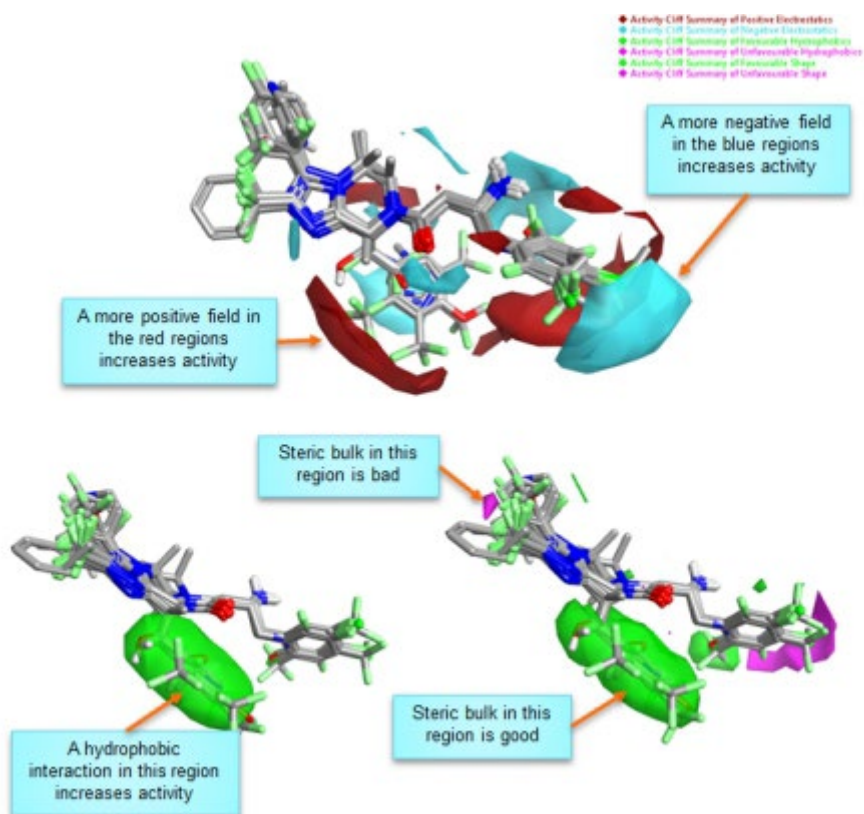
Rezultat kvalitativnog modela je po-općena verzija farmakofornog modela tj. prosjek elektrostatskih i hidrofobnih molekulskih polja za set aktivnih molekula.

a)



| Field kind   |  | Name                              | Meaning  |
|--|--|-----------------------------------|--|
| Average Electrostatics of Actives.<br>Press Ctrl-1 to toggle on/off. |  | Average Positive Field of Actives | Active molecules in general have a positive field in this region         |
|  |  | Average Negative Field of Actives | Active molecules in general have a negative field in this region         |
| Average Hydrophobics of Actives.<br>Press Ctrl-2 to toggle on/off.   |  | Average Hydrophobics of Actives   | Active molecules in general make hydrophobic interactions in this region |
| Average Shape of Actives.<br>Press Ctrl-3 to toggle on/off.          |  | Average Shape of Actives          | Average shape of active molecules  |

b)



| Field kind  |  | Name                     | Meaning  |
|---|--|--------------------------|--|
| Activity Cliff Summary of Electrostatics.<br>Press Ctrl-4 to toggle on/off. |  | Positive Electrostatics  | More positive/less negative electrostatic potential leads to higher activity |
|   |  | Negative Electrostatics  | More negative/less positive electrostatic potential leads to higher activity |
| Activity Cliff Summary of Hydrophobics.<br>Press Ctrl-5 to toggle on/off.   |  | Favorable Hydrophobics   | An hydrophobic interaction in this region leads to higher activity           |
|   |  | Unfavorable Hydrophobics | An hydrophobic interaction in this region leads to lower activity            |
| Activity Cliff Summary of Shape.<br>Press Ctrl-6 to toggle on/off.          |  | Favorable Shape          | More steric bulk leads to higher activity                                    |
|   |  | Unfavorable Shape        | More steric bulk leads to lower activity (excluded region)                   |

**Slika 2.25.** Primjer interpretacije kvalitativnog modela. **a)** Uprosječna svojstva aktivnih molekula; **b)** Activity Cliff analiza

Prosječni elektrostatski potencijal aktivnih molekula pokazuje regije u kojima, prema Activity Atlas modelu, aktivne molekule općenito imaju ili pozitivno ili negativno polje. Kako je polje povezano s višom biološkom aktivnosti, nove molekule koje pokazuju bilo pozitivno ili

negativno polje u istoj regiji i imaju odgovarajući oblik i hidrofobne interakcije, također bi trebale biti aktivne. Uprosječene hidrofobne regije pokazuju područja u kojima aktivne molekule generalno ostvaruju pozitivne hidrofobne interakcije s metom. Prikazan je također i uprosječni oblik aktivnih molekula.

Activity atlas također omogućava određivanje onih molekulskih polja koja pri maloj promjeni značajno utječu na promjenu aktivnosti (engl. Activity cliffs).

Activity Cliff analiza pokazuje regije, gdje će pozitivnije polje (u crvenim regijama) i / ili negativnije polje (u plavoj regiji) povećati aktivnost. Treba obratiti pažnju na to da se pozitivnije polje podjednako može interpretirati i kao manje negativno. To znači da stavljanje snažnih donora vodikove veze u tu regiju poboljšava aktivnost, ali jednako tako može značiti da stavljanje snažnog akceptora vodikove veze u toj regiji pogoršava aktivnost. Molekule treba promatrati u kontekstu cjelokupnog skupa podataka.

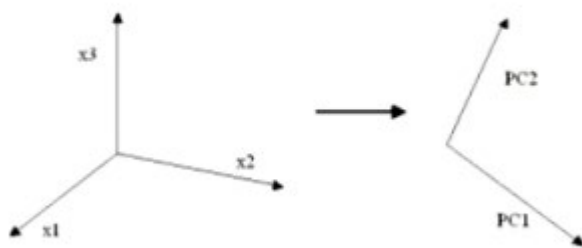
Activity Cliff analiza hidrofobnih regija pokazuje gdje je povećanje hidrofobnih interakcija povoljno (zelena područja), odnosno nepovoljno (magenta regije) za biološku aktivnost. Activity Cliff analiza oblika pokazuje regije u kojima je sterički efekt povoljan, zelena, odnosno nepovoljan, magenta.

## 2.12. PLS analiza

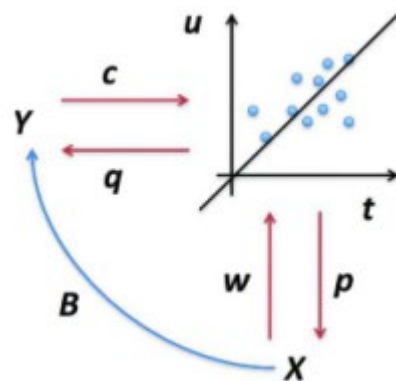
PLS metoda[116] statistički je pristup široko korišten u kemometriji, posebno u slučaju kada je broj nezavisnih varijabli veći od broja točaka podataka.

PLS metoda je regresijska inačica metode glavnih komponentata koja se temelji na projekciji višedimenzionalnog prostora u 2 ili 3D prostor opisan međusobno ortogonalnim glavnim komponentama (engl. Principal components):

a)



b)



**Slika 2.26.** Shematski prikaz PLS analize. Dva seta podataka  $X$  i  $Y$  projiciraju se vektorima udjela  $w$  i  $c$  na latentne komponente,  $t$  i  $u$ , te se provodi regresija najmanjeg kvadrata.  $p$  i  $q$  su vektori koeficijenata nezavisnih varijabli

Djelomična analiza najmanjih kvadrata (PLS) metoda je za izgradnju prediktivnih modela kad postoji mnogo faktora (deskriptora) mogu biti međusobno kolinearni. Osim predviđanja zavisnih varijabli, iz PLS modela se mogu zaključiti i odnosi između nezavisnih varijabli te njihov doprinos veličini/procesu koji se modelira. Time je moguće razviti i mehanistički model, tj. statističkim pristupom istražiti jednostavnije faktore koji utječu na složeniju zavisnu varijablu.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. Opće napomene

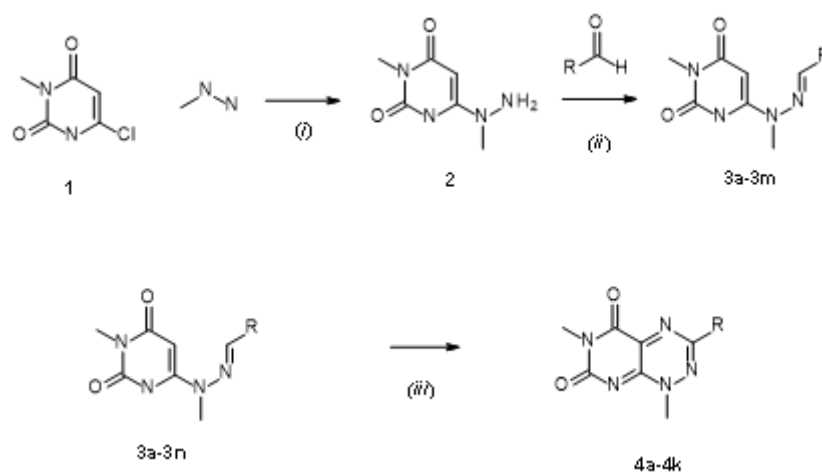
Korištena otapala i kemikalije u eksperimentima bili su analitičke čistoće. Termin “sobna temperatura” odnosi se na temperaturni interval od 20 do 25 °C.

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su na spregnutom sustavu tekućinske kromatografije i masenog spektrometra te UV spektrofotometra (LC/MS/UV), Acquity UPLC sa SQD masenim detektorom proizvođača Waters i tankoslojnom kromatografijom na aluminijskim pločicama Merck Silica gel 60 F254 veličine čestica 10 µm. Detekcija je provedena pomoću UV svjetla valne duljine 254 nm ili/i 365 nm.

Produkti su izolirani kromatografijom na stupcu pri čemu su korištene komercijalno dostupne kolone na krutom nosaču proizvođača Interchim Puriflash 450 na automatiziranom sustavu (Interchim Puriflash 450). Spojevi koji su korišteni u biološkim ispitivanjima čišćeni su na vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masenog spektrometra te UV spektrofotometra (HPLC/MS/UV): Waters Mass Directed Auto Purification System with ZQ mass spectrometer. NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance DRX 300 (300 MHz), Bruker Avance DRX 400 (400 MHz), Bruker Avance DRX 500 (500 MHz) i Bruker Avance III 600 (600 MHz) spektrometrima uz tetrametilsilan (TMS, (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si) kao interni standard. Kao otapalo korišten je deuterirani dimetil-sulfoksid (DMSO-d<sub>6</sub>).

*In vitro* ispitivanja djelovanja pripremljenih spojeva provedeno je u *In vitro* laboratoriju pod vodstvom dr.sc. Dubravka Jelića, dok su *in vitro* farmakološka svojstva nosintetiziranih spojeva ispitivana u *In vitro* ADME laboratoriju pod vodstvom dr.sc. Astrid Milić.

## 3.2. Kemijske sintetske metode



**Shema 3.1.:** Priprava spojeva. (i): metilhidrazin, EtOH, MW, 100°C, 10 min; (ii): aldehid, EtOH, MW, 100°C, 10 min; (iii): NaNO<sub>2</sub>, octena kiselina/ voda, 0°C to RT

### Općenita procedura:

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (1eq.) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq.). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100 ° C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je aldehid dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100 ° C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietileterom te sušen u vacuum sušnici. Sirovi produkt koristi se u sljedećem sintetskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja. kako bi se dobio produkt **3**.

Produkt **3** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6-18 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se

spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio ciklički produkt **4**.

### 3.2.1. Priprava necikličkih spojeva, **3a-3m**

#### 3.2.1.1. (6 - [[(E) -benzilideneamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, (**3a**), FID1685-001A1):

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06  $\mu$ l). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je benzaldehid (1,6eq; 105,75mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100 ° C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3a** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz,  $\delta$  ppm): 3,11 (s, 3H), 3,35 (s, 3H), 5,25 (s, 1H), 7,36-7,46 (m, 3H), 7,97 (s, 1H), 7,98 (s, 2H), 10,66 (s, 1H).

MS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=259,52 m/z

#### 3.2.1.2. 4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-diokso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] - benzonitril, **3b**

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06  $\mu$ l). Reakcijska posuda je zapečaćena i

podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 4-formilbenzonitril (1,6 eq; 130,67 mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3b** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,11 (s, 3H), 3,37 (s, 3H), 5,30 (s, 1H), 7,88 (d, 2H, J=8,0 Hz), 8,01 (s, 1H), 8,19 (d, 2H, J=8,11 Hz), 10,93 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=284,51 m/z

### ***3.2.1.3. (6 - [[(E) - (4-hidroksifenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3c***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06 μl). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 4-hidroksibenzaldehid (1,6 eq; 121,91 mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3c** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,11 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 5,18 (s, 1H), 6,80 (d, 2H, J=8,2 Hz), 7,80 (d, 2H, J=8,2 Hz), 7,89 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 10,50 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=275,51 m/z.

#### ***3.2.1.4. 4(6 - [[(E) - (4-metoksifenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3d***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06  $\mu$ l). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 4-metoksibenzaldehid (1,6 eq; 135,67 mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3d** čistoće 99% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz,  $\delta$  ppm): 3,11 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 5,19 (s, 1H), 6,99 (d, 2H, J=8,44 Hz), 7,90-7,95 (m, 3H), 10,60 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=289,58 m/z.

#### ***3.2.1.5. (4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-diokso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] benzensulfonamid, 3e***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06  $\mu$ l). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je formilbenzensulfonamid ((1,6eq; 184,56mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3e** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,12 (s, 3H), 3,37 (s, 3H), 5,29 (s, 1H), 7,41 (s, 2H), 7,85 (d, 2H, J=8,1 Hz), 8,02 (s, 1H), 8,17 (d, 2H, J=8,1 Hz), 10,85 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=338,51 m/z.

### ***3.2.1.6. (metil l- [4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-diokso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] fenil] ciklopropankarboksilat, 3f***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06 μl). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je metil-l- (4-formilfenil) ciklopropankarboksilata (1,6eq; 203,51mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3f** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 1,22 (s, 2H), 1,50 (s, 2H), 3,11 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,55 (s, 3H), 5,24 (s, 1H), 7,38 (d, 2H, J=8,22 Hz), 7,90 (d, 2H, J=7,76 Hz), 7,97 (s, 1H), 10,65 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=357,61 m/z.

### ***3.2.1.7. (3-metil-6- [metil - [(E) -2-feniletilideneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3g***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06 μl). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije.

Potom je 2-fenilacetaldehid (1,6eq; 119,72mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3g** čistoće 99% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,09 (s, 3H), 3,15 (s, 3H), 3,71 (d, 2H, J=5,4 Hz), 5,11 (s, 1H), 7,20-7,26 (m, 1H), 7,26-7,35 (m, 5H), 10,41 (s, 1H). ).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=273,55 m/z.

### **3.2.1.8. 8 (6 - *[[*(E)* -1 H-indol-3-ilmetileneamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3h***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06 μl). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 1H-indol-3-karbaldehid (1,6eq; 169,57mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3h** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,12 (s, 3H), 3,36 (s, 3H), 5,24 (s, 1H), 7,14-7,24 (m, 2H), 7,47 (d, 1H, J=7,75 Hz), 7,97 (s, 1H), 8,03 (d, 1H, J=7,55 Hz), 8,25 (s, 1H), 10,05 (s, 1H), 11,62 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=298,56 m/z.

### ***3.2.1.9. (3-metil-6- [metil - [(E) -1 H-pirololo [2,3-b] piridin-3-ylmethyleneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3i***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06  $\mu$ l). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 1H-pirololo [2,3-b] piridin-3-karbaldehid (1,6 eq; 145,63 mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3i** čistoće 95% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz,  $\delta$  ppm): 3,12 (s, 3H), 3,36 (s, 3H), 5,23 (s, 1H), 7,23 (m, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,29-8,32 (m, 1H), 8,41 (d, 1H, J=8,07 Hz), 10,25 (s, 1H), 12,14 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=299,56 m/z.

### ***3.2.1.10. (3-metil-6- [metil - [(E) -4-piridilmetileneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3j***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06  $\mu$ l). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je piridin-4-karbaldehid (1,6 eq; 106,74 mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3j** čistoće 99% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).



**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,12 (s, 3H), 3,37 (s, 3H), 5,32 (s, 1H), 7,92-7,97 (m, 3H), 8,62 (d, 2H, J=4,57 Hz), 10,91 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=260,54 m/z.

#### ***3.2.1.11. (3-metil-6- [metil - [(E) - (1-metil-2-okso-4-piridil) metilenamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, 3k***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06 μl). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 1-metil-2-okso-piridin-4-karbaldehid (1,6 eq; 136,65 mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3k** čistoće 94% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,11 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 3,49 (s, 3H), 5,23 (s, 1H), 6,32-6,37 (m, 1H), 7,82 (d, 1H, J=6,62 Hz), 7,94 (s, 1H), 8,54 (d, 1H, J=7,16 Hz), 10,71 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=290,53 m/z.

#### ***3.2.1.12. (6 - [[(E) - [2- (dimetilamino) fenil] metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3l***

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06 μl). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 2- (dimetilamino) benzaldehida (1,6 eq; 148,66 mg) dodan u reakcijsku smjesu.

Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3l** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 2,70 (s, 6H), 3,11 (s, 3H), 3,36 (s, 3H), 5,26 (s, 1H), 7,06 (t, 1H, J=7,56 Hz), 7,13 (d, 1H, J=8,14 Hz), 7,34 (t, 1H, J=7,85 Hz), 8,03 (s, 1H), 8,19 (d, 1H, J=7,85 Hz), 10,56 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=302,59 m/z.

### **3.2.1.13. (6 - [[(E) - (4-fluorofenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, 3m**

6-kloro-3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion (**1**) (1eq., 100mg) otopljen je u apsolutnom etanolu (2ml) te je dodan metilhidrazin (2,2eq., 72,06 μl). Reakcijska posuda je zapečaćena i podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C kako bi se dobio produkt **2** bez izolacije. Potom je 4-fluorbenzaldehyd (1,6 eq; 123,68 mg) dodan u reakcijsku smjesu. Reakcijska posuda ponovno je zapečaćena te podvrgnuta mikrovalnom zračenju 10 minuta na 100°C. Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i odfiltrirana pod utjecajem vakuuma. Rezultirajući talog trituiran je metanolom, zatim dietil-eterom te sušen u vakuum sušnici kako bi se dobio naslovni produkt **3m** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,11 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 5,23 (s, 1H), 7,23-7,29 (m, 2H), 7,98 (s, 1H), 8,06 (m, 2H), 10,76 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=277,53 m/z.

### **3.2.2. Priprava cikličkih spojeva, 4a-4m**

### *3.2.2.1. (1,6-dimetil-3-fenil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4a*

6 - [[(E) -benzylideneamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion; **3a** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4a** čistoće 94% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,29 (s, 3H), 4,06 (s, 3H), 7,59 (s, 3H), 8,20 (s, 2H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=270,50 m/z.

### *3.2.2.2. (4- (1,6-dimetil-5,7-diokso-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-3-il) benzonitril, 4b*

4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-diokso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] –benzonitril; **3b** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4b** čistoće 96% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,27 (s, 3H), 4,06 (s, 3H), 8,07 (s, 2H), 8,34 (s, 2H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=295,54 m/z.

**3.2.2.3. (3- (4-hidroksifenil) -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4c**

6 - [[[E] - (4-hidroksifenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion; **3c** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4c**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4c** čistoće 85% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,27 (s, 3H), 4,01 (s, 3H), 6,94 (d, 2H, J=7,83 Hz), 8,03 (d, 2H, J=8,17 Hz), 10,17 (s, 1H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=286,51 m/z.

**3.2.2.4. (3- (4-metoksifenil) -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4d**

6 - [[[E] - (4-metoksifenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion; **3d** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4d**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen

0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4d** čistoće 92% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,27 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 4,03 (s, 3H), 7,14 (d, 2H, J=8,65), 8,13 (d, 2H, J=8,37).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=300,53 m/z.

#### ***3.2.2.5. 4- (1,6-dimetil-5,7-diokso-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-3-il) benzensulfonamid, 4e***

4-[(E)-[metil-(3-metil-2,4-diokso-1H-pirimidin-6-il)hidrazono]metil]bensensulfonamid; **3e** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4e**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4e** čistoće 89% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,29 (s, 3H), 4,07 (s, 3H), 7,54 (s, 2H), 8,03 (d, 2H, J=8,30 Hz), 8,36 (d, 2H, J=8,30 Hz).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=349,54 m/z.

### ***3.2.2.6. (metil l- [4- (l, 6-dimetil-5,7-diokso-pirimido [5,4-e] [l, 2,4] triazin-3-il) fenil] ciklopropankarboksilat, 4f***

metil l- [4 - [(E) - [metil- (3-metil-2,4-diokso-1H-pirimidin-6-il) hidrazono] metil] fenil] ciklopropankarboksilat; **3f** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4f**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4f** čistoće 99% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 1,27 (s, 2H), 1,54 (s, 2H), 3,28 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 4,05 (s, 3H), 7,55 (d, 2H, J=7,89 Hz), 8,12 (d, 2H, J=7,89).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=368,605 m/z.

### ***3.2.2.7. (3-benzil-1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4g***

3-metil-6- [metil - [(E) -2-feniletideneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion, **3g** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4g**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4g** čistoće 85% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,23 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 4,22 (s, 1H), 4,46 (s, 1H), 7,20-7,34 (m, 5H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=284,51 m/z.

#### ***3.2.2.8. (1,6-dimetil-3- (4-piridil) pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4j***

3-metil-6- [metil - [(E) -4-piridilmetileneamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion; **3j** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4j**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4j** čistoće 91% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,29 (s, 3H), 4,07 (s, 3H), 8,08 (s, 2H), 8,82 (s, 2H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=271,53 m/z.

#### ***3.2.2.9. (5-hydroxy-2,8-dimethyl-4- (1-methyl-2-oxo-4-pyridyl) -2,3,5lambda5,8,10-pentazabicyclo [4.4.0] deca-1 (10), 3,5-triene-7,9-dione, 4k***

metil-6- [metil - [(E) - (1-metil-2-okso-4-piridil) metilenamino] amino] -1 H-pirimidin-2,4-dion; **3k** (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše

nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4k**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4k** čistoće 97% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,17 (s, 3H), 3,50 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 6,39 (m, 1H), 7,68 (d, 2H, J=7,07 Hz), 7,99 (d, 2H, J=6,39 Hz).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=317,54 m/z.

### ***3.2.2.10. (3- [2- (dimetilamino) fenil] -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4l***

(Dimetilamino) fenil] metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, **3l** (1 eq, 1 mmol)otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4l**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4l** čistoće 91% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 2,55 (s, 3H), 2,65 (s, 3H), 3,27 (s, 3H), 4,01 (s, 3H), 6,97-7,05 (m, 1H), 7,08-7,15 (m, 1H), 7,38-7,48 (m, 2H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=313,57 m/z.



### 3.2.2.11. (3- (4-fluorofenil) -1,6-dimetil-pirimido [5,4-e] [1,2,4] triazin-5,7-dion, 4m

6 - [[[E] - (4-fluorofenil) metilenamino] -metil-amino] -3-metil-1H-pirimidin-2,4-dion, **3m**; (1 eq, 1 mmol) otopi se u smjesi octene kiseline (7 ml) i vode (0,7 ml). Reakcijska se smjesa ohladi u ledenoj kupelji na 0 ° C i doda se natrijev nitrit (1,5 ekv.). Nakon 6 sati reakcijska smjesa se razrijedi s vodom te se ekstrahira s diklorometanom. Organski slojevi se spoje, osuše nad natrijevim sulfatom, profiltriraju te upare pod sniženim tlakom kako bi se dobio sirovi produkt **4m**. Sirovi produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu. Gradijent je podešen 0-10% MeOH / EtOAc u 25 kolonskih volumena. Odgovarajuće frakcije su spojene i uparene pod sniženim tlakom kako bi se dobio naslovni produkt **4m** čistoće 100% prema UPLC-MS-u (UV, 254 nm).

**1H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz, δ ppm): 3,28 (s, 3H), 4,05 (s, 3H), 7,39-7,48 (m, 2H), 8,19-8,28 (m, 2H).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup>=288,51 m/z.

## 3.3. BIOLOŠKE METODE

### 3.3.1. Biokemijski pokus – *in vitro* određivanje inhibicijskog djelovanja

Komplet za određivanje inhibicijske aktivnosti molekula na JMJD2C (KDM4C) enzimu kupljen je od BPS Bioscience (San Diego, USA) kompanije. Eksperiment se temelji na kemiluminiscencijskom odzivu, a komplet je dizajniran za mjerenje inhibicijske aktivnosti molekula na JMJD2C enzimu korištenjem visoko specifičnog antitijela koji prepoznaje demetilirani supstrat. Eksperimentalni postupak sastoji se od nekoliko koraka na mikrotitarskoj pločici. Prvo, uzorak koji sadrži JMJD2C enzim inkubira se na 37°C s uzorkom koji sadrži testni pufer jedan sat. Zatim se dodaje primarno protutijelo. Konačno, pločica se

tretira s HRP-obilježenim sekundarnim antitijelom nakon čega slijedi dodavanje HRP supstrata kako bi se proizvela kemilumescencija koja se zatim može mjeriti upotrebom kemiluminescentnog detektora. Testovi za određivanje postotka inhibicije i vrijednosti IC<sub>50</sub> provedeni su prema protokolu proizvođača[43].

Reagensi:

|  | <b>Proizvođač</b> | <b>Kataloški broj</b> | <b>Lot. no.</b> |
|--|-------------------|-----------------------|-----------------|
| JMJD2C Komplet                           | BPS Bioscience    | 50405                 | 161005          |
| JMJD2C enzim                             | BPS Bioscience    | 50105                 | 12107           |
| Primarno protutijelo 5                   | BPS Bioscience    | 52140E                | 160607          |
| Sekundarno protutijelo (HRP) 1           | BPS Bioscience    | 52130H                | 160113          |
| DMSO                                     | Sigma             | D2650                 |                 |
| UltraPure Tris                           | Invitrogen        | 15504-020             |                 |
| NaCl                                     | Sigma             | S6546-1L              |                 |
| Tween 20                                 | Sigma             | 27434-8               |                 |
| PDA (2,4-piridin dikarboksilna kiselina) | Sigma standard    | P6339-5               | STBB8970V       |

**Tablica 3.1.** Popis potrebnih komponenti za izvođenje biokemijskog pokusa

|                                 | <b>Blank</b> | <b>Positive Control</b> | <b>Test Inhibitor</b> |
|---------------------------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| 4x JMJD2C direct assay buffer 1 | 12.5 µL      | 12.5 µL                 | 12.5 µL               |
| Distilled water                 | 12.5 µL      | 12.5 µL                 | 12.5 µL               |
| Test Inhibitor/Activator        |              |                         | 5 µL                  |
| Inhibitor buffer (no inhibitor) | 5 µL         | 5 µL                    |                       |
| 1x JMJD2C direct assay buffer   | 20 µL        |                         |                       |
| JMJD2C (10 ng/µL)               |              | 20 µL                   | 20 µL                 |

|       |            |            |            |
|-------|------------|------------|------------|
| Total | 50 $\mu$ L | 50 $\mu$ L | 50 $\mu$ L |
|-------|------------|------------|------------|

**Tablica 3.2.** Izračun dodanih volumena priređenih otopina po jažicama

**Protokol izvođenja biokemijskog pokusa:**

- 1) Pločica se rehidrira dodavanjem 200  $\mu$ l TBS-T pufera (1 x TBS, pH 8,0, koji sadrži 0,05% otopine Tween-20) u svaku jažicu. Inkubira se 15 minuta na sobnoj temperaturi. Pločica se zatim preokrene na čisti papirnati ručnik kako bi se uklonila tekućinu.
- 2) Pripremi se glavna otopina: u jažice se doda 12,5  $\mu$ l 4x JMJD2C otopine pufera 1 + 12,5  $\mu$ l destilirane vode). U svaku jažicu doda se 25  $\mu$ l glavne otopine.
- 3) Doda se 5  $\mu$ L otopine inhibitora u svaku jažicu označene kao "Test Inhibitor". Za pozitivnu kontrolu i blank doda se 10  $\mu$ L iste otopine bez inhibitora. Konačnu koncentracija DMSO-a mora biti manja od 1%.
- 4) Razrijedi se jedan dio 4x JMJD2C izravnog pufera 1 s tri dijela destilirane vode (četverostruko razrjeđivanje) kako bi se napravio 1 x JMJD2C izravni pufer 1.
- 5) Doda se 20  $\mu$ l 1 x JMJD2C izravnog pufera 1 u jažice označene kao "Blank".
- 6) Otopina JMJD2C enzima polako se otopi u ledenoj kupelji te se kratko promiješa. Otopina enzima zatim se alikvotira.
- 7) JMJD2C enzim razrijedi se 1x JMJD2C izravnim puferom na konačnu koncentraciju 10 ng /  $\mu$ l. Držite razrijeđeni enzim na ledu do upotrebe. Odbaciti bilo koji neiskorišteni razrijeđeni enzim nakon uporabe.

- 8) Pokrenuti reakciju dodavanjem 20 ul razrijeđenog JMJD2C enzima pripremljenog kao što je gore opisano u jažice označene kao "pozitivna kontrola" i "test inhibitor". Inkubira se na sobnoj temperaturi jedan sat.
- 9) Pločica se tri puta ispere s TBS-T puferom, a zatim se osuši na čistim papirnatim ručnicima.
- 10) Doda se 100 ul "stop" pufera u svaku jažicu. Pločica se protrese 10 minuta na rotirajućoj treskalici, a zatim se ukloni se supernatant iz jažica.
- 11) Razrijedi se primarno antitijelo 5 800 puta sa "stop" puferom.
- 12) Doda se 100 ul razrijeđenog primarnog protutijela 5 po jažici. Inkubira se 1 sat pri sobnoj temperaturi uz laganu trešnju.
- 13) Pločica se ispere TBS-T puferom i inkubira s "stop" puferom kako je opisano u koracima 9 i 10.
- 14) Razrijedi se sekundarno HRP-om obilježeno protutijelo 1 1000 puta sa "stop" puferom
- 15) Doda se 100 ul po jažici. Inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi uz laganu trešnju.
- 16) Pločica se ispere TBS-T puferom i inkubira s "stop" puferom kako je opisano u koracima 9 i 10.
- 17) Neposredno prije upotrebe, pomiješa se na ledu 5,5 ml HRP kemiluminescentnog supstrata A i 5,5 ml HRP kemiluminescentnog supstrata B i doda se 100 ul po jažici.
- 18) Odmah se očita kemiluminiscencija. Tipično trajanje integracije je 1 sekunda, odgoda nakon pokretanja je 100 ms.

### 3.3.2. Određivanje permeabilnosti spojeva na MDCKII-hMDR1 stanicama

MDCKII-hMDR1 stanice kupljene su od Solvo Biotechnology kompanije (Mađarska). DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), fetalni goveđi serum, Glutamax-100, Antibiotik / Antimikotik, DMSO, Dulbecco-ov fosfatni pufer, MEM (Minimum Essential Medium) ne-esencijalne aminokiseline kupljene su od tvrtke Sigma (St. Louis, MO, USA).

Određena je permeabilnost u smjeru apikalno-bazolterano (AB), u smjeru bazolateralno-apikalno (BA) kao i aktivni prijenos putem P-glikoproteina u staničnoj membrani. Pokus je izveden na MDCKII-MDR1, Madin-Darby epitelnim stanicama psa s prekomjerno ekspresiranim humanim MDR1 genom koji kodira P-glikoprotein.

Stanice hMDR1-MDCK II pripremljene su za studiju istraživanja transporta nasađivanjem na umetke u koncentraciji od  $0,3 \times 10^6$  stanica/ml. Tome je prethodila inkubacija umetaka na pločici od 24 jažice (24-well cell culture multiwell plate, Millipore) s hranjivom podlogom za uzgoj stanica tijekom 1 sata pri 37°C. Stanice su nahranjene svježom hranjivom podlogom 24h nakon nasađivanja i uzgajane 3 dana dok nisu postigle potrebnu konfluentnost.

Na dan pokusa i 2 sata nakon hranjenja, stanice su isprane i uravnotežene u puferu za studiju transporta DPBS (pH 7,4) tijekom 30 minuta pri 37 °C uz 95% vlažnosti zraka. Otopine testiranih supstanci sadržavale su makrolidni antibiotik u koncentraciji od 5  $\mu$ M i 100  $\mu$ M fluorescentni biljeg „lucifer yellow“ u puferu za studiju transporta s ukupnih 1% DMSO.

Za testiranje transporta u smjeru apikalno-bazolterano (AB), pufer je uklonjen s jednostrukog sloja stanica i umeci su prebačeni u nove pločice u kojima je svaka jažica u donjem odjeljku (bazolateralna strana) sadržavala 800  $\mu$ l pufera za studiju transporta prethodno zagrijanog pri 37 °C. Otopina supstance u puferu za studiju transporta (37 °C) nanesa je na jednostruki sloj stanica (apikalna strana) u volumenu od 400  $\mu$ l.

Za testiranje transporta u smjeru bazolateralno-apikalno (BA) prethodno zagrijana otopina testirane supstance nanosena je u donji odjeljak u volumenu od 800  $\mu$ l (bazolateralna strana), dok je 400  $\mu$ l pufera za studiju transporta nanoseno na jednostruki sloj stanica u gornjem odjeljku (apikalna strana). Pločice su inkubirane pri 37 °C tijekom 90 minuta uz blagu trešnju.

Uzorci iz primateljskog odjeljka (100  $\mu$ l) uzeti su nakon 0 i 90 minuta inkubacije a uzorci iz davateljskog odjeljka (100  $\mu$ l) uzeti su na početku i kraju pokusa. Kao pozitivna kontrola uporabljen je amprenavir u koncentraciji od 0,5  $\mu$ M u duplikatu u oba smjera. Svaka supstanca testirana je u duplikatu, u oba smjera. Koncentracije testiranih supstanci određene su spregnutom tehnikom LC-MS/MS kako je opisano u poglavlju 2.2.5. Vrijednosti koeficijenta prodornosti i njihovih omjera izračunati su prema jednadžbama niže pomoću aplikacije Excel 2010 (Microsoft).

„Lucifer yellow“, fluorescentni biljeg paracelularnog transporta, uporabljen je kao kontrola svakog pojedinog jednostrukog sloja stanica s ciljem provjere konzistentnosti staničnih čvrstih veza pri čemu je mjerenje obavljeno prije i nakon pokusa. Koristila se kvantifikacija pomoću fluorescentnog čitača (Fluorocan Ascent FL, Thermo LabSystems) pri valnim duljinama  $E_x = 485$  nm i  $E_m = 530$  nm. Budući da ovaj fluorescentni biljeg prolazi između stanica u formiranom jednostrukom sloju, Papp vrijednosti veće od 30 nm/s ukazuju na lošu kvalitetu formiranog jednostrukog sloja stanica, te se takvi uzorci nisu koristili u pokusu.

Koncentracije supstanci u davateljskoj i primateljskoj pločici detektirane su spektrometrijom mase (LC-MS/MS) prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.5. Koeficijent prodornosti Papp[nm/s] izračunat je uporabom slijedeće jednadžbe:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{c_0 \times A}$$

gdje je  $dQ/dt$  kumulativna masa [ $\mu\text{g/s}$ ],  $c_0$  izmjerena početna koncentracija u davateljskom odjeljku [ $\mu\text{g/ml}$ ],  $A$  odgovara površini membrane jednostrukog sloja stanica (npr.  $A = 4,71 \text{ cm}^2$  za pločicu sa šest jažica).

Efluks omjer između  $P_{app}$  vrijednosti studija istraživanja transporta u oba smjera, apikalno-bazolateralno (AB) i bazolateralno-apikalno (BA) izračunat je prema slijedećoj jednadžbi:

$$P_{app} \left( \frac{BA}{AB} \right) = \frac{P_{app}(BA)}{P_{app}(AB)}$$

### 3.3.3. Metabolička stabilnost u jetrenim mikrosomima

Metabolička stabilnost sintetiziranih molekula određena je u mikrosomima jetre miša. Razrjeđivanjem početne otopine mikrosoma jetre (koncentracija proteina 20 mg/ml) priređene su inkubacijske otopine koncentracije mikrosomalnih proteina od 0,5 mg/ml i sintetiziranih inhibitora koncentracije 1  $\mu\text{M}$  u 50 mM PBS otopine (pH 7,4).

Reakcija je započeta dodavanjem NADPH regeneracijskog sustava [sadrži NADP koncentracije 2 mM, glukoza-6-fosfat koncentracije 20 mM, magnezijev klorid koncentracije 2 mM i glukoza-6-P-dehidrogenazu koncentracije 4 U/ml u PBS otopini (pH 7,4)] i protresanjem u vodenoj kupelji pri 37 °C. Uzorci od 100  $\mu\text{l}$  uzimani su u  $t = 0, 10, 20, 30, 45$  i 60 minuta, a zatim su dodani hladnoj otopini za zaustavljanje reakcije (acetonitril : metanol = 2 : 1 (v/v)) koja je sadržavala unutrašnji standard (diclofenac 100 ng/ml). Uzorci su centrifugirani pri 10000xg tijekom 5 minuta, a supernatanti pipetirani direktno za LC-MS/MS analizu. Svaki spoj testiran je u duplikatu. Metabolička aktivnost mikrosoma praćena je simultanom analizom nekoliko različitih kontrolnih spojeva (testosteron, propranolol i kofein) unutar istog inkubacijskog vremena.

Metabolička stabilnost testiranih inhibitora određena je praćenjem smanjenja njihove početne koncentracije u smjesi jetrenih mikrosoma nakon inkubacije od jednog sata. Smanjenje koncentracije testirane supstance izražava se relativno u odnosu na omjer površine ispod krivulje analita i površine ispod krivulje unutrašnjeg standarda u prvoj točki mjerenja ( $t = 0$  min) proglašenoj kao 100% vrijednosti analita. Vrijeme poluživota *in vitro* (*in vitro*  $t_{1/2}$ ) računa se iz brzine transformacije supstance, odnosno iz linearne regresije ovisnosti prirodnog logaritma postotka preostale analizirane supstance o vremenu inkubacije. Kako je brzina biotransformacije supstance definirana nagibom pravca ( $k$ ) dobivenog linearnom regresijom, vrijeme poluživota *in vitro* izražava se kao:

$$in\ vitro\ t_{1/2} = -\frac{\ln 2}{k}$$

Hepatički mikrosomalni intrinzični klirens *in vitro* ( $CL_{int}$ ), izračunat je iz vremena poluživota *in vitro* prema slijedećoj jednadžbi:

$$CL_{int} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \times \frac{\text{ml inkubacijske smjese}}{\text{mg proteina}} \times \frac{\text{mg mikrosomalnih proteina}}{\text{g jetre}}$$

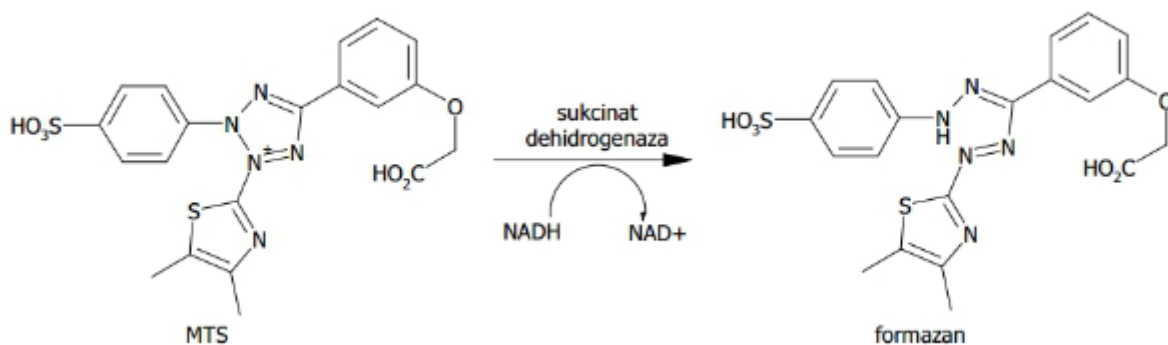
(pri izvođenju pokusa u 500  $\mu$ l inkubacijske smjese dodaje se 25  $\mu$ l mikrosoma koncentracije 10 mg/ml. Masa mikrosomalnih proteina po masi jetre je konstantna vrijednost koja za sve vrste iznosi 52,5).

Izračunate vrijednosti mikrosomalnog intrinzičnog klirensa *in vitro* te vremena poluživota *in vitro* korištene su za klasifikaciju testiranih supstanci; molekule se smatraju stabilnima ukoliko je klirens manji od 0,6 ml/min $\times$ g, a vrijeme poluživota veće od 120 minuta.



### 3.3.4. Utjecaj spojeva na vijabilnost stanica HepG2 i A549 staničnih linija

Utjecaj spojeva na vijabilnost stanica određena je na staničnoj liniji humanog karcinoma jetre HepG2 (engl. human caucasian hepatocyte carcinoma cells) i humanim adenokarcinomnim stanicama alveolarnog bazalnog epitela A549 MTS testom prema metodi Mosmanna [117]. Spojevi su otopljeni u DMSO-u tako da njihova koncentracija bude 1 mg/ml. Iz tih otopina pripremljena je matična mikrotitarska pločica (Storplate-384- deep-well-V plate, Perkin Elmer) s 1:3 serijskim razrjeđenjem čistim DMSO-om u triplikatu. Pločica je pripremljena na Janus robotu za pipetiranje (JANUS Integrator Platform, 8 tips, AJI8001, Perkin Elmer). 500 nL uzorka preneseno je s matične pločice na radnu pločicu pomoću robota za pipetiranje Mosquito (3019-0002, TTP Labtech). Stanice su distribuirane u pločice od 384 jažice, u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  stanica po jažici, u 50  $\mu$ l medija za kulturu stanica. Tijekom 24 sata kod HepG2 stanične linije, odnosno 72 sata kod A549 stanične linije, stanice u normalnoj fazi rasta izložene su potencijalno citotoksičnom, odnosno antiproliferativnom učinku testiranih inhibitorskih spojeva koji se određuje dodatkom reagensa MTS. Nakon završene inkubacije žive stanice, odnosno stanice sposobne za proliferaciju, mogu se detektirati odvojeno od onih koje to nisu. U živim stanicama uslijed djelovanja enzima sukcinat dehidrogenaze, uz pomoć oksidacije staničnog koenzima NADH u  $\text{NAD}^+$ , dolazi do otvaranja tetrazolnog prstena reagensa MTS pri čemu nastaju ljubičasti formazanski kristali (**Shema 3.2.**) kao mjera mitohondrijske aktivnosti stanica. Kod stanica koje su u ranoj fazi apoptoze također dolazi do nastanka formazana, dok kod mrtvih stanica promjena vijabilnosti ne dovodi do promjene boje.



**Shema 3.2.** Reakcija otvaranja tetrazolnog prstena MTS reagensapod utjecajem sukcinat dehidrogenaze i NADH staničnog koenzima

Detekcija se nakon 24 sata (HepG2), odnosno 72 sata (A549) provodi dodatkom 5  $\mu$ L reagensa MTS direktno na staničnu liniju u mikrotitracijskim pločicama, nakon čega slijedi 2 sata inkubacije pri 37 °C. Apsorbancija se očitava pri 490 nm spektrofotometrijskim čitačem mikrotitracijskih pločica (EnVision, Perkin Elmer). Rezultati su prikazani u obliku  $IC_{50}$  vrijednosti svake supstance za rast pojedine stanične linije, ili kao postotak inhibicije staničnog rasta pri nekoj koncentraciji ispitivane supstance. Sve supstance analizirane su u duplikatu. Kao referentni kontrolni spoj koristio se staurosporin čije su vrijednosti odgovarale standardnima za ovaj pokus. Podaci su obrađeni koristeći GraphPad Prism računalni program.

### 3.3.5. LC-MS/MS analiza uzoraka iz *in vitro* pokusa

Sustav spregnute tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i tandemске spektrometrije masa (MS/MS) sastojao se od Shimadzu Nexera X2 UHPLC (Kyto, Japan) binarne crpke sa sustavom za samostalno skupljanje uzoraka i spektrometra mase (SCIEX API4000 triple quadrupole, Applied Biosystems, Division of MDS Inc., Toronto, Canada).

Kromatografsko odjeljivanje provedeno je na UHPLC kolonama HALO2 C18 (2.1x20 mm, 2  $\mu$ m) ili Luna Omega C18(2,1x30 mm, 1.6 $\mu$ m) pri protoku od 0,7ml/min. Korištena je gradijentna metoda pri temperaturi kolone od 50°C. Kao mobilna faza korišteni su acetonitril i voda zakiseljeni s 0,1% mravlje kiseline. Supstance su analizirane uporabom pozitivnog ionskog moda u praćenju višestrukih reakcija (MRM, engl. multiple reaction monitoring) sa specifičnom MRM tranzicijom za svaki spoj.

## 3.4. Računalne metode

### 3.4.1. Molekulsko uklapanje

Dostupne kristalne strukture JMJD2C i JMJD2A proteina kao i njihove ko-kristalne strukture s različitim inhibitorima preuzete su iz PDB (protein data bank) baze podataka[118]. Korišteni su ligandi iz kristalnih struktura pod šifrom 2XML, 5FJH i 5FJK. Studije vezivanja liganada provedene su pomoću protokola za molekulsko uklapanje Glide [119, 120] unutar Schroedinger programskog paketa [121] uz visoku preciznost (XP). Vezujuće su poze dodatno optimirane i energije vezanja procijenjene korištenjem MM-GBSA protokola i OPLS3 polja sila. Fleksibilni dio aktivnog mjesta enzima koji je optimiran MM-GBSA protokolom obuhvaćao je udaljenost od 5 Å od ispitivanog liganda. QM/MM izračuni provedeni su u QSite programu unutar Schroedinger programskog paketa[121].

### 3.4.2. Hibridne kvantno-mehaničke / molekulsko-mehaničke (QM/MM) metode

Prilikom ko-kristalizacije, JMJD2A protein tretiran je cinkom, stoga je u računima definirano singletno spinsko stanje cinkovog iona ( $Zn^{2+}$ ), te singletno i kvintetno spinsko stanje željezovog iona ( $Fe^{2+}$ ). JMJD2C kompleksi razmatrani su s niklovim ( $Ni^{2+}$ ) ionom u tripletnom stanju. Za opis QM dijela metalnog kompleksa, korišten je B3LYP-D3 funkcional gustoće[122-125]. Bazni set 6-31+G(2d,p) [126] korišten je za ugljikove, vodikove, kisikove i dušikove atome, a lav3p++(2d,p) za metalne ione. MM dio je opisan s OPLS\_2005 poljem sila [127]

NBO (engl. natural bond orbital) analiza provedena je na optimiziranim geometrijama[128]. Analiza Fockove matrice u NBO baznom setu napravljena je pomoću teorije perturbacije drugog reda kako bi se procijenila jakost donorsko-akceptorskih interakcija između metalnog

iona i liganda. Elektronska struktura i orbitalni nivoi izračunati su iz optimiziranih geometrija na M06-2x/6-31G (2d, p)+ razini. Korišten je M06-2x funkcional jer je prethodno pokazano da dobro reproducira ionizacijske energije i elektronske afinitete[129-131].

### **3.4.3. Metode molekulskih polja**

Za usporedbu molekulskih polja pripremljenih molekula korišten je Cresset računalni paket[115]. Posebice je korišten za dizajn novih strukturnih motiva, odnosno zamjenu toksoflavinskog novim motivima.

Cresset računalni paket skup je alata koji se koristi za dizajn molekula na temelju struktura poznatih liganada (engl. Ligand-based drug design), te (SAR , engl. structure – activity relationship) za istraživanje odnosa između strukture i aktivnosti koristeći molekulska polja. Radi na način da generira i koristi preklapanja molekulskih polja kao način za usporedbu molekula unutar kemijskih serija. Ovaj alat može pomoći u dizajnu kemijskih biblioteka i za određivanje prioriteta pri sintezi spojeva.

### **3.4.4. PLS (engl. Partial least squares) analiza**

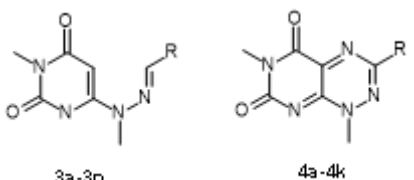










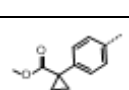


Djelomična analiza najmanjeg kvadrata (PLS engl. partial least square) korištena je za izgradnju statističkih modela za a) predviđanje inhibicijske aktivnosti pomoću izračunanih parametara jačine interakcija liganada i JMJD2C enzima i solvacijskih parametara, te za b) predviđanje utjecaja na staničnu proliferaciju kod HepG2 i A549 staničnih linija pomoću eksperimentalno određene inhibicijske aktivnosti priređenih molekula na JMJD2C enzimu, stanične

permeabilosti (Papp (AB)), te izračunatih parametara; clogP, topološke polarne površine (TPSA), broja donora i akceptora vodikovih veza (HBD, HBA), te HOMO / LUMO orbitalnih prijelaza kao nezavisnih varijabli. Za provedbu PLS analize korišten je Simca računalni program [132].

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

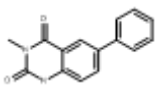
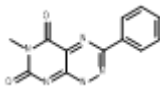
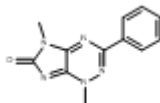
## 4.1. Priprava spojeva

Spojevi za biološka testiranja dizajnirani su na temelju strukturnih analiza JMJD2A/C enzima te su sintetizirani u 3 optimizacijska ciklusa prema procedurama opisanima u eksperimentalnom dijelu 3.2. Prvo su sintetizirane linearne molekule **3a-3m** da bi se ispitala mogućnost njihove koordinacije u aktivno mjesto JMJD2C enzima. Nakon toga, linearne su molekule ciklizacijom u prisutnosti natrijevog nitrita i octene kiseline prevedene u (bi)cikličke produkte **4a-4k** temeljene na toksoflavinskom motivu (**Tablica 4.1.a**). U trećem optimizacijskom ciklusu, priređene su molekule kod kojih je toksoflavinski motiv zamijenjen novim strukturnim motivima (**Tablica 4.1.b**, spojevi **5a-5c**).

|  |   |        |   |
|--|---|--------|---|
| Spoj   | R   | Spoj   | R   |
| 3a, 4a   |  | 3h     |  |
| 3b, 4b   |  | 3i     |  |
| 3c, 4c   |  | 3j, 4j |  |
| 3d, 4d   |  | 3k, 4k |  |
| 3e, 4e   |  | 3l, 4l |  |
| 3f, 4f   |  | 3m, 4m |  |
| 3g, 4g   |  |        |   |



**Tablica 4.1. a)** Sintetizirane linearne (**3a-3m**) i (bi)cikličke (**4a-4m**) molekule

| Spoj  |   |   |
|---|---|---|
| 5a  | 5b  | 5c  |
|  |  |  |

**Tablica 4.1 b)** Sintetizirani spojevi kod kojih je toksoflavinski motiv zamijenjen novim strukturnim motivima (**5a-5c**)

## 4.2. Optimiranje računalnih metoda – studija JMJD2A enzima

Primjena računalnih metoda u dizajnu lijekova temeljenog na strukturnim osnovama (SBDD – engl. *structure based drug design*) omogućava istraživanje mogućih načina interakcije inhibitora i amino-kiselina u aktivnom mjestu enzima, te procjenu jačine tih interakcija i njihov utjecaj na biološku aktivnost molekule. Modeliranje interakcija između metaloenzima i liganada predstavlja poseban izazov jer standardne metode molekulskog uklapanja i molekulskog polja sila ne mogu adekvatno opisati donorsko-akceptorske koordinativne veze koje metalni ioni stvaraju u svojoj koordinacijskoj sferi. Zbog toga je potrebno dodatno optimirati metode molekulskog uklapanja i testirati ih na postojećim eksperimentalnim podacima. Također je za točnije predviđanje energija interakcije potrebno koristiti kvantno mehaničke metode.

U ovom radu je u svrhu optimiranja računalnog protokola korišten set literaturno dostupnih JMJD2A kristalnih struktura[133]. Zbog visoke homologije između JMJD2A i JMJD2C proteina kao i zbog manjeg broja objavljenih JMJD2C kristalnih struktura, korištene su JMJD2A kristalne strukture kako bi se istražila primjenjivost protokola molekulskog uklapanja, MMGBSA (engl. *molecular mechanics/ generalized Born and surface area*) i QM/MM (engl. *quantum mechanics / molecular mechanics*) metoda za proučavanje geometrija i energija vezanja liganada s JMJD2 klasom proteina. Sličnost katalitičkih domena JMJD2A i JMJD2C proteina je 84% pa je pretpostavljeno da će računalni protokoli razvijeni za JMJD2A komplekse biti primjenjivi i u slučaju JMJD2C enzima. U QM/MM računima, QM dio obuhvaćao je prvu koordinacijsku sferu metalnog iona uključujući molekule kristalne vode, zatim aminokiselinske ostatak His278, trijadu His190, Thr191, Glu192 te molekulu liganda. Optimalan odabir kvantno-mehaničke metode vrlo je važan kako bi se dobili rezultati zadovoljavajuće točnosti u prihvatljivom vremenskom periodu.

Metoda funkcionala gustoće, DFT (eng. *density functional theory*) predstavlja bolji izbor u odnosu na HF (Hartree-Fock), LDA (engl. *local density approximation*; aproksimacija lokalne gustoće) pa čak i MP2 (engl. *second order Møller-Plesset perturbation theory*) metode, no poboljšanja nisu sustavna i često se slaganje s eksperimentalnim podacima treba empirijski testirati za različite sustave od interesa[127, 134]. U više navrata potvrđeno je kako je B3LYP-D3 funkcional optimalan izbor za istraživanje kompleksa metaloenzima i liganda[124, 125, 127, 129]te je korišten u ovoj studiji.

Rendgenske kristalne strukture kompleksa JMJD2A s inhibitorima korištene su kao polazna točka za MM/GBSA (engl. *molecular mechanics/generalized Born and surface area*) i QM/MM (engl. *quantum mechanics/molecular mechanics*) optimizacije. Energije interakcija izračunate su kao razlika između energija optimiranih kompleksa i energija slobodnog liganda i proteina. Budući da su QM/MM optimizacijski proračuni računalno i vremenski vrlo zahtjevni, pogotovo u slučaju sporo konvergirajućih izračuna za plitke (ravne) površine potencijalne energije kao i za viša spinska stanja metalnih iona, QM/MM izračuni su također provedeni na geometrijama kompleksa optimiranih MM/GBSA metodom te kristalnim strukturama (kako bi se istražila primjenjivost računalno manje zahtjevnog protokola.

Predviđanje eksperimentalnih energija vezanja odnosno inhibicijskog potencijala liganda vrlo je zahtjevan zadatak, pa u literaturi postoji niz približenja i pojednostavljenja računskog postupka[135]. Prethodno je pokazano da se podaci o eksperimentalnim aktivnostima mogu približno izraziti kao linearna kombinacija izračunatih QM/MM energija interakcije ( $\Delta E_{vdw}$  i  $\Delta E_{electrostatic}$ ) i desolvatacijskih energija (promjena površina pristupačnih otapalu,  $\Delta SASA$ [136]metodama molekulske dinamike (MD) ili Monte Carlo simulacijama:

$$\Delta G_b = \alpha \times \Delta \langle E_{vdw} \rangle + \beta \times \Delta \langle E_{el} \rangle + \gamma \times \Delta \langle SASA \rangle + \kappa$$

$\Delta$ SASA sastoji se od hidrofobnog (FOSA), hidrofilnog (FISA),  $\pi$  aromatskog doprinosa te doprinosa donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, zatim doprinosa dipola, volumena i globularnosti.

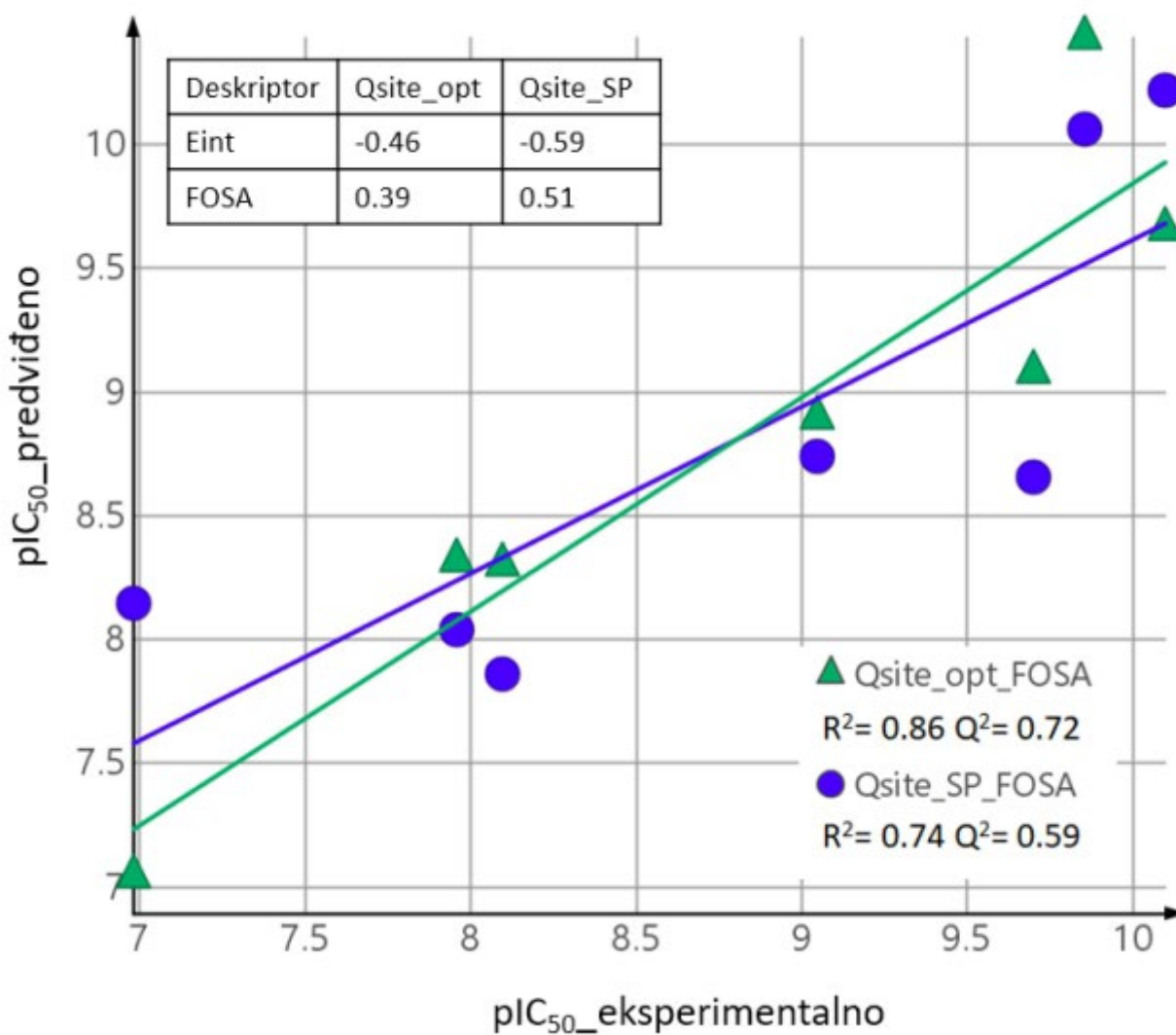
Slične metode za razmatranje desolvatacije složenijih molekula zahtijevale su uzimanje u obzir broj donora i akceptora vodikovih veza[130].

U ovom radu istražena su daljnja pojednostavljena računalnog protokola uz semi-kvantitativno slaganje s eksperimentalnim aktivnostima. Pretpostavljeno je da su energije desolvatacije proteina slične za sve ispitivane komplekse, budući da ne dolazi do značajnih induciranih konformacijskih promjena proteina. Također je pretpostavljeno da su zbog molekulske rigidnosti konformacijske promjene liganda nakon vezanja male, pa je  $\Delta$ SASA aproksimirana površinom nevezane molekule inhibitora dostupne molekulama vode.

Desolvatacijski doprinos izražen je različitim QikProp [137] deskriptorima koji opisuju otapalu izloženu površinu; SASA (molekulska površina dostupna otapalu, engl. *solvent-accessible surface area*), FOSA (hidrofobna komponenta SASA-e), FISA (hidrofilna komponenta SASA-e), PISA ( $\pi$  komponenta SASA-e), HBA (akceptori vodikove veze), HBD (donori vodikove veze), dipolni moment, volumen i globularnost. Eksperimentalne aktivnosti izražene kao  $pIC_{50}$  vrijednosti korelirane su s QM/MM energijama i gore navedenim deskriptorima, korištenjem PLS (engl. *partial least squares*) statističke metode (regresijska metoda parcijalnih najmanjih kvadrata). Dobivena je prilično dobra korelacija za skup od 7 JMJD2A-ligand kompleksa kao što je prikazano na **Slici 4.1**. Vrijednosti deskriptora korištenih u razvoju modela prikazane su u **Tablici 4.2**.

Najbolji PLS model dobiven je sa QM/MM energijom interakcije te hidrofobnom molekulskom površinom dostupnom otapalu, kao deskriptorima. Korelacije s  $pIC_{50}$  vrijednostima iznosile su

$R^2=0.86/Q=0.72$  za geometrije optimirane QM/MM metodom, te  $R^2=0.74/Q=0.59$  za geometrije optimirane MM/GBSA metodom. Iako se za geometrije optimirane QM/MM metodom dobije nešto bolje slaganje s eksperimentalnim vrijednostima, u svrhu optimiranja vremenske zahtjevnosti računalnog protokola, za istraživanje interakcija inhibitora s JMJD2C enzimom korištena je QM/MM//MM/GBSA metoda.



**Slika 4.1.** Korelacija između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti pIC<sub>50</sub> za skupinu

JMJD2A inhibitora

Jačina i priroda donorsko-akceptorske koordinativne veze između liganda i metalnog iona dodatno je kvantificirana analizom Fockove matrice u NBO bazi prema teoriji perturbacije drugog reda. Delokalizacija gustoće nesparenog elektronskog para na N(4) dušikovom atomu u nepopunjene nevezane orbitale metalnog iona iznosi 44-64 kcal/mol za ligande 5F2S, 5F2W, 5F51 i 5F32 kao što je prikazano u **Tablici 4.3**.

U zaključku možemo reći da su literaturno dostupni strukturni i biološki podaci za JMJD2A-inhibitor komplekse uspješno korišteni za optimizaciju i testiranje računalnog protokola za ovu klasu metaloenzima, te je dodatno dobiven uvid u prirodu interakcija i glavne čimbenike koji utječu na aktivnost. Također je izgrađen statistički model pomoću kojeg se mogu predvidjeti aktivnosti novih potencijalnih inhibitora, uz napomenu da je model potrebno validirati na dodatnom setu spojeva. Iako JMJD2A enzim nije bio primarni interes ovog rada, dobivene informacije su vrijedan doprinos istraživanju ove izoforme.

| <b>PDB kod</b> | <b>pIC<sub>50</sub></b> | <b>DE (QM/MM_opt) kcal/mol</b> | <b>DE (QM/MM_SP*) kcal/mol</b> | <b>NBO E(2) kcal/mol</b> | <b>dipol</b> | <b>SASA</b> | <b>FOSA</b> | <b>FISA</b> | <b>PISA</b> | <b>volumen</b> | <b>donorHB*</b> | <b>akcptHB*</b> | <b>glob</b> | <b>PSA</b> |
|----------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------|------------|
| 5F2S           | 9.70                    | -154.6039253                   | -145.291506                    | 61.34                    | 5.34         | 416.18      | 0.00        | 203.21      | 159.71      | 665.27         | 3.0             | 5.0             | 0.89        | 98.64      |
| 5F2W           | 6.98                    | 130.1966959                    | -99.8153781                    | 49.3                     | 7.28         | 421.85      | 0.00        | 210.48      | 158.21      | 675.38         | 4.0             | 5.5             | 0.88        | 102.80     |
| 5F5I           | 9.05                    | -65.0715905                    | -121.530489                    |                          | 3.65         | 485.77      | 74.80       | 139.64      | 271.34      | 821.16         | 2.0             | 4.5             | 0.87        | 75.79      |
| 5F32           | 7.96                    | -47.98794232                   | -90.5212817                    | 44.2                     | 4.47         | 422.75      | 0.00        | 183.38      | 186.17      | 695.35         | 3.0             | 6.5             | 0.90        | 97.80      |
| 5F3I           | 10.10                   | -67.4390739                    | -202.119833                    | 64.21                    | 5.40         | 768.17      | 196.98      | 138.00      | 292.30      | 1375.16        | 1.0             | 7.5             | 0.78        | 85.59      |
| 5F3E           | 9.85                    | -161.0439024                   | -180.964471                    |                          | 6.51         | 566.33      | 213.93      | 136.13      | 216.27      | 958.16         | 1.0             | 7.5             | 0.83        | 84.92      |
| 5F39           | 8.10                    | -46.0380954                    | -74.7010602                    |                          | 5.28         | 406.09      | 0.00        | 122.10      | 228.20      | 666.02         | 1.0             | 6.0             | 0.91        | 72.24      |

**Tablica 4.2.** Eksperimentalne aktivnosti, izračunate QM/MM energije interakcije, NBO energije delokalizacije drugog reda i 3D strukturni deskriptori kompleksa s JMJD2A proteinom

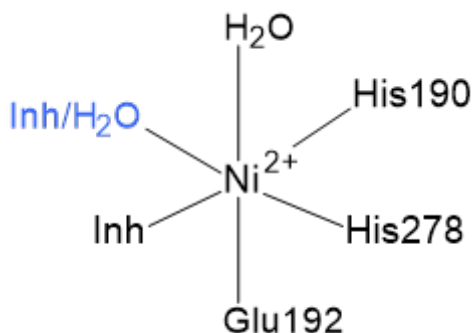
| Spoj       | pIC <sub>50</sub> _eksp. | DE<br>(QM/MM_SP*)<br>kcal/mol | dipol | SASA   | FOSA   | FISA   | PISA   | volumen | donorHB** | akceptHB** | glob | PSA    |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|-----------|------------|------|--------|
| 4a         | 6.62                     | -70.66                        | 6.99  | 519.81 | 169.16 | 135.32 | 215.33 | 860.75  | 0.00      | 7.00       | 0.84 | 93.43  |
| 4b         | 7.75                     | -72.03                        | 3.51  | 551.18 | 165.30 | 202.22 | 183.67 | 924.57  | 0.00      | 8.50       | 0.83 | 120.26 |
| 4c         | 6.58                     | -75.79                        | 8.07  | 533.84 | 171.03 | 186.83 | 175.99 | 885.19  | 1.00      | 7.75       | 0.84 | 114.93 |
| 4d         | 8.16                     | -79.55                        | 6.47  | 546.12 | 255.52 | 128.22 | 162.38 | 928.53  | 0.00      | 7.75       | 0.84 | 100.86 |
| 4e         | 7.47                     | -83.14                        | 6.25  | 580.23 | 162.66 | 267.40 | 148.28 | 988.12  | 2.00      | 11.50      | 0.83 | 157.11 |
| 4g         | 7.54                     | -73.81                        | 5.84  | 535.77 | 206.93 | 124.38 | 204.46 | 909.73  | 0.00      | 7.00       | 0.85 | 94.87  |
| 4j         | 7.43                     | -70.52                        | 4.20  | 499.29 | 162.88 | 155.78 | 180.63 | 837.08  | 0.00      | 8.50       | 0.86 | 105.79 |
| 4l         | 7.97                     | -70.38                        | 6.70  | 567.15 | 293.90 | 114.07 | 159.18 | 988.26  | 0.00      | 8.00       | 0.85 | 93.89  |
| 4m         | 7.13                     | -56.38                        | 2.62  | 517.25 | 161.86 | 136.65 | 172.64 | 870.24  | 1.25      | 5.25       | 0.85 | 96.74  |
| toxoflavin | 6.69                     | -56.69                        | 4.19  | 390.54 | 165.43 | 160.77 | 64.34  | 623.45  | 0.00      | 7.50       | 0.90 | 99.94  |

**Tablica 4.3.** Eksperimentalne aktivnosti, izračunate QM/MM energije interakcije i 3D strukturni deskriptori za komplekse s JMJD2C enzimom



### 4.3. Opis aktivnog mjesta JMJD2C proteina

JMJD2C je metaloprotein koji sadrži željezov (II) ion u aktivnom mjestu. U kristalografskim istraživanjima Fe (II) ion zamijenjen je niklovim (II) ionom u svrhu povećanja stabilnosti pročišćenog enzima[138]. JMJD2C enzim pripada superfamiliji hidroksilaza, a da bi postigao svoju biološku funkciju potreban mu je  $\alpha$ -ketoglutarat kao kofaktor. Tri su rendgenske strukture literaturno dostupne u PDB (Protein Data Bank) bazi: 2XLM, 5FJK i 5FJH i sve tri su korištene u daljnjim računskim analizama. Ni (II) ion ima oktaedarsku koordinaciju te ostvaruje koordinativnu vezu s aminokiselinama histidin 190, histidin 278, glutaminska kiselina 192 iz samog proteina te jednom ili dvije molekule vode ovisno je li inhibitor monodentatni ili bidentatni ligand (**Slika 4.2.**).

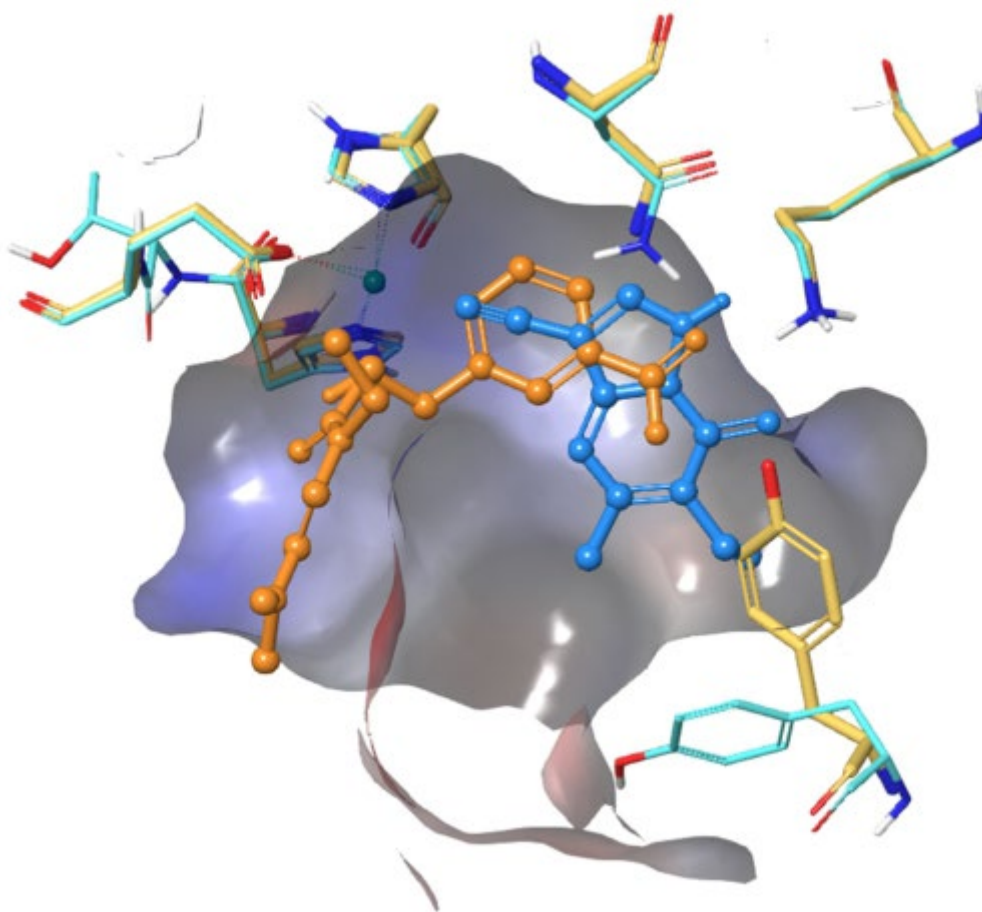


**Slika 4.2.** Formiranje oktaedarske koordinacije Ni<sup>2+</sup>iona

$\alpha$ -ketoglutarat je bidentatni ligand jednako kao i derivat izonikotinske kiseline iz 5FJH kristalne strukture, dok derivat pirazolo [1, 5-*a*] pirimidina iz 5FJK kristalne strukture popunjava jednu koordinacijsku poziciju te stoga sadrži dvije molekule vode u koordinacijskoj sferi metala. Dodatne interakcije formiraju se s bočnim lancima vodikovim vezama na suprotnoj strani

veznog mjesta i to s aminokiselinama: tirozin134, lizin208 i asparagin200 kao što je prikazano na **Slici 4.3**.

U usporedbi sa 5FJH i 2XML kristalnim strukturama, kod 5FJK kristalne strukture dolazi do konformacijskih promjena induciranih vezanjem liganda. Lizin243 je pomaknut te tako dolazi do prekinuća solnog mosta između lizina243 i asparaginske kiseline137 što omogućava lakši ulazak u vezno mjesto. Također, tirozin134 pomaknut je na dno veznog mjesta što omogućuje ligandu da se veže poprijeko veznog mjesta, formira  $\pi$ - $\pi$  interakcije s fenilnim prstenom tirozina134 i vodikovu vezu s lizinom208 kao što je pokazano na **Slici 4.3**. Pretpostavlja se da su hidroksilne skupine serina198 i serina290 različito orijentirane zbog mreže vodikovih veza s koordiniranim molekulama vode. Dostupne kristalne strukture stoga pokazuju mogućnost značajnih konformacijskih promjena u aktivnom mjestu enzima, te stvaranja različitih koordinacijskih sfera metalnih iona ovisno o strukturnim svojstvima inhibitora.



**Slika 4.3.** Preklopljena aktivna mjesta enzima 5FJH (narančasto/ žuto) i 5FJK (plavo/ tirkizno) s njihovim pripadajućim ligandima

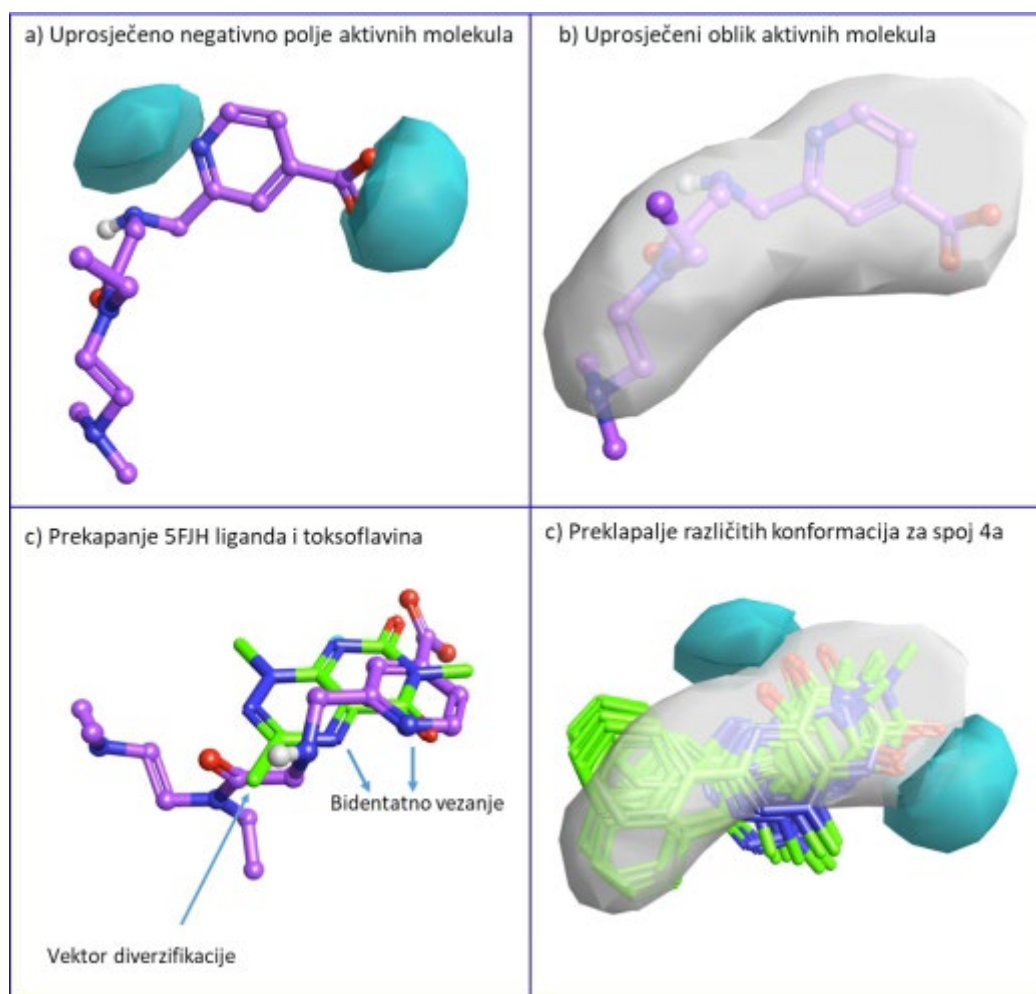
#### 4.4. Analiza poznatih JMJD2C inhibitora

Literaturno dostupni inhibitori JMJD2C enzima te njihove biološke aktivnosti prikupljene su iz Chembl baze podataka[139]. Na temelju raspona njihove biološke aktivnosti i strukturne raznolikosti, odabrano je 40 spojeva za usporedbu s ligandima iz kristalnih struktura 5FJH i 5FJK (PDB). Molekule su međusobno preklopljene koristeći Cresset tehnologiju i preklapanje molekulskih polja (engl. *field-based alignment*). Kao što je opisano u metodama, Cresset tehnologija preklapa i uspoređuje molekule na temelju molekulskih polja za razliku od

uobičajenog pristupa u kojem se molekule direktno uspoređuju po svojim strukturnim karakteristikama. Ovim pristupom molekule se uspoređuju po elektrostatskim, hidrofobnim i van der Waalsovim molekulskim poljima, čime je omogućena analiza molekula onako kako je „vidi“ biološka okolina, u ovom slučaju JMJD2C enzim kao biološka meta. Cresset tehnologijom molekulskih polja, osim preklapanja molekula mogu se izgraditi 3D QSAR modeli te istražiti poopćena farmakoforna svojstva molekula, slično klasičnim farmakofornim modelima[115, 139]. Stoga je na prikupljenom setu podataka za JMJD2C inhibitore izračunat kvalitativni farmakoforni model (3D SAR model) koristeći računalni program Activity Atlas.

Dobiveni farmakoforni model zajedno sa strukturnim karakteristikama JMJD2C veznog mjesta, opisanog u prošlom poglavlju, korišten je za dizajniranje fokusirane biblioteke spojeva temeljenih na toksoflavinskom motivu. Kao što je prikazano na **slici 4.4.a**, glavni elektrostatski doprinos aktivnosti kod JMJD2C inhibitora negativna su elektrostatska polja koja potječu od nesparenog elektronskog para dušikova atoma koordinativno vezanog na metalni ion. Inhibitori također imaju i elektronima bogate skupine (karboksilna kiselina u slučaju liganda 5FJH) koji tvore snažnu mrežu vodikovih veza s aminokiselinama tirozin134, lizin208 i asparagin200, kao što je vidljivo i iz dostupnih kristalnih struktura. Na **slici 4.4.b** prikazan je uprosječen oblik aktivnih molekula. Toksoflavinski motiv zatim je preklopljen s referentnim ligandom iz 5FJH kristalne strukture (**Slika 4.4.c**) kako bi se istražili mogući načini vezanja, ali i daljnje strukturne modifikacije. Analiza elektrostatskih polja pokazala je da se toksoflavin dobro uklapa u općeniti farmakoforni model te da je položaj C3 prikladan za daljnju kemijsku diverzifikaciju. Spoj **4a** korišten je kao reprezentativna molekula za istraživanje može li se aromatski prsten smjestiti unutar uprosječenog oblika aktivnih spojeva. Jasno je vidljivo da je preklapanje dobro (**Slika 4.4.d**), međutim i kod monodentatnog i kod bidentatnog vezanja postojat će stanoviti ustupak na štetu direktne koordinacije kako bi se molekule smjestile u

zadani oblik. Zbog toga se može očekivati inducirano uklapanje dizajniranih molekula kao i pomicanje nekih aminokiselinskih lanaca u veznom mjestu, kao što je već viđeno kod 5FJK kristalne strukture i nekima od dostupnih JMJD2A ko-kristalnih struktura.



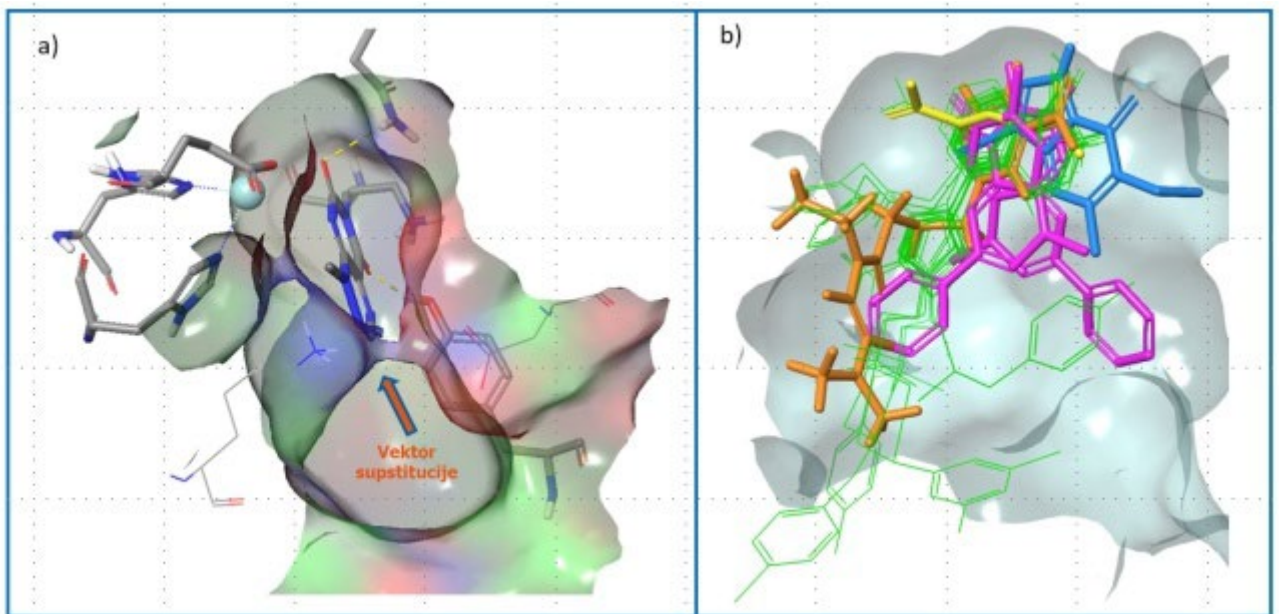
**Slika 4.4.** Farmakorne karakteristike JMJD2C inhibitora: a) prosječno negativno elektrostatsko polje aktivnih spojeva, b) prosječni oblik aktivnih spojeva, c) preklapanje 5FJH liganda s toksoflavinom, d) uklapanje različitih konformacija spoja 4a u generalizirani farmakoforni model

## 4.5. Ispitivanje interakcija JMJD2C enzima s derivatima toksoflavina

### 4.5.1. Studije molekuskog uklapanja

Potencijalni načini vezanja dizajniranih spojeva temeljenih na toksoflavinskom motivu istraženi su molekulskim uklapanjem u 5FJH/2XML i 5FJK kristalne strukture. U slučaju 5FJH kristalne strukture istraženi su monodentatni i bidentatni načini vezanja dok je za 5FJK kristalnu strukturu istražen samo monodentatni način vezanja pri čemu su koordinativno vezane dvije molekule vode. Da bi se omogućilo bidentatno vezanje u 5FJH kristalnu strukturu, bila je potrebna promjena konformacije pobočnog lanca lizina<sup>243</sup> analogno 2XML i 5FJK strukturama. Orijentacija molekula vode kao i moguća mreža vodikovih veza optimizirane su protokolima za pripremu proteina i interaktivnog optimiranja vodikovih veza unutar Schroedinger Maestro programskog paketa. Optimiranje protokola za molekulsko uklapanje provedeno je na način da rezultati uklapanja odgovaraju eksperimentalnim rezultatima za sve tri kristalne strukture. Ispitane su kombinacije nekoliko parametara uključujući preciznost postupka molekuskog uklapanja (SP – standardna preciznost, XP – povećana preciznost), testiranje utjecaja kristalnih voda i mreže vodikovih veza koje tvore s amino-kiselinskim lancima u aktivnom mjestu, te tri različita zadana uvjeta za stvaranje koordinativnih interakcija s metalnim ionom. Proveden je niz računalnih eksperimenata, a protokol molekuskog uklapanja sa standardnom preciznošću (SP) uz dodatne uvjete; oktaedarsku koordinaciju metalnog iona i pre-definirane donorsko-akceptorske interakcije između metala i liganda dao je najbolje slaganje s eksperimentalnim geometrijama. Komplex toksoflavina s JMJD2C (PDB: 2XML) prikazan je na **slici 4.5.a**. Rezultati molekuskog uklapanja potvrđuju zaključke iz analize temeljene na JMJD2C ligandima; vektor daljnjih strukturnih modifikacija može se postaviti na atom C3 toksoflavinskog motiva. Molekulsko uklapanje spoja **4a** koristeći standardnu

preciznost (SP) rezultiralo je bidentatnim vezanjem unutar 5FJH strukture i monodentatnim vezanjem u 5FJK strukturu kao što je prikazano na **Slici 4.5.b**. Slika **4.5.b** također prikazuje različite načine vezanja liganada iz trenutno dostupnih rendgenskih struktura za JMJD2A i JMJD2C enzime. Iz slike je vidljivo da postoji značajna razlika u načinu vezanja, orijentaciji i smještaju pojedinih inhibitora u aktivno mjesto.



**Slika 4.5. a)** Predloženi način vezanja toksoflavina u aktivnom mjestu JMJD2C enzima (PDB: 5FJH). **b)** Preklapanje 2XML liganda - žuto; JMJD2A inhibitori - zeleno; 5FJH ligand - narančasto; 5FJK ligand - plava; spoj 4a u monodentatnom i bidentatnom načinu – magenta

#### 4.5.2. MM/GBSA i QM/MM studije

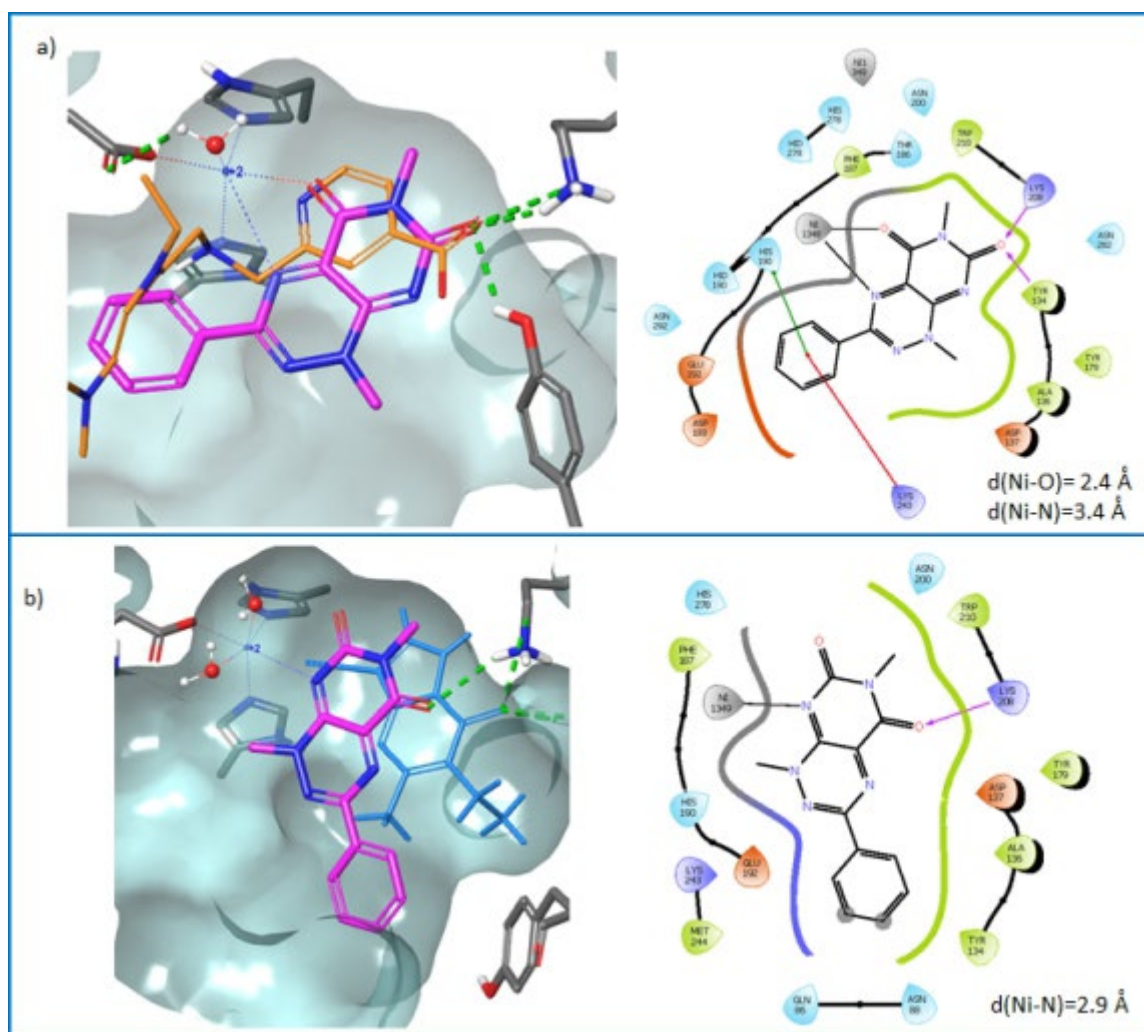
Kompleksi dobiveni molekulskim uklapanjem dodatno su minimizirani korištenjem MM/GBSA (engl. molecular mechanics/generalized Born surface area) metode te su tako dobivene

strukture korištene u QM/MM izračunima. Provedeni su računi u kojima je geometrija QM dijela bila fiksna, a MM dio je minimiziran (QM/MM//MM/GBSA). Također su MM/GBSA geometrije korištene kao početne geometrije za QM/MM optimizaciju kompleksa. Finalne geometrije prikazane su na **Slici 4.6.**; bidentatni način vezanja spoja **4a** prikazan je na **slici 4.6.a**, a monodentatni na **slici 4.6.b**. U oba slučaja glavne interakcije s proteinom nastaju koordinacijom metala s 8-N dušikovim atomom i 7-CO karbonilnim atomom kisika te vodikovim vezama između 5-CO karbonilnog atoma kisika s lizinom<sup>208</sup> i tirozinom<sup>134</sup>. NBO (engl. Natural bond orbital) analiza pokazuje da je energija delokalizacije elektronske gustoće nesparenih elektronskih parova dušika i kisika u nepopunjene nevezne vanjske orbitale metalnog iona u rasponu JMJD2A kompleksa; 22 i 45 kcal/mol; dok je delokalizacija elektrona za ligande iz struktura 5FJH i 5FJK mnogo jača te iznosi 162kcal/mol odnosno 138 kcal/mol.

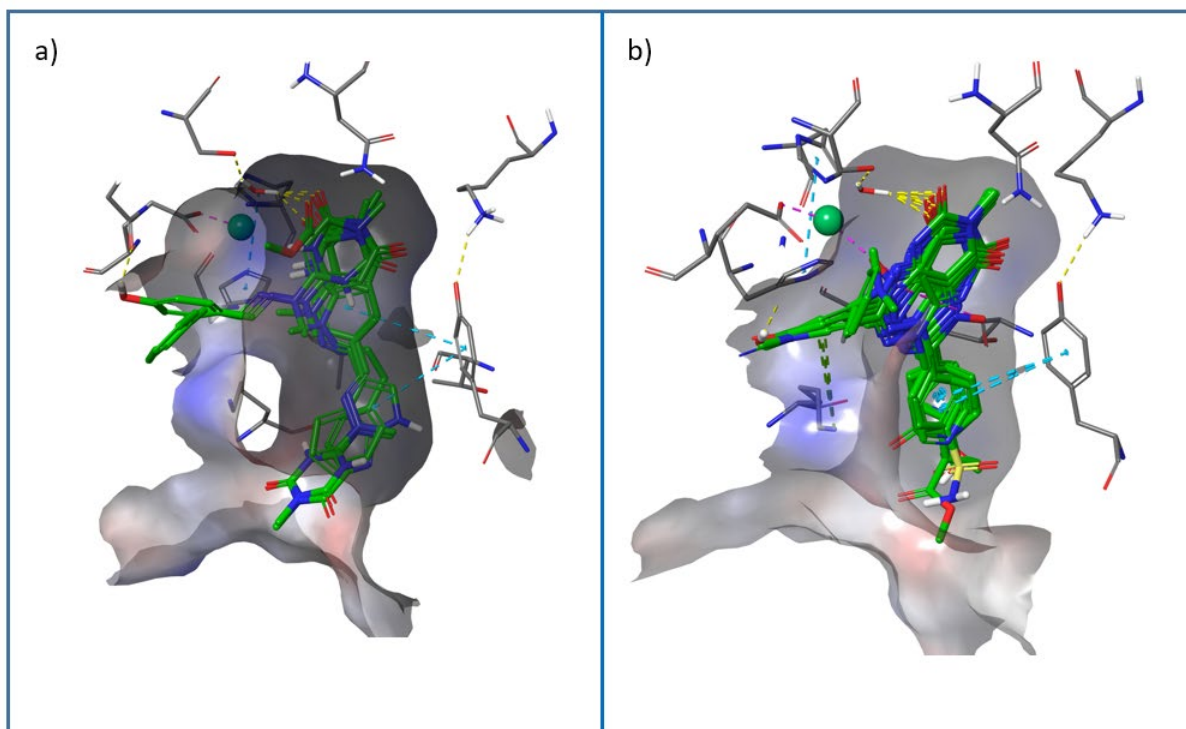
Na slici 4.7. prikazane su priređeni linearni, odnosno ciklički spojevi uklopljeni u aktivno mjesto JMJD2C enzima opisanim protokolom.

Korelacija eksperimentalno određenih inhibitorских aktivnosti s QM/MM energijama izračunatih za monodentatno i bidentatno vezanje prikazana je u slijedećem poglavlju.





**Slika 4.6.a)** MM/GBSA optimizirana geometrija spoja **4a** preklopljena s 5FJH ligandom i odgovarajući 2D dijagram. **b)** MM/GBSA optimizirana geometrija spoja **4a** preklopljena s 5FJK ligandom i odgovarajući 2D dijagram



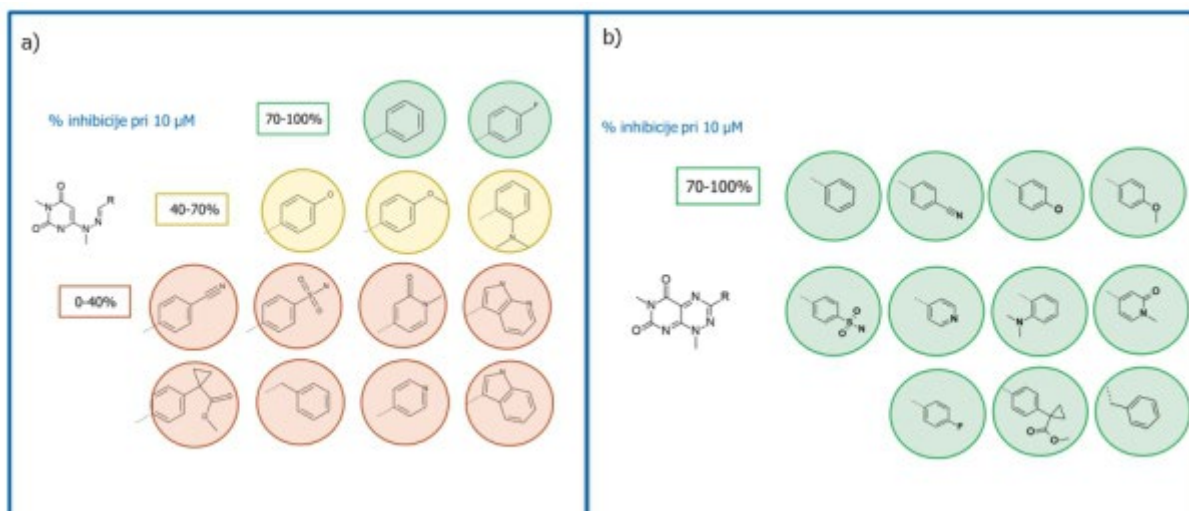
**Slika 4.7. a)** Pripravljene molekule uklopljene u aktivnom mjestu JMJD2C enzima za a) linearne spojeve; **b)** (bi)cikličke spojeve

## 4.6. *In vitro* biološko profiliranje

### 4.6.1. Inhibicijska aktivnost na JMJD2C enzimu

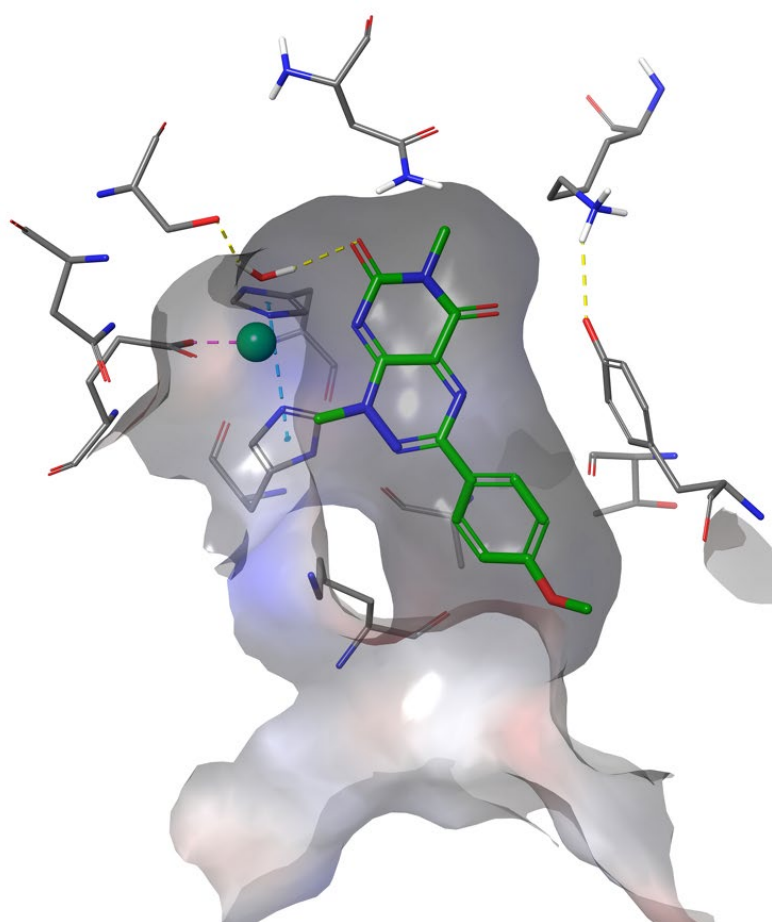
Inhibicijska aktivnost pripremljenih spojeva određena je biokemijskim esejem opisanim u poglavlju o metodama. Većina linearnih spojeva pokazala je inhibiciju od 40% ili manje. Spojevi **3c**, **3d** i **3l** pokazali su inhibiciju u rasponu 40-70% (**Slika 4.8. a**). Među najboljim linearnim spojevima su **3a** i **3m** s inhibicijom većom od 70%. Sve cikličke molekule pokazale su inhibiciju od 100% (**Slika 4.8 b**) te su im određene  $IC_{50}$  vrijednosti inhibicije. Rezultati biološke aktivnosti

prikazani su u **Tablici 4**. Sve cikličke molekule pokazale su inhibicijsko djelovanje u nanomolarnom koncentracijskom području. U usporedbi s literaturnom vrijednosti za aktivnost toksoflavina ( $IC_{50} = 541 \text{ nM}$ , CHEMBL578512) spojevi **4a-4m** pokazali su poboljšanu aktivnost, zahvaljujući dodatnim interakcijama supstituiranog fenilnog prstena s enzimom. Međutim, učinkovitost vezanja (engl. Ligand efficiency) toksoflavinskih derivata nije poboljšana u odnosu na sam toksoflavin (**Tablica 4.5**). Razlog tome mogu biti: a) nespecifične hidrofobne interakcije dodatnog fenilnog prstena pri čemu aktivnost raste s porastom molekulske mase i b) nemogućnost formiranja optimalne oktaedarske koordinacije s metalnim ionom zbog steričkih smetnji između dodatnog fenila i amino-kiselinskih bočnih lanaca na ulazu u aktivno mjesto. Pripravljene molekule zbog svoje rigidne strukture nemaju konformacijske fleksibilnosti kojom bi se optimirale interakcije dodatnog fenilnog prstena unutar aktivnog mjesta. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da bi supstituenti manje molekulske mase i s više rotacijskih stupnjeva slobode mogli dodatno povećati efikasnost vezanja (**Slika 4.9**).



**Slika 4.8.** Određivanje inhibicijske aktivnosti u odnosu na standard piridin-2,4-karboksilnu dikiselinu za **a)** linearne molekule; **b)** (bi)cikličke molekule

U svrhu optimiranja ADMET svojstva molekula temeljenih na toksoflavinskom motivu te kako bi se unijela dodatna kemijska raznolikost, ispitana je mogućnost promjene osnovnog strukturnog motiva (engl. *scaffold hopping*). Predloženo je nekoliko strukturnih preinaka (**Tablica 1b**) s namjerom da se smanji redoks potencijal toksoflavinskog motiva, a da se pri tom zadrži dobra inhibicijska aktivnost (spojevi **5a**, **5b** i **5c**). Usporedba molekulskih polja novih strukturnih motiva s toksoflavinskim prikazano je na **Slici 4.10**. Iako je opažen pad  $IC_{50}$  vrijednosti u biokemijskom ispitivanju u mikromolarno koncentracijsko područje (**Tablica 4.4.**), i **5b** i **5c** mogu se smatrati novom polazišnom točkom za daljnje optimiranje JMJD2C inhibitora.

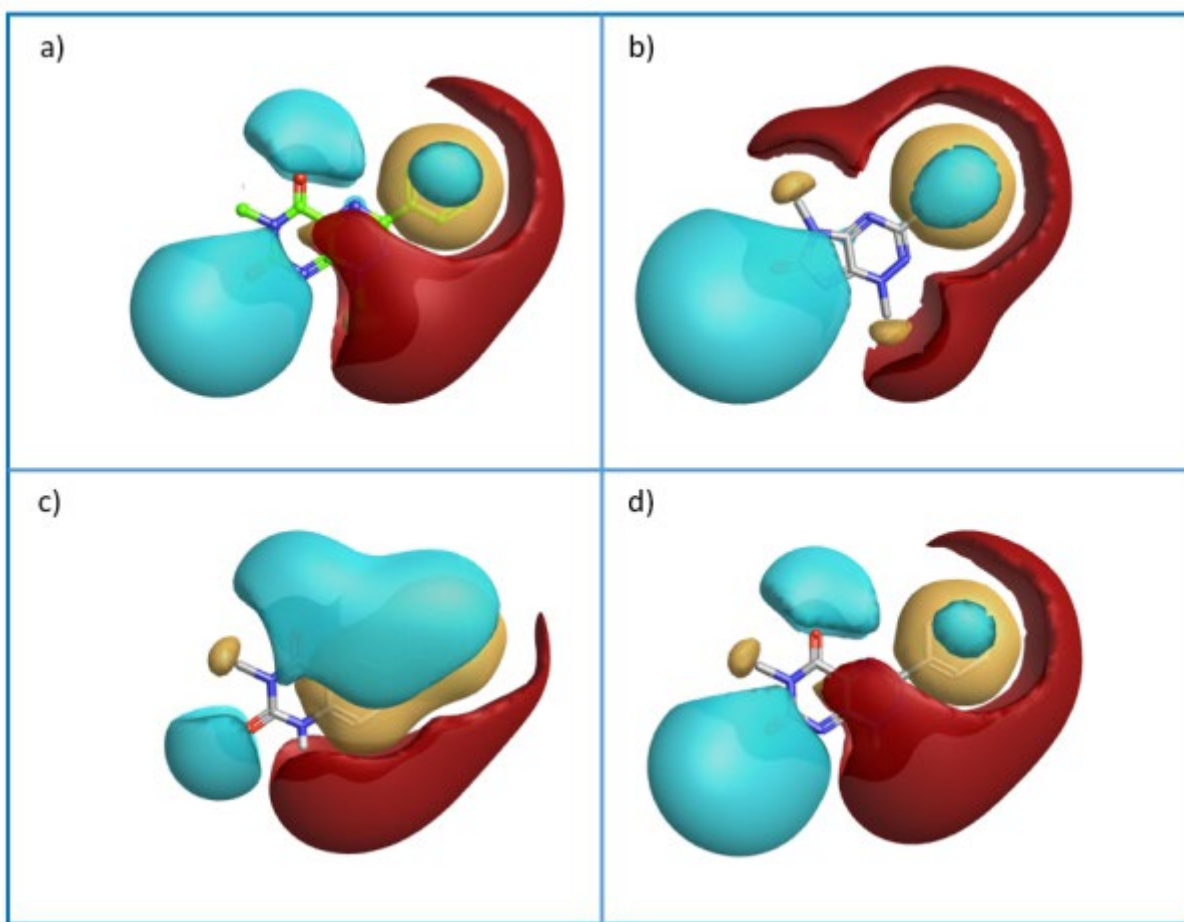


**Slika 4.9.** Uklopljena molekula **4d** koja je pokazala najbolju inhibicijsku aktivnost u aktivnom mjestu enzima JMJD2C

| Spoj               | JMJD2C IC <sub>50</sub> [nM] | Pasivna permeabilnost(A2B) Papp [x10-6 cm/sec] | P-gp substrat | Clint [μl/min/mg] | HepG2 IC <sub>50</sub> [μM] | A549 IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------------------|------------------------------|--|---------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>4a</b>          | 130                          | 34.7   | -             | <12.5             | 0.87                        | 1.1                        |
| <b>4b</b>          | 11                           | 26.8   | -             | <12.5             | 0.80                        | 1.9                        |
| <b>4c</b>          | 242                          | 13.2   | -             | <12.5             | 1.1                         | 5.8                        |
| <b>4d</b>          | 8                            | 34.5   | -             | <12.5             | 0.80                        | 1.1                        |
| <b>4e</b>          | 42                           | 0.8  | -             | <12.5             | 5.6                         | >30                        |
| <b>4f</b>          | NA                           | 24.9   | +             | <12.5             | 1.2                         | 1.3                        |
| <b>4g</b>          | 29                           | 25.3   | -             | <12.5             | 5.1                         | >30                        |
| <b>4j</b>          | 19                           | 13.4   | -             | 11.6              | 1.8                         | 4.3                        |
| <b>4k</b>          | NA                           | 1.1  | -             | 71850             | 4.5                         | 8.8                        |
| <b>4l</b>          | 16                           | 18.0   | -             | <12.5             | 2.1                         | 5.7                        |
| <b>4m</b>          | 81                           | 30.6   | -             | <12.5             | 0.82                        | 1.6                        |
| <b>5a</b>          | >10000                       | 27.3   | -             | 229.1             | >25                         | >30                        |
| <b>5b</b>          | 7626                         | 35.5   | -             | <12.5             | >25                         | >30                        |
| <b>5c</b>          | 12650                        | 40.6   | -             | 13.1              | >25                         | >30                        |
| <b>Toksoflavin</b> | 54124                        | 16.0   | -             | <12.5             | 4.5                         | 0.022                      |

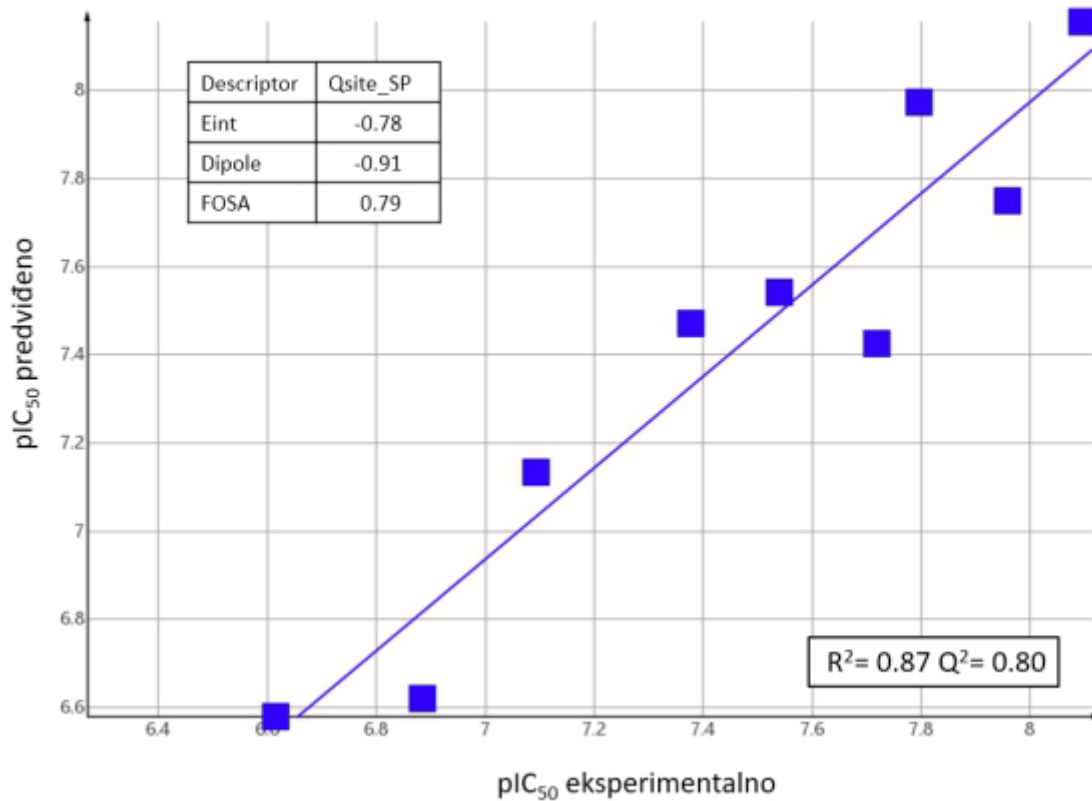
**Tablica 4.4.** Inhibitorska aktivnost na JMJD2C enzimu, pasivna permeabilnost, afinitet za P-gp proteine, mikrosomalna stabilnost (Clint) i utjecaj testiranih spojeva na staničnu proliferaciju HepG2 i A549 staničnih linija.

Izračunate QM/MM energije interakcije inhibitora s JMJD2C enzimom korelirane su s eksperimentalnim aktivnostima izraženim kao  $pIC_{50}$  vrijednosti. Korištena su dva seta računskih vrijednosti; za monodentatni i bidentatni način vezanja. Uz izračunane energije interakcije korišteni su i QikProp deskriptori kao približenje desolvatacijskih efekata (kao što je opisano u odjeljku 3.1 za JMJD2A inhibitore). Izračunane vrijednosti korelirane su s eksperimentalnim  $pIC_{50}$  vrijednostima multiparametarskom metodom parcijalne linearne regresije (PLS) kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu (odjeljak 3.4.4.)



**Slika 4.10.** Molekulska polja izračunata u Cresset programu za a) spoj 4a; b) spoj 5a; c) spoj 5b; d) spoj 5c

Rezultati su prikazani na **Slici 4.11.** i **Tablici 4.3.** Uz energiju interakcije inhibitora s JMJD2C enzimom, dodatni parametri u modelu su izračunani dipolni moment liganda te njegova njegova hidrofobna površina dostupna otapalu. Model ukazuje da će aktivnost spoja rasti ukoliko je a) jača energija interakcije i b) ukoliko je spoj hidrofobniji i ima manji dipolni moment; čime će i entropijski doprinos prelaska liganda iz polarnog vodenog medija u lipofilnije područje veznog mjesta biti manji. Dobiveni model također pokazuje da su de-solvatacijski efekti podjednako važni kao i energija interakcije između inhibitora i enzima. Predloženi računalni protokol i izgrađeni QSAR model mogu se koristiti za semi-kvantitativno predviđanje aktivnosti i virtualni probir novih potencijalnih JMJD2C inhibitora.



**Slika 4.11.** Korelacija između eksperimentalnih i predviđenih  $pIC_{50}$  vrijednosti za skup JMJD2C inhibitora temeljenih na toksioflavinskom motivu.

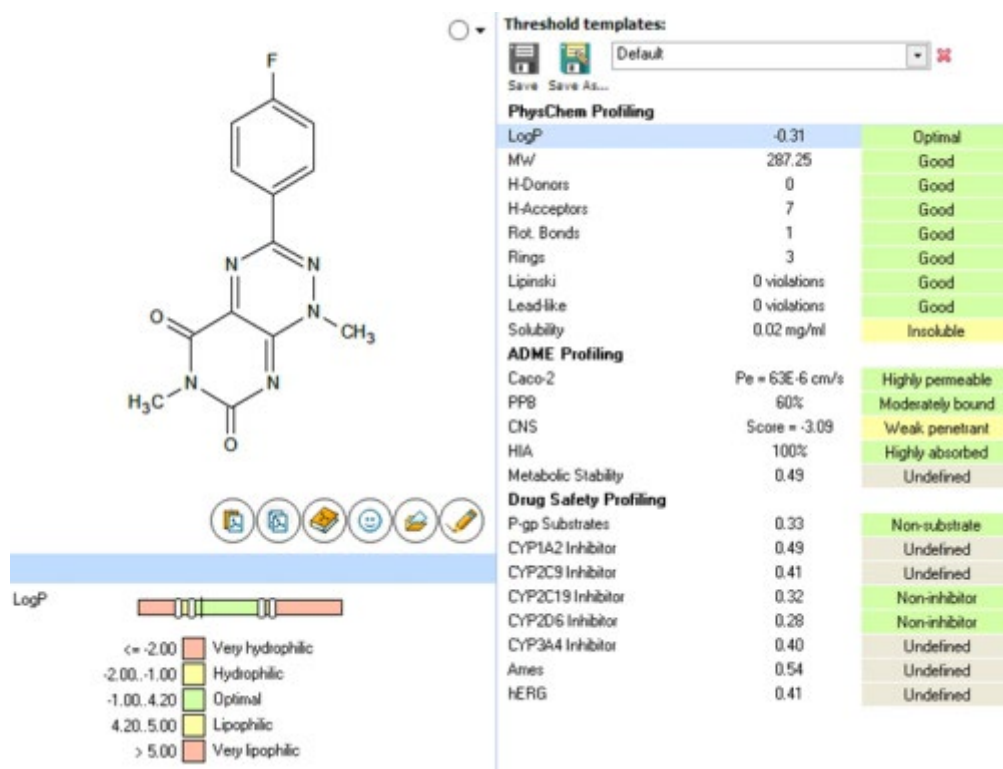
## 4.7. ADME svojstva

### 4.7.1. *In silico* profiliranje

Provedeno je *in silico* predviđanje ADME svojstava pripremljenih molekula u Precepta[140] programskom paketu. Profiliranje je uključivalo računanje svojstava kao što su



lipofilnost (LogP), topološka polarna površina (TPSA – engl. topological polar surface area), pasivna permeabilnost, vezanje za proteine plazme (%PPB – engl. plasma protein binding) te aktivnost naspram citokroma P450 (CYP). Na **Slici 4.12.** prikazan je primjer profiliranja prema svojstvima sličnima lijeku (engl. drug-like properties). Gotovo svi rezultati pokazuju povoljna svojstva.

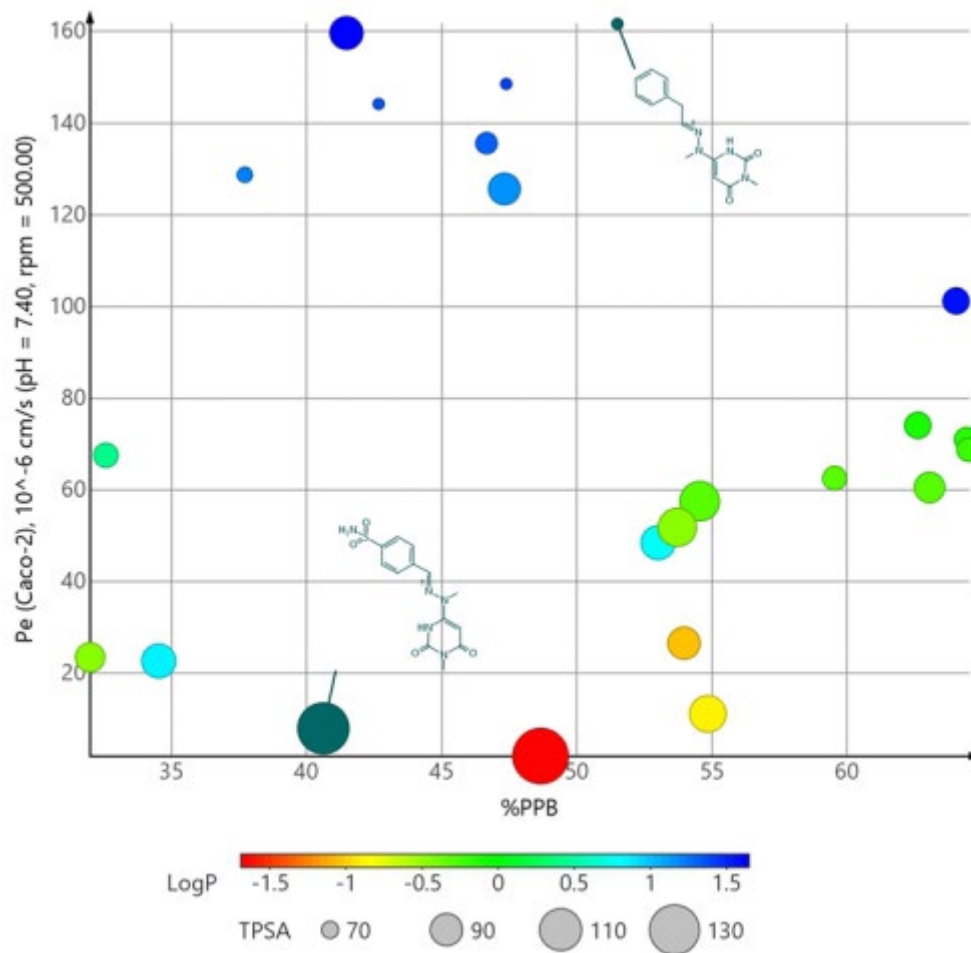


**Slika 4.12.** *In silico* predviđanje ADME svojstava za priređene molekule

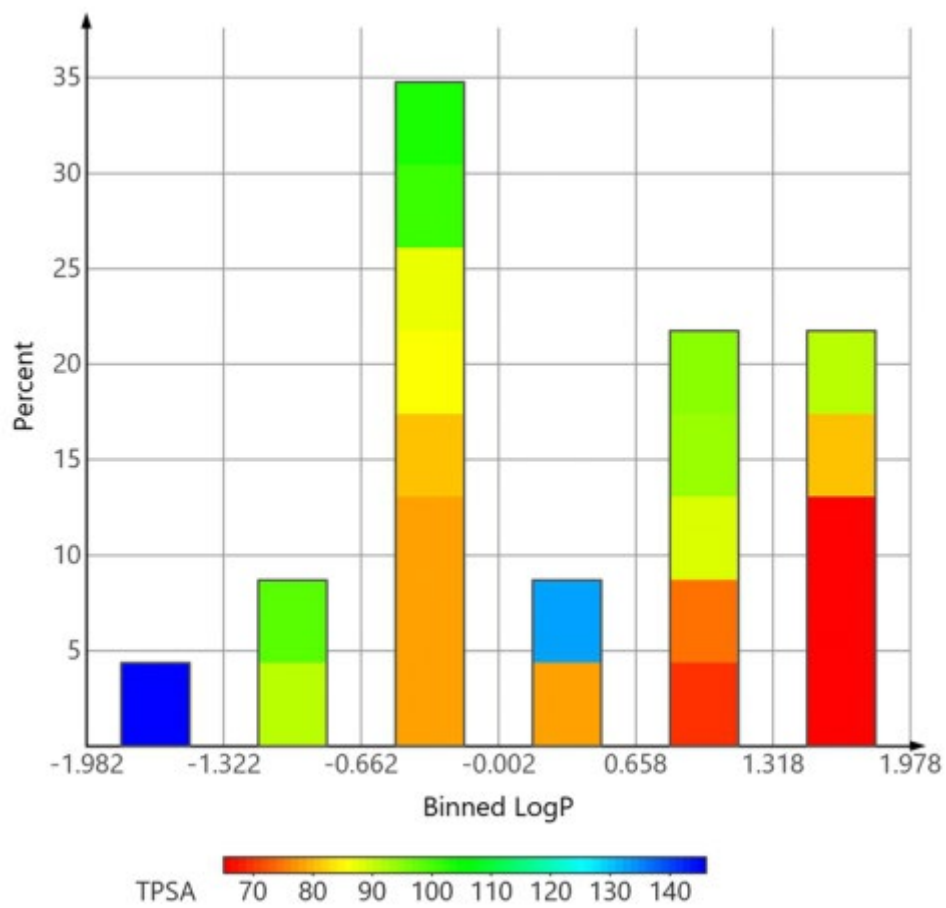
Lipofilnost je izražena kao raspodjela molekula u dvofaznom sustavu n-oktanol – voda, a računa se kao logaritam partijskog koeficijenta između n-oktanola i vode ( $\log P$ ). Kako bise supstanca mogla apsorbirati ona mora biti dovoljno hidrofilna kako bi se otopila u vodenom mediju probavnog trakta, no isto tako mora biti dovoljno lipofilna da prođe kroz membranski fosfolipidni dvosloj.

Topološka polarna površina (TPSA) molekule definira se kao površinski zbroj svih polarnih atoma molekule, prvenstveno kisika i dušika, uključujući i atome vodika vezane na njih. TPSA se uobičajeno koristi u medicinskoj kemiji za optimizaciju permeabilnosti supstanci. Supstance s polarnom površinom većom od 140 kvadratnih angstroma obično imaju lošiju permeabilnost kroz staničnu membranu.

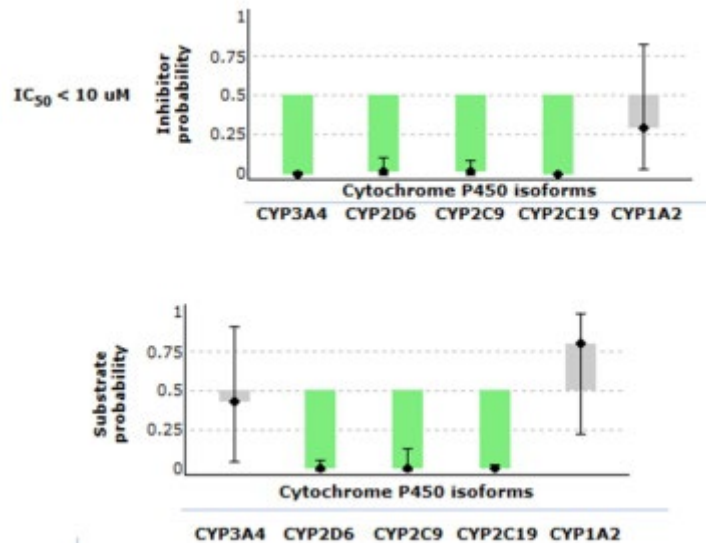
Pokazano je da su dizajnirani spojevi u dobrom rasponu lipofilnosti i topološke polarne površine (TPSA). Također, očekuje se da će spojevi imati dobru pasivnu permeabilnost i nisko vezanje za proteine plazme kao što je vidljivo na **Slikama 4.13 i 4.14**.



**Slika 4.13.** *In silico* profiliranje priređenih molekula prema pasivnoj permeabilnosti i vezanju za proteine plazme (%PPB – engl. plasma protein binding). Također je prikazan utjecaj lipofilnosti (LogP) i topološke polarne površine molekula (TPSA – engl. total polar surface area).



**Slika 4.14.** *In silico* predviđanje raspona priređenih molekula prema lipofilnosti (LogP) i topološkoj polarnoj površini (TPSA)



**Slika 4.15.** *In silico* predviđanje metabolizma putem različitih izoformi citokroma P450.

*In silico* analiza pokazala je da se pripravljeni spojevi nalaze u povoljnom rasponu fizikalno-kemijskih svojstava, da se očekuje nisko vezanje za proteine plazme i dobra permeabilnost. Također je predviđeno da spojevi nisu inhibitori citokroma P450 te da je moguć metabolizam putem CYP3A4 i CYP1A2 enzima kao što je pokazano sa slici 4.15. U slijedećem koraku eksperimentalno su određene permeabilnost i metabolička stabilnost pripravljenih spojeva.

#### 4.7.2. *In vitro* profiliranje

Za spojeve koji su pokazali inhibicijsku aktivnost na JMJD2C enzimu određena su *in vitro* ADME svojstva prema protokolima opisanim u poglavlju o metodama. Rezultati *in vitro* ADME profiliranja, uključujući MDCKII-MDR1 permeabilnost i mikrosomalnu metaboličku stabilnost, prikazani su u tablici 4.4.

##### 4.7.2.1. Test permeabilnosti na MDCKII-MDR1 stanicama

Većina ispitivanih spojeva pokazala je visoku pasivnu permeabilnost, s Papp (A2B) vrijednostima u prisutnosti P-gp inhibitora u rasponu od  $10,8 - 34,5 \times 10^{-6}$  cm/s. Dva spoja klasificirana su kao niskopropusna, **4e** i **4k**, sa vrijednostima propusnosti  $< 2 \times 10^{-6}$  cm/s. Prema

granicama određenim u literaturi [92, 100] na propusnost većine ispitivanih spojeva nije utjecao P-glikoprotein. Omjer izlučivanja (Papp (BA) / Papp (AB)) je bio niži od 2 i u prisutnosti inhibitora nije smanjen za više od 50% u usporedbi s omjerom izlučivanja bez P-gp inhibitora. Samo je spoj **4f** klasificiran kao mogući P-gp supstrat.

#### **4.7.2.2. Metabolička stabilnost**

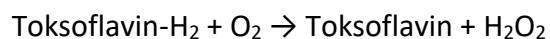
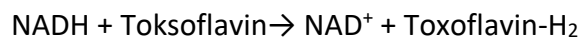
Inkubacija s mikrosomima jetre miša pokazala je da su gotovo svi ispitivani spojevi stabilne molekule s vrijednostima klirensa ispod 12,5  $\mu\text{l}/\text{min} / \text{mg}$  proteina, osim spoja **5a** koji je pokazao profil visokog klirensa. Pored toga, za spoj **4k** nije određena vrijednost klirensa zbog analitičkih poteškoća.

Izmjerene vrijednosti za permeabilnost kroz membranu i metaboličku stabilnost u skladu su *sain silico* predviđenim vrijednostima, pa se *in silico* metode mogu koristiti za profiliranje i prioritiziranje novih ciljnih molekula.

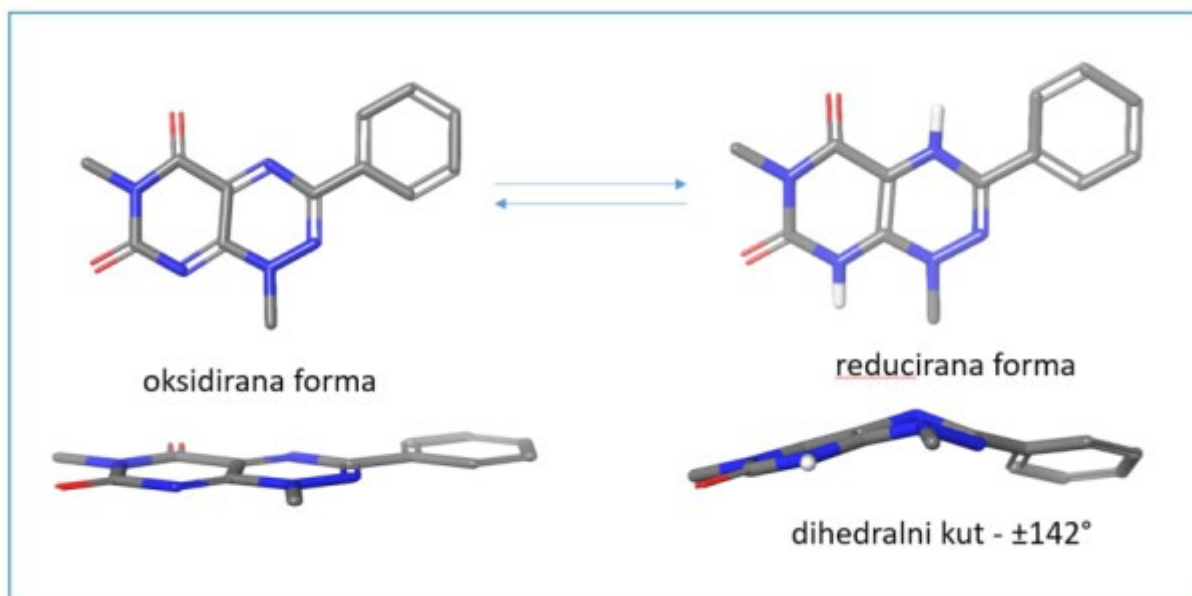
#### **4.7.3. Redoks potencijal derivata toksoflavina**

Kako bi se bolje razumjela elektronska struktura pripremljenih derivata toksoflavina i istražila moguća veza s izmjerenim utjecajem na staničnu vijabilnost, izračunati su njihovi redoks potencijali.

Kao što je već objavljeno za molekule temeljene na flavinskom motivu, redoks potencijal može se modulirati supstituentima različitih svojstava[141]. Poznato je da toksoflavin kao prirodni spoj ima redoks svojstva koja rezultiraju smanjenjem stanične vijabilnosti. Mehanizam reakcije sličan je mehanizmu kod flavina te je pokazano da se odvija na sljedeći način:

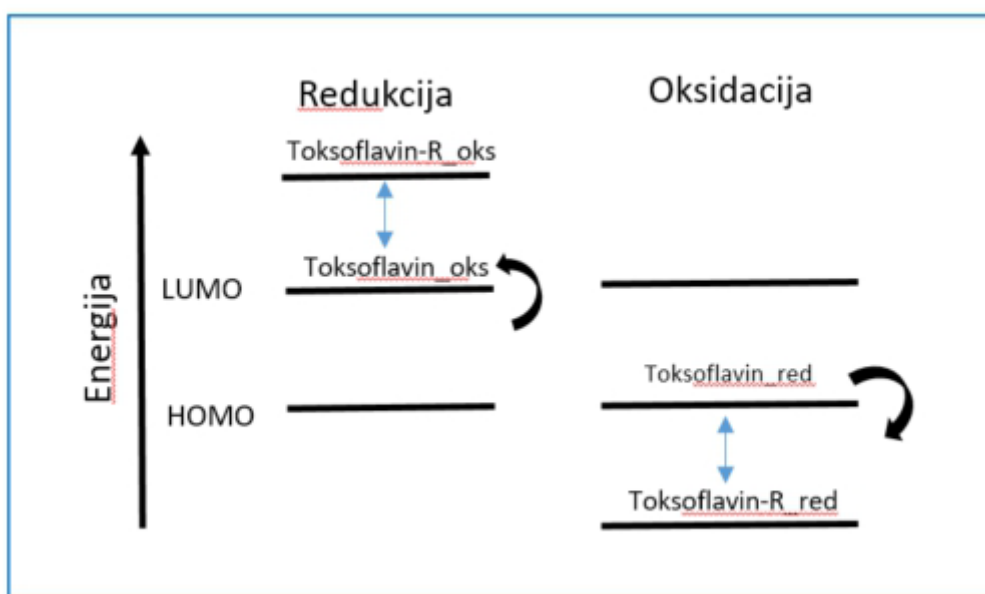


pri čemu nastaje po stanicu toksični vodikov peroksid[142]. Geometrije pripravljenih molekula te njihova elektronska struktura istražena su metodom funkcionala gustoće (DFT eng. Density functional theory) M06-2x/6-31(2d,p)+ kako je opisano u odjeljku s metodama (3.4.2.). Derivati toksoflavina planarni su u oksidiranom obliku a savijeni pod kutom od  $\pm 142^\circ$  u reduciranom obliku zbog piramidalizacije dušika, analogno flavinskim derivatima (**Slika 4.16.**)[143, 144].



**Slika 4.16.** Geometrije derivata toksoflavina supstituiranog fenilnim prstenom (**4a**) u oksidiranom i reduciranom obliku.

Smanjenje redoks potencijala postiže se destabilizacijom LUMO orbitale (eng. Lowest Unoccupied Molecular Orbital) oksidiranog oblika u odnosu na toksoflavin (jer će trebati više energije da bi se orbitale popunile dodatnim elektronima) te stabilizacija HOMO orbitale (eng. highest occupied molecular orbital) reducirane forme toksoflavina (jer će trebati više energije za izvlačenje elektrona) kao što je prikazano na **Slici 4.17**.



**Slika 4.17.** Shematski prikaz željenog utjecaja različito supstituiranih fenilnih prstena na toksoflavinskom motivu u cilju smanjenja redoks potencijala.

Utjecaj različito supstituiranih fenilnih prstena na elektronsku strukturu toksoflavina, a time i na redoks potencijal, izračunan je za sve pripravljene molekule.

Doista, LUMO orbitale ispitivanih derivata u oksidiranom obliku destabilizirane su u usporedbi s toksoflavinom. To ukazuje na niži afinitet prema redukciji. Međutim, apsolutne negativne vrijednosti energija LUMO orbitala pokazuju da je redukcija još uvijek spontani proces za

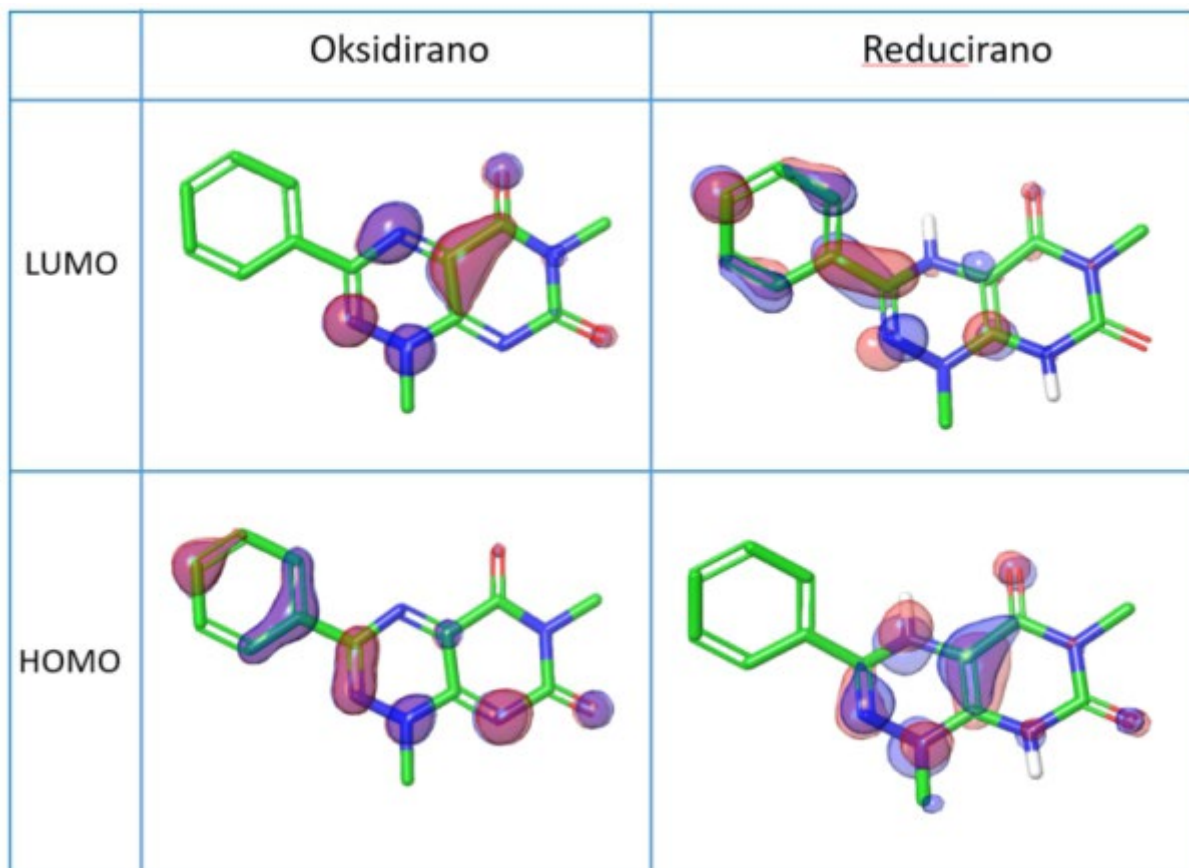


ispitivane derivate toksoflavina. Uspoređujući značajno veću energiju orbitala acikličkih spojeva, gdje diazalenski konjugirani sustav ne postoji, s cikličkim supstituiranim derivatima toksoflavina, još uvijek ostaje pitanje je li ta LUMO destabilizacija dovoljno značajna da smanji redoks potencijal i potencijalnu nespecifičnu toksičnost supstituiranih spojeva temeljenih na toksoflavinskom motivu.

HOMO orbitale reducirane forme također se destabiliziraju odabranim supstitucijama što ih čini sklonijima oksidaciji, za sve molekule osim u slučaju spojeva **3b** i **3e**. Iako je redox potencijal zbirni efekt oba procesa, očekuje se da bi redukcija kao prvi korak mogla biti sporija nego za toksoflavin, kao što je to slučaj s ranim radom na flavinama od strane Halla i suradnika[143].

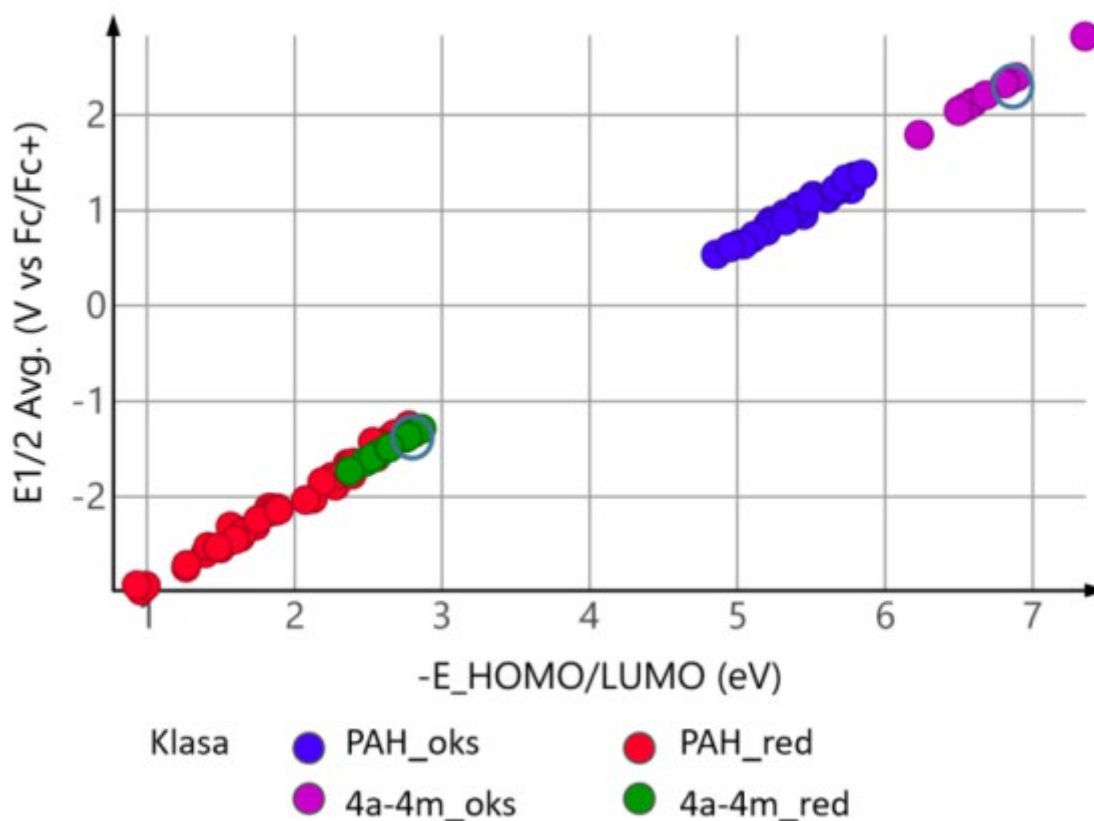
Kao što je i očekivano, HOMO orbitala reduciranog oblika nalikuje LUMO orbitali oksidiranog oblika kao što je prikazano na **Slici 4.18**. Uglavnom je  $\pi^*$  orbitala lokalizirana na diazalenskom sustavu i nepodijeljenom elektronskom paru susjednog dušikovog atoma. Raspodjela elektronske gustoće na fenilnom supstituentu također doprinosi i HOMO orbitali oksidiranog oblika i LUMO orbitali reduciranog oblika.

Zanimljivo je također primijetiti da nepodijeljeni elektronski par N8 dušikova atoma iz diazalenskog sustava puni HOMO orbitale oksidiranog oblika, dok je drugi nepodijeljeni elektronski par na N4 dušikovom atomu dio LUMO orbitale (**Slika 4.18.**). Ovo može objasniti preferencijalnu koordinaciju N8 dušikova atoma prema ionu metala što je uočeno kod rezultata molekuskog uklapanja i QM/MM računa.



**Slika 4.18.** Vanjske orbitale za oksidirane i reducirane forme spoja **4a**.

Predviđeni potencijali redukcije i oksidacije toksoflavinskih derivata uspoređeni su s izmjerenim i izračunatim redoks potencijalima za policikličke aromatske ugljikovodike kao što je prikazano na **Slici 4.19.**[145, 146]. Predviđeni redoks potencijali izračunati su iz energija vanjskih orbitala koristeći regresijsku jednadžbu za poliaromatske ugljikovodike. Reducijski potencijali ispitivanih derivata toksoflavina nalaze se u rasponu izmjerenih i izračunatih potencijala za poliaromatske ugljikovodike, dok su oksidacijski potencijali reduciranih formi veći od onih kod poliaromatskih ugljikovodika, što potvrđuje povećani redox potencijal toxoflavina u odnosu na policikličke aromatske ugljikovodike.



**Slika 4.19.** Prikaz izračunatih HOMO/LUMO energija (eV) u odnosu na eksperimentalni E1/2 prosjek. Zaokružene točke su vrijednosti za toksoflavin.

#### 4.8. Utjecaj na proliferaciju staničnih linija HepG2 i A549

Ispitivana je proliferacija staničnih linija HepG2 i A549 nakon 24 i 72 sata inkubacije s ispitivanim spojevima prema protokolima opisanim u odjeljku s metodama. HepG2 je stanična linija koju čine stanice karcinoma ljudske jetre s visokom stopom proliferacije. HepG2 stanična linija uobičajeno se koristi u ispitivanjima metabolizma lijekova i hepatoksičnosti. A549 stanice su adenokarcinomne stanice alveolarnog bazalnog epitela čovjeka. Koriste se obično kao modeli za proučavanje raka i razvoj terapije lijekovima protiv njega. Važno je napomenuti da

je utjecaj na proliferaciju HepG2 stanica mjeren nakon 24 sata dok je utjecaj na proliferaciju A549 stanica mjeren nakon 72 sata.

Rezultati ispitivanja na ovim staničnim linijama su prikazani u **Tablici 4.4**. Spojevi **4a-4m** utječu na staničnu proliferaciju kod obje stanične linije s  $IC_{50}$  vrijednostima u niskom mikromolarnom ( $\mu M$ ) rasponu. Izuzetak su spojevi **4e** i **4g** koji nisu pokazali utjecaj na proliferaciju kod A549 stanične linije.

Spojevi **5a-5c** nisu pokazali utjecaj na staničnu proliferaciju ni kod jedne od staničnih linija. Ti su rezultati u skladu s mjerenom inhibicijskom aktivnošću na JMJD2C enzimu. Međutim, očekuje se da će utjecaj na staničnu proliferaciju biti kombinacija ciljane inhibicijske aktivnosti na JMJD2C enzimu (vjerojatno i ostalih bliskih analoga iz JMJD2 klase enzima) i nespecifične toksičnosti zbog oksido-reduktivnog potencijala toksoflavinskog motiva.

Budući da su rezultati na HepG2 staničnoj liniji usporedivi s onima za A549 staničnu liniju, unatoč znatno dužem vremenu inkubacije u slučaju A549 stanične linije, to ukazuje da bi glavni faktor koji utječe na proliferaciju stanične linije mogao biti specifična, ciljana aktivnost na JMJD2C enzimu. Takav zaključak dodatno je potkrijepljen rezultatima dobivenim za sam toksoflavin, gdje je  $IC_{50}$  vrijednost na A549 staničnoj liniji za dva reda veličine niži nego na HepG2 staničnoj liniji, a također i za jedan red veličine manji od njegove inhibicijske aktivnosti na JMJD2C enzimu.

Odnos između inhibicijske aktivnosti na JMJD2C enzimu i utjecaja na staničnu proliferaciju grafički je prikazana na **Slikama 4.20. a) i b)**. Da bi se dodatno istražili glavni čimbenici koji utječu na staničnu proliferaciju, provedena je analiza parcijalne linearne regresije (PLS) za izgradnju statističkog modela.

Pored inhibicijske aktivnosti na JMJD2C enzimu, izračunato je i nekoliko strukturnih parametara; clogP, ukupna polarna površina (TPSA), broj donora i akceptora vodikovih veza

(HBD, HBA). Pored toga, eksperimentalna permeabilnost (Papp (AB)) i izračunati prijelazi HOMO/LUMO orbitala korišteni su kao neovisne varijable. PLS modeli utjecaja na staničnu proliferaciju za HepG2 i A549 stanične linije prikazani su na slikama **4.20. c) i d)**.

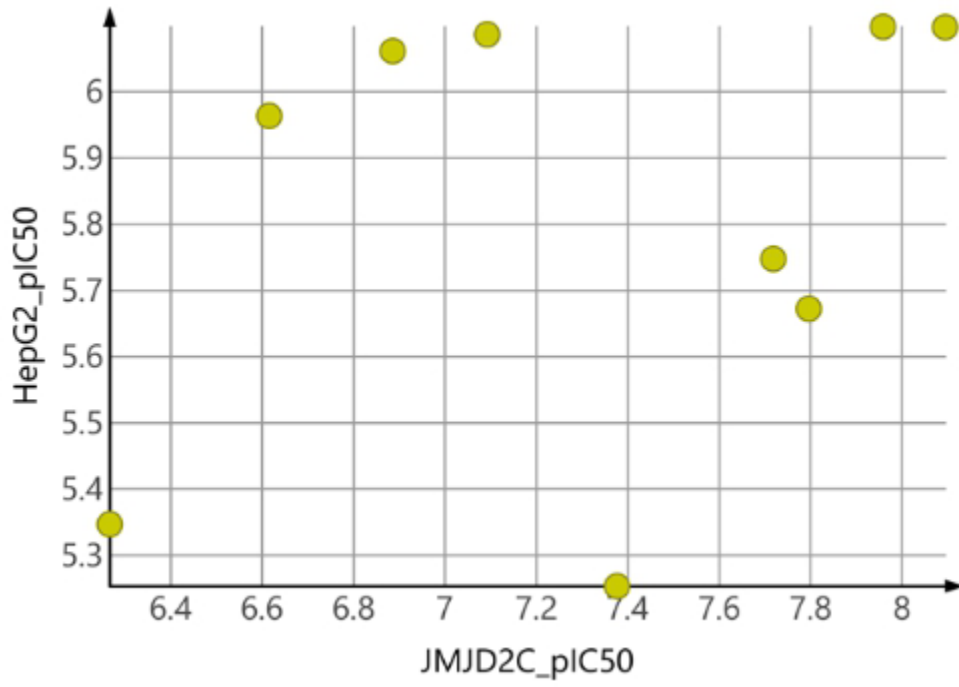
Eksperimentalne vrijednosti, izračunati parametri i predviđene IC<sub>50</sub> vrijednosti navedeni su u **Tablici 5**. Razvijeni modeli opisuju proliferaciju HepG2 stanične linije pomoću specifične inhibicijske aktivnosti na JMJD2C enzimu, stanične permeabilnosti i izračunatih logP vrijednosti. Na proliferaciju kod A549 stanične linije utječu isti parametri s dodatkom LUMO orbitalnih prijelaza oksidirane forme ispitivanih spojeva.

To je u skladu s duljim vremenskim periodom inkubacije u eksperimentalnim postavkama za A549 staničnu liniju gdje bi nespecifični toksični učinci uzrokovani redox potencijalom spojeva mogli imati veći utjecaj na izmjerene IC<sub>50</sub> vrijednosti. Važno je napomenuti da je za model proliferacije A549 stanične linije toksoflavin isključen jer nijedna od predviđenih neovisnih varijabli nije mogla objasniti značajnu razliku između stanične proliferacije HepG2 i A549 staničnih linija. Kao što je prethodno rečeno, to može biti pokazatelj da je za ispitivane derivate nespecifična toksičnost toksoflavina uzrokovana njegovim redoks potencijalom smanjena. Također je moguće da je kod derivata toksoflavina smanjen afinitet za neke druge, strukturno slične, biološke mete.

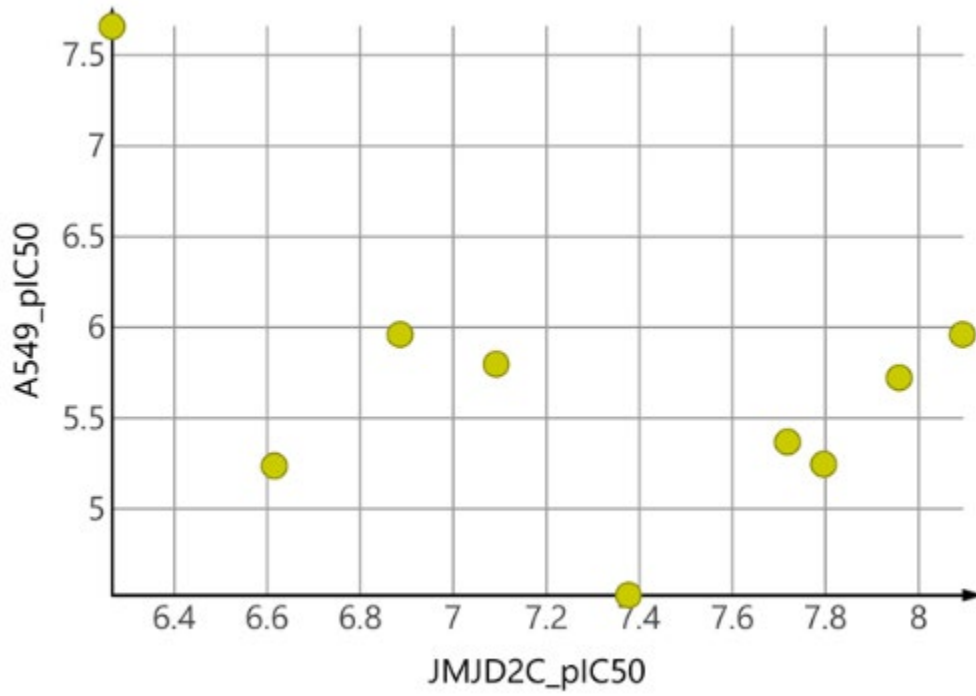
| Spoj       | JMJD2C<br>pIC <sub>50</sub> | HepG2<br>pIC <sub>50</sub> | A549<br>pIC <sub>50</sub> | ΔLUMO<br>oks_eV | ΔHOMO<br>red_eV | A2BPapp<br>[x10 <sup>-6</sup> cm/sec] | cLogP | HBA | HBD | TPSA   | HepG2_pred | A549_pred |
|------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|-------|-----|-----|--------|------------|-----------|
| 4a         | 6.89                        | 6.06                       | 5.96                      | 0.24            | 0.22            | 34.20                                 | -0.26 | 7   | 0   | 77.70  | 6.12       | 5.86      |
| 4b         | 7.96                        | 6.10                       | 5.72                      | -0.05           | -0.07           | 19.37                                 | -0.43 | 8   | 0   | 101.49 | 5.97       | 5.74      |
| 4c         | 6.62                        | 5.96                       | 5.24                      | 0.30            | 0.27            | 11.58                                 | -0.61 | 8   | 1   | 97.93  | 5.72       | 5.08      |
| 4d         | 8.09                        | 6.10                       | 5.96                      | 0.33            | 0.31            | 21.89                                 | -0.33 | 8   | 0   | 86.93  | 6.04       | 5.81      |
| 4e         | 7.38                        | 5.25                       | 4.52                      | -0.05           | 0.00            | 0.70                                  | -1.50 | 10  | 1   | 146.24 | 5.42       | 4.71      |
| 4j         | 7.72                        | 5.75                       | 5.37                      | 0.04            | 0.01            | 10.76                                 | -1.26 | 8   | 0   | 90.59  | 5.63       | 5.13      |
| 4l         | 7.80                        | 5.67                       | 5.24                      | 0.43            | 0.32            | 14.12                                 | -0.37 | 8   | 0   | 80.94  | 5.91       | 5.51      |
| 4m         | 7.09                        | 6.09                       | 5.80                      | 0.16            | 0.13            | 33.53                                 | -0.16 | 7   | 0   | 77.70  | 6.15       | 5.95      |
| toxoflavin | 6.27                        | 5.35                       | 7.66                      | 0.00            | 0.00            | 11.70                                 | -1.91 | 7   | 0   | 77.70  | 5.36       |           |

**Tablica 5.** Eksperimentalne aktivnosti, izračunati parametri i predviđene IC<sub>50</sub> vrijednosti za HepG2 i A549 stanične linije

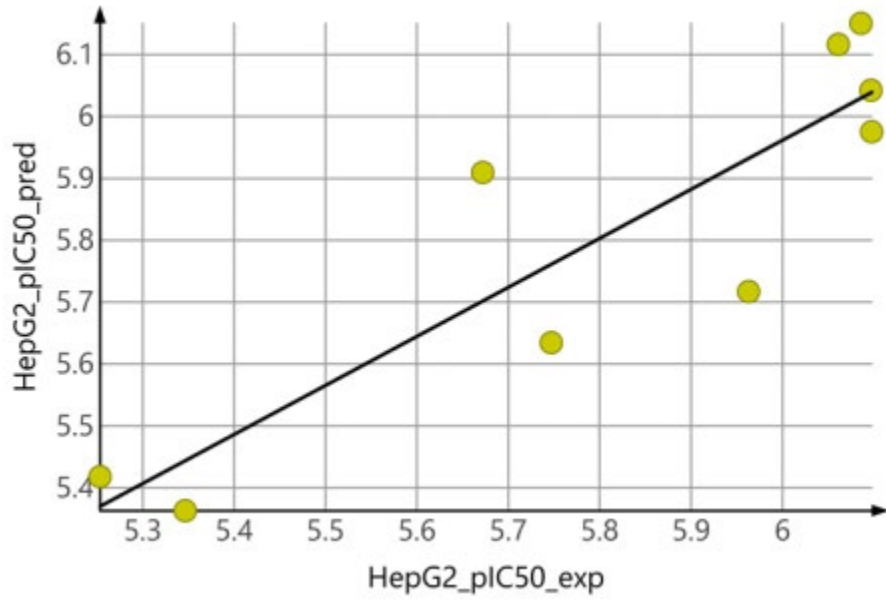
a)



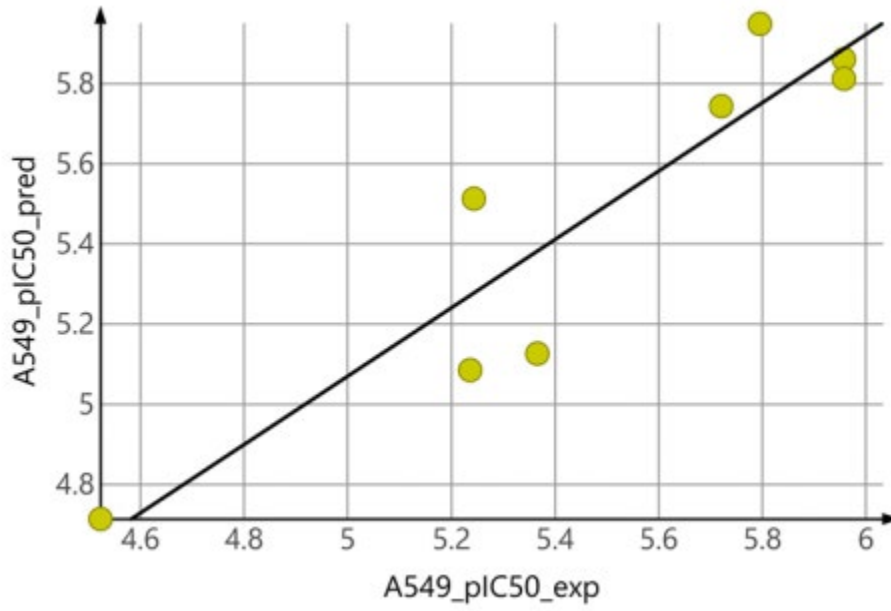
b)



c)



d)





**Slika 4.20.** Inhibicijska aktivnost enzima JMJD2C u odnosu na staničnu proliferaciju za a) HepG2 i b) A549 stanične linije. Eksperimentalne vrijednosti u odnosu na predviđene  $plC_{50}$  vrijednosti za c) HepG2 i d) A549 stanične linije.

## 5. ZAKLJUČAK

Epigenetičke promjene najčešće označavaju promjene koje utječu na aktivnost i ekspresiju gena u stanici, ali se mogu koristiti i za opisivanje nasljednih fenotipskih promjena. Takvi učinci na stanične i fiziološke fenotipske osobine mogu proizaći iz vanjskih čimbenika ili biti dio uobičajenog razvoja.

Post-transkripcijske epigenetičke modifikacije histona vitalne su za stanice pri regulaciji ekspresije gena i mogu imati mnoge različite uloge u stanicama. Postoji nekoliko vrsta modifikacija histona: acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinacija i sumoilacija. Acetilacija i metilacija najznačajnije su i najbolje proučene modifikacije histona.

Metilacija je čest i široko korišten mehanizam za epigenetičke modifikacije u stanicama. Pokazalo se da može biti povezana s mnogim ljudskim bolestima, uključujući različite karcinome, autoimune poremećaje i neurološke poremećaje (Huntingtonova, Alzheimerova, Parkinsonove bolest, shizofrenija).

Uspjesi s inhibitorima histon deacetilaze (HDAC) u kliničkom području potaknuli su razvoj regulacijskih molekula za metilaciju histona, uključujući inhibitore histon lizin demetilaze (KDM/JmJc).

Brojni dokazi sugeriraju povezanost JMJD2C enzima i različitih karcinoma. Mnoga su istraživanja već objavljena na tu temu i svakim se danom pronalazi sve više dokaza da je JMJD2C enzim doista jedan od pokretača nastanka karcinoma što samo dokazuje kako je ovo područje danas od velikog interesa medicinske kemije. U posljednjih nekoliko godina identificirano je više vrsta inhibitora JMJD2C enzima, međutim većina tih inhibitora su analozi kofaktora  $\alpha$ -ketoglutarata, kao N-oksalil glicin, 2,4-piridin dikarboksilna kiselina ili su snažni metalni kelatori poput 2,2-bipiridina ili hidroksikinolona. Iako ovi spojevi mogu biti snažni biokemijski inhibitori, zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava imaju loša ADME svojstava, posebno staničnu permeabilnost.

U ovom radu dizajnirana je, sintetizirana i u biokemijskim i staničnim eksperimentima profilirana fokusirana biblioteka nekarboksilatnih inhibitora JMJD2C histon demetilaze zasnovana na toksoflavinskom strukturnom motivu. Pri samom dizajnu molekula posebna se pažnja obratila i na to da molekule imaju ujedno i povoljna ADME svojstva. Kako bi se umanjio redoks potencijal i

nepovoljna svojstava koja on nosi, na toksoflavinski motiv uvedeni su supstituenti s različitim elektronskim svojstvima.

Biološko profiliranje pripremljene biblioteke identificiralo je nekoliko spojeva kao snažne inhibitore JMJD2C enzima s aktivnošću u niskom nanomolarnom području u specifičnom biokemijskom eksperimentu te u mikromolarnom području u staničnim eksperimentima na HepG2 i A549 staničnim linijama. Aktivni spojevi također posjeduju i poboljšana *in vitro* ADME svojstva s dobrom pasivnom staničnom permeabilnošću i metaboličkom stabilnošću.

Analizirane su strukturne interakcije pripremljenih inhibitora s aktivnim mjestom JMJD2C enzima optimiziranim protokolom za molekularno uklapanje. Energije interakcija predviđene su QM/MM hibridnim pristupom, a redoks potencijal izračunat je hibridnim DFT metodama. Koristeći Cresset paket računalnih programa i literaturno dostupne podatke o inhibicijskoj aktivnosti spojeva iz ChEMBL baze podataka, izgrađen je generalizirani farmakoforni model aktivnih molekula. Pokazano je da se novosintetizirani spojevi temeljeni na toksoflavinskom motivu oblikom i farmakofornim svojstvima dobro uklapaju u izgrađeni model.

Provedena je statistička analiza prikupljenih podataka kako bi se izgradio mehanistički model interakcija i dobio uvid u glavne čimbenike koji utječu na staničnu aktivnost ispitivanih spojeva.

Razvijeni statistički modeli doprinose razumijevanju djelovanja pripremljenih spojeva te dekonvoluciji izmjerene stanične aktivnosti na doprinose specifične aktivnosti na JMJD2C enzimu, redoks potencijala i nespecifičnog utjecaja na staničnu vijabilnost, kao i mogućih interakcija s drugim biološkim metama. Zanimljivo je napomenuti da se stanična proliferacija HepG2 linije može predvidjeti iz specifične inhibicijske aktivnosti na JMJD2C enzimu, stanične permeabilnosti i izračunatih logP vrijednosti. Na staničnu proliferaciju u stanicama A549 utječu isti parametri s dodatkom LUMO orbitalnih prijelaza oksidiranog oblika za ispitivane spojeve. To je u skladu s duljim vremenskim trajanjem eksperimenta kod A549 stanične linije gdje bi nespecifični toksični učinci mogli imati veći utjecaj na izmjerene IC<sub>50</sub> vrijednosti. To može biti pokazatelj da je za ispitivane spojeve nespecifična toksičnost toksoflavina, uslijed njegova redoks potencijala, smanjena.

Kao rezultat ovog rada identificirane su molekule pogodni sa snažnom inhibicijskom aktivnosti na JMJD2C enzimu i povoljnim ADME svojstvima te kao takve predstavljaju dobru polaznu točku za daljnju optimizaciju i razvoj prema učinkovitim i ne-toksičnim potencijalnim onkološkim lijekovima.

## 6. LITERATURNI IZVORI

1. Zhong, W.-Z. and S.-F. Zhou, *Molecular science for drug development and biomedicine*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(11): p. 20072-20078.
2. Zhou, S.-F. and W.-Z. Zhong, *Drug Design and Discovery: Principles and Applications*. Molecules (Basel, Switzerland), 2017. **22**(2): p. 279.
3. Doroshow, J.H., *Re-Engineering Early Phase Cancer DrugDevelopment: Decreasing the Time from Novel Target to Novel Therapeutic*. 2011.
4. Henning, S.W. and G. Beste, *Loss-of-function strategies in drug target validation*. Current Drug Discovery, 2002: p. 17-21.
5. Peet, N., *What constitutes target validation?* Targets, 2003. **2**: p. 125-127.
6. Yang, Y., S.J. Adelstein, and A.I. Kassis, *Target discovery from data mining approaches*. Drug Discov Today, 2009. **14**(3-4): p. 147-54.
7. Fox, S., et al., *High-throughput screening: update on practices and success*. J Biomol Screen, 2006. **11**(7): p. 864-9.
8. Boppana, K., et al., *Knowledge based identification of MAO-B selective inhibitors using pharmacophore and structure based virtual screening models*. Eur J Med Chem, 2009. **44**(9): p. 3584-90.
9. McInnes, C., *Virtual screening strategies in drug discovery*. Curr Opin Chem Biol, 2007. **11**(5): p. 494-502.
10. Price, A.J., S. Howard, and B.D. Cons, *Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets*. Essays Biochem, 2017. **61**(5): p. 475-484.
11. Congreve, M., et al., *A 'rule of three' for fragment-based lead discovery?* Drug Discov Today, 2003. **8**(19): p. 876-7.
12. Powers, R., *Structure-Based Drug Discovery Edited by Harren Jhoti (Astex Therapeutics, Cambridge, U.K.) and Andrew R. Leach (GlaxoSmithKline, Stevenage, U.K.)*. Springer: Dordrecht. 2007. xii + 250 pp. \$169.00. ISBN 978-1-4020-4406-9. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(32): p. 10042-10043.
13. Lin, S.-K., *Pharmacophore Perception, Development and Use in Drug Design*. Edited by Osman F. Güner. Molecules, 2000. **5**(7): p. 987-989.
14. Wilkinson, G.R., *Drug metabolism and variability among patients in drug response*. N Engl J Med, 2005. **352**(21): p. 2211-21.
15. Annunziato, A., *DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin*. Nature Education, 2008. **1**(1):26.
16. Klemm, S.L., Z. Shipony, and W.J. Greenleaf, *Chromatin accessibility and the regulatory epigenome*. Nat Rev Genet, 2019. **20**(4): p. 207-220.
17. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
18. Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-322.
19. Guo, J.U., et al., *Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain*. Cell, 2011. **145**(3): p. 423-34.

20. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
21. Berndsen, C.E. and J.M. Denu, *Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(6): p. 682-9.
22. Mellert, H.S. and S.B. McMahon, *Biochemical pathways that regulate acetyltransferase and deacetylase activity in mammalian cells*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(11): p. 571-8.
23. Michan, S. and D. Sinclair, *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. Biochem J, 2007. **404**(1): p. 1-13.
24. Metzger, E., et al., *LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 436-9.
25. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
26. Volkel, P. and P.O. Angrand, *The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation*. Biochimie, 2007. **89**(1): p. 1-20.
27. Seeler, J.S. and A. Dejean, *Nuclear and unclear functions of SUMO*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 690-9.
28. Shiio, Y. and R.N. Eisenman, *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13225-30.
29. Nathan, D., et al., *Histone sumoylation is a negative regulator in Saccharomyces cerevisiae and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications*. Genes Dev, 2006. **20**(8): p. 966-76.
30. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-412.
31. Luger, K. and J.C. Hansen, *Nucleosome and chromatin fiber dynamics*. Current Opinion in Structural Biology, 2005. **15**(2): p. 188-196.
32. Byvoet, P., et al., *The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells*. Arch Biochem Biophys, 1972. **148**(2): p. 558-67.
33. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. **119**(7): p. 941-53.
34. Thomas, G., H. Lange, and K. Hempel, *Relative stability of lysine-bound methyl groups in arginine-rich histones and their subfractions in Ehrlich ascites tumor cells in vitro*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1972. **353**: p. 1423-8.
35. Lachner, M., R.J. O'Sullivan, and T. Jenuwein, *An epigenetic road map for histone lysine methylation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 11): p. 2117-24.
36. Rea, S., F. Eisenhaber, and D. O'Carroll, *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. Nature, 2000. **406**: p. 593-9.
37. Dawson, Mark A. and T. Kouzarides, *Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
38. Black, Joshua C., C. Van Rechem, and Johnathan R. Whetstone, *Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact*. Molecular Cell, 2012. **48**(4): p. 491-507.
39. Klose, R.J., E.M. Kallin, and Y. Zhang, *JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(9): p. 715-27.



40. Katoh, M. and M. Katoh, *Identification and characterization of JMJD2 family genes in silico*. Int J Oncol, 2004. **24**: p. 1623-8.
41. Kawazu, M., et al., *Histone demethylase JMJD2B functions as a co-factor of estrogen receptor in breast cancer proliferation and mammary gland development*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17830.
42. Krishnan, S. and R.C. Trievel, *Structural and functional analysis of JMJD2D reveals molecular basis for site-specific demethylation among JMJD2 demethylases*. Structure, 2013. **21**(1): p. 98-108.
43. Whetstine, J.R., et al., *Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases*. Cell, 2006. **125**(3): p. 467-81.
44. Greer, E.L. and Y. Shi, *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(5): p. 343-57.
45. Kouzarides, T., *Histone methylation in transcriptional control*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(2): p. 198-209.
46. Sims, R.J., 3rd, K. Nishioka, and D. Reinberg, *Histone lysine methylation: a signature for chromatin function*. Trends Genet, 2003. **19**(11): p. 629-39.
47. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
48. Labbé, R.M., A. Holowatyj, and Z.-Q. Yang, *Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential*. American journal of translational research, 2013. **6**(1): p. 1-15.
49. Cloos, P.A., et al., *The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 307-11.
50. Hillringhaus, L., et al., *Structural and evolutionary basis for the dual substrate selectivity of human KDM4 histone demethylase family*. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41616-25.
51. Wigle, T.J., et al., *A High-Throughput Mass Spectrometry Assay Coupled with Redox Activity Testing Reduces Artifacts and False Positives in Lysine Demethylase Screening*. J Biomol Screen, 2015. **20**(6): p. 810-20.
52. Gehling, V.S., et al., *Identification of potent, selective KDM5 inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2016. **26**(17): p. 4350-4.
53. Zhang, C., et al., *Histone demethylase JMJD2C: epigenetic regulators in tumors*. Oncotarget, 2017. **8**(53): p. 91723-91733.
54. Wang, Z., et al., *Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome*. Nat Genet, 2008. **40**(7): p. 897-903.
55. Loh, Y.H., et al., *Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2545-57.
56. Tomaz, R.A., et al., *Jmjd2c facilitates the assembly of essential enhancer-protein complexes at the onset of embryonic stem cell differentiation*. Development, 2017. **144**(4): p. 567-579.
57. Sim, Y.J., et al., *2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms*. Stem Cell Reports, 2017. **8**(5): p. 1312-1328.
58. Pedersen, M.T., et al., *Continual removal of H3K9 promoter methylation by Jmjd2 demethylases is vital for ESC self-renewal and early development*. Embo j, 2016. **35**(14): p. 1550-64.

59. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
60. Yang, Z.Q., et al., *Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4735-9.
61. Helias, C., et al., *Polycythemia vera transforming to acute myeloid leukemia and complex abnormalities including 9p homogeneously staining region with amplification of MLLT3, JMJD2C, JAK2, and SMARCA2*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **180**(1): p. 51-5.
62. Rui, L., et al., *Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes*. Cancer Cell, 2010. **18**(6): p. 590-605.
63. Northcott, P.A., et al., *Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 465-72.
64. Suikki, H.E., et al., *Genetic alterations and changes in expression of histone demethylases in prostate cancer*. Prostate, 2010. **70**(8): p. 889-98.
65. Wu, J., et al., *Identification and functional analysis of 9p24 amplified genes in human breast cancer*. Oncogene, 2012. **31**(3): p. 333-41.
66. Berry, W.L. and R. Janknecht, *KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells*. Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 2936-42.
67. Mohammed, H., et al., *Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer*. Nature, 2015. **523**(7560): p. 313-7.
68. Ibrahim, A.A., et al., *Hypoxia Causes Downregulation of Dicer in Hepatocellular Carcinoma, Which Is Required for Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha and Epithelial-Mesenchymal Transition*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(14): p. 3896-3905.
69. Ye, Q., et al., *Genetic alterations of KDM4 subfamily and therapeutic effect of novel demethylase inhibitor in breast cancer*. American Journal of Cancer Research, 2015. **5**(4): p. 1519-1530.
70. Liu, G., et al., *Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer*. Oncogene, 2009. **28**(50): p. 4491-4500.
71. Luo, W., et al., *Histone demethylase JMJD2C is a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 that is required for breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(49): p. E3367-76.
72. Lee, H.-Y., E.G. Yang, and H. Park, *Hypoxia enhances the expression of prostate-specific antigen by modifying the quantity and catalytic activity of Jumonji C domain-containing histone demethylases*. Carcinogenesis, 2013. **34**(12): p. 2706-2715.
73. Li, X. and S. Dong, *Histone demethylase JMJD2B and JMJD2C induce fibroblast growth factor 2: mediated tumorigenesis of osteosarcoma*. Med Oncol, 2015. **32**(3): p. 53.
74. Van Veen, A.G.M., W. K., Recl. Trav. Chim., 1934. **53**: p. 257-268.
75. Daves, G.D., R.K. Robins, and C.C. Cheng, *THE TOTAL SYNTHESIS OF TOXOFLAVIN*. Journal of the American Chemical Society, 1961. **83**(18): p. 3904-3905.
76. Nagamatsu, T., et al., *Syntheses of 3-Substituted 1-Methyl-6-phenylpyrimido[5, 4-e]-1, 2, 4-triazine-5, 7(1H, 6H)-diones (6-Phenyl Analogs of Toxoflavin) and Their 4-Oxides, and Evaluation of Antimicrobial Activity of Toxoflavins and Their Analogs*. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1993. **41**(2): p. 362-368.
77. Yoneda, F., et al., *Syntheses of isoalloxazines, alloxazines, toxoflavins, and fervenulins by oxidative cyclization of the Michael-type adducts from substituted 6-aminouracils and*

- azo-compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1976(22): p. 2398-2402.
78. Todorovic, N., et al., *Microwave-assisted synthesis of 3-aryl-pyrimido[5,4-*e*][1,2,4]triazine-5,7(1*H*,6*H*)-dione libraries: derivatives of toxoflavin*. *Tetrahedron Letters*, 2010. **51**(46): p. 6037-6040.
  79. Franci, G., et al., *Identification and characterization of PKF118-310 as a KDM4A inhibitor*. *Epigenetics*, 2017. **12**(3): p. 198-205.
  80. Leow, P.C., et al., *Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/beta-catenin antagonists against human osteosarcoma cells*. *Invest New Drugs*, 2010. **28**(6): p. 766-82.
  81. Thakur, R. and D.P. Mishra, *Pharmacological modulation of beta-catenin and its applications in cancer therapy*. *J Cell Mol Med*, 2013. **17**(4): p. 449-56.
  82. Lepourcelet, M., et al., *Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(1): p. 91-102.
  83. Desaphy, J., et al., *sc-PDB: a 3D-database of ligandable binding sites--10 years on*. *Nucleic acids research*, 2015. **43**(Database issue): p. D399-D404.
  84. Pedersen, M.T. and K. Helin, *Histone demethylases in development and disease*. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(11): p. 662-71.
  85. Park, S.Y., J.W. Park, and Y.S. Chun, *Jumonji histone demethylases as emerging therapeutic targets*. *Pharmacol Res*, 2016. **105**: p. 146-51.
  86. Kawamura, A., et al., *Highly selective inhibition of histone demethylases by de novo macrocyclic peptides*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14773.
  87. Thinnis, C.C., et al., *Targeting histone lysine demethylases - progress, challenges, and the future*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1839**(12): p. 1416-32.
  88. Westaway, S.M., et al., *Cell Penetrant Inhibitors of the KDM4 and KDM5 Families of Histone Lysine Demethylases. 2. Pyrido[3,4-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one Derivatives*. *J Med Chem*, 2016. **59**(4): p. 1370-87.
  89. Westaway, S.M., et al., *Cell penetrant inhibitors of the KDM4 and KDM5 families of histone lysine demethylases. 2. Pyrido[3,4-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one derivatives*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016. **59**(4): p. 1370-1387.
  90. Davies, M., et al., *ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(W1): p. W612-20.
  91. Raouf, A., et al., *Toxoflavins and deazaflavins as the first reported selective small molecule inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase II*. *J Med Chem*, 2013. **56**(16): p. 6352-70.
  92. Arpinelli, F. and F. Bamfi, *The FDA guidance for industry on PROs: the point of view of a pharmaceutical company*. *Health Qual Life Outcomes*, 2006. **4**(1): p. 85.
  93. Darvas, F., et al., *In Silico and Ex silico ADME approaches for drug discovery*. *Curr Top Med Chem*, 2002. **2**(12): p. 1287-304.
  94. Thompson, T.N., *Early ADME in support of drug discovery: the role of metabolic stability studies*. *Curr Drug Metab*, 2000. **1**(3): p. 215-41.
  95. van de Waterbeemd, H. and E. Gifford, *ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?* *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(3): p. 192-204.

96. Balani, S.K., et al., *Strategy of utilizing in vitro and in vivo ADME tools for lead optimization and drug candidate selection*. *Curr Top Med Chem*, 2005. **5**(11): p. 1033-8.
97. Singh, S.S., *Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs*. *Curr Drug Metab*, 2006. **7**(2): p. 165-82.
98. Li, A.P., *Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery*. *Drug Discov Today*, 2001. **6**(7): p. 357-366.
99. Acharya, P., et al., *Kinetic Identification of Membrane Transporters That Assist P-glycoprotein-Mediated Transport of Digoxin and Loperamide through a Confluent Monolayer of MDCKII-hMDR1 Cells*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2008. **36**(2): p. 452.
100. Mahar Doan, K.M., et al., *Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **303**(3): p. 1029-37.
101. Kremers, P., *In vitro Tests for Predicting Drug-Drug Interactions: The Need for Validated Procedures*. *Pharmacology & Toxicology*, 2002. **91**(5): p. 209-217.
102. Jorgensen, W.L., *The many roles of computation in drug discovery*. *Science*, 2004. **303**(5665): p. 1813-8.
103. Jorgensen, W.L., *Efficient drug lead discovery and optimization*. *Acc Chem Res*, 2009. **42**(6): p. 724-33.
104. Jensen, F., *An Introduction to Computational Chemistry*. Wiley, Chichester, England, 1998.
105. Leach, A.R., *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd edn. Prentice Hall, New York 2001.
106. Carloni, P., U. Rothlisberger, and M. Parrinello, *The Role and Perspective of Ab Initio Molecular Dynamics in the Study of Biological Systems*. *Accounts of Chemical Research*, 2002. **35**(6): p. 455-464.
107. Frenkel, D. and B. Smit, *Understanding Molecular Simulation*. Academic, San Diego, 2002.
108. Schneider, G. and U. Fechner, *Computer-based de novo design of drug-like molecules*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(8): p. 649-63.
109. De Vivo, M., *Bridging quantum mechanics and structure-based drug design*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. **16**: p. 1619-33.
110. Palermo, G., et al., *Anandamide hydrolysis in FAAH reveals a dual strategy for efficient enzyme-assisted amide bond cleavage via nitrogen inversion*. *J Phys Chem B*, 2015. **119**(3): p. 789-801.
111. Palermo, G., et al., *Molecular Simulations Highlight the Role of Metals in Catalysis and Inhibition of Type II Topoisomerase*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2013. **9**(2): p. 857-862.
112. Lodola, A. and M. De Vivo, *The increasing role of QM/MM in drug discovery*. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2012. **87**: p. 337-62.
113. Nantasenamat, C., C. Isarankura-Na-Ayudhya, and V. Prachayasittikul, *Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds*. *Expert Opin Drug Discov*, 2010. **5**(7): p. 633-54.

114. Lipinski, C., *Chris Lipinski. Interview by Peter Kirkpatrick*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(12): p. 900-1.
115. Cheeseright, T., et al., *Molecular field extrema as descriptors of biological activity: definition and validation*. J Chem Inf Model, 2006. **46**(2): p. 665-76.
116. Wold, S., M. Sjostrom, and L. Eriksson, *PLS-regression: A Basic Tool of Chemometrics*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2001. **58**: p. 109-130.
117. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
118. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 235-42.
119. Friesner, R.A., et al., *Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes*. J Med Chem, 2006. **49**(21): p. 6177-96.
120. Friesner, R.A., et al., *Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy*. J Med Chem, 2004. **47**(7): p. 1739-49.
121. Schroedinger, *MacroModel*, Schroedinger, LLC. 2017.
122. Becke, A.D., *Density - functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. The Journal of Chemical Physics, 1993. **98**(7): p. 5648-5652.
123. Lee, C., W. Yang, and R.G. Parr, *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Phys Rev B Condens Matter, 1988. **37**(2): p. 785-789.
124. Vosko, S.H., L. Wilk, and M. Nusair, *Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis*. Canadian Journal of Physics, 1980. **58**(8): p. 1200-1211.
125. Stephens, P.J., et al., *Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields*. The Journal of Physical Chemistry, 1994. **98**(45): p. 11623-11627.
126. Hehre, W.J., R. Ditchfield, and J.A. Pople, *Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules*. The Journal of Chemical Physics, 1972. **56**(5): p. 2257-2261.
127. Banks, J.L., et al., *Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT)*. J Comput Chem, 2005. **26**(16): p. 1752-80.
128. Glendening, E.D., C.R. Landis, and F. Weinhold, *Natural bond orbital methods*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 2012. **2**(1): p. 1-42.
129. Armendariz-Vidales, G., et al., *Nature of electrogenerated intermediates in nitro-substituted nor-beta-lapachones: the structure of radical species during successive electron transfer in multiredox centers*. J Org Chem, 2014. **79**(11): p. 5201-8.
130. Marenich, A.V., et al., *Computational electrochemistry: prediction of liquid-phase reduction potentials*. Phys Chem Chem Phys, 2014. **16**(29): p. 15068-106.
131. Isegawa, M., F. Neese, and D.A. Pantazis, *Ionization Energies and Aqueous Redox Potentials of Organic Molecules: Comparison of DFT, Correlated ab Initio Theory and Pair Natural Orbital Approaches*. J Chem Theory Comput, 2016. **12**(5): p. 2272-84.
132. Biotech, S.S., *Simca-P11.5*. 2013.

133. Bavetsias, V., et al., *8-Substituted Pyrido[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-one Derivatives As Potent, Cell Permeable, KDM4 (JMJD2) and KDM5 (JARID1) Histone Lysine Demethylase Inhibitors*. J Med Chem, 2016. **59**(4): p. 1388-409.
134. Hay, P.J. and W.R. Wadt, *Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals*. The Journal of Chemical Physics, 1985. **82**(1): p. 299-310.
135. Řezáč, J. and P. Hobza, *Benchmark Calculations of Interaction Energies in Noncovalent Complexes and Their Applications*. Chemical Reviews, 2016. **116**(9): p. 5038-5071.
136. Khandelwal, A., et al., *A combination of docking, QM/MM methods, and MD simulation for binding affinity estimation of metalloprotein ligands*. J Med Chem, 2005. **48**(17): p. 5437-47.
137. Schrödinger Release 2019-1: QikProp, S., LLC, New York, NY, 2019.
138. Cecatiello, V., Pasqualato, S., *Crystal Structures of Human Jmjd2C Catalytic Domain Bound to Inhibitors*. To be published, 2015.
139. Gaulton, A., et al., *The ChEMBL database in 2017*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D945-D954.
140. ACD / Percepta, R., Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2017.
141. Mueller, R.M., et al., *Interplay of flavin's redox states and protein dynamics: an insight from QM/MM simulations of dihydronicotinamide riboside quinone oxidoreductase 2*. J Phys Chem B, 2011. **115**(13): p. 3632-41.
142. Latuasan, H.E. and W. Berends, *On the origin of the toxicity of toxoflavin*. Biochim Biophys Acta, 1961. **52**: p. 502-8.
143. Hall, L.H., B.J. Orchard, and S.K. Tripathy, *The structure and properties of flavins: Molecular orbital study based on totally optimized geometries. I. Molecular geometry investigations*. International Journal of Quantum Chemistry, 1987. **31**(2): p. 195-216.
144. North, M.A., S. Bhattacharyya, and D.G. Truhlar, *Improved density functional description of the electrochemistry and structure-property descriptors of substituted flavins*. J Phys Chem B, 2010. **114**(46): p. 14907-15.
145. Mendez-Hernandez, D.D., et al., *Simple and accurate correlation of experimental redox potentials and DFT-calculated HOMO/LUMO energies of polycyclic aromatic hydrocarbons*. J Mol Model, 2013. **19**(7): p. 2845-8.
146. Davis, A.P. and A.J. Fry, *Experimental and computed absolute redox potentials of polycyclic aromatic hydrocarbons are highly linearly correlated over a wide range of structures and potentials*. J Phys Chem A, 2010. **114**(46): p. 12299-304.

## 7. DODACI

## 7.1. Popis slika

|   |    |
|---|----|
| <b>Slika 1.1.</b> Shematski prikaz plana rada pri izradi dizertacije.....                                       | 23 |
| <b>Slika 2.1.</b> Shematski prikaz razvoja novog lijeka po fazama.....  | 24 |
| <b>Slika 2.2.</b> Faze istraživanja lijeka od validacije biloške mete do razvoja kliničkog kandidata.....       | 26 |
| <b>Slika 2.3.</b> Udio najčešćih bioloških meta pri istraživanji lijekova podijeljenih u biokemijske grupe..... | 27 |
| <b>Slika 2.4.</b> Validacija biloške mete.....  | 29 |
| <b>Slika 2.5.</b> Prikaz filtriranja spojeva prema svojstvima pri virtualnom probiru.....                       | 31 |
| <b>Slika 2.6.</b> Prikaz cikličkog procesa optimizacije vodeće molekule.....                                    | 35 |
| <b>Slika 2.7.</b> Prikaz strukture kromatina.....   | 38 |
| <b>Slika 2.8.</b> Demetilaze JMJD2 obitelji.....  | 47 |
| <b>Slika 2.9.</b> Shematski prikaz domena JMJD2C enzima.....  | 48 |
| <b>Slika 2.10.</b> Kristalna struktura humanog JMJD2C enzima.....   | 49 |
| <b>Slika 2.11.</b> Grafički prikaz različitih izvedbi ELISA biokemijskog pokusa.....                            | 60 |
| <b>Slika 2.12.</b> ADME svojstva.....   | 61 |
| <b>Slika 2.13.</b> Razlozi za neuspjeh kliničkih kandidata 1991. i 2001. Godine.....                            | 63 |
| <b>Slika 2.14.</b> Određivanje lipofilnosti.....  | 64 |
| <b>Slika 2.15.</b> Određivanje permeabilnosti.....  | 69 |
| <b>Slika 2.16.</b> Tipični protokol virtualnog probira.....   | 79 |
| <b>Slika 2.17.</b> <i>De novo</i> oblikovanje liganda.....  | 81 |
| <b>Slika 2.18.</b> QM / MM pristup.....   | 83 |
| <b>Slika 2.19.</b> Primjer farmakofornog modela.....  | 85 |
| <b>Slika 2.21.</b> Vrste polja u Cresset programskom paketu.....  | 90 |
| <b>Slika 2.22.</b> Shematski prikaz tijeka rada za izradu 3D QSAR modela.....                                   | 91 |
| <b>Slika 2.23.</b> Primjer interpretacije 3D QSAR modela.....   | 92 |
| <b>Slika 2.24.</b> Shematski prikaz tijeka rada za izradu kvalitativnog modela „Activity atlas“ protokolom..... | 93 |
| <b>Slika 2.25.</b> Primjer interpretacije kvalitativnog modela.....   | 95 |
| <b>Slika 2.26.</b> Shematski prikaz PLS analize.....  | 97 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Slika 4.1.</b> Korelacija između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti pIC <sub>50</sub> za skupinu JMJD2A inhibitora.....                                     | 138 |
| <b>Slika 4.2.</b> Formiranje oktaedarske koordinacije Ni <sup>2+</sup> iona.....   | 141 |
| <b>Slika 4.3.</b> Preklopljena aktivna mjesta enzima 5FJH (narančasto/ žuto) i 5FJK (plavo/ tirkizno) s njihovim pripadajućim ligandima.....                           | 143 |
| <b>Slika 4.4.</b> Farmakorne karakteristike JMJD2C inhibitora.....   | 145 |
| <b>Slika 4.5.</b> Predloženi način vezanja toksoflavina u aktivnom mjestu JMJD2C enzima.....   | 147 |
| <b>Slika 4.6.</b> MM/GBSA optimizirana geometrija spoja <b>4a</b> .....  | 149 |
| <b>Slika 4.7. a)</b> Pripravljene molekule uklopljene u aktivnom mjestu JMJD2C enzima.....   | 150 |
| <b>Slika 4.8.</b> Određivanje inhibicijske aktivnosti u odnosu na standard piridin-2,4-karboksilnu dikiselinu.....   | 151 |
| <b>Slika 4.9.</b> Uklopljena molekula <b>4d</b> .....  | 153 |
| <b>Slika 4.10.</b> Molekulska polja izračunata u Cresset programu.....   | 155 |
| <b>Slika 4.11.</b> Korelacija između eksperimentalnih i predviđenih pIC <sub>50</sub> vrijednosti za skup JMJD2C inhibitora temeljenih na toksioflavinskom motivu..... | 156 |
| <b>Slika 4.12.</b> <i>In silico</i> predviđanje ADME svojstava za priređene molekule.....  | 157 |
| <b>Slika 4.13.</b> <i>In silico</i> profiliranje priređenih molekula.....  | 159 |
| <b>Slika 4.14.</b> <i>In silico</i> predviđanje raspona priređenih molekula prema lipofilnosti (LogP) i topološkoj polarnoj površini (TPSA).....                       | 160 |
| <b>Slika 4.15.</b> <i>In silico</i> predviđanje metabolizma putem različitih izoformi citokroma P450.....  | 161 |
| <b>Slika 4.16.</b> Geometrije derivata toksoflavina supstituiranog fenilnim prstenom ( <b>4a</b> ) u oksidiranom i reduciranom obliku.....                             | 163 |
| <b>Slika 4.17.</b> Shematski prikaz željenog utjecaja različito supstituiranih fenilnih prstena na toksioflavinskom motivu u cilju smanjenja redoks potencijala.....   | 164 |
| <b>Slika 4.18.</b> Vanjske orbitale za oksidirane i reducirane forme spoja <b>4a</b> .....   | 166 |
| <b>Slika 4.19.</b> Prikaz izračunatih HOMO/LUMO energija (eV) u odnosu na eksperimentalni E1/2 prosjek. Zaokružene točke su vrijednosti za toksoflavin.....            | 167 |
| <b>Slika 4.20.</b> Inhibicijska aktivnost enzima JMJD2C u odnosu na staničnu proliferaciju.....  | 173 |

## 7.2. Popis tablica

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tablica 3.1.</b> Popis potrebnih komponenti za izvođenje biokemijskog pokusa.....   | 117 |
| <b>Tablica 3.2.</b> Izračun dodanih volumena priređenih otopina po jažicama.....   | 118 |
| <b>Tablica 4.1. a)</b> Sintetizirane linearne ( <b>3a-3m</b> ) i (bi)cikličke ( <b>4a-4m</b> ) molekule.....   | 133 |
| <b>Tablica 4.1 b)</b> Sintetizirani spojevi kod kojih je toksoflavinski motiv zamijenjen novim strukturnim motivima ( <b>5a-5c</b> ).....  | 133 |
| <b>Tablica 4.2.</b> Eksperimentalne aktivnosti, izračunate QM/MM energije interakcije, NBO energije delokalizacije drugog reda i 3D strukturni deskriptori kompleksa s JMJD2A proteinom.....   | 139 |
| <b>Tablica 4.3.</b> Eksperimentalne aktivnosti, izračunate QM/MM energije interakcije i 3D strukturni deskriptori za komplekse s JMJD2C enzimom.....   | 140 |
| <b>Tablica 4.4.</b> Inhibitorska aktivnost na JMJD2C enzimu, pasivna permeabilnost, afinitet za P-gp proteine, mikrosomalna stabilnost (Clint) i utjecaj testiranih spojeva na staničnu proliferaciju HepG2 i A549 staničnih linija..... | 153 |
| <b>Tablica 5.</b> Eksperimentalne aktivnosti, izračunati parametri i predviđene IC <sub>50</sub> vrijednosti za HepG2 i A549 stanične linije.....  | 170 |

### 7.3. Popis shema

|  |     |
|--|-----|
| <b>Shema 2.1.</b> Strukturni prikaz metilacije citozina.....   | 40  |
| <b>Shema 2.2.</b> Sintetski put za pripremu fokusirane biblioteke toksoflavinskih derivata.....  | 53  |
| <b>Shema 2.3.</b> Numeracija položaja kod toksoflavina.....  | 57  |
| <b>Shema 3.1.:</b> Priprava spojeva.....   | 101 |
| <b>Shema 3.2.</b> Reakcija otvaranja tetrazolnog prstena MTS reagensapod utjecajem sukcinat dehidrogenaze i NADH staničnog koenzima..... | 126 |

## 7.4. Popis jednadžbi

|  |    |
|--|----|
| <b>Jednadžba 2.1.</b> Osnovna jednadžba polja..... | 76 |
|--|----|

## 7.5. Popis kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

2OG - 2-oksoglutarat

SAHA - suberoilanilidhidroksamska kiselina

2,4-PDCA - piridin-2,4-dikarboksilnu kiselinu

ADME – apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija

Lys – lizin

Tyr – tirozin

Asn – asparagin

ELISA - engl. enzyme-linked immunosorbent assay

QM/MM - hibridne kvantno-mehaničkim / molekulsko-mehaničke metode

GPCR - engl. G-protein-coupled receptors

HTS - engl. high-throughput screening

FBDD - engl. fragment based drug discovery

NMR - Nuklearna magnetska rezonancija

SPR – engl. Surface plasmon resonance

SAR - engl. structure - activity relationship

SBDD - engl. structure based drug discovery

LBDD – engl. ligand based drug design

CYP - citokrom P450

hERG - engl. human Ether-à-go-go-Related Gene

HAT - histon acetiltransferaze

HDAC – histon deacetilaza

LSD - lizin-specifična demetilaza

ADP – adenzin difosfat

PHD - engl. plant homeodomain

HIF-1 - engl. hypoxia-inducible factor 1

EtOH – etanol

$\mu$ W – mikrovalno zračenje

PDB – engl. Protein data bank

DMSO – dimetil sulfoksid

AP - alkalna fosfataza

HRP – engl. Horseradish peroxidase

UGT - uridin difosfat-glukuronozil transferaza

GST - glutation-S-transferaza

PST - fenol sulfotransferaza

FEP - engl. free-energy perturbation

MD - molekulska dinamika

QM - kvantna mehanika

QSPR - engl. quantitative structure–property relationship

MM - molekulska mehanika

VS - engl. virtual screening

HF - Hartree-Fock

MP - Møller-Plesset

DFT – engl. density functional theory

PCA - engl. principal component analysis

PLS - engl. partial least square

PK – farmakokinetika

ACC - engl. atom-centred charge

XED – engl. eXtended Electron Distribution

MeOH – metanol

EtOAc – etil-acetat

MRM - engl. multiple reaction monitoring

MM-GBSA – engl. molecular mechanics, the generalized Born model and solvent accessibility

NBO - engl. natural bond orbital

HOMO – engl. highest occupied molecular orbital

LUMO – engl. lowest unoccupied molecular orbital

TPSA – engl. total polar surface area

## 8. ŽIVOTOPIS



## **I osobni podaci**

Ime i prezime:                      Vatroslav Letfus

Datum i mjesto rođenja:        14. svibnja 1982., Zagreb, Hrvatska

## **II Podaci o školovanju**

1988.-1996.    Osnovna škola „Ljudevit Gaj“, Zaprešić

1996.-2000.    VII. Gimnazija, Zagreb

2000.-2007.    studij inženjerstva na odsjeku za Kemiju pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

2012.-2020.    poslijediplomski studij „Medicinska kemija“ pri Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci

## **III Podaci o zaposlenju**

2007.-2009.    GlaxoSmithKline istraživaki centar Zagreb d.o.o.

2009.-2010.    Institut “Ruđer Bošković”

2010.-2012.    Galapagos istraživački centar Zagreb d.o.o.

2012.-            Fidelta istraživaki centar Zagreb d.o.o.

#### **IV Članstvo u organizacijama**

Hrvatsko kemijsko društvo

#### **V Popis radova**

##### ***Znanstveni radovi u časopisima:***

1. Letfus V., Jelić D., Bokulić A., Petrinić Grba A., Koštrun S., *“Rational design, synthesis and biological profiling of new KDM4C inhibitors”*, Bioorg Med Chem. 2020 Jan 1;28 (1):115128
2. Padovan J., Ralić J., Letfus V., Milić A., Bencetić Mihaljević V., *“Investigating the barriers to bioavailability of macrolide antibiotics in the rat”*, Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2012 Sep;37(3):163-71

#### **VI Priopćenja na znanstvenim skupovima**

##### ***Predavanja:***

1. Mini simpozij medicinske i farmaceutске kemije, Zagreb, 2017.
2. Computational Chemistry Day, Zagreb, 2019.

##### ***Poster:***

1. 2<sup>nd</sup> Anglo-Nordic MedChem symposium, Snekkersten, Denmark, 2019.

##### ***Stručno usavršavanje:***

1. Summer School of Medicinal Chemistry, Drew University, NJ, SAD, 2011.
2. European School of Medicinal Chemistry Collegi del Colle e Tridente, Urbino, Italija, 2016.