



Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej
Zakład Chemii Leków

MAREK JAMROZIK

**Wspomagane komputerowo
poszukiwanie inhibitorów reduktaz
antybiotyków antracyklinowych
w celu optymalizacji farmakoterapii
przeciwnowotworowej**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Marcin Kołaczkowski

Promotor pomocniczy: dr Adam Bucki

Kraków 2022

*„Perfekcja jest nieosiągalna,
ale jeśli dążymy do perfekcji,
możemy osiągnąć doskonałość.”*

Vince Lombardi

Pragnę wyrazić ogromną wdzięczność

Panu Prof. dr hab. Marcinowi Kołaczkowskiemu

Panu dr Adamowi Buckiemu

*za opiekę naukową, poświęcony czas, okazane zaufanie
i inspirację w codziennym dążeniu do zdobywania wiedzy*

Serdecznie dziękuję
prof. dr hab. Elżbiecie Pękali
mgr farm. Kamilowi Pisce
dr Paulinie Koczurkiewicz-Adamczyk
za owocną współpracę naukową,
wsparcie merytoryczne
i przeprowadzenie badań in vitro
opisanych w niniejszej rozprawie

Serdecznie dziękuję
dr Krzysztofowi Więckowskiemu
za syntezę związków C16, C17 i C18

Serdecznie dziękuję
mgr farm. Alicji Gawalskiej
mgr Nikoli Fajkis-Zajączkowskiej
dr Annie Pasiece
dr Jakubowi Jończykowi
za stworzenie niezapomnianej atmosfery,
wypełniającej przez lata nasz pokój na 4 piętrze

*Szczególnie dziękuję **Mojej Rodzinie i Przyjaciółom***
za życzliwość, cierpliwość i nieustanne wsparcie

Finansowanie

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane ze środków:

1. Grantu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM 19: „Dualne inhibitory CBR1 i AKR1C3 jako nowe podejście mające na celu poprawę efektywności i bezpieczeństwa terapii antracyklinami”.

nr 2020/37/N/NZ7/01097

Kierownik projektu: mgr farm. Marek Jamrozik

Przewidywany okres realizacji: 19.01.2021 – 18.06.2023,

2. Dotacji celowej na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich na rok 2019, ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum: „Modelowanie molekularne struktury reduktazy karbonylowej pierwszej oraz ocena roli glutationu w procesie rozpoznawania ligandów przez enzym w celu znalezienia nowych związków o potencjalnych właściwościach poprawiających bezpieczeństwo terapii doksorubicyną”.

nr N42/DBS/000058.

Kierownik projektu: mgr farm. Marek Jamrozik

Okres realizacji: 11.06.2019 – 31.12.2020,

3. Dotacji celowej na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich na rok 2021, ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum: „Modelowanie molekularne struktury aldo-keto reduktazy 1C3 oraz poszukiwanie dualnych inhibitorów aldo-keto reduktazy 1C3 i reduktazy karbonylowej 1 w celu znalezienia nowych związków o potencjalnych właściwościach poprawiających efektywność i bezpieczeństwo terapii antracyklinami”.

nr N42/DBS/000188

Kierownik projektu: mgr farm. Marek Jamrozik

Przewidywany okres realizacji: 24.05.2021 – 31.12.2022.

Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych, podczas których zaprezentowano wyniki badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, sfinansowano ze środków wymienionych powyżej oraz środków przyznanych w ramach Jagiellońskiego Programu Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich, realizowanego jako Działanie 5 projektu ZintegrUJ (Kompleksowy Program Rozwoju Uniwersytetu Jagiellońskiego).



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Spis treści

| | |
|---|-----------|
| STRESZCZENIE | 15 |
| SYNOPSIS | 18 |
| WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW..... | 21 |
| 1. WSTĘP | 23 |
| 1.1 Charakterystyka i zastosowanie antybiotyków antracyklinowych | 23 |
| 1.2 Charakterystyka reduktazy karbonylowej 1 (CBR1)..... | 29 |
| 1.3 Charakterystyka aldo-keto reduktazy 1C3 (AKR1C3)..... | 33 |
| 1.4 Hamowanie aktywności CBR1 i AKR1C3 jako metoda poprawy skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania antybiotyków antracyklinowych | 37 |
| 1.5 Wspomagane komputerowo projektowanie leków – wybrane metody i zastosowanie..... | 42 |
| 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY | 48 |
| 3. METODYKA BADAŃ..... | 51 |
| 3.1 Informacje ogólne, schemat przeprowadzonych badań..... | 51 |
| 3.2 Badania <i>in silico</i> | 54 |
| 3.2.1 Oprogramowanie wykorzystane w badaniach..... | 54 |
| 3.2.2 Procedura wstępnego przygotowywania struktur krystalicznych i związków chemicznych do użycia w pakiecie oprogramowania Schrödinger..... | 55 |
| 3.2.3 Wybór struktur krystalicznych i ligandów do optymalizacji CBR1 i AKR1C3 | 56 |
| 3.2.3.1 Struktury krystaliczne i ligandy wykorzystane w poszukiwaniach nowych inhibitorów CBR1 | 56 |
| 3.2.3.2 Struktury krystaliczne i ligandy wykorzystane w poszukiwaniach dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 | 58 |
| 3.2.4 Optymalizacja centrów aktywnych CBR1 i AKR1C3 metodą Induced-Fit docking..... | 62 |
| 3.2.5 Procedura dokowania w programie Glide | 63 |
| 3.2.6 Retrospektywny wirtualny skrining modeli CBR1 i AKR1C3 | 64 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.7 | Przygotowanie, przeprowadzenie i analiza symulacji dynamiki molekularnej kompleksów CBR1/AKR1C3 | 68 |
| 3.2.8 | Przygotowanie i walidacja modelu farmakoforowego inhibitorów AKR1C3 | 69 |
| 3.2.9 | Prospektywny wirtualny skринing bazy związków chemicznych na wybranych modelach CBR1 i AKR1C3..... | 70 |
| 3.2.10 | Predykcja <i>in silico</i> i analiza wybranych parametrów ADMET oraz ścieżek metabolizmu potencjalnych nowych ligandów CBR1 i AKR1C3 | 73 |
| 3.3 | Badania <i>in vitro</i> | 76 |
| 3.3.1 | Badanie hamowania rekombinowanego CBR1 | 76 |
| 3.3.2 | Badanie hamowania rekombinowanego AKR1C3 | 76 |
| 3.3.3 | Warunki prowadzenia hodowli komórkowych..... | 77 |
| 3.3.4 | Badania żywotności komórek przy użyciu testu SRB | 77 |
| 3.4 | Analiza statystyczna badań <i>in vitro</i> | 77 |
| 4. | WYNIKI I DYSKUSJA BADAŃ WŁASNYCH..... | 78 |
| 4.1 | Poszukiwanie nowych inhibitorów CBR1 | 78 |
| 4.1.1 | Optymalizacja wybranych struktur krystalicznych CBR1 przy użyciu Induced-fit docking | 78 |
| 4.1.2 | Retrospektywny wirtualny skринing wybranych modeli CBR1 | 81 |
| 4.1.3 | Ocena stabilności wybranych kompleksów CBR1-hydroxyPP z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej, wybór modeli CBR1 do prospektywnego wirtualnego skринingu..... | 86 |
| 4.1.4 | Prospektywny wirtualny skринing i selekcja nowych chemotypów potencjalnych inhibitorów CBR1 | 92 |
| 4.1.5 | Predykcja <i>in silico</i> i analiza wybranych parametrów ADMET potencjalnych inhibitorów CBR1, wytypowanie związków do badań enzymatycznych | 95 |
| 4.1.6 | Ocena hamowania rekombinowanego CBR1 przez wyselekcjonowane związki | 100 |
| 4.1.7 | Dokowanie pochodnych 2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu do zoptymalizowanych modeli CBR1, wybór związków do badań enzymatycznych | 101 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.1.8 | Ocena hamowania rekombinowanego enzymu CBR1 przez wybrane pochodne 2-fenyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onu..... | 103 |
| 4.1.9 | Predykcja <i>in silico</i> oraz analiza parametrów ADMET i ścieżek metabolizmu związków C2 i C17..... | 109 |
| 4.2 | Ocena możliwości hamowania CBR1 przez związek ASP9521 – badania <i>in silico</i> i <i>in vitro</i> | 112 |
| 4.2.1 | Dokowanie ASP9521 do zoptymalizowanego modelu CBR1, analiza sposobu wiązania związku w centrum aktywnym enzymu | 112 |
| 4.2.2. | Analiza interakcji CBR1-ASP9521 z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej..... | 114 |
| 4.2.3 | Ocena hamowania rekombinowanego enzymu CBR1 przez ASP9521 oraz efektu łącznego podania DNR i ASP9521 na żywotność komórek linii A549..... | 120 |
| 4.3 | Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 | 123 |
| 4.3.1 | Optymalizacja wybranych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3 przy użyciu Induced-fit docking..... | 123 |
| 4.3.2 | Retrospektywny wirtualny skrining wybranych modeli CBR1 i AKR1C3..... | 129 |
| 4.3.3 | Ocena stabilności wybranych modeli CBR1 i AKR1C3 z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej, wybór modeli do prospektywnego wirtualnego skriningu..... | 136 |
| 4.3.4 | Przygotowanie modelu farmakoforowego inhibitorów AKR1C3, wstępny prospektywny wirtualny skrining bazy związków chemicznych (LigandScout)..... | 143 |
| 4.3.5 | Właściwy prospektywny wirtualny skrining i selekcja potencjalnych dualnych inhibitorów CBR-AKR1C3 (Glide)..... | 147 |
| 4.3.6 | Predykcja <i>in silico</i> i analiza wybranych parametrów ADMET potencjalnych dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 | 152 |
| 4.3.7 | Ocena hamowania rekombinowanych CBR1 i AKR1C3 przez wytypowane związki | 154 |
| 4.4 | Podsumowanie analiz <i>in silico</i> i testów enzymatycznych, wybór związków do badań komórkowych..... | 162 |
| 4.5 | Ocena wpływu wybranych inhibitorów CBR1 i AKR1C3 na aktywność przeciwnowotworową daunorubicyny wobec komórek linii A549 | 163 |

| | |
|---|------------|
| 5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ OBJĘTYCH ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ..... | 166 |
| 6. MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE | 169 |
| 6.1 Rozwinięcia wybranych skrótów występujących w oprogramowaniu ADMET Predictor | 169 |
| 6.2 Nazwy systematyczne oraz zapisy struktur (SMILES) związków rozpatrywanych jako potencjalne nowe inhibitory CBR1 | 170 |
| 6.3 Nazwy systematyczne oraz zapisy struktur (SMILES) związków rozpatrywanych jako potencjalne dualne inhibitory CBR1-AKR1C3 | 175 |
| 6.4 Predykcja <i>in silico</i> wybranych parametrów ADMET potencjalnych dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, nieprzedstawionych w rozdziale 4.3.6..... | 179 |
| 7. SPIS TABEL I RYCIN | 182 |
| 7.1 Spis tabel | 182 |
| 7.2 Spis rycin..... | 183 |
| 8. PIŚMIENNICTWO..... | 188 |

STRESZCZENIE

Według prognoz Światowej Organizacji Zdrowia, w bieżącym stuleciu choroby nowotworowe wyprzedzą choroby układu krążenia jako główna przyczyna zgonu w większości krajów. Skuteczna farmakoterapia nowotworów jest wciąż jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny i farmacji. Pomimo rozwoju i wprowadzenia do terapii wielu innowacyjnych leków przeciwnowotworowych, szerokie zastosowanie nadal znajdują substancje stosowane z powodzeniem od wielu lat. Przykładem są antybiotyki antracyklinowe (ANT), które wykorzystywane są w leczeniu zarówno guzów litych, jak i nowotworów hematologicznych. Niestety, ich użyteczność jest ograniczona w związku z lekoopornością rozwijającą się w trakcie terapii oraz zwiększonym ryzykiem kardi toksyczności. Przyczyny występowania obu niekorzystnych efektów pozostają do końca niewyjaśnione. Według jednej z hipotez odpowiadają za nie metabolity ANT powstałe w wyniku aktywności enzymów z grupy reduktaz. Głównymi enzymami odpowiedzialnymi za ten proces są reduktaza karbonylowa 1 (CBR1) oraz aldo-keto reduktaza 1C3 (AKR1C3). Zahamowanie aktywności wymienionych enzymów powinno więc skutkować wzmożeniem działania leków i ograniczać efekt kardi toksyczny.

Celem badań, opisanych w niniejszej rozprawie, było zastosowanie wybranych metod komputerowo wspomaganego projektowania leków do optymalizacji wybranych trójwymiarowych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3, a następnie wykorzystania ich w poszukiwaniu nowych inhibitorów enzymatycznych.

W pierwszej części badań, mającej na celu poszukiwanie nowych inhibitorów CBR1, przeprowadzono optymalizację dwóch struktur krystalicznych enzymu (kody PDB: 1WMA i 3BHJ), różniących się obecnością cząsteczki glutationu w centrum aktywnym CBR1. Wykorzystując metody optymalizacji (Induced-fit docking, dokowanie, dynamika molekularna) i oceny (retrospektywny wirtualny skrining) trójwymiarowych modeli celów biologicznych, wybrano 2 modele (**1WMA_A3** oraz **3BHJ_N1**), przy użyciu których przeprowadzono następnie prospektywny wirtualny skrining, dokując bibliotekę ponad 2,3 miliona

związków chemicznych. Wytypowano, zakupiono, a następnie sprawdzono w badaniach hamowania CBR1 9 nowych chemotypów potencjalnych inhibitorów. Wśród nich najskuteczniejszym okazał się związek będący pochodną **2-fenyl-3,4-dihydrochinolin-4-onu** (związek **C2**, $IC_{50} = 7,56 \mu M$). W wyniku dalszych optymalizacji strukturalnych uzyskano kolejne inhibitory, a najskuteczniejszym z nich okazał się związek **C17** ($IC_{50} = 0,68 \mu M$). W pozach uzyskanych w dokowaniach nawiązywał on oddziaływania z wszystkimi kluczowymi resztami aminokwasowymi enzymu: Ser139, Tyr193, Met234 (wiązania wodorowe) i Trp229 (oddziaływanie hydrofobowe typu π - π).

W drugiej części badań przeanalizowano możliwość hamowania CBR1 przez związek **ASP9521**, będący znanym, silnym inhibitorem AKR1C3, o elementach struktury występujących wśród inhibitorów CBR1. W dokowaniach potwierdzono, że związek może nawiązywać takie same oddziaływania, jak wymieniony wcześniej związek C17, a w symulacji dynamiki molekularnej stwierdzono możliwość utrzymania stabilnego położenia związku w centrum aktywnym enzymu w ciągu 20 ns trwania symulacji, co wskazywało na to, że ASP9521 może być ligandem CBR1. Hipotezę tą potwierdzono w badaniach enzymatycznych ($IC_{50} = 44,00 \mu M$). Dodatkowo wykazano, że dodatek ASP9521 wzmacnia przeciwnowotworowe działanie daunorubicyny wobec komórek nowotworu płuc (linia A549), obniżając o 14,25% stężenie leku konieczne do zahamowania wzrostu komórek o połowę.

Zidentyfikowanie ASP9521 jako dualnego inhibitora CBR1-AKR1C3 o umiarkowanej aktywności było impulsem do poszukiwania nowych chemotypów dualnych inhibitorów głównych reduktaz ANT, których korzystny efekt mógłby przewyższać stosowanie selektywnych inhibitorów jednego z enzymów. W tym celu przeprowadzono, przy pomocy narzędzi opisanych w pierwszej części badań, optymalizację wybranych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3, a w wyniku prospektywnego wirtualnego skriningu, wykonanego na zoptymalizowanych modelach (modele **11E3** i **74H1**), wytypowano 36 potencjalnych inhibitorów CBR1-AKR1C3. Wśród nich większość związków wykazała umiarkowane bądź silne działanie hamujące wobec AKR1C3 (najsilniejszym inhibitorem był związek **P27**, którego IC_{50} AKR1C3 = $2,25 \mu M$), przy umiarkowanym bądź słabym hamowaniu

CBR1. Dodatkowa analiza związków zidentyfikowanych wcześniej jako inhibitory CBR1 wykazała, że związek **C17** posiada silne właściwości hamowania obu kluczowych reduktaz ANT, będąc obok ASP9521 drugim opisanym w niniejszej pracy dualnym inhibitorem CBR1-AKR1C3 (IC_{50} CBR1 = 0,68 μ M; IC_{50} AKR1C3 = 6,94 μ M). Na podstawie łącznej analizy badań *in silico* i testów enzymatycznych wskazano także układ **1-benzoilopiperydyny** (obecny w związkach **P1-P9**) jako korzystny pod kątem dalszych optymalizacji mających na celu uzyskanie kolejnych dualnych inhibitorów enzymatycznych.

W badaniach komórkowych na linii A549 wykazano, że dodatek związków **P18** i **P25** poprawiał przeciwnowotworowe działanie daunorubicyny, podobnie jak miało to miejsce w przypadku związku ASP9521.

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej doprowadziły do otrzymania zoptymalizowanych trójwymiarowych modeli wybranych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3, które posłużyły następnie do zidentyfikowania nowych inhibitorów głównych reduktaz ANT, w tym nieopisanych dotychczas dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3. Przy selekcji związków uwzględniano nie tylko pozy uzyskane w prospektywnych skriningach, lecz również wartości parametrów ADMET, przewidywanych przy pomocy dedykowanego oprogramowania, zgodnie z rekomendacjami w zakresie nowoczesnego racjonalnego projektowania leków. Zarówno najlepsze związki serii C (**C2**, **C17**), jak i serii P (**P18**, **P25**, **P27**) nie posiadały elementów strukturalnych, mogących zwiększać ryzyko toksyczności, bądź wpływających na niekorzystną farmakokinetykę opisywanych substancji.

SYNOPSIS

According to World Health Organization forecast, in this century cancers will become the most common cause of death in most of countries, affecting more people than cardiovascular diseases. Effective cancer pharmacotherapy is still one of the most challenging for modern medicine and pharmacy. Despite development and introduction of plenty of innovative anticancer drugs, substances that have been using for many years are still widely used in therapy. Anthracycline antibiotics (ANT) are one of such groups of drugs. They are using in treatment of both solid tumours and haematological malignancies. Unfortunately, their usage is limited due to drug resistance developing during the therapy and increased risk of cardiotoxicity. The reasons behind those effects are still unclear. One of the hypotheses suggests that they are caused by ANT metabolites formed by enzymes called reductases. The main enzymes responsible for this process are carbonyl reductase 1 (CBR1) and aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3). Thus, inhibition of those enzymes should increase drugs activity and limit their cardiotoxicity.

The aim of the research presented in this thesis was application of selected computer-aided drug design methods in optimization of selected CBR1 and AKR1C3 three-dimensional crystal structures and then to use the optimized models in searching for new enzymatic inhibitors.

The first part of research was focused on searching for new CBR1 inhibitors. Optimization of two crystal structures (PDB codes: 1WMA and 3BHJ) was performed. The structures differed in the presence of glutathione within the active site of CBR1. Using several optimization (Induced-fit docking, flexible docking, molecular dynamics) and evaluation (retrospective virtual screening) methods, two CBR1 models (**1WMA_A3** and **3BHJ_N1**) were selected. They were then used to dock a library of over 2.3 million compounds in prospective virtual screening. 9 chemotypes of new potential CBR1 inhibitors were selected and then evaluated in CBR1 inhibition assay. Among them the most effective was a derivative of **2-phenyl-3,4-dihydroquinazolin-4-one** (compound **C2**, $IC_{50} = 7,56 \mu M$). Further structure optimization led to discovery of more CBR1 inhibitors, with the most potent one – compound **C17** ($IC_{50} = 0,68 \mu M$). In the poses obtained in docking, the compound

formed molecular interactions with all crucial CBR1 amino acid residues: Ser139, Tyr 193, Met234 (H-bonds) and Trp229 (π - π hydrophobic interaction).

The aim of the second part of the research was to analyse the potential of **ASP9521** to inhibit CBR1. The compound is recognised as a potent AKR1C3 inhibitor, with structural features typical for CBR1 inhibitors. Docking studies confirmed that ASP9521 can form the same molecular interactions as the previously described compound **C17**. Results of molecular dynamics simulation revealed that the compound can keep stable conformation within the CBR1 catalytic site in the whole range of simulation time (20 ns), suggesting that ASP9521 may be a CBR1 ligand. This hypothesis was confirmed in inhibitory enzymatic assay ($IC_{50} = 44,00 \mu M$). Additionally, ASP9521 ameliorated anticancer activity of daunorubicin against pulmonary cancer cells (cell line A549), decreasing by 14,25% drug concentration necessary to inhibit cells growth by a half.

Identification of a moderate dual CBR1-AKR1C3 inhibitory activity of ASP9521 led to initiation of searching for new chemotypes of dual inhibitors of main ANT reductases, the combined effect of which may surpass the use of a selective inhibitor. For this purpose, selected CBR1 and AKR1C3 crystal structures were optimized, using computer tools and methods described in the first part of the research. 36 potential CBR1-AKR1C3 inhibitors were selected after prospective virtual screening performed on the best rated models (**11E3** and **74H1**). Most of the compounds turned out to be moderate or potent AKR1C3 inhibitors (the most potent inhibitor was compound **P27**, with $IC_{50} AKR1C3 = 2,25 \mu M$), with moderate or weak CBR1 inhibition. Additional analysis of compounds previously pointed as CBR1 inhibitors revealed that compound **C17** had also potent AKR1C3 inhibitory properties, which made him the second (the first was ASP9521) dual CBR1-AKR1C3 inhibitor described in this thesis ($IC_{50} CBR1 = 0,68 \mu M$; $IC_{50} AKR1C3 = 6,94 \mu M$). Based on combined analysis of both *in silico* and *in vitro* research, **1-benzylpiperidine** (present in compounds **P1-P9**) was indicated as a favourable chemotype for further optimization research with intention to discovery of new dual enzymatic inhibitors.

In vitro research, performed on A549 cell line, revealed that addition of compounds **P18** and **P25** increased anticancer activity of daunorubicin – the same effect was observed previously for ASP9521.

The research described in this doctoral thesis led to optimized three-dimensional models of selected CBR1 and AKR1C3 crystal structures. The models were applied to identify new inhibitors of main ANT reductases, including compounds with a new, unique dual CBR1-AKR1C3 inhibitory properties. The compound selection was based not only on poses achieved in prospective screenings, but also on evaluation of selected ADMET parameters, predicted by dedicated software, in accordance with rules of modern, rational drug design. Both the best compounds from C series (**C2**, **C17**) and P series (**P18**, **P25**, **P27**) did not contain structural features that could enhance a risk of toxicity or cause unfavourable pharmacokinetic properties of the described substances.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|--------|---|
| 23-HBA | kwask 23-hydroksybetulinowy ang. <i>23-hydroxybetulinic acid</i> |
| AKR | aldo-keto reduktaza ang. <i>aldo-keto reductase</i> |
| ANT | antybiotyki antracyklinowe ang. <i>anthracycline antibiotics</i> |
| BEDROC | <i>Boltzmann-Enhanced Discrimination of Receiver-Operating Characteristic</i> |
| CAD | pochodne amidu kwasu cynamonowego ang. <i>cinnamamide derivatives</i> |
| CBR | reduktaza karbonylowa ang. <i>carbonyl reductase</i> |
| CADD | wspomagane komputerowo projektowanie leków ang. <i>computer-aided drug design</i> |
| CDK | kinazy zależne od cyklin ang. <i>cyclin-dependent kinase</i> |
| CRPC | nowotwór prostaty oporny na kastrację ang. <i>castration-resistant prostate cancer</i> |
| DNA | kwask deoksyrybonukleinowy ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| DNR | daunorubicyna ang. <i>daunorubicin</i> |
| DNRol | daunorubicynol ang. <i>daunorubicinol</i> |
| DOX | doksorubicyna ang. <i>doxorubicin</i> |
| DOXol | doksorubicynol ang. <i>doxorubicinol</i> |
| EF | współczynnik wzbogacenia bazy ang. <i>enrichment factor</i> |

| | |
|------------|--|
| FBS | <p> płodowa surowica bydlęca ang. <i>fetal bovine serum</i></p> |
| GSH | <p> glutation ang. <i>glutathione</i></p> |
| HTVS | <p> wysokowydajny wirtualny skrining ang. <i>High-Throughput Virtual Screening</i></p> |
| hydroxy-PP | <p> 3-(4-amino-1-tertbutylo-1H-pirazolo[3,4-D]pirymidyn-3-ylo)fenol</p> |
| IFD | <p> <i>induced-fit docking</i></p> |
| LBDD | <p> projektowanie leków na bazie struktury ligandów ang. <i>ligand-based drug design</i></p> |
| MD | <p> dynamika molekularna ang. <i>molecular dynamics</i></p> |
| NADH | <p> Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy ang. <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i></p> |
| NLPZ | <p> Niesteroidowe leki przeciwzapalne</p> |
| Pgp | <p> glikoproteina P ang. <i>P-glycoprotein</i></p> |
| SBDD | <p> projektowanie leków na bazie struktury celu biologicznego ang. <i>structure-based drug design</i></p> |
| SRB | <p> sulforodamina B ang. <i>sulforhodamine B</i></p> |
| ROC | <p> <i>Receiver Operator Characteristic area under the curve</i></p> |
| ROS | <p> reaktywne formy tlenu ang. <i>reactive oxygen species</i></p> |
| SDR | <p> krótkołańcuchowe dehydrogenazy/reduktazy ang. <i>short-chain dehydrogenases/reductases</i></p> |
| TopII | <p> Topoizomeraza II ang. <i>Topoisomerase II</i></p> |
| WDW | <p> 3,6-dihydropirymidyn-1(2H)-ylo(5-metylo-1H-indol-2-ylo)metanon</p> |

1. WSTĘP

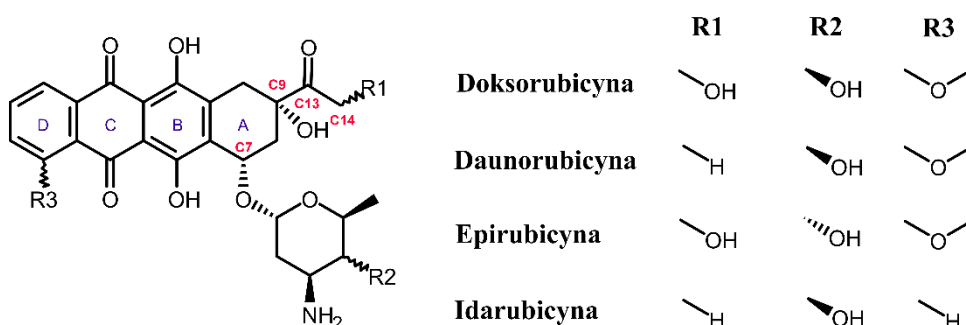
1.1 Charakterystyka i zastosowanie antybiotyków antracyklinowych

Nowotwory stanowią grupę chorób, których wspólną cechą są nadmierne podziały komórkowe. Proces nowotworzenia jest inicjowany i napędzany przez mutacje genetyczne, które uniemożliwiają właściwe kontrolowanie procesów podziału i różnicowania komórek [1]. Według szacunków Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem, w 2020 roku na nowotwory zachorowało na świecie 19,3 miliona osób, natomiast w ich wyniku zmarło około 10 milionów osób. Agencja prognozuje, że w ciągu najbliższego stulecia nowotwory wyprzedzą choroby układu krążenia jako główna przyczyna śmierci w większości krajów [2].

Niestety, o żadnym ze stosowanych obecnie leków przeciwnowotworowych nie można powiedzieć, że jest w pełni skuteczny i bezpieczny. Naraża to pacjentów onkologicznych na ryzyko przedłużających się terapii, wznowienia choroby bądź ciężkich działań niepożądanych, będących wynikiem ubocznego działania leków.

Antybiotyki antracyklinowe (ANT) są jedną z najczęściej stosowanych grup leków przeciwnowotworowych. Ich historia sięga początku lat 60. XX wieku, kiedy pierwszy przedstawiciel tej grupy – daunorubicyna (DNR) – został wyizolowany z bakterii rodzaju *Streptomyces peucetius*, a następnie zastosowany z powodzeniem w leczeniu białaczki. W wyniku modyfikacji genetycznych szczepów bakterii rodzaju *Streptomyces* otrzymano drugiego najistotniejszego przedstawiciela ANT – doksorubicynę (DOX) [3], [4]. Mimo że od odkrycia DNR i DOX minęło prawie 60 lat, są one wciąż szeroko stosowane, zarówno w leczeniu guzów litych, jak i nowotworów hematologicznych. ANT są wykorzystywane (najczęściej w terapiach skojarzonych, razem z innymi lekami) w około 30% terapii nowotworów piersi oraz 60-70% terapii chłoniaków. Poza tym znajdują zastosowanie między innymi w leczeniu białaczek, nowotworów pęcherza moczowego, jajników oraz mięsaków tkanek miękkich [5]–[8]. O niesłabnącym znaczeniu ANT świadczy fakt, że zarówno DOX, jak i DNR wciąż znajdują się na opracowanej i stale aktualizowanej przez Światową Organizację Zdrowia liście kluczowych leków zaspokajających priorytetowe potrzeby zdrowotne populacji [9].

Strukturę najważniejszych ANT przedstawiono na **Rycinie 1**. Z chemicznego punktu widzenia są one glikozydami, których aglikon stanowi planarny, polihydroksylowy układ antrachinonu (pierścienie B, C i D), przyłączony do sześciowęglowego pierścienia alkilowego A. W położeniu 9 znajduje się dodatkowy łańcuch węglowy, podstawiony w pozycji C13 grupą ketonową. W niektórych przypadkach (np. DOX), w położeniu C14 występuje dodatkowa grupa hydroksylowa. Część cukrową ANT najczęściej stanowi przyłączona w pozycji 7 daunozamina (3-amino-2,3,6-trideoksy- α -L-likso-heksopiranoza). Jest to podstawowy cukier występujący w ANT, jednak w modyfikacjach obecnie stosowanych leków występują także inne cząsteczki, a nawet kilka połączonych ze sobą cząsteczek (np. w takich związkach jak pirarubicyna i aklarubicyna) [3].



Ryc. 1: Struktura wybranych leków z grupy antybiotyków antracyklinowych.

Poza dwoma, wymienionymi wcześniej, najczęściej stosowanymi ANT, istotne znaczenie kliniczne mają także epirubicyna i idarubicyna. Epirubicyna jest modyfikacją DOX powstałą na skutek inwersji konfiguracji grupy hydroksylowej w położeniu 4' daunozaminy (R2). Wykazuje aktywność zbliżoną do DOX, i jest od niej lepiej tolerowana [10]. Idarubicyna jest modyfikacją DNR, powstałą na skutek usunięcia grupy metoksylovej w pozycji 4. W porównaniu z DNR jest nieco mniej polarna i bardziej lipofilowa, w związku z czym może być przyjmowana doustnie (mimo to większość zarejestrowanych preparatów jest przeznaczona do podania dożylnego) [11].

Mechanizm działania ANT jest złożony i można w nim wyróżnić co najmniej trzy istotne składowe. Płaski układ pierścieni B, C i D umożliwia interkalację ANT do bruzdy większej DNA, podczas gdy konfiguracja daunosaminy umożliwia interkalację do bruzdy mniejszej DNA. W ich wyniku hamowane są procesy związane z replikacją DNA [12]. Taki sam efekt jest wynikiem hamowania przez ANT aktywności topoisomerazy II (TopII) – enzymu odpowiedzialnego za rozplatanie (rozluźnianie) podwójnej helisy DNA, co ułatwia dostęp do nici innym enzymom odpowiedzialnym za transkrypcję lub replikację. ANT, łącząc się z kompleksem DNA-TopII, trwale go stabilizują, uniemożliwiając przeprowadzenie replikacji. Aktywność przeciwnowotworowa jest związana z hamowaniem przede wszystkim podtypu α TopII, występującego głównie w komórkach ulegających intensywnym podziałom [13], [14]. Trzecim mechanizmem działania ANT jest wpływ na zwiększenie generowania reaktywnych form tlenu (ROS). Wywołują one stres oksydacyjny i upośledzają funkcjonowanie komórki, co w konsekwencji prowadzi do indukowania apoptozy. Wytwarzanie ROS jest związane z redukcją, będącego elementem ANT, układu chinonu. Równie istotnym czynnikiem jest redukcja jonów żelaza, tworzących kompleksy z aglikonem ANT. W jej wyniku, przy udziale cząsteczki tlenu, powstają reaktywne i toksyczne aniony ponadtlenkowe [15].

Pomimo złożonego mechanizmu działania i udowodnionej klinicznie skuteczności, zastosowanie ANT pozostaje ograniczone. Jest to uwarunkowane dwoma czynnikami: wytwarzającą się opornością komórek nowotworowych na leki oraz kardiotoksycznością, którą uznaje się za główne działanie niepożądane ANT. Dotychczas nie udało się w pełni określić przyczyn występowania obu wspomnianych efektów, jednak w środowisku naukowym funkcjonuje kilka hipotez, które stanowią podstawę do poszukiwania sposobów niwelowania lekooporności i kardiotoksyczności ANT.

Zwiększona aktywność pomp wyrzutu leków jest jednym z najczęściej wymienianych powodów oporności komórek nowotworowych na ANT. Wśród odpowiedzialnych za wyrzut ANT z komórek transporterów, wymienia się między innymi wybrane transportery z grupy MRP (ang. *multidrug resistance associated protein*), jednak największe znaczenie przypisuje się glikoproteinie P (ang.

P-glycoprotein, Pgp), której zwiększoną ekspresję obserwuje się w wielu rodzajach nowotworów. Zarówno DOX, jak i DNR, są wskazywane jako substraty Pgp [16]. Jednak dotychczasowe próby stosowania inhibitorów Pgp jako substancji mogących wpływać na zahamowanie wyrzutu ANT z komórek, a w konsekwencji zwiększenie aktywności leków, nie przyniosły satysfakcjonujących rezultatów [17]–[19].

Istotną w kontekście lekooporności ANT jest także zmiana metabolizmu komórek nowotworowych, prowadząca między innymi do zwiększenia stopnia upłynnienia błony komórkowej, co prowadzi do ułatwienia usuwania leków z wnętrza komórek. Inne badania wskazują, że na lekooporność ANT może mieć wpływ indukowane farmakoterapią nasilenie aktywności topoizomeraz i procesów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA [16].

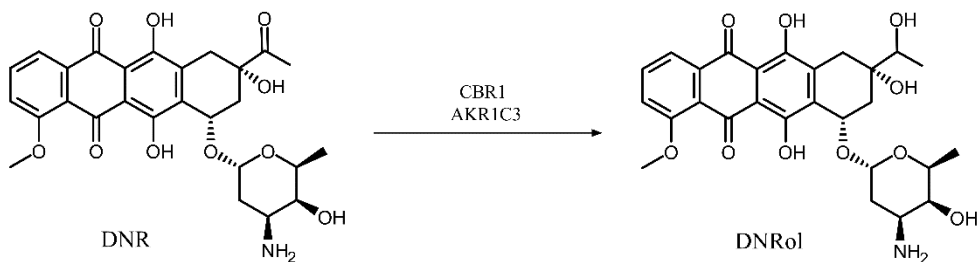
Kardiotoksyczność jest drugim, obok lekooporności, czynnikiem ograniczającym kliniczne wykorzystanie ANT. Zwiększone ryzyko powikłań kardiologicznych, takich jak niewydolność serca, arytmie czy kardiomiopatie, było obserwowane już w pierwszych latach stosowania DNR i DOX [20]. Niekorzystne efekty mogą pojawiać się zarówno w trakcie terapii, jak i wiele lat po jej zakończeniu. Udowodniono, że zwiększone ryzyko zaburzeń kardiologicznych jest związane z przyjętą kumulatywną dawką ANT. Z analizy opublikowanej w 2003 roku wynika, że powikłania kardiologiczne po zastosowaniu DOX dotyczyły 5%, 16%, 26% i 48% pacjentów, którzy przyjęli łączną dawkę leku kolejno 400, 500, 550 i 700 mg/m² [21].

Część hipotez dotyczących kardiotoksyczności ANT jest związana z mechanizmem działania leków. Zwraca się w nich uwagę na hamowanie podtypu β TopII, który, w przeciwieństwie do podtypu α , występuje przede wszystkim w komórkach stabilnych (nie ulegających intensywnym podziałom), takich jak kardiomiocyty [22]. Inny z postulowanych mechanizmów ma na uwadze generowanie nadmiaru ROS, działających toksycznie na komórki mięśnia sercowego [15]. Niestety, dotychczasowe badania antyoksydantów, jako substancji pozwalających rozwiązać ten problem, nie przyniosły pożądaných rezultatów.

Jedynym dopuszczonym do stosowania lekiem, mającym ograniczać kardiotoksyczność ANT, jest deksrazoksan, który działa poprzez chelatowanie jonów żelaza, nie dopuszczając do tworzenia opisywanych wcześniej kompleksów ANT-

żelazo i generowania ROS [23]. Dodatkowo, związek ten uniemożliwia interakcję i hamowanie przez ANT TopII β [24]. Jednak zastosowanie deksrazoksanu jest ograniczone w związku z pojawiającymi się obawami dotyczącymi jego wpływu na zmniejszenie skuteczności ANT i zwiększenie ryzyka występowania wtórnych nowotworów [25], [26]. W celu zmniejszenia efektu kardiotoksycznego, podejmowane są także próby modyfikacji leczenia, polegające np. na przedłużeniu podania leków we wlewach dożylnych lub stosowaniu liposomalnych form ANT (przede wszystkim DOX). Badane były także (z umiarkowanym powodzeniem) połączenia ANT z powszechnie stosowanymi lekami kardiologicznymi, takimi jak nebiwolol i karwedilol, jak również zastosowania kombinacji karwedilolu i enalaprylu [27]–[31].

W ostatnich latach istotnego znaczenia nabrała hipoteza, według której za lekooporność oraz kardiotoksyczność ANT nie są odpowiedzialne stosowane leki, ale ich metabolity, powstające w wyniku dwuelektronowej, NAD(P)H-zależnej redukcji grupy ketonowej przy węglu C13 (**Ryc. 2**). Do tej pory dokładnie scharakteryzowano działanie metabolitów dwóch głównych ANT: doksorubicynolu (DOXol) i daunorubicynolu (DNRol) [32], [33].



Ryc. 2: Schemat metabolizmu ANT do ich zredukowanych pochodnych o potencjalnych właściwościach kardiotoksycznych oraz zmniejszonej aktywności przeciwnowotworowej, na przykładzie metabolizmu DNR.

W organizmie ludzkim, za przeprowadzenie opisywanych przemian metabolicznych odpowiadają dwie grupy enzymów: reduktazy karbonylowe (CBR) oraz aldo-keto reduktazy (AKR). Wśród nich, za najbardziej istotne uważa się reduktazę karbonylową 1 (CBR1) oraz aldo-keto reduktazę 1C3 (AKR1C3). Miejscem tworzenia zredukowanych metabolitów ANT są między innymi wątroba

i nerki, jednak, z punktu widzenia skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leków tej grupy, najistotniejszy okazuje się być metabolizm przebiegający w komórkach nowotworowych [34].

W szeregu prac badawczych wykazano zależność między zwiększoną ekspresją CBR1 i AKR1C3 w komórkach nowotworowych, a zmniejszoną aktywnością przeciwnowotworową ANT, jak również zwiększonym ryzykiem kardiotoksyczności. Ocenia się, że dawka LD₅₀ (ang. *lethal dose* – dawka śmiertelna) DOXol-u, powodująca śmierć 50% komórek nowotworowych, jest 50-150x wyższa niż dla DOX [35]. Zwiększoną ekspresję AKR1C3 wykazano u pacjentek z nowotworem piersi opornym na leczenie DOX, jak również w opornych na ANT liniach komórkowych nowotworów. Podobne wyniki zaobserwowano wobec DNR i jej metabolitu. Badania komórek pobranych od pacjentów chorych na białaczkę wykazały związek między zwiększoną ekspresją CBR1 i zmniejszoną odpowiedzią na leczenie DNR [33].

Aktywność zredukowanych metabolitów ANT wobec komórek serca jest również niekorzystna. Wykazano, że DOXol w znacznym stopniu zaburza wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia, prowadząc do zmniejszenia aktywności skurczowej mięśniówki serca. W doświadczeniach przeprowadzonych na izolowanych sercach królików wykazano, że DOXol obniżał zdolność skurczową serca 30-krotnie bardziej niż DOX. Poza wpływem na homeostazę wapnia, zredukowane metabolity ANT uważa się za czynniki hamujące aktywność pomp regulujących wewnątrzkomórkowe stężenie jonów sodu, potasu i magnezu [36], [37]. Eksperymenty przeprowadzone na myszach dowiodły, że nadekspresja CBR1 przyspieszała rozwój kardiotoksyczności wywołanej podaniem DOX. Z drugiej strony, myszy pozbawione genu kodującego CBR1 nie wykazywały objawów kardiotoksyczności [38], [39].

Rosnące znaczenie hipotezy dotyczącej wpływu zredukowanych metabolitów ANT na aktywność i bezpieczeństwo stosowania tych leków zrodziło kolejne pytania. Dotyczyły one tego, czy hamowanie metabolizmu ANT może mieć korzystny wpływ na profil działania tej grupy leków. Wyniki opublikowanych do tej pory badań opisano w rozdziale 1.4.

1.2 Charakterystyka reduktazy karbonylowej 1 (CBR1)

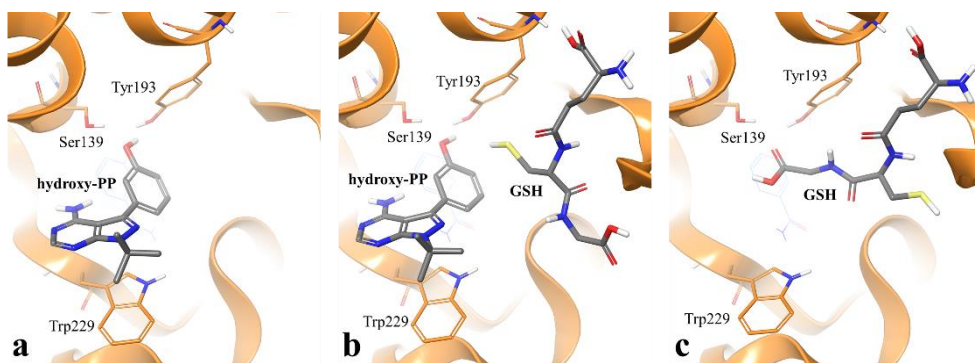
CBR1 jest enzymem należącym do rodziny krótkołańcuchowych dehydrogenaz/reduktaz (ang. *short-chain dehydrogenases/reductases*, SDR). Poza CBR1, u człowieka wykryto także podtypy 3 i 4, jednak to podtypowi 1 przypisuje się największe znaczenie w procesach komórkowych, związanych z redukcją endogennych chinonów i ksenobiotyków. Enzym ten wykryto we wszystkich organach, jednak największą ekspresję wykazano w organach mających najczęściej bezpośredni kontakt z ksenobiotykami: wątrobie, nerkach oraz jelicie cienkim [40]. W związku z tym uznaje się, że udział w I fazie metabolizmu jest podstawową funkcją CBR1. Poprzez przeprowadzanie redukcji ugrupowań karbonylowych aldehydów, ketonów i chinonów, enzym powoduje powstanie alkoholi i hydrochinonów, które są związkami lepiej rozpuszczalnymi i łatwiejszymi do sprzęgania w II fazie metabolizmu [41]. Cytoplazma jest głównym obszarem, w którym występuje CBR1. Obecność enzymu wykryto także w mikrosomach [42]. Jego ekspresja w różnych rodzajach nowotworów może być jednym z czynników wpływających na rokowania dotyczące dalszego rozwoju choroby. Zwiększoną ekspresję CBR1 wykazano w komórkach wykazujących oporność na leczenie ANT [33].

CBR1 składa się z 277 aminokwasów. Enzym występuje w formie monomerycznej, a do pełnej funkcjonalności (zdolności do dwuelektronowej redukcji związków karbonylowych) potrzebuje cząsteczki NADPH, która pełni rolę kofaktora. Nie wykazano aktywności CBR1 jako enzymu katalizującego odwrotną reakcję dehydrogenacji (odwodornienia) alkoholi przy współudziale NADP⁺. Najistotniejszą częścią CBR1 jest jego centrum aktywne. Można w nim zidentyfikować typową dla rodziny SDR tetradę katalityczną, na którą w przypadku CBR1 składają się reszty Asn113, Ser139, Tyr193 i Lys197. Spośród tych reszt, najistotniejsze znaczenie dla wiązania ligandów w centrum aktywnym przypisuje się Tyr193 i Ser139. Pierwsza z reszt aminokwasowych bierze udział w przenoszeniu na substrat protonu, natomiast druga odpowiada za stabilizację ułożenia grupy karbonylowej substratu, w trakcie przeprowadzenia reakcji enzymatycznej [43], [44]. Innymi istotnymi resztami aminokwasowymi, odpowiadającymi za rozpoznawanie

ligandów enzymu, są Met141, Trp229 i Ala235. Badania porównujące budowę centrów aktywnych CBR1 i CBR3 wykazały, że to różnice w obrębie wymienionych reszt powodują, że CBR1, w porównaniu do CBR3, posiada szersze spektrum ligandów wśród ksenobiotyków i jest istotniejszym enzymem dla przeprowadzania metabolizmu leków [44].

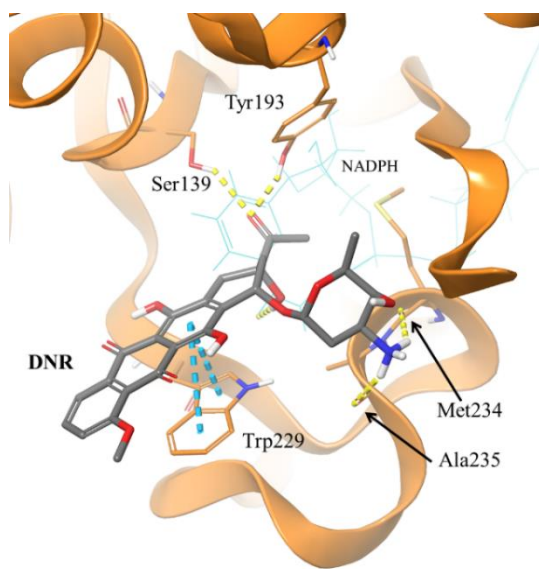
Czynnikiem stanowiącym istotny element funkcjonalności CBR1 jest, znajdujące się w obrębie centrum aktywnego, miejsce wiązania glutationu (GSH). Dotychczasowe badania wskazują, że skoniugowane z GSH małowcząsteczkowe substraty CBR1 mają wyższe powinowactwo do enzymu. Dodatkowo, poprzez swoje oddziaływanie w centrum aktywnym, GSH może ułatwiać odpowiednie dopasowanie do enzymu substratom, które nie są z nim skoniugowane [45]. Jednak według danych literaturowych, GSH nie jest elementem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania enzymu, a reakcje enzymatyczne mogą przebiegać także bez niego, zwłaszcza w przypadku substratów o dużych rozmiarach, takich jak ANT [46], [47].

Obecnie uważa się, że GSH może przyjmować różne ułożenie w centrum aktywnym CBR1, w zależności od występowania w pobliżu ligandów. Ma on stanowić swego rodzaju ochronę dostępu do centrum aktywnego przed cząsteczkami o niekorzystnych właściwościach (np. o dużym potencjale oksydacyjnym) [48]. W przypadku braku ligandów niedaleko CBR1, GSH lokuje się w pobliżu reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg reakcji enzymatycznej: Ser139 i Tyr193, natomiast gdy do enzymu zbliża się jego ligand, następuje zmiana konformacji GSH i skierowanie go w okolice cząsteczki NADPH, bądź całkowite oddysocjowanie [45], [48]. Wśród wykrystalizowanych dotychczas sześciu struktur krystalicznych ludzkiej CBR1 można odnaleźć zarówno takie, w których w centrum aktywnym występuje jedynie silny inhibitor - hydroxy-PP (kod PDB 1WMA), jedynie GSH (4Z3D), bądź jednocześnie hydroxy-PP i GSH (3BHJ) [45], [48], [49]. Różnice w ułożeniu GSH w centrum aktywnym, między wymienionymi strukturami, przedstawiono na **Rycinie 3**. Z kolei w centrum aktywnym kryształu CBR1, oznaczonego kodem 2PFG, znajduje się bicykliczny związek, będący rezultatem połączenia GSH i formaldehydu [50].



Ryc. 3: Centrum aktywne CBR1 w trzech strukturach krystalicznych enzymu: 1WMA (a), 3BHJ (b), 4Z3D (c). Na ilustracjach b i c przedstawiono różnice w sposobie ułożenia cząsteczki GSH w zależności od obecności lub braku w centrum aktywnym hydroxy-PP, będącego inhibitorem CBR1. Źródło – opracowanie własne na podstawie struktur krystalicznych umieszczonych w bazie Protein Data Bank (rcsb.org).

Sposób wiązania ligandów w centrum aktywnym CBR1, wraz z istotnymi resztami aminokwasowymi, przedstawiono na przykładzie DNR (**Ryc. 4**) [47]. Kluczowe są, wymienione wcześniej, oddziaływania z łańcuchami bocznymi Ser139 i Tyr193 (wiązania wodorowe). Dodatkowo występują wiązania wodorowe z atomami tlenu łańcuchów głównych Met234 i Ala235. Za szczególnie istotne uważa się oddziaływanie z Met234. Badania zależności struktura-aktywność w grupie flawonoidów, będących silnymi inhibitorami CBR1, wskazały, że nasilenie działania hamującego jest związane z obecnością donora wiązania wodorowego, tworzącego wiązanie wodorowe z Met234 [51]. Kolejną ważną resztą aminokwasową w centrum aktywnym CBR1 jest Trp229, którego aromatyczny łańcuch boczny tworzy oddziaływania π - π z aromatycznymi fragmentami ligandów enzymu. Oddziaływania te zostały zaobserwowane zarówno dla ANT, silnego inhibitora hydroxy-PP, jak i inhibitorów z grupy flawonoidów i pochodnych kwasu cynamonowego [49], [51], [52].

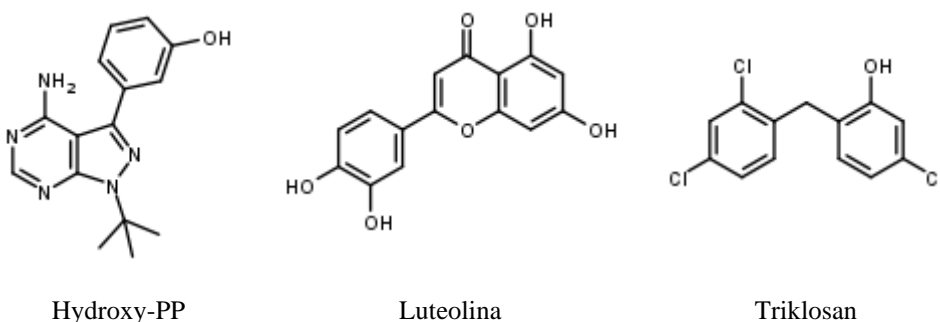


Ryc. 4: Sposób wiązania ligandów w centrum aktywnym CBR1 na przykładzie DNR. Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią. Opracowano na podstawie [47]

Dokładna funkcja CBR1 w organizmie wciąż nie jest do końca poznana. Jak wspomniano, enzym bierze udział w metabolizmie wielu leków, między innymi ANT, warfaryny, haloperidolu, bupropionu. Bierze także udział w przekształceniu nabumetonu do jego formy aktywnej. Poza tym, CBR1 odpowiada za redukcję reaktywnych chinonów, przez co jest często uznawany za enzym uczestniczący w procesach detoksykacji komórki. Przykłady chinonów, będących substratami CBR1, przedstawiono w rozdziale 3.2.3.1. Poza tym, enzym jest odpowiedzialny za 9-ketoredukcję prostaglandyn E1 i E2 oraz dezaktywację obecnego w dymie nikotynowym, toksycznego 4-metylonitrozoamino-1-(3-pirydylo)-1-butanonu [40], [43].

Puła poznanych do tej pory inhibitorów CBR1 jest bardzo ograniczona. Dotychczasowe badania skupiały się przede wszystkim na związkach pochodzenia naturalnego. Silne działanie hamujące wobec CBR1 udowodniono dla grupy flawonoidów oraz chalkonów [51], [53]. Hamowanie CBR1 jest także postulowanym mechanizmem działania syntetycznych pochodnych amidu kwasu cynamonowego i związków będących pochodnymi 8-hydroksy-2-iminochromenu. Silnym inhibitorem jest także triklosan, znany szerzej jako związek o działaniu

przeciwgrzybiczym i przeciwbakteryjnym [52], [54]. Kurkumina i resweratrol są również opisywane jako inhibitory CBR1, jednak, w przeciwieństwie do wymienionych wcześniej związków, mają one oddziaływać nie w centrum aktywnym, a w miejscu wiązania NADPH [55], [56]. Struktury wybranych inhibitorów CBR1 przedstawiono na **Rycinie 5** oraz **Rycinie 11** w rozdziale 3.2.3.2. Wartości IC_{50} dla najsilniejszych poznanych inhibitorów CBR1 wynoszą między 0,1-1 μ M.



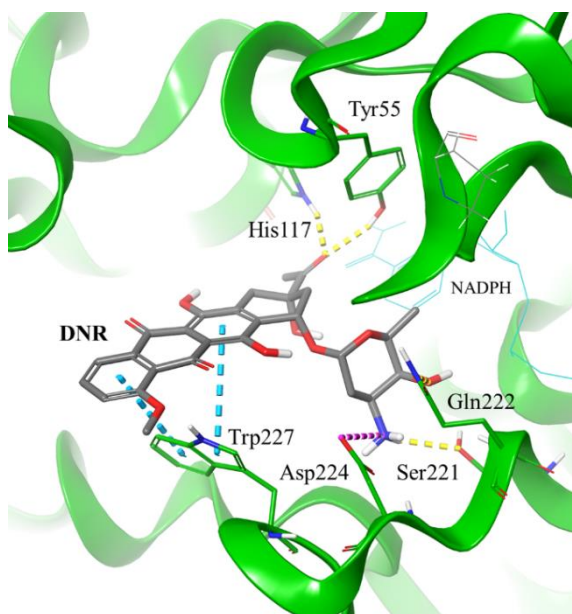
Ryc. 5: Struktury wybranych inhibitorów CBR1.

1.3 Charakterystyka aldo-keto reduktazy 1C3 (AKR1C3)

AKR1C3 należy do enzymów z rodziny aldo-keto reduktaz. W organizmie ludzkim występują cztery podtypy AKR1C (1-4). Ich kluczową rolą jest redukcja ugrupowań ketonowych steroidów, jednak każdy z enzymów wykazuje preferencję do redukcji grupy karbonylowej znajdującej się w innym położeniu substratu. AKR1C3 odpowiada głównie za redukcję ugrupowania znajdującego się w pozycji 17 steroidów. W przeciwieństwie do pozostałych podtypów, ekspresja AKR1C3 jest w największym stopniu obserwowana w organach endokrynych: prostaty i nadnerczach [57], [58]. Nadekspresja została potwierdzona w szeregu nowotworów, w tym nowotworze prostaty opornym na kastrację (ang. *castration-resistant prostate cancer*, CRPC), w którym AKR1C3 ma kluczowe znaczenie jako enzym przekształcający dehydroepiandrosteron i androstenodion do kolejno androstenodiolu i testosteronu, napędzających procesy związane z rozwojem nowotworu. Enzym odpowiada także za redukcję progesteronu do jego mniej aktywnej hydroksypochodnej [59], [60].

AKR1C3 jest monomerycznym, cytoplazmatycznym enzymem zbudowanym z 323 aminokwasów. Podobnie jak w przypadku CBR1, do aktywności AKR1C3 jako reduktazy konieczny jest współdziałanie kofaktora w postaci NADPH [58]. Jednak w przeciwieństwie do CBR1, AKR1C3 może także wykazywać odwrotną aktywność, czyli katalizować dehydrogenację ligandów przy współdziałaniu NADP⁺. W praktyce aktywność ta ma jednak dużo mniejsze znaczenie z powodu silnego powinowactwa do enzymu NADPH, które wielokrotnie przewyższa powinowactwo formy utlenionej kofaktora [61].

Tetradę katalityczną AKR1C3 stanowią reszty aminokwasowe Asp50, Tyr55, Lys84 i His117. Budowa centrum aktywnego jest bardziej skomplikowana od opisywanej wcześniej dla CBR1. W jego obrębie wyróżnia się pięć przestrzeni: miejsce oksyanionowe z odpowiadającymi za redukcję resztami Tyr55 i His117, w pobliżu których umiejscawia się grupa karbonylowa substratu; kanał steroidowy oraz trzy podkieszenie, określane jako SP1, SP2 i SP3 [62], [63].



Ryc. 6: Sposób wiązania ligandów w centrum aktywnym AKR1C3 na przykładzie DNR.

Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; wiązania jonowe zaznaczono fioletową, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

Opracowano na podstawie [47]

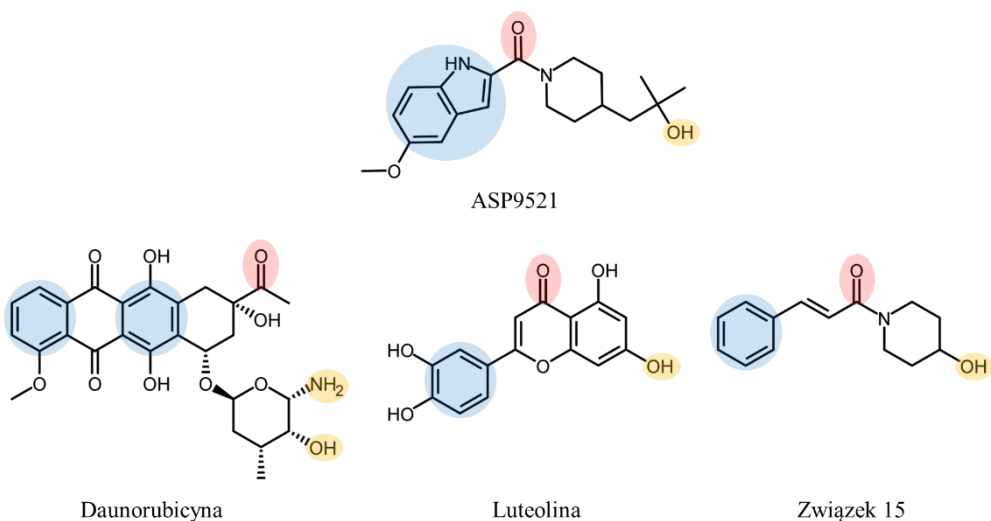
Sposób wiązania ligandów w centrum aktywnym AKR1C3, na przykładzie DNR, przedstawiono na **Rycinie 6**. Zgodnie z opisywanym mechanizmem katalizy enzymatycznej, ugrupowanie karbonylowe znajduje się w pobliżu należących do tetrazy katalitycznej łańcuchów bocznych Tyr55 i His117, tworząc ze wspomnianymi resztami aminokwasowymi wiązania wodorowe. Istotnymi dla sposobu wiązania wybranych ligandów są także reszty Ser221, Gln222 oraz Asp224, które tworzą oddziaływania z fragmentem cukrowym DNR. Warte odnotowania jest to, że w przypadku AKR1C3, za tworzenie oddziaływań odpowiadają łańcuchy boczne reszt aminokwasowych, podczas gdy w CBR1 analogiczne interakcje były obserwowane z atomami łańcuchów głównych reszt Met234 i Ala235. Opisywane interakcje są wspierane przez oddziaływanie π - π między aglikonem DNR, a łańcuchem bocznym Trp227, stanowiącym element kanału steroidowego. Poza Trp227, w obrębie centrum aktywnego AKR1C3 (podkieszeni SP1-SP3) znajdują się jeszcze trzy aminokwasy, posiadające łańcuchy boczne o charakterze aromatycznym (Trp86, Phe306, Phe311), które są istotne dla sposobu wiązania ligandów w większości spośród blisko pięćdziesięciu otrzymanych do tej pory struktur krystalicznych AKR1C3 [57].

Liczba dotychczas poznanych inhibitorów AKR1C3 znacząco przewyższa pulę inhibitorów CBR1. Wiele z nich stanowią związki pochodzenia naturalnego, takie jak, na przykład, pochodne kwasu cyjankowego oraz kwasy fenolowe. Hamujące działanie wobec enzymu wykazano także dla alkaloidu berberyny [64]–[67]. Coraz więcej doniesień literaturowych wspomina o hamowaniu AKR1C3 przez niektóre z inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, takich jak olaparyb, dynacyklib i selicyklib [68]–[70]. Wśród inhibitorów AKR1C3 są także pochodne sulfonylomocznika, a także powszechnie stosowane niesteroidowe leki przeciwzapalne (oraz ich pochodne), takie jak naproksen, indometacyna i kwas flufenamowy [71], [72]. Struktury wybranych inhibitorów AKR1C3 przedstawiono w rozdziale 3.2.3.2.

AKR1C3 jest enzymem budzącym duże zainteresowanie jako cel terapeutyczny w leczeniu takich schorzeń, jak endometrioza i CRPC. Hamowanie jego aktywności było między innymi przedmiotem badań klinicznych związków

BAY-1128688 (terapia endometriozy; wycofany z powodu hepatotoksyczności spowodowanej interakcją z enzymami innymi niż AKR1C3) oraz ASP9521 [73], [74]. Szczególnie interesujący jest drugi z tych związków, który był testowany w terapii CRPC. Poprzez zablokowanie AKR1C3 miał on uniemożliwić wytwarzanie testosteronu i powodować zatrzymanie rozwoju nowotworu. Niestety, w przeprowadzonym badaniu klinicznym nie wykazano istotnych zmian w poziomie markerów świadczących o skuteczności klinicznej związku. Mimo to, na podstawie zebranych danych stwierdzono, że ASP9521 jest substancją o satysfakcjonującym profilu bezpieczeństwa oraz korzystnych właściwościach farmakokinetycznych (może być podawany doustnie). Co równie ważne, ASP9521 nie wykazywał powinowactwa wobec receptorów dla testosteronu, estrogenów, progesteronu oraz gluko- i mineralokortykoidów [59], [74].

Na **Rycinie 7** przedstawiono strukturę ASP9521. W budowie związku można zaobserwować szereg podobieństw do wybranych, opisywanych wcześniej inhibitorów CBR1, jak również do ANT, będących substratami zarówno CBR1, jak i AKR1C3.



Ryc. 7: Porównanie struktur ASP9521 i wybranych ligandów CBR1: daunorubicyny, luteoliny i związku 15. Kolorami zaznaczono fragmenty powtarzające się we wszystkich strukturach: akceptor wiązania wodorowego (czerwony), donor wiązania wodorowego (żółty), pierścień aromatyczny (niebieski).

Poza ugrupowaniem amidowym, zawierającym grupę karbonylową charakterystyczną dla substratów obu enzymów, w strukturze ASP9521 znajduje się aromatyczny pierścień indolowy oraz łańcuch alifatyczny zakończony grupą hydroksylową, mogącą spełniać funkcję donora wiązania wodorowego, podobnie jak ma to miejsce w pozycji 7 luteoliny i innych flawonoidów [51]. ASP9521 zawiera dodatkowo pierścień piperydyny, który jest obecny również w strukturze Związku 15 – pochodnej amidu kwasu cynamonowego, poprawiającej aktywność cytotoksyczną ANT poprzez hamowanie CBR1. W analizach z wykorzystaniem dokowania wskazano układ piperydyny jako element poprawiający stopień dopasowania związków do centrum aktywnego CBR1 [52]. Powyższe obserwacje skłaniają do dokładniejszego zbadania ASP9521 jako potencjalnego inhibitora CBR1 oraz sprawdzenia jego wpływu na efekt cytotoksyczny ANT po łącznym podaniu z lekami tej grupy.

1.4 Hamowanie aktywności CBR1 i AKR1C3 jako metoda poprawy skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania antybiotyków antracyklinowych

Rosnąca ilość doniesień wskazujących, że za opornością komórek nowotworów na działanie ANT oraz kardiotoksycznością leków mogą stać ich zredukowane hydroksymetabolity, spowodowała zwiększenie zainteresowania poszukiwaniem inhibitorów CBR1 i AKR1C3. Pomimo niewielkiej puli poznanych inhibitorów CBR1, pierwsze doniesienia o korzystnym wpływie hamowania tego enzymu na skuteczność ANT pojawiły się już w 2005 roku. W tym czasie AKR1C3 był uważany jako interesujący cel terapeutyczny przede wszystkim ze względu na jego rolę w metabolizmie steroidów, a nie jako jedna z głównych reduktaz ANT. Zaczęło się to stopniowo zmieniać w latach 2014-2015, kiedy pojawiły się pierwsze prace badające efekty łącznego podania ANT i inhibitorów AKR1C3. Do tej pory, badania opisujące efekt wspólnego podania ANT i inhibitorów reduktaz ANT ograniczają się do prac *in vitro* oraz *in vivo*, nie przeprowadzono natomiast badań klinicznych z zastosowaniem wspomnianych inhibitorów. W literaturze naukowej można też znaleźć informację o jednym badaniu klinicznym łączącym ANT

i związek hamujący CBR1. Badano w nim potencjalny efekt kardioprotekcyjny flawonoidowej pochodnej monoHER podczas stosowania DOX (ostatecznie nie zaobserwowano wspomnianego efektu) [75]. Badania laboratoryjne potwierdziły co prawda, że związek jest w stanie hamować CBR1, jednak aktywność ta była bardzo umiarkowana (IC_{50} przy zastosowaniu jako substrat w reakcji enzymatycznej DOX lub DNR wynosiło między 37-220 μM), a głównym, postulowanym przez autorów, mechanizmem działania monoHER u pacjentów onkologicznych miało być działanie antyoksydacyjne, nie zaś hamowanie CBR1 [76].

Wśród związków istotnych w kontekście badania budowy i funkcji CBR1 jest hydroxy-PP-Me – jeden z najsilniejszych poznanych inhibitorów enzymu ($IC_{50} = 759 \text{ nM}$). W badaniach z użyciem linii komórkowej nowotworu płuc A549, hydroxy-PP-Me, użyty w stężeniu 8 μM , powodował poprawę efektu cytotoksycznego DNR o 25%, natomiast związek stosowany samodzielnie nie wpływał na zmianę żywotności komórek [49]. Było to pierwsze tak istotne doniesienie literaturowe mówiące o potencjale CBR1 jako celu terapeutycznego we wspomaganiu terapii ANT. W kolejnych latach wykazano, że hydroxy-PP-Me wzmacnia aktywność cytotoksyczną DOX w wybranych liniach komórkowych nowotworu piersi. Równie obiecujące wyniki uzyskano w modelach zwierzęcych (mysim i szczurzym), w których hydroxy-PP-Me wspomagał działanie przeciwnowotworowe DOX oraz ograniczał kardiotoksyczność leku [77].

Działanie hamujące wobec CBR1 wykazano dla wybranych przedstawicieli długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Dla kwasu oleinowego wykonano także pogłębione badania komórkowe, w których wykazano jego korzystny wpływ na aktywność DOX wobec komórek nowotworu żołądka (MKN45), w których wcześniej udowodniono zwiększoną ekspresję CBR1 [78].

Z punktu widzenia dokładniejszego poznania funkcji i możliwości wykorzystania CBR1, cennymi są badania z użyciem flawonoidów i ich pochodnych. Zależność struktura-aktywność została opisana dla blisko 30 przedstawicieli flawonoidów, jednak efekt ich łącznego podania z ANT sprawdzono do tej pory dla zaledwie kilku spośród nich [51]. Wykazano korzystny wpływ kwercetyny na cytotoksyczność DOX w liniach komórkowych MKN45 oraz LoVo (nowotwór

okrężnicy) [79]. Hamowanie CBR1 potwierdzono także dla trzech pochodnych flawonoidowych: ksantohumolu, izoksantohumolu oraz 8-prenylnaryngeniny. Po podaniu wymienionych pochodnych odnotowano istotne ograniczenie metabolizmu DNR w komórkach nowotworu okrężnicy (SW480), jednak w opublikowanych badaniach nie oceniono wpływu związków na efekt cytotoksyczny leku [80].

Innymi przedstawicielami związków pochodzenia naturalnego, będącymi inhibitorami CBR1, są alkaloid piperlongumina oraz triterpen kwas 23-hydroksybetulinowy (23-HBA). W badaniach z użyciem komórek nowotworu prostaty (DU-145), piperlongumina w połączeniu z DOX wykazywały synergizm w działaniu cytotoksycznym i antyproliferacyjnym. Co ciekawe, połączenie piperlonguminy i DOX wykazywało także efekt antyinwazyjny, podczas gdy takiej aktywności nie obserwowano dla żadnej z wymienionych substancji stosowanych samodzielnie [81]. Z kolei 23-HBA, użyty w nietoksycznym wobec komórek stężeniu, wzmacniał cytotoksyczne działanie DOX linii komórkowych nowotworów płuc, żołądka oraz wątroby. Właściwości 23-HBA zbadano także w modelu *in vivo* na myszach z wszczepionymi komórkami mięsaka. Po okresie rozwoju guza oceniono działanie przeciwnowotworowe DOX i porównano je z efektem łącznego podania DOX i triterpenu. Dodatkowe podanie 23-HBA powodowało zmniejszenie masy guza o 52-59%, co było lepszym efektem niż obserwowany przy zastosowaniu jedynie DOX (zmniejszenie masy guza o 43%) [82]. W kolejnych badaniach oceniano kardioprotekcyjne właściwości 23-HBA. Wykazano, że dodatek triterpenu niwelował niekorzystne działanie cytotoksyczne DOX wobec linii szczurzych kardiomiocytów H9c2. Z kolei w modelu mysim związek wpływał korzystnie na funkcjonowanie mięśniówki serca oraz ograniczał niekorzystny wpływ DOX na kardiomiocyty [83].

Kolejną grupą inhibitorów CBR1, zastosowanych w celu poprawy skuteczności i bezpieczeństwa ANT, były pochodne amidu kwasu cynamonowego (CAD). Najaktywniejsze związki poprawiały aktywność cytotoksyczną DOX wobec komórek linii A549. Podobnie jak w przypadku PL, wybrane CAD w połączeniu z DOX wykazywały działanie antyinwazyjne. Było to związane ze zmianami w cytoszkielecie komórek poddawanych inkubacji z badanymi związkami. Co

ważne, wspomaganie cytotoksycznego efektu DOX było ograniczone do komórek nowotworowych, natomiast połączenie CAD i DOX nie upośledzało w większym stopniu funkcjonowania komórek zdrowych (fibroblastów) w porównaniu z samodzielnym podaniem DOX [52].

Dotychczasowe badania łącznego podania ANT i inhibitorów AKR1C3 były skoncentrowane na wzmocnieniu efektu cytotoksycznego, natomiast nie oceniano w nich potencjalnego efektu kardioprotekcyjnego. W ciągu ostatnich lat opublikowano szereg wyników prac badawczych, w których badano efekt koadministracji ANT wraz z będącymi na etapie rozwoju klinicznego inhibitorami kinaz o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Mogłyby one tym samym pełnić podwójną rolę: leków przeciwnowotworowych i jednocześnie substancji wspomagających farmakoterapię ANT. Jednym z przykładów takich związków jest dynacyklib, będący inhibitorem kilku podtypów kinaz zależnych od cyklin (CDK) i kandydatem na lek między innymi w terapii nowotworów piersi oraz płuc [69]. W badaniach komórkowych na linii nowotworu jelita grubego HCT-116 (po wzmocnieniu bazowej ekspresji AKR1C3 w komórkach), dwugodzinna preinkubacja komórek dynacyklibem wpływała na zwiększenie efektu cytotoksycznego DNR. Podobny efekt zaobserwowano dla czterech innych inhibitorów CDK: AZD5438, R547 oraz selecyklibu i purwalanolu A - związków o budowie purynowej [70], [84]. Linia komórkowa HCT-116 była dotychczas najczęściej wykorzystywanym modelem komórkowym w badaniach nad synergistycznym działaniem ANT i przeciwnowotworowych inhibitorów kinaz. [69]. Buparlisib, będący kolejnym z inhibitorów kinaz o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej, wykazywał hamowanie AKR1C3 ($IC_{50} = 9,5 \mu M$), przy jednoczesnym braku aktywności hamujących wobec innych reduktaz (w tym CBR1). W badaniach komórkowych buparlisib hamował metabolizm DNR do DNRolu oraz wykazywał efekt poprawiający cytotoksyczne działanie DNR (badania przeprowadzone dla stałego stężenia DNR i rosnących stężeń buparlisibu) [85].

Linia komórkowa HCT-116 z nadekspresją AKR1C3 została także wykorzystana do potwierdzenia korzyści wynikających z wspólnego zastosowania DNR i olaparybu – silnego inhibitora polimeraz poli-ADP-rybozy, stosowanego

w terapii nowotworów piersi, jajnika oraz CRPC. Olaparyb jest już lekiem dopuszczonym do stosowania w farmakoterapii i jednocześnie wciąż badanym w monoterapii i terapiach skojarzonych kolejnych rodzajów nowotworów, co czyni jego połączenie z ANT szczególnie interesującym z punktu widzenia uwzględnienia hamowania AKR1C3 jako jednego z dodatkowych kierunków aktywności tego związku [68], [86].

Istotne znaczenie mają także prace dotyczące wpływu hamowania AKR1C3 na poprawę działania cytotoksycznego DNR wobec komórek ostrej białaczki szpikowej oraz ostrej białaczki limfoblastycznej. Jako badane inhibitory AKR1C3 zastosowano syntetyczne pochodne kwasu cynamonowego, w których modyfikacje strukturalne były wprowadzane w obrębie pierścienia fenylowego (w przypadku opisywanych wcześniej hamujących CBR1 amidów kwasu cynamonowego, modyfikacje dotyczyły głównie fragmentu dołączonego do reszty amidowej). Po ustaleniu zależności struktura-aktywność i wyborze najsilniejszych inhibitorów przeprowadzono badania *in vitro*, których wyniki dowiodły, że koadministracja ANT z inhibitorami AKR1C3 jest w stanie wzmocnić działanie przeciwnowotworowe leku ponad dziesięciokrotnie [64], [87].

Pomimo zdecydowanie większej puli znanych inhibitorów AKR1C3, do tej pory nie przeprowadzono odpowiednio dużej liczby badań nad ich łączonym stosowaniem z ANT. Obecnie wciąż dominują badania nad wykorzystaniem tych inhibitorów w schorzeniach związanych z zaburzeniami przemian steroidów, takimi jak CRPC i endometrioza. Z kolei badania inhibitorów CBR1, skupiające się na ich potencjalnym zastosowaniu jako adiuwanty w terapii przeciwnowotworowej ANT, są ograniczone ze względu na małą pulę znanych inhibitorów o lekopodobnej strukturze i właściwościach. Dostępna literatura nie wskazuje na próby celowanego projektowania i poszukiwania związków będących jednocześnie inhibitorami obu wspomnianych enzymów. Opisanie takiej nowej grupy związków – dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 – mogłoby w istotny sposób przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat hamowania metabolizmu ANT jako metody optymalizacji farmakoterapii lekami tej grupy.

1.5 Wspomagane komputerowo projektowanie leków – wybrane metody i zastosowanie

Rewolucja technologiczna, której owocem są między innymi komputery o coraz większych mocach obliczeniowych, spowodowała dynamiczny postęp w wielu dziedzinach nauki, w tym odkrywaniu i rozwoju leków. Obecnie istotnym elementem poszukiwania nowych substancji leczniczych jest wykorzystywanie różnego rodzaju metod komputerowych. Umożliwiło ono stopniowe odejście od projektowania nowych związków aktywnych wyłącznie na podstawie podobieństwa do już znanych ligandów celów terapeutycznych. Dzięki wykorzystaniu trójwymiarowych struktur makrocząsteczek (receptorów, enzymów itp.), możliwe stało się celowane projektowanie związków mających oddziaływać z konkretnymi elementami tych molekuł [88], [89]. Wykorzystanie trójwymiarowych modeli makromolekuł w odkrywaniu leków określa się projektowaniem leków na bazie struktury celu biologicznego (ang. *structure-based drug design*, SBDD). Jednak projektowanie związków aktywnych w oparciu o struktury dotychczas znanych ligandów nie zostało całkowicie porzucone i jest nadal stosowane, zwłaszcza gdy nie jest dostępna eksperymentalnie ustalona trójwymiarowa struktura celu biologicznego. Jest to tak zwane projektowanie leków na bazie struktury ligandów (ang. *ligand-based drug design*, LBDD) [90]. Kolejnym zastosowaniem metod komputerowych jest ich wykorzystanie do oszacowania oraz analizy parametrów ADMET dla związków chemicznych będących kandydatami na nowe leki. Jest to szczególnie istotne, gdyż obecny paradygmat funkcjonujący w dziedzinie chemii farmaceutycznej mówi, że o użyteczności terapeutycznej cząsteczki nie świadczy jedynie jej powinowactwo do celu biologicznego, ale balans między odpowiednią aktywnością farmakodynamiczną oraz korzystnymi parametrami ADMET [91].

Z uwagi na szerokie możliwości zastosowania metod obliczeniowych w nowoczesnej chemii farmaceutycznej, stanowią one jedną z podstaw tak zwanego racjonalnego projektowania leków (ang. *rational drug design*) [92].

Wspomagane komputerowo projektowanie leków (ang. *computer-aided drug design*, CADD) stanowi obecnie jeden z wiodących trendów w poszukiwaniu substancji aktywnych, umożliwiając oszczędność czasu i kosztów poprzez eliminację

na wczesnych etapach substancji o potencjalnie słabej aktywności oraz posiadających elementy struktury mogące stanowić przeszkody w toku dalszej optymalizacji (na przykład toksykofory). Według szacunków, wykorzystanie CADD może obniżyć koszty związane z procesami odkrywania i rozwoju leków nawet o połowę [93]. Jednym z wielu przykładów pomyślnego wykorzystania CADD jest historia imatynibu – leku stosowanego w leczeniu nowotworów krwi. Dzięki wykorzystaniu metod komputerowych odkryto podstawowy układ farmakoforowy - 2-feniloaminopirymidynę – na bazie którego dokonywano dalszych modyfikacji, aż do otrzymania struktury imatynibu. CADD zastosowano następnie do dalszej optymalizacji, w wyniku której otrzymano nilotynib, będący lekiem o szerszej aktywności przeciwnowotworowej, również w grupie pacjentów o specyficznych mutacjach genetycznych przez które terapia imatynibem była nieskuteczna [94], [95].

Jedną z najczęściej stosowanych w SBDD metod jest dokowanie. Polega ono na próbach przestrzennego dopasowania związków o potwierdzonej lub przewidywanej aktywności do miejsca aktywnego (ortosterycznego lub allosterycznego) w obrębie makrocząsteczki. Zadaniem dokowania jest przy tym odwzorowanie, w jak najdokładniejszy sposób, rzeczywistej konformacji aktywnej liganda i oddziaływań (m.in. wiązań wodorowych, interakcji hydrofobowych, itp.), które tworzy z celem biologicznym. Pozwala to na określenie kluczowych dla wiązania liganda reszt aminokwasowych, a w oparciu o te informacje, na selekcję i optymalizację struktur potencjalnych nowych ligandów [96]. W oparciu o ocenę charakteru oddziaływań między zadokowanym związkiem a celem biologicznym, możliwe jest przybliżone oszacowanie tego, czy związek faktycznie jest/będzie ligandem badanego celu biologicznego. Służą do tego między innymi funkcje oceniające, które analizują siłę oddziaływań między atomami liganda i celu, a ich wartości mogą pomagać w porównywaniu między sobą analizowanych związków. Są to jednak wciąż przybliżenia i dlatego w dokowaniu bierze się pod uwagę nie tylko wartości funkcji oceniających, ale także choćby takie czynniki, jak wizualna ocena sposobu ułożenia analizowanego związku w centrum aktywnym celu biologicznego oraz rodzaje oddziaływań między celem i ligandem [97]. Rozwój mocy obliczeniowej komputerów umożliwia dokowanie bibliotek milionów związków

chemicznych, a co za tym idzie wskazywanie nowych chemotypów potencjalnych ligandów celów biologicznych. Taką procedurę nazywa się (prospektywnym) wysokowydajnym wirtualnym skринingiem (HTVS). Związki wykorzystywane w skринingach mogą pochodzić z bibliotek komercyjnie dostępnych cząsteczek (np. baza ZINC), ale mogą to być także na przykład biblioteki związków należących do firm farmaceutycznych, które wykorzystują tego typu skринingi w początkowych etapach poszukiwania substancji aktywnych. Należy zaznaczyć, że podstawowym celem HTVS jest wstępne wytypowanie związków mogących wykazywać powinowactwo wobec badanego celu biologicznego, nie zaś bezpośrednie otrzymanie ligandów o bardzo wysokiej aktywności – optymalizacja jest kolejnym krokiem badawczym, który również może być z powodzeniem przeprowadzony bądź wsparty z pomocą narzędzi komputerowych [98], [99]. Poza skринingami, korzystającymi z bibliotek związków chemicznych, wykorzystuje się także tzw. projektowanie *de novo* oraz projektowanie w oparciu o dokowanie fragmentów związków, a następnie dobudowywanie kolejnych fragmentów w oparciu o analizę budowy przestrzennej centrum aktywnego. Zastosowanie tych metod jest jednak utrudnione z uwagi na olbrzymią pulę możliwych połączeń chemicznych (szacunki podają, że pula związków mogących być uzyskanymi w wyniku projektowania *de novo* sięga nawet 10^{100}), przy nadal skończonych możliwościach syntetycznych, uniemożliwiających otrzymanie niektórych cząsteczek [100]. W tym wypadku, zwłaszcza na bardzo wstępnym etapie poszukiwania substancji aktywnych i ograniczonym budżecie, większe zastosowanie mają skринingi z wykorzystaniem bibliotek związków dostępnych komercyjnie lub też celowane modyfikacje związków istniejących, mające na celu optymalizację struktury.

Większość stosowanych obecnie protokołów dokowania uwzględnia swobodę konformacyjną liganda, pozostawiając jednocześnie „usztynioną” konformację aminokwasów centrum aktywnego celu biologicznego. Odbiega to od przyjętego, opartego na zasadzie wzajemnego dopasowania, schematu oddziaływania cel-ligand. Jednym ze sposobów dostosowania symulacji komputerowych do procesów zachodzących w warunkach fizjologicznych jest zastosowanie protokołów uwzględniających indukowaną strukturą liganda korektę położenia łańcuchów

bocznych aminokwasów centrum aktywnego celu biologicznego (ang. *Induced-fit docking*, IFD) [101]. Takie podejście okazuje się szczególnie przydatne w przypadku poszukiwania zupełnie nowych chemotypów związków aktywnych. Może także służyć do optymalizacji centrów aktywnych trójwymiarowych struktur krystalicznych. W takim przypadku IFD stanowi początkowy etap skutkujący wygenerowaniem nowych modeli strukturalnych o skorygowanych położeniach przestrzennych wybranych reszt aminokwasowych. Jakość otrzymanych modeli można następnie oceniać, na przykład, na drodze tzw. retrospektywnego wirtualnego skryningu, w którym do modelu dokuje się zarówno związki o potwierdzonej aktywności, jak i te nieaktywne (ang. *decoys*) i ocenia (np. poprzez porównanie wartości funkcji oceniającej) kolejność uszeregowania zadokowanych związków. W przypadku idealnego modelu, wszystkie związki aktywne powinny być ocenione lepiej od nieaktywnych, jednak w praktyce ciężko uzyskać aż tak dokładne modele, a na wyniki retrospektywnego wirtualnego skryningu duży wpływ mają charakter celu biologicznego oraz to, jakie ligandy zostały wybrane do procedury optymalizacji [52], [102].

Dynamika molekularna (ang. *molecular dynamics*, MD) jest stosowaną w CADD metodą o wciąż rosnącym znaczeniu, gdyż umożliwia ocenę zachodzących w określonym przedziale czasu zmian w zachowaniu kompleksu cel-ligand: przemian konformacyjnych i następujących zmian energii kompleksu, a także ilości i rodzaju interakcji molekularnych. Metoda ta umożliwia dokładniejszą ocenę tego, jaki jest najbardziej prawdopodobny sposób wiązania liganda w centrum aktywnym celu oraz to, które interakcje są kluczowe dla uzyskania powinowactwa przez ligand [103]. MD uwzględnia obecność w otoczeniu kompleksu cel-ligand cząsteczek wody (lub innego rozpuszczalnika) oraz dobrany skład jonowy tak, aby warunki symulacji były jak najbardziej zbliżone do warunków panujących w organizmie. Umożliwia to między innymi ocenę występowania dodatkowych interakcji wytwarzanych z udziałem cząsteczek wody (tzw. mostki wodne), które zazwyczaj nie mogą być zaobserwowane podczas dokowania (nie stosuje się w nim środowiska rozpuszczalnika, a statyczny charakter procesu uniemożliwia obserwację tworzenia takich oddziaływań w czasie). Symulacje MD przeprowadza się dla ustalanych wartości temperatury i ciśnienia, tak aby, podobnie jak w przypadku

wspominanych rozpuszczalników, jak najlepiej odwzorowywać warunki fizjologiczne [104], [105].

W przypadku braku trójwymiarowych struktur interesującego celu biologicznego można zastosować makrocząsteczkę o zbliżonej budowie jako matrycę (ang. *template*), służącą do opracowania na jej bazie jak najdokładniejszego modelu właściwego celu. Metoda ta nosi nazwę modelowania homologicznego. Jednak często w takich przypadkach, a zwłaszcza wtedy, gdy nie ma dostępnej makrocząsteczki mogącej służyć jako matryca, przechodzi się do wykorzystania LBDD. Jedną z najczęściej stosowanych metod w obrębie tej gałęzi CADD jest modelowanie farmakoforowe. Na bazie trójwymiarowych struktur znanych ligandów tworzy się modele farmakoforowe – trójwymiarowe „mapy” powiązanych ze sobą cech strukturalnych, które powinien posiadać związek wykazujący powinowactwo do danego celu biologicznego. Uzyskane w ten sposób modele mogą być następnie zastosowane w prospektywnych skринingach, mających wstępnie zawęzić pulę analizowanych związków i pozostawić do dalszych analiz jedynie takie, które posiadają pewne wskazane cechy strukturalne [106]. Takie postępowanie jest uzasadnione choćby wtedy, gdy skринingowa biblioteka związków jest bardzo obszerna, a dostępne moce obliczeniowe uniemożliwiają sprawne wykonanie pełnego skринingu w oparciu o budowę celu biologicznego. Skринing w oparciu o farmakofor nie wymaga wykorzystania aż tak dużych mocy obliczeniowych, więc jego wykonanie umożliwia oszczędność czasu i pozostawienie zawężonej puli związków przeznaczonych do „właściwego” skринingu.

O tym, czy dana substancja ma szansę stać się lekiem, decyduje nie tylko jej aktywność i selektywność, ale także zestaw właściwości farmakokinetycznych i toksykologicznych, zebranych zbiorczo pod akronimem ADMET. Zwracanie szczególnej uwagi na parametry ADMET, już na wstępnych etapach poszukiwania nowych substancji aktywnych, ma istotne znaczenie dla projektu badawczego, gdyż wczesna identyfikacja i modyfikacja/wykluczenie struktur o niekorzystnych właściwościach umożliwia oszczędność czasu, zasobów i kosztów [91]. Poza elementami stanowiącymi złoty standard w poszukiwaniu leków, takimi jak reguła Lipińskiego, w ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na wykluczanie z analiz

związków o potencjale do wykazywania fałszywie pozytywnych wyników badań aktywności biologicznych (tzw. PAINS - *pan-assay interference compounds*), jak również związków o potencjale do wyzwalania różnego rodzaju toksyczności [107], [108]. Poza optymalizacją struktur ligandów pod kątem zwiększenia ich aktywności, CADD znajduje także zastosowanie w określaniu i ocenie parametrów ADMET. Dostępnych jest obecnie szereg programów oraz serwisów internetowych, które, na podstawie struktury związku, są w stanie określić zaawansowane parametry opisujące jego budowę oraz ocenić wynikające z niej zagrożenia [109], [110]. W przypadku modelowania ADMET olbrzymie znaczenie mają metody uczenia maszynowego. Wykorzystuje się w nich właściwości tysięcy znanych i już zbadanych związków w celu umożliwienia, na ich podstawie, predykcji właściwości ADMET dla nowych, nieopisanych dotychczas substancji. Dzięki temu można określić zarówno właściwości fizykochemiczne związku ($\log P$, rozpuszczalność itp.), jak również np. oszacować prawdopodobieństwo wystąpienia ryzyka kardiotoxyczności wynikającej z blokowania kanałów hERG. Im więcej zbadanych związków referencyjnych użytych jako „przykłady” i bardziej zaawansowane metody analizy danych, tym dokładniejsze modele predykcyjne można otrzymać [109], [111]. Wykorzystanie CADD do predykcji i oceny parametrów ADMET pozwala na znaczące ograniczenie liczby związków przeznaczanych do badań laboratoryjnych, mających na celu określenie właściwości fizykochemicznych, jak również do badań bezpieczeństwa – zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

Powyższe przykłady wskazują możliwości szerokiego wykorzystania CADD na każdym etapie odkrywania leku – od wstępnego poszukiwania nowych chemotypów związków wykazujących aktywność biologiczną (ang. *hit*), aż do optymalizacji związków wiodących (ang. *lead*). Nie stanowią tylko dodatku do badań, ale są jednym z motorów napędowych projektów badawczych. Niektórzy autorzy przewidują, że w związku z coraz bardziej istotną rolą metod obliczeniowych, przestaną one być wkrótce metodami wspomagającymi, a staną się metodami sterującymi odkrywanie leków – *computer-driven drug discovery* [112]. Wymaga to jednak zarówno dalszego wzrostu mocy obliczeniowych, jak i doskonalenia metod i algorytmów badawczych.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Poszukiwanie skutecznych i bezpiecznych leków przeciwnowotworowych stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej nauki. Pomimo pojawiania się na rynku nowych leków, substancje wykorzystywane już od wielu lat wciąż pozostają jednymi z najczęściej stosowanych. Zaliczają się do nich między innymi antybiotyki antracyklinowe, które dzięki udowodnionej skuteczności, zarówno w leczeniu guzów litych, jak i nowotworów hematologicznych, są nadal podstawowym elementem licznych schematów terapeutycznych [9]. Jednak zagrażająca ich stosowaniu lekooporność oraz udowodniona kardiotoxyczność, zmusiły do poszukiwania rozwiązań mogących niwelować wymienione efekty. Jedną z możliwych strategii jest hamowanie metabolizmu ANT na drodze blokowania aktywności enzymów redukujących ich grupy karbonyłowe: CBR1 i AKR1C3.

Celem badań opisanych w niniejszej pracy było zastosowanie zaawansowanych narzędzi i metod komputerowych do optymalizacji trójwymiarowych struktur głównych reduktaz ANT oraz wykorzystanie ich do poszukiwania nowych inhibitorów enzymatycznych. Badania podzielono na trzy części:

1. Poszukiwanie nowych inhibitorów CBR1.

Pula poznanych dotychczas inhibitorów CBR1 jest ograniczona, a dodatkowo jedynie część z nich stanowią związki o budowie i właściwościach lekopodobnych. Projektowanie inhibitorów CBR1 utrudnia także potencjalna obecność w obrębie centrum aktywnego cząsteczki GSH, którego rola wciąż pozostaje do końca niewyjaśniona. Celem tej części badań było wykorzystanie podejścia SBDD do optymalizacji wybranych struktur krystalicznych CBR1 oraz wyselekcjonowanie na drodze wirtualnego skriningu nowych, potencjalnych inhibitorów enzymu, uwzględniając dwa możliwe stany, które mogą występować w warunkach fizjologicznych – z GSH obecnym w centrum aktywnym oraz bez niego. W celu określenia aktywności biologicznej wytypowanych związków zaplanowano wykorzystanie rekombinowanego enzymu oraz badania na linii komórkowej nowotworu płuca A549.

2. Ocena możliwości hamowania CBR1 przez związek ASP9521:

Znaczne podobieństwo między strukturą ASP9521, będącego silnym inhibitorem AKR1C3, a strukturami znanych inhibitorów CBR1, stanowi przesłankę do tego, że wspomniany związek może być inhibitorem jednocześnie obu głównych reduktaz ANT. Celem tej części badań było zweryfikowanie tej hipotezy. Zaplanowano wykorzystanie takich narzędzi, jak dokowanie i symulacje MD, których użycie miało pozwolić na określenie możliwości tworzenia przez ASP9521 oddziaływań obserwowanych dla znanych inhibitorów CBR1, jak również umożliwić ocenę stabilności uzyskanego kompleksu CBR1-ASP9521 oraz dynamikę zmian ilości i rodzaju oddziaływań enzym-ligand. W celu weryfikacji hipotez, będących wynikiem badań *in silico*, zaplanowano badania hamowania rekombinowanego CBR1 przez ASP9521.

3. Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3:

W wyniku poszukiwań rozwiązań mających wspomagać leczenie ANT za pomocą związków selektywnie blokujących jedną z dwóch głównych reduktaz ANT (CBR1 lub AKR1C3), nie uzyskano dotychczas całkowitego wyeliminowania niekorzystnych efektów leków – lekooporności i kardiotoksyczności. Może to wynikać z wciąż aktywnej, alternatywnej ścieżki metabolicznej, obejmującej działanie drugiej z głównych reduktaz. Wobec tego, dopiero równoczesne zahamowanie aktywności zarówno CBR1, jak i AKR1C3 mogłoby skutkować pełnym osiągnięciem poprawy skuteczności i bezpieczeństwa ANT. Podobieństwa między strukturami obu enzymów skłoniły do zweryfikowania hipotezy o możliwości uzyskania związków, będących dualnymi inhibitorami CBR1-AKR1C3. W tym celu zaplanowano przeprowadzenie analogicznych zadań badawczych, jak przy poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1, wykorzystując zarówno dostępne narzędzia SBDD, jak również elementy modelowania farmakoforowego. W celu określenia aktywności biologicznej wytypowanych związków, zaplanowano wykorzystanie rekombinowanych enzymów oraz badania na linii komórkowej nowotworu płuca A549.

W każdym z opisanych etapów badań zaplanowano wykorzystanie szeregu metod wspomaganego komputerowo projektowania leków, stosowanych z powodzeniem już wcześniej w ramach prac prowadzonych w kontekście innych celów biologicznych w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM [47], [102], [113]. W celu optymalizacji centrów aktywnych wybranych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3 zaplanowano przeprowadzenie dokowań z uwzględnieniem swobody konformacyjnej zarówno liganda, jak i łańcuchów bocznych aminokwasów, dopasowujących swoje położenie w zależności od użytych w dokowaniu ligandów (metoda IFD). Wykorzystanie zoptymalizowanych modeli, ocenionych na drodze retrospektywnych wirtualnych skryningów i symulacji MD, przewidziano w prospektywnych wirtualnych skryningach, pozwalających na wytypowanie nowych chemotypów potencjalnych inhibitorów CBR1 oraz dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3. Selekcję związków zaplanowano przeprowadzić nie tylko na podstawie oceny uzyskanych w wyniku skryningów pól i wartości funkcji oceniającej, ale także w oparciu o analizę wybranych, oszacowanych przy pomocy dedykowanego oprogramowania, parametrów ADMET, tak aby z puli potencjalnych nowych inhibitorów usunąć związki o niekorzystnych właściwościach strukturalnych bądź farmakokinetycznych.

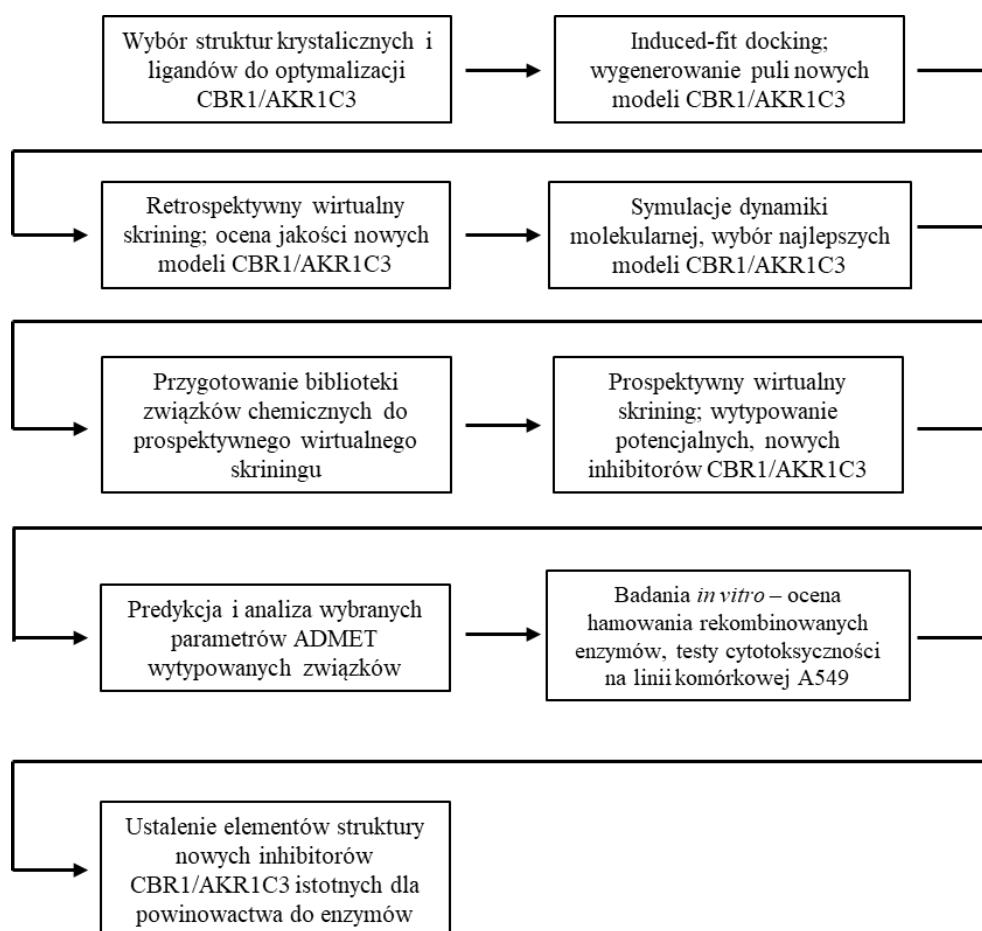
Opisane w niniejszej pracy badania *in silico* postanowiono wzbogacić o badania *in vitro* wyselekcjonowanych związków, polegającą na ocenie hamowania izolowanego CBR1/AKR1C3 oraz ocenie wpływu dodatku inhibitorów enzymatycznych na aktywność przeciwnowotworową DNR. Badania te zostały przeprowadzone przez pracowników Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UJ CM, specjalizującego się w badaniach nowych substancji mających wspomagać farmakoterapię ANT [52], [81].

Łączna analiza wyników badań *in silico* i *in vitro* miała na celu wskazanie elementów strukturalnych ligandów, będących istotnymi dla uzyskania powinowactwa wobec CBR1 i AKR1C3.

3. METODYKA BADAŃ

3.1 Informacje ogólne, schemat przeprowadzonych badań

W ramach badań wykorzystano strategię poszukiwania potencjalnych inhibitorów reduktaz w oparciu o strukturę celu biologicznego. W obu częściach zastosowano analogiczny proces prowadzący do wyselekcjonowania, a następnie zbadania związków, mających być nowymi inhibitorami CBR1 lub dualnymi inhibitorami CBR1-AKR1C3. Przyjęty schemat postępowania przedstawiono na **Rycinie 8**.



Ryc. 8: Schemat postępowania zastosowany przy poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1 i dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, a także oceny ich wpływu na aktywność przeciwnowotworową DNR.

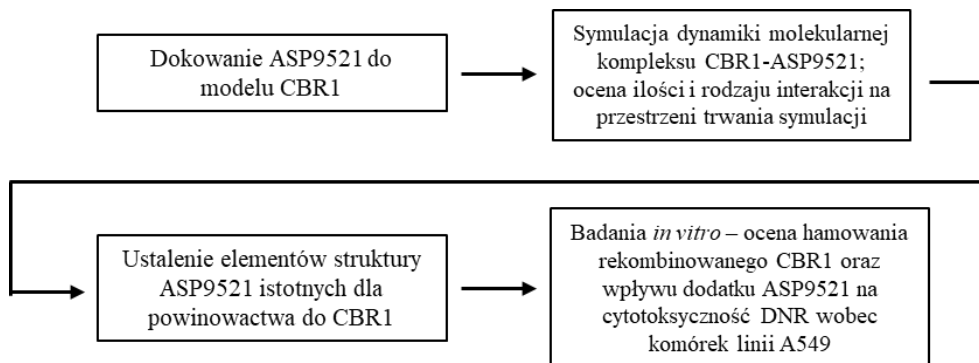
Kluczowym elementem dla uzyskania rzetelnych wyników w podejściu SBDD były trójwymiarowe struktury CBR1 i AKR1C3, otrzymane metodami krystalograficznymi. Każda z nich charakteryzowała się określoną rozdzielczością, czyli dokładnością, z jaką udało się ustalić przestrzenne położenie atomów budujących kolejne reszty aminokwasowe. Rozmieszczenie reszt aminokwasowych w obrębie centrum aktywnego danej struktury krystalicznej było uzależnione od liganda wykorzystanego w procesie krystalizacji (zdecydowana większość kryształów CBR1 i AKR1C3 została wykrystalizowana wraz z ich ligandami). Wreszcie, kompleksy białko-ligand są układami dynamicznymi, a zatem w wyniku krystalizacji otrzymywany jest zaledwie jeden z ich możliwych stanów konformacyjnych. Wobec tego, wybrane struktury krystaliczne CBR1 i AKR1C3 poddano optymalizacji położenia reszt aminokwasowych w obrębie centrów aktywnych enzymów, stosując w tym celu ich wybrane, znane ligandy. Uzyskane modele oceniono w retrospektywnym wirtualnym skryningu, którego wyniki, scharakteryzowane za pomocą wybranych parametrów, m.in. BEDROC, EF_{1%}, EF_{5%}, ROC (rozwinęcia skrótów i opis parametrów w rozdziale 3.2.6), posłużyły do wyboru modeli CBR1 i AKR1C3 odróżniających w zadowalającym stopniu znane ligandy enzymów od fałszywych ligandów. Następnie do tych modeli zadokowano po jednym wybranym ligandzie CBR1/AKR1C3 i przeprowadzono symulacje MD, w celu dodatkowej oceny tego, czy uzyskane w wyniku IFD przestrzenne rozmieszczenie reszt aminokwasowych jest w stanie pozostać stosunkowo niezmiennie w trakcie całej symulacji oraz czy nie będzie wpływało niekorzystnie na zachowanie (położenie) liganda w centrum aktywnym (z uwzględnieniem oddziaływań cel-ligand).

Łączna ocena retrospektywnego wirtualnego skryningu oraz MD posłużyła do wytypowania najlepszych modeli CBR1 i AKR1C3, które zostały wykorzystane w prospektywnych wirtualnych skryningach. Bibliotekę związków chemicznych, użytych w skryningach, zawężono do związków spełniających warunki *lead-like* (struktur wiodących w procesie odkrywania leków; szczegóły w rozdziale 3.2.9). Dla wytypowanych struktur oszacowano, przy użyciu dedykowanego oprogramowania, wybrane parametry ADMET, aby pulę badanych cząsteczek ograniczyć wyłącznie

do charakteryzujących się korzystnymi właściwościami farmakokinetycznymi, a przy tym nie zawierających w swojej strukturze toksykoforów oraz elementów charakteryzujących związki zaliczane do grupy PAINS.

Wytypowane, potencjalne inhibitory CBR1 oraz AKR1C3 zostały zakupione i przekazane do badań *in vitro*. Pierwszym etapem było potwierdzenie hamowania aktywności celów biologicznych z wykorzystaniem rekombinowanych enzymów. Związki wykazujące najsilniejsze działanie hamujące względem CBR1/AKR1C3 przekazano do badań komórkowych, mających na celu sprawdzenie efektu łącznego podania nowych inhibitorów enzymatycznych i DNR na żywotność komórek linii A549 oraz porównanie go do efektu występującego po zastosowaniu DNR bez dodatku inhibitora.

W części badań dotyczącej sprawdzenia potencjału związku ASP9521 do bycia ligandem CBR1 i tego, czy jego łączne podanie z DNR może wpływać korzystnie na efekt przeciwnowotworowy leku, wykorzystano metody opisane powyżej. Schemat postępowania przedstawiono na **Rycinie 9**.



Ryc. 9: Schemat postępowania zastosowany przy analizie ASP9521 jako potencjalnego inhibitora CBR1 oraz oceny efektu cytotoksycznego po łącznym podaniu ASP9521 i DNR.

ASP9521 zadokowano do zoptymalizowanego we wcześniejszej części badań modelu CBR1. Po analizie otrzymanego sposobu wiązania i porównaniu go ze sposobem wiązania znanych ligandów, przeprowadzono symulację MD w celu określenia rodzaju i znaczenia potencjalnych interakcji obserwowanych między CBR1 a ASP9521. W oparciu o uzyskane wyniki (rozdziały 4.2.1 i 4.2.2) zakupiono

związek ASP9521 i przekazano go do badań *in vitro* – hamowania rekombinowanego enzymu oraz testów cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych linii A549. Oceniono efekt łącznego podania ASP9521 z DNR i porównywano go z efektem uzyskiwanym po użyciu wyłącznie DNR.

3.2 Badania *in silico*

3.2.1 Oprogramowanie wykorzystane w badaniach

Optymalizację trójwymiarowych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3, przeprowadzenie retrospektywnych skriningów, wraz z wyznaczeniem parametrów opisujących ich wyniki, jak również przeprowadzenie prospektywnych wirtualnych skriningów, mających na celu wytypowanie potencjalnych nowych inhibitorów CBR1 i AKR1C3, wykonano przy użyciu platformy Small-Molecule Drug Discovery (Schrödinger Inc.), z wykorzystaniem interfejsu graficznego Maestro 2018-4 (wersja 11.8.012). Najbardziej prawdopodobny stan jonizacji związków używanych w dokowaniach oraz symulacjach MD, przewidziany wcześniej przy pomocy oprogramowania Schrödinger, potwierdzano dodatkowo za pomocą programu MarvinSketch 19.4 (ChemAxon, chemaxon.com).

Symulacje MD, analizę uzyskiwanych w symulacjach MD oddziaływań cel-ligand, jak również analizę zmian położenia enzymu i liganda w trakcie trwania symulacji, przeprowadzono w programie Desmond (D. E. Shaw Research oraz Schrödinger Inc.), z wykorzystaniem interfejsu graficznego Maestro.

W celu opracowania modelu farmakoforowego inhibitorów AKR1C3 oraz wykonania wstępnego skriningu, w oparciu o zbudowany model farmakoforowy, wykorzystano oprogramowanie LigandScout 4.4.7 (Inte:Ligand Inc.).

Predykcję parametrów ADMET oraz możliwych ścieżek metabolizmu wytypowanych w prospektywnych skriningach związków przeprowadzono przy pomocy oprogramowania ADMET Predictor 9.5 (Simulations Plus, Inc.). Do oszacowania wybranych parametrów wykorzystano także internetową platformę predykcyjną SwissADME (swissadme.ch).

3.2.2 Procedura wstępnego przygotowywania struktur krystalicznych i związków chemicznych do użycia w pakiecie oprogramowania Schrödinger

Wykorzystane w badaniach *in silico* struktury krystaliczne CBR1 i AKR1C3 pochodziły z bazy Protein Data Bank (rcsb.org). W celu ich wstępnego przygotowania użyto modułu Protein Preparation Wizard (Schrödinger Inc.) [114]. Wykorzystanie programu umożliwiło usunięcie nadmiarowych monomerów enzymów (w przypadku kryształów uzyskanych w postaci dwóch lub więcej monomerów), sprawdzenie prawidłowości przypisania atomów, dodanie brakujących atomów wodoru, optymalizację sieci wewnątrzbiałkowych wiązań wodorowych oraz minimalizację energii układu, przy użyciu pola siłowego OPLS3e. Podczas przygotowywania struktur usunięto pozostałe po procesie krystalizacji cząsteczki substancji wspomagających ten proces (glicerol, glikol polietylenowy, jony siarczanowe i chlorkowe) oraz cząsteczki wody. Pozostawiono natomiast wykorzystane w krystalizacji ligandy CBR1/AKR1C3, cząsteczki kofaktora NAD(P)⁺/NAD(P)H oraz cząsteczki GSH (w kryształach 3BHJ – jedynej wykorzystywanej w badaniach strukturalnych, w której występował GSH).

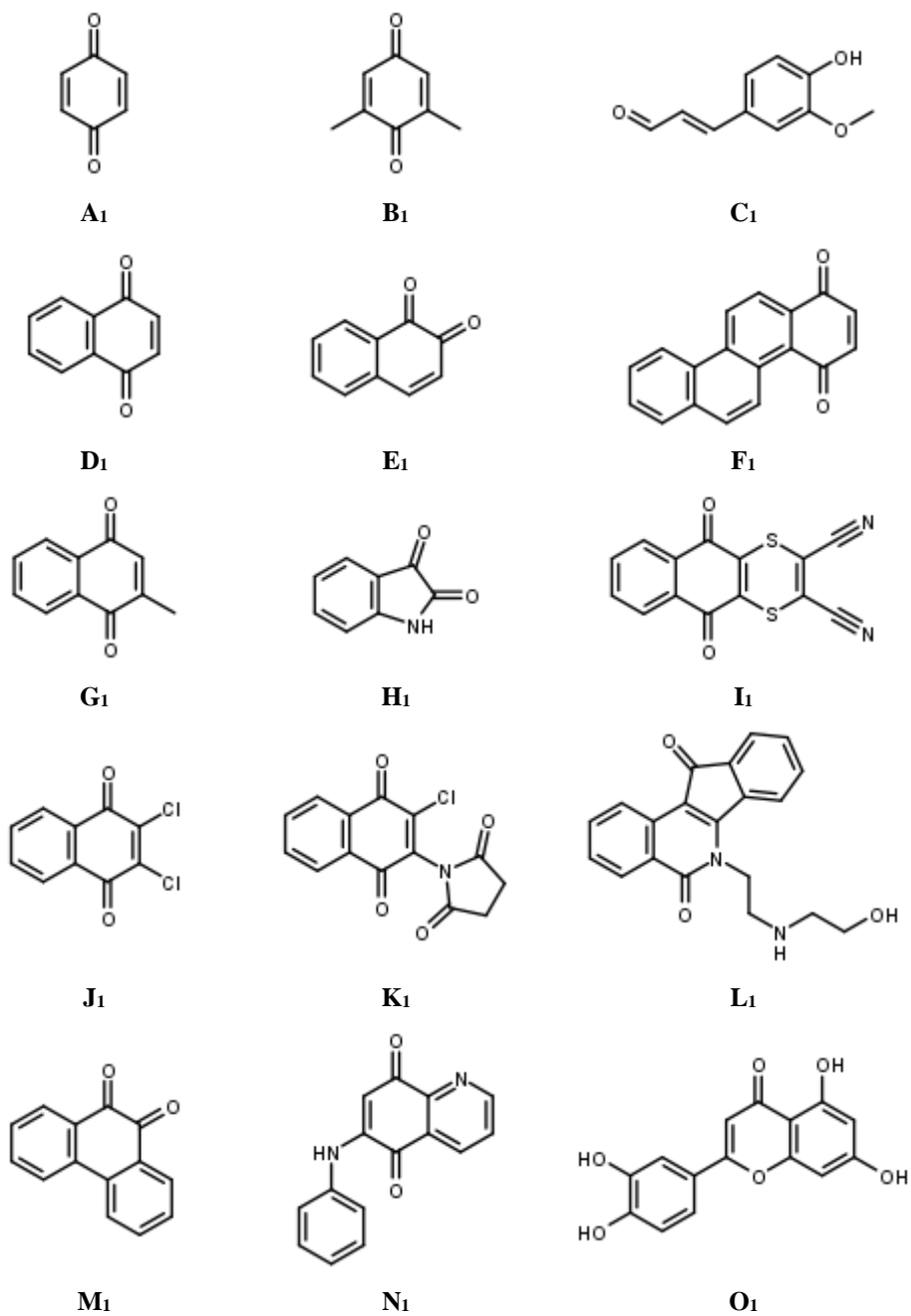
Struktury związków chemicznych, wykorzystywanych w dokowaniach, IFD, symulacjach MD oraz skryningach zostały narysowane w formie dwuwymiarowej z wykorzystaniem interfejsu Maestro, bądź zapisane w formacie SMILES, a następnie zaimportowane do programu. Wykorzystując moduł LigPrep (Schrödinger Inc.), były one przekształcane w przestrzennie zoptymalizowane formy trójwymiarowe – nadawano im najkorzystniejsze energetycznie konformacje oraz określano najbardziej prawdopodobne stany jonizacji, występujące w zakresie pH $7,4 \pm 0,2$. Przewidywane stany jonizacji były dodatkowo potwierdzane w programie MarvinSketch (z wyjątkiem fałszywych ligandów wygenerowanych na potrzeby retrospektywnych wirtualnych skryningów oraz liczącej około 3 miliony struktur biblioteki związków chemicznych użytych w prospektywnych wirtualnych skryningach).

3.2.3 Wybór struktur krystalicznych i ligandów do optymalizacji CBR1 i AKR1C3

3.2.3.1 Struktury krystaliczne i ligandy wykorzystane w poszukiwaniach nowych inhibitorów CBR1

Do optymalizacji wykorzystano struktury krystaliczne **1WMA** (wykryształizowany z hydroxy-PP, bez GSH) oraz **3BHJ** (wykryształizowany z hydroxy-PP oraz GSH). Struktura 1WMA jest jedną z najczęściej wykorzystywanych w badaniach analizujących sposób oddziaływania CBR1 z jego ligandami. Charakteryzuje się ona dobrą rozdzielczością (1.24 Å), brakiem luk w sekwencji aminokwasowej, a dodatkowo została wykryształizowana razem z silnym, ortosterycznym inhibitorem CBR1 (obecność liganda w centrum aktywnym CBR1 i AKR1C3 ułatwia czynności związane z właściwym przygotowaniem i przeprowadzeniem IFD) [49]. Natomiast struktura 3BHJ, wykryształizowana wraz z GSH, wykazuje ułożenie dodatkowego kofaktora w sposób umożliwiający swobodne umieszczenie w centrum aktywnym enzymu jego znanego lub potencjalnego liganda [45]. Dodatkowym atutem tej struktury jest to, że w jej centrum aktywnym, poza GSH, znajduje się także hydroxy-PP, czyli ten sam ligand, który stanowi element struktury 1WMA.

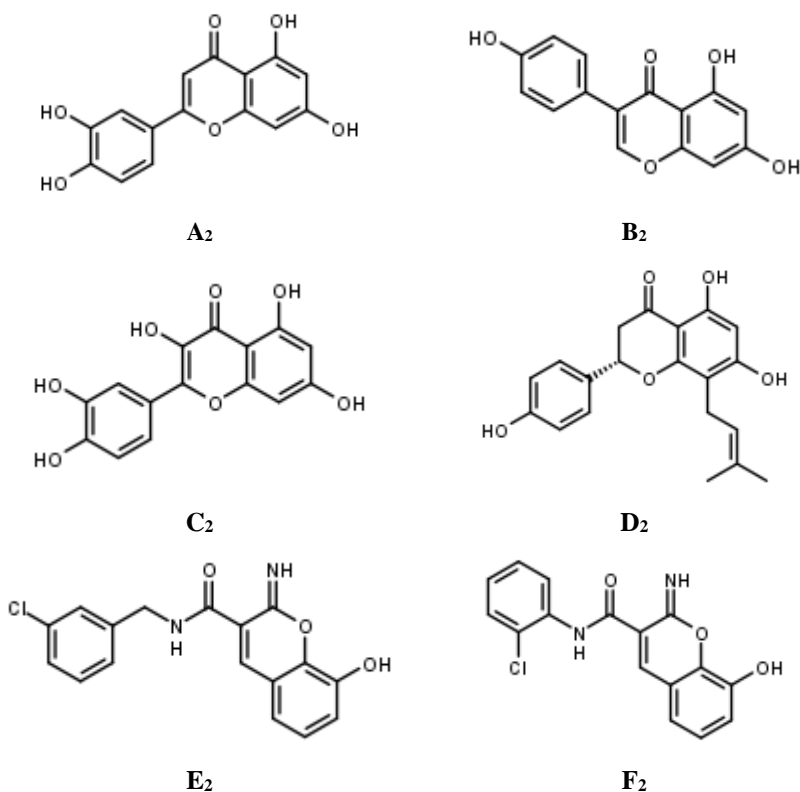
Obecność w obrębie centrum aktywnego CBR1 GSH powoduje zmniejszenie przestrzeni dostępnej dla ortosterycznych ligandów enzymu. Wobec tego, do optymalizacji struktur krystalicznych wybrano 14 małowcząsteczkowych substratów CBR1 oraz posiadającą bardziej rozbudowaną strukturę luteolinę, jako jeden z najsilniejszych znanych inhibitorów enzymu. Większość z wybranych substratów posiadała co najmniej 1 układ aromatyczny, który jest korzystny z punktu widzenia powinowactwa ligandów do CBR1. Aktywność małowcząsteczkowych substratów CBR1, wytypowanych do wykorzystania w optymalizacji centrów aktywnych kryształów, opisano szczegółowo w artykule Pilka i wsp [44]. W wyborze uwzględniono przede wszystkim te ligandy CBR1, które odznaczały się wysoką selektywnością w porównaniu z pokrewnym enzymem – CBR3. Struktury omawianych ligandów przedstawiono na **Rycinie 10**.

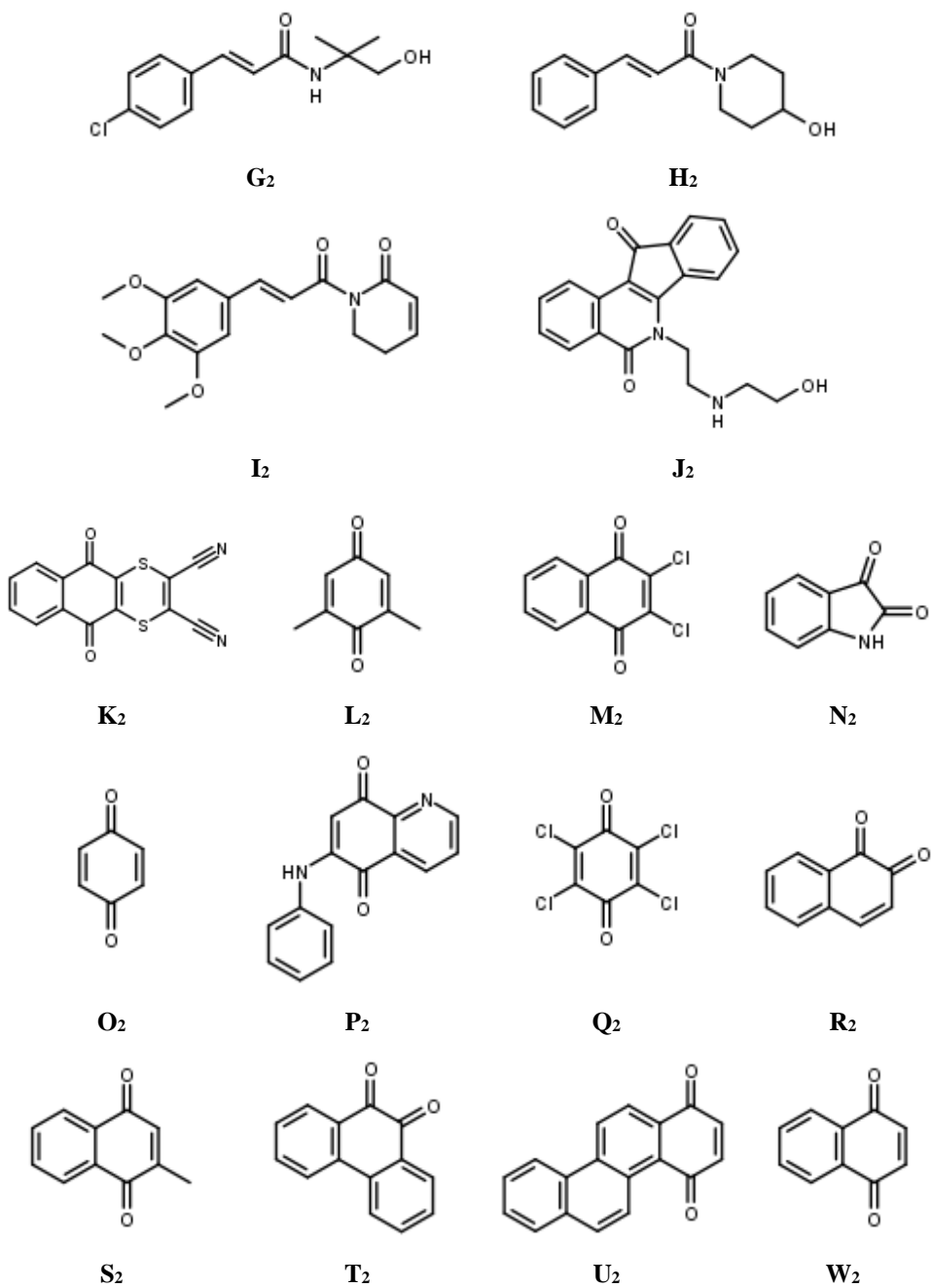


Ryc. 10: Poszukiwanie nowych inhibitorów CBR1: ligandy narzędziowe wykorzystane do optymalizacji budowy centrum aktywnego enzymu w kryształach 1WMA i 3BHJ.

3.2.3.2 Struktury krystaliczne i ligandy wykorzystane w poszukiwaniach dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3

W wyborze struktur krystalicznych białek oraz ligandów CBR1 do poszukiwania dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, uwzględniono obserwacje i wyniki wcześniejszych badań, których celem było znalezienie nowych inhibitorów CBR1 (rozdział 4.1) oraz badań potencjału hamowania CBR1 przez związek ASP9521 (rozdział 4.2). Przeprowadzono ponowną optymalizację CBR1, wykorzystując tym razem, poza małowcząsteczkowymi substratami, także ligandy o bardziej rozbudowanych strukturach: wybrane pochodne flawonoidowe, pochodne 8-hydroksy-2-iminochromenu, pochodne amidu kwasu cynamonowego oraz piperlonguminę. Z puli ligandów narzędziowych usunięto te, które nie sprawdziły się w IFD jako związki umożliwiające skuteczną optymalizację położenia aminokwasów w obrębie centrum aktywnego CBR1 (więcej informacji w rozdziałach 4.1.1 i 4.1.2). W celu przeprowadzenia optymalizacji centrum aktywnego CBR1 wykorzystano w sumie 22 ligandy narzędziowe. Ich struktury przedstawiono na **Rycinie 11**.

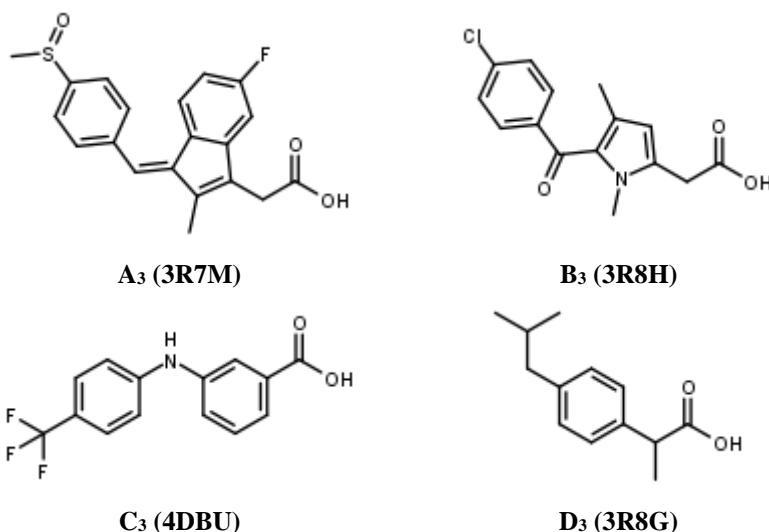




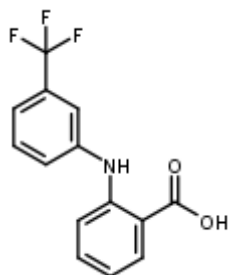
Ryc. 11: Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3: ligandy narzędziowe wykorzystane do optymalizacji przestrzennej centrum aktywnego wybranych kryształów CBR1.

Strukturami krystalicznymi CBR1 użytymi w tej części badań były: wykorzystany już wcześniej kryształ **1WMA** oraz **2PFG**. Drugi z wymienionych kryształów jest jedynym, obok 1WMA, w którego centrum aktywnym znajduje się ligand enzymu, przy jednoczesnym braku cząsteczki GSH [50].

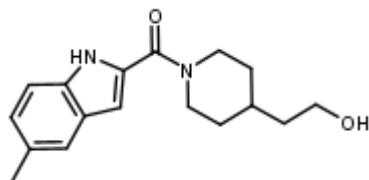
W wyniku selekcji dostępnych struktur krystalicznych AKR1C3, do zadań badawczych wytypowano ostatecznie 5 struktur o wysokiej jakości i zróżnicowanych ligandach wykorzystanych w procesie krystalizacji: **1S2A**, **1S2C** (w centrum aktywnym przedstawiciele leków z grupy NLPZ), **4ZFC** (w centrum aktywnym gliklazyd), **6F78** (w centrum aktywnym pochodna benzizoksazolu) i **7C7G** (w centrum aktywnym pochodna chromenu) [62], [72], [115], [116]. Z uwagi na znaczną liczbę znanych ligandów AKR1C3, pulę związków przeznaczonych do optymalizacji centrum aktywnego ograniczono do tych, które są obecne w dostępnych kryształach AKR1C3, a zatem znany jest ich sposób wiązania z analizowanym celem biologicznym. Wśród wytypowanych ligandów znaleźli się między innymi wybrani przedstawiciele leków z grupy NLPZ oraz związki zbudowane na bazie indolu (zbliżone do ASP9521). Ich struktury przedstawiono na **Rycinie 12**.



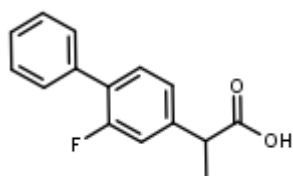
Ryc. 12: Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3: ligandy narzędziowe wykorzystane do przestrzennej optymalizacji centrum aktywnego wybranych kryształów AKR1C3. W nawiasach oznaczenia struktur krystalicznych AKR1C3, w których razem z enzymem wykrystalizowano wskazane ligandy.



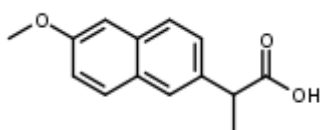
E₃ (1S2C)



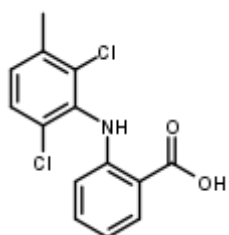
F₃ (4WDX)



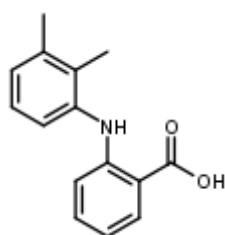
G₃ (3R94)



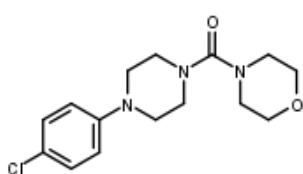
H₃ (3R58)



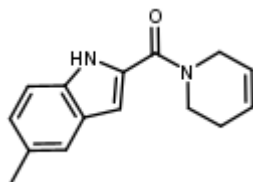
I₃ (3R6I)



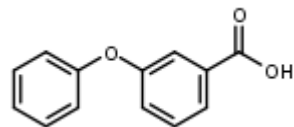
J₃ (3R43)



K₃ (4HMN)



L₃ (4WDW)



M₃ (3UWE)

Ryc. 12 c.d.: Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3: ligandy narzędziowe wykorzystane do przestrzennej optymalizacji centrów aktywnych wybranych kryształów AKR1C3. W nawiasach oznaczenia struktur krystalicznych AKR1C3, w których razem z enzymem wykrystalizowano wskazane ligandy.

3.2.4 Optymalizacja centrów aktywnych CBR1 i AKR1C3 metodą Induced-Fit docking

W procesach optymalizacji konformacyjnej położenia reszt aminokwasowych centrów aktywnych CBR1 i AKR1C3 wykorzystano metodę IFD obejmującą cztery etapy [101]:

1. wstępne dokowanie liganda do wskazanego fragmentu celu biologicznego, mogącego być określonym zarówno na podstawie lokalizacji oryginalnie wykrywanego liganda, jak również poprzez wskazanie reszt aminokwasowych, w pobliżu których ligand ma zostać zadokowany; dokowanie może być przeprowadzone bez wskazywania reszt aminokwasowych, które powinny nawiązać oddziaływanie z ligandem, ale może być także zmodyfikowane o ustawienie tzw. więzów farmakoforowych (ang. *constraints*) z resztą lub resztami aminokwasowymi istotnymi z punktu widzenia uzyskania/odtworzenia prawidłowego sposobu wiązania cel-ligand; dokowanie w tym etapie IFD jest przeprowadzane przy użyciu programu Glide,
2. przewidywanie najbardziej korzystnych energetycznie konformacji łańcuchów bocznych aminokwasów będących w określonej odległości od zadokowanego liganda (w podstawowych ustawieniach skryptu jest to 5 Å, jako optymalna odległość dla detekcji wszystkich istotnych oddziaływań cel-ligand, w tym wiązań wodorowych i oddziaływań aromatycznych) oraz dodatkowa minimalizacja przewidzianej konformacji, uwzględniając przestrzenne ułożenie zadokowanego w 1 etapie liganda; w tym etapie wykorzystywany jest program Prime Refinement, umożliwiający predykcję i optymalizację struktur przestrzennych białek [117],
3. redokowanie liganda do otrzymanego w etapie 2 modelu konformacyjnego celu biologicznego,
4. oszacowanie energii wiązania cel-ligand dla nowego modelu konformacyjnego, przy użyciu funkcji IFDScore (kcal/mol).

W opisany sposób przeprowadzono zarówno optymalizację struktur CBR1, jak i AKR1C3. Przestrzeń (ang. *box*), w obrębie której wykonano wstępne dokowanie ligandów narzędziowych (etap 1), wyznaczono na podstawie położenia wykrytych ligandów enzymów. We wstępnych dokowaniach zastosowano dodatkowo więzy farmakoforowe, które w przypadku poszukiwania nowych inhibitorów CBR1 zostały ustawione na reszcie Ser139. Natomiast w optymalizacji struktur krystalicznych, mających posłużyć w poszukiwaniach dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, dla każdego z kryształów przeprowadzono po 2 powtórzenia IFD. W każdym z nich ustawiono więzy farmakoforowe na innej, wchodzącej w skład tetrady katalitycznej, reszcie aminokwasowej: dla CBR1 były to Ser139 i Tyr193; dla AKR1C3 były to Tyr55 i His117. W wyniku użycia IFD, dla każdego użytego liganda generowano maksymalnie 20 nowych modeli konformacyjnych.

Uzyskane w wyniku IFD nowe modele konformacyjne CBR1 i AKR1C3 zostały poddane ocenie jakościowej pod kątem poprawności ułożenia liganda w centrum aktywnym oraz uzyskanego sposobu oddziaływania cel-ligand. W przypadku ligandów CBR1, ocenę oparto na danych literaturowych oraz mechanizmie działania enzymu (grupa karbonylowa liganda usytuowana w pobliżu reszt Ser139 i Tyr193, tworząca z nimi wiązania wodorowe), natomiast dla nowych modeli AKR1C3 porównywano otrzymane ułożenie liganda w centrum aktywnym z tym, które uzyskano wcześniej w wyniku krystalizacji AKR1C3 (**Rycina 12**; w nawiasach podano kody kryształów z bazy PDB, w których wraz z białkiem wykrytych ligandów). W przypadku tego enzymu kluczowym było położenie grupy ketonowej/amidowej/karboksyłowej ligandów w pobliżu reszt aminokwasowych Tyr55 i His117 oraz obecność wiązań wodorowych z wymienionymi resztami.

3.2.5 Procedura dokowania w programie Glide

Program Glide (Schrödinger Inc) został wykorzystany w celu przeprowadzenia dokowań w ramach: retrospektywnych wirtualnych skriningów, dokowań poprzedzających symulacje MD oraz prospektywnych wirtualnych skriningów, wraz z redokowaniem wytypowanych w ich wyniku związków [118].

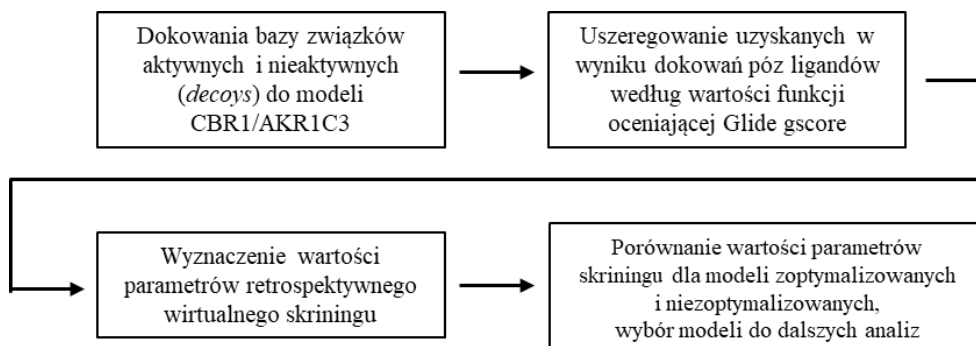
Przed przystąpieniem do właściwego dokowania, przygotowano pliki (*grids*) zawierające informację o strukturze celu biologicznego, określające przestrzeń, w obrębie której miały zostać zadokowane ligandy/biblioteki związków. Przyjęto analogiczny sposób postępowania jak w przypadku IFD – przestrzeń dokowania ustawiono w oparciu o położenie liganda w uzyskanym w wyniku IFD kompleksie cel-ligand, a następnie ustawiono więzy farmakoforowe na tej samej reszcie aminokwasowej, na której został on wcześniej ustawiony w IFD.

Dokowanie w programie Glide wykonywano z uwzględnieniem swobody konformacyjnej ligandów, poszukując konformacji odpowiadających lokalnemu minimum energetycznemu, umożliwiającym odpowiednie ułożenie ligandów oraz nawiązanie oddziaływań z istotnymi resztami aminokwasowymi CBR1/AKR1C3. Dokowania przeprowadzono przy użyciu algorytmu Glide SP (ang. *standard precision*), wykorzystującego tzw. standardową precyzję próbkowania konformacyjnego ligandów. W wyniku dokowań uzyskiwano ustaloną przed dokowaniem ilość póż, czyli przestrzennych ułożeń liganda w obrębie centrum aktywnego. W wirtualnych skринingach (zarówno retrospektywnych, jak i prospektywnych) wynikiem dokowań była jedna, najkorzystniejsza energetycznie, poza każdego liganda, natomiast w wyniku redokowań oraz dokowań poprzedzających symulacje MD, uzyskiwano po 5 póż, co było wystarczającą ilością kompleksów do oceny jakościowej uwzględniającej powtarzalność sposobu wiązania oraz występowanie wymaganych oddziaływań cel-ligand.

3.2.6 Retrospektywny wirtualny skринing modeli CBR1 i AKR1C3

Przeprowadzona optymalizacja położenia reszt aminokwasowych centrów aktywnych CBR1 i AKR1C3 miała na celu poprawę zdolności modeli do rozpoznawania ligandów enzymów. Aby ocenić powyższe cechy każdego modelu, który przeszedł wstępną selekcję, wykorzystano retrospektywny wirtualny skринing. Metoda ta polega na zadokowaniu do badanego modelu puli (bazy) związków, składającej się zarówno ze związków aktywnych, jak i wielokrotnie większej liczby związków nieaktywnych (lub potencjalnie nieaktywnych), a następnie analizę wyników dokowania w oparciu np. o wartości funkcji oceniającej Glide gscore [102].

W przypadku hipotetycznego idealnego modelu, wszystkie związki o potwierdzonej aktywności miałyby korzystniejsze wartości ocenianych parametrów, w porównaniu z nieaktywnymi. Im więcej związków nieaktywnych zaklasyfikowanych przed związkami aktywnymi, tym mniejsza użyteczność ocenianego modelu. Sposób postępowania zastosowany w ocenie otrzymanych modeli CBR1 i AKR1C3 przedstawiono na **Rycinie 13**.



Ryc. 13: Schemat postępowania zastosowany przy przeprowadzeniu i analizie retrospektywnego wirtualnego skriningu jako metody oceniającej jakość nowych modeli CBR1 i AKR1C3.

Do wygenerowania puli potencjalnie nieaktywnych związków (fałszywe ligandy, *decoys*) wobec CBR1/AKR1C3 wykorzystano internetowy serwis DUD-E (dude.docking.org) [119]. Na podstawie struktur związków aktywnych, zapisanych w formacie SMILES, została wygenerowana pula fałszywych ligandów, cechujących się zbliżonymi właściwościami fizykochemicznymi, ale na tyle odmienną strukturą, aby (w założeniu twórców serwisu) utracić możliwość wiązania się z danym celem biologicznym. Dla każdego liganda zostało wygenerowanych 50 fałszywych ligandów.

W części badań dotyczącej poszukiwania nowych inhibitorów CBR1, 4 spośród 15 ligandów użytych w IFD nie zostały wykorzystane przy wygenerowaniu puli fałszywych ligandów, a następnie w retrospektywnym wirtualnym skriningu, z uwagi na ich niską użyteczność w procesie optymalizacji CBR1 (szczegółowo w rozdziale 4.1.1). Natomiast w części pracy dotyczącej poszukiwania dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, do stworzenia puli fałszywych ligandów używanych

w retrospektywnych wirtualnych skriningach zostały wykorzystane wszystkie ligandy użyte wcześniej w procesie optymalizacji centrów aktywnych przy pomocy IFD. Po wygenerowaniu puli fałszywych ligandów, wszystkie związki zostały zoptymalizowane przy pomocy programu LigPrep, a następnie zadokowane do badanych modeli. Tą samą pulę związków zadokowano także do nieoptymalizowanych modeli, aby móc porównać, w jakim stopniu przeprowadzona optymalizacja wpłynęła na poprawę stopnia rozpoznawania przez modele ligandów CBR1/AKR1C3. Skринingi przeprowadzono z aktywowanymi więzami farmakoforowymi (*constraints*), które zostały opisane w rozdziale poświęconym IFD. W badaniach poświęconych poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1, dla najlepszych modeli powtórzono skринingi bez aktywnych więzów farmakoforowych.

Po wykonaniu retrospektywnych wirtualnych skriningów, zadokowane związki uszeregowano według wartości funkcji oceniającej Glide gscore, zaczynając od wartości najbardziej ujemnych, wskazujących na korzystniejszy charakter uzyskanej pozy (wartość funkcji oznacza przewidywaną energię kompleksu cel-ligand, a im niższa wartość energii, tym potencjalnie lepsza trwałość uzyskanego kompleksu). Do oceny każdego z badanych modeli CBR1 i AKR1C3 wykorzystano szereg parametrów, których wyznaczenie było możliwe dzięki oprogramowaniu Schrödinger (narzędzie Enrichment Calculator) [118]:

1. W oparciu o wartość funkcji Glide gscore wykreślono wykresy wzbogacenia bazy, będące graficzną prezentacją skuteczności odnajdywania przez model związków aktywnych (oś y) w danym procencie puli wszystkich zadokowanych związków (oś x). Na podstawie tych wykresów określono parametr **ROC** (ang. *Receiver Operator Characteristic area under the curve*), czyli pole pod uzyskaną krzywą. Wartość ROC przyjmowała zakres 0-1, gdzie 1 oznaczało idealne dopasowanie, a wartość 0,5 opisywała model rozpoznający związki aktywne i nieaktywne w sposób zbliżony do losowego;
2. **BEDROC** (ang. *Boltzmann-Enhanced Discrimination of Receiver-Operating Characteristic*) – parametr określany jako ważona wersja wartości ROC, przykładający większą wagę do wyników rejestrowanych

w początkowych fragmentach uszeregowanej bazy; przyjmuje wartości między 0-1, przy czym im wyższa jego wartość, tym dany model lepiej rozpoznaje związki aktywne, klasyfikując je przed fałszywymi ligandami; waga promowania znalezionych związków aktywnych w początkowych fragmentach bazy jest określana poprzez ustalenie tzw. współczynnika α ; na potrzeby przeprowadzonych analiz przyjęto wartość $\alpha = 20$, co odpowiada pierwszym 8% wyników skriningu;

3. **Współczynnik wzbogacenia bazy** (ang. *enrichment factor*, EF) – współczynnik będący miarą przyrostu liczby odnalezionych związków aktywnych w danym segmencie bazy, uszeregowanej po wartości funkcji oceniającej, w stosunku do rozkładu losowego; na potrzeby przeprowadzonych badań określano wartość współczynnika dla pierwszych 1%, 5% i 10% bazy;
4. **Współczynnik Eff** – pochodna współczynników EF i BEDROC, określająca kolejność występowania w wynikach retrospektywnego skriningu związków aktywnych i nieaktywnych, przyjmująca wartości od -1 do 1, przy czym -1 oznacza, że wszystkie związki nieaktywne były uszeregowane w wynikach skriningu przed aktywnymi, wartość 1 oznacza, że wszystkie związki aktywne były uszeregowane przed nieaktywnymi, zaś 0 gdy obie grupy związków zostały „wymieszane” w równych proporcjach; podobnie jak przy współczynniku EF, Eff określa się dla pewnego przedziału bazy. W niniejszych badaniach określano wartość parametru dla 1%, 5% i 10% bazy;
5. Dodatkowym parametrem liczbowym opisującym jakość analizowanych modeli był **Act**, czyli procent związków aktywnych znalezionych przez model w określonym przedziale bazy (określono dla 1%, 5% i 10% bazy);

Wartości opisanych parametrów określono dla każdego z modeli, który pozytywnie przeszedł weryfikację po IFD, jak również dla nieoptymalizowanych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3. Do kolejnego etapu oceny nowych modeli enzymów wybrano te, dla których wszystkie wymienione parametry miały korzystniejsze wartości niż wyznaczone dla nieoptymalizowanych struktur.

3.2.7 Przygotowanie, przeprowadzenie i analiza symulacji dynamiki molekularnej kompleksów CBR1/AKR1C3

Modele CBR1 i AKR1C3, których parametry retrospektywnego wirtualnego skriningu były korzystniejsze w porównaniu do parametrów modeli nieoptymalizowanych, zostały poddane dodatkowym analizom przy użyciu symulacji MD, wykonanych w programie Desmond [120]. W pierwszym etapie, do wybranych modeli zadokowano (bądź redokowano) ich ligandy, którymi były odpowiednio związki hydroxy-PP i WDW. Otrzymane kompleksy enzym-ligand poddano przygotowaniu do przeprowadzenia MD. W tym celu użyto modułu System Builder (Schrödinger Inc.). Odpowiednie środowisko symulacji stworzono poprzez umieszczenie kompleksów enzym-ligand w przestrzeni o kształcie sześcianu, którego brzegi znajdowały się w odległości 10 Å od najbardziej wysuniętych fragmentów kompleksu. Do wypełniania ustalonej przestrzeni rozpuszczalnikiem wykorzystano model wodny TIP4P. Aby w pełni zasymulować środowisko fizjologiczne, do przestrzeni dodano także jony sodu i chloru w stężeniu 0,15 M.

Przygotowane w ten sposób systemy były poddawane symulacjom MD z wykorzystaniem pola siłowego OPLS3e. Czas trwania symulacji ustawiono na 20 ns w przypadku modeli optymalizowanych w celu poszukiwania nowych inhibitorów CBR1 oraz 50 ns dla modeli używanych w poszukiwaniu dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3. Poddawane analizie modele AKR1C3 i CBR1 (otrzymane na bazie struktur krystalicznych 1WMA i 2PFG) wykazywały znaczną stabilność w 20-nanosekundowych symulacjach. Wobec tego, aby dostrzec istotne różnice w stabilności między kompleksami, wydłużono symulacje do 50 ns. (szczegółowe wyniki opisano w rozdziale 4.3.3). Taki sam sposób postępowania przy przygotowaniu i przeprowadzeniu MD zastosowano dla związku ASP9521 i symulacji jego zachowania w centrum aktywnym CBR1 (symulacja o długości 20 ns). Dla każdej symulacji ustawiono interwał zapisu klatki (ang. *trajectory interval*) na 10 ps. Oznaczało to, że oprogramowanie miało zapisywać bieżący stan kompleksu cel-ligand w odstępach czasowych co 10 ps. Wynikiem symulacji były pozy (klatki) kompleksów cel-ligand, uchwycone w kolejnych punktach czasowych.

W przypadku symulacji 20 ns uzyskiwano serię 2000 klatek, natomiast przy symulacjach 50 ns liczba klatek wynosiła 5000.

Otrzymane w wyniku MD serie klatek, z uchwyconymi stanami przejściowymi, posłużyły do analiz rodzaju i czasu trwania interakcji cel-ligand. W tym celu wykorzystano narzędzie Simulation Interactions Diagram, pozwalające na podsumowanie występowania takich oddziaływań, jak wiązania wodorowe, wiązania jonowe, oddziaływania aromatyczne (z wyszczególnieniem oddziaływań π - π , kation- π oraz innych (niespecyficznych) oddziaływań hydrofobowych), a także mostki solne. Z kolei narzędzie Simulation Event Analysis zostało wykorzystane do opracowywania danych na temat odległości między kluczowymi resztami aminokwasowymi centrów aktywnych CBR1/AKR1C3, a wybranymi elementami ligandów.

3.2.8 Przygotowanie i walidacja modelu farmakoforowego inhibitorów AKR1C3

Model farmakoforowy inhibitorów AKR1C3 został opracowany jako element umożliwiający przeprowadzenie pierwszego etapu prospektywnego wirtualnego skriningu w celu poszukiwania dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3.

Do zbudowania i walidacji modelu użyto program LigandScout [121]. Wykorzystano kompleks najlepiej oceniony w retrospektywnym wirtualnym skriningu i symulacji MD. Dzięki oprogramowaniu LigandScout został wygenerowany model, który wyznaczył szereg cech strukturalnych, mających istotne znaczenie dla powinowactwa związku do AKR1C3. Dodatkowo, na podstawie znanego sposobu wiązania ligandów AKR1C3 w obrębie centrum aktywnego enzymu, wskazano w uzyskanym modelu to, które elementy są kluczowe dla utrzymania powinowactwa, a które są istotne, ale ich obecność nie jest niezbędna (zaznaczone w modelu jako opcjonalne). Każda z cech farmakoforowych została ukazana jako sfera o określonym promieniu, w którym powinien znajdować się dany fragment liganda. W ramach optymalizacji modelu dokonywano modyfikacji promieni wskazanych cech i sprawdzano, jak wprowadzane zmiany wpływają na skuteczność rozpoznawania przez model inhibitorów AKR1C3.

W celu sprawdzenia jakości kolejnych modyfikacji modelu farmakoforowego wykorzystano związki aktywne i nieaktywne opisane w rozdziałach 3.2.3.2 i 3.2.6. W oparciu o dwuwymiarowe struktury, program LigandScout wygenerował dla każdego z nich po maksymalnie 4000 konformacji, które w kolejnym etapie były dopasowywane do testowanych modyfikacji modelu. Jakość każdego z nich oceniano porównując liczbę ligandów oraz fałszywych ligandów, które wpasowywały się w analizowany model farmakoforowy. W przypadku idealnego modelu zostałyby rozpoznane wszystkie użyte ligandy (13). Celem optymalizacji modelu farmakoforowego AKR1C3 było to, aby mógł on rozpoznawać możliwie jak największą liczbę znanych ligandów, przy jak najmniejszym odsetku fałszywych ligandów rozpoznawanych błędnie jako związki aktywne.

W oparciu o opisane powyżej kroki, podjęto także próbę stworzenia skutecznego modelu farmakoforowego dla inhibitorów CBR1, jednak z uwagi na niewielkie rozmiary większości ligandów enzymu nie uzyskano satysfakcjonujących wyników – modele opracowywane na bazie hydroxy-PP nie były w stanie rozpoznać dostatecznej liczby ligandów, a jednocześnie rozpoznawały błędnie znaczny odsetek fałszywych ligandów. W związku z tym, dbając o jakość uzyskiwanych wyników, nie skorzystano z modelu farmakoforowego CBR1, a dalsze postępowanie badawcze oparto jedynie o opracowany model AKR1C3.

3.2.9 Prospektywny wirtualny skrining bazy związków chemicznych na wybranych modelach CBR1 i AKR1C3

Do stworzenia biblioteki związków użytych w prospektywnych skriningach wykorzystano bazę ZINC (zinc.docking.org; wersja 15), gromadzącą informacje o milionach komercyjnie dostępnych związków chemicznych. Na potrzeby przeprowadzanych badań pobrano, w formacie SMILES, fragment bazy, w skład której wchodziły związki dostępne do kupienia „od zaraz” (*in-stock*). Bibliotekę zawężono do związków oznaczonych jako *lead-like* (o właściwościach, które w procesie odkrywania leków spełniają struktury wiodące). Zastosowano następujące kryteria: logP -1 - 3,5; masa cząsteczkowa < 350 g/mol. Oba kryteria spełniało około

2,1 miliona związków. Mając na uwadze to, że zarówno wśród ligandów CBR1, jak i AKR1C3, znajdują się bardziej rozbudowane związki (m.in. ANT i inne ksenobiotyki), bazę do prospektywnych skriningów poszerzono o związki mające masę cząsteczkową między 350 a 375 g/mol (przy zachowaniu logP między -1 - 3,5; łącznie około 655 tysięcy związków). Tak skomponowana baza skriningowa liczyła w sumie ponad 2,7 miliona struktur.

Zarówno w poszukiwaniach nowych inhibitorów CBR1, jak i dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, przeprowadzono po 2 skriningi. W obu częściach zastosowano jednak nieco inne podejście przy wstępnym zawężeniu biblioteki skriningowej:

Prospektywny wirtualny skrining w poszukiwaniach inhibitorów CBR1

Struktury zgromadzone w bibliotece skriningowej zostały przestrzennie zoptymalizowane przy użyciu programu LigPrep, jak opisano w rozdziale 3.2.2. Na tym etapie program ten został także wykorzystany do zawężenia biblioteki. W oparciu o informacje wynikające ze struktur znanych ligandów (w tym inhibitorów) CBR1, pozostawiono w bibliotece wyłącznie związki posiadające co najmniej jeden układ aromatyczny oraz co najmniej jeden akceptor wiązania wodorowego (HBA). Zoptymalizowane związki zostały następnie zadokowane, przy użyciu programu Glide, do wcześniej wybranych dwóch modeli CBR1: bez cząsteczki GSH w centrum aktywnym (na bazie kryształu 1WMA) oraz z obecną cząsteczką GSH (na bazie kryształu 3BHJ). Pozy uzyskane po zadokowaniu związków uszeregowano według wartości funkcji oceniającej glide gscore, tak samo jak miało to miejsce w retrospektywnych wirtualnych skriningach.

Po przeprowadzeniu obu skriningów poddano analizie po 5000 najlepiej ocenionych związków. Celem takiego postępowania było znalezienie związków, które znalazły się wśród najlepiej ocenionych wyników zarówno w modelu z GSH, jak i bez niego, co stanowiłoby podstawę do rozpatrywania ich jako potencjalnie uniwersalne ligandy CBR1, bez względu na obecność w centrum aktywnym dodatkowego kofaktora. Po odnalezieniu takich związków zostały one poddane analizie sposobu wiązania z CBR1 oraz spójności sposobu wiązania w modelach

z GSH i bez niego. Przeprowadzono dla nich także powtórne dokowania, w celu sprawdzenia powtarzalności uzyskanego sposobu wiązania.

Prospektywny wirtualny skrining w poszukiwaniach dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3

Prospektywny wirtualny skrining w tej części badań składał się z dwóch etapów. Z uwagi na doświadczenia skriningów przeprowadzonych wcześniej na modelach CBR1, które pochłaniały znaczącą ilość czasu i mocy obliczeniowych (czas przeprowadzenia jednego skriningu wynosił około miesiąca), postanowiono zastosować wstępny skrining w oparciu o budowę liganda, który umożliwiałby przesianie bazy skriningowej i pozostawienie do „właściwego” prospektywnego skriningu jedynie takich związków, które wykazują przynajmniej podstawowe podobieństwo strukturalne do ligandów jednego z opisywanych celów biologicznych (w tym przypadku do AKR1C3). W pierwszym etapie wykorzystano oprogramowanie LigandScout i opisany w rozdziale 3.2.8 model farmakoforowy zbudowany na bazie związku WDW. Bibliotekę skriningową, składającą się z ponad 2,7 miliona związków, zaimportowano do graficznego interfejsu programu, a następnie wygenerowano pulę konformerów dla każdego z nich, tak jak opisano w rozdziale 3.2.8. Przygotowaną bazę przeanalizowano pod kątem dopasowania do farmakoforu AKR1C3. W wyniku dokowania uzyskano pulę zawężoną do związków, które spełniały wstępne założenia strukturalne inhibitorów AKR1C3.

Zawężona biblioteka skriningowa (zapisana w formacie SMILES) została przygotowana do właściwego skriningu w programach pakietu Schrödinger. Związki zostały zoptymalizowane (tym razem w programie LigPrep nie zastosowano już dodatkowego filtra strukturalnego opisanego przy poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1), a następnie zadokowane do zoptymalizowanych modeli CBR1 i AKR1C3 za pomocą programu Glide. Po przeprowadzeniu skriningów, ich wyniki zostały uszeregowane według wzrastających wartości funkcji oceniającej glide gscore.

W przypadku poszukiwania dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 wykonano skriningi do dwóch różnych celów biologicznych, a zatem, nawet obserwując znaczne podobieństwa w budowie centrów aktywnych obu enzymów,

szanse na znalezienie wspólnych związków wśród najlepszych wyników obu skriningów były mniejsze niż przy modelach tego samego celu, jak miało miejsce w części badań poświęconej nowym inhibitorom CBR1. Wobec tego „przestrzeń” poszukiwań wspólnych związków rozszerzono z 5000 do 10000 najlepiej ocenionych struktur. Po odnalezieniu takich związków zostały one, podobnie jak wcześniej przy poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1, poddane analizie sposobu wiązania z oboma celami biologicznymi. Przeprowadzono także powtórne dokowania w celu sprawdzenia powtarzalności uzyskanych sposobów wiązania w obrębie CBR1 i AKR1C3.

Przeprowadzenie i przeanalizowanie wyników prospektywnych wirtualnych skriningów, wraz z opisywanymi w rozdziale 3.2.10 predykcjami wybranych parametrów ADMET, były głównymi zadaniami prowadzącymi do wytypowania związków będących potencjalnymi nowymi inhibitorami najważniejszych reduktaz ANT.

3.2.10 Predykcja *in silico* i analiza wybranych parametrów ADMET oraz ścieżek metabolizmu potencjalnych nowych ligandów CBR1 i AKR1C3

W celu predykcji *in silico* parametrów ADMET potencjalnych, nowych inhibitorów reduktaz ANT, wykorzystano 2 narzędzia: internetową platformę predykcyjną SwissADME (swissadme.ch) oraz oprogramowanie ADMET Predictor (Simulations Plus, Inc.) [109]. Analiza wybranych właściwości fizykochemicznych wytypowanych związków została przeprowadzona w celu zidentyfikowania potencjalnego ryzyka (niekorzystna farmakokinetyka, metabolizm, toksyczność), które mogłyby wykazywać badane związki. Oceny dokonano poprzez porównanie z parametrami określonymi dla dotychczas znanych inhibitorów reduktaz ANT: hydroxy-PP, triklosanu i ASP9521. Dodatkowo, w części badań dotyczącej poszukiwania nowych inhibitorów CBR1, predykcja i analiza wybranych parametrów ADMET służyła wytypowaniu do zakupu po jednym przedstawicielu każdego z nowych chemotypów potencjalnych inhibitorów.

Przy użyciu platformy SwissADME przeprowadzono predykcję następujących parametrów:

1. **rozpuszczalność (rozp.)**; analizowane związki określano jako dobrze, umiarkowanie bądź słabo rozpuszczalne,
2. współczynnik podziału **logP**: w serwisie SwissADME dostępnych jest 5 modeli wyznaczania logP oraz uśredniona wartość wszystkich 5 predykcji; na potrzeby opisywanych badań uwzględniano wartość uśrednioną, opisaną w serwisie jako *Consensus Log P_{ow}*;
3. **TPSA** (ang. *topological polar surface area*) – topologiczna powierzchnia polarna cząsteczki, wyrażona w Å²,
4. **fr. sp³** - frakcja atomów węgla o konfiguracji sp³,
5. **GI abs.** - stopień wchłaniania żołądkowo-jelitowego związku; określane w serwisie jako wysoki, umiarkowany bądź niski,
6. **BBB perm.** – przepuszczalność przez barierę krew-mózg,
7. **PAINS** – obecność w analizowanej strukturze elementów mogących wpływać na uzyskiwanie w testach *in vitro* fałszywie pozytywnych wyników oraz cech wskazujących na potencjał związku do niespecyficznego reagowania z licznymi celami biologicznymi,
8. **BRENK** – obecność w analizowanych strukturach elementów stanowiących potencjalne toksykofory.

Wyniki otrzymanych predykcji zestawiono w tabelach, a w celu ułatwienia ich analizy zastosowano kod kolorystyczny, przedstawiony w **Tabeli 1**.

Do predykcji i analizy wybranych parametrów ADMET wykorzystano także 3 moduły programu ADMET Predictor: *Physicochemical and Biopharmaceutical, Metabolism* oraz *Toxicity*. Za ich pomocą wyznaczono takie parametry jak:

- frakcja związku niezwiązana z białkami osocza (**hum fup%**),
- ryzyko blokowania przez analizowany związek kanałów hERG (**hERG**),
- ryzyko bycia przez związek substratem/inhibitorem Pgp (**Pgp subs.** oraz **Pgp inh.**).

Dodatkowo wykorzystano 4 dostępne w ADMET Predictor modele szacujące ryzyko wystąpienia efektów niepożądanych związanych z potencjalną mutagennością (**MUT_Risk**), toksycznością (**TOX_Risk**), zmniejszoną/zwiększoną absorpcją (**Absn_Risk**) oraz zwiększonym w wyniku działania enzymów cytochromu P450 metabolizmem (**CYP_Risk**). Wartości 0 oznaczały brak wspomnianego ryzyka, a im wyższa wartość w danym modelu predykcyjnym, tym większe ryzyko wystąpienia niepożądanego efektu. ADMET Predictor wskazywał także rodzaj potencjalnego ryzyka (**RISK_Code**). W tabelach przedstawiających wyniki predykcji umieszczono skróty wykrytych alarmów, natomiast ich rozwinięcia zostały umieszczone w materiałach uzupełniających (Rozdział 6.1). Za pomocą programu ADMET Predictor przeprowadzono także predykcje potencjalnych ścieżek metabolizmu (przy udziale CYP450) i struktur metabolitów wybranych analizowanych związków.

Tab. 1: Kryteria analizy wybranych parametrów ADMET potencjalnych nowych inhibitorów reduktaz ANT, określonych przy wykorzystaniu serwisu SwissADME oraz programu ADMET Predictor.

| parametr | wartość/przedział | | |
|-----------------------|-------------------|----------------|-------------|
| rozp. | dobra | umiarkowana | słaba |
| logP | 0-3 | -1-0; 3-4 | < -1; > 4 |
| TPSA | 50-120 | 30-50; 120-140 | < 30; > 140 |
| fr. sp3 | > 0,50 | 0,25-0,50 | < 0,25 |
| GI abs. | wysoka | umiarkowana | niska |
| BBB perm. | nie | | tak |
| PAINS | brak | | obecne |
| BRENK | brak | | obecne |
| hum fup% | > 1% | | ≤ 1% |
| hERG filter | nie blokuje | | blokuje |
| Pgp subs./inh. | nie | | tak |

3.3 Badania *in vitro*

*Przedstawione w niniejszej pracy badania *in vitro* zostały przeprowadzone przez pracowników Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UJ CM – mgr farm. Kamila Piskę oraz dr Paulinę Koczurkiewicz-Adamczyk.*

3.3.1 Badanie hamowania rekombinowanego CBR1

Mieszaninę inkubacyjną, zawierającą rekombinowany enzym CBR1 (0,5 μM), menadion (120 μM) i badany związek (znany/potencjalny inhibitor) w buforze fosforanowym (pH 7,4), wstępnie inkubowano przez 5 minut w 37 °C na 96-dołkowych mikroplątkach UV-transparentnych. Następnie, w celu zainicjowania reakcji, dodawano roztwór NADPH (do stężenia ostatecznego 200 μM). Reakcję monitorowano przez pomiar absorbancji przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ co 20 sekund przez 10 minut. Do wyznaczenia początkowych prędkości reakcji wykorzystywano spadek absorbancji odpowiadający utlenianiu NADPH. Właściwości hamujące badanych związków określono, porównując szybkość reakcji z kontrolą. Wstępne badanie hamowania CBR1 wykonywano w stężeniu badanego związku równym 100 μM , a po zaobserwowaniu oczekiwanej aktywności, w celu wyznaczenia wartości IC_{50} , wykonywano oznaczenia w zakresie stężeń 0,1-100 μM (0,1, 1, 10, 25, 50, 100 μM). Eksperymenty wykonywano w 3 powtórzeniach.

3.3.2 Badanie hamowania rekombinowanego AKR1C3

Mieszaninę inkubacyjną, zawierającą rekombinowany enzym AKR1C3 (0,2 μM), 9,10-fenantrenochinon (10 μM) i badany związek (znany/potencjalny inhibitor) w buforze fosforanowym (pH 7,4), wstępnie inkubowano przez 5 minut w 37 °C na 96-dołkowych mikroplątkach UV-transparentnych. Następnie, w celu zainicjowania reakcji, dodawano roztwór NADPH (do stężenia ostatecznego 200 μM). Reakcję monitorowano przez pomiar absorbancji przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ co 20 sekund przez 10 minut. Spadek absorbancji, odpowiadający utlenianiu NADPH, wykorzystano do wyznaczenia początkowych prędkości reakcji metodą regresji liniowej. Właściwości hamujące badanych związków określono, porównując szybkość reakcji z kontrolą. Wstępne badanie hamowania AKR1C3 wykonywano w stężeniu badanego związku

równym 100 μM , a po zaobserwowaniu oczekiwanej aktywności, w celu wyznaczenia wartości IC_{50} , wykonywano oznaczenia w zakresie stężeń 0,1-100 μM (0,1; 1; 10; 25; 50; 100 μM). Eksperymenty wykonywano w 3 powtórzeniach.

3.3.3 Warunki prowadzenia hodowli komórkowych

Komórki linii A549 hodowano w inkubatorach utrzymujących standardowe warunki temperatury (37 °C) i stężenia dwutlenku węgla (5%). Hodowle prowadzono używając pożywki DMEM, z dodatkiem FBS (10%) i mieszaniny antybiotyków (1%).

3.3.4 Badania żywotności komórek przy użyciu testu SRB

Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości 10 000 na dołek. Po 24 godzinach komórki inkubowano przez kolejne 48 godzin z badanym związkiem (25 μM) i DNR w zakresie stężeń 0,05–1 μM (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 μM). Następnie komórki utrwalano i płukano wodą destylowaną, a dalej poddawano wybarwianiu roztworem SRB, wiążącego się stechiometrycznie z białkami komórek. Po 15 minutach wybarwione komórki płukano czterokrotnie, a po osuszeniu barwnik wmywano, dodając czynnik rozpuszczający (200 μl). Mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 565 \text{ nm}$. Żywotność określano porównując absorbancję próbek eksperymentalnych do absorbancji kontroli. Eksperyment wykonano w trzykrotnym powtórzeniu, wykonując za każdym razem trzy próby jakościowe.

3.4 Analiza statystyczna badań *in vitro*

Do sprawdzania istotności statystycznej różnicy między wartościami IC_{50} dla DNR i kombinacji DNR z inhibitorami reduktaz ANT (test SRB na komórkach linii A549) wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych. Do sprawdzania istotności statystycznej różnicy w żywotności komórek linii A549, w wyniku dodania inhibitorów reduktaz ANT w stężeniu 25 μM , wykorzystano jednoczynnikowy test ANOVA z testem post-hoc Tukeya. Obliczenia przeprowadzono w programie GraphPad Prism. Istotność statystyczną wyznaczono dla poziomu istotności $p < 0,05$.

4. WYNIKI I DYSKUSJA BADAŃ WŁASNYCH

4.1 Poszukiwanie nowych inhibitorów CBR1

4.1.1 Optymalizacja wybranych struktur krystalicznych CBR1 przy użyciu Induced-fit docking

Dotychczasowe badania struktury i funkcji CBR1 nie pozwoliły na wystarczająco dokładnie określenie roli GSH w zachowaniu prawidłowej funkcjonalności enzymu. Cząsteczka GSH, umiejscawiając się w pobliżu centrum aktywnego, może ułatwiać odpowiednie dopasowanie przestrzenne niewielkich ligandów, jednak jej obecność znacznie utrudnia, lub wręcz uniemożliwia dopasowanie i nawiązanie kluczowych interakcji w przypadku większych ligandów, takich jak na przykład ANT. Wobec tego, w ramach niniejszych badań, poświęconych poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1, zastosowano podejście, które miało umożliwić selekcję związków posiadających zdolność odpowiedniego dopasowania do celu biologicznego, zarówno w obecności GSH, jak i przy jego braku. Przyjęcie takiego sposobu działania wymusiło konieczność równoległej optymalizacji dwóch struktur krystalicznych CBR1 – z GSH w centrum aktywnym (kod PDB: 3BHJ) oraz bez niego (kod PDB: 1WMA).

W wyniku optymalizacji struktury 1WMA przy użyciu metody IFD, uzyskano 251 kompleksów cel-ligand, ze zmodyfikowanym ułożeniem przestrzennym reszt aminokwasowych centrum aktywnego CBR1, dostosowanym do liganda wykorzystanego w ramach optymalizacji. Następnie, każdy model został poddany ocenie jakościowej, która miała na celu określenie poprawności ułożenia liganda, w oparciu o znany mechanizm działania enzymu, (rozdziały 1.2 i 3.2.4; grupa karbonylowa liganda usytuowana w pobliżu reszt Ser139 i Tyr193, z którymi tworzyła wiązania wodorowe). W wyniku przeprowadzonej oceny, do retrospektywnego wirtualnego skryningu wybrano 56 kompleksów, co stanowiło 22,3% wszystkich kompleksów uzyskanych przy użyciu IFD. Wśród ligandów narzędziowych, które najlepiej sprawdziły się w tym etapie optymalizacji (dla których do dalszej analizy wybrano największą ilość kompleksów) były związki: A₁, D₁, F₁, G₁, I₁ (wzory strukturalne wszystkich użytych ligandów narzędziowych

przedstawiono na **Rycinie 10** w rozdziale 3.2.3.1). Natomiast najmniejszą użyteczność w przeprowadzonej procedurze wykazały związki E₁, L₁ oraz N₁. W **Tabeli 2** przedstawiono podsumowanie liczby nowych modeli CBR1, uzyskanych w wyniku optymalizacji struktury krystalicznej 1WMA.

W wyniku optymalizacji metodą IFD uzyskano 264 nowe modele strukturalne kryształu 3BHJ. Po przeprowadzeniu oceny jakościowej uzyskanych kompleksów, do dalszej analizy wybrano 49 z nich (18,56% uzyskanych kompleksów). W przypadku tego kryształu, najwięcej kompleksów wykazujących sposób wiązania zgodny z mechanizmem działania enzymu (**rozdział 1.2**), uzyskano z wykorzystaniem ligandów narzędziowych D₁, F₁, G₁, K₁. Z kolei dla związków C₁, I₁, L₁ oraz O₁ nie uzyskano żadnego kompleksu, który spełniałby kryteria poprawnego sposobu wiązania w centrum aktywnym CBR1. Związki te, w porównaniu z pozostałymi ligandami narzędziowymi, charakteryzowały się bardziej rozbudowaną strukturą. Biorąc pod uwagę obecność w centrum aktywnym kryształu 3BHJ cząsteczki GSH, ograniczającej przestrzeń, w obrębie której mogły zostać umieszczone dokowane ligandy, tworzenie kompleksów z wymienionymi związkami było utrudnione i stąd, mimo uzyskania znaczącej liczby nowych modeli (po 19 dla C₁, I₁, L₁ oraz O₁), nie uzyskano kompleksów z właściwym ułożeniem (sposobem wiązania) liganda.

W kontekście optymalizacji modeli CBR1, na bazie kryształu 3BHJ, szczególnie interesującym wydaje się być przypadek związku O₁ – luteoliny – która mimo tego, że jest znanym, silnym inhibitorem CBR1, nie sprawdziła się jako ligand narzędziowy przy optymalizacji kryształu 3BHJ. Brak odpowiedniego dopasowania cząsteczki tego związku do centrum aktywnego CBR1, w którym znajdował się GSH, może wskazywać na to, że to właśnie dodatkowy kofaktor jest czynnikiem sterycznym, uniemożliwiającym nawiązanie właściwych interakcji między CBR1 a luteoliną. Stanowi to kolejną przesłankę wskazującą na przewagę stosowania, w badaniach nad nowymi inhibitorami CBR1, modeli bez cząsteczki GSH w centrum aktywnym (o niekorzystnym wpływie obecności GSH na efektywność dokowania większych ligandów CBR1, takich jak np. ANT, wspomniano w rozdziale 1.2).

Informacje dotyczące liczby nowych modeli CBR1, uzyskanych w wyniku optymalizacji kryształu 3BHJ, wraz z liczbą kompleksów wybranych do dalszej analizy (retrospektywnego wirtualnego skriningu), przedstawiono w **Tabeli 2**.

Tab. 2: Podsumowanie procesu optymalizacji kryształów CBR1 (1WMA oraz 3BHJ), przy użyciu metody IFD, z zastosowaniem piętnastu wybranych ligandów narzędziowych CBR1; retr. VS – retrospektywny wirtualny skrining.

| ligand narzędziowy użyty do optymalizacji | kryształ 1WMA | | kryształ 3BHJ | |
|--|---|--|---|--|
| | liczba kompleksów uzyskanych w IFD | liczba kompleksów wybranych do retr. VS | liczba kompleksów uzyskanych w IFD | liczba kompleksów wybranych do retr. VS |
| A ₁ | 16 | 5 | 18 | 4 |
| B ₁ | 17 | 3 | 15 | 4 |
| C ₁ | 15 | 2 | 19 | 0 |
| D ₁ | 14 | 9 | 18 | 6 |
| E ₁ | 19 | 1 | 18 | 3 |
| F ₁ | 18 | 8 | 17 | 6 |
| G ₁ | 17 | 5 | 18 | 6 |
| H ₁ | 15 | 2 | 19 | 2 |
| I ₁ | 19 | 8 | 19 | 0 |
| J ₁ | 15 | 4 | 18 | 4 |
| K ₁ | 15 | 3 | 14 | 9 |
| L ₁ | 17 | 0 | 19 | 0 |
| M ₁ | 19 | 3 | 15 | 2 |
| N ₁ | 16 | 1 | 18 | 3 |
| O ₁ | 19 | 2 | 19 | 0 |
| łącznie | 251 | 56 | 264 | 49 |

56 nowych modeli CBR1, uzyskanych w wyniku optymalizacji struktury krystalicznej 1WMA, a także 49 modeli opartych na strukturze 3BHJ, zostało zakodowanych w następujący sposób:

(kod PDB kryształu)_(kod użytego w IFD liganda)(numer kompleksu z ligandem)

Przykładowo, kod 1WMA_M2 oznaczał model uzyskany w wyniku optymalizacji struktury 1WMA, do którego optymalizacji za pomocą IFD użyto ligand narzędziowy M₁ i był to drugi z kolei model, oparty na tym ligandzie, który został oceniony korzystnie i skierowany do dalszej analizy (retrospektywnego wirtualnego skriningu).

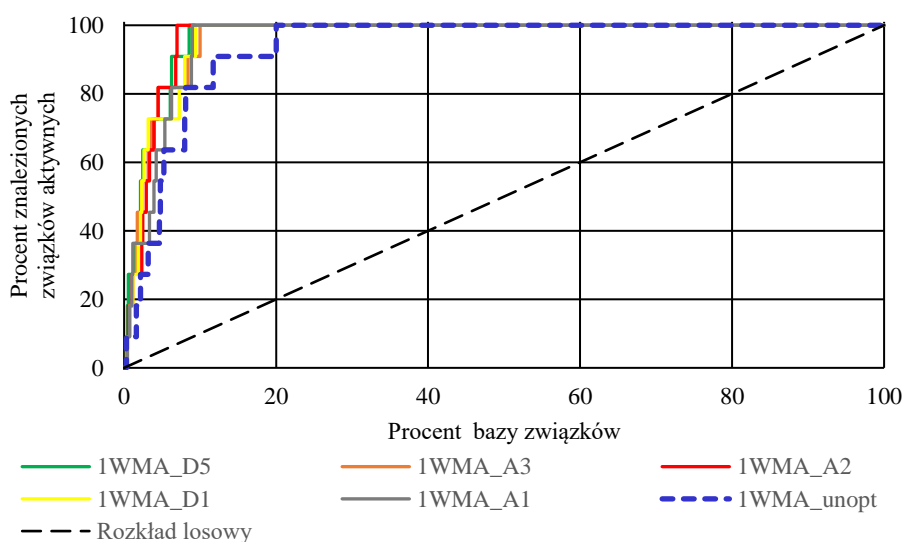
4.1.2 Retrospektywny wirtualny skrining wybranych modeli CBR1

W ramach przygotowań do przeprowadzenia retrospektywnych wirtualnych skriningów, dla 11 spośród 15 ligandów narzędziowych wygenerowano pulę fałszywych ligandów. W tworzeniu bazy związków do skriningów pominięto 4 ligandy, przy których użyciu, na etapie optymalizacji kryształu 3BHJ, nie uzyskano żadnego kompleksu o poprawnym ułożeniu ligandów w centrum aktywnym enzymu. Były to związki C₁, I₁, L₁ oraz O₁.

Poza przeprowadzeniem retrospektywnego wirtualnego skriningu dla 105 nowych modeli CBR1 (56 uzyskanych na strukturze 1WMA i 49 na bazie struktury 3BHJ), wykonano analogiczną procedurę dla początkowych modeli, którymi były kryształy 1WMA oraz 3BHJ. Parametry uzyskane dla nieoptymalizowanych kryształów stanowiły punkt odniesienia, do którego były porównywane modele otrzymane w wyniku optymalizacji. Pierwszym etapem oceny było porównanie wartości parametru $BEDROC_{\alpha=20}$ nowych modeli, z wartościami uzyskanymi dla wyjściowych kryształów: 1WMA = 0,484; 3BHJ = 0,327. W kolejnym etapie porównywano pozostałe, opisane w rozdziale 3.2.6, parametry retrospektywnego wirtualnego skriningu.

Spośród 56 modeli CBR1 opartych na strukturze 1WMA, które zostały poddane ocenie w retrospektywnym wirtualnym skriningu, 17 wykazało wartość parametru $BEDROC_{\alpha=20}$ wyższą, niż wartość dla modelu nieoptymalizowanego (30,36% analizowanych modeli). Podczas analizy wyników skriningu zaobserwowano, że szczególnie modele oparte na 3 ligandach narzędziowych – A₁, B₁ oraz D₁ – cechowały się na tyle korzystnym położeniem przestrzennym reszt aminokwasowych centrum aktywnego CBR1, aby z dużą skutecznością odróżniać właściwe ligandy enzymu od fałszywych ligandów. W przypadku ligandów A₁ i B₁, po 3 modele wykazały wyższą wartość parametru $BEDROC_{\alpha=20}$ od struktury krystalicznej użytej do IFD. Z kolei dla liganda D₁ takich modeli zidentyfikowano aż 6. Jednak analiza pozostałych parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu (ROC, EF, Eff, %Act) znacząco zawężyła liczbę modeli, które spełniały opisane w rozdziale 3.2.6 kryteria, kwalifikujące je jako lepsze od wyjściowych struktur krystalicznych. Spośród 17 wskazanych modeli, jedynie dla 5 z nich wszystkie

parametry skringingu były korzystniejsze w porównaniu z modelem nieoptymalizowanym. Były to 3 modele uzyskane przy użyciu liganda A₁ oraz 2 modele zoptymalizowane przy użyciu liganda D₁. W porównaniu z modelem nieoptymalizowanym, żaden z modeli, uzyskanych na drodze optymalizacji ligandem B₁, nie wykazał poprawy wszystkich analizowanych parametrów. Na **Rycinie 14**, będącej tzw. wykresem wzbogacenia bazy, przedstawiono w formie graficznej trendy w rozpoznawaniu ligandów CBR1 przez 5 modeli najlepiej ocenionych w retrospektywnym wirtualnym skringingu, uzyskanych na drodze optymalizacji kryształu 1WMA. Wykres przedstawia porównanie wspomnianych modeli z nieoptymalizowaną strukturą krystaliczną 1WMA (1WMA_unopt).



Ryc. 14: Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie nieoptymalizowanego modelu CBR1, opartego na strukturze krystalicznej 1WMA, z najlepszymi modelami uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD.

Z uwagi na niewielką liczbę modeli 1WMA, które wykazały poprawę kompletu parametrów retrospektywnego wirtualnego skringingu, wszystkie przedstawione na **Rycinie 14** zostały wytypowane do kolejnego etapu oceny, którym były symulacje MD. Pełen zestaw wartości parametrów skringingu, dla wymienionych modeli, zamieszczono w **Tabeli 3a**.

Tab. 3: Zestaw parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu najlepszych modeli uzyskanych w wyniku optymalizacji kryształów 1WMA (a) oraz 3BHJ (b).

a

| Nazwa modelu | BEDROC _{$\alpha=20$} | ROC | EF _{1%} | EF _{5%} | EF _{10%} | Eff _{1%} | Eff _{5%} | Eff _{10%} | Act _{1%} | Act _{5%} | Act _{10%} |
|-------------------|--|-------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 1WMA_D5 | 0,716 | 0,98 | 27 | 15 | 10 | 0,929 | 0,871 | 0,818 | 27,3 | 72,7 | 100 |
| 1WMA_A3 | 0,690 | 0,97 | 18 | 17 | 10 | 0,929 | 0,885 | 0,818 | 18,2 | 81,8 | 100 |
| 1WMA_A2 | 0,679 | 0,98 | 27 | 17 | 10 | 0,929 | 0,885 | 0,818 | 18,2 | 81,8 | 100 |
| 1WMA_D1 | 0,673 | 0,97 | 18 | 15 | 10 | 0,929 | 0,871 | 0,818 | 18,2 | 72,7 | 100 |
| 1WMA_A1 | 0,620 | 0,97 | 27 | 13 | 10 | 0,946 | 0,871 | 0,818 | 18,2 | 63,6 | 100 |
| <i>1WMA_unopt</i> | <i>0,484</i> | <i>0,94</i> | <i>9</i> | <i>11</i> | <i>8,2</i> | <i>0,802</i> | <i>0,854</i> | <i>0,782</i> | <i>9,1</i> | <i>54,5</i> | <i>81,8</i> |

b

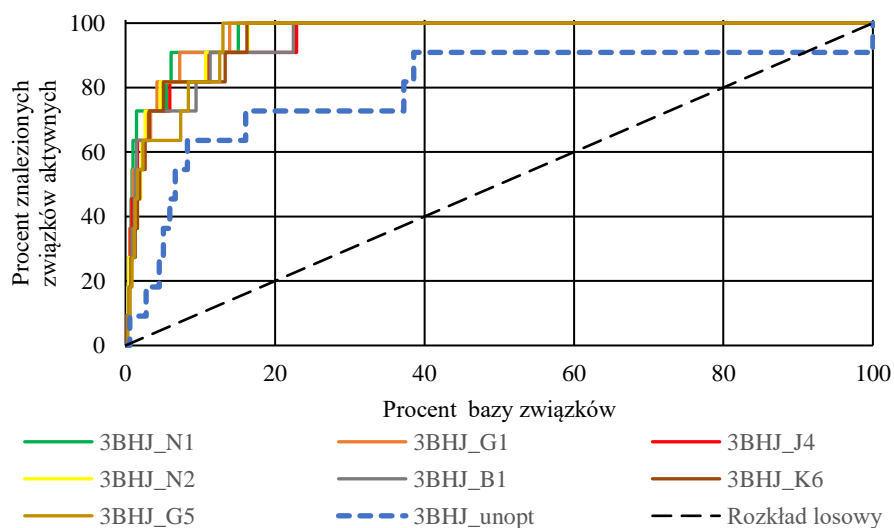
| Nazwa modelu | BEDROC _{$\alpha=20$} | ROC | EF _{1%} | EF _{5%} | EF _{10%} | Eff _{1%} | Eff _{5%} | Eff _{10%} | Act _{1%} | Act _{5%} | Act _{10%} |
|-------------------|--|-------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 3BHJ_N1 | 0,826 | 0,98 | 63 | 15 | 9,1 | 0,973 | 0,896 | 0,802 | 54,5 | 72,7 | 90,9 |
| 3BHJ_G1 | 0,779 | 0,98 | 54 | 17 | 9,1 | 0,964 | 0,885 | 0,802 | 45,5 | 81,8 | 90,9 |
| 3BHJ_J4 | 0,752 | 0,96 | 45 | 15 | 8,2 | 0,969 | 0,885 | 0,782 | 45,5 | 72,7 | 81,8 |
| 3BHJ_N2 | 0,736 | 0,97 | 36 | 17 | 8,2 | 0,946 | 0,885 | 0,802 | 27,3 | 81,8 | 81,8 |
| 3BHJ_B1 | 0,722 | 0,96 | 36 | 15 | 8,2 | 0,969 | 0,871 | 0,782 | 36,4 | 72,7 | 81,8 |
| 3BHJ_K6 | 0,701 | 0,97 | 27 | 15 | 8,2 | 0,946 | 0,885 | 0,782 | 27,3 | 72,7 | 81,8 |
| 3BHJ_G5 | 0,664 | 0,96 | 27 | 13 | 8,2 | 0,964 | 0,854 | 0,782 | 27,3 | 63,6 | 81,8 |
| <i>3BHJ_unopt</i> | <i>0,327</i> | <i>0,80</i> | <i>9</i> | <i>5,5</i> | <i>6,4</i> | <i>0,802</i> | <i>0,758</i> | <i>0,728</i> | <i>9,1</i> | <i>27,3</i> | <i>63,6</i> |

Procedura optymalizacji struktury 3BHJ poskutkowała uzyskaniem znacznie większej liczby modeli o korzystniejszych wartościach parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu. Spośród 49 analizowanych modeli, aż 38 (80,9%) cechowało się wyższą wartością parametru $BEDROC_{\alpha=20}$, w porównaniu z wyjściową strukturą krystaliczną 3BHJ ($BEDROC_{\alpha=20} = 0,327$). Najwięcej spośród takich modeli zostało uzyskanych na bazie optymalizacji z użyciem ligandów narzędziowych D₁ oraz G₁ (po 6 dla każdego z nich). Dla każdego z użytych ligandów narzędziowych uzyskano co najmniej 1 model, którego parametr $BEDROC_{\alpha=20}$ był wyższy od wartości odniesienia (0,327). Obserwacja ta stanowi potwierdzenie tego, że narzędzia i procedury służące do optymalizacji trójwymiarowych struktur krystalicznych, takie jak IFD, są istotnym elementem SBDD i powinny być wykorzystywane regularnie, nawet gdy dysponuje się strukturą krystaliczną celu biologicznego. Przemawiają za tym także analizy kolejnych, poza $BEDROC_{\alpha=20}$, parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu. Poprawę wartości wszystkich analizowanych parametrów uzyskano dla 27 analizowanych modeli. Szczegóły dotyczące tego, które ligandy narzędziowe pozwoliły na uzyskanie modeli o najlepszych parametrach, przedstawiono w **Tabeli 4**.

Tab. 4: Podsumowanie retrospektywnego wirtualnego skriningu modeli uzyskanych na bazie optymalizacji struktury 3BHJ; retr. VS – retrospektywny wirtualny skrining; 3BHJ_unopt – nieoptymalizowana struktura krystaliczna 3BHJ.

| ligand narzędziowy użyty do optymalizacji | liczba kompleksów użytych w retr. VS | kompleksy o wartości parametru $BEDROC_{\alpha=20} > 0,327$ | kompleksy o parametrach korzystniejszych od 3BHJ_unopt |
|---|--------------------------------------|---|--|
| A ₁ | 4 | 1 | 0 |
| B ₁ | 4 | 4 | 3 |
| D ₁ | 6 | 6 | 4 |
| E ₁ | 3 | 3 | 3 |
| F ₁ | 6 | 5 | 5 |
| G ₁ | 6 | 6 | 6 |
| H ₁ | 2 | 1 | 0 |
| J ₁ | 4 | 4 | 2 |
| K ₁ | 9 | 4 | 2 |
| M ₁ | 2 | 2 | 0 |
| N ₁ | 3 | 2 | 2 |
| łącznie | 49 | 38 | 27 |

Znaczna ilość uzyskanych modeli 3BHJ, których parametry retrospektywnego skringingu uległy poprawie (w stosunku do modelu nieoptymalizowanego), wymusiła dodatkową selekcję, mającą na celu ograniczenie liczby modeli poddanych późniejszej analizie przy pomocy MD. W ramach selekcji poszukiwano takich modeli, dla których wszystkie najważniejsze parametry, opisujące skuteczność skringingu w pierwszym procencie uzyskanych wyników – $EF_{1\%}$, $Eff_{1\%}$, $Act_{1\%}$ - wraz z $BEDROC_{\alpha=20}$, były wyższe niż uzyskane dla nieoptymalizowanego modelu. Dla każdego z parametrów wytypowano po 15 najlepiej ocenionych modeli. W wyniku tak przeprowadzonej selekcji, do symulacji MD wytypowano ostatecznie 7 modeli opartych na strukturze krystalicznej 3BHJ. Na **Rycinie 15** przedstawiono wykres wzbogacenia bazy dla wybranych modeli, podobnie jak miało to miejsce dla opisywanych wcześniej, opartych na strukturze 1WMA; natomiast komplet wartości parametrów retrospektywnego wirtualnego skringingu przedstawiono w **Tabeli 3b**. Zarówno w przypadku modeli opartych na strukturze 1WMA, jak i 3BHJ, można zaobserwować znaczącą poprawę parametrów, zwłaszcza w pierwszym procencie zadokowanej puli związków - kluczowym z punktu widzenia efektywności planowanych prospektywnych skringingów.



Ryc. 15: Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie nieoptymalizowanego modelu CBR1, opartego na strukturze krystalicznej 3BHJ, z najlepszymi modelami uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD.

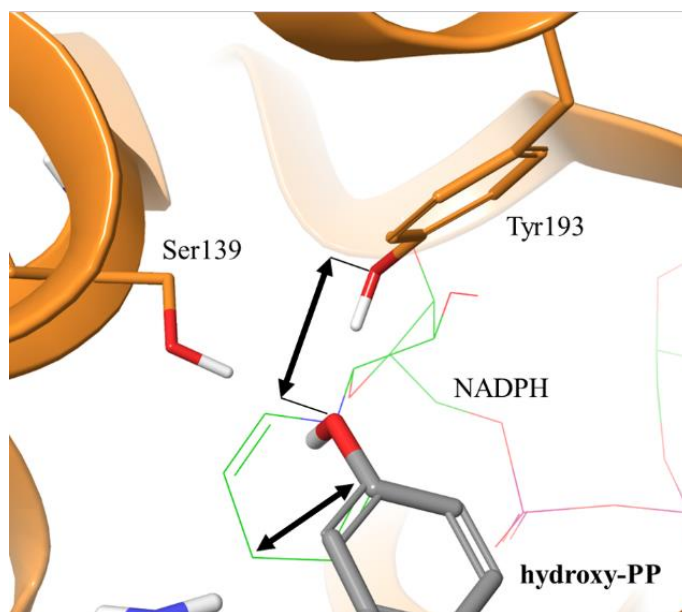
Analizując wyniki retrospektywnych wirtualnych skriningów dla wyjściowych struktur 1WMA i 3BHJ, zaobserwowano znaczącą różnicę w zdolności rozpoznawania ligandów CBR1 przez oba modele. Struktura 3BHJ, z GSH w pobliżu centrum aktywnego enzymu, rozpoznawała ligandy znacznie słabiej od 1WMA. Procedura dokowania jednego z ligandów (M_1) zakończyła się niepowodzeniem, co było widoczne na wykresie wzbogacenia bazy (**Ryc. 15**), gdzie wykres 3BHJ_uopt nie osiąga 100% zidentyfikowanych związków aktywnych. Biorąc pod uwagę, że zarówno kryształ 1WMA, jak i 3BHJ, zostały uzyskane w wysokiej rozdzielczości (kolejno 1.24 Å i 1.77 Å), trudności z odpowiednim ułożeniem ligandów w obrębie centrum aktywnego 3BHJ mogły wynikać z obecności w nim GSH. Dopiero optymalizacja przy użyciu IFD, która wymusiła zmianę przestrzennego położenia reszt bocznych aminokwasów centrum aktywnego, umożliwiła poprawę stopnia rozpoznawania ligandów przez tak utworzone modele.

4.1.3 Ocena stabilności wybranych kompleksów CBR1-hydroxyPP z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej, wybór modeli CBR1 do prospektywnego wirtualnego skriningu

Symulacje MD stanowiły dodatkowy element oceny zoptymalizowanych modeli CBR1. Po redokowaniu do nich liganda znajdującego się w wyjściowych strukturach krystalicznych 1WMA i 3BHJ (hydroxy-PP), oceniono jego zdolność do utrzymania optymalnego położenia w centrum aktywnym enzymu w trakcie 20 ns symulacji. Celem tych badań było sprawdzenie, czy uzyskana w IFD zmiana konformacji wybranych reszt aminokwasowych CBR1 nie wpłynęła niekorzystnie na zdolność utrzymywania odpowiedniego położenia liganda w centrum aktywnym.

W celu określenia stabilności hydroxy-PP w centrum aktywnym CBR1, wykorzystano pomiar odległości między ligandem i kluczowymi elementami kompleksu enzymatycznego, (przedstawione na **Rycinie 16**). Były to odległość między grupą hydroksylową hydroxy-PP i grupą hydroksylową łańcucha bocznego reszty Tyr193 oraz odległość między atomem węgla pierścienia benzenu hydroxy-PP, do którego dołączona była grupa hydroksylowa, a wybranym (ulegającym odprotonowaniu w trakcie reakcji enzymatycznej) atomem węgla

pirydyny, będącej elementem NADP(H). Podczas reakcji enzymatycznej, wskazane elementy kompleksu enzymatycznego biorą bezpośredni udział w przeniesieniu protonów na redukowany substrat.



Ryc. 16: Odległości między hydroxy-PP, a kluczowymi elementami kompleksu enzymatycznego CBR1, oceniane podczas 20 ns symulacji MD (na przykładzie modelu uzyskanego na bazie struktury krystalicznej 1WMA).

Średnie odległości, uzyskane w kolejnych przedziałach czasowych symulacji MD, przedstawiono w **Tabeli 5**. Modele uzyskane w oparciu o strukturę 1WMA wykazywały większą stabilność w ciągu trwania całej symulacji, a hydroxy-PP utrzymywał stałe ułożenie względem kluczowych elementów kompleksu enzymatycznego (za optymalną przyjęto odległość do 3 Å, umożliwiającą nawiązywanie wiązań wodorowych i przeniesienie protonu). Jedynie w przypadku modeli 1WMA_A2 oraz 1WMA_D1 zaobserwowano stopniowe zwiększanie się odległości między ligandem, a kompleksem enzymatycznym, w przedziale 10-20 ns symulacji. Z kolei modele opracowane na bazie struktury 3BHJ okazały się mniej stabilne, zwłaszcza przy pomiarze odległości między hydroxy-PP a atomem węgla NADP+. W przypadku tych modeli zaobserwowano większą

Tab. 5: Ocena stabilności hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanych modeli CBR1 - średnie odległości, uzyskane w kolejnych przedziałach czasowych 20 ns symulacji MD modeli uzyskanych w oparciu o strukturę 1WMA (a) i 3BHJ (b)

a

| Nazwa modelu | średnia odległość hydroxy-PP – Tyr193 [Å] | | | | średnia odległość hydroxy-PP – NADP(H) [Å] | | | |
|--------------|---|---------|----------|----------|--|---------|----------|----------|
| | 0-5 ns | 5-10 ns | 10-15 ns | 15-20 ns | 0-5 ns | 5-10 ns | 10-15 ns | 15-20 ns |
| 1WMA_D5 | 2,93 | 3,12 | 3,31 | 2,97 | 3,73 | 3,77 | 3,85 | 3,79 |
| 1WMA_A3 | 2,90 | 3,03 | 3,14 | 3,25 | 3,75 | 3,75 | 3,84 | 3,87 |
| 1WMA_A2 | 3,27 | 3,52 | 6,88 | 8,48 | 3,78 | 4,26 | 6,48 | 6,52 |
| 1WMA_D1 | 3,03 | 3,81 | 3,74 | 5,78 | 3,79 | 4,11 | 4,16 | 4,33 |
| 1WMA_A1 | 2,95 | 2,88 | 2,95 | 3,06 | 3,72 | 3,91 | 3,88 | 3,98 |

b

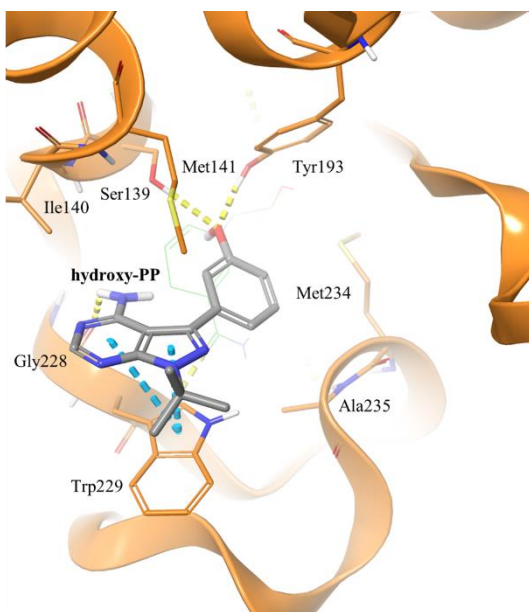
| Nazwa modelu | średnia odległość hydroxy-PP – Tyr193 [Å] | | | | średnia odległość hydroxy-PP – NADP(H) [Å] | | | |
|--------------|---|---------|----------|----------|--|---------|----------|----------|
| | 0-5 ns | 5-10 ns | 10-15 ns | 15-20 ns | 0-5 ns | 5-10 ns | 10-15 ns | 15-20 ns |
| 3BHJ_N1 | 3,12 | 3,18 | 3,56 | 3,90 | 4,31 | 4,63 | 4,06 | 4,12 |
| 3BHJ_G1 | 3,02 | 3,47 | 4,00 | 5,07 | 3,60 | 4,80 | 5,32 | 5,71 |
| 3BHJ_J4 | 2,78 | 3,01 | 5,02 | 4,41 | 3,49 | 3,57 | 4,08 | 4,16 |
| 3BHJ_N2 | 2,96 | 3,51 | 3,84 | 3,09 | 4,23 | 4,81 | 5,56 | 6,15 |
| 3BHJ_B1 | 4,52 | 8,18 | 6,80 | 6,38 | 4,39 | 5,97 | 5,22 | 5,39 |
| 3BHJ_K6 | 4,64 | 5,02 | 4,88 | 4,74 | 4,71 | 4,88 | 4,95 | 4,93 |
| 3BHJ_G5 | 5,57 | 4,02 | 4,37 | 7,22 | 4,96 | 3,79 | 3,75 | 6,95 |

niż w opisywanych wcześniej modelach, zmienność konformacyjną hydroxy-PP. Jednak o zwiększającej się odległości między ligandem i kofaktorem decydowały nie tylko dynamiczne zmiany położenia hydroxy-PP, lecz także znaczne zmiany konformacyjne NADP⁺, nie obserwowane w tak dużym stopniu w modelach opartych na strukturze 1WMA. Uwzględniając to, że największą różnicę w budowie obu wyjściowych struktur krystalicznych stanowiła obecność cząsteczki GSH w kryształach 3BHJ, uzasadnione wydaje się stwierdzenie, że to oddziaływania między wskazanym kofaktorem, a hydroxy-PP i NADP⁺, wpływały na zmniejszenie stopnia stabilności całego kompleksu podczas symulacji MD, mimo że postulowana, fizjologiczna rola GSH ma polegać na stabilizacji małowiązanych ligandów CBR1 w centrum aktywnym enzymu. Spośród 7 analizowanych modeli, uzyskanych w oparciu o strukturę 3BHJ, zaledwie 4 wykazywały zadowalającą stabilność w pierwszej połowie symulacji (3BHJ_N1, 3BHJ_G1, 3BHJ_J4 i 3BHJ_N2), przyjmując kryterium odległości między ligandem, a resztą Tyr193. Jednak zaledwie w przypadku dwóch spośród wymienionych modeli (3BHJ_N1 oraz 3BHJ_N2), trend ten utrzymał się także w drugiej połowie symulacji. Z kolei w przypadku pomiaru odległości między ligandem, a fragmentem NADP⁺, żaden z modeli nie okazał się tak stabilny, jak opisane wcześniej modele uzyskane na bazie struktury 1WMA. Najbardziej stabilnymi okazały się modele 3BHJ_N1 oraz 3BHJ_J4.

20-nanosekundowe symulacje MD, przeprowadzone dla wybranych modeli CBR1, potwierdziły zdolność utrzymania odpowiedniego ułożenia liganda (hydroxy-PP) w centrum aktywnym enzymu. Modele uzyskane na bazie kryształu 1WMA odznaczały się większą stabilnością ułożenia hydroxy-PP w porównaniu z modelami opartymi o strukturę 3BHJ. W przypadku niektórych modeli (np. 1WMA_A2 i 3BHJ_B1) obserwowano wyraźnie mniejszą stabilność liganda, łącznie z tendencją do stopniowego opuszczania przestrzeni centrum aktywnego. Mogło być to spowodowane tym, że centrum aktywne CBR1 nie jest szczelnie otoczone ze wszystkich stron przez reszty aminokwasowe, a zatem wybrane (większe) ligandy, zamiast indukować przekształcenia konformacyjne miejsca wiążącego, mogą być same bardziej podatne na zmiany konformacji reszt aminokwasowych i przez to łatwiej oddysocjowywać z przestrzeni centrum aktywnego. Na uwagę zasługiwało

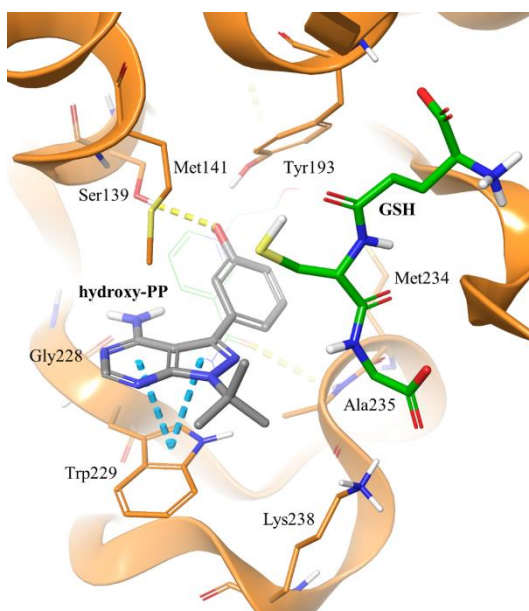
także to, że w przeprowadzonych symulacjach, w utrzymywaniu odpowiedniego ułożenia liganda istotną rolę spełniał łańcuch boczny reszty Trp229. Hydroxy-PP zachowywał optymalne położenie wtedy, gdy fragment aromatyczny liganda był ułożony niemal równolegle do reszty Trp229 (umożliwiając tworzenie oddziaływań π - π). Z kolei odstępstwa od takiego położenia powodowały coraz większą niestabilność liganda i narastające problemy z utrzymaniem optymalnych odległości, zarówno w stosunku do reszty aminokwasowej Tyr193, jak i fragmentu NADP(H).

Po przeanalizowaniu zarówno wyników retrospektywnego wirtualnego skringingu, jak również symulacji MD, wybór najlepszego modelu na bazie struktury 1WMA zawężono do modeli 1WMA_D5 oraz 1WMA_A3. Oba modele odznaczały się bardzo korzystnymi właściwościami we wszystkich przeprowadzonych analizach. Na korzyść modelu 1WMA_D5 przemawiały nieznacznie lepsze wartości parametrów retrospektywnego wirtualnego skringingu, jednak ponowna analiza sposobu wiązania ligandów CBR1, uzyskanych w ramach dokowań w retrospektywnym skringingu, wykazała, że to model 1WMA_A3 pozwala uzyskać poprawniejsze ułożenia cząsteczek w centrum aktywnym CBR1. Wobec tego, do kolejnego etapu badań (prospektywnego wirtualnego skringingu) wybrano model **1WMA_A3**. Z kolei spośród modeli otrzymanych w oparciu o kryształ 3BHJ wybrano model **3BHJ_N1**. Wyróżniał się on zarówno jeśli chodzi o parametry uzyskane w retrospektywnym wirtualnym skringingu (zwłaszcza w analizach pierwszego procenta bazy), jak i w symulacji MD. Jednak na ponowne podkreślenie zasługuje fakt, że w wyniku optymalizacji kryształu 3BHJ przy użyciu IFD udało się uzyskać szereg modeli, których zdolność rozpoznawania ligandów CBR1 była znacznie lepsza w porównaniu z nieoptymalizowaną strukturą krystaliczną 3BHJ. **Ryciny 17 i 18** przedstawiają ujęcia centrów aktywnych CBR1 w modelach 1WMA_A3 i 3BHJ_N1, do których redokowano hydroxy-PP. Przedstawione pozycje stanowiły punkty startowe w symulacjach MD, których wyniki opisano powyżej. Podano również ponownie parametry retrospektywnego wirtualnego skringingu charakteryzujące oba modele. Zarówno 1WMA_A3, jak i 3BHJ_N1 zostały wykorzystane do prospektywnego wirtualnego skringingu, którego celem było wytypowanie nowych, potencjalnych inhibitorów CBR1.



| Model 1WMA_A3 | |
|------------------------------|-------|
| BEDROC_{α=20} | 0,690 |
| ROC | 0,97 |
| EF_{1%} | 18 |
| EF_{5%} | 17 |
| EF_{10%} | 10 |
| Eff_{1%} | 0,929 |
| Eff_{5%} | 0,885 |
| Eff_{10%} | 0,818 |
| Act_{1%} | 18,2 |
| Act_{5%} | 81,8 |
| Act_{10%} | 100 |

Ryc. 17: Sposób wiązania hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu CBR1 oznaczonego kodem 1WMA_A3 (uwidoczniono reszty aminokwasowe będące w odległości do 3 Å od liganda). Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.



| Model 3BHJ_N1 | |
|------------------------------|-------|
| BEDROC_{α=20} | 0,826 |
| ROC | 0,98 |
| EF_{1%} | 63 |
| EF_{5%} | 15 |
| EF_{10%} | 9,1 |
| Eff_{1%} | 0,973 |
| Eff_{5%} | 0,896 |
| Eff_{10%} | 0,802 |
| Act_{1%} | 54,5 |
| Act_{5%} | 72,7 |
| Act_{10%} | 90,9 |

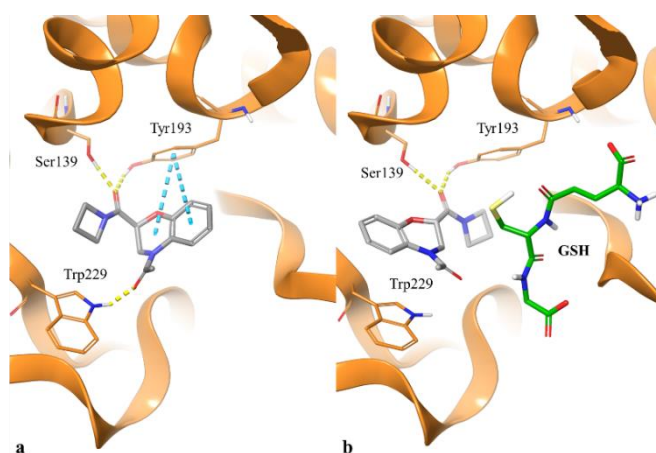
Ryc. 18: Sposób wiązania hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu CBR1 oznaczonego kodem 3BHJ_N1 (uwidoczniono reszty aminokwasowe będące w odległości do 3 Å od liganda). Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

4.1.4 Prospektywny wirtualny skrining i selekcja nowych chemotypów potencjalnych inhibitorów CBR1

W ramach procedury prospektywnego wirtualnego skriningu, do dwóch zoptymalizowanych modeli CBR1 zadokowano około 2,7 miliona komercyjnie dostępnych związków chemicznych, zdeponowanych w bazie ZINC. Podobnie jak miało to miejsce przy retrospektywnym wirtualnym skriningu, także w tym etapie wyniki dokowań uszeregowano na podstawie wartości funkcji oceniającej glide gscore, rozpoczynając od związków o najkorzystniejszych wartościach (oceny najbardziej ujemne). W wyniku analiz 5000 najkorzystniej ocenionych cząsteczek w skriningu na modelu 1WMA_A3, a następnie modelu 3BHJ_N1, zidentyfikowano 102 związki, które powtórzyły się wśród najlepiej ocenionych w obu skriningach. Stanowiły one 2,04% analizowanych cząsteczek. Odsetek powtarzających się związków mógł być zdecydowanie wyższy, gdyby nie obecność w modelu 3BHJ_N1 cząsteczki GSH, która stanowiła czynnik ograniczający przestrzeń centrum aktywnego CBR1, w obrębie której mogły znajdować się fragmenty dokowanych związków. Dokonując przeglądu wyników skriningów zaobserwowano, że model 3BHJ_N1 promował mniejsze cząsteczki, które nawiązywały oddziaływania głównie z dwoma kluczowymi resztami aminokwasowymi (Ser139 i Tyr193, wiązania wodorowe). W przypadku części związków obserwowano także oddziaływania z łańcuchem głównym Gly228 (wiązanie wodorowe) i/lub Trp229 (oddziaływanie π - π). Wszystkie wymienione oddziaływania są typowymi dla ligandów CBR1 i zostały już wspomniane we wcześniejszych rozdziałach. Z kolei model 1WMA_A3 promował w skriningu związki o bardziej rozbudowanych strukturach, które umożliwiały nawiązywanie dodatkowych oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe z łańcuchami głównymi Phe94, Met234 oraz (rzadko) Ala235, będące praktycznie niemożliwymi do uzyskania w modelu z cząsteczką GSH obecną w centrum aktywnym enzymu. W obu skriningach, w pozach uzyskanych dla związków posiadających dodatkowy układ aromatyczny w bliskim sąsiedztwie akceptora wiązania wodorowego (atom tlenu grupy amidowej), odnotowano także dodatkowe oddziaływania π - π z Tyr193 (występujące zazwyczaj razem z wspomnianym wcześniej wiązaniem wodorowym z tą samą resztą aminokwasową).

Wśród zaobserwowanych oddziaływań występowało także niekiedy wiązanie wodorowe z łańcuchem bocznym Trp229.

Po wstępnym wyselekcjonowaniu 102 związków przeprowadzono dokładną analizę wizualną uzyskanych pól (kompleksów enzym-związek). Miało to na celu ocenę powtarzalności sposobu wiązania, niezależnie od obecności lub braku cząsteczki GSH w centrum aktywnym. W wyniku analizy stwierdzono, że wspomnianą właściwość wykazywało 50 ze 102 związków. W przypadku pozostałych, najczęściej dokowane związki zachowywały kluczowe oddziaływania (z Ser139 i Tyr193) poprzez atom tlenu, będący elementem grupy amidowej/laktamowej, jednak wspomniany atom stanowił jednocześnie punkt, względem którego następowała rotacja cząsteczek, w zależności od użytego modelu. Skutkowało to różnym sposobem wiązania uzyskiwanym w dwóch modelach, co uznano za niepożądaną cechę i uznano za kryterium odrzucenia związków z dalszej analizy. Na **Rycinie 19** przedstawiono przykład związku, który obrazuje opisane zjawisko. Spójny sposób wiązania hydroxy-PP w kryształach 1WMA oraz 3BHI stanowił wskazanie, którym kierowano się formułując powyższe kryterium. Uznano, że występowanie różnych położeń przestrzennych potencjalnych ligandów utrudniłyby późniejszą ocenę zależności struktura-aktywność i projektowanie kolejnych modyfikacji, mających wzmacniać powinowactwo do CBR1.



Ryc. 19: Przykład związku (ZINC000032819068) o dwóch możliwych sposobach wiązania w centrum aktywnym CBR1, w zależności od obecności lub braku GSH: związek zadokowany do modelu 1WMA_A3 (a) oraz 3BHI_N1 (b).

Dalsza analiza doprowadziła do zidentyfikowania elementów strukturalnych powtarzających się w co najmniej kilku spośród wyselekcjonowanych związków. Na tej podstawie przyporządkowano każdy z nich do jednej z dziewięciu grup (w nawiasach podano liczbę związków przypisanych do danej grupy):

1. pochodne 2-podstawionego 4H-pirydo[1,2-a]pirymidyn-4-onu (6 związków)
2. pochodne 2-podstawionego 3,4-dihydrochinazolin-4-onu (5 związków),
3. związki, których wspólną cechą była obecność dwóch skondensowanych układów sześcioczłonowych (5 związków),
4. pochodne 2-podstawionego heksahydro-1H-pirol[1,2-c]imidazol-1,3-dionu (6 związków),
5. związki, których wspólną cechą była obecność co najmniej dwóch pierścieni (aromatycznych bądź niearomatycznych) połączonych ze sobą za pomocą atomu węgla stanowiącego element grupy ketonowej/amidowej (6 związków),
6. związki, których wspólną cechą była obecność skondensowanego pierścienia sześcio- i pięcioczłonowego, a także ugrupowania laktamowego wchodzącego w skład pierścienia sześcioczłonowego (5 związków),
7. pochodne 2-podstawionego 4H,6H,7H,8H,9H,10H-piryrido [1,2-a] azepin-4-onu (5 związków),
8. związki posiadające co najmniej 3 skondensowane pierścienie (7 związków),
9. związki o innych chemotypach, których nie można było przypisać do pozostałych grup (5 związków).

Przykłady związków należących do każdej z grup przedstawiono na **Rycinie 20** (Rozdział 4.1.5). W celu zachowania przejrzystej struktury opisu wyników, w dalszych rozdziałach (zarówno w części poświęconej poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1, jak również dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3) użyto kodów przypisanych poszczególnym związkom w bazie ZINC, a następnie symboli, które nadano wybranym związkom, już po ich zakupie i przekazaniu do badań biologicznych. Natomiast nazwy systematyczne każdego z nich zostały umieszczone w Materiałach uzupełniających (**Rozdziały 6.2 i 6.3**).

4.1.5 Predykcja *in silico* i analiza wybranych parametrów ADMET potencjalnych inhibitorów CBR1, wytypowanie związków do badań enzymatycznych

Opisany w poprzednim rozdziale podział potencjalnych, nowych inhibitorów CBR1 na 9 grup umożliwił analizę i porównywanie przewidywanych parametrów ADMET, nie tylko ze związkami o już potwierdzonej aktywności wobec CBR1 (triklosan i hydroxy-PP), ale również między związkami w obrębie danej grupy. Na podstawie analiz przewidywanych parametrów ADMET oraz uzyskanych wcześniej wyników dokowania, wyselekcjonowano z każdej grupy po jednym związku o najbardziej korzystnych właściwościach. Łącznie, dziewięć wyselekcjonowanych związków zostało zakupionych i przekazanych do badań biologicznych.

W **Tabeli 6** przedstawiono zestawienie parametrów wyselekcjonowanych związków oraz dwóch związków referencyjnych: triklosanu i hydroxy-PP. Wytypowane związki charakteryzowały się parametrami ADMET zbliżonymi do hydroxy-PP oraz korzystniejszymi w porównaniu z triklosanem – zarówno w oparciu o parametry wynikające ze struktury (rozpuszczalność, logP, TPSA), jak również związane z potencjalną toksycznością (ryzyka związane z intensywnym metabolizmem przez enzymy CYP450 oraz potencjalne problemy z absorpcją). Wszystkie związki, wskazane jako potencjalne nowe inhibitory CBR1, cechowały się zadowalającymi wartościami parametrów określających ich rozpuszczalność, absorpcję z przewodu pokarmowego, logP oraz TPSA. Cztery z nich wskazano jako mogące przechodzić przez barierę krew-mózg. Przyjęto tę właściwość jako niekorzystną (większość nowotworów, w których stosowane są ANT, nie są umiejscowione w obrębie OUN), jednak nie krytyczną na etapie wstępnej oceny. Większość z wytypowanych związków charakteryzowała się stosunkowo niskimi wartościami frakcji sp^3 , co świadczyło o dużym stopniu ich płaskości. W racjonalnym projektowaniu leków właściwość ta jest uważana za niekorzystną, jednak w przypadku analizowanego celu biologicznego uzyskane wartości są zrozumiałe, w odniesieniu do już znanych ligandów CBR1. Jak wskazano w poprzednich rozdziałach, są to w większości niewielkie związki o co najmniej

jednym pierścieniu aromatycznym, który nadaje cząsteczce płaski charakter (większość związków użytych jako ligandy narzędziowe w IFD). Zaprezentowane wcześniej dokowania oraz analizy symulacji MD wskazywały na istotną rolę reszty aminokwasowej Trp229, której łańcuch boczny bierze udział w tworzeniu oddziaływań π - π , stabilizujących ligandy w centrum aktywnym enzymu. Zatem obecność tej reszty aminokwasowej promuje występowanie w ligandach płaskich hydrofobowych fragmentów, preferencyjnie o charakterze (hetero)aromatycznym.

W związkach wytypowanych jako nowe, potencjalne inhibitory CBR1, nie zidentyfikowano fragmentów mogących klasyfikować je jako PAINS oraz nie stwierdzono obecności toksykoforów (filtr BRENK). Wyjątek stanowił ZINC000905477248, wybrany spośród związków grupy 4. Potencjalnie toksyczny fragment stanowiła hydantoina. Jednak wspomniany fragment stanowił trzon strukturalny wszystkich związków, które znalazły się w grupie 4. ZINC000905477248 wykazywał najkorzystniejsze parametry ADMET ze wszystkich struktur analizowanych w grupie 4. Był on najkorzystniej oceniony (według wskazań oprogramowania ADMET Predictor) zwłaszcza w parametrach takich jak potencjał mutageny, toksyczny i wynikający z intensywnego metabolizmu przez enzymy CYP450.

Dla większości z wytypowanych związków oceniono, że nie powinny być ligandami Pgp oraz nie stanowią zagrożenia w postaci hamowania kanałów hERG.

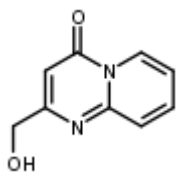
Pogłębiona analiza, przy użyciu wybranych modułów ADMET Predictor, wskazała na nieznacznie podwyższone ryzyko związane z mutagennością dla sześciu spośród wytypowanych związków. Zwrócono także uwagę na potencjalną toksyczność niektórych z nich w modelach mysim bądź szczurzym. Natomiast nie odnotowano, bądź odnotowano bardzo nieznaczne, potencjalne problemy związane z absorpcją i zwiększonym metabolizmem. Dla dwóch z wyselekcjonowanych związków - ZINC000048603426 i ZINC000015974495 – nie odnotowano żadnych potencjalnych zagrożeń ani właściwości strukturalnych mogących wpływać niekorzystnie na ich dostępność biologiczną i bezpieczeństwo.

Tab. 6: Wybrane parametry ADMET nowych, potencjalnych inhibitorów CBR1

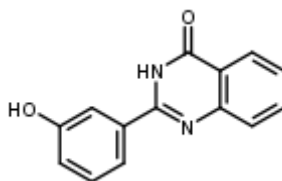
| grupa | związek | rozp. | logP | TPSA | fr. sp3 | GI abs. | BBB perm. | PAINS | BRENK | hum fup% | hERG filter | Pgp subs. | Pgp inh. |
|-------|-------------------|-------|------|-------|---------|---------|-----------|-------|-------|----------|-------------|-----------|----------|
| | Triklosan | | 4,32 | 29,46 | 0,00 | | | | | 2,935 | | | |
| | hydroxy-PP | | 1,95 | 89,85 | 0,27 | | | | | 15,619 | | | |
| 1 | ZINC000021952985 | | 0,46 | 54,60 | 0,11 | | | | | 71,59 | | | |
| 2 | ZINC000048603426 | | 2,40 | 65,98 | 0,00 | | | | | 11,28 | | | |
| 3 | ZINC000003420326 | | 0,56 | 77,98 | 0,10 | | | | | 55,146 | | | |
| 4 | ZINC000905477248 | | 1,59 | 53,51 | 0,50 | | | | | 37,965 | | | |
| 5 | ZINC000014166710 | | 1,91 | 64,43 | 0,47 | | | | | 35,484 | | | |
| 6 | ZINC000015974495 | | 1,05 | 92,91 | 0,15 | | | | | 27,224 | | | |
| 7 | ZINC000016769085 | | 3,07 | 55,12 | 0,26 | | | | | 5,714 | | | |
| 8 | ZINC000004727263 | | 0,59 | 67,23 | 0,15 | | | | | 36,111 | | | |
| 9 | ZINC000065493318 | | 1,87 | 76,70 | 0,43 | | | | | 58,595 | | | |

| grupa | związek | MUT_Risk | MUT_Code | TOX_Risk | TOX_Code | CYP_Risk | CYP_Code | Absn_Risk | Absn_Code |
|-------|-------------------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| | Triklosan | | | 0,095 | rat | 1,6 | 1A2, CL | 1,484 | Kow, Sw |
| | hydroxy-PP | 0,9 | m_97, S_98 | 1 | Xm | | | | |
| 1 | ZINC000021952985 | 0,6 | m102 | 1 | HEPX | | | | |
| 2 | ZINC000048603426 | | | | | | | | |
| 3 | ZINC000003420326 | 0,6 | NIHS | 2 | Xm, HEPX | 0,04 | mi | | |
| 4 | ZINC000905477248 | 0,9 | S_97, S_98 | 1,458 | rat, Xr | 0,378 | 1A2 | | |
| 5 | ZINC000014166710 | 1,2 | m535, NIHS | 2 | Xm, MUT | | | | |
| 6 | ZINC000015974495 | | | | | | | | |
| 7 | ZINC000016769085 | 0,6 | m_97 | | | 0,444 | 3A4 | | |
| 8 | ZINC000004727263 | | | 0,918 | Xm | | | | |
| 9 | ZINC000065493318 | | | 1 | Xm | 0,018 | 2C9 | | |

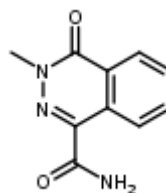
Na **Rycinie 20** przedstawiono struktury potencjalnych nowych inhibitorów CBR1, które zostały wyselekcjonowane w wyniku zastosowania prospektywnego wirtualnego skringingu oraz dodatkowej oceny parametrów ADMET.



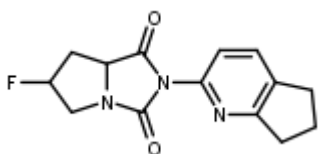
ZINC000021952985 (C1)



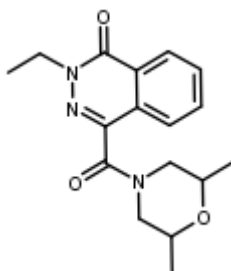
ZINC000048603426 (C2)



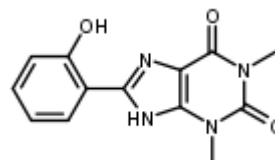
ZINC000003420326 (C3)



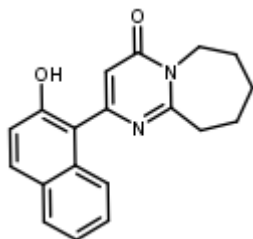
ZINC000905477248 (C4)



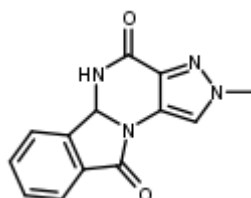
ZINC000014166710 (C5)



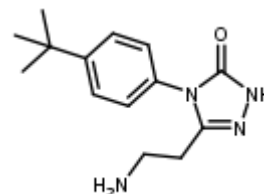
ZINC000015974495 (C6)



ZINC000016769085 (C7)



ZINC000004727263 (C8)



ZINC000065493318 (C9)

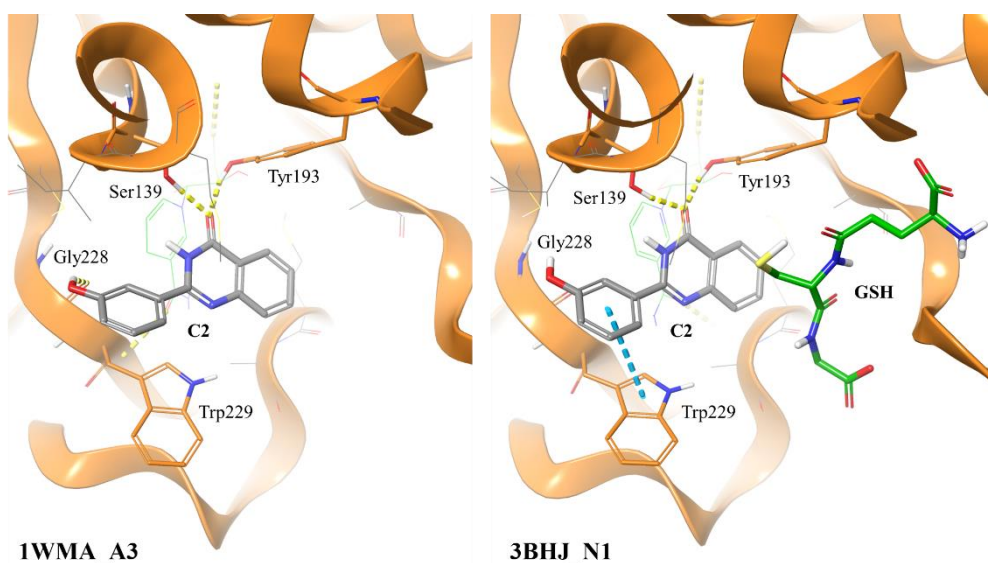
Ryc. 20: Potencjalne nowe inhibitory CBR1 wyselekcjonowane na drodze prospektywnego wirtualnego skringingu oraz dodatkowej oceny wybranych parametrów ADMET.

W nawiasach podano oznaczenie stosowane w kolejnych etapach oceny związków.

Cechą wspólną wszystkich związków była obecność ugrupowania laktamowego, które zastępowało, obecną w substratach CBR1, grupę ketonową (usytuowane w pobliżu reszt aminokwasowych Ser139 i Tyr193). W każdym ze związków występował co najmniej jeden pierścień aromatyczny. W przypadku związków występował on oddziaływanie π - π z łańcuchem bocznym Trp229. 4 związki posiadały w swojej strukturze dodatkowy

donor wiązania wodorowego (pochodzący z grupy hydroksylowej), który umożliwił im nawiązanie oddziaływania z resztą Gly228 (oddziaływanie to było także obserwowane między hydroxy-PP a CBR1 podczas symulacji MD opisanych we wcześniejszym rozdziale). Wśród wyselekcjonowanych związków zaobserwowano pewną powtarzalność strukturalną: rozbudowany fragment leżący w pobliżu reszt Gly228 i Trp229 (wyjątkiem były związki C1 i C3) oraz brak fragmentów mogących umiejscawiać się w pobliżu reszt Met234 i Ala235. Druga z zależności była wynikiem, jak już wcześniej wspomniano, ograniczenia możliwości poprawnego zadokowania bardziej rozbudowanych związków w modelu CBR1 z GSH obecnym w centrum aktywnym.

Na **Rycinie 21** przedstawiono reprezentatywny sposób wiązania związków C1-C9 (na przykładzie związku C2) w centrum aktywnym CBR1 (w modelach 1WMA_A3 i 3BHJ_N1). Na rycinie widać, że w zależności od uzyskanej w dokowaniu pozycji, związek C2 może nawiązywać jedno z dwóch dodatkowych oddziaływań: wiązanie wodorowe z Gly228 lub oddziaływanie aromatyczne typu π - π z Trp229.



Ryc. 21: Sposób wiązania w centrum aktywnym CBR1 nowych potencjalnych inhibitorów enzymatycznych (C1-C9), na przykładzie związku C2. Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

4.1.6 Ocena hamowania rekombinowanego CBR1 przez wyselekcjonowane związki

W pierwszym etapie oceny aktywności wytypowanych cząsteczek zbadano potencjał do hamowania rekombinowanego enzymu w stężeniu związków wynoszącym 100 μM . Dodatkowo, w analogicznych warunkach, zbadano właściwości hamujące związku referencyjnego – triklosanu. **Tabela 7** przedstawia uzyskane wartości procentowe hamowania rekombinowanego CBR1 (wszystkie badania enzymatyczne opisane w rozdziałach 4.1-4.3 zostały przeprowadzone przez mgr farm. Kamila Piskę oraz dr Paulinę Koczurkiewicz-Adamczyk).

Tab. 7: Ocena hamowania aktywności rekombinowanego CBR1 przez związki C1-C9 oraz znany inhibitor enzymu - triklosan.

| badany związek | % hamowania CBR1 w 100 μM badanego związku | IC ₅₀ [μM] |
|------------------|---|--------------------------------------|
| C1 | 17,03 % | - |
| C2 | 83,41 % | 7,56 μM |
| C3 | 20,40 % | - |
| C4 | 13,01 % | - |
| C5 | < 10 % | - |
| C6 | 14,73 % | - |
| C7 | 15,56 % | - |
| C8 | 13,37 % | - |
| C9 | < 10 % | - |
| Triklosan | 90,26 % | 7,92 μM |

W przeprowadzonych oznaczeniach, większość spośród badanych związków wykazywała między 10-20% hamowania CBR1. Dla dwóch związków – C5 oraz C9 – otrzymane wartości hamowania były poniżej 10%. C5, jako jedyny spośród testowanych związków, posiadał bardziej rozbudowany fragment umiejscawiający się między resztami Trp229 i Met234. Związek ten był strukturalnie najbardziej podobny do związku C3, który w przeprowadzonych oznaczeniach wykazał nieznacznie wyższy stopień hamowania enzymu (20,40%). Może to stanowić wskazówkę, aby w projektowaniu inhibitorów CBR1 unikać rozbudowywania struktur we wspomnianym fragmencie związku, jednak hipoteza ta powinna zostać

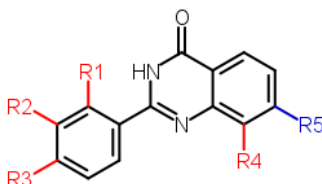
zweryfikowana z wykorzystaniem szerszej serii pochodnych o silniejszych właściwościach hamujących aktywność enzymu. Z kolei C9, jako jedyny spośród badanych związków, nie posiadał w swojej strukturze fragmentu mogącego umiejscawiać się w przestrzeni pomiędzy Tyr193 oraz NADP(H) (na **Rycinie 21** analogiczną rolę spełniają skondensowane pierścienie aromatyczne będące elementem 3,4-dihydrochinazolin-4-onu).

W przeprowadzonych oznaczeniach najkorzystniejsze właściwości hamowania CBR1 wykazał związek C2. Procent hamowania enzymu był porównywalny do uzyskanego dla triklosanu. Wobec tego, w celu wyznaczenia wartości IC_{50} , poszerzono analizę o badanie w szerszym zakresie stężeń C2 i triklosanu. Wyznaczone wartości IC_{50} , przedstawione powyżej (w **Tabeli 7**), wskazują na to, że potencjał hamowania CBR1 przez związek C2 jest zbliżony do referencyjnego inhibitora - triklosanu. Na korzyść związku C2 przemawia jednak to, że cechuje się on korzystniejszymi parametrami ADMET (opisanymi w rozdziale 4.1.5). Jest to także pierwszy związek z grupy 2-podstawionego 3,4-dihydrochinazolin-4-onu, dla którego wykazano właściwości hamujące wobec CBR1. Był to jednak zaledwie 1 z około 2000 dostępnych w bazie ZINC związków, których trzon stanowi układ 2-fenyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onu (uznano, że znajdujący się w położeniu 2, dodatkowy pierścień fenyłowy, jest jednym z kluczowych elementów decydujących o powinowactwie do enzymu i dlatego w dalszych badaniach analizowano wyłącznie związki zawierające ten fragment struktury). W celu poszukiwania kolejnych inhibitorów CBR1 oraz próby opisanie zależności struktura-aktywność, przeprowadzono pogłębioną analizę związków o tym chemotypie.

4.1.7 Dokowanie pochodnych 2-fenyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onu do zoptymalizowanych modeli CBR1, wybór związków do badań enzymatycznych

Do modeli 1WMA_A3 oraz 3BHJ_N1 zadokowano 2243 pochodnych 2-fenyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onu dostępnych w bazie ZINC. Następnie, tak jak w przypadku opisanego wcześniej prospektywnego wirtualnego skriningu,

przeprowadzono analizę mającą na celu zidentyfikowanie związków powtarzających się wśród najkorzystniej ocenionych w obu modelach. Przeanalizowano po 220 najlepiej ocenionych struktur, co stanowiło 10% zadokowanej puli. Znalaziono 26 związków spełniających zakładane kryteria. Każdy z nich cechował się obecnością dodatkowego podstawnika/podstawników przyłączonych do 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu. **Rycina 22** przedstawia położenia, w których najczęściej występowały modyfikacje (R1-R4).



Ryc. 22: Kierunki modyfikacji strukturalnych 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu, które zostały ocenione korzystnie w dokowaniach do modeli 1WMA_A3 i 3BHJ_N1.

R1-R3 stanowiły podstawniki o charakterze donorów wiązań wodorowych bądź fluor lub grupa trifluorometylowa. Z kolei w położeniu R4 podstawnik stanowiły grupa metylova lub metoksylova. W ramach poszukiwań nowych inhibitorów enzymatycznych, do zakupu i zbadania właściwości hamujących wobec CBR1 wybrano 4 związki z podstawnikami w położeniu R1 oraz R4 (związki C11-C14; czynnikiem ograniczającym liczbę zakupionych związków okazał się czas dostawy oraz koszt ich zakupu u dostawców). Dodatkowo, w ramach prac prowadzonych w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM przez dr Krzysztofa Więckowskiego, podjęto próbę syntezy dwóch dodatkowych pochodnych posiadających grupę aminową w położeniu R1 lub R2 (związki C15 i C16). Pochodne o takiej budowie nie były dostępne komercyjnie, ale ich otrzymanie i analizę uznano za celowe z uwagi na analogiczne położenie grupy aminowej w hydroxy-PP.

Wśród wyselekcjonowanych związków nie było żadnego posiadającego podstawnik w położeniu R3. Mimo że związki o takiej budowie wykazywały korzystne parametry w dokowaniach, dodatkowy podstawnik nie nawiązywał oddziaływań z żadną z reszt aminokwasowych CBR1. W związku z tym, na tym etapie badań skupiono się na analizie związków, których modyfikacje strukturalne mogły istotnie wpływać na sposób wiązania liganda w centrum aktywnym enzymu.

Wśród zebranych w bazie ZINC, dostępnych komercyjnie związków, nie znaleziono struktur posiadających podstawniki w położeniu 7 2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu (na **Rycinie 22** oznaczono to położenie symbolem R5). Jednak analiza zależności struktura-aktywność w obrębie flawonoidów, będących strukturalnie zbliżonymi do związku C2, wskazała na wzrost aktywności hamującej związków posiadających dodatkowy donor wiązania wodorowego w położeniu 7 [51]. Różnica była na tyle istotna, że podobnie jak w przypadku opisanych wcześniej związków C15 i C16, zdecydowano o syntezie dwóch dodatkowych struktur (C17 i C18). Były nimi modyfikacja związku C2 oraz analogu związku C2 z grupą hydroksylową przyłączoną w położeniu *orto* pierścienia fenylowego (w odróżnieniu od położenia *meta* w związku C2).

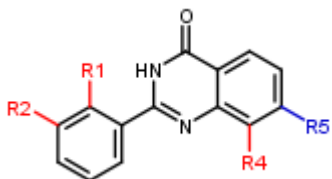
Związki C17 i C18 także zadokowano do modeli 1WMA_A3 oraz 3BHJ_N1, jednak korzystny, obserwowany dla pozostałych pochodnych, sposób wiązania uzyskano jedynie w wypadku modelu bez cząsteczki GSH w centrum aktywnym. Poza powtarzającymi się oddziaływaniami z Ser139, Tyr193 i Trp229, związki C17 i C18 nawiązywały także wiązania wodorowe z Met234 (w modelu 1WMA_A3), opisywane wcześniej m.in. dla luteoliny i ANT.

Poza opisanymi powyżej cząsteczkami, zakupiono także pozbawiony dodatkowych podstawników 2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-on (związek C10), stanowiący związek odniesienia w badaniach zależności struktura-aktywność. Struktury wszystkich wytypowanych do badań związków przedstawiono w **Tabeli 8** na stronie 104, w rozdziale poświęconym ocenie hamowania rekombinowanego CBR1. Z kolei ich nazwy systematyczne zostały umieszczone w Materiałach uzupełniających (Rozdział 6.2).

4.1.8 Ocena hamowania rekombinowanego enzymu CBR1 przez wybrane pochodne 2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu

Badania hamowania rekombinowanego enzymu CBR1 przeprowadzono w analogiczny sposób jak miało to miejsce w przypadku związków C1-C9. Wyniki oznaczeń przedstawiono w **Tabeli 8**.

Tab. 8: Ocena hamowania aktywności rekombinowanego CBR1 przez związki C2 oraz C10-C18. *nie określono hamowania CBR1 w związku z niepowodzeniem syntezy C15.



| związek | R1 | R2 | R4 | R5 | % hamowania CBR1 w 100 μM badanego związku lub IC_{50} [μM] |
|---------|-----------------|---------------------------------|-----------------|----|--|
| C2 | H | OH | H | H | 83,41 % <u>7,56 μM</u> |
| C10 | H | H | H | H | 29,83 % |
| C11 | OH | H | H | H | 35,06 % |
| C12 | H | F | H | H | 39,77 % |
| C13 | H | SO ₂ NH ₂ | H | H | 44,50 % |
| C14 | H | H | CH ₃ | H | 14,50 % |
| C15 * | H | NH ₂ | H | H | - |
| C16 | NH ₂ | H | H | H | 12,17 % |
| C17 | H | OH | H | OH | 88,54 % <u>0,68 μM</u> |
| C18 | OH | H | H | OH | 67,90 % <u>62,80 μM</u> |

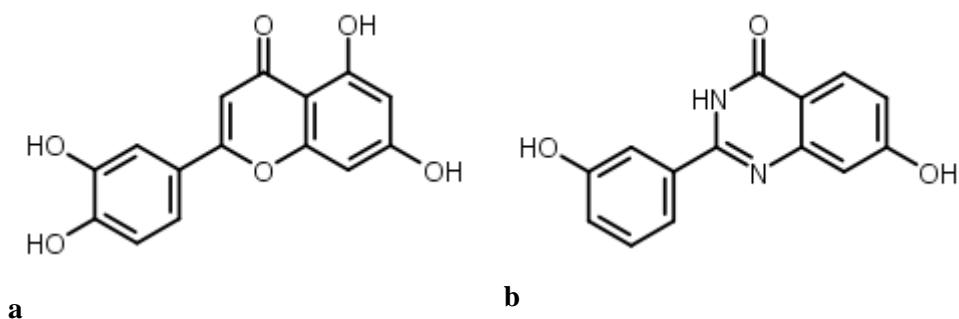
2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-on (związek C10), hamował CBR1 w znacznie mniejszym stopniu niż C2, wyselekcjonowany wcześniej w prospektywnym wirtualnym skriningu. Obserwowana różnica wynika z obecności dodatkowego donora wiązania wodorowego w związku C2, w położeniu *meta* pierścienia fenylowego. W pozach uzyskanych w wyniku dokowania, opisywany podstawnik nawiązywał wiązanie wodorowe z łańcuchem głównym Gly228 (**Rycina 21** na stronie 99). Wiązanie to może wpływać na większą stabilność związku w kompleksie z CBR1, wydłużać czas oddziaływań cel-ligand, a co za tym idzie czas przebywania inhibitora w centrum aktywnym. W dotychczas opublikowanych pracach nie wskazywano oddziaływania z Gly228 jako istotnego dla zwiększania aktywności inhibitorów CBR1 (mimo że jest ono obecne w kryształach 1WMA), w przeciwieństwie do oddziaływania z sąsiednią resztą aminokwasową – Trp229 – obserwowanego dla niemal wszystkich inhibitorów CBR1 dokowanych do trójwymiarowych modeli enzymu.

Zamiana położenia podstawnika elektronodonorowego z *meta* na *orto* (C11) spowodowała zmniejszenie aktywności badanego związku do poziomu porównywalnego z opisywanym wcześniej związkiem C10. Podobny efekt przyniosła zamiana podstawnika na grupę aminową. Pomimo tego, że grupa ta była obecna w hydroxy-PP, dodanie jej do 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu spowodowało znaczne zmniejszenie aktywności w porównaniu z niepodstawionym związkiem (związek C16 vs C10). Jednak wobec niepowodzenia syntezy związku, w którym grupa aminowa znajdowałaby się w pozycji *meta* pierścienia fenylowego (C15), nie można jednoznacznie określić wpływu wprowadzenia tej grupy na aktywność związków w analizowanym chemotypie. Natomiast bez wątpliwości istotnym obniżeniem aktywności skutkowało dodanie podstawnika metylowego w pierścieniu fenylowym 3,4-dihydrochinazolin-4-onu (C14). Obserwowana zależność potwierdza spostrzeżenia płynące z analizy budowy opisywanych wcześniej związków C5 i C3, w przypadku których wprowadzenie bardziej rozbudowanego podstawnika (C5) skutkowało zmniejszeniem aktywności hamującej wobec CBR1. Jednak w celu weryfikacji stawianej hipotezy konieczne będzie sprawdzenie większej ilości związków o bardziej zróżnicowanej aktywności.

Wśród związków oznaczonych symbolami C10-C16, związki C12 i C13 cechowały się korzystniejszymi właściwościami hamującymi aktywność CBR1 w porównaniu ze związkiem niepodstawionym, którym był 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-on (C10). Oba związki, podobnie jak opisywana wcześniej cząsteczka C2, charakteryzowały się obecnością podstawnika w położeniu *meta* w pierścieniu fenylowym. Zarówno wprowadzenie podstawnika fluorowego, jak i grupy sulfonamidowej, powodowały nieznaczną poprawę aktywności związków. Były to jednak wciąż wartości dalekie od uzyskanych wcześniej w analogicznych warunkach dla związku C2, który w opisywanym położeniu posiadał grupę hydroksylową, będącą silnym donorem wiązania wodorowego. Analiza właściwości związków C2, C10, C12 i C13 wskazuje na to, że już sama obecność podstawnika w położeniu *meta* pierścienia fenylowego może wywierać korzystny wpływ na aktywność hamującą pochodnych 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu. Kwestią otwartą pozostaje jednak dokładniejsza analiza tego, jak na zmianę właściwości hamujących wobec CBR1 wpływa rodzaj i wielkość podstawnika. W zbadanych dotychczas związkach najkorzystniej sprawdziło się umieszczenie niewielkiego podstawnika o charakterze silnego donora wiązania wodorowego (związek C2), który nie tylko mógł zapewniać odpowiedni efekt steryczny, ale także, a może przede wszystkim, zapewniał nawiązanie dodatkowego oddziaływania z celem biologicznym, którym było wspomniane wcześniej wiązanie wodorowe z Gly228.

Najbardziej istotną poprawę siły hamowania CBR1, wśród pochodnych 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu, uzyskano w wyniku wprowadzenia dodatkowego podstawnika w położeniu 7 (na **Rycinie 22** oznaczony symbolem R5), którym była grupa hydroksylowa. Wspomniana zmiana była obecna w związkach C17 i C18, będącymi modyfikacjami kolejno związków C2 i C11. W przypadku związków C11 i C18, wprowadzenie dodatkowego podstawnika elektronodonorowego zwiększyło stopień hamowania z 35,06% do 67,90%, przy stężeniu badanego związku równym 100 μM . Badania przeprowadzone w niższych stężeniach badanego związku pozwoliły wyznaczyć wartość IC_{50} związku C18, które w zastosowanym modelu oznaczeń wyniosło 62,80 μM . Ustalona wartość była wyższa niż dla opisywanych wcześniej triklosanu i związku C2, ale potwierdziła,

że wprowadzenie w pozycji 7 podstawnika o charakterze donora wiązania wodorowego, poprawia aktywność hamującą wobec CBR1. Potwierdziły to także oznaczenia wykonane dla związku C17, który okazał się najsilniejszym inhibitorem spośród wszystkich badanych pochodnych 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu. W przypadku tego związku wartość IC_{50} wyniosła $0,68 \mu M$. Była zatem niższa nie tylko w porównaniu z pozbawionym podstawnika w pozycji 7 związkiem C2, ale również ze związkiem referencyjnym – triklosanem. Korzystne właściwości związku C17 mogą łączyć się, jak zostało już wcześniej wskazane, z podobieństwem strukturalnym nowo opisanego związku z luteoliną, będącą jednym z najsilniejszych poznanych inhibitorów CBR1. Jednak w porównaniu z wspomnianym flawonoidem, związek C17 odznacza się większym stopniem lekopodobieństwa. Nie zawiera on niestabilnego metabolicznie układu katecholu, który jest dodatkowo charakterystyczny zarówno dla związków należących do grupy PAINS, jak również cząsteczek o potencjalnych właściwościach toksycznych (filtr BRENK). Struktury obu opisywanych związków przedstawiono na **Rycinie 23**.

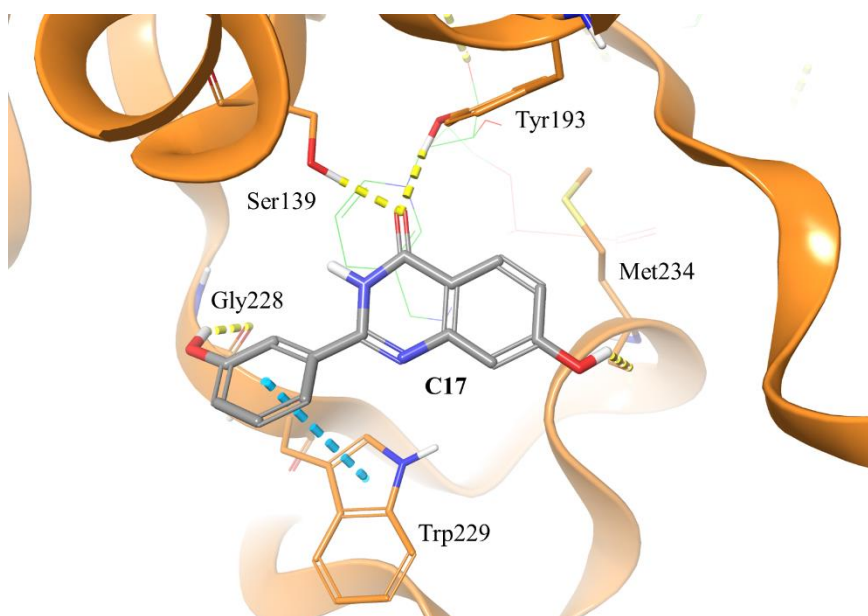


Ryc. 23: Porównanie struktur luteoliny (a) oraz związku C17 (b).

Należy ponownie podkreślić, że korzystne pozy związków C17 i C18 uzyskano jedynie w wyniku dokowania obu związków do modelu CBR1 niezawierającego cząsteczki GSH (1WMA_A3). Wspomniana obserwacja, wraz z wynikami uzyskanymi dla związków C1-C9, stanowią kolejną przesłankę uzasadniającą stosowanie podejścia, w którym poszukiwanie nowych inhibitorów enzymatycznych będzie bazowało na wykorzystaniu modelu CBR1 pozbawionego cząsteczki kofaktora, którym jest GSH. Może to umożliwić selekcję związków

o bardziej rozbudowanych strukturach, zajmujących przestrzeń w pobliżu reszt aminokwasowych Met234 i Ala235, opisywanych jako istotne dla uzyskania optymalnego sposobu wiązania, obserwowanego między innymi dla ANT oraz flawonoidów.

Rycina 24 przedstawia reprezentatywną pozę związku C17 w centrum aktywnym CBR1, uzyskaną w wyniku dokowania do modelu 1WMA_A3. Na rycinie widoczne są wszystkie najistotniejsze oddziaływania decydujące o korzystnych cechach związku C17 jako inhibitora CBR1. Poza wiązaniami wodorowymi z dwoma resztami aminokwasowymi wchodzącymi w skład tetrazy katalitycznej – Ser139 i Tyr193 – obecne są także wiązania wodorowe z Met234 (obserwowane m.in. dla ANT i flawonoidów) oraz Gly228 (obserwowane dla hydroxy-PP w kryształach 1WMA). Widoczne jest także oddziaływanie π - π między pierścieniem fenylowym związku C17, a łańcuchem bocznym Trp229.



Ryc. 24: Sposób wiązania związku C17 w centrum aktywnym CBR1. Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

4.1.9 Predykcja *in silico* oraz analiza parametrów ADMET i ścieżek metabolizmu związków C2 i C17

W Tabeli 9 przedstawiono wartości wybranych parametrów ADMET oszacowanych dla związku C17 oraz zestawiono je z zaprezentowanymi wcześniej parametrami związku C2.

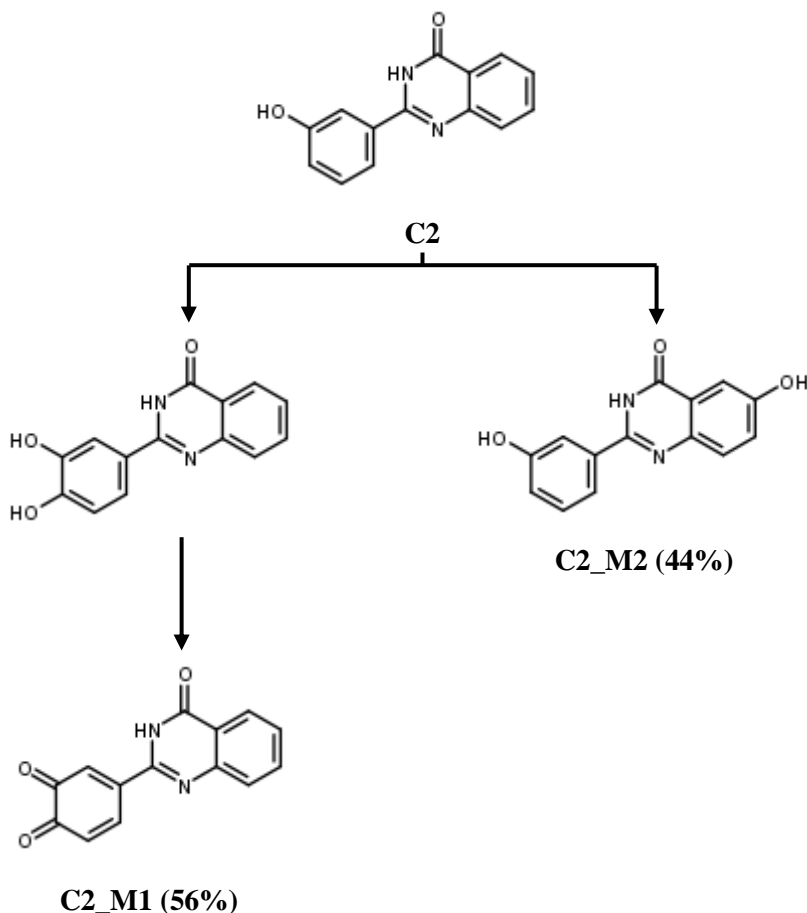
Tab. 9: Porównanie predykcji wybranych parametrów ADMET związków C2 i C17. Oznaczenia kolorystyczne opisano w rozdziale 3.2.10 (Tab. 1).

| | C2 | C17 |
|---------------------|-------|-------|
| rozp. | | |
| logP | 2,40 | 1,87 |
| TPSA | 65,98 | 86,21 |
| fr. sp ³ | 0,00 | 0,00 |
| GI abs. | | |
| BBB perm. | | |
| PAINS | | |
| BRENK | | |
| hum fup% | 11,28 | 15,41 |
| hERG filter | | |
| Pgp subs. | | |
| Pgp inh. | | |
| MUT_Risk | | |
| MUT_Code | | |
| TOX_Risk | | |
| TOX_Code | | |
| CYP_Risk | | 0,229 |
| CYP_Code | | 2C9 |
| Absn_Risk | | |
| Absn_Code | | |

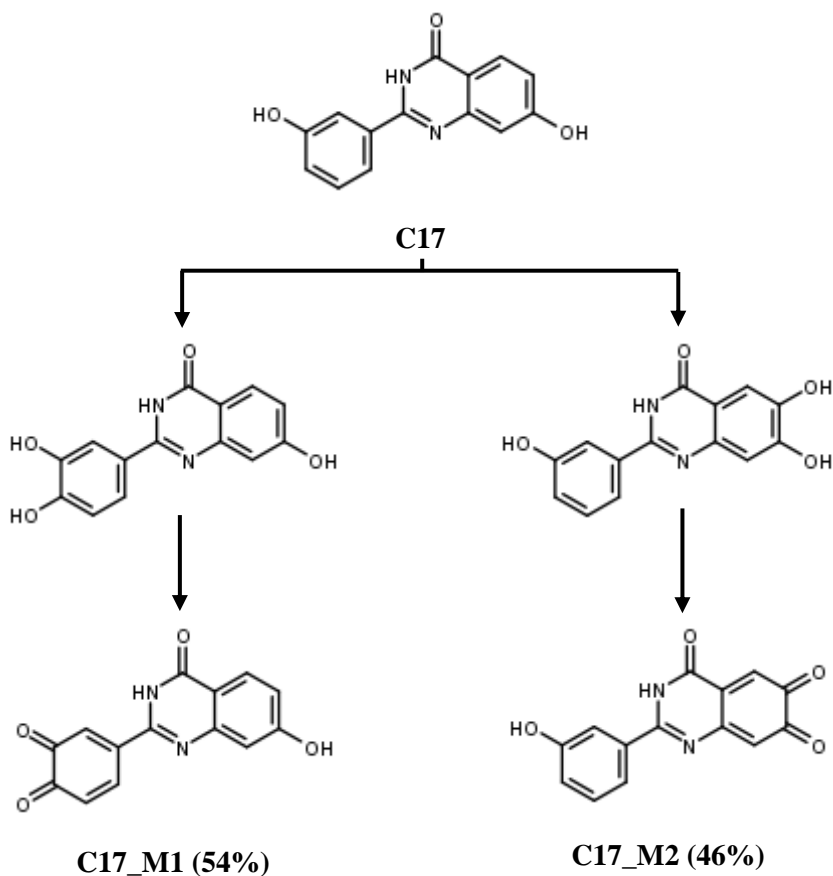
Otrzymane wartości wskazują na to, że wprowadzenie do związku C2 dodatkowej grupy hydroksylowej nie wpływa niekorzystnie na wybrane parametry ADMET. Oba związki charakteryzują się prawie identycznymi właściwościami fizykochemicznymi. Wprowadzenie dodatkowej grupy hydroksylowej skutkowało, co zrozumiałe, zwiększeniem powierzchni polarnej cząsteczki (TPSA), która jednak nie osiągnęła wartości niekorzystnych np. z punktu widzenia wchłaniania. Dodatkowy donor wiązania wodorowego, będący elementem związku C17, okazał się czynnikiem ograniczającym możliwość przechodzenia związku przez barierę krew-mózg, co uznano za korzystną właściwość związku. Nieznacznie wzrósł także

szacowany procent związku występującego w organizmie w formie niezwiązanej z białkami osocza. Związek C17 utrzymał także większość korzystnych parametrów ADMET, oszacowanych przy użyciu oprogramowania ADMET Predictor (w tym parametrów związanych z potencjalną toksycznością). W porównaniu ze związkiem C2, jedyną niekorzystną cechą związku C17 było nieznacznie zwiększone ryzyko intensywnego metabolizmu przez podtyp 2C9 cytochromu P450.

Dodatkowym elementem oceny związków C2 oraz C17 była predykcja ich potencjalnych metabolitów, będących wynikiem aktywności izoenzymów CYP450, wykonana przy użyciu oprogramowania ADMET Predictor. Proponowane kierunki metabolizmu przedstawiono na **Rycinach 25 i 26**.



Ryc. 25: Potencjalne kierunki metabolizmu związku C2, przewidziane przy użyciu oprogramowania ADMET Predictor. W nawiasach podano udział procentowy poszczególnych metabolitów.



Ryc. 26: Potencjalne kierunki metabolizmu związku C17, przewidziane przy użyciu oprogramowania ADMET Predictor. W nawiasach podano udział procentowy poszczególnych metabolitów.

Uzyskane dane wskazały, że głównymi kierunkami metabolizmu, zarówno w przypadku związku C2, jak i C17, było przyłączenie dodatkowej grupy hydroksylowej w sąsiedztwie grup już obecnych w obu związkach. Powstałe w ten sposób metabolity miałyby być następnie utleniane, co prowadziłoby do powstania w obrębie związków *ortho*-benzochinonów. Występowanie w związkach tego fragmentu oceniane jest jako niekorzystne i potencjalnie toksyczne (filtr BRENK), w związku z czym wskazana jest dalsza optymalizacja struktur C2 i C17, tak aby uniemożliwić tworzenie potencjalnie toksycznych *ortho*-benzochinonów, przy jednoczesnym zachowaniu właściwego sposobu wiązania pochodnych 2-fenyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onu i utrzymaniu aktywności ligandów. Mogłaby ona

uwzględnić próbę wprowadzenia dodatkowych podstawników lub heteroatomów w położeniach wskazywanych przez oprogramowanie ADMET Predictor jako wrażliwe na metabolizm, albo rozważenie zastąpienia układów fenolowych odpowiednimi bioizosterami (np. laktam, formamid).

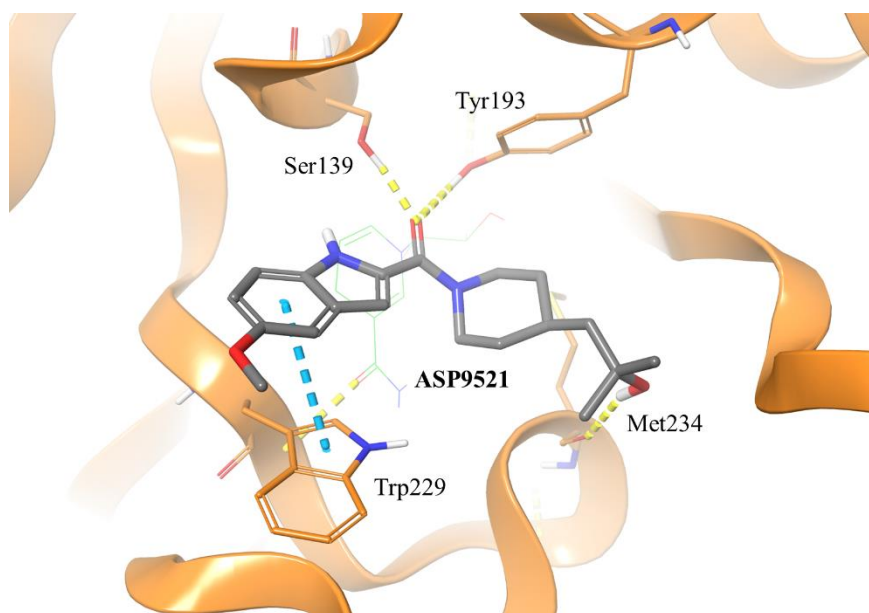
Analiza potencjalnych metabolitów związku C2 miała także na celu uzyskanie odpowiedzi, czy w wyniku działania izoenzymów CYP450 może zachodzić hydroksylacja związku w położeniu 7, w wyniku czego jako metabolit związku C2 powstawałby związek C17. Jednak wśród proponowanych metabolitów nie zidentyfikowano opisywanej modyfikacji. W zamian, jednym z kierunków metabolizmu była hydroksylacja w położeniu 6 (**Ryc. 25**, związek C2_M2). Wprowadzenie podstawnika (np. atomu fluoru) w położeniu 6 związków C2 i C17 może być zatem kolejną interesującą modyfikacją strukturalną. Jej zastosowanie uniemożliwiłoby tworzenie opisywanych wcześniej *ortho*-benzochinonów (**Ryc. 26**, związek C17_M2).

4.2 Ocena możliwości hamowania CBR1 przez związek ASP9521 – badania *in silico* i *in vitro*

4.2.1 Dokowanie ASP9521 do zoptymalizowanego modelu CBR1, analiza sposobu wiązania związku w centrum aktywnym enzymu

W rozdziale 1.3 przedstawiono podobieństwo struktury ASP9521 do znanych inhibitorów CBR1. Związek zawiera elementy obecne zarówno w ANT (więcej niż jeden pierścień aromatyczny), pochodnych amidu kwasu cynamonowego o postulowanym mechanizmie działania poprzez hamowanie CBR1 (piperydyna i grupa amidowa, których wspólnym elementem jest atom azotu) oraz donor wiązania wodorowego, znajdujący się w takim położeniu, które umożliwia nawiązywanie oddziaływania z Met234 (uznanego za kluczowe z punktu widzenia wzmocnienia aktywności hamującej wobec CBR1 w grupie flawonoidów). Kierując się tymi przesłankami, postanowiono zbadać potencjalną aktywność hamującą ASP9521 wobec CBR1. W pierwszym etapie badań, związek zadokowano do

zoptymalizowanego modelu 1WMA_A3, który wcześniej wykorzystano z powodzeniem w poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1. Na podstawie porównania wyników badań aktywności związków C2 i C17, jak również opisywanych wcześniej obserwacji, wskazujących na to, że związki o bardziej rozbudowanej strukturze nie były w stanie uzyskać właściwego sposobu wiązania w modelach z cząsteczką GSH w centrum aktywnym enzymu, dokowanie ASP9521 przeprowadzono wyłącznie przy użyciu modelu pozbawionego dodatkowego kofaktora. Reprezentatywną pozę, uzyskaną na drodze dokowania związku ASP9521 do modelu 1WMA_A3, przedstawiono na **Rycinie 27**.



Ryc. 27: Sposób wiązania związku ASP9521 w centrum aktywnym CBR1, uzyskany w wyniku dokowania. Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

Rezultaty dokowania potwierdziły możliwości związku ASP9521 do nawiązywania analogicznych oddziaływań, jak opisane wcześniej dla inhibitorów CBR1 o potwierdzonej aktywności. Dodatkowo, poszczególne fragmenty związku znajdowały się w tych samych obszarach centrum aktywnego CBR1, co wymienione wcześniej elementy strukturalne ANT, pochodnych amidu kwasu cyjanonowego i flawonoidów. Grupa amidowa ASP9521 znajdowała się w pobliżu cząsteczki NADPH oraz reszt Ser139 i Tyr193, tworząc z oboma aminokwasami wiązania

wodorowe, kluczowe z punktu widzenia nabywania powinowactwa do opisywanego celu biologicznego. Fragment indolowy ASP9521 znajdował się w pobliżu reszty Trp229, a odległość między tymi elementami umożliwiła nawiązanie oddziaływania π - π . Z kolei pierścień piperidyny, wraz z, przyłączonym w położeniu *para*, łańcuchem 2-hydroksy-2-metylopropylowym, zostały skierowane w pobliże reszt Met234 i Ala235, tworząc wiązanie wodorowe z łańcuchem głównym pierwszej z wymienionych reszt aminokwasowych. Znaczenie wszystkich tych oddziaływań było już kilkakrotnie podkreślone we wcześniejszych rozdziałach. Warto dodatkowo zaznaczyć, że ASP9521, w wyniku dokowania, nawiązywał w obrębie centrum aktywnego CBR1 takie same oddziaływania, jak opisywany wcześniej związek C17, który okazał się być silnym inhibitorem enzymu. Jedyną różnicą w sposobach wiązania ASP9521 i C17 było dodatkowe wiązanie wodorowe z resztą Gly228, nie zaobserwowane w przypadku ASP9521.

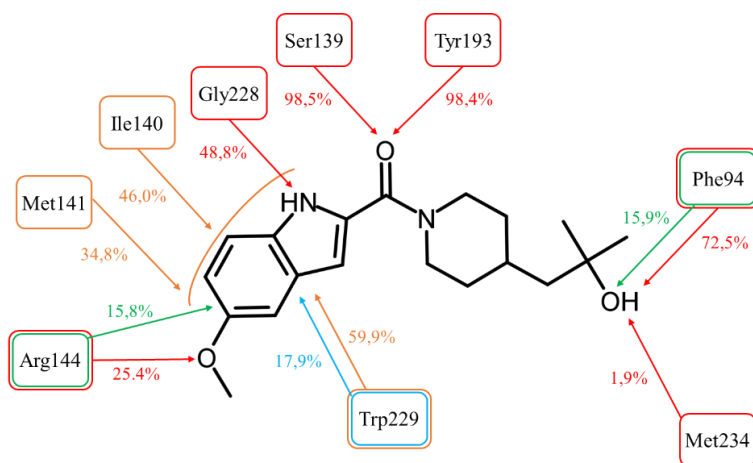
Zadowalające rezultaty dokowania silnego inhibitora AKR1C3, jakim jest związek ASP9521, do centrum aktywnego drugiej z głównych reduktaz ANT – CBR1 – były kolejnym, po porównaniu budowy centrów aktywnych obu enzymów, czynnikiem przemawiającym za zasadnością podjęcia próby poszukiwania związków, będących inhibitorami jednocześnie CBR1, jak i AKR1C3. W przypadku potwierdzenia hamowania CBR1 przez ASP9521, będący już wcześniej kandydatem na lek (testowany w badaniach klinicznych), związek ten mógłby okazać się bardzo istotnym z punktu widzenia optymalizacji terapii przeciwnowotworowej z użyciem ANT, działając na drodze hamowania metabolizmu tych leków.

4.2.2. Analiza interakcji CBR1-ASP9521 z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej

Badanie potencjału ASP9521 do hamowania rekombinowanego CBR1 poprzedzono 20 ns symulacją MD, której celem była ocena zachowania i stabilności kompleksu cel-ligand, w warunkach mających symulować fizjologiczne. Analiza miała także zweryfikować obserwacje zarejestrowane w dokowaniu: możliwość pozostania związku w centrum aktywnym enzymu, wraz z zachowaniem opisanego w poprzednim rozdziale sposobu wiązania. Dotychczas opublikowano zaledwie

jedną pracę, w której przeprowadzono symulację MD CBR1 razem z ligandami enzymu, którymi były DOX i DNR [122]. Wykazano w niej obecność, wymienianych już we wcześniejszych rozdziałach, oddziaływań między ligandami, a resztami aminokwasowymi Ser139, Tyr193 i Trp229. Jednak do tej pory nie wykorzystywano symulacji MD w analizach mających na celu określenie czy związki, o wciąż niepotwierdzonym powinowactwie wobec CBR1, wykazują na tyle korzystne właściwości, aby móc być rozpatrywanymi jako potencjalne ligandy enzymatyczne. Jak podkreślono w rozdziale 1.5, metody komputerowe, takie jak dokowanie i MD, stanowią istotny element racjonalnego projektowania leków i są coraz częściej wykorzystywane w celu wstępnej analizy prowadzącej do selekcji związków kierowanych do badań *in vitro* / *in vivo* - zazwyczaj kosztowniejszych i niejednokrotnie wymagających wykorzystania substancji o właściwościach toksycznych. Do takich substancji zaliczają się także ANT, które jako leki przeciwnowotworowe muszą być przechowywane i używane z zachowaniem wysokiego stopnia ostrożności i ścisłego przestrzegania procedur laboratoryjnych.

Na **Rycinie 28** przedstawiono podsumowanie jakościowe i ilościowe oddziaływań, które zaobserwowano w trakcie 20 ns symulacji MD kompleksu CBR1-ASP9521 (wykorzystując model 1WMA_A3) oraz procent czasu symulacji, w jakim były one obecne.



Ryc. 28: Oddziaływania zaobserwowane między ASP9521 a resztami aminokwasowymi centrum aktywnego CBR1 (model 1WMA_A3) w trakcie 20 ns symulacji MD. Kolejnymi kolorami zaznaczono: wiązania wodorowe (czerwony), oddziaływania π - π (niebieski), inne oddziaływania hydrofobowe (pomarańczowy), mostki wodne (zielony).

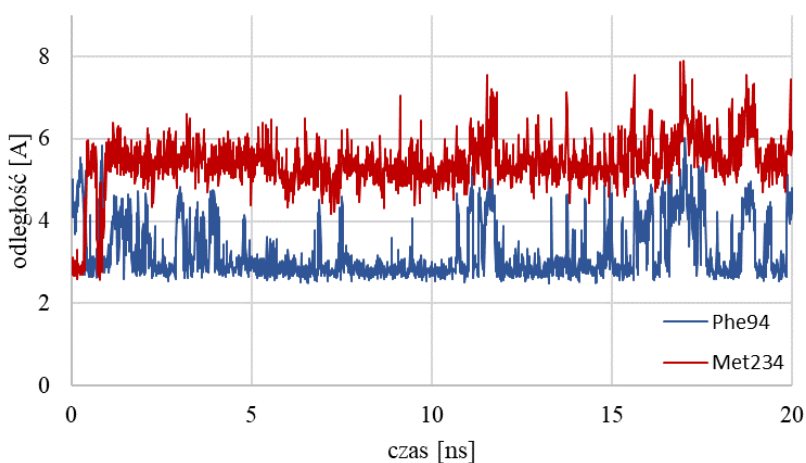
W trakcie 20 ns symulacji MD, związek ASP9521 wykazał zdolność do pozostania w obrębie centrum aktywnego CBR1 i zachowania większości, z obserwowanych w dokowaniu, oddziaływań z kluczowymi resztami aminokwasowymi enzymu. Przez niemal cały czas trwania symulacji obserwowano utrzymanie wiązań wodorowych, nawiązanych zarówno z Ser139, jak i Tyr193. Pojawiły się także dwa dodatkowe wiązania wodorowe: między łańcuchem głównym Gly228 i atomem azotu indolu (donor wiązania wodorowego; 48,8% czasu symulacji), a także między łańcuchem bocznym Arg144 i atomem tlenu grupy metoksylovej, przyłączonej do indolu (25,4%). Oddziaływanie z Gly228 było jedynym, które różnicowało sposób wiązania związków ASP9521 i C17, a zatem jego obecność (nawet mimo tego, że nie była obserwowana przez całość czasu symulacji) jest korzystna z punktu widzenia potencjalnej aktywności biologicznej związku. Natomiast drugie z wymienionych wiązań – z Arg144 – zostało nawiązane w wyniku dużej zmienności konformacyjnej tej reszty aminokwasowej. Można ją określić aminokwasem stanowiącym „wrota” do centrum aktywnego CBR1. Nie tworzy wewnątrzbiałkowych oddziaływań z innymi resztami aminokwasowymi enzymu, jest za to otoczona licznymi cząsteczkami wody. Powyższe spostrzeżenia tłumaczą obserwowane zmiany konformacyjne reszty Arg144 i możliwość tworzenia oddziaływań z fragmentem związku ASP9521. Wspomniana reszta była także odpowiedzialna za tworzenie wiązania wodorowego z ligandem w kryształce CBR1 oznaczonym kodem 2PFG [50]. Nie pojawiły się jednak żadne informacje/hipotezy mówiące o pełnieniu przez nią istotnej roli w prawidłowym sposobie wiązania innych ligandów CBR1, w tym ANT i flawonoidów.

Wśród oddziaływań zaobserwowanych w trakcie 20 ns symulacji MD ASP9521 znalazło się także, podkreślane wielokrotnie jako niezwykle istotne, oddziaływanie π - π z łańcuchem bocznym Trp229. Nie było ono jednak tak trwałe, jak opisywane wcześniej oddziaływania z resztami Ser139 i Tyr193. Było ono obecne przez 17,9% czasu symulacji. Jednak brak tego oddziaływania przez większość symulacji nie wykluczało stabilności badanego związku w centrum aktywnym CBR1 i nie oznaczało braku udziału reszty Trp229 w sposobie wiązania ASP9521, gdyż przez 59,9% czasu był obserwowany inny typ interakcji, określanej

w oprogramowaniu Desmond jako „inne oddziaływania hydrofobowe”. Ten sam typ oddziaływań zarejestrowano, przez 34,8% czasu symulacji, między fragmentem indolowym ASP9521, a resztą Met141. Aminokwas ten był także opisywany jako istotny dla sposobu wiązania ANT, ze względu na możliwość tworzenia właśnie oddziaływań hydrofobowych z pierścieniami antrachinonu. W analizie przywoływanej już symulacji MD DOX i DNR uznano, że reszty Met141 i Trp229 tworzą hydrofobową przestrzeń, w którą „wpasowuje się” się antrachinonowy fragment ANT (dla opisu obserwowanego zjawiska, autorzy użyli sformułowania „sandwiched”, mającego ułatwić wizualizację powstałego kompleksu) [122]. Nie uwzględniono natomiast znaczenia innej, leżącej w pobliżu i posiadającej hydrofobowy łańcuch boczny, reszty aminokwasowej. Mowa o Ile140, której hydrofobowe oddziaływania z fragmentem indolu związku ASP9521 zaobserwowano w 46,0% czasu symulacji. Obserwacja ta może wskazywać na ważny udział nie dwóch, ale trzech reszt aminokwasowych (Ile140, Met141 i Trp229) w różnicowaniu powinowactwa substancji do CBR1. Potwierdza także zasadność uwzględniania fragmentów hydrofobowych w związkach projektowanych pod kątem hamowania enzymu.

Największą różnicą między sposobem wiązania ASP9521 uzyskanym w wyniku dokowania, a obserwowanym w trakcie symulacji MD, był zanik wiązania wodorowego między grupą hydroksylową przyłączonego do pierścienia piperydyny łańcucha 2-hydroksy-2-metylopropylowego, a łańcuchem głównym Met234. W przeprowadzonej symulacji MD, wspomniane oddziaływanie było obserwowane zaledwie przez 1,9% czasu, na samym początku symulacji. Łańcuch 2-hydroksy-2-metylopropylowy był fragmentem ASP9521, który wykazywał największą swobodę konformacyjną na przestrzeni 20 ns MD. Po zaniku wiązania wodorowego z Met234, opisywany fragment skierował się w przestrzeń, w której w innych kryształach CBR1 (3BHI i 4Z3D) znajdowała się cząsteczka GSH. Zmiana położenia łańcucha nie była spowodowana ani nie wymusiła zmiany konformacji pierścienia piperydyny, która przez całość symulacji pozostawała w korzystnej energetycznie formie krzesłkowej. Zamiast wiązania wodorowego z Met234, na skutek zmiany położenia łańcucha 2-hydroksy-2-metylopropylowego, zostało utworzone inne wiązanie wodorowe,

z łańcuchem głównym reszty Phe94. Było ono obserwowane przez 72,5% czasu symulacji. Jego obecność jest warta odnotowania, gdyż reszta Phe94 była jednym z punktów oddziaływań między CBR1, a cząsteczką GSH, zarówno w strukturze krystalicznej 3BHJ, jak i 4Z3D [45], [48]. Na **Rycinie 29** przedstawiono porównanie odległości zarejestrowanych między grupą hydroksylową ASP9521, a atomami tlenu łańcuchów głównych Phe94 i Met234, z którymi wspomniana grupa tworzyła wiązanie wodorowe w trakcie symulacji MD. Zarejestrowane dane wskazują na preferencje związku ASP9521 do przyjmowania w centrum aktywnym CBR1 konformacji umożliwiającej nawiązanie oddziaływania z Phe94.



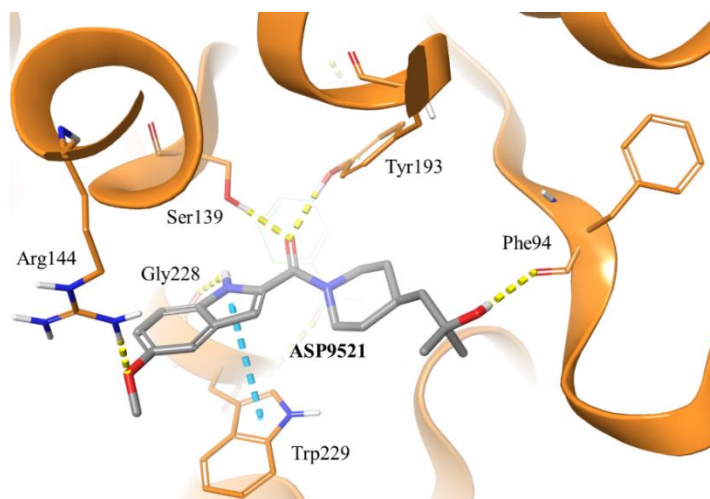
Ryc. 29: Porównanie odległości między grupą hydroksylową ASP9521, będącej elementem łańcucha 2-hydroksy-2-metylopropylowego, a atomami tlenu łańcuchów głównych dwóch reszt aminokwasowych centrum aktywnego CBR1: Phe94 i Met234.

Do tej pory nie prowadzono projektowania inhibitorów CBR1 z myślą o nawiązywaniu przez nie oddziaływań z resztą Phe94. Jednak w przypadku potwierdzenia powinowactwa związku ASP9521 do CBR1, opisywany kierunek powinien być poważnie brany pod uwagę, a porównanie aktywności między związkami „celowanymi” na nawiązanie oddziaływań kolejno z Met234 lub Phe94 w znacznym stopniu poszerzyłoby wiedzę na temat zależności struktura-aktywność w grupie inhibitorów CBR1. Warto także podkreślić, że ASP9521 różni się od takich silnych inhibitorów CBR1 jak luteolina i związek C17 tym, że donor wiązania wodorowego, nawiązujący oddziaływanie z resztą Met234, jest elementem bardziej rozbudowanego fragmentu, o znacznym stopniu zmienności konformacyjnej,

podczas gdy w dwóch pozostałych związkach analogiczne elementy są związane z bardziej usztywnionymi fragmentami, które stanowią pierścienie fenylowe.

Ostatnim rodzajem oddziaływań, które zaobserwowano podczas 20 ns symulacji MD, były mostki wodne, umożliwiające nawiązanie połączeń między ASP9521, a wspomnianymi już resztami aminokwasowymi Phe94 i Arg144. Mimo że nie wydają się one być kluczowymi z punktu widzenia nabywania powinowactwa związków do celu biologicznego, ich obecność może dodatkowo stabilizować kompleks cel-ligand, a co za tym idzie polepszać aktywność biologiczną inhibitorów. Występowanie tych oddziaływań może być zatem czynnikiem skłaniającym do projektowania i badania modyfikacji strukturalnych, mających dodatkowe podstawniki o charakterze polarnym, jak choćby obecna w ASP9521 grupa metoksylova. Należy jednak wciąż mieć na uwadze wszelkie zmiany parametrów ADMET, będące efektem wprowadzania takich modyfikacji.

Rycina 30 przedstawia zmodyfikowany, uzyskany w symulacji MD, sposób wiązania związku ASP9521, uwzględniający wszystkie opisane powyżej zmiany w ilości i rodzaju oddziaływań cel-ligand (dla przejrzystości grafiki nie przedstawiono mostków wodnych i oddziaływań określonych jako „inne oddziaływania hydrofobowe”; stan uchwycony w 19,8 ns trwania symulacji).



Ryc. 30: Reprezentatywny sposób wiązania związku ASP9521 w centrum aktywnym CBR1, zaobserwowany w trakcie MD (w 19,8 ns symulacji). Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

4.2.3 Ocena hamowania rekombinowanego enzymu CBR1 przez ASP9521 oraz efektu łącznego podania DNR i ASP9521 na żywotność komórek linii A549

Ocenę hamowania rekombinowanego enzymu CBR1 przez ASP951 przeprowadzono według procedury, jaką zastosowano przy poszukiwaniach nowych inhibitorów CBR1. Rozpoczęto od pomiaru hamowania aktywności enzymu w stężeniu związku równemu 100 μM , po czym, uzyskawszy zadowalające wyniki, przeprowadzono badanie w niższych stężeniach, a następnie wyznaczono IC_{50} :

| | |
|---|--------------------------------------|
| % hamowania CBR1 przez ASP9521 w stężeniu 100 μM | 85,39% |
| IC_{50} ASP9521 wobec CBR1 | 44,0 μM |

Wartość IC_{50} dla hamowania CBR1 przez ASP9521 była znacznie wyższa niż dla opisywanych wcześniej związków C2 i C17, jednak ASP9521 wykazywał silniejsze działanie hamujące wobec reduktazy niż pozostałe związki serii 'C'. Jego aktywność była porównywalna do wcześniej obserwowanej dla związku C18 ($\text{IC}_{50} = 62,80 \mu\text{M}$). Uzyskane wyniki wskazują na umiarkowaną zdolność ASP9521 do hamowania aktywności CBR1. Są one także kolejną przesłanką świadczącą o możliwości projektowania związków, będących jednocześnie inhibitorami obu głównych reduktaz ANT: CBR1 i AKR1C3. Związek ASP9521 był kandydatem na lek, którego mechanizm działania miał wynikać z hamowania AKR1C3. W toku optymalizacji strukturalnych uzyskano pożądaną, nanomolową aktywność. Jednak w badaniach nie uwzględniano innych, potencjalnych kierunków aktywności związku, także przez hamowanie CBR1. Wobec tego, zaobserwowanie takiego działania jest tym bardziej interesujące i wskazuje na to, że dalsze modyfikacje strukturalne mogłyby skutkować zwiększeniem siły działania wobec CBR1, przy jednoczesnej próbie utrzymania osiągniętego wcześniej efektu hamującego wobec AKR1C3. Niewykluczone, że wśród już zsyntezowanych związków, testowanych w programie, którego efektem był wybór ASP9521 do badań klinicznych, znajdował się związek o bardziej zbalansowanej aktywności wobec obu głównych reduktaz ANT.

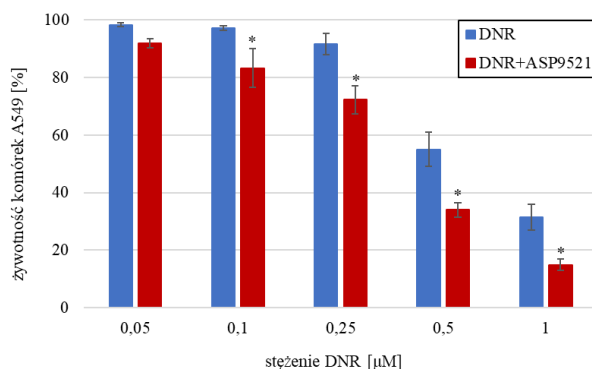
Mimo posiadania wszystkich cech farmakoforowych, obecnych w innych inhibitorach CBR1, związek ASP9521 nie okazał się być równie skuteczny jak,

na przykład, luteolina i związki C2 oraz C17. Mogła mieć na to wpływ, wspomniana już wcześniej, większa swoboda konformacyjna fragmentu liganda, którego elementem był donor wiązania wodorowego, mający tworzyć wiązanie wodorowe z resztą Met234. Zaobserwowana w symulacjach MD preferencja fragmentu 2-hydroksy-2-metylopropylowego do umiejscawiania się w pobliżu reszty Phe94 mogła być ostatecznie właściwością niekorzystną z punktu widzenia powinowactwa do celu biologicznego. Jednak w celu weryfikacji tej hipotezy konieczna jest poszerzona analiza zależności struktura-aktywność, wymagająca zbadania aktywności szeregu związków o zbliżonej budowie, a różniących się jedynie położeniem donora wiązania wodorowego. Wartym sprawdzenia byłoby także zbadanie związków o krótszym łańcuchu alifatycznym, co zmniejszyłoby swobodę konformacyjną tego fragmentu i, być może, zwiększyło odsetek czasu, w którym wspomniany fragment znajdowałby się w pobliżu reszty Met234. W tym samym kontekście, interesującym wydaje się porównanie aktywności związków o nienasyconym łańcuchu alifatycznym, w którym, poprzez wprowadzenie izometrii *cis-trans*, uzyskano by struktury o ‘narzuconym’ ułożeniu donora wiązania wodorowego w kierunku reszty Met234 lub Phe94 (podobny efekt można by uzyskać poprzez wprowadzenie usztywnionego podstawnika, np. układu cyklicznego). Jednak nawet umiarkowana aktywność związku ASP9521, w połączeniu z wynikami uzyskanymi dla związku C17, potwierdza, że związki o bardziej rozbudowanych strukturach, mogące choćby częściowo zajmować, w obrębie centrum aktywnego CBR1, przestrzeń okupowaną w pewnych warunkach fizjologicznych przez GSH, spełniają się lepiej jako inhibitory CBR1 w porównaniu z mniej (lub w ogóle) rozbudowanymi strukturami (większość związków serii ‘C’).

Zarówno symulacje *in silico*, jak i badania hamowania rekombinowanego CBR1, potwierdzają istotną rolę fragmentu o charakterze aromatycznym w uzyskaniu odpowiedniego sposobu wiązania i uzyskania powinowactwa wobec omawianego enzymu. Wobec tego w dalszych etapach badań będzie można próbować korzystać z różnego typu układów aromatycznych, nie ograniczając się jedynie do karbocyklicznych pochodnych fenylowych. Nie bez znaczenia pozostaje także rola podstawienia pierścieni atomami lub grupami funkcyjnymi o charakterze

elektronodonorowym i/lub elektronoakceptorowym, którego przykładem była grupa metoksylowa, mogąca nawiązywać oddziaływania z resztą Arg144.

W drugim etapie badań *in vitro* sprawdzono, jak ASP9521 (w stężeniu 25 μM) wpływał na efekt cytotoksyczny DNR, zastosowanej w szerokim zakresie stężeń (0,05 – 1 μM), wobec komórek nowotworu płuc (linia A549; **Ryc.31**; badania przeprowadzone przez mgr farm. Kamila Piskę).



Ryc. 31: Efekt łącznego podania związku ASP9521 (25 μM) i DNR na żywotność komórek linii A549, w porównaniu z DNR bez dodatku inhibitora reduktaz ANT, po 48 godzinach inkubacji; * istotność statystyczna -/+ ASP9521 przy $p < 0,05$.

W wyniku dodania związku ASP9521 uzyskano istotne statystycznie zwiększenie efektu przeciwnowotworowego DNR w czterech, spośród pięciu badanych stężeń leku: 0,1, 0,25, 0,5 i 0,1 μM DNR. Wyznaczono także stężenie DNR konieczne do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych o 50%. Dla leku stosowanego samodzielnie wynosiło ono **0,442 μM** . Z kolei dodatek ASP9521, w stężeniu 25 μM , zmniejszył wymagane stężenie DNR o 14,25%, do **0,379 μM** . Podobny trend zaobserwowano, na przykład, dla wybranych pochodnych amidu kwasu cynamonowego, zwiększających efekt cytotoksyczny DOX. Były wśród nich związki o budowie zbliżonej do ASP9521, zawierające pierścień piperidyny z przyłączonym donorem wiązania wodorowego (**Rycina 7**, Związek 15) [52].

Uzyskane wyniki są kolejnym dowodem na słuszność rozwijania koncepcji stosowania inhibitorów reduktaz ANT jako związków mogących wspomagać terapię takimi lekami, jak DOX i DNR. Skłaniają także do poszukiwania chemotypów będących w stanie w odpowiedni sposób dopasowywać się do centrów aktywnych CBR1 i AKR1C3, pełniąc rolę dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3.

4.3 Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3

4.3.1 Optymalizacja wybranych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3 przy użyciu Induced-fit docking

Optymalizacja wybranych struktur krystalicznych CBR1

Obserwacje i wnioski zebrane w rozdziałach 4.1 oraz 4.2 wskazały na przewagę podejścia poszukiwań inhibitorów CBR1, w którym wykorzystywane są modele bez dodatkowego kofaktora. Wobec tego, w części badań poświęconej poszukiwaniu dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 postanowiono wykorzystać modele bez GSH, w których, dzięki większej przestrzeni centrum aktywnego, możliwe byłoby zadokowanie bardziej zróżnicowanych chemotypów o dodatkowych podstawnikach skierowanych w pobliże reszt Phe94, Met234 oraz Ala235. Na przyjęty sposób postępowania miała także wpływ analiza budowy znanych inhibitorów AKR1C3. Są to w większości związki o rozbudowanych strukturach (ich przykłady pokazano na **Rycinie 12** w rozdziale 3.2.3.2). W związku z tym, przed przystąpieniem do poszukiwania dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, przeprowadzono ponowną optymalizację struktur krystalicznych CBR1, tym razem przy użyciu bardziej zróżnicowanej puli ligandów narzędziowych (przedstawionych na **Rycinie 11** w rozdziale 3.2.3.2). Ponownie wykorzystano część związków użytych do wcześniejszych optymalizacji, których wynikiem było między innymi otrzymanie modelu 1WMA_A3. Dodatkowo wykorzystano związki będące przedstawicielami flawonoidów, pochodnych amidu kwasu cyjanonowego oraz 8-iminochromenu (ligandy oznaczone symbolami A₂-J₂). Poza kryształem 1WMA, w tej części badań wykorzystano również kryształ 2PFG, w którego centrum aktywnym, podobnie jak w kryształ 1WMA, nie znajdowała się cząsteczka GSH. Kolejną zmianą, w porównaniu z zastosowanym wcześniej podejściem, było przeprowadzenie dla każdego z kryształów po dwóch powtórzeniach IFD, które różniły się między sobą resztami aminokwasowymi, na których ustawiono wiązki farmakoforowe. Ponieważ większość związków, które zostały wyselekcjonowane we wcześniejszych prospektywnych wirtualnych skriningach, nawiązywała oddziaływania zarówno z Tyr193, jak i Ser139, przeprowadzono dodatkowe IFD z więzami

farmakoforowymi na drugiej z wymienionych reszt aminokwasowych. Wobec tego, liczba uzyskanych kompleksów cel-ligand uległa znacznemu zwiększeniu.

W wyniku optymalizacji kryształu 1WMA uzyskano 505 kompleksów cel-ligand ze zmienionym położeniem reszt aminokwasowych centrum aktywnego CBR1. W wyniku oceny jakościowej poprawności uzyskanych sposobów wiązania ligandów, do retrospektywnego wirtualnego skriningu wybrano 111 z nich, co stanowiło 21,98% wszystkich modeli. Była to wartość zbliżona do uzyskanej na tym etapie optymalizacji opisanej w rozdziale 4.1 (22,3%). Ligandami narzędziowymi, które najlepiej sprawdziły się w tej części badań, były związki oznaczone symbolami I₂, K₂, U₂, W₂. Z kolei, w wyniku wykorzystania IFD do optymalizacji struktury 2PFG otrzymano aż 741 nowych modeli strukturalnych. Poprzez ocenę jakościową otrzymanych kompleksów cel-ligand, do kolejnego etapu analizy wybrano 144 modele, co stanowiło 19,43% wszystkich kompleksów, a zatem nieznacznie mniej niż przy opisanych powyżej optymalizacjach struktury 1WMA. W przypadku tego kryształu, najwięcej modeli z poprawnym ułożeniem ligandów narzędziowych uzyskano dla związków K₂, L₂, O₂, T₂ oraz U₂.

Podsumowując, do kolejnego etapu oceny (retrospektywnego wirtualnego skriningu) wybrano 255 modeli CBR1. Wśród ligandów narzędziowych, które najlepiej sprawdziły się w optymalizacji przy użyciu IFD, były związki K₂ (do dalszych analiz wybrano 20 modeli zoptymalizowanych w oparciu o ten ligand), U₂ oraz W₂ (po 19 modeli). Z kolei najmniej modeli wybrano spośród zoptymalizowanych przy użyciu związków D₂ (2), F₂ (3) oraz N₂ (4). Analiza modeli, wybranych do retrospektywnego wirtualnego skriningu wskazała, że użycie bardziej rozbudowanych ligandów narzędziowych (A₂-J₂) nie skutkowało zwiększeniem liczby modeli wybranych do dalszej analizy. Liczba wyselekcjonowanych do retrospektywnego wirtualnego skriningu modeli, opartych o ligandy A₂-J₂, wyniosła średnio 7,7 dla każdego z nich. Z kolei dla mniej rozbudowanych związków (K₂-W₂) średnia wyniosła aż 14,8. W **Tabeli 10** przedstawiono podsumowanie optymalizacji kryształów 1WMA i 3BHJ przy użyciu wybranych ligandów CBR1. Jednak warto przypomnieć, że główny wyznacznik przydatności danego modelu był określany nie poprzez jakościową ocenę wizualną, a na drodze ustalenia parametrów

retrospektywnego wirtualnego skriningu (takich jak BEDROC i $EF_{1\%}$), opisanych poniżej.

Tab. 10: Podsumowanie procesu optymalizacji kryształów CBR1 (1WMA oraz 2PFG) przy użyciu metody IFD; retr. VS – retrospektywny wirtualny skrining.

| ligand narzędziowy użyty do optymalizacji | kryształ 1WMA | | kryształ 2PFG | |
|--|---|--|---|--|
| | liczba kompleksów uzyskanych w IFD | liczba kompleksów wybranych do retr. VS | liczba kompleksów uzyskanych w IFD | liczba kompleksów wybranych do retr. VS |
| A ₂ | 26 | 5 | 38 | 3 |
| B ₂ | 26 | 5 | 34 | 1 |
| C ₂ | 23 | 2 | 39 | 6 |
| D ₂ | 20 | 1 | 36 | 1 |
| E ₂ | 25 | 4 | 35 | 4 |
| F ₂ | 23 | 3 | 37 | 0 |
| G ₂ | 21 | 3 | 36 | 3 |
| H ₂ | 20 | 5 | 29 | 7 |
| I ₂ | 34 | 15 | 28 | 0 |
| J ₂ | 21 | 0 | 35 | 9 |
| K ₂ | 20 | 9 | 29 | 11 |
| L ₂ | 28 | 5 | 36 | 11 |
| M ₂ | 19 | 6 | 32 | 5 |
| N ₂ | 24 | 2 | 36 | 2 |
| O ₂ | 18 | 7 | 33 | 11 |
| P ₂ | 22 | 4 | 26 | 10 |
| Q ₂ | 21 | 5 | 30 | 10 |
| R ₂ | 27 | 3 | 29 | 8 |
| S ₂ | 24 | 5 | 38 | 10 |
| T ₂ | 21 | 5 | 32 | 11 |
| U ₂ | 23 | 8 | 37 | 11 |
| W ₂ | 19 | 9 | 36 | 10 |
| łącznie | 505 | 111 | 741 | 144 |

Optymalizacja wybranych struktur krystalicznych AKR1C3

W przeciwieństwie do CBR1, AKR1C3 jest enzymem będącym wielokrotnie obiektem badań krystalograficznych. Wynika to przede wszystkim z postrzegania go jako interesujący, potencjalny cel terapeutyczny. Znaczna ilość dostępnych kryształów AKR1C3 (blisko 50) wymusiła konieczność wstępnej selekcji struktur, które mogłyby zostać wykorzystane do optymalizacji konformacyjnej centrum

aktywnego enzymu. W ostatecznym wyborze uwzględniono przede wszystkim ich jakość (rozdzielczość kryształu 2 Å lub lepsza) oraz kompletność - w wielu dostępnych strukturach krystalicznych brakowało współrzędnych przestrzennych atomów tworzących kolejne reszty aminokwasowe lub nawet większych fragmentów sekwencji (np. w kryształach 3UFY, 4WDX, 3R6I). Struktury AKR1C3 przeanalizowano także pod kątem tego, z jakimi ligandami zostały współwykryształizowane. Wykluczono kryształy bez ligandów w centrum aktywnym bądź z ligandami o budowie nielekopodobnej (np. 1RY0 wykryształizowany z prostaglandyną G2 i 5HNU wykryształizowany z gallusanem oktylu). W wyniku analiz, do optymalizacji wybrano 5 struktur, wymienionych w rozdziale 3.2.3.2: 1S2A, 1S2C, 4ZFC, 6F78 oraz 7C7G. Podobnie jak podczas wcześniejszej optymalizacji CBR1, również w przypadku AKR1C3 zastosowano 2 powtórzenia IFD z różnymi więzami farmakoforowymi – na resztach aminokwasowych Tyr55 oraz His117.

Podobnie jak w przypadku struktur krystalicznych, również znaczna liczba znanych ligandów AKR1C3 wymusiła zawężenie puli ligandów narzędziowych jedynie do wybranych chemotypów. Początkowe próby optymalizacji i oceny modeli uzyskanych przy użyciu zróżnicowanych chemotypów ligandów narzędziowych kończyły się niepowodzeniem, gdyż dla modeli nie uzyskiwano poprawy parametrów, w porównaniu z nieoptymalizowanymi strukturami krystalicznymi AKR1C3 (badania własne nieprzedstawione w niniejszej rozprawie). Wobec tego, zdecydowano o wykorzystaniu jedynie ligandów (a dokładniej inhibitorów), którymi byli wybrani przedstawiciele niesteroidowych leków przeciwzapalnych (związki najczęściej występujące w kryształach AKR1C3 wraz z białkiem) oraz związki uzyskane w projekcie, którego wynikiem było otrzymanie związku ASP9521. Dodatkową korzyścią wykorzystania takiego postępowania było to, że wszystkie użyte ligandy narzędziowe były związkami, które zostały już wcześniej wykryształizowane w centrum aktywnym AKR1C3, co znacznie ułatwiło ocenę jakościową modeli uzyskanych w wyniku optymalizacji.

W **Tabeli 11** przedstawiono podsumowanie optymalizacji 5 struktur krystalicznych AKR1C3 przy użyciu metody IFD. Podano w niej liczbę modeli

wybranych do dalszej oceny (poprzez retrospektywny wirtualny skrining), a także sumę modeli wybranych w oparciu o zastosowanie danego kryształu/liganda.

Tab. 11: Podsumowanie procesu optymalizacji wybranych kryształów AKR1C3 przy użyciu metody IFD; retr. VS – retrospektywny wirtualny skrining.

| ligand narzędziowy użyty do optymalizacji | liczba kompleksów wybranych do retr. VS | | | | | |
|--|---|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | 1S2C | 4ZFC | 1S2A | 6F78 | 7C7G | łącznie |
| A ₃ | 6 | 2 | 0 | 5 | 2 | 15 |
| B ₃ | 6 | 2 | 2 | 2 | 2 | 14 |
| C ₃ | 8 | 7 | 3 | 12 | 10 | 40 |
| D ₃ | 10 | 4 | 5 | 2 | 5 | 26 |
| E ₃ | 9 | 1 | 7 | 5 | 3 | 25 |
| F ₃ | 5 | 10 | 10 | 10 | 9 | 44 |
| G ₃ | 10 | 8 | 7 | 10 | 12 | 47 |
| H ₃ | 10 | 9 | 5 | 8 | 8 | 40 |
| I ₃ | 7 | 9 | 5 | 11 | 5 | 37 |
| J ₃ | 5 | 2 | 1 | 3 | 1 | 12 |
| K ₃ | 10 | 10 | 6 | 7 | 4 | 37 |
| L ₃ | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 50 |
| M ₃ | 5 | 2 | 2 | 2 | 6 | 17 |
| łącznie | 101 | 76 | 63 | 87 | 77 | 404 |

Do kolejnego etapu analiz wybrano 404 modele. Najwięcej, bo aż 25%, stanowiły modele zoptymalizowane w oparciu o kryształ 1S2C. Z kolei najmniej modeli, bo zaledwie 63, było opartych na kryształ 1S2A. Było to o tyle zaskakujące, że ligandami, wykorzystanymi podczas krystalizacji obu kryształów były NLPZ, odpowiednio kwas flufenamowy i indometacyna. Można się zatem było spodziewać, że inni przedstawiciele NLPZ także będą w stanie uzyskać odpowiedni sposób wiązania z wymienionymi kryształami. Jednak w przeprowadzonych badaniach udało się to uzyskać wyłącznie w przypadku kryształu 1S2C. Dla pozostałych struktur uzyskano między 76-87 modeli, które spełniały kryterium oceny jakościowej (obecność wiązań wodorowych z Tyr55 i His117) i zostały skierowane do dalszej oceny.

W trakcie analizy otrzymanych modeli AKR1C3 nie odnotowano ligandów narzędziowych, które nie byłyby w stanie nawiązać właściwych (obecnych w kryształach) oddziaływań z najistotniejszymi resztami aminokwasowymi enzymu. Co prawda 3 ligandy (B₃, J₃ oraz M₃) miały mniejsze zastosowanie w porównaniu z pozostałymi związkami (kolejno 14, 12 i 17 wybranych do retrospektywnego skryningu modeli przy średniej około 31 modeli na każdy użyty ligand), jednak były to i tak korzystniejsze wyniki niż te uzyskane dla części ligandów narzędziowych użytych w optymalizacjach CBR1.

Podobnie jak przy poszukiwaniach nowych inhibitorów CBR1, modele uzyskane dzięki IFD, które następnie przeszły pomyślnie ocenę ułożenia i sposobu wiązania w centrum aktywnym CBR1/AKR1C3, zostały zakodowane poprzez nadanie czteroelementowych oznaczeń, według poniższego wzoru:

| <i>kod PDB kryształu</i> | <i>więzy farmakoforowe (constraints)</i> | <i>ligand użyty w IFD</i> | <i>numer kolejnego kompleksu z ligandem</i> |
|------------------------------|--|------------------------------------|---|
| dla CBR1: | dla CBR1: | dla CBR1: | |
| 1 – 1WMA | 1 – Ser139 | A ₍₂₎ -W ₍₂₎ | |
| 2 – 2PFG | 2 – Tyr193 | | |
| dla AKR1C3: | dla AKR1C3: | dla AKR1C3: | |
| 3 – 1S2C | 3 – Tyr55 | A ₍₃₎ -M ₍₃₎ | |
| 4 – 4ZFC | 4 – His117 | | |
| 5 – 1S2A | | | |
| 6 – 6F78 | | | |
| 7 – 7C7G | | | |

Przykładowo, oznaczenie 74L2 kodowało drugi z kolei model AKR1C3, uzyskany poprzez optymalizację kryształu 7C7G, przy użyciu liganda L₃ (ligandy przedstawione na **rycinach 11 i 12** w rozdziale 3.2.3.2).

4.3.2 Retrospektywny wirtualny skrining wybranych modeli CBR1 i AKR1C3

Retrospektywny wirtualny skrining i ocenę modeli przeprowadzono w taki sam sposób, jaki zastosowano w przeprowadzonych wcześniej poszukiwaniach nowych inhibitorów CBR1 (zadokowanie do każdego z modeli ligandów narzędziowych wykorzystanych wcześniej w IFD oraz wygenerowanych na podstawie ich struktur puli fałszywych ligandów). Jednak zastosowanie więcej niż jednego kryształu każdego z enzymów oraz dwóch różnych więzów farmakoforowych dla każdego z nich spowodowało zwiększenie liczby wstępnych, nieoptymalizowanych modeli (struktur krystalicznych), które można było uznać za modele odniesienia (nieoptymalizowane). W związku z tym, za modele odniesienia uznano te spośród nieoptymalizowanych struktur krystalicznych, które cechowały się najkorzystniejszymi wartościami parametru $BEDROC_{\alpha=20}$. Dla CBR1 był to model kryształu 1WMA z więzami farmakoforowymi ustawionym na reszcie Ser139 (**11_unopt**; $BEDROC_{\alpha=20} = 0,571$). Z kolei w przypadku AKR1C3, modelem odniesienia była struktura oparta na kryształach 1S2C, z więzami farmakoforowymi na reszcie Tyr55 (**33_unopt**; $BEDROC_{\alpha=20} = 0,368$). Pełen zestaw parametrów, uzyskanych dla obu modeli odniesienia, przedstawiono w **Tabeli 12**.

Retrospektywny wirtualny skrining wybranych modeli CBR1

W opisywanym etapie badań oceniono zdolność rozpoznawania ligandów CBR1 przez 255 wyselekcjonowanych modeli enzymu. Procedurę przeprowadzono także dla modelu 1WMA_A3, użytego wcześniej w skriningach prowadzących do wyłonienia nowych inhibitorów CBR1. Jak zaznaczono w poprzednim rozdziale, poszerzenie puli ligandów narzędziowych o związki o bardziej rozbudowanych strukturach mogło wpłynąć na zdolność rozpoznawania tych ligandów przez opisywany model, który pierwotnie został zoptymalizowany pod kątem dopasowania nieco mniejszych związków. Po zadokowaniu puli ligandów i fałszywych ligandów oraz oszacowaniu parametrów retrospektywnego skriningu, model 1WMA_A3 cechował się wartością $BEDROC_{\alpha=20}$ równą 0,538, a zatem niższą niż dla modelu 11_unopt, służącego jako model odniesienia. Opisany przykład obrazuje kluczowe znaczenie rodzaju ligandów wybranych w celu optymalizacji struktur krystalicznych.

Mimo że komputerowo-wspomagane projektowanie leków jest otwarte na poszukiwanie zupełnie nowych chemotypów ligandów celów biologicznych, ocena badacza i wybór odpowiedniej puli ligandów narzędziowych do optymalizacji może, w pewnym stopniu, promować modele, do których lepiej będą się dopasowywały związki o pewnych określonych właściwościach, na przykład rozmiarze. W badaniach poświęconych nowym inhibitorom CBR1 brano pod uwagę obecność GSH w centrum aktywnym enzymu, zatem optymalizację przeprowadzono przy pomocy ligandów narzędziowych o niewielkich rozmiarach. Z kolei przy poszukiwaniu dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, spodziewając się lepszej aktywności bardziej rozbudowanych związków, skorzystano z dostępnych ligandów o większych rozmiarach.

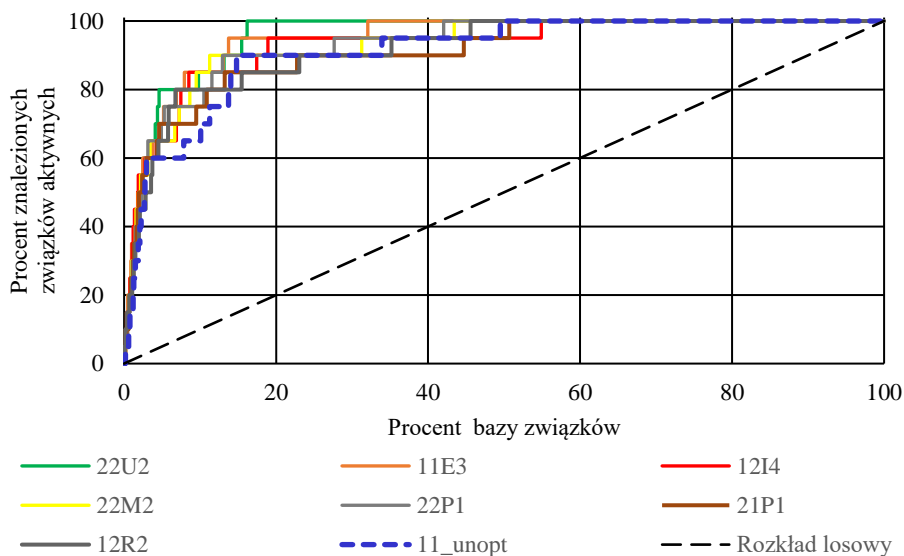
Spośród 255 modeli CBR1, opartych na strukturze 1WMA, które zostały poddane ocenie w retrospektywnym wirtualnym skriningu, 38 wykazało wartość parametru $BEDROC_{\alpha=20}$ wyższą niż uzyskana dla modelu nieoptymalizowanego (14,9% analizowanych modeli). Procentowo była to wartość niższa w porównaniu z modelami uzyskanymi w badaniach nad nowymi inhibitorami CBR1 (30,36%, szczegóły w rozdziale 4.1.2). Należy jednak zaznaczyć, że wartość parametru $BEDROC_{\alpha=20}$ dla nieoptymalizowanego modelu odniesienia w bieżącym rozdziale była znacząco wyższa niż dla analogicznego modelu z poprzedniej części badań (0,571 przy 0,484 dla modelu 1WMA_unopt).

Ligandami narzędziowymi, przy użyciu których uzyskano najwięcej modeli o korzystniejszej wartości parametru $BEDROC_{\alpha=20}$, w porównaniu z modelem 11_unopt, były ligandy K_2 i P_2 (w sumie 13 z 38 modeli). 15 modeli było utworzonych na bazie struktury krystalicznej 1WMA, natomiast 23 na kryształach 2PFG. Jednak proporcja ta może wynikać z większej liczby modeli uzyskanych w wyniku optymalizacji kryształu 2PFG, których użyteczność była sprawdzana w retrospektywnym wirtualnym skriningu, a niekoniecznie z lepszych właściwości samej struktury krystalicznej, pozwalających na skuteczniejsze dopasowywanie się do niej ligandów.

Analiza pozostałych parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu doprowadziła do wyselekcjonowania 7 modeli CBR1, dla których wszystkie

oceniane wskaźniki uległy poprawie w porównaniu z modelem 11_unopt. Były to 4 modele uzyskane na bazie struktury krystalicznej 2PFG i 3 na bazie kryształu 1WMA. Nie odnotowano natomiast, aby którykolwiek z ligandów narzędziowych, użytych do optymalizacji CBR1 w tej części badań, umożliwił uzyskanie istotnie wyższej liczby modeli o korzystniejszych ocenach retrospektywnego wirtualnego skriningu. Spośród 7 wybranych modeli, 2 zostały uzyskane w wyniku optymalizacji przy użyciu liganda P₂, natomiast po jednym modelu uzyskano używając ligandów E₂, I₂, M₂, R₂ oraz U₂.

Zestawienie wartości parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu najlepiej ocenionych modeli CBR1 przedstawiono w **Tabeli 12a**. Natomiast **Rycina 32** przedstawia wykresy wzbogacenia bazy zoptymalizowanych modeli, porównawszy je z modelem 11_unopt oraz rozkładem losowym. Wszystkie prezentowane poniżej modele CBR1 zostały następnie poddane dodatkowej ocenie przy użyciu symulacji MD.



Ryc. 32: Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie modelu odniesienia 11_unopt z wybranymi modelami CBR1 uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD.

Tab. 12: Zestaw parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu najlepszych modeli uzyskanych w wyniku optymalizacji wybranych kryształów CBR1 (a) oraz AKR1C3 (b).

a

| Nazwa modelu | BEDROC _{$\alpha=20$} | ROC | EF _{1%} | EF _{5%} | EF _{10%} | Eff _{1%} | Eff _{5%} | Eff _{10%} | Act _{1%} | Act _{5%} | Act _{10%} |
|-----------------|--|-------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 22U2 | 0,702 | 0,97 | 31 | 16 | 8,5 | 0,951 | 0,882 | 0,789 | 30 | 80 | 85 |
| 11E3 | 0,698 | 0,96 | 36 | 14 | 8,5 | 0,957 | 0,875 | 0,789 | 35 | 70 | 85 |
| 12I4 | 0,679 | 0,94 | 31 | 13 | 8,5 | 0,964 | 0,857 | 0,789 | 30 | 65 | 85 |
| 22M2 | 0,665 | 0,94 | 31 | 13 | 8,5 | 0,961 | 0,857 | 0,800 | 30 | 65 | 85 |
| 22P1 | 0,659 | 0,94 | 26 | 14 | 7,5 | 0,957 | 0,875 | 0,778 | 25 | 70 | 75 |
| 21P1 | 0,641 | 0,92 | 26 | 14 | 7,5 | 0,957 | 0,867 | 0,778 | 25 | 70 | 75 |
| 12R2 | 0,628 | 0,93 | 20 | 13 | 8 | 0,944 | 0,875 | 0,778 | 20 | 65 | 80 |
| <i>11_unopt</i> | <i>0,571</i> | <i>0,91</i> | <i>15</i> | <i>12</i> | <i>6,5</i> | <i>0,935</i> | <i>0,846</i> | <i>0,750</i> | <i>15</i> | <i>60</i> | <i>65</i> |

b

| Nazwa modelu | BEDROC _{$\alpha=20$} | ROC | EF _{1%} | EF _{5%} | EF _{10%} | Eff _{1%} | Eff _{5%} | Eff _{10%} | Act _{1%} | Act _{5%} | Act _{10%} |
|-----------------|--|-------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 74H1 | 0,643 | 0,96 | 22 | 15 | 8,5 | 0,937 | 0,878 | 0,805 | 23,1 | 76,9 | 84,6 |
| 33A2 | 0,532 | 0,96 | 7,3 | 11 | 8,5 | 0,770 | 0,830 | 0,805 | 7,7 | 53,8 | 84,6 |
| 74L5 | 0,514 | 0,88 | 22 | 11 | 7 | 0,917 | 0,830 | 0,748 | 23,1 | 53,8 | 69,2 |
| 54L4 | 0,508 | 0,86 | 29 | 9,3 | 7 | 0,949 | 0,830 | 0,748 | 23,1 | 46,2 | 69,2 |
| 73C6 | 0,484 | 0,92 | 22 | 9,3 | 6,2 | 0,937 | 0,805 | 0,720 | 15,4 | 46,2 | 61,5 |
| 33E3 | 0,474 | 0,89 | 22 | 11 | 6,2 | 0,917 | 0,830 | 0,720 | 15,4 | 53,8 | 61,5 |
| 74L1 | 0,471 | 0,87 | 15 | 11 | 6,2 | 0,878 | 0,830 | 0,720 | 15,4 | 53,8 | 61,5 |
| 33E4 | 0,459 | 0,91 | 15 | 9,3 | 7 | 0,917 | 0,830 | 0,770 | 15,4 | 46,2 | 69,2 |
| <i>33_unopt</i> | <i>0,368</i> | <i>0,85</i> | <i>7,3</i> | <i>7,7</i> | <i>4,6</i> | <i>0,770</i> | <i>0,770</i> | <i>0,687</i> | <i>7,7</i> | <i>38,5</i> | <i>46,2</i> |

Retrospektywny wirtualny skrining wybranych modeli AKR1C3

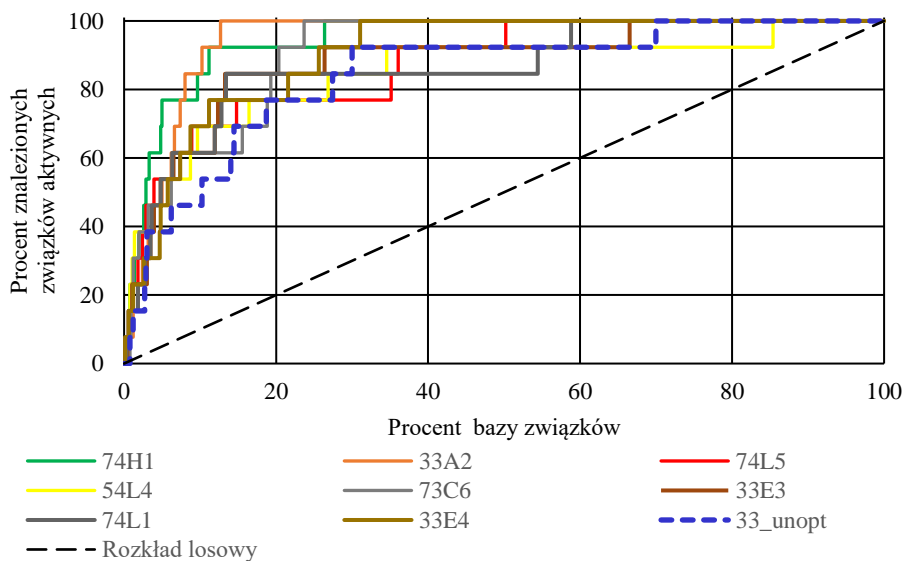
W ramach retrospektywnego wirtualnego skriningu oceniono 404 modele AKR1C3, z których 66 (16,3%) wykazało wyższą wartość parametru $BEDROC_{\alpha=20}$ w porównaniu z modelem odniesienia 33_unopt (0,368). W przypadku tego celu biologicznego, zdecydowanie trudniej było uzyskać modele, które byłyby w stanie dostatecznie dobrze rozróżniać znane ligandy AKR1C3 od, utworzonych na ich podstawie, fałszywych ligandów. Mogło to być spowodowane odmienną niż w przypadku CBR1 budową centrum aktywnego AKR1C3, zawierającego dodatkowe podkieszenie oraz tzw. kanał steroidowy (dokładniejszy opis budowy centrum aktywnego tego enzymu przedstawiono w rozdziale 1.3). Większa objętość centrum aktywnego mogła utrudniać selekcję ligandów od fałszywych ligandów oraz uzyskiwanie odpowiedniego sposobu wiązania z celem biologicznym. Jednak nawet przy tak utrudnionym zadaniu, jeden ligand narzędziowy (związek L_3) umożliwił uzyskanie zdecydowanie większej liczby modeli o korzystnych parametrach retrospektywnego wirtualnego skriningu (15 spośród 66 zoptymalizowanych modeli zostało uzyskanych w oparciu o ten właśnie ligand). Warto zaznaczyć, że związek L_3 był najbardziej podobny do opisywanego we wcześniejszym rozdziale ASP9521. Poza modelami opartymi na bazie związku L_3 , również związki H_3 oraz I_3 okazały się ligandami, dzięki którym, w wyniku optymalizacji, uzyskano znaczną ilość korzystnie ocenionych modeli AKR1C3 (kolejno 9 i 8). Podsumowanie tego, które ligandy najlepiej sprawdziły się w uzyskiwaniu modeli o najlepszych ocenach przy użyciu retrospektywnego wirtualnego skriningu, przedstawiono w **Tabeli 13**.

Spośród struktur krystalicznych, na bazie których opracowywano nowe modele AKR1C3, najwięcej korzystnie ocenionych modeli otrzymano w oparciu o kryształ 1S2C (21 modeli). Potwierdziło to wysoką użyteczność tej struktury krystalicznej, sygnalizowaną już na etapie wykorzystania IFD. Z kolei najmniej korzystnie ocenionych modeli uzyskano w oparciu o optymalizację struktury 4ZFC (8 modeli).

Tab. 13: Podsumowanie retrospektywnego wirtualnego skriningu nowych modeli AKR1C3; retr. VS – retrospektywny wirtualny skrining; 33_unopt – model odniesienia stanowiący niezoptymalizowany kryształ 1S2C.

| ligand narzędziowy użyty do optymalizacji | liczba kompleksów użytych w retr. VS | kompleksy o wartości parametru BEDROC _{$\alpha=20$} > 0,368 | kompleksy o parametrach korzystniejszych od 33_unopt |
|---|---|---|---|
| A ₃ | 15 | 4 | 1 |
| B ₃ | 14 | 1 | 0 |
| C ₃ | 40 | 5 | 1 |
| D ₃ | 26 | 2 | 0 |
| E ₃ | 25 | 3 | 2 |
| F ₃ | 44 | 6 | 0 |
| G ₃ | 47 | 6 | 0 |
| H ₃ | 40 | 9 | 1 |
| I ₃ | 37 | 8 | 0 |
| J ₃ | 12 | 3 | 0 |
| K ₃ | 37 | 1 | 0 |
| L ₃ | 50 | 15 | 3 |
| M ₃ | 17 | 3 | 0 |

Analiza pozostałych parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu, mająca na celu pozostawienie w analizie jedynie tych modeli, które cechowałyby się poprawą wartości wszystkich wskaźników w porównaniu z 33_unopt, skutkowałą zawężeniem puli modeli do 7. Zostały one przeznaczone do dodatkowej oceny na drodze symulacji MD. Jako ósmy uwzględniono model 33E3, który, mimo że nie wykazał poprawy parametrów retrospektywnego skriningu w pierwszym procencie analizowanej bazy zadokowanych związków, uzyskał znaczną poprawę pozostałych wskaźników. Był to również model o drugiej najwyższej wartości parametru BEDROC _{$\alpha=20$} spośród wszystkich analizowanych modeli (0,532). Wobec tego, mając na uwadze zarówno korzystną ocenę, jak również niewielką liczbę modeli wytypowanych do dalszej analizy, zdecydowano o uwzględnieniu tego modelu w dalszych analizach. Komplet wartości wszystkich parametrów retrospektywnego wirtualnego skriningu modeli wybranych do symulacji MD przedstawiono w **Tabeli 12b**. Z kolei na **Rycinie 33** przedstawiono wykres wzbogacenia bazy uzyskany dla opisywanych modeli.



Ryc. 33: Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie modelu odniesienia 33_unopt z modelami AKR1C3 uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD.

Spośród pięciu struktur krystalicznych, wykorzystanych do optymalizacji modeli AKR1C3, największą użytecznością cechowały się kryształy 7C7G oraz 1S2C. Do symulacji MD wybrano kolejno 4 i 3 modele uzyskane w oparciu o wymienione struktury krystaliczne. Inaczej niż przy optymalizacji CBR1, jeden spośród modeli AKR1C3 – 74H1 – wyróżniał się szczególnie korzystnymi parametrami retrospektywnego skringingu, zwłaszcza analizując pierwszy procent bazy wyników. Nie zmieniło to jednak podejścia stosowanego przy wyborze optymalnych modeli do prospektywnego skringingu - nie zrezygnowano z dodatkowej oceny na drodze symulacji MD. Mimo wyróżniających się wartości parametrów modelu 74H1 należy podkreślić, że optymalizacja struktur krystalicznych AKR1C3 okazała się trudniejsza w porównaniu z przeprowadzoną wcześniej dla CBR1. Pomimo tego, że model odniesienia 33_unopt cechował się przeciętnymi wartościami parametrów skringingu ($BEDROC_{\alpha=20} = 0,368$; $ROC = 0,85$), zaledwie 7 spośród 404 ocenianych modeli wykazało poprawę wszystkich analizowanych parametrów. Napotkane trudności mogły wynikać ze wspomnianej już złożoności budowy centrum aktywnego AKR1C3. Mogły być również wynikiem wciąż znacznego różnicowania strukturalnego ligandów narzędziowych użytych w optymalizacji

i retrospektywnym wirtualnym skriningu. Mimo że większość z tych ligandów stanowiły cząsteczki zaliczane do NLPZ, każdy z nich wykazywał różnice w budowie, które były większe niż w przypadku większości ligandów narzędziowych wykorzystywanych w optymalizacjach CBR1.

4.3.3 Ocena stabilności wybranych modeli CBR1 i AKR1C3 z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej, wybór modeli do prospektywnego wirtualnego skriningu

Symulacje MD wybranych modeli CBR1

W tej części analiz zastosowano podejście wykorzystane już z powodzeniem w selekcji modeli pod kątem poszukiwań nowych inhibitorów CBR1. Poddano ocenie stabilność ułożenia hydroxy-PP w centrum aktywnym enzymu. Za kryteria oceny przyjęto przedstawione wcześniej (**Rycina 16**) odległości między kluczowymi, z punktu widzenia przeprowadzenia reakcji enzymatycznej, elementami liganda oraz kompleksu enzymatycznego (reszta Tyr193 i atom węgla NADP(H)). W związku z tym, że w tej części badań nie przeprowadzano symulacji modeli opartych na strukturze 3BHJ, które okazały się znacznie mniej stabilne, w porównaniu z modelami uzyskanymi na bazie kryształu 1WMA, wydłużono czas symulacji z 20 do 50 ns (aby uzyskać szerszą charakterystykę kompleksów).

W **Tabeli 14a** przedstawiono średnie odległości zmierzone w kolejnych zakresach czasowych symulacji MD wybranych modeli CBR1. Zarówno modele uzyskane na bazie kryształu 1WMA, jak i 2PFG, cechowały się znaczną stabilnością zadokowanych ligandów w całym zakresie prowadzonych symulacji. Zadawalająca stabilność kompleksów, uzyskanych w oparciu o strukturę 2PFG, była kolejną przesłanką wskazującą na to, że za niestabilność modeli otrzymanych w wyniku optymalizacji kryształu 3BHJ odpowiadała cząsteczka GSH, która oddziałując zarówno z NADP⁺, jak i redokowanym hydroxy-PP, powodowała zwiększenie niestabilności konformacyjnej liganda, a w konsekwencji tendencję do tracenia przez niego optymalnego położenia w obrębie centrum aktywnego enzymu.

Tab. 14: Ocena stabilności hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanych modeli CBR1 (a) i AKR1C3 (b) - średnie odległości, uzyskane w kolejnych przedziałach czasowych 50 ns symulacji MD

a

| Nazwa modelu | średnia odległość hydroxy-PP – Tyr193 [Å] | | | | | średnia odległość hydroxy-PP – NADP(H) [Å] | | | | |
|--------------|---|----------|----------|----------|----------|--|----------|----------|----------|----------|
| | 0-10 ns | 10-20 ns | 20-30 ns | 30-40 ns | 40-50 ns | 0-10 ns | 10-20 ns | 20-30 ns | 30-40 ns | 40-50 ns |
| 22U2 | 3,17 | 4,03 | 4,36 | 3,53 | 3,47 | 3,84 | 4,05 | 4,27 | 3,91 | 3,85 |
| 11E3 | 3,25 | 3,38 | 3,01 | 2,92 | 4,33 | 3,95 | 4,04 | 3,85 | 3,78 | 3,86 |
| 12I4 | 3,94 | 3,83 | 3,66 | 5,05 | 5,30 | 4,79 | 5,01 | 5,24 | 5,38 | 5,43 |
| 22M2 | 2,80 | 3,13 | 3,20 | 2,79 | 3,51 | 3,66 | 4,10 | 4,51 | 4,48 | 4,66 |
| 22P1 | 3,71 | 6,68 | 4,51 | 3,14 | 2,79 | 4,02 | 5,03 | 4,18 | 4,00 | 4,17 |
| 21P1 | 2,77 | 3,37 | 4,57 | 5,14 | 4,09 | 3,62 | 3,99 | 3,93 | 5,92 | 5,98 |
| 12R2 | 3,14 | 3,52 | 5,12 | 4,99 | 3,99 | 4,14 | 5,03 | 5,37 | 6,10 | 6,57 |

b

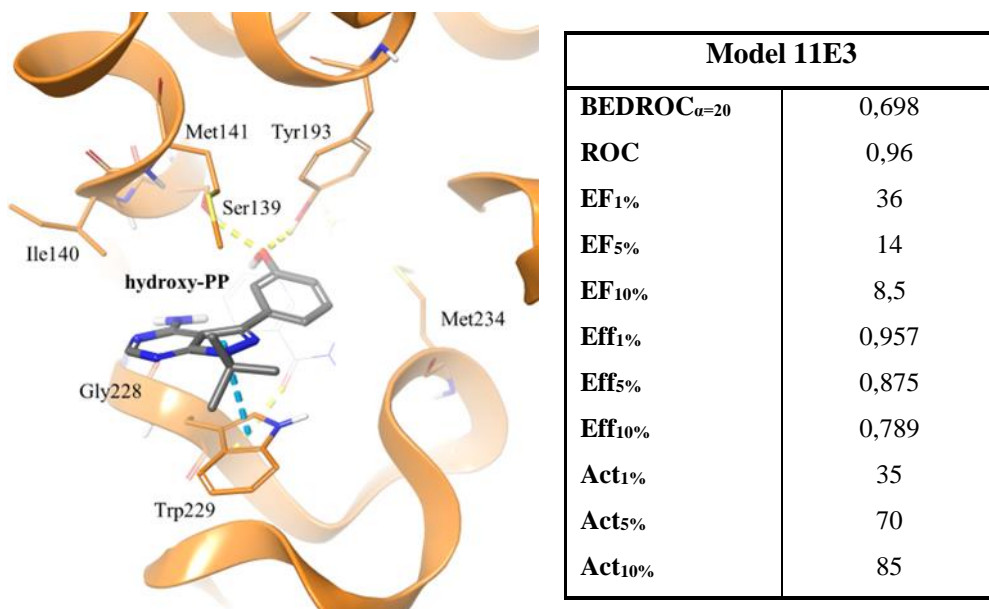
| Nazwa modelu | średnia odległość WDW – Tyr55 [Å] | | | | | średnia odległość WDW – NADP(H) [Å] | | | | |
|--------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 0-10 ns | 10-20 ns | 20-30 ns | 30-40 ns | 40-50 ns | 0-10 ns | 10-20 ns | 20-30 ns | 30-40 ns | 40-50 ns |
| 74H1 | 2,71 | 2,77 | 2,76 | 3,20 | 2,94 | 3,66 | 3,76 | 3,74 | 3,76 | 3,72 |
| 33A2 | 7,75 | 8,44 | 8,39 | 8,46 | 7,64 | 5,05 | 5,35 | 5,34 | 5,38 | 5,42 |
| 74L5 | 2,74 | 2,76 | 2,82 | 3,37 | 4,05 | 3,61 | 3,64 | 3,59 | 3,65 | 3,65 |
| 54L4 | 2,76 | 2,74 | 2,75 | 2,77 | 2,77 | 3,69 | 3,66 | 3,63 | 3,59 | 3,60 |
| 73C6 | 2,77 | 2,79 | 2,75 | 2,73 | 2,74 | 3,71 | 3,68 | 3,66 | 3,63 | 3,60 |
| 33E3 | 2,75 | 2,73 | 2,79 | 2,77 | 2,78 | 3,64 | 3,58 | 3,59 | 3,57 | 3,61 |
| 74L1 | 2,80 | 2,82 | 2,81 | 2,84 | 2,85 | 3,62 | 3,66 | 3,75 | 3,75 | 3,69 |
| 33E4 | 2,75 | 4,00 | 5,09 | 10,68 | 11,49 | 3,73 | 4,25 | 4,98 | 9,35 | 10,62 |

W pierwszych 20 ns symulacji jedynie dla modelu 22P1 zaobserwowano utratę stabilności hydroxy-PP w centrum aktywnym (między 10-20 ns). Natomiast dla pozostałych modeli średnie odległości między ligandem a kompleksem enzymatycznym nie odbiegały od uzyskanych dla modeli optymalizowanych i opisywanych w rozdziale 4.1 (zaobserwowano jedynie nieznacznie większe odległości między atomem węgla hydroxy-PP a fragmentem NADPH). Dla większości modeli CBR1 nie zaobserwowano istotnego zwiększenia analizowanych odległości (które oznaczałyby utratę stabilności hydroxy-PP w centrum aktywnym) także w kolejnych przedziałach czasowych symulacji. Jedynie modele 21P1 i 12R2 wykazały znaczne pogorszenie analizowanych parametrów między 30-50 ns symulacji. Z kolei w modelu 12I4 zaobserwowano stopniowe oddalanie się hydroxy-PP od optymalnego położenia w centrum aktywnym CBR1, jednak nie było ono tak gwałtowne jak dla dwóch przywołanych wcześniej modeli, w których doszło do nagłej zmiany położenia liganda w drugiej połowie symulacji.

Największą stabilnością podczas symulacji MD cechowały się dwa modele, które we wcześniejszych badaniach uzyskały najkorzystniejsze wartości parametrów retrospektywnego wirtualnego skringingu: 22U2 oraz 11E3. Wobec tego finalny wybór modelu do wykorzystania w prospektywnym skringingu, zawężono do dwóch wymienionych modeli. Po przeprowadzeniu ponownej analizy parametrów retrospektywnego wirtualnego skringingu oraz oceny wizualnej uzyskanych póz, do dalszych analiz wybrano model **11E3**. W ocenie wizualnej nie zaobserwowano poważnych odstępstw od poprawnego sposobu wiązania zadokowanych ligandów narzędziowych, zarówno w modelu 11E3, jak i 22U2. Z kolei analiza parametrów skringingu wykazała, że model 11E3 miał co prawda nieznacznie niższe wartości parametrów $BEDROC_{\alpha=20}$ (0,702 vs 0,698) oraz ROC (0,97 vs 0,96) w porównaniu z modelem 22U2, jednak o jego wyborze zdecydowała znacznie korzystniejsza wartość parametru EF, uzyskana dla pierwszego procenta analizowanej bazy wyników – 36 dla modelu 11E3 w porównaniu z 31 dla modelu 22U2. W związku z tym, że analizę wyników prospektywnego wirtualnego skringingu zaplanowano przeprowadzić dla maksymalnie 1% najlepiej ocenionych związków, kryterium

EF_{1%}, wraz z parametrem BEDROC _{$\alpha=20$} uznano za kluczowe w końcowej ocenie modeli CBR1 i AKR1C3.

Na **Rycinie 34** przedstawiono ujęcie centrum aktywnego modelu 11E3 z redokowanym hydroxy-PP, stanowiące punkt wyjściowy w przeprowadzonej symulacji MD. Podano również parametry retrospektywnego wirtualnego skriningu opisujące wybrany model.



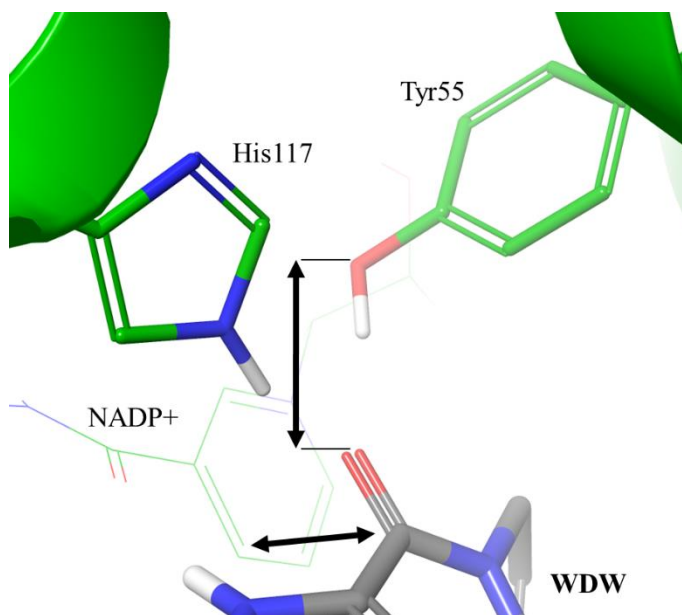
Ryc. 34: Sposób wiązania hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu CBR1 oznaczonego kodem 11E3 (uwidoczniiono reszty aminokwasowe będące w odległości do 3 Å od liganda). Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania π - π zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

Symulacje MD wybranych modeli AKR1C3

W ocenie modeli AKR1C3 przyjęto podejście opisane we wcześniejszych optymalizacjach modeli CBR1. W ciągu 50 ns symulacji MD oceniono zachowanie kompleksu enzym-ligand oraz możliwość utrzymania korzystnego położenia liganda w obrębie centrum aktywnego AKR1C3. Ligandem, który wykorzystano w tej części badań, był związek WDW. Został on wybrany jako związek, który najlepiej sprawdził się w optymalizacji modeli enzymu przy pomocy IFD (oznaczony w tej części jako ligand narzędziowy L₃). Dodatkowo, na korzyść WDW przemawiało to,

że nie był ligandem występującym w którymkolwiek z kryształów, na bazie których uzyskano modele poddane symulacjom MD (1S2C, 1S2A, 7C7G).

W ramach oceny stabilności WDW w centrum aktywnym AKR1C3 przeprowadzono pomiar i analizę odległości między elementami liganda i kompleksu enzymatycznego, które w wypadku wiązania substratu mają kluczowe znaczenie dla przeprowadzenia reakcji katalitycznej. Ocenie poddano odległość między atomem tlenu grupy amidowej WDW, a atomem tlenu grupy hydroksylowej reszty aminokwasowej Tyr55. Drugim pomiarem była odległość między atomem węgla, stanowiącym element grupy amidowej WDW, a atomem węgla pirydyny NADP(H), który podczas reakcji enzymatycznej ulega odprotonowaniu. Odległości, które poddano analizie, przedstawiono na **Rycinie 35**.



Ryc. 35: Odległości między WDW, a kluczowymi elementami kompleksu enzymatycznego AKR1C3, oceniane podczas 50 ns symulacji MD (na przykładzie modelu uzyskanego na bazie struktury krystalicznej 7C7G).

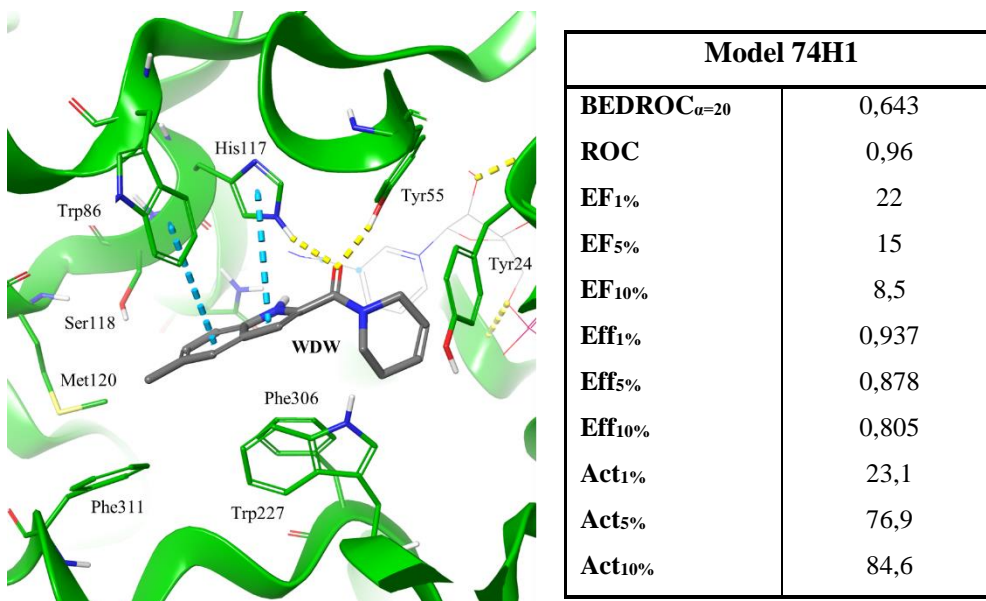
Średnie odległości między analizowanymi elementami modeli AKR1C3 i WDW, uzyskane w kolejnych przedziałach czasowych symulacji MD, przedstawiono w **Tabeli 14b**. Zarówno reszty aminokwasowe modeli AKR1C3, jak i użyty w symulacjach ligand (WDW), wykazywały znaczną stabilność konformacyjną w ciągu 50 ns symulacji. Uzyskane w wyniku symulacji trajektorie,

które zostały poddane wstępnej ocenie wizualnej, różniły się pod tym względem od większości modeli CBR1. Znaczna stabilność została potwierdzona w pomiarach odległości między wymienionymi wcześniej elementami WDW i kompleksu enzymatycznego. Dla sześciu spośród ośmiu analizowanych modeli zarejestrowano bardzo zbliżone średnie wartości mierzonych odległości. Jedyne w przypadku modeli 33A2 oraz 33E4 miało miejsce stopniowe oddalanie się liganda od centrum aktywnego enzymu. Znaczna stabilność analizowanych modeli, w porównaniu z modelami CBR1, mogła wynikać z odmiennego otoczenia centrów aktywnych obu enzymów. W przypadku CBR1 centrum aktywne jest położone blisko powierzchni enzymu i nie jest ściśle otoczone ze wszystkich stron przez reszty aminokwasowe. Wobec tego ułatwiony był dostęp do centrum aktywnego cząsteczek rozpuszczalnika. Wymienione czynniki mogły wpływać na większą niestabilność konformacyjną reszt aminokwasowych centrum aktywnego oraz ligandów enzymu. Z kolei centrum aktywne AKR1C3, mimo większych rozmiarów i występowania w nim kilku dodatkowych przestrzeni (opisanych w rozdziale 1.3), jest ściślej otoczone ze wszystkich stron i w związku z tym zadokowane ligandy nie posiadały tak dużej swobody konformacyjnej jak obserwowana w CBR1. Występowanie w centrum aktywnym AKR1C3 szeregu reszt aminokwasowych o aromatycznych łańcuchach bocznych dodatkowo stabilizowało ligandy, w których występowały takie elementy jak np. pierścień fenyłowy lub indol, tak jak w związku WDW. CBR1, w którego centrum aktywnym występuje zaledwie jedna reszta aminokwasowa o charakterze aromatycznym (Trp229), posiadała mniejszą możliwość stabilizowania położenia ligandów na drodze wytwarzania oddziaływań π - π oraz CH- π .

Jak zaznaczono, większość analizowanych modeli AKR1C3 wykazała znaczny stopień stabilności WDW w centrum aktywnym enzymu podczas 50 ns symulacji MD. W związku z tym, wyboru optymalnego modelu, który miał zostać wykorzystany w prospektywnym wirtualnym skryningu, dokonano przede wszystkim w oparciu o analizę parametrów retrospektywnego wirtualnego skryningu. Spośród najlepiej ocenionych modeli, zdecydowanie najkorzystniejszą wartością parametru $BEDROC_{\alpha=20}$ odznaczał się model 74H1 (0,643). Wykazywał on także najlepsze wartości parametrów oceniających jego skuteczność w rozpoznawaniu ligandów

AKR1C3, analizując pierwszych 5% i 10% wyników. Co prawda, uwzględniając wyłącznie najlepiej oceniony 1% bazy, korzystniejszymi wartościami parametrów cechował się model 54L4, jednak jego skuteczność w rozpoznawaniu ligandów enzymu nie utrzymała się w kolejnych procentach bazy wyników. Było to także widoczne w wartościach innych parametrów: ROC (0,86), a zwłaszcza $BEDROC_{\alpha=20}$ (0,508), który wskazywał, że przy całościowej analizie wyników skringingu, model 54L4 był tylko nieznacznie bardziej skuteczny w rozpoznawaniu ligandów od niezoptymalizowanego modelu 33_unopt. Wobec powyższych przesłanek, a także korzystnych obserwacji uzyskanych na drodze analizy symulacji MD, model **74H1** wybrano do wykorzystania w prospektywnym wirtualnym skringingu.

Ujęcie centrum aktywnego wybranego modelu, wraz z kompletem parametrów retrospektywnego wirtualnego skringingu, przedstawiono na **Rycinie 36**.



Ryc. 36: Sposób wiązania WDW w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu AKR1C3 oznaczonego kodem 74H1 (uwidoczniono reszty aminokwasowe będące w odległości do 3 Å od liganda). Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania aromatyczne zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

4.3.4 Przygotowanie modelu farmakoforowego inhibitorów AKR1C3, wstępny prospektywny wirtualny skrining bazy związków chemicznych (LigandScout)

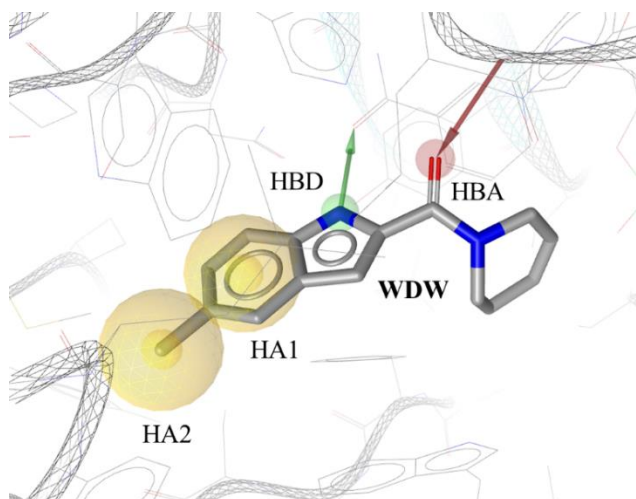
Przygotowanie modeli farmakoforowych ligandów AKR1C3 i CBR1 (opartych na strukturze celu biologicznego) oraz przeprowadzenie wstępnych prospektywnych skriningów, opartych o uzyskane farmakofory, miało na celu zawężenie puli związków chemicznych, które miałyby zostać zadokowane we właściwych skriningach, bazujących na trójwymiarowych, zoptymalizowanych modelach obu celów biologicznych. Jednak zróżnicowanie strukturalne wykorzystanych na etapie optymalizacji ligandów narzędziowych CBR1 uniemożliwiło uzyskanie wspólnego modelu farmakoforowego, który pozwoliłby na efektywne wyeliminowanie z dalszych analiz związków nieposiadających pożądanых cech strukturalnych. W przypadku większych ligandów, takich jak pochodne amidu kwasu cyjanonowego, proponowane przez oprogramowanie LigandScout modele farmakoforowe uniemożliwiały dopasowanie do nich mniejszych ligandów o potwierdzonej aktywności biologicznej. Z kolei próby wykorzystania jako matryce mniejszych ligandów, takich jak chinony, kończyły się niepowodzeniem, z uwagi na brak wystarczającej liczby elementów strukturalnych, które można było uznać za cechy farmakoforowe i na ich podstawie zbudować odpowiednie modele (za optymalne dla opisywanych badań przyjęto uzyskanie modeli zawierających 3-4 cechy farmakoforowe). Wobec tego skupiono się jedynie na przygotowaniu i optymalizacji modelu farmakoforowego inhibitorów AKR1C3.

Model farmakoforowy inhibitorów AKR1C3 opracowano w oparciu o ligand WDW, zadokowany do modelu 74H1. W wyniku analiz trójwymiarowej struktury liganda, jak również jego otoczenia (centrum aktywnego AKR1C3), program LigandScout zaproponował bazowy model farmakoforowy, w którego skład wchodziły:

1. akceptor wiązania wodorowego (**HBA**), którego rolę pełnił atom tlenu grupy amidowej WDW,
2. donor wiązania wodorowego (**HBD**), zlokalizowany na atomie azotu wchodzącym w skład indolu,

- obszar hydrofobowy 1 (**HA1**), którego centrum wyznaczono w obrębie pierścienia fenylowego wchodzącego w skład indolu,
- obszar hydrofobowy 2 (**HA2**), którego centrum wyznaczono na grupie metylowej przyłączonej do indolu.

Dla każdej z cech farmakoforowych ustawiono zakres tolerancji wynoszący 1,5 Å. Oznaczało to, że przy próbie dopasowania do modelu innych związków, nie musiały one idealnie odwzorowywać przestrzennego położenia wszystkich elementów farmakoforu, a jedynie leżeć w zakresie 1,5 Å od nich. Bazowy model farmakoforowy, utworzony na bazie związku WDW w centrum aktywnym AKR1C3 (model 74H1), przedstawiono na **Rycinie 37** (dla zachowania przejrzystości ryciny nie uwzględniono zakresów tolerancji dla HBA i HBD).

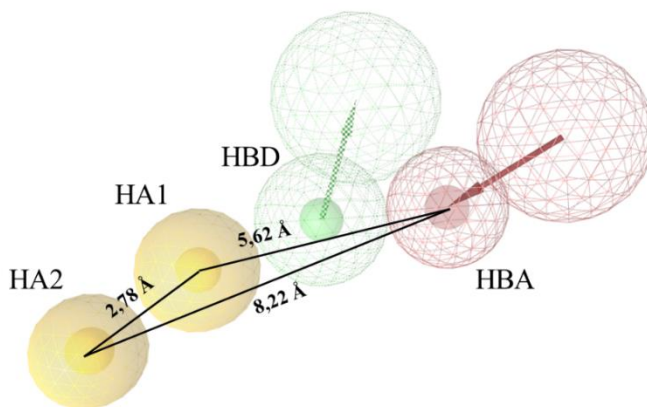


Ryc. 37: Bazowy model farmakoforowy inhibitorów AKR1C3, opracowany na podstawie struktury związku WDW. Za pomocą sfer oznaczono kolejne cechy farmakoforowe modelu: HBA (czerwony), HBD (zielony), HA1 oraz HA2 (żółty, dodatkowo zaznaczone zakresy tolerancji wynoszące 1,5 Å).

Do tak przygotowanego modelu dopasowywano następnie ligandy oraz fałszywe ligandy (*decoys*), których użyto w przeprowadzonych wcześniej retrospektywnych wirtualnych skriningach. Celem wykorzystania modelu w tym etapie miało być sprawdzenie, czy wszystkie znane ligandy będą w stanie dopasować się do modelu, przy jednoczesnym odrzuceniu jak największej ilości związków niebędących ligandami AKR1C3. Założono jednak, że przy tak prostym modelu nie

będzie możliwe odrzucenie wszystkich *decoy*-ów. Nie stanowiło to znacznej przeszkody, gdyż głównym zadaniem modelu miało być wstępne przefiltrowanie związków, które miały zostać wykorzystane we właściwym prospektywnym skriningu, nie zaś finalna selekcja struktur do zakupu i zbadania w testach *in vitro*.

Analiza farmakoforowa wskazała na wysoki stopień dopasowania do bazowego farmakoforu 132 z 663 wykorzystanych związków (19,9% bazy). Wśród nich było jednak zaledwie 6 znanych inhibitorów AKR1C3, wobec czego taki model nie mógł zostać uznany za przydatny w dalszych badaniach. Analiza wyników wskazała, że niedopasowanie pozostałych 7 inhibitorów było spowodowane brakiem w ich strukturze jednej z cech farmakoforowych – HBD. W związku z tym zdecydowano o zmianie statusu tej cechy z „koniecznej” na „opcjonalną”. Oznaczało to, że dopasowywane struktury nie musiały jej posiadać, ale jej obecność wpływała korzystnie na całościową ocenę (*score*) dopasowania związku do modelu (mogło to być istotne przy wykorzystaniu skriningu farmakoforowego jako jedyne źródła informacji o przydatności kolejnych struktur, jednak, jako że w niniejszych badaniach był to jedynie element poprzedzający skrining w oparciu o strukturę celu biologicznego, nie brano pod uwagę wartości funkcji oceniającej dopasowanie związków do farmakoforu). Po zmianie statusu HBD na „opcjonalny” i ponownym sprawdzeniu ligandów i fałszywych ligandów, do modelu zostało dopasowanych 411 związków (62,0%), w tym wszystkie 13 inhibitorów AKR1C3. W kolejnym etapie badań analizowano wpływ zmian zakresu tolerancji poszczególnych cech farmakoforowych na liczbę ligandów oraz fałszywych ligandów, które dopasowywały się do modelu farmakoforowego. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano po zmniejszeniu zakresu tolerancji dla HBA i HA1 z 1,5 do 1,35 Å, a dla HA2 do 1,2 Å (**Rycina 38**). W wyniku dokowania puli związków do tak zmodyfikowanego modelu, dopasowaniu uległy 362 z nich (54,6%), w tym wszystkie znane ligandy (inhibitory) AKR1C3. Dalsze modyfikacje zakresu tolerancji poszczególnych cech farmakoforowych wpływały niekorzystnie na model i skutkowały brakiem dopasowania jednego lub więcej ligandów AKR1C3. Uznano, że utrata zdolności rozpoznawania tych ligandów przez model może rzutować na jakość przeprowadzonego wstępnego skriningu farmakoforowego.



Ryc. 38: Zoptymalizowany model farmakoforowy inhibitorów AKR1C3, opracowany na podstawie struktury związku WDW, wraz z odległościami między cechami oznaczonymi jako niezbędne w modelu (HBA, HA1, HA2). Obok HBA oraz HBD (cecha opcjonalna) zaznaczono przestrzenie, w obrębie których powinny się znajdować elementy celu biologicznego, umożliwiające wytworzenie wiązania wodorowego cel-ligand.

Do zoptymalizowanego modelu farmakoforowego zadokowano następnie bazę ponad 2,7 miliona związków chemicznych, wykorzystanych już wcześniej w prospektywnym skriningu pod kątem poszukiwania nowych inhibitorów CBR1 (rozdział 4.1.4). Kryteria dopasowania do trzech, wymaganych przez model, cech farmakoforowych spełniło 1,06 miliona związków, co stanowiło około 39,3% wykorzystanej bazy. Struktury, które pomyślnie przeszły przez ten etap analizy, zostały następnie wykorzystane we właściwym prospektywnym skriningu, przeprowadzonym przy użyciu programu Glide.

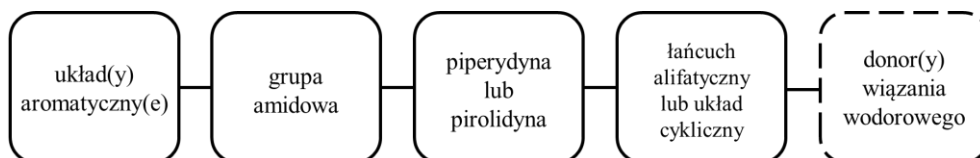
Przeprowadzenie wstępnego skriningu farmakoforowego, w oparciu o model inhibitorów jednego z badanych celów biologicznych, pozwoliło na odsianie związków nieposiadających cech strukturalnych, które wiązały się z nabywaniem powinowactwa do enzymów i oczekiwanej aktywności (w tym wypadku hamującej). Jednak kryteria przyjęte przy optymalizacji modelu farmakoforowego nie były zbyt restrykcyjne aby zapobiec sytuacji, w której model okazałby się zbyt selektywny i promował jedynie takie związki, które byłyby strukturalnie najbardziej podobne do wyjściowego liganda (WDW). W takiej sytuacji utrudnione byłoby znalezienie jakichkolwiek nowych chemotypów inhibitorów.

4.3.5 Właściwy prospektywny wirtualny skrining i selekcja potencjalnych dualnych inhibitorów CBR-AKR1C3 (Glide)

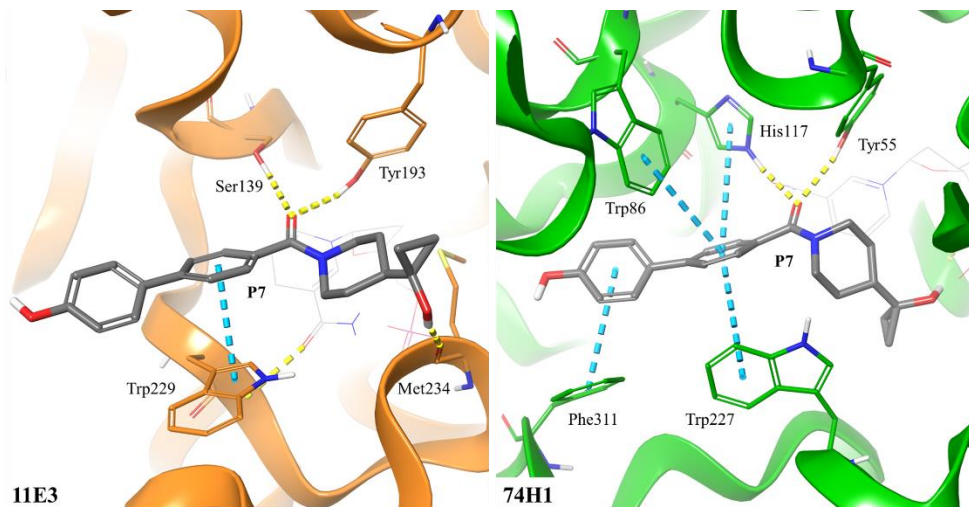
Prospektywny wirtualny skrining przeprowadzono w taki sam sposób, jak miało to miejsce w przypadku poszukiwań nowych inhibitorów CBR1. Jednak tym razem przeanalizowano po 10000 związków najlepiej ocenionych zarówno w skriningu do modelu CBR1, jak i AKR1C3. Wśród nich zidentyfikowano 235 związków, które powtórzyły się wśród najlepiej ocenionych, zarówno w dokowaniu do modelu 11E3, jak i modelu 74H1. Stanowiły one 2,35% analizowanej puli związków. Była to wartość zbliżona do uzyskanej podczas analogicznej analizy pod kątem poszukiwania nowych inhibitorów CBR1 w modelach z GSH oraz bez niego (2,04%). Kolejnym etapem analizy była jakościowa (wizualna) ocena sposobu wiązania wskazanych związków w centrach aktywnych CBR1 i AKR1C3. Spośród 235 związków, prawidłowy (obserwowany wcześniej dla znanych ligandów) sposób wiązania w centrum aktywnym CBR1 wykazało 88 związków. Natomiast w przypadku AKR1C3 było to 97 związków. Jednak nie zawsze prawidłowy sposób wiązania w centrum aktywnym jednego z enzymów równał się poprawnemu ułożeniu także w drugim celu biologicznym. Zadowalający sposób wiązania jednocześnie w modelach obu enzymów odnotowano dla 45 związków. Dodatkowa analiza komercyjnej dostępności związków (czas oczekiwania na dostarczenie, cena, minimalna ilość związku konieczna do przeprowadzenia zamówienia) wymusiła zawężenie analizowanej puli do 36 struktur. Ich nazwy chemiczne, wraz z zastosowanym kodowaniem (związkom nadano symbole P1-P36), zostały przedstawione w materiałach uzupełniających, w **rozdziale 6.3**. Z kolei wzory strukturalne wybranych związków, które w późniejszych testach *in vitro* wykazały najlepsze właściwości hamujące wobec CBR1 i AKR1C3, przedstawiono na **Rycinie 43** w **rozdziale 4.3.7**.

Dla ponad połowy związków, które były najlepiej dopasowane do centrów aktywnych modeli CBR1 i AKR1C3, zaobserwowano powtarzający się schemat budowy (**Rycina 39**). Składały się one z 1-3 pierścieniowego układu aromatycznego (zarówno heterocyklicznego, jak i pozbawionego heteroatomów; rzadziej występowały dodatkowe pierścienie niearomatyczne) połączonego z grupą amidową.

W większości związków atom azotu był elementem wspólnym dla grupy amidowej oraz pierścienia heterocyklicznego – piperydyny lub pirolidyny. Jest to kolejny przykład, w którym oprogramowanie wykorzystywane w skriningach wskazało pierścień piperydyny jako element, który może poprawiać stopień dopasowania struktury w centrum aktywnym CBR1. W części spośród wyselekcjonowanych związków, do pierścienia piperydyny/pirolidyny był dołączony dodatkowy łańcuch alifatyczny lub układ cykliczny. W opisywanym fragmencie często pojawiał się jeden lub dwa donory wiązania wodorowego. W ujęciu całościowym, wyselekcjonowane struktury przypominały przytaczany już niejednokrotnie ASP9521. Reprezentatywne sposoby wiązania związków wyselekcjonowanych w wirtualnym skriningu, na przykładzie związku P7, przedstawiono na **Rycinie 40**.



Ryc. 39: Ogólny schemat budowy związków, które wykazały korzystny sposób ułożenia w centrach aktywnych CBR1 i AKR1C3, uzyskanych w ramach prospektywnego wirtualnego skriningu. Przerywaną linią zaznaczono fragment, który występował jedynie w niektórych spośród wytypowanych związków.



Ryc. 40: Reprezentatywny sposób wiązania w centrum aktywnym CBR1(a) oraz AKR1C3 (b) potencjalnego dualnego inhibitora CBR1-AKR1C3 (na przykładzie związku P7). Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania aromatyczne zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

W przypadku CBR1 zaobserwowano, typowe dla ligandów tego enzymu, oddziaływania z resztami Ser139, Tyr193 (wiązania wodorowe) oraz Trp229 (oddziaływanie π - π). Obecność, wśród większości analizowanych związków, dodatkowych donorów wiązań wodorowych, spowodowała wytworzenie także oddziaływań z resztami Met234 lub Ala235 (wiązania wodorowe). Ten rodzaj interakcji cel-ligand był już opisywany wcześniej w przypadku ANT oraz związku C17, dla którego stanowił kluczowy czynnik nasilający powinowactwo do enzymu i wzmocnienie aktywności hamującej wobec CBR1. Jednak zupełnie nową obserwacją było pojawienie się wśród analizowanych związków takich, w których występował jeszcze jeden donator wiązania wodorowego, znajdujący się w pobliżu donora nawiązującego oddziaływania z Met234 lub Ala235. Dodatkowy donor (grupa hydroksylowa) umożliwiał nawiązanie wiązania wodorowego z łańcuchem głównym Phe94. Wspomniana reszta aminokwasowa była odpowiedzialna za interakcję z cząsteczką GSH (kryształ 3BHJ). Wiązanie wodorowe z Phe94 zaobserwowano także w trakcie symulacji dynamiki molekularnej kompleksu CBR1-ASP9521 (**rozdział 4.2.2**). Zatem prospektywny wirtualny skrining wskazał na potencjał dobrego dopasowania do centrum aktywnego CBR1 związków mogących nawiązywać oddziaływania jednocześnie z obiema resztami aminokwasowymi, które miały wydatny udział w sposobie wiązania ASP9521. Związków o tak rozbudowanej strukturze nie wyselekcjonowano podczas skriningów dążących do znalezienia nowych inhibitorów CBR1, z uwagi na użycie w nich modelu, w którym opisywany fragment centrum aktywnego był zajęty przez cząsteczkę GSH. Obecnie opisywane skriningi, w przeciwieństwie do wcześniejszych, nie premiowały natomiast związków mogących nawiązywać oddziaływania z resztą Gly228.

Najistotniejszymi oddziaływaniami, obserwowanymi w obrębie centrum aktywnego AKR1C3, były wiązania wodorowe z dwoma aminokwasami tetrady katalitycznej: Tyr55 oraz His117. Znaczna liczba reszt aminokwasowych zawierających fragmenty o charakterze aromatycznym, uzasadnia wytypowanie w wirtualnym skriningu związków o analogicznych elementach struktury. W większości analizowanych związków występował więcej niż jeden pierścień aromatyczny. W pozie każdego ze związków odnotowano nawiązanie oddziaływań

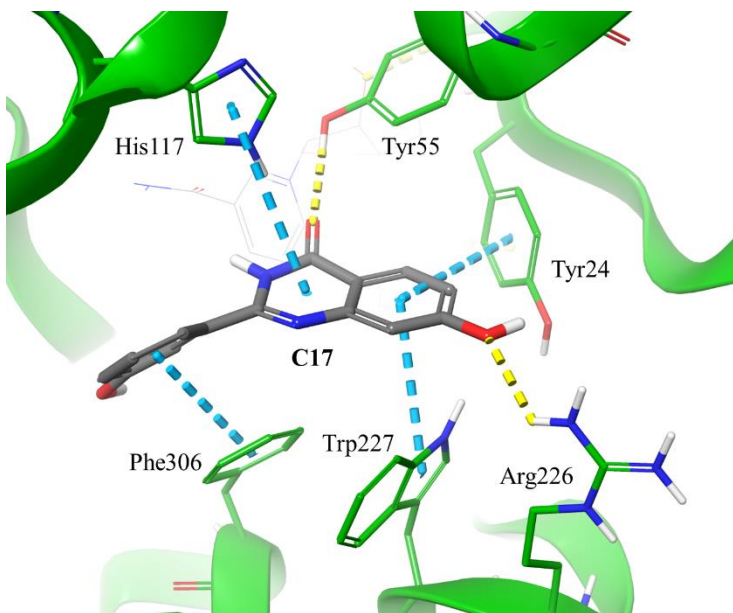
π - π bądź CH- π z co najmniej jedną z wymienionych reszt aminokwasowych: Trp86, Trp227, Phe306, Phe311. Z kolei donory wiązań wodorowych, znajdujące się po przeciwnej stronie grupy amidowej, umożliwiały nawiązanie wiązań wodorowych z resztami Ser221 oraz Asp224. Wymienione aminokwasy były już wcześniej wskazane jako istotne dla uzyskania odpowiedniego sposobu wiązania ANT w centrum aktywnym AKR1C3. Natomiast w analizach potencjalnych nowych inhibitorów AKR1C3, podwójną rolę spełniała reszta Tyr24, leżąca w pobliżu Ser221 oraz Asp224. Umożliwiała ona wytworzenie wiązań wodorowych ze związkami, które w opisywanym fragmencie struktury zawierały donor/donory wiązania wodorowego. Z kolei, w przypadku związków nieposiadających tego elementu, brała ona często udział w tworzeniu oddziaływań aromatycznych: π - π albo CH- π .

Poza przeprowadzeniem wirtualnego skriningu związków bazy ZINC, do modelu AKR1C3 (74H1) zadokowano także związek C17 (nie był on obecny w pobranej i wykorzystywanej bazie), będący silnym inhibitorem CBR1. Uzyskany sposób wiązania i poza zostały korzystnie ocenione przez funkcję oceniającą glide gscore, co pozwoliło ulokować związek C17 wśród 5000 najlepiej ocenionych struktur w wirtualnym skriningu na modelu 74H1. Związek C17 wykazał także interesujący sposób wiązania w centrum aktywnym enzymu (**Rycina 41**). W jego skład wchodziły dwa wiązania wodorowe: z Tyr55 (typowe dla ligandów AKR1C3) oraz między grupą hydroksylową w położeniu 7 (różnicującą związek C17 od opisywanego wcześniej związku C2) a łańcuchem bocznym Arg226. Oddziaływanie to nie było zbyt często obserwowane wśród innych związków dokowanych do modelu 74H1. Wśród 36 opisywanych wcześniej, wyselekcjonowanych jako potencjalne dualne inhibitory CBR1-AKR1C3, pojawiło się jedynie w sposobie wiązania trzech związków. Natomiast dla związku C17 nie odnotowano obecności wiązania wodorowego z drugą resztą aminokwasową tetrady katalitycznej – His117. Aminokwas ten pełnił tym razem jednak inną rolę, nawiązując oddziaływanie aromatyczne (CH- π) z zadokowanym związkiem. Było to jedno z aż czterech oddziaływań aromatycznych, które pojawiły się w pozie uzyskanej w wyniku zadokowania C17 do modelu AKR1C3. Drugie oddziaływanie aromatyczne (π - π) występowało między pierścieniem fenylowym, dołączonym do układu

3,4-dihydrochinazolin-4-onu, a resztą Phe306. Z kolei położenie samego 3,4-dihydrochinazolin-4-onu było dodatkowo stabilizowane przez oddziaływania z resztami Tyr24 oraz Trp227.

W uzyskanym sposobie wiązania nie wykazano żadnych interakcji z wymienianymi już wcześniej resztami Ser221 i Asp224. W przeciwieństwie do sposobu wiązania z CBR1, grupa hydroksylowa w położeniu *meta* pierścienia fenylowego C17 nie nawiązywała żadnych oddziaływań z resztami aminokwasowymi AKR1C3.

Wyniki dokowania związku C17 do modelu 74H1 wskazały na potencjał układu 2-fenyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onu do uzyskiwania korzystnego położenia i nawiązywania szeregu oddziaływań w centrum aktywnym AKR1C3. W związku z tym zdecydowano o sprawdzeniu wybranych związków opisywanej wcześniej serii C (C2, C10, C11, C17, C18) pod kątem hamowania AKR1C3 i dołączenia ich do związków serii P jako potencjalnych, dualnych inhibitorów reduktaz ANT.



Ryc. 41: Sposób wiązania związku C17 w centrum aktywnym AKR1C3, uzyskany w wyniku dokowania do modelu 74H1. Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania aromatyczne zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

4.3.6 Predykcja *in silico* i analiza wybranych parametrów ADMET potencjalnych dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3

Zakup związków, będących potencjalnymi dualnymi inhibitorami CBR1-AKR1C3, został poprzedzony dodatkową predykcją i analizą parametrów fizykochemicznych oraz bezpieczeństwa, wykonaną przy pomocy oprogramowania ADMET Predictor oraz SwissADME. W **Tabeli 15** przedstawiono zestawienie parametrów dla wybranych związków, których analizy pojawiają się w kolejnych rozdziałach niniejszej pracy (dodano także zestaw parametrów dla ASP9521, dla którego wykazano dualną aktywność hamującą CBR1-AKR1C3). Z kolei wyniki predykcji dla pozostałych związków zamieszczono w materiałach uzupełniających (**Rozdział 6.4**).

Zdecydowana większość spośród 36 analizowanych związków wykazała korzystne wartości oszacowanych parametrów fizykochemicznych. Rozpuszczalność 32 związków oceniono jako dobrą, a pozostałych czterech (P7, P26, P27, P35) jako umiarkowaną. Jedynie dwa związki (P7 oraz P13) miały przewidywany logP nieco powyżej przyjętego optymalnego zakresu (0-3). Zgodnie z przewidywaniami, w analizowanych strukturach nie zidentyfikowano elementów wykrywanych przy pomocy filtrów PAINS oraz BRENK. Nieco ponad połowa związków (20) wykazała możliwość przechodzenia przez barierę krew-mózg (zgodnie z kluczem oceny, opisanym w rozdziale 3.2.10, uznano tę właściwość jako niekorzystną), podobnie jak miało to miejsce dla ASP9521. Większość związków, wskazanych jako potencjalne dualne inhibitory CBR1-AKR1C3, wykazywała korzystne wartości frakcji sp₃: dla 22 mieściła się ona w przedziale 0,3-0,5, a dla 7 wynosiła powyżej 0,5. Była to znaczna zmiana w porównaniu do związków, które były analizowane jako potencjalne nowe inhibitory CBR1, gdzie dla większości z nich obserwowano wartości w przedziale 0-0,2.

Dla 8 związków wskazano potencjalne zagrożenie wynikające z możliwości blokowania kanałów hERG, natomiast dla 9 odnotowano możliwość interakcji z Pgp – jako substrat bądź inhibitor.

Tab. 15: Wybrane parametry ADMET nowych, potencjalnych dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3

| kod | związek | rozp. | logP | TPSA | fr. sp3 | GI abs. | BBB perm. | PAINS | BRENK | hum fup% | hERG filter | Pgp subs. | Pgp inh. |
|-----|------------------|----------|---------------------|--------------|-------------|-------------|-------------------|-----------|-----------|---------------|-------------|-----------|----------|
| | ASP9521 | | 2,78 | 65,56 | 0,53 | | | | | 10,348 | | | |
| P1 | ZINC001772701434 | | 2,07 | 60,77 | 0,53 | | | | | 21,841 | | | |
| P2 | ZINC000652662803 | | 2,99 | 40,54 | 0,56 | | | | | 10,667 | | | |
| P4 | ZINC000652664444 | | 2,77 | 40,54 | 0,56 | | | | | 15,38 | | | |
| P7 | ZINC001772806576 | | 3,03 | 60,77 | 0,38 | | | | | 5,736 | | | |
| P18 | ZINC001506407800 | | 2,52 | 55,20 | 0,29 | | | | | 8,212 | | | |
| P20 | ZINC000096417271 | | 2,78 | 51,02 | 0,24 | | | | | 8,101 | | | |
| P21 | ZINC000426647288 | | 2,00 | 63,64 | 0,27 | | | | | 22,065 | | | |
| P23 | ZINC000044322682 | | 2,24 | 79,19 | 0,26 | | | | | 8,448 | | | |
| P25 | ZINC000004038559 | | 2,60 | 40,62 | 0,26 | | | | | 12,904 | | | |
| P27 | ZINC000006473269 | | 2,52 | 103,26 | 0,12 | | | | | 4,734 | | | |
| kod | związek | MUT_Risk | MUT_Code | TOX_Risk | TOX_Code | CYP_Risk | CYP_Code | Absn_Risk | Absn_Code | | | | |
| | ASP9521 | | | | | 0,16 | 1A2 | | | | | | |
| P1 | ZINC001772701434 | | | | | 1 | 2C19 | | | | | | |
| P2 | ZINC000652662803 | | | | | 1,086 | 1A2; 2C19; 3A4 | | | | | | |
| P4 | ZINC000652664444 | | | | | 0,401 | 3A4 | | | | | | |
| P7 | ZINC001772806576 | | | | | 1 | 3A4 | | | | | | |
| P18 | ZINC001506407800 | | | | | 0,208 | mi | | | | | | |
| P20 | ZINC000096417271 | 0,6 | S_97 | 3 | rat; Xr; Xm | 0,775 | 3A4; mi | | | | | | |
| P21 | ZINC000426647288 | 0,6 | S_98; m100 | 0,81 | rat; Xr | | | | | | | | |
| P23 | ZINC000044322682 | 1,5 | S_97; S_98; m535 | 2 | Xr; MUT | 0,789 | 3A4; mi | | | | | | |
| P25 | ZINC000004038559 | | | 1 | Xr | 1,096 | 3A4; mi | | | | | | |
| P27 | ZINC000006473269 | | | | | | | 0,24 | Peff | | | | |

W predykcjach przeprowadzonych przez program ADMET Predictor, oceniających potencjalne problemy związane z mutagennością, toksycznością, zwiększonym metabolizmem oraz zmniejszoną absorpcją związków P1-P36 nie wykazano struktur charakteryzujących się niepokojąco wysokimi wartościami przewidywanego ryzyka. Bardzo dobre parametry uzyskano dla związku ASP9521 (jedynie nieznacznie podwyższone ryzyko związane ze zwiększonym metabolizmem przez enzym CYP1A2), co nie jest zaskoczeniem, pamiętając o tym, że związek ten był wynikiem optymalizacji zarówno aktywności, jak i parametrów bezpieczeństwa, czego efektem było jego dotarcie aż do rozwoju klinicznego. Dla 14 związków serii P wykazano nieznacznie podwyższone ryzyko mutagenności (największe dla związku P23). Wśród związków, dla których wskazano potencjalne ryzyko toksyczności, główne obawy dotyczyły możliwości wystąpienia toksyczności w badaniach na modelach mysim bądź szczurzym. Z kolei analiza zwiększonego potencjału metabolicznego wskazała, dla części związków, ryzyko nadmiernego metabolizmu przez CYP3A4 (16 z 36) oraz, w mniejszym stopniu, przez inne izoformy CYP. Jednak kompleksowa analiza, uwzględniająca wszystkie wymienione czynniki, wskazała na korzystne wartości parametrów farmakokinetycznych i bezpieczeństwa dla wyselekcjonowanych związków, a optymalizacja strukturalna, mająca na celu wyeliminowanie alarmów wskazanych przez ADMET Predictor, powinna być kolejnym etapem badań nad wybranymi związkami serii P, po potwierdzeniu ich wartości jako inhibitory jednego lub obu enzymów metabolizujących ANT i uzyskaniu zadowalających wyników badań komórkowych, oceniających ich wpływ na skuteczność działania cytotoksycznego DOX/DNR.

4.3.7 Ocena hamowania rekombinowanych CBR1 i AKR1C3 przez wytypowane związki

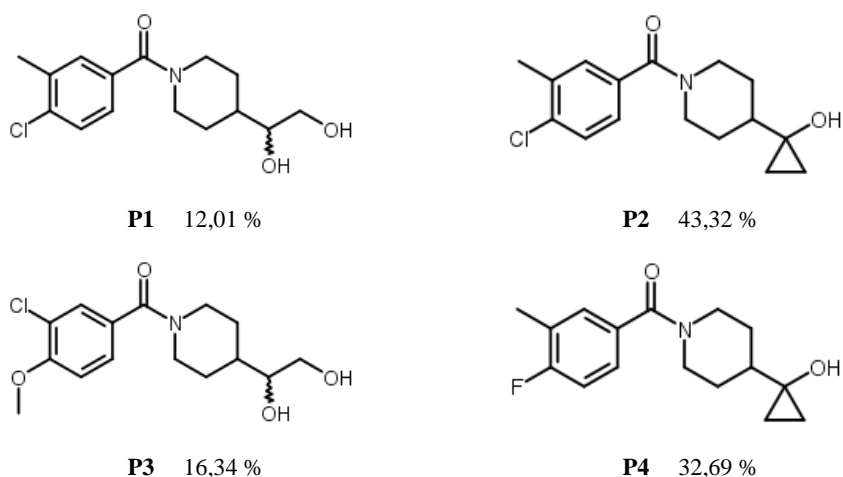
W badaniach na rekombinowanych CBR1 i AKR1C3 oceniono potencjał hamujący 39 związków: 34 z serii P oraz 5 z serii C. Wobec ograniczeń prawnych, limitujących dostęp do wybranych substancji na terenie RP, nie pozyskano związków P13 oraz P14 (według dostawcy związków były to substancje kontrolowane, o powinowactwie do receptorów kannabinoidowych). W **Tabeli 16** przedstawiono

wyniki badań enzymatycznych (ASP9521 jako związek odniesienia). Wartości hamowania CBR1 dla związków serii C zaczerpnięto z przedstawionej wcześniej **Tabeli 8** (rozdział 4.1.8).

Tab. 16: Ocena hamowania aktywności rekombinowanego CBR1 i AKR1C3 przez związki P1-P36 oraz wybrane związki serii C. Wzory strukturalne związków odznaczających się korzystnymi parametrami hamowania jednego lub obu enzymów przedstawiono na **Rycinie 43** na stronie 160.

| badany związek | % hamowania <i>CBR1</i> w 100 μM badanego związku lub <u>IC₅₀ [μM]</u> | % hamowania <i>AKR1C3</i> w 100 μM badanego związku lub <u>IC₅₀ [μM]</u> | badany związek | % hamowania <i>CBR1</i> w 100 μM badanego związku lub <u>IC₅₀ [μM]</u> | % hamowania <i>AKR1C3</i> w 100 μM badanego związku lub <u>IC₅₀ [μM]</u> |
|----------------|---|---|----------------|---|---|
| | P1 | 12,01 % | | <u>22,14 μM</u> | P23 |
| P2 | 43,32 % | 56,46 % | P24 | < 10 % | 38,75 % |
| P3 | 16,34 % | 66,86 % | P25 | 49,53 % | <u>13,83 μM</u> |
| P4 | 32,69 % | 54,54 % | P26 | < 10 % | 43,10 % |
| P5 | < 10 % | 46,44 % | P27 | 13,32 % | <u>2,25 μM</u> |
| P6 | < 10 % | 25,70 % | P28 | < 10 % | 48,60 % |
| P7 | 49,41 % | <u>10,72 μM</u> | P29 | < 10 % | 40,01 % |
| P8 | < 10 % | 11,03 % | P30 | < 10 % | 68,79 % |
| P9 | 26,72 % | 58,07 % | P31 | < 10 % | 58,31 % |
| P10 | < 10 % | < 10 % | P32 | < 10 % | < 10 % |
| P11 | < 10 % | 11,84 % | P33 | < 10 % | 34,64 % |
| P12 | < 10 % | 22,42 % | P34 | < 10 % | 58,38 % |
| P15 | 13,39 % | 52,30 % | P35 | < 10 % | 47,42 % |
| P16 | 13,77 % | 21,72 % | P36 | < 10 % | <u>50,63 μM</u> |
| P17 | < 10 % | 61,00 % | C2 | <u>7,56 μM</u> | <u>27,99 μM</u> |
| P18 | < 10 % | <u>14,52 μM</u> | C10 | 29,83 % | 26,84 % |
| P19 | < 10 % | 65,22 % | C11 | 35,06 % | <u>15,58 μM</u> |
| P20 | < 10 % | <u>15,05 μM</u> | C17 | <u>0,68 μM</u> | <u>6,94 μM</u> |
| P21 | < 10 % | <u>24,22 μM</u> | C18 | <u>62,80 μM</u> | <u>6,27 μM</u> |
| P22 | < 10 % | 14,04 % | ASP9521 | <u>44,00 μM</u> | <u>0,36 μM</u> |

Zarówno w przypadku badań opisanych w rozdziale 4.1, jak i w ramach poszukiwania dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, znaczną trudnością okazało się zidentyfikowanie nowych inhibitorów CBR1. Wśród związków serii P, najaktywniejsze cząsteczki, testowane w stężeniu 100 μM , hamowały aktywność enzymu na poziomie 40-50%. Mimo że wyniki te nie pozwalają na określenie badanych związków jako efektywnych inhibitorów CBR1, są to lepsze rezultaty niż uzyskane we wcześniejszym skriningu, który doprowadził do wyselekcjonowania i zbadania związków C1-C9 (z wyjątkiem związku C2). W trakcie analizy wyników oznaczeń odnotowano kilka zależności strukturalnych, które mogą się okazać pomocne w kolejnych próbach poszukiwania nowych inhibitorów enzymatycznych. Jedną z nich był wpływ rodzaju podstawnika dołączonego do pierścienia piperydyny na stopień hamowania CBR1. Zaobserwowano go na przykładzie pochodnych 1-benzoilopiperydyny (związki P1-P9). Był to najczęściej występujący chemotyp wśród zakupionych związków. Poza szeregiem modyfikacji w bezpośrednim otoczeniu pierścienia fenylowego, do pierścienia piperydyny były przyłączone jedynie 2 rodzaje podstawników: 1,2-etanodiolowy lub cyklopropan-1-olowy. Przykłady obu typów związków, wraz z oznaczonymi aktywnościami, przedstawiono na **Rycinie 42**.



Ryc. 42: Wpływ rodzaju podstawnika elektronodonorowego na stopień hamowania CBR1 w grupie wybranych pochodnych 1-benzoilopiperydyny.

Pierwszy z wymienionych podstawników charakteryzował się znaczną swobodą konformacyjną, dzięki czemu związki z tym podstawnikiem miały

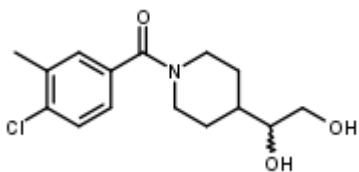
możliwość nawiązywania oddziaływań zarówno z resztą Met234, jak również Phe94, podobnie jak miało miejsce w przypadku wiązania ASP9521 w CBR1 (**Rycina 30**, rozdział 4.2.2). Z kolei drugi z podstawników nie tylko był uboższy o jeden donor wiązania wodorowego (uniemożliwiało to jednoczesne nawiązanie oddziaływań z Met234 i Phe94), ale także, z uwagi na obecność pierścienia cyklopropyloвого, wykazywał znacznie mniejszą swobodę konformacyjną. Nie przeszkadzało to jednak w nawiązywaniu oddziaływań (wiązań wodorowych) z resztą Met234 (przedstawione na **Rycinie 40** w rozdziale 4.3.5). Przeprowadzone badania enzymatyczne wykazały, że wprowadzenie bardziej usztywnionego podstawnika, kierującego donor wiązania wodorowego (grupę hydroksylową) bezpośrednio w kierunku reszty Met234, stanowi lepsze rozwiązanie niż zastosowanie podstawników alifatycznych, nawet o większej liczbie donorów wiązania wodorowego. Widać to zwłaszcza porównując aktywność związków P1 i P2, będących bezpośrednimi analogami, różniącymi się jedynie rodzajem podstawnika przyłączonego do pierścienia piperydyny. Potwierdzenie tego spostrzeżenia wymagać będzie zbadania większej ilości analogów, jednak ma swoje uzasadnienie także przywołując wyniki wcześniejszych badań związków takich jak luteolina, C17 i ASP9521. Na zwiększenie stopnia hamowania przez dwa pierwsze związki miało wpływ wprowadzenie podstawnika elektronodonorowego, który nie wykazywał swobody konformacyjnej, a jego położenie było ściśle uzależnione od położenia fragmentu, do którego był dołączony, czyli pierścienia fenylowego. Z kolei ASP9521, posiadając w tym samym fragmencie podstawnik alifatyczny o dużej swobodzie konformacyjnej (mogący kierować się albo w pobliże reszty Met234, albo Phe94), nie cechował się równie wysokim stopniem hamowania CBR1. Ponadto, przeprowadzone badania enzymatyczne nie potwierdziły większej aktywności hamującej związków, które zawierały dodatkowy donor wiązania wodorowego (poza wybranymi związkami P1-P9, taką samą zależność zaobserwowano dla związków P15 oraz P16).

Dla żadnego ze związków zawierających fragment sulfonamidowy (P10-P12) nie odnotowano aktywności hamującej, zarówno wobec CBR1, jak i AKR1C3. Wskazuje to na brak zastosowania tego podstawnika w kolejnych badaniach pod kątem poszukiwania inhibitorów opisywanych enzymów. W stosunku

do CBR1 nie zaobserwowano także oczekiwanej aktywności dla związków C15-C21, zbliżonych strukturalnie do analizowanego wcześniej związku ASP9521. Wysoką aktywność stwierdzono natomiast dla wybranych związków, w których fragment aromatyczny (**Rycina 39**) stanowił płaski układ trzech pierścieni (P23 i P25), przestrzennie naśladujący czteroczłonowy aglikon ANT (w tym szkielet antrachinonu). Co ciekawe, nawet obecność układu aromatycznego we fragmencie cząsteczki, który lokował się w pobliżu reszty Met234, bez obecności donora wiązania wodorowego, nie wpłynął niekorzystnie na aktywność hamującą związku P25. Niewątpliwie interesującym, w kontekście określenia zależności struktura-aktywność, byłoby zbadanie stopnia hamowania CBR1 przez modyfikację związku P25, zawierającą dodatkową grupę hydroksylową, mogącą nawiązywać oddziaływanie z resztą Met234 lub Ala235. Wśród związków P1-P36 nie było cząsteczek posiadających podstawnik elektronodonorowy w położeniu umożliwiającym nawiązanie wiązania wodorowego z resztą Gly228. Jak oceniono wcześniej, dodanie do struktury tego elementu miało istotne znaczenie dla poprawy hamowania CBR1 przez badane związki serii C (na przykładzie porównania aktywności związków C2 oraz C10). Brak związków zawierających wspomnianą cechę strukturalną mógł wynikać z ich słabszej oceny w skryningu do modelu AKR1C3. Jednak w planowaniu kolejnych kroków, dążących do uzyskania związków aktywnych wobec obu enzymów, omawiana modyfikacja powinna być sprawdzona i oceniona. Niestety, wśród dostępnych komercyjnie (baza ZINC) pochodnych 1-benzoilopiperidyny, obiecujących pod kątem hamowania CBR1, nie zidentyfikowano struktur zawierających donor wiązania wodorowego we fragmencie, który przy przyjęciu sposobu wiązania przedstawionego na **Rycinie 39**, umożliwiłby utworzenie wiązania wodorowego z resztą Gly228.

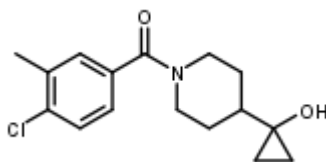
W przeciwieństwie do CBR1, większość związków serii P wykazała umiarkowany bądź znaczny stopień hamowania AKR1C3 (zestawienie struktur i stopnia hamowania obu enzymów dla najbardziej obiecujących związków przedstawiono na **Rycinie 43**). Dla 8 spośród 34 związków wyznaczono wartość IC_{50} , natomiast kolejnych 16 wykazało co najmniej 40% hamowania AKR1C3 (w stężeniu badanego związku równym 100 μ M). Zadowolające wyniki uzyskano dla

omawianych już wcześniej pochodnych 1-benzoilopiperidyny, wśród których najlepsze właściwości wykazały związki P7 (IC_{50} AKR1C3 = 10,72 μ M) oraz P1 (IC_{50} AKR1C3 = 22,14 μ M). Wskazuje to na potencjał tego chemotypu pod kątem uzyskania skutecznych, dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 jednak, aby to osiągnąć, konieczne są dalsze modyfikacje i optymalizacje strukturalne, zwłaszcza pod kątem uzyskania odpowiedniej aktywności wobec pierwszego z wymienionych enzymów. Opisana strategia działania może także znaleźć zastosowanie dla związku P25, który skutecznie hamował AKR1C3 (IC_{50} AKR1C3 = 13,83 μ M) oraz wykazał potencjał do hamowania CBR1 (49,53% w 100 μ M badanego związku). Zauważalne aktywności uzyskano także dla związków będących strukturalnie najbliższymi zbliżonymi do ASP9521, składających się z dwupierścieniowego fragmentu aromatycznego, połączonego z grupą amidową. Były to związki P18 (IC_{50} AKR1C3 = 14,52 μ M), P20 (IC_{50} AKR1C3 = 15,05 μ M) oraz P21 (IC_{50} AKR1C3 = 24,22 μ M). Jednak wszystkie te związki okazały się selektywne wobec AKR1C3, nie wykazując działania hamującego CBR1. Ten sam efekt uzyskano dla związku P27, który okazał się najsilniejszym inhibitorem w grupie związków serii P, z IC_{50} na poziomie 2,25 μ M. Cechował się on także ciekawym sposobem wiązania w centrum aktywnym AKR1C3 (**Rycina 44**), różniącym się od obserwowanego dla opisywanych wcześniej cząsteczek, w tym WDW. Miało to związek z budową P27 i obecnością w jego strukturze grupy karboksylowej, obecnej także w lekach z grupy NLPZ, które udało się wykrystalizować wraz z AKR1C3 w szeregu struktur krystalicznych (np. 3UFY, 3R94, 1S1R, 1S2C). W opisywanych kryształach, za oddziaływania z resztami Tyr55 oraz His117 odpowiadała właśnie grupa karboksylowa NLPZ. To samo zjawisko miało miejsce w przypadku związku P27, dla którego to grupa karboksylowa, a nie atom tlenu trójpierścieniowego układu 1H,2H,3H,9H-pirololo[2,1-b]chinazolin-9-onu, brała udział w tworzeniu wiązań wodorowych z resztami aminokwasowymi tetrady katalitycznej. Jednak również wspomniany atom tlenu nawiązał wiązanie wodorowe – z Ser118. Odpowiednie ułożenie liganda w centrum aktywnym AKR1C3 było dodatkowo stabilizowane przez oddziaływania aromatyczne między układem trójpierścieniowym a resztami Trp86, His117 oraz Trp227. Trp227 nawiązywał także drugie oddziaływanie aromatyczne, z pierścieniem tiofenu związku P27.



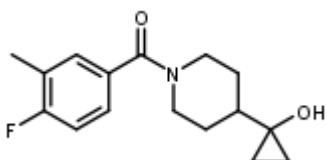
P1

CBR1: 12,01 % **AKR1C3:** 22,14 μ M



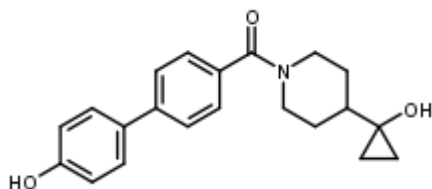
P2

CBR1: 43,32 % **AKR1C3:** 56,46 %



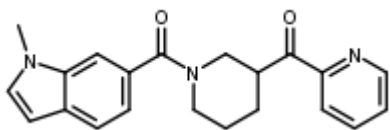
P4

CBR1: 32,69 % **AKR1C3:** 54,54 %



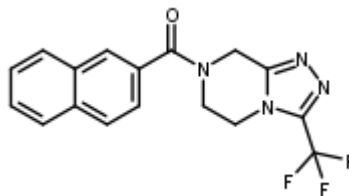
P7

CBR1: 49,41 % **AKR1C3:** 10,72 μ M



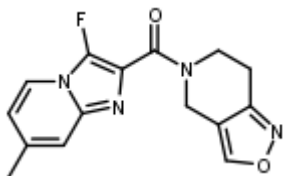
P18

CBR1: < 10 % **AKR1C3:** 14,52 μ M



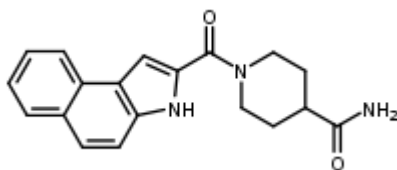
P20

CBR1: < 10 % **AKR1C3:** 15,05 μ M



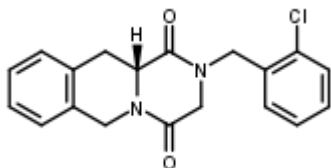
P21

CBR1: < 10 % **AKR1C3:** 24,22 μ M



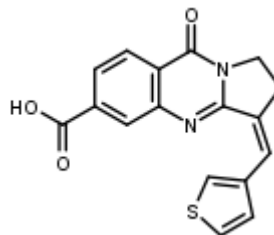
P23

CBR1: 44,65 % **AKR1C3:** 58,69 %



P25

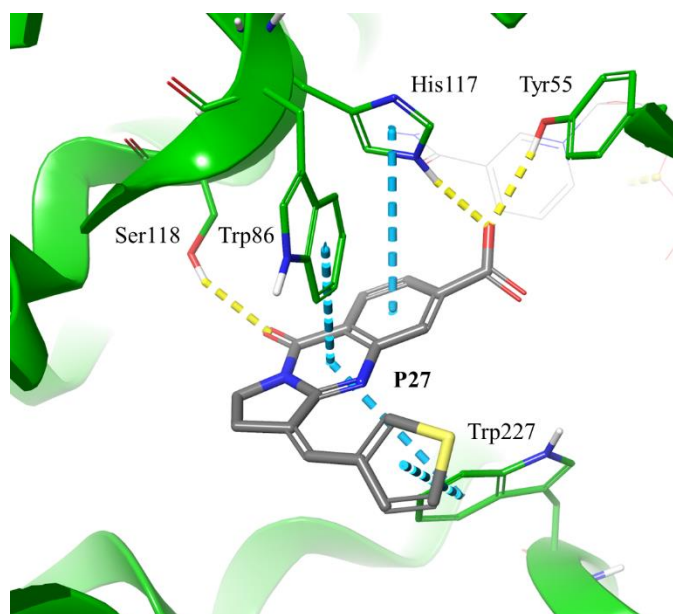
CBR1: 49,53 % **AKR1C3:** 13,83 μ M



P27

CBR1: 13,32 % **AKR1C3:** 2,25 μ M

Ryc. 43: Hamowanie aktywności CBR1 i AKR1C3 (% hamowania w 100 μ M lub wyrażony jako wartość IC_{50} w μ M) przez wybrane związki serii P.



Ryc. 44: Sposób wiązania związku P27 w centrum aktywnym AKR1C3, uzyskany w wyniku dokowania do modelu 74H1. Wiązania wodorowe zaznaczono żółtą, przerywaną linią; oddziaływania aromatyczne zaznaczono niebieską, przerywaną linią.

W wyniku badań hamowania AKR1C3 przez wybrane związki serii C wykazano, że pozbawiony dodatkowych podstawników układ 2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu (C10) nie wykazuje pożądanej aktywności, a procent hamowania enzymu jest niższy niż dla większości opisywanych wcześniej związków serii P. Jednak istotne zwiększenie siły hamowania AKR1C3 uzyskano w wyniku modyfikacji poprzez dodanie jednego lub więcej donora wiązania wodorowego. Podstawienie pierścienia fenyłowego spowodowało, że wartość IC_{50} związków (C2 oraz C11) wyniosła między 15-30 μM . Jednak w przypadku AKR1C3, inaczej niż miało to miejsce dla CBR1, podstawienie w położeniu *ortho* (C11) okazało się korzystniejsze od *meta* (C2). Jeszcze korzystniejszy efekt uzyskano poprzez wprowadzenie grupy hydroksylowej w pozycję 7 3,4-dihydrochinazolin-4-onu. Zarówno związek C17, jak i C18, wykazały znaczącą siłę hamowania AKR1C3, a wyznaczone dla nich wartości IC_{50} mieściły się w zakresie 6-7 μM . Z przeprowadzonych analiz wynika, że przy podstawieniu pochodnych 2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu w pozycji 7, położenie donora wiązania wodorowego

w pierścieniu fenylowym (*orto* bądź *meta*) nie wpływa na zmianę stopnia aktywności związku.

Badania enzymatyczne wybranych związków serii C potwierdziły potencjał do hamowania AKR1C3 struktur opartych na szkielecie 2-fenilo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu. Dodatkowo potwierdzono, zaobserwowany w dokowaniu związku C17, wpływ grupy hydroksylowej w pozycji 7 na sposób wiązania i siłę działania związków należących do tego chemotypu. Za wzrost aktywności związków C17 i C18 mogło odpowiadać dodatkowe wiązanie wodorowe, wytworzone między wspomnianą grupą hydroksylową i resztą Arg226, opisane w rozdziale 4.3.5.

4.4 Podsumowanie analiz *in silico* i testów enzymatycznych, wybór związków do badań komórkowych

W wyniku optymalizacji trójwymiarowych struktur krystalicznych CBR1 i AKR1C3, a następnie prospektywnych wirtualnych skriningów, zidentyfikowano szereg inhibitorów jednego lub obu enzymów. Kolejnym, po testach enzymatycznych, elementem oceny związków, były testy *in vitro* na komórkach linii A549, których celem było sprawdzenie wpływu inhibitora na aktywność przeciwnowotworową DNR. Do tych badań wybrano 8 związków: **C2, C17, C18, P7, P18, P20, P25 i P27**. Nie było wśród nich związków działających selektywnie wobec CBR1, jednak 2 z nich – C2 i C17 – wykazały większą aktywność wobec CBR1 niż AKR1C3. Aktywności uzyskane dla związku C17 pozwoliły na określenie go jako dualnego inhibitora CBR1-AKR1C3, a zatem związku o nieopisanej do tej pory (poza ASP9521), jednoczesnej aktywności wobec obu głównych reduktaz ANT. Pozostałe związki wykazały mniejszy lub większy stopień selektywności w stosunku do AKR1C3. Związek C18 wykazał około dziesięciokrotnie silniejszą aktywność wobec AKR1C3, porównywalną z określoną dla C17. Wartość IC₅₀ dla związków P7 i P25 była zbliżona dla uzyskanej dla C18, a dodatkowo oba związki wykazywały nieznaczny (niższy niż dla C18) stopień hamowania CBR1, który daje nadzieję na to, że ich dalsza optymalizacja może skutkować znalezieniem związków o wyższym powinowactwie do obu analizowanych enzymów. To, że modyfikacje strukturalne mogą znacząco wpłynąć na stopień badanych aktywności było widoczne zwłaszcza

w grupie pochodnych 1-benzoilopiperidyny, do których zaliczał się związek P7. Jednak słabsza aktywność pozostałych badanych cząsteczek sprawiła, że do badań komórkowych wytypowano zaledwie jednego przedstawiciela tego chemotypu. Mimo próby znalezienia dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, zidentyfikowano 3 selektywne, nieopisane dotychczas, inhibitory AKR1C3, których wpływ na aktywność DNR postanowiono dokładniej zbadać w modelach komórkowych. Były to związki P18, P20 i P27. Dwa pierwsze posiadały zdolność hamowania AKR1C3 na podobnym poziomie jak wymienione wcześniej związki serii P i C. Z kolei P27 okazał się najsilniejszym inhibitorem enzymu, o wartości IC_{50} wynoszącej 2,25 μM .

4.5 Ocena wpływu wybranych inhibitorów CBR1 i AKR1C3 na aktywność przeciwnowotworową daunorubicyny wobec komórek linii A549

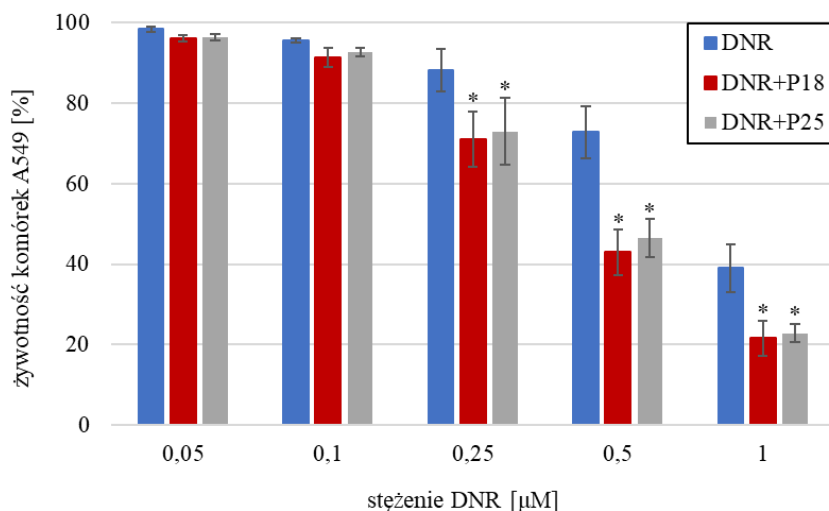
Opisane w rozdziale 4.5 badania biologiczne zostały przeprowadzone przez mgr farm. Kamila Piskę. W **Tabeli 17** przedstawiono wartości IC_{50} uzyskane dla DNR oraz dla kombinacji DNR z wybranymi inhibitorami reduktaz ANT.

Tab. 17: Ocena wpływu dodatku wybranych inhibitorów reduktaz ANT (zastosowanych w stężeniu 25 μM) na aktywność przeciwnowotworową DNR wobec komórek linii A549.

* istotność statystyczna +/- inhibitor przy $p < 0,05$

| związek lub kombinacja użytych związków | A549 IC_{50} (μM) |
|--|-------------------------------|
| DNR | 0,73 |
| DNR + P7 | 0,72 |
| DNR + P18 | 0,43 * |
| DNR + P20 | 0,77 |
| DNR + P25 | 0,46 * |
| DNR + P27 | 0,70 |
| DNR + C2 | 1,12 * |
| DNR + C17 | 0,92 |
| DNR + C18 | 1,01 * |

Dwa spośród badanych związków – P18 oraz P25 – wykazały statystycznie istotną poprawę aktywności DNR przy zastosowaniu kombinacji leku z inhibitorem, mierzona jako zmianę wartości IC_{50} . Dodatek związku P18 zmniejszał o 41,1% stężenie DNR konieczne do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych linii A549 o połowę. Dla związku P25 zaobserwowano nieznacznie mniejszą skuteczność (37,0%). Szczegółowe informacje dotyczące żywotności komórek nowotworowych po dodaniu P18 lub P25 w stężeniu 25 μ M, w szerokim zakresie stężeń DNR, przedstawiono na **Rycinie 45**. Badane inhibitory istotnie poprawiały skuteczność DNR zastosowanej w stężeniach 0,25, 0,5 oraz 1 μ M. Były to wyniki porównywalne z badanym wcześniej ASP9521, jednak związek ten poprawiał także działanie DNR zastosowanej w stężeniu 0,1 μ M (**Rycina 31** na stronie 122).



Ryc. 45: Efekt łącznego podania związku P18 lub P25 (25 μ M) i DNR na żywotność komórek linii A549, w porównaniu z DNR bez dodatku inhibitora reduktaz ANT, po 48 godzinach inkubacji; * istotność statystyczna -/+ inhibitor przy $p < 0,05$.

W przypadku pozostałych badanych związków serii P nie zaobserwowano ich korzystanego wpływu na aktywność przeciwnowotworową DNR, mimo hamowania AKR1C3 w stopniu porównywalnym, bądź lepszym, niż związki P18 i P25. Brak aktywności mógł wynikać z innych, nie branych dotychczas pod uwagę, mechanizmów wewnątrzkomórkowych, dezaktywujących badane inhibitory (na przykład w wyniku metabolizmu). Inną potencjalną przyczyną

mogła być wciąż niedostatecznie silna aktywność inhibitorów (badany wcześniej ASP9521 wykazywał kilkukrotnie silniejsze hamowanie AKR1C3, z wartością IC_{50} poniżej 1 μ M). Związki P18 oraz P25 mogły także działać poprzez inne mechanizmy, które razem z hamowaniem reduktaz ANT umożliwiły poprawę aktywności cytotoksycznej DNR. W takim przypadku te dodatkowe mechanizmy działania nie były aktywne dla pozostałych badanych związków serii P. Nie można także wykluczyć różnic stężeń, jakie poszczególne związki mogły osiągnąć w komórkach, z uwagi na różny stopień ich przenikania do wnętrza komórek. Zebrane hipotezy wymagają jednak dodatkowych badań i zweryfikowania faktycznej przyczyny ograniczonej skuteczności komórkowej związków o potwierdzonej wcześniej aktywności hamującej wobec głównych reduktaz ANT (głównie AKR1C3). Istotną informacją będzie także zbadanie wpływu dodatku inhibitorów na żywotność innych linii komórek nowotworowych, pochodzących z różnych narządów.

Podobne hipotezy można postawić także dla związków C2, C17 oraz C18, które, będąc inhibitorami co najmniej jednej reduktazy ANT, nie wpłynęły na poprawę aktywności DNR. Analiza wyników zebranych w **Tabeli 17** pokazuje, że wspomniane związki spowodowały zwiększenie stężenia DNR koniecznego do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych. W tym przypadku przyczyną uzyskanego efektu może być działanie związków serii C na alternatywne komórkowe szlaki przekazywania sygnału, powodujące zwiększenie oporności komórek linii A549 na działanie DNR. Jednak, podobnie jak dla związków serii P, również w tym przypadku należy przeprowadzić dodatkowe badania oraz ocenić, czy taki sam efekt (osłabienie efektu DNR) powtórzy się w przypadku zastosowania innych modeli komórkowych. Istotną informacją będzie także zbadanie wpływu wybranych inhibitorów enzymatycznych na żywotność kardiomiocytów po zastosowaniu DNR, w celu ustalenia potencjalnych właściwości kardioprotekcyjnych związków serii P oraz C.

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ OBJĘTYCH ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ

W ramach badań składających się na niniejszą rozprawę doktorską zastosowano wybrane metody komputerowo wspomaganego projektowania leków, umożliwiające optymalizację trójwymiarowych struktur najważniejszych reduktaz ANT: CBR1 i AKR1C3, a następnie, wykorzystując zoptymalizowane modele, wyselekcjonowano nowe inhibitory enzymatyczne, których celem miała być poprawa aktywności przeciwnowotworowej ANT (na przykładzie DNR).

W pierwszej części badań przeprowadzono optymalizację dwóch struktur krystalicznych CBR1: **1WMA** oraz **3BHJ**. Struktury te różniły się obecnością GSH w obrębie centrum aktywnego enzymu, a równoległa optymalizacja obu kryształów miała na celu umożliwienie selekcji takich związków, które miałyby możliwość wiązania się w centrum aktywnym CBR1 niezależnie od obecności dodatkowego kofaktora, którym był GSH. Do optymalizacji wykorzystano szereg małowcząsteczkowych ligandów enzymu. W wyniku optymalizacji i oceny uzyskanych nowych modeli strukturalnych, wybrano dwa modele o najkorzystniejszych parametrach retrospektywnego wirtualnego skriningu: **1WMA_A3** oraz **3BHJ_N1**, które następnie wykorzystano w prospektywnym wirtualnym skriningu. Pozwolił on na wyselekcjonowanie nowego chemotypu inhibitorów CBR1, opartego na strukturze **2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu**. W ramach dodatkowych symulacji, skriningów i analiz zależności struktura-aktywność, opisano najważniejsze elementy strukturalne, konieczne do uzyskania aktywności hamującej związków tej grupy wobec CBR1. Najważniejszą z nich było wprowadzenie elektronodonorowego podstawnika w położeniu 7 2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-onu. Dzięki zastosowaniu tej modyfikacji uzyskano najbardziej aktywne spośród badanych struktur związki **C17**, którego wartość IC_{50} wobec CBR1 ustalono na poziomie **0,68 μ M** (przy 7,92 μ M dla triclosanu, będącego związkiem referencyjnym).

W drugim etapie badań oceniono potencjał związku **ASP9521** do bycia inhibitorem CBR1. Związek ten, znany już wcześniej jako silny inhibitor AKR1C3,

posiadał cechy strukturalne, które zaobserwowano także dla inhibitorów CBR1. W wyniku zastosowania dokowania potwierdzono możliwość nawiązywania przez ASP9521 kluczowych oddziaływań w obrębie centrum aktywnego CBR1 (wiązania wodorowe z Ser139, Tyr193 i Met234; oddziaływanie π - π z Trp229). Zdolność utrzymania stabilnej pozy w obrębie centrum aktywnego przez ASP9521 została potwierdzona w wyniku przeprowadzenia symulacji MD. Symulacja pozwoliła także zaobserwować drugi potencjalny sposób wiązania, w którym zamiast wiązania wodorowego z Met234 występowało wiązanie wodorowe z resztą aminokwasową Phe94, która była wcześniej opisywana jako istotna dla sposobu wiązania GSH w centrum aktywnym CBR1. Zadawalające obserwacje uzyskane w części *in silico* skłoniły do zbadania efektu hamującego ASP9521 wobec rekombinowanego CBR1. Związek okazał się umiarkowanym inhibitorem enzymatycznym, z **IC₅₀ na poziomie 44,0 μ M**. Był to, według wiedzy autora, pierwszy przypadek opisanego dualnej aktywności hamującej wobec dwóch głównych reduktaz ANT. Po serii badań *in silico* oraz eksperymentów enzymatycznych oceniono wpływ ASP9521 na aktywność przeciwnowotworową DNR wobec komórek linii A549. Wykazano istotną statystycznie poprawę działania leku, zastosowanego razem z ASP9521, w przypadku użycia DNR w stężeniach 0,1, 0,25, 0,5 i 1 μ M (przy stężeniu ASP9521 równemu 25 μ M). Dodatek ASP9521 umożliwił obniżenie o 14,25% stężenia DNR koniecznego do zahamowania o połowę wzrostu komórek nowotworowych.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę znalezienia związków hamujących jednocześnie obie główne reduktazy ANT, a zatem będących dualnymi inhibitorami CBR1-AKR1C3. W ramach prac przeprowadzono optymalizację 2 struktur krystalicznych CBR1 (**1WMA** i **2PFG**; obie struktury bez GSH w centrum aktywnym; do tej części badań zmodyfikowano pulę ligandów narzędziowych, użytych do optymalizacji, w porównaniu z ligandami zastosowanymi w części badań dedykowanej nowym inhibitorom CBR1) oraz 5 struktur krystalicznych AKR1C3 (**1S2A**, **1S2C**, **4ZFC**, **6F78**, **7C7G**). W wyniku optymalizacji oraz szczegółowej oceny otrzymanych nowych modeli enzymatycznych, wybrano po jednym najlepszym modelu każdego z enzymów: **11E3** (CBR1) oraz **74H1** (AKR1C3), które następnie zostały wykorzystane w prospektywnych wirtualnych skriningach.

Pozwoliły one na wytypowanie 36 związków (seria P), będących potencjalnymi dualnymi inhibitorami CBR1-AKR1C3. Wybrane i zakupione molekuly zostały następnie zbadane w testach hamowania rekombinowanych enzymów: CBR1 i AKR1C3. Oceniono także możliwość hamowania AKR1C3 przez niektóre związki zbadane wcześniej w części dotyczącej poszukiwania nowych inhibitorów CBR1. Zbadane substancje okazały się umiarkowanymi bądź silnymi inhibitorami AKR1C3, z nieznaczną aktywnością hamującą wobec CBR1. Związkiem, który wykazał dualne właściwości hamowania CBR1 i AKR1C3 był wspomniany wcześniej **C17** (IC_{50} CBR1: 0,68 μ M; IC_{50} AKR1C3: 6,94 μ M). Wyniki badań potwierdziły możliwość uzyskania substancji o podwójnym mechanizmie działania, hamujących obie główne reduktazy ANT, jednak potrzeba dalszych analiz zależności struktura-aktywność w celu znalezienia związków o optymalnych, zrównoważonych właściwościach hamujących wobec obu wymienionych enzymów. Spośród ligandów wykazujących selektywność hamowania AKR1C3, najsilniejszym inhibitorem okazał się związek **P27**, którego IC_{50} wobec AKR1C3 wynosiło **2,25 μ M**.

8 związków o najkorzystniejszych właściwościach hamujących wobec CBR1/AKR1C3 wytypowano do badań na linii komórkowej A549, aby, podobnie jak wcześniej w przypadku ASP9521, ocenić ich wpływ na aktywność DNR. Związki **P18** oraz **P25** istotnie poprawiały aktywność DNR, zastosowanej w stężeniach 0,25, 0,5 oraz 0,1 μ M. Pozwoliły one obniżyć stężenie DNR niezbędne do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych o połowę o **41,1% (P18)** i **37,0% (P25)**. Dla pozostałych badanych substancji nie odnotowano podobnego efektu. Należy przeprowadzić pogłębione badania, mające na celu znalezienie przyczyny braku oczekiwanej aktywności, w tym badania przenikania (i wyrzutu) inhibitorów reduktaz ANT z komórek oraz analizy ich stężeń wewnątrzkomórkowych. Kolejnym elementem dalszej oceny związków powinno być sprawdzenie ich aktywności wobec innych linii komórek nowotworowych, jak również ocena ich potencjalnego efektu kardioprotekcyjnego wobec DNR na liniach komórek kardiomiocytów.

6. MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE

6.1 Rozwinięcia wybranych skrótów występujących w oprogramowaniu ADMET Predictor

| | |
|------|---|
| 1A2 | zwiększony metabolizm przez CYP450 podtyp 1A2 |
| 2C9 | zwiększony metabolizm przez CYP450 podtyp 2C9 |
| 2C19 | zwiększony metabolizm przez CYP450 podtyp 2C19 |
| 2D6 | zwiększony metabolizm przez CYP450 podtyp 2D6 |
| 3A4 | zwiększony metabolizm przez CYP450 podtyp 3A4 |
| CL | klirens > 50 µl/min/mg HLM (ludzkie mikrosomy wątrobowe; ang. human liver microsome) |
| HEPX | ryzyko wywołania wzrostu stężenia enzymów wątrobowych (ALT, AST, LDH) |
| hERG | ryzyko blokowania kanałów hERG |
| Kow | zbyt wysoka przewidywana wartość logP |
| mi | ryzyko hamowania metabolizmu midazolamu przez CYP3A4 |
| MUT | wartość MUT_Risk powyżej 1,0 |
| NIHS | potencjalna toksyczność w modelu opracowanym przez Japoński Narodowy Instytut Zdrowia |
| Peff | niska przepuszczalność przez błony biologiczne |
| rat | toksyczność ostra u szczurów |
| Sw | słaba rozpuszczalność w wodzie |
| ti | hamowanie metabolizmu testosteronu przez CYP3A4 |
| Xm | potencjał rakotwórczy w przewlekłym podaniu u myszy |
| Xr | potencjał rakotwórczy w przewlekłym podaniu u szczurów |
| m_97 | |
| m_98 | |
| m100 | modele predykcji mutagenności opracowane przez twórców |
| m102 | oprogramowania ADMET Predictor |
| m535 | |
| S_97 | |
| S_98 | |

6.2 Nazwy systematyczne oraz zapisy struktur (SMILES) związków rozpatrywanych jako potencjalne nowe inhibitory CBR1

ZINC000019415295:

2-(sulfanylometylo)-4H-pirydo[1,2-a]pirymidyn-4-on
SCc1cc(=O)n2ccccc2n1

ZINC000021952985 – C1:

2-(hydroksymetylo)-4H-pirydo[1,2-a]pirymidyn-4-on
OCc1cc(=O)n2ccccc2n1

ZINC000028711584:

9-hydroksy-2-fenylo-4H-pirydo[1,2-a]pirymidyn-4-on
Oc1cccn2c1nc(cc2=O)-c1ccccc1

ZINC000039311044:

2-(dimetyloamino)-4H-pirydo[1,2-a]pirymidyn-4-on
CN(C)c1cc(=O)n2ccccc2n1

ZINC000047844254:

2-(aminometylo)-4H-pirydo[1,2-a]pirymidyn-4-on
NCc1cc(=O)n2ccccc2n1

ZINC001775974140:

2-[4-(5-metylopirymidyn-4-ylo)piperazyn-1-ylo]-4H-pirydo[1,2-a]
pirymidyn-4-on
Cc1cnnc1N1CCN(CC1)c1cc(=O)n2ccccc2n1

ZINC000048603426 – C2:

2-(3-hydroksyfenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Oc1cccc(c1)-c1nc2ccccc2c(=O)[nH]1

ZINC000085650623:

2-(5-chloro-2-hydroksy-fenylo)-3H-chinazolin-4-on
O=c1[nH]c(-c2cc(Cl)ccc2O)nc2ccccc12

ZINC000100329695:

2-[4-hydroksy-2-okso-1-(prop-2-en-1-ylo)-1,2-dihydrochinolin-3-ylo]-3,4-
dihydrochinazolin-4-on
Oc1c(-c2nc3ccccc3c(=O)[nH]2)c(=O)n(CC=C)c2ccccc12

ZINC000100504354:

2-(4-hydroksy-2-okso-1-propylo-1,2-dihydrochinolin-3-ylo)-3,4-
dihydrochinazolin-4-on
CCCN1c2ccccc2c(O)c(-c2nc3ccccc3c(=O)[nH]2)c1=O

ZINC000169353962:

2-(2-hydroksy-5-metoksyfenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Oc1ccc(O)c(-c2nc3ccccc3c(=O)[nH]2)c1

ZINC000000039292:

2-(2,3-dihydroksyfenylo)-4H-chromen-4-on
Oc1ccc(c1O)-c1cc(=O)c2ccccc2o1

ZINC000001762468:

kwaz 2,3-dimetylo-1,4-diokso-1,2,3,4-tetrahydroftalazyno-6-karboksylowy
Cn1n(C)c(=O)c2cc(ccc2c1=O)C(O)=O

ZINC000003420326 – C3:

3-metylo-4-okso-3,4-dihydroftalazyno-1-karboksyamid
Cn1nc(C(N)=O)c2ccccc2c1=O

ZINC000005687485:

2-(4-hydroksy-2-okso-1,2-dihydrochinolin-3-ylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Oc1c(-c2nc3ccccc3c(=O)[nH]2)c(=O)[nH]c2ccccc12

ZINC000039279020:

2-(2-hydroksyfenylo)-4H-1,3-benzoksazyn-4-on
Oc1ccccc1-c1nc(=O)c2ccccc2o1

ZINC000036755988:

2-(3-nitrofenylo)-heksahydro-1H-pirol[1,2-c]imidazolo-1,3-dion
[O-][N+](=O)c1cccc(c1)N1C(=O)C2CCCN2C1=O

ZINC000037515027:

2-(4-aminofenylo)-heksahydro-1H-pirol[1,2-c]imidazolo-1,3-dion
Nc1ccc(cc1)N1C(=O)C2CCCN2C1=O

ZINC000041110883:

2-[3-(trifluorometylo)fenylo]-heksahydro-1H-pirol[1,2-c]imidazolo-1,3-dion
FC(F)(F)c1cccc(c1)N1C(=O)C2CCCN2C1=O

ZINC000095921821:

2-(2,3-dihydro-1,4-benzodioksyn-6-ylo)-heksahydro-1H-pirol[1,2-c]
imidazolo-1,3-dion
O=C1C2CCCN2C(=O)N1c1ccc2OCCOc2c1

ZINC000253420315:

2-[1-(2,6-difluorofenylo)pirolidyn-3-ylo]-heksahydro-1H-pirol[1,2-c]
imidazolo-1,3-dion
Fc1cccc(F)c1N1CCC(C1)N1C(=O)C2CCCN2C1=O

ZINC000905477248 – C4:

(6S,7aS)-2-{5H,6H,7H-cyklopenta[b]pirydyn-2-ylo}-6-fluoro-heksahydro-1H-pirol[1,2-c]imidazolo-1,3-dion

F[C@H]1C[C@@H]2N(C1)C(=O)N(C2=O)c1ccc2CCCc2n1

ZINC000000237668:

4-(2,3-dihydro-1H-indol-1-karbonylo)-N,N-dimetyloanilina

CN(C)c1ccc(cc1)C(=O)N1CCc2ccccc12

ZINC000005350730:

1-{5,7-dimetylo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirymidyno-2-karbonylo}-2,3-dihydro-1H-indol

Cc1cc(C)n2nc(nc2n1)C(=O)N1CCc2ccccc12

ZINC000014166710 – C5:

4-(2,6-dimetylomorfolino-4-karbonylo)-2-etylo-1,2-dihydroftalazyn-1-on

CCn1nc(C(=O)N2CC(C)OC(C)C2)c2ccccc2c1=O

ZINC000020724028:

4-(2-cyklopropylo-1,3-dioksa-2,3-dihydro-1H-izoindolo-5-karbonylo)piperazyno-1-karbaldehyd

O=CN1CCN(CC1)C(=O)c1ccc2C(=O)N(C3CC3)C(=O)c2c1

ZINC000021873664:

2-[4-(chinolino-8-karbonylo)piperazyn-1-ylo]fenol

Oc1ccccc1N1CCN(CC1)C(=O)c1cccc2ccncc12

ZINC000067676939:

1-metylo-4-[5-(propan-2-ylo)-4H,5H,6H,7H,8H-pirazolo[1,5-a][1,4]diazepino-2-karbonylo]piperazyn-2-on

CC(C)N1CCCN2nc(cc2C1)C(=O)N1CCN(C)C(=O)C1

ZINC000000205291:

1,3-dimetylo-6-[3-(trifluorometylo)fenylo]-1H,2H,3H,4H,6H-pirol[3,4-d]pirymidyno-2,4-dion

Cn1c2cn(cc2c(=O)n(C)c1=O)-c1cccc(c1)C(F)(F)F

ZINC000000317308:

6-(2-hydroksyfenylo)-1,3-dimetylo-1H,2H,3H,4H,6H-pirol[3,4-d]pirymidyno-2,4-dion

Cn1c2cn(cc2c(=O)n(C)c1=O)-c1cccc1O

ZINC000004295875:

6-(3,4-dimetylofenylo)-1,3-dimetylo-1H,2H,3H,4H,6H-pirol[3,4-d]pirymidyno-2,4-dion

Cc1ccc(cc1C)-n1cc2n(C)c(=O)n(C)c(=O)c2c1

ZINC000015974495 – C6:

8-(2-hydroksyfenylo)-1,3-dimetylo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-puryno-2,6-dion
Cn1c2nc([nH]c2c(=O)n(C)c1=O)-c1ccccc1O

ZINC001704338487:

6-(1,3-dimetylo-1H-1,2,4-triazol-5-ilo)-2,3-dimetylo-3H,4H,5H,6H,7H-
pirolo[3,4-d]pirymidin-4-on
Cc1nc(N2Cc3nc(C)n(C)c(=O)c3C2)n(C)n1

ZINC000000401014:

2-(3-etoksy-4-hydroksyfenylo)-4H,6H,7H,8H,9H,10H-pirymido[1,2-a]
azepin-4-on
CCOc1cc(ccc1O)-c1cc(=O)n2CCCCC2c2n1

ZINC000002546634:

2-(3-nitrofenylo)-4H,6H,7H,8H,9H,10H-pirymido[1,2-a]azepin-4-on
O=c1cc(-c2cccc([N+](=O)[O-])c2)nc2n1CCCCC2

ZINC000008496538:

2-(2-metoksyfenylo)-4H,6H,7H,8H,9H,10H-pirymido[1,2-a]azepin-4-on
COc1ccccc1-c1cc(=O)n2c(n1)CCCCC2

ZINC000016769085 – C7:

2-(2-hydroksynaftalen-1-ylo)-4H,6H,7H,8H,9H,10H-pirymido[1,2-a]
azepin-4-on
Oc1ccc2ccccc2c1-c1cc(=O)n2CCCCC2c2n1

ZINC000016769160:

2-(5-bromo-2-hydroksyfenylo)-4H,6H,7H,8H,9H,10H-pirymido[1,2-a]
azepin-4-on
Oc1ccc(Br)cc1-c1cc(=O)n2CCCCC2c2n1

ZINC000000135046:

9-okso-9H-fluoreno-4-karboksyamid
NC(=O)c1cccc2C(=O)c3ccccc3-c12

ZINC000000204590:

(6aR)-6-hydroksy-5H,6H,6aH,11H-izoindolo[2,1-a]chinazolino-5,11-dion
O=C1c2ccccc2N2C(=O)c3ccccc3[C@H]2N1O

ZINC000001619977:

2-hydroksy-1H,2H,3H,9H-pirazolo[1,2-a]indazol-9-on
O=c1c2ccccc2n2n1C[C@@H](O)C2

ZINC000004727263 – C8:

4-metylo-1,4,5,8-tetraazatetracyklo[7.7.0.0²,⁶.0¹⁰,¹⁵]heksadeka-2,5,10,12,14-pentaeno-7,16-dion

Cn1cc2N3C(NC(=O)c2n1)c1cccc1C3=O

ZINC000005451717:

(3E)-3-[(2-hydroksyfenylo)metylideno]-1H,2H,3H,5H-pirolol[1,2-a]chinazolin-5-on

Oc1cccc1\C=C1/CCn2c1nc(=O)c1cccc21

ZINC000026897271:

5-okso-1H,2H,3H,5H,6H-indolo[2,3-f]indolizyno-11-karboksylian metylu

COC(=O)c1c2n(c(=O)c3[nH]c4cccc4c13)CCC2

ZINC000045958428:

1-(1,2-dihydroacenaftylen-5-ylo)-5-oksopirolidyno-3-karboksyamid

NC(=O)C1CN(C(=O)C1)c1ccc2CCc3cccc1c23

ZINC000001711094:

3-[(E)-[(2-hydroksynaftalen-1-ylo)metylideno]amino]-2-sulfanylideno-1,3-tiazolidyn-4-on

O=C1CSC(=S)N1/N=C/c1c(O)ccc2ccccc12

ZINC000045953662:

1-[3-(4-karbamoilo-2-oksopirolidyn-1-ylo)fenylo]-5-oksopirolidyno-3-karboksyamid

NC(=O)C1CN(C(=O)C1)c1cccc(c1)N1CC(CC1=O)C(N)=O

ZINC000065488968:

3-(2-aminoetylo)-4-[4-(trifluorometylo)fenylo]-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-on

NCCc1n[nH]c(=O)n1-c1ccc(cc1)C(F)(F)F

ZINC000065493318 – C9:

3-(2-aminoetylo)-4-(4-tert-butylofenylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-on

CC(C)(C)c1ccc(cc1)-n1c(CCN)n[nH]c1=O

ZINC000095349528:

2-[[2-(trifluorometylo)fenylo]metylo]-2H,3H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirydyn-3-on

FC(F)(F)c1cccc1Cn1nc2cccn2c1=O

ZINC000017917305 – C10:

2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-on

O=c1[nH]c(nc2ccccc12)-c1cccc1

ZINC000005072886 – C11:

2-(2-hydroksyfenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Oc1cccc1-c1nc2cccc2c(=O)[nH]1

ZINC000005939834 – C12:

2-(3-fluorofenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Fc1ccc(c1)-c1nc2cccc2c(=O)[nH]1

ZINC000048237694 – C13:

3-(4-okso-3,4-dihydrochinazolin-2-ylo)benzeno-1-sulfonamid
NS(=O)(=O)c1cccc(c1)-c1nc2cccc2c(=O)[nH]1

ZINC000016577257 – C14:

8-metylo-2-fenylo-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Cc1cccc2c(=O)[nH]c(-c3cccc3)nc12

C15:

2-(3-aminofenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Nc1ccc(c1)-c1nc2cccc2c(=O)[nH]1

C16:

2-(2-aminofenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
Nc1cccc1-c1nc2cccc2c(=O)[nH]1

C17:

7-hydroksy-2-(3-hydroksyfenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
O=c2[nH]c(c1cccc(O)c1)nc3cc(O)ccc23

C18:

7-hydroksy-2-(2-hydroksyfenylo)-3,4-dihydrochinazolin-4-on
O=c2[nH]c(c1cccc1O)nc3cc(O)ccc23

6.3 Nazwy systematyczne oraz zapisy struktur (SMILES) związków rozpatrywanych jako potencjalne dualne inhibitory CBR1-AKR1C3

ZINC001772701434 – P1:

1-[1-(4-chloro-3-metylobenzoilo)piperydyn-4-ylo]etano-1,2-diol
Cc1cc(ccc1Cl)C(=O)N1CCC(CC1)C(O)CO

ZINC000652662803 – P2:

1-[1-(4-chloro-3-metylobenzoilo)piperydyn-4-ylo]cyklopropan-1-ol
Cc1cc(ccc1Cl)C(=O)N1CCC(CC1)C1(O)CC1

ZINC001772707839 – P3:

1-[1-(3-chloro-4-metoksybenzoilo)piperydyn-4-ylo]etano-1,2-diol
COc1ccc(cc1Cl)C(=O)N1CCC(CC1)C(O)CO

ZINC000652664444 – P4:

1-[1-(4-fluoro-3-metylobenzoilo)piperydyn-4-ylo]cyklopropan-1-ol
Cc1cc(ccc1F)C(=O)N1CCC(CC1)C1(O)CC1

ZINC001772707392 – P5:

1-{1-[3-(dimetyloamino)benzoilo]piperydyn-4-ylo}etano-1,2-diol
CN(C)c1cccc(c1)C(=O)N1CCC(CC1)C(O)CO

ZINC000027476037 – P6:

1-{4-[3-(dimetyloamino)benzoilo]piperazyn-1-ylo}etan-1-on
CN(C)c1cccc(c1)C(=O)N1CCN(CC1)C(C)=O

ZINC001772806576 – P7:

4'-[4-(1-hydroksycyklopropylo)piperydyno-1-karbonylo]-[1,1'-bifenylo]-4-ol
Oc1ccc(cc1)-c1ccc(cc1)C(=O)N1CCC(CC1)C1(O)CC1

ZINC000426615113 – P8:

1-[4-(6-metoksypirydazyn-3-ylo)benzoilo]piperydyno-3-karboksyamid
COc1ccc(nn1)-c1ccc(cc1)C(=O)N1CCCC(C1)C(N)=O

ZINC001772804861 – P9:

1-(1-{4-[(5-metylo-1H-1,2,3,4-tetrazol-1-ilo)metylo]benzoilo}piperydyn-4-ylo)cyklopropan-1-ol
Cc1nnmn1Cc1ccc(cc1)C(=O)N1CCC(CC1)C1(O)CC1

ZINC000426544915 – P10:

(1-{8-metyloimidazo[1,2-a]pirydyno-2-karbonylo}pirolidyn-3-ylo)metanosulfonamid
Cc1cccn2cc(nc12)C(=O)N1CCC(CS(N)(=O)=O)C1

ZINC000299802561 – P11:

(1-{6-metyloimidazo[1,2-a]pirydyno-2-karbonylo}pirolidyn-3-ylo)metanosulfonamid
Cc1ccc2nc(cn2c1)C(=O)N1CCC(CS(N)(=O)=O)C1

ZINC000426624733 – P12:

{1-[3-(4-metylofenylo)-1H-pirazolo-5-karbonylo]pirolidyn-3-ylo}metanosulfonamid
Cc1ccc(cc1)-c1cc([nH]n1)C(=O)N1CCC(CS(N)(=O)=O)C1

ZINC000241657646 – P13:

4-[3-(2,6-difluorofenylo)pirolidyno-1-karbonylo]-1-(propan-2-ylo)-1H-pirazol

CC(C)n1cc(cn1)C(=O)N1CCC(C1)c1c(F)cccc1F

ZINC000584885359 – P14:

1-(difluorometylo)-3-[3-(4-fluorofenylo)pirolidyno-1-karbonylo]-1H-pirazol
FC(F)n1ccc(n1)C(=O)N1CCC(C1)c1ccc(F)cc1

ZINC001772711426 – P15:

1-[1-(1,3-benzotiazol-6-karbonylo)piperydyn-4-ylo]etano-1,2-diol
OCC(O)C1CCN(CC1)C(=O)c1ccc2nsc2c1

ZINC001772703993 – P16:

1-(1-{6-chloroimidazo[1,2-a]pirydyno-2-karbonylo}piperydyn-4-ylo)
etano-1,2-diol
OCC(O)C1CCN(CC1)C(=O)c1cn2cc(Cl)ccc2n1

ZINC000071422287 – P17:

Kwas 4-hydroksy-1-{8-metyloimidazo[1,2-a]pirydyno-2-karbonylo}
piperydyno-4-karboksylowy
Cc1cccn2cc(nc12)C(=O)N1CCC(O)(CC1)C(O)=O

ZINC001506407800 – P18:

1-metylo-6-[3-(pirydyno-2-karbonylo)piperydyno-1-karbonylo]-1H-indol
Cn1ccc2ccc(cc12)C(=O)N1CCCC(C1)C(=O)c1cccn1

ZINC000084300174 – P19:

1-[1-(7-chlorochinolino-2-karbonylo)piperydyn-4-ylo]etan-1-ol
CC(O)C1CCN(CC1)C(=O)c1ccc2ccc(Cl)cc2n1

ZINC000096417271 – P20:

7-(naftaleno-2-karbonylo)-3-(trifluorometylo)-5H,6H,7H,8H-
[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazyna
FC(F)(F)c1nnc2CN(CCn12)C(=O)c1ccc2ccccc2c1

ZINC000426647288 – P21:

3-fluoro-7-metylo-2-{4H,5H,6H,7H-[1,2]oksazolo[4,3-c]pirydyno-5-
karbonylo}imidazo[1,2-a]pirydyna
Cc1ccn2c(F)c(nc2c1)C(=O)N1CCc2nocc2C1

ZINC000033089119 – P22:

1-{2-metylo-9-okso-1-azatricyklo[6.3.1.0⁴,¹²]dodeka-4(12),5,7,10-tetraeno-
10-karbonylo}piperydyno-4-karboksyamid
CC1Cc2cccc3c2n1cc(C(=O)N1CCC(CC1)C(N)=O)c3=O

ZINC000044322682 – P23:

1-{3H-benzo[e]indolo-2-karbonylo}piperydyno-4-karboksyamid
NC(=O)C1CCN(CC1)C(=O)c1cc2c(ccc3ccccc23)[nH]1

ZINC000002917054 – P24:

6-metylo-N-[(4-metylofenylo)metylo]-2-okso-1,6,8-triazatrycyklo
[7.4.0.0³,7]trideka-3(7),4,8,10,12-pentaen -5-karboksyamid
Cc1ccc(CNC(=O)c2cc3c(nc4cccn4c3=O)n2C)cc1

ZINC000004038559 – P25:

(11aR)-2-[(2-chlorofenylo)metylo]-1H,2H,3H,4H,6H,11H,11aH-
pirazyno[1,2-b]izochinolino-1,4-dion
Clc1cccc1CN1CC(=O)N2Cc3cccc3C[C@@H]2C1=O |r|

ZINC000000804414 – P26:

5-(3-chlorobenzoiolo)-2,5,7-triazatrycyklo[6.4.0.0²,6]dodeka-1(12),6,8,10-tetraen
Clc1cccc(c1)C(=O)N1CCn2c1nc1cccc21

ZINC000006473269 – P27:

kwas 9-okso-3-[(tiofen-3-ylo)metylideno]-1H,2H,3H,9H-pirola
[2,1-b]chinazolino-6-karboksylowy
OC(=O)c1ccc2c(c1)nc1C(CCn1c2=O)=Cc1ccsc1 |w:17.20|

ZINC0000085471650 – P28:

1-(3,4-dimetylofenylo)-N-[2-(furan-3-ylo)-2-hydroksyetylo]-5-
oksopirolidyno-3-karboksyamid
Cc1ccc(cc1C)N1CC(CC1=O)C(=O)NCC(O)c1ccoc1

ZINC000000045016 – P29:

1-(4-etylofenylo)-N-(3-metoksyfenylo)-5-oksopirolidyno-3-karboksyamid
CCc1ccc(cc1)N1CC(CC1=O)C(=O)Nc1cccc(OC)c1

ZINC000012737415 – P30:

1-(3-fluoro-4-metylofenylo)-N-[(4-fluorofenylo)metylo]-5-oksopirolidyno-
3-karboksyamid
Cc1ccc(cc1F)N1CC(CC1=O)C(=O)NCc1ccc(F)cc1

ZINC000004374220 – P31:

N1-[1-(4-fluorofenylo)-5-oksopirolidyn-3-ylo]piperydyno-1,4-dikarboksyamid
NC(=O)C1CCN(CC1)C(=O)NC1CN(C(=O)C1)c1ccc(F)cc1

ZINC000009341746 – P32:

N-[2-(4-sulfamoiłofenylo)etylo]-1H-indolo-6-karboksyamid
NS(=O)(=O)c1ccc(CCNC(=O)c2ccc3cc[nH]c3c2)cc1

ZINC001529195604 – P33:

N-[(2S,3aR,5S,6aS)-5-hydroksy-oktahydropentalen-2-ylo]-N,2,3-
trimetylochinosalino-6-karboksyamid
CN([C@@H]1C[C@@H]2[C@H](O)C[C@@H]2C1)C(=O)c1ccc2nc(C)
c(C)nc2c1 |r|

ZINC000225547029 – P34:

2-[(3-fluorofenylo)metylo]-7-fenylo-2H,3H,7H,8H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]
pirazyno-3,8-dion

Fc1cccc(Cn2nc3n(ccn(-c4ccccc4)c3=O)c2=O)c1

ZINC000225547254 – P35:

7-(4-metylofenylo)-2-[(4-metylofenylo)metylo]-2H,3H,7H,8H-[1,2,4]
triazolo[4,3-a]pirazyno-3,8-dion

Cc1ccc(Cn2nc3n(ccn(-c4ccc(C)cc4)c3=O)c2=O)cc1

ZINC000189971696 – P36:

1-(7-fluoro-4-propylo-1,2,3,4-tetrahydrochinoksalin-1-ylo)-2-(1-metylo-
1H-pirazol-4-ilo)etan-1-on

CCCN1CCN(C(=O)Cc2cnn(C)c2)c2cc(F)ccc12

6.4 Predykcja *in silico* wybranych parametrów ADMET potencjalnych dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, nieprzedstawionych w rozdziale 4.3.6

Na kolejnych stronach, w **Tabelach 18** oraz **19**, przedstawiono wykaz predykcji parametrów ADMET dla związków, które nie zostały szczegółowo omówione w głównej części rozprawy doktorskiej.

Tab. 18: Wybrane parametry ADMET związków P1-P36, nieprzedstawionych w głównej części rozprawy (1/2)

| kod | związek | rozp. | logP | TPSA | fr. sp3 | GI abs. | BBB perm. | PAINS | BRENK | hum fup% | hERG filter | Pgp subs. | Pgp inh. |
|-----|------------------|-------|------|--------|---------|---------|-----------|-------|-------|----------|-------------|-----------|----------|
| P3 | ZINC001772707839 | | 1,69 | 70,00 | 0,53 | | | | | 24,289 | | | |
| P5 | ZINC001772707392 | | 1,22 | 64,01 | 0,56 | | | | | 34,656 | | | |
| P6 | ZINC000027476037 | | 1,14 | 43,86 | 0,47 | | | | | 55,828 | | | |
| P8 | ZINC000426615113 | | 1,43 | 98,41 | 0,33 | | | | | 20,115 | | | |
| P9 | ZINC001772804861 | | 1,65 | 84,14 | 0,56 | | | | | 25,586 | | | |
| P10 | ZINC000426544915 | | 0,61 | 106,15 | 0,43 | | | | | 45,67 | | | |
| P11 | ZINC000299802561 | | 0,53 | 106,15 | 0,43 | | | | | 46,284 | | | |
| P12 | ZINC000426624733 | | 1,17 | 117,53 | 0,38 | | | | | 23,148 | | | |
| P13 | ZINC000241657646 | | 3,15 | 38,13 | 0,41 | | | | | 9,649 | | | |
| P14 | ZINC000584885359 | | 2,91 | 38,13 | 0,33 | | | | | 8,181 | | | |
| P15 | ZINC001772711426 | | 1,66 | 101,90 | 0,47 | | | | | 20,821 | | | |
| P16 | ZINC001772703993 | | 1,33 | 78,07 | 0,47 | | | | | 31,486 | | | |
| P17 | ZINC000071422287 | | 0,61 | 95,14 | 0,40 | | | | | 21,725 | | | |

| kod | związek | MUT_Risk | MUT_Code | TOX_Risk | TOX_Code | CYP_Risk | CYP_Code | Absn_Risk | Absn_Code |
|-----|------------------|----------|---------------------------|----------|-------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| P3 | ZINC001772707839 | | | | | 1,769 | 1A2; 2C19 | | |
| P5 | ZINC001772707392 | | | | | | | | |
| P6 | ZINC000027476037 | | | | | 1,179 | 1A2; mi | | |
| P8 | ZINC000426615113 | | | 2 | Xr; Xm | 0,903 | 1A2 | | |
| P9 | ZINC001772804861 | | | 1,022 | Xr; Xm | 0,232 | 3A4 | | |
| P10 | ZINC000426544915 | | | | | | | 1 | Peff |
| P11 | ZINC000299802561 | | | | | | | 1 | Peff |
| P12 | ZINC000426624733 | | | 1,527 | Xr; Xm | 0,082 | 2C19 | 1 | Peff |
| P13 | ZINC000241657646 | | | 2 | Xm; HEPX | 1,508 | 3A4; mi | | |
| P14 | ZINC000584885359 | | | 2,262 | rat; Xr; Xm | 0,645 | 3A4; mi | | |
| P15 | ZINC001772711426 | 0,9 | S_97; S_98 | 1,803 | Xr; Xm | | | | |
| P16 | ZINC001772703993 | 1,8 | S_98; m100; m102; m535 | 1 | MUT | | | | |
| P17 | ZINC000071422287 | 0,3 | S_98 | | | | | 1 | Peff |

Tab. 19: Wybrane parametry ADMET związków P1-P36, nieprzedstawionych w głównej części rozprawy (2/2)

| kod | związek | rozp. | logP | TPSA | fr. sp3 | GI abs. | BBB perm. | PAINS | BRENK | hum fup% | hERG filter | Pgp subs. | Pgp inh. |
|-----|------------------|-------|------|--------|---------|---------|-----------|-------|-------|----------|-------------|-----------|----------|
| P19 | ZINC000084300174 | | 2,86 | 53,43 | 0,41 | | | | | 9,628 | | | |
| P22 | ZINC000033089119 | | 1,49 | 85,40 | 0,42 | | | | | 27,864 | | | |
| P24 | ZINC000002917054 | | 2,59 | 68,40 | 0,15 | | | | | 8,543 | | | |
| P26 | ZINC000000804414 | | 2,81 | 38,13 | 0,12 | | | | | 6,030 | | | |
| P28 | ZINC000085471650 | | 1,68 | 82,78 | 0,37 | | | | | 24,775 | | | |
| P29 | ZINC000000045016 | | 2,81 | 58,64 | 0,30 | | | | | 7,268 | | | |
| P30 | ZINC000012737415 | | 3,16 | 49,41 | 0,26 | | | | | 8,596 | | | |
| P31 | ZINC000004374220 | | 0,80 | 95,74 | 0,47 | | | | | 35,026 | | | |
| P32 | ZINC000009341746 | | 1,82 | 113,43 | 0,12 | | | | | 13,354 | | | |
| P33 | ZINC001529195604 | | 2,64 | 66,32 | 0,55 | | | | | 13,99 | | | |
| P34 | ZINC000225547029 | | 2,48 | 61,30 | 0,06 | | | | | 6,955 | | | |
| P35 | ZINC000225547254 | | 2,83 | 61,30 | 0,15 | | | | | 6,334 | | | |
| P36 | ZINC000189971696 | | 2,27 | 41,37 | 0,41 | | | | | 12,215 | | | |

| kod | związek | MUT_Risk | MUT_Code | TOX_Risk | TOX_Code | CYP_Risk | CYP_Code | Absn_Risk | Absn_Code |
|-----|------------------|----------|---------------------|----------|----------|----------|----------------------|-----------|-----------|
| P19 | ZINC000084300174 | 1,5 | m_97; S100; m102 | 1 | MUT | 0,263 | 1A2 | | |
| P22 | ZINC000033089119 | 0,9 | S_97; m_98 | | | 0,748 | mi | | |
| P24 | ZINC000002917054 | | | | | 0,273 | 3A4 | | |
| P26 | ZINC000000804414 | 0,9 | S_97; m_98 | 0,313 | hERG | 0,972 | 1A2 | | |
| P28 | ZINC000085471650 | 0,6 | S_98; m100 | 1 | Xr | 0,226 | 3A4 | | |
| P29 | ZINC000000045016 | | | 0,42 | Xr | 1,73 | 1A2; 2D6; 3A4; ti | | |
| P30 | ZINC000012737415 | | | | | 1,302 | 2C9; 3A4 | | |
| P31 | ZINC000004374220 | 0,6 | m535 | 1 | Xr | 0,777 | 3A4 | | |
| P32 | ZINC000009341746 | 0,6 | NIHS | 1 | Xr | 1,167 | 2C9; 2C19; ti | 1 | Peff |
| P33 | ZINC001529195604 | 0,3 | S_98 | 0,257 | Xr | | | | |
| P34 | ZINC000225547029 | 0,3 | m100 | 1 | Xm | 0,359 | 3A4 | | |
| P35 | ZINC000225547254 | | | 1 | Xm | | | 0,108 | Sw |
| P36 | ZINC000189971696 | | | 1 | Xm | 1,736 | 3A4; mi; ti | | |

7. SPIS TABEL I RYCIN

7.1 Spis tabel

| | | |
|---------|--|----------|
| Tab. 1 | Kryteria analizy wybranych parametrów ADMET potencjalnych nowych inhibitorów reduktaz ANT, określonych przy wykorzystaniu serwisu SwissADME oraz programu ADMET Predictor | str. 75 |
| Tab. 2 | Podsumowanie procesu optymalizacji kryształów CBR1 (1WMA oraz 3BHJ), przy użyciu metody IFD, z zastosowaniem piętnastu wybranych ligandów narzędziowych CBR1 | str. 80 |
| Tab. 3 | Zestaw parametrów retrospektywnego wirtualnego skryningu najlepszych modeli uzyskanych w wyniku optymalizacji kryształów 1WMA oraz 3BHJ | str. 83 |
| Tab. 4 | Podsumowanie retrospektywnego wirtualnego skryningu modeli uzyskanych na bazie optymalizacji struktury 3BHJ | str. 84 |
| Tab. 5 | Ocena stabilności hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanych modeli CBR1 - średnie odległości, uzyskane w kolejnych przedziałach czasowych 20 ns symulacji MD modeli uzyskanych w oparciu o strukturę 1WMA i 3BHJ | str. 88 |
| Tab. 6 | Wybrane parametry ADMET nowych, potencjalnych inhibitorów CBR1 | str. 97 |
| Tab. 7 | Ocena hamowania aktywności rekombinowanego CBR1 przez związki C1-C9 oraz znany inhibitor enzymu - triklosan | str. 100 |
| Tab. 8 | Ocena hamowania aktywności rekombinowanego CBR1 przez związki C2 oraz C10-C18 | str. 104 |
| Tab. 9 | Porównanie wybranych parametrów ADMET związków C2 i C17 | str. 109 |
| Tab. 10 | Podsumowanie procesu optymalizacji kryształów CBR1 (1WMA oraz 2PFG) przy użyciu metody IFD | str. 125 |
| Tab. 11 | Podsumowanie procesu optymalizacji wybranych kryształów AKR1C3 przy użyciu metody IFD | str. 127 |

| | | |
|---------|---|----------|
| Tab. 12 | Zestaw parametrów retrospektywnego wirtualnego skringu najlepszych modeli uzyskanych w wyniku optymalizacji wybranych kryształów CBR1 oraz AKR1C3 | str. 132 |
| Tab. 13 | Podsumowanie retrospektywnego wirtualnego skringu nowych modeli AKR1C3 | str. 134 |
| Tab. 14 | Ocena stabilności hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanych modeli CBR1 (a) i AKR1C3 (b) - średnie odległości, uzyskane w kolejnych przedziałach czasowych 50 ns symulacji MD | str. 137 |
| Tab. 15 | Wybrane parametry ADMET nowych, potencjalnych dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3 | str. 153 |
| Tab. 16 | Ocena hamowania aktywności rekombinowanego CBR1 i AKR1C3 przez związki P1-P36 oraz wybrane związki serii C | str. 155 |
| Tab. 17 | Ocena wpływu dodatku wybranych inhibitorów reduktaz ANT (zastosowanych w stężeniu 25 μ M) na aktywność przeciwnowotworową DNR wobec komórek linii A549 | str. 163 |
| Tab. 18 | Wybrane parametry ADMET związków P1-P36, nieprzedstawionych w głównej części rozprawy (1/2) | str. 180 |
| Tab. 19 | Wybrane parametry ADMET związków P1-P36, nieprzedstawionych w głównej części rozprawy (2/2) | str. 181 |

7.2 Spis rycin

| | | |
|--------|--|---------|
| Ryc. 1 | Struktura wybranych leków z grupy antybiotyków antracyklinowych | str. 24 |
| Ryc. 2 | Schemat metabolizmu ANT do ich zredukowanych pochodnych o potencjalnych właściwościach kardiotoxycznych oraz zmniejszonej aktywności przeciwnowotworowej, na przykładzie metabolizmu DNR | str. 27 |
| Ryc. 3 | Centrum aktywne CBR1 w trzech strukturach krystalicznych enzymu: 1WMA, 3BHJ, 4Z3D | str. 31 |
| Ryc. 4 | Sposób wiązania ligandów w centrum aktywnym CBR1 na przykładzie DNR | str. 32 |
| Ryc. 5 | Struktury wybranych inhibitorów CBR1 | str. 33 |

| | | |
|---------|---|------------|
| Ryc. 6 | Sposób wiązania ligandów w centrum aktywnym AKR1C3 na przykładzie DNR | str. 34 |
| Ryc. 7 | Porównanie struktur ASP9521 i wybranych ligandów CBR1: daunorubicyny, luteoliny i związku 15 | str. 36 |
| Ryc. 8 | Schemat postępowania zastosowany przy poszukiwaniu nowych inhibitorów CBR1 i dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3, a także oceny ich wpływu na aktywność przeciwnowotworową DNR | str. 51 |
| Ryc. 9 | Schemat postępowania zastosowany przy analizie ASP9521 jako potencjalnego inhibitora CBR1 oraz oceny efektu cytotoksycznego po łącznym podaniu ASP9521 i DNR | str. 53 |
| Ryc. 10 | Poszukiwanie nowych inhibitorów CBR1: ligandy narzędziowe wykorzystane do optymalizacji budowy centrum aktywnego enzymu w kryształach 1WMA i 3BHJ | str. 57 |
| Ryc. 11 | Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3: ligandy narzędziowe wykorzystane do optymalizacji przestrzennej centrum aktywnego wybranych kryształów CBR1 | str. 58-59 |
| Ryc. 12 | Poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3: ligandy narzędziowe wykorzystane do przestrzennej optymalizacji centrum aktywnego wybranych kryształów AKR1C3 | str. 60-61 |
| Ryc. 13 | Schemat postępowania zastosowany przy przeprowadzeniu i analizie retrospektywnego wirtualnego skringu jako metody oceniającej jakość nowych modeli CBR1 i AKR1C3 | str. 65 |
| Ryc. 14 | Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie nieoptymalizowanego modelu CBR1, opartego na strukturze krystalicznej 1WMA, z najlepszymi modelami uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD | str. 82 |
| Ryc. 15 | Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie nieoptymalizowanego modelu CBR1, opartego na strukturze krystalicznej 3BHJ, z najlepszymi modelami uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD | str. 85 |

| | | |
|---------|---|----------|
| Ryc. 16 | Odległości między hydroxy-PP, a kluczowymi elementami kompleksu enzymatycznego CBR1, oceniane podczas 20 ns symulacji MD (na przykładzie modelu uzyskanego na bazie struktury krystalicznej 1WMA) | str. 87 |
| Ryc. 17 | Sposób wiązania hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu CBR1 oznaczonego kodem 1WMA_A3 | str. 91 |
| Ryc. 18 | Sposób wiązania hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu CBR1 oznaczonego kodem 3BHJ_N1 | str. 91 |
| Ryc. 19 | Przykład związku (ZINC000032819068) o dwóch możliwych sposobach wiązania w centrum aktywnym CBR1, w zależności od obecności lub braku GSH | str. 93 |
| Ryc. 20 | Potencjalne nowe inhibitory CBR1 wyselekcjonowane na drodze prospektywnego wirtualnego skryningu oraz dodatkowej oceny wybranych parametrów ADMET | str. 98 |
| Ryc. 21 | Sposób wiązania w centrum aktywnym CBR1 nowych potencjalnych inhibitorów enzymatycznych (C1-C9), na przykładzie związku C2 | str. 99 |
| Ryc. 22 | Kierunki modyfikacji strukturalnych 2-fenyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onu, które zostały ocenione korzystnie w dokowaniach do modeli 1WMA_A3 i 3BHJ_N1 | str. 102 |
| Ryc. 23 | Porównanie struktur luteoliny oraz związku C17 | str. 107 |
| Ryc. 24 | Sposób wiązania związku C17 w centrum aktywnym CBR1 | str. 108 |
| Ryc. 25 | Potencjalne kierunki metabolizmu związku C2, przewidziane przy użyciu oprogramowania ADMET Predictor | str. 110 |
| Ryc. 26 | Potencjalne kierunki metabolizmu związku C17, przewidziane przy użyciu oprogramowania ADMET Predictor | str. 111 |
| Ryc. 27 | Sposób wiązania związku ASP9521 w centrum aktywnym CBR1, uzyskany w wyniku dokowania | str. 113 |

| | | |
|---------|--|----------|
| Ryc. 28 | Oddziaływania zaobserwowane między ASP9521 a resztami aminokwasowymi centrum aktywnego CBR1 (model 1WMA_A3) w trakcie 20 ns symulacji MD | str. 115 |
| Ryc. 29 | Porównanie odległości między grupą hydroksylową ASP9521, będącej elementem łańcucha 2-hydroksy-2-metylopropylowego, a atomami tlenu łańcuchów głównych dwóch reszt aminokwasowych centrum aktywnego CBR1: Phe94 i Met234 | str. 118 |
| Ryc. 30 | Reprezentatywny sposób wiązania związku ASP9521 w centrum aktywnym CBR1, zaobserwowany w trakcie MD (w 19,8 ns symulacji) | str. 119 |
| Ryc. 31 | Efekt łącznego podania związku ASP9521 (25 μ M) i DNR na żywotność komórek linii A549, w porównaniu z DNR bez dodatku inhibitora reduktaz ANT, po 48 godzinach inkubacji | str. 122 |
| Ryc. 32 | Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie modelu odniesienia 11_unopt z wybranymi modelami CBR1 uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD | str. 131 |
| Ryc. 33 | Wykres wzbogacenia bazy przedstawiający porównanie modelu odniesienia 33_unopt z modelami AKR1C3 uzyskanymi w wyniku optymalizacji przy użyciu IFD | str. 135 |
| Ryc. 34 | Sposób wiązania hydroxy-PP w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu CBR1 oznaczonego kodem 11E3 | str. 139 |
| Ryc. 35 | Odległości między WDW, a kluczowymi elementami kompleksu enzymatycznego AKR1C3, oceniane podczas 50 ns symulacji MD | str. 140 |
| Ryc. 36 | Sposób wiązania WDW w centrum aktywnym zoptymalizowanego modelu AKR1C3 oznaczonego kodem 74H1 | str. 142 |
| Ryc. 37 | Bazowy model farmakoforowy inhibitorów AKR1C3, opracowany na podstawie struktury związku WDW | str. 144 |
| Ryc. 38 | Zoptymalizowany model farmakoforowy inhibitorów AKR1C3, opracowany na podstawie struktury | str. 146 |

| | | |
|---------|--|----------|
| | związku WDW, wraz z odległościami między cechami oznaczonymi jako niezbędne w modelu | |
| Ryc. 39 | Ogólny schemat budowy związków, które wykazały korzystny sposób ułożenia w centrach aktywnych CBR1 i AKR1C3, uzyskanych w ramach prospektywnego wirtualnego skringingu | str. 148 |
| Ryc. 40 | Reprezentatywny sposób wiązania w centrum aktywnym CBR1 oraz AKR1C3 potencjalnego dualnego inhibitora CBR1-AKR1C3 (na przykładzie związku P7) | str. 148 |
| Ryc. 41 | Sposób wiązania związku C17 w centrum aktywnym AKR1C3, uzyskany w wyniku dokowania do modelu 74H1 | str. 151 |
| Ryc. 42 | Wpływ rodzaju podstawnika elektronodonorowego na stopień hamowania CBR1 w grupie wybranych pochodnych 1-benzoilopiperidyny | str. 156 |
| Ryc. 43 | Hamowanie aktywności CBR1 i AKR1C3 (% hamowania w 100 μ M lub wyrażony jako wartość IC50 w μ M) przez wybrane związki serii P | str. 160 |
| Ryc. 44 | Sposób wiązania związku P27 w centrum aktywnym AKR1C3, uzyskany w wyniku dokowania do modelu 74H1 | str. 161 |
| Ryc. 45 | Efekt łącznego podania związku P18 lub P25 (25 μ M) i DNR na żywotność komórek linii A549, w porównaniu z DNR bez dodatku inhibitora reduktaz ANT, po 48 godzinach inkubacji | str. 164 |

8. PIŚMIENICTWO

- [1] D. Krewski *i in.*, „Key characteristics of 86 agents known to cause cancer in humans”, *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.*, t. 22, nr 7–8, ss. 244–263, 2019, doi: 10.1080/10937404.2019.1643536.
- [2] „IARC (2021). IARC Biennial Report 2020–2021. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://publications.iarc.fr/607>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO.”
- [3] M. B. Martins-Teixeira i I. Carvalho, „Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives”, *ChemMedChem*, t. 15, nr 11, ss. 933–948, 2020, doi: 10.1002/cmdc.202000131.
- [4] M. L. Murphy, „Tan C. et al.: (1967), Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*, 20: 333-353. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1967\)](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1967))”.
- [5] S. H. Giordano, Y. L. Lin, Y. F. Kuo, G. N. Hortobagyi, i J. S. Goodwin, „Decline in the use of anthracyclines for breast cancer”, *J. Clin. Oncol.*, t. 30, nr 18, ss. 2232–2239, 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.40.1273.
- [6] C. Nabhan *i in.*, „Disease characteristics, treatment patterns, prognosis, outcomes and lymphoma-related mortality in elderly follicular lymphoma in the United States”, *Br. J. Haematol.*, t. 170, nr 1, ss. 85–95, 2015, doi: 10.1111/bjh.13399.
- [7] D. Chihara *i in.*, „Management strategies and outcomes for very elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma”, *Cancer*, t. 122, nr 20, ss. 3145–3151, 2016, doi: 10.1002/ncr.30173.
- [8] P. A. Henriksen, „Anthracycline cardiotoxicity: An update on mechanisms, monitoring and prevention”, *Heart*, t. 104, nr 12, ss. 971–977, 2018, doi: 10.1136/heartjnl-2017-312103.
- [9] *World Health Organization Model List of Essential Medicines – 22nd List, 2021. Geneva: World Health Organization; 2021 (WHO/MHP/HPS/EML/2021.02). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. .*
- [10] J. Robert, „Clinical Pharmacokinetics of Epirubicin”, *Clin. Pharmacokinet.*, t. 26, nr 6, ss. 428–438, 1994, doi: 10.2165/00003088-199426060-00002.
- [11] W. S. Lasota, D. L. de Valeriola, i M. J. Piccart, „Potential Role of Oral Anthracyclines in Older Patients with Cancer”, *Drugs Aging*, t. 4, nr 5, ss. 392–402, 1994, doi: 10.2165/00002512-199404050-00004.
- [12] C. A. Frederick *i in.*, „Structural Comparison of Anticancer Drug-DNA Complexes: Adriamycin and Daunomycin”, *Biochemistry*, t. 29, nr 10, ss. 2538–2549, 1990, doi: 10.1021/bi00462a016.
- [13] Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, i C. Marchand, „DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs”, *Chem. Biol.*, t. 17, nr 5, ss. 421–433, 2010, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.04.012.
- [14] A. Romero, T. Caldés, E. Díaz-Rubio, i M. Martín, „Topoisomerase 2 alpha: A real predictor of anthracycline efficacy?”, *Clin. Transl. Oncol.*, t. 14, nr 3, ss. 163–168, 2012, doi: 10.1007/s12094-012-0779-1.

- [15] M. Štěřba *i in.*, „Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection”, *Antioxidants Redox Signal.*, t. 18, nr 8, ss. 899–929, 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4795.
- [16] T. Capelôa, Z. Benyahia, L. X. Zampieri, M. C. N. M. Blackman, i P. Sonveaux, „Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines”, *Semin. Cell Dev. Biol.*, t. 98, nr March, ss. 181–191, 2020, doi: 10.1016/j.semcdb.2019.05.006.
- [17] L. Gandhi *i in.*, „A phase II study of the safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor VX-710 combined with doxorubicin and vincristine in patients with recurrent small cell lung cancer”, *Cancer*, t. 109, nr 5, ss. 924–932, 2007, doi: 10.1002/cncr.22492.
- [18] L. Pusztai *i in.*, „Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma”, *Cancer*, t. 104, nr 4, ss. 682–691, 2005, doi: 10.1002/cncr.21227.
- [19] A. Sandler *i in.*, „A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy”, *Clin. Cancer Res.*, t. 10, nr 10, ss. 3265–3272, 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0644.
- [20] D. D. von Hoff *i in.*, „Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure”, *Ann. Intern. Med.*, t. 91, nr 5, ss. 710–717, 1979, doi: 10.7326/0003-4819-91-5-710.
- [21] S. M. Swain, F. S. Whaley, i M. S. Ewer, „Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials”, *Cancer*, t. 97, nr 11, ss. 2869–2879, 2003, doi: 10.1002/cncr.11407.
- [22] S. Zhang *i in.*, „Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity”, *Nat. Med.*, t. 18, nr 11, ss. 1639–1642, 2012, doi: 10.1038/nm.2919.
- [23] J. H. Doroshov, „Dexrazoxane for the Prevention of Cardiac Toxicity and Treatment of Extravasation Injury from the Anthracycline Antibiotics”, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, t. 13, nr 10, ss. 1949–1956, 2012, doi: 10.2174/138920112802273245.
- [24] P. Kollárová-Brázdová *i in.*, „Investigation of structure-activity relationships of dexrazoxane analogs reveals topoisomerase II β interaction as a prerequisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, t. 373, nr 3, ss. 402–415, 2020, doi: 10.1124/jpet.119.264580.
- [25] H. Kim *i in.*, „Risk factor analysis for secondary malignancy in dexrazoxane-treated pediatric cancer patients”, *Cancer Res. Treat.*, t. 51, nr 1, ss. 357–367, 2019, doi: 10.4143/crt.2017.457.
- [26] E. Tahover *i in.*, „Dexrazoxane added to doxorubicin-based adjuvant chemotherapy of breast cancer: A retrospective cohort study with a comparative analysis of toxicity and survival”, *Anticancer. Drugs*, t. 28, nr 7, ss. 787–794, 2017, doi: 10.1097/CAD.0000000000000514.
- [27] S. E. Lipshultz *i in.*, „Continuous versus bolus infusion of doxorubicin in

- children with ALL: Long-term cardiac outcomes”, *Pediatrics*, t. 130, nr 6, ss. 1003–1011, 2012, doi: 10.1542/peds.2012-0727.
- [28] E. C. van Dalen, E. M. C. Michiels, H. N. Caron, i L. C. M. Kremer, „Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients”, *Cochrane Database Syst. Rev.*, t. 2010, nr 5, 2010, doi: 10.1002/14651858.CD005006.pub4.
- [29] M. G. Kaya *i in.*, „Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: A randomized control study”, *Int. J. Cardiol.*, t. 167, nr 5, ss. 2306–2310, 2013, doi: 10.1016/j.ijcard.2012.06.023.
- [30] A. Tashakori Beheshti, H. Mostafavi Toroghi, G. Hosseini, A. Zarifian, F. Homaei Shandiz, i A. Fazlinezhad, „Carvedilol Administration Can Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Double-Blind Randomized Trial”, *Cardiol.*, t. 134, nr 1, ss. 47–53, 2016, doi: 10.1159/000442722.
- [31] X. Bosch *i in.*, „Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: The OVERCOME trial (prevention of left ventricular dysfunction with enalapril and carvedilol in patients submitted t’”, *J. Am. Coll. Cardiol.*, t. 61, nr 23, ss. 2355–2362, 2013, doi: 10.1016/j.jacc.2013.02.072.
- [32] G. Minotti *i in.*, „Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: Comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite”, *Chem. Res. Toxicol.*, t. 13, nr 12, ss. 1336–1341, 2000, doi: 10.1021/tx000143z.
- [33] K. Piska, P. Koczurkiewicz, A. Bucki, K. Wójcik-Pszczola, M. Kołaczkowski, i E. Pękała, „Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines — role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents”, *Invest. New Drugs*, t. 35, nr 3, ss. 375–385, 2017, doi: 10.1007/s10637-017-0443-2.
- [34] J. Hofman, A. Skarka, J. Havrankova, i V. Wsol, „Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases”, *Biochem. Pharmacol.*, t. 96, nr 3, ss. 168–178, 2015, doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.005.
- [35] O. S. Bains *i in.*, „A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, t. 347, nr 2, ss. 375–387, 2013, doi: 10.1124/jpet.113.206805.
- [36] R. D. Olson *i in.*, „Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 85, nr 10, ss. 3585–3589, 1988, doi: 10.1073/pnas.85.10.3585.
- [37] R. J. Boucek, R. D. Olson, D. E. Brenner, E. M. Ogunbunmi, M. Inui, i S. Fleischer, „The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps: A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions”, *J. Biol. Chem.*, t. 262, nr 33, ss. 15851–15856,

- 1987, doi: 10.1016/s0021-9258(18)47666-1.
- [38] G. L. Forrest, B. Gonzalez, W. Tseng, X. Li, i J. Mann, „Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice”, *Cancer Res.*, t. 60, nr 18, ss. 5158–5164, 2000.
- [39] L. E. Olson, D. Bedja, S. J. Alvey, A. J. Cardounel, K. L. Gabrielson, i R. H. Reeves, „Protection from Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Mice with a Null Allele of Carbonyl Reductase”, *Cancer Res.*, t. 63, nr 20, ss. 6602–6606, 2003.
- [40] V. W. Petra Malátková, Edmund Maser, „Human carbonyl reductases.”, *Curr. Drug Metab.*, t. 11, ss. 639–658, 2010, doi: 10.2174/138920010794233530.
- [41] F. Hoffmann i E. Maser, „Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily”, *Drug Metab. Rev.*, t. 39, nr 1, ss. 87–144, 2007, doi: 10.1080/03602530600969440.
- [42] W. Hua, H. Zhang, S. Ryu, X. Yang, i L. Di, „Human Tissue Distribution of Carbonyl Reductase 1 Using Proteomic Approach With Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, *J. Pharm. Sci.*, t. 106, nr 5, ss. 1405–1411, 2017, doi: 10.1016/j.xphs.2017.01.024.
- [43] S. M. Shi i L. Di, „The role of carbonyl reductase 1 in drug discovery and development”, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, t. 13, nr 8, ss. 859–870, 2017, doi: 10.1080/17425255.2017.1356820.
- [44] E. S. Pilka i in., „Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases”, *PLoS One*, t. 4, nr 10, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007113.
- [45] R. L. Bateman, D. Rauh, B. Tavshanjian, i K. M. Shokat, „Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione reductase”, *J. Biol. Chem.*, t. 283, nr 51, ss. 35756–35762, 2008, doi: 10.1074/jbc.M807125200.
- [46] N. Usami, K. Kitahara, S. Ishikura, M. Nagano, S. Sakai, i A. Hara, „Characterization of a major form of human isatin reductase and the reduced metabolite”, *Eur. J. Biochem.*, t. 268, nr 22, ss. 5755–5763, 2001, doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02510.x.
- [47] K. Piska i in., „Carbonyl reduction pathway in hepatic in vitro metabolism of anthracyclines: Impact of structure on biotransformation rate”, *Toxicol. Lett.*, t. 342, ss. 50–57, 2021, doi: 10.1016/j.toxlet.2021.02.001.
- [48] Q. Liang, R. Liu, S. Du, i Y. Ding, „Structural insights on the catalytic site protection of human carbonyl reductase 1 by glutathione”, *J. Struct. Biol.*, t. 192, nr 1, ss. 138–144, 2015, doi: 10.1016/j.jsb.2015.09.005.
- [49] M. Tanaka i in., „An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules”, *PLoS Biol.*, t. 3, nr 5, ss. 0764–0776, 2005, doi: 10.1371/journal.pbio.0030128.
- [50] R. Bateman, D. Rauh, i K. M. Shokat, „Glutathione traps formaldehyde by formation of a bicyclo[4.4.1]undecane adduct”, *Org. Biomol. Chem.*, t. 5, nr 20, ss. 3363–3367, 2007, doi: 10.1039/b707602a.

- [51] Y. Arai *i in.*, „Structure-activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1 (CBR1)”, *Fitoterapia*, t. 101, ss. 51–56, 2015, doi: 10.1016/j.fitote.2014.12.010.
- [52] P. Koczurkiewicz-Adamczyk *i in.*, „Cinnamic acid derivatives as chemosensitising agents against DOX-treated lung cancer cells – Involvement of carbonyl reductase 1”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, t. 154, nr August, 2020, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105511.
- [53] A. Silvestrini, E. Meucci, A. Vitali, B. Giardina, i A. Mordente, „Chalcone inhibition of anthracycline secondary alcohol metabolite formation in rabbit and human heart cytosol”, *Chem. Res. Toxicol.*, t. 19, nr 11, ss. 1518–1524, 2006, doi: 10.1021/tx060159a.
- [54] D. Hu *i in.*, „Synthesis of 8-hydroxy-2-iminochromene derivatives as selective and potent inhibitors of human carbonyl reductase 1”, *Org. Biomol. Chem.*, t. 13, nr 27, ss. 7487–7499, 2015, doi: 10.1039/c5ob00847f.
- [55] J. Hintzpetter, J. Hornung, B. Ebert, H. J. Martin, i E. Maser, „Curcumin is a tight-binding inhibitor of the most efficient human daunorubicin reductase - Carbonyl reductase 1”, *Chem. Biol. Interact.*, t. 234, ss. 162–168, 2015, doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.019.
- [56] Y. Ito *i in.*, „Identification of carbonyl reductase 1 as a resveratrol-binding protein by affinity chromatography using 4'-amino-3,5-dihydroxy-trans-stilbene”, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).*, t. 59, nr 4, ss. 358–364, 2013, doi: 10.3177/jnsv.59.358.
- [57] Y. Liu *i in.*, „Overview of AKR1C3: Inhibitor Achievements and Disease Insights”, *J. Med. Chem.*, t. 63, nr 20, ss. 11305–11329, 2020, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b02138.
- [58] T. M. Penning, „AKR1C3 (type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders”, *Mol. Cell. Endocrinol.*, t. 489, nr September 2018, ss. 82–91, 2019, doi: 10.1016/j.mce.2018.07.002.
- [59] A. Kikuchi *i in.*, „In vitro and in vivo characterisation of ASP9521: A novel, selective, orally bioavailable inhibitor of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (17 β HSD5; AKR1C3)”, *Invest. New Drugs*, t. 32, nr 5, ss. 860–870, 2014, doi: 10.1007/s10637-014-0130-5.
- [60] N. Beranič, S. Gobec, i T. L. Rižner, „Progestins as inhibitors of the human 20-ketosteroid reductases, AKR1C1 and AKR1C3”, *Chem. Biol. Interact.*, t. 191, nr 1–3, ss. 227–233, 2011, doi: 10.1016/j.cbi.2010.12.012.
- [61] T. L. Rižner, H. K. Lin, D. M. Peehl, S. Steckelbroeck, D. R. Bauman, i T. M. Penning, „Human type 3 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells”, *Endocrinology*, t. 144, nr 7, ss. 2922–2932, 2003, doi: 10.1210/en.2002-0032.
- [62] A. L. Lovering, J. P. Ride, C. M. Bunce, J. C. Desmond, S. M. Cummings, i S. A. White, „Crystal Structures of Prostaglandin D2 11-Ketoreductase (AKR1C3) in Complex with the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Flufenamic Acid and Indomethacin”, *Cancer Res.*, t. 64, nr 5, ss. 1802–1810, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2847.

- [63] B. P. Schlegel, J. M. Jez, i T. M. Penning, „Mutagenesis of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase reveals a «push -pull» mechanism for proton transfer in aldo-keto reductases”, *Biochemistry*, t. 37, nr 10, ss. 3538–3548, 1998, doi: 10.1021/bi9723055.
- [64] K. Verma, T. Zang, T. M. Penning, i P. C. Trippier, „Potent and Highly Selective Aldo-Keto Reductase 1C3 (AKR1C3) Inhibitors Act as Chemotherapeutic Potentiators in Acute Myeloid Leukemia and T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia”, *J. Med. Chem.*, t. 62, nr 7, ss. 3590–3616, 2019, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00090.
- [65] C. Li *i in.*, „In vitro CAPE inhibitory activity towards human AKR1C3 and the molecular basis”, *Chem. Biol. Interact.*, t. 253, ss. 60–65, 2016, doi: 10.1016/j.cbi.2016.05.012.
- [66] P. Brožič, B. Golob, N. Gomboc, T. L. Rižner, i S. Gobec, „Cinnamic acids as new inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3)”, *Mol. Cell. Endocrinol.*, t. 248, nr 1–2, ss. 233–235, 2006, doi: 10.1016/j.mce.2005.10.020.
- [67] Y. Tian *i in.*, „Berberine inhibits androgen synthesis by interaction with aldo-keto reductase 1C3 in 22Rv1 prostate cancer cells”, *Asian J. Androl.*, t. 18, nr 4, ss. 607–612, 2016, doi: 10.4103/1008-682X.169997.
- [68] T. S. Tavares, J. Hofman, A. Lekešová, J. Želazková, i V. Wsól, „Olaparib synergizes the anticancer activity of daunorubicin via interaction with akr1c3”, *Cancers (Basel)*, t. 12, nr 11, ss. 1–16, 2020, doi: 10.3390/cancers12113127.
- [69] E. Novotná *i in.*, „Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile”, *Arch. Toxicol.*, t. 92, nr 9, ss. 2845–2857, 2018, doi: 10.1007/s00204-018-2258-0.
- [70] E. Novotná *i in.*, „Roscovitine and purvalanol A effectively reverse anthracycline resistance mediated by the activity of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): A promising therapeutic target for cancer treatment”, *Biochem. Pharmacol.*, t. 156, ss. 22–31, 2018, doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.001.
- [71] J. U. Flanagan, Y. Yosaatmadja, R. M. Teague, M. Z. L. Chai, A. P. Turnbull, i C. J. Squire, „Crystal Structures of Three Classes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Complex with Aldo-Keto Reductase 1C3”, *PLoS One*, t. 7, nr 8, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0043965.
- [72] Y. Zhao *i in.*, „In vitro inhibition of AKR1Cs by sulphonylureas and the structural basis”, *Chem. Biol. Interact.*, t. 240, ss. 310–315, 2015, doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.006.
- [73] T. L. Rižner i T. M. Penning, „Aldo-keto reductase 1C3—Assessment as a new target for the treatment of endometriosis”, *Pharmacol. Res.*, t. 152, 2020, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104446.
- [74] Y. Loriot *i in.*, „Safety, tolerability and anti-tumour activity of the androgen biosynthesis inhibitor ASP9521 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: Multi-centre phase I/II study”, *Invest. New Drugs*, t. 32, nr 5, ss. 995–1004, 2014, doi: 10.1007/s10637-014-0101-x.
- [75] A. M. E. Bruynzeel *i in.*, „The effect of monohydroxyethylrutoside on

- doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study”, *Br. J. Cancer*, t. 97, nr 8, ss. 1084–1089, 2007, doi: 10.1038/sj.bjc.6603994.
- [76] V. Gonzalez-Covarrubias, J. L. Kalabus, i J. G. Blanco, „Inhibition of polymorphic human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the cardioprotectant flavonoid 7-monohydroxyethyl rutoside (monoHER)”, *Pharm. Res.*, t. 25, nr 7, ss. 1730–1734, 2008, doi: 10.1007/s11095-008-9592-5.
- [77] A. Jo *i in.*, „Inhibition of Carbonyl Reductase 1 Safely Improves the Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment”, *Antioxidants Redox Signal.*, t. 26, nr 2, ss. 70–83, 2017, doi: 10.1089/ars.2015.6457.
- [78] A. Hara *i in.*, „Human carbonyl reductase 1 participating in intestinal first-pass drug metabolism is inhibited by fatty acids and acyl-CoAs”, *Biochem. Pharmacol.*, t. 138, ss. 185–192, 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.023.
- [79] T. Matsunaga *i in.*, „Up-regulation of carbonyl reductase 1 renders development of doxorubicin resistance in human gastrointestinal cancers”, *Biol. Pharm. Bull.*, t. 38, nr 9, ss. 1309–1319, 2015, doi: 10.1248/bpb.b15-00176.
- [80] J. M. Seliger, H.-J. Martin, E. Maser, i J. Hintzpeteter, „Potent inhibition of human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the prenylated chalconoid xanthohumol and its related prenylflavonoids isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin.”, *Chem. Biol. Interact.*, t. 305, ss. 156–162, maj 2019, doi: 10.1016/j.cbi.2019.02.031.
- [81] K. Piska *i in.*, „Synergistic anticancer activity of doxorubicin and piperlongumine on DU-145 prostate cancer cells – The involvement of carbonyl reductase 1 inhibition”, *Chem. Biol. Interact.*, t. 300, ss. 40–48, luty 2019, doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.003.
- [82] Y. Zheng *i in.*, „23-Hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin in vitro and in vivo”, *J. Ethnopharmacol.*, t. 128, nr 3, ss. 615–622, 2010, doi: 10.1016/j.jep.2010.02.004.
- [83] F. Zhou *i in.*, „Protective effect of 23-hydroxybetulinic acid on doxorubicin-induced cardiotoxicity: A correlation with the inhibition of carbonyl reductase-mediated metabolism”, *Br. J. Pharmacol.*, t. 172, nr 23, ss. 5690–5703, 2015, doi: 10.1111/bph.12995.
- [84] A. Sorf *i in.*, „Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters”, *Biochem. Pharmacol.*, t. 163, nr December 2018, ss. 290–298, 2019, doi: 10.1016/j.bcp.2019.02.035.
- [85] N. Bukum, E. Novotna, A. Morell, J. Hofman, i V. Wsol, „Buparlisib is a novel inhibitor of daunorubicin reduction mediated by aldo-keto reductase 1C3”, *Chem. Biol. Interact.*, t. 302, ss. 101–107, 2019, doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.026.
- [86] S. Bochum, S. Berger, i U. M. Martens, „Olaparib”, *Recent Results Cancer Res.*, t. 211, ss. 217–233, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-91442-8_15.

- [87] K. Verma, T. Zang, N. Gupta, T. M. Penning, i P. C. Trippier, „Selective AKR1C3 Inhibitors Potentiate Chemotherapeutic Activity in Multiple Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines”, *ACS Med. Chem. Lett.*, t. 7, nr 8, ss. 774–779, 2016, doi: 10.1021/acsmchemlett.6b00163.
- [88] M. Congreve, C. Oswald, i F. H. Marshall, „Applying Structure-Based Drug Design Approaches to Allosteric Modulators of GPCRs”, *Trends Pharmacol. Sci.*, t. 38, nr 9, ss. 837–847, 2017, doi: 10.1016/j.tips.2017.05.010.
- [89] R. Ferreira i A. Andricopulo, „Structure-Based Drug Design to Overcome Drug Resistance: Challenges and Opportunities”, *Curr. Pharm. Des.*, t. 20, nr 5, ss. 687–693, 2014, doi: 10.2174/138161282005140214161949.
- [90] W. Yu i A. D. M. Jr, „Chapter 5 Computer-Aided Drug Design Methods”, *Antibiot. Methods Protoc.*, t. 1520, ss. 85–106, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6634-9.
- [91] Y. Wang *i in.*, „In silico ADME/T modelling for rational drug design”, *Q. Rev. Biophys.*, t. 48, nr 4, ss. 488–515, 2015, doi: 10.1017/S0033583515000190.
- [92] S. Mandal, M. Moudgil, i S. K. Mandal, „Rational drug design”, *Eur. J. Pharmacol.*, t. 625, nr 1–3, ss. 90–100, 2009, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.065.
- [93] J. J. Tan, X. J. Cong, L. M. Hu, C. X. Wang, L. Jia, i X. J. Liang, „Therapeutic strategies underpinning the development of novel techniques for the treatment of HIV infection”, *Drug Discov. Today*, t. 15, nr 5–6, ss. 186–197, 2010, doi: 10.1016/j.drudis.2010.01.004.
- [94] B. J. Druker i N. B. Lydon, „Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia”, *J. Clin. Invest.*, t. 105, nr 1, ss. 3–7, 2000, doi: 10.1172/JCI9083.
- [95] E. Weisberg *i in.*, „Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl”, *Cancer Cell*, t. 7, nr 2, ss. 129–141, 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.007.
- [96] L. Pinzi i G. Rastelli, „Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 20, nr 18, 2019, doi: 10.3390/ijms20184331.
- [97] J. Li, A. Fu, i L. Zhang, „An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking”, *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.*, t. 11, nr 2, ss. 320–328, 2019, doi: 10.1007/s12539-019-00327-w.
- [98] E. Lionta, G. Spyrou, D. Vassilatis, i Z. Cournia, „Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances”, *Curr. Top. Med. Chem.*, t. 14, nr 16, ss. 1923–1938, 2014, doi: 10.2174/1568026614666140929124445.
- [99] Z. Wang *i in.*, *Combined strategies in structure-based virtual screening*, t. 22, nr 6. 2020.
- [100] M. Xiang, Y. Cao, W. Fan, L. Chen, i Y. Mo, „Computer-Aided Drug Design: Lead Discovery and Optimization”, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, t. 15, nr 4, ss. 328–337, 2012, doi: 10.2174/138620712799361825.
- [101] W. Sherman, T. Day, M. P. Jacobson, R. A. Friesner, i R. Farid, „Novel

- procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects”, *J. Med. Chem.*, t. 49, nr 2, ss. 534–553, 2006, doi: 10.1021/jm050540c.
- [102] M. Kołaczkowski, A. Bucki, M. Feder, i M. Pawłowski, „Ligand-optimized homology models of D1 and D2 dopamine receptors: Application for virtual screening”, *J. Chem. Inf. Model.*, t. 53, nr 3, ss. 638–648, 2013, doi: 10.1021/ci300413h.
- [103] P. W. Hildebrand, A. S. Rose, i J. K. S. Tiemann, „Bringing Molecular Dynamics Simulation Data into View”, *Trends Biochem. Sci.*, t. 44, nr 11, ss. 902–913, 2019, doi: 10.1016/j.tibs.2019.06.004.
- [104] N. Bharatham *i in.*, „Performance of a docking/molecular dynamics protocol for virtual screening of nutlin-class inhibitors of Mdmx”, *J. Mol. Graph. Model.*, t. 74, ss. 54–60, 2017, doi: 10.1016/j.jmgm.2017.02.014.
- [105] K. M. Visscher, W. C. Swope, i D. P. Geerke, „A QM/MM derived polarizable water model for molecular simulation”, *Molecules*, t. 23, nr 12, ss. 11–13, 2018, doi: 10.3390/molecules23123131.
- [106] T. T.T. Luu, N. Malcolm, i K. Nadassy, „Pharmacophore Modeling Methods in Focused Library Selection – Applications in the Context of a New Classification Scheme”, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, t. 14, nr 6, ss. 488–499, 2011, doi: 10.2174/138620711795767820.
- [107] J. B. Baell, „Feeling Nature’s PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS)”, *J. Nat. Prod.*, t. 79, nr 3, ss. 616–628, 2016, doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00947.
- [108] C. M. Chagas, S. Moss, i L. Alisaraie, „Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski’s Rule of Five”, *Int. J. Pharm.*, t. 549, nr 1–2, ss. 133–149, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.046.
- [109] A. Daina, O. Michielin, i V. Zoete, „SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules”, *Sci. Rep.*, t. 7, nr October 2016, ss. 1–13, 2017, doi: 10.1038/srep42717.
- [110] S. Kar i J. Leszczynski, „Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates”, *Expert Opin. Drug Discov.*, t. 15, nr 12, ss. 1473–1487, 2020, doi: 10.1080/17460441.2020.1798926.
- [111] L. L. G. Ferreira i A. D. Andricopulo, „ADMET modeling approaches in drug discovery”, *Drug Discov. Today*, t. 24, nr 5, ss. 1157–1165, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.03.015.
- [112] L. Frye, S. Bhat, K. Akinsanya, i R. Abel, „From computer-aided drug discovery to computer-driven drug discovery”, *Drug Discov. Today Technol.*, t. 39, nr xx, ss. 111–117, 2021, doi: 10.1016/j.ddtec.2021.08.001.
- [113] M. Kołaczkowski *i in.*, „Novel 5-HT6 receptor antagonists/D2 receptor partial agonists targeting behavioral and psychological symptoms of dementia”, *Eur. J. Med. Chem.*, t. 92, nr 2015, ss. 221–235, 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2014.12.045.
- [114] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, i W. Sherman, „Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on

- virtual screening enrichments”, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, t. 27, nr 3, ss. 221–234, 2013, doi: 10.1007/s10822-013-9644-8.
- [115] A. C. Pippione *i in.*, „Potent and selective aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) inhibitors based on the benzoisoxazole moiety: application of a bioisosteric scaffold hopping approach to flufenamic acid”, *Eur. J. Med. Chem.*, t. 150, ss. 930–945, 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.03.040.
- [116] S. Endo *i in.*, „Development of Novel AKR1C3 Inhibitors as New Potential Treatment for Castration-Resistant Prostate Cancer”, *J. Med. Chem.*, t. 63, nr 18, ss. 10396–10411, 2020, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00939.
- [117] M. P. Jacobson, R. A. Friesner, Z. Xiang, i B. Honig, „On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations”, *J. Mol. Biol.*, t. 320, nr 3, ss. 597–608, 2002, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00470-9.
- [118] J. L. Halgren, T.A.; Murphy, R.B.; Friesner, R.A.; Beard, H.S.; Frye, L.L.; Pollard, W.T.; Banks i Glide, „A new approach fo rrapid, accurate docking and scoring. II. Enrichment factors in database screening.”, *J. Med. Chem.*, t. 2, nr 47, ss. 1750–1759, 2004.
- [119] M. M. Mysinger, M. Carchia, J. J. Irwin, i B. K. Shoichet, „Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking”, *J. Med. Chem.*, t. 55, nr 14, ss. 6582–6594, 2012, doi: 10.1021/jm300687e.
- [120] K. J. Bowers *i in.*, „04090217.Pdf”, nr November, 2006.
- [121] G. Wolber i T. Langer, „LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters”, *J. Chem. Inf. Model.*, t. 45, nr 1, ss. 160–169, 2005, doi: 10.1021/ci049885e.
- [122] D. Pirolli, B. Giardina, A. Mordente, S. Ficarra, i M. C. De Rosa, „Understanding the binding of daunorubicin and doxorubicin to NADPH-dependent cytosolic reductases by computational methods”, *Eur. J. Med. Chem.*, t. 56, ss. 145–154, 2012, doi: 10.1016/j.ejmech.2012.08.023.