

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Dušan B. Ružić

**RACIONALNI DIZAJN, SINTEZA I *IN VITRO*
ISPITIVANJA SELEKTIVNIH INHIBITORA
HISTON DEACETILAZE 6**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Dušan B. Ružić

**RATIONAL DESIGN, SYNTHESIS AND *IN*
VITRO EVALUATION OF SELECTIVE
HISTONE DEACETYLASE 6 INHIBITORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Katarina Nikolić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

Prof. dr Olivera Čudina, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Miloš Petković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Tatjana Srđić-Rajić, naučni savetnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane: _____

„O jednom vremenu treba govoriti i uz njegove mane i uz njegove vrline. Pa sad, neki drugi to mogu, a vi ne možete, jer niste bili očigledni posmatrači...“

Čas istorije profesorke Ljube Ćosić, Gimnazija u Čačku, maj 2008. godine

Zahvalnica

Izrada doktorske disertacije započeta je 2015. godine na Katedri za farmaceutsku hemiju, na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu. Deo eksperimentalnog rada urađen je na Katedri za organsku hemiju (Farmaceutski fakultet Beograd), na Katedri za hemijsku biologiju (Univerzitet East Anglia, Norwich, Velika Britanija), kao i na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

Neizmernu zahvalnost dugujem mentorki doktorske disertacije, prof. dr Katarini Nikolić, za osmišljavanje teme, podršku i pruženo poverenje, razumevanje, konstruktivne razgovore i klice upornosti.

Ogromnu zahvalnost dugujem prof. dr Milošu Petkoviću za višegodišnju saradnju na polju organskih sinteza, uloženom vremenu i trudu u laboratoriji, kao i pomoći tokom izrade i pisanja disertacije.

Želim da iskažem veliku zahvalnost dr Tatjani Srdić-Rajić za uvođenje u svet kancerske biologije i biohemije, viščasovne diskusije rezultata i upornost u svim fazama istraživanja.

Zahvaljujem se profesoru A. Ganesanu sa Univerziteta East Anglia, Norwich (Velika Britanija) koji mi je otvorio vrata svoje laboratorije i što je nesebično podelio mnoštvo smernica u procesima otkrića lekova koje se ni u jednom univerzitetskom udžbeniku ne mogu pronaći.

Posebno hvala prof. Oliveri Čudini i prof. Jasmini Brborić na pravim primerima čestitosti, predanosti i pedantnosti u svakom aspektu rada na Katedri za farmaceutsku hemiju. Hvala prof. Oliveri na detaljnom i pažljivom čitanju disertacije.

Želim da se zahvalim svim ostalim kolegincama i kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju uz koje je rad na doktorskoj disertaciji bio praćen podrškom i poverenjem. Hvala prof. Zorici, prof. Bojanu, prof. Branki, prof. Vladimiru, doc. Slavici, doc. Milkici i doc. Jeleni.

Rad na doktorskoj disertaciji je bio obogaćen smehom, šalama i druženjima zahvaljujući kvalitetnom timu kolega iz kancelarije 209, Teodori, Milici, Jeleni i Milanu, ali i Mariji, Jelici i Mirjani. Posebno hvala mom sugrađaninu i saborcu iz biblioteke, kolegi Nemanji Đokoviću. Hvala mojim dragim studentima Milanu, Branku, Alenu, Mariji i Teodori koji su učili uz mene i pružili mi šansu da im otvorim vrata nauke na Farmaceutskom fakultetu.

U toku izrade doktorske disertacije, neizostavnu podršku su mi pružali najbliži prijatelji, razumevanjem, slušanjem i ponekad tumačenjem rezultata istraživanja. Hvala mojoj životno stečenoj sestri i kumi Neveni, hvala i životno stečenom bratu i kumu, Srđanu, hvala Marijani, hvala Vuku i hvala Sonji Legendi.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici (Mikiju, Đuki, Sofiji, Vuku, Maji, Pekiju i mami Emi) što ste mi tokom svake faze izrade disertacije pružali najveću podršku.

Hvala i merci mom svetu i oazi mira, mojoj supruzi Joki i ćerki Marti. Hvala za poštovanje, čekanje, balansiranje, strpljenje, slušanje i razumevanje.

Zbog truda da razume eksperimente, prepozna mogući problem, ubedi me da je šestica prava ocena za mene, još više zbog skromnosti, iskrenosti, čestitosti, razumevanja životnog poziva koji sam izabrao, upornosti da nikad ne odustanem čak i kad je najteže („Biće ti sigurno mnogo teže nego drugima”). I najviše zbog toga što je sa osmehom i smirenošću pokazivao svetu da može drugačije i plemenitije, ovu doktorsku disertaciju posvećujem osobi koja me na pola puta dopratila do današnjeg cilja - mom tati Branku.

SAŽETAK

Histon deacetilaze su metaloenzimi koji hidrolizuju acetilovane bočne amino grupe lizina na histonskim i nehistskim proteinima. Uklanjanjem acetil grupe sa lizina generiše se pozitivno naelektrisanje na histonima, koje gradi jonske veze sa negativno naelektrisanim DNK molekulima. Kao posledica građenja jonskih veza, hromatin postaje gusto pakovan, teže dostupan transkripcionim faktorima, koji posledično dovodi do represije genske transkripcije. U epigenetičkim istraživanjima, derivati hidroksamskih kiselina se koriste u dizajniranju inhibitora histon deacetilaza. Posledica inhibicije histon deacetilaza je indukcija apoptoze, zastoj u ćelijskom ciklusu, smanjenje rasta tumora, inhibicija migracije i invazije malignih ćelija. U zavisnosti od homologije u primarnoj sekvenci i ćelijske lokalizacije, histon deacetilaze su podeljene u četiri klase. Klasi I pripadaju HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8 izoforme. Klasa II se deli na dve podklase – klasu IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9), dok klasi IIb pripadaju HDAC6 i HDAC10. Posebno se izdvaja izoforma HDAC11 u okviru klase IV humanih histon deacetilaza.

Prva faza istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je kompjutersko dizajniranje selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6. Dizajniranje pomenutih inhibitora je omogućeno kombinovanjem studija kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (3D-QSAR), pretrage novih fragmenata, kao i studija molekuskog dokinga na trodimenzionalnim strukturama histon deacetilaza 1 i 6. Druga faza istraživanja bila je sinteza odabranih jedinjenja na osnovu zaključaka *in silico* studija racionalnog dizajna selektivnih HDAC6 inhibitora. Treća faza istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je određivanje vrednosti inhibitornih koncentracija (IC_{50}) nosintetisanih jedinjenja na humanim HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8 izoenzimima u *in vitro* enzimskim testovima. Ispitivanje antikancerskih osobina sintetisanih jedinjenja na ćelijama tumora dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) predstavlja četvrtu fazu istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji.

Kao rezultat kompjuterskog dizajniranja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6 izdvojeni se validni i prediktivni 3D-QSAR modeli. Tehnikom virtuelnog skrininga odabrani su odgovarajući fragmenti za dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora. Molekulskim dokingom je predviđen način vezivanja dizajniranih jedinjenja za humane HDAC1 i HDAC6 izoforme. Sintetisane su dve klase derivata hidroksamskih kiselina, derivati 1-benzhidrilnog piperazina i klasa 5,5-difenil-2,4-imidazolidindiona i okarakterisani metodama strukturne analize. Na osnovu rezultata *in vitro* enzimskih testiranja, identifikovano je sedam nanomolarnih inhibitora histon deacetilaze 6, od kojih su dva inhibitora: BDR-6, $IC_{50} = 186$ nM i BDR-9, $IC_{50} = 31$ nM selektivna za HDAC6 izoformu i jedan inhibitor je izdvojen kao dualni HDAC6/8 inhibitor. Ispitivanjima uticaja sintetisanih inhibitora na ćelijsko preživljavanje, apoptozu, promene u ćelijskom ciklusu, migraciju i invaziju ćelija kancera dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) izdvojen je neselektivni HDAC inhibitor, BDR-8 (HDAC1, $IC_{50} = 408$ nM; HDAC3 $IC_{50} = 207$ nM; HDAC6, $IC_{50} = 124$ nM i HDAC8, $IC_{50} = 245$ nM) sa najboljim antikancerskim osobinama. Najpotentniji sintetisani selektivni HDAC6 inhibitor, BDR-9 predstavlja necitotoksično jedinjenje sa antimigratornim osobinama na MCF-7 ćelijama kancera dojke. U ovoj doktorskoj disertaciji prikazan je sistematičan protokol za preklinički razvoj novih selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6, koji može da bude iskorišćen u budućim istraživanjima u oblasti otkrića lekova koji deluju na kancerski epigenom.

Ključne reči: histon deacetilaza 6, racionalni dizajn lekova, preklinički razvoj lekova, hidroksamske kiseline, 3D-QSAR, molekulski doking, epigenetika, kancer dojke, metastaze.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutsko-medicinska hemija i strukturna analiza

ABSTRACT

Histone deacetylases are metalloenzymes that hydrolyze acetylated lysine side chains on histone and non-histone proteins. Removal of the acetyl group from lysine generates a positive charge on histones that forms ionic bonds with negatively charged DNA molecules. As a consequence of forming ionic bonds, chromatin becomes densely packed, the access of the transcription factors is prevented, which in turn leads to the repression of gene transcription. In epigenetic drug discovery, hydroxamic acid derivatives are used in the design of histone deacetylase inhibitors. Inhibition of human histone deacetylases leads to induction of apoptosis, cell cycle arrest, tumor growth inhibition, inhibition of migration and invasion of malignant cells. Depending on the homology in the primary sequence and cell localization, histone deacetylases are classified into four classes. Class I is consisted of HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC8 isoforms. Class II is divided into two subclasses - class IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 and HDAC9), and class IIb (HDAC6 and HDAC10). The HDAC11 is the unique isoform within the class IV HDACs.

The first goal of research in this doctoral dissertation was computational drug design of selective histone deacetylase 6 inhibitors. The second goal of the research was the synthesis of selected compounds based on the predictions of *in silico* studies. The third research goal in this doctoral dissertation is to determine the inhibitory concentrations (IC_{50}) of newly synthesized compounds against human HDAC1, HDAC3, HDAC6 and HDAC8 isoenzymes in *in vitro* enzyme assays. Evaluation of anticancer properties of synthesized compounds on breast tumor cells (MDA-MB-231 and MCF-7) is the fourth goal set in this doctoral dissertation.

As a result of computational drug design study, valid and predictive 3D-QSAR models were generated. The most promising fragments for the design of selective HDAC6 inhibitors were selected by virtual screening technique. Molecular docking study predicted the binding modes of designed compounds toward the human HDAC1 and HDAC6 isoforms. Two classes of hydroxamic acid derivatives, 1-benzhydryl piperazine derivatives and 5,5-diphenyl-imidazolidine-2,4-dione derivatives were synthesized and characterized by NMR analysis and mass spectrometry. Considering the results of *in vitro* enzyme assays, seven nanomolar histone deacetylase 6 inhibitors were identified, of which two inhibitors: BDR-6, $IC_{50} = 186$ nM and BDR-9, $IC_{50} = 31$ nM are selective for HDAC6 isoform and one inhibitor was disclosed as dual HDAC6 / 8 inhibitor. Evaluation of the effects of synthesized inhibitors on cell survival, apoptosis, changes in cell cycle, migration and invasion of breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF-7) singled out a non-selective HDAC inhibitor, BDR-8 (HDAC1, $IC_{50} = 408$ nM; HDAC3 $IC_{50} = 207$ nM, HDAC6, $IC_{50} = 124$ nM and HDAC8, $IC_{50} = 245$ nM) with the best anticancer properties. The most potent selective HDAC6 inhibitor, BDR-9 is a non-cytotoxic compound with anti-migratory properties on MCF-7 breast cancer cells. In this doctoral dissertation, a systematic protocol for the preclinical drug discovery of novel selective histone deacetylase 6 inhibitors is presented, that can be used in future research of drug candidates that target the cancer epigenome.

Key words: histone deacetylase 6, rational drug design, preclinical drug discovery, hydroxamic acid, 3D-QSAR, molecular docking, epigenetics, breast cancer, metastasis.

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

Spisak skraćenica

CAP	Heterociklus ili karbociklus koji intereaguje sa spoljašnjim obodom katalitičkog džepa histon deacetilaza
DCM	Dihlormetan
DMF	Dimetilformamid
DNMT	DNK metiltransferaza
drHDAC6	<i>Danio rerio</i> HDAC6 (HDAC6 enzim poreklom iz zebrića)
EtOAc	Etil acetat
FBDD	Otkriće lekova zasnovano na korišćenju fragmenata
FITC	Fluorescein izotiocijanat
FLAP	<i>Fingerprints for Ligands and Proteins</i> (program za virtuelni skrining)
GRIND	Grid promenljive nezavisne od poravnanja
HAT	Histon acetiltransferaza
HDAC	Histon deacetilaza
HDLP	Protein sličan histon deacetilazama
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i> - šaperonski protein
LBDD	Otkriće lekova zasnovano na hemijskoj strukturi farmakološki aktivnog jedinjenja (liganda)
MeOH	Metanol
NF- κ B	Nuklearni faktor kapa B
NMR	Nuklearna magnetna rezonanca
p53	Tumor supresorski fosfoprotein p53
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (izotonični fosfatni pufer)
PE	Petrol etar
PRESS	<i>Predictive residual sum of squares</i> (suma kvadrata predviđenih reziduala)
p-TsOH	p-toluensulfonska kiselina
QSAR	Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti
R&D	Istraživanje i razvoj
RMSEE	Greška predviđanja <i>training set</i> modela
RMSEP	Greška predviđanja <i>test set</i> modela
SBDD	Otkriće lekova zasnovano na trodimenzionalnoj strukturi ciljnog mesta dejstva lekova
STAT	Transkripcioni faktor signalne transdukcije i aktivacije transkripcije
TLC	Tankoslojna hromatografija
TNBC	Ćelije kancera dojke negativne na prisustvo estrogenih, progesteronskih i HER2 receptora
ZBG	Cink-vezivna grupa

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Racionalni dizajn lekova	2
1.2. Pristup dizajniranju lekova zasnovan na hemijskoj strukturi liganda (<i>Ligand-Based Drug Design, LBDD</i>)	6
1.2.1. Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti – teorijski principi	7
1.2.2. 3D-QSAR modeli zasnovani na GRID polju sila	11
1.2.3. Domen primenljivosti QSAR modela	17
1.3. Pristup dizajniranju lekova zasnovan na hemijskoj strukturi fragmenata (<i>Fragment Based Drug Design, FBDD</i>)	19
1.4. Pristup dizajniranju lekova zasnovan na strukturi ciljnog mesta delovanja jedinjenja (<i>Structure Based Drug Design, SBDD</i>)	20
1.4.1. Međumolekulske interakcije u kompleksu ligand–receptor	21
1.4.2. Virtuelni skrining zasnovan na trodimenzionalnoj strukturi metaloenzima	23
1.4.3. Molekulski doking	23
1.4.4. Molekulska dinamika	25
1.5. Epigenetika – od vitalizma do organizma	28
1.5.1. Epigenetika u otkriću antikancerskih lekova	29
1.5.2. Histon deacetilaze – otkriće, fiziološka uloga i strukturalna biologija	34
1.5.3. Histon deacetilaza 6 – struktura i biološke uloge	39
1.5.4. Pregled registrovanih HDAC inhibitora i strategija za dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora	43
1.6. Pregled sintetskih metoda za dobijanje hidroksamskih kiselina	50
1.7. Biološki modeli za ispitivanje efekata selektivnih HDAC6 inhibitora	53
1.7.1. <i>In vitro</i> enzimski HDAC testovi za profilisanje nosintetisanih jedinjenja	53
1.7.2. Testovi za ispitivanje ćelijske vijabilnosti	54
1.7.3. Test za ispitivanje apoptoze ćelija	54
1.7.4. Test promene mitohondrijskog membranskog potencijala ćelija	55
1.7.5. Ispitivanje promena u ćelijskom ciklusu	55
1.7.6. Test za ispitivanje ćelijske migracije	56
1.7.7. Test za ispitivanje ćelijske invazije	57
2. CILJ RADA	58
3. EKSPERIMENTALNI DEO	60

3.1. Priprema 3D-QSAR modela za HDAC1 i HDAC6 inhibitornu aktivnost	61
3.1.1. Kompjuterski softveri za pripremu 3D-QSAR studija i molekularni doking.....	61
3.1.2. Priprema molekula za 3D-QSAR modelovanje.....	61
3.1.3. Molekularni doking – generisanje bioaktivnih konformacija HDAC inhibitora.....	62
3.1.4. Izračunavanje GRIND deskriptora i izdvajanje jedinjenja koja grade 3D-QSAR model.....	63
3.1.5. Protokol za izvođenje 3D-QSAR studije u programu <i>Pentacle</i>	64
3.2. Odabir fragmenata za dizajn novih, selektivnih HDAC6 inhibitora.....	66
3.2.1. Selekcija biblioteka fragmenata za pretrage novih CAP grupa i softveri za izračunavanje deskriptora	66
3.2.2. Izračunavanje deskriptora za odabir novih CAP grupa.....	66
3.2.3. Dizajniranje novih inhibitora histon deacetilaza	66
3.2.4. Predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih parametara dizajniranih jedinjenja	67
3.3. Priprema biblioteke fragmenata za virtuelni skrining novih cink-vezivnih grupa.....	68
3.3.1. Validacija virtuelnog skrininga fragmenata zasnovanog na strukturi HDAC6 enzima	68
3.3.2. Virtuelni skrining zasnovan na strukturi HDAC6 katalitičkog džepa	69
3.3.3. Molekularni doking fragmenata.....	69
3.3.4. Ispitivanje stabilnosti kompleksa HDAC6 i odabranih fragmenata molekulskom dinamikom.....	70
3.4. Sinteza derivata 1-(difenilmetil)-piperazina (1-benzhidrilnog piperazina)	71
3.4.1. Sintetski prekursori, reagensi i rastvarači.....	71
3.4.2. Oprema.....	71
3.4.3. Sintetske procedure za dobijanje BDR derivata hidroksamskih kiselina	71
3.5. Sinteza derivata 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona (FDR derivati)	73
3.5.1. Sintetski prekursori, reagensi i rastvarači	73
3.5.2. Sintetske procedure za dobijanje FDR-2, FDR-3 i FDR-4 derivata hidroksamskih kiselina	73
3.6. Ispitivanja sintetisanih jedinjenja u biološkim sistemima.....	76
3.6.1. Oprema.....	76
3.6.2. Enzimi, standardi, hemikalije i rastvarači	76
3.6.3. Čelijske kulture i uslovi kultivacije.....	77
3.6.4. Protokol za određivanje <i>in vitro</i> enzimske inhibicije humanih histon deacetilaza.....	77
3.6.5. Protokol za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na vijabilnost ćelija kancera dojke	78
3.6.6. Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na indukciju apoptoze ćelija kancera dojke (MDA-MB-231)	78
3.6.7. Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na promene u mitohondrijskom membranskom potencijalu.....	79

3.6.8.	Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na promene u ćelijskom ciklusu.....	79
3.6.9.	Protokoli za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na inhibiciju migracije i invazije ćelija kancera dojke.....	79
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	81
4.1.	Interpretacija 3D-QSAR modela za HDAC1 inhibitornu aktivnost.....	82
4.1.1.	Karakteristike baze HDAC1 inhibitora korišćenih za 3D-QSAR modelovanje	82
4.1.2.	Odabir bioaktivnih konformacija HDAC1 inhibitora	82
4.1.3.	Hemometrijska analiza 3D-QSAR modela za skup HDAC1 inhibitora	83
4.2.	Interpretacija 3D-QSAR modela za HDAC6 inhibitornu aktivnost.....	86
4.2.1.	Karakteristike baze HDAC6 inhibitora korišćenih za 3D-QSAR modelovanje	86
4.2.2.	Odabir bioaktivnih konformacija HDAC6 inhibitora	86
4.2.3.	Hemometrijska analiza 3D-QSAR modela za skup HDAC6 inhibitora	87
4.3.	Komparativna interpretacija najznačajnijih GRIND promenljivih zastupljenih u oba 3D-QSAR modela.....	91
4.4.	Domen primenljivosti generisanih 3D-QSAR modela.....	97
4.5.	Dizajniranje novih, selektivnih HDAC6 inhibitora zasnovanih na 3D-QSAR modelima i pretrazi fragmenata kao novih CAP grupa.....	98
4.6.	Određivanje odnosa hemijske strukture i selektivne HDAC6 inhibicije - studija molekuskog dokinga	108
4.7.	<i>In silico</i> pretraga novih, nehidroksamskih cink-vezivnih grupa	111
4.7.1.	Izdvajanje novih cink-vezivnih grupa tehnikom virtuelnog skrininga zasnovanog na strukturi HDAC6 enzima.....	111
4.7.2.	Pretraga selektivnih cink-vezivnih grupa tehnikom molekuskog dokinga.....	115
4.7.3.	Analiza stabilnosti kompleksa HDAC6 i odabranih fragmenata simulacijama molekulske dinamike	118
4.8.	Strukturalna analiza i fizičko-hemijska karakterizacija novosintetisanih derivata 1-(difenilmetil)-piperazina	120
4.9.	Strukturalna analiza i fizičko-hemijska karakterizacija novosintetisanih derivata 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona	128
4.10.	<i>In vitro</i> enzimaska i ćelijska testiranja novosintetisanih HDAC6 inhibitora.....	133
4.10.1.	Ispitivanje <i>in vitro</i> enzimске inhibicije humanih histon deacetilaza	133
4.10.2.	Određivanje citotoksičnosti novosintetisanih jedinjenja na ćelijama kancera dojke	141
4.10.3.	Analiza uticaja citotoksičnih derivata 1-(difenilmetil)-piperazina na inicijaciju apoptoze.....	144
4.10.4.	Ispitivanje proapoptotskih efekata BDR-8 inhibitora na MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama kancera dojke	146
4.10.5.	Analiza uticaja BDR-8 inhibitora na promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa.....	149

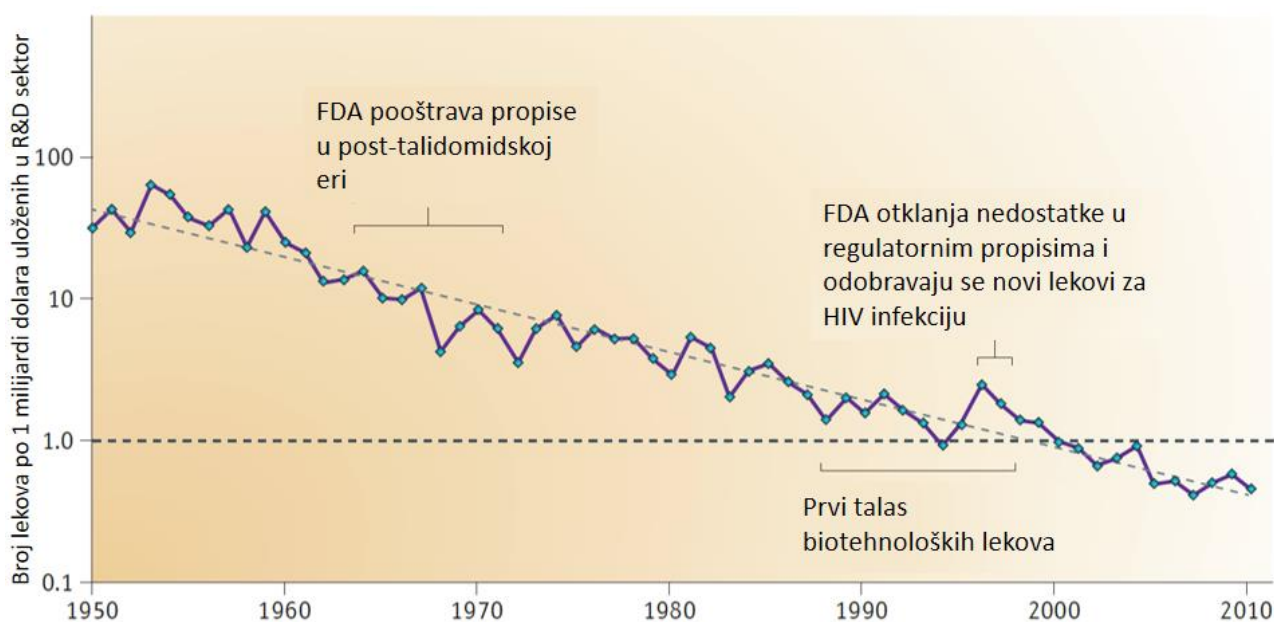
4.10.6.	Fenotipske promene MDA-MB-231 ćelija nakon tretiranja BDR-8 inhibitorom	150
4.10.7.	Uticaj nosintetisanih jedinjenja na procese migracije i invazije ćelija kancera dojke	152
5.	ZAKLJUČAK.....	154
6.	LITERATURA.....	159
7.	PRILOZI.....	181
7.1.	Hemijske strukture HDAC1 inhibitora korišćenih za pripremu 3D-QSAR modela.....	182
7.2.	Hemijske strukture HDAC6 inhibitora korišćenih za pripremu 3D-QSAR modela.....	183
7.3.	Tabela P1. Prikaz eksperimentalnih i modelom predviđenih <i>pKi</i> vrednosti za HDAC1 3D-QSAR model	184
7.4.	Tabela P2. Prikaz eksperimentalnih i modelom predviđenih <i>pKi</i> vrednosti za HDAC6 3D-QSAR model	185
7.5.	Prikaz izdvojenih fragmenata iz <i>General Fragment Library</i> i <i>Epigenetic Targeted Library</i>	186
7.6.	Tabela P3. Prikaz metalnih helatora – fragmenata koji su inhibitori humane histon deacetilaze 6	194
7.7.	Tabela P4. Prikaz neaktivnih fragmenata na HDAC6 izoformi	196
7.8.	Tabela P5. Vrednosti <i>ChemScore</i> funkcije vrednovanja za dokovane fragmente	197
7.9.	Prikaz NMR spektara jedinjenja BDR-8	200
7.10.	Prikaz NMR spektara jedinjenja BDR-9	202
	Biografija kandidata.....	204
	Izjava o autorstvu	205
	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	206
	Izjava o korišćenju	207

1. UVOD

1.1. Racionalni dizajn lekova

U poslednjih 70 godina primetan je naučni i tehnološki napredak koji je doprineo detaljnijem i regulisanom procesu otkrića novog leka. Dostupnost visokopropusnih tehnika (eng. *high-throughput techniques*) otkrića lekova koje su automatizovale procese pipetiranja i povećale broj sintetisanih i testiranih jedinjenja pospešile su procese identifikacije biološki aktivnih molekula (*hit* jedinjenja) na ispitivanim farmakološkim modelima. Neizostavno je spomenuti i tehnološka rešenja koja su razvijana da bi se što preciznije identifikovala interakcija leka sa ciljnim mestom delovanja, ciljnim tkivom i biološki/klinički odgovor, kao što su visokopropusni skrining¹, kristalografija bazirana na x-zracima², sekvenciranje genoma³, korišćenje transgenih životinjskih modela⁴, upotreba CRISPR/Cas9 tehnike editovanja gena⁵, primena saznanja u oblasti biotehnologije⁶. Unapređivanjem pomenutih tehnologija, povećavali su se istraživački i razvojni kapaciteti (eng. *Research and Development* – R&D) originatorske farmaceutske industrije. Sa druge strane, put razvoja leka od prekliničke faze do faze registracije postao je duži i iscrpniji u post-talidomidskoj eri⁷ (period od 1961. godine do danas) zbog povećanog broja i vrste zahteva regulatornih tela koja odobravaju lekove za kliničku upotrebu. Razmatrajući pomenute tehnološke, naučne i regulatorne aspekte razvoja leka, može se steći (pogrešan) utisak da efikasnost otkrića novog leka od sredine XX veka do danas konstantno raste.

Detaljnija analiza istraživača Scannell et al.⁸ zaposlenih pri akademskim i industrijskim sektorima razvoja leka u Velikoj Britaniji, uzbunila je stručnu javnost formulacijom Eroomovog zakona. Scannell i saradnici su pristupili godišnjim finansijskim izveštajima Američke nacionalne naučne fondacije i efikasnost R&D sektora farmaceutskih kompanija prikazali kao broj registrovanih lekova po jednoj milijardi uloženi dolara (na ordinati) za svaku kalendarsku godinu (na apscisi) u periodu 1950-2010. godine (**Slika 1**). Linearni pad efikasnosti (broj odobrenih lekova za kliničku primenu), odnosno porast ulaganja u R&D sektor tokom praćenih 60 godina, otvorio je ključna pitanja o efikasnosti razvoja novog leka u vodećim farmaceutskim industrijama.



Slika 1. Grafički prikaz broja novoregistrovanih lekova koje je odobrila FDA (Američka agencija za hranu i lekove) po jednoj milijardi uloženi američkih dolara za R&D sektor (prikazano na ordinati) dvostruko se smanjuje na svakih devet godina. Uložene finansije su prilagođene inflaciji američkog dolara; (originalna slika preuzeta iz reference 8)

Od 2012. godine kada je objavljena studija Scannell-a i saradnika, intenzivno su identifikovani gorući problemi i predložena dugoročna rešenja za prevazilaženje krize prouzrokovane skupim i neefikasnim ulaganjima u R&D sektor farmaceutske industrije. *Astra Zeneka* je postulirala pravilo 5R za prevazilaženje krize produktivnosti⁹ na osnovu retrospektivne studije ishoda projekata otkrića lekova i detaljnih konsultacija sa vodećim naučnicima u svim fazama razvoja leka. Pravilo 5R sugerise da budući projekti razvoja lekova treba jasno da definišu:

- **right target** (precizno definisanje ciljnog mesta delovanja budućeg leka i povezanost ciljnog mesta sa biološkim odgovorom);
- **right tissue** (jasno definisanje farmakokinetičkih i farmakoloških osobina budućeg leka u ciljnom ispitivanom tkivu);
- **right safety** (definisanje bezbednosnog profila budućeg leka);
- **right patient** (pravilan odabir populacije pacijenata za klinička ispitivanja);
- **right commercial potential** (definisanje potencijala komercijalizacije projekta otkrića lekova).

Otkriće i razvoj novih hemijskih entiteta (eng. *Novel chemical entity*) je višestepeni proces koji se dešava pri akademskim i industrijskom institucijama. U literaturi je poznato da je značajan broj lekova otkriven u akademskim istraživačkim grupama (brojni su primeri: *penicilin*, *pregabalin*, *tamoksifen*, *imatinib*, *vemurafenib* i dr.)^{10,11}. Pomenute tehnologije i finansijska sredstva (javne finansije države i donatorske finansije) značajno su manje dostupne za istraživače pri akademiji nego u industrijskim sektorima otkrića i razvoja leka. Zaista, postoje i izvanredni primeri akademskih institucija širom Evrope i Amerike koje se bave prekliničkim razvojem leka i raspolažu većim finansijama nego većina univerzitetskih centara (CRUK – *Cancer Therapeutic Unit*¹²; *Dundee Drug Discovery Unit*¹³; *National Phenotypic Screening Centre*¹⁴; *European Screening Centre Newhouse and European Lead Factory*¹⁵, *Dana–Farber Cancer Institute*¹⁶ i brojni drugi).

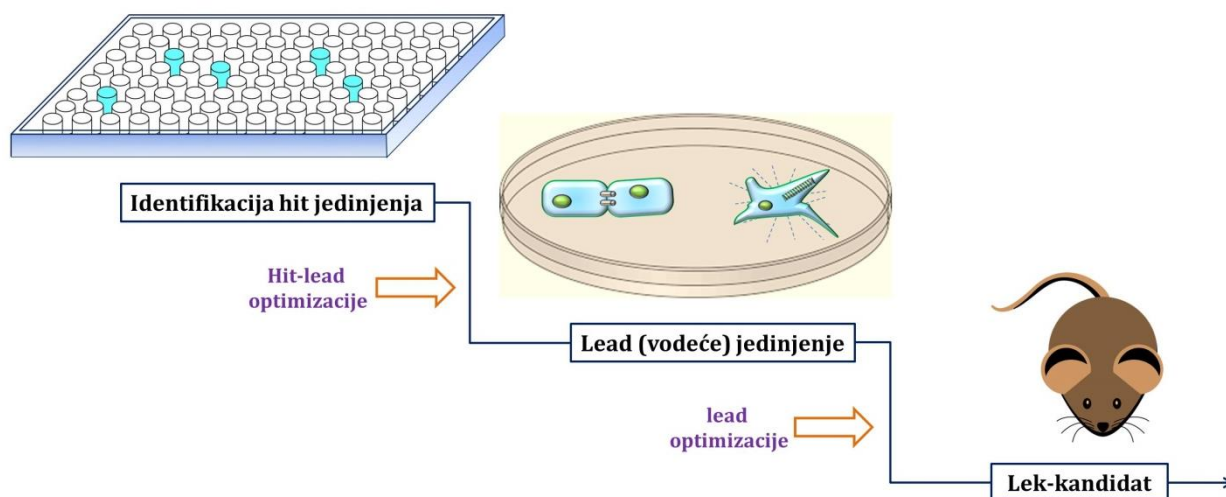
Ograničena finansijska sredstva za većinu akademskih institucija stvorila su povoljnu atmosferu za primenu kompjuterske hemije i tehnika molekuskog modelovanja u svim prekliničkim fazama otkrića i razvoja leka. Proces otkrića leka može biti započet identifikacijom **hit jedinjenja** (odgovarajućeg hemijskog skeleta – eng. *chemical scaffold*) pretragom raznovrsnih biblioteka jedinjenja. Pronalaženje hit jedinjenja (jednog ili više) može biti eksperimentalno izvedeno (tehnikama *high-throughput screening-a*) ili kompjuterskim skriningom (tehnikama *virtual screening-a*). Eksperimentalno pronalaženje *hit* jedinjenja zahteva velike kapacitete istraživačkog centra u svakom smislu – posedovanje virtuelnih baza jedinjenja (često preko million jedinjenja), automatizovane ili robotizovane uređaje za izvođenje *in vitro* testova, nabavka velike količine reagenasa za biološke testove, velike kapacitete za deponovanje i čuvanje rezultata *in vitro* testiranja (u elektronskom obliku). Ilustracije radi, neke od najpoznatijih komercijalnih baza jedinjenja i broj jedinjenja koje sadrže prikazane su u **Tabeli 1**.

Tabela 1. Prikaz odabranih komercijalnih baza jedinjenja

Biblioteke jedinjenja	Broj jedinjenja
Asinex ¹⁷	> 260.000
BOC Sciences ¹⁸	> 3,2 miliona
ChemBridge ¹⁹	> 1,3 miliona
Enamine ²⁰	> 3,6 miliona
OTAVACHemicals ²¹	> 270.000
Selleck Chemicals ²²	> 99.000
Specs ²³	> 500.000

Progresija **hit** jedinjenja (molekula koji modulira odgovor ciljnog mesta delovanja pri *in vitro* uslovima) preko **vodećeg (lead)** jedinjenja, za koje je neophodno dokazati farmakološke efekte u kompleksnijim biološkim sistemima (*in vitro* ćelijske kulture, animalni modeli) do **leka-kandidata** jeste višestepen, skup i neizvestan proces (pojednostavljen šematski prikaz dat je na **Slici 2**). Efikasnost timova istraživača koji rade na projektima pri *Research and Development* (R&D) sektorima neprekidno se dovodi u pitanje, uzimajući u obzir da jedan od deset lekova bude odobren za humanu upotrebu²⁴. Ne postoji univerzalan protokol za otkriće svih neželjenih, iznenadnih efekata leka-kandidata u kliničkim ispitivanjima, te se kao razlozi za najčešće obustavljanje kliničkog razvoja leka navode:

1. Neidentifikovani toksikološki efekti leka-kandidata u prekliničkoj fazi razvoja (u radovima istraživača vodećih farmaceutskih kompanija ističe se kao prvi i najvažniji razlog obustavljanja I faze kliničkih ispitivanja).²⁵
2. Interakcije sa biomolekulima (proteinima, nukleinskim kiselinama, lipidima) koje nije bilo moguće predvideti tokom prekliničkog razvoja leka) – poznate kao i *off-target* interakcije.²⁶
3. Nepredvidiva humana farmakokinetika – zbog neadekvatnog razmatranja fizičko-hemijskih osobina leka-kandidata i povezanosti njegovih osobina sa ADME karakteristikama.²⁵



Slika 2. Uprošćen prikaz otkrića i razvoja leka od identifikacije hit jedinjenja, preko vodećeg (*lead* jedinjenja) do leka-kandidata koji će se koristiti za inicijalne (*first-in-human*) kliničke studije.

Nijedna farmaceutska kompanija ne poseduje najbolje intelektualne, finansijske i eksperimentalne kapacitete uz pomoć kojih bi predvidela moguće neuspehe i time redukovala troškove za razvoj potencijalnog leka. U literaturi su poznati brojni primeri neuspeha razvoja lekova²⁷, ti neuspesi su plaćeni i iz njih se mogu racionalizovati rizični koraci u razvoju leka. Uvidom u bazu podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) zaključuje se da se koncept racionalnog dizajna lekova prvi put spominje 1970. godine²⁸. Autor rada *Belleau B.* spominje važnost postojanja modela receptor–inhibitor koji bi mogao da doprinese boljem razumevanju funkcije receptora i dizajnu afinitetnijih liganada. Radovi koji su objavljivani u narednim godinama imali su udela u definisanju koncepta racionalnog dizajna lekova, kao i razvoju terminološkog korpusa u okviru koncepta dizajna lekova.

Početkom devedesetih godina prošlog veka upotreba računara je veoma uspešno zaokrenula smer dizajna lekova od empirijskog ka racionalnom pristupu.²⁹ Koncept racionalnog dizajna lekova metodološki se deli na dva pristupa:

1. pristup dizajnu lekova zasnovan na hemijskoj strukturi liganda (*ligand-based drug design*, LBDD)³⁰;
2. pristup dizajnu lekova zasnovan na trodimenzionalnoj strukturi ciljnog mesta delovanja (*structure-based* ili *target-based drug design*, SBDD ili TBDD).

Važno je spomenuti da tehnike *ligand-based* i *structure-based drug design*-a ne treba isključivo da asociraju na računarsko dizajniranje lekova. Eksperimentalne biofizičke metode (kristalografija bazirana na x-zracima, X-ray; nuklearna magnetna rezonanca, NMR; masena spektrometrija, MS; rezonanca površinskih plazmona (*Surface plasmon resonance* – SRC); izotermalna titraciona kalorimetrija, ITC i druge³¹) koriste se za identifikacije novih hemijskih jedinjenja koja imaju željeni biološki profil. Nastavak projekata dizajniranja lekova počiva na preliminarno identifikovanim hit jedinjenjima, dok racionalizaciji hipoteze najčešće u pomoć pristižu kompjuterske tehnike dizajniranja lekova.

1.2. Pristup dizajniranju lekova zasnovan na hemijskoj strukturi liganda (*Ligand-Based Drug Design, LBDD*)

Tokom poslediplomskog izučavanja farmaceutsko-medicinske hemije i metoda dizajniranja lekova, autoru disertacije je glavna inspiracija bila da identifikuje potentno biološki aktivno jedinjenje na izučavanom ciljnom mestu delovanja. Biološka aktivnost, ali i kompleksnost hemijske strukture novootkrivenog jedinjenja su dve determinante kojima farmaceutski hemičar treba da se vodi u daljim koracima prekliničkog razvoja leka-kandidata.

Pretpostavimo da je jedinjenje X sintetisano u okviru istraživačke grupe koja se bavila razvojem antihipertenzivnih lekova. Novi doktorand je testirao jedinjenje X na ćelijskom modelu kancera dojke (primer ćelijskog soja: trostruko negativni kancer dojke, TNBC; šifra ćelijskog soja MDA-MB-231) i identifikovao submikromolarni citotoksični efekat supstance X ($IC_{50} = 0,98 \mu M$). U nastavku istraživanja pred istraživačkom grupom postavlja se nekoliko ključnih pitanja:

- a) Da li testirana supstanca X dovodi do biološkog odgovora u interakciji sa specifičnim receptorom, enzimom ili zaustavlja ćelijsku deobu nespecifičnim interakcijama sa DNK molekulom?
- b) Da li je moguće identifikovati i/ili sintetisati nekoliko strukturno sličnih derivata jedinjenja X i formirati hipotezu o odnosu hemijske strukture derivata jedinjenja X sa dobijenim biološkim aktivnostima?

U prvom slučaju, koji bi trebalo da bude primarni cilj inicijalnog prekliničkog razvoja leka (pravilo 5R – *Right target*), neophodno je dovesti u vezu hemijsku strukturu jedinjenja X sa odgovarajućim ciljnim mestom/mehanizmom delovanja. Iako izuzetno poželjan, ovakav pristup je manje verovatan ukoliko osnovni hemijski skelet jedinjenja X nije prethodno opisan u literaturi kao derivat sa antikancerskim svojstvima.

Najrealniji scenario u situaciji kada se biološki aktivnom jedinjenju X ne zna ciljno mesto delovanja, jeste pretraga virtuelnih biblioteka bioaktivnih jedinjenja. Cilj pretrage velikih baza jedinjenja je pronalaženje hemijski sličnih jedinjenja (*similarity-based virtual screening*)³² na osnovu definisanih fizičko-hemijskih parametara jedinjenja X. Ovakav pristup predstavlja jednu od *ligand-based* tehnika, u kojoj se na osnovu sličnosti u fizičko-hemijskim osobinama ili deskriptorima (od engleske reči *describe*) jedinjenja X pretražuju molekuli sa najslabijom hemijskom strukturom (deskriptorima) u odabranoj virtuelnoj biblioteci jedinjenja. Identifikovana jedinjenja sa sličnim fizičko-hemijskim osobinama bioaktivnom jedinjenju X se poruče ili sintetišu i testiraju na istim ćelijama i pod istim uslovima kao i jedinjenje X.

Prikazani slučaj tehnike *similarity-based virtual screening*-a predstavlja jednu od najstarijih *ligand-based* tehnika. Cilj *similarity-based* skrininga jeste pronalaženje većeg broja poznatih bioaktivnih jedinjenja (derivata jedinjenja X) koja bi doprinela boljem razumevanju mehanizma delovanja jedinjenja X i uspostavljanju veze između hemijske strukture i biološke aktivnosti identifikovanih derivata jedinjenja X.³³

Opisane metode nisu računarski zahtevne; mogu za kratak vremenski period da opravdaju ili opovrgnu dalji nastavak istraživanja antikancerskih svojstava jedinjenja X. Identifikacija novog bioaktivnog skeleta zahteva i njegovu validaciju testiranjem sličnih derivata, analoga polaznog jedinjenja.³⁴ Ukoliko bi se nakon *in vitro* testiranja za, na primer, 20 derivata jedinjenja X ispitala njihova biološka aktivnost, dalji nastavak studije bio bi usmeren ka razvoju studija kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (QSAR – *quantitative structure activity relationship studies*).

1.2.1. Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti – teorijski principi

Nasuprot kvalitativnom opisu odnosa hemijske strukture derivata sa ispitivanim farmakološkim odgovorom, kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti (*QSAR – quantitative structure-activity relationship studies*) pružaju informacije o veličini (kvantitetu) uticaja neke funkcionalne grupe i/ili deskriptora koji doprinose biološkoj aktivnosti jedinjenja.³⁵ Veza između hemijske strukture jedinjenja (konstitucije, C) i fiziološke aktivnosti (Φ) prvi put se spominje u radovima britanskih lekara i hemičara **Alexander-a Crum-a Brown-a** i **Thomas-a Fraser-a**³⁶.

$$\Phi = f(C)$$

Studije kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti zasnivaju se na generisanju matematičkih modela koji dovode u vezu hemijsku strukturu jedinjenja sa vrednostima ispitivanog biološkog odgovora. Da bi se uspešno uspostavila matematička relacija između hemijske strukture grupe jedinjenja i njihovih bioloških aktivnosti, neophodno je hemijsku strukturu svakog jedinjenja numerički opisati (od engleske reči *describe*) u obliku molekulskih deskriptora.³⁷

Vrste molekulskih deskriptora koji mogu biti korišćeni u QSAR studijama su:³⁸

- a) konstitutivni deskriptori;
- b) topološki deskriptori;
- c) geometrijski deskriptori;
- d) elektronski deskriptori i
- e) fizičkohemijski deskriptori.

Konstitutivni deskriptori definišu broj određenih atoma u strukturi jedinjenja (primer: broj atoma broma (N_{Br}); broj odgovarajućih hemijskih veza u jedinjenju; broj aromatičnih prstenova, molekulsku masu i druge). Ovi deskriptori ne daju informacije o redosledu povezivanja atoma unutar molekula, niti definišu prostorni raspored atoma (konformaciju molekula). U literaturi su opisani i kao 1D deskriptori (jednodimenzionalni deskriptori).³⁹

Topološki deskriptori su informativniji od konstitutivnih, jer za razliku od njih daju informacije o načinu povezivanja atoma unutar ispitivanog molekula. Dobijeni su na osnovu hemijskih grafova⁴⁰ i kao takvi definišu oblik, veličinu i način račvanja ispitivanog organskog molekula. Jedan od najčešće korišćenih topoloških deskriptora jeste TPSA (*Topological Polar Surface Area*); upravo zbog jednostavnosti interpretacije i mogućnosti primene u studijama koje predviđaju intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci.⁴¹ Konačno, topološki deskriptori se koriste u analizi odnosa hemijske strukture i biološke aktivnosti kao 2D (dvodimenzionalni) deskriptori.

Geometrijski deskriptori su računarski zahtevniji i za njihovo izračunavanje je neophodno pripremiti hemijske strukture ispitivanih organskih jedinjenja u trodimenzionalnoj (3D) konformaciji.⁴² Ova klasa raznorodnih deskriptora daje informacije o trodimenzionalnom obliku organskog molekula, opisuje različite vrste molekulskih površina (*molecular surface*) ispitivanih organskih molekula, sferičnost, simetriju molekula i dr. Neki od primera ovih deskriptora su: MoRSE deskriptori, WHIM deskriptori, 3D Autocorrelation deskriptori, GETAWAY deskriptori, kao i brojni drugi. Važno je napomenuti da su oni konformaciono zavisni i da se prilikom njihove interpretacije mora pažljivo razmatrati relevantna (bioaktivna) konformacija za ispitivano jedinjenje. Detalji izračunavanja i interpretacije ovih deskriptora mogu se pronaći u knjizi autora Todeschini R. i Consonni V. (*Handbook of Molecular Descriptors*).⁴²

Elektronski deskriptori se izračunavaju korišćenjem kvantno-hemijskih metoda. Ovi deskriptori opisuju elektronska svojstva organskih molekula, kao što su: naelektrisanje, elektronegativnost, molekularna polarizabilnost, dipolni momenat, energije molekulskih orbitala – HOMO (*Highest Occupied Molecule Orbital*) energija i LUMO (*Lowest Unoccupied Molecule Orbital*) energija.^{43,44} Ova klasa deskriptora doprinosi razjašnjavanju i interpretaciji intramolekulskih interakcija u okviru jednog molekula, kao i intermolekulskih interakcija između ispitivanog molekula i na primer, ciljnog mesta delovanja.⁴⁴

Fizičko-hemijski deskriptori dovode u vezu hemijsku strukturu jedinjenja sa farmakokinetičkim i biofarmaceutskim osobinama organskih molekula⁴⁵. Neki od najznačajnijih fizičko-hemijskih deskriptora su:

- **Particioni koeficijent (P)** – predstavlja raspodelu organskog molekula između organske faze (imitira lipidna svojstva ćelijske membrane, najčešće se koristi oktanol) i vodenog sloja (koji imitira intra/ekstraćelijsku vodenu fazu). Ovaj deskriptor se u literaturi prikazuje i u obliku logaritma, logP, pomoću koga se definiše lipofilnost organskog jedinjenja⁴⁶.
- **Rastvorljivost jedinjenja u vodi** – doprinosi razumevanju oslobađanja lekovite supstance iz doziranog farmaceutskog oblika, rastvaranju lekovite supstance na mestu primene (ili u odgovarajućim biološkim tečnostima). Potrebno je istaći da se rastvorljivost svake supstance na definisanoj temperaturi može predvideti u zavisnosti od njenih kiselo-baznih osobina, kao i njene osnovne rastvorljivosti (rastvorljivost nejonizovanog oblika leka)^{47,48}.

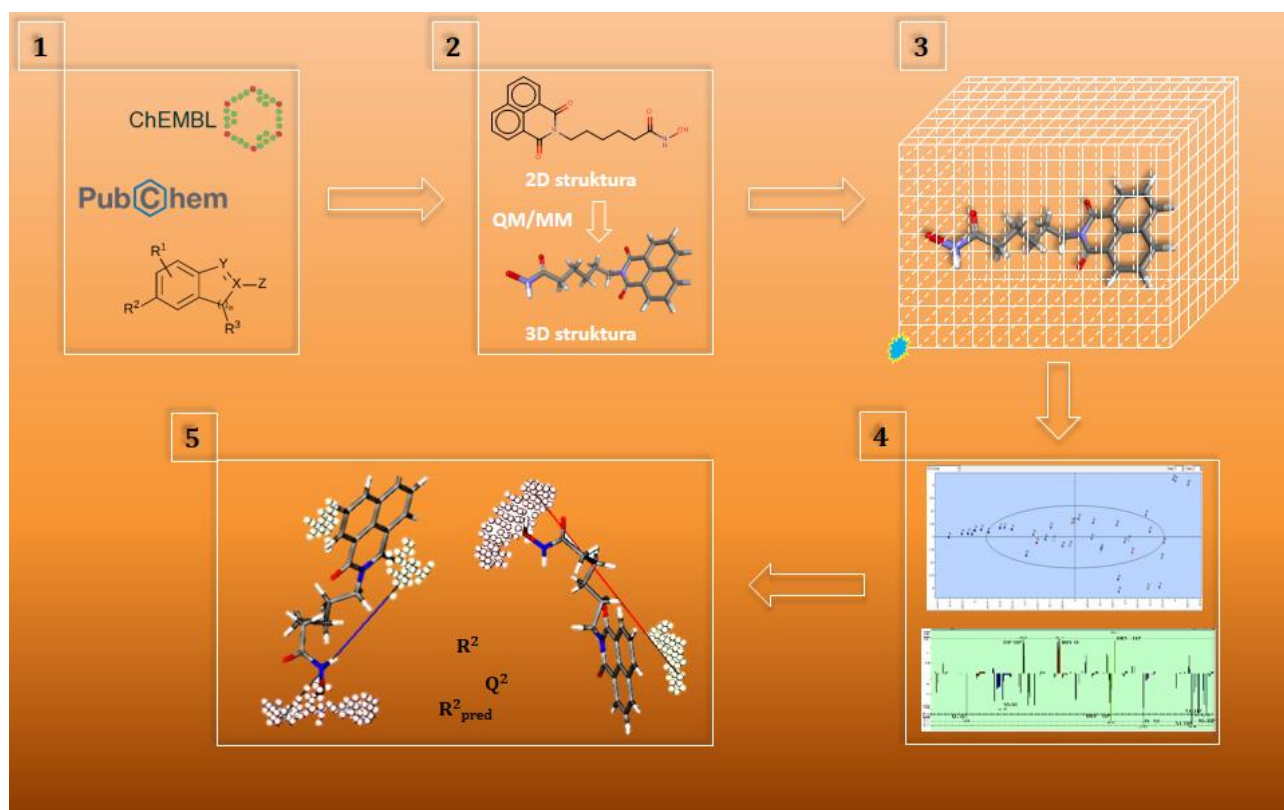
Numerički prikaz hemijske strukture jedinjenja najčešće predstavlja jedan od prvih koraka u studijama kompjuterske hemije i *in silico* dizajna lekova. Zbog toga se kompjuterski hemičari tokom pripreme prediktivnih modela služe različitim softverskim paketima za izračunavanje deskriptora. U ovom poglavlju je prikazana opšta podela deskriptora, pri čemu se specifični deskriptori mogu pronaći i izračunati u brojnim softverskim paketima.

Nekoliko najznačajnijih softverskih paketa za računanje deskriptora dati su u **Tabeli 2**.

Tabela 2. Prikaz najznačajnijih softvera za izračunavanje atomskih i molekulskih deskriptora

Naziv softvera	Elektronska adresa	Vrsta deskriptora koje računa	Status softvera
ACD lab	https://www.acdlabs.com/	fizičko-hemijski deskriptori: Abrahamovi – Absolv parametri; ADME, toksikološki parametri	komercijalni
ADMET predictor	https://www.simulations-plus.com/	fizičko-hemijska, biofarmaceutska, ADME i toksikološka svojstva	komercijalni
Dragon	https://chm.kode-solutions.net/pf/dragon-7-0/	konstitutivni, topološki, geometrijski, elektronski deskriptori	komercijalni
GRID	https://www.moldiscovery.com/software/grid/	GRIND deskriptori (trodimenzionalna molekulska polja vodoničnih, sternih i hidrofobnih interakcija)	komercijalni
OpenBabel	www.openbabel.org	molekulski fingerprint-ovi i similarity pretrage	nekomercijalni

Protokol priprave QSAR modela prikazan je na **Slici 3**.



Slika 3. Šematski prikaz dizajna 3D-QSAR studije

Uspešno izvedenje 3D-QSAR studije može se prikazati kroz sledeće korake:

1. Identifikacija i izdvajanje baze jedinjenja koja su testirana na ciljnom mestu delovanja od interesa (**korak 1, Slika 3**). Jedinjenja za 3D-QSAR studiju mogu da se preuzmu iz ChEMBL, PubChem virtuelnih biblioteka jedinjenja, iz radova objavljenih u časopisima ili iz patentne dokumentacije. Važno je u prvim koracima odabrati jedinjenja sa istim mehanizmom delovanja, koja su testirana na isti način (isti uslovi izvođenja *in vitro* enzimskog/ćelijskog testa), sa što širim opsegom biološke aktivnosti⁴⁹.
2. Jedinjenja se iz virtuelnih biblioteka preuzimaju u dvodimenzionalnim hemijskim strukturama (2D prikaz) i odgovarajućim metodama geometrijskih optimizacija generišu trodimenzionalne (3D) konformacije (**korak 2, Slika 3**). Veoma opširni pregledni radovi u vezi sa metodama molekulske mehanike⁵⁰ i kvantne mehanike⁵¹, koje se primenjuju za geometrijske optimizacije mogu se pronaći u pomenutim referencama.
3. Ispitivana jedinjenja za 3D-QSAR model se pozicioniraju u virtuelnu mrežu, kavez (eng. *grid*) po čijim osama se kreće molekulska proba koja ispituje energije interakcije jedinjenje–proba (**korak 3, Slika 3**). Molekulske probe mogu biti mali organski molekuli (karbonilna grupa, amid) i procenjuju funkcionalne grupe na jedinjenjima koja mogu biti donori ili akceptori vodoničnih veza. Dodatno, mogu se opisati potencijali hidrofobnih i sternih interakcija ispitivanih jedinjenja. Na ovaj način se definišu polja molekularskih interakcija (eng. *Molecular Interaction Fields* – MIF) oko ispitivanih jedinjenja i interakcione energije, koja služe za odabir i izračunavanje najznačajnijih molekularskih deskriptora. Ovi deskriptori će biti korišćeni za dobijanje prediktivnog 3D-QSAR modela.
4. Hemoinformatička analiza dobijenih podataka (**korak 4, Slika 3**) podrazumeva korišćenje statističkih tehnika analize glavnih komponenta – PCA (eng. *principal*

component analysis) i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata – PLS (eng. *partial least square*). Dodatno, PCA analiza se može koristiti za odabir jedinjenja koja čine model (eng. *training set*) i jedinjenja koja će biti korišćena za eksternu validaciju modela (eng. *test set*). Broj izračunatih deskriptora MIF tehnikom je često izuzetno veliki, zbog čega PLS predstavlja metodu izbora za uspostavljanje korelacije između deskriptora i biološke aktivnosti korišćenih jedinjenja za pripremu 3D-QSAR modela.

5. Statistička procena kvaliteta modela i interpretacija uticaja nezavisnih promenljivih na biološku aktivnost predstavlja jedan od najzahtevnijih koraka u 3D-QSAR analizi.

U molekularnoj mehanici organski molekuli se definišu pomoću polja sila (eng. *force fields*) kao skupovi atoma između kojih su precizno definisane međuatomske potencijalne energije. Polja sila opisuju ugao veze u određenom organskom molekulu, kao i dužinu hemijske veze, torzione uglove itd. Dodatno, pomoću polja sila mogu se izračunati intermolekulske potencijalne energije (*Lennard-Jones* potencijal i *Coulomb*-ove elektrostatičke interakcije) koje daju informacije o vrsti i jačini interakcija između dva organska molekula. Zbog toga što se pomoću polja sila mogu opisati (parametrizovati) organski molekuli i numeričkim simulacijama definisati njihove 3D koordinate, vezivne i nevezivne energije, polja sila imaju veliku primenu u kompjuterskom dizajniranju lekova.

U kontekstu 3D-QSAR modelovanja, metoda koja je iskoristila brojne prednosti polja sila jeste metoda molekularnih polja interakcija (*Molecular Interaction Fields* – MIF)⁵². Jedna od metoda koja je već trećinu veka u intenzivnoj upotrebi za definisanje trodimenzionalnih odnosa strukture i aktivnosti jeste komparativna analiza molekularnih polja, CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*)⁵³. CoMFA, kao polje sila, računa nekovalentne sterne i elektrostatičke interakcije između biološki aktivnih jedinjenja i molekularnih proba (koje ispituju sterne i elektrostatičke interakcije na molekulima). Za izračunavanje molekularnih deskriptora, konformacije jedinjenja moraju biti poravnane i nakon toga se računaju deskriptori u molekularskom polju u obliku kaveza (*grid, lattice*). Molekulske probe se kreću u trodimenzionalnom prostoru duž sve tri ose (x, y, z) zadatog kaveza i identifikuju atome ili funkcionalne grupe koje grade (favorizovane ili nefavorizovane) sterne ili elektrostatičke interakcije sa ciljnim mestom delovanja. Ovakva metoda daje trodimenzionalne konturne mape koje su intuitivne i mogu pojednostaviti interpretaciju odnosa strukture i aktivnosti. Međutim, jedan od veoma često spominjanih nedostataka CoMFA metoda jeste inicijalno poravnavanje konformacija modelovanih jedinjenja⁵⁴. Ovakva metoda ne može biti pouzdana za dobijanje 3D-QSAR modela sačinjenih od fleksibilnih organskih molekula (čak i kada se modeluju derivati sa istim hemijskim skeletom), zbog potencijalne pristrasnosti kompjuterskog hemičara koji odabira konformacije za 3D-QSAR studiju. Pristrasan (često i neracionalan) odabir konformacije jedinjenja koji će doprineti razvoju (ne)validnog 3D-QSAR modela može da udalji istraživača od modelovanja biološki relevantnih (bioaktivnih) konformacija i tako učini 3D-QSAR analizu praktično neupotrebljivom⁵⁵.

Modifikovana verzija CoMFA metode koja se takođe koristi u praksi je komparativna analiza pokazatelja molekulske sličnosti, CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*)^{56,57}. Kod CoMSIA metode pet različitih polja molekulske sličnosti (donorske, akceptorske vodonične veze, sterne, elektrostatičke i hidrofobne interakcije) izračunavaju se koristeći Gaussian-ovu funkciju. Ova metoda daje nešto jednostavnije konturne mape za interpretaciju; pomoću pet različitih polja generišu se najvažniji tipovi interakcija ligand–virtuelni receptor. Za razliku od CoMFA metode, CoMSIA metodom se identifikuju favorizovani/nefavorizovani fragmenti modelovanih jedinjenja za ispitivanu biološku aktivnost.⁴⁹

Metoda (polje sila) kod koje je prevaziđena problematika poravnavanja trodimenzionalnih konformacija jedinjenja za pripremu 3D-QSAR modela naziva se GRID. GRID predstavlja važno polje sila pomoću kojeg se mogu opisati (identifikovati) molekulska polja interakcija (*Molecular Interaction Fields* – MIF), koja se prevođenjem u odgovarajuće deskriptore mogu koristiti za dobijanje 3D-QSAR modela. Detaljan opis metodologije dobijanja 3D-QSAR modela pomoću GRID polja sila, kao i interpretacije i validacije ovih QSAR modela dati su u narednom potpoglavlju.

1.2.2. 3D-QSAR modeli zasnovani na GRID polju sila

Program GRID se spominje prvi put u publikaciji oksfordskog naučnika **Petra Goodford-a**⁵⁸. Goodford je u saradnji sa kristalografima iz *Wellcome Research* laboratorija razvio program GRID, za koji je smatrao da će doneti revoluciju u procesu otkrića lekova. Ujedno, **Goodford** se smatra „prvim apostolom“ kompjuterskog dizajna lekova koji je nakon više godina predanog rada na razvoju programa GRID dočeka da farmaceutska kompanija *Glaxo* iskoristi program za otkriće leka za prevenciju i terapiju virusa influence – zanamivir (*Relenza*)⁵⁹.

Softver GRID koristi monoatomske (fragmentne) ili molekulske probe pomoću kojih se računaju interakcione energije (MIF-ovi) između organskih molekula i proba. Smisao korišćenja GRID proba je simulacija (imitiranje) relevantnih međumolekulskih interakcija koje se ostvaruju na nivou biofaze (lek–receptor). Uzimajući u obzir da su najvažnije interakcije u prepoznavanju lek–ciljno mesto delovanja:

- vodonične interakcije,
- Van der Waals interakcije,
- sterne interakcije,
- kao i elektrostatičke (jonske veze),

ova metoda pomoću GRID proba ispituje mesta favorizovanih ili nefavorizovanih interakcija na ispitivanim molekulima (mali organski molekuli ili makromolekuli).

Analogno spomenutim interakcijama, probe koje se koriste za simulaciju prepoznavanja interakcija lek–receptor su:

- **DRY proba** (uračunava entropijski efekat vezivanja, odnosno uzima u obzir fleksibilne delove molekula, kao i građenje hidrofobnih interakcija). Ova proba nema naelektrisanje i ona identifikuje delove organskih molekula/proteina, koji grade hidrofobne interakcije.
- **O proba** (monoatomska proba, sp² karbonilni kiseonik) je vodonično-akceptorska proba koja na ispitivanim molekulima identifikuje funkcionalne grupe koje mogu biti donori vodoničnih veza.
- **N1 proba** (planarni, amidski azot) je donorsko-vodonična proba koja na ispitivanim molekulima identifikuje funkcionalne grupe koje mogu biti akseptori vodoničnih veza.
- **TIP proba** (sterne interakcije) je proba koja ispituje oblik modelovanih jedinjenja pomoću lokalne zakrivljenosti molekulskih površina⁶⁰.

Polja molekulskih sila mogu biti definisana za vezivna mesta malih molekula u strukturi receptora ili enzima. Izračunata za makromolekule, polja molekulskih interakcija identifikuju mesta sa minimumom energije u okviru aktivnog mesta i mogu poslužiti za generisanje trodimenzionalnog farmakofornog modela. Definisane farmakofore na osnovu trodimenzionalne strukture vezivnog mesta receptora ima raznovrsnu primenu u tehnikama dizajna lekova baziranih na strukturi receptora (SBDD).

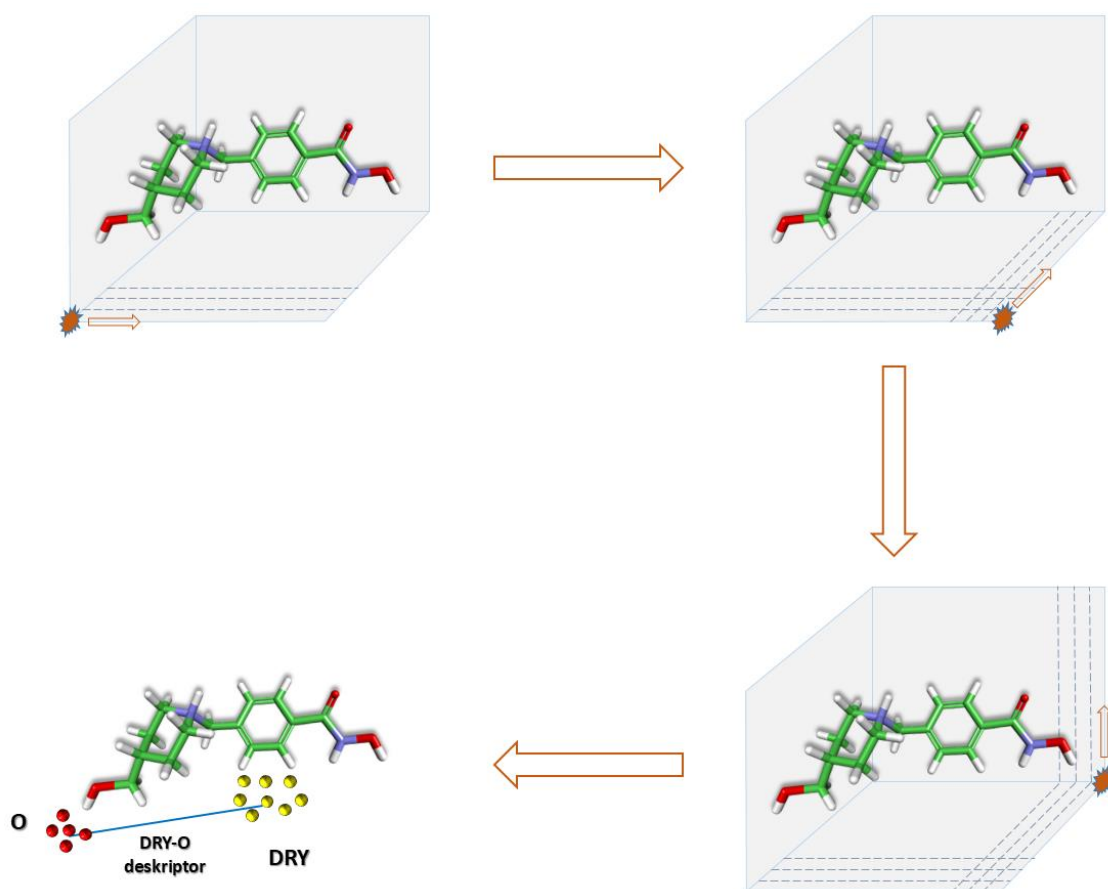
Ukoliko struktura ciljnog mesta delovanja nije poznata, moguće je definisati polja molekulske interakcije za baze malih organskih molekula sa istom biološkom aktivnošću. U ovom slučaju se izračunavanjem energija proba-funkcionalna grupa dobijaju 3D molekulske deskriptori (deskriptorske promenljive). Već pomenuti deskriptori u odeljku 1.2.1. imaju primenu u matematičkom modelovanju odnosa hemijske strukture i biološke aktivnosti za skup hemijski srodnih jedinjenja.

Važna grupa deskriptora koja je nastala iz GRID metode su **GRid INdependent Descriptors** (GRIND)⁶¹, odnosno deskriptori nezavisni od poravnanja molekula. GRIND deskriptori su razvijeni sa ciljem da se ekstrahuju najvažnija mesta interakcije malih organskih molekula sa probama na odgovarajućoj distanci. Šematski prikaz identifikacije polja sila (MIF-ova) na određenom organskom molekulu dat je na **Slici 4**.

GRIND promenljive se izračunavaju tako što se svako modelovano jedinjenje postavi u trodimenzionalni kavez i proba (označena narandžastom bojom, **Slika 4**) putuje duž sve tri ose koordinatnog sistema (x, y i z). Proba se pomera u diskretnim rastojanjima, najčešće u intervalima od 0,5 Å i identifikuju se mesta na molekulima (funkcionalne grupe) koja mogu da ostvare poželjne (favorizovane) nekovalentne interakcije sa odgovarajućom probom. Izračunata energija interakcija između proba i molekula je sadržana u sledećoj jednačini:

$$E = E_{VDW} + E_{EL} + E_{HB} + S \quad (1)$$

pri čemu je van der Waals-ova energija označena sa E_{VDW} , elektrostatička energija je obeležena sa E_{EL} , dok su energije potrebne za uspostavljanje vodoničnih interakcija i entropija označene redom sa E_{HB} i S .



Slika 4. Šematski prikaz izračunavanja deskriptorskih GRIND promenljivih

Polja interakcija oko bilo kog molekula mogu biti opisana hiljadama čvorova (eng. *node*) oko funkcionalnih grupa u molekulu. Da bi se izdvojile najrelevantnije interakcije proba–molekul, program ALMOND⁶² sadrži algoritam za identifikaciju molekulskih polja koja imaju što negativniju vrednost energije E (jednačina 1), pri čemu se dodatno zadržavaju polja interakcija čija je apsolutna vrednost što veća. Da bi program uspešno generisao GRIND promenljive, identifikuju se rastojanja između čvorova koja su označena kao najrelevantnija (sa što nižom energijom E i što većom apsolutnom vrednošću). Bitno je napomenuti da broj čvorova koje će ALMOND algoritam sačuvati za izračunavanje GRIND promenljivih može da utiče i na generisanje i na kvalitet dobijenog 3D-QSAR modela, zbog čega bi trebalo pažljivo razmotriti inicijalno opisana polja molekulskih interakcija i njihova međusobna grupisanja.

Konačno, GRIND promenljive se primenom polja molekulskih interakcija generišu kao geometrijski deskriptori, pri čemu ALMOND izdvaja najrelevantnije čvorove (polja interakcija opisana oko funkcionalnih grupa) na odgovarajućem rastojanju. GRIND promenljive na ovaj način daju informaciju o virtuelnom receptorskom mestu, jer probe imitiraju potencijalne interakcije bočnih ostataka amino kiselina u ciljnom mestu delovanja. Ovako generisane GRIND promenljive ne zavise od početnih koordinata mreže u kojoj se opisuju polja interakcija, već od geometrijskog rastojanja (2D) dva relevantna čvora. Ovim zapisom strukture molekula, gde se identifikuju čvorovi (mesta) poželjnih interakcija molekula na odgovarajućem rastojanju, uspešno se prevazilazi problem poravnavanja molekula za 3D-QSAR studije (nisu važne 3D koordinate molekula). GRIND promenljive ne zavise od poravnavanja molekula, čime se značajno umanjuje pristrasnost kompjuterskog hemičara prilikom pripreme 3D struktura jedinjenja za QSAR model.

Ono što nije prevaziđeno sa deskriptorima nezavisnim od poravnanja je zavisnost od 3D konformacije molekula. Promena položaja ili orijentacije određene funkcionalne grupe u strukturi molekula može da utiče da program ALMOND ne identifikuje GRIND promenljivu na istom rastojanju kao za prvobitnu konformaciju. Ovaj nedostatak je važno razmotriti tokom inicijalne faze pripreme 3D konformacija jedinjenja i racionalno odabrati/obrazložiti metodu za dobijanje konačnih konformacija jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje.

Uspešna priprema 3D-QSAR studije pomoću GRID metode se danas izvodi u programu *Pentacle*⁶³. Program *Pentacle* sadrži više programa i/ili algoritama, koji su razvijeni da kompjuterskim hemičarima pojednostave način pripreme modela, kao i da spreče pristrasnost prilikom identifikacije i odabira ključnih GRIND promenljivih koje koreliraju sa biološkom aktivnošću. Algoritmi koji su inkorporirani u *Pentacle* su:

- **GRID program**, koji izračunava polja molekulskih interakcija (MIF) na način koji je prikazan na **Slici 4**, koristeći četiri probe: DRY, TIP, O i N1.
- **ALMOND algoritam**, koji generiše i izdvaja najrelevantnije GRIND deskriptorske promenljive.
- **CLACC (eng. Consistently Large Auto and Cross Correlation) algoritam**, koji zapisuje (kodira) proizvode energija čvorova u obliku auto i kros-korelograma, važnih za interpretaciju 3D-QSAR modela.

Za pripremljeni set molekula odgovarajuće biološke aktivnosti koji se koristi za 3D-QSAR studiju, program *Pentacle* daje i numeričke vrednosti i grafičke prikaze koji su značajni za dalje tumačenje odnosa hemijske strukture i aktivnosti. GRIND promenljive se u programu *Pentacle* prikazuju kroz auto-korelograme (npr. TIP-TIP) i kros-korelograme (O-N1), sa kojih se može očitati na kojoj distanci se nalazi odgovarajuća GRIND promenljiva, kao i jačina interakcija definisana odgovarajućom probom. Oblik korelograma tumači se tako da uži pikovi

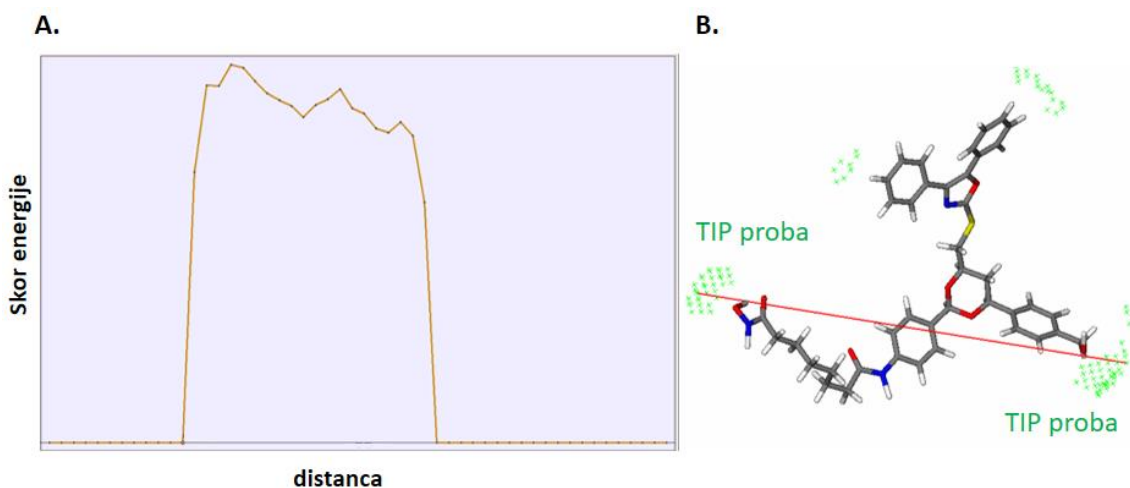
prikazuju slabije interakcije, dok širi pikovi na korelogramu sugerišu snažnije interakcije proba–funkcionalna grupa u virtuelnom receptorskom mestu.

S obzirom na to da program *Pentacle* koristi četiri probe za definisanje polja molekulskih interakcija, moguće je pomoću 10 različitih GRIND promenljivih opisati hemijsku strukturu molekula i dovesti je u vezu sa njenom biološkom aktivnosti. Tih 10 GRIND promenljivih prikazane su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Vrste GRIND promenljivih koje program *Pentacle* koristi za 3D-QSAR modelovanje

GRIND promenljiva	Hemijska interpretacija
DRY-DRY	Promenljiva daje informaciju o geometrijskoj distanci dva hidrofobna polja interakcija opisana oko hidrofobnih funkcionalnih grupa u molekulu.
O-O	Promenljiva daje informaciju o geometrijskoj distanci dva vodonično-akceptorska polja interakcija opisana oko funkcionalnih grupa koje su donori vodoničnih interakcija u molekulu.
N1-N1	Promenljiva daje informaciju o geometrijskoj distanci dva vodonično-donorska polja interakcija opisana oko funkcionalnih grupa koje su akseptori vodoničnih interakcija u molekulu.
TIP-TIP	Promenljiva daje informaciju o geometrijskoj distanci dve sterne probe koje su opisane oko konveksnih površina biološki aktivnog molekula.
DRY-O	Promenljiva daje informacije o geometrijskoj distanci hidrofobnog i vodonično-akceptorskog polja interakcija koja su opisana oko hidrofobne i vodonično-donorske funkcionalne grupe.
DRY-N1	Promenljiva daje informacije o geometrijskoj distanci hidrofobnog i vodonično-donorskog polja interakcija koji su opisani oko hidrofobne i vodonično-akceptorske funkcionalne grupe.
DRY-TIP	Promenljiva daje informacije o geometrijskoj distanci hidrofobnog i sternog polja interakcija koji su opisani oko hidrofobne i lokalno zakrivljene (ispupčene) funkcionalne grupe.
O-N1	Promenljiva daje informacije o geometrijskoj distanci vodonično-akceptorskog i vodonično-donorskog polja interakcija koji su opisani oko funkcionalnih grupa koje predstavljaju donora i akceptora vodoničnih interakcija.
O-TIP	Promenljiva daje informacije o geometrijskoj distanci vodonično-akceptorskog i sternog polja interakcija koji su opisani oko vodonično-donorske i lokalno zakrivljene (ispupčene) funkcionalne grupe.
N1-TIP	Promenljiva daje informacije o geometrijskoj distanci vodonično-donorskog i sternog polja interakcija koji su opisani oko vodonično-akceptorske i lokalno zakrivljene (ispupčene) funkcionalne grupe.

GRIND promenljive mogu biti očitane sa korelograma, ali se pored njih u programu *Pentacle* uvek nalaze i grafički prikazi promenljivih u okviru trodimenzionalne strukture molekula (**Slika 5**). Korelogrami predstavljaju zavisnost skora energije interakcije proba-funkcionalna grupa u odnosu na distancu između posmatranog čvornog para (polja interakcija). Vrednosti proizvoda energije se u *Pentacle*-u skaliraju pomoću maksimalne energije polja interakcija, pri čemu su vrednosti skora energije u opsegu od 0,0 do 1,0. Pomoću ovih vrednosti skorova se analizira „relevantnost“ svake interakcije, odnosno GRIND deskriptorske promenljive (0,0 – nije favorizovana, 1,0 – veoma favorizovana interakcija).



Slika 5. A. Prikaz korelograma, **B.** Prikaz TIP-TIP promjenljive (zeleno označeni krstići predstavljaju pojedinačni sterna čvor) koja definiše favorizovane sterne interakcije (crvena boja promjenljive) sa virtuelnim receptorskim mestom.

Važno je napomenuti da svaka proba može biti jednostavno prepoznata u *Pentacle* programu prema precizno definisanim bojama, tako da se DRY proba označava žutom bojom, O proba crvenom bojom, N1 proba plavom bojom i već opisana TIP proba zelenom bojom.

Izračunate GRIND promjenljive u programu *Pentacle* pružaju informacije o sledećim karakteristikama jedinjenja koja se koriste za 3D-QSAR modelovanje:

- GRIND promjenljiva predstavlja geometrijsku distancu dva polja interakcija (dve grupe istih ili različitih proba) i kao takva određuje potencijalnu distancu između bočnih ostataka amino kiselina u virtuelnom receptorskom mestu. GRIND promjenljive ne ukazuju na distancu između funkcionalnih grupa u ispitivanim molekulima.
- Indirektnom interpretacijom GRIND promjenljivih, izvode se hipoteze o **kvalitativnom** doprinosu funkcionalnih grupa čije prisustvo u strukturi molekula doprinosi odgovarajućoj farmakološkoj aktivnosti.
- Jasno razlikovanje „veličine“ doprinosa GRIND promjenljivih u okviru iste vrste deskriptorskih promjenljivih (npr. dve DRY-DRY promjenljive u 3D-QSAR modelu) je omogućeno jednostavnim poređenjem vrednosti proizvoda (skorova) energije na korelogramima.
- GRIND promjenljive služe kao smernice za dizajniranje novih molekula, tako što se prisustvo, tj. odsustvo favorizovanih interakcija u strukturama aktivnih, odnosno neaktivnih jedinjenja koristi za generisanje hipoteza o odnosu strukture i biološke aktivnosti.

Nakon upoznavanja osnovne metodologije rada *Pentacle* programa i razumevanjem interpretacije GRIND deskriptora, pred istraživačem se postavlja ključno pitanje za završetak 3D-QSAR studije:

Pomoću kojih statističkih metoda se izračunate GRIND promjenljive mogu dovesti u vezu sa definisanom biološkom aktivnošću?

Odgovor na ovo pitanje leži u činjenici da *Pentacle* računanjem polja sila za trodimenzionalne konformacije molekula, može da identifikuje preko hiljadu GRIND promjenljivih. Značajno veliki broj GRIND deskriptora se metodama multivarijantne statističke analize može dovesti u vezu sa biološkom aktivnošću.

Da bi se uspešno konstruisali 3D-QSAR modeli pomoću mnogobrojnih nezavisnih promjenljivih (GRIND deskriptora), koriste se hemometrijske metode kao što su analiza

glavnih komponenti (*Principal component analysis* - PCA)⁶⁴ i regresiona metoda parcijalnih (delimičnih) najmanjih kvadrata (*Partial least square* - PLS)⁶⁵. Suština upotrebe ovih statističkih tehnika je redukcija inicijalnog broja GRIND promenljivih do nekoliko glavnih komponenti (latentnih promenljivih) koje su jednostavnije za interpretaciju. Metoda izbora za dobijanje regresionog modela je gore spomenuti PLS.

3D-QSAR modeli zasnovani na GRIND deskriptorima se mogu pripremiti prema protokolu i objašnjenjima prikazanim na **Slici 3**. Konačan ishod generisanja 3D-QSAR modela je dobijanje **validnog i primenljivog** 3D-QSAR modela. Dobijanje validnog modela, koji će imati praktičnu primenu u dizajnu novih molekula i racionalizaciji sinteze analoga identifikovanih jedinjenja zasniva se na izračunavanju parametara validacije 3D-QSAR modela.

Validnost dobijenih modela se može kvalifikovati parametrima interne (**Tabela 4**) i eksterne validacije (**Tabela 5**). Internom validacijom (proverom) 3D-QSAR modela se dobijaju informacije o tačnosti i pozdanosti samog modela (jedinjenja iz *training set*-a) da predvidi već poznate biološke aktivnosti. Podjednako je važno napomenuti da parametri interne validacije **ne mogu biti korišćeni** za tumačenje prediktivnosti 3D-QSAR modela. Veličine koje se računaju tokom interne provere tačnosti 3D-QSAR modela su:

- **R²** - koeficijent determinacije regresionog modela – predstavlja kvadrat koeficijenta korelacije između stvarnih (eksperimentalnih) vrednosti biološkog odgovora i modelom predviđenih vrednosti biološkog odgovora⁶⁶.
- **Q²** – kvadrat koeficijenta korelacije dobijen ukrštenom- ili kros-validacijom – parametar koji se dobija *leave-one-out* metodom (LOO, dobijanje koeficijenta korelacije izostavljanjem po jednog jedinjenja u *training* setu, sve dok se svako jedinjenje po jedan put ne izostavi). Vrednosti Q² parametra doprinose razumevanju robusnosti modela, ali ne i prediktivnosti.
- **RMSEE** (*Root Mean Square Error of Estimation*) – greška predviđanja *training set* modela; izračunava se kao kvadratni koren sume kvadrata reziduala (eksperimentalna aktivnost – predviđena aktivnost) koja je podeljena brojem jedinjenja u *training* setu.

Tabela 4. Prikaz parametara interne validacije i njihovog izračunavanja.

Interna validacija 3D-QSAR modela

Parametar	Jednačina	Napomena
R²	$R^2 = \frac{\sum (\hat{Y}_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}{\sum (Y_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$	$\hat{Y}_{\text{training}}$ – LOO-predviđena vrednost biološke aktivnosti; $\bar{Y}_{\text{training}}$ – srednja vrednost eksperimentalno određenih aktivnosti; Y_{training} – pojedinačna vrednost eksperimentalno određenih aktivnosti
Q²	$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum (Y_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$	
PRESS	$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2$	$e_{(i)}^2$ – suma kvadrata razlike između stvarnih i LOO predviđenih vrednosti ($\hat{Y}_{\text{training}}$)
RMSEE	$\text{RMSEE} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}}$	n – broj jedinjenja u training setu

Preciznost modela da predvidi sopstvene (eksperimentalne) vrednosti bioloških aktivnosti jedinjenja u okviru *training* seta je važan, ali ne i dovoljan uslov da se 3D-QSAR model okarakteriše kao prediktivan.

Validno predviđanje biološke aktivnosti novih, nepoznatih molekula slične hemijske strukture kao i jedinjenja u test setu je cilj eksterne validacije^{67,68}. Tokom pripreme 3D-QSAR modela neophodno je upotrebiti test set jedinjenja, koja ne čine 3D-QSAR model, ali se koriste za kvalifikaciju prediktivnih kapaciteta modela. Parametri eksterne validacije (**Tabela 5**) su:

- **R²_{pred}** – koeficijent determinacije koji se računa za molekule iz test seta.
- **RMSEP** (*Root Mean Square Error of Prediction*) – greška predviđanja test set jedinjenja, izračunava se koristeći vrednosti reziduala za jedinjenja u okviru test seta.
- **Parametri r² metrike**^{67,69} (r²_m, r²/_m, $\overline{r_m^2}$ i Δr_m^2) koji predstavljaju dodatne zahteve za eksternu validaciju 3D-QSAR modela.

Tabela 5. Prikaz parametara eksterne validacije i njihovog izračunavanja.

Eksterna validacija 3D-QSAR modela

Parametar	Jednačina	Napomena	
R²_{pred}	$R_{\text{pred}}^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{\text{test}} - \hat{Y}_{\text{test}})^2}{\sum (Y_{\text{test}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$	\hat{Y}_{test} – predviđena vrednost biološke aktivnosti test set jedinjenja; \bar{Y}_{test} – srednja vrednost predviđenih aktivnosti test set jedinjenja; Y_{training} – pojedinačna vrednost predviđenih aktivnosti test set jedinjenja	
RMSEP	$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}}$	n – broj jedinjenja korišćenih u test setu	
Parametri r² metrike	r²_m	$r_m^2 = r^2 (1 - \sqrt{r^2 - r_0^2})$	r² i r²₀ su koeficijenti determinacije izračunati za korelaciju između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti bioloških aktivnosti za test set jedinjenja.
	r²/_m	$r_m^{/2} = r^2 (1 - \sqrt{r^2 - r_0^{/2}})$	r²₀ je kvadratni korelacioni koeficijent između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti (korelacija dobijena zamenom parametara na x i y osama).
	$\overline{r_m^2}$	$\overline{r_m^2} = \frac{r_m^2 + r_m^{/2}}{2}$	
	Δr_m^2	$\Delta r_m^2 = r_m^2 - r_m^{/2}$	

1.2.3. Domen primenljivosti QSAR modela

Kada se za pripremu 3D-QSAR modela izdvajaju jedinjenja, potrebno je pažljivo odabrati jedinjenja koja su testirana pod istim eksperimentalnim uslovima. Još važnije je odabrati jedinjenja koja sadrže isti/sličan osnovni hemijski skelet. Broj *training* set jedinjenja, raznolikost njihovih supstituenata i modaliteti osnovnog hemijskog skeleta jedinjenja čine

hemijski prostor svakog QSAR modela. Nije ispravno predviđati farmakološku aktivnost za nove hemijske strukture jedinjenja koje su raznorodne u odnosu na hemijske strukture jedinjenja koje čine QSAR model. Da bi se ovaj problem izbegao, nakon pripreme, interpretacije i validacije QSAR modela važno je definisati i njegov domen primenljivosti (eng. *applicability domain*) koji će ograničiti performanse QSAR modela.

Domen primenljivosti je koncept predložen od Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD)⁷⁰ i podrazumeva definisanje deskriptorskog prostora QSAR modela u okviru kog se može sa sigurnošću predviđati biološka aktivnost novodizajniranih jedinjenja.

Smatra se da su deskriptori *training set* jedinjenja u nekom 3D-QSAR modelu normalno distribuirani (Gausova raspodela) i da se vrednosti deskriptora *training set* jedinjenja mogu pronaći u okviru $\pm 3SD$ (standardne devijacije)⁷¹. Ukoliko deskriptori nekog jedinjenja pripadaju prostoru izvan ovog opsega, jedinjenje se smatra *outlier*-om (različitim od ostalih u skupu). Takvo jedinjenje se ne može koristiti ni za pripremu QSAR modela (u *training setu*), kao što se ni predviđanje njegove biološke aktivnosti ne može smatrati pouzdanim.

Jedan od metoda za definisanje domena primenljivosti jeste metod zasnovan na distanci ili *leverage* pristup. Ovim pristupom se definiše granična vrednost (*threshold*, h^*) na osnovu jednačine:

$$h^* = \frac{3(p+1)}{n} \quad (2)$$

gde su p deskriptori pomoću kojih se definiše domen primenljivosti, a n broj *training set* jedinjenja.

Korišćenjem vrednosti deskriptora za svako jedinjenje u *training* i *test setu* može se izračunati pojedinačna *leverage* vrednost za svako jedinjenje. Zbog lakše interpretacije i grafičkog tumačenja domena primenljivosti, konstruiše se *Williams-ov* dijagram, kao zavisnost standardizovanih reziduala u odnosu na izračunate *leverage* vrednosti (h) za svako jedinjenje. Na *Williams-ovom* dijagramu se na Y-osi definiše $\pm 3SD$ standardizovanih reziduala, na x-osi se unese granična (h^*) vrednost i posledično se mogu identifikovati *outlier*-i modela.

Kada se razmatra pouzdanost predviđanja novodizajniranih jedinjenja, standardizovani reziduali se ne mogu izračunati (jer za novodizajnirano jedinjenje ne postoji vrednost biološke aktivnosti), grafički se prikazuje distribucija izračunatih *leverage* (h) vrednosti na x-osi i procenjuje se način grupisanja novodizajniranih jedinjenja u odnosu na grupisanje *training* i *test set* jedinjenja.

1.3. Pristup dizajniranju lekova zasnovan na hemijskoj strukturi fragmenata (*Fragment Based Drug Design, FBDD*)

Fragmenti predstavljaju organske molekule čija je molekulska masa manja od 300 Da. Za razliku od lekovitih supstanci, sadrže manji broj heteroatoma, ostvaruju manje od 3 donorske i/ili 3 akceptorske vodonične veze i njihova lipofilnost je manja od 3 ($\text{clogP} < 3$)⁷². Fragmenti su nisko-afinitetni ligandi čiji je afinitet za specifično ciljno mesto delovanja u opsegu od visokih mikromolarnih do milimolarnih koncentracija⁷³. Strategija dizajniranja novih lekova-kandidata korišćenjem fragmenata ima nekoliko prednosti:

- Afinitet vezivanja fragmenata za odgovarajuće ciljno mesto delovanja potiče od njihovog entalpijskog pre nego od entropijskog doprinosa vezivanju⁷⁴,
- U poređenju sa lekovitim supstancama, fragmenti pružaju više mogućnosti za optimizacije fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina tokom dizajniranja novih hemijskih skeleta⁷⁵,
- Tokom kasnijih faza optimizacije vodećih molekula (*lead molecule*) dizajniranih na osnovu strukture fragmenata, moguće je efikasnije zadržati komplementarnost između liganda i receptora⁷⁶ i
- Projekti bazirani na dizajniranju lekova polazeći od fragmenata omogućuju *de novo* dizajn lekovitih supstanci; povećavaju šanse za dobijanjem novih hemijskih skeleta koji mogu biti patentno zaštićeni.

Do sada su razvijena tri leka koristeći metode dizajniranja lekova zasnovane na fragmentima - vemurafenib⁷⁷, venetoklaks⁷⁸ i erdafitinib⁷⁹. Dizajniranje lekova zasnovano na fragmentima je inicijalno razvijano u sprezi sa različitim biofizičkim metodama (kristalografija bazirana na X-zracima, rezonanca površinskih plazmona, izotermalna titraciona kalorimetrija, fluorescentna korelaciona spektroskopija i brojne druge). Izbor eksperimentalne biofizičke metode zavisi od dostupne baze fragmenata koja će biti korišćena za skrining, kao i od propusnosti (vremena potrebnog za skrining jednog jedinjenja iz eksperimentalne baze fragmenata)⁸⁰.

Noviji projekti medicinske hemije svedoče da je moguće koristiti i virtuelne baze fragmenata za identifikaciju i optimizaciju strukture fragmenata do vodećeg jedinjenja sa osobinama lekovitih supstanci⁸¹⁻⁸³. Za *in silico* studije dizajniranja novih lekova-kandidata, važno je pravilno odabrati virtuelnu bazu fragmenata čije osobine odgovaraju Pravilu 3 ($\text{Mr} < 300$ Da, broj donora/akceptora vodonične veze ≤ 3 i $\text{clogP} \leq 3$). Dodatno, potrebno je prefiltrirati virtuelnu bazu fragmenata tako da se uklone jedinjenja koja poseduju toksikofore u strukturi, kao i fragmente koji predstavljaju lažno pozitivna *hit* jedinjenja (vezuju se neselektivno, kovalentno za većinu ciljnih mesta delovanja)⁸⁴.

Neke od strategija za razvoj fragmenta do *lead* molekula su⁸⁵:

- rast fragmenata (*Fragment growing*)
- supstitucija fragmenta novim skeletom (*Scaffold hopping*)
- povezivanje fragmenata pomoću odgovarajućeg linkera (*Fragment linking*) i
- strategija preklapanja fragmenata (*Fragment merging*)

U ovoj doktorskoj disertaciji biće prikazana *in silico* studija virtuelnog skrininga i identifikacije novih cink-vezivnih grupa, koje mogu biti iskorišćene u dizajniranju novih, selektivnih inhibitora humane histon deacetilaze 6 (HDAC6).

1.4. Pristup dizajniranju lekova zasnovan na strukturi ciljnog mesta delovanja jedinjenja (*Structure Based Drug Design, SBDD*)

Kada je istraživačima dostupna trodimenzionalna struktura ciljnog mesta delovanja lekova, moguće je proširiti aspekt dizajniranja lekova razmatranjem strukture kompleksa lek-ciljno mesto delovanja. Informacije koje se mogu dobiti izučavanjem 3D strukture kompleksa lek-ciljno mesto delovanja su sledeće:

- identifikacija strukture i oblika vezivnog mesta/vezivnih mesta za male molekule na strukturi ciljnog mesta delovanja (receptora)
- broj i vrsta međumolekulskih interakcija u kompleksu lek-receptor
- vezivna (bioaktivna) konformacija leka (malog organskog molekula)

Trodimenzionalne strukture ciljnog mesta delovanja mogu biti razrešene različitim biofizičkim i kompjuterskim metodama:

- kristalografija zasnovana na X-zracima²
- NMR spektroskopija^{86,87}
- kriogena elektronska mikroskopija⁸⁸
- homologo modelovanje⁸⁹
- platforma *AlphaFold* zasnovana na mašinskom učenju⁹⁰

Najveći broj razrešenih 3D-struktura ciljnih mesta delovanja lekova je dostupan na sajtu Protein Data Bank, PDB (<https://www.rcsb.org/>) gde istraživači kontinuirano deponuju nove strukture makromolekula. Strukture deponovane na sajtu PDB su u najvećem procentu razrešene kristalografijom zasnovanom na X-zracima.

Do 2021. godine se činilo da će veliki udeo humanog proteoma biti i dalje u budućnosti razrešavan biofizičkim metodama. Pojavljivanjem platforme AlphaFold, u okviru Google kompanije, desila se revolucija u predviđanjima trodimenzionalne strukture proteina. Naime, istraživači iz DeepMind kompanije su uspešno razvili neuronske mreže koje sa visokom preciznošću predviđaju 3D stukturu i oblik proteina. Koristeći primarnu sekvencu proteina i homologe proteine, istraživači DeepMind-a su otvorenim pristupom obezbedili svim istraživačima širom sveta da koriste predviđene 3D strukture proteina (čak 98,5% humanih proteina) koje godinama unazad nisu uspevali da razreše biofizičkim metodama! Ipak, čini se da kompleksne biofizičke metode neće izgubiti na značaju nakon otkrića AlphaFold-a, jer će kvalitet modela neuronskih mreža uvek biti procenjivan uz pomoć eksperimentalno razrešenih struktura proteina.

Da bi neka struktura proteina ili enzima bila korišćena za dizajn novih molekula koji moduliraju njenu aktivnost, neophodno je identifikovati strukturu aktivnog (katalitičkog) mesta proteina, njegovu geometriju i fizičko-hemijske karakteristike unutar vezivnog mesta. Prepoznavanje lek-receptor interakcija predstavlja osnov za izučavanje uticaja organskih molekula na strukturu i funkciju receptora.

Postoje tri glavne determinante koje utiču na molekulske prepoznavanje ligand-ciljno mesto delovanja:

- termodinamika vezivanja
- komplementarnost površina ligand-receptor

- o fizičko-hemijske osobine liganda i receptora

Krajem 19. veka je predložen model „ključa i brave“ pomoću koga je na veoma uprošćen način opisano da se lek, kao ključ, vezuje za makromolekule koji su pojednostavljeno posmatrani kao brava⁹¹. Sredinom XX veka je **Daniel Koshland** proširio ideju razumevanja interakcija lek-receptor razmatrajući fleksibilnost proteina koja se dešava nakon vezivanja liganda. Optimizacija uklapanja liganda u protein podrazumeva da dođe do izvesnog stepena „preuređivanja“ njihovih trodimenzionalnih struktura⁹².

Razvojem novih biofizičkih metoda, postalo je jasno da je površinska komplementarnost važna za vezivanje liganda za receptor. Stabilnost kompleksa ligand-receptor određena je lipofilnim, sternim i elektrostatičkim karakteristikama oba molekula.

Termodinamičke karakteristike vezivanja liganda za receptor definisane su slobodnom energijom vezivanja (ΔG), entalpijom (ΔH) i entropijom (ΔS). Stabilnost formiranog kompleksa definisana je Gibbs-ovom slobodnom energijom vezivanja (ΔG).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Energija slobodnog vezivanja direktno korelira sa konstantom afiniteta K_d i definiše stabilnost biološkog kompleksa:

$$\Delta G = -RT \ln K_d \quad (4)$$

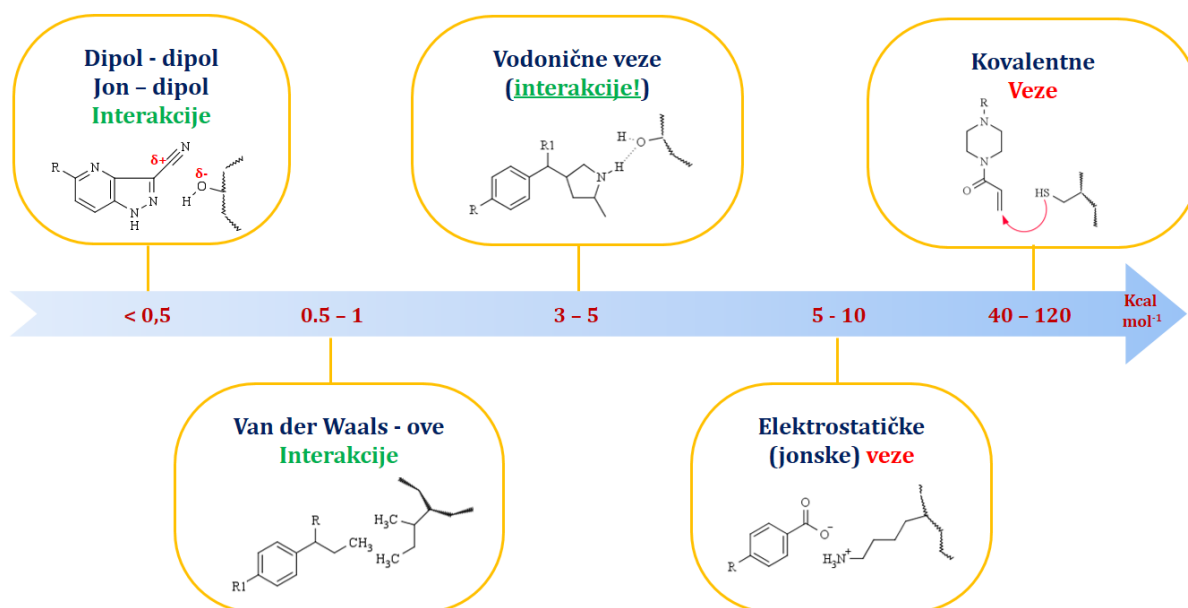
gde su R - univerzalna gasna konstanta, a T - apsolutna temperatura.

Entalpija vezivanja definiše gubitak nekovalentnih interakcija, uglavnom vodoničnih veza sa molekulima vode (efekat izmene vode u vezivnom mestu), interakcije između liganda i receptora i reorganizaciju dislociranih molekula rastvarača⁹³. Vezivna entropija liganda podrazumeva izmenu molekula vode sa vezivne površine proteina, kao i redukciju broja mogućih konformera liganda u vezivnom džepu. Tokom inicijalne faze razvoja vodećeg jedinjenja, istraživači se fokusiraju na optimizacije entalpijskog doprinosa slobodnoj energiji vezivanja (povećavanje broja vodoničnih interakcija sa bočnim ostacima amino kiselina u vezivnom mestu). U kasnijim fazama optimizacije strukture vodećeg jedinjenja, kada je cilj poboljšati parametre vezivanja liganda za receptor (unapređenjem potentnosti, odnosno sintezom analoga koji ima nanomolarne IC_{50} vrednosti) najčešće se razmatra redukcija konformacione slobode liganda u vezivnom mestu. Sinteza potentnijih analoga rigidnije strukture u odnosu na inicijalno jedinjenje, posledično i porast afiniteta liganda se objašnjavaju entropijskim doprinosom⁹⁴.

Racionalizacija vezivanja liganda za specifično ciljno mesto delovanja zahteva detaljno poznavanje međumolekulskih interakcija ligand-receptor, definisanje vezivnih molekula vode u strukturi kompleksa, kao i energetskog doprinosa vezivanja liganda (entalpijski ili entropijski doprinos).

1.4.1. Međumolekulske interakcije u kompleksu ligand–receptor

Najvažnije interakcije odgovorne za prepoznavanje ligand-receptor su nekovalentne interakcije, kao što su dipol-dipol i jon-dipol, jon-indukovani dipol interakcije, *Van der Waalsove* (hidrofobne) interakcije, vodonične interakcije i jonske veze (**Slika 6**)⁹⁵. Druge vrste interakcija značajnih tokom formiranja kompleksa ligand-receptor su kovalentne veze i koordinacije metalnih jona u sastavu aktivnog mesta enzima.



Slika 6. Prikaz vrsta međumolekulskih interakcija poređanih po jačini izraženoj u kcal mol⁻¹

Za stvaranje kompleksa između liganda i ciljnog mesta delovanja često je potrebno formiranje više od jedne međumolekulske interakcije, zbog slabe prirode nekovalentnih sila. Kratak domet većine nekovalentnih interakcija podrazumeva da se grupe koje intereaguju nađu u neposrednoj blizini, kao i da postoji komplementarnost između intereagujućih grupa.

Zbog izučavanja inhibitora metaloenzima, posebna pažnja u ovoj doktorskoj disertaciji biće usmerena ka razmatranju metal-ligand interakcija. Brojni su primeri metaloproteina u literaturi. Od posebnog značaja u studijama otkrića lekova su enzimi čiji metali imaju funkcionalnu ulogu (učestvuju u katalitičkim ulogama enzima, prenosu elektrona itd).⁹⁶ Inhibitori metaloenzima, kao mali organski molekuli, sadrže specifične funkcionalne grupe (jonofore) koje se još nazivaju metal-vezivne grupe. Neki od primera lekova koji sadrže jonofore (metal-vezivne grupe) su dati u **Tabeli 6**.

Tabela 6. Prikaz najčešćih metal-vezivnih grupa u stukturi lekova (označene crvenom bojom)

<p>Primer leka: doksiciklin⁹⁷ Jonofora: keton i enolna grupa</p>	<p>Primer leka: dolutegravir⁹⁸ Jonofora: karbonilna grupa laktama i enol</p>
<p>Primer leka: zileuton⁹⁹ Jonofora: N-hidroksiurea</p>	<p>Primer leka: vorinostat¹⁰⁰ Jonofora: hidroksamska kiselina</p>

Ligandi mogu da grade komplekse sa metalima u okviru metaloenzima u različitim koordinacionim geometrijama. Ukoliko jedan heteroatom koordinira metalni jon, radi se o monodentatnoj koordinaciji, suprotno, dva heteroatoma grade bidentatne komplekse¹⁰¹.

Metode dizajniranja inhibitora metaloenzima zasnovane na trodimenzionalnoj strukturi enzima (SBDD) se smatraju izuzetno validnim za identifikaciju, karakterizaciju i optimizaciju hemijskih struktura novih inhibitora¹⁰². Najčešće korišćene *in silico* SBDD metode u racionalnom dizajniranju inhibitora metaloenzima su:

- virtuelni skrining zasnovan na trodimenzionalnoj strukturi metaloenzima
- molekulski doking
- molekulska dinamika

1.4.2. Virtuelni skrining zasnovan na trodimenzionalnoj strukturi metaloenzima

Trodimenzionalna struktura aktivnog mesta metaloenzima predstavlja šablon (obrazac) u odnosu na koji se mogu izdvojiti obećavajući inhibitori iz virtuelnih baza jedinjenja.

Program FLAP, koji koristi GRID metodologiju (opisanu u 1.1.2. potpoglavlju), definiše polja interakcija u označenom aktivnom mestu enzima. Pomoću proba DRY, O, N1, N+ (identifikuje pozitivna naelektrisanja), O- (negativno naelektrisanje) i H (oblik) se opisuju mesta favorizovanih interakcija u strukturi aktivnog mesta enzima (tzv. kvadrupleti), tj. definišu se trodimenzionalne farmakofore¹⁰³.

U narednom koraku se identifikuju farmakofore za odgovarajući broj konformacija jedinjenja (najčešće 25) u okviru virtuelne baze koja se koristi za skrining. FLAP generiše po jednu zajedničku farmakoforu za svaku konformaciju jednog liganda, čuva je i preklapa sa farmakoforom aktivnog mesta enzima. Rangiranje jedinjenja nakon skrining procedure se izvodi poređenjem sličnosti MIF šablona (aktivnog džepa enzima) sa sličnostima MIF-ova jedinjenja. Preklapanjem farmakofora šablona (enzima) i jedinjenja rangiraju se virtuelna jedinjenja i dodeljuju im se odgovarajući skorovi.

Primena GRID metodologije iskorišćena je u projektima virtuelnog skrininga za identifikaciju inhibitora metaloenzima leukotrien A4 (LTA4) hidrolaze¹⁰⁴, Eya 2 (*Eyes Absent 2*) fosfataze¹⁰⁵ endonukleaze virusa Influenze¹⁰⁶, RNaze H virusa HIV-a¹⁰⁷. U ovoj disertaciji će biti prikazana studija identifikacije ne-hidroksamskih cink-vezivnih funkcionalnih grupa za dizajn selektivnih HDAC6 inhibitora, koristeći GRID metodologiju u okviru programa FLAP¹⁰⁸.

1.4.3. Molekulski doking

Jedan od modaliteta studija dizajniranja lekova zasnovanih na trodimenzionalnoj strukturi receptora jeste molekulski doking (molekulsko usidranje). Cilj studije molekuskog dokinga jeste identifikacija vezivne poze, orijentacije i vezivne konformacije ispitivanih liganada¹⁰⁹.

Proces molekuskog dokinga može se opisati u nekoliko koraka:

- a) Izdvajanje i priprema kompleksa ligand–receptor iz odgovarajućih baza 3D struktura makromolekula (npr. *Protein Data Bank*, <https://www.rcsb.org/>). Priprema proteina podrazumeva detaljnu introspekciju vezivnog džepa receptora, dodavanje nedostajućih ostataka amino-kiselina, dodavanje vodonika i odgovarajućih protonacija bočnih ostataka amino kiselina pri zadatim pH uslovima na kojima se izvodi molekulski doking.

- b) Priprema trodimenzionalnih konformacija liganada za doking studiju najčešće koristeći različite metode kvantne mehanike
- c) Pozicioniranje liganda u definisanoj strukturi aktivnog mesta receptora (identifikacija poze, orijentacije i konformacije liganda)
- d) Rangiranje liganada koristeći različite algoritme, tzv. *scoring* funkcije (funkcije vrednovanja)
- e) Vizuelizacija i validacija rezultata dokinga

U osnovi, molekularni doking se zasniva na korišćenju algoritama za pretragu odnosno uzorkovanje vezivnih konformacija i algoritama za rangiranje predviđenih poza liganda.

Uzorkovanje vezivnih konformacija podrazumeva predviđanje konformacije, orijentacije i translacije liganda. Cilj prvog koraka dokinga je predviđanje strukture kompleksa receptor-ligand. Programi koji se koriste za doking studije koriste algoritme za uzorkovanje koji tretiraju male molekule kao fleksibilne, dok se proteini najčešće tretiraju kao rigidni, nešto ređe se njihove amino kiseline tretiraju kao fleksibilne. Algoritmi za uzorkovanje se u literaturi dele na algoritme koji izvode sistematsku pretragu konformacija, poza i orijentacija liganada, algoritme koji se zasnivaju na podudarnosti trodimenzionalnog oblika liganda i receptorskog mesta, kao i na stohastičke algoritme¹¹⁰.

Razvijeni su različiti algoritmi uzorkovanja koji su podeljeni u tri grupe:

- **Algoritmi sistematskog pretraživanja** (korišćeni u Glide, DOCK 4.0, FlexX, FLOG softverima) – ovi algoritmi tretiraju ligande kao potpuno fleksibilne i generišu veliki broj vezivnih konformacija fragmentacijom liganada ili predpripremljenih konformacija
- **Algoritmi koji se zasnivaju na komplementarnosti trodimenzionalnog oblika liganda i receptorskog mesta** (korišćeni u DOCK, FRED, Surflex softverima) – najjednostavniji algoritmi za uzorkovanje koji se zasnivaju na komplementarnosti liganda i receptorskog mesta, koriste preformirane konformacije liganada (tokom dokinga konformacije su rigidne)¹¹¹.
- **Stohastički algoritmi** (korišćeni u *GOLD*, *AutoDock* programima) – tretiraju ligand kao fleksibilan tako što slučajnim promenama modifikuju rotacione i konformacione slobode liganda. Najčešće se ovi algoritmi dele na Monte Carlo i genetske algoritme¹¹².

Nakon uzorkovanja konformacija ispitivanih liganada, koriste se algoritmi za rangiranje (vrednovanje) dobijenih konformacija, u literaturi poznate kao *scoring* funkcije. Funkcije vrednovanja služe za procenu, predviđanje (ali ne i tačno izračunavanje) vezivnog afiniteta liganda za receptor. Pomoću funkcija vrednovanja može se validirati doking procedura (dokingom kokristalnog liganda u poznatom 3D kompleksu ligand-receptor), kao i sprovesti studija virtuelnog skrininga velikih biblioteka jedinjenja¹¹³.

Funkcije vrednovanja se dele u tri kategorije:

- **Funkcije vrednovanja zasnovane na poljima sila** (*Force-field based scoring functions* – primer AMBER¹¹⁴ ili CHARMM¹¹⁵ polja sila) – ove funkcije vrednovanja sabiraju energije interakcija ligand-receptor (van der Waals (VdW) energije, elektrostatičke energije, energije istezanja/savijanja/torzionih promena uglova)¹¹⁶. Najčešće korišćeni softveri u kojima su implementirane ove funkcije vrednovanja su *GOLD*, *DOCK*, *AutoDock*.
- **Empirijske funkcije vrednovanja** (primer – *GlideScore*, *X-SCORE*, *LUDI*) - koriste regresionu analizu, gde se energija vezivanja razlaže na nekoliko komponenti –

vodonične interakcije, jonske veze, hidrofobni efekat i entropija vezivanja. Programi koji koriste empirijske funkcije vrednovanja su *Glide*, *Flex*, *Surflex*, *GOLD* (ChemScore funkcija)¹¹⁷.

- **Funkcije vrednovanja na bazi znanja** (primer - ASP funkcija vrednovanja¹¹⁸) – ove funkcije koriste podatke iz eksperimentalno dobijenih kompleksa ligand-receptor, računajući interatomske distance između liganda i receptora.

Postavljanje metode dokinga za projekat dizajniranja novih liganada ili skrininga velikih baza jedinjenja podrazumeva korišćenje više funkcija vrednovanja i procenu njihovih performansi. Kada se procenjuje da li funkcija vrednovanja ima odgovarajuće i validne performanse, potrebno je dokovati ko-kristalni ligand i izračunati RMSD (*root-mean-square deviation*) vrednost između ko-kristalne poze i dokovane poze. Literaturni podaci sugerišu da RMSD vrednost manja od 2Å karakteriše zadovoljavajuće performanse odabrane funkcije vrednovanja¹¹⁹. Pored vrednosti RMSD, potrebno je pre-testirati kapacitete funkcija vrednovanja da razlikuju farmakološki aktivno jedinjenje od lažno-pozitivnih jedinjenja (eng. *decoys*, ona koja se ne vezuju za receptor)¹²⁰.

S obzirom da će predmet ove doktorske disertacije biti dizajn inhibitora metaloenzima, funkcije vrednovanja koje uračunavaju energiju interakcija metal-ligand su inkorporirane u programu *GOLD*.

Program ***GOLD*** (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) koristi genetski algoritam za uzorkovanje konformacija i pet različitih funkcija vrednovanja. Genetski algoritam je potpuno automatizovan i intuitivan, sa vrlo direktnim protokolom rada tokom postavke doking metode. Principi rada *GOLD* programa se zasnivaju na sledećim karakteristikama¹²¹:

- Korišćenje genetskog algoritma pomoću koga se modifikuju (mutiraju) diedralni uglovi, geometrija heterocikličnih i karbocikličnih prstenova, fleksibilne veze itd.
- Doking pripremljenih liganada u definisanom receptorskom mestu se zasniva na identifikaciji mesta (tačaka) vodoničnog vezivanja i hidrofobnih interakcija na proteinu i ligandima, nakon čega se ove tačke preklapaju.
- *GOLD* koristi različite funkcije vrednovanja, kao što su GoldScore, ChemScore, ASP CHEMPLP i *User Defined Score*.

Za doking metal-helirajućih liganada (npr. hidroksamskih kiselina koje heliraju jon Zn^{2+} u aktivnom mestu histon deacetilaze) mogu se koristiti dve funkcije vrednovanja – ChemScore¹²² i ASP funkcija.

ChemScore funkcija računa slobodnu energiju vezivanja liganda prema sledećoj jednačini:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_o + \Delta G_{\text{hbond}}S_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{metal}}S_{\text{metal}} + \Delta G_{\text{lipo}}S_{\text{lipo}} + \Delta G_{\text{rot}}H_{\text{rot}} \quad (5)$$

gde su S_{hbond} , S_{metal} and S_{lipo} skorovi za vodonično vezivanje, metal-akceptorske i lipofilne interakcije. H_{rot} skor opisuje gubitak konformacione entropije kada se ligand veže za receptor.

1.4.4. Molekulska dinamika

Ukoliko se molekulska doking posmatra kao slikoviti prikaz prepoznavanja liganda i receptora u određenom vremenskom trenutku, molekulska dinamika se može posmatrati kao video zapis istog procesa u precizno definisanom vremenskom intervalu.

Molekulski doking tretira protein kao rigidni makromolekul, što za većinu ciljnih mesta delovanja lekova predstavlja biološki nerelevantan, odnosno aproksimirani sistem ispitivanja interakcija ligand–receptor. U slučaju da je za dizajniranje novih molekula važno razumevanje konformacionih promena receptora tokom vezivanja liganda, u takvim studijama se primenjuje tehnika molekulske dinamike (MD). Molekulska dinamika se u najvećem broju istraživačkih grupa ne koristi kao visoko-propusna tehnika, jer je i vremenski i resursno izuzetno zahtevna metoda.

Dinamičke promene liganda i receptora u odgovarajućem vremenskom okviru zahtevaju korišćenje odgovarajućih polja sila (*force fields*). Vodeći se načelima Heraklitove filozofije, *Panta rei* („sve teče, sve se kreće”), atomi u molekulskoj mehanici se tretiraju kao čestice (definisane mase i naelektrisanja) koje se neprestano kreću pod dejstvom odgovarajućih sila¹²³. Da bi se interakcije između atoma i/ili molekula ispitala tokom odgovarajućih simulacija molekulske dinamike, koriste se polja sila koje definiše molekulska mehanika. Postoji veliki broj razvijenih polja sila koja se primenjuju u studijama molekulske dinamike, kao što su AMBER¹²⁴, CHARMM¹²⁵, GROMOS¹²⁶, OPLS¹²⁷. Cilj ovakvih proračuna je dobijanje potencijalne energije sistema koja sadrži šest različitih vrsta interakcija:

$$U = V_{LJ} + V_{EL} + V_{BS} + V_{AB} + V_{PT} + V_{IT} \quad (6)$$

pri čemu veličina U predstavlja potencijalnu energiju sistema, V_{LJ} predstavlja Lennard–Jones-ov potencijal, V_{EL} definiše elektrostatičku potencijalnu energiju (Coulomb-ove sile), V_{BS} predstavlja energiju istežanja veza između parova atoma povezanih kovalentnim vezama, V_{AB} opisuje energiju savijanja uglova, V_{PT} i V_{IT} predstavljaju torzione energije pravilnih i nepravilnih diedralnih uglova veza posmatranih između četiri atoma.

Prve dve energije predstavljaju nevezivne interakcije, dok poslednje četiri veličine u jednačini (6) predstavljaju energije vezivnih interakcija. Kada se definišu (parametrizuju) interakcije između atoma pomoću prikazane jednačine za računanje potencijalnih energija, izračunavaju se položaj, brzina i ubrzanje atoma, koji služe za rešavanje klasične Njutnove jednačine kretanja.

Izvođenje molekulske dinamike se može sumirati u nekoliko koraka¹²⁸:

- Parametrizacija sistema koji se ispituje (generisanje topologije proteina i liganda, izdvajanje koordinata proteina i liganda). U ovoj fazi se definišu početni položaji atoma, njihove brzine i ubrzanja, koji će biti korišćeni za rešavanje njutnovskih jednačina kretanja.
- Definisane trodimenzionalne jedinične ćelije kao prostora za simulaciju (*simulation box*) u kome se prate dinamičke promene u zadatim vremenskim intervalima. Najčešći oblik simulacionog prostora (kutije) je triklinični sistem (paralelopiped). U ovom koraku se definišu periodični uslovi (*periodic boundary conditions*) pomoću kojih se redukuju efekti „ograničenja” prostora simulacije i izvodi se solvatacija sistema (molekulima vode).
- Faza minimizacije energije koja predstavlja simulaciju kinetičkih i termodinamičkih osobina kompleksa receptor–ligand. Minimizacijom energije se priprema sistem receptor–ligand, tako što se izbegavaju bliski (nedozvoljeni) kontakti dva atoma, sistem se relaksira do lokalnog minimuma energije i umanjuju se sterne smetnje dodatnog rastvarača (vode). Da bi se uspešno reprodukovali eksperimentalni uslovi, pojedinačni parametri kao što su broj čestica (N), pritisak (P), temperatura (T), zapremina (V) i energija (E) mogu se održavati konstantnim, korišćenjem

odgovarajućih statičkih ansambala. Na primer, ukoliko se ukupna energija (E), broj atomskih čestica (N) i zapremina sistema (V) ograniče na konstantne vrednosti, tada se primenjuje mikrokanonični ENV ansambl.

- Faza zagrevanja sistema od 0 K do 300 K u odgovarajućem vremenskom intervalu, povećavajući temperaturu postepeno, u intervalima.
- Faza uravnoteženja (ekvilibracije) predstavlja fazu tokom koje se kinetička energija generisana iz faze zagrevanja uravnotežuje sa potencijalnom energijom. Tokom ove faze se parametri sistema obično uravnotežuju pomoću statističkih ansambala, NVT i NPT.
- Faza simulacije molekulske dinamike, koja se izvodi u tačno definisanim koracima (vremenskim intervalima). Kompjuterski hemičar tokom ove faze definiše vremenski interval (npr. 20 ns) u kome će posmatrati modelovani biološki sistem.
- Analiza interakcija protein–ligand započinje izdvajanjem koordinata nakon MD simulacije. Posle toga se analiziraju pozicije atoma liganda i receptora pomoću parametara RMSD (*Root Mean Square Deviation*), kao i RMSF parametra (*Root Mean Square Fluctuation*), koji daje informacije o fluktuacijama amino kiselina u okviru proteina.

1.5. Epigenetika – od vitalizma do organicizma

Filozofija matematike i fizike je razvijana od antičkih perioda, dok se za filozofiju biologije ne mogu naći istorijski izvori pre prve polovine XIX veka. Pokušaji da se razumeju funkcionalni i razvojni procesi nekog organizma bili su inkorporirani u učenjima **vitalizma, mehanicizma i holicizma (organicizma)**. Sva tri koncepta bila su predmet oprečnih mišljenja značajnih razvojnih i teorijskih biologa XIX i XX veka¹²⁹.

Vitalizam je nudio objašnjenje koje glasi da u živim, složenim organizmima postoji neka živa, vitalna sila (francuska reč – *élan vital*) koja ne može biti objašnjena fizičkim ili hemijskim principima. Zagovornik vitalističke teorije **Henri Bergson** je svoje tvrdnje i visoko posećena predavanja u Njujorku zasnivao na ranim opservacijama nemačkog biologa **Hans-a Driesch-a** i njegovim eksperimentima sa embrionima morskog ježa i žabe. Vitalistički biolozi su smatrali da se jedino živi organizmi, pomoću nevidljivih sila, mogu podeliti i stvoriti novi život, potpuno funkcionalan kao i onaj iz koga su nastali¹³⁰.

Biolozi koji su zagovarali **mehanicizam** su smatrali da je vitalistički koncept pružao neutemeljena objašnjenja, koja kao takva ne mogu doprineti saznanjima razvojne biologije. U vitalističko–mehaničkoj debati zagovornici mehanicizma su tvrdili da se nastanak organizma mora opisati postepeno, korak po korak, objašnjavajući proces u kome manje komponente grade jedan kompleksan sistem (organizam).

Umorni od vitalističko–mehaničke debate, naučnici iz Engleske **Joseph Needham** (biohemičar) i njegova supruga **Dorothy Needham** (biohemičarka), **Joseph Henry Woodger** (teorijski biolog i filozof u oblasti biologije), **John Desmond Bernal** (kristalograf), **Dorothy Wrinch** (matematičarka i teorijska biohemičarka) i **Conrad Hal Waddington** (razvojni biolog i paleontolog) okupljali su se tridesetih godina XX veka i diskutovali o krizi u prirodnim naukama. Njihova okupljanja u okviru Teorijskog biološkog kluba, prvo u kolibi u Epsom Downs, Surrey, pa nakon toga i u iznajmljenoj vetrenjači u Norfolku postavila su kamen temeljac za novi filozofski koncept u biologiji – **organicizam**. Koncept organicizma tog perioda negirao je postojanje nedefinisane vitalne sile koja stvara novi organizam od prethodne generacije. Čak i mehanistički koncept, da jednostavna skupina gena može doprineti razvoju novog fenotipa, bio je snažno osporavan na skupovima biologa „trećeg pravca” (*third way*). Članovi Teorijskog biološkog kluba, organicisti, smatrali su da postoji nešto između, nešto izvan jednostavne relacije genom–fenotip, koja utiče na konstituciju jedinke (organizma)¹³⁰.

Pre nego što će **Conrad Waddington** preuzeti Aristotelovu ideju o epigenezi i preformulisati filozofske misli organicizma u pojam epigenetike, važno je spomenuti doprinos i drugih naučnika u radu Teorijskog biološkog kluba. Posebno se izdvaja izuzetan vizionarski rad matematičarke **Dorothy Wrinch**¹³¹, koja je u preliminarnom radu u časopisu *Nature* opisala interakcije proteina oko nukleinskih kiselina hromozoma. **Wrinch** je postavila preliminarni topološki model pomoću kojeg je objasnila da su hromozomi i proteini upleteni u mrežu koja se širi i skuplja tokom mitoze. Svesna tehnoloških nedostataka tog vremena, **Wrinch** je vrlo smelo iznela tvrdnju (čak 1934. godine!) da proteini nose kompleksnije informacije nego nukleinske kiseline u sastavu hromozoma. Ovaj model se danas značajno razlikuje od centralne dogme molekularne biologije, ali je pomogao teorijskim biologima „trećeg pravca” da imenuju šta je to treće, pored gena i fenotipa, što je važno za razvoj organizma.

Conrad Waddington je oživeo pojam **epigenetike** (**epi**, latinski – iznad, izvan) na osnovu diskusija u okviru Teorijskog biološkog kluba, pri čemu je to primer naučne discipline koja nije proizašla iz laboratorijskih eksperimenata. Uprkos dobrim polaznim hipotezama,

epigenetika tridesetih godina XX veka nije doživela značajan uspon. Teorijski biološki klub postaje interesantiji bezbednosnim službama nego naučnoj javnosti; nakon Drugog svetskog rata se raspada.

Pitanje koje je zadavalo dosta poteškoća embriolozima, evolucionim biolozima XX veka je – **Po kojim šablonima se od jedne somatske ćelije sa jedinstvenim genetičkim materijalom (DNK) mogu razviti različiti (feno)tipovi ćelija?**

Nakon **Waddington**-ove postulatije epigenetike, dve struje biologa davale su svoja objašnjenja razvojnim fenomenima ćelija. Jedni su tvrdili da svaka ćelija sadrži preformirane elemente koji se uvećavaju tokom deobe i razvoja ćelija, dok su drugi (pa i sam **Waddington**) smatrali da postoje određene hemijske reakcije koje se dešavaju zahvaljujući postojanju rastvorljivih komponenata koje sprovode tačno definisan razvojni plan u svakoj ćeliji¹³².

Nakon revolucionarnog otkrića centralne dogme molekularne biologije¹³³, klupko oko epigenetičkih mehanizama nasleđivanja počelo je da se odmotava. Epigenetika je doživela uspon krajem XX veka i definisana je kao studija naslednih promena fenotipa koje se ne mogu objasniti promenama u sekvenci DNK molekula¹³⁴.

1.5.1. Epigenetika u otkriću antikancerskih lekova

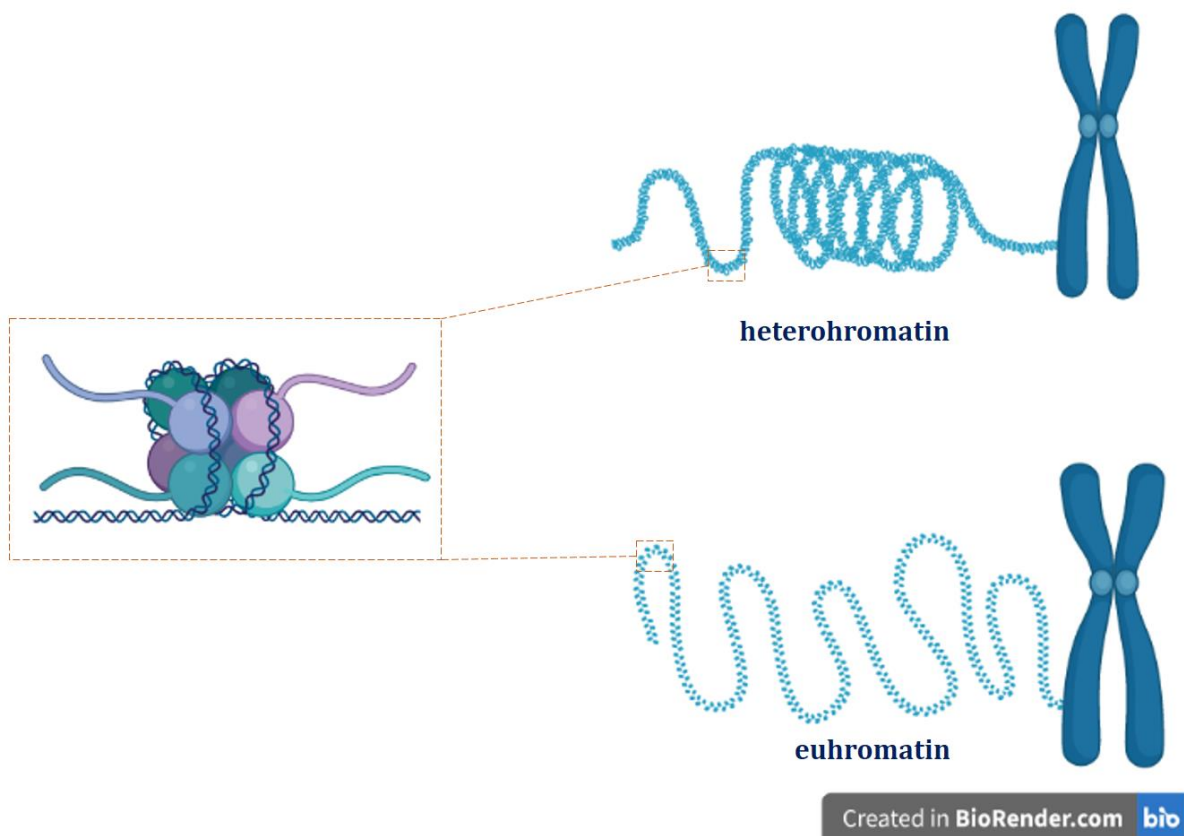
Kontrola ekspresije gena je pod uticajem transkripcionih faktora¹³⁵, kovalentnih modifikacija DNK molekula i post-translacionih modifikacija hromatina¹³⁶. Transkripciona kontrola gena podrazumeva regulaciju genske ekspresije i/ili represije delovanjem mnoštva transkripcionih faktora. Interakcije DNK–transkripcioni faktori su visoko specifične u ćelijama eukariota. Transkripcioni faktori u sastavu multiproteinskih kompleksa mogu da se vežu za RNK polimeraze i moduliraju njihovu funkciju. Postoje dokazi i o njihovom vezivanju za hromatin, kao i uticajima na remodelovanje nukleotida¹³⁷.

Posebna pažnja u regulaciji genske ekspresije u ovoj doktorskoj disertaciji biće posvećena post-translacionoj kontroli dinamike hromatina. Hromatin, kao idealno arhitektonsko rešenje eukariotske ćelije kojom se genetski materijal dužine dva metra smešta u jedro, predstavlja kompleksnu organizaciju nukleinskih kiselina i proteina (histona). Da bi se smestio u ćeliju, hromatin pomoću malih histonskih proteina pakuje DNK u klupka (globule) koji mu daju kondenzovanu formu. Ovakvom strukturnom organizacijom nastaje jedinstveni skelet – nukleozom, koji se sastoji od četiri para histonskih proteina ili oktamera histona (H2A, H2B, H3 i H4).

U okviru nukleozoma, 146 baznih parova DNK je obmotano oko oktamera baznih histona (pozitivno naelektrisanih, bogatih amino–kiselinama argininom i lizinom). Usko pakovanje histona i nukleinskih kiselina je posledica građenja jonskih veza između histona i DNK molekula, čime se objašnjava kompaktnost hromatina. Nukleozomi se dalje organizuju u različite trodimenzionalne strukture: perle, solenoide i ostale strukture, sve do hromozoma.

Sa stanovišta strukturnih i biohemijskih karakteristika, hromatin se može identifikovati u jedru kao (**Slika 7**):

- heterohromatin – kondenzovani, transkripciono neaktivan oblik hromatina;
- euhromatin – relaksirani, transkripciono aktivan oblik hromatina.



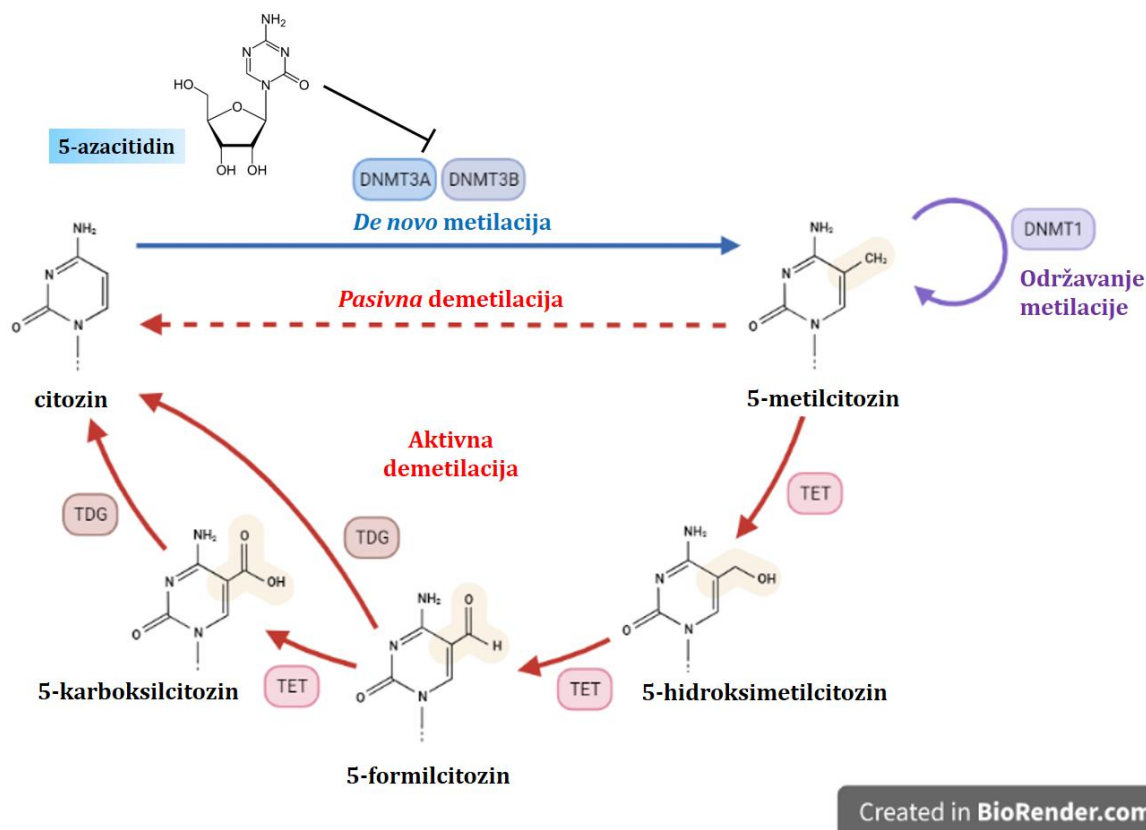
Slika 7. Šematski prikaz nukleozoma (levo) i kondenzovanog (heterohromatina) i relaksiranog (euhromatina) oblika hromatina (desno)

Heterohromatin je zbog gustog pakovanja nukleozoma teže dostupan transkripcionoj mašineriji, pa se zbog toga smatra transkripciono neaktivnim oblikom hromatina. Za razliku od njega, euhromatin predstavlja relaksiranu (otvorenu) formu hromatina, u kojoj su određene grupe gena dostupne za transkripcione faktore. Dinamička ravnoteža između heterohromatina i euhromatina regulisana je enzimskim transformacijama, kako DNK molekula, tako i histona. Kovalentne modifikacije DNK molekula i posttranslacione modifikacije histonskih proteina utiču na dinamičku ravnotežu između hetero i euhromatina i predstavljaju srž epigenetske kontrole genske ekspresije.

Enzimski katalizovana metilacija citozina u sastavu DNK molekula, posredstvom enzima DNK metiltransferaza, predstavlja najranije otkriveni mehanizam regulacije genske ekspresije¹³⁸. Metilacija citozina se dovodi u vezu sa represijom gena u nekodirajućim regionima genoma. Međutim, metilacija CpG ostrvaca u transkripciono aktivnim genima (njihovim promoterskim regionima) nije uobičajena¹³⁹. Enzimi DNK metiltransferaze (DNMT) koriste kao kofaktor S-adenozil-L-metionin, koji donira metil grupu u položaju 5 citozina (**Slika 8**), u okviru CpG dinukleotida, pri čemu **ne dolazi** do ometanja sparivanja baza DNK. Ukoliko DNK metiltransferaze aberantno metiluju CpG ostrvca u sastavu promotorskih regiona tumor-supresorskih gena, nastala DNK hipermetilacija dovodi do represije tumor-supresorskih gena. Konačno, dokaz o povezanosti maligne transformacije ćelija retine i hipermetilacije CpG ostrvaca pokazana je u pionirskom radu Greger i saradnika, 1989. godine.¹⁴⁰

Do danas je opisano pet različitih DNK metiltransferaza (citozin metilaza): DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B i DNMT3L. *De novo* metilacija citozina odvija se posredstvom izoformi DNMT3A i DNMT3B, dok izoforma DNMT1 održava *in vivo* nivo metilacije citozina u genomu. Nakon svakog ciklusa replikacije stvara se dvolančana DNK kod koje je samo roditeljski lanac

metilovan, a DNMT1 izoforma generiše simetrično metilovane lance DNK.¹⁴¹. Uklanjanje metil grupa sa 5-metilcitozina je posredovano TET enzimima (eng. *Ten-Eleven-Translocation*) ili DNK demetilazama, koje nizom oksidativnih reakcija i nakon reparacije nukleinskih baza ponovo uvode citozin u strukturu DNK (**Slika 8**)¹⁴². Izoforme DNMT2 i DNMT3L nemaju katalitičku metiltransferaznu aktivnost.



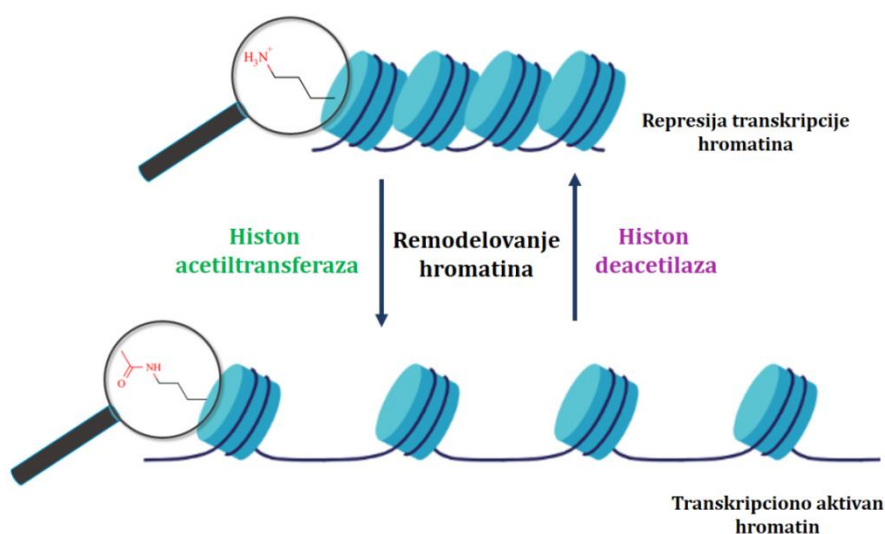
Slika 8. Šematski prikaz *in vivo* sinteze 5-metil citozina posredstvom DNK metiltransferaza (plavi deo šeme) i prikaz demetilacije 5-metilcitozina pomoću TET enzima (DNK demetilaza, crveni deo šeme); 5-azacitidin je prikazan u gornjem levom uglu i predstavlja inhibitor DNK metiltransferaza; TDG - timin DNK glikozilaza

Nivo metiloma u humanom genomu regulisan je antagonističkim aktivnostima DNK metiltransferaza i DNK demetilaza. Poremećaj ravnoteže metilacije u humanom genomu je povezan sa nastankom brojnih malignih oboljenja, kao što su hematološki tumori – mijelodisplastični sindrom (MDS) i akutna mijeloidna leukemija (AML)¹⁴³. Jedan od prvih epigenetičkih modulatora, hipometilirajući agens, koji se koristi u terapiji spomenutih hematoloških kancera, jeste nukleozidni antimetabolit, 5-azacitidin (strukturna formula data na **Slici 8**). Ovaj lek ima više antikancerskih mehanizama delovanja, stoga se njegovo antineoplastično delovanje može objasniti dejstvom na inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina i proteina (citotoksično delovanje i delovanje antimetabolita)¹⁴⁴. Drugi mehanizam delovanja je inhibicija epigenetičkog ciljnog mesta delovanja: DNK metiltransferaze. 5-azacitidin u nižim dozama deluje kao epigenetički inhibitor¹⁴⁵.

Posttranslacione modifikacije histona prvi put se spominju šezdesetih godina prošlog veka u radovima Vincent-a Allfrey-a¹⁴⁶. Bazni amino-kiselinski ostaci histona (lizin, arginin) mogu biti kovalentno modifikovane metabolitima male molekulske mase, kao što su grupe: acetil, benzoil, formil, krotonil, metil, sukcinil, kao i brojne druge. Postoje dokazi i o kovalentnom vezivanju molekula velike molekulske mase za histone, kao što su ubikvitin, SUMO-protein

(ubikvitinu sličan proteinski modifikator). Uzimajući u obzir da su pomenute hemijske modifikacije identifikovane na histonima, bez direktne promene u hemijskoj strukturi DNK, ovakve modifikacije se danas u literaturi navode kao epigenetički markeri^{147,148}. Promene u ćelijskom metabolizmu, kao jednom od esencijalnih obeležja maligne alteracije ćelija¹⁴⁹, dovele su u tesnu vezu dinamiku i organizaciju hromatina sa kancerskom epigenetikom.

Lizinski ostaci u sekvenci histona mogu biti acetilovane/deacetilovane na različitim histonima (najčešće na histonima H3 i H4) uz pomoć precizno regulisane aktivnosti enzima iz klasa histon acetiltransferaza – HAT (EC 2.3.1.48) i histon deacetilaza – HDAC (EC 3.5.1.98). Histon acetiltransferaze acetiluju ϵ -terminalnu amino grupu specifičnih lizina na histonima, dok histon deacetilaze hidrolizuju acetil-lizin ostatke sa histonskih N-terminalnih krajeva (**Slika 9**)¹⁵⁰. Nivo acetilacije histona (histonski acetilom) regulisan je ravnotežnom aktivnosti ove dve klase enzima i sveukupno utiče na remodelovanje hromatina i aktivaciju ili represiju transkripcije gena¹⁵¹.



Slika 9. Pojednostavljeni prikaz modifikacije lizinskih bočnih ostataka na histonima pomoću enzima histon acetiltransferaza (HAT) i histon deacetilaza (HDAC)

Povezanost stepena acetilacije histona i ekspresije odgovarajućih gena dokazana je u brojnim studijama¹⁵¹⁻¹⁵³. Histon deacetilaze, nakon hidrolize acetil grupe sa lizinskih ostataka histona, povećavaju gustinu pozitivnog naelektrisanja na histonima, čime je olakšana elektrostatička interakcija sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama u strukturi DNK. Ovakva interakcija dovodi do kondenzacije hromatina i posledično do transkripcione represije određenih gena. Kada histon acetiltransferaze (HAT) acetiluju specifične lizinske ostatke na histonima, repulzija između DNK i smanjene gustine pozitivno naelektrisanih ostataka histona (usled građenja amida na ϵ -terminalnim amino grupama lizinskih ostataka) dovodi do dekonkondenzacije hromatina. Acetilovani lizini na histonima su epigenetički markeri koji mogu biti „očitan“ pomoću proteina čitača (eng. *readers*), kakvi su bromodomeni, određeni transkripcioni faktori i tako inicirati proces transkripcije odgovarajućih gena^{154,155}.

Histon deacetilaze (HDAC) mogu biti regulatori i u onkogenim i u onkosupresivnim mehanizmima regulacije ćelijskog ciklusa. Jedan od prvih modela u kome je objašnjen uticaj histon deacetilaza u nastanku hematoloških maligniteta jeste studija koja je proučavala etiopatogenezu akutne promijelocitne leukemije¹⁵⁶. Pokazano je da oligomerizacijom histon deacetilaza i receptora za retionoinsku kiselinu (RAR) nastaju različiti fuzioni proteini koji

dovode do represije transkripcije gena koji regulišu diferencijaciju promijelocita do terminalnih mijelocitnih ćelija¹⁵⁷.

Enzimi iz familije histon deacetilaza podjeljeni su u četiri klase prema homologiji sekvence sa prvobitno otkrivenim gljivičnim (*Saccharomyces cerevisiae*) histon deacetilazama. Klase I, II i IV su cink-zavisne hidrolaze, dok su histon deacetilaze iz klase III enzimi za čiju aktivnost je neophodno prisustvo kofaktora NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid)¹⁵⁸. U jedru je najveća gustina histon deacetilaza iz I klase (HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8) i klase IV (HDAC11), dok enzimi iz klase IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9) i klase IIb (HDAC6 i HDAC10) mogu imati i nuklearnu i citoplazmatsku lokalizaciju u ćeliji. Katalitički domen cink-zavisnih histon deacetilaza poseduje veliki stepen konzerviranosti u primarnoj sekvenci u okviru ove tri klase HDAC-ova, dok je primećena značajna varijabilnost u sekvenci, volumenu i polarnosti na spoljašnjem obodu vezivnog mesta¹⁵⁹.

U kontekstu onkogeneze, geni za nuklearne izoforme HDAC-ova (HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8) najčešće nisu mutirani, već je primećena aberantna ekspresija histon deacetilaza u solidnim kancerskim ćelijama¹⁶⁰. Ne postoje jednostavni obrasci po kojima se mogu definisati aberantni nivoi acetiloma u solidnim tumorima jer je najčešće reč o izmenama drugih posttranslacionih modifikacija pored acetilovanja, kao što su metilacije lizina, arginina, pa i citozina, što otežava formiranje konsenzusa i identifikaciju jasnih epigenetičkih biomarkera malignog oboljenja. Jasno je da se poređenjem dva različita solidna maligniteta ne mogu naći slični epigenetički mehanizmi koji dovode do onkogeneze.

Dok su još uvek modeli prema kojima histon deacetilaze iniciraju malignu transformaciju ćelije predmet naučnih debata, za većinu molekulskih obeležja kancera danas se zna da su regulisani epigenetičkim modifikacijama¹⁶¹. Mehanizmi putem kojih HDAC promovišu onkogenu transformaciju ćelija, kao i njihovu progresiju ka metastatskom fenotipu dati su u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Odabrani mehanizmi promocije onkogeneze i progresije malignih ćelija ka metastatskom fenotipu

Obeležja maligne bolesti	HDAC posredovani mehanizmi	
Fenomeni u onkogenezi	Apoptoza i autofagija	- <i>c-Myc</i> posredovano povećanje ekspresije HDAC2 izoforme sprečava apoptozu ćelija kancera kolona ¹⁶² . - Povećana ekspresija HDAC1 u glioma ćelijama korelira sa mehanizmima rezistencije na apoptozu ¹⁶³ .
	Ćelijski ciklus i proliferacija	- Nuklearne HDAC izoforme (HDAC1/2/3/8) stimulišu proliferaciju kancerskih ćelija u okviru multiproteinskih transkriptorskih kompleksa ¹⁶⁴ . - HDAC4 suprimira ekspresiju p21 ^{WAF1/Cip1} proteina, deluje antiproliferativno u ćelijama kancera ovarijuma i glioblastoma ¹⁶⁵ .
	Diferencijacija	- Povećana ekspresija HDAC1/2/3 u karcinomu pankreasa povezana sa dediferencijacijom ¹⁶⁶ .
Fenomeni u progresiji tumora	Migracija i invazija	- Povećana HDAC1 ekspresija dovodi do invazije ćelija hepatocelularnog kancera u portalnu venu ¹⁶⁷ . - Prekomerna ekspresija HDAC6 izoforme dovodi do povećane migrabilnosti i invazivnosti ćelija kancera dojke ¹⁶⁸ .
	Angiogeneza	- HDAC7 utiče na morfologiju, migraciju i sposobnost endotelnih ćelija da formiraju cevaste strukture ¹⁶⁹ .

Prikazani mehanizmi u **Tabeli 7** samo su mali deo do sada objavljenih rezultata i odnose se na povećanu aktivnost HDAC u različitim tumorskim ćelijama. Važno je napomenuti da HDAC enzimi mogu da deacetiluju brojne druge, nehistsonske proteine u ćelijama, što će biti predmet diskusije u narednim poglavljima.

Iz svega navedenog, zaključuje se da histon deacetilaze predstavljaju važna epigenetička ciljna mesta za delovanja koja:

- mogu biti inhibirana malim organskim molekulima i/ili peptidnim molekulima koji interferiraju sa procesima inicijacije onkogeneze i procesima progresije tumora ka metastatskom fenotipu i
- pokazuju izvestan stepen specifičnosti u određenim tipovima tumora, što može biti osnov za razvoj tkivno-specifičnih hemioterapeutika.

Do danas je registrovano pet inhibitora histon deacetilaza i potvrđena je njihova klinička efikasnost u terapiji hematoloških kancera. Prvi registrovani epigenetički modulatori u terapiji refraktarnog kutanog T-ćelijskog limfoma, perifernog T-ćelijskog limfoma i multiplog mijeloma su *romidepsin* (Istodax™), *vorinostat* (Zolinza™), *belinostat* (Beleodaq™), *panobinostat* (Farydak™) i *tucidinostat* (Epidaza™)¹⁷⁰. Svi pomenuti inhibitori su neselektivni, deluju na više HDAC izoformi i u literaturi se označavaju i kao pan-HDAC inhibitori. Iako je broj potencijalnih antikancerskih indikacija za primenu inhibitora histon deacetilaza znatno veći u prekliničkim studijama, klinička primena ovih lekova je za sada ograničena na farmakoterapiju hematoloških maligniteta¹⁷¹. Monoterapija solidnih tumora inhibitorima histon deacetilaza za sada ostaje nejasna i klinički nerelevantna, i to zbog kompenzatorne aktivacije antiapoptotskih signalnih puteva u kancerskih ćelijama solidnih tumora^{171,172}.

1.5.2. Histon deacetilaze – otkriće, fiziološka uloga i strukturna biologija

Prva otkrivena humana histon deacetilaza bila je HDAC1 izoforma¹⁷³. Otkriće je usledilo nakon razvoja matriksa koji je bio obložen trapoksinom, prirodnim proizvodom tetraciklične peptidne strukture. Primećeno je da trapoksin dovodi do akumulacije acetilovanog histona H3, isto kao i tada poznati fungalni antibiotik – trihostatin A (TSA), reverzibilni inhibitor histon deacetilaze kod sisara¹⁷⁴. Za razliku od trihostatina A, trapoksin je ireverzibilnom inhibicijom HDAC dovodio do hiperacetilacije histona H3 zbog prisustva epoksida u hemijskoj strukturi¹⁷⁵.

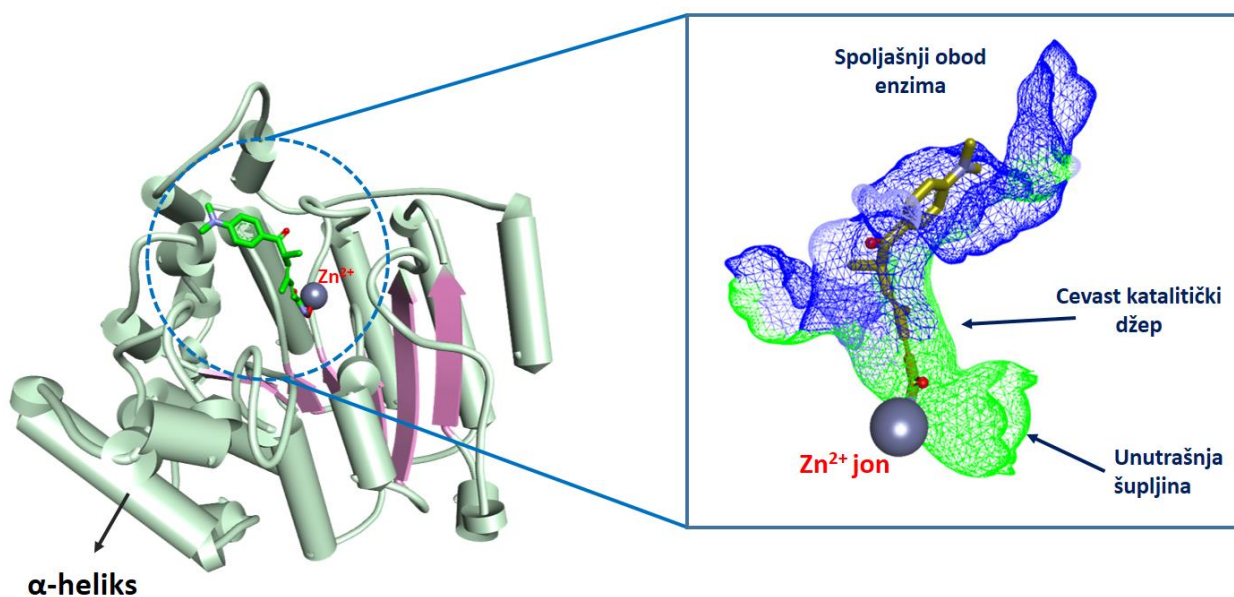
Zajedno sa HDAC1 izoformom, otkriveno je i da su izoforme HDAC2¹⁷⁶, HDAC3¹⁷⁷ i HDAC8¹⁷⁸ ortolozi gljivičnoj RPD3 (*Reduced Potassium Dependency-3*) izoformi. Pomenute četiri humane izoforme su ujedno danas i predstavnici HDAC klase I, nuklearnih izoformi koje predstavljaju klasične epigenetičke regulatore genske ekspresije. HDAC enzimi klase I nalaze se u jedru u sastavu multiproteinskih kompleksa koji se vezuju za hromatin i dovode do represije genske ekspresije. Danas se zna da postoje barem četiri različite vrste kompleksa u čijem sastavu se mogu naći HDAC izoforme I klase. To su^{179,180}:

- korepresorski kompleks SIN3;
- SMRT/NcoR represivni kompleks;
- kompleks koji remodeluje nukleozome sa deacetilaznom aktivnosti (NuRD) i
- CoREST kompleks.

Histon deacetilaze klase I u sastavu ovih kompleksa utiču na regulaciju ćelijskog ciklusa, proliferaciju i diferencijaciju zdravih ćelija¹⁸¹. Aberantna ekspresija pomenutih izoformi, dovedena je u vezu sa nastankom hematoloških kancera¹⁸², zbog čega se ulažu ogromni napori u farmakološke manipulacije klase I HDAC.

Prva kristalna struktura histon deacetilaze je objavljena još 1999. godine. To je bila struktura bakterijskog HDAC homologa (HDLP, odnosno Histone Deacetylase Like-Protein) u kompleksu sa trihostatinom A.¹⁸³ Razrešavanjem kristalne strukture HDLP enzima olakšano je kasnije određivanje kristalografskih struktura svih humanih HDAC izoformi. Iz kristalne strukture HDLP (**Slika 10**) saznalo se da:

- histon deacetilaze su građene od 16 α -heliksa i 8 paralelnih β -ploča (otvorena konformacija);
- petlje koje potiču od C-terminusa β -ploča formiraju produžetak strukture enzima izvan α -heliksa i β -ploča (označeno plavim krugom na **Slici 10**);
- označene petlje L1-L7 formiraju duboki i uski katalitički džep cevastog oblika;
- pri dnu katalitičkog džepa, nalazi se susedna unutrašnja šupljina (tada nepoznate uloge).



Slika 10. Prikaz trodimenzionalne kristalne strukture bakterijske histon deacetilaze, HDLP u kompleksu sa trihostatinom A (levo), α -heliksi su obojeni ljubičasto, jon Zn^{2+} je prikazan sferom sive boje; Trodimenzionalni prikaz interakcije TSA sa katalitičkim džepom HDLP prikazan je desno.

Strukturna organizacija petlji koje formiraju katalitički džep, ali i spoljašnji obod katalitičkog mesta, glavne su determinante po kojima se međusobno razlikuju HDAC izoforme klase I. Varijabilna dužina petlji L1-L7, kao i njihova fleksibilnost utiču na specifičnost interakcija sa proteinima čiji lizini se deacetiluju. Poznavanje strukturne biologije HDAC izoformi, kao i fleksibilnosti petlji koje formiraju katalitički džep, jeste važan korak ka dizajniranju selektivnih inhibitora za odgovarajuću izoformu¹⁸⁴.

Do danas su razrešene kristalne strukture svih HDAC izoformi u okviru klase I, čime je omogućeno *in silico* dizajniranje novih inhibitora na osnovu trodimenzionalne strukture enzima (*structure-based drug design*, SBDD). Pregled kristalografskih kristalnih struktura HDAC klase I predstavljen je u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Pregled dostupnih kristalnih struktura histon deacetilaza klase I

Izoforma HDAC klase I	PDB kod	Kokristalni inhibitor
HDAC1	5ICN	H4K16Hx (peptidni fragment histona H4)
HDAC2	7KBG	Jedinjenje 20 (2-supstituisani benzamidni inhibitor)
HDAC3	4A69	Nema, acetatni jon koordiniran za katalitički Zn ²⁺
HDAC8	1T64	Trihostatin A

Postoji veliki procenat homologije u amino-kiselinskim sekvencama u okviru HDAC izoformi klase I. Poravnavanjem primarnih sekvenci HDAC klase I i bakterijske izoforme HDLP u platformi ClustalW¹⁸⁵ uočava se da HDAC1 i HDAC2 izoforma sadrže više od 84% sličnosti u primarnoj sekvenci (**Slika 11**).

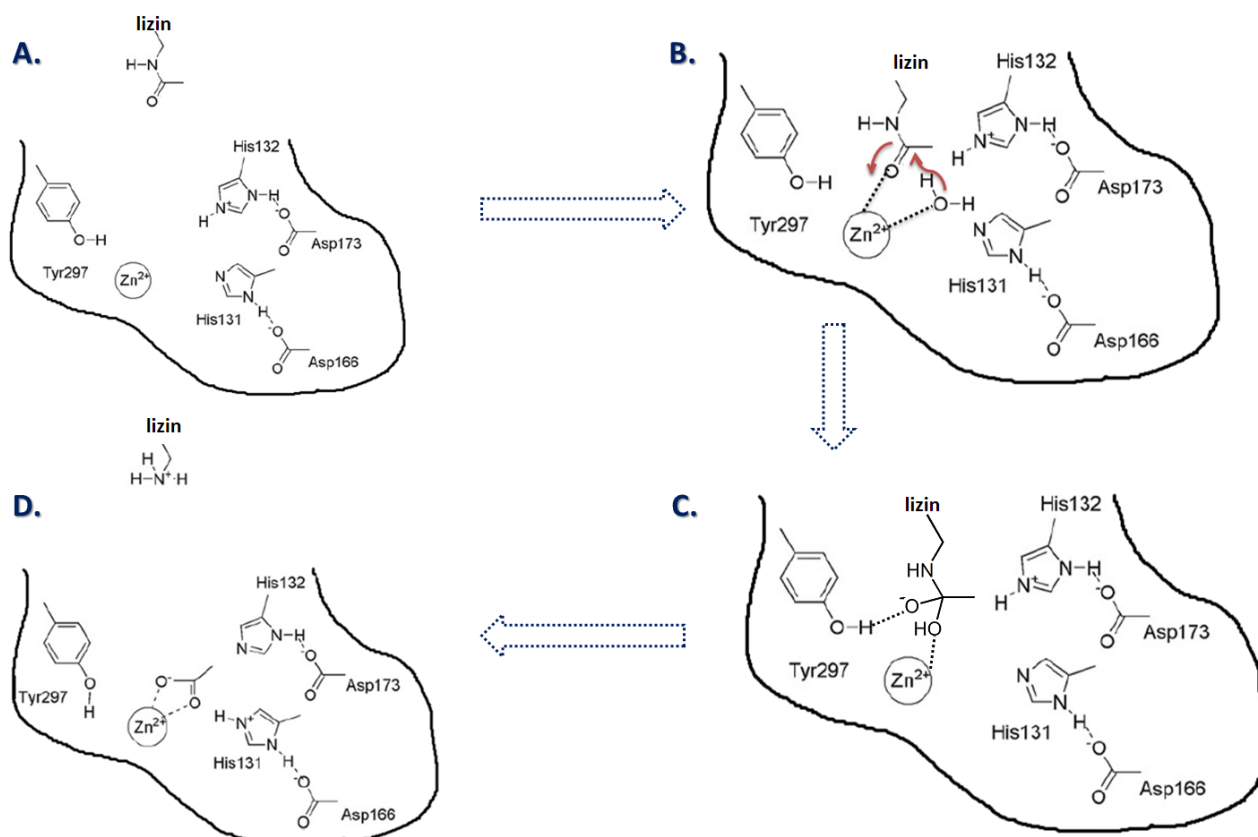


Rezultati ClustalW poravnanja sekvenci:

```
Sequences (1:2) Aligned. Score: 84.2324
Sequences (1:3) Aligned. Score: 56.0748
Sequences (1:4) Aligned. Score: 37.6658
Sequences (1:5) Aligned. Score: 16.2602
Sequences (2:3) Aligned. Score: 55.8411
Sequences (2:4) Aligned. Score: 37.931
Sequences (2:5) Aligned. Score: 16.2602
Sequences (3:4) Aligned. Score: 37.931
Sequences (3:5) Aligned. Score: 18.1572
Sequences (4:5) Aligned. Score: 16.8022
```

Slika 11. Pojednostavljeni prikaz histon deacetilaza I klase i bakterijske HDLP izoforme prema broju amino-kiselina u primarnoj sekvenci. Poravnavanjem primarnih sekvenci pomoću platforme ClustalW, u donjem delu slike je prikazan procenat sličnosti u primarnoj sekvenci (Sequence 1 – HDAC1 izoforma; Sequence 2 – HDAC2 izoforma; Sequence 3 – HDAC3 izoforma; Sequence 4 – HDAC8 izoforma; Sequence 5 – HDLP izoforma)

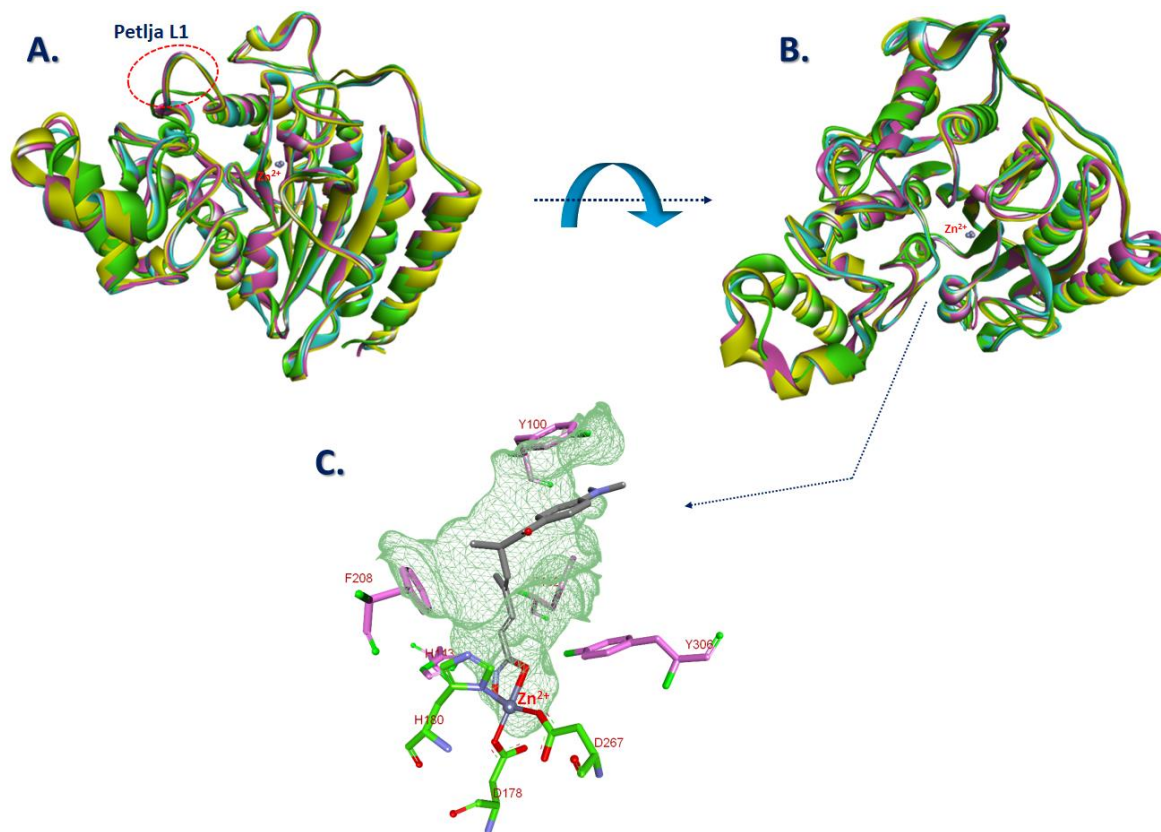
Za projekte dizajniranja lekova, važno je poznavanje katalitičkog (deacetilaznog) domena humanih histon deacetilaza. Hidroliza acetil grupe sa acetil-lizinskih bočnih ostataka odvija se u visoko konzerviranom katalitičkom domenu¹⁸⁶. Katalitički jon Zn^{2+} je u strukturi HDAC-ova koordiniran pomoću bočnih ostataka asparaginske kiseline i histidina. Da bi amid bio hidrolizovan, neophodno je prisustvo katalitičkog molekula vode (**Slika 12 B**). Molekul vode helira jon Zn^{2+} i tako polarizovan nukleofilno napada karbonilni ugljenik amidske veze acetil-lizina. Prelazni aciloksianjon (**Slika 12 C**) dodatno je stabilizovan vodoničnom interakcijom sa OH grupom okolnog tirozina (Tyr297), čime se olakšava hidroliza amida do acetata i primarnog amina lizina¹⁸³.



Slika 12. Pojednostavljen mehanizam hidrolize acetil-lizinskih bočnih ostataka posredovan histon deacetilazama: **A.** Acetil-lizinski ostatak histona/proteina biva dopremljen u blizinu katalitičkog džepa HDAC enzima. **B.** Polarizovan molekul vode nukleofilno napada karbonilni ugljenik amidske veze, **C.** Formiranje prelaznog aciloksianjona, koji je dodatno stabilizovan vodoničnom vezom sa Tyr297, korak u kome dolazi do hidrolize. **D.** Acetat prolazno koordinira za Zn^{2+} jon, dok protonovani lizin napušta katalitički džep. Bočni ostaci histidina i asparaginske kiseline koji koordiniraju Zn^{2+} jon su izostavljeni zbog jasnijeg prikaza.

Građa katalitičkog (deacetilaznog) domena HDAC izoformi u okviru klase I je visoko konzervirana. Poravnavanjem kristalografskih struktura histon deacetilaza primećuje se veoma slična arhitektura deacetilaznog domena. Katalitički Zn^{2+} se nalazi pri dnu džepa, dok se spoljašnji obod sastoji od sličnih, hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (fenilalanin, histidin, glicin, metionin i tirozin) koji stabilizuju kompleks HDAC-supstrat. Prisustvo bočnih hidrofobnih ostataka amino-kiselina koji potiču od petlje katalitičkog džepa doprinosi formiranju tubularne strukture deacetilaznog domena. Fenilalanini hidrofobnim, π - π interakcijama stabilizuju alkil niz acetil-lizina i tako dopremaju acetilamidski fragment do

jona metala koji katalizuje hidrolizu. Spoljašnji obod HDAC8 izoforme je znatno drugačiji u odnosu na strukturu HDAC1, HDAC2 i HDAC3 izoformi¹⁸⁷. Petlja L1 (od Ser30 do Lys36) je fleksibilnija u odnosu na L1 petlje koje su prisutne u strukturama ostalih HDAC I klase. Veća fleksibilnost petlje L1 doprinosi različitoj supstratnoj specifičnosti izoforme HDAC8, čime se objašnjava razlika u afinitetu endogenih supstrata HDAC8, kao i različita struktura selektivnih inhibitora HDAC8 izoforme (**Slika 13**).



Slika 13. **A.** Šematski prikaz poravnanih trodimenzionalnih struktura histon deacetilaza I klase (HDAC1 – plavo, HDAC2 – ljubičasto, HDAC3 – žuto i HDAC8 – zeleno). **B.** Prikaz poravnanih histon deacetilaza I klase od površine katalitičkog džepa ka unutrašnjosti (pogled odozgo). **C.** Trodimenzionalni prikaz katalitičkog džepa (mreža) HDAC8 izoforme u kompleksu sa trihostatinom A (PDB:1T64). Amino-kiselinski ostaci koji koordiniraju jon Zn^{2+} su obojeni zelenom, dok su ostaci amino-kiselina koje definišu volumen džepa obojeni ljubičastom bojom.

Izoforme u okviru klase II su podeljene na subklase IIa i IIb. Značajna strukturna razlika izoformi klase IIa je mutacija katalitičkog tirozina do histidina. Kao posledica ove mutacije, histidin ne stabilizuje prelazni aciloksianjon, čime se objašnjava i do 1000 puta manja efikasnost deacetilacije acetil-lizinskih ostataka u odnosu na klasu I HDAC-ova¹⁸⁸. Supstrati za humane HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9 su laki lanci miozina (MyHC), gama koaktivator 1 alfa receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PGC-1 α), heat shock-u srodan protein 71 kDa (Hsc70)¹⁸⁹.

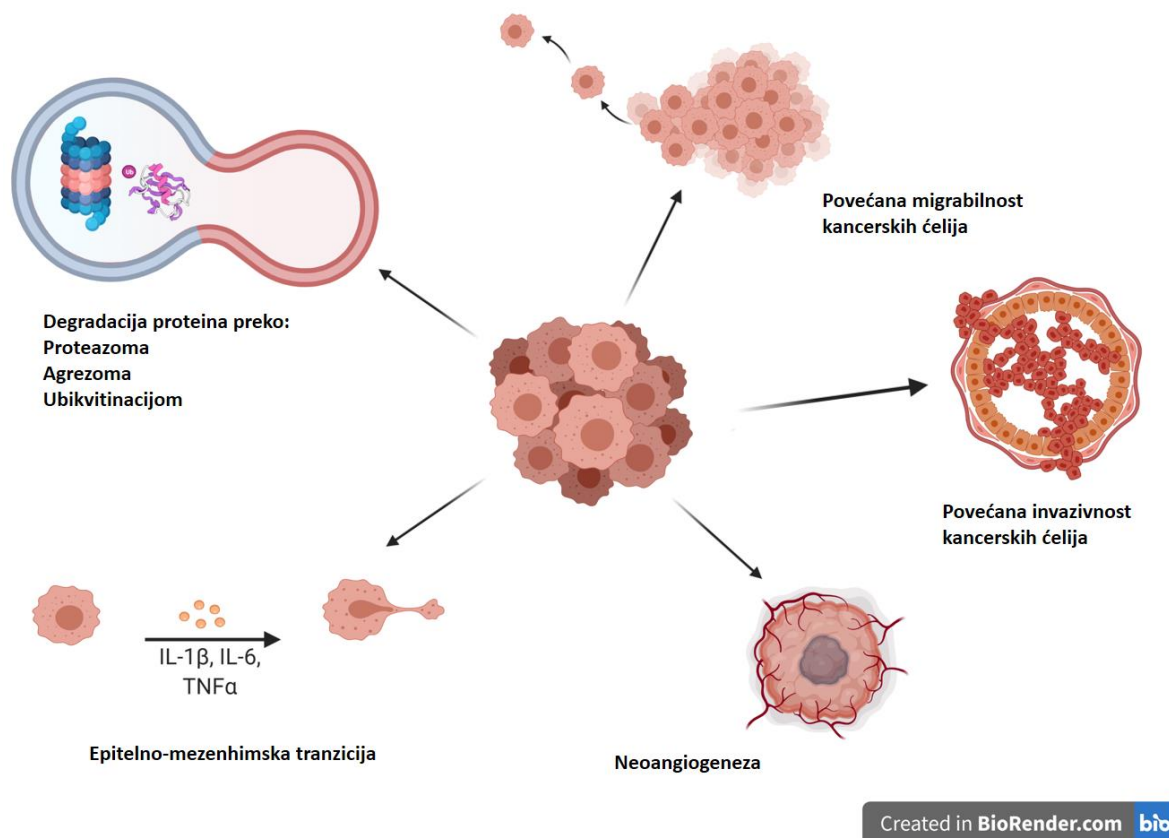
Klasa IV u okviru familije HDAC-ova se sastoji iz jednog predstavnika – histon deacetilaze 11 (HDAC11)¹⁹⁰. Poređenjem broja amino-kiselina sa ostalim predstavnicima HDAC familije, HDAC11 je najmanja izoforma koju čini 347 amino-kiselina¹⁹¹. Interesantna činjenica je da HDAC11 izoforma (kao i HDAC8), pored deacetilazne, poseduje i deacilaznu (demiristoil) aktivnost¹⁹².

1.5.3. Histon deacetilaza 6 – struktura i biološke uloge

Poznato je da histon deacetilaze mogu da hidrolizuju acetil-lizinske ostatke i na nehistskim supstratima (p53, YY1, HMG proteini, STAT3, NF- κ B, α -tubulin, kortaktin, Hsp90, peroksiredoksin i mnogi drugi)^{193,194}.

U drugoj polovini XX veka dokazane su brojne uloge histon deacetilaza u izmeni dinamike hromatina, reverzibilnim deacetilovanjem histona. Otkriće da histon deacetilaze mogu da napuste jedro i deacetiluju proteine citoplazme povećalo je interesovanja biologa za negenomičke uloge HDAC izoformi. Hubbert i saradnici¹⁹⁵ su 2002. godine objavili studiju u kojoj su dokazali da histon deacetilaza 6 ima tubulin-deacetilaznu aktivnost (navodi se u radovima skraćeno i kao TDAC – *tubulin deacetylase*). Pomenuta studija je zasnovana na pretpostavci da diverzitet amino-kiselinske sekvence svih 11 HDAC izoformi izvan konzervirane sekvence katalitičkog domena doprinosi raznolikosti HDAC–protein interakcija, te samim tim i njihovim različitim biološkim ulogama. U trenutku objavljivanja studije Hubbert-a i saradnika bilo je poznato da je HDAC6 izoforma dominantno lokalizovana u citoplazmi¹⁹⁶. Jedno od ključnih pitanja koje se nametnulo istraživačima jeste povezanost između vanjedarne lokalizacije HDAC6 i acetilacije α -tubulina. Testovima imunobojenja je dokazano da je HDAC6 lokalizovana oko jedra (perinuklearno), kao i na obodima ćelijske membrane (sa partnerskim proteinom p150^{glued} i mikrotubulama) gde se formiraju protruzivni membranski elementi¹⁹⁷. Kolokalizacija HDAC6 izoforme sa dineinskim motornim kompleksom koji sadrži polipeptid p150^{glued} ukazala je na drugi biološki ishod deacetilacija posredovanih HDAC6 izoformom – degradaciju loše savijenih (*fold*-ovanih) proteina.

Danas se uloge HDAC6 izoforme manje povezuju sa onkogenom transformacijom ćelije. Miševi kod kojih je izvršen *knock-out* HDAC6 izoforme preživljavaju, normalno se razvijaju i imaju hiperacetilovane nivoe tubulina u ćelijama¹⁹⁸. Usled citoplazmatske lokalizacije ove izoforme, HDAC6 hidrolizuje acetil-lizinske ostatke i drugih rastvorljivih proteina u citoplazmi, kao što su peroksiredoksin¹⁹⁹, heat shock protein 90 (Hsp90) i kortaktin²⁰⁰. Novija istraživanja su dokazala da HDAC6 ima važnu ulogu u regulaciji dinamike mikrotubula, kao i u remodelovanju ostalih filamenata citoskeleta (aktin, miozin)²⁰¹. U kontekstu deacetilovanja α -tubulina, poznato je da HDAC6 posreduje u nizu događaja u kojima ćelije epitelne morfologije dobijaju svojstva mezenhimalnih ćelija. Fenomen epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) je jedan od događaja koji omogućava migraciju kancerskih ćelija sa mesta primarnog tumora ka drugim organima. HDAC6 izoforma utiče na ekspresiju markera EMT aktivacijom TGF- β 1/Smad3 signalnog puta²⁰². Takođe, histon deacetilaza 6 je bitan regulator procesa degradacije proteina putem agrezoma jer se vezuje za poliubikvitirane proteine i transportuje ih pomoću proteina dineina do agrezoma²⁰³. Inhibicijom enzima HDAC6 dolazi do agregacije i akumulacije oštećenih proteina u ćeliji, što dalje dovodi do pokretanja procesa autofagije²⁰⁴. Tubulin deacetilazna aktivnost HDAC6 povećava motilitet^{201,205} i invazivnost¹⁶⁸ ćelija kancera dojke (**Slika 14**) tako što dovodi do hipoacetilacije tubulina. Deacetilacija posredovana HDAC6 enzimom skraćuje poluživot dinamičnim mikrotubulima²⁰⁶, dok acetilovani mikrotubuli imaju značajno duži poluživot i otporniji su na mehanički stres^{207,208}. U kancerskim ćelijama primećena je povećana ekspresija izoforme HDAC6, pre nego prisustvo mutiranih formi ovog enzima. Postoje kontradiktorni podaci za model kancera dojke, gde jedna grupa autora tvrdi da povećana ekspresija iRNK HDAC6 predstavlja dobar prognostički parametar preživljavanja²⁰⁹, dok druga grupa autora smatra da je HDAC6 povezan sa agresivnijim oblikom kancera dojke²⁰⁵. Uzimajući u obzir prikazane citoplazmatske uloge humane histon deacetilaze 6 u fiziološkim i patološkim procesima ćelija, danas se HDAC6 smatra validiranim ciljnim mestom delovanja za dizajniranje i razvoj selektivnih HDAC6 inhibitora²¹⁰.

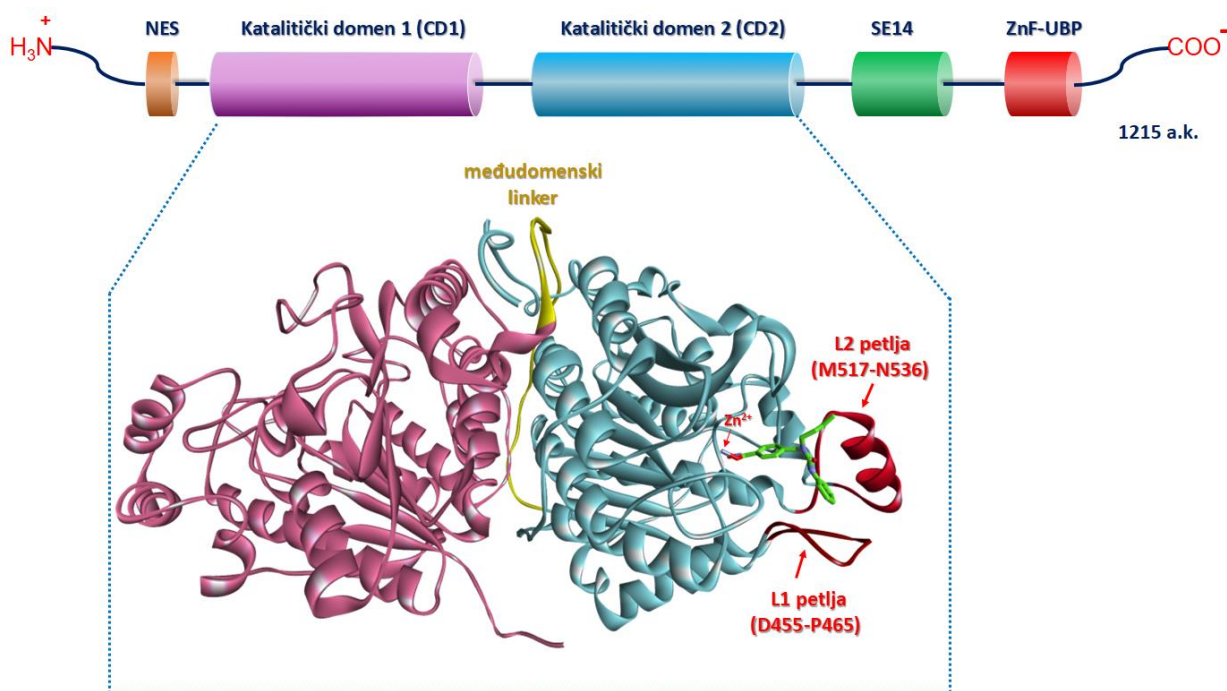


Slika 14. Prikaz glavnih obeležja kancerske ćelije u čijem nastanku posreduje HDAC6 izoforma

Histon deacetilaza 6 je karakterističan predstavnik klase IIb HDAC familije enzima po tome što poseduje dva katalitička domena, kao i domen za vezivanje ubikvitina, u blizini C-terminalnog dela amino-kiselinske sekvence (**Slika 15**). Citoplazmatska lokalizacija omogućena je zahvaljujući prisustvu ponavljajućih tetradekapeptida koji sadrže serin i glutaminsku kiselinu (SE14). Do 2016. godine nije bila poznata trodimenzionalna struktura humane HDAC6. Za dizajniranje i sintezu potentnih i selektivnih HDAC6 inhibitora, istraživači su koristili homologe modele HDAC6 koje je pripremio prof. Olaf Wiest sa Univerziteta *Notre Dame*²¹¹. Na leto 2016. godine dve veoma obimne studije u časopisu *Nature Chemical Biology* priložile su prve kristalografske strukture HDAC6 izoforme^{210,212}. Tada su istraživači **Christianson** i **Hai** deponovali nekoliko kristalnih struktura kompleksa HDAC6-inhibitor čije je poreklo bilo iz zebrića (*Danio rerio*, zebrafish). Zbog problema sa kristalizacijom mišje i humane HDAC6 izoforme u radu istih autora objavljena je i struktura humanog drugog katalitičkog domena (CD2) u kompleksu sa trihostatinom A (PDB:5EDU). Zbog visokih procenata identiteta i sličnosti u amino-kiselinskoj sekvenci između humane izoforme i izoforme dobijene iz zebrića, smatra se da je izučavanje kompleksa HDAC6-inhibitor iz zebrića validan i pouzdan model za SBDD studije²¹².

Ključno pitanje koje se postavilo pred istraživačima je: **Koji od katalitičkih domena je racionalno ciljati pomoću malih molekula tako da se inhibira funkcija HDAC6 *in vivo*?** Pre publikacije pomenuta dva rada u časopisu *NatChemBio*, postojala su suprotna mišljenja u vezi sa načinima deacetilacije α -tubulina²¹³⁻²¹⁵, odnosno mikrotubula²¹⁶. Da bi uspešno odgovorili na ovo pitanje, istraživači u obe istraživačke grupe^{210,212} sintetisali su različite fluorogene peptide (koji predstavljaju fragmente α -tubulina, p53, histon H4, Hsp90) i testirali ih na humanom HDAC6 enzimu i mutiranim katalitičkim domenima humane i *danio rerio* (dr) izoformi. U obe studije je pokazano da inaktivacija prvog katalitičkog domena (CD1)

pojedinačnim mutacijama katalitičkih tirozina (Y386) ili histidina (H194) ne utiče na enzimsku katalizu. Suprotno, mutacijom tirozina (Y782) i histidina (H574, H651) važnih za enzimsku katalizu drugog katalitičkog domena (i humane i *danio rerio* izoforme), katalitička aktivnost se kompletno gubi. Korišćenjem fluorogenih peptida takođe je pokazano da CD1 domen ima supstratnu specifičnost za peptide čiji acetil-lizini se nalaze na C-terminusu. Za razliku od CD1, drugi katalitički domen – CD2, hidrolizuje acetil grupu i na endo i na egzo acetil-lizinskim peptidima, čime je pokazano da CD2 domen ima veću supstratnu specifičnost.



Slika 15. Prikaz organizacije HDAC6 izoforme (iznad) i *danio rerio* HDAC6 kristalne strukture u kompleksu sa neksturastat-om A (ispod, PDB – 5G0J, inhibitor označen zeleno). Prvi katalitički domen je obojen ljubičastom, drugi katalitički domen plavom bojom; NES – nuklearni eksportni signal, SE14 – serin-glutamat ponavljajući tetradekapeptid, ZnF-UBP – ubikvitin vezivni domen koji sadrži motiv sa cinkovim prstima.

Da bi se razumela razlika u afinitetu različitih fluorogenih peptida, mutacijom serina u položaju 531 u *danio rerio* kristalografskom modelu, kao i serina-568 u humanom modelu, katalitička efikasnost enzima se gubi čak 258 puta! Pokazano je da je konzervirani S531, odnosno S568 na površini katalitičkog džepa važan za nastanak kompleksa peptid–enzim i predstavlja bitnu interakciju koja treba da se razmatra u dizajnu selektivnih HDAC6 inhibitora.

Konačno, **Miyake** et al. su zaključili da je međudomenski linker (sekvenca amino kiselina između CD1 i CD2 domena) važan za optimalnu HDAC6 aktivnost i da najverovatnije stupa u protein–protein interakcije sa proteinima u dineinskom motornom kompleksu (bitnom za degradaciju loše savijenih proteina putem agregoma)²¹⁰. Jedinstvena pozicija α -heliksa (H25, koji se nalazi u regionu P519–E528) i L2 petlja koja se nastavlja na H25 heliks (**Slika 15**) čine da katalitičko mesto HDAC6 ima veći radijus (14 Å) u poređenju sa HDAC izoformama klase I. Ovo zapažanje je iskorišćeno u brojnim studijama dizajna selektivnih inhibitora HDAC6 izoforme i jasno je naznačeno u kristalografskoj studiji Porter et al.²¹⁷

Strukturne determinante koje čine HDAC6 izoformu jedinstvenom u odnosu na ostale predstavnike HDAC familije su:

- Prisustvo dva katalitička domena (CD1 i CD2). CD1 domen najverovatnije deacetiluje supstrate koji imaju C-terminalni acetil-lizin, dok se za CD2 domen zna da ima tubulin-deacetilaznu aktivnost. CD2 domen deacetiluje dominantnije heterodimere (α - i β -tubulin) u odnosu na mikrotubule.
- Oba katalitička domena imaju istu arhitekturu: hidrofobni tunel od površine oboda džepa do katalitičkog jona Zn^{2+} odgovoran je za *Van der Waals* interakcije sa ugljovodoničnim nizom lizina. Katalitički jon Zn^{2+} je koordiniran bočnim ostacima amino-kiselina histidina i dve asparaginske kiseline; katalitički tirozin učestvuje u stabilizaciji intermedijernog aciloksianjona.
- Konformacija petlje L1 (D455-P465) je drugačija u odnosu na konformaciju iste petlje posmatrane u HDAC izoformama I klase, što je važno za način usidranja inhibitora. L1 petlja kod HDAC1, HDAC2 i HDAC3 čini spoljašnji obod katalitičkog mesta restriktivnijim za usidranje inhibitora nego što je to slučaj sa HDAC6 izoformom²¹⁷.
- H25 heliks i petlju koja se nastavlja na H25 segment (u laboratoriji Christianson-a celokupna sekvenca je nazvana kao L2 petlja) čine amino-kiseline M517-N536. U ovoj petlji se nalazi ključna amino-kiselina S531 za prepoznavanje α -tubulina, koja predstavlja važni strukturni element koji treba razmatrati tokom dizajna selektivnih HDAC6 inhibitora.
- Razrešavanjem više kristalografskih kompleksa drHDAC6–inhibitor došlo se do zaključka da su petlje L1 i L2 rigidne i da kristalne strukture drHDAC6 mogu da se koriste za SBDD tehnike dizajniranja novih inhibitora, posebno za molekularni doking.

Farmakološke manipulacije histon deacetilaze 6 predstavljaju validnu strategiju u dizajniranju i razvoju novih hemioterapeutika^{218–220}, lekova za neurodegenerativne bolesti^{221–223} i imunoloških oboljenja.^{224,225} U ovoj doktorskoj disertaciji biće prikazan racionalni dizajn, kao i sintetske strategije za dobijanje HDAC6 selektivnih inhibitora, polazeći od hemijskih struktura poznatih HDAC6 inhibitora (LBDD metode), kao i dostupnih kristalografskih struktura HDAC6 enzima (SBDD metode).

Više od dve decenije istraživači u oblasti epigenetike koriste „opšteprihvaćeni model” za opisivanje farmakofore HDAC inhibitora. **Jung M.** je 1999. godine prvi predložio farmakoforni model HDAC inhibitora²²⁶, koji definiše da svaki HDAC inhibitor ima tri glavne strukturne determinante (**Slika 16 A**):

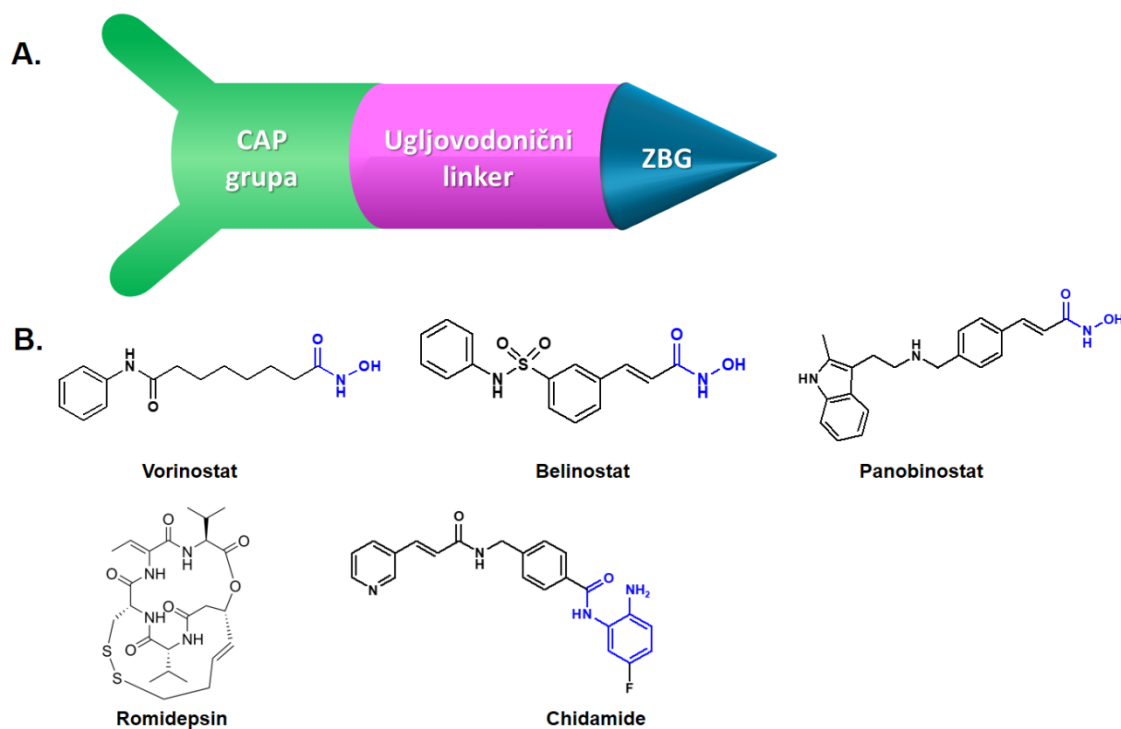
- **CAP (capping) grupu** – heterociklus ili karbociklus koji intezue sa hidrofobnim amino-kiselinama koje definišu obod HDAC izoformi (najčešće potiču od L1, L2 ili L7 petlji),
- **ugljovodonični linker**, koji se proteže dužinom hidrofobnog cevastog tunela i imitira ugljovodonični niz lizina i
- **cink-vezivnu (helirajuću) grupu** ZBG, koja koordinira katalitički jon Zn^{2+} .

Pregled HDAC inhibitora, sa posebnim osvrtom na selektivne HDAC6 inhibitore je opisan u sledećem potpoglavlju.

1.5.4. Pregled registrovanih HDAC inhibitora i strategija za dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora

U farmakoterapiji hematoloških maligniteta kao HDAC inhibitori, koriste se (**Slika 16B**)²²⁷:

- **vorinostat** (*ZolinzaTM*), odobren za upotrebu 2006. godine, koristi se u terapiji kutanog T-ćelijskog limfoma;
- **romidepsin** (*IstodaxTM*), odobren za upotrebu 2009. godine, koristi se u terapiji kutanog T-ćelijskog limfoma;
- **belinostat** (*BeleodaqTM*), odobren za upotrebu 2014. godine, koristi se u terapiji relapsnog ili refraktarnog perifernog T-ćelijskog limfoma;
- **panobinostat** (*FarydakTM*), odobren za upotrebu 2015. godine, koristi se u terapiji multiplog mijeloma i
- **tucidinostat** (*Chidamide, EpidazaTM*), odobren za upotrebu 2015. godine u Kini, koristi se u terapiji perifernog T-ćelijskog limfoma i kancera dojke.

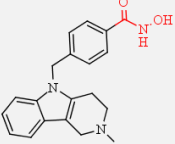
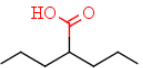
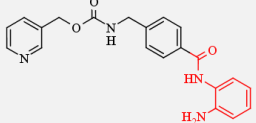
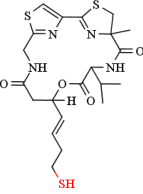
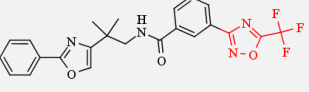
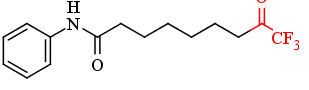
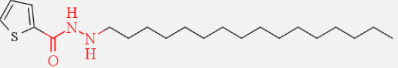


Slika 16. A. Opšti farmakoforni model HDAC inhibitora. **B.** Hemijske strukture odobrenih HDAC inhibitora u terapiji malignih oboljenja.

I dalje postoji velika disproporcija u broju odobrenih HDAC inhibitora i lekova-kandidata koji su dizajnirani kao selektivni HDAC inhibitori za određenu izoformu. Podaci iz kliničkih studija registrovanih HDAC inhibitora ukazali su na neke od važnih nedostataka derivata ove grupe lekova. Izražena kardiotsičnost, povezana sa aktivacijom hERG kanala, primećena je kod pacijenata koji su bili tretirani SAHA-om i romidepsinom²²⁸. Posebno, podaci iz prekliničkih ispitivanja su doveli u vezu prisustvo hidroksamske kiseline u strukturi HDAC inhibitora sa niskom rastvorljivosti, mutagenosti (koja nastaje usled Lossen-e degradacije hidroksamske kiseline do toksičnih izocijanata), kao i nastajanjem neaktivnih metabolita hidroksamskih kiselina – glukuronida^{229,230}. Varijabilna farmakokinetika derivata hidroksamskih kiselina je i posledica njihovog metaboličkog profila, kao i smanjene tkivne distribucije u solidne tumore.

Inhibitori histon deacetilaza koji se koriste u terapiji nisu selektivni, deluju na nekoliko izoformi HDAC-ova i u literaturi se nazivaju pan-HDAC inhibitori. Prepoznatljiva je farmakofora HDAC inhibitora (**Slika 16B**) na strukturama derivata hidroksamske kiseline (vorinostat, belinostat, panobinostat), dok je u strukturi leka *Chidamide* (tucidinostat) kao grupa koja koordinira cink iskorišćen 2-aminoanilid. Hidroksamska kiselina u strukturi HDAC inhibitora nije dovoljan uslov za selektivnost jedinjenja ka odgovarajućoj izoformi. Ne postoji cink-vezivna grupa koja je specifična za odgovarajući izoenzim, ali su poznate grupe koje imaju veći afinitet ka nekoj od klasa HDAC enzima. U **Tabeli 9** prikazane su neke od najznačajnijih testiranih cink-vezivnih grupa i njihov afinitet ka odgovarajućoj klasi HDAC-ova.

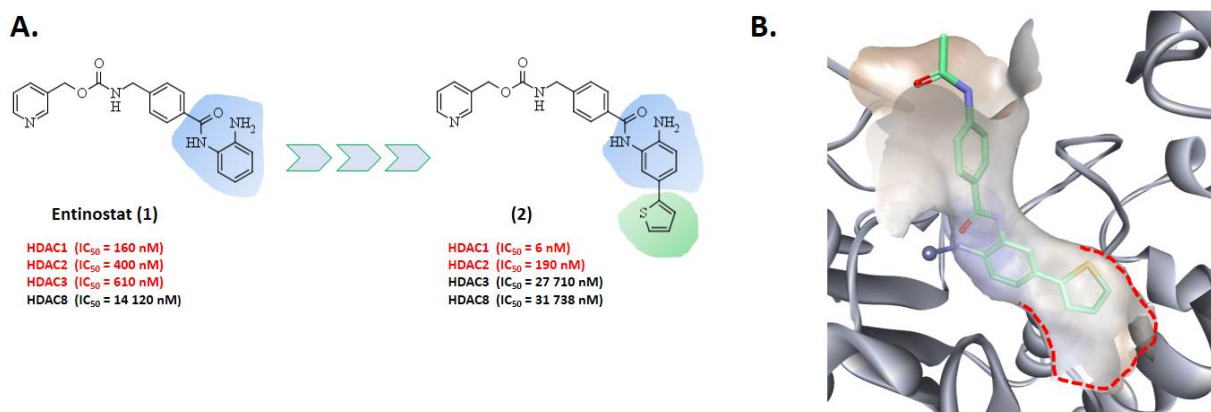
Tabela 9. Pregled najznačajnijih ZBG u strukturama HDAC inhibitora (označeno crvenom bojom) i njihov afinitet ka odgovarajućoj izoformi

Cink-vezivna grupa	Primer HDAC inhibitora	Afinitet ka odgovarajućoj klasi/podklasi HDAC
Hidroksamska kiselina ²³¹		Najpotentnija ZBG, inhibira HDAC klase I, klase IIa / IIb
Karboksilna kiselina ²³²		Slabo potentna ZBG, afinitet ka klasi I
2-aminoanilid ²³³		Potentna ZBG, inhibira HDAC1/HDAC2/HDAC3 izoforme, manje potentna na HDAC8
Tiol ²³⁴		Često prisutna u prirodnim proizvodima, depsi-peptidima, afinitet ka klasi I, neki od primera inhibiraju HDAC6 / HDAC8 izoforme
5-Trifluorometil 1,2,4-oksadiazol ²³⁵		Afinitet ka klasi IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9), manji afinitet ka HDAC6/HDAC8
Trifluorometilketon ²³⁶		Metabolički nestabilna ZBG, afinitet ka klasi IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9)
Hidrazid ¹⁹²		Primer ZBG sa n-palmitoil nizom koja ima afinitet ka HDAC11

Derivati 2-aminoanilida (*orto*-aminoanilida) okarakterisani su kao inhibitori klase I HDAC enzima. Prevedhodno inhibiraju katalitičku aktivnost HDAC1, HDAC2 i HDAC3 izoformi (IC₅₀ vrednosti u nanomolarnim koncentracijama), dok su isti derivati slabije aktivni na HDAC8 izoformi (IC₅₀ vrednosti u mikromolarnim koncentracijama). Registrovani predstavnik ove grupe derivata je lek tucidinostat (*Chidamide*, **Slika 16B**). Postoje pretpostavke da u katalitičkom tunelu HDAC8, bočni niz triptofana – W141 ograničava ulazak voluminoznih 2-

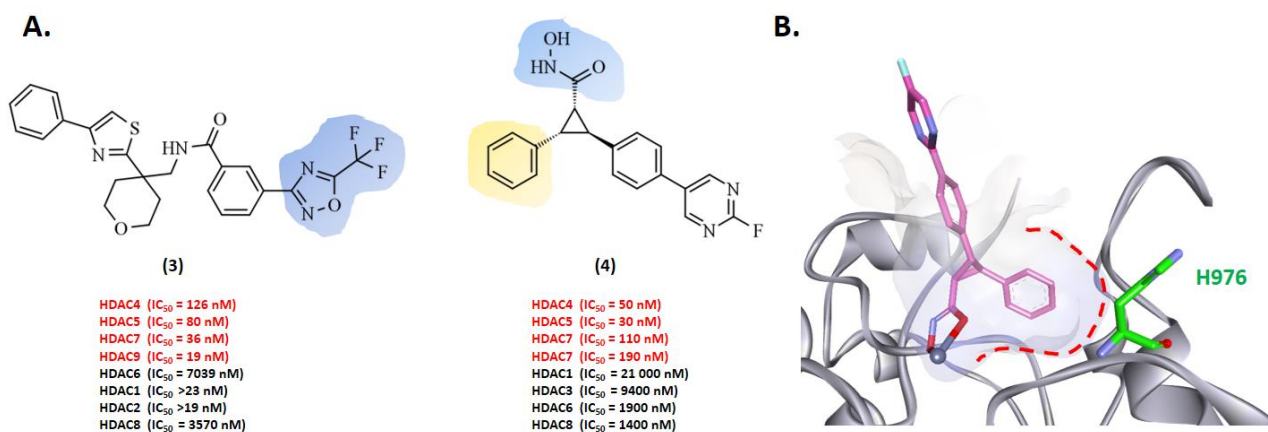
aminoanilida do dela džepa gde se nalazi jon Zn^{2+} , za razliku od manje voluminoznog leucina (L144) u strukturi HDAC1/HDAC2/HDAC3 izoformi²³⁷.

Jedinjenje entinostat (**Slika 17A**) deluje kao nanomolarni HDAC1, HDAC2, HDAC3 inhibitor, dok HDAC8 izoenzim inhibira u mikromolarnim koncentracijama. U pokušajima da se sintetišu selektivni inhibitori specifične nuklearne HDAC izoforme, došlo se do saznanja da supstitucija 2-aminoanilida u položaju 5 heterociklusom tioenom (2-tienil supstitucija) generiše potentne HDAC1/HDAC2 inhibitore. Ovi inhibitori (jedinjenje 2, **Slika 17 A**) indukuju otvaranje *foot pocket*-a (unutrašnje šupljine, **Slika 17 B**) u koju se usidrava 2-tienil supstituent. Supstitucijom 2-aminoanilida u položaju 5 tioenom ili fenil grupom povećava se selektivnost ka izoformama HDAC1/HDAC2 i istovremeno smanjuje potentnost derivata ka HDAC3 izoformi. Do danas nije sintetisan nijedan selektivni HDAC1 ili HDAC2 inhibitor, derivat 2-aminoanilida, što predstavlja izazov budućim medicinskim hemičarima koji se bave klasičnim epigenetičkim inhibitorima histon deacetilaza. Dodatno, revalidacija prvobitno postuliranog HDAC farmakofornog modela je neophodna, zbog plastičnosti katalitičkog džepa i otvaranja manjih džepova (eng. *sub-pockets*) nakon vezivanja specifičnih HDAC inhibitora.



Slika 17. A. Derivati 2-aminoanilida (entinostat i njegov 5-supstituisani tienil analog), HDAC inhibitori koji deluju na nuklearne izoforme (HDAC1, HDAC2, HDAC3). **B.** Prikaz kristalografske strukture HDAC2 u kompleksu sa 5-tienil supstituisanim derivatom 2-aminoanilida (PDB: 4LY1), crvenom bojom je označen tioenom-indukovano *foot pocket*.

Derivati 5-trifluorometil 1,2,4-oksadiazola (jedinjenje 3, **Slika 18 A**) pokazuju afinitet prema klasi IIa HDAC-ova (HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9). Kiseonik iz 1,2,4-oksadiazola i jedan fluor iz trifluorometil grupe slabim elektrostatičkim interakcijama intereaguju sa katalitičkim Zn^{2+} (ne heliraju jon cinka). Poznato je prisustvo specifičnog, manjeg džepa (eng. *sub-pocket-a*) u blizini jona Zn^{2+} (eng. *lower pocket*)²³⁸ koji postoji zbog specifične mutacije tirozina do histidina u strukturi HDAC klase IIa (**Slika 18 B**). Bočni ostatak H976 u strukturi HDAC4 je orijentisan dalje od jona metala, čime se objašnjava i slabija deacetilazna aktivnost ove potklase enzima, kao i postojanje *lower sub-pocket*-a. Ovaj manji džep u blizini jona cinka može da bude okupiran lipofilnim hetero ili karbociklusima, čime se postiže inhibicija izoformi u okviru klase IIa.



Slika 18. A. Derivat 5-trifluorometil 1,2,4-oksadiazola (3) i derivat diarilciklopropan hidroksamske kiseline (4) kao HDAC inhibitori enzima klase IIa. **B.** Prikaz kristalografske strukture HDAC4 u kompleksu sa jedinjenjem 4 (PDB: 4CBT), crvenom bojom je označen *lower pocket* koji postoji zbog fleksibilnog histidina H976; plavo su označene cink-vezivne grupe, a žutom bojom je označen fenil prsten koji se usidrava u specifični *lower pocket*.

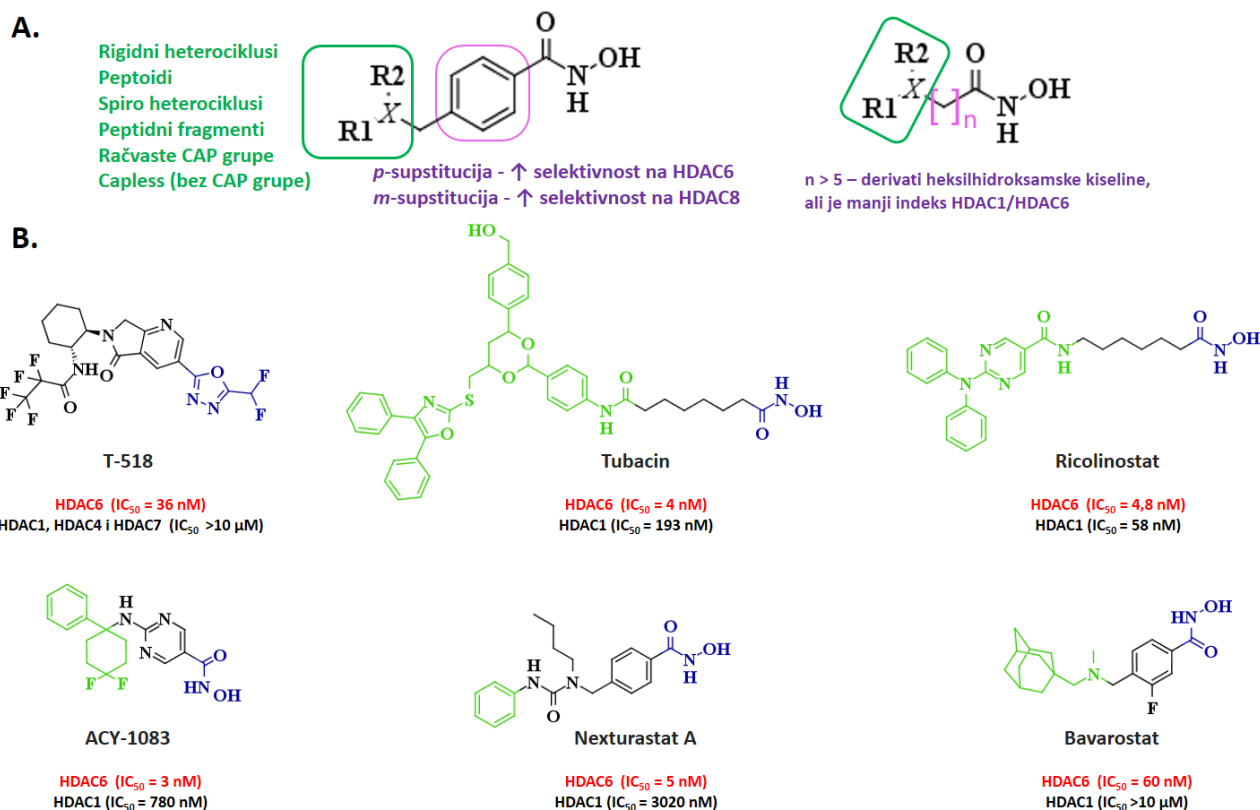
Na primerima inhibitora klasa I i IIa može se zaključiti da postoje karakteristične cink-vezivne grupe koje mogu da doprinesu razvoju klasno specifičnih HDAC inhibitora, ali do sada nije otkrivena ZBG koja je izoformski specifična. Hemijske modifikacije ZBG, kao što je postojanje hidrofobnog tiofena koji indukuje otvaranje unutrašnje šupljine blizu katalitičkog Zn²⁺, ali i modifikacija linkera aromatičnim prstenom koji se usidrava u *lower pocket*, neke su od „dodatnih“ farmakofornih karakteristika koje služe za dizajn selektivnih HDAC inhibitora.

Uzimajući u obzir prethodno opisano, jasno je da spoljašnji obod katalitičkog džepa ima najveću raznolikost u pogledu trodimenzionalne strukture i amino-kiselina u sastavu petlje koje ga definišu. Farmakoforna determinanta HDAC inhibitora koja intereaguje sa spoljašnjim obodom jeste CAP (*capping*) grupa. Ne postoji jasan konsenzus o tome koja determinanta farmakofore je značajnija za aktivnost, ali je poznato da inhibitori bez cink-vezivne grupe²³⁹, analozi prirodnog proizvoda apicidina, inhibiraju nuklearne HDAC izoenzime (HDAC1, HDAC2 i HDAC3) u nanomolarnim koncentracijama. Za sada se čini da HDAC inhibitori sa voluminoznim CAP grupama (ciklični tetrapeptidi, prirodni depsi-peptidi) bez ZBG pokazuju afinitet ka HDAC izoenzimima I klase.

S obzirom na razlike u strukturalnoj biologiji HDAC6 enzima u odnosu na izoenzime klase I, klase IIa i klase IV (HDAC11), do sada je najviše studija usmereno u razvoj selektivnih HDAC6 inhibitora²⁴⁰. Na osnovnu mnogobrojnih sintetisanih inhibitora, odnos strukture i selektivne HDAC6 aktivnosti može se prikazati kroz sledeću analizu:

- Najčešće zastupljena cink-vezivna grupa u strukturi selektivnih HDAC6 inhibitora je hidroksamska kiselina. Od skoro je poznato je da 5-(difluorometil)-1,3,4-oksadiazol²⁴¹ može biti korišćen kao ZBG u dizajnu selektivnih HDAC6 inhibitora (**Slika 19**).
- CAP grupa može biti povezana i sa alifatičnim²⁴² i sa aromatičnim²⁴³ linkerima, pri čemu se u dizajnu selektivnih HDAC6 inhibitora prednost daje para-supstituisanim derivatima fenilhidroksamskih kiselina²²⁷. Ukoliko se sintetišu meta-supstituisani derivati fenilhidroksamskih kiselina, postiže se selektivnost ka HDAC8 izoformi.
- CAP grupa može i ne mora da postoji u strukturi selektivnih HDAC6 inhibitora²⁴⁴. HDAC6 inhibitori bez CAP grupe (fenil-hidroksamat, cikloheksil hidroksamat), iako nanomolarni i selektivni inhibitori, nemaju karakteristike vodeće (*lead*) supstance za dalji razvoj u projektima medicinske hemije. Korišćenje različitih heterocikličnih i

karbocikličnih CAP grupa predstavlja najveću inspiraciju za razvoj selektivnih HDAC6 inhibitora, ali i dualnih HDAC6/kinaznih inhibitora, HDAC6-PROTAC inhibitora itd.

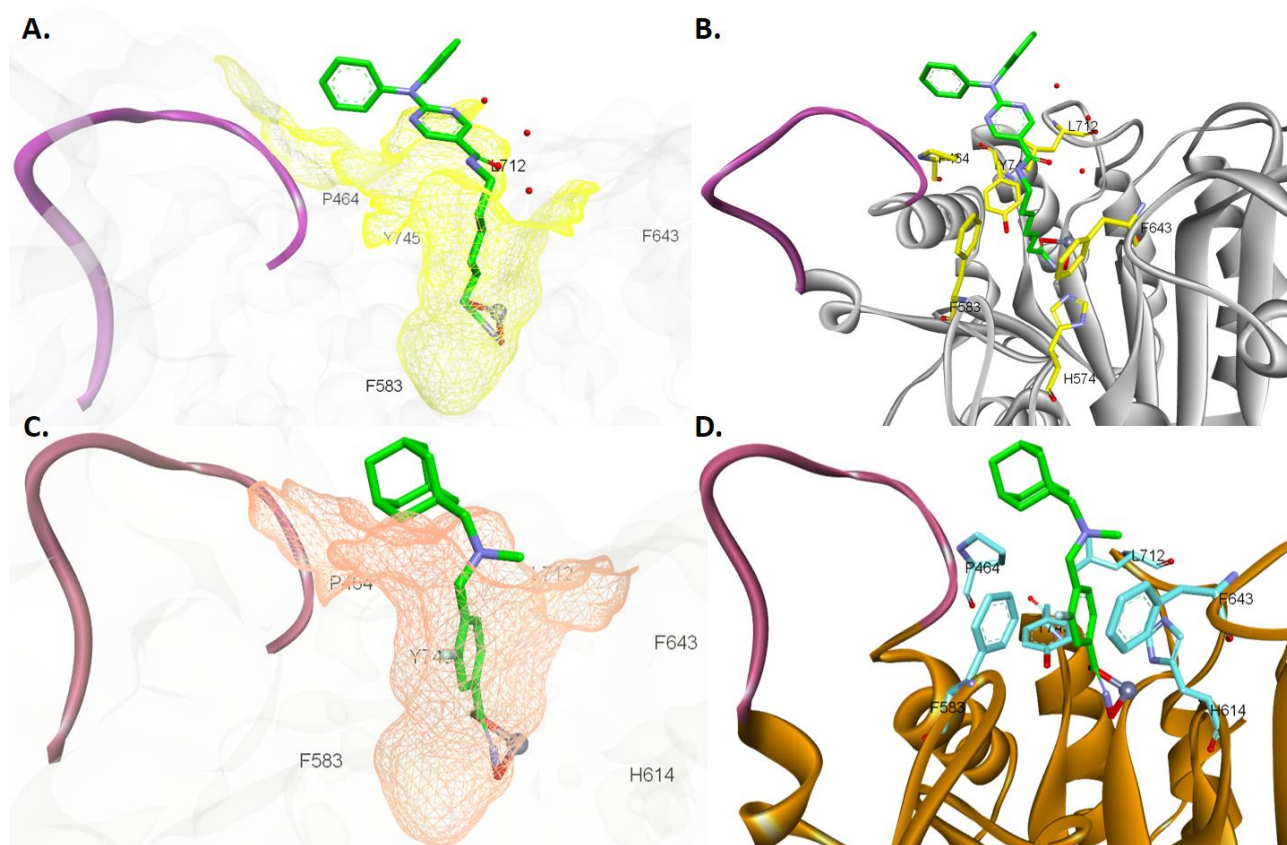


Slika 19. A. Odnos strukture i HDAC6 inhibitorne aktivnosti prikazan na derivatima arilhidroksamata (levo) i alkilhidroksamata (desno). **B.** Pregled najznačajnijih selektivnih HDAC6 inhibitora, T-518 je derivat 5-(difluorometil)-1,3,4-oksadiazola, tubacin i ricolinostat su derivati alkil-hidroksamata, a ACY-1083, neksturastat A i bavarostat predstavnici fenilhidroksamata; ZBG su obojene plavom bojom, CAP grupe označene zelenom bojom.

Selektivni HDAC6 inhibitori, derivati fenilhidroksamske kiseline koordiniraju Zn^{2+} jon monodentatno, dok je primećeno da derivati alkilhidroksamskih kiselina pomoću oba kiseonika hidroksamske kiseline heliraju katalitički jon HDAC-ova²¹⁷. Danas se, nakon više razrešenih kristalografskih struktura *danio rerio* HDAC6 izoforme (drugog katalitičkog domena) zna da na dentatnost hidroksamske kiseline utiče i hemija CAP grupe. Primećeno je da selektivni inhibitori, kao što su ricolinostat, ACY-1083, bavarostat ostvaruju interakcije sa karakterističnom L1 petljom (H455-E465, **Slika 20**). Ova petlja definiše mali vezivni džep (L1 *sub-pocket*) i bogata je histidinima, prolinom i intereaguje sa najvećim brojem heterociklusa u sastavu CAP grupa inhibitora. L1 petlja je rigidnija u strukturama HDAC1, HDAC2 i HDAC3 izoformi i razlog je što spoljašnji obod klase I HDAC-ova ima manji dijametar. Ovim činjenicama se može objasniti zašto HDAC6 inhibitori sa voluminoznim CAP grupama (u najvećem broju slučajeva) ne inhibiraju katalitičku funkciju HDAC-ova klase I. Dodatno, katalitički tunel je uži u strukturi HDAC6 izoforme, tipično je oblikovan fenilalaninskim ostacima (F583 i F643) i vrlo lako gradi π - π međumolekulske interakcije sa aril linkerom HDAC6 inhibitora.

Na **Slici 20** prikazane su trodimenzionalne strukture kristalografskih kompleksa *danio rerio* HDAC6 sa ricolinostatom (**Slika 20A i B**) i sa bavarostatom (**Slika 20C i D**). Ovi primeri ilustruju dva selektivna HDAC6 inhibitora sa različitom hemijom linkera. Ricolinostat

doprema hidroksamsku kiselinu pomoću fleksibilnog linkera do jona Zn^{2+} , koji bidentatno helira jon cinka. Fleksibilni linker omogućuje ricolinostatu da zauzme više konformacija zbog čega je primećeno da se hidrofobna CAP grupa pozicionira u L1 džepu (gradi hidrofobne interakcije sa P464). Ostale hidrofobne interakcije sa bočnim ostacima L1 džepa nisu primećene. CAP grupa se dodatno stabilizuje građenjem vodoničnih interakcija sa površinskim molekulima vode. Bavarostat je derivat fenil-hidroksamske kiseline, koji kao izuzetak od većine fenilhidroksamata, helira jon Zn^{2+} takođe bidentatno (**Slika 20C i D**). Naime, primećeno je da je jon cinka teže dostupan fenil-hidroksamskim kiselinama zbog čega najveći broj ovih inhibitora preko negativno naelektrisanog kiseonika helira metal, dok molekul vode (katalitička voda) helira cink i donira vodonik karbonilnoj grupi hidroksamske kiseline²¹⁷. Bavarostat ima adamantil fragment u sastavu CAP grupe koji je povezan sa sp^3 hibridizovanim azotom tercijarnog amina. Verovatna piramidalna inverzija tercijarnog amina omogućuje da bavarostat zauzme optimalnu bioaktivnu konformaciju u hidrofobnom L1 džepu, dok metil grupa (kao drugi supstituent na sp^3 azotu) zbog male voluminoznosti doprinosi bidentatnoj koordinaciji cinka.



Slika 20 A. Prikaz vezivnog džepa ricolinostata u strukturi *drHDAC6* (drugi katalitički domen) i **B.** Prikaz vezivnih interakcija ricolinostata sa bočnim ostacima amino-kiselina (označene žuto). **C.** Prikaz vezivnog džepa bavarostata u strukturi *drHDAC6* (drugi katalitički domen) i **D.** Prikaz vezivnih interakcija bavarostata sa bočnim ostacima amino-kiselina (označene plavo). Inhibitori su na slikama obojeni zeleno, L1 petlja je obojena ljubičasto.

Kada se izučava selektivnost inhibitora ka HDAC6 izoformi, neizostavno je spomenuti regioizomere derivata fenil-hidroksamskih kiseline. Supstitucija fenil-hidroksamske kiseline u položaju 4 (*para* položaj) u strukturama najvećeg broja jedinjenja favorizuje HDAC6 inhibiciju. Ukoliko se CAP grupa dizajnira u položaju 3 (*meta* položaj) aromatičnog linkera, primećeno je da takvi inhibitori imaju veći afinitet ka HDAC8 izoformi. Nije retko da istraživači dobiju dualne HDAC6/HDAC8 inhibitore zbog plastičnosti L1 petlje (S30 – K36) u

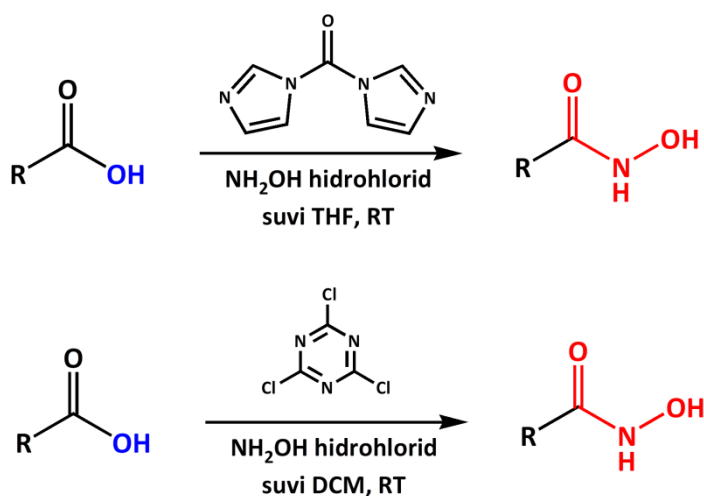
strukturi HDAC8 izoforme. Fleksibilnost L1 petlje omogućuje formiranje dodatnog, bočnog džepa (*side-pocket*) pored oboda katalitičkog džepa HDAC8, čime se objašnjava HDAC8 selektivnost meta-supstituisanih fenil-hidroksamata¹⁸⁷. Zbog manjeg broja amino kiselina u L1 petlji kod HDAC8 izoforme u poređenju sa HDAC6, vezivanjem inhibitora dolazi do konformacionih promena i formiranja bočnog džepa, što predstavlja specifičnu odliku HDAC8 izoenzima.

1.6. Pregled sintetskih metoda za dobijanje hidroksamskih kiselina

Hidroksamska kiselina predstavlja metal-helirajuću funkcionalnu grupu, značajnu u dizajnu inhibitora metaloenzima. Koordinacija gvožđe (Fe^{3+}) i cink (Zn^{2+}) jona je iskorišćena u dizajnu registrovanog leka **zileutona** (inhibitor 5-lipooksigenaze)⁹⁹ i kliničkog leka-kandidata, **marimastata** (neselektivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza)²⁴⁵.

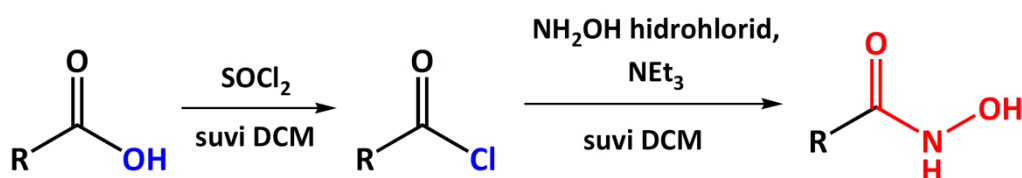
Uzimajući u obzir da su hidroksamske kiseline derivati N-hidroksi amida, jedna od najčešće korišćenih metoda za njihovu sintezu jeste nukleofilna supstitucija derivata karboksilnih kiselina korišćenjem hidroksilamina (NH_2OH). Karboksilne kiseline su najslabije reaktivne u reakcijama nukleofilne supstitucije, pa se u radovima češće nailazi na primere sinteze hidroksamskih kiselina iz odgovarajućih acil-hlorida ili metil- ili etil- estara karboksilnih kiselina.

Karboksilne kiseline u reakciji sa hidroksilaminom ne daju hidroksamske kiseline, pa se moraju aktivirati korišćenjem različitih kupljućih reagenasa. U literaturi je opisano korišćenje 1 ekvivalenta karbonildiimidazola (CDI)²⁴⁶ ili 0,3 ekvivalenta 2,4,6-trihloro(1,3,5)-triazina (hlorid cijanurične kiseline, TCT)²⁴⁷. Kao nukleofil se najčešće koristi komercijalno dostupan hidroksilamin-hidrohlorid (u višku 1,1 – 1,5 ekvivalenta) iz koga se pomoću odgovarajuće baze (trietilamina ili N-metilmorfolina) generiše slobodan hidroksilamin. Reakcija se najčešće izvodi u suvim rastvaračima, i u zavisnosti od rastvorljivosti polazne karboksilne kiseline koriste se tetrahidrofuran (THF) ili dihlormetan (DCM). Pomenute reakcije (**Šema 1**) izvode se na sobnoj temperaturi.



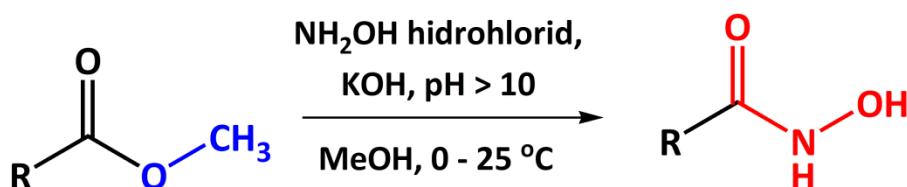
Šema 1. Prikaz sintetskih procedura za dobijanje hidroksamskih kiselina koristeći CDI (gornja reakcija) i TCT (donja reakcija) kao kupljućii reagens

Ekonomičnija strategija za konverziju karboksilnih u hidroksamske kiseline jeste sinteza hlorida kiselina (acil-halogenida), koji pri suvim uslovima reaguju sa hidroksilaminom i generišu hidroksamske kiseline²⁴⁸. Ovakav pristup podrazumeva sintezu u dve faze. U prvoj sintetskoj fazi kiselina reaguje sa tionil-hloridom u dihlormetanu uz zagrevanje, nakon čega se hlorid kiselina meša sa hidroksilamin-hidrohloridom i bazom (obično trietilaminom) u suvom dihlormetanu, dajući derivate hidroksamskih kiselina (**Šema 2**).



Šema 2. Sinteza hidroksamskih kiselina preko intermedijernog hlorida kiseline

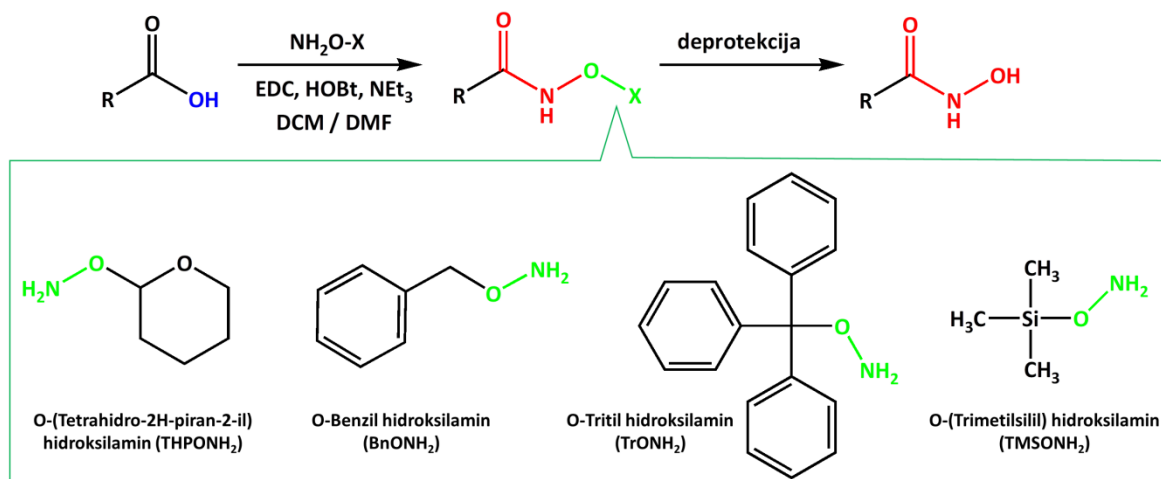
Konverzija estara karboksilnih kiselina (metil ili etil estara) do hidroksamskih kiselina je najčešće primenjivana sintetska procedura za dobijanje inhibitora histon deacetilaza^{243,249}. Metil estri se u baznoj sredini (pH>10) u metanolu kao rastvaraču konvertuju u hidroksamske kiseline. Reakcija se izvodi tako što se hidroksilamin-hidrohlorid i kalijum-hidroksid odvojeno rastvore u metanolu. Rastvor kalijum-hidroksida (6 ekvivalenata) se na 0°C dodaje u rastvor hidroksilamin-hidrohlorida (3 ekvivalenta) i mešaju se pola sata. Talog kalijum-hlorida se filtrira i sveže pripremljen metanolni rastvor hidroksilamina dodaje u metanolni rastvor metil estera. Reakcija se izvodi na sobnoj temperaturi i prema literaturnim podacima, proizvod nastaje za 4–6 časova (**Šema 3**).



Šema 3. Sinteza hidroksamskih kiselina iz metil estarskih derivata karboksilnih kiselina

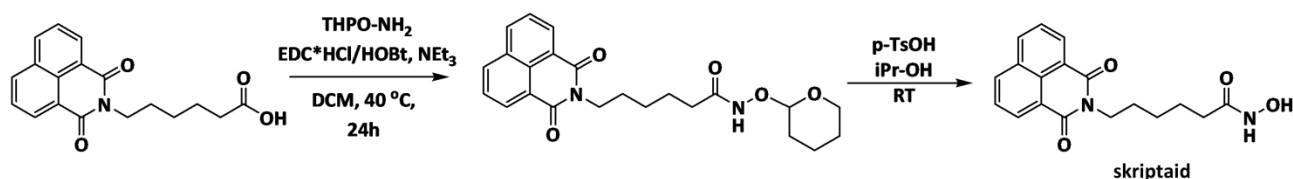
Moguće je da se umesto *in situ* pripremljenog metanolnog rastvora hidroksilamina koristi i komercijalno dostupan 50% vodeni rastvor hidroksilamina, uz dodatak metanolnog rastvora kalijum-hidroksida²⁵⁰. Najčešće se u ovim reakcijama krajnji proizvod, derivat hidroksamske kiseline, dobija u prinosu od oko 50%. Nije retko da polazni metil estar pri baznim uslovima hidrolizuje do karboksilne kiseline, što može otežati prečišćavanje finalnog proizvoda, zbog sličnih retencionih vremena karboksilne i hidroksamske kiseline u normalno-faznim hromatografskim uslovima. Da bi se taj problem prevazišao, ispiranje smeše karboksilna kiselina / hidroksamska kiselina zasićenim rastvorom NaHCO₃ može da ukloni karboksilnu kiselinu, zbog niže pKa vrednosti u odnosu na hidroksamske kiseline (pKa~9).

Izazov u sintezi derivata derivata hidroksamskih kiselina može da bude i nestabilnost u baznoj sredini ostalih funkcionalnih grupa u strukturama polaznog metil estera ili karboksilne kiseline. Zbog nepredvidivih prinosa reakcije i/ili poteškoća u izolovanju derivata hidroksamskih kiselina, razvijeni su komercijalno dostupni donori hidroksilamina, kod kojih je kiseonik hidroksilamina supstituisan nekom zaštitnom grupom. Primeri takvih reagensa dati su na **Šemi 4**. Sinteza supstituisanih hidroksamata zasniva se na aktivaciji karboksilne kiseline kuplujućim reagensima (najčešće EDC, 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid u obliku hidrohloridne soli) uz hidroksibenzotriazol (HOBt) u odgovarajućem rastvaraču (DCM, DMF). Intermedijedni hidroksamat je često lipofilniji, pa ga je moguće hromatografijom na koloni izolovati i ukloniti polaznu karboksilnu kiselinu. Uklanjanje zaštitne grupe na hidroksamskoj kiselini izvodi se uz korišćenje p-toluensulfonske kiseline (p-TsOH), hlorovodonične kiseline, trifluorosirćetne kiseline (TFA)²⁵¹.



Šema 4. Sinteza derivata hidroksamskih kiselina pomoću donora hidroksilamina

Primer sinteze skriptaida, kao naftalimidnog derivata hidroksamske kiseline, prikazan je na Šemi 5²⁵². Primećeno je da dolazi do degradacije naftalimidnog jezgra kada se za dobijanje skriptaida koristi nesupstituisani hidroksilamin. Kao pogodna alternativa za njegovu sintezu, upotrebljen je zaštićeni hidroksilamin (THPO-NH₂), i nastali intermedijer hidrolizom acetala pomoću p-TsOH u 2-propanolu daje krajnji proizvod (skriptaid, neselektivni HDAC inhibitor).



Šema 5. Prikaz sintetske procedure za dobijanje skriptaida

Postoje dve važne karakteristike derivata hidroksamskih kiselina, koje sintetskim hemičarima mogu da pomognu u identifikaciji derivata hidroksamskih kiselina, pre strukturne analize NMR spektroskopijom ili masenom analizom, a to su:

- mrlje koje potiču od hidroksamskih kiselina na TLC pločici se boje crveno pomoću rastvora gvožđe (III)-hlorida, FeCl₃ i
- uparavanjem rastvarača (najčešće etil-acetata) nakon hromatografije na koloni, hidroksamske kiseline pene u balonu i kristališu kao igličasti kristali.

1.7. Biološki modeli za ispitivanje efekata selektivnih HDAC6 inhibitora

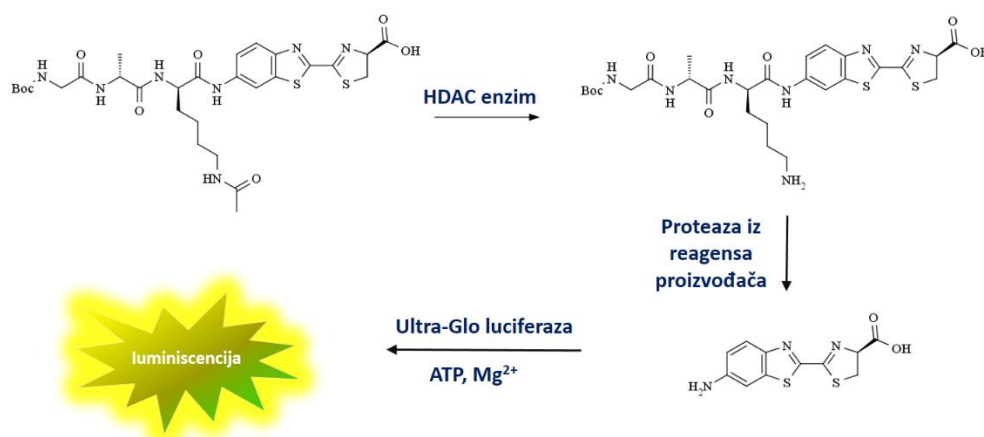
Klasični epigenetički HDAC inhibitori (inhibitori nuklearnih HDAC izoformi, klase I) indukuju hiperacetilaciju histona H3 i H4. Antineoplastični efekat HDAC inhibitora klase I inhibira ćelijske događaje koji iniciraju tumorogenezu (indukcija apoptoze, diferencijacija, zastoje u ćelijskom ciklusu, indukcija mitohondrijskog stresa)^{253,254}.

U slučaju HDAC6 inhibitora, zbog prethodno opisane citoplazmatske lokalizacije i implikacija u deacetilaciji proteina koji ulaze u sastav citoskeleta, očekivano je da inhibicija HDAC6 interferira sa procesima progresije tumora. Drugim rečima, selektivni HDAC6 inhibitori predstavljaju obećavajuću klasu inhibitora koji u precizno definisanim koncentracijama pri *in vitro* i *in vivo* uslovima treba da inhibiraju nastanak i diseminaciju metastatskog fenotipa maligne bolesti, pre nego da indukuju citotoksični efekat.

1.7.1. *In vitro* enzimski HDAC testovi za profilisanje nosintetisanih jedinjenja

Prvi korak u profilisanju inhibitora histon deacetilaza podrazumeva korišćenje odgovarajućeg enzimskog testa pomoću koga se definiše inhibitorna koncentracija, IC₅₀. Za ispitivanje HDAC6 selektivnosti nosintetisanih jedinjenja, potrebno je upotrebiti barem dva izoenzima iz klase I i IIb (npr. HDAC1 i HDAC6). Najčešće korišćeni *in vitro* enzimski testovi za profilisanje novih inhibitora su fluorometrijski (Fluor de Lys)²⁵⁵ i luminiscentni testovi. U ovoj doktorskoj disertaciji biće prikazani luminiscentni (bioluminogeni) testovi, jer su oni korišćeni za profilisanje nosintetisanih inhibitora.

Luminiscentni test (HDAC-Glo I/II) se zasniva na korišćenju specifičnog tripeptidnog supstrata histon deacetilaza koji sadrži ε-acetilovani lizin. Na C-terminusu peptidnog supstrata je kuplovan amino-luciferin (**Slika 21**) koji nakon HDAC posredovane deacetilacije podleže hidrolizi amino-luciferinskog fragmenta pomoću peptidaze u sastavu reagensa proizvođača (*developer reagent*). Amino-luciferin je supstrat za rekombinantni enzim *Ultra-Glo* luciferazu, koji se nalazi u sastavu reagensa proizvođača, i količina svetlosti koja se završno emituje srazmerna je enzimskoj HDAC aktivnosti. U prisustvu inhibitora odgovarajuće HDAC izoforme kaskada prikazanih reakcija je onemogućena, što se detektuje manjom emisijom svetlosti ka detektoru luminiscencije (luminometru)²⁵⁶.



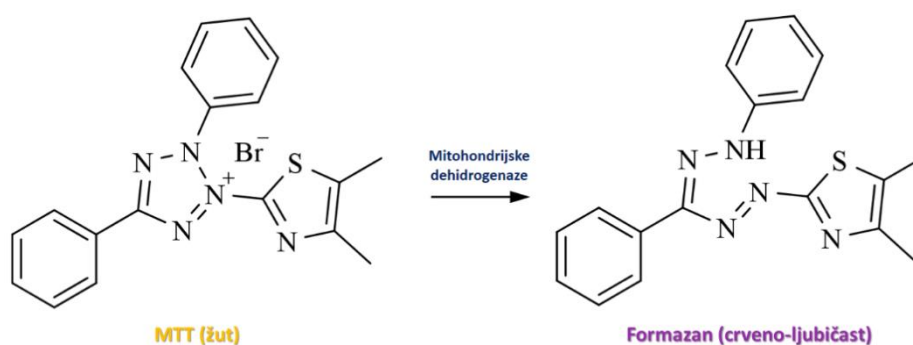
Slika 21. Pojednostavljeni prikaz HDAC-Glo I/II enzimskog testa. Odgovarajuća HDAC izoforma deacetiluje acetil-lizinski ostatak, nakon čega proteaza iz proizvođačevog reagensa hidrolizuje peptid i oslobađa luciferin koji postaje supstrat za rekombinantnu luciferazu.

Bioluminiscentni signal se meri na luminometru i srazmeran je deacetilaznoj aktivnosti HDAC izoforme.

1.7.2. Testovi za ispitivanje ćelijske vijabilnosti

U projektima otkrića i razvoja antikancerskih lekova jedan od najčešćih testova kojim se određuje (kvantifikuje) citotoksičnost novosintetisanih jedinjenja jeste **ispitivanje ćelijske vijabilnosti**. Vijabilnost ćelija podrazumeva određivanje broja zdravih ćelija u ćelijskoj kulturi kao indikatora metaboličke aktivnosti ćelija. Najčešći metabolički testovi za ispitivanje vijabilnosti ćelija zasnovani su na upotrebi tetrazolijum soli (**Slika 22**).

Test koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji je MTT i podrazumeva korišćenje žutog jedinjenja – **3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida** koji je supstrat za mitohondrijske dehidrogenaze. Test se zasniva na inkubaciji kancerskih (ili zdravih ćelija) sa prirodnim ili sintetskim jedinjenjima (najčešće u šest različitih koncentracija, počev od 100 μM kao najveće (top) koncentracije). Ćelije se inkubiraju 48 ili 72 časa, nakon čega im se dodaje MTT reagens. Vijabilne ćelije redukuju MTT do crveno-ljubičastog formazanskog jedinjenja koje se ne rastvara u vodi. Zbog niske rastvorljivosti formazana dodaje se deterdžent natrijum-dodecilsulfat. Nakon rastvaranja kristala formazana, očitava se apsorbancija na čitaču mikroploča i izračunava se polovina maksimalne inhibitorne koncentracije, IC_{50} (eng. *half-maximal inhibitory concentration*).



Slika 22. Prikaz reakcije redukcije MTT reagensa do formazanske boje u vijabilnim ćelijama

1.7.3. Test za ispitivanje apoptoze ćelija

Oštećenje ćelije izazvano ekstraćelijskim stimulusima aktivira signalne puteve u ćeliji koji dovode do ćelijske smrti. Najčešći fenomen ćelijske smrti koji indukuju antikancerski lekovi jeste **apoptoza**. Programirana ćelijska smrt, apoptoza ili ćelijski suicid, jeste antipod ćelijskom rastu i svaka ćelija ima precizne mehanizme za održavanje ravnoteže između ćelijskog rasta i ćelijske smrti.

Postoje dva načina pokretanja apoptoze ćelije: spoljašnji (ekstrinzični) i unutrašnji (intrinzični) put aktivacije apoptoze²⁵⁷. Centralni događaj u oba apoptotska puta jeste aktivacija kaspaza, proteolitičkih enzima. Spoljašnji put aktivacije apoptoze podrazumeva aktivaciju CD95 receptora smrti (receptora iz grupe TNF signalnih receptora) koji se nalazi na ćelijskoj membrani. Transmembranski CD95 receptori prenose signale preko svog intraćelijskog domena (domena smrti) koji aktivira kaspazu-8. Kaspaza-8 direktnim ili indirektnim signalnim putevima inicira apoptozu ćelije²⁵⁸. Za razliku od spoljašnjeg puta, unutrašnji put apoptoze podrazumeva aktivaciju mitohondrijskog proapoptotskog „arsenala

oružja”²⁵⁹. Signali koji pokreću unutrašnji put apoptoze indukuju stvaranje kanala na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Proapoptotski proteini iz familije BCL-2 stvaraju kanale i tako dovode do ruptуре mitohondrijske membrane i hiperpermeabilnosti međumembranskih proteina (prevashodno citohroma C) u citoplazmu.²⁶⁰ Signali receptora smrti i mitohondrijskog puta susstiču se na nivou kaspaze-3, koja aktivira nishodne apoptotske mehanizme, translokaciju fosfatidilserina ekstracelularno²⁶¹ i dovodi do smrti ćelije²⁵⁹.

Translokacija fosfatidilserina tokom apoptoze je posredovana kaspazama. Ekspresija fosfatidilserina na površini ćelije se detektuje korišćenjem Ca^{2+} zavisnog fosfolipid-vezujućeg proteina aneksina-V (Annexin-V) koji je obeležen fluorescentnom bojom (FITC – Fluorescein IzoTioCijanat). Metoda pomoću koje se detektuju apoptotične ćelije aneksinskim bojenjem je **protočna citometrija**. Ovim testom se može ispitati i kvantifikovati uticaj novosintetisanih jedinjenja na indukciju rane i kasne apoptoze. Nekrotične ćelije takođe eksprimiraju na svojoj površini fosfatidilserin, pa se protočnom citometrijom detektuju ćelije koje umiru nekrozom. Najčešće se prilikom ispitivanja apoptoze ćelija, pored Annexin-V koriste i boje koje se interkaliraju u strukturu DNK²⁶², kao što je propidijum-jodid ili 7-aminoaktinomycin D (7-AAD)²⁶³. 7-AAD ne prolazi spontano kroz intaktnu ćelijsku membranu i zbog toga je koristan u aneksinskom testu za bojenje kasnih apoptotičnih i nekrotičnih ćelija.

1.7.4. Test promene mitohondrijskog membranskog potencijala ćelija

Unutrašnji put apoptoze dovodi do fenomena „permeabilne tranzicije”, odnosno do poremećaja u mitohondrijskom membranskom potencijalu ($\Delta\Psi_m$). Stvaranje mitohondrijske permeabilne tranzicione pore (preko koje izlaze joni iz mitohondrija) dovodi do poremećaja u oksido-redukcionom statusu membrane mitohondrija, gubitka $\Delta\Psi_m$, što predstavlja signal rane faze apoptoze.

Test kojim se kvantifikuju ćelije u ranoj apoptozi se zasniva na korišćenju katjonske JC-1 boje, koja pomoću protočnog citometra detektuje zelenu (530 nm) ili crvenu (590 nm) fluorescencu. U navedenom testu se koristi fluorescentna katjonska boja JC-1 koja je lipofilna i akumulira se u mitohondrijama kao JC-1 monomer (emituje zelenu fluorescencu na 530 nm) ili JC-1 oligomer (emituje crvenu fluorescencu na 590 nm). Ukoliko je potencijal mitohondrijske membrane visok, JC-1 boja emituje crvenu fluorescenciju, za razliku od niskih vrednosti mitohondrijskog potencijala (odnosno prilikom pada $\Delta\Psi_m$) kada JC-1 boja emituje zelenu fluorescenciju. Smanjenje odnosa crvena/zelena fluorescencija detektovano na citometru predstavlja indikator pada mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) i upućuje na promene koje se dešavaju u ranoj apoptozi ispitivanih ćelija²⁶⁴.

1.7.5. Ispitivanje promena u ćelijskom ciklusu

Rast i umnožavanje ćelija se dešava zahvaljujući precizno regulisanom ćelijskom ciklusu. Da bi od jedne ćelije nastale dve ćerke ćelije, neophodno je da dođe do duplikacije genetičkog materijala (DNK) i posledične podele nuklearnog i citoplazmatskog materijala. Ćelijski ciklus se deli na četiri faze:

- **G1** (prva faza ćelijskog rasta u kojoj dolazi do povećanja volumena ćelije i pripreme za sintetsku fazu ćelijskog ciklusa);
- **S** (sintetska faza, period u kome se dešava replikacija DNK);
- **G2** (druga faza ćelijskog rasta u kojoj se sintetišu neophodni proteini za mitozu i dešava se homologa rekombinacija kojom se popravljaju prekidi u DNK lancima) i

- **M** (mitotička faza, faza u kojoj dolazi do deobe genetičkog materijala).

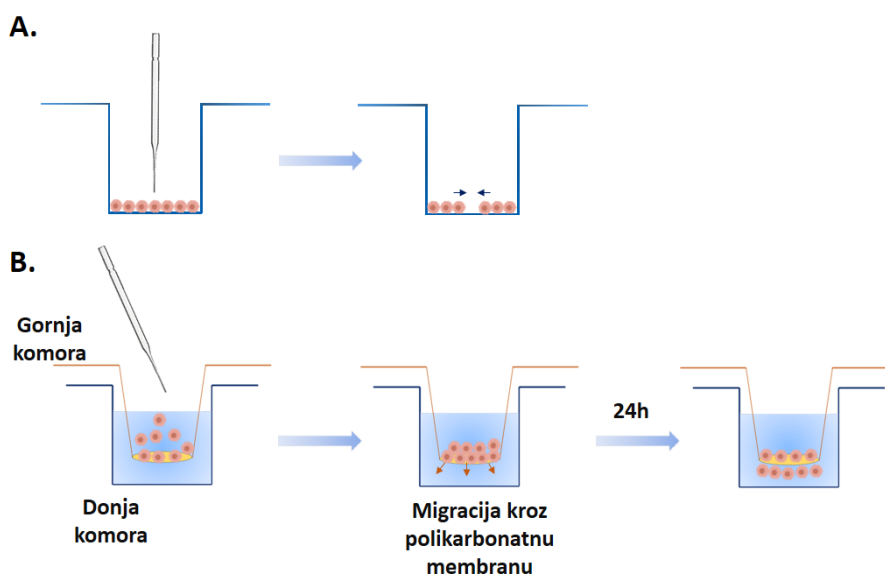
Završetkom mitoze (M faze), ćelija se deli na dve ćerke ćelije²⁶⁵.

Jedno od obeležja maligne bolesti jeste kontinuirano održavanje ćelijske proliferacije²⁶⁶. Protočna citometrija takođe je metoda izbora za određivanje distribucije testiranih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Zasniva se na fiksiranju ćelija hladnim etanolom (ispitivane ćelije postaju permeabilnije) i korišćenju propidijum-jodida (PI) kao DNK interkalirajućeg agensa. Propidijum-jodid nakon umetanja u DNK lance i ekscitacije plave svetlosti (488 nm) emituje fluorescentni signal koji se detektuje na citometru²⁶⁷. Moguće je da se PI veže i za RNK molekule, zbog čega se u protokolu za ispitivanje ćelijskog ciklusa koristi enzim ribonukleaza (RNA-za).

1.7.6. Test za ispitivanje ćelijske migracije

U osnovi metastatskog događaja je izmenjena dinamika ćelijske adhezije, povećana migrabilnost (motilitet) ćelija i epitelno-mezenhimski tranzicija. Kancerske ćelije mogu tokom rasta i nekontrolisane proliferacije da generišu metastatski fenotip, koji se razlikuje od primarnih malignih ćelija nastalih u organizmu. Metastatski fenotip karakteriše poremećena kontraktilnost, nestabilna dinamika citoskeletnih filamenata i invazivnost.

Danas se uticaj novosintetisanih jedinjenja na inhibiciju migracije kancerskih ćelija *in vitro* može izučavati u dvodimenzionalnim (2D) i trodimenzionalnim (3D) testovima. Najčešće korišćeni 2D testovi za ispitivanje antimigratornih svojstava novih supstanci su *scratch* ili *wound healing* test i test migracije kroz polikarbonatnu membranu (eng. *transwell migration assay*)²⁶⁸. U testu zarastanja rana ćelije se zaseju i kultiviraju tako da adheriraju u monosloju u korišćenim bazenima (procenat konfluencije 70 – 80%). Nakon toga se sterilnom Pasterovom pipetom pažljivo formira brazda (eng. *scratch*) na sredini bazena i ćelijska kultura se kultivira 24 časa sa ispitivanim jedinjenjima (**Slika 23A**). Nakon inkubacije, odstrani se ćelijski medijum, ćelije se oboje najčešće kristal-violet bojom i pomoću invertne mikroskopije softverskom podrškom se kvantifikuje rastojanje (dijametar) brazde pre i posle tretmana ćelija sa ispitivanim inhibitorima²⁶⁹.



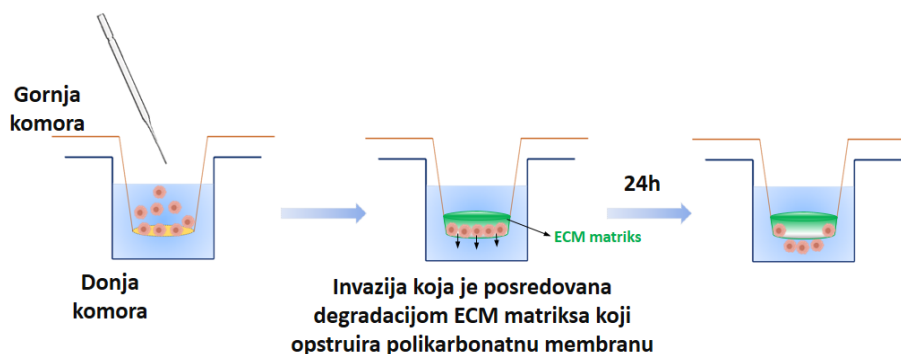
Slika 23. A. Uprošćeni prikaz *scratch* testa. B. Prikaz izvođenja testa migracije kroz polikarbonatnu membranu (*transwell migration assay*).

Iako najčešće korišćen, *scratch* test nije standardizovan između laboratorija, što mu se pripisuje kao jedan od nedostataka. Test migracije kroz polikarbonatnu membranu podrazumeva aplikaciju ćelija u gornju komoru i praćenje promena u migraciji ćelija u donju komoru nakon tretmana ispitivanim supstancama (**Slika 23 B**). Posle 24 časa od tretmana, preostale ćelije u gornjoj komori se uklone, a ćelije na donjem delu polikarbonatne membrane se fiksiraju hladnim metanolom i boje 0,1% kristal-violetom. Obojene ćelije se fotografišu i kvantifikuju pomoću odgovarajućeg softvera²⁷⁰.

1.7.7. Test za ispitivanje ćelijske invazije

Invazivnost kancerskih ćelija je obeležje maligne bolesti koje karakteriše enzimski posredovana degradacija tkivnog ekstraćelijskog matriksa i prodor ćelija kancera u vaskularni i limfatični sistem. Razlika između migracije i invazije, kao esencijalnih komponenata metastatskog događaja, je u osobini invazivnog fenotipa da degradira bazalnu membranu koristeći matriksne enzime²⁷¹.

Najčešće korišćeni *in vitro* test kojim se ispituje efekat novosintetisanih jedinjenja na invazivni potencijal kancerskih ćelija jeste test invazije kroz bazalnu membranu dobijenu iz mišjih sarkomskih ćelija (engl. *Matrigel*). U ovom testu ćelije se zaseju u gornju komoru u kojoj se na polikarbonatnom filteru (membrani) nalazi ekstraćelijski proteinski matriks (*matrigel*, sastavljen od proteina laminina i kolagena, heparan sulfat proteoglikana i faktora rasta²⁷²). Matrigel imitira svojstva bazalne membrane – *in vivo*. Ujedno, ekstraćelijski matriks opstruira pore na polikarbonatnoj membrani, zbog čega ćelije sa invazivnim svojstvima degradiraju matriks i prodiru na suprotnu stranu membrane (u donju komoru), dok neinvazivne ćelije ostaju u gornjoj komori (**Slika 24**). Broj ćelija koje su dospele na donji deo membrane kvantifikuje se koristeći fluorescentne boje ili svetlosni mikroskop²⁷³.



Slika 24. Šematski prikaz *in vitro* testa za ispitivanje anti-invazivnih osobina novosintetisanih supstanci

2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Formiranje i validacija prediktivnih modela kvantitativnog odnosa trodimenzionalne strukture i inhibitorne aktivnosti (3D-QSAR) za grupu objavljenih inhibitora histon deacetilaze 1 i histon deacetilaze 6 (racionalni dizajn baziran na strukturi liganada).
2. Kompjutersko dizajniranje novih, selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6 zasnovano na:
 - Analizi statistički najznačajnijih GRIND deskriptorskih promjenljivih izračunatih u oba 3D-QSAR modela (za HDAC1 i HDAC6 inhibitornu aktivnost);
 - Identifikaciji novih fragmenata kao potencijalnih CAP grupa na osnovu deskriptorske sličnosti sa 1,8-naftalimidskim fragmentom;
 - Identifikaciji novih cink-vezivnih grupa koje doprinose selektivnosti inhibitora ka HDAC6 izoformi.
3. Sinteza selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6, kao derivata:
 - 1-difenilmetil piperazina (1-benzhidrlnog piperazina) i
 - 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona (fenitoina)na osnovu zaključaka dobijenih u studijama kompjuterskog dizajniranja lekova.
4. Određivanje inhibitornih koncentracija (IC₅₀) novosintetisanih jedinjenja na humanim HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8 izoenzimima koristeći *in vitro* enzimske testove koji se zasnivaju na detekciji luminiscencije.
5. Ispitivanje antikancerskih efekata novosintetisanih jedinjenja na ćelijskim modelima kancera dojke (MDA-MB-231 i MCF-7):
 - Određivanje citotoksičnosti novosintetisanih jedinjenja u testu ćelijske vijabilnosti (MTT test);
 - Ispitivanje efekata sintetisanih jedinjenja na indukciju apoptoze;
 - Ispitivanje efekata sintetisanih jedinjenja na promene mitohondrijskog membranskog potencijala;
 - Ispitivanje efekata sintetisanih jedinjenja na promene u ćelijskom ciklusu i
 - Identifikacija vodećeg antikancerskog jedinjenja, kvantifikacija subapoptotskih koncentracija.
6. Ispitivanje antimigratornih i antiinvazivnih osobina vodećih jedinjenja u dvodimenzionalnih testovima migracije (eng. *transwell migation* i *wound healing*) i invazije (eng. *matrigel invasion*) na ćelijama kancera dojke.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Priprema 3D-QSAR modela za HDAC1 i HDAC6 inhibitornu aktivnost

3.1.1. Kompiuterski softveri za pripremu 3D-QSAR studija i molekularni doking

- *Marvin Sketch* 6.1.0 program (Chem Axon 2013, Budapest, Hungary)
- *ChemDraw Ultra* 7.0.0 (CambridgeSoft Corporation. 2013. Cambridge, MA, USA)
- *ChemBio3D Ultra* 13.0 (CambridgeSoft Corporation. 2013. Cambridge, MA, USA)
- *Gaussian 09* program (Gaussian, Inc., Pittsburgh, SAD 1998)
- *Pentacle* softver 1.07 (Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italia 2013)
- SPSS v.20.0 software (IBM Corp. Released 2011. Armonk, New York)
- *GOLD Software* 5.6.0 (The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), Cambridge, UK)

3.1.2. Priprema molekula za 3D-QSAR modelovanje

Molekuli koji su korišćeni za pripremu 3D-QSAR modela su preuzeti iz ChEMBL baze jedinjenja (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Preuzeta su dva skupa jedinjenja, inhibitori histon deacetilaze 1 (36 jedinjenja, **Prilog 7.1**) i inhibitori histon deacetilaze 6 (32 jedinjenja, **Prilog 7.2**) čije su konstante inhibicije (K_i vrednosti) korišćene kao zavisna promenljiva za pripremu 3D-QSAR modela. Odabir inhibitora je zasnovan na nekoliko važnih kriterijuma:

- a) Tip enzimskog testa (odabrana su jedinjenja koja su testirana u *in vitro* enzimskim testovima, eliminisana su jedinjenja čija je aktivnost određena u ćelijskim testovima),
- b) Poreklo enzima korišćenog u testu (odabrani su testovi kod kojih su histon deacetilaze 1 i 6 bile humanog porekla) i
- c) Hemija cink-vezivne grupe (odabrani su derivati hidroksamskih kiselina).

Dvodimenzionalne hemijske strukture inhibitora su sačuvane u *.sdf* fajlu. Pomoću Marvin Sketch 6.1.0 softvera su određeni dominantni hemijski oblici odabranih HDAC1 i HDAC6 inhibitora pri fiziološkim uslovima (pH=7,4). Svaki inhibitor je sačuvan u obliku pojedinačnog *.mol* fajla, nakon čega su modelovane trodimenzionalne konformacije jedinjenja u programu ChemBio3D Ultra 13.0. Program ChemBio3D koristi Gaussian 09 softver za geometrijske optimizacije molekula, pri čemu su odabrani inhibitori optimizovani pomoću *ab initio* Hartree-Fock/3-21 G metode. Nakon geometrijskih optimizacija svih pripremljenih inhibitora, molekuli su sačuvani kao *.mol2* fajlovi i kao takvi korišćeni za studije molekularnog dokinga.

Vrednosti bioloških aktivnosti odabranih inhibitora za QSAR studije su pretvorene u pK_i vrednost, koja predstavlja negativan dekadni logaritam konstante inhibicije, $pK_i = -\log_{10}(K_i)$.

3.1.3. Molekulski doking – generisanje bioaktivnih konformacija HDAC inhibitora

Da bi se uspešno pripremile bioaktivne konformacije inhibitora čija vezivna konformacija nije razrešena kristalografijom, primenjena je metoda molekulskog dokinga. Molekulski doking (u daljem tekstu samo doking) je izveden u programu *GOLD*, verzija programa 5.6.0. Uzimajući u obzir da su kristalne strukture humane histon deacetilaze 1 (PDB : 5ICN) kao i humane histon deacetilaze 6 (PDB : 5EDU) određene kristalografijom, moguće je validiranom postavkom doking procedure predvideti vezivne konformacije odabranih inhibitora za 3D-QSAR studije.

Pet inhibitora HDAC6 izoforme koji su preuzeti iz ChEMBL baze za 3D-QSAR modelovanje imaju razrešenu trodimenzionalnu bioaktivnu konformaciju (konformacija inhibitora u vezivnom džepu HDAC6) i kao takvi su korišćeni za pripremu modela, bez prethodnih geometrijskih optimizacija. Inhibitori čije bioaktivne konformacije su preuzimane iz kristalnih struktura su dati ispod, zajedno sa PDB kodovima kompleksa HDAC6-inhibitor:

- **5EDU** (kompleks HDAC6 - ChEMBL99)
- **5EEI** (kompleks HDAC6 - ChEMBL98)
- **5EF8** (kompleks HDAC6 - ChEMBL483254)
- **5EEN** (kompleks HDAC6 - ChEMBL408513)
- **5EFB** (kompleks HDAC6 - ChEMBL314389)

Prilikom pripreme doking procedure u *GOLD* 5.6.0 softveru, na obe izoforme histon deacetilaza definišu su sledeći parametri:

- **Odabir konfiguracionog šablona** *gold_metallo_protease_gen_VS* osigurava da će u *GOLD*-u biti izveden doking na metaloenzimima, za koje su definisane metal-ligand međumolekulske interakcije
- **Vezivno mesto za doking inhibitora** je definisano u prečniku od 8Å u odnosu na kristalne ligande (za HDAC1 u odnosu na pentapeptidni kokristalni inhibitor, dok je u kristalnoj strukturi HDAC6 izoforme vezivno mesto definisano u odnosu na trihostatin A)
- **Vodonici koji nedostaju u proteinu i/ili ligandu** se dodaju odabirom opcije Add hydrogens.
- **Uzorkovanje torzionih uglova fleksibilnih veza** u strukturama pripremljenih inhibitora je izvedeno pomoću genetskog algoritma odabirom polja Torsion Angle Distributions.
- **Broj uzorkovanih konformacija (Genetic algorithm run)** je podešen na 100 sa efikasnošću pretraživanja podešenim na 100%.
- **Odabrana funkcija vrednovanja (Scoring function)** je ChemScore, jer je ova empirijska funkcija razvijena i validirana da izračunava metal-ligand interakcije. Jednačina po kojoj se izračunava ChemScore vrednost je označena ispod:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{metal}} + \Delta G_{\text{lipo}} + \Delta G_{\text{rot}} \quad (7)$$

$$\text{ChemScore} = \Delta G_{\text{binding}} + P_{\text{clash}} + c_{\text{internal}} P_{\text{internal}} + (c_{\text{covalent}} P_{\text{covalent}} + P_{\text{constraint}}) \quad (8)$$

pri čemu ΔG_{bond} , ΔG_{metal} , ΔG_{lipo} su parametri pomoću kojih se procenjuju doprinosi slobodne energija vezivanja za građenje vodoničnih interakcija, metal-ligand i hidrofobnih interakcija. Parametar ΔG_{rot} izračunava gubitak energije po torzionom stepenu slobode, dok parametri P_{internal} , P_{covalent} i $P_{\text{constraint}}$ izračunavaju gubitak slobodne energije u slučaju kada se uspostave nedozvoljene međumolekulske interakcije, kovalentne veze i strukturna ograničenja.

- **Kompleks Zn^{2+} - hidroksamat** može da nagradi tetraedarsku geometriju (4), trigonalnu bipiramidu (5) i oktaedarsku geometriju (6).
- **Broj konformacija koje se čuvaju** za tumačenje vezivnih poza je šest za svaki inhibitor.

Validacija doking procedure je izvedena dokingom ko-kristalnih liganada, nakon čega je izračunata vrednost RMSD (eng. *Root-Mean-Square Deviation*). Da bi procedura dokinga bila validna, odabrana su doking podešavanja kod kojih je RMSD vrednost bila manja ili jednaka 2Å^{274} .

Odabir virtuelnih bioaktivnih konformacija se zasniva na detaljnom razmatranju vezivnih poza i međumolekulskih interakcija enzim-inhibitor i vrednosti ChemScore funkcija (odabiraju su konformacije sa najvećim vrednostima ChemScore-a). Dodatno, kriterijum za odabir bioaktivnih konformacija je uspostavljanje koordinativnih veza sa katalitičkim jonom Zn^{2+} (monodentatno ili bidentatno koordiniranje).

3.1.4. Izračunavanje GRIND deskriptora i izdvajanje jedinjenja koja grade 3D-QSAR model

Program *Pentacle* verzija 1.07 je upotrebljen za izračunavanje trodimenzionalnih molekularnih deskriptora nezavisnih od poravnanja (GRIND) i dobijanje 3D-QSAR modela⁶¹. Izračunavanje GRIND deskriptora zasnovano je na konceptu polja molekulskih interakcija (MIF)²⁷⁵, korišćenjem različitih proba (malih molekula ili fragmenata molekula) koje imitiraju važne međumolekulske interakcije ligand-receptor. Hidrofobne interakcije za pripremljene HDAC1 i HDAC6 inhibitore izračunate su pomoću DRY probe. Funkcionalne grupe koje mogu da grade vodonične interakcije su ispitane pomoću vodonično-akceptorske probe **O** (sp^2 , karbonilni kiseonik) i vodonično-donorske probe **N1** (amidski azot). Sterne interakcije i oblik jedinjenja su ispitani pomoću TIP probe⁶⁰.

Kada se izračunavaju polja molekulskih interakcija, razmak između tačaka u okviru trodimenzionalnog kaveza po kome se kreću probe je podešen na $0,5\text{Å}$. Uzimajući u obzir da se za jedno jedinjenje može definisati i do 100 000 energetski favorizovanih regiona (čvorova), izdvajanje (ekstrakcija) najrelevantnijih polja interakcija se izvodi koristeći ALMOND algoritam. ALMOND algoritam izdvaja čvorove (mesta interakcije proba-funkcionalna grupa jedinjenja) koji imaju negativne vrednosti energije i čija je apsolutna vrednost visoka²⁷⁶. Nakon identifikacije najrelevantnijih interakcija, proizvodi energija interakcija najvećih vrednosti se skladište i kodiraju u geometrijske GRIND promenljive. Sve GRIND promenljive koje se čuvaju kao najznačajnije za ispitivani skup inhibitora se mogu vizuelizovati u *Pentacle* programu na trodimenzionalnim prikazima struktura inhibitora. Vrednosti proizvoda energije dva ista ili različita tipa polja unose se u auto (između istih tipova polja, npr. O-O) i unakrsne (između različitih tipova polja, npr. DRY-TIP) korelograme, koristeći CLACC algoritam, pomoću koga se izračunavaju distance između dva čvora (polja), koristeći identifikator raspona (eng. *smoothing window*) koji se uobičajeno postavlja na $0,8\text{Å}$.

Najčešće se korišćenjem CLACC algoritma dobija više od 1000 GRIND promenljivih, koje se redukuju primenom frakcionog faktorskog dizajna (FFD) u programu *Pentacle*. Redukcijom broja promenljivih se poboljšava kvalitet modela. Potrebno je redukovati broj promenljivih u maksimalno 2 do 3 ponavljanja FFD, kako se ne bi dobili pretrenirani (slučajni) 3D-QSAR modeli. Tokom FFD potrebno je obratiti pažnju na statističke vrednosti parametara kvaliteta modela (interna validacija – R^2 , Q^2 , broj latentnih promenljivih).

Na osnovu *Principal Component Analysis* dijagrama (PCA plot), celokupan skup preuzetih jedinjenja sa ChEMBL-a (poštujući OECD princip sličnosti), se razdvaja na *training* (70%) i *test set* (30%) jedinjenja odabirom jedinjenja koja se nalaze blisko u deskriptorskom prostoru (imaju slične vrednosti deskriptora). Dodatno, prilikom pripreme training set jedinjenja za 3D-QSAR model, važno je obratiti pažnju na uniformnu raspodelu bioloških aktivnosti (pKi) jedinjenja u training setu, kao i odsustvo većih razlika u biološkoj aktivnosti ($\Delta pKi \sim 15\%$ logaritamske vrednosti) između dva jedinjenja sličnih bioloških aktivnosti.

3.1.5. Protokol za izvođenje 3D-QSAR studije u programu *Pentacle*

Nakon izdvajanja test set jedinjenja na osnovu pravila sličnosti (PCA plot) i OECD preporuka, 3D-QSAR modeli se generišu prateći sledeće smernice:

- Pripremljeni inhibitori za 3D-QSAR studiju (sa konformacijama izdvojenim nakon molekuskog dokinga) se dodaju u program *Pentacle*. U istom koraku im se dodeljuju imena (ChEMBL kodovi) i eksperimentalne vrednosti (Y promenljiva, pKi vrednost). Za svaku izoformu se pripremaju posebni, odvojeni modeli.
- Pre nego što se izračunaju GRIND deskriptori, potrebno je u prozoru sa svim jedinjenjima privremeno ukloniti (poništiti, engl. *uncheck*) test set jedinjenja, kako bi se pripremio model koji čine training set jedinjenja.
- Kao algoritam za diskretizaciju se odabira ALMOND, a kao algoritam za kodiranje GRIND promenljivih u korelograme, odabira se unapređeni CLACC algoritam.
- Nakon odabira algoritama, program izračunava GRIND deskriptore i izdvaja one sa najvećim uticajem na biološku aktivnost.
- Potrebno je odabrati polje za pripremu PCA i PLS regresionog modela i redukovati broj GRIND deskriptora pomoću FFD.
- Primenom FFD ponavljanja prate se parametri interne validacije - koeficijent determinacije- R^2 , kvadrat koeficijenta korelacije dobijen ukrštenom ili kros-validacijom – Q^2 i greška predviđanja pKi vrednosti za jedinjenja training seta – RMSEE. Potrebno je izvan programa *Pentacle* izračunati linearnu korelaciju (R^2_{obs} vs R^2_{pred}) između stvarnih (eksperimentalnih) vrednosti pKi_{obs} i vrednosti predviđenih modelom, pKi_{pred} .
- Model ima internu (unutrašnju) preciznost ukoliko zadovoljava sledeće kriterijume (**Tabela 10**):

Tabela 10. Prikaz numeričkih kriterijuma za prihvatanje unutrašnje preciznosti 3D-QSAR modela

Kriterijum	Parametri interne validacije		
	R^2	Q^2 (LOO)	RMSEE
	> 0,7	> 0,5	R^2_{obs} vs R^2_{pred}

- Nakon čuvanja preciznog i robustnog modela, predviđaju se biološke aktivnosti za test (eksterni) set jedinjenja i prate se osnovni parametri eksterne validacije dati u

Pentacle-u: R^2_{pred} – koeficijent determinacije za predviđanje test set jedinjenja, greška predviđanja test set jedinjenja (RMSEP). Potrebno je naknadno izračunati parametre r^2 metrike^{67,69} koristeći formule date u Uvodnom delu (Potpoglavlje 1.2.2, **Tabela 5**).

- Model ima dobru prediktivnu moć ukoliko zadovoljava sledeće kriterijume eksterne validacije (**Tabela 11**):

Tabela 11. Prikaz numeričkih kriterijuma za prihvatanje unutrašnje preciznosti 3D-QSAR modela

Parametri eksterne validacije								
	R^2_{pred}	RMSEP	r^2_m	r^2/m	$\overline{r^2_m}$	Δr^2_m	$\frac{r^2 - r_0^2}{r^2}$	k'
Kriterijum	> 0,6	$\leq 2RMSEE$	> 0,5	> 0,5	> 0,5	< 0,2	< 0,1	$0,85 \leq k' \leq 1,15$

- Domen primenljivosti se izračunava u programu SPSS v.20.0 software tako što se iz programa *Pentacle* izdvoje najznačajnije GRIND promenljive (ekstrakcijom sa dijagrama VarX selected-VarY) za svaku promenljivu od interesa. Za dati broj jedinjenja training seta (n) i vrednosti odabranih GRIND deskriptora (p) koje čine domen primenljivosti se izračunava granična vrednost h^* , prema formuli:

$$h^* = \frac{3(p+1)}{n}$$

Ovako dobijene vrednosti za svako jedinjenje (izračunato i za training i test set) se unose u Williams-ov dijagram, koji predstavlja zavisnost vrednosti h izračunate za svako jedinjenje u odnosu na standardizovane reziduale (izračunate u SPSS programu). Nakon dobijanja Williams-ovog dijagrama povlači se granična vrednost h^* i identifikuje da li sva jedinjenja pripadaju istom deskriptorskom prostoru i da li postoje jedinjenja izvan domena primenljivosti (*outlier*-i).

- S obzirom na to da kod novodizajniranih jedinjenja nije moguće izračunati standardizovane reziduale (jer ne postoje eksperimentalne vrednosti biološke aktivnosti), priprema se modifikovani Williams-ov dijagram unošenjem h vrednosti za svako dizajnirano jedinjenje i poređenjem sa definisanom graničnom vrednošću, h^* .

3.2. Odabir fragmenata za dizajn novih, selektivnih HDAC6 inhibitora

3.2.1. Selekcija biblioteka fragmenata za pretrage novih CAP grupa i softveri za izračunavanje deskriptora

- *The General Fragment* biblioteka (Life Chemicals)²⁷⁷ koja sadrži 40142 fragmenta
- *Epigenetic Targeted* biblioteka (Life Chemicals)²⁷⁷ koja sadrži 7019 fragmenata
- DRAGON software verzija 6,0 (Talete srl, 2010)
- Instant JChem v17.3.27.0 (Chem Axon, 2017)
<https://chemaxon.com/products/instant-jchem>

Odabrane biblioteke fragmenata od zastupnika Life Chemicals su prethodno filtrirane i sadrže fragmente koji odgovaraju pravilu trojke (eng. *Rule of three*, R03)⁷². CAP grupa HDAC6 inhibitora skriptaida, 1,8-naftalimid, je korišćena kao šablon za identifikaciju novih CAP grupa iz odabranih biblioteka fragmenata.

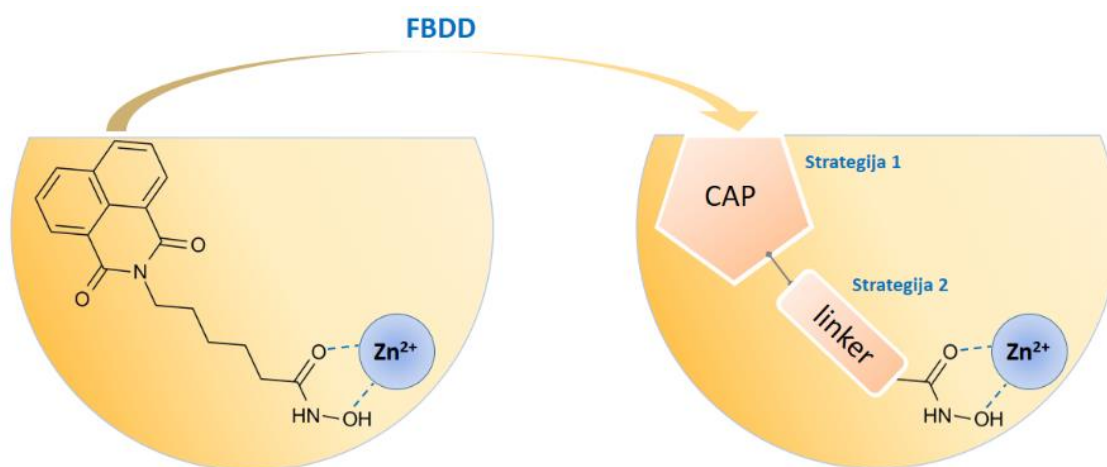
3.2.2. Izračunavanje deskriptora za odabir novih CAP grupa

U programu Dragon, v. 6,0 su izračunati deskriptori **McGowan zapremina** (Vx), **Moriguchi particioni koeficijent oktanol-voda** (MLogP) i ukupna površina fragmenta izračunata iz *van der Waals*-ovih prečnika (Sa_{tot}). Izračunate vrednosti deskriptora za obe biblioteke fragmenata su upoređene sa vrednostima istih deskriptora za 1,8-naftalimidni heterociklus, sa ciljem da se identifikuju novi fragmenti koji mogu da posluže za zamenu 1,8-naftalimida u dizajnu novih selektivnih HDAC6 inhibitora (**scaffold hopping** strategija dizajna zasnovana na fragmentom pristupu).

3.2.3. Dizajniranje novih inhibitora histon deacetilaza

Na osnovu informacija dobijenih iz 3D-QSAR modela i skrininga fragmentnih biblioteka, dizajn novih selektivnih HDAC6 inhibitora baziran je na dve strategije (Slika 25):

- **Strategija 1** – Supstitucija 1,8-naftalimidnog heterociklusa novim CAP grupama, bez izmene dužine ugljovodoničnog linkera (C6)
- **Strategija 2** – Supstitucija 1,8-naftalimidnog heterociklusa novim CAP grupama, uz izmenu dužine ugljovodoničnog (C8) ili aromatičnog (fenil) linkera.



Slika 25. Slikoviti prikaz strategija u dizajniranju novih selektivnih HDAC6 inhibitora zasnovanih na rezultatima 3D-QSAR studija

3.2.4. Predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih parametara dizajniranih jedinjenja

Program ADMET Predictor, verzija 8.5.0 je upotrebljen za izračunavanje najznačajnijih fizičko-hemijskih (osnovna rastvorljivost, lipofilnost, rastvorljivost) i farmakokinetičkih (procena rizika za gastrointestinalnu apsorpciju i procena odstupanja od pravila petice po Lipinskom) parametara za dizajnirana jedinjenja i model inhibitor – skriptaid. Izračunati parametri su upoređeni sa vrednostima dobijenim za skriptaid, kao potentni HDAC6 inhibitori. Odabir jedinjenja za sintezu je zasnovan na razlikama u predviđenim inhibitornim konstantama ($\Delta pKi = pKi_{HDAC6} - pKi_{HDAC1}$) i vrednostima izračunatih ADMET parametara.

3.3. Priprema biblioteke fragmenata za virtuelni skrining novih cink-vezivnih grupa

Priprema biblioteke fragmenata sa metal-helirajućim svojstvima je izvedena kombinacijom fragmenata iz tri izvora:

- Originalnih naučno istraživačkih radova autora Jacobsen et al., 2011²⁷⁸ i Chen et al., 2013²⁷⁹
- Chelator Fragment biblioteka (Otava Chemicals)²⁸⁰
- ZINC15 biblioteka²⁸¹

Fragmenti iz prva dva izvora su filtrirani u softveru Instant JChem v17.3.27.0, pri čemu su kriterijumi za filtraciju bili parametri R03 pravila. Nakog toga je upotrebljena FAF-*drug* alatka za filtriranje potencijalnih fragmenata koji predstavljaju toksikofore, agregatore u *in vitro* testovima, kao i fragmente koji daju lažno pozitivne rezultate (PAINS)²⁸². Konačno, uklanjanjem lažno-pozitivnih fragmenata, generisana je **FL1** databaza.

Druga značajno veća biblioteka ZINC15 (<https://zinc15.docking.org/>), je filtrirana u Instant JChem v17.3.27.0 programu koristeći kriterijume Pravila 3 (broj donora/broj akceptora vodoničnih veza ≤ 3 , broj rotabilnih veza ≤ 3 , broj asimetričnih atoma ≤ 1 , broj prstenova ≤ 2). Ovi fragmenti su posledično filtrirani prema kriterijumima FAF-*drug* alatki i uklonjene su poznate cink-vezivne grupe u strukturi HDAC inhibitora. Ukupan broj jedinjenja nakon inicijalne filtracije je 183 223 fragmenta. Zbog izuzetno velikog broja odabranih fragmenata ZINC15 biblioteke, program FLAP je iskorišćen za virtuelno prefiltriranje biblioteke metal-helatnih fragmenata na osnovu kristalne strukture HDAC6 izoforme u binarnom režimu. Za virtuelnu prefiltraciju, izračunati su kvadrupleti za katalitički džep HDAC6 izoforme kao šablona i upoređeni sa kvadrupletima fragmenata ZINC baze. Prefiltrirani fragmenti su koristeći bit-string modalitet (1-prisutna, 0-odsutna farmakoforna karakteristika) upoređeni (preklopljeni) sa delom katalitičkog džepa oko jona Zn^{2+} i rangirani na osnovu GlobalSum funkcije. Najbolje rangirani fragmenti su sačuvani kao **FL2** databaza.

3.3.1. Validacija virtuelnog skrininga fragmenata zasnovanog na strukturi HDAC6 enzima

Da bi procedura virtuelnog skrininga bila pouzdana, sa ChEMBL databaze (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) su preuzeti poznati fragmenti sa cink-vezivnim osobinama. Odabrani fragmenti su korišćeni kao validacioni set jedinjenja za procenu performansi virtuelnog skrininga. Kriterijum za odabir fragmenata je:

- Molekulska masa ≤ 250
- Postojanje *in vitro* enzimske aktivnosti na HDAC6 izoformi
- Postojanje granične vrednosti za aktivne odnosno neaktivne fragmente na HDAC6 izoenzimu, tako da su fragmenti sa vrednosti $IC_{50} \leq 10 \mu M$ označeni kao aktivni, dok su kao neaktivni fragmenti izdvojeni oni čija je $IC_{50} > 10 \mu M$. Fragmenti čija je vrednost IC_{50} bila u intervalu 7,5 – 10 μM nisu korišćeni za pripremu validacionog seta jedinjenja.

3.3.2. Virtuelni skrining zasnovan na strukturi HDAC6 katalitičkog džepa

Neophodni resursi za izvođenje studije virtuelnog skrininga na trodimenzionalnoj kristalnoj strukturi HDAC6 izoforme su:

- Kristalna struktura humane HDAC6, drugog katalitičkog domena ([5EDU](#)) – preuzeta sa sajta Protein Data Bank
- Fragmentna databaza FL1 – sačinjena od 268 fragmenata
- Fragmentna databaza FL2 – sačinjena od 1501 fragmenta
- Validacioni set fragmenata (aktivne i neaktivne HDAC6-Zn²⁺ vezivne grupe)
- FLAP 2.1.0 program (Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italija 2015)

U programu FLAP je dodata kristalna struktura drugog katalitičkog domena HDAC6 izoforme²¹², pri čemu je odabran katalitički jon Zn²⁺ kao središte sfere za računanje molekulskih polja interakcija, u prečniku od 2,5 Å. GRID probe (H, N1, O i DRY) su korišćene za identifikaciju farmakofornih tačaka u okviru HDAC6 katalitičkog džepa. Proba H definiše molekulski oblik, proba N1 identifikuje akceptore vodoničnih veza, proba O identifikuje bočne nizove aminokiselina koji su donori vodoničnih veza i proba DRY definiše hidrofobne regione u ispitivanom džepu. Definisanjem farmakofore vezivnog džepa pomoću 4 probe generiše se farmakoforni šablon koji se koristi za preklapanje sa farmakofornim karakteristikama ispitivanih fragmenata. Mera preklapanja farmakofornih tačaka u FLAP programu može da se izračuna pomoću 19 različitih skorova⁵². Skrining je izveden u visoko preciznom modalitetu, korišćenjem pripremljenih databaza fragmenata FL1 i FL2, kao i validacionog seta fragmenata. FLAP program konstruiše i ROC (eng. *receiver operating curves*) krive koje služe za interpretaciju performansi virtuelnog skrininga.

3.3.3. Molekulski doking fragmenata

Najbolje rangirani fragmenti nakon virtuelnog skrininga su dokovani u trodimenzionalne kristalne strukture HDAC1 (PDB: [5ICN](#)), HDAC 4 (PDB: [4CBY](#)) HDAC6, drugi katalitički domen (PDB: [5EDU](#)) i HDAC8 (PDB [3SFF](#)) u programu *GOLD* 5.6.0. Enzimi su pripremljeni pomoću platforme PlayMolecule, protonacije aminokiselina su pripremljene na pH=7,4, uklonjeni su molekuli vode, osim katalitičkog molekula vode u blizini jona cinka.

Svi fragmenti su pripremljeni na isti način, tako što su dvodimenzionalne strukture minimizovane u ChemBio3D Ultra, koristeći MM2 metodu minimizacije. Sve funkcionalne grupe koje jonizuju u pripremljenim fragmentima su pripremljene u programu Marvin Sketch, vodeći računa da % jonizacije na fiziološkom pH bude preko 50% (dominantna forma).

Doking fragmenata na sve četiri odabrane izoforme je izveden odabirom sledećih parametara u programu *GOLD*:

- Konfiguracioni šablon za doking fragmenata je *gold_metallo_protease_gen_VS*
- Vezivni džep je definisan oko katalitičkog jona Zn²⁺ u prečniku od 8Å

- Omogućeno je da sve fleksibilne veze slobodno rotiraju tokom uzorkovanja konformacija fragmenata
- Broj konformacija koji je sačuvan za interpretaciju dokinga je 6
- ChemScore funkcija vrednovanja je korišćena za procenu, rangiranje i odabir fragmenata na sve četiri HDAC izoforme

Validacija doking procedure je procenjena izračunavanjem RMSD vrednosti za doking na svakoj izoformi. Izbor potencijalno novih, nehidroksamskih cink-vezivnih fragmenata je zasnovan na vrednosti ChemScore funkcije i načina koordinacije jona Zn^{2+} u aktivnom mestu. Uporedo sa vizuelizacijom vezivnih konformacija fragmenata, poređene su ChemScore vrednosti fragmenata sa vrednostima dobijenim za fenilhidroksamsku kiselinu, kao kontrolnu cink-vezivnu grupu.

3.3.4. Ispitivanje stabilnosti kompleksa HDAC6 i odabranih fragmenata molekulskom dinamikom

Na osnovu rezultata molekulskog dokinga, kompleksi najbolje rangiranih fragmenata na HDAC6 izoformi su pripremljeni za molekulsku dinamiku (MD). Softver GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) je korišćen za simulacije molekulske dinamike. Definisane topologije enzima je izvedeno pomoću AMBER99SB-ILDN polja sila, dok je parametrizacija liganada izvedena pomoću opšteg Amber polja sila (GAFF2, *General Amber force field*) računanjem parcijalnih atomskih naelektrisanja pomoću HF-6-31G* baznog seta. Program koji je omogućio jednostavniju parametrizaciju fragmenata je AnteChamber Python Parser interfacE. Kompleksi enzim-fragment su solvatisani molekulima vode, koristeći TIP3P model, i dodati su joni Na^+ u oktaedarsku jediničnu ćeliju. U strukturi HDAC6 izoenzima joni K^+ su zadržani.

Sistem za molekulsku dinamiku je minimizovan kroz 5000 koraka algoritmom opadajućeg gradijenta sa maksimalnom silom podešenom na $10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. Ekvilibracija sistema je izvršena prvo u NVT ansamblu za 100 ps na 310 K, koristeći Verscale termostat. Nakon toga, u NPT ansamblu na 100 ps je održavan pritisak od 1,0 bara pomoću Parrinello–Rahman barostata. Kretanje atoma proteina je bilo ograničeno, dok su molekuli vode i kontrajoni podešeni kao mobilni. Svaki kompleks HDAC6-fragment je simuliran 20 ns na konstantnoj temperaturi od 310 K i pri pritisku od 1 bara pomoću Particle Mesh Ewald (PME) pristupa za izračunavanje elektrostatičkih interakcija, koristeći 10 \AA kao graničnu vrednost. LINCS (*LINear Constraint Solver*) algoritam je korišćen za ograničenje veza, uključujući atome vodonika. Dobijene trajektorije su analizirane pomoću Gromacs *gmk_rms* i *gmk_rmsf* alatki.

3.4. Sinteza derivata 1-(difenilmetil)-piperazina (1-benzhidrilnog piperazina)

3.4.1. Sintetski prekursori, reagensi i rastvarači

- 1-(difenilmetil)-piperazin, ≥98.0% (NT), Sigma Aldrich
- Metil bromoacetat, 97%, Sigma-Aldrich
- Metil 3-bromopropionat, 97%, Sigma-Aldrich
- Metil 4-bromobutanoat, >98%, Thermo Scientific
- Metil 5-bromovalerat, 97%, Sigma-Aldrich
- Metil 6-bromoheksanoat, >96%, Thermo Scientific
- Metil 7-bromoheptanoat, 98%, Alfa Aesar
- 8-bromooktanska kiselina, 97%, Alfa Aesar
- Metil 4-(bromometil)benzoat, 98%. Sigma Aldrich
- Tionil-hlorid, 97%, Sigma Aldrich
- Dihlormetan, HPLC čistoće, Sigma Aldrich
- Metanol, HPLC čistoće, Sigma Aldrich
- Acetonitril HPLC čistoće, Sigma Aldrich
- Etilacetat, p.a, Fisher Chemical
- Kalijum karbonat, Sigma Aldrich
- Celite® 545, Sigma Aldrich
- Silikagel 60 za hromatografiju na koloni (veličina čestica 0,035-0,075 mm, veličina pore 60 Å) (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Rastvarači za NMR eksperimente: Deutero hloroform (CDCl₃), deutero metanol (CD₃OD) i deutero dimetilsulfoksid (DMSO-d₆)

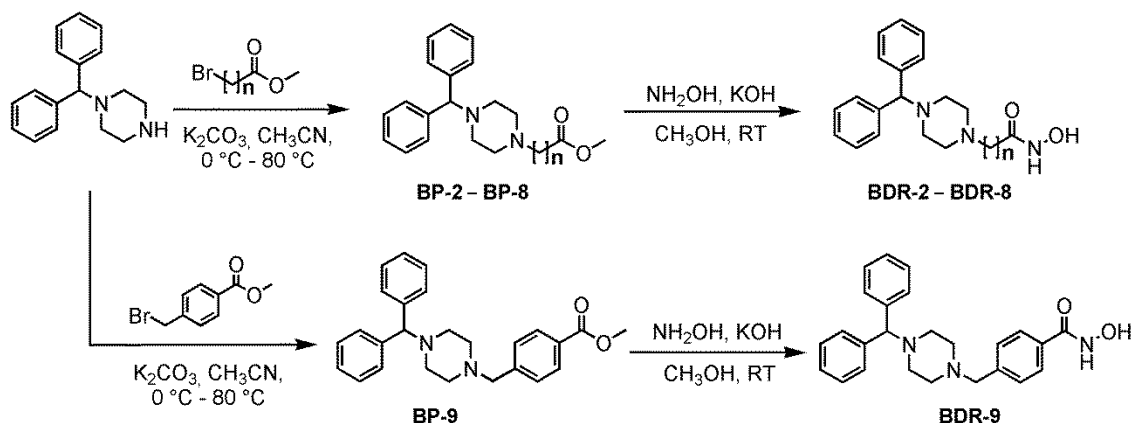
3.4.2. Oprema

- Analitička vaga, Adventurer-Pro (proizvođač Ohaus Corporation)
- Magnetna mešalica sa grejačem (proizvođač Tehnica Rotamix SHP-10)
- Ploče za tankoslojnu hromatografiju, dimenzije 20 x 20 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄, (proizvođač Merck)
- Komora sa izvorom ultraljubičastog zračenja, UV-Cabinet (Camag, Muttenz, Švajcarska)
- Rotacioni vakuum uparivač (Heidolph Rotary Evaporator)
- Rotacioni vakuum uparivač visokih performansi (Rotary vane pump RZ 2.5, Vacuumbrand, Wertheim, Nemačka)
- Vakuum sušnica (Thermo Heraeus, Fisher Scientific, UK, VT 6025)
- NMR spektrometar (Bruker, USA, Ascend 400)
- Tečni hromatograf sa masenim detektorom (Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight LC/MS sistem sa elektrosprej izvorom jonizacije)

3.4.3. Sintetske procedure za dobijanje BDR derivata hidroksamskih kiselina

Sinteza derivata 1-(difenilmetil)-piperazina (oznake **BDR 2-9**) prikazana je na **Slici 26**. Celokupna sintetska procedura za dobijanje finalnih derivata hidroksamskih kiselina je izvedena u dva sintetska koraka (**Procedura A** – alkilacije 1-(difenilmetil)-piperazina

odgovarajućim bromo metilestrima i **Procedura B** – sinteza hidroksamskih kiselina iz metil estara).



Slika 26. Šematski prikaz sinteze BDR derivata

Opšta procedura za alkilaciju 1-(difenilmetil)-piperazina (Jedinjenja BP-2 – BP9, Procedura A):

U balonu sa okruglim dnom je dodat 1 ekvivalent 1-(difenilmetil)-piperazina rastvoren u 5 mL acetonitrila. Nakon toga je dodato 1,7 ekvivalenata kalijum-karbonata na 0°C. Odgovarajući bromo-metilestar (1,1 ekvivalent) je ukapavan tokom pola sata u pripremljenu smešu i reakcija je refluktovana preko noći. Završetak reakcije je praćen na tankoslojnoj hromatografiji (TLC) u sistemu mobilne faze etilacetat/dihlormetan 1:1 (v/v). Nakon završetka reakcije, sadržaj iz balona je filtriran kroz dijatomejsku zemlju (Celite®) i ispiran etilacetatom. Smeša rastvarača je uparena na vakuum uparivaču i sirovi proizvod reakcije je prečišćen na hromatografiji na koloni, sistem etilacetat/dihlormetan 1/1(v/v).

Opšta procedura za sintezu derivata hidroksamske kiseline (Jedinjenja BDR2-9, Procedura B):

Derivati hidroksamskih kiselina su sintetisani prema proceduri koju su opisali autori Reddy et al, 2000²⁴⁹. U prvoj fazi je sveže pripremljen metanolni rastvor hidroksilamina mešanjem metanolnih rastvora kalijum hidroksida (6 ekvivalenata) i hidroksilamin-hidrohlorida (3 ekvivalenta) na ledenom kupatilu u toku pola sata. Smeša je intenzivno mešana, pri čemu je dobijen nerastvorni kalijum-hlorid u metanolu. Precipitat kalijum-hlorida je odvojen filtracijom.

U drugom koraku je sveže pripremljeni rastvor hidroksilamina ukapavan u metanolni rastvor odgovarajućeg metil estra 1-(difenilmetil)-piperazina (derivati BP-2 – BP-9) na 0 °C. Pomoću čvrstog kalijum hidroksida, podešen je pH reakcije na 10. Smeša je mešana na sobnoj temperaturi 4-6 sati. Tok reakcije je praćen na tankoslojnoj hromatografiji, u sistemu mobilne faze dihlormetan/metanol 95/5 (v/v). Nakon završetka reakcije, metanol je uparen do suva i zasićenim rastvorom natrijum bikarbonata je neutralisana sirova smeša. Ukoliko je bilo potrebno, pH vodenog rastvora je podešena na 8 pomoću 2M hlorovodonične kiseline. Sadržaj je prebačen u levak za ekstrakciju i organski sloj (etilacetat) je dodat. Jedinjenje je raspodeljeno između organske i vodene faze, ispirano zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (3 x 5mL brine) i sušeno preko anhidrovanog natrijum-sulfata. Organski sloj je uparen do suva, a finalni derivati hidroksamskih kiselina su prečišćeni hromatografijom na koloni, u

sistemu dihlormetan/metanol 95/5 (v/v). Identifikacija hidroksamskih kiselina na razvijenim hromatogramima je moguća pomoću rastvora gvožđe (III) hlorida (mrlje crvene boje).

Svi prekursori (**BP-2 – BP-9**) i konačni proizvodi (**BDR-2 – BDR-9**) su okarakterisani NMR (^1H i ^{13}C) spektroskopijom, kao i masenom analizom.

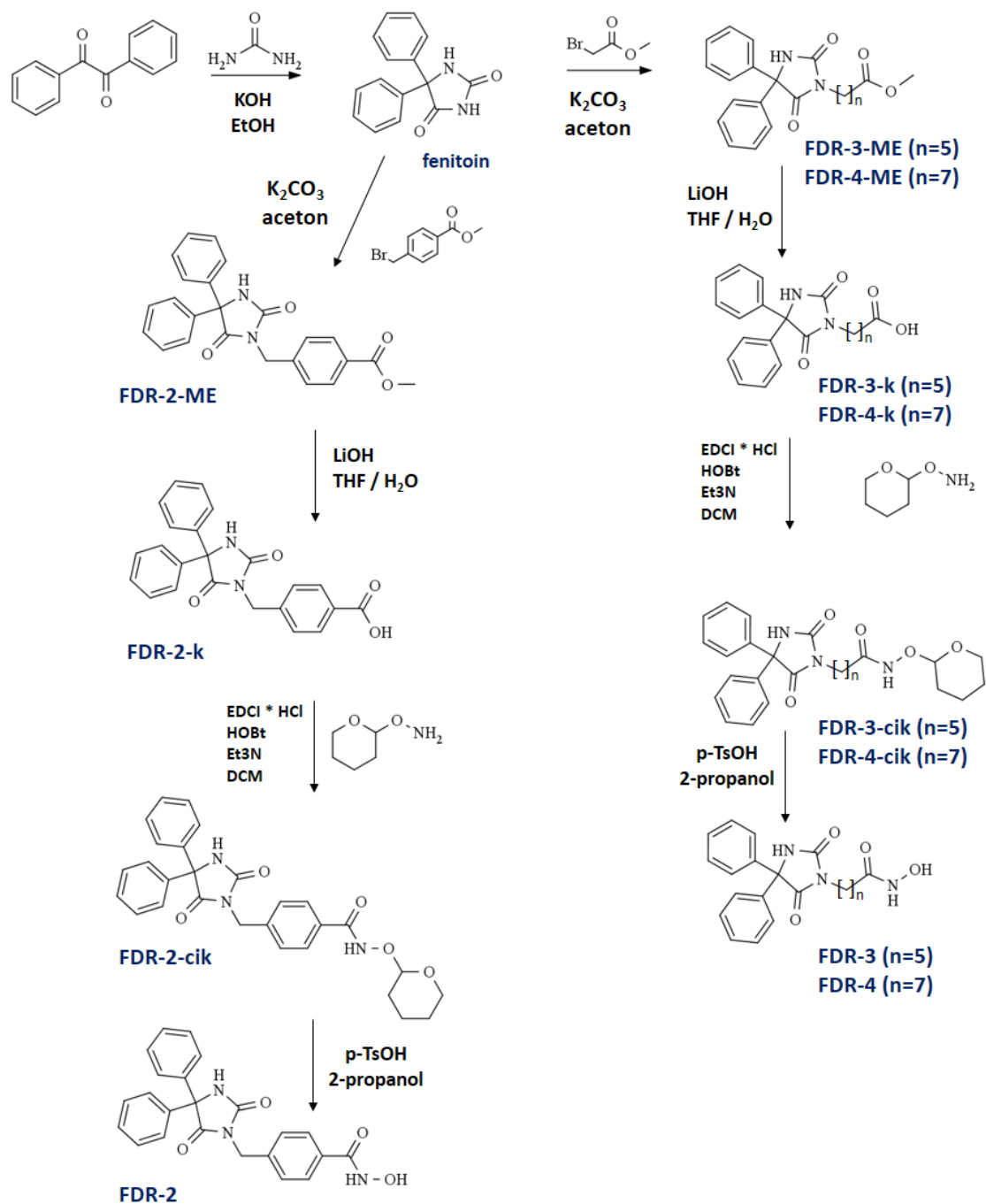
3.5. Sinteza derivata 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona (FDR derivati)

3.5.1. Sintetski prekursori, reagensi i rastvarači

- Benzil (Sigma Aldrich)
- Urea (Sigma Aldrich)
- Kalijum hidroksid (Sigma Aldrich)
- Hlorovodonična kiselina (Sigma Aldrich)
- Metil 6-bromoheksanoat, >96%, Thermo Scientific
- 8-bromooktanska kiselina, 97%, Alfa Aesar
- Metil 4-(bromometil)benzoat, 98%, Sigma Aldrich
- Tionil-hlorid, 97%, Sigma Aldrich
- Magnezijum sulfat, anhidrovani (Sigma Aldrich)
- Dihlormetan, HPLC čistoće, Sigma Aldrich
- Metanol, HPLC čistoće, Sigma Aldrich
- Acetonitril HPLC čistoće, Sigma Aldrich
- Etilacetat, p.a, Fisher Chemical
- Kalijum karbonat, Sigma Aldrich
- Celite® 545, Sigma Aldrich
- Silikagel 60 za *dry flash* hromatografiju na koloni (veličina čestica 0,035-0,075 mm, veličina pore 60 Å) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Rastvarači za NMR eksperimente: Deutero hloroform (CDCl_3), deutero metanol (CD_3OD) i deutero dimetilsulfoksid (DMSO-d_6)

3.5.2. Sintetske procedure za dobijanje FDR-2, FDR-3 i FDR-4 derivata hidroksamskih kiselina

Sinteza derivata 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona (oznake **FDR-2, FDR-3 i FDR-4**) prikazana je na **Slici 27**. Derivati hidroksamske kiseline su sintetisani u pet sintetskih faza. U prvoj fazi, sintetisan je antiepileptik fenitoin iz benzila. U drugom sintetskom koraku, alkilacijom imidskog azota imidazolidin-2,4-diona dobijeni su estarski derivati (FDR-2-ME, FDR-3-ME i FDR-4-ME). Hidrolizom estara pomoću LiOH dobijeni su derivati karboksilnih kiselina. Kuplovanjem karboksilnih kiselina sa O-(tetrahidro-2H-piran-2il)hidroksilaminom u četvrtoj fazi dobijaju se derivati ciklične hidroksamske kiseline. Hidrolizom acetala, u petoj sintetskoj fazi dobijaju se finalni proizvodi, derivati hidroksamske kiseline (FDR-2, FDR-3 i FDR-4).



Slika 27. Šematski prikaz sinteze FDR derivata

Sintetski korak 1: Opšta procedura za sintezu 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona

U balonu sa okruglim dnom pomešani su benzil (1 ekvivalent) i urea (1,8 ekvivalenta) u 40 mL etanola. U smešu je ukapan 66% rastvor kalijum-hidroksida (5 mL) i smeša je zagrevana na temperaturi refluksa etanola. Nakon 2 sata refluksa, reakciona smeša se izlije u 60 mL hladne vode, dobijeni talog se profiltrira i u filtrat ukapava 2M hlorovodonična kiselina uz mešanje na magnetnoj mešalici. Kiselina se ukapava do pH~4, nakon taloženja proizvod se filtrira, ispira destilovanom vodom i suši preko noći na tamnom mestu²⁸³.

Sintetski korak 2: Opšta procedura za alkilaciju 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona

U balonu sa okruglim dnom pomešani su 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-dion (1 ekvivalent), kalijum-karbonat (1,25 ekvivalenata) i aceton. U nastalu suspenziju je dodat 1,1 ekvivalent odgovarajućeg bromo-metiletra i reakciona smeša je refluktovana preko noći. Nakon 16 časova, aceton je uparen, dodata je destilovana voda i smeša prebačena u levak za ekstrakciju. Proizvod je ekstrahovan dihlormetanom (3 x 10 mL). Dihlormetanski sloj je ispran zasićenim rastvorom natrijum-hlorida i sušen preko anhidrovanog magnezijum-sulfata²⁸⁴. Proizvod je prečišćen hromatografijom na koloni korišćenjem mobilne faze (petrol etar/etar 1/1, v/v).

Sintetski korak 3: Opšta procedura za hidrolizu metil estara

Dobijeni metil estri (FDR-2-ME, FDR-3-ME i FDR-4-ME, 1 ekvivalent) su hidrolizovani pomoću litijum-hidroksida (10 ekvivalenata) u smeši tetrahidrofurana i vode (1:1). Hidroliza je izvedena na sobnoj temperaturi, preko noći. Nakon završetka reakcije, tetrahidrofuran je uparen, a vodenom sloju je podešen pH~4 pomoću 2M HCl (izdvaja se kiselina kao talog). Zakišeljani vodeni sloj je prebačen u levak za ekstrakciju, pomešan i ispiran sa etil acetatom (3 puta). Etilacetatni slojevi su sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata. Rastvarač je uparen do suva, nakon čega je proizvod sušen u vakuum sušnici i dobijeni su derivati kiselina uljaste konzistencije. Kiseline su ispirane malim količinama dietiletra, pri čemu je došlo do kristalizacije; dietiletar je uparen azotom i kiseline pripremljene za narednu sintetsku fazu.

Sintetski korak 4: Sinteza zaštićenih (cikličnih) derivata hidroksamske kiseline

Sintetisani derivati kiselina (FDR-2-k, FDR-3-k i FDR-4-k) su kuplovani zaštićenim derivatom hidrosilamina, O-(tetrahydro-2H-piran-2il) hidrosilaminom (THPONH₂). Karboksilne kiseline (1 ekvivalent) su rastvorene u dihlormetanu i aktivirane pomoću kuplujućih reagenasa, EDCI*HCl (1,4 ekvivalent) i HOBt (1,8 ekvivalenata). Nakon dodatka organske baze, trietilamina (1,8 ekvivalenata), dodat je THPONH₂ (1,5 ekvivalent). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi, preko noći. Završetak reakcije je praćen na tankoslojnoj hromatografiji (mobilna faza etil acetat/petrol etar/metanol 1/1/0,1; v/v/v). Reakciona smeša je prenetu u levak za ekstrakciju, pomešana sa vodom i nakon odvajanja, organski sloj je ispran zasićenim rastvorom natrijum-hlorida. Organski sloj je uparen do suva i prečišćen hromatografijom na koloni. Izolovani ciklični hidroksamati su direktno korišćeni u sledećoj sintetskoj fazi.

Sintetski korak 5: Sinteza finalnih derivata hidroksamske kiseline

Izolovani ciklični hidroksamati (FDR-2-cik, FDR-3-cik i FDR-4-cik, 1 ekvivalent) su rastvoreni u 2mL 2-propanola i hidrolizovani pomoću para-toluensulfonske kiseline (p-TsOH, 0,3 ekvivalenta). Reakcija je izvedena na sobnoj temperaturi, preko noći. Nakon završetka reakcije, 2-propanol je uparen i reakciona smeša prečišćena hromatografijom na koloni (PE/EtOAc 2/1, zatim DCM/MeOH 95/5, v/v). Mobilna faza je uparena do suva i izolovani su konačni derivati hidroksamske kiseline za biološka testiranja.

3.6. Ispitivanja sintetisanih jedinjenja u biološkim sistemima

3.6.1. Oprema

- Akustični dispenzer (Echo® Liquid Handling Technology, Labcyte Inc)
- EnSpire multimodalni čitač mikrotitarskih ploča (PerkinElmer)
- CO₂ Inkubator
- Vorteks mešalica
- Čitač mikrotitarskih ploča (Fluoroscanner Ascent FL microplate fluorometer and luminometer, Thermo Scientific)
- Centrifuga sa hlađenjem i fiksnim rotorom 5430R, Eppendorf
- Laminarna komora Aura 2000 MAC, BIOAIR
- Mikroskop Olympus BX51
- Protočni citometar, BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, USA)

3.6.2. Enzimi, standardi, hemikalije i rastvarači

- Humani rekombinantni HDAC1 enzim (C-ter-His-FLAG-HDAC1, BPS Bioscience 50051)
- Humani rekombinantni HDAC3 enzim (C-terminal His-tag; NCOR2: N-terminal GST tag, BPS Bioscience 50003)
- Humani rekombinantni HDAC6 enzim (N-terminal GST tag, BPS Bioscience 50006)
- Humani HDAC8 enzim (full length with C-terminal His-tag BPS Bioscience 50008)
- Valproinska kiselina (Sigma Aldrich)
- Natrijum butirat (Sigma Aldrich)
- Tubastatin A (Sigma Aldrich)
- HDAC-Glo™ I/II set za enzimsko testiranje - sadrži peptid obeležen aminoluciferinom (HDAC-Glo™ I/II Substrate), pufer (HDAC-Glo™ I/II Buffer), reagens proizvođača (Developer Reagent) i Trihostatin A (Promega Corporation, G6420)
- Dimetilsulfoksid (Sigma Aldrich)
- Etanol (Carl Roth)
- Izotonični i sterilni fosfatni pufer (tablete za rastvaranje, Sigma Aldrich)
- Voda za injekcije (GALENKA a.d)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medijum za ćelijske kulture (Sigma Aldrich)
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medijum za ćelijske kulture (Sigma Aldrich)
- Tripan plavo boja (Trypan blue) (Thermo Fisher Scientific)
- Fetalni goveđi serum, FBS (Sigma Aldrich)
- Tripsin (Trypsin/EDTA Solution, Thermo Fisher Scientific, kataloški broj R001100)
- MTT boja, 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-terazolijum bromid (Sigma Aldrich)
- SDS, natrijum dodecil sulfat (Sigma Aldrich)
- Aneksin vezivni pufer (eBioscience™ Binding Buffer for Annexin V, kataloški broj: BMS500BB)
- Aneksin V (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- 7AAD boja (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)

- Ribonukleaza-A (RNA-a, Thermo Fisher Scientific)
- Propidijum-jodid (Thermo Fisher Scientific)
- JC-1 boja (*Invitrogen*, kataloški broj T3168)

3.6.3. Čelijske kulture i uslovi kultivacije

- MDA-MB-231 (ATCC kod: HTB-26™) – humane, epitelne, trostruko negativne (ER-, PR- i HER2-) ćelije adenokarcinoma dojke (*triple negative breast cancer* – TNBC)
- MCF-7 (ATCC kod: HTB-22™) – humane, epitelne, estrogen i progesteron pozitivne (ER+, PR+ i HER2-) ćelije adenokarcinoma dojke

Humane ćelije kancera dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) su gajene u DMEM podlozi sa visokom koncentracijom glukoze, suplementiranoj sa penicilinom, streptomycinom i 10% humanim fetalnim serumom. Čelije su održavane u monosloju, u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i 5% udelom CO₂ u atmosferi vazduha. Čelije su presađivane dva puta u toku jedne nedelje.

3.6.4. Protokol za određivanje *in vitro* enzimske inhibicije humanih histon deacetilaza

Jedinjenja se rastvore u DMSO-u, pri čemu je koncentracija osnovnog rastvora svakog jedinjenja C=10 mM. Sva jedinjenja se pipetiraju u bunare na matriksnoj ploči (*Labcyte* ploče sa 384 bunara), sa korakom razblaženja 1:2. Sa matriksne ploče se jedinjenja pomoću akustičnog dispenzera raspršuju na ploču za *in vitro* testove sa 384 bunara (*Corning*® polistirenske, nesterilne ploče). Jedinjenja se raspršuju u svaki bazen u triplikatu, u 11 serijskih koncentracija. Nakon raspršivanja jedinjenja u 8 serijskih koncentracija, dodaje se (najčešće u poslednju, 24. kolonu) pufer proizvođača (*HDAC-Glo™ I/II Buffer*). U poslednjoj koloni se dodaju sve komponente za *in vitro* test, osim inhibitora (negativna kontrola – umesto inhibitora se dodaje DMSO, zbog provere tolerancije enzima na DMSO). Kao pozitivne kontrole se koriste trihostatin A (početna koncentracija 2 μM), valproinska kiselina i natrijum-butirat. Na ploču za *in vitro* test se nakon dodatka nosintetisanih supstanci i poznatih inhibitora, dodaje rastvor enzima (rastvori se pripremaju u puferu proizvođača). Centrifugiranjem ploča na 1000 obrta, ploče se inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićene od svetlosti aluminijumskom folijom). Nakon inkubacije, u bazene se dodaje reagens proizvođača, da se inicira enzimska reakcija luciferaze. Ploče se ponovo centrifugiraju, inkubiraju u intervalu 10 – 20 minuta (u zavisnosti od enzimskog testa) i luminiscencija se očitava na EnSpire čitaču mikroploča. Sirovi podaci se očitavaju u Prism softveru (GraphPad Prism 5.02) i konstruišu se krive odnosa doze i efekta (% inhibicije enzima) koristeći logističku regresionu analizu. Procenat inhibicije i kvalitet rezultata *in vitro* testa (Z') se izračunavaju pomoću sledećih matematičkih relacija²⁵⁶:

$$\% \text{ inhibicija} = \frac{Raw_{well} - AVG_{low}}{AVG_{high} - AVG_{low}} \quad (9)$$

$$Z' = 1 - 3 * \frac{STD_{high} + STD_{low}}{AVG_{high} - AVG_{low}} \quad (10)$$

Parametar Raw_{well} predstavlja sirovu vrednost luminiscencije očitane za svaki bazen, AVG_{low} predstavlja srednju vrednost luminiscencije u bazenima gde je dodata negativna kontrola

(DMSO), AVG_{high} predstavlja srednju vrednost luminiscencije u bazenima sa pozitivnom kontrolom (trihostatin A, valproinska kiselina i natrijum butirat). STD_{high} i STD_{low} predstavljaju standardne devijacije izračunate za pozitivnu i negativnu kontrolu *in vitro* testa. Vrednost statističkog parametra Z' treba da bude veća od 0,5 da bi se rezultati smatrali validnim za interpretaciju. Inhibicija svakog jedinjenja se izražava kao vrednost $IC_{50} \pm$ standardna devijacija, koja se očitava u programu GraphPad Prism 5.02.

3.6.5. Protokol za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na vijabilnost ćelija kancera dojke

Biološki aktivna jedinjenja koja su izdvojena nakon enzimskih testova su dalje testirana u *in vitro* testu za ispitivanje vijabilnosti ćelija. Sposobnost jedinjenja da redukuje rast ćelija u dvodimenzionalnoj ćelijskoj kulturi može se odrediti MTT testom. Identifikovani HDAC inhibitori su pripremljeni kao DMSO rastvori u koncentraciji 50 mM. Ćelije MDA-MB-231 (4000 ćelija po bazenu) i MCF-7 (5000 ćelija po bazenu) su zasejane u mikrotitarske ploče sa 96 bunara i kultivisane prema specifikacijama proizvođača. U svaki bazen je dodato 100 μ L podloge sa ćelijama i ćelije se kultivišu 24 časa u sterilnim uslovima, u inkubatoru na 37°C, atmosferi povećane vlažnosti u kojoj je udeo CO₂ 5%. Nakon 24 časa, ćelije se tretiraju sa po 50 μ L sintetisanih jedinjenja i tubastatinom A, pri čemu je najveća koncentracija jedinjenja 100 μ M. Za definisanje inhibicije rasta ćelija (IC_{50} odnosno GI_{50}), ćelije se tretiraju serijom razblaženih rastvora (dilucioni korak 1:2) u vremenskom intervalu od 48 časova. Nakon dva dana, u bazene se dodaje 20 μ L rastvora MTT, ploče se inkubiraju 4 sata i dodaje se 100 μ L 10% rastvora natrijum dodecil sulfata (SDS), čime se zaustavlja hemijska konverzija MTT-a u formazan. Nakon 24 časa, meri se apsorbance na 570 nm na čitaču za mikrotitarske ploče. Procenat vijabilnih ćelija (procenat preživljavanja) se izračunava prema sledećoj matematičkoj relaciji:

$$\% \text{ ćelijske vijabilnosti} = 100 * \frac{A_t - A_b}{A_c - A_b} \quad (11)$$

Pošto se ćelije tretiraju u triplicatu za svaku koncentraciju, srednja vrednost apsorbance tretiranih ćelija se označava sa A_t , srednja vrednost apsorbance koja potiče od rastvorenog jedinjenja u podlozi označava se sa A_b i srednja vrednost apsorbance koja potiče od netretiranih ćelija je označena sa A_c . Citotoksična koncentracija pri kojoj dolazi do redukcije vijabilnosti ćelija za 50% u odnosu na kontrolnu (netretirane ćelije) jeste IC_{50} , odnosno GI_{50} .

3.6.6. Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na indukciju apoptoze ćelija kancera dojke (MDA-MB-231)

Indukcija apoptoze posredovana sintetisanim HDAC inhibitorima je ispitana u aneksinskom testu, koristeći *Annexin V-FITC* set.

Ćelije trostruko negativnog kancera dojke (MDA-MB-231) su zasejane u flaskovima ($0,4 \times 10^6$) i nakon 24-časovnog, 48-časovnog i 72-časovnog tretiranja inhibitorima (pri koncentracijama nižim od IC_{50} vrednosti, određenim u MTT testu) svi uzorci su centrifugirani (2000 obrtaja/5 minuta). Tečni supernatant se odvaja, a ćelije se resuspenduju u 1 mL PBS-a. Sadržaj se meša, nakon čega se 100 μ L suspenzije ćelija (1×10^5) prebaci u epruvete za protočni citometar. U epruvete se dodaje 900 μ L rastvora PBS-a, centrifugira 5 minuta na 2000 obrtaja. Sadržaj u epruvetama se nakon centrifuge odliva i ćelijama se dodaje 100 μ L radnog rastvora aneksin-

vezivnog pufera. Nakon pufera, u epruvete se dodaje 4 μL aneksina V i 4 μL 7AAD boje. Epruvete se inkubiraju u mraku 15 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u epruvete se dodaje još 300 μL radnog rastvora aneksin-vezivnog pufera.

Na citometru FACS Calibur (potpomognuto Cell Quest softverom) se očitava procenat ćelija kod kojih je inicirana rana, kasna apoptoza (odnosno nekroza) u zavisnosti od detekcije ćelija koje su obeležene aneksinom (marker rane apoptoze) i 7AAD bojom (marker kasno-apoptotičnih odnosno nekrotičnih ćelija).

3.6.7. Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na promene u mitohondrijskom membranskom potencijalu

Ćelije (1×10^6) koje su suspendovane u PBS-u se, nakon ponovnog centrifugiranja, prebace u epruvete za citometrijsku analizu (160 μL). U epruvete sa suspenzijom ćelija se dodaje 40 μL radnog rastvora JC-1 boje (radni rastvor se priprema tako što se komercijalno dostupna boja razblaži 100 puta pomoću PBS-a do finalne koncentracije 15,4 μM). Nakon dodatka JC-1 boje, epruvete se inkubiraju na 37 $^{\circ}\text{C}$ u vlažnoj atmosferi 15 minuta. JC-1 boja ima veliki afinitet za membranu mitohondrija, i nakon depolarizacije mitohondrijske membrane, akumulira se u njoj, što se na citometru može očitati kao odnos fluorescentnog crvenog (590 nm) i fluorescentnog zelenog (529 nm) signala (izražen kao transmembranski potencijal, $\Delta\psi\text{m}$).

3.6.8. Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na promene u ćelijskom ciklusu

U epruvete sa 1×10^6 ćelija doda se 400 μL PBS i 400 μL hladnog etanola. Epruvete se zatvore i ostave u zamrzivaču 30 minuta. Nakon inkubacije, ćelije se centrifugiraju i dodaje im se 500 μL PBS-a. Ponovo se ćelije centrifugiraju 5 min na 2000 obrtaja. Sadržaj u epruvetama se odliva, dodaje im se 270 μL PBS-a, 80 μL RNA-ze (finalna koncentracija 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i 50 μL propidijum-jodida (PI, finalna koncentracija 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sadržaj u epruvetama se meša i ostavi u mraku 30 minuta i nakon toga čita odgovor na citometru FACS Calibur E440, kao procenat distribucije ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (sub- G_1 , G_0/G_1 , S i G_2).

3.6.9. Protokoli za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na inhibiciju migracije i invazije ćelija kancera dojke

Antimigratorni i antiinvazivni efekti odabranih inhibitora su ispitani na agresivnoj, trostruko negativnoj (ER-, PR- i HER2 -) liniji kancera dojke (MDA-MB-231) i estrogen pozitivnom ćelijskom soju kancera dojke (MCF-7).

Test za ispitivanje antimigratornih osobina novosintetisanih jedinjenja (*Transwell migration assay*) – Redukcija migracije MDA-MB-231 ćelija je ispitivana na sterilnim pločama sa 24 bazena na kojima su dodati Corning® Costar® Transwell® inserti za ćelijske kulture. Inserti na donjoj strani sadrže filter od poroznog polikarbonatnog kompozita, dijametra 8,0 μm . Suspenzija od 6×10^4 ćelija u 200 μL je zasejana u gornjem bazenu (komori), dok je donji bazen bio ispunjen sa 800 μL medijuma. Ćelije se tretiraju novosintetisanim jedinjenjima i nakon 24 časa preostale ćelije u gornjoj komori se uklanjaju pomoću vate koja je nakvašena medijumom, dok se inserti ispiraju 2 puta sa zagrejanom (37 $^{\circ}\text{C}$) rastvorom PBS-a. Nakon toga, ćelije koje su lokalizovane na donjem delu inserta se fiksiraju pomoću hladnog

metanola na 2 minuta i boje sa 0,1% rastvorom kristal ljubičastog u trajanju od 15 minuta. Obojene ćelije se slikaju i kvantifikuju pomoću NIH-Image J softvera²⁸⁵.

Test za ispitivanje antimigratornih osobina novosintetisanih jedinjenja (*Scratch ili Wound healing test*) – MCF-7 ćelije (1×10^5 po bazenu) su zasejane u monosloju i tretirane novosintetisanim inhibitorima u odgovarajućim koncentracijama. Nakon toga je sterilnom Pasterovom pipetom (200 μ l) zagreban monosloj ćelija i formirana je brazda. Ćelije su inkubirane 24 časa i nakon inkubacije, ćelijski medijum je uklonjen, ćelije isprane dva puta sa rastvorom PBS-a i fiksirane hladnim metanolom 15 minuta. Nakon uklanjanja metanola, ćelije su bojene 0,1% rastvorom kristal ljubičastog. Redukcija dijametra brazde u odnosu na početni dijametar brazde ($t = 0$) je vizuelizovana na invertnom mikroskopu uz pomoć NIH-Image J softvera. Dodatno, odmah nakon formiranja brazde MCF-7 ćelije su fiksirane, bojene kristal ljubičastim i izmeren je početni dijametar brazde.

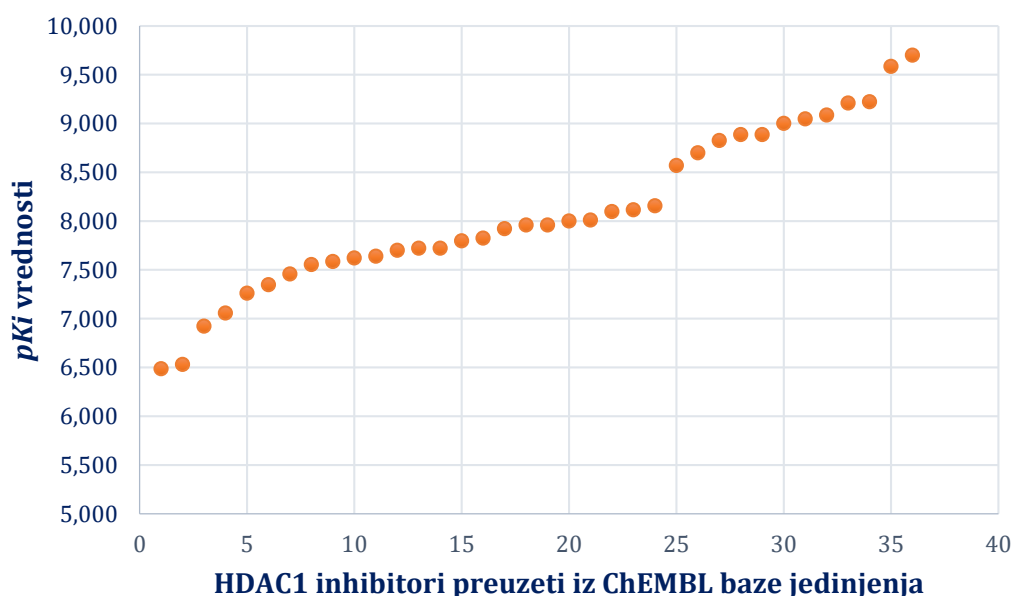
Test za ispitivanje antiinvazivnih osobina novosintetisanih jedinjenja (*Matrigel Invasion assay*) – Redukcija invazivnog potencijala MDA-MB-231 ćelija je ispitivana na sterilnim pločama sa 24 bazena na kojima su dodati Corning™ BioCoat™ Matrigel™ inserti za ćelijske kulture. Inserti su sačinjeni od poroznog polikarbonatnog kompozita, dijametra 8,0 μ m. Pre dodatka ćelija, na inserte je dodat matrigel (Corning Matrigel Matrix™). Suspenzija od 6×10^4 ćelija u 200 μ L je zasejana u gornjem bazenu (komori), dok je donji bazen bio ispunjen sa 800 μ L medijuma. Ćelije se tretiraju novosintetisanim inhibitorima i nakon 24 časa preostale ćelije u gornjoj komori se uklanjaju pomoću vate koja je nakvašena medijumom, a inserti se ispiraju 2 puta sa zagrejanom (37°C) rastvorom PBS-a. Nakon toga, ćelije koje su lokalizovane na donjem delu inserta se fiksiraju pomoću hladnog metanola 2 minuta i boje sa 0,1% rastvorom kristal ljubičastog u trajanju od 15 minuta. Obojene ćelije se slikaju i kvantifikuju pomoću NIH-Image J softvera²⁸⁵.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Interpretacija 3D-QSAR modela za HDAC1 inhibitornu aktivnost

4.1.1. Karakteristike baze HDAC1 inhibitora korišćenih za 3D-QSAR modelovanje

Opseg pK_i vrednosti HDAC1 inhibitora koji su korišćeni za pripremu 3D-QSAR modela je od 6,486 do 9,699 ($\Delta pK_{iHDAC1} = 3,213$). Inhibitorna HDAC1 aktivnost jedinjenja je distribuirana u opsegu većem od 3 logaritamske jedinice, odnosno obuhvata submikromolarni opseg aktivnosti sa najaktivnijim jedinjenjem čija je IC_{50} vrednost 0,2 nM do najmanje aktivnog jedinjenja, čija je IC_{50} vrednost 326,4 nM. Smatra se da razlika u biološkoj aktivnosti između dva susedna jedinjenja u 3D-QSAR modelu ne treba da bude veća od 15% u odnosu na celokupni opseg aktivnosti⁶⁸. U slučaju pripremljenog 3D-QSAR modela, razlika u pK_i vrednosti između dva susedna HDAC1 inhibitora ne bi trebalo da bude veća od 0,45 logaritamskih vrednosti (**Slika 28**).



Slika 28. Distribucija pK_i vrednosti 36 odabranih HDAC1 inhibitora za 3D-QSAR modelovanje

Sa prikazanog dijagrama na **Slici 28** evidentno je da ne postoje razlike u HDAC1 inhibitornim vrednostima veće od 0,45 logaritamskih jedinica za dva susedna inhibitora.

4.1.2. Odabir bioaktivnih konformacija HDAC1 inhibitora

Za odabir trodimenzionalnih struktura HDAC1 inhibitora, korišćene su konformacije generisane nakon molekuskog dokinga na izoformi HDAC1 (opis procedure dat u odeljku 3.1.3). Važno je istaći da postoje neselektivni inhibitori u oba skupa inhibitora (inhibiraju i HDAC1 i HDAC6 izoformu), pa su za pripreme trodimenzionalnih struktura takvih jedinjenja korišćene različite konformacije (dobijene molekuskim dokingom na HDAC1 i HDAC6 izoformama).

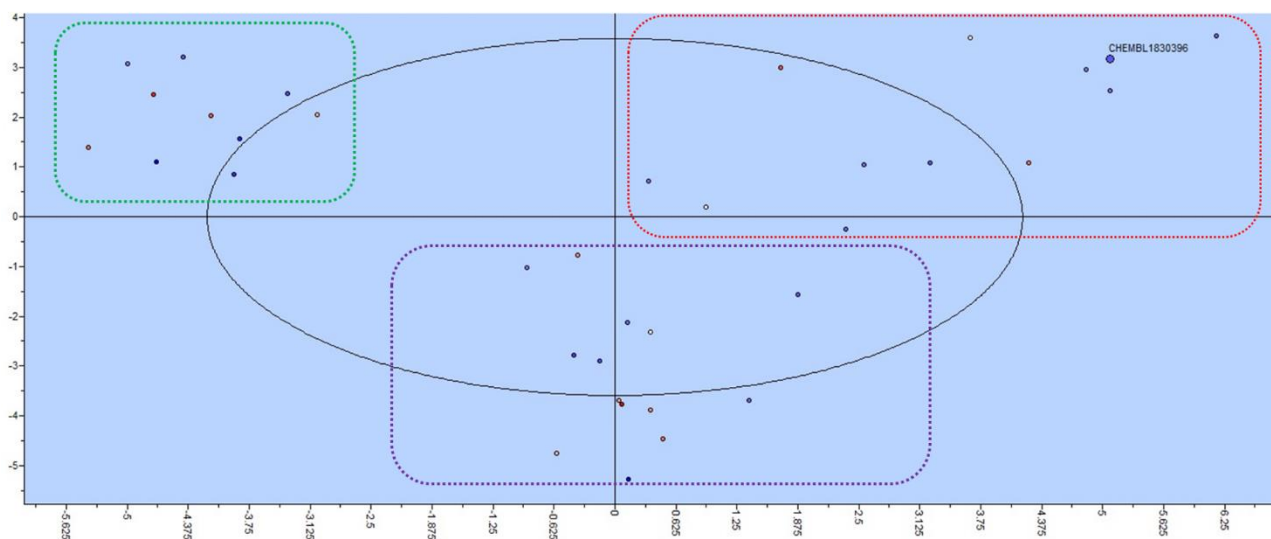
Konformacije svakog inhibitora su odabrane tako da se hidroksamska kiselina pozicionira u blizini jona cinka i da su vizuelizacijom međumolekulskih interakcija prisutne koordinatne

veze cink-hidroksamska kiselina (ili u monodentatno ili bidentatnom načinu koordinacije). Dodatno, za odabir finalne bioaktivne konformacije razmatrane su vrednosti funkcije vrednovanja (ChemScore), kao i odsustvo intermolekulskih sudara (nedozvoljenih sternih sudara atoma).

Trodimenzionalne konformacije HDAC1 inhibitora (N=36) su zajedno sa inhibitornim vrednostima (pK_{iHDAC1}) dodate u program *Pentacle* 1.07 i izračunati su GRIND deskriptori.

4.1.3. Hemometrijska analiza 3D-QSAR modela za skup HDAC1 inhibitora

Nakon izračunavanja GRIND promenljivih i njihove korelacije sa pK_i vrednostima HDAC1 inhibitora u celokupnom setu (N=36), analizirana je distribucija jedinjenja u PCA dijagramu skorova (PCA scores plot, **Slika 29**).



Slika 29. Dijagram PCA skorova generisan za celokupan HDAC1 skup inhibitora, uokvireni delovi dijagrama predstavljaju različite podgrupe deskriptorski-sličnih jedinjenja (klasteri)

Na prikazanom PCA dijagramu skorova je primećeno pregrupisanje HDAC1 inhibitora u tri grupe (klastera). Deskriptorska sličnost, odnosno blizina objekta u PCA dijagramu je važna za odabir jedinjenja za test setu, ali i za identifikaciju strukturno raznorodnih jedinjenja (eng. *outliers*). Primećeno je pregrupisanje u tri klastera:

- Klaster 1 – Jedinjenja sa osnovnim hemijskim skeletom sličnim tubacinu
- Klaster 2 - Jedinjenja sa osnovnim hemijskim skeletom sličnim vorinostatu
- Klaster 3 - Jedinjenja sa benzimidazolnim hemijskim skeletom

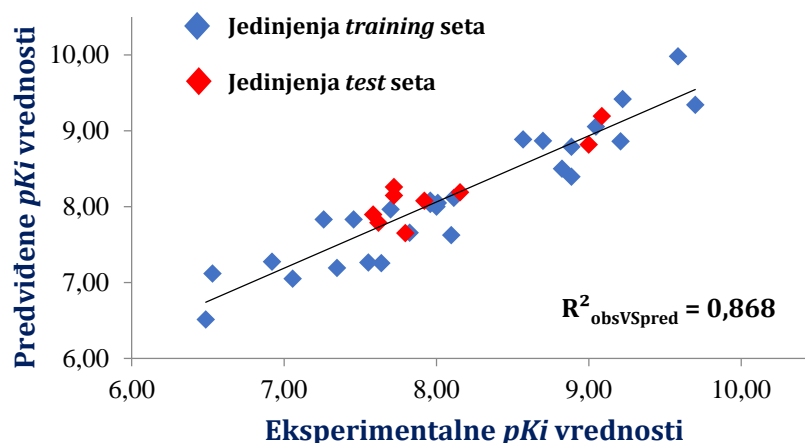
Odabir test set jedinjenja (N=9) je izveden ekstrakcijom jedinjenja iz svakog klastera, nakon čega je uspešno generisan 3D-QSAR model pomoću training seta (N=27). Dobijeni 3D-QSAR model je opisan pomoću tri latentne promenljive (LV=3, tri glavne komponente nakon PCA analize) i 57% varijabilnosti skupa jedinjenja je opisano pomoću 3 glavne komponente.

Statistički parametri interne validacije HDAC1 3D-QSAR modela (R^2 , Q^2 , RMSEE i $R^2_{\text{obs VS pred}}$) kao i eksterne validacije (R^2_{pred} , RMSEP) i r^2 metrike su prikazani u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Statistički parametri za 3D-QSAR model koji opisuje HDAC1 inhibitornu aktivnost

<i>Parametri interne validacije</i>				
	R^2	Q^2 (L00)	RMSEE	$R^2_{\text{obs VS pred}}$
	0,9	0,61	0,302	0,868
Kriterijum	> 0,7	> 0,5		
<i>Parametri eksterne validacije</i>				
	R^2_{pred}	RMSEP	r^2_m	r^2/m
	0,744	0,276	0,768	0,594
Kriterijum	> 0,6	$\leq 2\text{RMSEP}$	> 0,5	> 0,5
	$\overline{r^2}_m$	Δr^2_m	$(r^2 - r^2_0) / r^2$	k'
	0,681	0,174	0,097	1,018
Kriterijum	> 0,5	< 0,2	< 0,1	$0,85 \leq k' \leq 1,15$

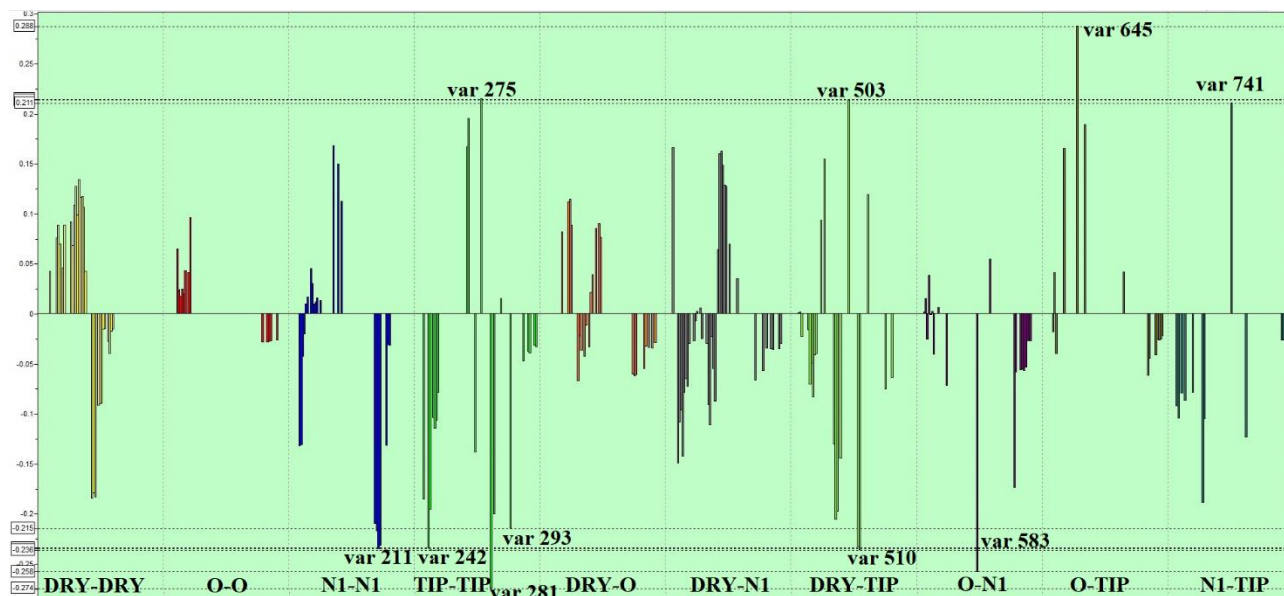
Razmatrajući izračunate parametre validacije prikazane u **Tabeli 12**, zaključuje se da razvijeni 3D-QSAR model može pouzdano da predvidi biološke aktivnosti jedinjenja koja sačinjavaju model ($R^2=0,9$, $Q^2=0,61$) sa greškom predviđanja $pK_{i\text{pred}} \pm 0,302$. Grafik zavisnosti eksperimentalnih pK_i vrednosti u odnosu na predviđene pK_i vrednosti dat je na **Slici 30** ($R^2_{\text{obs VS pred}} = 0,868$).



Slika 30. Grafik zavisnosti eksperimentalnih u odnosu na predviđene pK_i vrednosti za HDAC1 inhibitore

Dobijeni 3D-QSAR model pouzdano i validno predviđa biološku aktivnost test jedinjenja, što je opravdano vrednostima $R^2_{\text{pred}} = 0,744$ i parametrima r^2 metrike (r^2_m , r^2/m , $\overline{r^2}_m$ su veće od 0,5 i njihova razlika Δr^2_m je manja od 0,2). Model predviđa HDAC1 inhibitornu aktivnost novih, hemijski srodnih jedinjenja sa greškom $pK_{i\text{pred}} \pm 0,276$. Eksperimentalne i predviđene $pK_{i\text{HDAC1}}$ vrednosti za training i test set jedinjenja u pripremljenom 3D-QSAR modelu su prikazane u **Prilogu 7.3, Tabela P1**.

Najznačajnije GRIND promenljive koje doprinose HDAC1 inhibitornoj aktivnosti se identifikuju na dijagramu PLS koeficijenata (**Slika 31**).



Slika 31. Dijagram PLS koeficijenata za 3D-QSAR model koji definiše HDAC1 inhibitornu aktivnost. Najuticajnije GRIND promenljive su označene na dijagramu.

Nakon PLS regresione analize, identifikovani su najuticajniji deskriptori u okviru 6 grupa (blokova) GRIND promenljivih. Na HDAC1 inhibitornu aktivnost za odabrani skup inhibitora najznačajnije utiču:

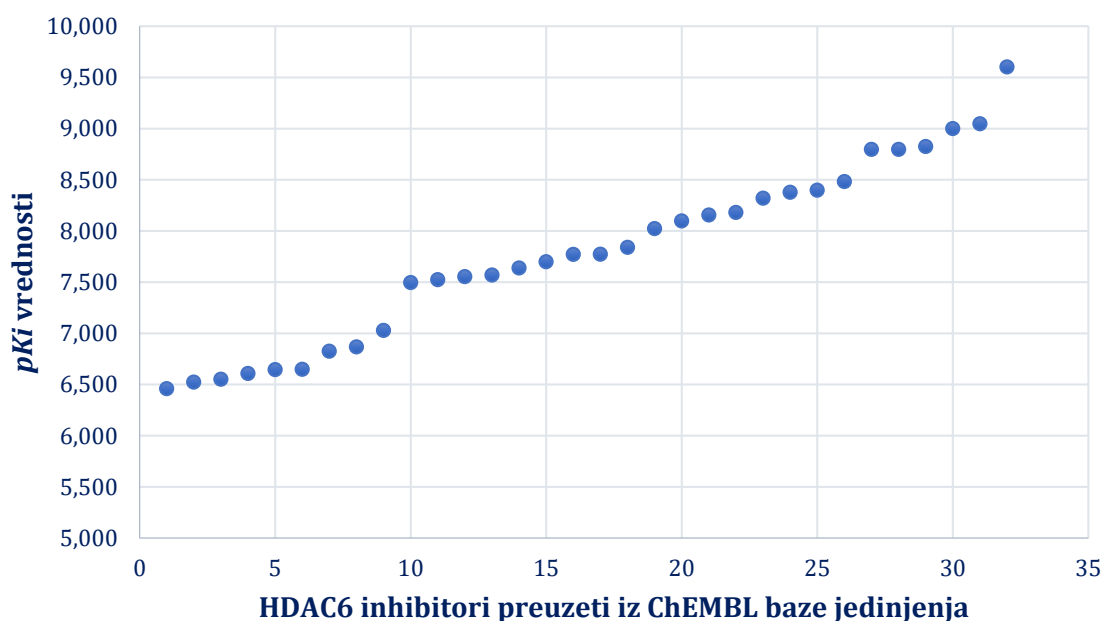
- **N1-N1 promenljiva (var211)** je opisana između dve probe koje identifikuju funkcionalne grupe na inhibitorima koje su akceptori vodonične veze. Ova promenljiva ima negativan uticaj na pK_{iHDAC1} i zastupljena je u inhibitorima čije su $pK_{iHDAC1} < 8,0$.
- Najznačajnije **TIP-TIP promenljive (var242, var281 i var293)** negativno utiču na zavisnu promenljivu (pK_{iHDAC1}), pri čemu **var275** pozitivno doprinosi inhibiciji HDAC1 izoforme. Promenljiva **var275** (na distanci 16,4 – 16,8 Å) pozitivno doprinosi HDAC1 inhibitornoj aktivnosti manje voluminoznih jedinjenja, koja imaju linker sa manjim brojem C atoma (derivati benzimidazola). TIP-TIP promenljiva sa većim rastojanjem između proba (18,8 – 19,2 Å, **var 293**) zastupljena je u više od 70% modelovanih inhibitora i najznačajniji uticaj ispoljava na inhibitore čija je $pK_{iHDAC1} < 8,0$.
- **DRY-TIP promenljivom (var503)** se opisuju favorizovane interakcije hidrofobnih i sternih funkcionalnih grupa modelovanih inhibitora. Zastupljenija DRY-TIP promenljiva (**var510**) je prisutna kod više od 50% modelovanih inhibitora i negativno doprinosi HDAC1 inhibiciji.
- **O-N1 promenljiva (var583)** negativno doprinosi HDAC1 inhibitornoj aktivnosti modelovanih inhibitora. Ova promenljiva je opisana oko funkcionalnih grupa inhibitora koje su donori i akceptori vodonične veze.
- **O-TIP promenljiva (var 645)** ima pozitivan uticaj na HDAC1 inhibiciju, ali zbog prisustva probe koja identifikuje donore vodonične veze na manjem rastojanju od probe koja opisuje lokalnu zakrivljenost površine inhibitora (8,4–8,8 Å), nema značajnu primenu u interpretaciji modela.

- **N1-TIP promenljiva (var741)** pozitivno doprinosi inhibitornoj aktivnosti na HDAC1 izoformi i zastupljena je između proba koje identifikuju akceptore vodoničnih veza na molekulima inhibitora i sterne TIP probe.

4.2. Interpretacija 3D-QSAR modela za HDAC6 inhibitornu aktivnost

4.2.1. Karakteristike baze HDAC6 inhibitora korišćenih za 3D-QSAR modelovanje

Opseg pK_i vrednosti HDAC6 inhibitora koji su korišćeni za pripremu 3D-QSAR modela je od 6,548 do 9,602 ($\Delta pK_{iHDAC1} = 3,054$). Inhibitorna HDAC6 aktivnost jedinjenja je distribuirana u opsegu većem od 3 logaritamske jedinice, odnosno obuhvata submikromolarni opseg aktivnosti sa najmanje aktivnim jedinjenjem čija je IC_{50} vrednost 283,1 nM do najaktivnijeg jedinjenja, čija je IC_{50} vrednost 0,25 nM. Smatra se da razlika u biološkoj aktivnosti između dva susedna jedinjenja u 3D-QSAR modelu ne treba da bude veća od 15% u odnosu na celokupni opseg aktivnosti⁶⁸. U slučaju pripremljenog 3D-QSAR modela, razlika u pK_i vrednosti između dva susedna HDAC1 inhibitora ne bi trebalo da bude veća od 0,45 logaritamskih vrednosti (**Slika 32**). Za najaktivnije jedinjenje (ChEMBL96051, $pK_{iHDAC6} = 9,602$) razlika u pK_i vrednosti od susednog inhibitora je nešto veća od 15% ($\Delta pK_i = 9,602 - 9,046 = 0,556$). Uklanjanjem najaktivnijeg jedinjenja, kvalitet modela je bio značajno lošiji, zbog čega je molekul zadržan za pripremu 3D-QSAR modela, kao i za dizajniranje novih, selektivnih HDAC6 inhibitora.



Slika 32. Distribucija pK_i vrednosti za 32 odabrana HDAC6 inhibitora za 3D-QSAR modelovanje

4.2.2. Odabir bioaktivnih konformacija HDAC6 inhibitora

Za razliku od skupa HDAC1 inhibitora, u bazi HDAC6 inhibitora bioaktivne konformacije za 5 jedinjenja su preuzete iz dostupnih kristalnih struktura HDAC6 izoforme (jedinjenje

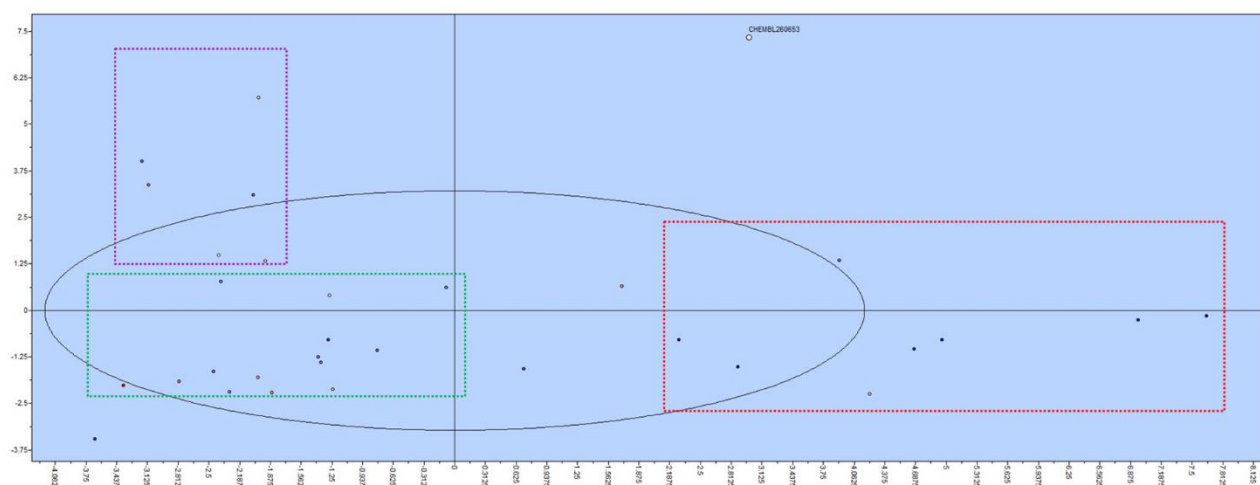
ChEMBL314389 iz kristalografske strukture [5EFB](#), ChEMBL408513 iz kristalografske strukture [5EEN](#), ChEMBL483254 iz kristalografske strukture [5EF8](#), ChEMBL98 iz kristalografske strukture [5EEI](#), ChEMBL99 iz kristalografske strukture [5EDU](#)). Trodimenzionalne konformacije za preostalih 27 jedinjenja su generisane tehnikom molekuskog dokinga (opis dat u odeljku 3.1.3) u kristalnoj strukturi drugog katalitičkog domena humane histon deacetilaze 6 (PDB: [5EDU](#)).

Konformacije HDAC6 inhibitora su pripremljene razmatranjem orijentacije i pozicioniranja hidroksamske kiseline u blizini katalitičkog jona Zn^{2+} , prisustvom monodentatnih ili bidentatnih načina koordinacije jona Zn^{2+} (monodentatni način za derivate fenilhidroksamskih kiselina, bidentatni način za alkilhidroksamske kiseline). Finalne konformacije su odabirane na osnovu ChemScore vrednosti (razmatrajući prvo konformacije sa najvišim vrednostima funkcije vrednovanja).

Pripremljeni skup od 32 HDAC6 inhibitora je dodat u program *Pentacle* 1.07 sa biološkim vrednostima inhibicije HDAC6 izoforme (kao pK_{iHDAC6}) i izračunati su GRIND deskriptori.

4.2.3. Hemometrijska analiza 3D-QSAR modela za skup HDAC6 inhibitora

Izračunate GRIND deskriptorske promenljive (780) su metodama multivarijantne analize podataka redukovane na nekoliko glavnih komponenti (analiza glavnih komponenata, PCA). Distribucija jedinjenja u PCA dijagramu skorova (eng. *PCA scores plot*) je prikazana na **Slici 33**.



Slika 33. Dijagram PCA skorova generisan za celokupan HDAC6 skup inhibitora, uokvireni delovi dijagrama (pravouganci) predstavljaju različite podgrupe deskriptorski-sličnih jedinjenja (klasteri)

Na prikazanom PCA dijagramu skorova je primećeno pregrupisavanje HDAC6 inhibitora u tri grupe (klastera). Izuzetak je jedinjenje ChEMBL260653, koje se na osnovu prikazanog dijagrama PCA skorova može smatrati strukturno raznorodnim jedinjenjem (*outlier*). Iskustvo u našoj istraživačkoj grupi je pokazalo da **ne bi trebalo** inicijalne *outlier*-e sa PCA dijagrama skorova uklanjati iz dalje pripreme 3D-QSAR modela u sledećim slučajevima:

- Kada se njegovim uklanjanjem iz training seta pogoršaju interne performanse modela (parametri R^2 i Q^2);
- Kada sporni *outlier* poseduje veliki stepen fleksibilnosti (mogućnost za generisanje velikog broja konformera u bioaktivnom mestu) i
- Kada pozicioniranje spornog jedinjenja u Williams-ovom dijagramu za domen primenljivosti 3D-QSAR modela ne prevazilazi graničnu vrednost (h^*).

Jedinjenje ChEMBL260653 (hemijska struktura prikazana na slici, **Prilog 7.2**) poseduje sve osnovne farmakoforne karakteristike (CAP grupu, alifatični ugljovodonični linker i cink-vezivnu grupu, hidroksamsku kiselinu) i njegovim uklanjanjem iz training seta se dobijaju 3D-QSAR modeli nižeg kvaliteta.

Deskriptorska sličnost, odnosno blizina objekta u PCA dijagramu je važna za odabir jedinjenja za test set, ali i za identifikaciju strukturno raznorodnih jedinjenja (*outliers*). Pregrupisanje je primećeno za:

- Klaster 1 – Jedinjenja sa osnovnim hemijskim skeletom sličnim tubacinu
- Klaster 2 - Jedinjenja sa osnovnim hemijskim skeletom sličnim vorinostatu
- Klaster 3 - Jedinjenja sa benzimidazolnim hemijskim skeletom

Odabir test set jedinjenja (N=8, 25% od ukupnog broja) je izveden ekstrakcijom jedinjenja iz svakog klastera, nakon čega je uspešno generisan 3D-QSAR model pomoću training seta (N=24). Dobijeni 3D-QSAR model je opisan pomoću dve latentne promenljive (LV=2, dve glavne komponente nakon PCA analize) i 40,5% varijabilnosti skupa jedinjenja je opisano pomoću 2 glavne komponente.

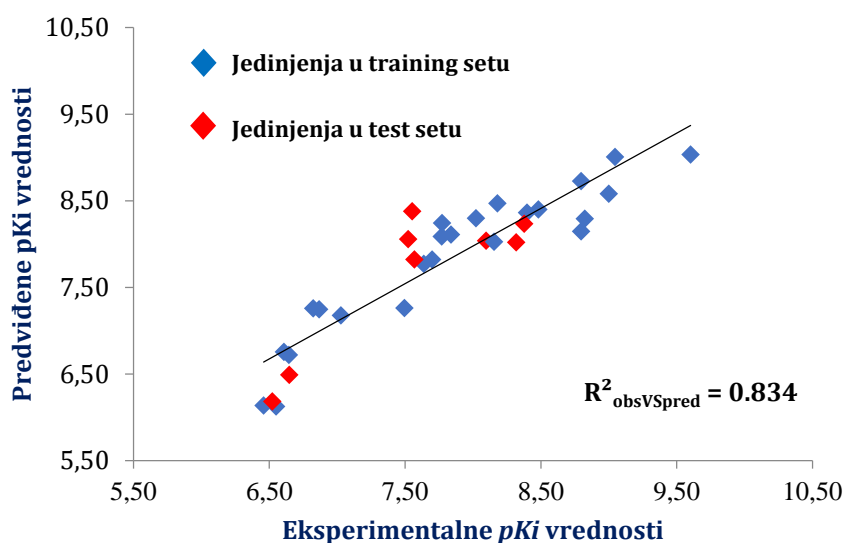
Statistički parametri interne validacije HDAC6 3D-QSAR modela (R^2 , Q^2 , RMSEE i $R^2_{\text{obs VS pred}}$) kao i eksterne validacije (R^2_{pred} , RMSEP) i r^2 metrike su prikazani u **Tabeli 13**.

Tabela 13. Statistički parametri za 3D-QSAR model koji opisuje HDAC6 inhibitornu aktivnost

<i>Parametri interne validacije</i>				
	R^2	Q^2 (1.00)	RMSEE	$R^2_{\text{obs VS pred}}$
	0,91	0,75	0,261	0,834
Kriterijum	> 0,7	> 0,5		
<i>Parametri eksterne validacije</i>				
	R^2_{pred}	RMSEP	r^2_{m}	r^2_{m}
	0,859	0,341	0,629	0,785
Kriterijum	> 0,6	$\leq 2\text{RMSEP}$	> 0,5	> 0,5
	$\overline{r^2_{\text{m}}}$	Δr^2_{m}	$(r^2 - r^2_{/20}) / r^2$	k'
	0,707	0,156	0,0065	0,998
Kriterijum	> 0,5	< 0,2	< 0,1	$0,85 \leq k' \leq 1,15$

Dobijeni 3D-QSAR model koji opisuje i kvantifikuje HDAC6 inhibitornu aktivnost 24 modelovana jedinjenja pouzdano predviđa njihove biološke aktivnosti (model je interno validan). Inhibicija HDAC6 enzimske aktivnosti za training set jedinjenja predviđa $pK_{i\text{HDAC6}}$ uz

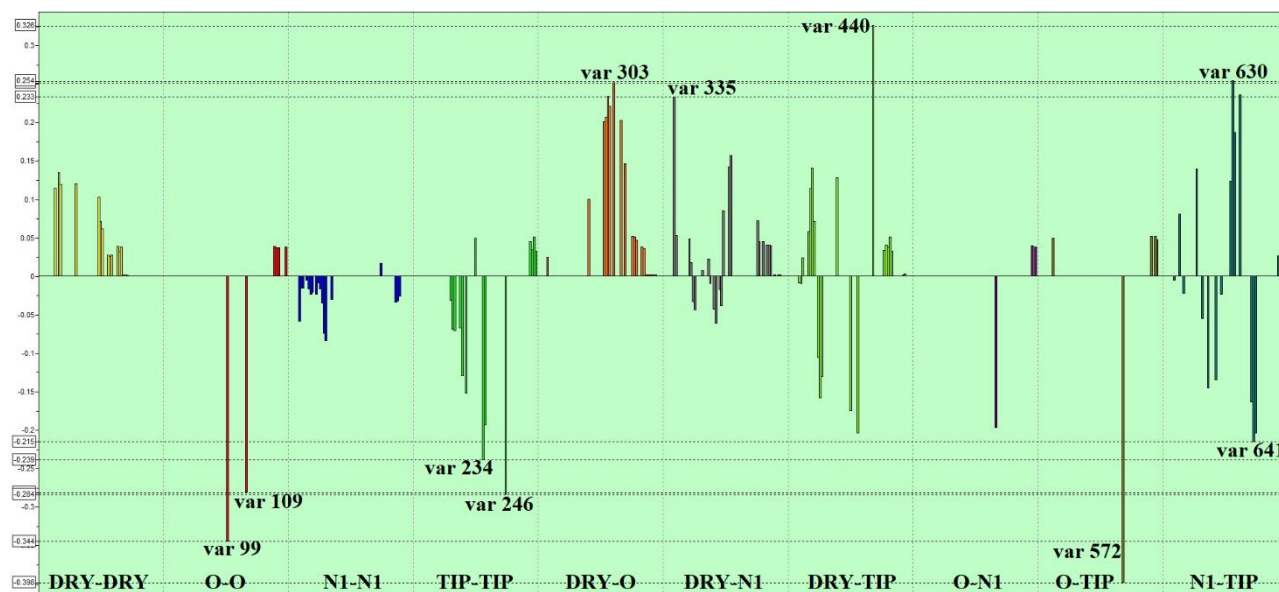
grešku predviđanja $\pm 0,261$ (Tabela 13). Grafik zavisnosti eksperimentalnih pK_i vrednosti u odnosu na predviđene pK_i vrednosti dat je na Slici 30 ($R^2_{\text{obs VS pred}} = 0,834$).



Slika 34. Grafik zavisnosti eksperimentalnih u odnosu na predviđene pK_i vrednosti za HDAC6 inhibitore

Dobijeni 3D-QSAR model pouzdano i validno predviđa biološku aktivnost test jedinjenja, što je opravdano vrednostima $R^2_{\text{pred}} = 0,859$ i parametrima r^2 metrike ($r^2_m, r^2_{/m}, r^2_m^2$ su veće od 0,5 i njihova razlika Δr^2_m je manja od 0,2). Model predviđa HDAC6 inhibitornu aktivnost novih, hemijski srodnih jedinjenja sa greškom $pK_{i\text{pred}} \pm 0,341$. Eksperimentalne i predviđene $pK_{i\text{HDAC6}}$ vrednosti za training i test set jedinjenja u pripremljenom 3D-QSAR modelu su prikazane u Prilogu 7.4, Tabela P2.

Najznačajnije GRIND promenljive koje doprinose HDAC6 inhibitornoj aktivnosti se identifikuju na dijagramu PLS koeficijenata (Slika 35).



Slika 35. Dijagram PLS koeficijenata za 3D-QSAR model koji definiše HDAC6 inhibitornu aktivnost. Najuticajnije GRIND promenljive su označene na dijagramu.

Sa dijagrama PLS koeficijenata, identifikovani su najznačajniji deskriptori u okviru 7 grupa (blokova) GRIND promenljivih. GRIND promenljive koje imaju najveći uticaj na HDAC6_{6-16,0}

- **O-O promenljive (var99 i var109)** su lokalizovane između dve probe koje identifikuju akceptore vodoničnih veza na strukturama HDAC6 inhibitora. Promenljiva **var99** (na distanci 13,2 – 13,6 Å) i promenljiva **var109** (na distanci 17,2 – 17,6 Å) negativno doprinose HDAC6 inhibiciji u više od 70% modelovanih HDAC6 inhibitora. Vizuelizacijom položaja pomenutih O-O deskriptorskih promenljivih uviđeno je da postojanje donora vodonične veze u strukturi CAP grupe na distanci od 13,2 do 17,6 Å do hidroksamske kiseline negativno doprinosi HDAC6 inhibitornoj aktivnosti.
- **TIP-TIP promenljive (var234 i var246)** opisuju molekularni oblik HDAC6 inhibitora na različitim distancama i obe promenljive negativno doprinose pK_{iHDAC6} . Najveće vrednosti ovih promenljivih su zastupljene u manje potentnim jedinjenjima ($pK_{iHDAC6} < 7,5$).
- **DRY-O promenljiva (var303)** pozitivno doprinosi HDAC6 inhibitornoj aktivnosti u svim modelovanim inhibitorima. Ova promenljiva je lokalizovana između hidrofobne probe i probe koja identifikuje donore vodonične veze na strukturi inhibitora (distanca 15,6 – 16,0 Å).
- **GRIND promenljiva DRY-N1 (var335)** pozitivno doprinosi HDAC6 inhibitornoj aktivnosti. Opisana je na kraćoj distanci (2,0 – 2,4 Å) i nekonzistentno se javlja u različitim delovima molekula HDAC6 inhibitora, stoga nema praktičan značaj u interpretaciji 3D-QSAR modela.
- **DRY-TIP promenljiva (var440)** sugerise da je prisustvo hidrofobne CAP grupe u strukturi HDAC6 inhibitora na odgovarajućoj udaljenosti od hidroksamske grupe favorizovano za inhibiciju HDAC6 enzima.
- **O-TIP promenljiva (var572)** negativno doprinosi vrednosti pK_{iHDAC6} . Ova promenljiva je opisana oko strukture svih modelovanih inhibitora, osim u strukturama ChEMBL408513, ChEMBL1830536, ChEMBL320497 i ChEMBL55895. Javlja se između probe koja identifikuje donore vodoničnih veza na strukturi HDAC6 inhibitora i sterne probe opisane oko hidroksamske kiseline.
- **Promenljive N1-TIP (var630 i var641)** su izdvojene kao promenljive koje na manjoj distanci (14,4 – 14,8 Å) pozitivno, odnosno na većoj distanci (18,8 – 19,2 Å) negativno doprinose pK_{iHDAC6} . Najpotentnija jedinjenja u bazi HDAC6 inhibitora imaju najveće vrednosti promenljive **var630**. Za razliku od **var630**, probe koje definišu promenljivu **var641** su inverzno lokalizovane (N1 proba oko hidroksamske kiseline, TIP proba oko CAP grupa) oko strukture inhibitora, pa se ove dve promenljive međusobno ne mogu porediti.

Da bi se uspešno postavile hipoteze za dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora, neophodno je međusobno uporediti najznačajnije GRIND deskriptorske promenljive u oba 3D-QSAR modela.

4.3. Komparativna interpretacija najznačajnijih GRIND promjenljivih zastupljenih u oba 3D-QSAR modela

Uvidom u bazu PubMed početkom novembra 2021. godine, pronađene su 64 publikacije u kojima su objavljene 3D-QSAR studije za HDAC inhibitornu aktivnost. Među pronađenim radovima, postoji 6 radova u kojima je pomoću 3D-QSAR studija spregnutim sa drugim *in silico* tehnikama pristupljeno problemu selektivnosti ka određenoj HDAC izoformi. Prvi pokušaji 3D-QSAR modelovanja inhibitora selektivnih za klasu II HDAC-ova su publikovani 2008. godine²⁸⁶. Nakon skoro jedne decenije, publikovane su studije koje ispituju kvantitativne odnose strukture i HDAC2²⁸⁷, HDAC8^{288,289} i HDAC1 inhibicije²⁹⁰. Među navedenim publikacijama, ne postoje studije u kojima su pripremljeni 3D-QSAR modeli za dva ili više HDAC izoenzimskih inhibitora.

U ovoj doktorskoj disertaciji su pripremljena dva 3D-QSAR modela, jedan model opisuje i kvantifikuje doprinose strukturnih elemenata važnih za HDAC1 inhibiciju. HDAC1 izoforma je izabrana kao predstavnik klase I HDAC-ova, dok je drugi model ispitivao odnose strukture i inhibicije HDAC6 izoforme (klasa IIb HDAC). U oba skupa inhibitora se nalaze neselektivni inhibitori, preuzeti sa dostupne baze ChEMBL. Broj zajedničkih inhibitora za oba skupa je 29 jedinjenja (HDAC1 3D-QSAR model pripremljen na osnovu 36 jedinjenja, dok je HDAC6 3D-QSAR model pripremljen koristeći 32 jedinjenja). Dodatna prednost naše studije je što, pored pripreme dva modela za poređenje i izdvajanje strukturnih determinanti koje doprinose selektivnosti inhibitora, jedan inhibitor nema istu trodimenzionalnu konformaciju u oba modela. Generisanjem virtuelnih bioaktivnih konformacija postiže se preciznije definisanje hemijskog prostora za inhibiciju HDAC1, odnosno HDAC6 izoenzima.

Razvijeni 3D-QSAR modeli prikazani u odeljcima 4.1. i 4.2. su korišćeni za analizu najznačajnijih GRIND deskriptorskih promjenljivih. Da bi se identifikovali „strukturni signali” koji doprinose afinitetu ka HDAC6 izoformi, a diskriminišu afinitet ka nuklearnoj izoformi HDAC1, kao model inhibitori su korišćeni skriptaid (ChEMBL96051, $pK_{iHDAC1}=8,824$ i $pK_{iHDAC6}=9,602$) i tubacin (ChEMBL356769, $pK_{iHDAC1}=6,486$ i $pK_{iHDAC6}=9,046$).

Cilj ovog dela studije je da se uporedi nekoliko grupa GRIND promjenljivih (DRY-TIP, TIP-TIP i DRY-O) i izvedu hipoteze za dizajn selektivnih HDAC6 inhibitora. Kriterijumi za odabir komparativnih GRIND promjenljivih su:

- Poređenje GRIND promjenljivih u oba 3D-QSAR modela je moguće samo u okviru iste klase promjenljivih (npr. poređenje TIP-TIP promjenljivih u HDAC1 i HDAC6 3D-QSAR modelima)
- Promenljive koje su lokalizovane na sličnoj distanci ($\pm 20\%$) u okruženju istih strukturnih determinanti ispitivanih HDAC1/HDAC6 inhibitora su komparativno interpretirane²⁹¹.

Izdvojene GRIND promenljive koje su korišćene za poređenje oba 3D-QSAR modela prikazane su u **Tabeli 14**.

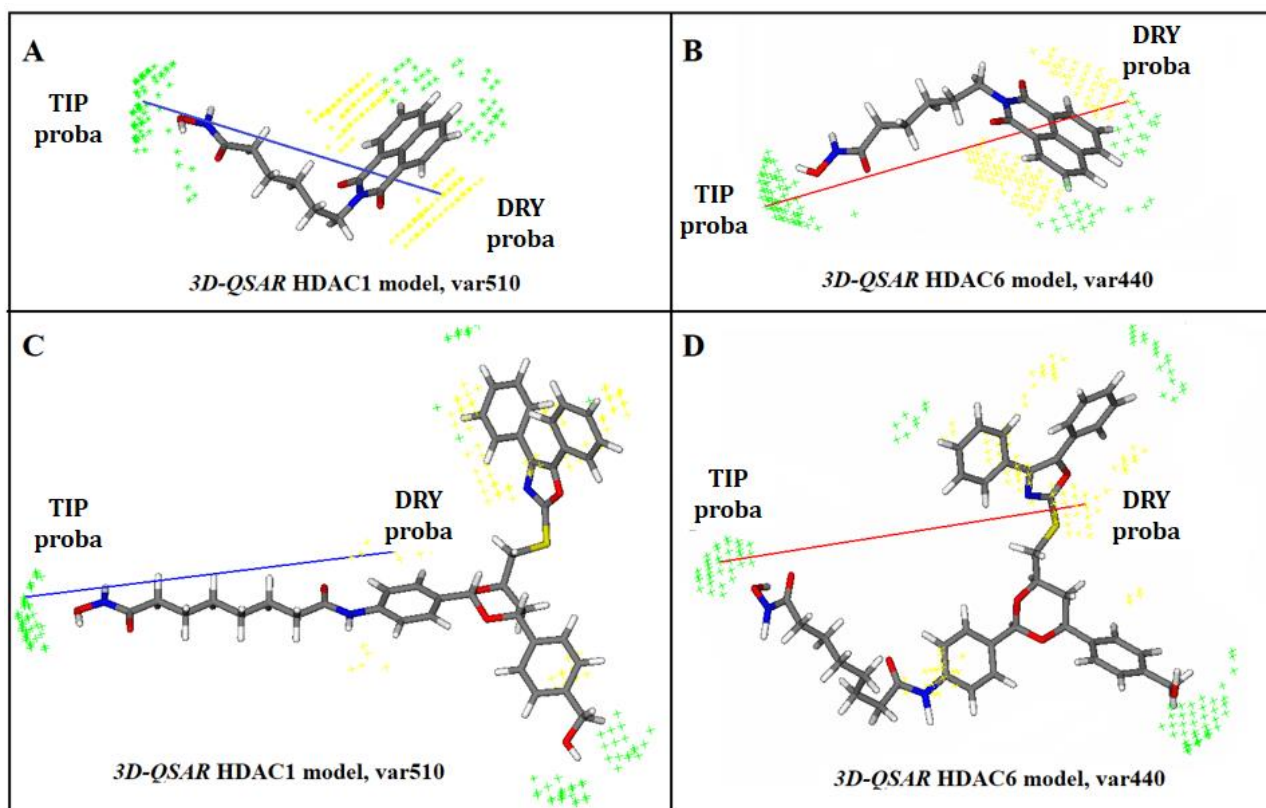
Tabela 14. Komparativni prikaz najznačajnijih GRIND promenljivih koje definišu HDAC1 i HDAC6 3D-QSAR modele

HDAC1 GRIND promenljiva (doprinos)	Rastojanje između proba (Å)	Zastupljenost GRIND promenljive u HDAC1 3D-QSAR modelu	HDAC6 GRIND promenljiva (doprinos)	Rastojanje između proba (Å)	Zastupljenost GRIND promenljive u HDAC6 3D-QSAR modelu
v275 TIP-TIP (pozitivan)	16,4 – 16,8	Najznačajnija promenljiva koja je opisana kod HDAC1 inhibitora sa manje voluminoznim CAP grupama.	v234 TIP-TIP (negativna)	14,4 – 14,8	Promenljiva opisana kod svih modelovanih inhibitora.
v281 TIP-TIP (negativan)	18,8 – 19,2	Prisutna kod 70% HDAC1 inhibitora, najveće vrednosti ove promenljive zastupljene kod jedinjenja čije su $pK_{iHDAC1} < 8,0$.	v246 TIP-TIP (negativan)	19,2 – 19,6	Promenljiva opisana kod 70% HDAC6 inhibitora, veće vrednosti ove promenljive su zastupljene kod derivata benzimidazola, sa nižim konstantama inhibicije ($pK_{iHDAC6} < 7,5$).
v293 TIP-TIP (negativan)	23,6 – 24,0	Zastupljena u sedam HDAC1 inhibitora sa voluminoznim CAP grupama, lokalizovana između dve sterne probe koje su opisane oko hidroksamske kiseline i CAP grupa.	v303 DRY-O (pozitivan)	15,6 – 16,0	Promenljiva je lokalizovana između hidrofobne probe i probe koja identifikuje donore vodonične veze; ima najveću vrednosti kod najpotentnijih HDAC6 inhibitora CHEMBL356769 i CHEMBL96051.
v510 DRY-TIP (negativan)	16,8 – 17,2	Promenljiva izražena kod 50% modelovanih HDAC1 inhibitora; karakteristično se javlja kod manje potentnih HDAC1 inhibitora čije su $pK_{iHDAC1} < 8,0$.	v440 DRY-TIP (pozitivan)	17,6 – 18,0	Promenljiva je lokalizovana između hidrofobne i sterne probe; ima najveće vrednosti kod potentnih HDAC6 inhibitora ($pK_{iHDAC6} > 8,3$).

Prva klasa GRIND promenljivih koja ima suprotne uticaje na inhibiciju HDAC1, odnosno HDAC6 izoformi je **DRY-TIP** promenljiva (**var510** u HDAC1 3D-QSAR modelu i **var440** u HDAC6 3D-QSAR modelu). Promenljiva je definisana hidrofobnom i sternom probom, koje su opisane oko CAP grupe (definiše hidrofobne interakcije) i hidroksamske kiseline (definiše sterne interakcije). U oba modela, promenljiva je definisana na sličnom rastojanju između proba (16,8 – 17,2 Å u HDAC1 3D-QSAR modelu i 17,6 – 18,0 Å u HDAC6 3D-QSAR modelu). Za skup HDAC1 inhibitora, hidrofobne CAP grupe na rastojanju od 17 Å od hidroksamske kiseline negativno utiču na inhibiciju HDAC1 izoforme, dok prisustvo CAP grupe na sličnom rastojanju od hidroksamske kiseline pozitivno doprinosi inhibiciji HDAC6 izoenzima.

Vizuelizacijom GRIND promenljivih na trodimenzionalnim strukturama inhibitora (**Slika 36**) i poređenjem eksperimentalnih vrednosti inhibicije za dva model jedinjenja – skriptaida ($pK_{iHDAC1}=8.824$ i $pK_{iHDAC6}=9.602$) u odnosu na tubacin ($pK_{iHDAC1}=6.486$ i $pK_{iHDAC6}=9.046$),

može se doneti zaključak da distanca između CAP grupe i hidroksamske kiseline doprinosi selektivnosti ka HDAC6 izoformi. Na osnovu 3D-QSAR modela u našoj studiji, zaključuje se da dužina ugljovodoničnog linkera favorizuje selektivnost inhibicije HDAC6 izoenzima. Ovakav zaključak je u skladu sa prethodnim istraživanjima, u kojima je empirijski prikazan odnos strukture i HDAC6 inhibicije²⁹².

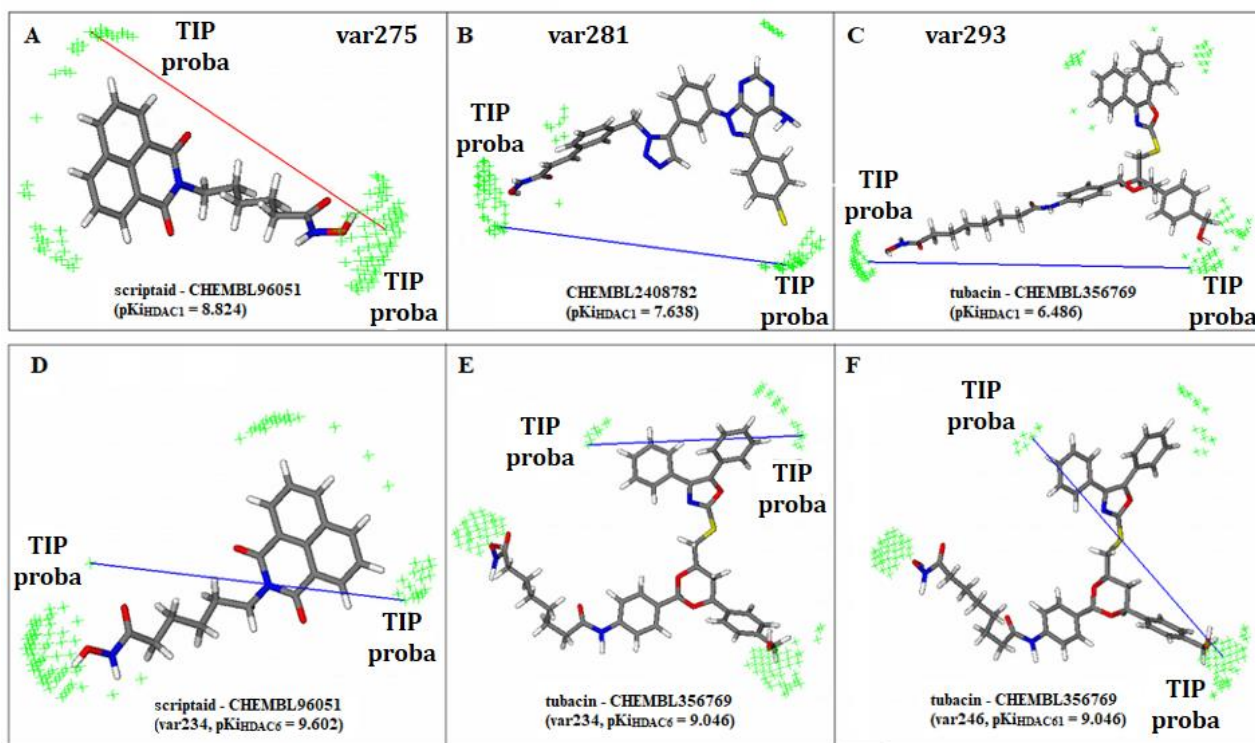


Slika 36. Prikaz DRY-TIP promenljivih (var510 iz HDAC1 i var440 iz HDAC6 3D-QSAR modela) u jedinjenjima CHEMBL96051 (skriptaid - A i B) i CHEMBL356769 (tubacin - C i D); žuti krstići predstavljaju hidrofobnu DRY probu, zeleni krstići predstavljaju TIP sondu; Pozitivne interakcije su prikazane crvenom linijom, dok su negativne interakcije prikazane plavom linijom.

Klasa GRIND deskriptorskih promenljivih koja upotpunjuje racionalizaciju selektivnosti ka HDAC6 izoformi su **TIP-TIP promenljive**. Ove promenljive su identifikovane kao najznačajnije u oba 3D-QSAR modela. U HDAC1 3D-QSAR modelu **var275** (rastojanje 16,4 – 16,8 Å, **Slika 37A**) pozitivno doprinosi HDAC1 inhibitornoj aktivnosti, dok **var281** (rastojanje 18,8-19,2 Å, **Slika 37B**) i **var293** (rastojanje 23,6-24,0 Å) imaju negativan uticaj na inhibiciju HDAC1. Optimalan molekularni oblik inhibitora koji pozitivno doprinosi inhibiciji HDAC1 izoforme je definisan promenljivom **var275**. Ova GRIND promenljiva definiše molekularni oblik inhibitora na kraćem rastojanju (16,4 – 16,8 Å) i izražena je kod najaktivnijih HDAC1 inhibitora. Promenljiva **var275** u poređenju sa **var281** i **var293** koje su formirane na većim rastojanjima između sternih proba, doprinosi objašnjenju zašto smanjenje broja ugljenika u linkeru doprinosi HDAC1 inhibitornom profilu jedinjenja.

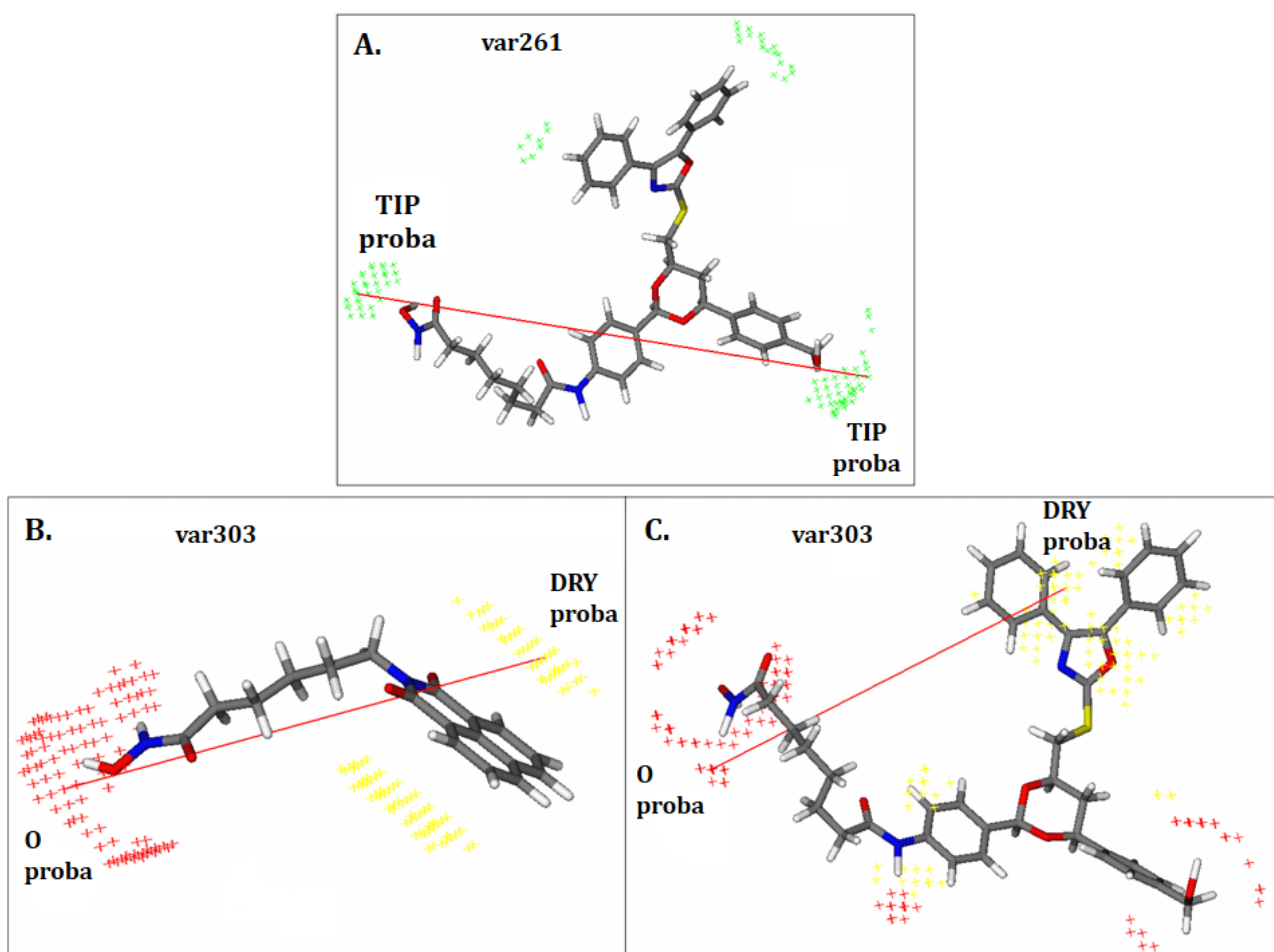
Za razliku od HDAC1 3D-QSAR modela, **TIP-TIP promenljive var234** (14,4 – 14,8 Å) i **var246** (19,2 – 19,6 Å) negativno doprinose pK_{iHDAC6} kod jedinjenja skriptaida, ChEMBL96051 (**Slika 37D**). Ove deskriptorske promenljive su opisane između dve TIP probe koje definišu sterne interakcije CAP grupe i sterne interakcije hidroksamske kiseline. Međutim, ukoliko se vizeulizuju ove promenljive kod tubacina i manje potentnog HDAC6 inhibitora

ChEMBL356769 (**Slika 37E i 37F**), primećuje se drugačija lokalizacija TIP-TIP **var234** i **var246** promenljivih (definišu sterne interakcije u CAP grupi). Zbog nekonzistentne interpretacije pomenutih TIP-TIP promenljivih, **var234** i **var246** se ne mogu koristiti za interpretaciju HDAC6 3D-QSAR modela i poređenje sa HDAC1 3D-QSAR modelom. U skupu HDAC6 inhibitora koji su korišćeni za 3D-QSAR modelovanje postoje jedinjenja čiji hemijski skelet je sličan tubacinu. Sa dijagrama PLS koeficijenata (**Slika 35**) promenljiva **var261** na rastojanju 25,2 – 25,6 Å jasno ukazuje na povoljnu interakciju aromatičnog prstena u CAP grupi i hidroksamske kiseline u tubacinu (CHEMBL356769, **Slika 38**). Iako ova promenljiva ne postoji kod većine inhibitora u HDAC6 3D-QSAR modelu, promenljiva **var261** ilustruje važnost dužine linkera kod HDAC6 inhibitora (klase modelovanih inhibitora sličnih tubacinu), u poređenju sa inhibitorima HDAC1 enzima.



Slika 37. Prikaz TIP-TIP promenljivih iz HDAC1 3D-QSAR modela (**A, B i C**) i TIP-TIP promenljivih iz HDAC6 3D-QSAR modela (**D, E i F**) kod jedinjenja skriptaida, CHEMBL96051 (**A i D**), jedinjenja CHEMBL2408782 (**B i E**) i tubacina - CHEMBL356769 (**C i F**). Zeleni krstići označavaju sterne (TIP) probe; GRIND promenljive koje negativno koreliraju sa pK_{iHDAC6} su prikazane plavom bojom, dok su promenljive koje pozitivno doprinose pK_{iHDAC6} prikazane crvenom bojom.

U HDAC6 3D-QSAR modelu, GRIND promenljiva **DRY-O (var303)** je najznačajnija nezavisna promenljiva sa pozitivnim doprinosom na inhibiciju HDAC6 izoforme. Može se primetiti (**Slika 31**) da GRIND promenljive u okviru iste klase ne utiču značajno na HDAC1 inhibitornu aktivnost. Molekularna interakcija između hidrofobne DRY probe sa CAP grupom i probe O koja intereaguje sa donorima vodonične veze (hidroksamskim kiselinama) je jedinstvena za HDAC6 inhibitorni skup jedinjenja u 3D-QSAR modelu. Ova promenljiva je zastupljena u skoro svim inhibitorima u training skupu jedinjenja na rastojanju 15,6 – 16,0 Å (**Slika 38**).



Slika 38A. Prikaz TIP-TIP promenljive (**var 261**) u jedinjenju tubacin - CHEMBL356769; **B.** prikaz promenljive DRY-O (**var303**) u jedinjenjima skriptaid - CHEMBL96051 i **C.** tubacin - CHEMBL356769, na distanci 15,6 – 16,0 Å. Zeleni krstići predstavljaju sterne probe, žuti krstići označavaju hidrofobne regione, crveni krstići predstavljaju probu koja identifikuje donore vodonične veze. Pozitivne interakcije su obojene crvenom bojom.

Interpretacijom najznačajnijih deskriptorskih promenljivih u oba 3D-QSAR modela, mogu se izvesti najvažniji zaključci za *in silico* dizajn novih, selektivnih inhibitora:

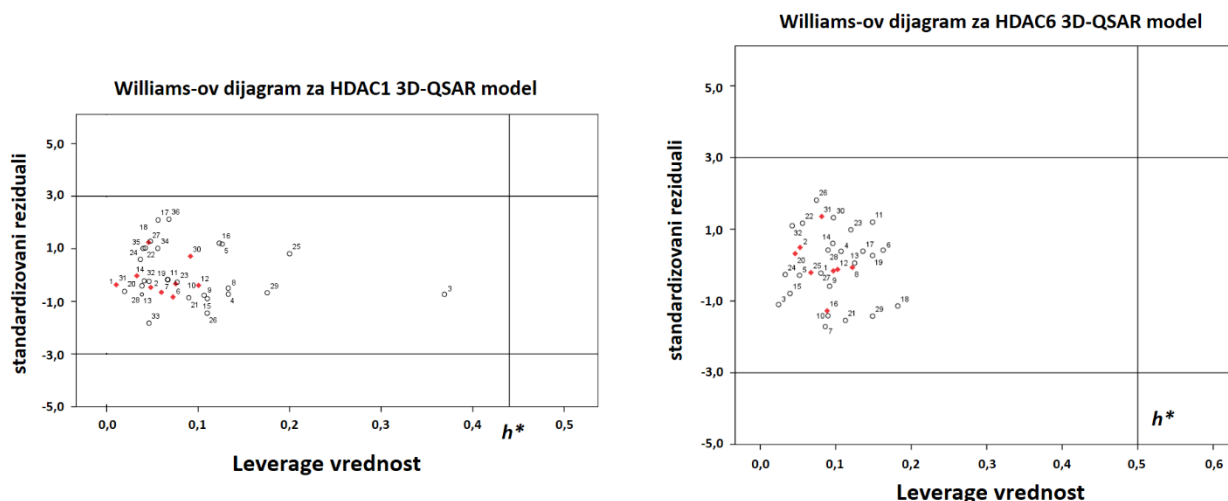
- Hidrofobne interakcije CAP grupe sa DRY probom su važne za HDAC6 inhibitorski profil modelovanih jedinjenja, što se primećuje izdvajanjem DRY-TIP (**var440**) i DRY-O (**var303**) kao najuticajnijih promenljivih na pK_{iHDAC6} . GRIND promenljive iz iste klase u HDAC1 3D-QSAR modelu imaju negativan uticaj na HDAC1 inhibitorsku aktivnost. Na osnovu prikazanih determinanti oba 3D-QSAR modela, može se pretpostaviti da hidrofobnost CAP grupe potencira selektivnost inhibitora ka HDAC6 izoformi.
- Trodimenzionalni oblik (geometrija) HDAC6 inhibitora (definisani TIP-TIP) negativno doprinosi (diskriminiše) biološku aktivnost HDAC6 inhibitora. Vrednosti TIP-TIP promenljivih (**var234** i **var246**) su najviše u srednje potentnim HDAC6 inhibitorima u okviru training skupa jedinjenja (klasa benzimidazola, $pK_{iHDAC6} < 7,5$). U poređenju sa HDAC1 3D-QSAR modelom, TIP-TIP **var275** pozitivno utiče na inhibiciju HDAC1 (promenljiva opisana na sličnom rastojanju kao i u HDAC6 modelu, čvorne tačke proba pozicionirane između istih strukturnih determinanti HDAC inhibitora) izoforme. Na osnovu ovih podataka, pretpostavlja se da voluminoznost CAP grupe, kao i rastojanje između CAP grupe do hidroksamske kiseline može da doprinese boljoj rezoluciji inhibitorskog profila jedinjenja na HDAC1 i HDAC6 izoenzimima, odnosno da unapredi

selektivnost jedinjenja na HDAC6 izoformi. Hipoteza generisana nakon dobijenih 3D-QSAR modela je u saglasnosti sa prethodno publikovanim eksperimentalnim rezultatima u drugim istraživačkim grupama²⁹³.

- HDAC6 inhibitori koji u korišćenom training skupu imaju najniže pK_i vrednosti, $pK_{iHDAC6} < 7,0$ (primer: ChEMBL55895, ChEMBL1830396, ChEMBL1851943 i ChEMBL1830422) imaju linkere sa manjim brojem C atoma, i zbog toga nisu definisani DRY-O promenljivom (**var303**) kao najznačajnijom za HDAC6 inhibitornu aktivnost. Srednje potentni inhibitori ($pK_{iHDAC6} = 7,0 - 8,0$) su opisani malim vrednostima promenljive DRY-O **var303**, na osnovu čega se može pretpostaviti da dizajn i sinteza selektivnih HDAC6 inhibitora treba da budu usmereni ka dobijanju inhibitora sa optimalnom dužinom linkera od 6 do 8 C atoma, koliko je definisano u HDAC6 3D-QSAR modelu.

4.4. Domen primenljivosti generisanih 3D-QSAR modela

Prema zahtevima Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD), najznačajnije promenljive iz oba 3D-QSAR modela su upotrebljene za definisanje domena primenljivosti. *Williams-ov* dijagram je konstruisan za jedinjenja u training i test grupama (**Slika 39**).



Slika 39. Prikazi *Williams-ovog* dijagrama za HDAC1 3D-QSAR model (levo) i HDAC6 3D-QSAR model (desno)

Na osnovu izračunatih domena primenljivosti, zaključuje se da jedinjenja koja čine training i test skup u oba modela imaju *leverage* vrednosti koje su ispod granične (h^*) i ujedno njihovi standardizovani reziduali su u opsegu ± 3 standardne devijacije. Dodatno, sa *Williams-ovih* dijagrama se može uočiti da ne postoje *outlier* jedinjenja (ona čija je hemijska struktura značajno različita od ostalih molekula koji definišu 3D-QSAR modele).

4.5. Dizajniranje novih, selektivnih HDAC6 inhibitora zasnovanih na 3D-QSAR modelima i pretrazi fragmenata kao novih CAP grupa

3D-QSAR modeli koji opisuju HDAC1, odnosno HDAC6 inhibitornu aktivnost u ovoj doktorskoj disertaciji su generisani kao validni, precizni i pouzdani modeli pomoću kojih se u definisanom domenu primenljivosti (hemijskom prostoru) mogu predvideti biološke aktivnosti novodizajniranih HDAC inhibitora.

Interpretacija GRIND promenljivih u oba 3D-QSAR modela upotrebljena je za dizajniranje novih HDAC6 inhibitora zasnovanih na pretrazi fragmenata (*Fragment-based drug design*). Na osnovu komparativne analize 3D-QSAR modela (poglavlje 4.3), zaključeno je da hidrofobnost i molekularni volumen CAP grupe, kao i dužina ugljovodoničnog linkera mogu da budu iskorišćeni kao dve glavne smernice za dizajn novih, selektivnih HDAC6 inhibitora. Jedinjenje koje je korišćeno kao referentno (šablon) u pretrazi novih CAP grupa je skriptaid (CHEMBL96051). Skriptaid ima veći afinitet ka HDAC6 izoformi ($pK_{iHDAC6} = 9,602$) u odnosu na HDAC1 izoenzim ($pK_{iHDAC1} = 8,824$).

Jedna od inicijalnih strategija dizajniranja novih, selektivnih HDAC6 inhibitora zasnovana je na zameni heterocikličnog skeleta 1,8-naftalimida u strukturi skriptaida. Opravdanost ove strategije zasniva se na pozitivnom doprinosu najuticajnijih GRIND nezavisnih promenljivih koje definišu hidrofobnost CAP grupe (DRY-TIP, **var440** i DRY-O, **var303**). Druga odrednica koja je poslužila za identifikaciju novih CAP grupa je molekularna zapremina naftalimidnog jezgra, prepoznata na osnovu klase TIP-TIP promenljivih. Na osnovu rezultata HDAC1 3D-QSAR modela (**var281** i **var293**), čini se da je molekularna zapremina CAP grupe diskriminatorna za inhibiciju HDAC1 biološke aktivnosti (negativno doprinosi inhibiciji HDAC1 izoforme), dok se molekularna zapremina CAP grupe HDAC6 inhibitora ne može jednoznačno tumačiti na osnovu naših rezultata 3D-QSAR modela. Pretraga novih fragmenata čija je izračunata molekularna zapremina veća od molekularne zapremine 1,8-naftalimidne CAP grupe je odabrana kao dodatni kriterijum za izbor novih CAP grupa.

Konačno, druga strategija koja je implementirana u dizajnu novih, selektivnih HDAC6 inhibitora jeste izmena vrste i dužine ugljovodoničnog linkera u strukturi HDAC inhibitora. Interpretacijom DRY-O promenljive (**var 303**) u HDAC6 3D-QSAR modelu se pretpostavilo da dužina linkera potentnih HDAC6 inhibitora utiče na selektivan inhibitorni profil derivata alkilhidroksamskih kiselina. Poznato je da aromatični linker (fenil grupa)²²⁷ u strukturi inhibitora doprinose selektivnoj HDAC6 inhibiciji, međutim sintetisani su derivati fenilhidroksamskih kiselina koji selektivno inhibiraju HDAC8 izoformu (primer *meta* supstituisanih fenilhidroksamskih kiselina¹⁸⁷). Uzimajući u obzir značenje GRIND promenljivih koje definišu virtuelne receptorske interakcije CAP grupa i hidroksamskih kiselina razdvojenih različitim linkerima, kao i opisane literaturne podatke, strukture odabranih fragmenata su korišćene za dizajniranje inhibitora sa alkil (heksil- i oktil-) kao i fenil- linkerima (**Slika 25**).

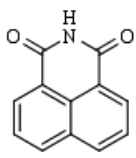
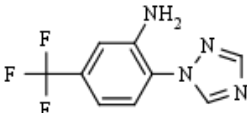
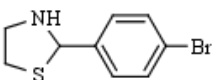
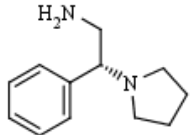
Fragmenti u sastavu virtuelnih biblioteka **General Fragment Library** i **Epigenetic Targeted Library** (kompanije *Life Chemicals Inc*) su korišćeni za skrining i identifikaciju fragmenata sa sličnim fizičko-hemijskim osobinama kao 1,8-naftalimid. U programu Dragon v 6.0.7. su izračunati i odabrani najznačajniji fragmenti koji imaju približno slične ili veće vrednosti McGowan zapremine (V_x) i ukupne površine fragmenta izračunate iz van der Waals-ovih prečnika (S_{tot}). Neki od najznačajnijih fragmenata za dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora su prikazani u **Tabeli 15**, dok su strukture ostalih, potencijalnih fragmenata za buduće studije prikazane u **Prilogu 7.5**. doktorske disertacije. Na osnovu prethodno

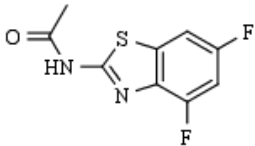
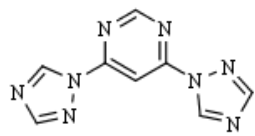
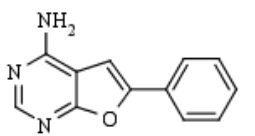
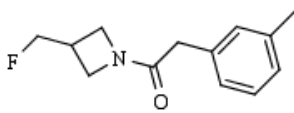
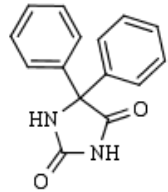
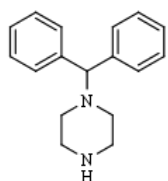
objavljenih rezultata pretrage fragmenata kao HDAC inhibitora²⁹⁴, došlo se do konsenzusa da je visokopropusnim skriningom jedne desetine fragmentne baze moguće identifikovati polovinu stvarno aktivnih fragmenata na HDAC enzimu. Uzimajući u obzir pomenutu stopu pogodaka u virtuelnom skriningu (engl. *hit rate*), nakon izračunavanja Dragon deskriptora za 44 850 jedinjenja u obe fragmentne baze, zadržano je 4485 fragmenata čija je vrednost V_x parametara jednaka ili veća od V_x vrednosti za 1,8-naftalimid ($V_x = 205,8 \text{ \AA}^3$).

Pregledom redukovane baze od 4485 jedinjenja, primećena je velika zastupljenost neheterocikličnih organskih molekula. Njihovim uklanjanjem u programu Discovery Studio, preostalih 1000 heterocikličnih fragmenata je zadržano za dizajniranje novih HDAC6 inhibitora. Fragmenti koji su odabrani za detaljniju analizu su razmatrani sa stanovišta izračunatih Dragon deskriptora (birani su fragmenti koji imaju slične ili veće vrednosti deskriptora $MlogP$, SA_{tot} i V_x). Drugi kriterijum za odabir fragmenata se zasnivao na prisustvu nukleofilnih funkcionalnih grupa koje mogu u jednom sintetskom koraku da se derivatizuju sa različitim bromo estrima.

U **Tabeli 15** su prikazani fragmenti odabrani na osnovu goreopisanih kriterijuma, ostali heterociklični fragmenti koji su izdvojeni iz virtuelnih baza kompanije *Life Chemicals*, i koji ne zadovoljavaju neki od pomenutih kriterijuma su prikazani u Prilogu 7.5.

Tabela 15. Prikaz devet najznačajnijih fragmenata odabranih za detaljniju *in silico* analizu i sintezu novih selektivnih HDAC6 inhibitora

Fragment	MlogP	SA _{tot} (Å ²)	V _x (Å ³)	Dostupnost
 1,8 - naftalimid	2,831	191,659	205,864	CAS broj: 81-83-4 Sigma Aldrich 10 g - €23
 F2124-0419 2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilin	2,840	214,737	206,977	CAS broj: 438019-67-1 Enamine 10 g - €660
 F1912-0001 2-(4-bromofenil)thiazolidin	2,836	211,018	208,272	CAS broj: 67086-81-1 Enamine 10 g - €2226
 F3308-1195 2-fenil-2-(pirolidin-1-il)etan-1-amin	2,113	224,461	210,266	CAS broj: 31466-46-3 Enamine 10 g - €1210

 <p>F1813-1101 N-(4,6-difluorobenzo[d]thiazol-2-yl)acetamid</p>	2,688	213,875	211,379	CAS broj: 313554-90-4 Enamine 10 g – €330
 <p>F1967-1731 4,6-di(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pirimidin</p>	3,447	205,347	212,359	CAS broj: 141652-41-7 Enamine 100 mg – €220
 <p>F0918-2040 6-fenilfuro[2,3-d]pirimidin-4-amin</p>	2,835	213,969	222,126	CAS broj: 18031-97-5 Sigma Aldrich 1 g - €403
 <p>F6554-4810 1-(3-(fluorometil)azetidin-1-il)-2-(m-tolil)etan-1-on</p>	2,833	240,840	229,767	CAS broj: 313554-90-4 Life Chemicals 2 mg – €79
 <p>F0020-1370 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-dion</p>	2,607	273,44	267,658	CAS broj: 57-41-0 Sigma Aldrich 10 g – €161
 <p>F0268-2663 1-(difenilmetil)piperazin</p>	3,406	281,678	280,681	CAS broj: 841-77-0 Life Chemicals 10g – €20

Razmatrajući sintetske mogućnosti i dostupnost fragmenata, za dizajn novih, selektivnih HDAC6 inhibitora odabrani su najisplativiji fragmenti, *1-(difenilmetil)piperazin* (1-benzhidrilni piperazin, **1-BHP**) i *5,5-difenil-imidazolidin-2,4-dion* (antiepileptik fenitoin). Odabir oba fragmenta je zasnovan na sledećim kriterijumima:

- Cena: 1-BHP je 20 evra za 10 grama, dok je fenitoin moguće sintetisati iz benzila i uree.
- 1-BHP, kao i fenitoin je moguće alkilovati različitim bromo-estrima. Dobijene derivate metil estara, kao intermedijere, je moguće supstituisati sveže pripremljenim hidroksilaminom i izolovati finalne hidroksamske kiseline.

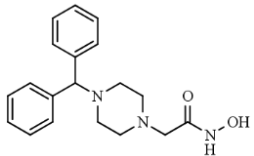
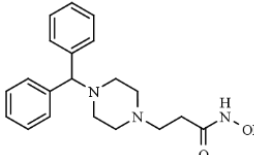
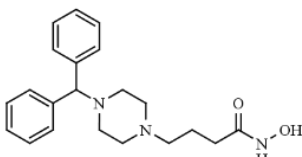
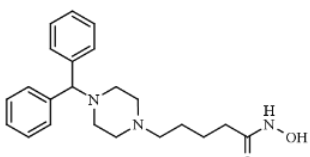
- Oba jedinjenja zadovoljavaju fragmentno pravilo trojke (*Rule of three, Ro3*); imaju molekulske mase manje od 300, $cLogP \leq 3$, broj donora i akceptora vodonične veze je manji od 3, pojedinačno.

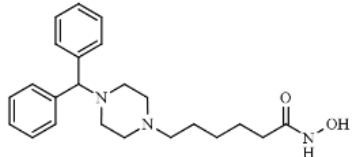
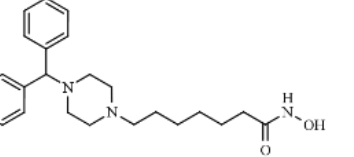
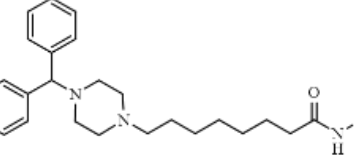
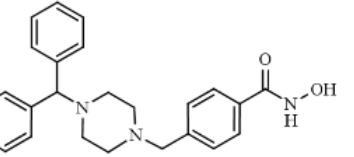
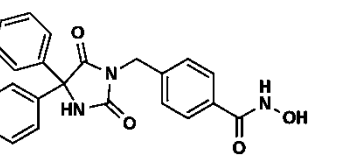
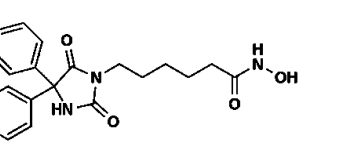
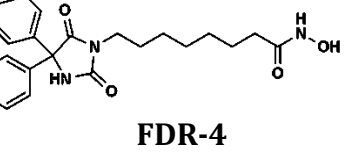
Jedinjenja 1-(difenilmetil)piperazin i 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-dion je moguće u reakciji nukleofilne supstitucije derivatizovati sa različitim bromo estrima. Zbog toga je predloženo da se od 1-(difenilmetil)piperazina sintetiše prva klasa derivata koji imaju 1– 7 ugljenikovih atoma u linkeru (koristeći bromo metilestre različite dužine ugljovodoničnog niza, kao i metilestar 4-bromometilbenzoeve kiseline). Modifikacija dužine alkil niza bromo metil estara korišćenih u sintezi zasnovana je na zaključcima dobijenim u obe 3D-QSAR studije (potpoglavlje 4.3).

Kao druga klasa derivata, predložena je supstitucija 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona (fenitoina) metil estrima 6-bromoheksanske kiseline, 8-bromooktanske kiseline i 4-bromometil benzoeve kiseline. Jedinjenja koja su predložena za sinteze su geometrijski optimizovana, molekulskim dokingom su predviđene njihove bioaktivne konformacije na obe HDAC izoforme (HDAC1/HDAC6). Izdvojene trodimenzionalne konformacije su dodate u program *Pentacle* (kao *test set* jedinjenja) za predviđanja bioloških aktivnosti (pKi vrednosti).

Predložena jedinjenja za sintezu, zajedno sa predviđenim pKi vrednostima u oba 3D-QSAR modela su data u **Tabeli 16**.

Tabela 16. Prikaz hemijske strukture dizajniranih inhibitora i predviđenih pKi vrednosti na osnovu oba 3D-QSAR modela

Struktura dizajniranog jedinjenja	pKi_{HDAC1}	pKi_{HDAC6}
 <p>BDR-2</p>	8,409 #	7,544 #
 <p>BDR-3</p>	9,365 #	7,630 #
 <p>BDR-4</p>	8,511 #	7,583 #
 <p>BDR-5</p>	7,641 #	7,355 #

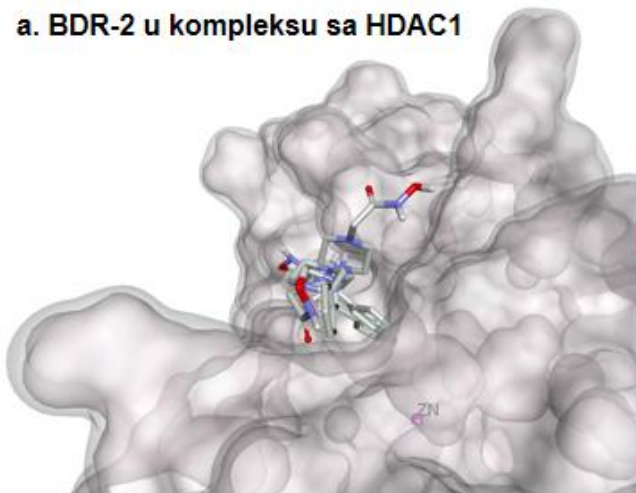
 <p>BDR-6</p>	8,276 #	8,762
 <p>BDR-7</p>	8,072	8,276
 <p>BDR-8</p>	8,594	8,371
 <p>BDR-9</p>	8,153	8,385
 <p>FDR-2</p>	7,852 #	8,269
 <p>FDR-3</p>	8,353	8,440
 <p>FDR-4</p>	8,113	8,180

vrednosti sa oznakom (#) su predviđene za konformacije dobijene na osnovu doking predviđanja, ali se zbog izostanka kanoničnog vezivanja za ispitivane histon deacetilaze ne mogu smatrati pouzdanim

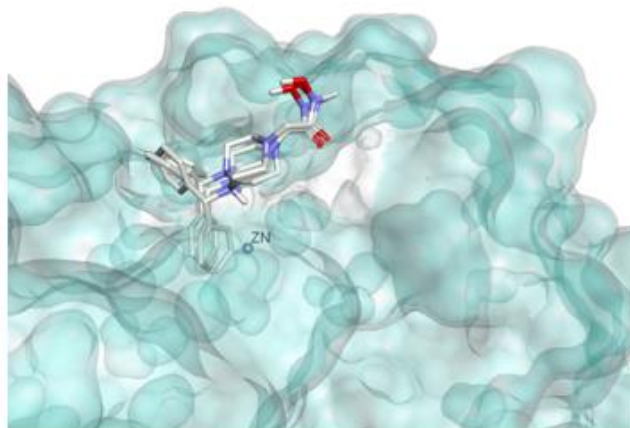
Prikazana jedinjenja u **Tabeli 16** su odabrana za sintezu i predstavljaju nove hemijske strukture koje se ne nalaze u u bazi *SciFinder*. Razlozi za dizajniranje alkilhidroksamskih kiselina, derivata 1-benzhidrilnog piperazina koji sadrže od 1 do 7 ugljenikovih atoma u linkeru su određivanje optimalne dužine linkera za dobijanje selektivnih HDAC6 inhibitora, kao i identifikacija strukturno sličnih derivata, kao negativnih kontrola (eng. *null compounds*) za biološka testiranja.

Prikazi vezivnih konformacija dizajniranih jedinjenja su dati na **Slikama 40, 41, 42 i 43**.

a. BDR-2 u kompleksu sa HDAC1



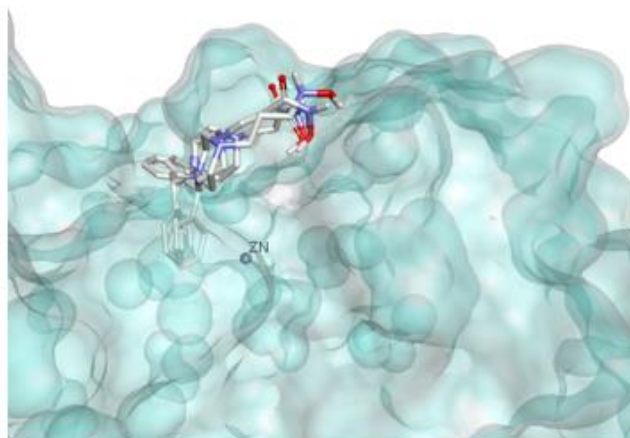
b. BDR-2 u kompleksu sa HDAC6



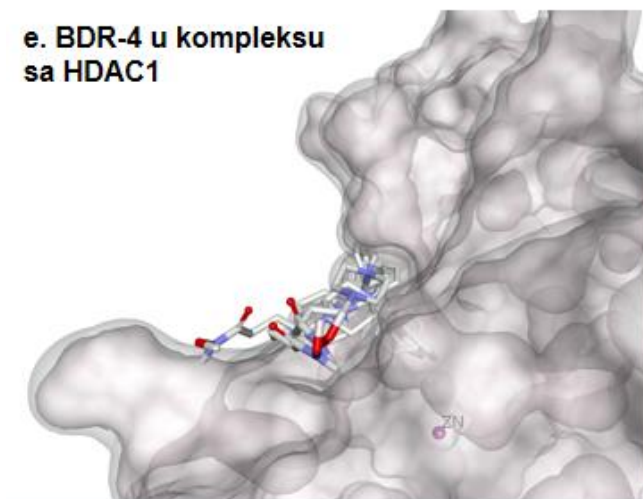
c. BDR-3 u kompleksu sa HDAC1



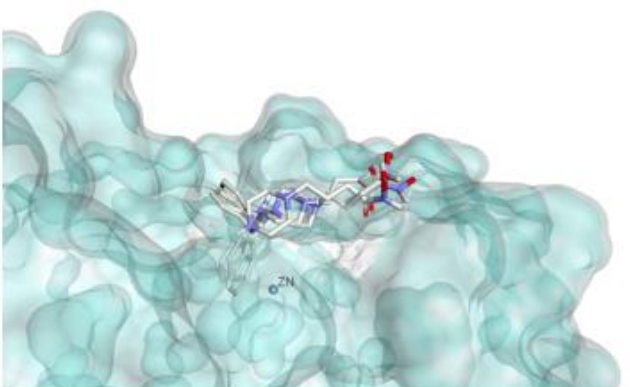
d. BDR-3 u kompleksu sa HDAC6



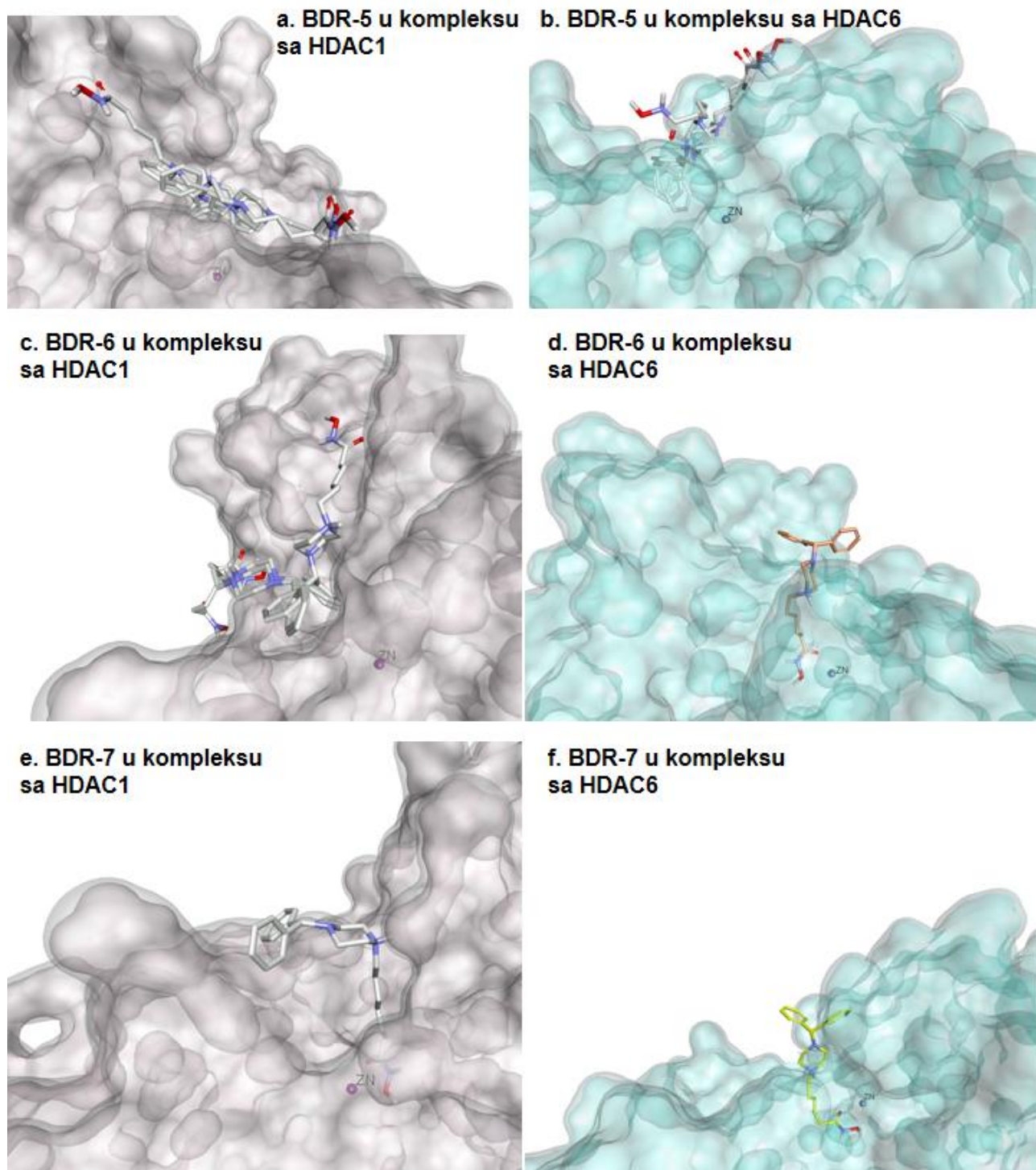
e. BDR-4 u kompleksu sa HDAC1



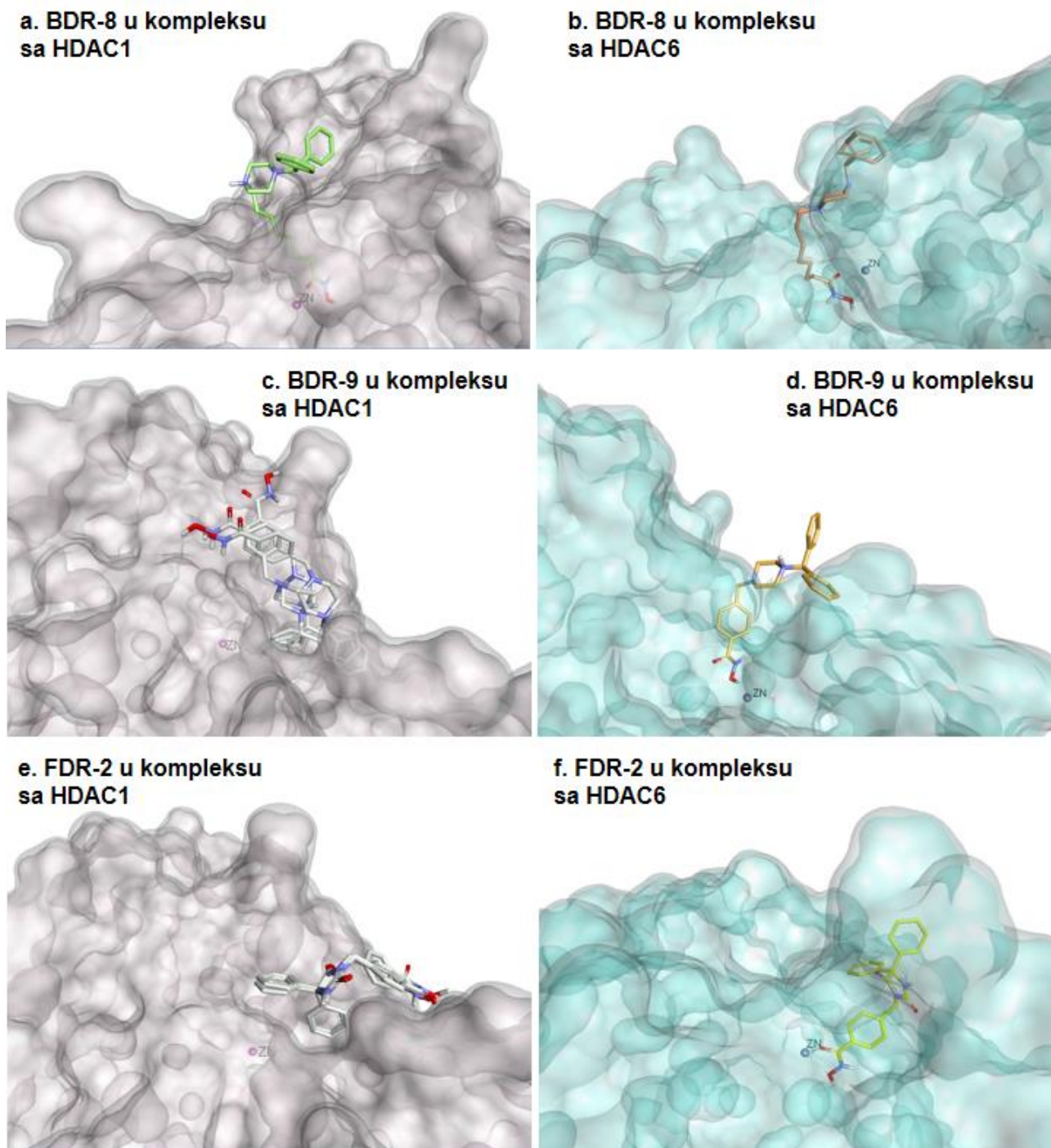
f. BDR-4 u kompleksu sa HDAC6



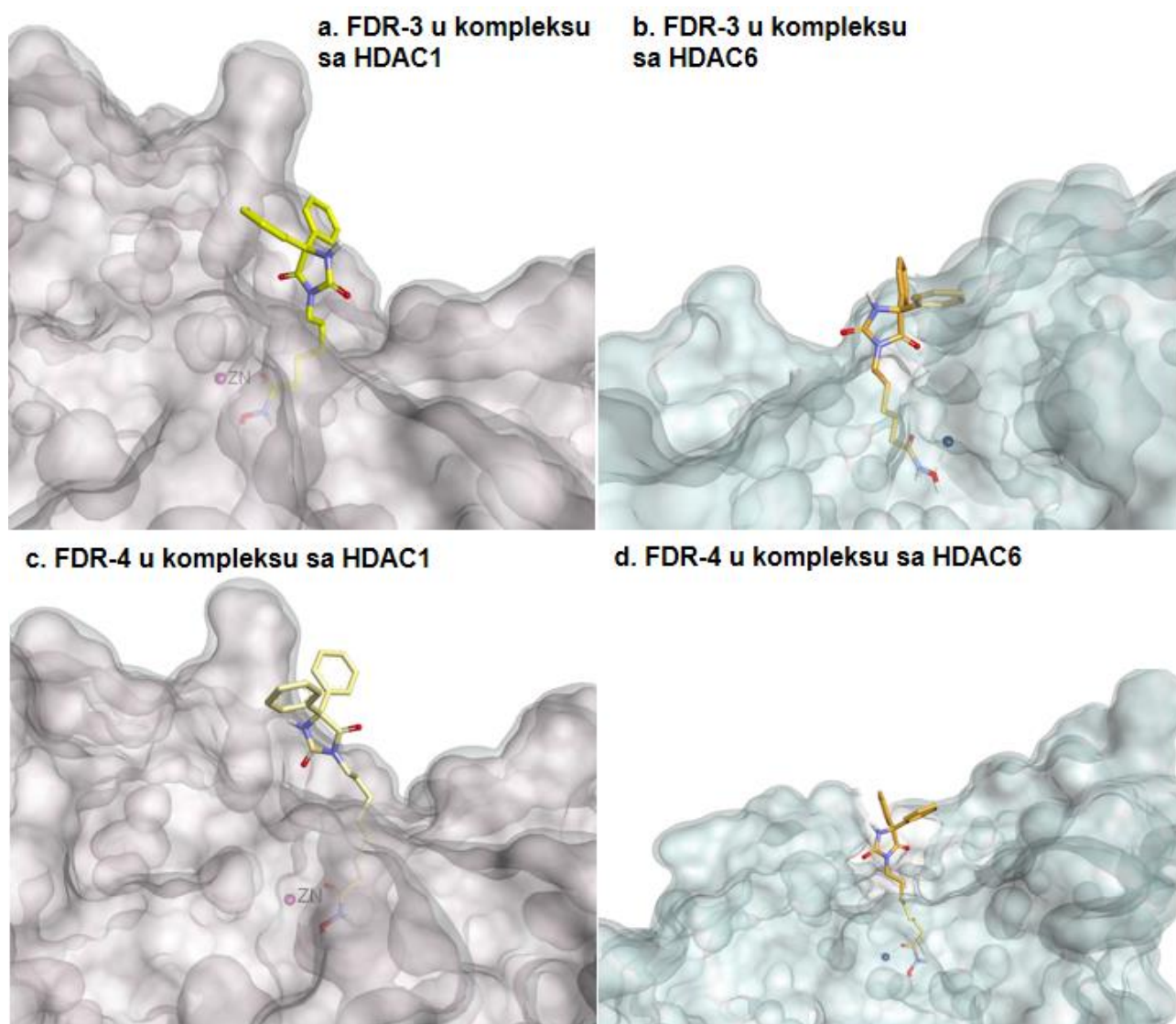
Slika 40. Prikaz *in silico* predviđenih vezivnih konformacija (tri najbolje rangirane konformacije) novosintetisanog **a)** jedinjenja BDR-2 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima; **b)** jedinjenja BDR-2 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima; **c)** jedinjenja BDR-3 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima; **d)** jedinjenja BDR-3 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima; **e)** jedinjenja BDR-4 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima i **f)** jedinjenja BDR-4 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima



Slika 41. Prikaz *in silico* predviđenih vezivnih konformacija novosintetisanog **a)** jedinjenja BDR-5 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima (tri najbolje rangirane konformacije); **b)** jedinjenja BDR-5 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima (tri najbolje rangirane konformacije); **c)** jedinjenja BDR-6 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima (tri najbolje rangirane konformacije); **d)** jedinjenja BDR-6 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima; **e)** jedinjenja BDR-7 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima i **f)** jedinjenja BDR-7 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima



Slika 42. Prikaz *in silico* predviđenih vezivnih konformacija novosintetisanog **a)** jedinjenja BDR-8 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima; **b)** jedinjenja BDR-8 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima; **c)** jedinjenja BDR-9 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima (tri najbolje rangirane konformacije); **d)** jedinjenja BDR-9 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima; **e)** jedinjenja FDR-2 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima i **f)** jedinjenja FDR-2 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima



Slika 43. Prikaz *in silico* predviđenih vezivnih konformacija novosintetisanog **a)** jedinjenja FDR-3 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima; **b)** jedinjenja FDR-3 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima; **c)** jedinjenja FDR-4 u strukturi humanog HDAC1 izoenzima i **d)** jedinjenja FDR-4 u strukturi humanog HDAC6 izoenzima

Razmatranjem vezivnih konformacija novodizajniranih jedinjenja (**Slike 40, 41, 42 i 43**) zaključuje se da:

- Jedinjenja BDR-2, BDR-3, BDR-4 i BDR-5 ne ostvaruju kanonični način vezivanja za humane HDAC1 i HDAC6 izoforme. Hidroksamske kiseline pomenutih derivata su orijentisane izvan katalitičkog džepa (prikazano kroz tri najbolje rangirane doking poze), na osnovu čega se pretpostavlja da pomenuti inhibitori neće ispoljiti potentnu HDAC1 i/ili HDAC6 inhibiciju. Jedinjenja su ipak predložena za sintezu, jer mogu da posluže za racionalizaciju odnosa strukture i enzimske inhibicije humanih histon deacetilaza 1 i 6, kao i da budu korišćena kao negativne probe za biološka testiranja.
- Jedinjenje BDR-6 nije uspešno udokovano u humanu HDAC1 izoformu (primećena je fizička okupiranost katalitičkog džepa, ali ne i interakcija hidroksamske kiseline sa jonom metala), dok je u HDAC6 katalitičkom džepu uspešno koordinirano za katalitički

- jon Zn^{2+} (**Slika 41**). Jedinjenja BDR-7 i BDR-8 su prema doking predviđanjima uspešno usidrena u katalitički džep obe proučavane HDAC izoforme.
- c) Nijedan derivat fenilhidroksamskih kiselina (BDR-9 i FDR-2) ne koordinira jon metala u katalitičkom mestu HDAC1 izoenzima, dok je primećena monodentatna koordinacija za katalitički jon cinka u HDAC6 izoformi.
- d) Alkilhidroksamski derivati 5,5-difenil imidazolidin-2,4-diona (jedinjenja FDR-3 i FDR-4) se usidravaju u oba katalitička džepa histon deacetilaza HDAC1/HDAC6, za dobijene bioaktivne konformacije su predviđene približno iste pK_i vrednosti. Na osnovu doking poza, kao i predviđenih vrednosti konstanti inhibicije, smatra se da će jedinjenje FDR-2 najverovatnije ispoljiti selektivni biološki HDAC6 profil u odnosu na HDAC1 izoformu, dok će jedinjenja FDR-3 i FDR-4 ostvariti potentan, ali verovatno neselektivan HDAC6 inhibitorski potencijal.

Da bi se dodatno opravdao izbor najboljih kandidata za sintezu, u programu ADMET Predictor su izračunati osnovni fizičko-hemijski i farmakokinetički parametri (**Tabela 17**) i upoređeni sa model jedinjenjem, skriptaidom. Ovim predviđanjima je moguće u početnim fazama dizajniranja lekova prepoznati jedinjenja sa problematičnom rastvorljivošću, kao i rizicima u vezi sa osnovnim farmakokinetičkim procesima pri *per os* primeni lekova.

Tabela 17. Tabela prikaz predviđenih fizičko-hemijskih parametara za dizajnirana jedinjenja

Jedinjenje	S+logP	S+logD	S+Sw	Absn_Risk	RuleOf5
BDR-2	1,194	1,133	0,415	0	0
BDR-3	1,429	1,143	0,609	0	0
BDR-4	1,729	0,916	0,844	0	0
BDR-5	2,146	1,254	0,641	0,5	0
BDR-6	2,582	1,927	0,397	1	0
BDR-7	2,978	2,281	0,299	1	0
BDR-8	3,378	2,660	0,223	1,26	0
BDR-9	2,876	2,724	0,043	0	0
FDR-2	3,162	3,147	0,024	0	0
FDR-3	2,478	2,474	0,220	0,5	0
FDR-4	3,048	3,045	0,133	1	0
skriptaid	2,009	2,005	0,027	0	0

S+logP – lipofilnost nejonizovanog oblika jedinjenja, **S+logD** – efektivna lipofilnost jedinjenja pri pH=7,4, **S+Sw** – rastvorljivost jedinjenja u mg/mL, **Absn_Risk** – parametar koji procenjuje rizik za gastrointestinalnu apsorpciju (opseg 0 – 8; 0-najniži, 8- najviši rizik), **RuleOf5** – parametar koji procenjuje odstupanje fizičko-hemijskih osobina jedinjenja od Lipinski pravila petice

Na osnovu rezultata predviđanja fizičko-hemijskih parametara, zaključuje se da će jedinjenja koja imaju broj C atoma u linkeru veći od 4 imati veću lipofilnost od skriptaida, što može da doprinese boljoj distribuciji inhibitora u ispitivane ćelije kancera. Nijedno dizajnirano jedinjenje ne odstupa od Lipinski pravila pet (nemaju više od 5 heteroatoma koji su donori ili akceptora vodoničnih veza, Mw nije veća od 500, logP nije veći od 5).

4.6. Određivanje odnosa hemijske strukture i selektivne HDAC6 inhibicije - studija molekuskog dokinga

U okviru doktorske disertacije izvedena je studija molekuskog dokinga čiji su rezultati objavljeni u radu S. Bouchet, C. Linot, **D. Ruzic**, D. Agbaba, B. Foucaq, J. Roche, K. Nikolic, C. Blanquart, P. Bertrand. *Extending Cross Metathesis To Identify Selective HDAC Inhibitors: Synthesis, Biological Activities, and Modeling*. ACS Medicinal Chemistry Letters. May 9, 2019.

U radu je opisana sinteza **selektivnog HDAC6 inhibitora** (jedinjenje B18) na Univerzitetu Poitiers, Francuska (**Slika 44A**). Jedinjenje inhibira HDAC6 izoformu u nanomolarnom opsegu koncentracija ($IC_{50}=95$ nM), dok izoforme klase I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8) inhibira u mikromolarnim koncentracijama (**Slika 44A**). Jedinjenje B18 ne inhibira HDAC enzime klase IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9).

Studija virtuelnog dokinga je izvedena sa ciljem da se objasni HDAC6 selektivni profil nosintetisanog jedinjenja i identifikuju značajne molekulske determinante koje doprinose selektivnosti jedinjenja B18.

U programu Discovery Studio je pripremljeno svih 11 izoformi humanih histon deacetilaza, s tim što su:

- Kristalne strukture izoformi **HDAC1**: 5ICN, **HDAC2**: 5IWG, **HDAC3**: 4A69, drugi katalitički domen **HDAC6**: 5EDU, **HDAC7**: 3ZNR i **HDAC8**: 5FCW preuzete sa sajta Protein Data Bank,
- Strukture homologih HDAC izoformi za koje ne postoji kristalografska struktura dobijene ljubaznošću profesora Olafa Wiest-a sa Univerziteta u Notre Dame (<https://www3.nd.edu/~owiest/>).

Virtuelni doking je izveden u programu *GOLD* koristeći ChemScore (CSFF) kao funkciju vrednovanja. Validnost pripremljene doking procedure je proverena izračunavanjem RMSD vrednosti za ponovno dokovan kristalni ligand i dokingom jedinjenja (*S*)-trihostatina A (skraćeno *S*-TSA), za koji je prethodno objavljen *in vitro* enzimski profil na svih 11 HDAC izoformi. Vezivni džep je podešen u prečniku od 15 Å od katalitičkog jona Zn^{2+} , torzioni uglovi liganada su podešeni da slobodno rotiraju i za svaki ligand je uzorkovano 30 konformacija. Rezultati dokinga jedinjenja (*S*)-trihostatina A i jedinjenja B18 su prikazani u **Tabeli 18**.

Virtuelni doking uspešno reprodukuje vezivne poze i konformacije kristalnih liganada sa RMSD vrednostima ispod 1,5 Å izračunatih za svaku HDAC izoformu. Na osnovu rezultata funkcija vrednovanja ChemScore za (*S*)-trihostatin A (**Tabela 18**), primećuje se da postoji pozitivna korelacija između vrednosti inhibitornih koncentracija (IC_{50}) i dokingom izračunatih CSFF vrednosti. Najveća CSFF vrednost izračunata je nakon dokinga (*S*)-TSA u drugom katalitičkom domenu HDAC6, što je u skladu sa eksperimentalno dobijenim vrednostima inhibicije HDAC6 izoforme.

Najveća CSFF vrednost nakon dokinga jedinjenja B18 na svim HDAC izoformama je izračunata za interakciju B18 sa drugim katalitičkim domenom HDAC6 enzima (CSFF = 35,37).

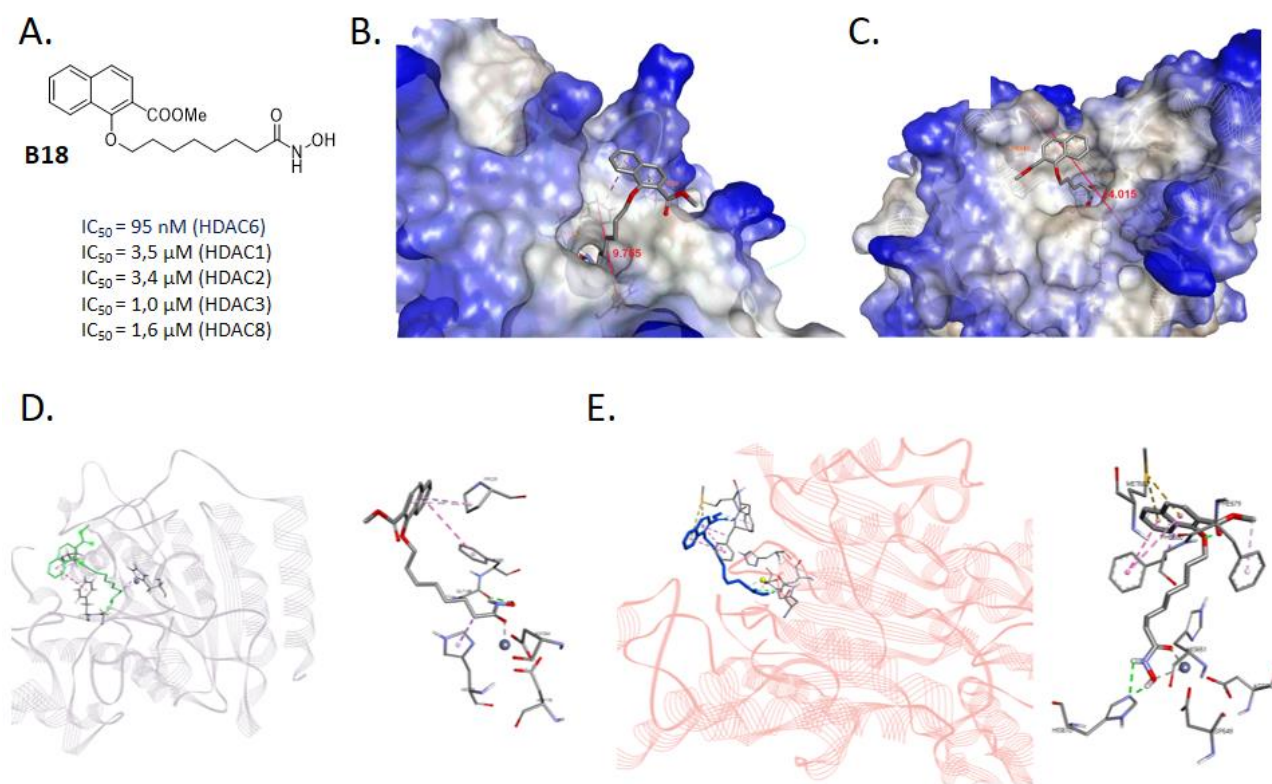
Tabela 18. Prikaz *in vitro* enzimskog profila S-trihostatina A i izračunatih *ChemScore* funkcija vrednovanja nakon dokinga (S)-TSA i jedinjenja 18; važne međumolekulske interakcije jedinjenja sa bočnim ostacima su označene jednim slovom i rednim brojem aminokiseline u primarnoj sekvenci.

	Jedinjenje (S)-TSA			Jedinjenje B-18	
	IC ₅₀ (nM)	<i>ChemScore</i> funkcija vrednovanja	Aminokiseline koje ostvaruju interakcije	<i>ChemScore</i> funkcija vrednovanja	Aminokiseline koje ostvaruju interakcije
HDAC1	206,30±15.84	31,56	H140-141, F150, F205, Y303	24,08	P29, G149, F150, H178
HDAC2	612,65±116.60	36,14	H145-146, F155, H183, F210, L276, G306, Y308	26,85	H145-146, Y308
HDAC3	320,80±27.01	34,85	H135, F144, D170, H172, F199, F200, L266, G296, Y298	29,36	H134, F199
HDAC4	6341±627.91	28,66	H802-803, F812, F871, G974	28,46	H802, H803, G974
HDAC5	6325±117.38	26,30	H832, G841, F842, L973, H1006	19,38	invertovana poza
HDAC6 CDII	11,1±0.62	41,44	H610, F620, T678, F680	35,37	H610, F679-680, M682
HDAC6 CDI	11,1±0.62	38,98	H192, H193, F202, W261, G361, Y363	33,27	P83, S150, H192, K330
HDAC7	1823,50±6.36	27,41	H669-670, F738, H709, F738, D801, L810	25,10	invertovana poza
HDAC8	312,20±3.96	30,75	L101, H142, F152, F208, M274, G304, Y306	28,34	Y100, L101, H142, H180, Y306
HDAC9	4824±228.40	29,13	G791, F792, H822, N849, F851, P922, L923	22,59	F851, D914, G955
HDAC10	403,35±10.25	33,09	H134-135, F144, W203, F205, L206, D265	26,75	H135, F144, H174, W203
HDAC11	2684,00±398.81	26,99	H142, F152, H183, I208, D261	24,85	D181, I208, Y209

Smatra se da je razlog selektivne inhibicije HDAC6 izoforme širi obod drugog katalitičkog džepa histon deacetilaze 6 (14,015 Å) u odnosu na histon deacetilazu 1 (9,765 Å, **Slika 44**) čiji bočni nizovi ostvaruju međumolekulske interakcije sa CAP grupom jedinjenja B18. Naftalenski ciklus intereaguje sa fenil grupama dva fenilalanina (F679 i F680) hidrofobnim π - π interakcijama i dodatno se stabilizuje na površini džepa π -sumpor interakcijom sa metioninom 682. Karbonilna grupa estra položaja 2 je akceptor vodonika sa azota peptidne veze između F679 i F680. Hidroksamska kiselina koordinira katalitički jon Zn²⁺ bidentatno u katalitičkom džepu HDAC6.

Za razliku od HDAC6, jedinjenje B18 ima manju vrednost CSFF funkcije nakon dokinga na HDAC1 izoformi. Vizuelizacijom poze i međumolekulskih interakcija jedinjenja B18 u katalitičkom džepu HDAC1, zaključuje se da zbog dužine linkera (7 ugljenikovih atoma i jedan etarski kiseonik) CAP grupa se pozicionira izvan oboda katalitičkog džepa HDAC1. Izmerena širina oboda u programu Discovery Studio je 9,765 Å, što se dodatno smatra kao razlog

nemogućnosti usidravanja CAP grupe jedinjenja B18. Mikromolarna inhibicija HDAC1 izoforme je verovatno rezultat prolazne koordinacije katalitičkog cinka u vezivnom džepu i entropijskog doprinosa vezivanja jedinjenja B18 za histon deacetilazu 1.



Slika 44. **A.** Hemijska struktura jedinjenja B18 sa vrednostima enzimske inhibicije, **B.** Prikaz vezivne konformacije B18 u katalitičkom džepu HDAC1, **C.** Prikaz vezivne konformacije B18 u katalitičkom džepu HDAC6, **D.** Pojednostavljeni prikaz pozicioniranja B18 u katalitičkom džepu HDAC1 (levo) i prikaz interakcija B18 sa bočnim ostacima HDAC1 (desno) i **E.** Pojednostavljeni prikaz pozicioniranja B18 u drugom katalitičkom džepu HDAC6 (levo) i prikaz interakcija B18 sa bočnim ostacima drugog katalitičkog džepa HDAC6 (desno)

4.7. *In silico* pretraga novih, nehidroksamskih cink-vezivnih grupa

Metabolička nestabilnost hidroksamskih kiselina podstakla je istraživače da identifikuju nove, nehidroksamske cink vezivne grupe (ZBG)²⁹⁵. Zbog brze glukuronidacije i hidrolize hidroksamske kiseline u *in vivo* uslovima, razlozi za identifikaciju novih ZBG su zasnovani i na nepovoljnoj metaboličkoj degradaciji hidroksamskih kiselina, kao i identifikaciji novih ZBG koje selektivno inhibiraju odgovarajuću HDAC izoformu. Poznate su neke cink helatorske grupe za koje se smatra da doprinose selektivnosti ka HDAC6 izoformi. To su:

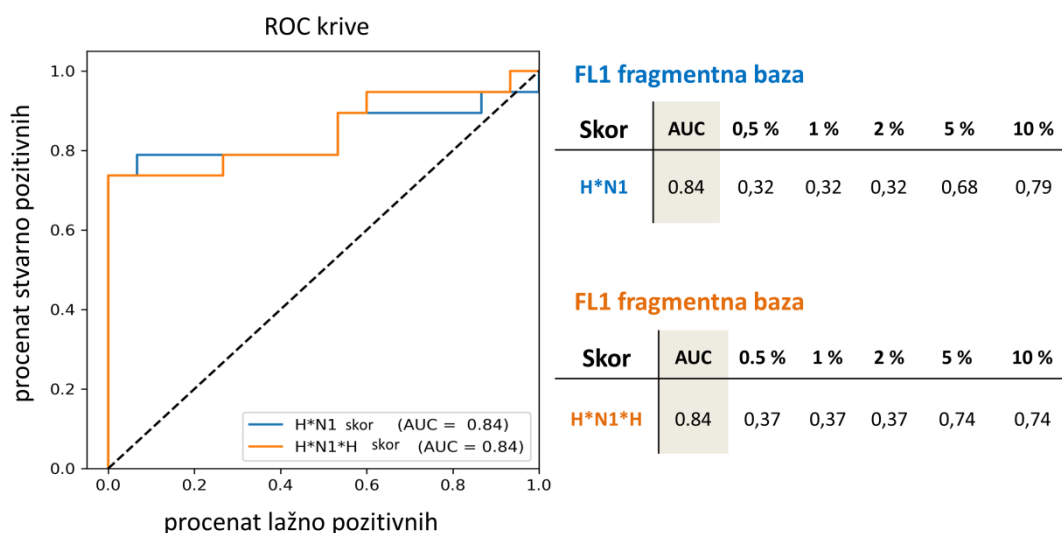
- 3-hidroksipiridin-2-tion²⁹⁶ koji je identifikovan na osnovu prethodno poznatih inhibitora matriksnih metaloproteinaza,
- (2-oksazol-2-il)fenol²⁹⁷
- Hidrazidi²⁹⁸

U pomenutim studijama, nove cink vezivne grupe su identifikovane na osnovu strukture poznatih inhibitora metaloenzima, uz vrlo mali doprinos razjašnjavanju selektivnosti novih ZBG. Pošto do sada druge istraživačke grupe nisu objavile studije virtuelne pretrage i razmatranja selektivnosti novih cink vezivnih grupa, u ovoj doktorskoj disertaciji je prvi put dizajniran i pripremljen protokol za identifikaciju novih ZBG koje doprinose selektivnosti ka HDAC6 izoformi.

4.7.1. Izdvajanje novih cink-vezivnih grupa tehnikom virtuelnog skrininga zasnovanog na strukturi HDAC6 enzima

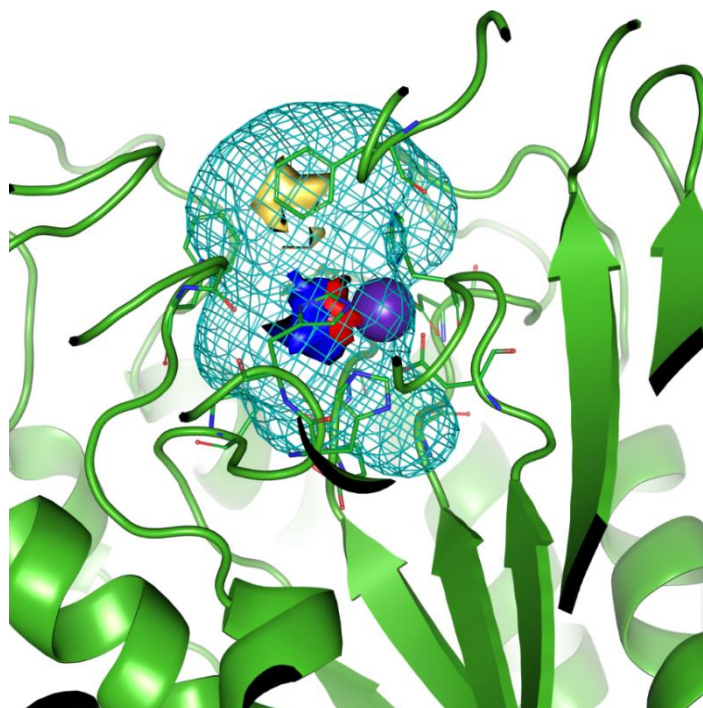
Virtuelnim skriningom fragmentnih databaza (odeljak 3.3) pokazano je da dve FLAP skor funkcije, ***H*N1*** i ***H*N1*H*** imaju najveće AUC vrednosti (eng. *Area Under Curve*, površina ispod ROC krive). Kada je AUC vrednost blizu 1, smatra se da model ima dobra klasifikaciona svojstva, odnosno da model visoko rangira stvarno aktivna (literaturno poznata) jedinjenja u odnosu na neaktivna. Prikaz ROC krivih sa *Enrichment* faktorima je dat na **Slici 45**, dok su hemijske strukture aktivnih i neaktivnih fragmenata dati u **Prilogu 7.6 (Tabela P3) i Prilogu 7.7 (Tabela P4)**, redom.

Skriningom prve fragmentne baze (FL1), FLAP skor koji najbolje ukazuje na preklapanje farmakofore fragmenata sa farmakoforom katalitičkog džepa HDAC6 je ***H*N1*** skor. Skor ***H*N1*** ukazuje da fragmenti FL1 baze treba da imaju komplementaran oblik (H proba) sa oblikom džepa, kao i da uspostave akceptorske vodonične interakcije sa bočnim ostacima u okruženju jona cinka (**Slika 46**). U poređenju sa performansama skrininga druge fragmentne baze FL2, skrining prve baze ima bolju moć klasifikacije aktivnih od neaktivnih fragmenata u okviru prvih 10% visoko rangiranih lažno pozitivnih jedinjenja. Vrednost *Enrichment faktora* za FL1 bazu u prvih 10% iznosi 0,79 (**Slika 45**), što ukazuje da se među prvih 10% rangiranih lažno pozitivnih jedinjenja nalazi 79% farmakološki aktivnih cink-vezivnih grupa.



Slika 45. Prikaz ROC krive (levo) nakon skrininga FL1 (označena plavo) i FL2 (označena narandžasto) fragmentnih baza; desno su prikazani validacioni parametri za oba modela virtuelnog skrininga

U slučaju druge fragmentne baze, FL2, skor koji najbolje opisuje komplementarnost fragmenata sa katalitičkim džepom je **H*N1*H**. Oblici (H probe) i donorska vodonična svojstva najbolje rangiranih fragmenata u virtuelnom skriningu druge baze FL2 se u visokom stepenu preklapaju sa definisanom farmakoforom katalitičkog džepa HDAC6 (vrednost AUC je 0,84). U okviru 10% najbolje rangiranih lažno pozitivnih fragmenata, identifikovano je 74% farmakološki aktivnih cink vezivnih grupa.



Slika 46. Trodimenzionalni prikaz izračunatih polja molekulske interakcije za drugi katalitički džep humane HDAC6 izoforme koji se koristi kao šablon (eng. *template*) za virtuelni skrining; Proba oblika (H proba) je prikazana kao plava mrežasta kontura, O proba (crvena površina, identifikuje donore vodonične veze), N1 proba (plava površina, identifikuje akceptore vodonične veze) i hidrofobna DRY proba. Katalitički jon cinka je prikazan kao ljubičasta sfera

Nakon analize i validacije oba modela virtuelnog skrininga zasnovanog na trodimenzionalnoj strukturi HDAC6 enzima, zadržano je po 20 najboljih fragmenata iz obe fragmentne baze koji do sada nisu opisani u literaturi kao helatori cinka (**Tabela 19 i 20**).

Tabela 19. Prikaz 20 najbolje rangiranih fragmenata kao potencijalnih helatora cinka iz baze FL1, sortiranih po opadajućoj vrednosti H*N1 skora.

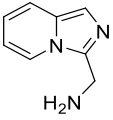
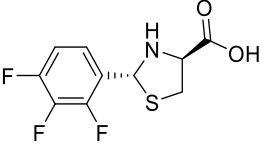
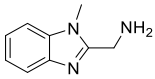
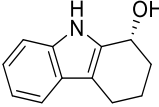
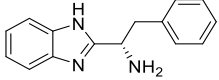
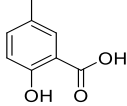
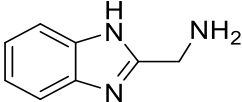
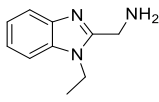
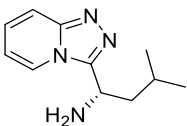
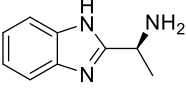
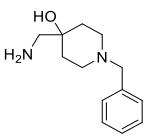
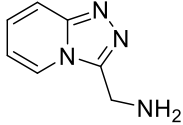
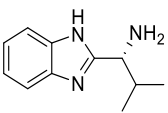
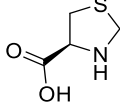
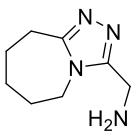
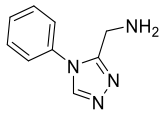
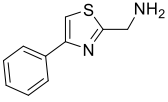
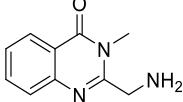
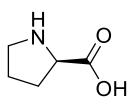
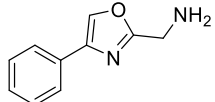
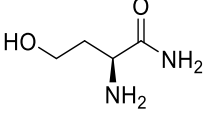
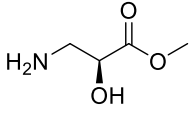
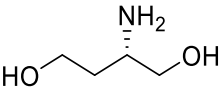
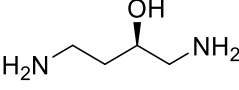
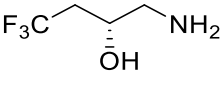
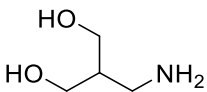
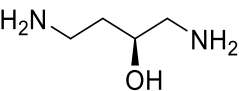
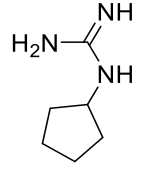
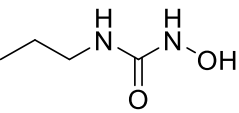
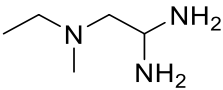
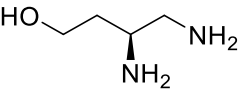
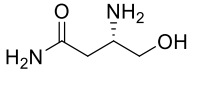
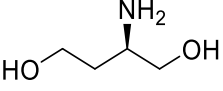
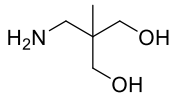
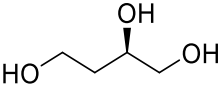
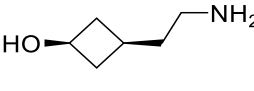
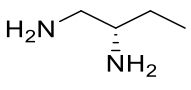
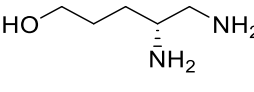
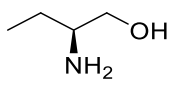
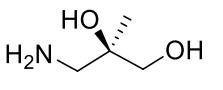
Jedinjenje	Hemijska struktura	Vrednost skora H*N1	Jedinjenje	Hemijska struktura	Vrednost skora H*N1
4		0,686	20		0,562
8		0,628	12		0,560
19		0,621	6		0,558
3		0,590	11		0,557
17		0,578	7		0,556
18		0,577	5		0,553
15		0,576	2		0,549
9		0,571	10		0,548
16		0,570	14		0,547
1		0,564	13		0,546

Tabela 20. Prikaz 20 najbolje rangiranih fragmenata kao potencijalnih helatora cinka iz baze FL2, sortiranih po opadajućoj vrednosti H*N1*H skora.

Jedinjenje	Hemijska struktura	Vrednost skora H*N1*H	Jedinjenje	Hemijska struktura	Vrednost skora H*N1*H
27		0,652	35		0,624
29		0,652	26		0,617
30		0,649	34		0,614
25		0,645	21		0,613
23		0,642	39		0,611
33		0,638	28		0,610
32		0,634	36		0,606
31		0,632	38		0,603
40		0,631	24		0,602
22		0,630	37		0,601

4.7.2. Pretraga selektivnih cink-vezivnih grupa tehnikom molekuskog dokinga

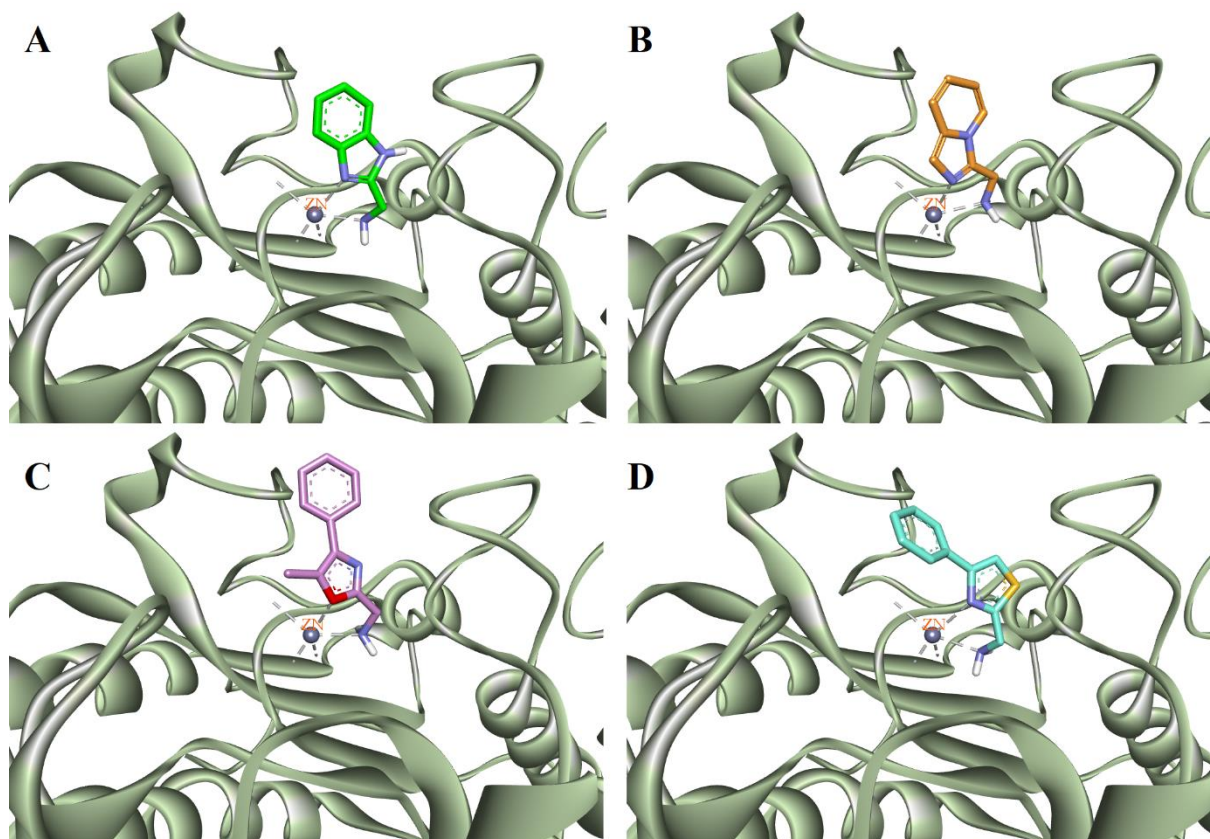
Način vezivanja 40 izdvojenih fragmenata je detaljnije proučavan tehnikom molekuskog dokinga koristeći kristalografske strukture četiri HDAC enzima (HDAC1, HDAC4, HDAC6 i HDAC8). Odabrane izoforme su predstavnici različitih klasa HDAC, pri čemu su iz klase I HDAC1 i HDAC8 izoenzimi, iz klase IIa je HDAC4 i iz klase IIb je HDAC6 izoforma. Korišćenje izoforme HDAC8 kao drugog predstavnika klase I, pored HDAC1 izoenzima je odabrano zbog različite strukture vezivnog mesta HDAC8²⁹⁹.

U doking proceduri ChemScore funkcije vrednovanja (CSFF) su korišćene za izdvajanje najboljih kandidata, kao *in silico* predviđenih selektivnih cink vezivnih grupa na HDAC6 izoformi. Da bi se dodatno validirala procedura identifikacije selektivne cink-vezivne grupe, kao referentni fragment je dokovana i benzenhidroksamska kiselina (BHA). Poznato je da BHA ima najveći inhibitorni potencijal na HDAC6 izoformi (IC₅₀ vrednosti na HDAC1 4,73 μM, na HDAC4 >33,3 μM, HDAC6 0,11 μM i HDAC8 1,92 μM)³⁰⁰.

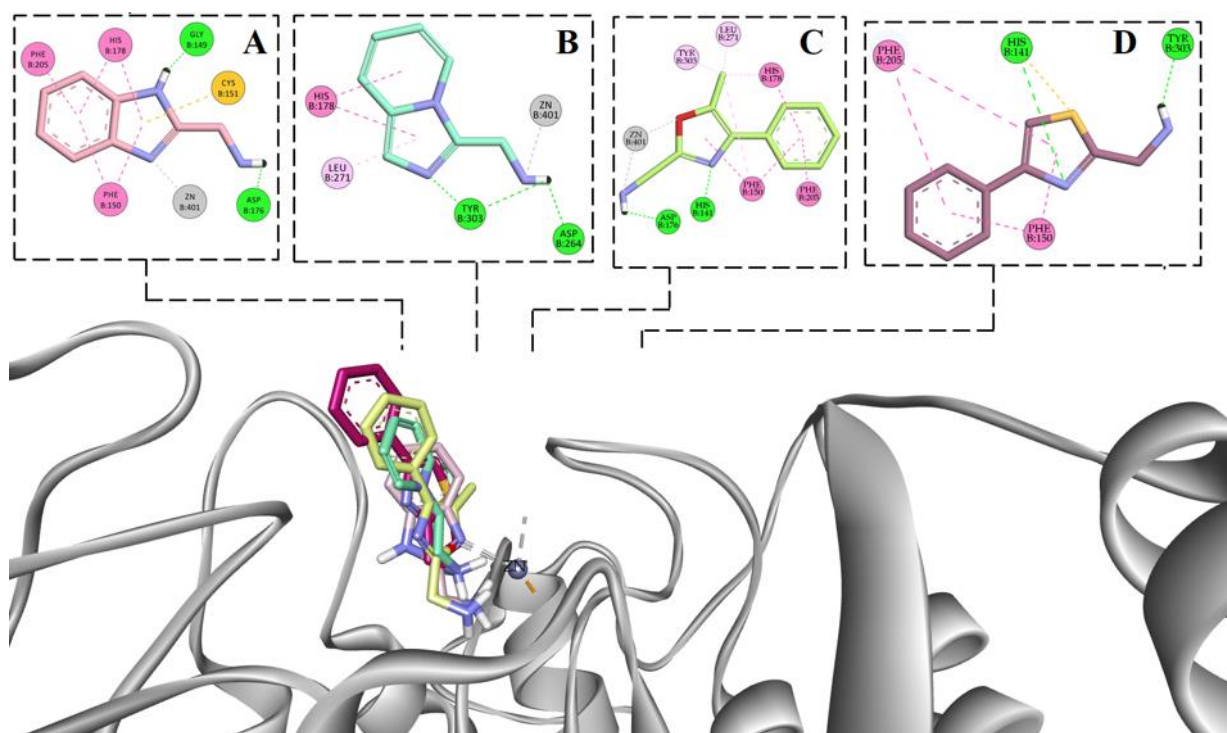
Pored vrednosti CSFF, geometrija i dentatnost kompleksa fragment-Zn²⁺ su razmatrane, pri čemu su fragmenti koji heliraju jon cinka (monodentatno ili bidentatno) sa najvišim CSFF vrednostima izdvojeni za detaljnu analizu profila selektivnosti. Analizom vezivnih interakcija, CSFF skorova i načina koordinacije katalitičkog Zn²⁺ jona izdvojeno je trideset potencijalnih helatora cinka u odnosu na polaznih četrdeset fragmenata (**Tabela P5**). Na osnovu rezultata molekuskog dokinga (**Tabela P5**), bilo je očekivano da bolji HDAC6 profil selektivnosti ima prvih 20 fragmenata (dobijenih iz FL1 fragmentne baze). Fragmenti dobijeni iz druge baze (FL2) su manjeg volumena, ali značajno fleksibilniji, što se smatra kao jedan od razloga nižih CSFF skorova na HDAC6 izoformi kod ove grupe fragmenata.

Fragmenti za koje je predviđeno da heliraju jon Zn²⁺ u aktivnom mestu HDAC6 sa većim CSFF vrednostima nego što je izračunato za BHA (CSFF=31,6326) su označeni brojevima **3, 4, 13 i 16 (Prilog 7.8, Tabela P5)**. Fragment **7** ima značajno veće vrednosti CSFF skora na HDAC6 izoformi (CSFF=36,576), u odnosu na BHA. Dodatno, vrednost CSFF fragmenta **7** na HDAC8 izoformi je 36,802, zbog čega je u ovom delu studije fragment **7** označen kao potencijalno neselektivan fragment i nije razmatran u dizajnu novih, selektivnih HDAC6 inhibitora.

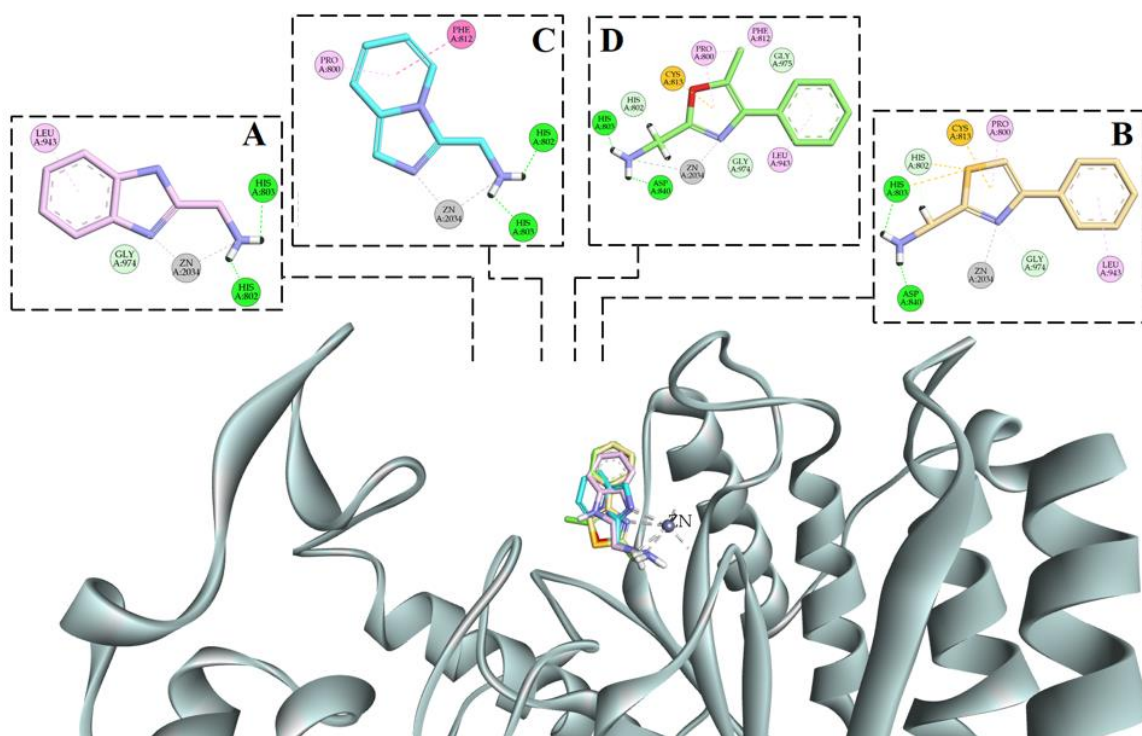
Predviđeno je molekulskim dokingom da jedinjenja **3, 4, 13 i 16** heliraju jon cinka bidentatno u strukturi drugog katalitičkog domena HDAC6 (**Slika 47**). Vezivne poze **3, 4, 13 i 16** fragmenata u kristalografskim strukturama HDAC1, HDAC4 i HDAC8 izoformi su prikazane na **Slikama 48, 49 i 50**. Na osnovu nižih CSFF vrednosti **3, 4, 13 i 16** fragmenata (**Prilog 7.8, Tabela P5**), pretpostavlja se da bi odabrani fragmenti imali manji afinitet za HDAC1, HDAC4 i HDAC8 izoforme u odnosu na HDAC6. Upoređivanjem vezivnih poza i orijentacija, fragmenti **3, 4 i 13** uspešno heliraju katalitički jon cinka u aktivnim džepovima svih ispitivanih histon deacetilaza (**Slike 47-50**). Sa druge strane, primećeno je da fragment **16** ne koordinira katalitički jon cinka u katalitičkim džepovima nuklearnih izoformi HDAC1 i HDAC8 (**Slike 48, 50**), što je predstavljalo ohrabrujući rezultat za odabir ovog fragmenta kao nove potencijalno HDAC6 selektivne ZBG grupe.



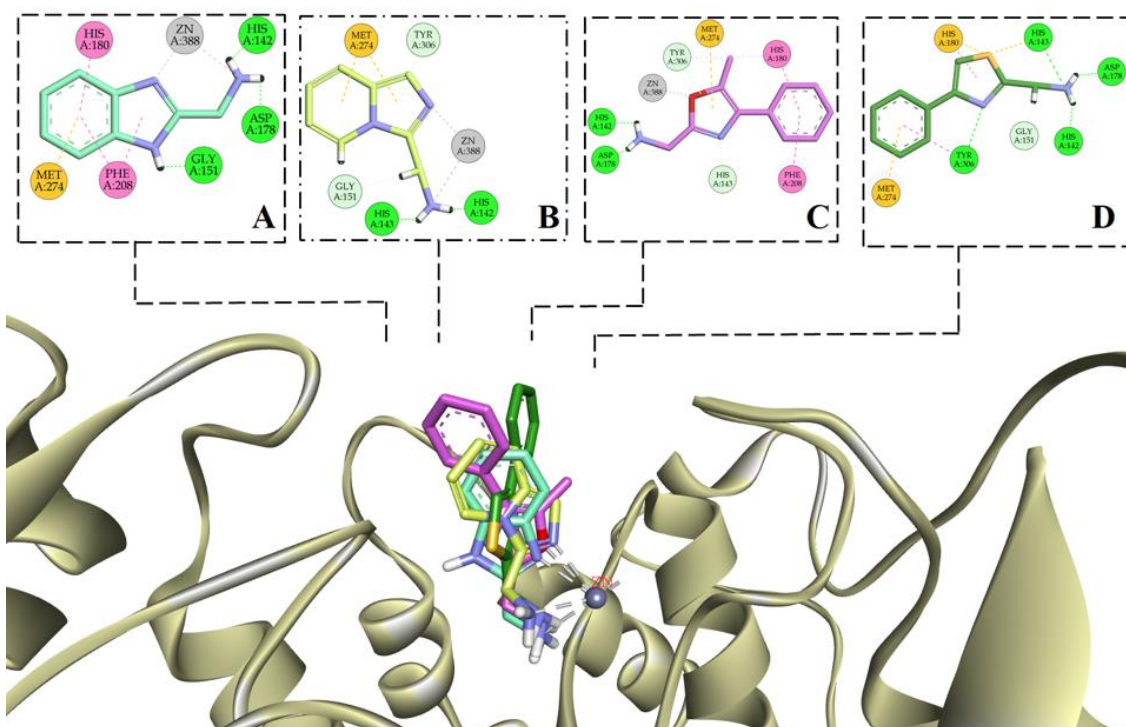
Slika 47. Prikaz vezivnih poza izdvojenih fragmenata nakon molekuskog dokinga u strukturi drugog katalitičkog domena HDAC6; fragment 3 (A), fragment 4 (B), fragment 13 (C) i fragment 16 (D)



Slika 48. Prikaz vezivnih konformacija odabranih fragmenata (A – fragment 3, B – fragment 4, C – fragment 13 i D – fragment 16) u strukturi katalitičkog džepa HDAC1 izoforme; naziv vezivnih interakcija je izostavljen zbog jasnijeg prikaza slike



Slika 49. Prikaz vezivnih konformacija odabranih fragmenata (A – fragment 3, B – fragment 4, C – fragment 13 i D – fragment 16) u strukturi katalitičkog džepa HDAC4 izoforme; naziv vezivnih interakcija je izostavljen zbog jasnijeg prikaza slike

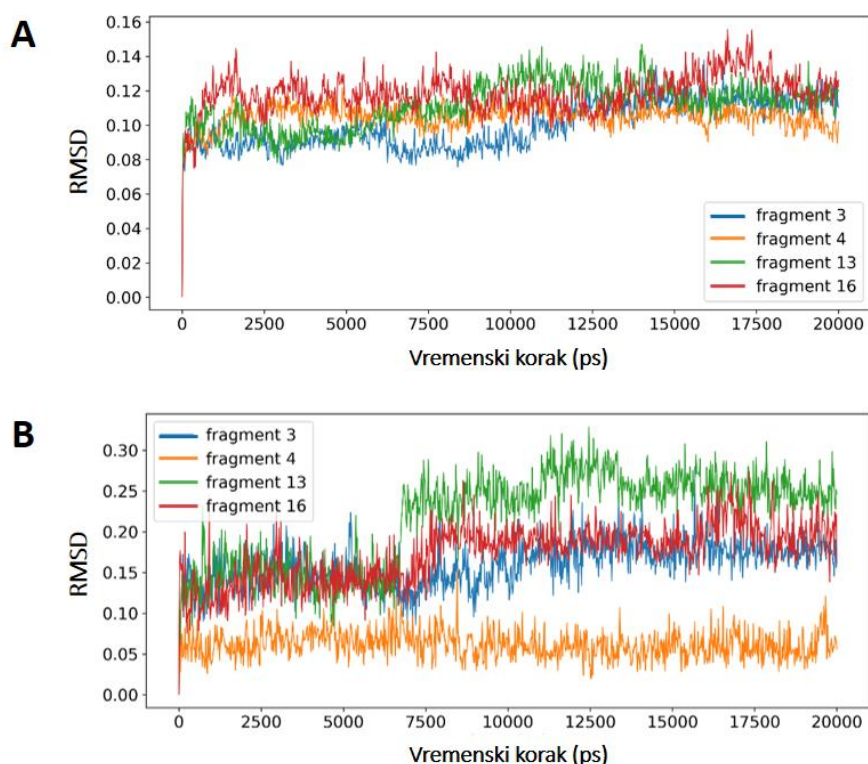


Slika 50. Prikaz vezivnih konformacija odabranih fragmenata (A – fragment 3, B – fragment 4, C – fragment 13 i D – fragment 16) u strukturi katalitičkog džepa HDAC8 izoforme; naziv vezivnih interakcija je izostavljen zbog jasnijeg prikaza slike

Uzimajući u obzir činjenicu da je tokom molekuskog dokinga protein statičan, stabilnost dobijenih kompleksa kao i njihova dentatnost je ispitana u studiji molekulske dinamike.

4.7.3. Analiza stabilnosti kompleksa HDAC6 i odabranih fragmenata simulacijama molekulske dinamike

Pripremljeni fragmenti **3**, **4**, **13** i **16** u kompleksu sa HDAC6 (prema protokolu opisanom u odeljku 3.3.4) su podvrgnuti simulacijama molekulske dinamike (trajanje simulacije 20 ns). Na osnovu dijagrama srednje kvadratne devijacije (RMSD) izračunate za alfa ugljenikove atome ($C\alpha$) istih bočnih ostataka enzima HDAC6 pre i nakon simulacije, zaključuje se da su sva četiri simulirana kompleksa ostala stabilna tokom kratke MD simulacije (**Slika 51A**). Dodatno, izračunate RMSD vrednosti za ove fragmente tokom 20 ns simulacije potvrđuju da su sva četiri kompleksa stabilna u zadatom sistemu. Ujedno, potvrđeno je da su predviđanja molekuskim dokingom validna, odnosno da se u narednim istraživanjima novih ZBG molekulski doking može smatrati dovoljno pouzdanim za identifikaciju funkcionalnih grupa/heterociklusa koji koordiniraju jon cinka u katalitičkom džepu HDAC6 enzima.

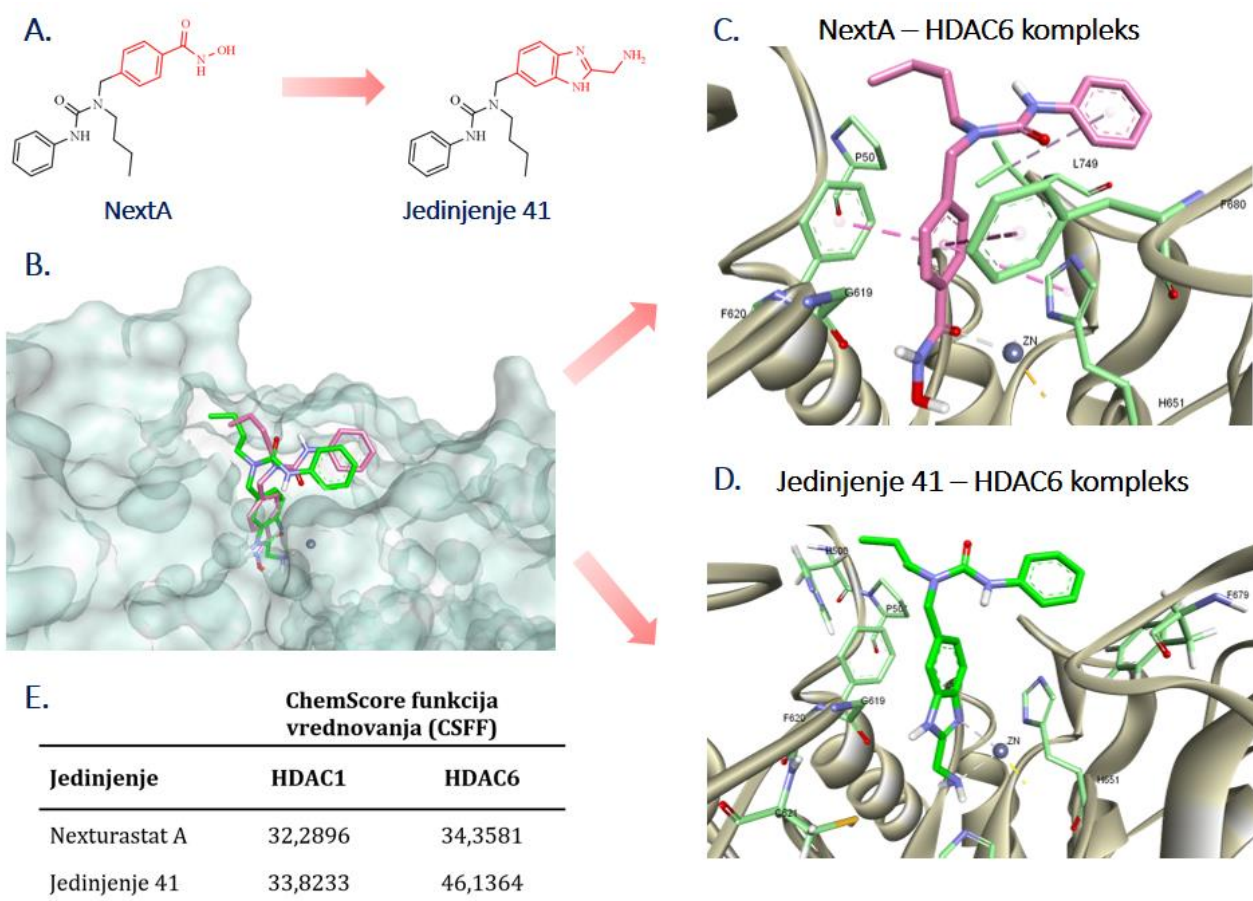


Slika 51. RMSD dijagrami izračunati za **A.** alfa-ugljenikove atome ($C\alpha$) enzima i **B.** za atome fragmenata nakon 20ns simulacije molekulske dinamike

Uzimajući u obzir rezultate dokinga (vezivne konformacije i CSFF vrednosti), kao i proračune slobodne energije vezivanja fragmenata za HDAC6 enzim¹⁰⁸ (rezultati ovih proračuna nisu prikazani u doktorskoj disertaciji, već u originalnom radu autora disertacije), odabran je fragment **3** kao najbolji za dizajn novih, selektivnih HDAC6 inhibitora koji ne sadrže hidroksamsku kiselinu kao ZBG. Fragment **3** predstavlja **2-aminometil-benzimidazol** za koji je studijom molekuskog dokinga predviđeno da koordinira jon cinka bidentatno. Predviđena koordinacija se ostvaruje preko primarnog alifatičnog amina (nejonizovanog azota u $-NH_2$ grupi) i sp^2 hibridizovanog azota piridinskog tipa u imidazolovom prstenu.

Da bi se ispitaio način vezivanja nove identifikovane ZBG, hidroksamska kiselina u strukturi selektivnog HDAC6 inhibitora, Nexturastat A³⁰¹ je zamenjena 2-aminometil-benzimidazolom i dizajnirano je novo **jedinjenje 41**, kao potencijalni selektivni HDAC6 inhibitor.

Molekulskim dokingom je ispitan način vezivanja novog liganda, način orijentacije i vezivanja ZBG je upoređen sa kompleksom polaznog fragmenta **3** u strukturi HDAC6 enzima. Istovremeno sa novodizajniranim jedinjenjem u dokingu je ispitan i poznati inhibitor Nexturastat A, i oba jedinjenja su dokovana u strukture HDAC1 i HDAC6 izoformi. Rezultati dokinga su prikazani na **Slici 52**, a vrednosti CSFF u Tabeli E na **Slici 52**.

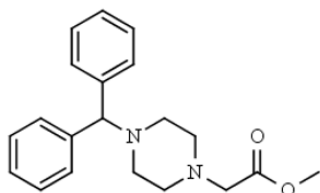


Slika 52A. Prikaz inkorporacije nove cink-vezivne grupe u strukturi poznatog selektivnog HDAC6 inhibitora; **B.** Trodimenzionalni prikaz konformacija jedinjenja NextA i 41 u aktivnom džepu HDAC6 enzima; **C.** Detaljniji prikaz vezivnih interakcija jedinjenja NextA u vezivnom džepu HDAC6 i **D.** Detaljniji prikaz vezivnih interakcija jedinjenja 41 u vezivnom džepu HDAC6; **E.** Vrednosti CSFF dobijene za jedinjenja NextA i 41 nakon molekuskog dokinga na HDAC1 i HDAC6 izoformama.

Oba proučavana jedinjenja se usidravaju u aktivni džep HDAC6 enzima, koordiniraju katalitički jon cinka (NextA monodentatno, preko kiseonika karbonilne grupe, a jedinjenje **41** preko azota imidazola i primarne amino grupe). S obzirom da su linker i CAP grupa identične u strukturama oba jedinjenja, iste interakcije stabilizuju vezivanje oba jedinjenja u aktivnom mestu HDAC6. Zaključno, jedinjenje **41** ima veći CSFF skor od jedinjenja NextA izračunatog nakon dokinga na HDAC6 izoformi, što sugeriše da 2-aminometil-benzimidazol predstavlja novu, nehidroksamsku ZBG koja može da bude korišćena u novim studijama dizajniranja selektivnih HDAC6 inhibitora.

4.8. Strukturna analiza i fizičko-hemijska karakterizacija nosintetisanih derivata 1-(difenilmetil)-piperazina

Sintetisana jedinjenja su okarakterisana NMR spektroskopijom (^1H NMR i ^{13}C NMR eksperimentima). Hemijska pomeranja su prikazana u δ jedinicama (ppm), a konstante kuplovanja (J) u hercima (Hz). Tetrametilsilan je korišćen kao interni standard, dok su nazivi deuterio rastvarača u kojima su snimani spektri navedeni uz hemijska pomeranja. Određene su precizne mase finalnih jedinjenja za biološka testiranja na tačnom hromatografu spregnutim sa masenim spektrometrom visoke rezolucije (LC/ESI-ToF-MS).



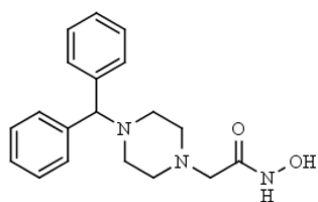
Jedinjenje BP-2

Metil 2-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il] acetat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (504,7 mg, 2 mmol, 1,0 ekvivalent), metil bromoacetata (210,0 μL , 336,53 mg, 2,2 mmol, 2,2 ekvivalenta) i K_2CO_3 (470 mg, 3,4 mmol, 1,7 ekvivalent) u 10 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite[®], ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM: EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se jedinjenje BP-2 koje je uljaste konzistencije, žuto-braon boje (369,2 mg, prinos 54,17%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.40 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 7.26 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.24 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.22 (s, 2H), 2.60 (s, 4H), 2.46 (s, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 170.74, 142.66, 128.45, 127.96, 126.92, 76.08, 59.41, 53.30, 51.62, 51.60.



Jedinjenje BDR-2

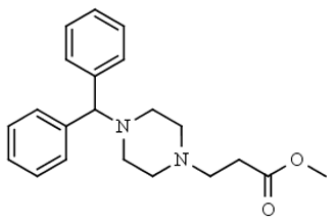
2-(4-(difenilmetil)-piperazin-1-il)-N-hidroxiacetamid

Jedinjenje BDR-2 je dobijeno iz prekursora BP-2 (259 mg, 1,03 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH = 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje uljaste konzistencije, žuto-braon boje (118,6 mg, 40,94 % prinos).

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7,42 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 7,25 (t, J = 7,5 Hz, 4H), 7,16 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 4,23 (s, 1H), 3,01 (s, 2H), 2,70 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 2,55 (s, 3H), 2,43 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 166,13, 141,17, 126,59, 126,04, 125,13, 74,71, 57,39, 51,57, 49,84.

HRMS-ESI: izračunato za $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 326,1863
izmereno $[\text{m}/\text{z}]$: 326,1866.



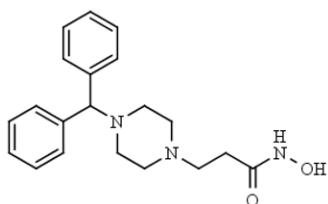
Jedinjenje BP-3

Metil 3-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il] propanoat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (252,35 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 3-bromopropanoata (120,0 μ L, 183,7 mg, 1,1 mmol, 1,1 ekvivalent) i K_2CO_3 (234,96 mg, 1,7 mmol, 1,7 ekvivalenta) u 10 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite®, ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM : EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se jedinjenje BP-3 koje je uljaste konzistencije, žuto-braon boje (224,6 mg, prinos 66,17%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.39 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 7.23 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.14 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.20 (s, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.68 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.45 (m, J = 21.0, 13.9 Hz, 10H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 172.84, 142.70, 128.40, 127.89, 126.85, 76.17, 53.45, 53.16, 51.81, 51.49, 32.08.



Jedinjenje BDR-3

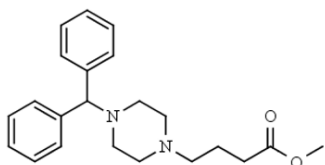
3-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il]-N-hidroksipropanamid

Jedinjenje BDR-3 je dobijeno iz prekursora BP-3 (168 mg, 0,4949 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH = 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje uljaste konzistencije, mrko braon boje (30,1 mg, prinos 17,86 %).

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.55 (s, 1H), 7.42 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 7.26 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.23 (s, 1H), 2.67 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.53 (s, 4H), 2.43 (s, 4H), 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 169.91, 142.60, 128.12, 127.57, 126.68, 76.24, 53.58, 52.62, 51.33, 29.77.

HRMS-ESI: izračunato za $C_{20}H_{25}N_3O_2$ [M + H]⁺ 340,1947
izmereno [m/z]: 340,2020



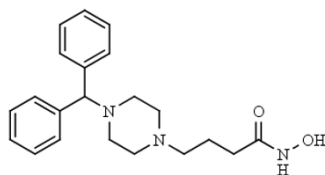
Jedinjenje BP-4

Metil 4-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il] butanoat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (252,35 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 4-bromobutanoata (151,50 μ L, 217,236 mg, 1,2 mmol, 1,2 ekvivalenta) i K_2CO_3 (234,95 mg, 1,7 mmol, 1,7 ekvivalenata) u 10 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite®, ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM: EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se jedinjenje BP-4 koje je čvrste konzistencije, blede žute boje (300,0 mg, prinos 85,11%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.40 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 7.25 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.21 (s, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 2.33 (m, J = 15.8, 8.0 Hz, 6H), 1.79 (m, J = 7.4 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 173.99, 142.80, 128.42, 127.94, 126.86, 76.26, 57.66, 53.39, 51.93, 51.48, 32.08, 22.18.



Jedinjenje BDR-4

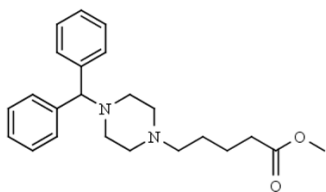
4-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il]-N-hidroksibutanamid

Jedinjenje BDR-4 je dobijeno iz prekursora BP-4 (141,8 mg, 0,4011 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH = 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje uljaste konzistencije koje nakon stajanja u frižideru kristališe dajući mrko braon praškastu supstancu (39,0 mg, prinos 27,43 %).

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.45 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.20 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.38 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.07 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.63 (s, 4H), 2.46 – 2.39 (m, 2H), 1.93 – 1.83 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 178.77, 141.73, 128.42, 127.50, 127.11, 74.98, 57.38, 51.82, 48.92, 35.07, 19.72.

HRMS-ESI: izračunato za $C_{21}H_{27}N_3O_2$ $[M + H]^+$ 354,2176
izmereno $[m/z]$: 354,2224



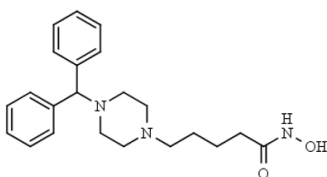
Jedinjenje BP-5

Metil 5-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il] pentanoat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (252,35 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 5-bromopentanoata (171,70 μ L, 217,236 mg, 1,2 mmol, 1,2 ekvivalenta) i K_2CO_3 (234,95 mg, 1,7 mmol, 1,7 ekvivalenta) u 10 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite®, ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM : EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se mrko braon uljasto jedinjenje BP-5 (248,2 mg, prinos 67,72%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.40 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 7.25 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.21 (s, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.44 (s, 7H), 2.32 (m, J = 14.5, 7.2 Hz, 5H), 1.63 (m, J = 15.1, 7.4 Hz, 2H), 1.49 (m, J = 9.6, 7.4 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 174.00, 142.82, 128.43, 127.95, 126.86, 76.28, 58.17, 53.50, 51.92, 51.46, 33.94, 26.36, 23.00.



Jedinjenje BDR-5

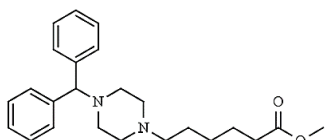
5-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il]-N-hidroksipentanamid

Jedinjenje BDR-5 je dobijeno iz prekursora BP-5 (97,7 mg, 0,2665 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH = 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje uljaste konzistencije mrko braon boje (42,0 mg, prinos 43,10 %).

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.40 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 7.24 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.15 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.29 (s, 1H), 3.06 (s, 4H), 2.87 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 2.57 (s, 4H), 2.19 (s, 2H), 1.71 – 1.52 (m, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 179.77, 141.91, 128.40, 127.48, 127.05, 75.23, 56.19, 51.80, 48.94, 35.99, 23.66, 22.73.

HRMS-ESI: izračunato za $C_{22}H_{29}N_3O_2$ $[M + H]^+$ 368,2333
izmereno $[m/z]$: 368,2337



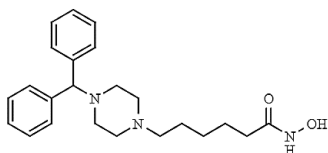
Jedinjenje BP-6

Metil 6-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il] heksanoat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (252,35 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 6-bromoheksanoata (157,40 μ L, 207,13 mg, 1,2 mmol, 1,2 ekvivalenta) i K_2CO_3 (234,95 mg, 1,7 mmol, 1,7 ekvivalenata) u 10 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite®, ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM: EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se jedinjenje BP-6 kao bela kristalna supstanca (235,55 mg, prinos 78,11%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.41 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 7.28 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.17 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.24 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 2.35 (s, 4H), 2.28 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 2.24 – 2.08 (m, 4H), 1.56 – 1.46 (m, 2H), 1.43 – 1.32 (m, 2H), 1.30 – 1.18 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 173.77, 143.43, 128.93, 128.02, 127.25, 75.72, 58.12, 53.39, 52.06, 51.59, 33.74, 26.90, 26.43, 24.85.



Jedinjenje BDR-6

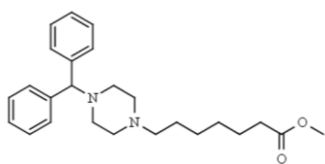
6-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il]-N-hidroksiheksanamid

Jedinjenje BDR-6 je dobijeno iz prekursora BP-6 (100,0 mg, 0,2627 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH = 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje kao bela, kristalna supstanca (64,2 mg, prinos 64,03 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.40 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 7.27 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.24 (s, 1H), 2.46 – 2.17 (m, 9H), 2.11 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 1.91 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.45 (m, J = 14.7, 7.3 Hz, 2H), 1.41 – 1.30 (m, 2H), 1.27 – 1.14 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.48, 143.44, 128.93, 128.01, 127.24, 75.69, 58.23, 53.39, 52.04, 32.69, 27.00, 26.45, 25.50.

HRMS-ESI: izračunato za $C_{23}H_{31}N_3O_2$ $[M + H]^+$ 382,2416
izmereno $[m/z]$: 382,2488



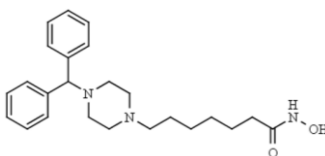
Jedinjenje BP-7

Metil 7-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il] heptanoat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (252,35 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 7-bromoheptanoata (213,0 μ L, 267,73 mg, 1,2 mmol, 1,2 ekvivalenta) i K_2CO_3 (234,95 mg, 1,7 mmol, 1,7 ekvivalenata) u 10 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite®, ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM: EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se jedinjenje BP-7 kao bela kristalna supstanca (289,2 mg, prinos 73,29 %).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 10.27 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.40 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 7.27 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.25 (s, 1H), 2.40 (s, 4H), 2.28 (s, 6H), 2.16 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 1.90 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 1.46 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 1.37 (s, 2H), 1.23 (s, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 169.54, 143.37, 128.94, 128.01, 127.26, 75.61, 58.15, 53.30, 51.86, 34.08, 32.68, 28.94, 27.07, 25.52.



Jedinjenje BDR-7

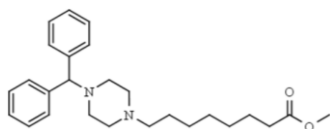
7-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il]-N-hidroksiheptanamid

Jedinjenje BDR-7 je dobijeno iz prekursora BP-7 (83,0 mg, 0,2103 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje kao blede žuta praškasta supstanca (32,5 mg, prinos 39,06%).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.27 (s, 1H), 7.40 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 7.27 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.25 (s, 1H), 2.46 – 2.08 (m, 11H), 1.91 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.46 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 1.37 (s, 1H), 1.23 (s, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.54, 143.37, 128.94, 128.01, 127.26, 75.61, 58.15, 53.30, 51.86, 34.08, 32.68, 28.94, 27.07, 25.52.

HRMS-ESI: izračunato za $C_{24}H_{33}N_3O_2$ $[M + H]^+$ 396,2646
izmereno $[m/z]$: 396,2645



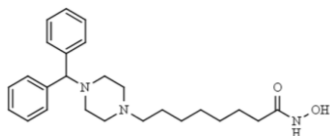
Jedinjenje BP-8

Metil 8-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il] oktanoat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (369,75 mg, 1,4651 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 8-bromooktanoata (213,0 μ L, 434,3 mg, 1,8314 mmol, 1,25 ekvivalenta) i K_2CO_3 (344,24 mg, 1,8314 mmol, 1,7 ekvivalenta) u 15 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite®, ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM: EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se jedinjenje BP-8 kao bela kristalna supstanca (362,7 mg, prinos 60,59 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.40 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 7.27 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.23 (s, 1H), 3.56 (s, 3H), 2.34 (s, 6H), 2.34 – 2.17 (m, 6H), 1.55 – 1.45 (m, 2H), 1.36 (s, 2H), 1.23 (s, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173.81, 143.45, 128.94, 128.02, 127.25, 75.72, 58.29, 53.42, 52.07, 51.59, 33.72, 29.01, 28.87, 27.22, 26.68, 24.84.



Jedinjenje BDR-8

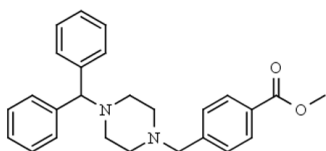
8-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-il]-N-hidroksioktanamid

Jedinjenje BDR-8 je dobijeno iz prekursora BP-8 (282,00 mg, 0,6902 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH = 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje penaste konzistencije, koje nakon hlađenja u frižideru kristališe kao bela, kristalna supstanca (159,8 mg, prinos 56,5%).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.31 (s, 1H), 7.41 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 7.27 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.17 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.24 (s, 1H), 2.47 – 2.07 (m, 10H), 1.92 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.51 – 1.41 (m, 2H), 1.37 (s, 2H), 1.22 (s, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.54, 143.39, 128.94, 128.00, 127.25, 75.65, 58.22, 53.33, 51.92, 32.70, 29.08, 28.99, 27.26, 26.60, 25.52.

HRMS-ESI: izračunato za $C_{25}H_{35}N_3O_2$ $[M + H]^+$ 410,2729
izmereno $[m/z]$: 410,2803



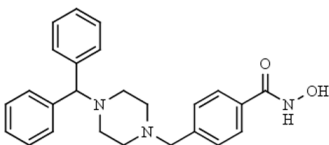
Jedinjenje BP-9

Metil 4-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-ilmetil] benzoat

Sintetisan iz 1-(difenilmetil)-piperazina (277,58 mg, 1,0999 mmol, 1,1 ekvivalent), metil 4-(bromometil)benzoata (229,07 mg, 1,0 mmol, 1,0 ekvivalent) i K_2CO_3 (234,94 mg, 1,6994 mmol, 1,7 ekvivalenata) u 10 mL acetonitrila prema opštoj proceduri A. Po završetku reakcije, reakciona smeša je filtrirana kroz Celite®, ispirana etil acetatom i prečišćena hromatografijom na koloni (gradijent DCM: EtOAc = 9/1 do 1/1, v/v). Sušenjem u vakuumu dobija se jedinjenje BP-9 kao kristalna supstanca braon boje (398,0 mg, prinos 99,9%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.01 – 7.93 (m, 2H), 7.44 – 7.35 (m, 6H), 7.30 – 7.21 (m, 4H), 7.16 (m, $J = 7.0, 3.9$ Hz, 2H), 4.23 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.88 (d, $J = 2.0$ Hz, 3H), 3.55 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H), 2.47 (s, 8H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 167.01, 142.72, 129.50, 128.94, 128.41, 127.93, 126.87, 76.18, 62.62, 53.42, 51.96, 51.85.



Jedinjenje BDR-9

4-[4-(difenilmetil)-piperazin-1-ilmetil]-N-hidroksibenzamid

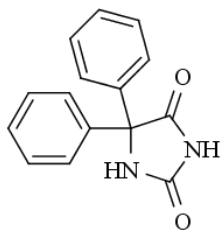
Jedinjenje BDR-9 je dobijeno iz prekursora BP-9 (69,7 mg, 0,1740 mmol) prema opštoj proceduri B opisanoj za dobijanje hidroksamskih kiselina. Prečišćavanjem hromatografijom na koloni (DCM/MeOH = 95/5, v/v) dobijeno je finalno jedinjenje penaste konzistencije, koje nakon hlađenja u frižideru kristališe kao bela, kristalna supstanca (25,0 mg, prinos 35,78 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.14 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 7.4$ Hz, 5H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.26 (s, 1H), 3.51 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 2.36 (d, $J = 33.9$ Hz, 8H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.19, 142.83, 129.20, 128.74, 128.63, 128.45, 127.54, 126.78, 75.03, 61.47, 52.70, 52.67, 51.42.

HRMS-ESI: izračunato za $C_{25}H_{27}N_3O_2$ $[M + H]^+$ 402,2103
izmereno $[m/z]$: 402,2165

4.9. Strukturna analiza i fizičko-hemijska karakterizacija novosintetisanih derivata 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona

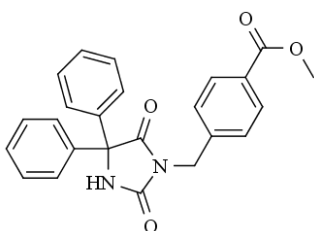


5,5-difenil-imidazolidin-2,4-dion (fenitoin)

Sintetisan iz benzila (2 g, 9,4 mmol, 1 ekvivalent) i uree (1 g, 16,6 mmol, 1,8 ekvivalenata) pomešanih u 40 mL etanola. Nakon dodatka 5,0 mL rastvora KOH koncentracije 66%, reakcija je postavljena 2 sata na refluksu. Nakon završetka reakcije, sadržaj balona je izliven u hladnu vodu (50 mL), formirani talog je uklonjen filtracijom. U filtrat je dodat rastvor HCl (1:1) do formiranja taloga. Istaloženi 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-dion je filtriran, ispran destilovanom vodom i osušen na sobnoj temperaturi. Dobijena je bela kristalna supstanca (1,986g, prinos 83%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 11.10 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 7.37 (m, J = 14.6, 7.0 Hz, 10H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 174.70, 156.08, 139.90, 128.45, 127.88, 126.57, 70.22



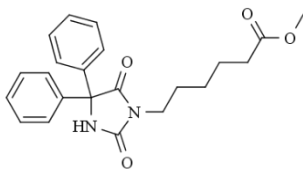
Jedinjenje FDR-2-ME

4-(2,5-diokso-4,4-difenil-imidazolidin-1-ilmetil)- metil ester benzoeve kiseline

Sintetisan iz fenitoina (252,27 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 4-(bromometil)benzoata (251,98 mg, 1,1 mmol, 1,1 ekvivalenta) i K₂CO₃ (172,76 mg, 1,25 mmol, 1,25 ekvivalenata) u 10 mL suvog acetona prema proceduri datoj u sintetskom koraku 2. Po završetku reakcije, aceton je uparen, dodata je destilovana voda, proizvod ekstrahovan sa DCM-om i prečišćen na koloni (PE : Et₂O = 1/1, v/v). Uparavanjem rastvarača i naknadnom tritracijom jedinjenja malom količinom Et₂O dobijena je bela kristalna supstanca (324,3 mg, prinos 80,98%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 7.32 (s, 10H), 4.75 (s, 2H), 3.90 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.03, 166.74, 156.24, 140.76, 138.95, 130.05, 129.80, 128.87, 128.69, 128.15, 126.79, 70.34, 52.18, 42.25.



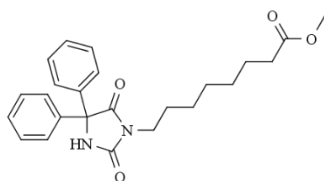
Jedinjenje FDR-3-ME

6-(2,5-diokso-4,4-difenil-imidazolidin-1-il)-metil estar heksanske kiseline

Sintetisan iz fenitoina (252,27 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 6-bromoheksanoata (209,08 mg, 1,25 mmol, 1,25 ekvivalenata) i K_2CO_3 (138,21 mg, 2 mmol, 2 ekvivalenta) u 10 mL suvog acetona prema proceduri datoj u sintetskom koraku 2. Po završetku reakcije, aceton je uparen, dodata je destilovana voda, proizvod ekstrahovan sa DCM-om i prečišćen na koloni (PE:Et₂O = 1/1, v/v). Uparavanjem rastvarača i naknadnom tritracijom jedinjenja malom količinom Et₂O dobijena je bela kristalna supstanca (384,4 mg, prinos >99%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9.60 (s, 1H), 7.38 (m, 10H), 3.61 – 3.52 (m, 3H), 3.43 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.60 – 1.42 (m, 4H), 1.21 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173.66, 173.62, 155.84, 140.15, 129.02, 128.60, 127.07, 69.49, 51.61, 38.29, 33.55, 27.56, 25.91, 24.32.



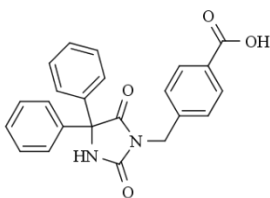
Jedinjenje FDR-4-ME

8-(2,5-Diokso-4,4-difenil-imidazolidin-1-il)-metil estar oktanske kiseline

Sintetisan iz fenitoina (252,27 mg, 1 mmol, 1,0 ekvivalent), metil 8-bromooktanoata (296,46 mg, 1,25 mmol, 1,25 ekvivalenata) i K_2CO_3 (276,42 mg, 2,0 mmol, 2 ekvivalenta) u 10 mL suvog acetona prema proceduri datoj u sintetskom koraku 2. Po završetku reakcije, aceton je uparen, dodata je destilovana voda, proizvod ekstrahovan sa DCM-om i prečišćen na koloni (PE : Et₂O = 1/1, v/v). Uparavanjem rastvarača i naknadnom tritracijom jedinjenja malom količinom Et₂O dobijena je bela kristalna supstanca (289,7 mg, prinos 70,92%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9.59 (s, 1H), 7.37 (m, 10H), 3.57 (s, 3H), 3.43 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.25 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.55 – 1.39 (m, 4H), 1.20 (m, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 174.67, 173.41, 155.12, 140.39, 129.42, 128.42, 126.58, 68.92, 51,42, 38.91, 34.51, 29.37, 27.10, 27.02, 25,04 24.25.



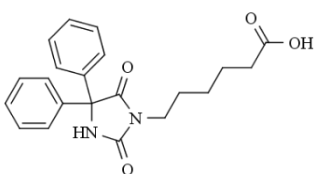
Jedinjenje FDR-2-kis

4-(2,5-diokso-4,4-difenil-imidazolidin-1-ilmetil)-benzoeva kiselina

Sintetisana hidrolizom jedinjenja FDR-2-ME (150,0 mg, 0,3746 mmol, 1,0 ekvivalent) pomoću LiOH (26,0719 mg, 1,0863 mmol, 2,9 ekvivalenta) u smeši THF/H₂O (5 mL). Izolovano je jedinjenje FDR-2-kis kao bela kristalna supstanca (144,7 mg, prinos >99%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.94 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.45 – 7.27 (m, 12H), 4.70 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172.99, 166.93, 155.06, 141.35, 139.44, 130.05, 129.66, 128.64, 128.26, 127.38, 126.58, 69.33.



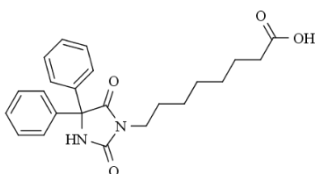
Jedinjenje FDR-3-kis

6-(2,5-diokso-4,4-difenil-imidazolidin-1-il)-heksanska kiselina

Sintetisana hidrolizom jedinjenja FDR-3-ME (138,0 mg, 0,3672 mmol, 1,0 ekvivalent) pomoću LiOH (34,8192 mg, 1,4508 mmol, 4 ekvivalenta) u smeši THF/H₂O (5 mL). Izolovano je jedinjenje FDR-3-kis kao bela kristalna supstanca (126,9 mg, prinos 95,5%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 11.99 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 7.48 – 7.30 (m, 10H), 3.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.14 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.50 (m, 4H), 1.20 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ 174.77, 173.65, 155.85, 140.13, 129.05, 128.62, 127.08, 69.50, 38.34, 33.91, 27.65, 26.03, 24.37.



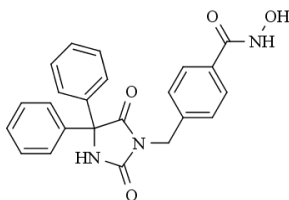
Jedinjenje FDR-4-kis

8-(2,5-diokso-4,4-difenil-imidazolidin-1-il)-oktanska kiselina

Sintetisana hidrolizom jedinjenja FDR-4-ME (136,0 mg, 0,3333 mmol, 1,0 ekvivalent) pomoću LiOH (32,00 mg, 1,3333 mmol, 4 ekvivalenta) u smeši THF/H₂O (5 mL). Izolovano je jedinjenje FDR-4-kis kao bela kristalna supstanca (121,6 mg, prinos 92,59%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 11.94 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 7.37 (m, 10H), 3.43 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.16 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.57 – 1.47 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.19 (d, J = 11.3 Hz, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 174.93, 173.65, 155.88, 140.15, 129.03, 128.61, 127.06, 69.47, 38.40, 34.08, 28.85, 28.57, 27.77, 26.26, 24.77.



Jedinjenje FDR-2

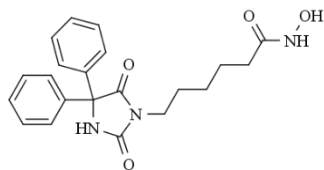
4-(2,5-dioekso-4,4-difenil-imidazolidin-1-ilmetil)-N-hidroksibenzamid

Iz sirovog proizvoda FDR-2-cik (121,38 mg, 0,2500 mmol, 1 ekvivalent) hidrolizom pomoću pTsOH (14,74 mg, 0,0775 mmol, 0,3 ekvivalenta) u 2-propanolu. Finalni proizvod je prečišćen na hromatografijom na koloni PE : EtOAc = 2/1, pa DCM : MeOH = 95/5, v/v) i dobijena je penasta supstanca, koja stajanjem u frižideru kristališe u obliku belih, igličastih kristala (34,7 mg, prinos 34,58%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.14 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 7.4 Hz, 5H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.26 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.26 (s, 1H), 3.51 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 2.36 (d, J = 33.9 Hz, 8H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 175.20, 167.77, 157.54, 141.50, 140.82, 129.68, 129.51, 129.33, 129.05, 128.48, 128.05, 71.51, 65.23, 49.00.

HRMS-ESI: izračunato za C₂₃H₁₉N₃O₄ [M + H]⁺ 402,1448
izmereno [m/z]: 402,1447



Jedinjenje FDR-3

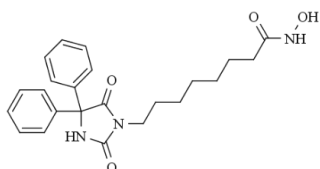
6-(2,5-dioekso-4,4-difenil-imidazolidin-1-il)-N-hidroksi heksanamid

Iz sirovog proizvoda FDR-3-cik (65,0 mg, 0,1396 mmol, 1 ekvivalent) hidrolizom pomoću pTsOH (8,21 mg, 0,0431 mmol, 0,309 ekvivalenta) u 2-propanolu. Finalni proizvod je prečišćen na hromatografijom na koloni PE : EtOAc = 2/ 1, pa DCM : MeOH = 95/5, v/v) i dobijena je penasta supstanca, koja stajanjem u frižideru kristališe u obliku belih, igličastih kristala (22,2 mg, prinos 41,69%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.26 (s, 1H), 7.36 (s, 10H), 3.54 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.04 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.34 – 1.25 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD): δ 174.15, 171.29, 156.64, 139.57, 128.29, 128.06, 126.68, 69.90, 38.09, 32.14, 27.31, 25.75, 24.78.

HRMS-ESI: izračunato za C₂₅H₂₇N₃O₂ [M + H]⁺ 382,1761
izmereno [m/z]: 382,1761



Jedinjenje FDR-4

8-(2,5-diokso-4,4-difenil-imidazolidin-1-il)-oktanska kiselina

Iz sirovog proizvoda FDR-4-cik (96,9 mg, 0,1963 mmol, 1 ekvivalent) hidrolizom pomoću pTsOH (0,4712 mg, 0,0196 mmol, 0,1 ekvivalent) u 2-propanolu. Finalni proizvod je prečišćen hromatografijom na koloni PE:EtOAc = 2/1, pa DCM : MeOH = 95/5, v/v) i dobijena je penasta supstanca, koja stajanjem u frižideru kristališe u obliku belih, igličastih kristala (55,8 mg, prinos 69,42%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 10.30 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.37 (m, 10H), 3.42 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.89 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.55 – 1.47 (m, 2H), 1.44 – 1.35 (m, 2H), 1.22 – 1.10 (m, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.59, 171.53, 157.17, 139.11, 128.81, 128.57, 126.85, 70.16, 38.67, 32.54, 28.37, 27.86, 27.49, 25.84, 24.81.

HRMS-ESI: izračunato za C₂₅H₂₇N₃O₂ [M + H]⁺ 410,2074
izmereno [m/z]: 410,2074

4.10. *In vitro* enzimski i ćelijski testiranja novosintetisanih HDAC6 inhibitora

4.10.1. Ispitivanje *in vitro* enzimске inhibicije humanih histon deacetilaza

Određivanje inhibitorne aktivnosti jedinjenja, kao i njihovog profila selektivnosti na humanim histon deacetilazama sprovedeno je u *in vitro* enzimskim testovima za visoko propusni skrining³⁰². Da bi se redukovao broj jedinjenja za određivanje krive odnosa doze i efekta, prvobitno su sva jedinjenja testirana pri istoj koncentraciji (5 μ M) u triplikatu, sa ciljem da se odredi procenat inhibicije HDAC6 izoforme. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 21**.

Tabela 21. Prikaz procenata inhibicije sintetisanih jedinjenja pri koncentraciji od 5 μ M

% inhibicije HDAC6 pri koncentraciji od 5 μ M								
Jedinjenje	BDR-2	BDR-3	BDR-4	BDR-5	BDR-6	BDR-7	BDR-8	BDR-9
	12,2 %	22,2%	3,1 %	18,2 %	95,6 %	97,1 %	97,7 %	96,9 %
Jedinjenje	FDR-2	FDR-3	FDR-4					
	96,8 %	98,7 %	100 %					

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 21**, zaključuje se da jedinjenja sa linkerom koji sadrži n=1, 2, 3 i 4 ugljenikova atoma (BDR-2, BDR-3, BDR-4 i BDR-5) inhibiraju humanu histon deacetilazu 6 u mikromolarnim koncentracijama ($IC_{50} > 1 \mu$ M). Pomenuta jedinjenja nisu korišćena u daljim studijama, dok su preostala jedinjenja (BDR-6, BDR-7, BDR-8, BDR-9, FDR-2, FDR-3 i FDR-4) korišćena za ispitivanje enzimске inhibitorne koncentracije (IC_{50}), kao i HDAC profila selektivnosti. Rezultati studija selektivnosti prikazani su u **Tabeli 22**.

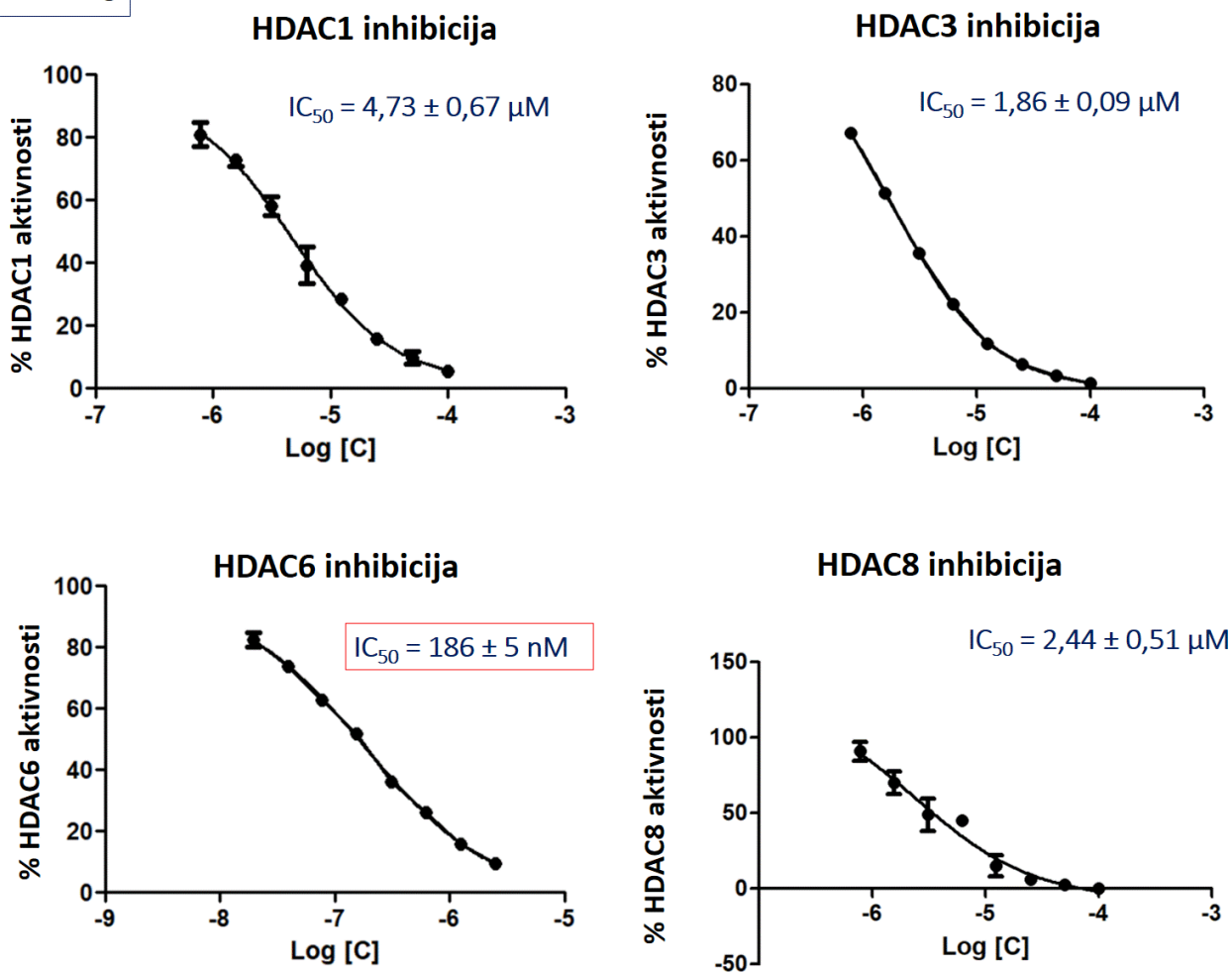
Tabela 22. Pregled *in vitro* enzimskih profila novosintetisanih derivata 1-benzhidrilnog piperazina i 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona; kontrolna jedinjenja su preuzeta iz reference²⁵⁶

Jedinjenje	$IC_{50} \pm Sd (\mu$ M)				Indeksi selektivnosti		
	HDAC1	HDAC3	HDAC6	HDAC8	HDAC1/6	HDAC3/6	HDAC8/6
BDR-6	4,730 \pm 0,670	1,860 \pm 0,090	0,186 \pm 0,005	2,440 \pm 0,510	25,4	10	13,1
BDR-7	0,619 \pm 0,023	0,267 \pm 0,019	0,096 \pm 0,008	0,345 \pm 0,017	6,4	2,8	3,6
BDR-8	0,408 \pm 0,022	0,207 \pm 0,014	0,124 \pm 0,013	0,245 \pm 0,002	3,3	1,7	2
BDR-9	1,474 \pm 0,172	3,467 \pm 0,121	0,031 \pm 0,004	0,708 \pm 0,045	47,5	111,8	23
BP-8	> 50	> 50	> 50	> 50	-	-	-
FDR-2	3,166 \pm 0,089	2,256 \pm 0,009	0,0434 \pm 0,0001	< 0,078	73	52	NI
FDR-3	0,677 \pm 0,041	0,549 \pm 0,009	0,021 \pm 0,003	0,302 \pm 0,005	32,5	26,3	14,5
FDR-4	< 0,078	< 0,078	0,0165 \pm 0,0007	< 0,078	NI	NI	NI
valproinska kiselina[#]	660	>1000	>1000	103	-	-	-
natrijum butirat[#]	8,3	4,8	>1000	10,4	-	-	-
trihostatin A	0,0013	0,0015	0,0036	0,400	-	-	-

Vrednosti su izražene kroz srednju vrednost $IC_{50} \pm$ standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta, NI – nije izračunato, # vrednosti IC_{50} preuzete iz literature

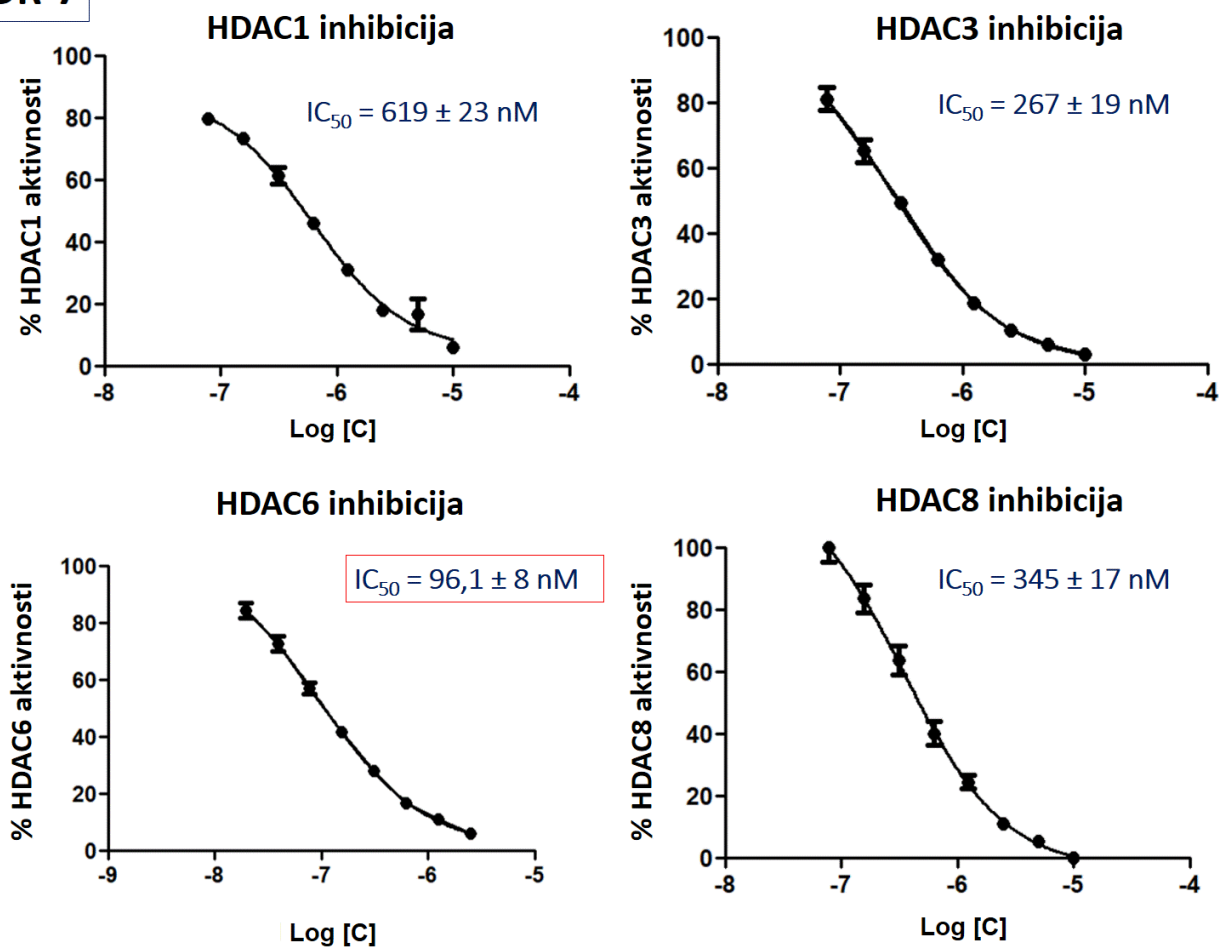
Krive odnosa doze i inhibicije odgovarajuće HDAC izoforme date su na **Slikama 53, 54, 55, 56, 57, 58 i 59.**

BDR-6



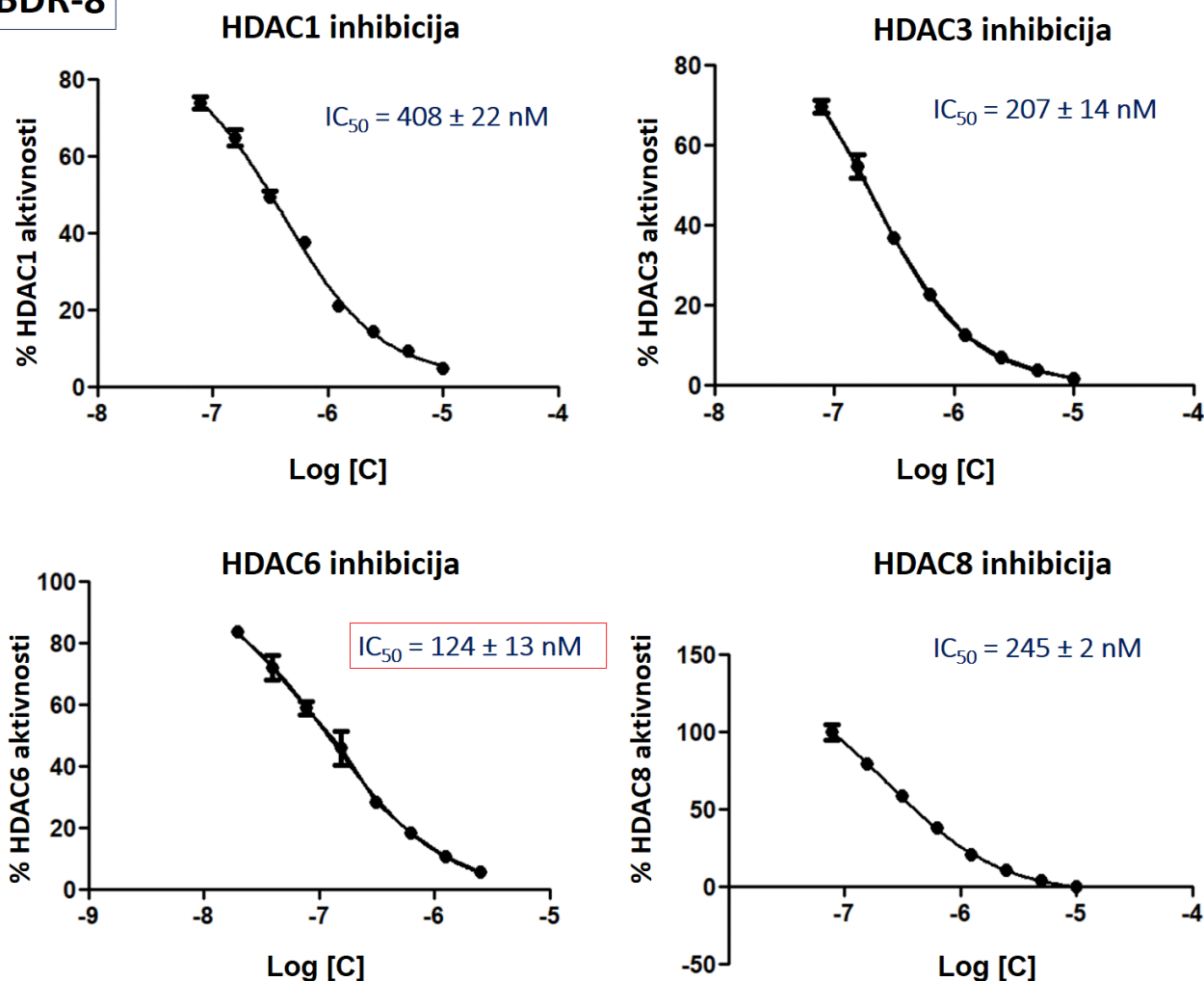
Slika 53. Prikaz dijagrama odnosa doze i HDAC inhibicije za jedinjenje BDR-6; pored dijagrama su date vrednosti IC_{50} koncentracija

Jedinjenje BDR-6 predstavlja selektivan HDAC6 inhibitor čija je $IC_{50} = 186 nM$, dok je inhibicija nuklearnih izoformi definisana u mikromolarnim koncentracijama (za HDAC1 je $IC_{50} = 4,73 \mu M$, za HDAC3 je $IC_{50} = 1,86 \mu M$ i za HDAC8 je $IC_{50} = 2,44 \mu M$). Ujedno, jedinjenje BDR-6 više od 25 puta selektivnije inhibira HDAC6 izoformu u odnosu na HDAC1, 10 puta u odnosu na HDAC3 i više je od 13 puta potentniji inhibitor na HDAC6 izoformi u odnosu na HDAC8. Poredeći IC_{50} vrednosti za ostala jedinjenja (BDR-7, BDR-8, **Tabela 22**) zaključuje se da je pet ugljenikovih atoma u strukturi linkera alifatičnih hidroksamskih kiselina optimalno za selektivnu HDAC6 inhibiciju kod derivata 1-benzhidrilnog piperazina. Ovakav zaključak je u skladu sa rezultatima dobijenim analizom 3D-QSAR modela.

BDR-7

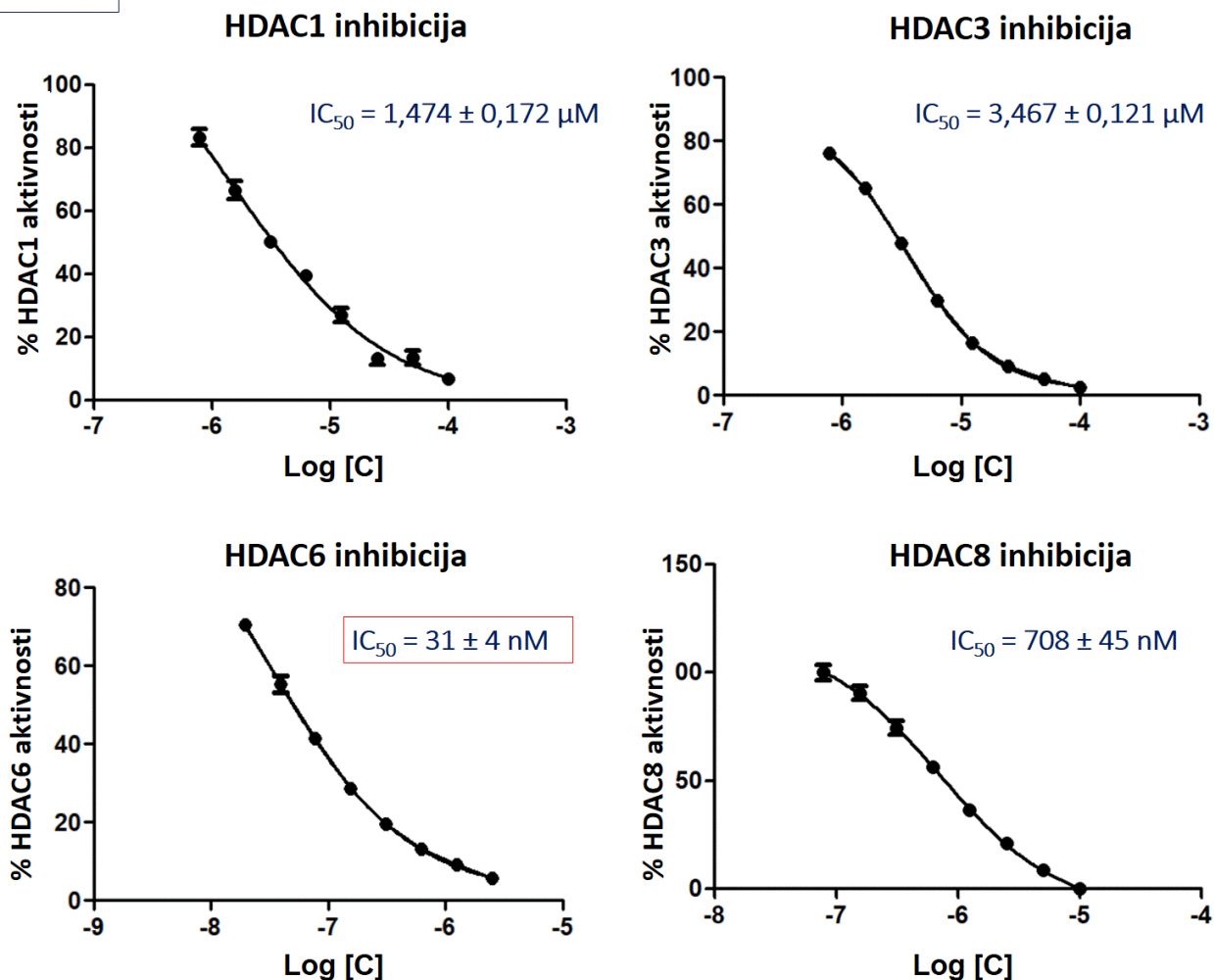
Slika 54. Prikaz dijagrama odnosa doze i HDAC inhibicije za jedinjenje BDR-7; pored dijagrama su date vrednosti IC₅₀ koncentracija

Jedinjenje BDR-7 predstavlja HDAC6 inhibitor čija je IC₅₀ = 96,1 nM. U poređenju sa jedinjenjem BDR-6, inhibitor BDR-7 ima niže indekse selektivnosti, odnosno inhibira nuklearne HDAC izoforme u nanomolarnim koncentracijama (619 nM za HDAC1, 267 nM za HDAC3 i 345 nM za HDAC8). Razmatrajući izračunate IC₅₀ vrednosti može se pretpostaviti da ćelijski efekti BDR-7 inhibitora ne mogu biti jednoznačno tumačeni u kontekstu HDAC6 inhibicije. Zaključno, broj ugljenikovih atoma n=6 u alifatičnom linkeru derivata 1-benzhidrilnog piperazina doprinosi dizajniranju selektivnog HDAC6 inhibitora, sa nižim indeksima selektivnosti u odnosu na BDR-6 inhibitor. S obzirom da u 3D-QSAR studiji dizajniranja novih inhibitora nisu predviđane biološke aktivnosti inhibitora sa 6 C atoma u linkeru, odnos aktivnosti HDAC1/6 = 6,4 za BDR-7 jedinjenje dodatno potvrđuje postavljenu hipotezu.

BDR-8

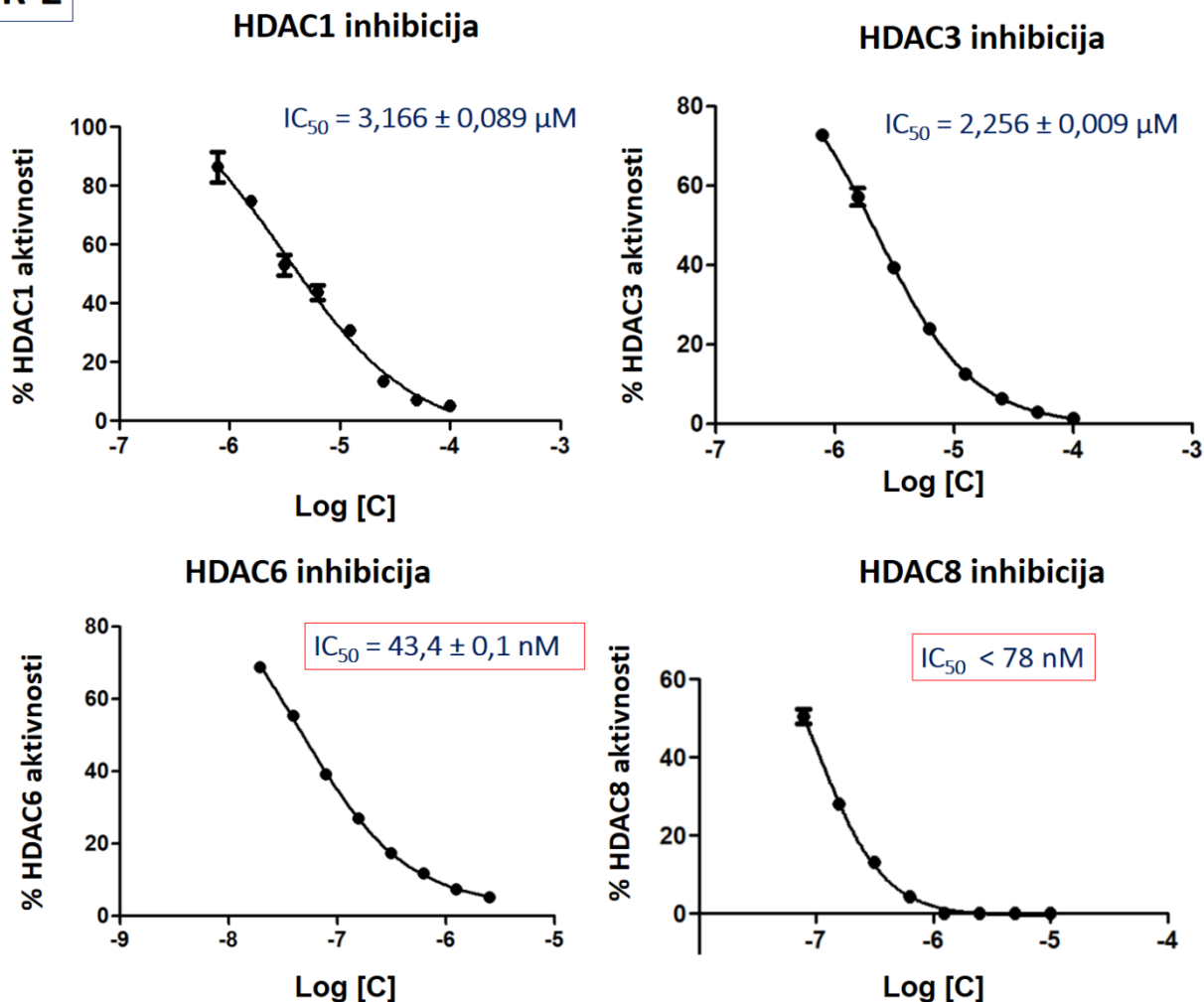
Slika 55. Prikaz dijagrama odnosa doze i HDAC inhibicije za jedinjenje BDR-8; pored dijagrama su date vrednosti IC₅₀ koncentracija

Jedinjenje BDR-8 predstavlja HDAC6 inhibitor čija je IC₅₀ = 124 nM. Među derivatima 1-benzhidrilnog piperazina koji inhibiraju HDAC6 izoenzim, ovo jedinjenje predstavlja najmanje selektivan HDAC6 inhibitor. Veoma niski indeksi selektivnosti (HDAC1/6 = 3,3; HDAC3/6 = 1,7 i HDAC8/6 = 2) ga čine pan-HDAC (neselektivnim HDAC) inhibitorom. Slično BDR-7 inhibitoru, ovo jedinjenje će u ćelijskim testovima inhibirati citoplazmatsku HDAC6 izoformu, kao i nuklearne HDAC izoforme, zbog čega se može očekivati kompleksniji antikancerski profil jedinjenja. Na osnovu prethodno izloženog, dužina linkera jedinjenja BDR-8 (broj C atoma je 7) u seriji derivata 1-benzhidrilnog piperazina i dalje omogućuje prvenstveno HDAC6 inhibiciju. Neočekivano, porast broja C atoma u linkeru pogoršava HDAC selektivni profil u odnosu na HDAC1 izoformu. Na osnovu prikazanih rezultata, zaključuje se da optimalna dužina linkera (n=5) kod derivata BDR-6 obezbeđuje jasniju rezoluciju inhibicije HDAC6 izoforme u odnosu na ispitivane nuklearne HDAC klasa I izoforme (HDAC1, HDAC3 i HDAC8). Važno je dodati da u budućim studijama optimizacije strukture i aktivnosti sintetisanih jedinjenja treba posebno obratiti pažnju na hemiju CAP grupe (1-benzhidrilni piperazin).

BDR-9

Slika 56. Prikaz dijagrama odnosa doze i HDAC inhibicije za jedinjenje BDR-9; pored dijagrama su date vrednosti IC_{50} koncentracija

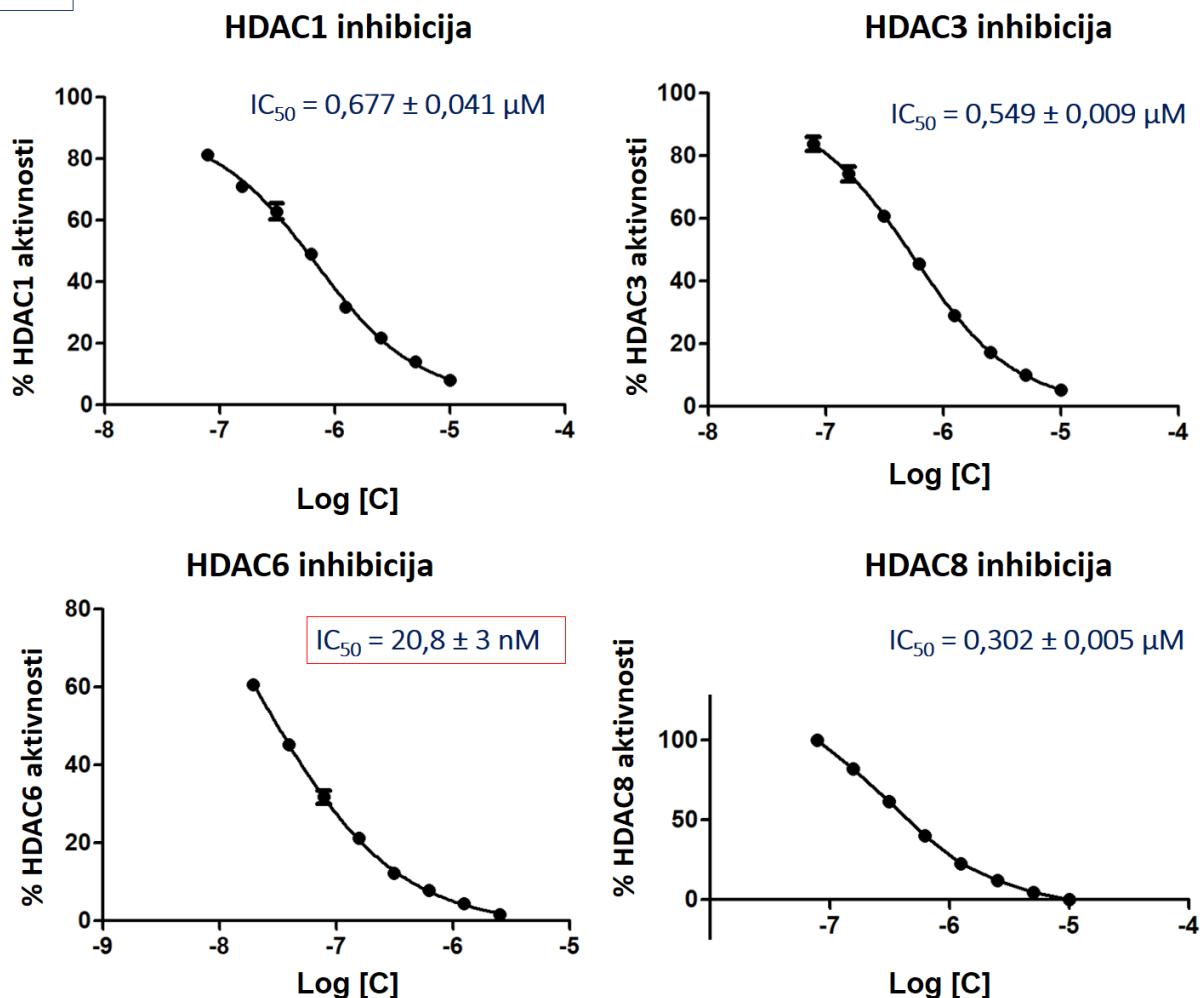
BDR-9 jedinjenje, kao derivat fenilhidroksamske kiseline, predstavlja selektivni HDAC6 inhibitor ($IC_{50} = 31 nM$), sa odličnim indeksima selektivnosti ($HDAC1/6 = 47,5$; $HDAC3/6 = 111,8$ i $HDAC8/6 = 23$). Među sintetisanim 1-benzhidrilnim derivatima piperazina, BDR-9 inhibitor je najselektivniji i najpotentniji HDAC6 inhibitor. Pretpostavlja se da će antikancerski efekti ovog jedinjenja na ćelijskim modelima poticati od inhibicije HDAC6 izoforme, dok se pri znatno višim koncentracijama (visoko mikromolarnim) mogu ispoljiti efekti koji potiču od inhibicije nuklearnih HDAC-ova. Ovo jedinjenje takođe doprinosi validnosti zaključaka komparativne 3D-QSAR studije, kao i prethodno objavljenim rezultatima²¹⁷ gde se tvrdi da derivati fenilhidroksamskih kiselina supstituisanih u para položaju favorizuju selektivnu HDAC6 inhibiciju.

FDR-2

Slika 57. Prikaz dijagrama odnosa doze i HDAC inhibicije za jedinjenje FDR-2; pored dijagrama su date vrednosti IC_{50} koncentracija

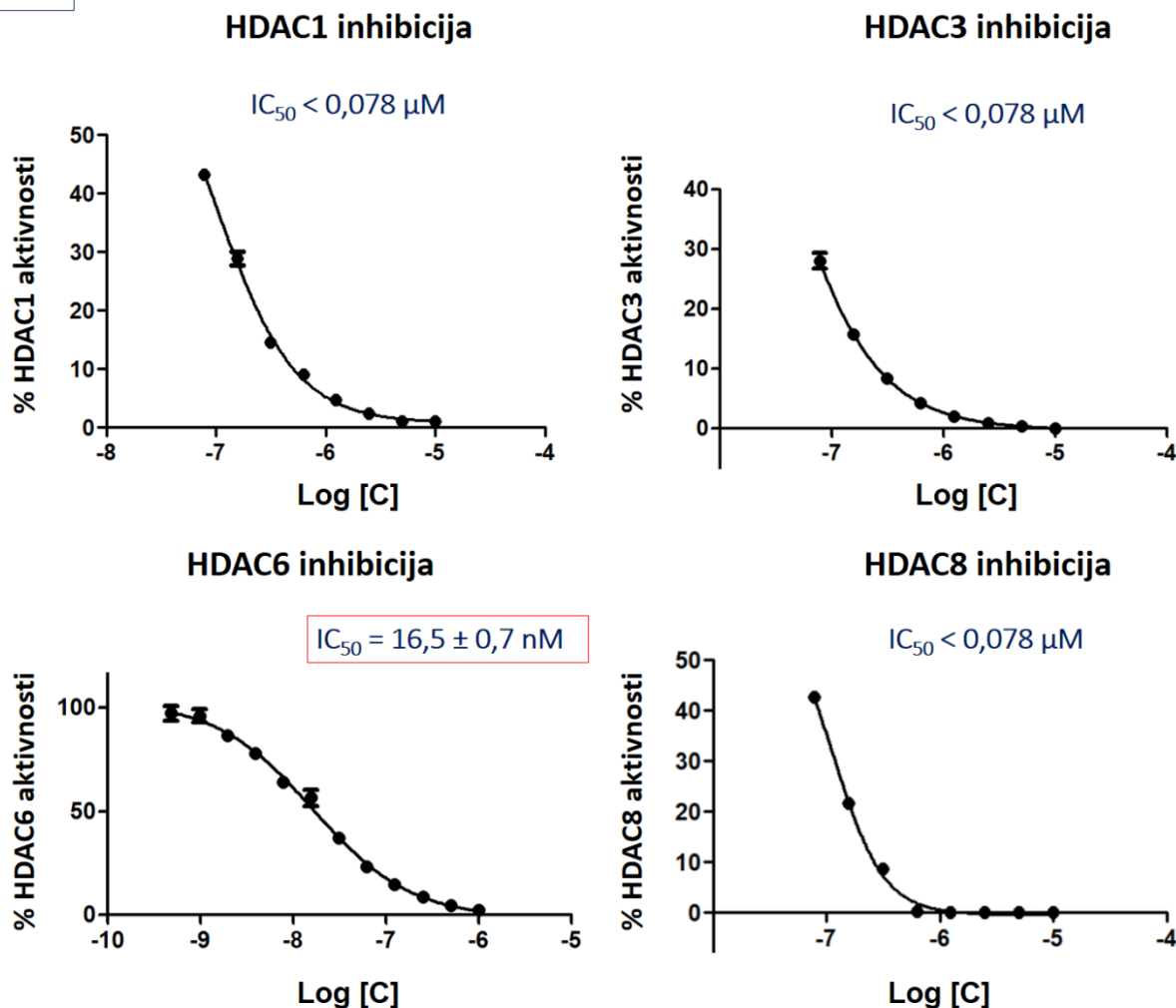
Među derivatima 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona, najbolji profil selektivnosti ima fenilhidroksamat FDR-2. Jedinjenje u mikromolarnim koncentracijama inhibira jedarne izoforme histon deacetilaza ($IC_{50} = 3,166 \mu M$ na HDAC1 izoformi i $IC_{50} = 2,256 \mu M$ na HDAC3 izoformi). Vrednost inhibitorne koncentracije na HDAC6 izoformi iznosi 43,4 nM, dok IC_{50} vrednost na HDAC8 izoformi je ispod 78 nM. FDR-2 inhibitor je 73 puta selektivniji za HDAC6 izoformu u odnosu na HDAC1, odnosno 52 puta selektivniji ka HDAC6 izoformi u odnosu na HDAC3. Koncentracije inhibitora dodate HDAC8 enzimu za razvijanje krive odnosa doze i efekta (najveća koncentracija $10 \mu M$, najniža koncentracija 78 nM) inhibiraju enzim manje od 50%. Zbog toga je neophodno koristiti niže koncentracije inhibitora (manje od 78 nM), kako bi se precizno odredila IC_{50} vrednost na pomenutoj izoformi.

Iako je jedinjenje FDR-2 para supstituisani derivat fenilhidroksamske kiseline, jedinjenje FDR2 predstavlja nanomolarni dualni HDAC6/8 inhibitor.

FDR-3

Slika 58. Prikaz dijagrama odnosa doze i HDAC inhibicije za jedinjenje FDR-3; pored dijagrama su date vrednosti IC_{50} koncentracija

Inhibitor FDR-3 predstavlja selektivni HDAC6 inhibitor ($IC_{50} = 20,8 \text{ nM}$) koji ima niže indekse selektivnosti (**Tabela 22**, indeks selektivnosti HDAC1/6 iznosi 32,5, za HDAC3/6 iznosi 23,6, dok za HDAC8/6 iznosi 14,5) nego FDR-2 inhibitor. Jedinjenje inhibira sve četiri testirane izoforme u submikromolarnim koncentracijama ($IC_{50} = 0,677 \mu M$ na HDAC1 izoformi, $IC_{50} = 0,549 \mu M$ na HDAC3 izoformi i $IC_{50} = 0,302 \mu M$ na HDAC8 izoformi). Razmatrajući dobijene vrednosti inhibicije HDAC1 i HDAC6 izoformi za FDR-3 jedinjenje, opravdavaju se postavljene hipoteze u 3D-QSAR modelima. Zbog prikazane enzimske inhibicije, očekuje se da će jedinjenje FDR-3 imati kompleksan antikancerski efekat na odabranim *in vitro/in vivo* modelima maligne bolesti. Ujedno, jedinjenje FDR-3 predstavlja odlično *hit* jedinjenje za *hit-to-lead* optimizacije sa ciljem dizajniranja inhibitora većih indeksa selektivnosti u odnosu na HDAC6 izoformu. U poređenju sa jedinjenjem FDR-4, inhibitor FDR-3 ima kraći linker (5 C atoma) i selektivniji profil HDAC6 inhibicije u odnosu na druge izoforme. Uzimajući u obzir da je obod katalitičkog džepa HDAC6 širi u odnosu na druge HDAC-ove, kao i da je dužina linkera od 5 C atoma optimalna za selektivnost ka HDAC6 izoformi, zamena fenil grupa/supstitucija fenil prstenova na heterociklusu imidazolidin-2,4-diona može biti dobra strategija u dizajnu selektivnijih HDAC6 inhibitora.

FDR-4

Slika 59. Prikaz dijagrama odnosa doze i HDAC inhibicije za jedinjenje FDR-4; pored dijagrama su date vrednosti IC_{50} koncentracija

Inhibitor FDR-4 je dizajniran na osnovu inicijalnih hipoteza u 3D-QSAR studiji, ima alifatični linker sa 7 ugljenikovih atoma i predstavlja HDAC6 inhibitor sa najmanjom selektivnošću u odnosu na ostale izoforme. Za inhibiciju HDAC1/3/8 enzima u bioluminogenim *in vitro* testovima, početna koncentracija inhibitora od $10 \mu M$ u 8 koraka razblaženja nije dostigla 50% inhibicije pomenutih izoformi, što je neophodno optimizovati u narednim koracima antikancerskog razvoja FDR-4 inhibitora.

Zaključno, dobijeni rezultati testiranja na HDAC enzimima su u skladu sa rezultatima predviđanja u 3D-QSAR modelima. Sva tri derivata (FDR-2, FDR-3 i FDR-4) su potentniji inhibitori na HDAC6 izoformi nego na HDAC1. Predviđanjima vezivnih poza i orijentacija jedinjenja u katalitičkim džepovima HDAC1 i HDAC6 enzima (**Slike 42 i 43**) zaključuje se da sva tri jedinjenja mogu da se usidre u vezivna mesta, osim jedinjenja FDR-2 u vezivnom džepu HDAC1. Dodatno, nisu primećene značajne interakcije inhibitora koji imaju alifatični linker, FDR-3 i FDR-4 sa spoljašnjim obodom HDAC6 enzima, što može da sugeriše da je dužina linkera $n=5$ (heksil linker) optimalna za dobijanje selektivnih HDAC6 inhibitora, koji kao CAP grupu sadrže 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-dion.

4.10.2. Određivanje citotoksičnosti novosintetisanih jedinjenja na ćelijama kancera dojke

Odabir vrste kancerskih ćelija za ispitivanje farmakoloških efekata sintetisanih inhibitora u ovoj doktorskoj disertaciji se zasniva na studiji istraživača Park, Soon Young, et al. (2011)³⁰³. U pomenutom istraživanju je pokazano da obe ćelijske linije korišćene u ovoj disertaciji (MDA-MB-231 i MCF-7) imaju povećanu ekspresiju HDAC4, HDAC6 i HDAC8 izoformi. Dodatno je istaknuto da je prekomerna ekspresija HDAC6 izoforme povezana sa povećanom invazivnošću MDA-MB-231 ćelija i ekspresijom matriksne metaloproteinaze MMP-9, odgovorne za degradaciju ekstraćelijskog matriksa tumorskog mikrokruženja.

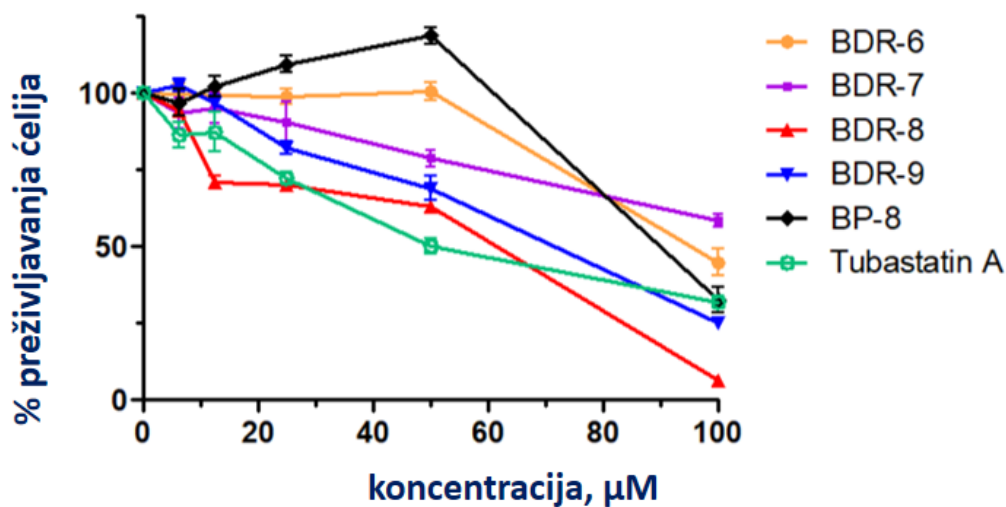
Rezultati ispitivanja vijabilnosti ćelija kancera dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) u komercijalnom MTT testu su prikazani u **Tabeli 23**.

Tabela 23. Pregled citotoksičnih koncentracija novosintetisanih derivata dobijenih na dve linije kancerskih ćelija

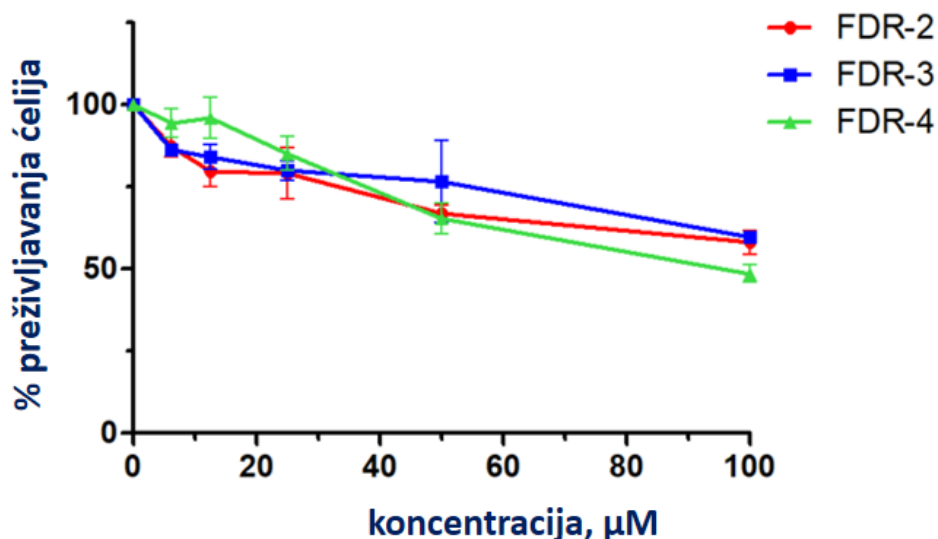
Jedinjenje	IC ₅₀ (µM)	
	MDA-MB-231 tumorska linija	MCF-7 tumorska linija
BDR-2	> 100	> 100
BDR-3	> 100	> 100
BDR-4	> 100	> 100
BDR-5	> 100	> 100
BDR-6	> 100	80,41
BDR-7	> 100	> 100
BDR-8	61,46	51,25
BP-8	89,89	> 100
BDR-9	71,53	99,18
FDR-2	> 100	> 100
FDR-3	> 100	> 100
FDR-4	95,68	> 100
tubastatin A	50,53	> 100

Tretiranje ćelija kancera dojke sintetisanim jedinjenjima dovodi do umerene redukcije preživljavanja MDA-MB-231 (**Slika 60**) i MCF-7 (**Slika 61**) ćelija nakon 48 časova. Jedinjenje BDR-6 kao selektivni HDAC6 inhibitor, deluje citotoksično na MCF-7 ćelijama, dok se pri testiranim koncentracijama (u intervalu od 6,25 do 100 µM) na trostruko negativnim ćelijama kancera dojke (TNBC) ne uočava citotoksični efekat jedinjenja BDR-6. Interesantno je primetiti da jedinjenje BDR-7, sa jednim ugljenikom više u alifatičnom linkeru, pri testiranim koncentracijama ne ispoljava citotoksičnost ni na jednoj od testiranih ćelijskih liniji. Za razliku od BDR-7, jedinjenje BDR-8 smanjuje preživljavanje za 50% MDA-MB-231 ćelija pri koncentraciji od 61,46 µM, dok se na estrogen receptor pozitivnoj ćelijskoj liniji kancera dojke (MCF7) isti efekat dešava na nižoj koncentraciji, 51,25 µM. Derivat fenilhidroksamske kiseline, jedinjenje BDR-9, pri koncentraciji od 71,53 µM dovodi do redukcije preživljavanja od 50% TNBC linije kancera dojke, dok pri opisanim eksperimentalnim uslovima citotoksični efekat na MCF7 ćelijskoj liniji nije primećen. U poređenju sa poznatim selektivnim inhibitorom HDAC6 tubastatinom A (IC₅₀=50,53 µM), naš fenilhidroksamat BDR-9 ispoljava citotoksičnost na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji pri znatno većim koncentracijama, što je u skladu sa očekivanim biološkim efektima selektivne HDAC6 inhibicije²⁹².

A. MDA-MB-231 ćelijska linija



B.

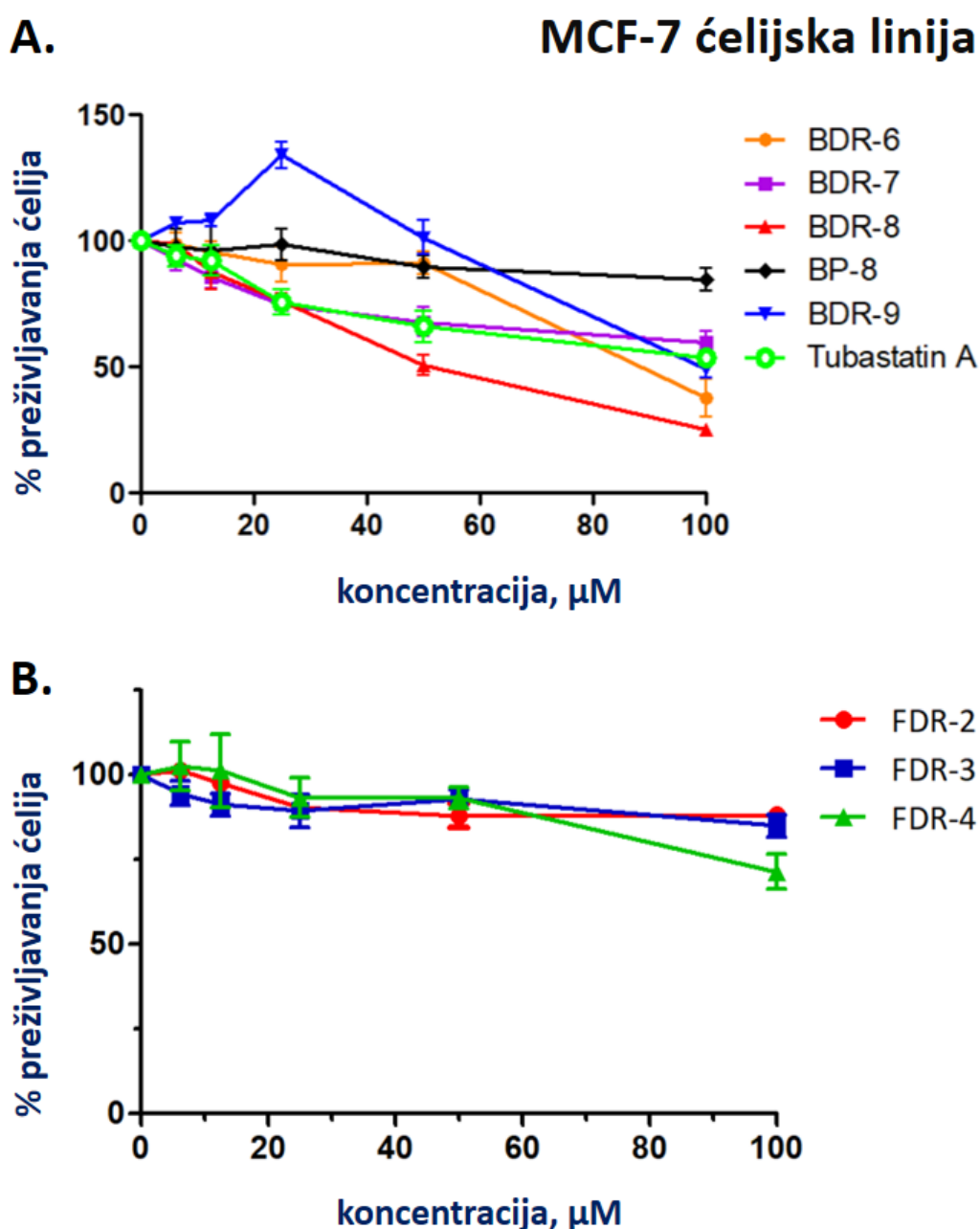


Slika 60. Prikaz dijagrama odnosa doze i citotoksičnosti dobijenih u MTT testu na trostruko negativnoj ćelijskoj liniji kancera dojke (MDA-MB-231)

Da bi se preliminarno utvrdilo da li efekti derivata 1-benzhidrilnog piperazina potiču od interakcija jedinjenja sa drugim ciljnim mestima u ćelijskom modelu kancera dojke, testiran je i prekursor BDR-8 jedinjenja, označen kao BP-8. Jedinjenje BP-8, kao derivat metil estra koji ne sadrži cink-vezivnu grupu, ima IC_{50} vrednost od $89,89 \mu\text{M}$ na TNBC ćelijskoj liniji. Na osnovu ovog podatka, može se zaključiti da je uslov za citotoksičnu aktivnost jedinjenja BDR-8 ($\text{IC}_{50}=61,46 \mu\text{M}$) prisustvo hidroksamske kiseline, odnosno do smanjenja preživljavanja MDA-MB-231 ćelija nakon tretiranja BDR-8 jedinjenjem dolazi usled specifičnih interakcija metaloenzima sa hidroksamskom kiselinom jedinjenja BDR-8.

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 23**, zaključuje se da derivati 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona ne ispoljavaju citotoksičan efekat ni na jednoj ispitivanoj ćelijskoj liniji. Ovakav ishod testiranja može da bude u vezi sa nižom rastvorljivošću FDR derivata (**Tabela 17**) u

odnosu na BDR klasu inhibitora. Jedinjenja FDR imaju i veći broj heteroatoma u odnosu na BDR derivate, što ih može činiti supstratima za brojne efluksne pumpe eksprimirane na površini MDA-MB-231 i MCF-7 ćelija³⁰⁴.



Slika 61. Prikaz dijagrama odnosa doze i citotoksičnosti dobijenih u MTT testu na ER+ ćelijskoj liniji kancera dojke (MCF-7)

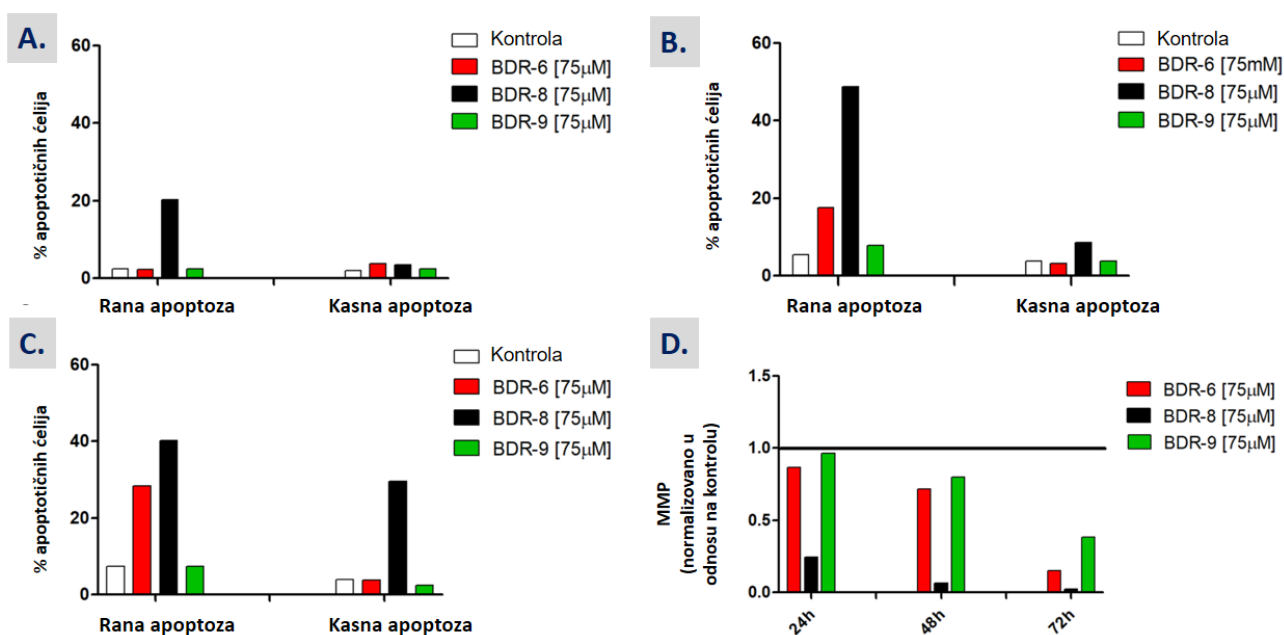
Konačno, poređenjem IC₅₀ vrednosti nakon MTT testa, zaključuje se da su MDA-MB-231 ćelije kancera dojke osetljivije na dejstvo BDR derivata. Nakon primarnog *in vitro* skrininga sintetisanih jedinjenja na ćelijama kancera dojke, odlučeno je da se u daljim ispitivanjima antikancerskog profila koriste derivati 1-(difenilmetil)-piperazina, odnosno jedinjenja **BDR-6**, **BDR-8** i **BDR-9**. Bez obzira što FDR derivati nisu pokazali citotoksičnost na ćelijama kancera dojke pri testiranim koncentracijama, moguće ih je zbog potentnog enzimskog HDAC profila testirati na drugim kancerskim modelima u budućim istraživanjima.

4.10.3. Analiza uticaja citotoksičnih derivata 1-(difenilmetil)-piperazina na inicijaciju apoptoze

Analizom citotoksičnih profila na osnovu MTT testa, detaljniji antikancerski profil je ispitan za sledeća jedinjenja:

- Dva selektivna HDAC6 inhibitora: **BDR-6** (smanjuje preživljavanje MCF-7 ćelija) i **BDR-9** (smanjuje preživljavanje MDA-MB-231 i MCF-7 ćelija)
- HDAC6 inhibitor sa najmanjim indeksima selektivnosti za ostale HDAC izoforme: **BDR-8** (citotoksičan na obe linije ćelija kancera)

Da bi se ispitaio mehanizam antitumorskog efekta navedenih jedinjenja na MDA-MB-231 ćelijama, korišćen je Annexin V-FITC test u kombinaciji sa propidijum jodidom. Ćelije su tretirane navedenim inhibitorima u istoj koncentraciji od 75 μ M u trajanju eksperimenta od 24, 48 i 72 sata. Koristeći protočnu citometriju, određena je distribucija ćelija u ranoj fazi apoptoze (aneksin pozitivne, 7AAD negativne ćelije), kasnoj fazi apoptoze i nekroze (aneksin pozitivne, 7AAD pozitivne ćelije).



Slika 62. Indukcija rane apoptoze u MDA-MB-231 ćelijama nakon **A.** 24-časovnog tretiranja; **B.** 48-časovnog tretiranja i **C.** 72-časovnog tretiranja ispitivanim HDAC6 inhibitorima; **D.** Prikaz vremenski-zavisne promene mitohondrijskog membranskog potencijala (MMP) u MDA-MB-231 ćelijama nakon tretiranja prikazanim HDAC6 inhibitorima.

Nakon 24 sata od tretiranja MDA-MB-231 ćelija BDR-8 inhibitorom primetan je porast udela ćelija u ranoj apoptozi (20,32%, **Slika 62A**), koji nakon 48 sati od započinjanja eksperimenta raste (48,78%, **Slika 62B**). Posle 72 sata inkubacije BDR-8 jedinjenja sa MDA-MB-231 ćelijama dolazi do porasta broja ćelija u kasnoj apoptozi, odnosno nekrozi.

Poređenjem rezultata za selektivne inhibitore BDR-6 i BDR-9 na prikazanoj raspodeli apoptotičnih ćelija (**Slika 62. A-C**) primećuje se da je vremenski-zavisan porast ćelija u ranoj

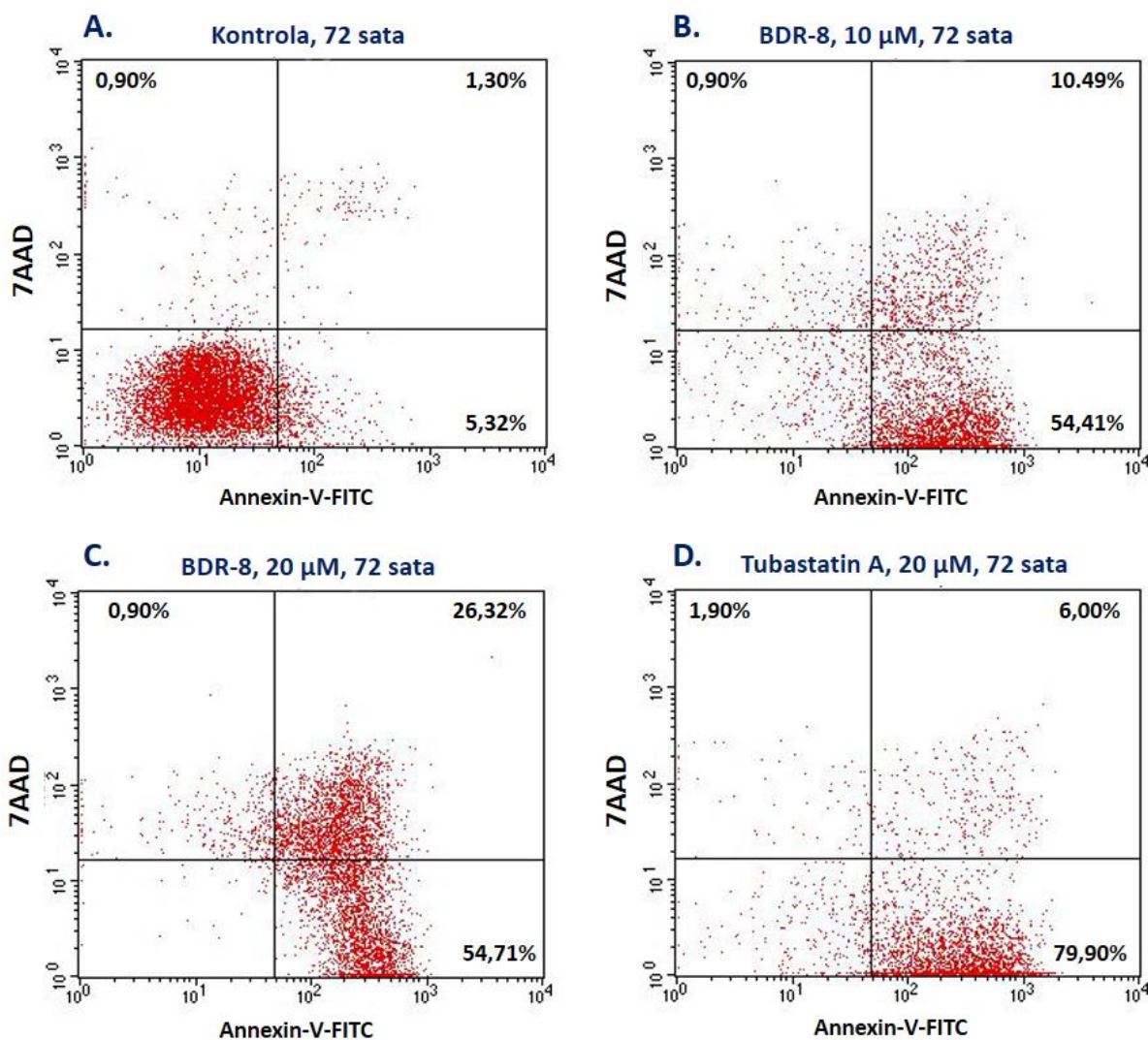
apoptozi prisutan kod BDR-6 inhibitora (2,32% posle 24 časa, 17,50% nakon 48 sati i 28,32% nakon 72 sata). Fenilhidroksamski derivat BDR-9 ne indukuje značajno ni ranu ni kasnu apoptozu u tretiranim ćelijama pri koncentraciji od 75 μM nakon 72 sata, što je u saglasnosti sa ranije opisanim efektima selektivnih HDAC6 inhibitora. Veoma je interesantna činjenica da određena IC_{50} vrednost za jedinjenje BDR-9 na MDA-MB-231 ćelijama u MTT testu iznosi 71,53 μM , što ne može biti dovedeno u vezu sa indukcijom rane i/ili kasne apoptoze. Na osnovu prikazanih rezultata zaključuje se da jedinjenje BDR-9 nema proapoptotski efekat na redukciju preživljavanja ispitivanih ćelija kancera dojke, zbog čega je neophodno ispitati druge antikancerske efekte BDR-9 jedinjenja.

Da bi se razumeo mehanizam aktivacije apoptotskih signala u MDA-MB-231 ćelijama, ispitana je promena mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\psi_m$). Merenje potencijala na protočnom citometru (FACS) je ukazalo na snažan pad mitohondrijskog membranskog potencijala kod ćelija tretiranih BDR-8 jedinjenjem (**Slika 62D**). Čak i nakon 24 sata od tretiranja MDA-MB-231 ćelija uočava se izrazito smanjenje membranskog potencijala, što sugeriše da je inicijacija apoptoze nakon tretmana BDR-8 jedinjenjem u koncentraciji od 75 μM orkestrirana unutrašnjim putem apoptoze. Za razliku od BDR-8 kao najmanje selektivnog HDAC6 inhibitora, jedinjenja BDR-6 i BDR-9 ne dovode do dramatične promene u membranskom potencijalu mitohondrija nakon 24 i 48 sati, dok je značajna redukcija vrednosti $\Delta\psi_m$ primećena tek nakon 72 sata. Ujedno, najizrazitiji pad potencijala je primećen kod jedinjenja BDR-8, što konačno ukazuje da je kandidat BDR-8 antikancersko jedinjenje koje deluje citotoksično na MDA-MB-231 ćelije preko unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze.

S obzirom na to da je BDR-8 inhibitor citotoksičan na obe ćelijske linije kancera dojke i da je nakon analize uticaja na apoptozu pokazao najpotentniji antikancerski efekat, u sledećoj fazi istraživanja je ispitano njegov antikancerski efekat pri nižim koncentracijama od IC_{50} (10 i 20 μM) i upoređen sa tubastatinom A.

4.10.4. Ispitivanje proapoptotskih efekata BDR-8 inhibitora na MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama kancera dojke

Ćelije MDA-MB-231 i MCF-7 su tretirane 72 sata jedinjenjem BDR-8 u koncentracijama (10 i 20 μM) nižim od citotoksičnih IC_{50} vrednosti dobijenih u MTT testu. Citometrijska analiza apoptoze na MDA-MB-231 ćelijama je prikazana na **Slici 63**.

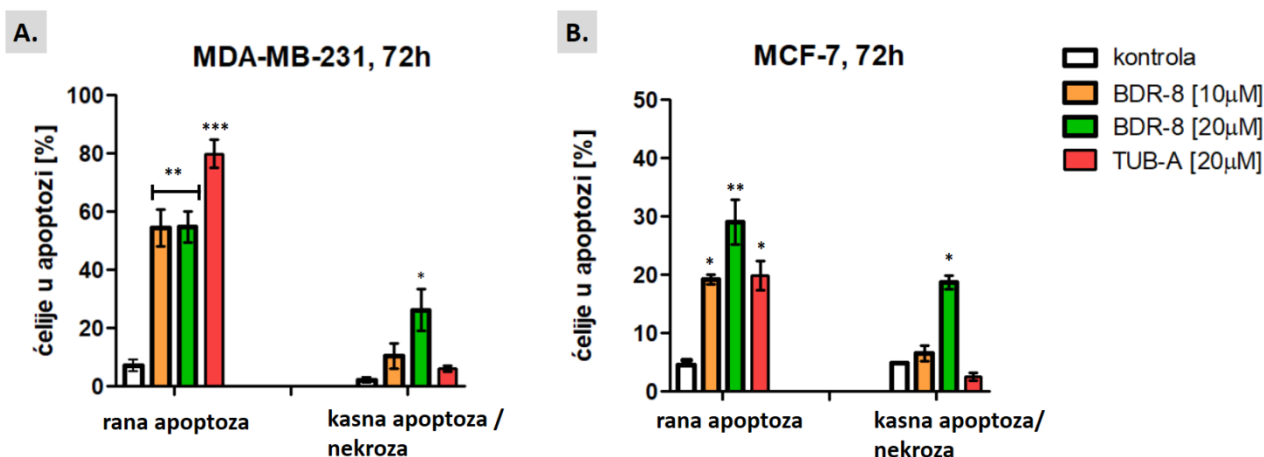


Slika 63. Analiza bojenja apoptotičnih MDA-MB-231 ćelija protočnom citometrijom u testu dvokolornog bojenja pomoću aneksina-V-FITC i 7AAD bojom, **A.** Kontrolna grupa, **B.** Tretman ćelija BDR-8 jedinjenjem (10 μM) 72 sata, **C.** Tretman ćelija BDR-8 jedinjenjem (20 μM) 72 sata i **D.** Tretman ćelija tubastatinom A (20 μM) 72 sata. Na prikazanom dvoparametarskom histogramu levi gornji kvadrant predstavlja aneksin negativne i 7AAD pozitivne ćelije (mrtve ćelije); desni gornji kvadrant predstavlja aneksin pozitivne i 7AAD pozitivne ćelije (kasna apoptoza/nekroza); levi donji kvadrant predstavlja aneksin negativne i 7AAD negativne ćelije (vijabilne ćelije) i desni donji kvadrant predstavlja aneksin pozitivne i 7AAD negativne ćelije (rana apoptoza).

Tretman MDA-MB-231 ćelija (**Slika 63B i 63C**) BDR-8 jedinjenjem pokazuje koncentraciono-zavisan porast kasno-apoptotičnih ćelija (pri koncentraciji 10 μM udeo je 10,49%, dok je pri koncentraciji 20 μM udeo 26,32%). Udeo ćelija u ranoj fazi apoptoze je iznad 50% (pri 10 μM

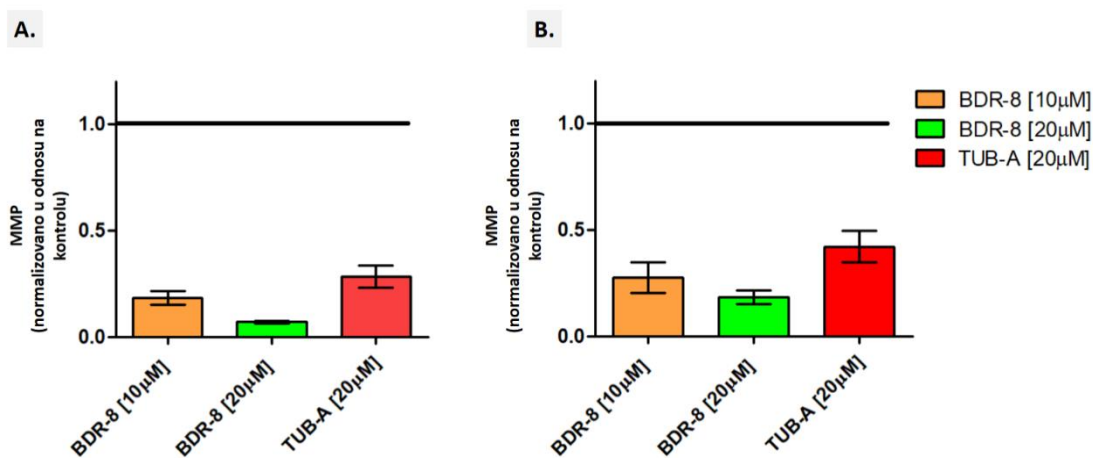
je 54,41%, pri 20 μM je 54,71%). Kao pozitivna kontrola u eksperimentima korišćen je tubastatin A koji 79,9% MDA-MB-231 ćelija uvodi u fazu rane apoptoze pri koncentraciji od 20 μM .

Indukcija apoptoze kod MCF-7 ćelija je detektovana istom metodom na protočnom citometru (**Slika 64B**), sa приметно nižim procentima MCF-7 ćelija u ranoj apoptozi (19,30% pri 10 μM i 29,16% pri 20 μM). Takođe, primećen je koncentraciono-zavisian porast ćelija u kasnoj apoptozi nakon BDR-8 tretmana (6,56% pri 10 μM i 18,81% pri 20 μM , **Slika 64B**). Tretiranje MCF-7 ćelija tubastatinom A (20 μM , **Slika 64B**) povećava udeo populacije ćelija u ranoj fazi apoptoze (19,85%) u odnosu na kontrolu.



Slika 64. Indukcija apoptoze u tumorskim ćelijama MDA-MB-231 (**A**) i MCF-7 (**B**) niskim dozama inhibitora BDR-8 (10 i 20 μM) i tubastatina A (20 μM). Procenat ćelija u ranoj i kasnoj fazi apoptoze je izmeren metodom dvokolornog bojenja pomoću aneksina-V-FITC i 7AAD bojom na protočnom citometru. Prikazana je srednja vrednost procenta apoptotičnih ćelija iz tri nezavisna eksperimenta (statistička značajnost određena pomoću t-testa: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Na isti način kao što je prethodno opisano, ispitan je uticaj jedinjenja BDR-8 (koncentracije 10 i 20 μM) i tubastatina A (20 μM) na promenu mitohondrijskog membranskog potencijala (**Slika 65**).



Slika 65. Pad mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) nakon tretiranja MDA-MB-231 (**A**) i MCF-7 (**B**) ćelija BDR-8 inhibitorom i tubastatinom A. Prikazana je srednja vrednost promene potencijala na osnovu rezultata tri ponovljena eksperimenta.

Značajan pad MMP potencijala ($\Delta\psi_m$) je određen u obe ćelijske linije tretirane 72 sata navedenim inhibitorima pri značajno nižim IC_{50} koncentracijama od koncentracija određenih u MTT testu. Jedinjenje BDR-8 značajnije redukuje vrednosti $\Delta\psi_m$ potencijala na MDA-MB-231 ćelijama, pri koncentraciji od 10 μM redukuje za 80%, odnosno za 93% je redukovan mitohondrijski potencijal u odnosu na kontrolu pri koncentraciji BDR-8 od 20 μM . Na obe ćelijske linije (MDA-MB-231 i MCF-7) dolazi do značajnijeg pada mitohondrijskog potencijala nakon tretiranja BDR-8 inhibitorom, u odnosu na tubastatin A.

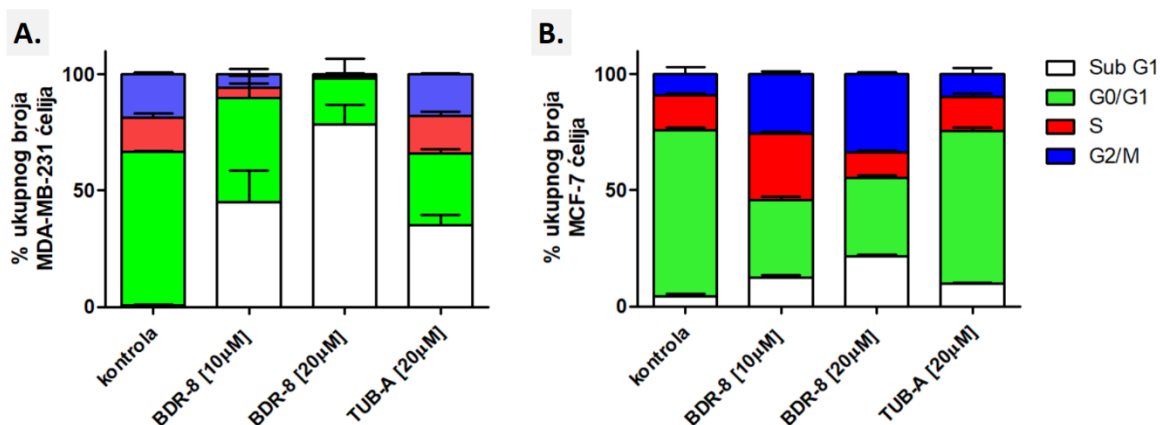
Rezime dobijenih rezultata na ćelijskim kulturama kancera dojke je sledeći:

- Među sintetisanim derivatima 1-(difenilmetil)-piperazina (BDR klasa), jedinjenja koja smanjuju preživljavanje ćelija trostruko negativnog kancera dojke (MDA-MB-231) su BDR-8, BP-8, BDR-9 i FDR-4. Vrednosti IC_{50} za sva četiri jedinjenja su iznad 50 μM , pri čemu se jedinjenje BDR-8 izdvaja kao najpotentnije. Njegova negativna kontrola (null-HDAC6 inhibitor), jedinjenje BP-8, ima slab citotoksičan efekat ($IC_{50}=89,89 \mu M$), što sugeriše da efekti jedinjenja BDR-8 na MDA-MB-231 ćelijama potiču od specifične interakcije hidroksamske kiseline sa nekim metaloenzimima, kao što su histon deacetilaze ili matriksne metaloproteaze.
- Nakon testiranja svih jedinjenja na MCF-7 ćelijama, zaključeno je da su MDA-MB-231 ćelije osetljivije na delovanje sintetisanih jedinjenja, posebno BDR klase derivata. Jedinjenje BDR-8 se takođe pokazalo kao najpotentnije citotoksično jedinjenje na MCF-7 ćelijama ($IC_{50}=51,25 \mu M$).
- Derivati 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona (FDR klasa) u okviru testiranih koncentracija pokazuju slab uticaj na preživljavanje obe linije kancerskih ćelija (efekti primećeni samo pri koncentracijama od 100 μM), zbog čega su u ovom delu istraživanja izostavljeni u daljim ispitivanjima antikancerskih osobina na modelu raka dojke.
- Detaljnim ispitivanjima uticaja sintetisanih jedinjenja na apoptotske mehanizme ćelijske smrti, kandidat BDR-8 vremenski- i koncentraciono-zavisno indukuje ranu i kasnu apoptozu MDA-MB-231 ćelija, dok selektivni HDAC6 inhibitori (BDR-6 i BDR-9) pri visokim koncentracijama (75 μM) ispoljavaju znatno slabije proapoptotske efekte nakon inkubacije od 72 sata.
- Najdramatičniji pad mitohondrijskog membranskog potencijala je primećen kod jedinjenja BDR-8 na obe ćelijske linije i to već nakon 24 sata od tretiranja ćelija, što konačno izdvaja jedinjenje BDR-8 kao najboljeg kandidata za dodatno profilisanje antikancerskih svojstava.

4.10.5. Analiza uticaja BDR-8 inhibitora na promene u distribuciji faza ćelijskog ciklusa

Pored ispitanih proapoptotskih mehanizama koji dovode do ćelijske smrti, zastoje u nekoj od faza ćelijskog ciklusa takođe predstavlja svojstvo antikancerskog hemioterapeutika. Da bi se ispitaio antiproliferativni efekat inhibitora BDR-8 (pri koncentracijama od 10 i 20 μM) nakon 72 sata, ćelije su obeležene propidijum-jodidom i na citometru je praćena distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (**Slika 66**).

Primećen je koncentraciono–zavisan uticaj jedinjenja BDR-8 na proliferaciju MCF-7 ćelija (**Slika 66B**). Inkubacija MCF-7 ćelija sa BDR-8 jedinjenjem u koncentraciji od 10 μM dovodi do zastoja ćelija u S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa i kompenzatornog smanjenja distribucije ćelija u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa. Tretiranje istih ćelija sa jedinjenjem BDR-8 u koncentraciji od 20 μM dovodi do značajnog zastoja ćelija u G2/M fazi, sa приметnim porastom frakcije apoptotičnih ćelija (procenat ćelija u sub-G1 fazi je približno 20%) uz smanjenje udela ćelija u G0/G1 i S fazama ćelijskog ciklusa.



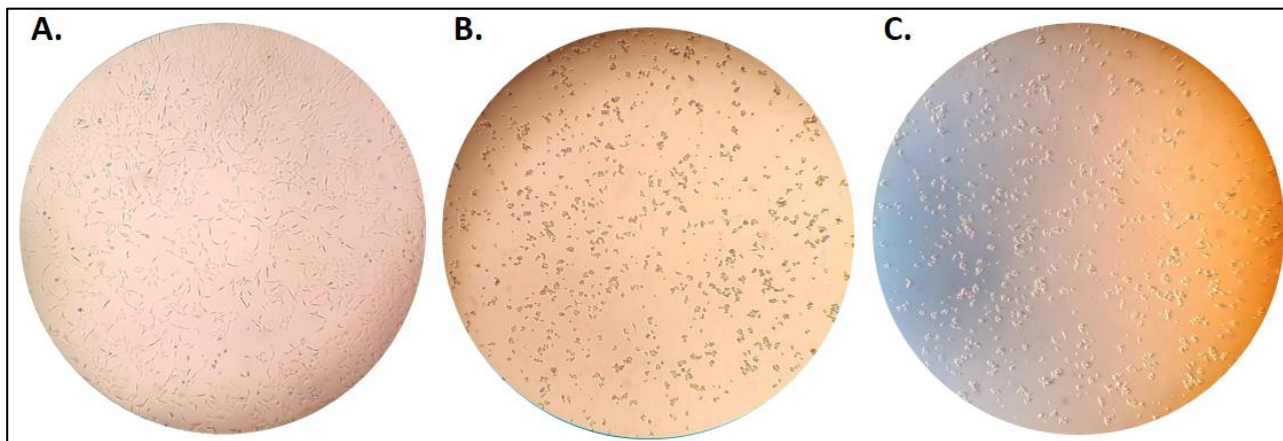
Slika 66. Prikaz promena u ćelijskom ciklusu MDA-MB-231 (A) i MCF-7 (B) ćelija nakon tretiranja BDR-8 inhibitorom (10 i 20 μM) i tubastatinom A (20 μM). Ćelije u sub-G1 frakciji su prikazane u belom stubiću, ćelije u G0/G1 fazi su prikazane u zelenom stubiću, ćelije zaustavljene u S fazi su prikazane u crvenom stubiću i ćelije zaustavljene u G2/M fazi su prikazane u plavom stubiću. Rezultati su prikazani na osnovu tri nezavisno izvedena eksperimenta.

Zbog visokog procenta MDA-MB-231 ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa (pri 10 μM iznosi 45,07% i na 20 μM udeo je 78,35%, **Slika 66A**), smatra se da proapoptotski efekti BDR-8 inhibitora pri testiranim koncentracijama značajnije doprinose ukupnom antikancerskom efektu nego zastoje ćelijskog ciklusa. Primarni antikancerski efekat jedinjenja BDR-8 je citotoksičnost na MDA-MB-231 ćelijama, za razliku od dominantnog citostatskog efekta na MCF-7 ćelijama pri istim koncentracijama.

Kao pozitivna kontrola, tubastatin A (20 μM) takođe pokazuje visok udeo ćelija u sub-G1 fazi (35% na MDA-MB-231 ćelijama) koji je praćen smanjenjem procenta zastupljenih ćelija u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa. Suprotno rezultatima na MDA-MB-231 ćelijama, tubastatin A ne dovodi do značajnih promena u fazama MCF-7 ćelijskog ciklusa pri testiranoj koncentraciji od 20 μM .

4.10.6. Fenotipske promene MDA-MB-231 ćelija nakon tretiranja BDR-8 inhibitorom

Nakon zasejavanja MDA-MB-231 ćelija na ploče sa 6 bunara i tretiranja ćelija BDR-8 inhibitorom (10 i 20 μM), već nakon 24 sata primećena je promena u morfologiji ćelija. MDA-MB-231 ćelije imaju mezenhimalni fenotip (**Slika 67A**), odnosno pod mikroskopom se uočavaju ćelije zvezdaste, vretenaste morfologije. Tretiranjem ćelija BDR-8 jedinjenjem (10 μM – **Slika 67B**, 20 μM – **Slika 67C**), već nakon 24 sata je primećena morfološka promena ćelija, kao i odvajanje ćelija sa površine bunara (promene koje su karakteristične za proces apoptoze, ćelije su se zaokruglile i odvojile od podloge bunara). Uočene promene pod mikroskopom su zabeležene fotografski (**Slika 67**).



Slika 67. Mikroskopski izgled MDA-MB-231 ćelija bez tretmana (**A**), nakon 24 časa od dodatka 10 μM BDR-8 inhibitora (**B**) i nakon 24 časa od dodatka 20 μM BDR-8 inhibitora (**C**).

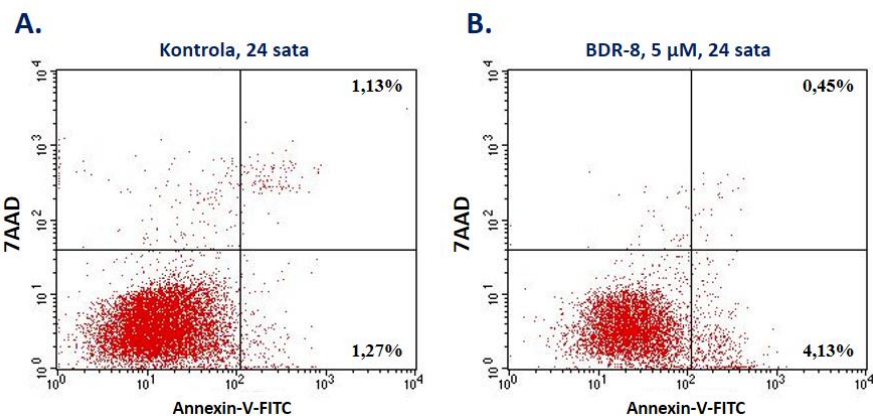
Uzimajući u obzir izmenjenu morfologiju ćelija pod mikroskopom (posebno u bazenu gde su ćelije inkubirane sa 10 μM BDR-8 inhibitora), kao i odvajanje ćelija sa dna bazena (potencijalno sugerise na izmenu adherentnosti ćelija), u ovoj fazi istraživanja je posumnjano da BDR-8 inhibitor interferira sa *in vitro* migratornim i invazivnim osobinama agresivnih MDA-MB-231 ćelija kancera dojke. Aktivacija migracije i invazije, kao jedan od važnih molekularnih obeležja maligne izmene ćelija³⁰⁵, predstavlja još jednu prepreku u lečenju metastatskog oblika bolesti.

Još uvek ne postoji izolovana, posebno definisana farmakoterapijska grupa lekova sa primarno antimigratornim i/ili antiinvazivnim osobinama, koji bi se koristili u težim stadijumima maligne bolesti. Neki konvencionalni hemioterapeutici se koriste kod dokazanog metastatskog kancera dojke (primer su derivati taksana³⁰⁶), jer deluju kao inhibitori depolimerizacije mikrotubula. Svakako da taksani deluju i na druga molekularna obeležja kancerske ćelije (apoptozu i zastoju u ćelijskom ciklusu) koja su zavisna od primenjene doze.

Da bi se ispitala antimigratorna i antiinvazivna svojstva BDR-8 inhibitora, prvi problem koji je trebalo da se reši je značajna indukcija rane i kasne apoptoze MDA-MB-231 ćelija pri koncentracijama BDR-8 od 10 i 20 μM (**Slika 63**). Određivanje koncentracije BDR-8 jedinjenja gde se ne dešava značajna apoptoza (takozvana **subapoptotska koncentracija**) je bio primarni cilj pre ispitivanja promena u migraciji i invaziji MDA-MB-231 ćelija.

Inkubacijom MDA-MB-231 ćelija 24 časa sa BDR-8 inhibitorom (5 μM) u manjoj koncentraciji nego što su prethodno korišćene, određena je subapoptotska koncentracija za testove

ispitivanja migracije i invazije u 2D kulturama. Udeo ćelija u ranoj apoptozi nakon inkubacije sa 5 μ M BDR-8 jedinjenja je 4,13 %, dok je detektovano 0,45% kasnoapoptotičnih ćelija (**Slika 68B**). Poređenjem rezultata sa kontrolom (**Slika 68A**), zaključeno je da 5 μ M BDR-8 inhibitora ne indukuje apoptozu značajnije (< 5%) nego što se ona spontano dešava u kontrolnom bazenu.

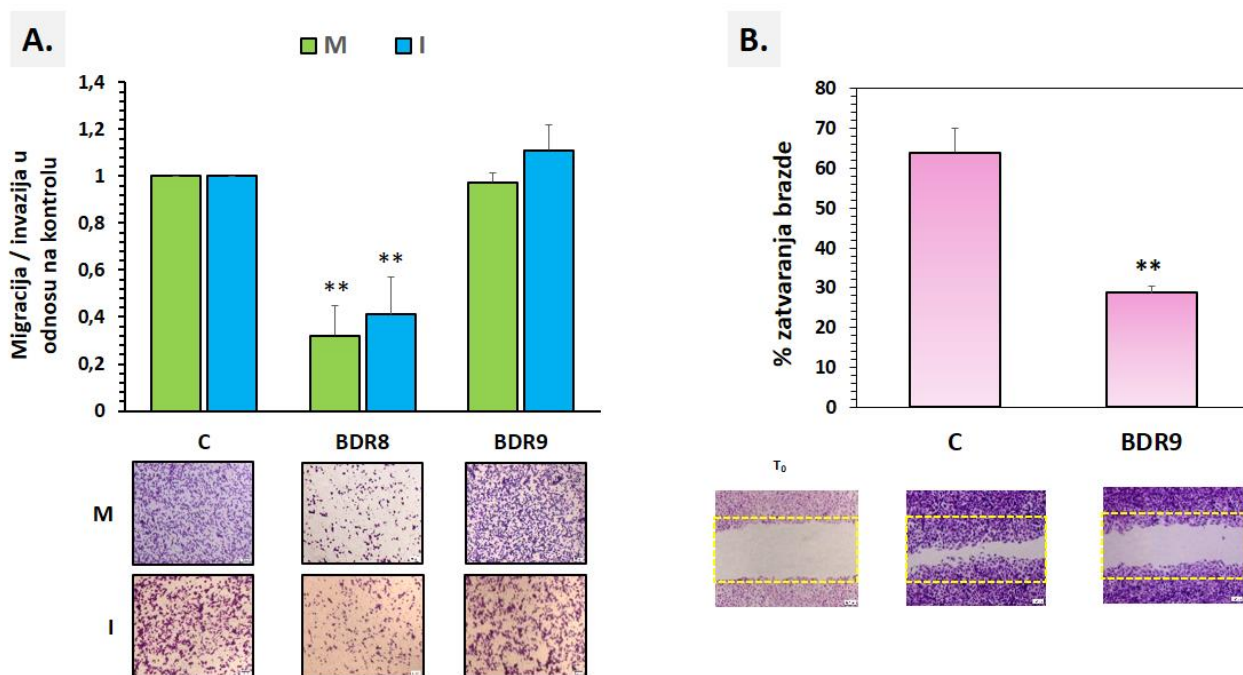


Slika 68. Analiza bojenja MDA-MB-231 ćelija protočnom citometrijom u testu dvokolornog bojenja pomoću aneksina-V-FITC i 7AAD bojom: **A.** Kontrolna grupa, **B.** Tretman ćelija BDR-8 jedinjenjem (5 μ M) nakon 24 sata.

4.10.7. Uticaj novosintetisanih jedinjenja na procese migracije i invazije ćelija kancera dojke

Trostruko negativne ćelije kancera dojke, MDA-MB-231 (negativno prisustvo estrogenih, progesteronskih receptora i HER2 proteina, TNBC) predstavljaju agresivne i veoma invazivne maligne ćelije dojke. Ove ćelije se koriste i u eksperimentalnim modelima za ispitivanja novih inhibitora koji interferiraju sa migratornim i invazivnim osobinama TNBC ćelija.

U ovom delu istraživanja korišćena su tri *in vitro* testa (opisana u potpoglavljima 1.7.6. i 1.7.7). Za ispitivanje antimigratornih osobina korišćen je test migracije ćelija kroz polikarbonatnu membranu (eng. *transwell migration assay*, **Slika 69A**) čije su pore promera 8 μm . Antiinvazivna svojstva sintetisanih inhibitora su ispitana u testu gde je polikarbonatna membrana obložena Matrigelom (eng. *Matrigel invasion assay*, **Slika 69A**). Ćelije kancera dojke MDA-MB-231 su tretirane BDR-8 inhibitorom (u subapoptotskoj dozi od 5 μM) i BDR-9 inhibitorom (u koncentraciji 10 μM) u trajanju od 24 sata. Zbog prethodno opisanih osobina ovih jedinjenja, BDR-8 je izabran zbog uočene izmene morfologije MDA-MB-231 ćelija nakon tretmana u testovima za ispitivanje apoptoze i ćelijskog ciklusa. Selektivni HDAC6 inhibitor (BDR-9) je odabran zbog poznatih literaturnih svojstava HDAC6 inhibitora na dinamiku mikrotubula i uticaja na remodelovanje citoskeleta²⁰¹.



Slika 69. Uticaj BDR-8 i BDR-9 inhibitora na migraciju i invaziju MDA-MB-231 ćelija ispitivanih u *transwell migration* i *Matrigel invasion testovima* (A) i uticaj BDR-9 inhibitora na migraciju MCF-7 ćelija u *wound healing* testu (B) Ćelije na dnu membrane su nakon izvođenja testa obojene kristal violetom. Rezultati su prikazani na osnovu tri nezavisno izvedena eksperimenta; statistička značajnost između tretmana je određena t-testom (** $p < 0,01$). *M* – oznaka za test ispitivanja migracije, *I* – oznaka za test ispitivanja invazije, T_0 – prikaz brazde (eng. *scratch*) neposredno nakon povlačenja pipete kroz monosloj MCF-7 ćelija.

Kako je prikazano na **Slici 69A**, jedinjenje BDR-8 u koncentraciji od 5 μM pokazuje značajne antimigratorne i antiinvazivne osobine na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji kancera dojke. Migratorna svojstva agresivnog oblika kancera dojke su delovanjem jedinjenja BDR-8 redukovana za 68% u odnosu na kontrolu, dok je invazivnost MDA-MB-231 ćelija smanjena za 59% u odnosu na kontrolne ćelije. Nasuprot očekivanjima i literaturnim podacima, selektivni inhibitor BDR-9 ne pokazuje antimigratorna i antiinvazivna svojstva na MDA-MB-231 ćelijama pri testiranoj koncentraciji od 10 μM .

Iako je u literaturi snažno podržan koncept selektivne inhibicije HDAC6 izoforme, u ovoj doktorskoj disertaciji je prvi put upoređen antimigratorni i antiinvazivni efekat HDAC6 inhibitora sa niskim selektivnim profilom ka HDAC6 izoformi (jedinjenje BDR-8) u odnosu na na „čisti“ selektivni HDAC6 inhibitor, jedinjenje BDR-9. Uzimajući u obzir da tumor predstavlja heterogenu populaciju ćelija³⁰⁷, kao i da je ekspresija estrogenih receptora u MCF-7 ćelijama povezana sa povećanom ekspresijom HDAC6 izoforme i migrabilnim svojstvima ćelija²⁰⁵, jedinjenje BDR-9 je testirano u *wound healing* testu. Koncentracija jedinjenja je bila 10 μM i trajanje testa je bilo 24 sata.

Na osnovu prikazanih rezultata (**Slika 69B**), primećuje se redukcija dijametra brazde u kontrolnom bazenu (63,9%) u odnosu na početni dijametar (T_0) brazde u monosloju. Nakon inkubacije ćelija sa BDR-9 inhibitorom, redukcija dijametra brazde je bila 28,7% u odnosu na početni (T_0) dijametar brazde. Na osnovu rezultata *scratch* testa, zaključuje se da selektivni HDAC6 inhibitor BDR-9 ostvaruje antimigratorni efekat na ER+ ćelijama kancera dojke, dok se pri testiranoj koncentraciji od 10 μM ne uočavaju antimigratorni ni antiinvazivni efekti na trostruko negativnim ćelijama kancera dojke.

Da bi se potpuno rasvetlila uloga selektivne inhibicije histon deacetilaze 6 na modelu kancera dojke, neophodno je u budućim istraživanjima ispitati povezanost antikancerskog i antimetastatskog efekta jedinjenja koja selektivno inhibiraju HDAC6 izoformu u odnosu na neselektivne HDAC inhibitore sa sličnom hemijskom strukturom. Zaključci takve studije bi mogli da objasne činjenicu da je trenutno više selektivnih HDAC6 inhibitora sa alifatičnim linkerima u kliničkim studijama u odnosu na HDAC6 inhibitore koji sadrže fenilhidroksamske kiseline u strukturi.

5. ZAKLJUČAK

U okviru doktorske disertacije *Racionalni dizajn, sinteza i in vitro ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6* prikazane su tri koordinisane studije: *in silico* racionalni dizajn selektivnih HDAC6 inhibitora, sinteza *in silico* dizajniranih inhibitora, kao i *in vitro* (enzimska i ćelijska) biološka ispitivanja novodizajniranih jedinjenja.

Inovativnost doktorske disertacije se može sumirati kroz sledeće činjenice:

- Prvi put su pripremljeni komparativni modeli kvantitativnih odnosa trodimenzionalne strukture i aktivnosti (3D-QSAR) za dve izoforme histon deacetilaza (HDAC1 i HDAC6). Skup jedinjenja korišćen za pripremu oba modela sadrži preko 80% zajedničkih inhibitora, zbog čega je bilo neophodno pripremiti bioaktivne konformacije inhibitora u studiji molekuskog dokinga na obe izoforme. Izdvajanjem konformacija inhibitora nakon molekuskog dokinga umesto geometrijskih optimizacija inhibitora, preciznije je definisan hemijski prostor inhibicije HDAC1, odnosno HDAC6 enzima.
- Dizajniranje jedinjenja za sinteze, kao potencijalnih HDAC6 inhibitora, je zasnovano na pretrazi novih heterocikličnih fragmenata čije su osobine definisane najznačajnijim GRIND deskriptorima interpretiranim na osnovu 3D-QSAR modela.
- Sintetisani derivati 1-(difenilmetil)-piperazina (BDR) i 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona (FDR) nisu do sada poznati u naučnoj literaturi i sadrže nove hemijske skelete u okviru hemijskog prostora selektivnih HDAC6 inhibitora.
- U doktorskoj disertaciji su sintetisana dva selektivna BDR derivata (BDR-6 i BDR-9) sa nanomolarnom aktivnosti i jedan dualni HDAC6/8 inhibitor iz klase FDR (FDR-2) sa nanomolarnom aktivnosti.
- Novosintetisano jedinjenje, BDR-8, je neselektivni HDAC inhibitor koji inhibira četiri izoforme (HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8) u nanomolarnim koncentracijama. Na osnovu ispitivanja uticaja BDR-8 jedinjenja na indukciju apoptoze, promenu mitohondrijskog membranskog potencijala, zastoja u ćelijskom ciklusu, kao i na procese migracije i invazije ćelija kancera dojke, izdvojen je BDR-8 inhibitor kao obećavajući antikancerski hemioterapeutik. Poređenjem efekata BDR-8 inhibitora sa efektima dva nova, selektivna HDAC6 inhibitora (BDR-6 i BDR-9), zaključeno je da BDR-8 ima najpotentniji antikancerski i antimetastatski profil.

Integrativnom analizom rezultata doktorske disertacije *Racionalni dizajn, sinteza i in vitro ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6* mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Pripremljen je pouzdan i validan 3D-QSAR model koji opisuje HDAC1 inhibitornu aktivnost. Model ima dobra prediktivna svojstva, što je okarakterisano statističkim parametrima interne validacije ($R^2 = 0,9$, $Q^2 = 0,61$, $RMSEE = 0,302$), kao i eksterne validacije ($R^2_{pred} = 0,744$, parametri r^2 metrike – r^2_m , r^2/m , r^2_m koji su veći od 0,5 i čija je greška predviđanja $RMSEP = 0,276$). Pripremljen je pouzdan i validan 3D-QSAR model koji opisuje HDAC6 inhibitornu aktivnost. Model koji opisuje HDAC6 inhibitornu aktivnost takođe zadovoljava kriterijume interne ($R^2 = 0,91$, $Q^2 = 0,75$, $RMSEE = 0,261$) i eksterne validacije ($R^2_{pred} = 0,859$, parametri r^2 metrike – r^2_m , r^2/m , r^2_m koji su veći od 0,5 i čija je greška predviđanja $RMSEP = 0,341$).
- Analizom i poređenjem najznačajnijih GRIND nezavisnih promenljivih u oba 3D-QSAR modela, došlo se do zaključka da su promenljive iz grupe DRY-TIP, TIP-TIP i DRY-O najinformativnije za postavljanje hipoteza za dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora. Na osnovu najuticajnijih promenljivih iz HDAC6 3D-QSAR modela, kao što su DRY-TIP (var440) i DRY-O (var303) zaključeno je da hidrofobnost CAP grupe doprinosi povećanju selektivnosti inhibitora ka HDAC6 izoformi, odnosno predviđeno je smanjenje potentnosti na HDAC1 izoformi u poređenju sa model molekulom

skriptaidom. Promenljive iz kategorije TIP-TIP (var234 i var246) u HDAC6 3D-QSAR modelu, kao i TIP-TIP (var 275) u HDAC1 3D-QSAR modelu su ukazale na značaj voluminoznosti CAP grupe HDAC inhibitora, tako da se strategijom povećanja molekulske zapremine CAP grupe potencira selektivnost ka HDAC6 izoformi, odnosno smanjuje afinitet dizajniranog jedinjenja ka nuklearnoj HDAC1 izoformi. Dužina ugljovodoničnog linkera je definisana DRY-0 promenljivom (var303) koja pozitivno doprinosi inhibitornoj aktivnosti jedinjenja na HDAC6 enzimu. Na osnovu toga je predviđeno da će duži alifatični linkeri (od 6 – 8 ugljenikovih atoma) u strukturi HDAC inhibitora doprineti selektivnosti ka HDAC6 izoformi u odnosu na HDAC1 izoenzim.

- Dizajniranje novih, potencijalno selektivnih HDAC6 inhibitora zasnovano je na zaključcima komparativne 3D-QSAR studije i korišćenju *in silico* fragmentnih baza *General Fragment Library* i *Epigenetic Targeted Library*, kompanije *Life Chemicals*. Pretragom novih CAP grupa (na osnovu deskriptora McGowan zapremine – V_x , *Moriguchi* particionog koeficijenta oktanol-voda – $MLogP$ i ukupne površine fragmenta izračunate iz *van der Waals*-ovih prečnika – S_{atot}) i zamenom sa 1,8-naftalimidnom CAP grupom model jedinjenja skriptaida odabrano je 9 najinteresantnijih fragmenata. Konačni izbor fragmenata za sinteze je zasnovan i na proceni odnosa troškova za nabavku ili sintezu fragmenta i dostupne polazne mase fragmenta. Odabrana su dva fragmenta – 1-(difenilmetil)-piperazin (sinonim 1-benzhidrilni piperazin) i 5,5-difenilimidazolidin-2,4-dion (koji je ujedno i lek fenitoin, antiepileptik i antiaritmik).
- Pored strategije zamene CAP grupe, za dizajniranje i sintezu selektivnih HDAC6 inhibitora predloženi su derivati hidroksamskih kiselina različite dužine linkera ($n=1 - 7$), kao i derivati fenilhidroksamskih kiselina. Predviđene su pK_i vrednosti za dizajnirana jedinjenja na oba 3D-QSAR modela i vizuelizovane su vezivne konformacije svih 11 predloženih jedinjenja. Već na osnovu *in silico* predviđanja pomoću 3D-QSAR modela i virtuelnog dokinga, pretpostavilo se da će jedinjenja sa dužim ugljovodoničnim linkerom (od 5 do 7 ugljenikovih atoma), kao i sa aromatičnim linkerom da inhibiraju HDAC6 izoformu potentnije od HDAC1 izoforme. Među derivatima 1-(difenilmetil)-piperazina koji imaju alifatični linker u strukturi, optimalan broj C atoma je 5 (jedinjenje BDR-6) za selektivnu inhibiciju HDAC6 izoforme. Povećanjem broja C atoma u strukturi linkera kod BDR derivata, zadržava se selektivna nanomolarna HDAC6 inhibitorna aktivnost, ali uz značajno smanjenje indeksa selektivnosti ka ostalim HDAC izoformama. Kod FDR derivata, najbolji profil selektivnosti ima fenilhidroksamski derivat FDR-2. Ujedno, na osnovu izračunatih enzimskih IC_{50} vrednosti na sve četiri izoforme i indeksa selektivnosti, čini se da je isti broj C atoma ($n=5$) optimalan za selektivnu HDAC6 inhibiciju. Ovakav zaključak bi trebalo da bude upotpunjen sintezom FDR analoga sa 4 i 6 C atoma u linkeru, kako bi se generisali jasniji odnosi strukture i selektivne HDAC6 inhibicije FDR klase inhibitora.
- Kombinovanjem *in silico* tehnika: virtuelnog skrininga zasnovanog na trodimenzionalnoj strukturi ciljnog mesta (HDAC6 enzima), molekuskog dokinga i molekulske dinamike identifikovana je nova nehidroksamska cink-vezivna grupa, 2-aminometil-benzimidazol, koja može da doprinese razvoju selektivnih HDAC6 inhibitora. Na osnovu predviđanja u molekuskom dokingu, smatra se da će nova cink-vezivna grupa bidentatno da koordinira jon Zn^{2+} u katalitičkom džepu HDAC6 izoforme. Pošto fenil grupa benzimidazola ostvaruje $\pi-\pi$ interakcije sa bočnim ostacima fenilalanina (F583 i F643) na isti način kao linker derivata fenilhidroksamskih kiselina, smatra se da 2-aminometil-benzimidazol predstavlja

hibridni fragment koji sadrži aromatični linker i cink-vezivnu grupu neophodne za selektivnu HDAC6 inhibiciju. Pretragom u literaturi, jedinjenja sa 2-aminometilbenzimidazolom kao HDAC inhibitori, još uvek nisu sintetisana niti testirana.

- Uspešno je sintetisano svih 11 predloženih derivata na maloj sintetskoj skali (od polaznog materijala prosečne mase 100 mg), u zadovoljavajućim prinosima u opsegu od 17,86% do 64,03%. Jedinjenja BDR klase su sintetisana u dva sintetska koraka, dok su jedinjenja FDR klase sintetisana u 5 sintetskih faza. Jedinjenja su uspešno okarakterisana pomoću NMR spektroskopije (^1H NMR i ^{13}C NMR eksperimenti), kao i pomoću masene analize visoke rezolucije (LC/ESI ToF masena spektrometrija).
- Na osnovu *in vitro* rezultata bioluminogenih testova za određivanje inhibitorne koncentracije (IC_{50}) sintetisanih jedinjenja na četiri izoforme (HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8), dobijeno je 7 HDAC inhibitora sa nanomolarnim aktivnostima od ukupno 11 derivata hidroksamskih kiselina sintetisanih u ovoj doktorskoj disertaciji (uspešnost, odnosno *hit rate* pri dobijanju HDAC6 inhibitora je 64%). Detaljnom analizom enzimskih profila selektivnosti, izdvojena su jedinjenja BDR-6, BDR-9 i FDR-2 kao visoko selektivna jedinjenja (indeksi selektivnosti HDAC1/6 su redom 25,4; 47,5 i 73) u odnosu na indeks selektivnosti skriptaida HDAC1/HDAC6=6,5. Na osnovu ovog rezultata, može se zaključiti da je *in silico* projekat dizajniranja selektivnih HDAC6 inhibitora racionalno i uspešno doprineo otkriću novih, potentnih i selektivnijih HDAC6 inhibitora, polazeći od model jedinjenja skriptaida.
- Primarnim skriningom citotoksičnosti sintetisanih jedinjenja na dve ćelijske linije (trostruko negativne ćelije kancera dojke MDA-MB-231 i ER+ ćelije kancera dojke MCF-7) izdvojena su jedinjenja BDR-6, BDR-8, BP-8, BDR-9 i FDR-4 kao jedinjenja koja su umereno citotoksična u MTT testu. Ostala sintetisana jedinjenja (BDR-2, BDR-3, BDR-4 i BDR-5, FDR-2 i FDR-3) ne indukuju citotoksičnost na ispitivanim ćelijama kancera dojke. S obzirom da FDR-2 i FDR-3 derivati, za razliku od BDR-2, BDR-3, BDR-4 i BDR-5 derivata inhibiraju HDAC6 izoformu, neophodno je u budućim studijama ispitati njihove efekte na drugim kancerskim ćelijama gde je dokazana prekomerna ekspresija HDAC6 izoforme.
- Analizom uticaja dva selektivna HDAC6 inhibitora (BDR-6 i BDR-9), kao i HDAC6 inhibitora sa najnižim indeksima selektivnosti (BDR-8) na indukciju apoptoze na ispitivanim ćelijama, zaključeno je da inhibitor BDR-8 (pri koncentracijama 10 i 20 μM) koncentraciono i vremenski zavisno indukuje ranu apoptozu, u obe ćelijske linije (preko 50% u MDA-MB-231 ćelijama i preko 30% u MCF-7 ćelijama nakon 72 sata). U skladu sa literaturnim podacima i citoplazmatskim proteinskim supstratima HDAC6 enzima u ćelijama, nije primećena značajna indukcija apoptoze kod selektivnih HDAC6 inhibitora (BDR-6 i BDR-9) u prvih 72 sata od tretiranja ćelija.
- Najverovatniji mehanizam pokretanja apoptotske kaskade u obe ćelijske kulture kancera dojke jeste unutrašnji put apoptoze (promenom mitohondrijskog membranskog potencijala, $\Delta\Psi_m$). Najdramatičniji pad mitohondrijskog membranskog potencijala je primećen nakon tretiranja obe ćelijske kulture kancera dojke sa BDR-8 inhibitorom. Pad potencijala je zavisn i od koncentracije i vremena inkubacije jedinjenja sa MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama.
- Zastoj u ćelijskom ciklusu je dodatno rasvetlio antikancerski efekat ispitivanih supstanci. Pri testiranim koncentracijama jedinjenja BDR-8 (10 i 20 μM) na MDA-MB-

231 ćelijama prisutna je u visokom procentu frakcija ćelija u sub-G1 fazi, što sugeriše na prisustvo apoptotičnih ćelija u kulturi. Tubastatin A, kao pozitivna kontrola takođe uvodi ćelije u sub-G1 fazu pri 20 μ M, dok ne utiče na faze ćelijskog ciklusa MCF-7 ćelija u istoj koncentraciji. Na MCF-7 ćelijama pri istim koncentracijama BDR-8 jedinjenja najprominentniji je zastoj u S i G2/M fazama ciklusa, uz koncentraciono zavisni porast nakupljanja MCF-7 ćelija u G2/M fazi.

- Zbog primećene promene morfologije MDA-MB-231 ćelija nakon tretmana BDR-8 jedinjenjem, posumnjano je da BDR-8 jedinjenje može da remeti migratorne i invazivne osobine ispitivanih ćelija kancera dojke. Određena je subapoptotska koncentracija jedinjenja (koncentracija koja je značajno ispod IC_{50} vrednosti u MTT testu i pri kojoj ne dolazi do značajne indukcije apoptoze) i korišćena u dvodimenzionalnim testovima ispitivanja migracije i invazije.
- Jedinjenje BDR-8 je pored proapoptotskih osobina i efekata na zastoj u ćelijskom ciklusu pokazalo i dobar antimigratorni i antiinvazivni efekat na MDA-MB-231 ćelijama (u testovima *transwell migration* i *matrigel invasion*), dok selektivni HDAC6 inhibitor na istoj liniji ćelija, BDR-9 ne menja ispitivana svojstva. Pregledom literature, utvrđeno je da su ER+ ćelije kancera dojke, u kojima je povećana ekspresija HDAC6 enzima, osetljive na selektivnu HDAC6 inhibiciju. U migracionom testu (eng. *wound healing*) na MCF-7 ćelijama je dokazan značajan antimigratorni potencijal BDR-9 inhibitora, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o efektima selektivne inhibicije HDAC6 izoforme.
- U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da je malim perturbacijama u hemijskoj strukturi dizajniranih jedinjenja moguće dobiti analoge sa različitim profilima inhibicije humanih histon deacetilaza. Značaj testiranja ovakve grupe analoga pruža mogućnost identifikacije i upoređivanja pojedinačnih uloga histon deacetilaza u patogenezi kancerskih oboljenja. Na osnovu svih prikazanih rezultata, pretpostavlja se da je superiorniji *in vitro* antikancerski i antimetastatski profil BDR-8 jedinjenja u odnosu na BDR-9 inhibitor na ispitivanim ćelijama kancera dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) u vezi sa njegovom neselektivnom HDAC inhibicijom. Poznato je da je ekspresija HDAC1, HDAC6 i HDAC8 u MDA-MB-231 ćelijama u snažnoj korelaciji sa invazivnim osobinama MDA-MB-231 ćelija. Da bi se dodatno potvrdili identifikovani antikancerski efekti nosivih jedinjenja u doktorskoj disertaciji, neophodno je buduća istraživanja sprovesti na životinjskim (*in vivo*) modelima maligne bolesti.

6. LITERATURA

- (1) Macarron, R.; Banks, M. N.; Bojanic, D.; Burns, D. J.; Cirovic, D. A.; Garyantes, T.; Green, D. V. S.; Hertzberg, R. P.; Janzen, W. P.; Paslay, J. W.; Schopfer, U.; Sittampalam, G. S. Impact of High-Throughput Screening in Biomedical Research. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (3), 188–195. <https://doi.org/10.1038/nrd3368>.
- (2) Blundell, T. L.; Patel, S. High-Throughput X-Ray Crystallography for Drug Discovery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, *4* (5), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.04.007>.
- (3) Reiss, T. Drug Discovery of the Future: The Implications of the Human Genome Project. *Trends Biotechnol.* **2001**, *19* (12), 496–499. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01811-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01811-X).
- (4) Törnell, J.; Snaith, M. Transgenic Systems in Drug Discovery: From Target Identification to Humanized Mice. *Drug Discov. Today* **2002**, *7* (8), 461–470. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02234-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02234-1).
- (5) Fellmann, C.; Gowen, B. G.; Lin, P.-C.; Doudna, J. A.; Corn, J. E. Cornerstones of CRISPR–Cas in Drug Discovery and Therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (2), 89–100. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.238>.
- (6) Avidor, Y.; Mabjeesh, N. J.; Matzkin, H. Biotechnology and Drug Discovery: From Bench to Bedside. *South. Med. J.* **2003**, *96* (12), 1174–1186. <https://doi.org/10.1097/01.SMJ.0000066654.35645.F7>.
- (7) Eichler, H.-G.; Abadie, E.; Baker, M.; Rasi, G. Fifty Years after Thalidomide; What Role for Drug Regulators? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *74* (5), 731–733. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04255.x>.
- (8) Scannell, J. W.; Blanckley, A.; Boldon, H.; Warrington, B. Diagnosing the Decline in Pharmaceutical R&D Efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (3), 191–200. <https://doi.org/10.1038/nrd3681>.
- (9) Cook, D.; Brown, D.; Alexander, R.; March, R.; Morgan, P.; Satterthwaite, G.; Pangalos, M. N. Lessons Learned from the Fate of AstraZeneca’s Drug Pipeline: A Five-Dimensional Framework. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (6), 419–431. <https://doi.org/10.1038/nrd4309>.
- (10) Carugo, A.; Draetta, G. F. Academic Discovery of Anticancer Drugs: Historic and Future Perspectives. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2019**, *3* (1), 385–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030518-055645>.
- (11) Jorgensen, W. L. Challenges for Academic Drug Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (47), 11680–11684. <https://doi.org/10.1002/anie.201204625>.
- (12) Cancer Research UK Cancer Therapeutics Unit - The Institute of Cancer Research, London <https://www.icr.ac.uk/our-research/centres-and-collaborations/centres-at-the-icr/cancer-research-uk-cancer-therapeutics-unit> (accessed 2020 -09 -09).
- (13) Home | Drug Discovery Unit <http://www.drugdiscovery.dundee.ac.uk/home> (accessed 2020 -09 -09).
- (14) NPSC | National Phenotypic Screening Centre <https://npsc.ac.uk/> (accessed 2020 -09 -09).
- (15) European Screening Centre | European Lead Factory <https://www.europeanleadfactory.eu/about/assets/european-screening-centre> (accessed 2020 -09 -09).
- (16) Dana-Farber Cancer Institute - Cancer Treatment and Research in Boston, MA <https://www.dana-farber.org/> (accessed 2021 -12 -23).
- (17) Screening Libraries (All Libraries) – Asinex.Com.
- (18) Best of Chemicals Supplier - BOC Sciences <https://www.bocsci.com/> (accessed 2020 -09 -15).
- (19) ChemBridge | Screening Libraries https://www.chembridge.com/screening_libraries/ (accessed 2020 -09 -15).
- (20) Home - Enamine <https://enamine.net/> (accessed 2020 -09 -15).

- (21) OTAVACHemicals, Ltd - synthetic organic compounds for research and drug discovery <https://otavachemicals.com/home> (accessed 2020 -09 -15).
- (22) Selleckchem.com - Bioactive Compounds Expert (Bioactive Compounds,Compound Libraries) <https://www.selleckchem.com/> (accessed 2020 -09 -15).
- (23) Specs - Compound Management services and Research Compounds for the Life Science industry <https://www.specs.net/index.php#aboutsspecs> (accessed 2020 -09 -15).
- (24) Hughes, J.; Rees, S.; Kalindjian, S.; Philpott, K. Principles of Early Drug Discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162* (6), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.
- (25) An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies | Nature Reviews Drug Discovery <https://www.nature.com/articles/nrd4609> (accessed 2020 -10 -08).
- (26) Rao, M. S.; Gupta, R.; Liguori, M. J.; Hu, M.; Huang, X.; Mantena, S. R.; Mittelstadt, S. W.; Blomme, E. A. G.; Van Vleet, T. R. Novel Computational Approach to Predict Off-Target Interactions for Small Molecules. *Front. Big Data* **2019**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fdata.2019.00025>.
- (27) Alteri, E.; Guizzaro, L. Be Open about Drug Failures to Speed up Research. *Nature* **2018**, *563* (7731), 317–319. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07352-7>.
- (28) Belleau, B. Rational Drug Design: Mirage or Miracle? *Can. Med. Assoc. J.* **1970**, *103* (8), 850–853.
- (29) Martin, Y. C. [29] Computer-Assisted Rational Drug Design. In *Methods in Enzymology; Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs*; Academic Press, 1991; Vol. 203, pp 587–613. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)03031-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)03031-B).
- (30) Bacilieri, M.; Moro, S. Ligand-Based Drug Design Methodologies in Drug Discovery Process: An Overview. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2006**, *3* (3), 155–165. <https://doi.org/10.2174/157016306780136781>.
- (31) Biophysical Methods in Drug Discovery from Small Molecule to Pharmaceutical | SpringerLink https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-398-5_12 (accessed 2020 -12 -01).
- (32) Eckert, H.; Bajorath, J. Molecular Similarity Analysis in Virtual Screening: Foundations, Limitations and Novel Approaches. *Drug Discov. Today* **2007**, *12* (5), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.01.011>.
- (33) Kristensen, T. G.; Nielsen, J.; Pedersen, C. N. S. METHODS FOR SIMILARITY-BASED VIRTUAL SCREENING. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**, *5* (6), e201302009. <https://doi.org/10.5936/csbj.201302009>.
- (34) Hessler, G.; Baringhaus, K.-H. The Scaffold Hopping Potential of Pharmacophores. *Drug Discov. Today Technol.* **2010**, *7* (4), e263–e269. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2010.09.001>.
- (35) Perkins, R.; Fang, H.; Tong, W.; Welsh, W. J. Quantitative Structure-Activity Relationship Methods: Perspectives on Drug Discovery and Toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22* (8), 1666–1679. <https://doi.org/10.1897/01-171>.
- (36) Brown, A. C.; Fraser, T. R. On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action; with Special Reference to the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases Derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia. *J. Anat. Physiol.* **1868**, *2* (2), 224–242.
- (37) Danishuddin; Khan, A. U. Descriptors and Their Selection Methods in QSAR Analysis: Paradigm for Drug Design. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (8), 1291–1302. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.013>.
- (38) Guha, R.; Willighagen, E. A Survey of Quantitative Descriptions of Molecular Structure. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (18), 1946–1956.

- (39) Kuz'min, V. E.; Artemenko, A. G.; Polischuk, P. G.; Muratov, E. N.; Hromov, A. I.; Liahovski, A. V.; Andronati, S. A.; Makan, S. Yu. Hierarchic System of QSAR Models (1D–4D) on the Base of Simplex Representation of Molecular Structure. *J. Mol. Model.* **2005**, *11* (6), 457–467. <https://doi.org/10.1007/s00894-005-0237-x>.
- (40) Rouvray, D. H. The Modeling of Chemical Phenomena Using Topological Indices. *J. Comput. Chem.* **1987**, *8* (4), 470–480. <https://doi.org/10.1002/jcc.540080427>.
- (41) Prasanna, S.; Doerksen, R. J. Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in 2D-QSAR. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (1), 21–41. <https://doi.org/10.2174/092986709787002817>.
- (42) Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of Molecular Descriptors*; John Wiley & Sons, 2008.
- (43) Electronic descriptors in quantitative structure—activity relationships - ScienceDirect <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169743987800394> (accessed 2021 -01 -07).
- (44) Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies | Chemical Reviews <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr950202r> (accessed 2021 -01 -07).
- (45) Raevsky, O. A. Physicochemical Descriptors in Property-Based Drug Design. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4* (10), 1041–1052. <https://doi.org/10.2174/1389557043402964>.
- (46) Ghose, A. K.; Crippen, G. M. Atomic Physicochemical Parameters for Three-Dimensional-Structure-Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 2. Modeling Dispersive and Hydrophobic Interactions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1987**, *27* (1), 21–35. <https://doi.org/10.1021/ci00053a005>.
- (47) Panchagnula, R.; Thomas, N. S. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics in Drug Research. *Int. J. Pharm.* **2000**, *201* (2), 131–150. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00344-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00344-6).
- (48) Lipinski, C. A. Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44* (1), 235–249. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00107-6).
- (49) Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N. Chapter 8 - Introduction to 3D-QSAR. In *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*; Roy, K., Kar, S., Das, R. N., Eds.; Academic Press: Boston, 2015; pp 291–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801505-6.00008-9>.
- (50) Raghuvir, R. S. P.; Mushtaque, S. S.; Radhakrishnan, P. I.; Evans, C. C. Molecular Mechanics Force Fields and Their Applications in Drug Design. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2009**, *8* (2), 128–150.
- (51) Santos, C. B. R.; Lobato, C. C.; Braga, F. S.; Morais, S. S. S.; Santos, C. F.; Fernandes, C. P.; Brasil, D. S. B.; Hage-Melim, L. I. S.; Macêdo, W. J. C.; Carvalho, J. C. T. Application of Hartree-Fock Method for Modeling of Bioactive Molecules Using SAR and QSPR. *Comput. Mol. Biosci.* **2014**, *4* (1), 1–24. <https://doi.org/10.4236/cmb.2014.41001>.
- (52) Molecular interaction fields in drug discovery: recent advances and future perspectives - Artese - 2013 - WIREs Computational Molecular Science - Wiley Online Library <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wcms.1150> (accessed 2021 -08 -24).
- (53) Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (18), 5959–5967. <https://doi.org/10.1021/ja00226a005>.
- (54) Kim, K. H. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). In *Molecular Similarity in Drug Design*; Dean, P. M., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1995; pp 291–331. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1350-2_12.
- (55) da Silva, C. H. T. de P.; Taft, C. A. 3D Descriptors Calculation and Conformational Search to Investigate Potential Bioactive Conformations, with Application in 3D-QSAR and Virtual

- Screening in Drug Design. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *35* (13), 2966–2974.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1237382>.
- (56) Tosco, P.; Mackey, M. 3.11 - Lessons and Successes in the Use of Molecular Fields. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Chackalamannil, S., Rotella, D., Ward, S. E., Eds.; Elsevier: Oxford, 2017; pp 253–296. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12353-4>.
- (57) Klebe, G. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis: CoMSIA. In *3D QSAR in Drug Design: Recent Advances*; Kubinyi, H., Folkers, G., Martin, Y. C., Eds.; Three-Dimensional Quantitative Structure Activity Relationships; Springer Netherlands: Dordrecht, 1998; pp 87–104. https://doi.org/10.1007/0-306-46858-1_6.
- (58) Goodford, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28* (7), 849–857. <https://doi.org/10.1021/jm00145a002>.
- (59) von Itzstein, M.; Wu, W. Y.; Kok, G. B.; Pegg, M. S.; Dyason, J. C.; Jin, B.; Van Phan, T.; Smythe, M. L.; White, H. F.; Oliver, S. W. Rational Design of Potent Sialidase-Based Inhibitors of Influenza Virus Replication. *Nature* **1993**, *363* (6428), 418–423. <https://doi.org/10.1038/363418a0>.
- (60) Fontaine, F.; Pastor, M.; Sanz, F. Incorporating Molecular Shape into the Alignment-Free GRid-INdependent Descriptors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (11), 2805–2815. <https://doi.org/10.1021/jm0311240>.
- (61) Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (17), 3233–3243. <https://doi.org/10.1021/jm000941m>.
- (62) Carosati, E.; Lemoine, H.; Spogli, R.; Grittner, D.; Mannhold, R.; Tabarrini, O.; Sabatini, S.; Cecchetti, V. Binding Studies and GRIND/ALMOND-Based 3D QSAR Analysis of Benzothiazine Type K(ATP)-Channel Openers. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (19), 5581–5591. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.06.010>.
- (63) Development of high-performance algorithms for a new generation of versatile molecular descriptors. The Pentacle software <https://www.tdx.cat/handle/10803/7201> (accessed 2021 -09 -10).
- (64) Yoo, C.; Shahlaei, M. The Applications of PCA in QSAR Studies: A Case Study on CCR5 Antagonists. *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91* (1), 137–152. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13064>.
- (65) Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. PLS-Regression: A Basic Tool of Chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *58* (2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1).
- (66) Alexander, D. L. J.; Tropsha, A.; Winkler, D. A. Beware of R²: Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (7), 1316–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00206>.
- (67) Pratim Roy, P.; Paul, S.; Mitra, I.; Roy, K. On Two Novel Parameters for Validation of Predictive QSAR Models. *Molecules* **2009**, *14* (5), 1660–1701. <https://doi.org/10.3390/molecules14051660>.
- (68) Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inform.* **2010**, *29* (6–7), 476–488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>.
- (69) Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N. Statistical Methods in QSAR/QSPR. In *A Primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Concepts*; Roy, K., Kar, S., Das, R. N., Eds.; SpringerBriefs in Molecular Science; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 37–59. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17281-1_2.
- (70) Principles of QSAR models validation: internal and external - Gramatica - 2007 - QSAR & Combinatorial Science - Wiley Online Library

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/qsar.200610151> (accessed 2021 -09 -12).

- (71) Roy, K.; Kar, S.; Ambure, P. On a Simple Approach for Determining Applicability Domain of QSAR Models. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *145*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.04.013>.
- (72) Jhoti, H.; Williams, G.; Rees, D. C.; Murray, C. W. The “rule of Three” for Fragment-Based Drug Discovery: Where Are We Now? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (8), 644–644. <https://doi.org/10.1038/nrd3926-c1>.
- (73) Konteatis, Z. What Makes a Good Fragment in Fragment-Based Drug Discovery? *Expert Opin. Drug Discov.* **2021**, *16* (7), 723–726. <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1905629>.
- (74) Murray, C. W.; Verdonk, M. L. The Consequences of Translational and Rotational Entropy Lost by Small Molecules on Binding to Proteins. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2002**, *16* (10), 741–753. <https://doi.org/10.1023/A:1022446720849>.
- (75) Leach, A. R.; Hann, M. M. Molecular Complexity and Fragment-Based Drug Discovery: Ten Years On. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (4), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.008>.
- (76) Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G. Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41* (3), 856–864. <https://doi.org/10.1021/ci000403i>.
- (77) Bollag, G.; Tsai, J.; Zhang, J.; Zhang, C.; Ibrahim, P.; Nolop, K.; Hirth, P. Vemurafenib: The First Drug Approved for BRAF-Mutant Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (11), 873–886. <https://doi.org/10.1038/nrd3847>.
- (78) Deeks, E. D. Venetoclax: First Global Approval. *Drugs* **2016**, *76* (9), 979–987. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0596-x>.
- (79) Markham, A. Erdafitinib: First Global Approval. *Drugs* **2019**, *79* (9), 1017–1021. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01142-9>.
- (80) Sun, C.; Petros, A. M.; Hajduk, P. J. Fragment-Based Lead Discovery: Challenges and Opportunities. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, *25* (7), 607–610. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9451-z>.
- (81) Zhao, H.; Dong, J.; Lafleur, K.; Nevado, C.; Caflich, A. Discovery of a Novel Chemotype of Tyrosine Kinase Inhibitors by Fragment-Based Docking and Molecular Dynamics. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (10), 834–838. <https://doi.org/10.1021/ml3001984>.
- (82) Oyarzabal, J.; Zarich, N.; Albarran, M. I.; Palacios, I.; Urbano-Cuadrado, M.; Mateos, G.; Reymundo, I.; Rabal, O.; Salgado, A.; Corriero, A.; Fominaya, J.; Pastor, J.; Bischoff, J. R. Discovery of Mitogen-Activated Protein Kinase-Interacting Kinase 1 Inhibitors by a Comprehensive Fragment-Oriented Virtual Screening Approach. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (18), 6618–6628. <https://doi.org/10.1021/jm1005513>.
- (83) Giordanetto, F.; Kull, B.; Dellsén, A. Discovery of Novel Class 1 Phosphatidylinositide 3-Kinases (PI3K) Fragment Inhibitors through Structure-Based Virtual Screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (2), 829–835. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.11.087>.
- (84) Baell, J.; Walters, M. A. Chemistry: Chemical Con Artists Foil Drug Discovery. *Nature* **2014**, *513* (7519), 481–483. <https://doi.org/10.1038/513481a>.
- (85) Wang, Z.-Z.; Shi, X.-X.; Huang, G.-Y.; Hao, G.-F.; Yang, G.-F. Fragment-Based Drug Design Facilitates Selective Kinase Inhibitor Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2021**, *42* (7), 551–565. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.04.001>.
- (86) Protein structure determination from NMR chemical shifts | PNAS <https://www.pnas.org/content/104/23/9615> (accessed 2021 -09 -12).
- (87) Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. 2. Basic Principles of Multi-Dimensional NMR. 1990.
- (88) Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM | Nature <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2833->

4%E2%80%8B%E2%80%8B%E2%80%8B?fbclid=IwAR3kieHpKrEdBpBXu6nH0dbR4xkvHJ-B_KWlaNO9H3ZZsE8ws1INjwwSw-I (accessed 2021 -09 -13).

- (89) Homology modelling of protein-protein complexes: a simple method and its possibilities and limitations | BMC Bioinformatics | Full Text <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-9-427> (accessed 2021 -09 -13).
- (90) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (91) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme - Fischer - 1894 - Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft - Wiley Online Library <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.18940270364> (accessed 2021 -09 -13).
- (92) Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44* (2), 98–104.
- (93) Chervenak, M. C.; Toone, E. J. A Direct Measure of the Contribution of Solvent Reorganization to the Enthalpy of Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (23), 10533–10539. <https://doi.org/10.1021/ja00102a021>.
- (94) Klebe, G. Applying Thermodynamic Profiling in Lead Finding and Optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (2), 95–110. <https://doi.org/10.1038/nrd4486>.
- (95) Nolan, T.; Singh, N.; McCurdy, C. R. Ligand Macromolecule Interactions: Theoretical Principles of Molecular Recognition. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2009**, *572*, 13–29. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-244-5_2.
- (96) Chen, A. Y.; Adamek, R. N.; Dick, B. L.; Credille, C. V.; Morrison, C. N.; Cohen, S. M. Targeting Metalloenzymes for Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 1323–1455. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00201>.
- (97) Nguyen, F.; Starosta, A. L.; Arenz, S.; Sohmen, D.; Dönhöfer, A.; Wilson, D. N. Tetracycline Antibiotics and Resistance Mechanisms. *Biol. Chem.* **2014**, *395* (5), 559–575. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0292>.
- (98) Ribera, E.; Podzamczar, D. [Mechanisms of action, pharmacology and interactions of dolutegravir]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2015**, *33 Suppl 1*, 2–8. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(15\)30002-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(15)30002-1).
- (99) Rossi, A.; Pergola, C.; Koeberle, A.; Hoffmann, M.; Dehm, F.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S.; Werz, O.; Sautebin, L. The 5-Lipoxygenase Inhibitor, Zileuton, Suppresses Prostaglandin Biosynthesis by Inhibition of Arachidonic Acid Release in Macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161* (3), 555–570. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00930.x>.
- (100) Marks, P. A.; Rifkind, R. A.; Richon, V. M.; Breslow, R.; Miller, T.; Kelly, W. K. Histone Deacetylases and Cancer: Causes and Therapies. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1* (3), 194–202. <https://doi.org/10.1038/35106079>.
- (101) Riccardi, L.; Genna, V.; De Vivo, M. Metal–Ligand Interactions in Drug Design. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *2* (7), 100–112. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0018-6>.
- (102) Wang, Z.; Sun, H.; Yao, X.; Li, D.; Xu, L.; Li, Y.; Tian, S.; Hou, T. Comprehensive Evaluation of Ten Docking Programs on a Diverse Set of Protein-Ligand Complexes: The Prediction Accuracy of Sampling Power and Scoring Power. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **2016**, *18* (18), 12964–12975. <https://doi.org/10.1039/c6cp01555g>.
- (103) Sciabola, S.; Stanton, R. V.; Mills, J. E.; Flocco, M. M.; Baroni, M.; Cruciani, G.; Perruccio, F.; Mason, J. S. High-Throughput Virtual Screening of Proteins Using GRID Molecular

- Interaction Fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (1), 155–169.
<https://doi.org/10.1021/ci9003317>.
- (104) Werz, O.; Gerstmeier, J.; Garscha, U. Novel Leukotriene Biosynthesis Inhibitors (2012–2016) as Anti-Inflammatory Agents. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27* (5), 607–620.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1276568>.
- (105) Park, H.; Jung, S.-K.; Yu, K. R.; Kim, J. H.; Kim, Y.-S.; Ko, J. H.; Park, B. C.; Kim, S. J. Structure-Based Virtual Screening Approach to the Discovery of Novel Inhibitors of Eyes Absent 2 Phosphatase with Various Metal Chelating Moieties. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *78* (4), 642–650. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01192.x>.
- (106) Pala, N.; Stevaert, A.; Dallochio, R.; Dessì, A.; Rogolino, D.; Carcelli, M.; Sanna, V.; Sechi, M.; Naesens, L. Virtual Screening and Biological Validation of Novel Influenza Virus PA Endonuclease Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (8), 866–871.
<https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00109>.
- (107) Poongavanam, V.; Kongsted, J. Virtual Screening Models for Prediction of HIV-1 RT Associated RNase H Inhibition. *PLOS ONE* **2013**, *8* (9), e73478.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073478>.
- (108) Alves Avelar, L. A.; Ruzic, D.; Djokovic, N.; Kurz, T.; Nikolic, K. Structure-Based Design of Selective Histone Deacetylase 6 Zinc Binding Groups. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *38* (11), 3166–3177. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1652687>.
- (109) Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. Molecular Docking. In *Molecular Modeling of Proteins*; Kukol, A., Ed.; Methods Molecular Biology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2008; pp 365–382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19.
- (110) Elokely, K. M.; Doerksen, R. J. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (8), 1934–1945.
<https://doi.org/10.1021/ci400040d>.
- (111) Jain, A. N. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (4), 499–511.
<https://doi.org/10.1021/jm020406h>.
- (112) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking - ScienceDirect
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283696908979> (accessed 2021 -09 -14).
- (113) Li, J.; Fu, A.; Zhang, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* **2019**, *11* (2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.
- (114) AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions - Weiner - 1981 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.540020311> (accessed 2021 -09 -14).
- (115) CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations - Brooks - 1983 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.540040211> (accessed 2021 -09 -14).
- (116) Huang, S.-Y.; Zou, X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11* (8), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>.
- (117) Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes | SpringerLink
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007996124545> (accessed 2021 -09 -14).
- (118) General and targeted statistical potentials for protein–ligand interactions - Mooij - 2005 - Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics - Wiley Online Library
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.20588> (accessed 2021 -09 -14).

- (119) Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20730182/> (accessed 2021 -09 -14).
- (120) Graves, A. P.; Brenk, R.; Shoichet, B. K. Decoys for Docking. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (11), 3714–3728. <https://doi.org/10.1021/jm0491187>.
- (121) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2003**, *52* (4), 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.
- (122) Liebeschuetz, J. W.; Cole, J. C.; Korb, O. Pose Prediction and Virtual Screening Performance of GOLD Scoring Functions in a Standardized Test. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26* (6), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9551-4>.
- (123) Hinchliffe, A. *Molecular Modelling for Beginners*; John Wiley & Sons, 2003.
- (124) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.
- (125) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- (126) Schuler, L. D.; Daura, X.; Gunsteren, W. F. van. An Improved GROMOS96 Force Field for Aliphatic Hydrocarbons in the Condensed Phase. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22* (11), 1205–1218. <https://doi.org/10.1002/jcc.1078>.
- (127) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (45), 11225–11236. <https://doi.org/10.1021/ja9621760>.
- (128) Bray, S. A.; Senapathi, T.; Barnett, C. B.; Grüning, B. A. Intuitive, Reproducible High-Throughput Molecular Dynamics in Galaxy: A Tutorial. *J. Cheminformatics* **2020**, *12* (1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00451-6>.
- (129) Allen, G. E. Mechanism, Vitalism and Organicism in Late Nineteenth and Twentieth-Century Biology: The Importance of Historical Context. *Stud. Hist. Philos. Sci. Part C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **2005**, *36* (2), 261–283. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2005.03.003>.
- (130) Peterson, E. L. *The Life Organic: The Theoretical Biology Club and the Roots of Epigenetics*; University of Pittsburgh Press: Pittsburgh, 2016.
- (131) Wrinch, D. M. Chromosome Behaviour in Terms of Protein Pattern. **2020**. <https://doi.org/10.1038/134978a0>.
- (132) Felsenfeld, G. A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6* (1), a018200. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018200>.
- (133) Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **1970**, *227* (5258), 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>.
- (134) Berger, S. L.; Kouzarides, T.; Shiekhatar, R.; Shilatifard, A. An Operational Definition of Epigenetics. *Genes Dev.* **2009**, *23* (7), 781–783. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>.
- (135) Zaret, K. S.; Carroll, J. S. Pioneer Transcription Factors: Establishing Competence for Gene Expression. *Genes Dev.* **2011**, *25* (21), 2227–2241. <https://doi.org/10.1101/gad.176826.111>.
- (136) Fan, J.; Krautkramer, K. A.; Feldman, J. L.; Denu, J. M. Metabolic Regulation of Histone Post-Translational Modifications. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 95–108. <https://doi.org/10.1021/cb500846u>.
- (137) Lambert, S. A.; Jolma, A.; Campitelli, L. F.; Das, P. K.; Yin, Y.; Albu, M.; Chen, X.; Taipale, J.; Hughes, T. R.; Weirauch, M. T. The Human Transcription Factors. *Cell* **2018**, *172* (4), 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>.

- (138) Hotchkiss, R. D. The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography. *J. Biol. Chem.* **1948**, *175* (1), 315–332.
- (139) Bird, A. DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes Dev.* **2002**, *16* (1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>.
- (140) Greger, V.; Passarge, E.; Höpping, W.; Messmer, E.; Horsthemke, B. Epigenetic Changes May Contribute to the Formation and Spontaneous Regression of Retinoblastoma. *Hum. Genet.* **1989**, *83* (2), 155–158. <https://doi.org/10.1007/BF00286709>.
- (141) Petryk, N.; Bultmann, S.; Bartke, T.; Defossez, P.-A. Staying True to Yourself: Mechanisms of DNA Methylation Maintenance in Mammals. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (6), 3020–3032. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1154>.
- (142) Li, Y.-Q.; Zhou, P.-Z.; Zheng, X.-D.; Walsh, C. P.; Xu, G.-L. Association of Dnmt3a and Thymine DNA Glycosylase Links DNA Methylation with Base-Excision Repair. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (2), 390–400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1052>.
- (143) Jones, P. A.; Issa, J.-P. J.; Baylin, S. Targeting the Cancer Epigenome for Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17* (10), 630–641. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93>.
- (144) Jones, P. A. Gene Activation by 5-Azacytidine. In *DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance*; Razin, A., Cedar, H., Riggs, A. D., Eds.; Springer Series in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 1984; pp 165–187. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8519-6_9.
- (145) Christman, J. K.; Mendelsohn, N.; Herzog, D.; Schneiderman, N. Effect of 5-Azacytidine on Differentiation and DNA Methylation in Human Promyelocytic Leukemia Cells (HL-60). *Cancer Res.* **1983**, *43* (2), 763–769.
- (146) Allfrey, V. G.; Faulkner, R.; Mirsky, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *51* (5), 786–794.
- (147) Bannister, A. J.; Kouzarides, T. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. *Cell Res.* **2011**, *21* (3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- (148) Bártová, E.; Krejčí, J.; Harnicarová, A.; Galiová, G.; Kozubek, S. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **2008**, *56* (8), 711–721. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.951251>.
- (149) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (150) Verdin, E.; Ott, M. 50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation to Epigenetics, Metabolism and Beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16* (4), 258–264. <https://doi.org/10.1038/nrm3931>.
- (151) Peserico, A.; Simone, C. Physical and Functional HAT/HDAC Interplay Regulates Protein Acetylation Balance. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 371832. <https://doi.org/10.1155/2011/371832>.
- (152) Garcia-Ramirez, M.; Rocchini, C.; Ausio, J. Modulation of Chromatin Folding by Histone Acetylation. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (30), 17923–17928. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17923>.
- (153) Wang, X.; Hayes, J. J. Acetylation Mimics within Individual Core Histone Tail Domains Indicate Distinct Roles in Regulating the Stability of Higher-Order Chromatin Structure. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (1), 227–236. <https://doi.org/10.1128/MCB.01245-07>.
- (154) Gong, F.; Chiu, L.-Y.; Miller, K. M. Acetylation Reader Proteins: Linking Acetylation Signaling to Genome Maintenance and Cancer. *PLoS Genet.* **2016**, *12* (9), e1006272. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006272>.
- (155) Vettese-Dadey, M.; Grant, P. A.; Hebbes, T. R.; Crane-Robinson, C.; Allis, C. D.; Workman, J. L. Acetylation of Histone H4 Plays a Primary Role in Enhancing Transcription Factor Binding to Nucleosomal DNA in Vitro. *EMBO J.* **1996**, *15* (10), 2508–2518.

- (156) Minucci, S.; Nervi, C.; Lo Coco, F.; Pelicci, P. G. Histone Deacetylases: A Common Molecular Target for Differentiation Treatment of Acute Myeloid Leukemias? *Oncogene* **2001**, *20* (24), 3110–3115. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204336>.
- (157) Minucci, S.; Pelicci, P. G. Histone Deacetylase Inhibitors and the Promise of Epigenetic (and More) Treatments for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (1), 38–51. <https://doi.org/10.1038/nrc1779>.
- (158) Arrowsmith, C. H.; Bountra, C.; Fish, P. V.; Lee, K.; Schapira, M. Epigenetic Protein Families: A New Frontier for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (5), 384–400. <https://doi.org/10.1038/nrd3674>.
- (159) Bradner, J. E.; West, N.; Grachan, M. L.; Greenberg, E. F.; Haggarty, S. J.; Warnow, T.; Mazitschek, R. Chemical Phylogenetics of Histone Deacetylases. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6* (3), 238–243. <https://doi.org/10.1038/nchembio.313>.
- (160) Inche, A. G.; La Thangue, N. B. Keynote Review: Chromatin Control and Cancer-Drug Discovery: Realizing the Promise. *Drug Discov. Today* **2006**, *11* (3), 97–109. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03691-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03691-3).
- (161) Flavahan, W. A.; Gaskell, E.; Bernstein, B. E. Epigenetic Plasticity and the Hallmarks of Cancer. *Science* **2017**, *357* (6348), eaal2380. <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>.
- (162) Zhu, P.; Martin, E.; Mengwasser, J.; Schlag, P.; Janssen, K.-P.; Göttlicher, M. Induction of HDAC2 Expression upon Loss of APC in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Cell* **2004**, *5* (5), 455–463. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00114-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00114-x).
- (163) Wang, X.-Q.; Bai, H.-M.; Li, S.-T.; Sun, H.; Min, L.-Z.; Tao, B.-B.; Zhong, J.; Li, B. Knockdown of HDAC1 Expression Suppresses Invasion and Induces Apoptosis in Glioma Cells. *Oncotarget* **2017**, *8* (29), 48027–48040. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18227>.
- (164) Telles, E.; Seto, E. Modulation of Cell Cycle Regulators by HDACs. *Front. Biosci. Sch. Ed.* **2012**, *4*, 831–839.
- (165) Mottet, D.; Pirotte, S.; Lamour, V.; Hagedorn, M.; Javerzat, S.; Bikfalvi, A.; Bellahcène, A.; Verdin, E.; Castronovo, V. HDAC4 Represses P21WAF1/Cip1 Expression in Human Cancer Cells through a Sp1-Dependent, P53-Independent Mechanism. *Oncogene* **2009**, *28* (2), 243–256. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.371>.
- (166) Miyake, K.; Yoshizumi, T.; Imura, S.; Sugimoto, K.; Batmunkh, E.; Kanemura, H.; Morine, Y.; Shimada, M. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Histone Deacetylase 1, and Metastasis-Associated Protein 1 in Pancreatic Carcinoma: Correlation with Poor Prognosis with Possible Regulation. *Pancreas* **2008**, *36* (3), e1-9. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31815f2c2a>.
- (167) Rikimaru, T.; Taketomi, A.; Yamashita, Y.; Shirabe, K.; Hamatsu, T.; Shimada, M.; Maehara, Y. Clinical Significance of Histone Deacetylase 1 Expression in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* **2007**, *72* (1–2), 69–74. <https://doi.org/10.1159/000111106>.
- (168) Rey, M.; Irondelle, M.; Waharte, F.; Lizarraga, F.; Chavrier, P. HDAC6 Is Required for Invadopodia Activity and Invasion by Breast Tumor Cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90* (2), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.09.004>.
- (169) Mottet, D.; Bellahcène, A.; Pirotte, S.; Waltregny, D.; Deroanne, C.; Lamour, V.; Lidereau, R.; Castronovo, V. Histone Deacetylase 7 Silencing Alters Endothelial Cell Migration, a Key Step in Angiogenesis. *Circ. Res.* **2007**, *101* (12), 1237–1246. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.149377>.
- (170) Moskowitz, A. J.; Horwitz, S. M. Targeting Histone Deacetylases in T-Cell Lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **2017**, *58* (6), 1306–1319. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1247956>.
- (171) Zeng, H.; Qu, J.; Jin, N.; Xu, J.; Lin, C.; Chen, Y.; Yang, X.; He, X.; Tang, S.; Lan, X.; Yang, X.; Chen, Z.; Huang, M.; Ding, J.; Geng, M. Feedback Activation of Leukemia Inhibitory Factor

- Receptor Limits Response to Histone Deacetylase Inhibitors in Breast Cancer. *Cancer Cell* **2016**, *30* (3), 459–473. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.08.001>.
- (172) Hölscher, A. S.; Schulz, W. A.; Pinkerneil, M.; Niegisch, G.; Hoffmann, M. J. Combined Inhibition of BET Proteins and Class I HDACs Synergistically Induces Apoptosis in Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Clin. Epigenetics* **2018**, *10* (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0434-3>.
- (173) Taunton, J.; Hassig, C. A.; Schreiber, S. L. A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. *Science* **1996**, *272* (5260), 408–411. <https://doi.org/10.1126/science.272.5260.408>.
- (174) Kijima, M.; Yoshida, M.; Sugita, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T. Trapoxin, an Antitumor Cyclic Tetrapeptide, Is an Irreversible Inhibitor of Mammalian Histone Deacetylase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (30), 22429–22435. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41547-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41547-5).
- (175) Yoshida, M.; Horinouchi, S.; Beppu, T. Trichostatin A and Trapoxin: Novel Chemical Probes for the Role of Histone Acetylation in Chromatin Structure and Function. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **1995**, *17* (5), 423–430. <https://doi.org/10.1002/bies.950170510>.
- (176) Yang, W.-M.; Inouye, C.; Zeng, Y.; Bearss, D.; Seto, E. Transcriptional Repression by YY1 Is Mediated by Interaction with a Mammalian Homolog of the Yeast Global Regulator RPD3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (23), 12845–12850. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.12845>.
- (177) Emiliani, S.; Fischle, W.; Lint, C. V.; Al-Abed, Y.; Verdin, E. Characterization of a Human RPD3 Ortholog, HDAC3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (6), 2795–2800. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2795>.
- (178) BUGGY, J. J.; SIDERIS, M. L.; MAK, P.; LORIMER, D. D.; MCINTOSH, B.; CLARK, J. M. Cloning and Characterization of a Novel Human Histone Deacetylase, HDAC8. *Biochem. J.* **2000**, *350* (1), 199–205. <https://doi.org/10.1042/bj3500199>.
- (179) RUIJTER, A. J. M. de; GENNIP, A. H. van; CARON, H. N.; KEMP, S.; KUILENBURG, A. B. P. van. Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family. *Biochem. J.* **2003**, *370* (3), 737–749. <https://doi.org/10.1042/bj20021321>.
- (180) Millard, C. J.; Watson, P. J.; Celardo, I.; Gordiyenko, Y.; Cowley, S. M.; Robinson, C. V.; Fairall, L.; Schwabe, J. W. R. Class I HDACs Share a Common Mechanism of Regulation by Inositol Phosphates. *Mol. Cell* **2013**, *51* (1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.020>.
- (181) Reichert, N.; Choukrallah, M.-A.; Matthias, P. Multiple Roles of Class I HDACs in Proliferation, Differentiation, and Development. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69* (13), 2173–2187. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0921-9>.
- (182) Piekarz, R. L.; Robey, R. W.; Zhan, Z.; Kayastha, G.; Sayah, A.; Abdeldaim, A. H.; Torrico, S.; Bates, S. E. T-Cell Lymphoma as a Model for the Use of Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy: Impact of Depsipeptide on Molecular Markers, Therapeutic Targets, and Mechanisms of Resistance. *Blood* **2004**, *103* (12), 4636–4643. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3068>.
- (183) Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. Structures of a Histone Deacetylase Homologue Bound to the TSA and SAHA Inhibitors. *Nature* **1999**, *401* (6749), 188–193. <https://doi.org/10.1038/43710>.
- (184) Schapira, M. Structural Biology of Human Metal-Dependent Histone Deacetylases. In *Histone Deacetylases: the Biology and Clinical Implication*; Yao, T.-P., Seto, E., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 225–240. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21631-2_10.

- (185) Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- (186) Micelli, C.; Rastelli, G. Histone Deacetylases: Structural Determinants of Inhibitor Selectivity. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (6), 718–735. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.007>.
- (187) Somoza, J. R.; Skene, R. J.; Katz, B. A.; Mol, C.; Ho, J. D.; Jennings, A. J.; Luong, C.; Arvai, A.; Buggy, J. J.; Chi, E.; Tang, J.; Sang, B.-C.; Verner, E.; Wynands, R.; Leahy, E. M.; Dougan, D. R.; Snell, G.; Navre, M.; Knuth, M. W.; Swanson, R. V.; McRee, D. E.; Tari, L. W. Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases. *Structure* **2004**, *12* (7), 1325–1334. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.012>.
- (188) Lahm, A.; Paolini, C.; Pallaoro, M.; Nardi, M. C.; Jones, P.; Neddermann, P.; Sambucini, S.; Bottomley, M. J.; Surdo, P. L.; Carfi, A.; Koch, U.; Francesco, R. D.; Steinkühler, C.; Gallinari, P. Unraveling the Hidden Catalytic Activity of Vertebrate Class IIa Histone Deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (44), 17335–17340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706487104>.
- (189) Luo, L.; Martin, S. C.; Parkington, J.; Cadena, S. M.; Zhu, J.; Ibebunjo, C.; Summermatter, S.; Londraville, N.; Patora-Komisarska, K.; Widler, L.; Zhai, H.; Trendelenburg, A.-U.; Glass, D. J.; Shi, J. HDAC4 Controls Muscle Homeostasis through Deacetylation of Myosin Heavy Chain, PGC-1 α , and Hsc70. *Cell Rep.* **2019**, *29* (3), 749–763.e12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.023>.
- (190) Voelter-Mahlknecht, S.; Ho, A. D.; Mahlknecht, U. Chromosomal Organization and Localization of the Novel Class IV Human Histone Deacetylase 11 Gene. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, *16* (4), 589–598. <https://doi.org/10.3892/ijmm.16.4.589>.
- (191) Liu, S.-S.; Wu, F.; Jin, Y.-M.; Chang, W.-Q.; Xu, T.-M. HDAC11: A Rising Star in Epigenetics. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110607. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110607>.
- (192) Son, S. I.; Cao, J.; Zhu, C.-L.; Miller, S. P.; Lin, H. Activity-Guided Design of HDAC11-Specific Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (7), 1393–1397. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00292>.
- (193) Glozak, M. A.; Sengupta, N.; Zhang, X.; Seto, E. Acetylation and Deacetylation of Non-Histone Proteins. *Gene* **2005**, *363*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.010>.
- (194) Ran, J.; Yang, Y.; Li, D.; Liu, M.; Zhou, J. Deacetylation of α -Tubulin and Cortactin Is Required for HDAC6 to Trigger Ciliary Disassembly. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 12917. <https://doi.org/10.1038/srep12917>.
- (195) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase | Nature <https://www.nature.com/articles/417455a> (accessed 2021 -07 -22).
- (196) Verdel, A.; Curtet, S.; Brocard, M.-P.; Rousseaux, S.; Lemercier, C.; Yoshida, M.; Khochbin, S. Active Maintenance of MHD2/MHDAC6 Histone-Deacetylase in the Cytoplasm. *Curr. Biol.* **2000**, *10* (12), 747–749. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00542-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00542-X).
- (197) Lafarga, V.; Aymerich, I.; Tapia, O.; Mayor, F.; Penela, P. A Novel GRK2/HDAC6 Interaction Modulates Cell Spreading and Motility. *EMBO J.* **2012**, *31* (4), 856–869. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.466>.
- (198) Zhang, Y.; Kwon, S.; Yamaguchi, T.; Cubizolles, F.; Rousseaux, S.; Kneissel, M.; Cao, C.; Li, N.; Cheng, H.-L.; Chua, K.; Lombard, D.; Mizeracki, A.; Matthias, G.; Alt, F. W.; Khochbin, S.; Matthias, P. Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (5), 1688–1701. <https://doi.org/10.1128/MCB.01154-06>.

- (199) Parmigiani, R. B.; Xu, W. S.; Venta-Perez, G.; Erdjument-Bromage, H.; Yaneva, M.; Tempst, P.; Marks, P. A. HDAC6 Is a Specific Deacetylase of Peroxiredoxins and Is Involved in Redox Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (28), 9633–9638. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803749105>.
- (200) Kaluza, D.; Kroll, J.; Gesierich, S.; Yao, T.-P.; Boon, R. A.; Hergenreider, E.; Tjwa, M.; Rössig, L.; Seto, E.; Augustin, H. G.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S.; Urbich, C. Class IIb HDAC6 Regulates Endothelial Cell Migration and Angiogenesis by Deacetylation of Cortactin. *EMBO J.* **2011**, *30* (20), 4142–4156. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.298>.
- (201) Valenzuela-Fernández, A.; Cabrero, J. R.; Serrador, J. M.; Sánchez-Madrid, F. HDAC6: A Key Regulator of Cytoskeleton, Cell Migration and Cell-Cell Interactions. *Trends Cell Biol.* **2008**, *18* (6), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.04.003>.
- (202) Xu, L.; Liu, N.; Gu, H.; Wang, H.; Shi, Y.; Ma, X.; Ma, S.; Ni, J.; Tao, M.; Qiu, A.; Zhuang, S. Histone Deacetylase 6 Inhibition Counteracts the Epithelial–Mesenchymal Transition of Peritoneal Mesothelial Cells and Prevents Peritoneal Fibrosis. *Oncotarget* **2017**, *8* (51), 88730–88750. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20982>.
- (203) Rodriguez-Gonzalez, A.; Lin, T.; Ikeda, A. K.; Simms-Waldrip, T.; Fu, C.; Sakamoto, K. M. Role of the Aggresome Pathway in Cancer: Targeting Histone Deacetylase 6–Dependent Protein Degradation. *Cancer Res.* **2008**, *68* (8), 2557–2560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5989>.
- (204) Kaliszczak, M.; van Hechanova, E.; Li, Y.; Alsadah, H.; Parzych, K.; Auner, H. W.; Aboagye, E. O. The HDAC6 Inhibitor C1A Modulates Autophagy Substrates in Diverse Cancer Cells and Induces Cell Death. *Br. J. Cancer* **2018**, *119* (10), 1278–1287. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0232-5>.
- (205) Saji, S.; Kawakami, M.; Hayashi, S.; Yoshida, N.; Hirose, M.; Horiguchi, S.; Itoh, A.; Funata, N.; Schreiber, S. L.; Yoshida, M.; Toi, M. Significance of HDAC6 Regulation via Estrogen Signaling for Cell Motility and Prognosis in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Oncogene* **2005**, *24* (28), 4531–4539. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208646>.
- (206) Eshun-Wilson, L.; Zhang, R.; Portran, D.; Nachury, M. V.; Toso, D. B.; Löhr, T.; Vendruscolo, M.; Bonomi, M.; Fraser, J. S.; Nogales, E. Effects of α -Tubulin Acetylation on Microtubule Structure and Stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (21), 10366–10371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900441116>.
- (207) Portran, D.; Schaedel, L.; Xu, Z.; Théry, M.; Nachury, M. V. Tubulin Acetylation Protects Long-Lived Microtubules against Mechanical Ageing. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19* (4), 391–398. <https://doi.org/10.1038/ncb3481>.
- (208) Xu, Z.; Schaedel, L.; Portran, D.; Aguilar, A.; Gaillard, J.; Marinkovich, M. P.; Théry, M.; Nachury, M. V. Microtubules Acquire Resistance from Mechanical Breakage through Intralumenal Acetylation. *Science* **2017**, *356* (6335), 328–332. <https://doi.org/10.1126/science.aai8764>.
- (209) Zhang, Z.; Yamashita, H.; Toyama, T.; Sugiura, H.; Omoto, Y.; Ando, Y.; Mita, K.; Hamaguchi, M.; Hayashi, S.; Iwase, H. HDAC6 Expression Is Correlated with Better Survival in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (20), 6962–6968. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0455>.
- (210) Miyake, Y.; Keusch, J. J.; Wang, L.; Saito, M.; Hess, D.; Wang, X.; Melancon, B. J.; Helquist, P.; Gut, H.; Matthias, P. Structural Insights into HDAC6 Tubulin Deacetylation and Its Selective Inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (9), 748–754. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2140>.
- (211) Estiu, G.; Greenberg, E.; Harrison, C. B.; Kwiatkowski, N. P.; Mazitschek, R.; Bradner, J. E.; Wiest, O. Structural Origin of Selectivity in Class II-Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (10), 2898–2906. <https://doi.org/10.1021/jm7015254>.

- (212) Hai, Y.; Christianson, D. W. Histone Deacetylase 6 Structure and Molecular Basis of Catalysis and Inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (9), 741–747. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2134>.
- (213) Hubbert, C.; Guardiola, A.; Shao, R.; Kawaguchi, Y.; Ito, A.; Nixon, A.; Yoshida, M.; Wang, X.-F.; Yao, T.-P. HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase. *Nature* **2002**, *417* (6887), 455–458. <https://doi.org/10.1038/417455a>.
- (214) Zilberman, Y.; Ballestrem, C.; Carramusa, L.; Mazitschek, R.; Khochbin, S.; Bershadsky, A. Regulation of Microtubule Dynamics by Inhibition of the Tubulin Deacetylase HDAC6. *J. Cell Sci.* **2009**, *122* (19), 3531–3541. <https://doi.org/10.1242/jcs.046813>.
- (215) Skultetyova, L.; Ustinova, K.; Kutil, Z.; Novakova, Z.; Pavlicek, J.; Mikesova, J.; Trapl, D.; Baranova, P.; Havlinova, B.; Hubalek, M.; Lansky, Z.; Barinka, C. Human Histone Deacetylase 6 Shows Strong Preference for Tubulin Dimers over Assembled Microtubules. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 11547. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11739-3>.
- (216) Matsuyama, A.; Shimazu, T.; Sumida, Y.; Saito, A.; Yoshimatsu, Y.; Seigneurin-Berny, D.; Osada, H.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Horinouchi, S.; Yoshida, M. In Vivo Destabilization of Dynamic Microtubules by HDAC6-Mediated Deacetylation. *EMBO J.* **2002**, *21* (24), 6820–6831. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf682>.
- (217) Porter, N. J.; Mahendran, A.; Breslow, R.; Christianson, D. W. Unusual Zinc-Binding Mode of HDAC6-Selective Hydroxamate Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (51), 13459–13464. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718823114>.
- (218) Yoo, J.; Jeon, Y. H.; Lee, D. H.; Kim, G. W.; Lee, S. W.; Kim, S. Y.; Park, J.; Kwon, S. H. HDAC6-Selective Inhibitors Enhance Anticancer Effects of Paclitaxel in Ovarian Cancer Cells. *Oncol. Lett.* **2021**, *21* (3), 1–1. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12462>.
- (219) Namdar, M.; Perez, G.; Ngo, L.; Marks, P. A. Selective Inhibition of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Induces DNA Damage and Sensitizes Transformed Cells to Anticancer Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (46), 20003–20008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013754107>.
- (220) Liu, J.-R.; Yu, C.-W.; Hung, P.-Y.; Hsin, L.-W.; Chern, J.-W. High-Selective HDAC6 Inhibitor Promotes HDAC6 Degradation Following Autophagy Modulation and Enhanced Antitumor Immunity in Glioblastoma. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *163*, 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.03.023>.
- (221) Li, Y.; Sang, S.; Ren, W.; Pei, Y.; Bian, Y.; Chen, Y.; Sun, H. Inhibition of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) as a Therapeutic Strategy for Alzheimer’s Disease: A Review (2010–2020). *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *226*, 113874. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113874>.
- (222) Benoy, V.; Vanden Berghe, P.; Jarpe, M.; Van Damme, P.; Robberecht, W.; Van Den Bosch, L. Development of Improved HDAC6 Inhibitors as Pharmacological Therapy for Axonal Charcot–Marie–Tooth Disease. *Neurotherapeutics* **2017**, *14* (2), 417–428. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0501-z>.
- (223) Sabnis, R. W. Novel Histone Deacetylase 6 Inhibitors for Treating Alzheimer’s Disease and Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (8), 1202–1203. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00339>.
- (224) Moreno-Gonzalo, O.; Mayor, F.; Sánchez-Madrid, F. HDAC6 at Crossroads of Infection and Innate Immunity. *Trends Immunol.* **2018**, *39* (8), 591–595. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.05.004>.
- (225) Knox, T.; Sahakian, E.; Banik, D.; Hadley, M.; Palmer, E.; Noonepalle, S.; Kim, J.; Powers, J.; Gracia-Hernandez, M.; Oliveira, V.; Cheng, F.; Chen, J.; Barinka, C.; Pinilla-Ibarz, J.; Lee, N. H.; Kozikowski, A.; Villagra, A. Selective HDAC6 Inhibitors Improve Anti-PD-1 Immune Checkpoint Blockade Therapy by Decreasing the Anti-Inflammatory Phenotype of

- Macrophages and down-Regulation of Immunosuppressive Proteins in Tumor Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 6136. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42237-3>.
- (226) Jung, M.; Brosch, G.; Kölle, D.; Scherf, H.; Gerhäuser, C.; Loidl, P. Amide Analogues of Trichostatin A as Inhibitors of Histone Deacetylase and Inducers of Terminal Cell Differentiation. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (22), 4669–4679. <https://doi.org/10.1021/jm991091h>.
- (227) Ho, T. C. S.; Chan, A. H. Y.; Ganesan, A. Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (21), 12460–12484. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00830>.
- (228) Gryder, B. E.; Sodji, Q. H.; Oyelere, A. K. Targeted Cancer Therapy: Giving Histone Deacetylase Inhibitors All They Need to Succeed. *Future Med. Chem.* **2012**, *4* (4), 505–524. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.3>.
- (229) Shen, S.; Kozikowski, A. P. Why Hydroxamates May Not Be the Best Histone Deacetylase Inhibitors—What Some May Have Forgotten or Would Rather Forget? *ChemMedChem* **2016**, *11* (1), 15–21. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500486>.
- (230) Coussens, L. M.; Fingleton, B.; Matrisian, L. M. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations. *Science* **2002**, *295* (5564), 2387–2392. <https://doi.org/10.1126/science.1067100>.
- (231) Lauffer, B. E. L.; Mintzer, R.; Fong, R.; Mukund, S.; Tam, C.; Zilberleyb, I.; Flicke, B.; Ritscher, A.; Fedorowicz, G.; Vallerio, R.; Ortwine, D. F.; Gunzner, J.; Modrusan, Z.; Neumann, L.; Koth, C. M.; Lupardus, P. J.; Kaminker, J. S.; Heise, C. E.; Steiner, P. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Kinetic Rate Constants Correlate with Cellular Histone Acetylation but Not Transcription and Cell Viability. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (37), 26926–26943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490706>.
- (232) Göttlicher, M.; Minucci, S.; Zhu, P.; Krämer, O. H.; Schimpf, A.; Giavara, S.; Sleeman, J. P.; Lo Coco, F.; Nervi, C.; Pelicci, P. G.; Heinzl, T. Valproic Acid Defines a Novel Class of HDAC Inhibitors Inducing Differentiation of Transformed Cells. *EMBO J.* **2001**, *20* (24), 6969–6978. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>.
- (233) Simonini, M. V.; Camargo, L. M.; Dong, E.; Maloku, E.; Veldic, M.; Costa, E.; Guidotti, A. The Benzamide MS-275 Is a Potent, Long-Lasting Brain Region-Selective Inhibitor of Histone Deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (5), 1587–1592. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510341103>.
- (234) Zhang, L.; Zhang, J.; Jiang, Q.; Zhang, L.; Song, W. Zinc Binding Groups for Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, *33* (1), 714–721. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1417274>.
- (235) Stott, A. J.; Maillard, M. C.; Beaumont, V.; Allcock, D.; Aziz, O.; Borchers, A. H.; Blackaby, W.; Breccia, P.; Creighton-Gutteridge, G.; Haughan, A. F.; Jarvis, R. E.; Luckhurst, C. A.; Matthews, K. L.; McAllister, G.; Pollack, S.; Saville-Stones, E.; Van de Poël, A. J.; Vater, H. D.; Vann, J.; Williams, R.; Yates, D.; Muñoz-Sanjuán, I.; Dominguez, C. Evaluation of 5-(Trifluoromethyl)-1,2,4-Oxadiazole-Based Class IIa HDAC Inhibitors for Huntington's Disease. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (3), 380–388. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.0c00532>.
- (236) Nielsen, T. K.; Hildmann, C.; Riester, D.; Wegener, D.; Schwienhorst, A.; Ficner, R. Complex Structure of a Bacterial Class 2 Histone Deacetylase Homologue with a Trifluoromethylketone Inhibitor. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63* (Pt 4), 270–273. <https://doi.org/10.1107/S1744309107012377>.
- (237) Hildmann, C.; Wegener, D.; Riester, D.; Hempel, R.; Schober, A.; Merana, J.; Giurato, L.; Guccione, S.; Nielsen, T. K.; Ficner, R.; Schwienhorst, A. Substrate and Inhibitor Specificity of Class 1 and Class 2 Histone Deacetylases. *J. Biotechnol.* **2006**, *124* (1), 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.01.030>.

- (238) Bürli, R. W.; Luckhurst, C. A.; Aziz, O.; Matthews, K. L.; Yates, D.; Lyons, K. A.; Beconi, M.; McAllister, G.; Breccia, P.; Stott, A. J.; Penrose, S. D.; Wall, M.; Lamers, M.; Leonard, P.; Müller, I.; Richardson, C. M.; Jarvis, R.; Stones, L.; Hughes, S.; Wishart, G.; Haughan, A. F.; O'Connell, C.; Mead, T.; McNeil, H.; Vann, J.; Mangette, J.; Maillard, M.; Beaumont, V.; Munoz-Sanjuan, I.; Dominguez, C. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Potent and Selective Class IIa Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors as a Potential Therapy for Huntington's Disease. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (24), 9934–9954. <https://doi.org/10.1021/jm4011884>.
- (239) Vickers, C. J.; Olsen, C. A.; Leman, L. J.; Ghadiri, M. R. Discovery of HDAC Inhibitors That Lack an Active Site Zn²⁺-Binding Functional Group. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (6), 505–508. <https://doi.org/10.1021/ml300081u>.
- (240) Shen, S.; Kozikowski, A. P. A Patent Review of Histone Deacetylase 6 Inhibitors in Neurodegenerative Diseases (2014-2019). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30* (2), 121–136. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1708901>.
- (241) Onishi, T.; Maeda, R.; Terada, M.; Sato, S.; Fujii, T.; Ito, M.; Hashikami, K.; Kawamoto, T.; Tanaka, M. A Novel Orally Active HDAC6 Inhibitor T-518 Shows a Therapeutic Potential for Alzheimer's Disease and Tauopathy in Mice. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 15423. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94923-w>.
- (242) Santo, L.; Hideshima, T.; Kung, A. L.; Tseng, J.-C.; Tamang, D.; Yang, M.; Jarpe, M.; van Duzer, J. H.; Mazitschek, R.; Ogier, W. C.; Cirstea, D.; Rodig, S.; Eda, H.; Scullen, T.; Canavese, M.; Bradner, J.; Anderson, K. C.; Jones, S. S.; Raje, N. Preclinical Activity, Pharmacodynamic, and Pharmacokinetic Properties of a Selective HDAC6 Inhibitor, ACY-1215, in Combination with Bortezomib in Multiple Myeloma. *Blood* **2012**, *119* (11), 2579–2589. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-387365>.
- (243) Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P. Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (31), 10842–10846. <https://doi.org/10.1021/ja102758v>.
- (244) Porter, N. J.; Wagner, F. F.; Christianson, D. W. Entropy as a Driver of Selectivity for Inhibitor Binding to Histone Deacetylase 6. *Biochemistry* **2018**, *57* (26), 3916–3924. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00367>.
- (245) Winer, A.; Adams, S.; Mignatti, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17* (6), 1147–1155. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0646>.
- (246) Usachova, N.; Leitis, G.; Jirgensons, A.; Kalvinsh, I. Synthesis of Hydroxamic Acids by Activation of Carboxylic Acids with N,N'-Carbonyldiimidazole: Exploring the Efficiency of the Method. *Synth. Commun.* **2010**, *40* (6), 927–935. <https://doi.org/10.1080/00397910903026723>.
- (247) Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Salaris, M. Simple One-Flask Method for the Preparation of Hydroxamic Acids. *Org. Lett.* **2003**, *5* (15), 2715–2717. <https://doi.org/10.1021/ol034903j>.
- (248) Yang, K.; Nong, K.; Gu, Q.; Dong, J.; Wang, J. Discovery of N-Hydroxy-3-Alkoxybenzamides as Direct Acid Sphingomyelinase Inhibitors Using a Ligand-Based Pharmacophore Model. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.065>.
- (249) Reddy, A. S.; Kumar, M. S.; Reddy, G. R. A Convenient Method for the Preparation of Hydroxamic Acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (33), 6285–6288. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01058-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01058-3).
- (250) Marson, C. M.; Savy, P.; Rioja, A. S.; Mahadevan, T.; Mikol, C.; Veerupillai, A.; Nsubuga, E.; Chahwan, A.; Joel, S. P. Aromatic Sulfide Inhibitors of Histone Deacetylase Based on

- Arylsulfinyl-2,4-Hexadienoic Acid Hydroxyamides. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 800–805. <https://doi.org/10.1021/jm051010j>.
- (251) Alam, M. A. Methods for Hydroxamic Acid Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2019**, *23* (9), 978–993. <https://doi.org/10.2174/1385272823666190424142821>.
- (252) Fleming, C. L.; Ashton, T. D.; Nowell, C.; Devlin, M.; Natoli, A.; Schreuders, J.; Pfeffer, F. M. A Fluorescent Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor for Cellular Imaging. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (37), 7827–7830. <https://doi.org/10.1039/C5CC02059J>.
- (253) Glozak, M. A.; Seto, E. Histone Deacetylases and Cancer. *Oncogene* **2007**, *26* (37), 5420–5432. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210610>.
- (254) Knutson, A. K.; Welsh, J.; Taylor, T.; Roy, S.; Wang, W.-L. W.; Tenniswood, M. Comparative Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on P53 Target Gene Expression, Cell Cycle and Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2012**, *27* (3), 849–853. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1590>.
- (255) FLUOR DE LYS® HDAC fluorometric activity assay kit - BML-AK500 - Enzo Life Sciences <https://www.enzolifesciences.com/BML-AK500/fluor-de-lys-hdac-fluorometric-activity-assay-kit/> (accessed 2021 -10 -13).
- (256) Halley, F.; Reinshagen, J.; Ellinger, B.; Wolf, M.; Niles, A. L.; Evans, N. J.; Kirkland, T. A.; Wagner, J. M.; Jung, M.; Gribbon, P.; Gul, S. A Bioluminogenic HDAC Activity Assay: Validation and Screening. *J. Biomol. Screen.* **2011**, *16* (10), 1227–1235. <https://doi.org/10.1177/1087057111416004>.
- (257) Fulda, S.; Debatin, K.-M. Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy. *Oncogene* **2006**, *25* (34), 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>.
- (258) Krammer, P. H. CD95's Deadly Mission in the Immune System. *Nature* **2000**, *407* (6805), 789–795. <https://doi.org/10.1038/35037728>.
- (259) Hengartner, M. O. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature* **2000**, *407* (6805), 770–776. <https://doi.org/10.1038/35037710>.
- (260) Kale, J.; Osterlund, E. J.; Andrews, D. W. BCL-2 Family Proteins: Changing Partners in the Dance towards Death. *Cell Death Differ.* **2018**, *25* (1), 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>.
- (261) Cory, S. Phosphatidylserine Hide-and-Seek. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (48), 12092–12094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817485115>.
- (262) Telford, W. G. Multiparametric Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2018**, *1678*, 167–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_10.
- (263) Zembruski, N. C. L.; Stache, V.; Haefeli, W. E.; Weiss, J. 7-Aminoactinomycin D for Apoptosis Staining in Flow Cytometry. *Anal. Biochem.* **2012**, *429* (1), 79–81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>.
- (264) Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A. The Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\psi_m$) in Apoptosis; an Update. *Apoptosis* **2003**, *8* (2), 115–128. <https://doi.org/10.1023/A:1022945107762>.
- (265) Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36* (3), 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>.
- (266) Feitelson, M. A.; Arzumanyan, A.; Kulathinal, R. J.; Blain, S. W.; Holcombe, R. F.; Mahajna, J.; Marino, M.; Martinez-Chantar, M. L.; Nawroth, R.; Sanchez-Garcia, I.; Sharma, D.; Saxena, N. K.; Singh, N.; Vlachostergios, P. J.; Guo, S.; Honoki, K.; Fujii, H.; Georgakilas, A. G.; Amedei, A.; Niccolai, E.; Amin, A.; Ashraf, S. S.; Boosani, C. S.; Guha, G.; Ciriolo, M. R.; Aquilano, K.; Chen, S.; Mohammed, S. I.; Azmi, A. S.; Bhakta, D.; Halicka, D.; Nowsheen, S. Sustained Proliferation in Cancer: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35* (Suppl), S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2015.02.006>.

- (267) Z, D.; G, J. DNA Content Measurement for DNA Ploidy and Cell Cycle Analysis. *Curr. Protoc. Cytom.* **2001**, Chapter 7. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0705s00>.
- (268) Ashby, W. J.; Zijlstra, A. Established and Novel Methods of Interrogating Two-Dimensional Cell Migration. *Integr. Biol.* **2012**, 4 (11), 1338–1350. <https://doi.org/10.1039/c2ib20154b>.
- (269) Liang, C.-C.; Park, A. Y.; Guan, J.-L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.
- (270) Chen, H.-C. Boyden Chamber Assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2005**, 294, 15–22. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:015>.
- (271) Friedl, P.; Locker, J.; Sahai, E.; Segall, J. E. Classifying Collective Cancer Cell Invasion. *Nat. Cell Biol.* **2012**, 14 (8), 777–783. <https://doi.org/10.1038/ncb2548>.
- (272) Matrigel Matrix | Extracellular Matrix | Corning <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html> (accessed 2021 -10 -14).
- (273) Moutasim, K. A.; Nystrom, M. L.; Thomas, G. J. Cell Migration and Invasion Assays. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*; Cree, I. A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 333–343. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_27.
- (274) Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A.-M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (20), 5912–5931. <https://doi.org/10.1021/jm050362n>.
- (275) Artese, A.; Cross, S.; Costa, G.; Distinto, S.; Parrotta, L.; Alcaro, S.; Ortuso, F.; Cruciani, G. Molecular Interaction Fields in Drug Discovery: Recent Advances and Future Perspectives. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2013**, 3 (6), 594–613. <https://doi.org/10.1002/wcms.1150>.
- (276) Pastor, M. Alignment-Independent Descriptors from Molecular Interaction Fields. In *Molecular Interaction Fields*; John Wiley & Sons, Ltd, 2005; pp 117–143. <https://doi.org/10.1002/3527607676.ch6>.
- (277) Fragment Libraries | FBDD screening compounds | Life Chemicals <https://lifechemicals.com/screening-libraries/fragment-libraries> (accessed 2021 -10 -19).
- (278) Jacobsen, J. A.; Fullagar, J. L.; Miller, M. T.; Cohen, S. M. Identifying Chelators for Metalloprotein Inhibitors Using a Fragment-Based Approach. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (2), 591–602. <https://doi.org/10.1021/jm101266s>.
- (279) Chen, K.; Xu, L.; Wiest, O. Computational Exploration of Zinc Binding Groups for HDAC Inhibition. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (10), 5051–5055. <https://doi.org/10.1021/jo400406g>.
- (280) Agrawal, A.; Johnson, S. L.; Jacobsen, J. A.; Miller, M. T.; Chen, L.-H.; Pellecchia, M.; Cohen, S. M. Chelator Fragment Libraries for Targeting Metalloproteinases. *ChemMedChem* **2010**, 5 (2), 195–199. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900516>.
- (281) Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52 (7), 1757–1768. <https://doi.org/10.1021/ci3001277>.
- (282) Baell, J. B.; Nissink, J. W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations. *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13 (1), 36–44. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00903>.
- (283) Pankaskie, M. C.; Small, L. The synthesis of 5,5'-diphenylhydantoin: A novel benzil-benzilic acid rearrangement <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed063p650> (accessed 2021 -10 -26). <https://doi.org/10.1021/ed063p650>.

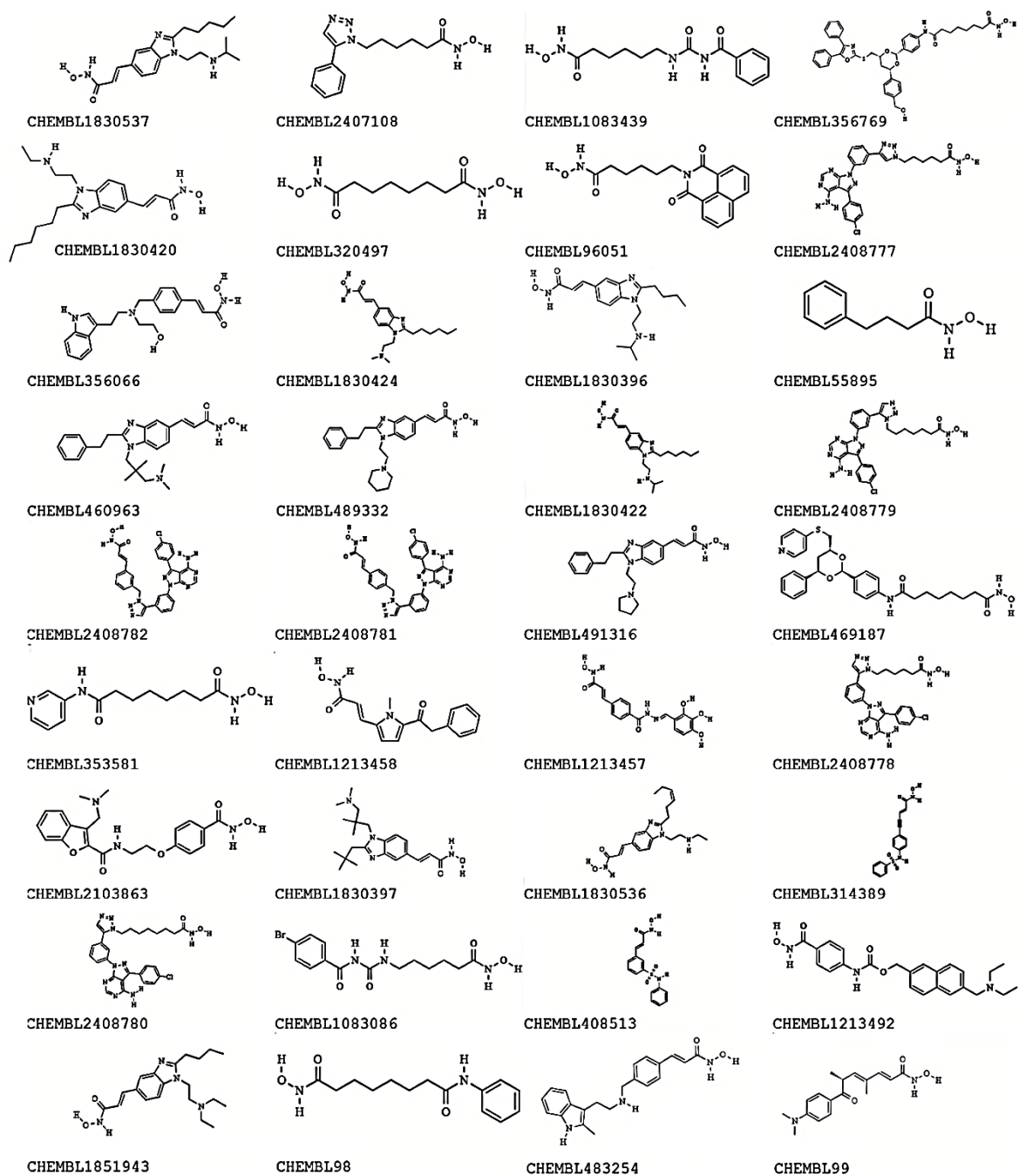
- (284) Aboeldahab, A. M. A.; Beshr, E. A. M.; Shoman, M. E.; Rabea, S. M.; Aly, O. M. Spirohydantoin and 1,2,4-Triazole-3-Carboxamide Derivatives as Inhibitors of Histone Deacetylase: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.021>.
- (285) Trivanović, D.; Jauković, A.; Krstić, J.; Nikolić, S.; Okić Djordjević, I.; Kukolj, T.; Obradović, H.; Mojsilović, S.; Ilić, V.; Santibanez, J. F.; Bugarski, D. Inflammatory Cytokines Prime Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells to Enhance Malignancy of MCF-7 Breast Cancer Cells via Transforming Growth Factor-B1. *IUBMB Life* **2016**, *68* (3), 190–200. <https://doi.org/10.1002/iub.1473>.
- (286) Ragno, R.; Simeoni, S.; Rotili, D.; Caroli, A.; Botta, G.; Brosch, G.; Massa, S.; Mai, A. Class II-Selective Histone Deacetylase Inhibitors. Part 2: Alignment-Independent GRIND 3-D QSAR, Homology and Docking Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43* (3), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.05.004>.
- (287) Pham-The, H.; Casañola-Martin, G.; Diéguez-Santana, K.; Nguyen-Hai, N.; Ngoc, N. T.; Vu-Duc, L.; Le-Thi-Thu, H. Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis and Virtual Screening Studies for Identifying HDAC2 Inhibitors from Known HDAC Bioactive Chemical Libraries. *SAR QSAR Environ. Res.* **2017**, *28* (3), 199–220. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2017.1294198>.
- (288) Kashyap, K.; Kakkar, R. An Insight into Selective and Potent Inhibition of Histone Deacetylase 8 through Induced-Fit Docking, Pharmacophore Modeling and QSAR Studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *38* (1), 48–65. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1567388>.
- (289) Kashyap, K.; Kakkar, R. Pharmacophore-Enabled Virtual Screening, Molecular Docking and Molecular Dynamics Studies for Identification of Potent and Selective Histone Deacetylase 8 Inhibitors. *Comput. Biol. Med.* **2020**, *123*, 103850. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103850>.
- (290) Sirous, H.; Campiani, G.; Brogi, S.; Calderone, V.; Chemi, G. Computer-Driven Development of an in Silico Tool for Finding Selective Histone Deacetylase 1 Inhibitors. *Mol. Basel Switz.* **2020**, *25* (8), E1952. <https://doi.org/10.3390/molecules25081952>.
- (291) Ruzic, D.; Petkovic, M.; Agbaba, D.; Ganesan, A.; Nikolic, K. Combined Ligand and Fragment-Based Drug Design of Selective Histone Deacetylase – 6 Inhibitors. *Mol. Inform.* **2019**, *38* (5), 1800083. <https://doi.org/10.1002/minf.201800083>.
- (292) Gaisina, I. N.; Tueckmantel, W.; Ugolkov, A.; Shen, S.; Hoffen, J.; Dubrovskiy, O.; Mazar, A.; Schoon, R. A.; Billadeau, D.; Kozikowski, A. P. Identification of HDAC6-Selective Inhibitors of Low Cancer Cell Cytotoxicity. *ChemMedChem* **2016**, *11* (1), 81–92. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500456>.
- (293) Schäfer, S.; Saunders, L.; Eliseeva, E.; Velena, A.; Jung, M.; Schwienhorst, A.; Strasser, A.; Dickmanns, A.; Ficner, R.; Schlimme, S.; Sippl, W.; Verdin, E.; Jung, M. Phenylalanine-Containing Hydroxamic Acids as Selective Inhibitors of Class IIb Histone Deacetylases (HDACs). *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (4), 2011–2033. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.092>.
- (294) Wassermann, A. M.; Kutchukian, P. S.; Lounkine, E.; Luethi, T.; Hamon, J.; Bocker, M. T.; Malik, H. A.; Cowan-Jacob, S. W.; Glick, M. Efficient Search of Chemical Space: Navigating from Fragments to Structurally Diverse Chemotypes. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8879–8891. <https://doi.org/10.1021/jm401309q>.
- (295) Hermant, P.; Bosc, D.; Piveteau, C.; Gealageas, R.; Lam, B.; Ronco, C.; Roignant, M.; Tolojanahary, H.; Jean, L.; Renard, P.-Y.; Lemdani, M.; Bourotte, M.; Herledan, A.; Bedart, C.; Biela, A.; Leroux, F.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R. Controlling Plasma Stability of Hydroxamic Acids: A MedChem Toolbox. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (21), 9067–9089. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01444>.

- (296) Patil, V.; Sodji, Q. H.; Kornacki, J. R.; Mrksich, M.; Oyelere, A. K. 3-Hydroxypyridin-2-Thione as Novel Zinc Binding Group for Selective Histone Deacetylase Inhibition. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (9), 3492–3506. <https://doi.org/10.1021/jm301769u>.
- (297) Li, Y.; Woster, P. M. Discovery of a New Class of Histone Deacetylase Inhibitors with a Novel Zinc Binding Group. *MedChemComm* **2015**, *6* (4), 613–618. <https://doi.org/10.1039/C4MD00401A>.
- (298) Goracci, L.; Deschamps, N.; Randazzo, G. M.; Petit, C.; Dos Santos Passos, C.; Carrupt, P.-A.; Simões-Pires, C.; Nurisso, A. A Rational Approach for the Identification of Non-Hydroxamate HDAC6-Selective Inhibitors. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 29086. <https://doi.org/10.1038/srep29086>.
- (299) Banerjee, S.; Adhikari, N.; Amin, S. A.; Jha, T. Histone Deacetylase 8 (HDAC8) and Its Inhibitors with Selectivity to Other Isoforms: An Overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 214–240. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.039>.
- (300) Wagner, F. F.; Olson, D. E.; Gale, J. P.; Kaya, T.; Weïwer, M.; Aidoud, N.; Thomas, M.; Davoine, E. L.; Lemercier, B. C.; Zhang, Y.-L.; Holson, E. B. Potent and Selective Inhibition of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Does Not Require a Surface-Binding Motif. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (4), 1772–1776. <https://doi.org/10.1021/jm301355j>.
- (301) Bergman, J. A.; Woan, K.; Perez-Villarroel, P.; Villagra, A.; Sotomayor, E. M.; Kozikowski, A. P. Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Bearing Substituted Urea Linkers Inhibit Melanoma Cell Growth. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9891–9899. <https://doi.org/10.1021/jm301098e>.
- (302) Gul S. Epigenetic assays for chemical biology and drug discovery. *Clin. Epigenetics.* **2017**, *9.1*: 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0342-6>.
- (303) Park, S. Y.; Jun, J. A.; Jeong, K. J.; Heo, H. J.; Sohn, J. S.; Lee, H. Y.; Park, C. G.; Kang, J. Histone Deacetylases 1, 6 and 8 Are Critical for Invasion in Breast Cancer. *Oncol. Rep.* **2011**, *25* (6), 1677–1681. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1236>.
- (304) Low, F. G.; Shabir, K.; Brown, J. E.; Bill, R. M.; Rothnie, A. J. Roles of ABCC1 and ABCC4 in Proliferation and Migration of Breast Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (20), 7664. <https://doi.org/10.3390/ijms21207664>.
- (305) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12* (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- (306) Ghersi, D.; Willson, M. L.; Chan, M. M. K.; Simes, J.; Donoghue, E.; Wilcken, N. Taxane-containing Regimens for Metastatic Breast Cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, No. 6. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003366.pub3>.
- (307) Holliday, D. L.; Speirs, V. Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13* (4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>.
- (308) Wang, Y.; Wallach, J.; Duane, S.; Wang, Y.; Wu, J.; Wang, J.; Adejare, A.; Ma, H. Developing Selective Histone Deacetylases (HDACs) Inhibitors through Ebselen and Analogs. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 1369–1382. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S124977>.
- (309) KrennHrubec, K.; Marshall, B. L.; Hedglin, M.; Verdin, E.; Ulrich, S. M. Design and Evaluation of ‘Linkerless’ Hydroxamic Acids as Selective HDAC8 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (10), 2874–2878. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.02.064>.
- (310) Mazitschek, R.; Patel, V.; Wirth, D. F.; Clardy, J. Development of a Fluorescence Polarization Based Assay for Histone Deacetylase Ligand Discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (9), 2809–2812. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.04.007>.
- (311) Kemp, M. M.; Wang, Q.; Fuller, J. H.; West, N.; Martinez, N. M.; Morse, E. M.; Weïwer, M.; Schreiber, S. L.; Bradner, J. E.; Koehler, A. N. A Novel HDAC Inhibitor with a Hydroxy-Pyrimidine Scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (14), 4164–4169. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.098>.
- (312) Olson, D. E.; Wagner, F. F.; Kaya, T.; Gale, J. P.; Aidoud, N.; Davoine, E. L.; Lazzaro, F.; Weïwer, M.; Zhang, Y.-L.; Holson, E. B. Discovery of the First Histone Deacetylase 6/8

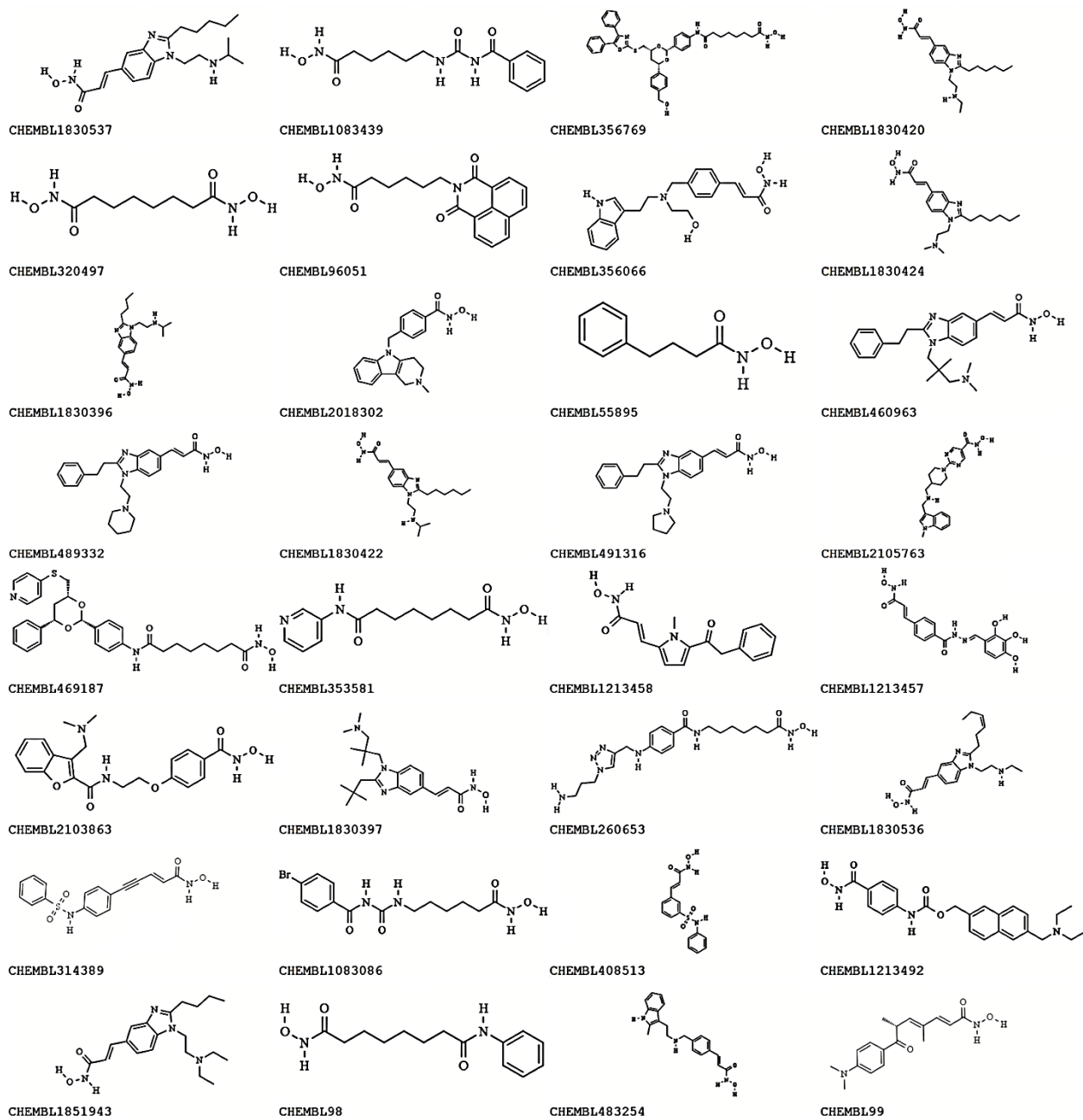
- Dual Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (11), 4816–4820.
<https://doi.org/10.1021/jm400390r>.
- (313) Giannini, G.; Vesce, L.; Battistuzzi, G.; Vignola, D.; Milazzo, F. M.; Guglielmi, M. B.; Barbarino, M.; Santaniello, M.; Fantò, N.; Mor, M.; Rivara, S.; Pala, D.; Taddei, M.; Pisano, C.; Cabri, W. ST7612AA1, a Thioacetate- ω (γ -Lactam Carboxamide) Derivative Selected from a Novel Generation of Oral HDAC Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8358–8377. <https://doi.org/10.1021/jm5008209>.
- (314) Muthyala, R.; Shin, W. S.; Xie, J.; Sham, Y. Y. Discovery of 1-Hydroxypyridine-2-Thiones as Selective Histone Deacetylase Inhibitors and Their Potential Application for Treating Leukemia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (19), 4320–4324.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.07.065>.
- (315) Spencer, J.; Amin, J.; Wang, M.; Packham, G.; Alwi, S. S. S.; Tizzard, G. J.; Coles, S. J.; Paranal, R. M.; Bradner, J. E.; Heightman, T. D. Synthesis and Biological Evaluation of JAHAs: Ferrocene-Based Histone Deacetylase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2* (5), 358–362. <https://doi.org/10.1021/ml100295v>.
- (316) Jones, P.; Bottomley, M. J.; Carfi, A.; Cecchetti, O.; Ferrigno, F.; Lo Surdo, P.; Ontoria, J. M.; Rowley, M.; Scarpelli, R.; Schultz-Fademrecht, C.; Steinkühler, C. 2-Trifluoroacetylthiophenes, a Novel Series of Potent and Selective Class II Histone Deacetylase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (11), 3456–3461.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.02.026>.

7. PRILOZI

7.1. Hemijske strukture HDAC1 inhibitora korišćenih za pripremu 3D-QSAR modela



7.2. Hemijske strukture HDAC6 inhibitora korišćenih za pripremu 3D-QSAR modela



7.3. **Tabela P1.** Prikaz eksperimentalnih i modelom predviđenih pK_i vrednosti za HDAC1 3D-QSAR model

Training set jedinjenja	pK_{iHDAC1} (eksperimentalne)	pK_{iHDAC1} (predviđene)	Rezidualne vrednosti
CHEMBL1083086	8,097	7,624	0,473
CHEMBL1213457	6,921	7,273	-0,352
CHEMBL1213458	7,260	7,832	-0,572
CHEMBL1213492	8,699	8,867	-0,168
CHEMBL1830420	7,959	8,036	-0,077
CHEMBL1830422	7,699	7,964	-0,265
CHEMBL1830536	8,114	8,116	-0,002
CHEMBL1830537	8,000	7,999	0,001
CHEMBL1851943	7,553	7,264	0,289
CHEMBL2407108	7,347	7,192	0,155
CHEMBL2408777	9,208	8,861	0,347
CHEMBL2408778	9,585	9,982	-0,397
CHEMBL2408780	8,009	8,049	-0,040
CHEMBL2408781	7,456	7,832	-0,376
CHEMBL2408782	7,638	7,254	0,384
CHEMBL314389	8,886	8,395	0,491
CHEMBL353581	8,569	8,887	-0,318
CHEMBL356066	9,222	9,418	-0,196
CHEMBL356769	6,486	6,513	-0,027
CHEMBL408513	9,046	9,056	-0,010
CHEMBL460963	7,824	7,655	0,169
CHEMBL469187	7,056	7,050	0,006
CHEMBL491316	7,959	8,079	-0,120
CHEMBL55895	6,530	7,117	-0,587
CHEMBL96051	8,824	8,500	0,324
CHEMBL98	8,886	8,790	0,096
CHEMBL99	9,699	9,342	0,357

Test set jedinjenja	pK_{iHDAC1} (eksperimentalne)	pK_{iHDAC1} (predviđene)	Rezidualne vrednosti
CHEMBL1083439	7,796	7,650	0,146
CHEMBL1830396	7,585	7,896	-0,311
CHEMBL1830397	7,620	7,788	-0,168
CHEMBL1830424	7,721	8,146	-0,425
CHEMBL2103863	8,155	8,188	-0,033
CHEMBL2408779	9,086	9,194	-0,108
CHEMBL320497	7,721	8,259	-0,538
CHEMBL483254	9,000	8,818	0,182
CHEMBL489332	7,921	8,078	-0,157

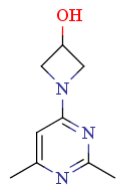
7.4. **Tabela P2.** Prikaz eksperimentalnih i modelom predviđenih pK_i vrednosti za HDAC6 3D-QSAR model

Training set jedinjenja	pK_{iHDAC6} (eksperimentalne)	pK_{iHDAC6} (predviđene)	Rezidualne vrednosti
CHEMBL1083086	8,097	8,038	0,059
CHEMBL1213457	7,495	7,261	0,234
CHEMBL1213458	7,523	8,058	-0,535
CHEMBL1213492	8,377	8,234	0,143
CHEMBL1830396	6,648	6,491	0,157
CHEMBL1830397	7,027	7,176	-0,149
CHEMBL1830422	6,458	6,137	0,321
CHEMBL1830424	6,523	6,183	0,340
CHEMBL1830536	8,398	8,363	0,035
CHEMBL1851943	6,607	6,756	-0,149
CHEMBL2018302	8,481	8,400	0,081
CHEMBL2103863	7,770	8,088	-0,318
CHEMBL260653	8,180	8,470	-0,290
CHEMBL314389	6,867	7,247	-0,380
CHEMBL320497	7,839	8,109	-0,270
CHEMBL356066	8,022	8,299	-0,277
CHEMBL356769	9,046	9,006	0,040
CHEMBL408513	8,796	8,727	0,069
CHEMBL460963	7,638	7,772	-0,134
CHEMBL483254	8,824	8,293	0,531
CHEMBL491316	7,699	7,822	-0,123
CHEMBL55895	6,824	7,258	-0,434
CHEMBL96051	9,602	9,034	0,568
CHEMBL99	9,000	8,580	0,420

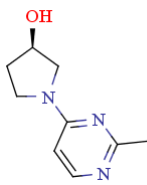
Test set jedinjenja	pK_{iHDAC6} (eksperimentalne)	pK_{iHDAC6} (predviđene)	Rezidualne vrednosti
CHEMBL1083439	8,155	8,414	-0,259
CHEMBL1830420	6,550	6,184	0,366
CHEMBL1830537	6,644	6,320	0,324
CHEMBL2105763	7,772	8,395	-0,623
CHEMBL353581	8,319	8,161	0,158
CHEMBL469187	7,553	7,796	-0,243
CHEMBL489332	7,569	7,536	0,033
CHEMBL98	8,796	8,406	0,390

7.5. Prikaz izdvojenih fragmenata iz *General Fragment Library* i *Epigenetic Targeted Library*

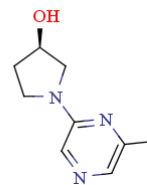
Odabrani fragmenti iz *General Fragment Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti S_{tot} od vrednosti za 1,8-naftalimid



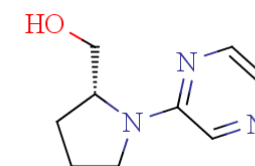
IDNUMBER: F6541-0378



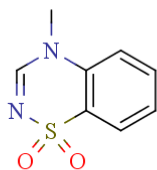
IDNUMBER: F6541-4769



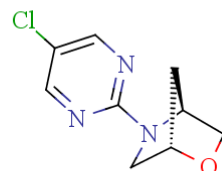
IDNUMBER: F6541-4772



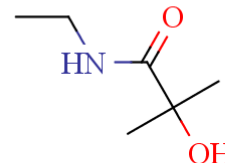
IDNUMBER: F6541-4526



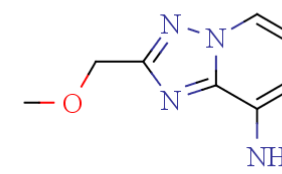
IDNUMBER: F1605-0386



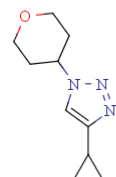
IDNUMBER: F6543-1965



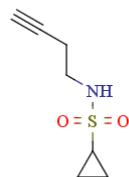
IDNUMBER: F8886-3244



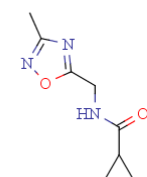
IDNUMBER: F6609-8288



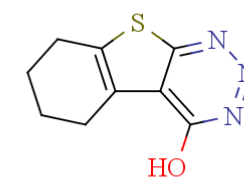
IDNUMBER: F6572-1357



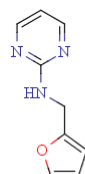
IDNUMBER: F6217-0384



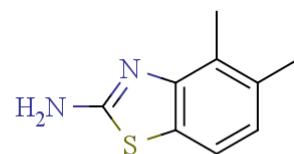
IDNUMBER: F5871-3607



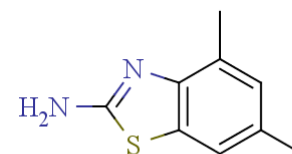
IDNUMBER: F1475-0032



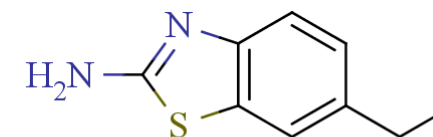
IDNUMBER: F6541-3383



IDNUMBER: F1911-0025

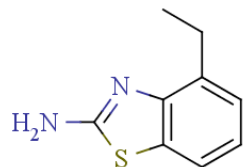


IDNUMBER: F1911-0026

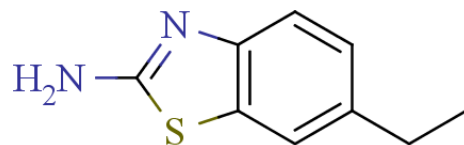


IDNUMBER: F0920-6929

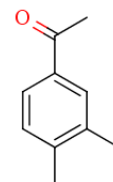
Odabrani fragmenti iz *General Fragment Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti S_{tot} od vrednosti za 1,8-naftalimid



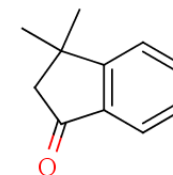
IDNUMBER: F1911-0002



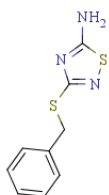
IDNUMBER: F1911-0011



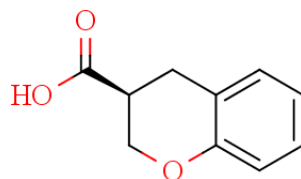
IDNUMBER: F9995-0151



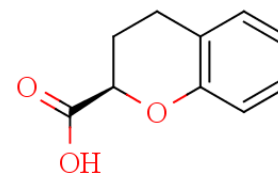
IDNUMBER: F8880-3126



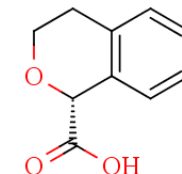
IDNUMBER: F2158-0566



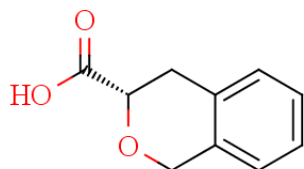
IDNUMBER: F2147-1735



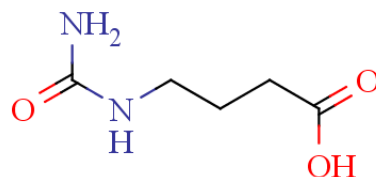
IDNUMBER: F2108-0136



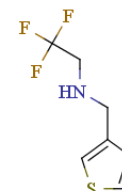
IDNUMBER: F0914-7167



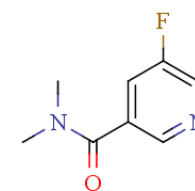
IDNUMBER: F2147-1238



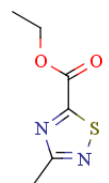
IDNUMBER: F3250-0724



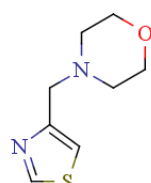
IDNUMBER: F2189-0613



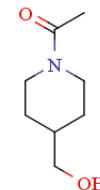
IDNUMBER: F6572-0933



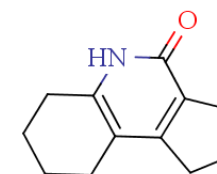
IDNUMBER: F9995-1829



IDNUMBER: F1905-0127

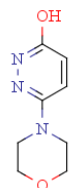


IDNUMBER: F1905-0270

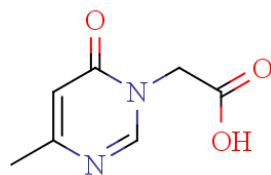


IDNUMBER: F6170-0026

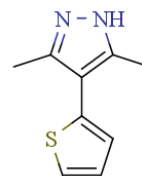
Odabrani fragmenti iz *General Fragment Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti S_{tot} od vrednosti za 1,8-naftalimid



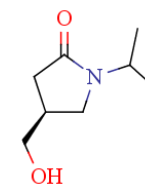
IDNUMBER: F1967-0428



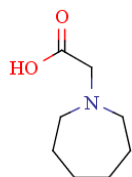
IDNUMBER: F1967-0259



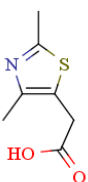
IDNUMBER: F2198-8597



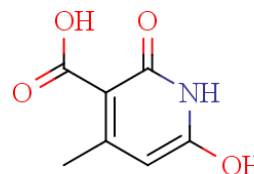
IDNUMBER: F2147-0248



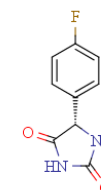
IDNUMBER: F1981-0007



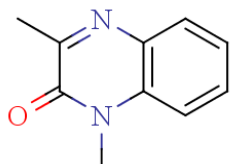
IDNUMBER: F3099-7071



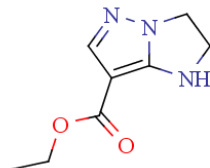
IDNUMBER: F3250-0688



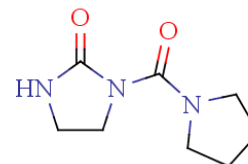
IDNUMBER: F2147-0649



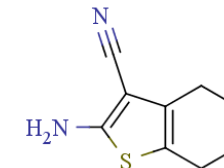
IDNUMBER: F0914-1180



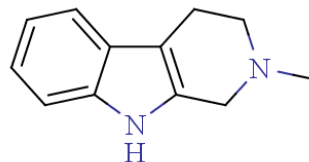
IDNUMBER: F8888-8736



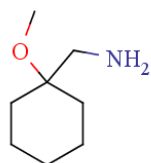
IDNUMBER: F6541-1394



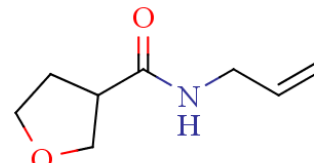
IDNUMBER: F0016-0385



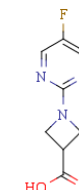
IDNUMBER: F1905-8574



IDNUMBER: F8880-3528

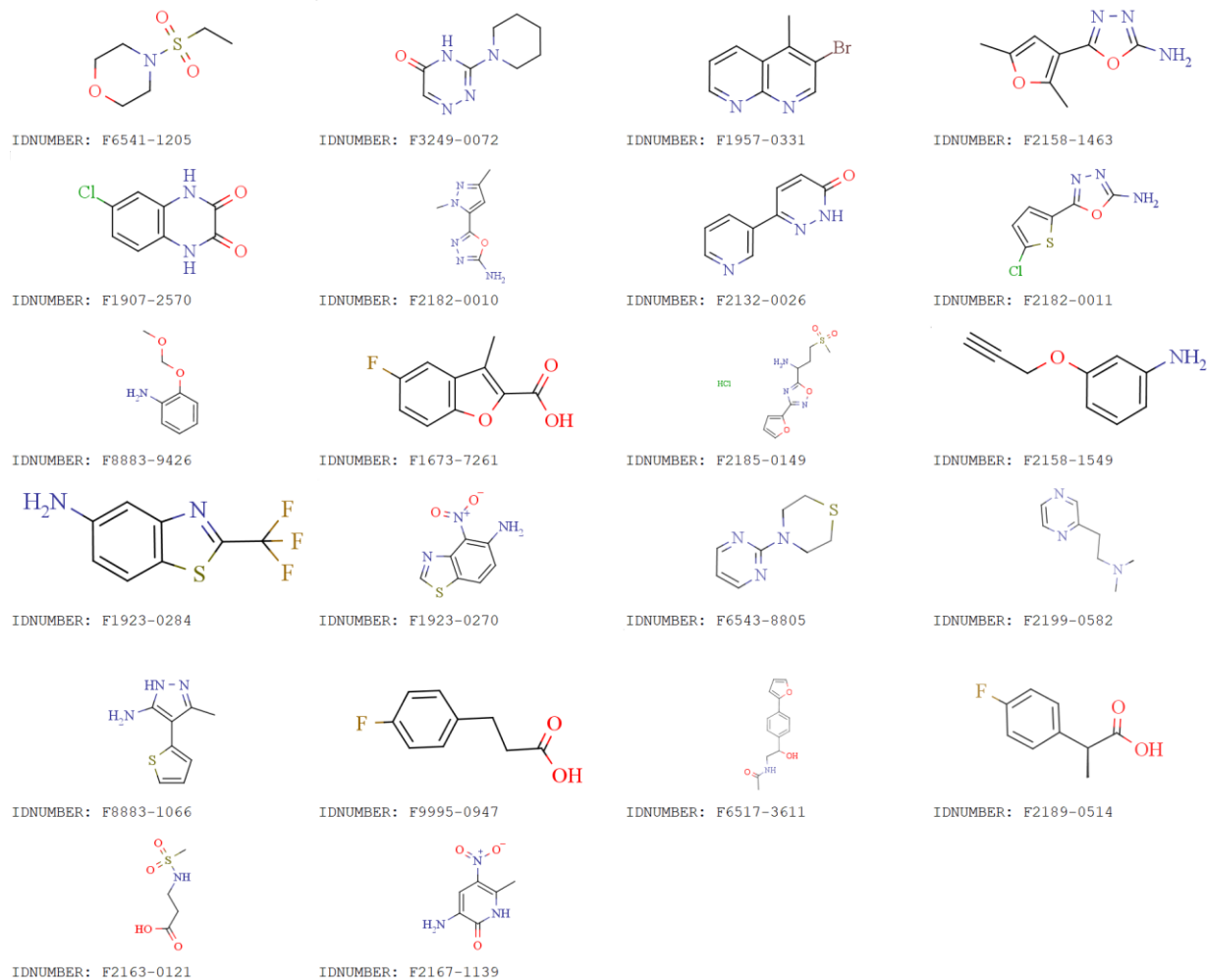


IDNUMBER: F6541-3147

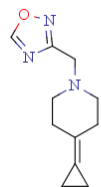


IDNUMBER: F2158-1842

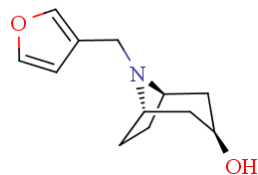
Odabrani fragmenti iz *General Fragment Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti S_{tot} od vrednosti za 1,8-naftalimid



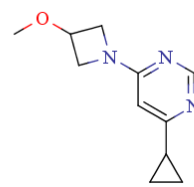
Odabrani fragmenti iz *General Fragment Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti Vx od vrednosti za 1,8-naftalimid



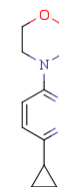
F6540-6688



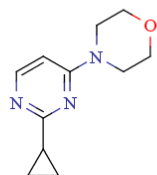
F6541-0216



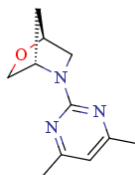
F6540-3824



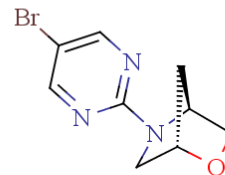
F6541-1093



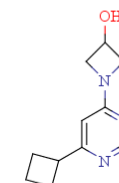
F6541-1094



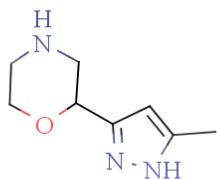
F6543-1961



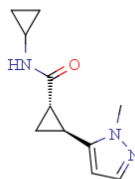
F6543-1962



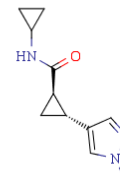
F6541-0353



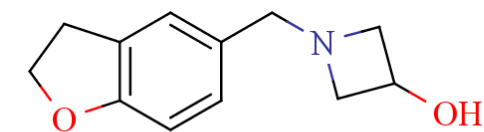
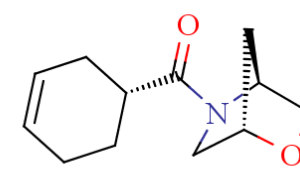
F6545-6670



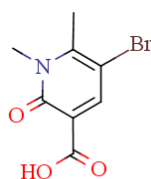
F6545-6673



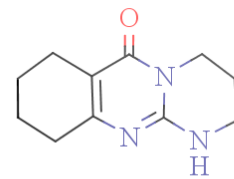
F6554-2002



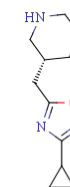
F6541-0398



F8888-3580

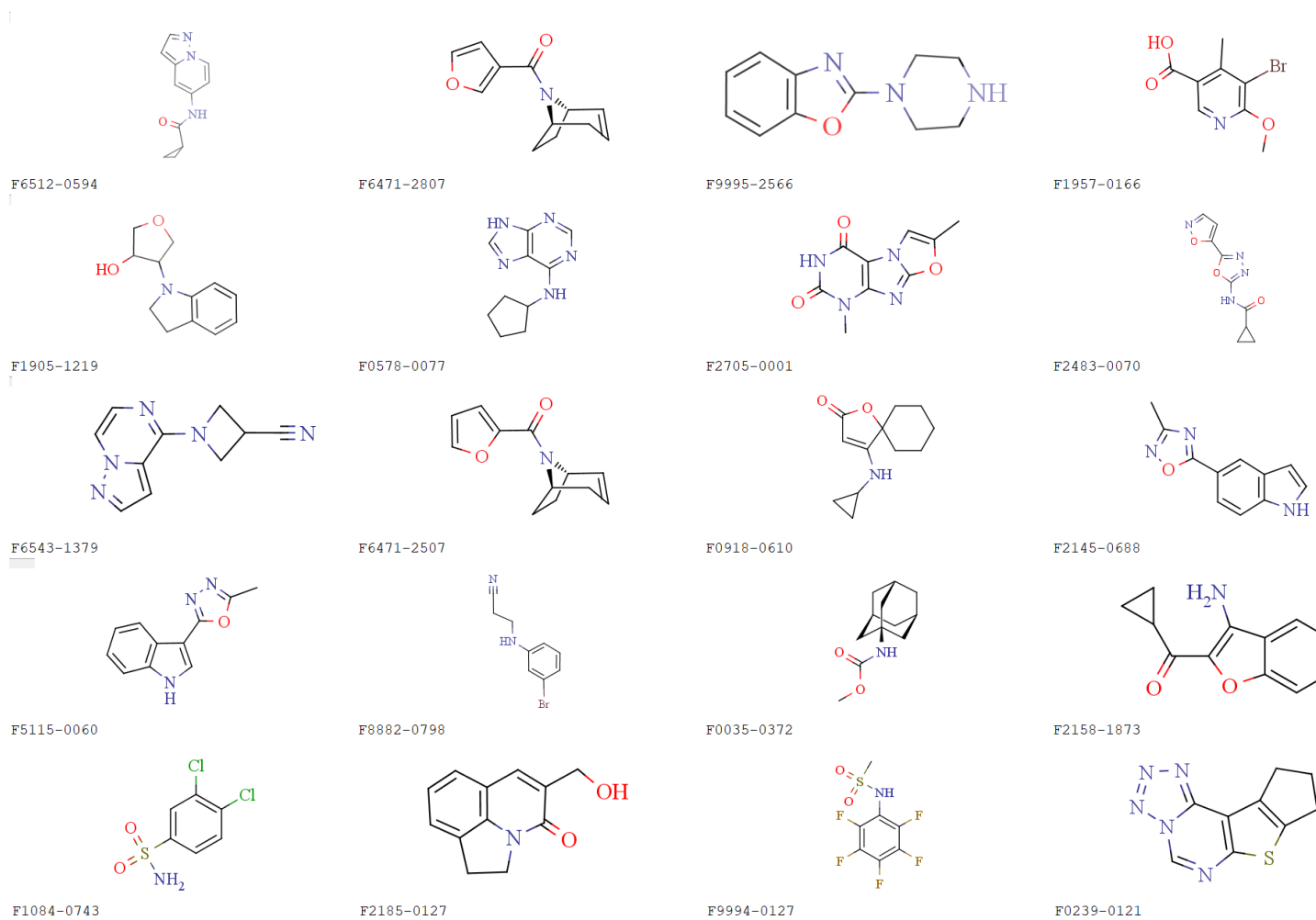


F1902-0052

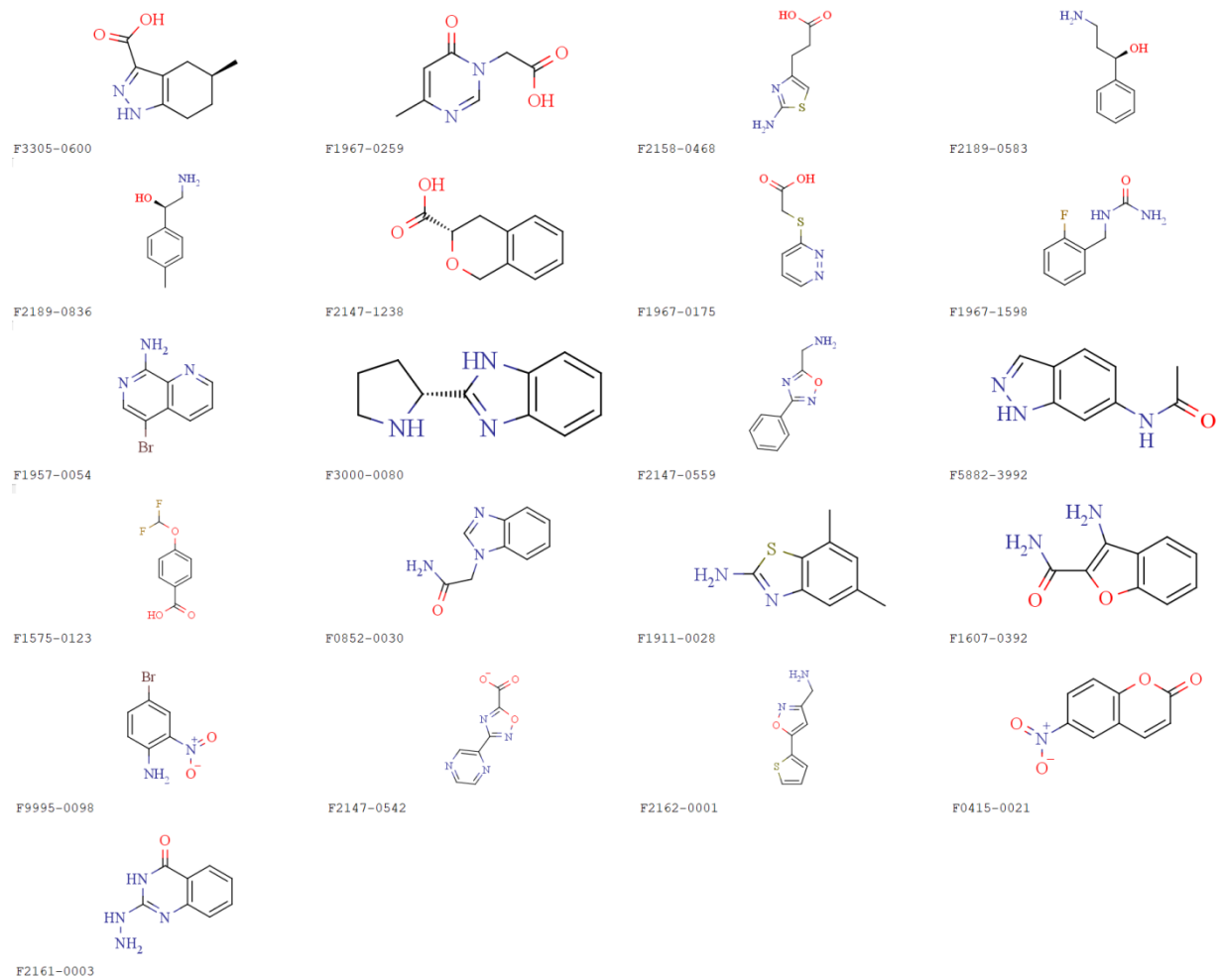


F1907-2276

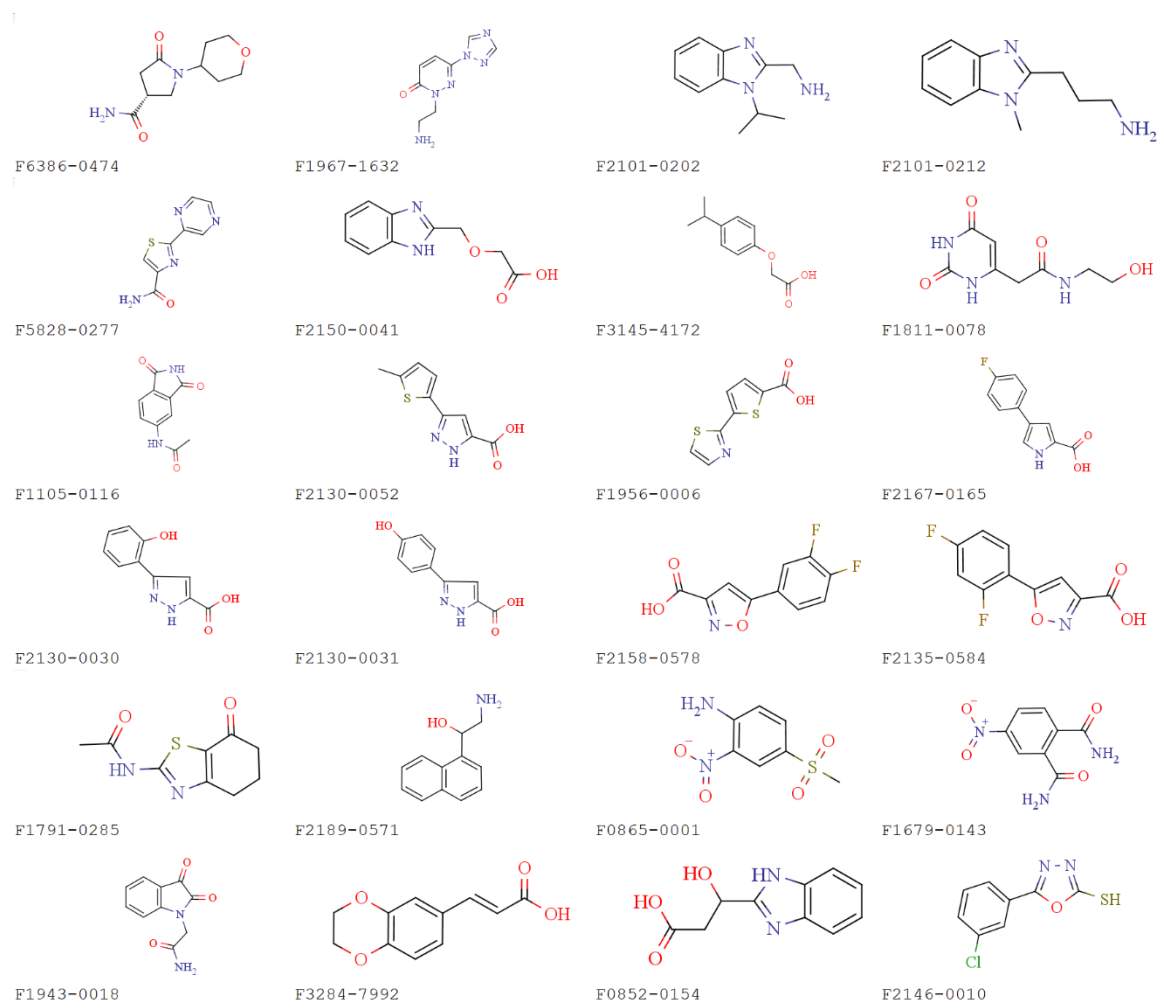
Odabrani fragmenti iz *General Fragment Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti Vx od vrednosti za 1,8-naftalimid



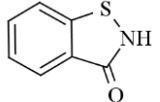
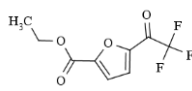
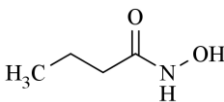
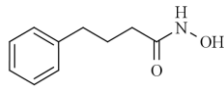
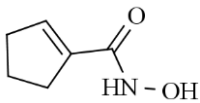
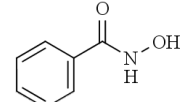
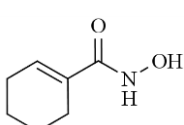
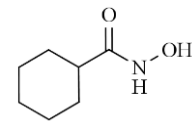
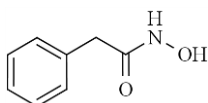
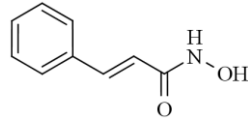
Odabrani fragmenti iz *Epigenetic Targeted Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti S_{tot} od vrednosti za 1,8-naftalimid

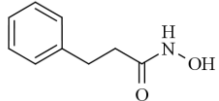
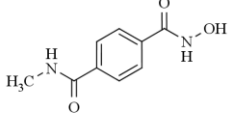
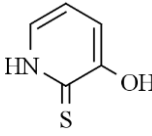
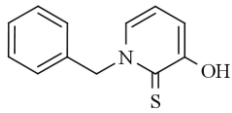
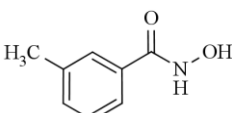
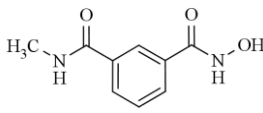
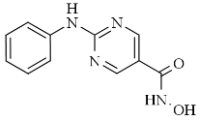
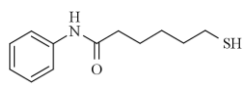
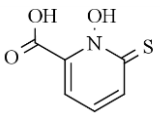
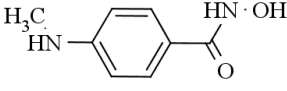


Odabrani fragmenti iz *Epigenetic Targeted Library* koji imaju jednake ili veće vrednosti Vx od vrednosti za 1,8-naftalimid

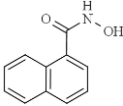
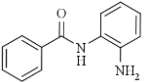
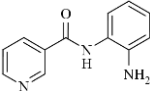
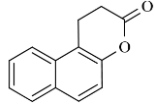
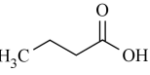
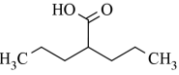
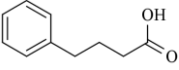
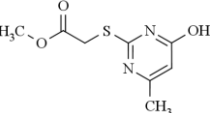
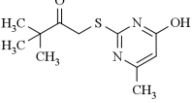
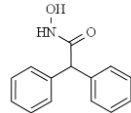


7.6. **Tabela P3.** Prikaz metalnih helatora – fragmenata koji su inhibitori humane histon deacetilaze 6

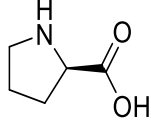
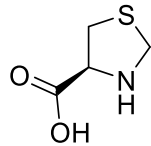
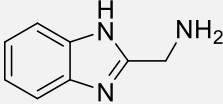
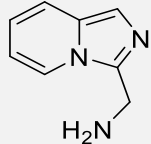
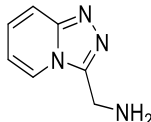
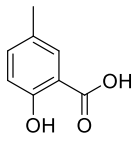
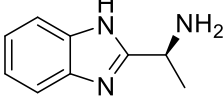
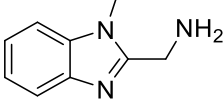
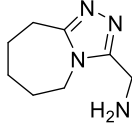
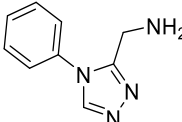
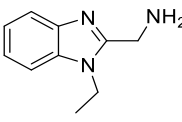
Aktivni fragmenti	Inhibicija HDAC6 izoforme IC ₅₀ (μ M)	Referenca
 CHEMBL297304	3.200	308
 CHEMBL496703	0.550	309
 CHEMBL1672332	2.000	310
 CHEMBL55895	0.500	310
 CHEMBL2333346	0.030	311
 CHEMBL16300	0.115	311
 CHEMBL2333344	0.012	311
 CHEMBL2333345	0.376	311
 CHEMBL152665	1.100	311
 CHEMBL154574	0.022	311

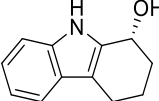
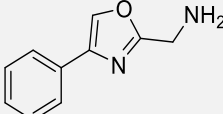
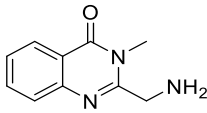
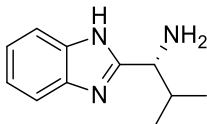
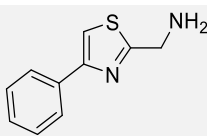
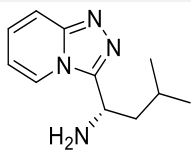
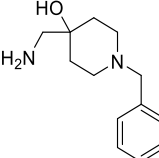
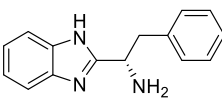
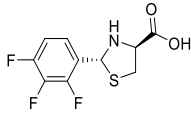
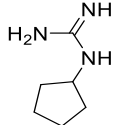
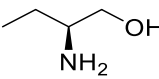
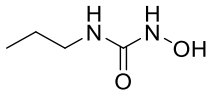
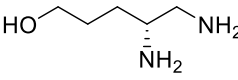
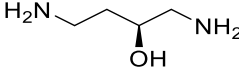
 CHEMBL152162	0.448	311
 CHEMBL2333343	0.028	311
 CHEMBL2337874	0.681	300
 CHEMBL2337875	0.457	300
 CHEMBL2381522	0.650	296
 CHEMBL2381521	2.500	296
 CHEMBL3652225	0.007	312
 CHEMBL109654	0.067	313
 CHEMBL3617543	0.150	314
 CHEMBL3415449	1.770	315

7.7. **Tabela P4.** Prikaz neaktivnih fragmenata na HDAC6 izoformi

Neaktivni fragmenti	Inhibicija HDAC6 izoforme IC ₅₀ (μM)	Referenca
 CHEMBL115468	> 100	309
 CHEMBL405072	>50	316
 CHEMBL236678	>50	316
 CHEMBL86537	>75	314
 CHEMBL14227	>2000	315
 CHEMBL109	>2000	315
 CHEMBL1469	>240	315
 CHEMBL1800380	>100	311
 CHEMBL1800382	>100	311
 CHEMBL396097	>11000	238

7.8. Tabela P5. Vrednosti ChemScore funkcije vrednovanja za dokovane fragmente

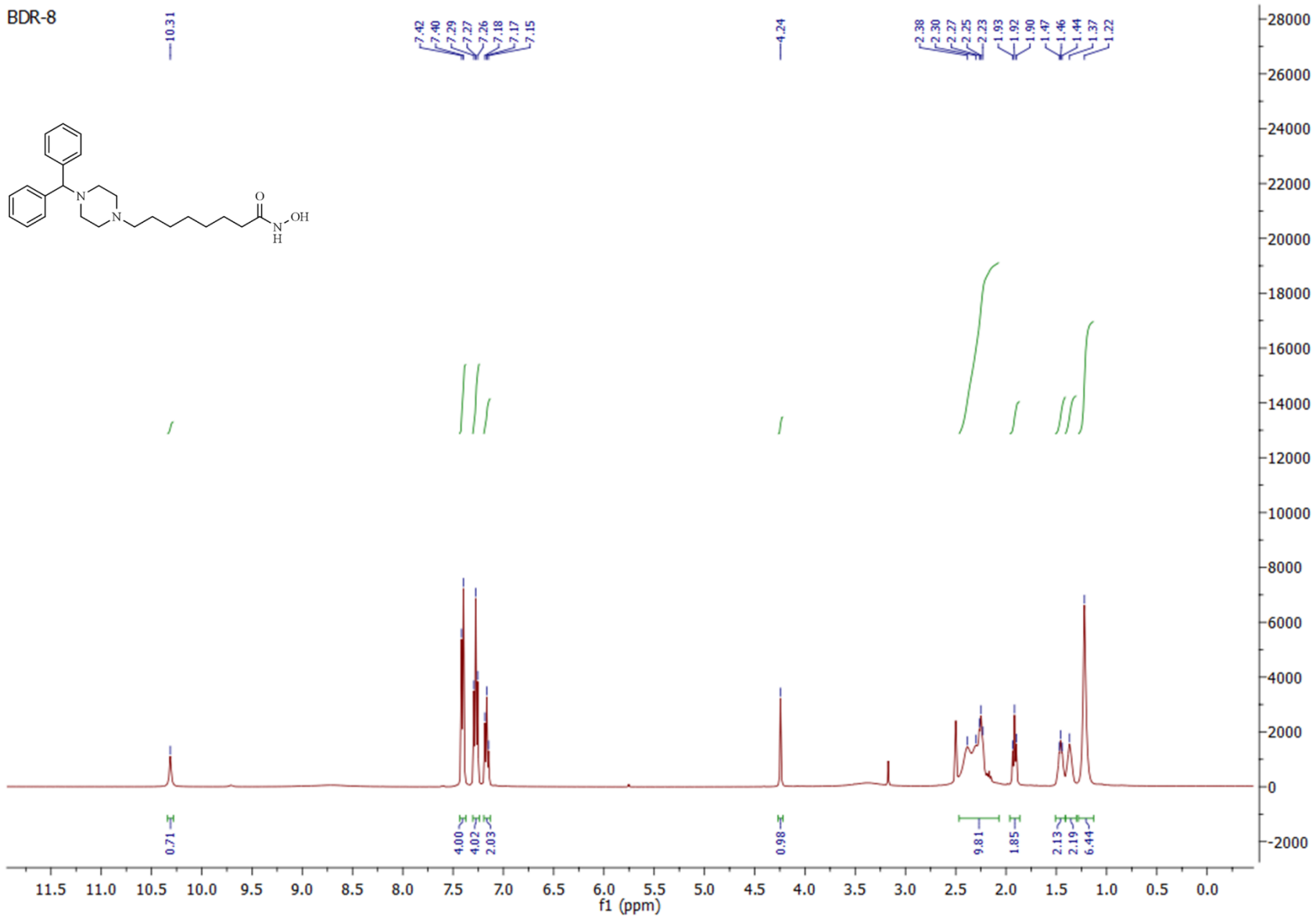
Redni broj	Hemijska struktura fragmenta	ChemScore funkcija vrednovanja (CSFF)			
		HDAC6	HDAC1	HDAC4	HDAC8
1		28.4898 N.K.	25.8847	22.9649	23.8009
2		24.9111 N.K.	23.1529	20.4474	19.2576
3		36.4746	29.9944	30.2654	34.8795
4		31.1332	25.4694	30.3946	28.4444
5		26.874	23.4472	29.3	25.3496
6		27.7006 N.K.	26.4165	26.5247	26.7527
7		36.5756	31.0949	29.5388	36.8017
8		28.6316	24.1322	32.0201	26.884
9		26.9698	21.7664	30.3481	24.874
10		25.1263	18.3045	27.7834	17.9162
11		24.0346	22.1933	31.3893	25.5807

12		27.5129 N.K.	26.2177	33.1004	25.563
13		32.0564	27.4713	29.2428	30.5287
14		20.2314 N.K.	17.7689	27.9519	20.3135
15		32.4989 N.K.	31.3672	28.8355	35.3856
16		32.8812	29.9679 I.P.	30.3291	32.3168 N.K.
17		18.3583	26.9367	31.5964	24.9839
18		32.7814	30.7632	38.0532	35.8265
19		24.5787 I.P.	34.3652	35.7917	28.8893
20		22.9226	18.391	24.9745	22.6788
21		23.5607 N.K.	23.2955	23.4662	24.0005
22		28.2003	24.3939	26.7005	29.7439
23		26.4268	23.9569	21.899	26.317
24		28.6551	25.4213	29.7456	30.341
25		27.245	25.8947	31.5518	32.2114

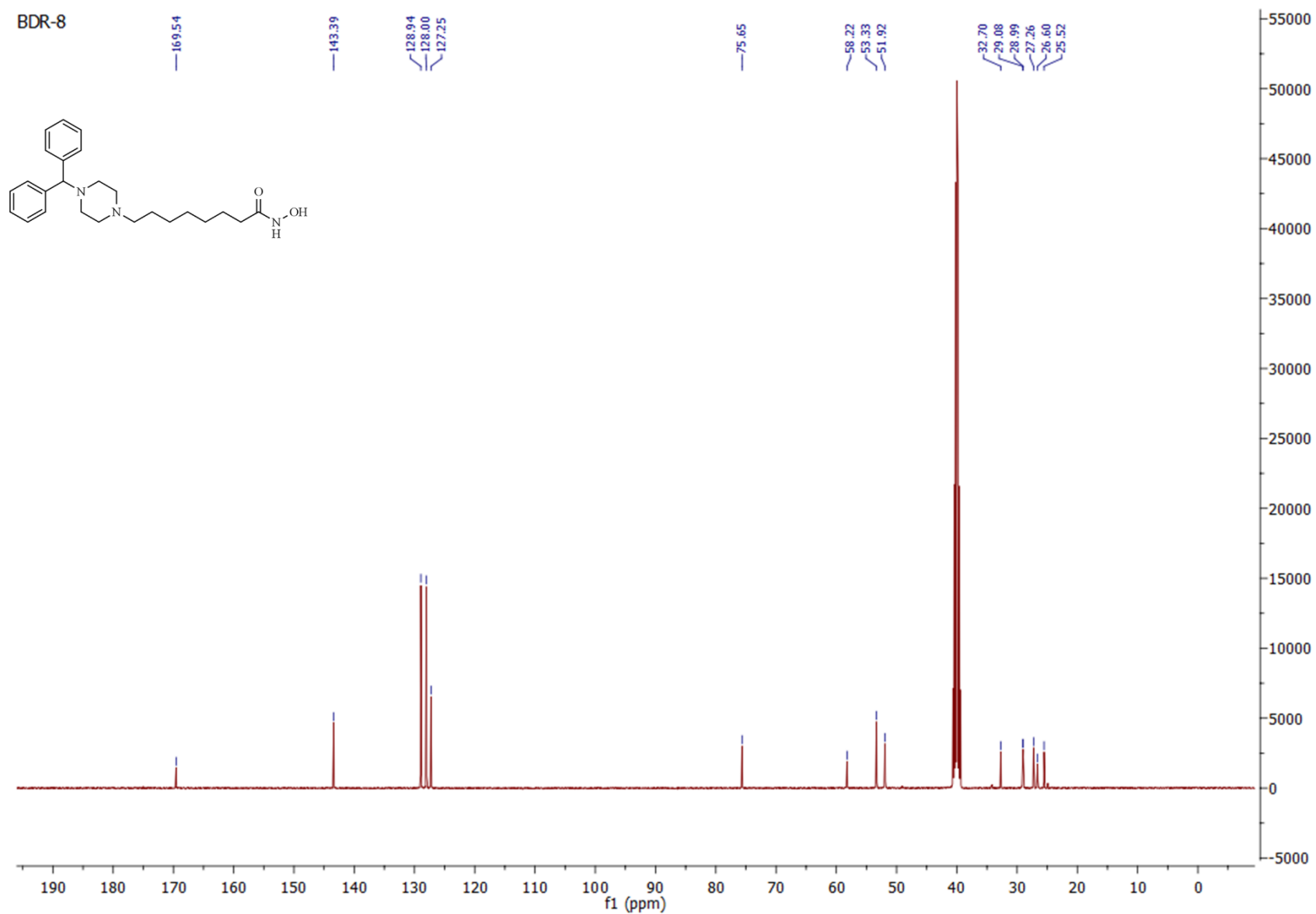
26		32.0273	24.1715	30.4741	32.6607
27		23.4205	19.2296	25.4829	23.3816
28		22.2478	18.7455	23.9045	24.1831
29		27.155	23.2101	27.6446	31.3194
30		22.5205	22.139	26.419	24.9152
31		28.7253	22.7752	30.1798	27.587
32		31.0196	24.4202	32.3626	31.2097
33		29.318 N.K.	23.7895	28.9713	33.5766
34		25.0866 N.K.	24.4708	27.4372	25.6845
35		27.3541	21.6326	26.5015	26.6982
36		22.1585	18.412	30.3597	25.7811
37		26.2223	21.0125	28.8447	28.5766
38		24.3948	23.4907	29.9866	26.2142
39		29.3988	24.7666	29.066	30.9126
40		27.3399	25.4547	30.3512	30.8412
BHA		31.6326	29.1091	26.1487	30.9807

N.K. označava da fragment ne koordinira jone Zn^{2+} unutar katalitičkog džepa HDAC6; IP označava da je poza fragmenta invertovana (heteroatomi su udaljeni od katalitičkog jona Zn^{2+})

7.9. Prikaz NMR spektara jedinjenja BDR-8 ¹HNMR spektar jedinjenja BDR-8

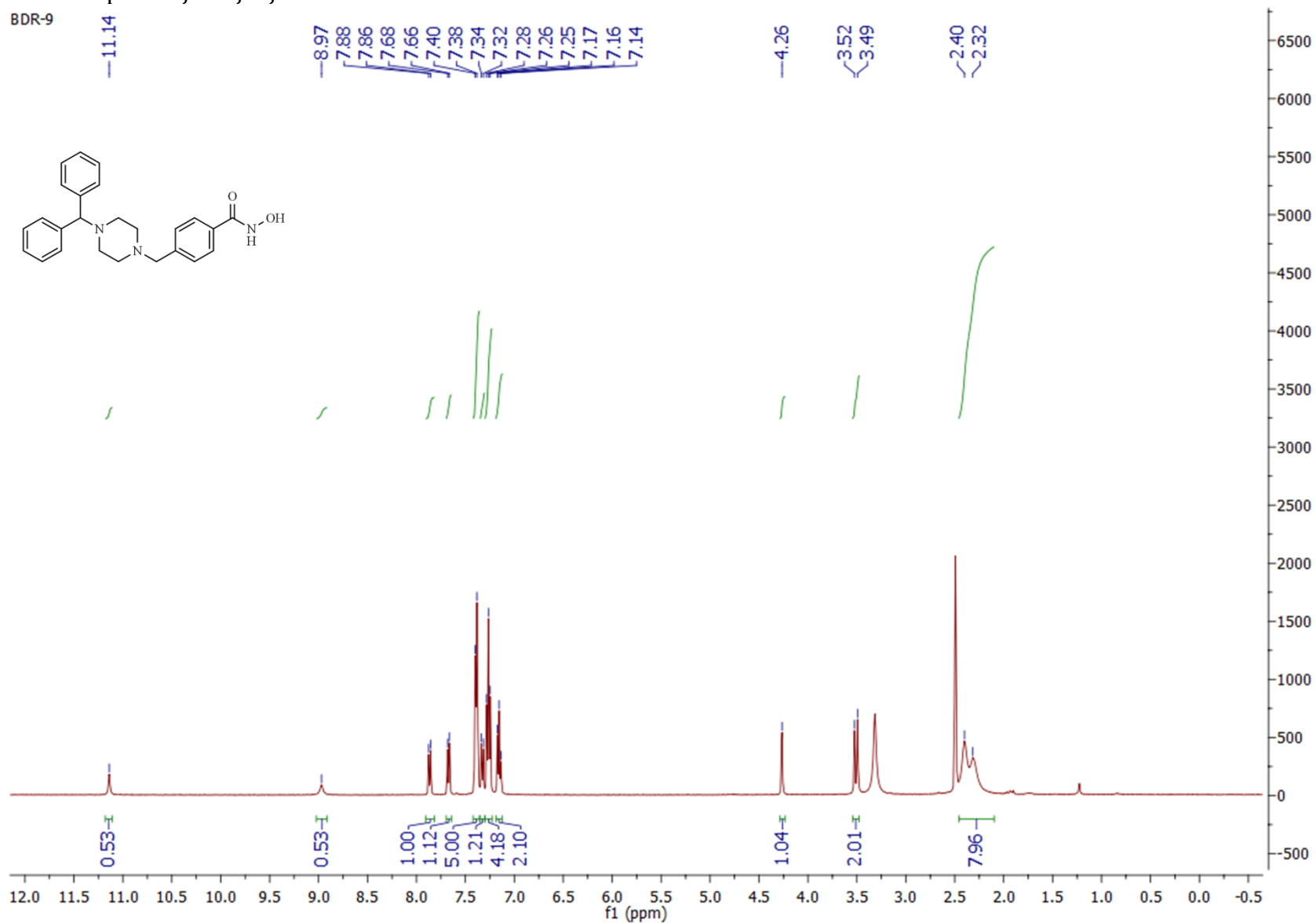


¹³CNMR spektra jedinjenja BDR-8

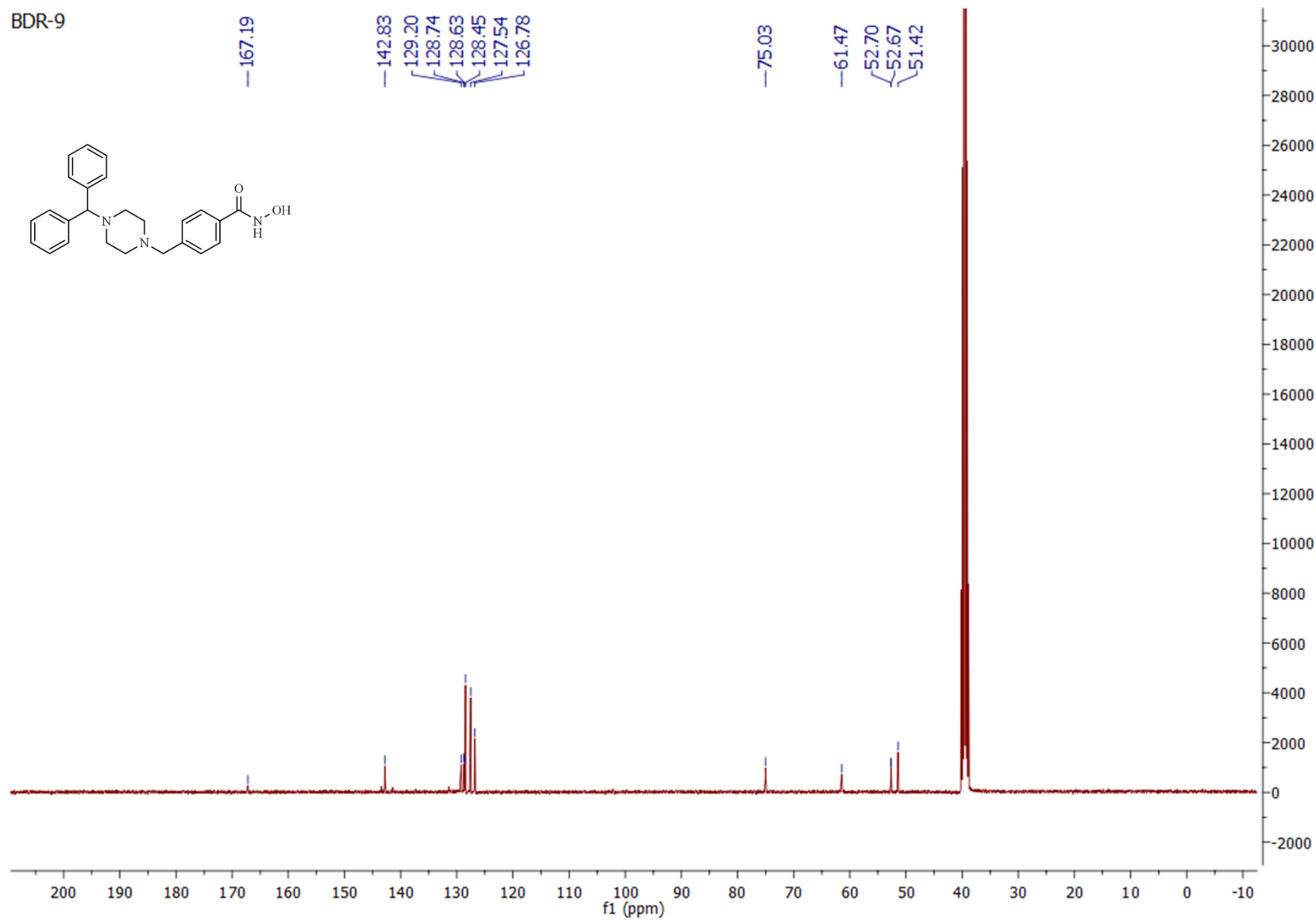


7.10. Prikaz NMR spektara jedinjenja BDR-9

¹HNMR spektar jedinjenja BDR-9



Prikaz ^{13}C NMR spektra jedinjenja BDR-9



Biografija kandidata

Dušan B. Ružić je rođen 29. juna 1990. u Čačku, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju kao nosilac Vukovih diploma. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2009/2010. godine i stekao zvanje magistra farmacije 7. oktobra 2014. godine odbranom završnog rada na Katedri za organsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Nagrađen je godišnjom nagradom „Profesor dr Ivan Berkeš“ za najboljeg studenta farmacije (generacija 2009–2014). Doktorske akademske studije iz farmaceutske hemije upisao je školske 2014/15. godine na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu (mentor prof. dr Katarina Nikolić). Na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije bio je zaposlen kao istraživač–pripravnik, zatim kao istraživač–saradnik. Od decembra 2019. godine zaposlen je kao asistent na Katedri za farmaceutsku hemiju. Dušan Ružić se u toku izrade doktorske disertacije (u periodu 2016 – 2018. godine) usavršavao na Katedri za hemijsku biologiju, *University of East Anglia, Norwich, United Kingdom* (u laboratoriji Prof. dr A. Ganesan-a) u oblasti organskih sinteza epigenetičkih inhibitora. U novembru 2018. godine je dobio istraživački grant od EpiChemBio COST 1406 projekta za jednomesečnu obuku u laboratoriji za visokopropusni skrining i preklinički razvoj *in vitro* enzimskih i ćelijskih testova na Fraunhofer IME ScreeningPort Institutu, Hamburg, Nemačka. U okviru naučno-istraživačkog rada, Dušan Ružić je objavio 15 radova i jedno poglavlje u monografiji od međunarodnog značaja: jedan rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), šest radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), šest radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), jedan rad u međunarodnom časopisu (M23) i jedan rad u vrhunskom nacionalnom časopisu M51 kategorije. Na međunarodnim kongresima ima osamnaest saopštenja štampanih u izvodu.

Spisak radova koji čine deo doktorske disertacije

1. **Ruzic, D.**, Petkovic, M., Agbaba, D., Ganesan, A., & Nikolic, K. (2019). Combined Ligand and Fragment-based Drug Design of Selective Histone Deacetylase-6 Inhibitors. *Molecular Informatics*, 38(5). (M21, Mathematical & Computational Biology (11/59) IF₂₀₁₉ = 2,741).
2. Bouchet, S., Linot, C., **Ruzic, D.**, Agbaba, D., Fouchaq, B., Roche, J., Nikolic, K., Blanquart, C. and Bertrand, P., 2019. Extending Cross Metathesis To Identify Selective HDAC Inhibitors: Synthesis, Biological Activities, and Modeling. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(6), pp.863-868. (M21, Chemistry, Medicinal (17/61) IF₂₀₁₉ = 3,975).
3. Alves Avelar, L. A.; **Ruzic, D.**; Djokovic, N.; Kurz, T.; Nikolic, K. Structure-Based Design of Selective Histone Deacetylase 6 Zinc Binding Groups. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2020, 38 (11), 3166–3177. (M22, Biochemistry/Molecular Biology (125/299) IF₂₀₁₈ = 3.310).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Dušan Ružić

Broj indeksa: 2/2014

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Racionalni dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanja selektivnih inhibitora histon
deacetilaze 6

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 14. 3. 2022. godine



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora	<u>Dušan Ružić</u>
Broj indeksa	<u>2/2014</u>
Studijski program	<u>Doktorske akademske studije – farmaceutska hemija</u>
Naslov rada	<u>Racionalni dizajn, sinteza i <i>in vitro</i> ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6</u>
Mentor	<u>Prof. dr Katarina Nikolić, vanredni profesor na Katedri za farmaceutsku hemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu</u>

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 14. 3. 2022. godine



Obrazac 7.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Racionalni dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 14. 3. 2022. godine



1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.