

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Strahinja S. Stevanović

***In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania* spp.**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Strahinja S. Stevanović

***In silico* selection and *in vitro* testing of natural  
and synthetic compounds inhibiting *Leishmania*  
spp. growth**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

**Mentori:**

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

---

dr sc. Milan Senčanski  
viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča”

---

**Članovi komisije:**

dr sc. Sanja Glišić,  
naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča”

---

dr sc. Brankica Filipić  
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Vladimir Dobričić  
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

**Datum odbrane:**

---

*Ova stranica je sa razlogom ostavljena prazna.*

## ***In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania* spp.**

### Sažetak

Predmet naučnog istraživanja ove doktorske disertacije „*In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanje prirodnih i sintetskih jedinjenja sa potencijalnom inhibitornom aktivnošću na rast *Leishmania* spp.” su prirodna i sintetska jedinjenja sa potencijalnim inhibitornim dejstvom na protozoe iz roda lajšmanija. Osnovni zadatak studije je bio da se *in silico* metodologijom pronađu odgovarajući kandidati koji pripadaju takvoj grupi jedinjenja i da se njihova aktivnost potvrdi *in vitro* eksperimentima. Dodatni zadatak je bilo postavljanje hipoteze o mehanizmu dejstva inhibitora na ciljna mesta u telu parazita na osnovu razumevanja interakcija hemijskih jedinjenja kandidata i odabranih metaboličkih enzima. Stečena saznanja imaju za cilj da doprinesu razvoj i dizajn novih aktivnih jedinjenja koja imaju potencijalnu hemoterapijsku primenu u lečenju lajšmanioze sa minimalnim toksičnim dejstvom na ćelije domaćina.

Prva faza istraživanja obuhvata: (1) Definisane kriterijuma za virtuelni skrining baza hemijskih jedinjenja upotrebom molekulskih deskriptora: elektron-jon interakcionog potencijala – EIIP i prosečnog kvazivalentnog broja – AQVN, 3D modela odnosa strukture i aktivnosti – 3D-QSAR i farmakofornog 3D modela zasnovanog na strukturi liganda; (2) Primena homolognog modelovanja enzima čija struktura nije kristalografski utvrđena; (3) razvoj kombinovanog protokola za virtuelni skrining zasnovanog na strukturi liganda i enzima u cilju dobijanja novih inhibitora rasta lajšmanije; (4) *In silico* skrining anti-targeta, tj. ispitivanje interakcija potencijalnih inhibitora sa enzimima koji učestvuju u njihovom metabolizmu i koji su prisutni u ćelijama domaćina; (5) Predviđanje apsorpcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije i toksičnosti – ADMET i fizičko-hemijskih osobina kandidata.

Druga faza istraživanja obuhvata: (1) Odabir kandidata sa potencijalnom aktivnošću na lajšmanije na osnovu *in silico* skrininga, a koji se mogu pronaći u katalogu dobavljača ili koji se pronalaze u dostupnoj bazi prirodnih proizvoda; (2) Dobijanje odabranih kandidata automatizovanom sintezom; (3) *In vitro* ispitivanje aktivnosti inhibitora porekla na *Leishmania* spp.

Definisane je protokol virtuelnog skrininga, a potom primenjen za pretragu baze MetIDB od 5.667 jedinjenja, upotrebom EIIP/AQVN filtera i 3D-QSAR. Jedinjenja sa najboljim rezultatima pretrage su potom dokovana u model humane i arginaze lajšmanije kao i anti-target modele koje čine citohromi P450 familije enzima 2a6, 2c9, 3a4, sulfotransferaza i pregnan-X-receptor sa ciljem označavanja neželjenih receptor-ligand interakcija u toku metabolizma. Upotreba ove metode utiče na donošenje odluke o odabiru kandidata koji potencijalno imaju umanjena toksična i neželjena dejstva u toku lečenja lajšmanioze.

Pripremljena je serija novih sintetskih jedinjenja, derivata oksadiazola i indolizina. Za ova jedinjenja su izračunati EIIP i AQVN deskriptori na osnovu kojih je formiran domen za upotrebu u narednom koraku, tj. skriningu zasnovanom na strukturi liganda. Najbolji kandidati su dokovani u model humane arginaze i finalno okarakterisani na osnovu dokinga u grupe anti-target enzima, kako bi se ispitala mogućnost interakcije sa proteinima esencijalnim za njihov metabolizam. Osam kandidata je testirano *in vitro*. Rezultati pokazuju da antilajšmanijalna aktivnost postoji za tri od osam kandidata. Najbolji kandidat sa 2,18  $\mu\text{M}$  IC<sub>50</sub> na amastigote *Leishmania donovani* u makrofagama, predstavlja interesantnu strukturu za razvoj novih agensa sa dejstvom na lajšmanije.

Primenom strukturnih podataka izozima, modelovana je 3D struktura *Leishmania infantum* alternativne NADH dehidrogenaze (tip 2) upotrebom metoda prepoznavanja homologa. Virtuelnim skriningom je izvršena pretraga potencijalnih inhibitora koji kao ciljno mesto dejstva imaju LNDH-2 ubikvinon-vezivno mesto. Potom je *in vitro* testirana inhibitorna aktivnost odabranih kandidata na

strukturno slični rekombinantni enzim NADH dehidrogenazu, tip 2, vrste *Staphylococcus aureus*, kao i mikrobicidno dejstvo na lajšmanije koje je testirano na amastigotima i promastigotima prirodne vrste *Leishmania infantum*. Identifikovano jedinjenje, supstituisani 6-metoksi-hinaldin, pokazalo je inhibitorni potencijal u nanomolarnoj koncentraciji.

Za kandidate sa značajnom aktivnošću na lajšmanije su izračunate ADMET osobine. Pomoću tih parametara je data procena farmakoloških rizika u slučaju primene odabranih kandidata kao terapeutika.

Ključne reči: *Leishmania* spp., arginaza, alternativna NADH dehidrogenaza, flavonoidi, oksadiazoli, indolizini, hinaldin

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutsko-medicinska hemija i strukturna analiza

# ***In silico* selection and *in vitro* testing of natural and synthetic compounds inhibiting *Leishmania* spp. growth**

## Abstract

The subject of this dissertation titled: "*In silico* selection and *in vitro* testing of natural and synthetic compounds inhibitors of *Leishmania* spp growth" is the natural and synthetic compounds that act as growth inhibitors of the protozoa of the genus *Leishmania*. The main objective of this study is to identify such compounds using *in silico* methodology and evaluate the activity by *in vitro* experiments. A further aim is to hypothesize the mechanism of action against specific targets within the parasite body, based on an understanding of molecular interactions with specific metabolic enzymes. These research findings should be used to develop targeted drugs against leishmaniasis that reduce the risk of toxic effects on host cells.

The first phase consists of (1) defining the criteria for virtual screening of compound databases using the descriptors: electron-ion interaction potential – EIIP and average quasivalence number - AQVN, quantitative structure-activity relationship - 3D-QSAR and ligand-based pharmacophore model. (2) The application of homology modeling to elucidate target structure necessary for receptor-ligand interactions with parasite and the host, for those enzymes for which crystallographic structure is not available; (3) The development of VS protocol comprising ligand-based and structure-based methods to obtain inhibitors of *Leishmania* growth; (4) *In silico* anti-target screening, viz.i.e. qualification of receptor-ligand interactions of the potential inhibitors against host metabolic enzymes; (5) The prediction of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity - ADMET and physicochemical properties of the selected candidates.

The second phase of research involves: (1) the selection of candidates with potential activity against leishmaniasis based on *in silico* screening, found in the supplier's catalog or in the available database of natural products; (2) the extraction of selected candidates by automated synthesis; (3) the *in vitro* study of the inhibitory activity of *Leishmania* spp.

After defining VS protocol, an initial screening was performed using an EIIP/AQVN filter and 3D-QSAR against the MetIDB database of 5,667 compounds. Top hits were screened *in silico* against human and *Leishmania* arginase and an anti-target model consisting of cytochromes P450 2a6, 2c9, 3a4, sulfotransferase, and the pregnane X receptor to flag unfavorable ligand-protein interactions during compound metabolism. Using this method as a filter affects the decision of choosing compounds which may produce fewer toxic and adverse effects in the treatment of leishmaniasis.

A series of novel oxadiazoles and indolizine-containing compounds were synthesized. Then, EIIP and AQVN values were calculated for each compound and only those that belonged to a predefined domain during ligand-based virtual screening were selected. Molecular docking of the selected candidates using a parasite arginase model was performed. The top hits were further docked to human arginase and characterized by docking to anti-target enzymes to mark their possible interactions with enzymes essential for their metabolism. Eight candidate compounds were selected for further experimental testing. The results show measurable *in vitro* anti-leishmanial activity for three out of eight compounds. A compound

with an IC<sub>50</sub> value of 2.18 μM on *Leishmania donovani* amastigotes represents an interesting molecular template for the further development of new anti-*Leishmania* agents.

Based on the available structural data of the isozymes, a 3D structural model of the alternative NADH dehydrogenase (type 2) of *Leishmania infantum* was constructed using homology recognition methods. A virtual screening was performed to search for potential inhibitors targeting the L<sub>2</sub>NDH-2 ubiquinone binding site. Selected compounds were screened *in vitro* for inhibitory activity in the structurally similar recombinant type-2 NDH-2 from *Staphylococcus aureus*, and their microbicidal activity on *Leishmania* was determined in the axenic wild-type amastigotes and promastigotes of *L. infantum*. The identified compound, a substituted 6-methoxy quinaldine, showed promising nanomolar leishmanicidal activity.

ADMET properties were determined for all candidates, based on which certain pharmacological risks of such compounds as therapeutics were estimated.

Keywords: *Leishmania* spp., arginase, alternative NADH dehydrogenase, flavonoids, oxadiazoles, indolizines, quinaldine

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis



# Lista skraćenica

<b>3D</b>	–	u tri dimenzije
<b>AD4</b>	–	program AutoDock verzija 4
<b>ADMET</b>	–	Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam, Ekskrecija i Toksičnost
<b>AmB</b>	–	Amfotericin B
<b>AQVN</b>	–	prosečan kvazivalentan broj
<b>ARG</b>	–	arginaza
<b>HsARG</b>	–	<i>Homo sapiens</i> arginaza
<b>BCS</b>	–	bazični EIIP/AQVN hemijski prostor
<b>BLAST</b>	–	Basic Local Sequence Alignment Tool (engl.)
<b>CD40</b>	–	klaster diferencijacije 40
<b>CID</b>	–	identifikacioni broj jedinjenja
<b>CTD</b>	–	domen C-terminusa
<b>CYP</b>	–	Citohrom P enzim
<b>DMAD</b>	–	Dimetil acetilendikarboksilat
<b>DMEM</b>	–	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (engl.)
<b>DNK</b>	–	dezoksiribonukleinska kiselina
<b>EIIP</b>	–	elektron jon interakcioni potencijal
<b>FAD</b>	–	flavin adenin dinukleotid
<b>GA</b>	–	genetički algoritam
<b>HDQ</b>	–	hidroksi-2-dodecil-4-(1H) kvinon
<b>HIFBS</b>	–	toplotom inaktivirani goveđi serum
<b>HIV</b>	–	virus humane imunodeficijencije
<b>IC<sub>50</sub></b>	–	koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50% inhibicije biološke funkciju u odnosu na kontrolu
<b>IFN</b>	–	interferon (gama...)
<b>IL</b>	–	interleukin (12, 1β...)
<b>LaARG</b>	–	<i>Leishmania amazonensis</i> arginaza
<b>LC/MS</b>	–	tečna hromatografija / masena spektrometrija
<b>NDH-2</b>	–	alternativna NADH oksidoreduktaza
<b>LiNDH-2</b>	–	<i>Leishmania infantum</i> alternativna NADH oksidoreduktaza
<b>PfNDH-2</b>	–	<i>Plasmodium falciparum</i> alternativna NADH oksidoreduktaza
<b>SaNDH-2</b>	–	<i>Staphylococcus aureus</i> alternativna NADH oksidoreduktaza
<b>ScNDH-2</b>	–	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> alternativna NADH oksidoreduktaza
<b>LMO</b>	–	Leave-Many-Out (engl.)
<b>LOO</b>	–	Leave-One-Out (engl.)
<b>LV</b>	–	latentna promenljiva
<b>MIF</b>	–	polja molekulskih interakcija
<b>MM/GBSA</b>	–	molekulska mehanika / generalizovan Born i površina dostupna rastvaraču
<b>NADH</b>	–	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>NCBI</b>	–	Nacionalni centar za bioinformatičke informacije
<b>NETs</b>	–	neutrofilne ekstracelularne zamke
<b>NMR</b>	–	nuklearno-magnentno-rezonantna spektroskopija
<b>NTD</b>	–	zanemarena tropska oboljenja
<b>OD</b>	–	optička gustina
<b>OECD</b>	–	Organisation for Economic Co-operation and Development (engl.)
<b>PA</b>	–	poliamini
<b>PAINS</b>	–	Pan Assay Interference Compounds (engl.)

<b>PCA</b>	–	analiza glavnih komponenti (metoda)
<b>PDB</b>	–	proteinska baza podata
<b>PLS</b>	–	parcijalnih najmanjih kvadrata (metoda)
<b>PLS</b>	–	metoda parcijalnih najmanjih kvadrata
<b>PXR</b>	–	pregnan-X-faktor
<b>QSAR</b>	–	kvantitativni odnos strukture i funkcije
<b>RCSB</b>	–	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (engl.)
<b>PDB</b>	–	Proteinska baza podataka
<b>RMSD</b>	–	koren kvadrata odstupanja
<b>RNK</b>	–	ribonukleinska kiselina
<b>ROS</b>	–	reaktivne vrste kiseonika
<b>SID</b>	–	Identifikacioni broj supstance
<b>STAT1</b>	–	prenosilac signala i aktivator transkripcije 1
<b>SULT</b>	–	sulfotransferaza
<b>TNF</b>	–	faktor nekroze tumora
<b>UQ</b>	–	ubikvinon
<b>UQ-1</b>	–	prvo vezivno mesto za ubikvinon
<b>UQ-2</b>	–	drugo vezivno mesto za ubikvinon
<b>Vina</b>	–	doking algoritam AutoDock Vina
<b>VS</b>	–	virtuelni skrining
<b>VL</b>	–	visceralni oblik lajšmanije
<b>WDI</b>	–	World Drug Index (engl.)
<b>WHO</b>	–	Svetska zdravstvena organizacija
<b>XP</b>	–	ekstra preciznost

# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Tema istraživanja.....	1
1.2.	<i>Leishmania</i> spp. i lajšmanioza .....	1
1.2.1.	Životni ciklus parazita <i>Leishmania</i> spp.....	1
1.2.2.	Lajšmanioza i nedostaci savremene hemoterapije.....	4
1.2.3.	Tipovi jedinjenja potencijalnih inhibitora rasta <i>Leishmania</i> spp.....	5
1.3.	Odabrana ciljna mesta dejstva za razvoj inhibitora rasta <i>Leishmania</i> spp.....	6
1.3.1.	Arginaza.....	6
1.3.2.	Alternativna NADH:ubikvinon oksidoreduktaza .....	6
1.4.	Pretraga kandidata sa potencijalnom inhibitornom aktivnošću na lajšmanije .....	8
1.4.1.	Specijalizovane baze i arhive jedinjenja.....	8
1.4.2.	Baze sekundarnih podataka.....	9
1.5.	Modeli kao filteri sa primenom u virtuelnom skriningu .....	10
1.1.1.	Deskriptori EIIP/AQVN.....	10
1.5.1.	Formiranje 3D-QSAR modela u programu Pentacle .....	10
1.5.2.	Validacija 3D-QSAR modela.....	12
1.5.3.	Formiranje farmakofornog 3D model u progamu LigandScout .....	12
1.5.4.	Homologno modelovanje upotrebom Phyre 2 servisa i validacija modela .....	13
1.5.5.	Programi i parametri za doking proračune .....	14
1.5.6.	PAINS deskriptori .....	15
1.5.7.	Predviđanje ADMET rizika .....	15
2.	Ciljevi istraživanja .....	17
3.	Materijali i metode.....	19
3.1.	Pregled poglavlja .....	19
3.2.	Protokoli za virtuelni skrining.....	19
3.3.	Modeli zasnovani na strukturi liganda .....	20
3.3.1.	3D-QSAR model inhibitora arginaze lajšmanije.....	20
3.3.2.	Razvoj farmakofornog 3D modela na bazi HDQ derivata .....	23
3.3.3.	Primena PAINS filtera upotrebom ChemBioServer .....	24
3.4.	Modeli zasnovani na strukturi ciljnog mesta.....	24
3.4.1.	Model strukture alternativne NADH dehidrogenaze tipa 2, LiNDH-2.....	24
3.4.2.	Doking kandidata u strukturni model <i>LiNDH-2</i> .....	25
3.4.3.	Modeli struktura arginaze .....	26
3.4.4.	Doking kandidata u strukturne modele <i>HsARG</i> i <i>LaARG</i> .....	26
3.4.5.	Modeli grupe anti-targeta .....	27

3.4.6.	Doking u anti-targete .....	27
3.5.	Jedinjenja za formiranje modela i kandidati za <i>in vitro</i> testiranja .....	28
3.5.1.	Flavonoidi .....	28
3.5.2.	Derivati oksadiazola i indolizina .....	31
3.5.3.	Derivati hinolona .....	33
3.6.	ADMET karakterizacija kandidata .....	34
3.7.	<i>In vitro</i> ispitivanja .....	35
3.7.1.	Priprema ćelijskih linija i <i>in vitro</i> ispitivanja na <i>L. infantum</i> .....	35
3.7.2.	Izvođenje eksperimenata kinetike stabilnog stanja i određivanje inhibitorne aktivnosti na <i>S. aureus</i> NDH-2 .....	35
3.7.3.	Priprema ćelijskih linija i <i>in vitro</i> ispitivanja na <i>L. donovani</i> .....	36
4.	Rezultati i diskusija .....	38
4.1.	Flavonoidi sa mikrobicidnom aktivnošću na lajšmanije .....	38
4.1.1.	Primena EIIP/AQVN filtera .....	38
4.1.2.	3D-QSAR model .....	39
4.1.3.	Primena 3D-QSAR modela .....	42
4.1.4.	Doking u strukturni model arginaze .....	43
4.1.5.	Karakterizacija kandidata .....	45
4.2.	Mikrobicidna aktivnost derivata okidiazola i indolizina na lajšmanije .....	48
4.2.1.	Postupak sinteze derivata 1,2,4-oksadiazola .....	48
4.2.2.	Postupak sinteza derivata indolizina .....	50
4.2.3.	Odabir kandidata za <i>in vitro</i> ispitivanja .....	51
4.2.4.	<i>In vitro</i> ispitivanje .....	54
4.2.5.	Karakterizacija kandidata .....	55
4.3.	Mikrobicidna aktivnost 6-metoksi-hinaldina na lajšmanije .....	57
4.3.1.	Model <i>Li</i> NDH-2 .....	57
4.3.2.	Primena farmakofornog modela .....	62
4.3.3.	Doking u strukturni model <i>Li</i> NDH-2 .....	63
4.3.4.	<i>In vitro</i> ispitivanje .....	66
4.3.5.	Karakterizacija kandidata .....	68
1.1.2.	Vrednost ADMET rizika za kandida Karakterizacija kandidata .....	68
5.	Zaključak .....	70
6.	Literatura .....	71
7.	Prilozi .....	79
7.1.	Prilog 1: Strukturna instrumentalna analiza derivata oksadiazola i indolizina .....	79
7.2.	Prilog 2: Rezultati kodiranja podataka, metoda validacije PLS modela .....	81
7.3.	Prilog 3: Kandidati dobijeni na osnovu modela <i>Li</i> NDH-2 i HDQ derivata .....	83

7.4.	Prilog 4: Raspodela ADMET rizika za kandidate koji su testirani in vitro i referentne terapeutike sa potvrdom o eksperimentalnoj aktivnosti na lajšmanije iz ChEMBL/DrugBank.....	85
7.5.	Prilog 5: <i>Ramachandran</i> -ova mapa za dobijeni model <i>Li</i> NDH-2.....	86

# 1. Uvod

## 1.1. Tema istraživanja

Infekcije ljudi i životinja protozoama su značajan zdravstveni problem u svetu. Lajšmanioza je bolest izazvana infekcijom parazita iz roda *Leishmania*. Poznato je preko dvadeset parazitskih vrsta ovog organizma, koje inficiraju sisare. Na osnovu izveštaja Svetske zdravstvene organizacije lajšmanioza je endemska bolest u više od devedeset zemalja u tropskim i subtropskim regijama i južnoj Evropi [1–3]. Lajšmanioza pripada zanemarenim tropskim bolestima i predstavlja problem za javno zdravlje s obzirom da broj zaraženih u svetu iznosi 12 miliona sa između 0,9 i 1,6 miliona novih slučajeva na godišnjem nivou. Na listi infektivnih bolesti, lajšmanioza zauzima tek deveto mesto, pa je zbog toga nedovoljan komercijalni interes za razvoj ciljanih terapeutika [4,5]. U nedostatku efikasne vakcine protiv lajšmanioze, lečenje oboljenja se svodi na kombinovanu hemoterapiju [6]. Tema ovog rada je razvoj inhibitora rasta lajšmanije sa ciljnim mestom dejstva upotrebom *in silico* metodologija, razvoj VS protokola za odabir kandidata počevši od većeg broja jedinjenja i primena *in vitro* testova za potvrdu inhibitorne aktivnosti.

## 1.2. *Leishmania* spp. i lajšmanioza

### 1.2.1. Životni ciklus parazita *Leishmania* spp.

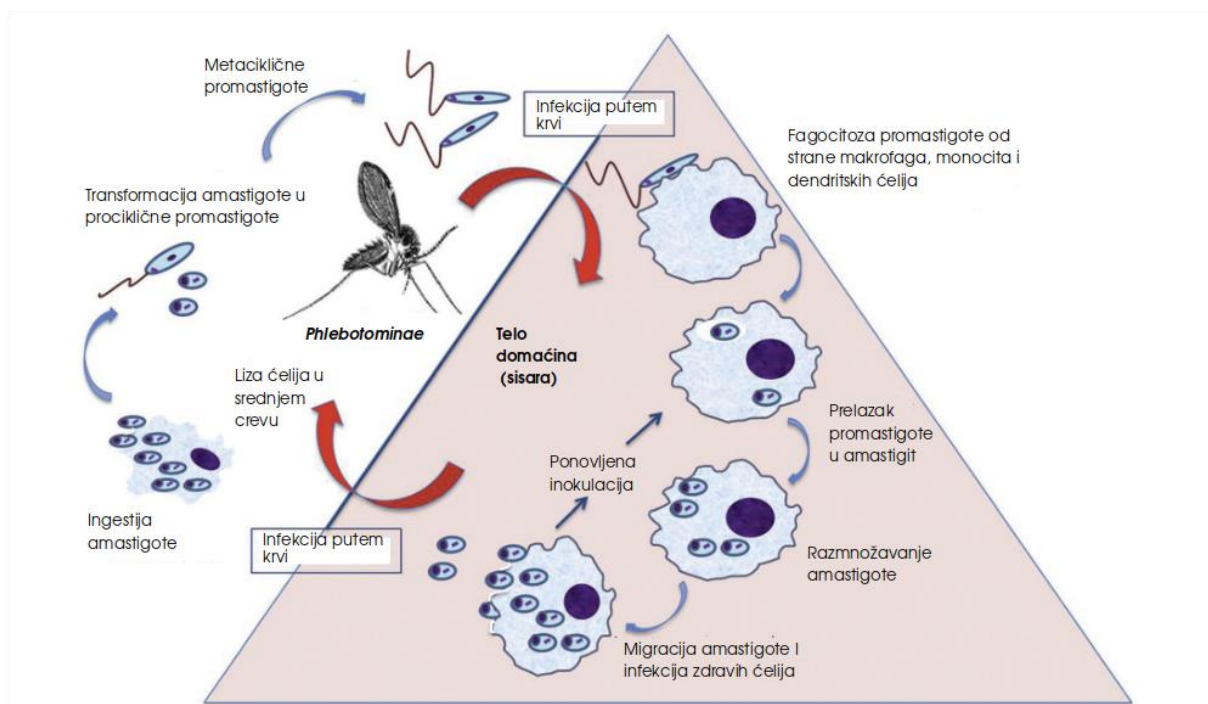
*Leishmania* spp. su protozoe familije Trypanosomatidae iz reda kinetoplastida [7]. Karakteristično za ove protozoe je da u toku svog životnog ciklusa zauzimaju različite morfološke oblike. Jedan deo svog životnog ciklusa provode u vektoru, a drugi u domaćinu. Promastigot je jedna od dve glavne ćelijske forme protozoe koja se prepoznaje po veličini od 15 do 25  $\mu\text{m}$  i obliku (od elipsoidnog do izduženog). Najvažnije karakteristike unutarćelijskog sadržaja promastigota, a koje su utvrđene metodama fluorescentne mikroskopije, su prisustvo nukleusa (eukariotski organizam), kinetoplasta i flagele. Kinetoplast, koji predstavlja mitohondrijsku DNK, je direktno povezan sa bazalnim telom iz kojeg se širi početak flagele. Kinetoplast i nukleus se takođe pronalaze unutar amastigot forme [8]. Amastigot, druga glavna ćelijska forma endoparazita, je kružnog ili ovalnog oblika sa prečnikom od 2 do 10  $\mu\text{m}$ . Amastigot je aflagelarna forma parazita, jer se flagela ne izdužava u ovoj fazi životnog ciklusa. U sisarima, lajšmanija postoji u formi amastigot, kao intracelularni parazit mononuklearnih fagocita. Druga morfološka forma lajšmanije, promastigot, je mobilna i može se izolovati iz vektora – peščane mušice iz roda *Phlebotomus* (u Starom svetu) i roda *Lutzomyia* (u Novom svetu) [9].

Interakcija lajšmanije i domaćina odvija se između promastigota lajšmanije i ciljnih ćelija domaćina (dendritske ćelije, neutrofili i makrofagi) [10]. Nakon inokulacije putem vektora (peščane mušice), promastigoti lajšmanije su brzo fagocitovani od strane neutrofila i makrofaga. Iako se lajšmanije u prvim satima infekcije uglavnom nalaze u neutrofilima, ne menjaju svoj morfološki oblik u amastigote, već se taj proces obavlja u makrofagama. Zbog toga, makrofagi su važne ćelije za uspostavljanje perzistentne infekcije i za preživljavanje parazita unutar domaćina. Iako se intracelularni rast i razmnožavanje lajšmanija odvija u makrofagama [11], makrofag ujedno igra važnu ulogu u eliminaciji parazita. Infekcija makrofaga lajšmanijom se odvija na dva načina: direktno, interakcijom receptora na površini parazita i makrofaga ili indirektno, fagocitozom inficiranih neutrofila [12,13]. Neutrofili čine 50% leukocita u cirkulaciji čoveka i imaju važnu ulogu u odbrani domaćina od patogena. Neutrofili su prve ćelije koje migriraju na mesto infekcije, usled čega predstavljaju prvu liniju odbrane domaćina i takođe imaju funkciju fagocitoze mikroorganizama [13]. Druge funkcije neutrofila su oslobađanje antimikrobnih medijatora, stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika što vodi ka pojavi oksidativnog stresa i formiranje

neutrofilne ekstracelularne zamke (NETs). NETs su kompleksi hromozomalne DNK, histona i granularnih proteina neutrofila koji se javljaju u vidu mreže, a njihova uloga je da zarobe mikroorganizme iz ekstracelularnog prostora. Pojava NETs je povezana sa disrupcijom ćelijske membrane koja vodi ka obliku programirane ćelijske smrti, nazvane netoza. Svojom funkcijom NETs usporavaju širenje infekcije, ali ne moraju obavezno imati mikrobicidno dejstvo. Kao i makrofagi, neutrofilni oslobađaju citokine i aktiviraju druge ćelije imunskog sistema, pa tako učestvuju u posredovanju proinflatarnog odgovora na infekciju. U makrofagama, lajšmanija se prenosi u endozom koji ubrzo prerasta u fagolizozom u kojem pH mikrookruženja postaje kiseo. Kisela sredina smanjuje šanse preživljavanja parazita u promastigot formi, pa dolazi do promene morfološkog oblika u amastigot koji može preživeti novonastale uslove. Lajšmanija luči molekule poput lipofosfoglicina, koji odlažu maturaciju fagolizozoma što produžava vreme za proces diferenciranja iz promastigot u amastigot formu.

Lajšmanije su razvile način da utiču na mikrobicidnu aktivnost makrofaga [14]. Ometanje aktivnosti se postiže lučenjem proteina koji deluju na intracelularne signalne puteve i koji su važni za imunske aktivnosti makrofagi. Zbog toga dolazi do supresije produkcije proinflatarnih citokina poput IL-1 $\beta$  i TNF, koji podstiču eliminaciju parazita [6, 13]. Pored toga, lajšmanija inhibira produkciju citokina (IL-12) i ometanjem formiranja multiproteinskog kompleksa CD40-signalozoma kao i degradacijom transkripcionih faktora (npr. nuklearni faktor kapa B) [13]. Smanjena ekspresija receptora za IFN- $\gamma$  na inficiranim makrofagama ukazuje da dolazi do ometanja IFN- $\gamma$  signalnog puta. Molekul unutar parazita, elongacioni faktor 1, povećava ekspresiju inhibitorne fosfotirozin fosfataze, koji uklanja fosfat sa fosforilovanih tirozina određenih proteina. Posledično dolazi do inhibicije aktivnosti proteina, tj. prenosa signala i aktivatora transkripcije 1 (STAT1). Krajnji rezultat je smanjena koncentracija azot-monoksida, važnog medijatora imunsignala i mikrobicidne aktivnosti [12, 15].

Lajšmanija, takođe, utiče na nivo mikro-RNK i stepen regulacije ekspresije ciljnih gena, a samim tim i njihovih transkripata. Posledično, dolazi do smanjene produkcije hemokina potrebnih za regrutovanje ćelija imunskog sistema na mesto infekcije [16]. Dakle, lajšmanije su razvile sposobnost da regulišu i izbegnu imunski odgovor domaćina. Jedna od najznačajnijih strategija koja im to obezbeđuje je mogućnost parazita da inficira ćelije domaćina uključujući i one čija je primarna funkcija upravo uklanjanje infekcije. Pojednostavljen prikaz životnog ciklusa lajšmanije se nalazi na *Slici 1*.

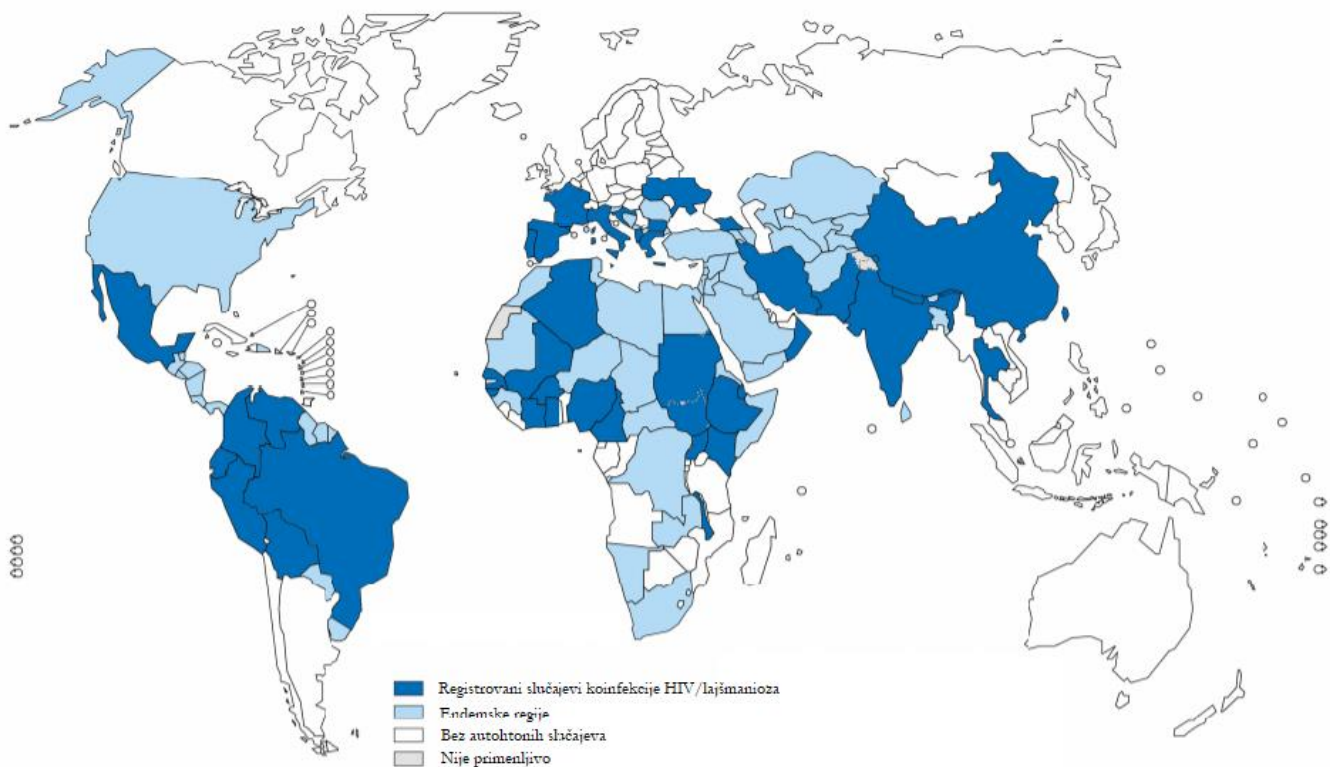


Slika 1. Životni ciklus *Leishmania* spp. [17]



## 1.2.2. Lajšmanioza i nedostaci savremene hemoterapije

Lajšmanioza je klasifikovana u zanemarene tropske bolesti. Postoje tri oblika lajšmanioze: Kutana (CL), mukokutana (MCL) i visceralna (VL), poznata još kao kala-azar [3]. Broj novih slučajeva na godišnjem nivou iznosi do 0,4 miliona za VL i 1,2 miliona za CL oblik lajšmanioze [18]. Zaraza se teško može kontrolisati, a lajšmanioza se može dijagnostikovati pri prvoj pojavi simptoma. Prva pojava simptoma se najčešće javlja u odmakloj fazi infekcije ili kod težih oblika oboljenja [19]. Najteži oblici oboljenja javljaju se u slučajevima koinfekcije, posebno kod obolelih od HIV-a. Koinfekcija sa HIV dovodi do akutnog pogoršanja zdravstvenog stanja, sa lošom kliničkom slikom, koja se bez lečenja završava smrću (u 95% slučajeva) [3]. U svetu od lajšmanioze umire do 30.000 ljudi godišnje. Na osnovu izveštaja Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO) 2018. godine, CL i VL oblici lajšmanioze su smatrani endemskim za 92 i 83 zemlje, *Slika 2*.



**Slika 2.** Geografski prikaz rasprostranjenosti lajšmanioze; Preuzeto iz WHO baze podataka.

Hemoterapija lajšmanioze se zasniva na upotrebi antiprotozoalnih agensa, antimikotika i antibiotika u kombinaciji [19]. Takva kombinovana hemoterapija nosi sa sobom određene nedostatke. Pojava neželjenih efekata, invazivni putevi administracije leka, visoke cene lečenja, dugotrajne terapije i male efikasnosti, pojava rezistencije parazita na lek i toksičnost po ćelije domaćina su neki od tih nedostataka [20,21]. Mehanizam delovanja terapeutika na lajšmaniju koji su u širokoj primeni, kao što je natrijum stiboglukonat, nije poznat. Prvenstveno za najteži – VL oblik, koristi se kombinovana terapija stiboglukonata (ili zamena – meglumin antimonijat), pentamidina i amfotericina. U nekim zemljama (npr. u Velikoj Britaniji) dozvoljena je upotreba miltefozina, prvog jedinjenja registrovanog kao lek za lečenje VL [22]. Prvobitno, ovaj alkilfosfolipid se koristio kao antineoplastik. Kao antineoplastik, ciljno mesto

dejstva leka miltefozin je P-glikoprotein 1, transmembranski protein koji ima ulogu u uklanjanju toksina i ksenobiotika van ćelije. Mehanizam antiprotozoalnog dejstva nije sasvim definisan, mada se u osnovi odvija u mitohondrijama gde dolazi do inhibicije citohrom-c oksidaze što dalje ometa funkciju organele i što dovodi do ćelijske smrti nalik apoptozi. Esencijalan enzim za metabolizam miltefozina je fosfolipaza D1. Terapiju miltefozinom često prati niz nuspojava, a od neželjenih efekata značajna je pojava teratogenog dejstva. Poznati mehanizmi dejstva terapeutika za lajšmaniozu, kao i potencijalni metabolički signalni putevi koji mogu učestvovati u mehanizmu su u vezi sa biosintezom sterola, transportom purina, aktivnošću na protein kinaze, proteinaze, biosintezom folata i topoizomerazom kao ciljnim mestima dejstva [23]. Međutim, izveštaji koji se odnose na rezistenciju različitih protozoa na ove terapeutike su sve češći, a povećanje doze značajno povećava rizik od pojave toksičnog dejstva u organizmu domaćina [24].

### 1.2.3. Tipovi jedinjenja potencijalnih inhibitora rasta *Leishmania* spp.

Prethodna istraživanja su pokazala veliki potencijal korišćenja prirodnih proizvoda kao agensa u terapiji lajšmanioze [25,26]. Prirodni proizvodi koji su do sada pokazali značajnu aktivnost prema lajšmanijama pripadaju klasi alkaloida, derivata fenola i terpena. Iz klase alkaloida, poznata su nam jedinjenja sa strukturama izohinolina, naftoizohinolina, benzohinolizidina, diterpenoida, derivata  $\beta$ -karbolina, piroolidinijum alkaloida, akridona, indola i steroidnih alkaloida. Izmerene  $IC_{50}$  vrednosti za ove klase jedinjenja su u opsegu od 1 do 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  [25]. Poznato je da terpeni i druge oksidujuće vrste jedinjenja imaju širok spektar antimikrobnog dejstva, ali i nisku efikasnost [27]. Do sada je izvršena pretraga aktivnosti upotrebom šireg spektra hemijskih jedinjenja i potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se dobila potvrda za mehanizam dejstva ovih jedinjenja sa specifičnim ciljnim mestom. Na taj način bi se stvorio uslov za optimizaciju i dobijanje selektivne toksičnosti na ćelije patogena.

Među derivatima fenola, flavonoidi prirodnog porekla su važna klasa inhibitora arginaze lajšmanija [27,28]. Ova vrsta jedinjenja pokazuje inhibitornu aktivnost na lajšmanije sa  $IC_{50}$  vrednostima u opsegu od 0,6 do 10,9  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Poređenja radi,  $IC_{50}$  za miltefozin iznosi 0,34  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Testiranje aktivnosti ovih jedinjenja je izvršeno i potvrđeno na vrsti *L. donovani*. Od testiranih flavonoida, jedino je kvercetin pokazao *in vivo* aktivnost (15,3%). Rezultati pokazuju da struktura kvercetina ima važnu ulogu za aktivnost na lajšmanije. Bioaktivna jedinjenja iz *Cecropia pachystachya* koja inhibiraju arginazu lajšmanije spadaju u glukozidne flavonoide [29]. Potvrdom aktivnosti jedinjenja iz serije flavonoida na piruvat kinaze, otvara se mogućnost za razvoj dualnih inhibitora iz klase flavonoida [30].

Serijska jedinjenja dobijena sintezom, koja sadrže strukturni motiv oksadiazola, pokazala su značajnu aktivnost kao antikinetoplastidi, a posebno kao agensi u terapiji lajšmanioze (za vrste koje uzrokuju visceralni tip oboljenja) [31,32]. Aktivnost je do sada ispitana u vezi sa CYP51, esencijalnim enzimom za biosintezu sterola. Pogodnosti su dodatno u tome, što su za jedinjenja 1,2,4-oksadiazola, ustanovljeni protokoli konvencionalne i nekonvencionalne sinteze [33,34,35].

Otrkiće kamptotecina i njegovih analoga kao antiprotozoalnih agensa, dovelo je do ispitivanja bioaktivnosti jedinjenja na bazi indolizina [36]. Derivati indolizina su se pokazali kao potentni antimikrobni i antiprotozoalni agensi. Iako su i za ovu klasu jedinjenja ustanovljene metode sinteze [37], potrebna su dodatna istraživanja koja bi ih okarakterisala na osnovu ciljnog mesta dejstva, prvenstveno radi postizanja selektivnosti i specifičnosti.

Pokazalo se da za hidroksi-2-dodecil-4-(1H) hinolon (u daljem tekstu, HDQ) postoji dualna aktivnost na ciljna mesta NDH-2 i citohrom bc1 [38]. Sa druge strane, HDQ nema osobine leka (engl. *drug-like*), ali je poslužio kao dobra polazna tačka za ratvoj aktivnih jedinjenja. Za jedinjenja derivate hinolona, izmerena je inhibitorna aktivnost u koncentracijama od 4,2 do 71  $\text{ng ml}^{-1}$  na multirezistentan *Plasmodium falciparum*. Uočeno je da određeni peptidi inhibiraju alternativnu NDH-2. *In vitro* skriningom od 304 mikrobicidna jedinjenja u finalnoj koncentraciji od 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  na *Gluconobacter oxydans*, izmerena je inhibitorna aktivnost za sledeća jedinjenja: Skopafungin (nifimicin; aktivnosti rezidua, 33%), gramicidin S

(31%), polimiksin B (51%), akuleacin A (63%), funikulozin (68%) i staurosporin (70%). Takav skrining je izvođen pri koncentracijama NADH (0,2 mM) i Q<sub>1</sub> (0,1 mM) u odnosu 2:1 što predstavlja sredinu u kojoj se vrši oksidoredukcija katalizovana enzimom NDH-2 i aktivnost ovog enzima se može izmeriti [39].

### 1.3. Odabrana ciljna mesta dejstva za razvoj inhibitora rasta *Leishmania* spp.

#### 1.3.1. Arginaza

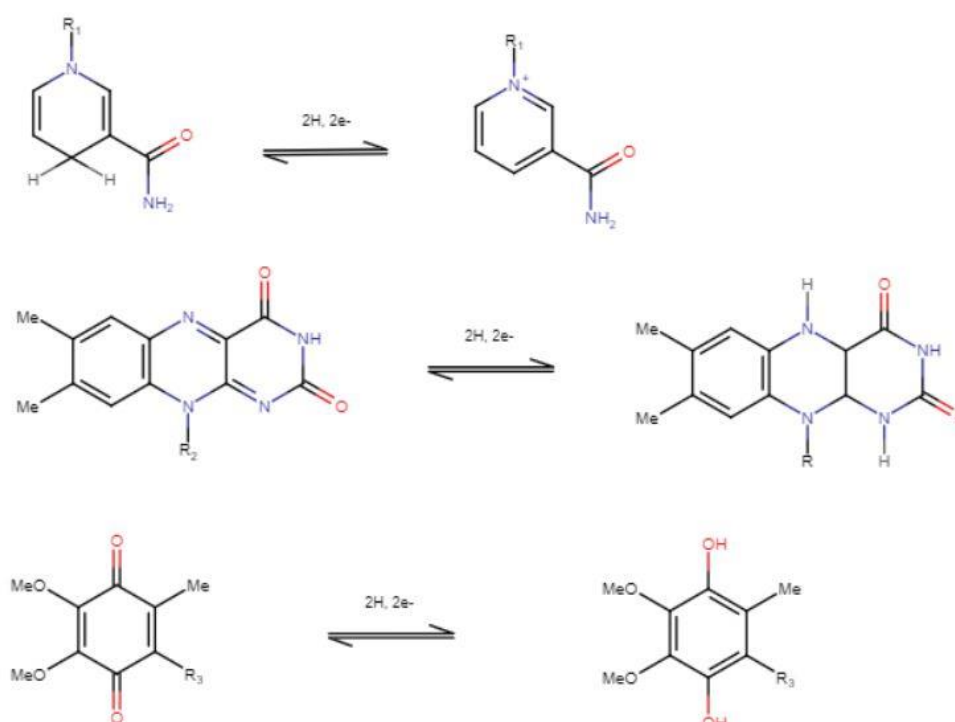
Protozoe familije Trypanozomatidae su karakteristične po metabolizmu zasnovanom na tiolu. U takvom metabolizmu tripanotion (N1-N8-bis(glutathionil)spermidin) - tripanotion reduktaza učestvuju u antioksidativnim procesima umesto glutation/glutathion reduktaznog i tioredoksin/tioredoksin reduktaznog sistema, pristutnih u metabolizmu domaćina (sisara) [40]. Važni metaboliti za biosintezu tiol tripanotiona su poliamini (PA). PA imaju presudnu ulogu za rast i preživljavanje parazita [41]. Prvi korak biosinteze PA je hidroliza L-arginina u L-ornitin i ureu, što je katalizovano arginazom [42,43]. Drugi korak je dekarboksilacija L-ornitina u putrescin (reakcija katalizovana ornitin dekarboksilazom). Supstrat putrescin i S-adenozilmetionin su neophodni za biosintezu spermidina (esencijalnog alifatičnog poliamina) [40].

Arginaza (ARG) je metaloenzim, esencijalan za proliferaciju *Leishmania* spp. Genskim uklanjanjem arginaze, lajšmanija postaje oksotrofna za PA [44]. Zbog diverziteta u ćelijskoj lokalizaciji, arginaza ima i druge uloge osim u ciklusu uree [43]. Strukturno, arginaza je homotrimer koji se sastoji od podjedinica veličine 20-40 kDa. Svaka podjedinica sadrži ortosterno vezivno mesto na dubini od 15 Å mereno sa površine enzima. Aktivnost arginaze je merljiva u baznoj sredini i zavisi od dvovalentnih jona mangana koji su prisutni u ortosteričnom vezivnom mestu [45]. U vezivnom mestu, joni mangana se nalaze na udaljenosti ~3.3 Å, pri čemu su stabilizovani interakcijom sa dva bočna ostatka asparaginske kiseline i sa hidroksidom iz okoline. Hidroksid ima ulogu nukleofila prilikom interakcije sa supstratom L-argininom (guanidinium katjon). Pretpostavka o mehanizmu interakcije enzima i supstrata je postavljena na osnovu kristalne strukture arginaze kristalografski usnimljene u strukturnom kompleksu sa inhibitorom – tiosemikarbazidom. Poznate su dve klase inhibitora arginaze [46]. Prva klasa je definisana prisustvom strukture 2-aminoimidazol, pri čemu prilikom receptor-ligand interakcije ne dolazi do izmeštanja hidroksida, već se inhibitor ponaša kao mimetik arginina i sprečava proces hidrolize endogenog supstrata. Druga klasa inhibitora može izmestiti hidroksid uz direktnu koordinaciju jona mangana i ta klasa stabilizuje prelazno stanje receptor-ligand interakcije. U tu klasu spadaju hidroksiarginini, boronska kiselina i njeni derivati i sulfonamidi. Trenutno nije pronađen inhibitor koji pokazuje selektivnost prema izoenzimima arginaze [47]. Sa stanovništa specifičnosti, arginaza lajšmanije se strukturno dovoljno razlikuje od humane arginaze, pa je pogodna kao ciljno mesto za razvoj inhibitora.

#### 1.3.2. Alternativna NADH:ubikvinon oksidoreduktaza

U grupu enzima koja je esencijalna za rast i razvoj lajšmanija ubraja se enzim NADH:ubikvinon oksidoreduktaza (ili NADH alternativna dehidrogenaza). Postoje dva tipa NADH dehidrogenaze, tip 1 koji je prisutan u mitohondrijama ćelija sisara i tip 2, tj. alternativna NADH dehidrogenaza (NDH-2) [48,49]. NDH-2 katalizuje biohemijsku reakciju oksidoredukcije u kojoj učestvuju NADH i ubikvinon. Alternativna NDH-2 je prisutna prvenstveno u mikroorganizmima i biljkama, a dokaz da je u deficitu u ćelijama sisara postavlja hipotezu da je gubitak ekspresionog koda rezultat povećanja lokomotorne atkivnosti organizma [50]. Zbog toga alternrativni tip ovog enzima predstavlja potencijalno ciljno mesto za razvoj inhibitora [51]. Inhibicija NDH-2 enzima bi dovela do smrti patogena. Enzim alternativna NDH-2 je integralni deo unutrašnje membrane mitohondrija, u formi strukturnog dimera [52]. Analizom

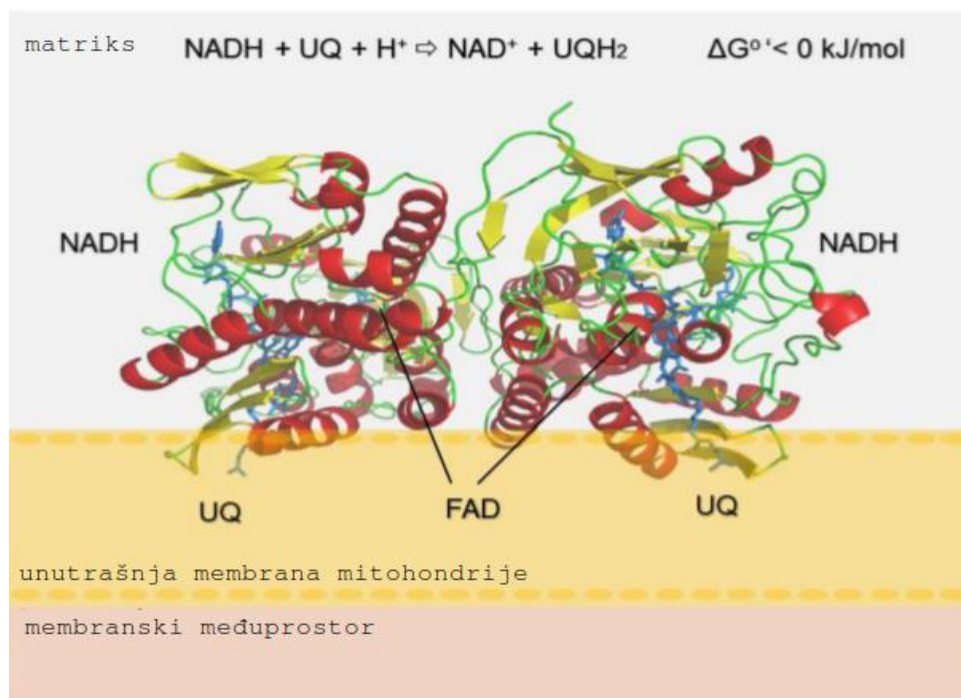
strukture na mestu ispoljavanja funkcije, svaka od monomernih jedinica sadrži amfipatičan niz koji se pruža sa početkom na C-terminusu i koji je u interakciji sa lipidnim dvoslojem membrane. Mehanizam NDH-2 enzima se zasniva na katalizi prenosa elektrona sa molekula NADH do ubikvinona preko izoaloksazinskog prstena na flavin adenin dinukleotidu (FAD). Strukturu monomerne jedinice NDH-2 čine dva Rosmanova tipa tercijarne strukture pri čemu svaki predstavlja vezivno mesto za dinukleotid, koji omogućava reverzibilan prenos elektrona i hidrida na endogeni supstrat. Vezivna mesta kofaktora se prostorno dodiruju, pa zbog toga dinukleotidi NADH i FAD formiraju  $\pi$ -steking interakcije, i tako stabilizuju kompleks za proces oksidoredukcije. Postavljene su dve hipoteze o mehanizmu oksidoredukcije – ping-pong mehanizam i mehanizam uz nastajanje trojnog kompleksa [53,54,55]. Prvi mehanizam predlaže da se vezivna mesta za NADH i ubikvinon preklapaju. Potvrda za drugi tip mehanizma se argumentuje postojanjem dva nezavisna vezivna mesta za ubikvinon [56], međutim jedino je prvo vezivno mesto ubikvinona (UQ-1) u interakciji sa kofaktorima. Ubikvinon sa kofaktorima formira trojni kompleks, pri čemu je omogućen prenos elektrona sa NADH na FAD. Sa kofaktora FAD elektroni se dalje prenose na ubikvinon koji se redukuje u ubikvinol, *Shema 1*.



**Shema 1.** Reakcije oksidoredukcije prenosa elektrona sa NADH na ubikvinon, preko FAD kofaktora. R<sub>1</sub> = Ribo-ADP; R<sub>2</sub> = Ribitil-ADP; R<sub>3</sub> = (CH<sub>2</sub>CHC(CH<sub>3</sub>)CH)<sub>6-10</sub>CH<sub>3</sub>.

U odnosu na tip 1 NADH:ubikvinon oksidoreduktaze respiratornog kompleksa 1, alternativna NDH-2 katalizuje elektronski transfer sa NADH do ubikvinona, pri čemu ne dolazi do kuplovanja protonске pumpe. Protonска pumpa formira gradiјent duž ćelijske membrane, a za takav proces potreban je utrošak energije. Zbog toga je katalitička reakcija u kojoj učestvuje alternativna NDH-2 ireverzibilna i egzergonička, tj. sa negativnom ukupnom standardnom promenom Gibsove energije. Umesto utroška energije za aktivaciju protonске pumpe, energija se oslobađa u vidu toplote. Ubikvinol se u daljem procesu oksidoredukcije reoksiduje što je takođe katalizovano enzimom, npr. kao što je

alternativna oksidaza [57]. Struktura makromolekularnog sistema koji učestvuje u oksidoredukcionom procesu respiratornog lanca u mitohondriji parazita, prikazan je na *Slici 3*.



**Slika 3.** Reakcija redukcije ubikvinona i strukturni prikaz homodimerne strukture *L*NDH-2 u kontaktu sa membranom.

Na *Slici 3* je prikazana ukupna reakcija oksidoredukcije i hipotetička kvaternarna struktura homodimera, tj. model za *L. infantum* NDH-2, *L*NDH-2. Orijeentacija interakcije sa unutrašnjom membranom je ustanovljena na osnovu kristalografskih struktura sa PDB oznakama 4g6g, 4g73 i 5jwa [58, 53]. C-terminus enzima ima hidrofobne osobine, pa je uronjen u površinski sloj membrane. Rosmanov domen NDH-2 čine 6 heliksa (crveno) i 6 beta pločica (žuto). To je funkcionalni deo enzima, koji sadrži vezivno mesto za dinukleotid, pri čemu je na slici prikazan trojni kompleks (plavo) koji obuhvata dva vezivna mesta dinukleotida i UQ-1 koje je orijentisano u smeru ka membrani.

## 1.4. Pretraga kandidata sa potencijalnom inhibitornom aktivnošću na lajšmanije

### 1.4.1. Specijalizovane baze i arhive jedinjenja

Baza podataka jedinjenja koja je korišćena za virtuelni skrining je MetIDB [59]. Baza sadrži podatke o eksperimentalnim i izračunatim  $^1\text{H}$  NMR spektrima, 3D strukturama i drugim parametrima za 6.000 jedinjenja klase flavonoida. U bazi se mogu pronaći i strukture drugih jedinjenja, prirodnih proizvoda, a posebno proizvoda sekundarnog metabolizma.

Interna arhiva jedinjenja koja je korišćena u ovom radu je KI, arhiva Hemijskog Instituta u Ljubljani. Ova baza je korišćena za virtuelni skrining jedinjenja na osnovu modela inhibitora NDH-2. Arhiva sadrži više od 500.000 komercijalno dostupnih jedinjenja.

## 1.4.2. Baze sekundarnih podataka

Baze sa aktivnostima jedinjenja koja su korišćena za izradu modela zasnovanih na strukturi liganda su preuzete iz ChEMBL baze podataka [60,61]. Za uređivanje podataka, analizu fizičko-hemijskih osobina i pregled eksperimentalnih podataka za jedinjenja koristili smo NIH PubChem [62]. Za informacije o farmakološkim osobinama terapeutika koristili smo DrugBank bazu [63].

U ChEMBL bazi su dostupni podaci o strukturama jedinjenja, potvrde o bioaktivnosti, vrsti eksperimenata na osnovu kojih su te aktivnosti izmerene i veze sa ciljnim mestom dejstva. Uređivanje baze je izvođeno uglavnom ručno, na osnovu primarnih podataka, tj. literature. Odnedavno na ChEMBL servisu je dostupan i tip pretrage pomoću primarne sekvence ciljnog mesta u FASTA formatu. Uz pomoć integrisanog BLAST-a (engl., *Basic Local Alignment Search Tool*) [64], za upitnu sekvencu se vrši pretraga po sličnosti sa ciljnim mestima dostupnim u bazi, a za koje postoji izmerena aktivnost. U trenutnoj verziji (chembl verzija 2.7) nalazi se 2 miliona jedinjenja, 13.382 ciljnih mesta i 16.066.462 vrednosti za bioaktivnost različitog tipa [61].

NIH Pubchem je repozitorijum podataka Nacionalnog centra za bioinformatičke informacije (NCBI) za jedinjenja dostupnih putem jedinstvenog identifikacionog broja (CID) i supstance dostupnih putem jedinstvenog identifikacionog broja (SID). Pristup repozitorijumu je javno dostupan (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), a pretraga se može izvršiti na osnovu zadate strukturne ili molekulske formule. Osim hemijske formule za pretragu se može koristiti i SMILES format, InChi ključ, kao i unos nekog od naziva za jedinjenje ili supstancu. Rezultati pretrage sadrže podatke o hemijskim, fizičkim, farmakološkim, toksikološkim i drugim osobinama dobijenim na osnovu eksperimentalnih rezultata. Dodatno, dostupne su oznake bezbednosti za hemikalije, linkovi ka primarnim podacima, kao i specifikacije za patent - gde je to primenljivo. Trenutna statistika PubChem je sledeća: 110.349.380 jedinjenja, 293,036,119 podataka o bioaktivnosti, 96,561 proteina, 238,612 puteva interakcije između malih molekula, proteina i gena. Konzorcijum za doprinos i razvoj PubChem repozitorijuma neprestano raste, a trenutno broji 836 članova [65].

DrugBank repozitorijum sadrži farmakološke i kliničke podatke o terapeutcima. Trenutno postoje četiri filtera koja klasifikuju pretragu na osnovu terapeutika, ciljnih mesta dejstva, metaboličkog puta i indikacije. Klasifikacija terapeutika izvršena je po grupama na: dozvoljeni lekovi, nedozvoljeni lekovi, nutrijenti, eksperimentalna grupa i lekovi povučeni sa tržišta.

RCSB PDB (u daljem tekstu, PDB) je uređena baza strukturnih podataka dobijenih upotrebom kristalografskih metoda [66]. Od strukturnih podataka u PDB se mogu pronaći modeli proteina, DNK, RNK i kompleksnih ansambala sa rešenjima strukture receptor-ligand ili generalno molekul-molekul interakcija. Tip metode na osnovu koje su dobijani podaci mape gustine elektrona je uglavnom rendgenska kristalografija, nuklearna magnetna rezonanca ili elektronska mikroskopija. Količina strukturnih podataka se na godišnjem nivou eksponencijalno povećava. Broj po prvi put rešenih struktura se na godišnjem nivou povećao 112 puta u periodu između 1976. i 2020. Uz napredak sa mogućnostima analize podataka porastao je i broj rešenja po strukturi, pa je u 2020. godini broj predloženih rešenja bio skoro 173.000 na 14.036 klastera sa identitetom > 95%.

UniProt baza podataka [67], ima za cilj da obezbedi pristup informacijama o sekvenci i funkciji proteina. UniProtKB se sastoji od anotiranih (209.157.139 TrEMBL sekvenci) i revidiranih (563.972 SwissProt sekvenci) podataka o strukturi i funkciji (i klasifikaciji na osnovu tih parametara), taksonomiji, subćelijskoj lokalizaciji i oboljenjima koje se dovode u vezu sa anotiranom sekvencom.



## 1.5. Modeli kao filteri sa primenom u virtuelnom skriningu

### 1.1.1. Deskriptori EIIP/AQVN

Funkcionalne osobine molekula se mogu objasniti upotrebom deskriptora [68]. Deskriptori su numeričke ili kategoričke veličine koje se računaju primenom matematičkih ili logičkih operacija za čiju parametrizaciju koristimo poznate osobine jedinjenja. Osobine jedinjenja su dobijene iz eksperimentalnih rezultata, primenom statistike ili semiempirijskih proračuna [69].

Elektron-jon interakcioni potencijal (EIIP) i prosečan kvazi-valentan broj (AQVN) su molekularni deskriptori koji služe kao indikacija dalekosežnih interakcija bioloških molekula. Dalekosežne receptor-ligand interakcije se javljaju na udaljenosti molekula  $> 5 \text{ \AA}$  [70,71]. Proračun deskriptora u ovom slučaju se zasniva na generalnom modelu pseudopotencijala [72]:

$$EIIP = 0.25Z^* \frac{\sin(1.04\pi Z^*)}{2\pi} \quad (1)$$

gde je  $Z^*$  prosečan kvazi-valentni broj (AQVN) definisan jednačinom:

$$Z^* = \sum m \left( \frac{n_i Z_i}{N} \right) \quad (2)$$

gde je  $Z_i$  - valentni broj  $i$ -te atomske komponente,  $n_i$  - broj atoma  $i$ -te komponente,  $m$  - broj atomskih komponenti u molekulu, i  $N$  ukupan broj atoma. Vrednosti EIIP koje se računaju na osnovu jednačine (1) i (2) su izražene u Rajdbergovim jedinicama energije ( $1\text{Ry} \approx 2.18 \cdot 10^{-18} \text{ J}$ ).

U slučaju kada vrednosti AQVN i EIIP konvergiraju, postoji i potencijal u receptor-ligand interakciji. Prethodno se, za različite vrste infektivnog oboljenja (HIV infekcija, ebola, malarija, bakterijske infekcije), pokazalo da mali molekuli sličnih AQVN i EIIP vrednosti imaju zajedničko, terapijski značajno ciljno mesto. Na osnovu toga je formiran kriterijum za VS velikog broja jedinjenja [73, 74]. Vrednovanje organskih jedinjenja na osnovu AQVN i EIIP deskriptora je metoda klasifikacije na osnovu biološke aktivnosti (mutagenost, karcinogenost, toksičnost, antibakterijsko dejstvo i citotoksičnost) [71]. Računanje EIIP/AQVN deskriptora se može obaviti na internet servisu, putem stranice Laboratorije za bioinformatiku i računarsku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča” (<https://www.vin.bg.ac.rs/180/tools/formcalc.php>).

U ovom radu, proračun EIIP/AQVN deskriptora je iskorišćen kao klasifikaciona metoda za mapiranje aktivnih i neaktivnih probi. Model EIIP/AQVN je primenjen u okviru VS, prvenstveno radi inicijalne i racionalne redukcije hemijskog prostora za pretragu.

### 1.5.1. Formiranje 3D-QSAR modela u programu Pentacle

Za dobijanje trodimenzionalnog modela kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (3D-QSAR) u ovom radu, koristili smo program Pentacle (verzija 1.05) [75,76]. Zbog toga ćemo reći nešto više o statističkim analizama integrisanim u ovom programu, kao i o deskriptorima koji se koriste za izradu modela. Pentacle je program za proračun deskriptora koji ne zavise od poravnanja (engl., *alignment free*), tj. GRIND deskriptora (engl. *GRid INdependent Descriptors*) [77]. Deskriptori GRIND se računaju na osnovu molekularnih polja interakcija (MIF) i mogu se podeliti po tipu na: Hidrofobne interakcije (DRY proba), akceptore vodonične veze (O proba), donore vodonične veze (N1 proba) i sterne interakcije (TIP proba). Ulazni podaci za izradu GRIND deskriptora su stereochemijski optimizovane 3D strukture jedinjenja sa korektnim redom veze i dodatim atomima vodonika. Za učitavanje podataka se koristi neki

of formata: Tripos mol2, MDL Sdf ili GRID. Nakon izračunavanja molekularnih polja interakcija, izdvajaju se regioni koji predstavljaju povoljne interakcije između probe i funkcionalnih grupa na molekulu, tzv. čvorni regioni. Prvi korak je proračun MIF, a drugi se još naziva i proces diskretizacije, tj. filterovanja MIF čiji broj za datu strukturu malog molekula može biti i do 100.000. Filterovanje je bazirano na vrednosti intenziteta polja i uzajamnog rastojanja u 3D prostoru. Ansambl regiona je i model tzv. virtuelnog vezivnog mesta receptora (engl. *Virtual Receptor Site*, VRS), i GRIND deskriptor je skup promenljivih koje nose vrednosti geometrijskih odnosa između regiona u ansamblu. Proces kodiranja GRIND deskriptora se zasniva na MACC-2 (engl., *maximum auto- and cross-correlation*) metodi koja računa energiju interakcije između svakog para čvornih regiona, uzimajući u obzir njihove međusobne udaljenosti. Rezultat kodiranja je da promenljive postaju nezavisne od položaja strukture jedinjenja u 3D prostoru. U programu Pentacle, rezultat se prikazuje kao superpozicija molekulske strukture jedinjenja i VRS, koje simuliraju interakciju molekula sa okolinom. Rezultat je takođe prikazan korelogramom odnosa energije između čvornih regiona i uzajamnog rastojanja.

Za analizu GRIND deskriptora i formiranje 3D-QSAR modela na osnovu dobijenih GRIND deskriptora, mogu se primeniti metode sa i bez nadzirnog učenja [78, 79]. Pogodne metode koje se najčešće koriste u hemometriji, a koje su dostupne u programu Pentacle su analiza glavnih komponenti (engl. *Principle Component Analysis*) i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square*).

Metoda koja se dobro pokazala za uklanjanje redundantnih iz skupa promenljivih je PCA. Jednostavan oblik formule PCA matrice je:

$${}_nX^m = {}_nT^d (P^T)^m \quad (3)$$

gde je  $X$  – matrica sa  $n$  brojem objekata i  $m$  promenljivih;  $T$  – redukovana matrica  $n$  broja objekata i  $d$  promenljivih;  $P$  – matrica preslikavanja sa  $d$  objekata i  $m$  promenljivih.

Glavne komponente su linearna kombinacija  $m$  slučajnih promenljivih koja se predstavlja u okviru novog koordinatnog sistema, pri čemu se broj novonastalih promenljivih ( $d$ ) dobija na osnovu kovarijanse. Tako je moguća ekstrakcija latentnih promenljivih (LV), tj. nezavisnih promenljivih koje su dobijene inferencijom iz početnih promenljivih i u geometrijskom smislu ortogonalne na njih. Prva glavna komponenta (PC1) po pravilu ima najveću varijansu. Kako je pokazano, primenom PCA na GRIND deskriptorima se dobija konačan broj glavnih komponenti koje objašnjavaju dominantni trend molekularnih osobina na osnovu proračunatih deskriptora (GRIND-PP metoda) [80]. Pre upotrebe PCA, podaci za unos su skalirani (proces normalizacije podataka) metodom centriranja srednjih vrednosti. Za validaciju QSAR modela, na osnovu PCA, ukupan broj deskriptora se može podeliti na skupove za trening i za test [81]. Druge metode za redukciju nezavisnih promenljivih se zasnivaju na faktorskoj analizi ili su to metode nelinearnog mapiranja [80].

Formiranje PLS modela se zasniva na statistici višestruke linearne regresije koja je primenjena na veći broj zavisnih promenljivih. Višestruka linearna regresija se računa na osnovu većeg broja nezavisnih promenljivih što podrazumeva da je broj dimenzija veći od 2. Za formiranje regresionog modela, linearna nezavisnost doprinosi efikasnosti, tj. daje jedinstvene informacije i čini model upotrebljivim za primenu u predviđanju molekulske funkcije [82]. Ako je zahtev za višestruku korelaciju zadovoljen, za svrhe formiranja modela primenjuje se regresiona jednačina:

$$Y = C_1 + C_2X_1 + C_3X_2 + \dots + C_kX_{k-1} + E \quad (4)$$

gde je  $Y$  – zavisna promenljiva,  $C$  – regresioni koeficijenti koje treba oceniti,  $X_k$  – nezavisne promenljive od 1 do  $k$ ;  $E$  – greška merenja, tj. ostaci. U slučaju kada imamo više zavisnih promenljivih, analitičko rešenje se dobija upotrebom matrice regresionih jednačina sa  $n$  redova i jednom kolonom za  $Y$



$(n \times 1)$ ;  $n$  redova i  $m$  kolona za  $X$  ( $n \times m$ ); jednim redom i  $m$  kolona za  $C$  ( $1 \times m$ ). Najkraći format jednačine za multivarijantnu regresiju (slučaj za  $Y$   $n \times m$ ) je:

$$Y = X\beta + \varepsilon \quad (5)$$

U jednačini (5)  $X\beta$  je sistematska komponenta modela, a  $\varepsilon$  slučajna komponenta modela [82]. U idealnom slučaju, nezavisne promenljive (koje se nazivaju i prediktori vrednosti) su visoko korelisane sa zavisnim promenljivama, tj. promenljivama za koje se formira prediktivni model [83].

### 1.5.2. Validacija 3D-QSAR modela

Validacija 3D-QSAR modela se u osnovi svodi na proračune varijanse zavisne promenljive ( $Y$ ), primenom metode najmanjih kvadrata. Metod se sastoji u tome da se nađe koeficijent  $\beta$  sistemske komponente (jednačina 5), tako da je srednja vrednost kvadrata devijacije minimalna [84]. U praktičnom smislu, primenom metode se iterativno računa linearna zavisnost promenljive ( $Y$ ) od nezavisne ( $X$ ) primenom regresione jednačine, sve do postizanja najbolje vrednosti za koeficijent determinacije –  $R^2$ . Koeficijent se izražava u standardizovanim vrednostima u intervalu od 0 do 1. Poznato ograničenje u hemometrijskim proračunima je mali broj  $Y$  generišućih podataka (npr. broj jedinjenja u okviru trening skupa,  $N$ ).

Prilikom unosa redundantnih nezavisnih promenljivih nastaje problem prevelikog slaganja (engl. *overfitting*) gde je stabilnost koeficijenta determinacije zadovoljena, ali model krajnje neadekvatan za predviđanje. Problem se najpre rešava internom validacijom, pri čemu se kao rezultat prikazuje koeficijent prediktivnog kapaciteta –  $Q^2$ . Za internu validaciju koriste se: (1) unakrsna validacija (LOO, LMO); (2) podela na podskup za trening i podskup za test, u slučaju da su oba prisutna u toku modelovanja; (3) metode permutacionog testa [84].

Formiranje (Q)SAR modela po OECD principima utiče na kvalitet modela i uspešnost validacije modela, kao i dobro predviđanje za interni (predviđanje  $Y$  u okviru trening skupa) i eksterni skup (predviđanje  $Y$  test skupa) [85]. (Q)SAR model koji je saglasan sa ovim principima ima nedvosmislen algoritam po kome se formira, definisan domen primenljivosti, odgovarajuću vrednost metrike za validaciju, robusnost i potencijal predviđanja, kao i mehanističku interpretaciju ukoliko je moguća.

### 1.5.3. Formiranje farmakofornog 3D model u programu LigandScout

Prema IUPAC-u, farmakofora je ansambl sternih i elektrostatičkih osobina jedinjenja koje objašnjavaju specifičnost molekulske interakcije liganda sa ciljnim mestom, a na osnovu kojih se izaziva ili blokira biološki signal [86]. Farmakofora se formira na osnovu MIF proba, a osnovni tipovi farmakofornih elementa za opis receptor-ligand interakcije su donor, akceptor vodonične veze, hidrofobna i aromatična proba. Pored navedenih elemenata, farmakofora sadrži i ekskluzione elemente (XVols) koji imitiraju strukturne osobine vezivnog mesta u receptoru.

Primena farmakofora se pokazala efikasnom za modelovanje receptor-ligand interakcija [86]. Program koji je specijalizovan za analizu receptor-ligand interakcija upotrebom 3D farmakofora je LigandScout [87]. Ligandscout je sastavljen iz modula za modelovanje zasnovano na strukturi enzima i liganda, modula za VS i modula za superpoziciju struktura malih molekula. U okviru komercijalne verzije programa, dostupan je OMEGA alat koji služi za generisanje konformacija i formiranje arhive jedinjenja za skrining na osnovu zadate neoptimizovane strukture jedinjenja u običajenim formatima (npr. SMILES) [88]. Dobijeni parametri za 3D farmakoforni model, dostupni u programu LigandScout, pokazuju vrednost preklapanja farmakofornih elemenata sa funkcionalnim grupama jedinjenja. Ocena slaganja

farmakofore (engl., *pharmacophore fit*) se izražava kao broj farmakofornih elemenata koji se preklapaju sa strukturom (funkcionalnom grupom) i RMSD od idealne superpozicije farmakofornog elementa i funkcionalne grupe. Mogu se koristiti i druge ocene kojima je zajedničko da se prikazuju u vidu normalizovanih vrednosti od 0 do 1, pri čemu je 1 optimum preklapanja strukturnih elementa jedinjenja i farmakofore. Za proračun koji uračunava sternu zaklonjenost, koristi se ocena preklapanja atomskih sfera (engl. *atom shape overlap*) ili *Gaussian shape similarity* [87].

#### 1.5.4. Homologno modelovanje upotrebom Phyre 2 servisa i validacija modela

Ispitivanje receptor-ligand interakcija zahteva upotrebu 3D strukturnog modela receptora, tj. ciljnog mesta dejstva i liganda. Predviđanje proteinske strukture polazeći od sekvence je problematika za čije rešavanje nije bilo značajnog pomaka u periodu od pola veka, sve do nedavno kada je trend potencijalne primene počeo da raste. Dve kategorije modelovanja proteinske strukture na osnovu sekvence su: (1) modelovanje zasnovano na mustri (engl. *template-based modeling*) i (2) slobodno modelovanje (engl. *free modeling*) [89]. Metoda homolognog modelovanja pripada prvoj kategoriji. Homolognim modelovanjem se računaju koordinate proteinske strukture u vidu 3D modela sa atomskom rezolucijom čija je jedinica angstrom ( $\text{\AA}$ ) i koja je uporediva sa homolognom strukturom čiji se podaci mogu pronaći u kristalografskoj bazi podataka. Početni podaci za dobijanje homologne strukture su sekvenca nepoznate proteinske strukture i muštra na osnovu koje će se model izgraditi. Da bi se izračunala strukturna sličnost, polazi se od poravnanja sekvenci. Nakon toga, sledi predviđanje sekundarne strukturne na osnovu osobina domena. Algoritam modelovanja pronalazi rešenje za proteinsko savijanje zadovoljavajući prostorna ograničenja i minimum energije (što bliže nativnoj strukturi) [90]. Primena ograničenja se vrši kontrolom uzajamnog rastojanja između atoma, vrednosti za uglove veza i torziona uglove, kao i drugih osobina atoma koje se dobijaju na osnovu strukture mustre. Homologno modelovanje se još naziva i komparativno modelovanje, pa se za validaciju modela procenjuje slaganje ili neslaganje modelovane strukture sa eksperimentalnim podacima (uključujući mapu elektronske gustine). Metode validacije 3D modela procenjuju ispravnost lokalne i globalne konformacije tako da se kao rezultat dobija procenat pouzdanosti modela. Pouzdan model koristi računarskoj analizi koja odgovara fizičkim principima (npr. molekulske mehanike) [90].

Pouzdanost modela se potvrđuje podacima iz poravnanja sekvenci. U idelnom slučaju, primarna struktura će ukazati na sličnosti i razlike koje dovode u pitanje biološku funkciju proteina korišćenih kao mustre (npr. pogodno za studije mutacije). U tim slučajevima, visoke homologije, algoritam za dobijanje homolognog modela se svodi na problem modelovanja neuređenih domena (ugl. domeni sa petljom). Kako se sličnost sekvenci smanjuje ( $< 20\%$ ) približava se zona nepouzdanog modela (engl., *twilight zone*) [91], i u tom slučaju se dovodi u pitanje primena metoda homolognog modelovanja za rešavanje problema strukture i funkcije. Identičnost para sekvenci sa  $> 15\%$  i ukoliko je poznato da se radi o funkcionalno sličnim proteinima (enzimima), predstavlja kriterijum za upotrebu homolognog modela u ispitivanjima receptor-ligand interakcija [92]. Identičnost od  $15\%$  je racionalan izbor za kriterijum zadovoljavajuće sličnosti, ako uzmemo u obzir održanje aktivnog domena u sekvencama izozima u toku evolucije.

Homologni model je podležan optimizaciji, koja se praktično svodi na rafinisanje 3D strukture. Potrebni parametri za rafinisanje modela se mogu dobiti na osnovu *Ramachandran*-ovog dijagrama [93]. Dijagram predstavlja vrednosti torzionih uglova  $\varphi$  (phi) i  $\psi$  (psi) – koji definišu stereohemiju rotamera bočnih aminokiselinskih ostataka. Torzioni ugao veza  $\varphi$  je definisan geometrijom veza između atoma  $N(i-1)$ ,  $C(i)$ ,  $C\alpha(i)$  i  $N(i)$  u nizu, a ugao  $\psi$  je analogno definisan sa  $C(i)$ ,  $C\alpha(i)$ ,  $N(i)$ ,  $C(i+1)$  geometrijom veza, pri čemu je  $i$  redni broj torzionog trija atoma u nizu. Ovim uglovima se prvenstveno identifikuju uređeni motivi koji se ponavljaju i koji su karakteristični za stabilnu sekundarnu strukturu. *Ramachandran*-ov dijagram pokazuje raspodelu vrednosti za torziona uglove veza na osnovu kojih se mapira tip prisutne sekundarne strukture (heliksa ili nabrane ravni) ali i optimalnost uglova kod aminokiselina prisutnih u

zavojnici ili neuređenoj petlji (Pro, Gly). Torzioni uglovi u modelu mogu imati vrednosti koje odgovaraju nekom od domena: preferiranih vrednosti, dozvoljenih vrednosti i nedozvoljenih vrednosti.

Servis Phyre 2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine v2.0) daje mogućnost izbora normalnog i intenzivnog metoda pretrage strukturnih informacija, tj. mustri za zadatu sekvencu proteina [94]. Pretraga započinje višestrukim poravnanjem sekvenci upotrebom HHblits i PSI-Blast [95]. Višestruko poravnanje ima za cilj pretragu sličnosti u sekvencama na osnovu skrivenih Markov modela (engl., *Hidden Markov Model*) sa ciljem pronalazjenja homologa. Zatim se vrši predviđanje sekundarne strukture po zadatoj sekvenci, upotrebom PSIPRED (engl., *Predict Secondary Structure*, v3.3.) [96]. PSIPRED generiše podatke i o neuređenosti strukture. Nakon toga, formira se trodimenzionalna struktura u saglasnosti sa kristalografskim rešenjem. Potom se modeluju petlje. Pri standardnom metodu rada, petlje se modeluju na osnovu arhive struktura petlji i uz pomoć empirijskog seta za vrednost energije. Bočni ostaci se modeluju upotrebom arhive rotamera (iz Roland Dunbrack-ove laboratorije) i odabirom konformacija (R3 pristup) za izbegavanje sternih smetnji. U intenzivnom metodu rada, 3D struktura petlji se računa *ab initio* na osnovu Poing protokola [96]. Rezultat homolognog modelovanja u Phyre 2 su 3D strukture sa izračunatim vrednostima za pokrivenost modelovane sekvence i pouzdanosti modela. Lista modela je rankirana na osnovu tih vrednosti. U slučaju kada je vrednost pouzdanosti modela > 90%, tada postoji i dokaz o homologiji tercijarne strukture. To u praktičnom smislu znači da se superpozicijom struktura modela i mustre, dobija RMSD u intervalu od 2 do 4 Å (u odnosu na nativnu strukturu). Interval je značajan ako se poredi sa vrednostima rezolucije kristalografskog rešenja za strukturu mustre. U Phyre 2 dokumentaciji pronalazimo da se sličnost sekvence < 30% odražava na poteškoće u modelovanju dugih petlji (misli se na dužinu petlje > 5 Å).

#### 1.5.5. Programi i parametri za doking proračune

Doking je korišćen u okviru VS kao metoda pretrage zasnovane na strukturi enzima NDH-2 i ARG iz roda *Leishmania* kao receptora. Upotrebom dokinga je dobijen opseg vrednosti afiniteta potencijalnih inhibitora ka odabranom receptoru, kao ciljnom mestu. Na osnovu serije ponovnog dokinga i dokinga pokušali smo da objasnimo mehanizam dejstva potencijalnog inhibitora. Doking se takođe koristi u anti-targetiranju. U nastavku sledi pregled mogućnosti doking alata korišćenih u ovom radu.

Za doking smo koristili GOLD [97], Glide XP [98], AutoDock 4 (u daljem tekstu AD4) i AutoDock Vina (u daljem tekstu Vina) [99, 100]. Svi korišćeni programi pružaju opcije za fleksibilan doking što je važan preduslov za merenje performansi. Ujedno, radi sigurnosti u statistički značaj rezultata pronađene su srednje vrednosti iz proračuna energije interakcije, dobijenih uz pomoć različitih doking algoritama, koje ćemo navesti u nastavku ovog poglavlja. Na taj način, postignut je konsenzus u predviđanju, što je u velikom broju slučajeva preporučeni metod rada [101]. GOLD i Glide XP su komercijalno dostupni alati u okviru programa za biofizičke proračune, CSD i Schrodinger paketa [102,103].

Prvobitno AD4, a kasnije Vina su dve verzije besplatnog programa. Razlika je u algoritmu računanja virtualne rešetke vezivnog mesta receptora, pa je Vina tu efikasnija za 2 reda veličina [104]. Više informacija se može pronaći na internet stranici Istraživačkog centra „Scripps” (<http://AutoDock.scripps.edu/>). Za umrežavanje AD4, Vina i GUI alata za trodimenzionalni prikaz rezultata, korišćen je pymol [105].

Program Pymol (v2.0) je program otvorenog koda održavan od strane firme „Schrodinger LCC”. Namenjen je za molekulska vizualizaciju. Napisan je u programskom jeziku python i C, a može se koristiti upotrebom GUI (graphical user interface) ili putem komandne linije [106].

Glide je komercijalni doking algoritam dostupan u okviru programa Maestro, kompanije „Schrodiner LLC”. Glide XP je optimizovan za uklanjanje lažnih pozitivnih proba u okviru VS. Preostale verzije Glide algoritma su Glide HTPS, za skrining preko jednog miliona jedinjenja, Glide SP (metod rada sa standardnom preciznošću), za skrining 10.000 – 900.000 jedinjenja [107].

Doking i proračun kvaliteta dokinga zavise od pI proteina protonacije proteina, prisustva molekula rastvarača, klasifikacija aktivnih i neaktivnih proba i procesiranja molekulskom mehanikom sa generalizovanom-Born i površinom dostupnom rastvaraču (MM-GBSA, *molecular mechanics- generalized Born-Surface Accessibility*) [108]. MM-GBSA je optimizovana za predviđanje slobodne energije vezivanja ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) za kongeneričku seriju jedinjenja zbog čega se koristi kao dorada doking rezultata na osnovu Glide-a.

Apsolutne vrednosti za energiju interakcije kao rezultat dokinga, ne moraju se nužno podudarati sa biološkim rezultatima. Međutim, rangiranje liganada na osnovu vrednosti slobodne energije interakcije ( $\Delta G$ ) je saglasno sa rangiranjem na osnovu bioloških merenja, posebno u slučaju za kongeneričku seriju jedinjenja koja se poredi sa rezultatima ponovnog dokingom kokristalisanog liganda [109]. Zbog toga što su rezultati dokinga aproksimacija slobodne energije interakcije, niže vrednosti ukazuju na viši afinitet. Linearne zavisnosti slobodne energije vezivanja i biološke vrednosti afiniteta receptor-ligand interakcije formulisana je za promenu Gibsove slobodne energije u stanju ravnoteže pri normalnim uslovima ( $\Delta G^\circ$ ):

$$\Delta G^0 = -2.3RT \log K_i \quad (6)$$

gde je  $T$  – temperatura u °K;  $K_i$  – ravnotežna konstanta interakcije i  $R$  – univerzalna gasna konstanta u  $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ .

#### 1.5.6. PAINS deskriptori

Tip hemijskih jedinjenja koja na osnovu svojih osobina i aktivnosti ometaju interakcije terapeutika sa ciljnim mestom u toku bioloških istraživanja su PAINS jedinjenja (engl., *Pan Assay Interference Compounds/Substances*) [110]. Na nivou molekulske strukture, sa PAINS se označavaju strukture i funkcionalne grupe jedinjenja za koje je zajedničko da imaju nespecifično receptor-ligand prepoznavanje, te najčešće daju lažno pozitivne rezultate na testu aktivnosti jedinjenja, jer se pokazalo da je efikasnost takvih jedinjenja mala [111]. Po tipu reakcionih osobina ovoj grupi pripadaju redukujući agensi i modulatori kovalentne veze.

Eliminacija PAINS jedinjenja se može izvršiti na osnovu binarne klasifikacije. Jednostavna pretraga PAINS fragmenata na osnovu InChi, SMILES ili drugog formata jedinjenja može se koristiti kao filter u okviru VS. Takva primena ima za cilj optimizaciju protokola VS, pri čemu se uklanjaju lažne pozitivne strukture iz skupa jedinjenja kandidata dobijenih u prethodnom koraku VS protokola.

#### 1.5.7. Predviđanje ADMET rizika

Karakterizaciju kandidata na osnovu proračuna deskriptora za fizičko-hemijske osobine, procenu interakcije sa transporterima i metaboličkim enzimima, toksičnost i procenu drugih farmakoloških osobina kandidata smo izveli upotrebom ADMET Predictor programa [112]. Program je koncipiran po modulima koji su grupisani po navedenoj klasifikaciji osobina. Kvalitet kandidata kao vodeće (engl. *lead*) jedinjenje, se procenjuje na osnovu ADMET Risk<sup>TM</sup> funkcije bodovanja, koja za rezultat daje vrednosti u intervalu od 0 do 22. U ovom radu, vrednosti funkcije su bile u intervalu 0-11. Kao rezultat, ADMET rizik je zasnovan na 117 predviđenih osobina jedinjenja koje kombinacijom karakterišu apsorpciju, metabolizam i toksično dejstvo jedinjenja. Na osnovu rezultata, dalje se može formirati model

kvantitativnog odnosa strukture i osobina (QSPR), za šta je pogodan modul ADMET Modeler. Pored ovog modula, koristili smo modul MedChem Designer u okviru kojeg su dostupni alati za analizu senzitivnosti strukture. Program ADMET Predictor je u nekoliko nezavisnih slučajeva dao precizne rezultate predviđanja osobina jedinjenja [112-15].

## 2. Ciljevi istraživanja

Enzimi kao ciljna mesta za selektivan i specifičan razvoj inhibitora rasta *Leishmania* spp. su arginaza (ARG) i tip 2 alternativna NADH dehidrogenaza (NDH-2). Inhibicija arginaze prouzrokuje oksidativni stres usled poliaminske auksotrofije. Zbog strukturnih razlika arginaza u ćelijama patogena i ćelijama sisara, ovaj enzim predstavlja adekvatno ciljno mesto za razvoj specifičnih inhibitora. Alternativna NDH-2 je adekvatno ciljno mesto za nove agense u terapiji lajšmanioze jer je esencijalan za normalnu funkciju respiratornog lanca organizma patogena. Ovaj enzim katalizuje elektronski transfer sa NADH do UQ, bez kuplovane protonske pumpe, pa je zbog toga pogodan za razvoj selektivne toksičnosti na ćelije lajšmanije.

Prethodna istraživanja aktivnosti prirodnih jedinjenja doprinela su identifikaciji novih strukturnih motiva koji se mogu iskoristiti za razvoj inhibitora ARG. Takve structure se mogu iskoristiti za dizajn farmakološki aktivnih jedinjenja na bazi prirodnih proizvoda sa dijetetskom primenom za oboljenja koja su u vezi sa putem regulacije u kojem učestvuje enzim arginaza. Druge klase hemijskih jedinjenja koje su pokazale aktivnost na lajšmanije, a koje se takođe mogu razmotriti kao inhibitori arginaze, su derivati oksadiazola i indolizina.

Pogodno jedinjenje za razvoj farmakofornog modela za pretragu potencijalnih inhibitora enzima alternativne NDH-2 je HDQ. Derivati HDQ pokazuju nanomolarni inhibicioni potencijal na alternativnoj NDH-2 prisutnoj u vrsti *P. falciparum*. Navedeni derivati su hemijski i strukturno slični ubikvinonu pa su zbog toga adekvatna početna jedinjenja za pretragu zasnovanu na strukturi liganda.

Na osnovu izloženog, osnovni ciljevi ovog istraživanja su:

1. Razviti VS protokol koji integriše metode zasnovane na strukturi liganda i ciljnog mesta dejstva u cilju odabira inhibitora enzima arginaze.
2. Razviti VS protokol koji integriše metode zasnovane na strukturi liganda i ciljnog mesta, sa ciljem odabira jedinjenja sa merljivim afinitetom u odnosu na ubikvinon, a čija aktivnost inhibira funkciju enzima alternativne NDH-2.
3. Izbor i priprema prirodnih i sintetskih inhibitora za *in vitro* testiranje.
4. Ispitivanje aktivnosti odabranih inhibitora za *in vitro* testiranja na ćelijskim linijama *Leishmania* spp.
5. Anti-target i ADMET profili kandidata koji pokazuju inhibitorno dejstvo na patogene iz roda *Leishmania*.
6. Ispitivanje inhibitorne aktivnosti kandidata na drugim mikroorganizmima radi kvantifikacije specifičnog i selektivnog dejstva.

U okviru ove disertacije, eksperimenti neophodni za rešavanje postavljenih ciljeva i zadataka izvedeni su u okviru COST CM1307 projekta čija je tema ciljana hemoterapija za oboljenja izazvana endoparazitima [116]. Deo istraživanja koji se tiče računarske obrade podataka i razvoja modela koji se navode u ovom radu, urađeni su na Institutu za nuklearne nauke „Vinča”, u laboratoriji za bioinformatiku i računarsku hemiju i na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, Katedri za farmaceutsku hemiju.

Baze jedinjenja koje su korišćene u ovom radu su bile dostupne zahvaljujući saradnji sa Hemijskim Institutom u Ljubljani, kao i , Univerzitetom u Tuluzu, odsekom za hemiju i to u okviru COST akcije CM1307.

Ispitivanja na ćelijskim linijama *Leishmania* spp. i drugi *in vitro* eksperimenti su sprovedeni na Univerzitetu u Lisabonu - Institutu „BioISI-Biosystems & Integrative Science”.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Pregled poglavlja

Metodologija ovog rada se zasniva na izradi i primeni različitih modela za predviđanje specifične biološke aktivnosti, a koja se dovodi u vezu sa inhibicijom rasta *Leishmania* spp. Jedan takav model je predstavljen pomoću funkcije preslikavanja ulaznih osobina u izlazne osobine jedinjenja i ima zadatak da matematički proveri hipotezu  $h(x)$ , pri čemu je  $x$  skup strukturnih podataka. Kvalitet modela se procenjuje na osnovu statističkih metoda, a sam proces provere kvaliteta modela naziva se validacija modela. Dobar model nije ograničen samo na pronalaženje pravilnosti, već i na identifikovanje nepravilnosti koje su rezultat šuma, tj. slučajnosti.

U okviru prve faze istraživanja primenili smo VS protokol koji se sastoji od AQVN/EIIP filtera, 3D-QSAR ili farmakofornog modela za pretragu jedinjenja upotrebom metode zasnovane na ligandu. Metodu homolognog modelovanja, primenili smo za dobijanje 3D modela enzima alternativne *L. infantum* NDH-2 (*L*NDH-2), polazeći od sekvence [117]. Za modele arginaze *L. mexicana* (*L*mARG) i *H. sapiens* (*H*sARG) smo koristili kristalografska rešenja 3D struktura [118, 119]. Na taj način smo u našem istraživanju upotpunili VS protokol upotrebom metoda zasnovanih na strukturi ciljnog mesta dejstva inhibitora.

Eksperimentalna provera modela izvršena je u drugoj fazi istraživanja, u kojoj smo odabrane kandidate testirali *in vitro*. Ono što je uticalo na kriterijum odabira kandidata za biološka ispitivanja je hemijski i strukturni diverzitet, kao i izračunata bioaktivnost na osnovu hemometrijskih modela sačinjenih od eksperimentalno izmerene bioaktivnosti poznatih inhibitora. U slučaju da je to bilo izvodljivo, pored inhibitorne aktivnosti odredili smo i citotoksičnost kandidata primenom *in vitro* ispitivanja aktivnosti na mikroorganizmima. Za najbolje kandidate, koji su pokazali značajnu *in vitro* aktivnost, predvideli smo osobine na osnovu modela apsorpcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije i toksičnosti pri čemu smo rezultate interpretirali u vidu rizika.

### 3.2. Protokoli za virtuelni skrining

Svaki od modela zasnovanih na strukturi liganda i ciljnog mesta (receptora, tj. enzima) je imao ulogu u filtriranju velikog broja jedinjenja sa ciljem dobijanja potencijalnih kandidata koji zadovoljavaju konsenzus kriterijuma. Kriterijumi koji su postavljeni su: Odabrati kandidate sa odgovarajućim strukturnim osobinama liganda na osnovu kojih je formiran model; Odabrati kandidate čiji izračunati afinitet receptor-ligand interakcije pripada intervalu koji je dobijen na osnovu izračunatog afiniteta receptora i endogenih liganda (potvrđenih eksperimentalnim metodama za merenje aktivnosti); Odabrati kandidate čiji ADMET profil ukazuje na bezbednost upotrebe kandidata kao inhibitora.

Filteri koje smo primenili za VS protokol dobijanja kandidata iz klase flavonoida, dostupnih u MetIDB su:

- (1) EIIP/AQVN deskriptori za redukciju hemijskog prostora;
- (2) 3D-QSAR model za predviđanje bioaktivnosti;
- (3) Doking u strukturne modele arginaze (*L*mARG, *H*sARG).

Za VS protokol dobijanja kandidata indolizina i oksadiazola koristili smo:



- (1) EIIP/AQVN deskriptore;
- (2) 3D-QSAR model;
- (3) Doking kao potvrda aktivnosti i specifičnosti na arginazu (*HsARG*, *LaARG*).

Za pretragu jedinjenja iz KI arhive (arhive jedinjenja Kemijskog Instituta u Ljubljani), koristili smo VS protokol koji obuhvata:

- (1) Farmakoforni 3D model;
- (2) Doking jedinjenja u model *La*NDH-2;
- (3) PAINS filter.

Podaci o jedinjenjima flavonoida su preuzeti iz MetIDB baze u standardnom InChI formatu. InChi ključ smo koristili kao primarni ključ. Uređeni podaci su sadržali InChI kod, naziv jedinjenja, CAS oznaku, hemijsku formulu, molekulsku masu jedinjenja i hemijski pomeraj protona.

KI arhiva nam je inicijalno bila dostupna u *csv* formatu. Uređivanje podataka smo izvršili na osnovu struktura u SMILES kao primarnog ključa, potom smo pronašli oznake i nazive za svako jedinjenje, dodelili nominalne molekulske mase i nazive dobavljača (VITAS-M, ChemDiv, ChemBridge itd.). Finalno, arhiv je sadržao 500.000 jedinjenja. S obzirom da je u pitanju razvoj 3D modela, za sva jedinjenja smo generisali skup konformacija upotrebom omega-best algoritma. Algoritam se sastoji iz tri faze proračuna. Inicijalno, za svako učitano jedinjenje izvrši se pretraga strukturnih fragmenata iz arhive 3D strukturnih podataka. Potom se označi maksimalan broj torzionih uglova na osnovu inherentne (engl. *knowledge-based*) liste konformera. Veliki broj konformacija se potom redukuje po kriterijumu za minimum energije (upotrebom MMFF94 polja sila, engl. *Merck Molecular Force Field 94*) i optimalnu geometriju. U procesu redukcije su uklonjeni duplikati. Energetski prozor za konformacije je definisan iterativno prilikom svake pojave minimuma, a finalni interval se normira u odnosu na globalni minimum. Finalni broj konformacija se može optimizovati zadatim parametrom. Za pripremu KI, broj konformacija po jedinjenju smo podesili na 25. Virtuelnu bazu smo sačuvali u multifunkcionalnom formatu, ldb formata, a sastav baze činio je 500.000 jedinjenja sa 25 konformacija po jedinjenju.

### 3.3. Modeli zasnovani na strukturi liganda

#### 3.3.1. 3D-QSAR model inhibitora arginaze lajšmanije

Za pretragu jedinjenja na osnovu potencijalne bioaktivnosti, formirali smo 3D-QSAR model. Model smo formirali na osnovu bioaktivnosti za arginazu vrste *L. amazonensis* kao zavisne promenljive. Iz ChEMBL baze je preuzeto 18 flavonoidnih jedinjenja sa poznatom IC<sub>50</sub> aktivnošću (66.67%) testiranim *in vitro* na rekombinantnoj arginazi *L. amazonensis*, prethodno eksprimiranoj u *Escherchia coli* (oznaka za ciljno mesto dejstva – ChEMBL3108635), *Tabela 1*. U tabeli se mogu pronaći i pChEMBL standardizovane vrednosti. Standardizacija pChEMBL vrednosti izvršena je ručnim uređivanjem podataka iz literature. Podaci se tiču receptor-ligand interakcija, za koje je dodeljen standardni tip IC<sub>50</sub> i standardna jedinica koncentracije u nM. Formula za proračun pChEMBL je sledeća:

$$\text{pChEMBL} = -\log_{10}(\text{IC}_{50}) \quad (7)$$

**Tabela 1:** Jedinjenja klase flavonoida sa  $IC_{50}$  na *L. amazonensis* arginazu i standardizovanim pChEMBL vrednostima iz ChEMBL baze podataka.

Pristupni kod	$IC_{50}$ (nM)	p $IC_{50}$ (pChEMBL)
CHEMBL3109443	900	6,05
CHEMBL583912	1600	5,80
CHEMBL311498	1700	5,77
CHEMBL250450	2000	5,70
CHEMBL164	2100	5,68
CHEMBL3109439	2400	5,62
CHEMBL3109442	3700	5,43
CHEMBL50	4000	5,40
CHEMBL3109444	4800	5,32
CHEMBL82242	12200	4,91
CHEMBL361362	13700	4,86
CHEMBL1078766	16600	4,78
CHEMBL3109441	35100	4,46
CHEMBL150	55000	4,26
CHEMBL3109437	88100	4,05
CHEMBL19074	120800	3,92
CHEMBL3109440	127900	3,89
CHEMBL3109438	223500	3,65

Kraj Tabele 1.

Podatke sa nazivima jedinjenja, strukturama i izmerenoj aktivnosti u p $IC_{50}$  smo sačuvali u *sdf* formatu, a potom učitali u program Pentacle. Naelektrisanje jedinjenja smo podesili na pH 7,4. Potom smo izračunali standardne GRIND deskriptore, na osnovu MIF proba: DRY (proba hidrofobne interakcije), N1 (donor vodonične veze), O ( $sp^2$  karboksilni kiseonik kao akceptor vodonične veze), TIP (deskriptor molekuskog oblika). Uz pomoć PCA dobili smo pet glavnih komponenti. Potom smo konstruisali PLS model sa tri latentne promenljive (engl., *latent variable*, LV). Model smo optimizovali redukcijom promenljivih upotrebom frakcionog faktorijalnog dizajna (engl. *Fractional factorial design*, FFD) do trenutka konvergiranja vrednosti koeficijenta determinacije  $R^2$  i parametra prediktivnog kapaciteta  $Q^2$ .

Od ukupno 520 PLS promenljivih, 114 je odabrano u toku 19 ciklusa optimizacije. Vrednosti parametara  $R^2$  i  $Q^2$  nakon konvergiranja, označeno sa  $R_{acc}^2$  i  $Q_{acc}^2$ , iznose 0,99 i 0,89. Statistika PLS modela koji je korišćen za dobijanje 3D-QSAR modela je prikazana u *Tabeli 2*. Filterovana jedinjenja iz prethodnog koraka su učitana u model i za ta jedinjenja je izračunata inhibitorna aktivnost u p $IC_{50}$ . Svi proračuni su dobijeni upotrebom Pentacle (v. 1,05) [76–78].

**Tabela 2:** Statistika PLS modela inhibitora arginaze (*L. amazonensis*).

#LV	SSX	SSX <sub>acc</sub>	SDEC	SDEP	R <sup>2</sup>	R <sub>acc</sub> <sup>2</sup>	Q <sub>acc</sub> <sup>2</sup>
1	28,31	28,31	0,45	0,61	0,64	0,64	0,34
2	12,94	41,25	0,13	0,33	0,33	0,97	0,81
3	7,95	49,20	0,08	0,25	0,02	0,99	0,89

Skraćenice za parametre prikazane u *Tabeli 2* su: #LV – broj latentnih promenljivih; SSX – objašnjenje X-te zavisne promenljive (suma kvadrata matrica za X); SSX<sub>acc</sub> – kumulativno objašnjenja X-te promenljive; SDEC – Standardna devijacija greške u proračunu; SDEP – standardna devijacija greške u predviđanju; R<sup>2</sup> – standardna devijacija; R<sub>acc</sub><sup>2</sup> – kumulativna vrednost koeficijenta determinacije; Q<sub>acc</sub><sup>2</sup> – kumulativna vrednost prediktivnog kapaciteta.

Formule za izračunavanje 3D-QSAR parametara su sledeće:

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS} \quad (8)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{TSS} \quad (9)$$

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (10)$$

Za jednačine (8-10), parametri su R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; RSS – suma kvadrata ostataka, TSS ukupna suma kvadrata; PRESS prediktivna suma kvadrata ostataka, e<sub>i</sub> – i-ti rezidual [83].

Formule ostalih statističkih parametara, koji su korišćeni u ovom radu:

$$SSX = \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (11)$$

gde je SSX parametar objašnjenja promenljive X, izražen kao suma kvadrata devijacije od prosečne vrednosti ( $\bar{x}$ ).

$$SDEC = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{calc})^2}{N}} \quad (12)$$

gde je SDEC – standardna devijacija greške u proračunu, y – prava vrednost i-te promenljive; y<sub>calc</sub> – izračunata vrednost za internu validaciju; N – ukupan broj podataka.

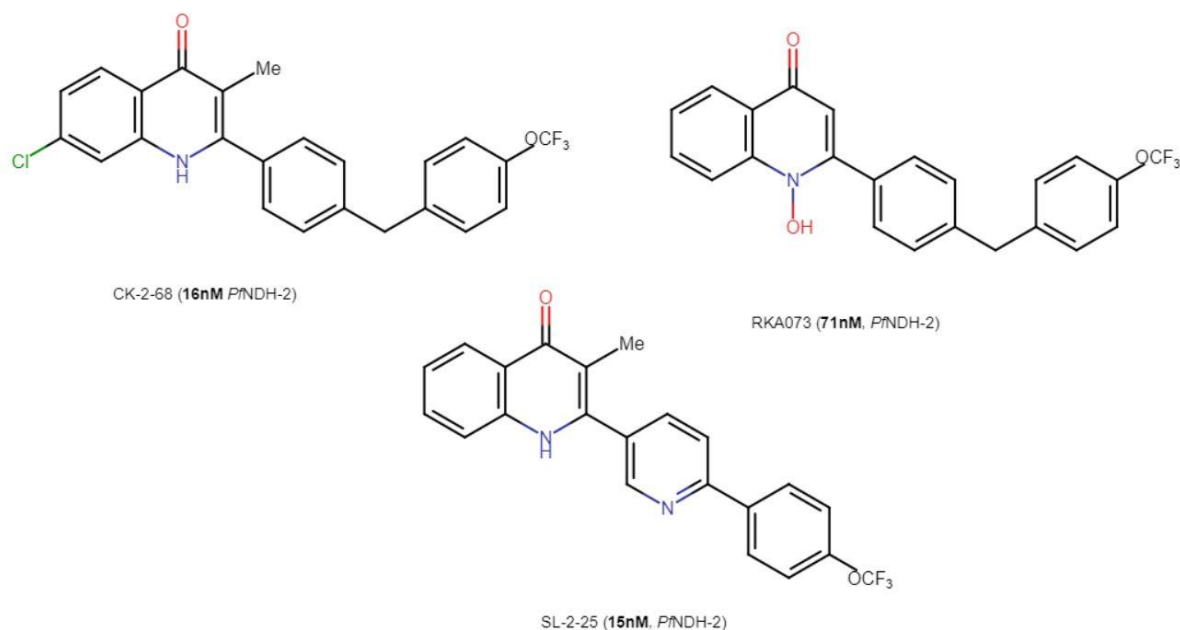
$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{pred})^2}{N-1}} \quad (13)$$

gde je SDEP – standardna devijacija greške u predviđanju, a y<sub>pred</sub> – predviđena vrednost promenljive.

Broj ciklusa za formiranje modela zavisi od potencijala konvergiranja koeficijenta determinacije i prediktivnog kapaciteta (ili do postizanja vrednosti sa R<sub>acc</sub><sup>2</sup> > 0,5 i Q<sub>acc</sub><sup>2</sup> > 0,9).

### 3.3.2. Razvoj farmakofornog 3D modela na bazi HDQ derivata

Za formiranje modela zasnovanog na 3D strukturi liganda, tj. farmakofornog modela, izabrali smo derivate HDQ, hidroksi-2-dodecil-4-(1H) hinolona sa nanomolarnom inhibitornom aktivnošću na NDH-2 enzim, vrste *P. falciparum* – PfNDH-2. Hemijske strukture HDQ derivata su prikazane na *Slici 4*. Jedinjenja derivata su preuzeta iz NIS PubChem baze, putem CID oznaka za CK-2-68: 56965336 RKA073: 70696279 i SL-2-25: 67609434. Vrednosti  $IC_{50}$  na PfNDH-2 su 16nM (CK-2-68), 71nM (RKA073) i 15nM (SL-2-25).



Slika 4. Strukture HDQ derivata

Strukture smo učitali u program LigandScout, modul za modelovanje zasnovano na strukturi liganda, u *sdf* formatu. Geometriju smo optimizovali računanjem minimuma energije, uz MMFF94 polje sila. Upotrebom OMEGA alata generisali smo konformere, sa parametrom od 500 jedinstvenih konformacija po jedinjenju. U toku generisanja konformera uklonjeni su i duplikati na osnovu RMS granice od 0,4 Å. Maksimalan broj generisanih konformera po strukturi smo podesili na 30.000, a maksimalan broj konformera po fragmentu strukture (engl. *intermediate conformer pool*) na 4.000. Konformacije su dinamički superponirane uz pomoć MIF, što je kao rezultat dalo deset farmakofornih modela zasnovanih na strukturi liganda. Učitani ligandi predstavljali su skup za trening modela, a dobijene modele smo rankirali na osnovu *pharmacophore fit* i *atom sphere overlap* ocena. Dva modela sa najvišim ocenama (0,911 i 0,910) smo odabrali za test validacije.

Za validaciju farmakofornih modela primenili smo virtualni skrining arhive sa 150 mamaca (engl., *decoys*) kao negativnih probi. Mamci su formirani na osnovu učitanih struktura jedinjenja iz trening skupa, tj. aktivnih jedinjenja HDQ derivata, a formiraju se tako da fizički liče na polazna jedinjenja, ali se dovoljno hemijski razlikuju, tako da ne poseduju osobine koje bi ih svrstale u rezultat pretrage. Za tu svrhu, koristili smo servis/bazu za generisanje korisnih mamaca, (engl., *Database of Useful Decoys: Enhanced, DUD-E*) [120]. Strukture jedinjenja iz trening skupa, u SMILES formatu, učitali smo u DUD-E servis. Za svako aktivno jedinjenje generisana je grupa od 50 mamaca, iste hemijske formule, ali različitih strukturnih osobina. Nakon preuzimanja mamaca u SMILES formatu, učitali smo ih u program

LigandScout; generisali im 3D strukture, kao i konformacije. Diskriminativnu performanse farmakofornih modela smo validirali skirningom 150 mamaca (50 po aktivnom jedinjenju) i 10.000 potencijalno aktivnih jedinjenja iz arhive KI (validacioni skup nastao proizvoljnim izborom jedinjenja iz KI arhive). Test skringinge smo izvršili sukcesivno uz pomoć modela 1 i modela 2. Farmakoforne elemente modela smo ručno optimizovali do finalnih farmakofornih modela, pri čemu je broj lažnih negativnih, kao merilo performanse modela, iznosila 2% u odnosu na inicijalnih 16 % (24/150 mamaca). Nakon optimizacije, upotreбили smo dva najbolje rankirana modela za VS arhive KI.

### 3.3.3. Primena PAINS filtera upotrebom ChemBioServer

Uklanjanje PAINS za zadataku strukturu jedinjenja, izvršili smo upotrebom ChemBioServer-a [121]. Pripremljena grupa jedinjenja je učitana u ChemBioServer u mol formatu i pokrenut je algoritam za identifikaciju strukturnih motiva klasifikovanih kao PAINS (lista toksičnih organskih jedinjenja dostupna je na internet adresi servisa, <https://chembioserver.vi-seem.eu/Toxic.php>). Nakon filtriranja, rezultati su preuzeti u tsv (engl. *tab separated values*) formatu. Format sadrži nazive jedinjenja, strukturne informacije i binarnu vrednost koja pokazuje da li struktura sadrži PAINS i sa oznakom za tip PAINS-a, ukoliko postoji. Na osnovu rezultata, uklonili smo jedinjenja u kojima je PAINS identifikovan.

## 3.4. Modeli zasnovani na strukturi ciljnog mesta

### 3.4.1. Model strukture alternativne NADH dehidrogenaze tipa 2, LiNDH-2

Sekvenca alternativne NDH-2 vrste *L. infantum* (LiNDH-2) je dostupna u UniProt bazi pod oznakom A4IDV2. Za izradu modela zasnovanog na strukturi LiNDH-2 koristili smo Phyre 2 (protein homology/analogy recognition engine v2.0) servis.

Sekvencu LiNDH-2 (A4IDV2) smo učitali u Phyre 2 portal i odabrali intenzivan metod rada za formiranje 3D modela. Za proces formiranja modela bilo nam je potrebno 32 sata. Najbolje rankiran homologi model je generisan na osnovu kristalografskog rešenja SaNDH-2, NADH: ubikvinon oksidoreduktaze (lanac B, PDB: 4g6g i 4g73) i SaNDH-2 [122], NADH:hinon oksidoreduktaze (lanac C, PDB: 4xdb) sa 33% i 27% sličnosti sa početno zadatom sekvencom i sa pouzdanosti modela od 100%. Dobijeni enzimi za mustre homolognog modelovanja spadaju u grupu oksidoreduktaza, membranskih proteina. Klasifikacija je urađena na osnovu funkcije proteina, subćelijske lokalizacije i strukturnih domena. Osnovne informacije modelovanja LiNDH-2 su prikazane u *Tabeli 3*.

**Tabela 3:** Informacije o referentnim strukturama korišćenim za homologno modelovanje LiNDH-2.

PDB oznaka	Tip lanca	% poravnanja	% identičnosti sekvenci	Rezolucija (Å)
4G6G, 4G73	B	80	33	2.5
4XDB	C	80	27	3.32

U *Tabeli 3*., navedena je PDB oznaka za pristup kristalografskim podacima o datoj strukturi mustre. Tip lanca označava koji deo sekvence iz mustre je iskorišćen za formiranje strukturnog modela; procenat poravnanja i identičnosti sekvenci odnosi se na rezultate jednodimenzionog poravnanja aminokiselinskih sekvenci i broju pronađenih identičnih aminokiselina na osnovu poravnanja. Rezolucija strukture je mera slaganja strukturnog 3D modela sa mapom elektronskog rasejanja izraženog u angstromima (Å,  $10^{-10}$  metara). Sa dobrom rezolucijom se smatra model na osnovu kojeg se svaki atom

može jasno identifikovati na mapi elektronske gustine, a rezolucija koja zadovoljava taj kriterijum iznosi oko 1 Å.

Za potrebe višestrukog poravnanja, sekvence *Sa*NDH-2 (P32340), *Sa*NDH-2 (Q2FZV7) i *Pj*NDH-2 (Q8I302) smo preuzeli iz UniProt baze u FASTA formatu. Poravnanje smo dobili korišćenjem Clustal X [123], a izlazne podatke sačuvali u PEARSON formatu. Primenom servisa za analizu poravnanja SMS (engl., *Sequence Manipulation Suite*) izračunali smo vrednosti poravnanja između parova sekvenci [124].

Strukturne modele (1) *Sa*NDH-2 (PDB oznaka 4g73) i (2) *Sa*NDH-2 (PDB oznaka 4xdb) smo učitali u pymol i pripremili u obliku strukturnog monomera. Struktura *Sa*NDH-2 je dodatno pripremljena za analizu vezivnog mesta ubikvinona (UQ-1). Nepotrebne podatke (lanac A, molekuli vode, ostali artefakti) smo uklonili. Konačan strukturni model je sadržao lanac B, kokristalisane UQ, FAD, NADH i dva jona metala Mg<sup>2+</sup>. Model smo upotrebili za analizu aktivnih konformacija liganda, potvrdu mehanizma interakcije na molekularskom nivou i podešavanje parametara za doking.

Sledeći korak je bila optimizacija homolognog modela *Li*NDH-2 na osnovu pripremljene referentne strukture *Sa*NDH-2 i *Sa*NDH-2. Homologni model smo učitali u radni prostor pymol-a zajedno sa pripremljenim strukturama. Izvršili smo superpoziciju učitanih strukturnih modela. Uz superpozicioniranje je izračunat RMSD u dva koraka: RMS za sve atome i RMSD osnovnog C $\alpha$ -niza proteina. Zbog većeg broja praznina, tj. delecija (engl. *gaps*) u domenu C-terminusa, finalni model *Li*NDH-2 je skraćen na 436 aminokiselina, ostatak smo uklonili, jer smo ga smatrali redundantnim za svrhu ispitivanja receptor-ligand interakcija.

Za validaciju homolognog modela, izračunali smo *Ramachandran*-ovu raspodelu torzionih uglova za dobijeni model (Prilog 5). Za izradu dijagrama koristili smo RAMPAGE servis [125]. Nakon optimizacije rotamera i uklanjanjem domena sa C-terminusom, CTD (engl., *carboxy-terminus domain*), broj aminokiselina u povoljnoj regiji dijagrama povećao se za 5% (sa 89% na 94%). Na osnovu *Ramachandran*-ovog dijagrama izvršili smo optimizaciju rotamera u modelu *Li*NDH-2 uzimajući za referencu 85% superponirane strukture *Sa*NDH-2 i 74% strukture *Sa*NDH-2.

### 3.4.2. Doking kandidata u strukturni model *Li*NDH-2

Za doking u *Li*NDH-2 koristili smo GOLD, a za metodu rada odabrali smo GoldScore fitness funkciju [97]. Doking proračun smo postavili tako da se uračuna prisustvo kofaktora FAD i supstrata NADH. Konformacije jedinjenja smo modelirali na osnovu trodimenzione superpozicije sa *Sa*NDH-2 koja je jedina kristalografska struktura koja sadrži oba molekula od kojih zavisi mehanizam interakcije. Radi optimizacije doking algoritma, najpre smo postavili parametre upotrebom ponovnog dokinga UQ u *Sa*NDH-2 i merenjem RMSD u odnosu na kristalografski dobijenu konformaciju. Nakon prilagođavanja doking parametara, sproveli smo doking UQ u vezivno mesto UQ-1 modela *Li*NDH-2.

Strukturni modeli smo pripremili u mol formatu, nakon čega su učitani u radni prostor GOLD programa. Parametri za optimalni doking u ovom slučaju su: vezivno mesto poluprečnika 6 Å koje obuhvata aktivnu konformaciju UQ. Region dodatnog bodovanja poluprečnika 3.5 Å od centra na delu sekvence LEU443-LEU444 strukturnog modela *Sa*NDH-2. Analizom superpozicije, smo ustanovili da ovaj region odgovara ARG368-MET373 i VAL383-LEU385 modela *Li*NDH-2. Region obuhvata hidrofobnu i fleksibilnu alkil grupu UQ.

Vrste sprovedenih doking eksperimenata u vezi sa ciljnim mestom su:

1. doking UQ u UQ-1, *Sa*NDH-2 (PDB ID 4g73);

2. doking UQ u UQ-1, *Sa*NDH-2 (pdb id 4xdb);
3. doking UQ-1 HDQ derivata u UQ-1, *Li*NDH-2;
4. doking u okviru VS protokola u UQ-1, *Li*NDH-2.

Za doking procedure 1-3 smo koristili GA, generički algoritam sa 120% efikasnosti. U okviru VS protokola izvršili smo doking 4.423 jedinjenja, dobijenih na osnovu modela zasnovanog na strukturi liganda. Za doking u VS protokolu, koristili smo genetički algoritam sa ograničenjem od 50 kcal mol<sup>-1</sup> i sa maksimalno 3 konformacije po jedinjenju. Od 13.041 dobijenih doking poza (uključujući konformacije), u prvom krugu identifikovali smo 428 jedinjenja (0,66%) sa najboljim rezultatom funkcije bodovanja. Odabranu grupu jedinjenja smo ponovo dokovali korišćenjem genetičkog algoritma sa 120% efikasnosti pretrage. Na taj način izvršena je fleksibilnija pretraga receptor-ligand interakcija. Poze sa GoldScore u intervalu od 60 do 90 (optimalnan interval) su upoređene sa doking pozama za UQ. Končan broj jedinjenja nakon ponovnog dokinga je sveden na 54 (318 konformacija). Tih 54 jedinjenja smo potom dokovali u UQ-1 modela *Sa*NDH-2 upotrebom programa Vina sa sledećim parametrima: iscrpnost pretrage od 100, maksimalan broj doking poza od 10, maksimalna razlika u energiji vezivanja od 3 kcal mol<sup>-1</sup>.

### 3.4.3. Modeli struktura arginaze

Homologni model araginaze vrste *L. amazonensis* (*La*ARG) smo modelovali na osnovu kristalne strukture arginaze *L. mexicana* u kompleksu sa ABH, 2(S)-amino-6-boronoheksanskom kiselinom kao inhibitorom (PDB oznaka: 4iu0) [118]. Strukturu modela smo preuzeli putem PMP (engl., *Protein Model Portal*) [126]. Ova struktura se pronalazi u ModBase, repozitorijumu komparativnih proteinskih strukturnih modela, pod oznakom za unos – O96394 [127]. Interno bodovanje u okviru ModBase, tj. MPQS iznosi 2,22. Modeli sa MPQS > 1,1 se smatraju pozudanim. Evaluaciju homolognog modela smo izvršili u programu MODELLER [128]. Za evaluaciju modela, MODELLER koristi PROSAAI za kvalitet uređenosti dok za pregled stereohemijske preciznosti koristi PROCHECK [129]. Algoritmi PROSAAI i PROCHECK pokazuju kada je model pouzdan za upotrebu i to uz pomoć Z-vrednosti koja konvergira onoj za referencu (npr. odnos Z-vrednost modela od -10,53 i mustre od -12,69). Evaluacija modela u programu MODELLER pokazala je GA341 od 1,0 za model pouzdanim jer je iznad praga od 0,7 koji ukazuje na potencijal modela. Pouzdan model podrazumeva da će protein imati homolognu tercijarnu strukturu (u odnosu na mustru) sa verovatnoćom > 95%. Homologni 3D model se smatra pouzdanim u slučaju gde se najmanje 30% C $\alpha$ -niza superponira sa strukturom mustre u granicama odstupanja (RMSD do 3,5 Å). Model kristalne strukture proteina humane arginaze je preuzeta iz PDB baze (2aeb) [119].

### 3.4.4. Doking kandidata u strukturne modele *Hs*ARG i *La*ARG

Doking je sproveden upotrebom Vina, Glide SP, uz naknadna procesiranja sa MM/GBSA i AD4. Površina rešetke interakcija je proširena da obuhvati sve bočne ostatke iz sekvence receptora od kojih zavise interakcije. Kristalni molekuli vode su zadržani usled mogućeg učestvovanja u receptor-ligand mehanizmu interakcije [130-132]. Za pretragu konformacionog prostora korišćen je Lamarkijanov genetički algoritam. Doking na ARG modelima je korišćen kao filter, za skrining jedinjenja klase flavonoida, oksadiazola i indolizina.

### 3.4.5. Modeli grupe anti-targeta

Anti-targete (engl., *off-targets*), ciljna mesta sa kojima jedinjenja intereaguju u toku metabolizma, smo koristili za doking kandidata. U grupu anti-targeta koji su korišćeni u ovom radu, spadaju ciljano odabrani enzimi za ispitivanje specifičnosti receptor-ligand interakcije [133]. Anti-targetiranje se dovodi u vezu sa potencijalnim toksičnim osobinama koja se identifikuju na osnovu potencijala receptor-ligand interakcije [134-6]. Strukturni modeli koji pripadaju grupi anti-targeta (engl. *anti-target battery*) u ovom radu se mogu pronaći u PDB pod sledećim oznakama (ili anotacijama za rešenje strukture):

1. 1m13 (nuklearni ksenobiotični receptor, PXR);
2. 2a3r (humana sulfottransferaza, SULT1A3);
3. 1z10 (humani izozim 2A6 CYP 450 familije);
4. 1og5 (humani izozim 2C9 CYP 450 familije);
5. 1tqn (humani izozim TA4 CYP 450 familije).

Ono što je zajedničko za date strukture jeste rezolucija  $< 2,6 \text{ \AA}$ . Modele grupe anti-targeta smo upotreбили za karakterizaciju osobina jedinjenja kandidata u toku metabolizma.

### 3.4.6. Doking u anti-targete

Cilj dokinga u anti-targete je dobijanje prosečne vrednosti za receptor-ligand interakciju upotrebom tri različita doking programa: Glide XP (XP), AD4 (AD4) i Vina (AV). Za referentne vrednosti koje određuju prag jakih interakcija, koristili smo energiju interakcije ko-kristalnog liganada, uzevši u obzir rezultate svih navedenih doking programa, pri čemu smo vrednosti za receptor-ligand interakcije dobili ponovnim dokingom u odgovarajući strukturni model iz grupe anti-targeta. Referentne vrednosti su prikazane u *Tabeli 4*.

**Tabela 4:** Apsolutne vrednosti za energije receptor-ligand interakcije upotrebom doking programa: Glide XP (XP), AutoDock 4 (AD4) i AutoDock Vina (Vina). PDB oznake odgovaraju opisu iz 3.4.5.

Doking program	1m13	2a3r	1z10	1og5	1tqn
XP	7,7	6,3	7,6	8,7	7,5
AD4	12,5	7,5	6,8	9,4	7,5
Vina	10,3	6	8,5	10	7,5

Izračunate energije interakcije su pretvorene u klasifikacioni model na osnovu intenziteta interakcije korišćenjem sledećih jednačina:

$$\text{Ocena od } 0,0 \text{ ako je } \Delta G - \Delta G_{\text{ref}} > 0,5; \quad (14)$$

$$\text{Ocena od } 0,5 \text{ ako je } |\Delta G - \Delta G_{\text{ref}}| \leq 0,5; \quad (15)$$

$$\text{Ocena od } 1,0 \text{ ako je } \Delta G - \Delta G_{\text{ref}} < -0,5; \quad (16)$$



gde je  $\Delta G_{\text{ref}}$  slobodna energija interakcije za referentnu vrednost iz *Tabele 4*, a  $\Delta G$  energija interakcije dokovanog liganda u vezivno mesto enzima. Dobijene rezultate smo prikazali u vidu matrice receptor-ligand interakcija iz grupe anti-targeta, pri čemu je klasifikacija označena upotrebom boja (crna – za vrednosti jakih interakcija ocenjenih sa 1,0; siva – za vrednosti srednje jačine interakcija, ocenjenih sa 0,5 i slabe interakcije sa ocenom 0,0 koje su bele boje).

### 3.5. Jedinjenja za formiranje modela i kandidati za *in vitro* testiranja

U ovom radu smo ispitali aktivnost jedinjenja različitih klasa na potencijalnu aktivnost i mikrobicidno dejstvo na lajšmanije, ali i bakterijske vrste. Za razvoj 3D-QSAR modela, trening skup se sastoji od 18 jedinjenja iz klase flavonoida.

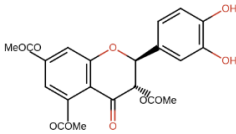
Kandidati koje smo odredili za *in vitro* testiranja mikrobicidne aktivnosti, a koja su dobijena uz pomoć 3D-QSAR modela, pripadaju klasi derivata oksadiazola i indolizina. Derivati oksadiazola i indolizina su pripremljeni automatizovanom sintezom, a analiza strukture i stepen čistoće sintetisanih jedinjenja su određeni  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, IC spektroskopijom i LC analizom (Prilog 1). Od ukupno 13 derivata oksadiazola i indolizina, pripremili smo 8 kandidata za *in vitro* testiranja.

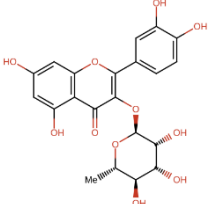
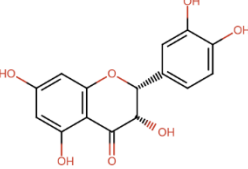
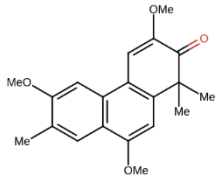
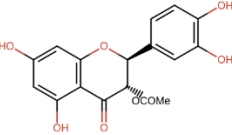
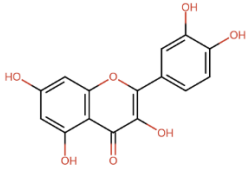
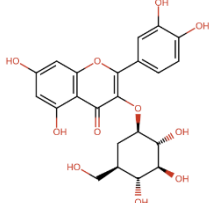
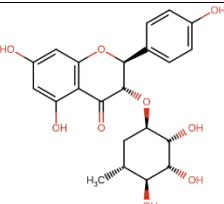
Predlog za izradu farmakofornih modela su 3 jedinjenja, HDQ derivati. Na osnovu farmakofornog modela i primenom drugih filtera u VS protokolu o kojima je bilo reči u prethodnom potpoglavlju, dobili smo 23 kandidata sa diverzitetom u hemijskim strukturama i koji su odabrani za *in vitro* ispitivanja. Dobijena 23 jedinjenja koja smo testirali *in vitro* su komercijalno dostupna.

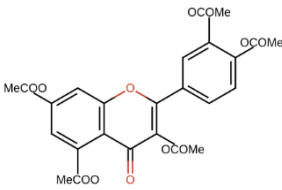
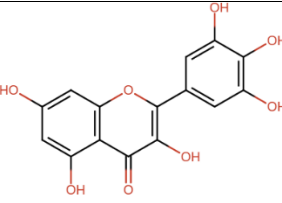
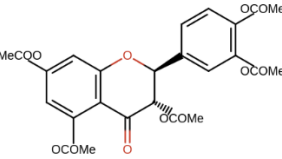
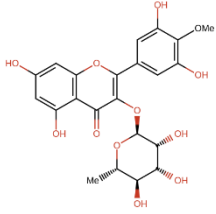
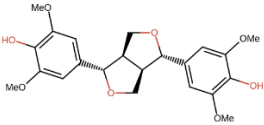
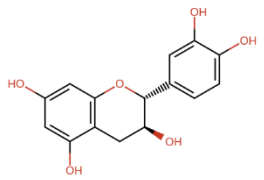
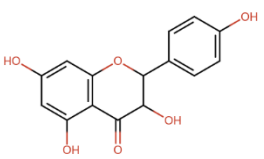
#### 3.5.1. Flavonoidi

Jedinjenja flavonoida smo koristili za razvoj modela inhibitora arginaze lajšmanije kao ciljnom mestu dejstva. Skup za trening 3D-QSAR modela se sastoji od 18 jedinjenja preuzetih iz ChEMBL baze. Jedinjenja ove grupe su klasifikovana na osnovu izmerene inhibitorne aktivnosti na arginazu *L. amazonensis* (*LaARG*) i dostupna su pod oznakom ChEMBL3108635 [137]. Lista jedinjenja flavonoida se nalazi u *Tabeli 5*.

**Tabela 5:** Jedinjenja flavonoida iz ChEMBL baze podataka. Inhibitorna aktivnost izražena u standardnoj pChEMBL vrednosti ( $\text{pIC}_{50}$ ) se odnosi na *LaARG*.

Oznaka	Trivijalan/IUPAC naziv	Struktura	$\text{pIC}_{50}$
CHEMBL3109443	[(2S,3S)-5,7-Diacetiloksi-2-(3,4-dihidroksifenil)-4-okso-2,3-dihidrohromen-3-il] acetat		6,05

Oznaka	Trivijalan/IUPAC naziv	Struktura	pIC <sub>50</sub>
CEMBL583912	(-)-Epikatecin		5,8
CHEMBL82242	Kvercitrin		4,91
CHEMBL1078766	Trigonostemon		4,78
CHEMBL3109442	[(2S,3S)-2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-4-okso-2,3-dihidrohromen-3-il] acetat		5,43
CHEMBL50	Meletin		5,4
CHEMBL250450	Izokvercetin		5,7
CHEMBL3109441	Neoengetin		4,45

Oznaka	Trivijalan/IUPAC naziv	Struktura	pIC <sub>50</sub>
CHEMBL19074	Kvercetin pentaacetat		3,92
CHEMBL164	Miricetin		5,68
CHEMBL3109444	2beta-[3,4-Bis(acetiloksi)fenil]-3alfa,5,7-tris(acetiloksi)hroman-4-on		5,32
CHEMBL3109438	Mearnsitrin		3,65
CHEMBL361362	Siringarezinol		4,86
CHEMBL311498	Cianidanol		5,77
CHEMBL150	Kaempferol		4,26

Oznaka	Trivijalan/IUPAC naziv	Struktura	pIC <sub>50</sub>
CHEMBL3109439	5,7-Dihidroksi-3-[(2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-metil-tetrahidropiran-2-il]oksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)hromen-4-on		5,62
CHEMBL3109437	5,7-Dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksihromen-4-on		4,06
CHEMBL3109440	3',4',5',3,5,6,7-Heptametoksiflavin		3,89

Kraj Tabele 5.

### 3.5.2. Derivati oksadiazola i indolizina

Jedinjenja oksadiazola i indolizina su dobijena metodom automatizovane sinteze. U nastavku su opisane uobičajne procedure za automatizovanu sintezu ove klase jedinjenja, a koja su korišćena u ovom radu.

Prvu grupu jedinjenja **1-5** smo pripremili reakcijom aldehida (1,00 mmol), hidrazida (1,00 mmol), etanola (4,0 mL) i 1M HCL (50 µL) u 13-mililitarskom reaktoru (engl. *double jacket reactor* „Chemspeed”) koji je opremljen kondenzatorom. Smeša je mešana na 700 rpm, 4h na 80 °C, a potom ohlađena do 20 °C. Precipitat smo filtrirali i isprali sa 2 mL etanola i 2 mL etiletra.

Procedura sinteze za jedinjenja **6 i 7**: Nitril (20,0 mmol), etanol (30,0 mL) i hidroksilamina (50% u vodi; 2,0 mL) smo dodali u 75-to mililitarski reaktor („Chemspeed”). Smeša je mešana na 600 rpm 5 h na 80 °C, a potom ohlađena na 20 °C. Rastvarač smo uklonili vakuum uparivačem. Talog sa proizvodom reakcije smo ostavili na prekonoćno sušenje u vakuum peći na 40 °C.

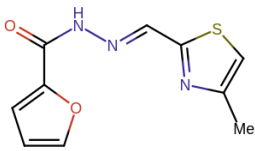
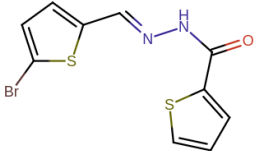
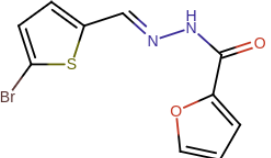
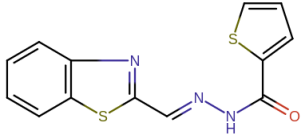
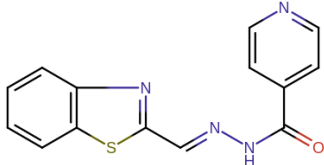
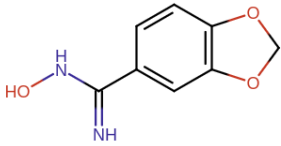
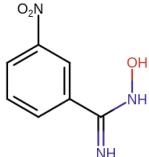
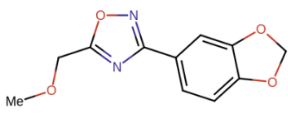
Jedinjenje **8** smo dobili reakcijom smeše jedinjenja **6** (180 mg, 1,00 mmol), acetonitrila (3,0 mL), trietilamina (153 µL, 1,10 mmol) i metoksiacetil hlorida (91 µL, 1,00 mmol). Reakcija je katalizovana mikrotalasnom radijacijom (130 °C u toku 1 h). Rastvarač smo potom uklonili vakuum uparivačem. Proizvod u kristalnom stanju smo isprali sa 15 mL etil acetata pri čemu je dobijeno 188 mg čistog jedinjenja.

Jedinjenja **9 i 10** su pripremljena reakcijom piridin/izohinolin smeše sa 2-(hlorometil)-5-nitro-1H-benzo[d]imidazolom [138,139]. Reakcijom dehidrohalogenizacije u prisustvu trietilamina u hloroformu dobijaju se jedinjenja u prinosu > 70%.

Za sintezu grupe jedinjenja **11-13**, napravili smo smešu prekursora jedinjenja **9** i jedinjenja **10** (1 mmol, 1 eq L<sup>-1</sup>) i alkina (1.1 mmol, 1,1 eq L<sup>-1</sup>) koju smo rastvorili u hloroformu. Reakcija se odvijala na hladnom, 0 °C. Potom smo ukapali trietilamin (1,3 mmol, 1.3 eq/L), nakon čega je smeša mešana 24 h na sobnoj temperaturi. Rastvarač smo uklonili vakuum uparivačem, a ostatak sa proizvodom prečistili fleš hromatografijom na koloni.

Dobijeni kandidati za *in vitro* ispitivanja mikrobicidnog dejstva na lajšmanije, a čija je sinteza ovde opisana su prikazani u *Tabeli 6*.

**Tabela 6:** Jedinjenja derivati oksadiazola i indolizina, korišćena u ovom radu.

#	Naziv po IUPAC-u	Struktura	Fizičkohemijske osobine	Prinos %
1	N <sup>2</sup> -[(4-metil-2-tiazolil)methilen]furan-2-karbohidrazid		Svetlo braon kristali, t.t. 121-124 °C LC čistoća 92%	61
2	N <sup>2</sup> -[(5-bromo-2-tiofenil)methilen]tiofen-2-karbohidrazid		Svetlo žuti kristali, t.t. 195-198 °C LC čistoća 99%	72
3	N <sup>2</sup> -[(5-bromo-2-tiofenil)metilen]furan-2-karbohidrazid		Svetlo žuti kristali, t.t. 201-202 °C LC čistoća 99%	71
4	N <sup>2</sup> -[(2-benzotiazolil)metilen]tiofen-2-karbohidrazid		Svetlo žuti kristali, t.t. 231-234 °C LC čistoća 99%	100
5	N <sup>2</sup> -[(2-benzotiazolil)metilen]piridin-4-karbohidrazid		Beličasti kristali, t.t. 234-237 °C LC čistoća 92%	70
6	3,4-(methilenedioksi)benzamidokim		Beli kristali,	100
7	3-nitrobenzamidoksim		Žuti kristali, t.t. 182-184 °C	100
8	3-[3,4-(metilendioksi)fenil]-5-(metoskimetil)-1,2,4-oksadiazol		Svetlo braon kristali, t.t. 56-57 °C LC čistoća 98	80

#	Naziv po IUPAC-u	Struktura	Fizičko-hemijske osobine	Prinos %
9	1-((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piridin-1-ijum klorid		-	75
10	2-((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)izohinolin-2-ijum klorid		-	95
11	dimetil 3-(5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)indolizin-1,2-dikarboksilat		t.t. 234 °C	25
12	dimetil 3-(5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)pirolo[2,1-a]izohinolin-1,2-dikarboksilat		t.t. 162 °C	28
13	metil 3-(5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)pirolo[2,1-a]izohinolin-1-karboksilat		t.t. 280 °C	27

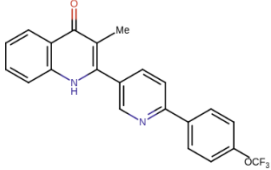
Kraj Tabele 6.

### 3.5.3. Derivati hinolona

Jedinjenja derivati HDQ su pokazala inhibitornu aktivnost na NDH-2 tip enzima vrste *P. falciparum*. Podatke o strukturi i mikrobicidnoj aktivnosti za HDQ derivate smo preuzeli iz ChEMBL baze, informacije o jedinjenjima su prikazane u *Tabeli 7*.

**Tabela 7:** HDQ derivati sa standardizovanom pIC<sub>50</sub> koja se odnosi na inhibiciju *Pf*NDH-2.

Oznaka	Šifra	Naziv po IUPAC-u	Struktura	pIC <sub>50</sub>
CHEMBL2030016	CK-2-68	7-hloro-3-metil-2-[4-[[4-(trifluorometoksi)fenil]metil]fenil]-1H-hinolin-4-on		6,80
CHEMBL2030061	RKA073	1-hidroksi-2-[4-[[4-(trifluorometoksi)fenil]metil]fenil]hinolin-4-on		6,15

Oznaka	Šifra	Naziv po IUPAC-u	Struktura	pIC <sub>50</sub>
CHEMBL2030291	SL-2-25	3-metil-2-[4-[4-(trifluorometoksi)fenil]fenil]-1H-hinolin-4-on		6,82

Kraj Tabele 7.

Strukture komercijalno dostupnih jedinjenja (VITAS-M, ChemDiv, ChemBridge), koja su bila rezultat VS pretrage, ali koja nisu pokazala *in vitro* mikrobicidnu aktivnost na lajšmanije (*L. infantum*) i bakterije (*S. aureus*), nalaze se u prilogu (Prilog 3).

### 3.6. ADMET karakterizacija kandidata

Formirali smo arhivu od 38 jedinjenja za koja smo izračunali ADMET deskriptore i osobine. Arhiva je formirana na osnovu dokumentovanih podataka u vezi sa ispitivanjima na lajšmaniji (broj eksperimenata: 3.484, većina dokumentovane aktivnosti na vrste: *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. major*). Referentne aktivnosti smo preuzeli sa ChEMBL. Preuzete aktivnosti sadrže jedinjenja sa anotiranim eksperimentalnim podacima iz neke od kliničkih faza ispitivanja efekata u terapiji lajšmanioze. Preuzete podatke smo koristili za formiranje ADMET klasifikacije. Uređivanje podataka smo izvršili uklaňanjem makromolekula i istovetnih terapeutika koji se pronalaze u različitim formulacijama, što je rezultovalo finalnom broju od 19 jedinjenja. Lista terapeutika je prikazana u Tabeli 8.

**Tabela 8:** Lista vodećih jedinjenja i terapeutika sa naznačenom osnovnom farmakološkom primenom ili potencijalnim dejstvom na osnovu neke od kliničkih faza ispitivanja efekata na lajšmanije.

#	Naziv	Oznaka (DrugBank)	Primarna farmakološka primena
1	Sitamakvin	DB04909	agens sa dejstvom na lajšmanije
2	Nitrofurazon (Nitrofuraz)	DB00336	antibiotik
3	Eflornitin	DB06243	antiprotozoalni agens
4	Pentoksifilin	DB00806	isprekidana hromost bolesti arterija
5	18-Metoksikoronaridin	DB15096	agens sa dejstvom na lajšmanije (Klin.faza 2)
6	Pentamidin	DB00738	agens sa dejstvom na tripanozome i lajšmanije
7	Azitromicin	DB00207	antibiotik
8	Suramin	DB04786	agens sa dejstvom na tripanozome
9	Paromomicin	DB01421	antibiotik
10	Gentamicin	DB00798	antibiotik
11	Nifurtimoks	DB11820	agens sa dejstvom na tripanozome
12	Amfotericin B	DB00681	antimikotik
13	Feksinidazol	DB12265	agens sa dejstvom na tripanozome (vodeće)
14	Alopurinol	DB00437	giht, hiperurikemija
15	Imikvimiod	DB00724	antikeratozni, antiviralni agens
16	Miltefozin	DB09031	antimikrobni agens, agens sa dejstvom na lajšmanije

#	Naziv	Oznaka (DrugBank)	Primarna farmakološka primena
17	Meglumin	DB09415	agens sa dejstvom na lajšmanije (u obliku bidentatnog kompleksa sa antimonom)
18	Benznidazol	DB11989	agens sa dejstvom na tripanozome
19	Flukonazol (Diflukan)	DB00196	antimikotik

Kraj Tabele 8.

Sva jedinjenja iz *Tabele 8.* zadovoljavaju pravilo 5 Lipinskog. Podatke o farmakološkoj primeni preuzeli smo iz DrugBank baze. Upotrebom ADMET Predictor programa smo za sva jedinjenja iz tabele izračunali fizičko-hemijske osobine.

Nakon što smo formirali tabelu referentnih jedinjenja, u ADMET Predictor smo učitali i jedinjenja kandidata koje smo prethodno predložili za *in vitro* testiranja. U kandidate spadaju flavonoidi (**TOP1-10**), derivati oksadazola i indolizina (**HIT1-11**) i kandidat **15 (K15)**. Potom smo za sva jedinjenja u ADMET Predictor-u izračunali fizičko-hemijske, ADME i toksikološke parametare. Učitana jedinjenja su prečišćena od jona i molekula vode, a naelektrisanje svakog jedinjenja je izračunato za pH 7,4. Na kraju, izračunali smo procenat apsorbirane i bioraspoložive frakcije jedinjenja (%Fa i %Fb). Prikaz raspodele ADMET rizika nalazi se u prilogu (Prilog 4).

### 3.7. *In vitro* ispitivanja

Potencijal inhibitorne aktivnosti kandidata smo utvrdili *in vitro* ispitivanjima. Potencijal inhibicije NDH-2 za odabrane kandidata je testiran na vrsti *L. infantum*. Eksperimenti su izvođeni na ćelijskim linijama sterilnih amastigota *L. infantum*. Radi potvrde specifičnosti, ispitali smo efekat kandidata kao inhibitora alternative NDH-2 iz *S. aureus*. Potencijal oksadiazola i indolizina kao inhibitora arginaze testiran je na ćelijskim linijama sterilnih promastigota i amastigota vrste *L. donovani*.

#### 3.7.1. Priprema ćelijskih linija i *in vitro* ispitivanja na *L. infantum*

Ćelijske linije promastigota *L. infantum* (MHOM MA67ITMAP263) smo održavali na 25 °C u RPMI 1640 Glutamax suplementu sa 10% (v/v) dezaktiviranog goveđeg seruma (iFBS), 50 U mL<sup>-1</sup> penicilina, 50 mg mL<sup>-1</sup> streptomocina i 25 mM natrijum sulfonske soli, HEPES (pH 7,4). Ćelijske linije amastigota *L. infantum* smo održavali u kontrolisanoj atmosferi (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), u „MAA” medijumu sa dodatkom 20% (v/v) iFBS, 2 mM Glutamax suplementa („GibcoBRL”) i 0,023 μM hemina („Sigma”) [140]. Kulture parazita smo rasejali na gustinu ćelija 1,5 x 10<sup>6</sup> po mL i tako preneli u mikrotitar ploču sa 96 bunarića sa MAA20 medijumom za amastigot i „RPMI” medijumom za promastigot. U bunariće smo alikvotirali različite koncentracije jedinjenja kandidata. Nakon 24 h, izmerili smo vijabilnost parazita primenom resazurinskog testa i izračunali procentualne razlike u odnosu na kontrolu [141]. Nakon analize podataka, odredili smo vrednosti za polovinu maksimalne koncentracije koja dovodi do inhibicije (IC<sub>50</sub>) za svako testirano jedinjenje.

#### 3.7.2. Izvođenje eksperimenata kinetike stabilnog stanja i određivanje inhibitorne aktivnosti na *S. aureus* NDH-2

Za merenje kinetike stabilnog stanja sa ciljem određivanja inhibitorne aktivnosti na *S. aureus* NDH-2, koristili smo sledeće reagense: NADH (proizvođača „Sigma Aldrich”), 2,3-dimetil 1,4-



naftohinon – DMN (pripremljen iz menadiona, „Sigma Aldrich”, St. Luis, MO, SAD) [140]. Da bismo ispitali efekat za 23 jedinjenja kandidata (Prilog 3), koristili smo „Shimadzu UV-1800” spektrofotometar i pratili apsorbanču donora elektrona, NADH na 340 nm [122]. Uzorak za merenje aktivnosti je pripremljen unutar anaerobne sobe na temperaturi od 35 °C, upotrebom DMN kao akceptora elektrona. Koeficijent ekstinkcije za NADH od 6,22 m M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> smo uzeli za proračun specifične aktivnosti NDH-2 (μmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> mg proteina). Reakciona smeša (1000 μL) je sadržala 20 nM NDH-2 u 100 mM rastvoru kalijum fosfata (pH 7), 250 μM NaCl, 100 μM NADH, 150 μM DMN i do 20 μM jedinjenja kandidata. Rezidualnu aktivnost (RA) smo izračunali kao količnik dobijene NDH-2 aktivnosti pri ispitivanoj koncentraciji potencijalnog inhibitora i NDH-2 aktivnosti bez prisustva inhibitora (kontrola). Vrednost ravnotežne konstante inibicije (K<sub>i</sub>) za jedinjenja kandidata **15** smo izračunali za sledeće koncentracije inhibitora: 50 μM, 20 μM, 10 μM i 5 μM. Rezultat za K<sub>i</sub> smo primenili u jednačini:

$$v_0^i = v_0^{max} \frac{\left(1 + \beta \frac{[I]}{K_i^{app}}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i^{app}}\right)} \quad (17)$$

Vrednost prividne konstante brzine reakcije – K<sub>i</sub><sup>app</sup> iznosi 8,9±1,9 μM.

### 3.7.3. Priprema ćelijskih linija i in vitro ispitivanja na *L. donovani*

Ćelijske linije promastigota *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3/LV9) smo održavali u kontrolisanoj atmosferi (5% CO<sub>2</sub>, 26 °C, u mraku), u kompletnom medijumu M199, suplementovanom sa 100 μM adenozina, 0,5 mg/L hemina, 40 mM Hepes (pH 7,4) i 10% toplotom inaktiviranim goveđim serumom (HIFBS). Uzorak promastigoti iz logaritamske faze rasta smo razblažili na gustinu od 1 x 10<sup>6</sup> ćelije po mL u M199 medijumu sa podešenim pH na 5,5, a potom održavali na 37 °C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Pod opisanim eksperimentalnim uslovima, dobili smo kulture sterlinih amastigota *L. donovani*.

Ćelijske linije makrofagi (RAW 264.7) smo održavali u kontrolisanim uslovima sa 5% CO<sub>2</sub> na 37 °C u DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sa 100 U mL<sup>-1</sup> penicilin-streptomycin smeše i 10% HIFBS.

Uobičajeni protokoli su prilagođeni za evaluaciju aktivnosti jedinjenja kandidata na *L. donovani* [140]. Za *in vitro* ispitivanja na ćelijskim linijama forme amastigota, napravili smo dvostruko serijsko razblaženje jedinjenja kandidata u mikrotitar ploči sa 96 bunarića u 100 μL kompletnog medijuma (objašnjeno u prvom pasusu). Potom smo u svako ogledno mesto aplikovali sterilne kulture amastigota sa gustom od 106 mL u 200 μL finalne zapremine. Nakon 72-časovne inkubacije u kontrolisanoj atmosferi (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) u svaki od bunarića smo aplikovali 20 μL 450 μM resazurina i inkubirali još 24 sata pri istim kontrolisanim uslovima, u mraku. U živim ćelijama resazurin se redukuje do resorufina, pa smo tu reakciju pratili na fotometru merenjem OD570nm (resorufin) i OD600nm (resazurin; „Lab systems Multiscan MS”). Aktivnost jedinjenja smo izračunali u μM IC<sub>50</sub>. Za referentnu vrednost korišćen je Amfotericin B (AmB).

*In vitro* testiranje inhibitorne aktivnosti na inficirane makrofage pripremili smo alikvotiranjem RAW 264,7 u mikrotitar ploče sa 96 bunarića do gustine ćelija 2 x 10<sup>4</sup>. Potom smo ih inkubirali u kontrolisanoj atmosferi (5% CO<sub>2</sub> na 37 °C) u toku 24 h. Pripremljene uzorke sterilnih amastigota (kako je ranije objašnjeno) smo centrifugirali 10 minuta na 2000 g, a potom resuspendovali u DMEM kompletnom medijumu i dodali u svaki bunarić do postizanja odnosa količine parazita i makrofagi 16:1. Nakon 24-časovnog inficiranja pri istim kontrolisanim uslovima (5% CO<sub>2</sub> na 37 °C), uklonili smo medijum i ekstracelularne parazite. Metodom dvostrukog serijskog razblaženja od maksimuma

koncentracije od 100  $\mu\text{M}$ , pripremili smo jedinjenja kandidata u 100  $\mu\text{L}$  DMEM medijumu, a potom dodali u mikrotitar ploču. Posle 48 sati tretmana, uklonili smo medijum i zamenili ga sa 100  $\mu\text{L}$  DPLR (engl. *Direct PCR Lysis Reagent*, proizvođača „Euromedex”). Nakon tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja na sobnoj temperaturi, dodali smo 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  proteinaze K i ostavili za prekonocnu inkubaciju na 55  $^{\circ}\text{C}$ , kako bi se ćelije lizirale. Po 10  $\mu\text{L}$  svakog ćelijskog ekstrakata smo dodali u 40  $\mu\text{L}$  DPLR sa „Sybr Green I” (0.05%, proizvođača „Invitrogen”). Za merenje DNK fluorescencije smo koristili „Mastercycler® realplex (Eppendorf)”. Aktivnost jedinjenja je izražena u  $\mu\text{M IC}_{50}$ . Za referentnu vrednost je korišćen AmB.

Citotoksičnu aktivnost smo ispitali *in vitro* na ćelijama RAW 264,7 makrofaga. Ćelijske linije su alikvotirane u mikrotitar ploči sa 96 oglednih mesta sa gustinom  $2 \times 10^4$  ćelija po bunariću. Nakon 24-časovne inkubacije u kontrolisanoj atmosferi (5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ ), uklonili smo medijum i u svaki bunarić dodali 100  $\mu\text{L}$  kompletni DMEM medijum sa serijom dvostrukog razblaženja uzoraka jedinjenja kandidata. Potom je usledila 48-časovna inkubacija u kontrolisanim uslovima sa 5%  $\text{CO}_2$  i 37  $^{\circ}\text{C}$ . Nakon inkubacije, smo u svaki bunarić dodali po 10  $\mu\text{L}$  450  $\mu\text{M}$  resazurina i ponovo inkubirali 4 h u mraku (5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ ). Vijabilnost ćelija smo pratili merenjem OD570nm (resorufin) i OD600nm (resazurin). Citotoksičnu aktivnost smo formulisali u  $\text{CC}_{50}$  (citotoksična koncentracija potrebna da se rast makrofaga inhibira za 50 %).

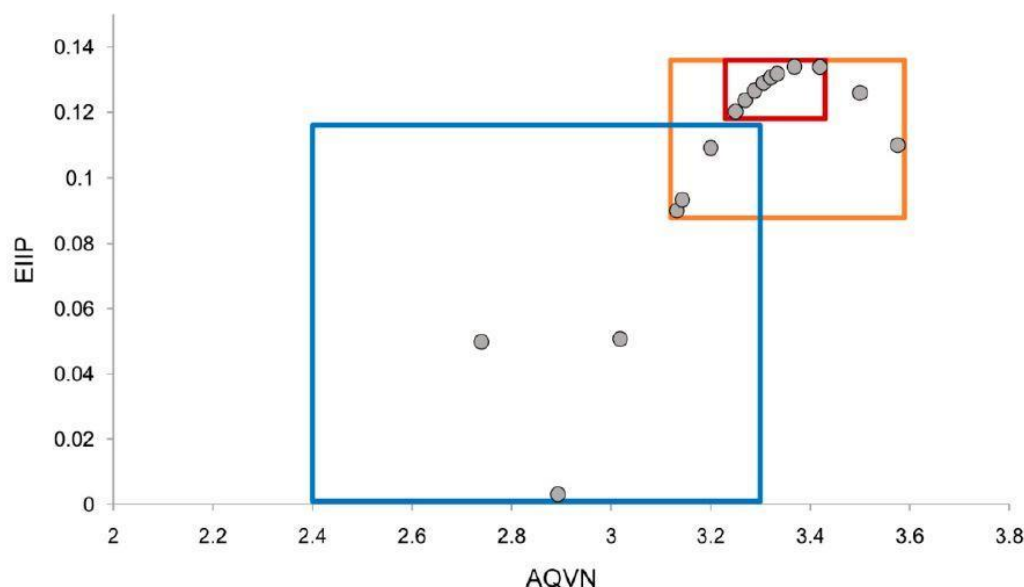
## 4. Rezultati i diskusija

### 4.1. Flavonoidi sa mikrobicidnom aktivnošću na lajšmanije

Trenutno postoji potreba za novim agensima u terapiji lajšmanioze, kao i potreba da mehanizam njihovog dejstva bude jasno definisan, a da se ujedno smanje rizici od neželjenih dejstava. Arginaza (ARG), enzim koji je esencijalan za sintezu PA je stoga odabran za ciljno mesto razvoja inhibitora. Flavonoidi su prirodni proizvodi i zbog toga nose manji rizik za pojavu toksičnosti po domaćina, kao i neželjena dejstva. Da bismo pronašli potencijalne inhibitore arginaze, primenili smo VS protokol na bazu od 5.567 jedinjenja flavonoida. Pretraga jedinjenja po opisanom VS protokolu koristi modele zasnovane na strukturi liganda i ciljnog mesta koji su primenjeni sukcesivno. Ukupni broj jedinjenja smo najpre okarakterisali na osnovu proračuna AQVN/EIIP koji su nam dali uvid u veličinu hemijskog prostora za pretragu. Predviđanje aktivnost kandidata smo dobili primenom 3D-QSAR modela. Od ukunog broja, 10 kandidata je pokazalo potencijalnu inhibitornu aktivnost prema arginazi na osnovu našeg modela. Neželjeno dejstvo na CYP 450 2A6, 2C9, 3A4 grupu enzima, sulfotransferaze i pregnan-X-receptor smo pokušali da predvidimo metodom anti-targetiranja [142]. Dodatno, izračunali smo ADMET vrednosti rizika za 10 najboljih kandidata.

#### 4.1.1. Primena EIIP/AQVN filtera

U prvom koraku pretrage smo za trening skup od 24 jedinjenja sa mikrobicidnim dejstvom na lajšmanije, koji su ujedno i inhibitori arginaze lajšmanije (dostupno pod oznakom ChEMBL3108635) izračunali AQVN/EIIP vrednosti. Od ovih 24 jedinjenja za 18 su izmerene  $IC_{50}$  vrednosti, koje su uzete kao parametar za razvoj 3D-QSAR modela. Na *Slici 5*, prikazali smo raspodelu AQVN/EIIP vrednosti za trening skup. Prošireni aktivni domen hemijskog prostora, koji obuhvata 87,5 % trening skupa, nalazi se u intervalu AQVN i EIIP vrednosti od 3,13 do 3,58 i od 0,09 do 0,134. Ovaj interval vrednosti smo postavili kao kriterijum za filtriranje jedinjenja iz početne baze. Skriningom MetIDB baze (5.679 jedinjenja) dobili smo 200 flavonoida koji zadovoljavaju postavljeni kriterijum.



**Slika 5.** Grafikon raspodele 24 jedinjenja, inhibitora arginaza lajšmanija, na osnovu EIIP i AQVN vrednosti. Domeni hemijskog prostora su klasifikovani na osnovu intervala EIIP/AQVN na (1) najuži opseg (crveno) u intervalima od 3,25 do 3,42 za AQVN i od 0,12 do 0,134 za EIIP; (2) domen sa 87,5% trening skupa (narandžasto); (3) domen hemijskog prostora definisan sa > 90 % jedinjenja iz *PubChem Compound* podataka. Statistika: Proširena aktivna grupa – u okviru domena 21 (87,5 %), van domena 3 (12,5%); domen sa najužim opsegom – u okviru domena 12 (50 %), van domena 12 (50 %)

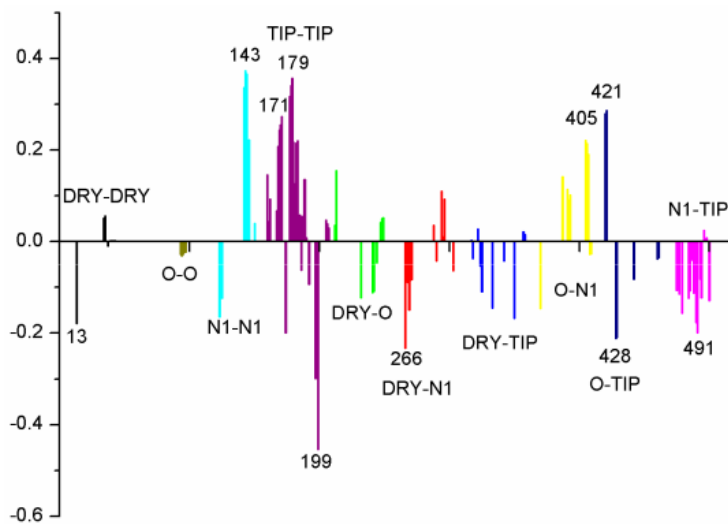
Prethodnom evaluacijom EIIP/AQVN distribucije za jedinjenja iz PubChem baze jedinjenja (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>), pokazalo se da je 92.5 % jedinjenja homogeno distribuirano u opsegu od 0,00 do 0,11 Ry za EIIP i od 2,4 do 3,3 za AQVN [142]. Domen kojeg čine navedeni intervali obuhvata većinu jedinjenja, pa je definisan kao bazičan EIIP/AQVN hemijski prostor (engl., *basic chemical space*, BCS). Većina jedinjenja iz trening skupa inhibitora arginaze lajšmanije, pripada distinktivnom domenu, izvan BCS prostora. Ideja iza predloženog kriterijuma je da daljim testiranjem manje frakcije jedinjenja koja pripadaju proširenom aktivnom domenu, imaju veću šansu za pronalaženjem kandidata. Dodatno, specifičnost kriterijuma se odražava u činjenici, da odabirom kandidata iz proširenog aktivnog domena na osnovu AQVN/EIIP modela, se dobija svega 3% od ukupnog broja jedinjenja.

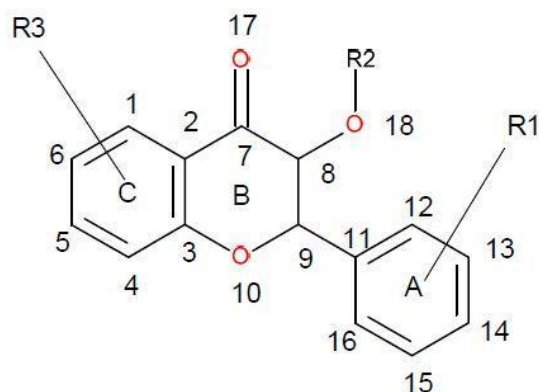
#### 4.1.2. 3D-QSAR model

Od ukupnog broja PLS promenljivih, 10 predstavljaju najznačajnije molekulske osobine koje karakterišu aktivnost inhibitora arginaze. Model je definisan sa promenljivama negativnog i pozitivnog doprinosa. Negativan doprinos je pronađen za promenljive 13, 199, 266, 428 i 491, a pozitivan potiče od promenljivih 143, 171, 179, 266, 405 i 421. Sastav 3D-QSAR modela je prikazan u *Tabeli 9* i na slikama *6* i *7*. Budući da je najveća vrednost koeficijenta determinacije dobijena za latentnu promenljivu 3, za upotrebu u predviđanju, korišćen je model sa tri latentne promenljive. Model je dalje validiran upotrebom metode kodiranja vrednosti zavisne promenljive, tj. bioaktivnosti, dok su vrednosti deskriptora ostale nepromenjene (Prilog 2). Kodiranje podataka je vrsta permutacionog testa u kojem se neka od zavisnih promenljivih podvrgne slučajnoj zameni vrednosti i tako koristi za trening modela. Test upotrebom kodiranih podataka ima veliki uticaj na kvalitet PLS modela [143]. U našem slučaju, kao rezultat testa primene kodiranih podataka vrednost za  $R^2$  je bila sve manja u svakoj narednom ciklusu, dok je  $Q^2$  vrednost dobila negativni predznak. U prvom testu pri upotrebi kodiranih podataka, model je konvergirao sa 65 nezavisnih promenljivih. U drugom sa 35 i u trećem sa 73.

**Tabela 9:** Najznačajnije PLS latentne promenljive za model inhibitora arginaze lajšmanija.

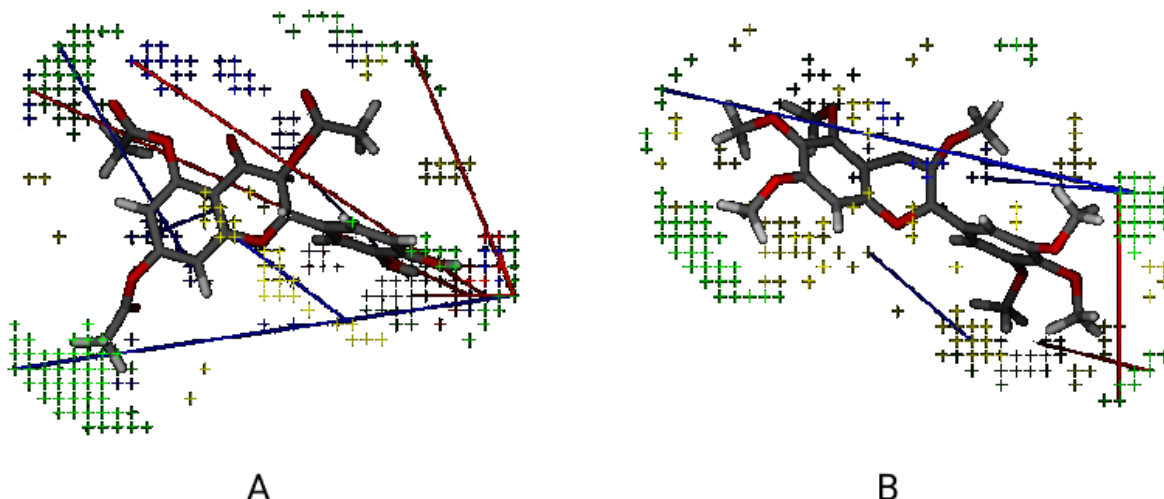
#	Broj promenljive	Tip	Udaljenost (Å)	Vrednosti LV5	Strukturni parametri (Slika 6.)
1	13	DRY-DRY	5,20 - 5,60	-0,1793	Udaljenost između dva aromatična prstena A i C
2	266	DRY-N1	2,40 - 2,80	-0,2333	Rastojanje između C3 ugljovodonikovog atoma iz B prstena i karbonilni kiseonikov atom O10 ili O17
3	405	O-N1	16,40 - 16,80	0,2214	Rastojanje između karbonilnog kiseonika OAc grupe na položaju C1 (prsten C) i atoma kiseonika iz OH grupe na položaju C14 (prsten A) ili kiseonika grupe C-CH <sub>2</sub> OH iz glukoze na položaju R2. Rastojanje je prisutno u CHEBML3109433, 361362 i 250450
4	199	TIP-TIP	17,20 - 17,60	-0,4547	Rastojanje između C6-C15 metil grupa
5	428	O-TIP	4,80 - 5,20	-0,2121	Rastojanje između metil grupe sa pozicije C14 i najbliže OH grupe na poziciji C15 prstena A.
6	143	N1-N1	15,60 - 16,00	0,3729	Rastojanje između atoma kiseonika na A i C prstenovima, položajima C14-C5.
7	421	O-TIP	2,00 - 2,40	0,2867	Rastojanje između atoma H i O na istoj OH grupi prstena A na C2 poziciji.
8	491	N1-TIP	9,20 - 9,60	-0,1997	Rastojanje između atoma kiseonika, prstena B ili heksoznog prstena i metil grupe sa prstena A, na pozicijama O10 - C14
9	171	TIP-TIP	6,00 - 6,40	0,2737	Rastojanje između dve konture OH grupa u susedstvu, prstena A, na pozicijama C13-C14
10	179	TIP-TIP	9,20 - 9,60	0,3568	Rastojanje između dve konture susednih OH grupa, prsten C, pozicije C6-C4

**Slika 6.** PLS (za LV 5) u 3D-QSAR modelu inhibitora arginaze lajšmanije



**Slika 7.** Zajednička struktura inhibitora arginaze lajšmanije preuzetih sa ChEMBL-a.  
R1, R3 – OH, OAc; R2 – OAc ili heksapiranozil

Promenljiva 13 je u vezi sa udaljenošću između dve probe aromatičnih prstena. Negativan doprinos ove promenljive relativno malog rastojanja između prstenova, ukazuje na postojanje dva hidrofobna aminokiselinska ostatka koji formiraju hidrofobne kontakte sa molekulom liganda. Promenljiva 266 se odnosi na udaljenost aromatičnog prstena i akceptora vodonične veze, a s obzirom na negativni doprinos i malo rastojanje, ukazuje na nepovoljan položaj dva bočna ostatka, prvog sa osobinama donora vodonične veze i drugog, hidrofobnog ostatka. Promenljiva 405 odgovara udaljenosti donora i akceptora vodonične veze na suprotnim stranama molekula jedinjenja. Kako raste vrednost promenljive 405, tako bi trebala da raste i aktivnost jedinjenja, što takođe govori i o širini potencijalnog vezivnog mesta u receptoru. Promenljiva 199 objašnjava oblik molekula, negativan doprinos potiče od sternih smetnji prilikom receptor-ligand interakcije. Promenljiva 428 opisuje tačku na površini molekula koja je u kontaktu sa donorom vodonične veze. Promenljiva 143 predstavlja udaljenost dva atoma donora vodonične veze, koji su na suprotnim stranama molekula. Fizičko-hemijsko značenje promenljivih 143 i 405 je slično. Nasuprot promenljivoj 428, promenljiva 421 pokazuje pozitivan doprinos za veća rastojanja donora vodonične veze i tačke na površini istovetnog atoma i to korelira sa aktivnošću. Promenljiva 419 ima sličan fizičko-hemijski efekat kao promenljiva 428. Promenljive 171 i 179 se odnose na blizinu dva donora vodonične veze (OH) koje imaju pozitivan uticaj na aktivnost jedinjenja. Neke promenljive su prikazane na *Slici 8*, u kombinaciji sa jedinjenjem sa najvećom izmerenom aktivnošću (A) i jedinjenjem sa najmanjom aktivnošću (B).

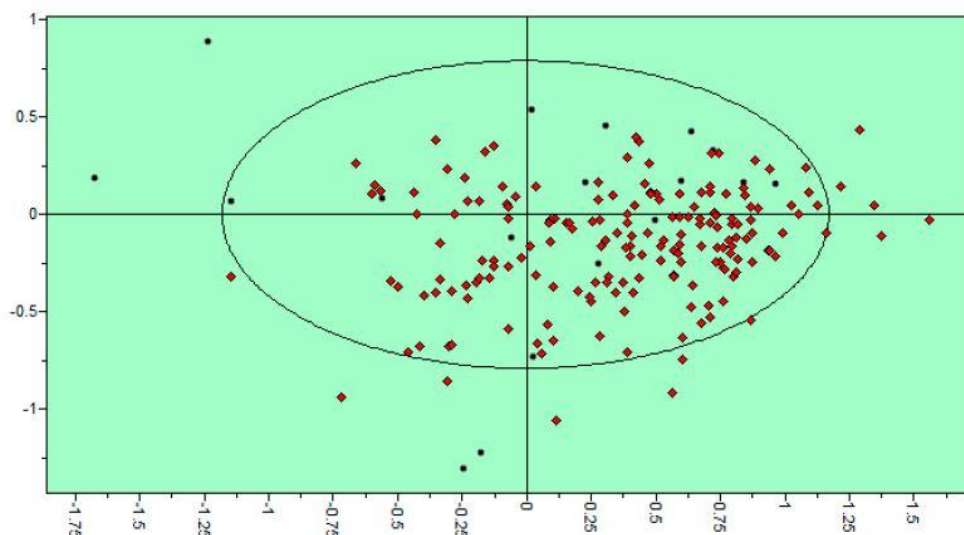


**Slika 8.** (A) Jedinjenje sa najvećom aktivnošću (CHEMBL3109443) i (B) jedinjenje sa najmanjom aktivnošću (CHEMBL3109440) u 3D-QSAR modelu na osnovu PLS promenljivih izračunatih na osnovu inhibitora arginaze *L. amazonensis*. Prikazane probe su TIP (zelene tačke), DRY (žuto), N1 (plavo), O (crveno). Linije koje povezuju konture označavaju promenljive po tipu interakcije (DRY-DRY, TIP-TIP, N1-TIP i ostale kombinacije)

Primenom 3D-QSAR modela, izračunali smo aktivnosti odabranih kandidata. Opisane PLS promenljive smo koristili kao parametre za procenu molekulske sličnosti. Primena modela je opisana u nastavku, potpoglavljima 4.1.3. i 4.2.3.

#### 4.1.3. Primena 3D-QSAR modela

3D-QSAR model smo primenili za proračun aktivnosti 200 jedinjenja dobijenih u prethodnom koraku pretrage na osnovu EIIP/AQVN kriterijuma. Vrednosti za aktivnost su izražene u  $pIC_{50}$ . Dva kriterijuma za rankiranje potencijalnih kandidata bila su: (1) Definisani položaj po PLS vrednosti koji je u blizini jedinjenja za trening modela, *Slika 9.* i (2) izračunate  $pIC_{50}$  vrednosti upotrebom 3D-QSAR modela. Rezultati proračuna za  $pIC_{50}$  su prikazani u *Tabeli 10.* Primenom kriterijuma, 10 najboljih kandidata je odabrano za doking u modele humane arginaze i arginaze lajšmanije.



**Slika 9.** Raspodela vrednosti PLS za 200 kandidata (crveno) i 18 jedinjenja skupa za učenje (crno) 3D-QSAR modela inhibitora arginaze lajšmanije

#### 4.1.4. Doking u strukturni model arginaze

Najboljih 10 kandidata je dokovano u model arginaze *L. amazonensis* (*LaARG*) a potom i model humane arginaze (*HsARG*). Rezultati dokinga su prikazani u *Tabeli 10*. U tabeli su takođe prikazane vrednosti predviđenih  $pIC_{50}$  upotrebom 3D-QSAR modela.

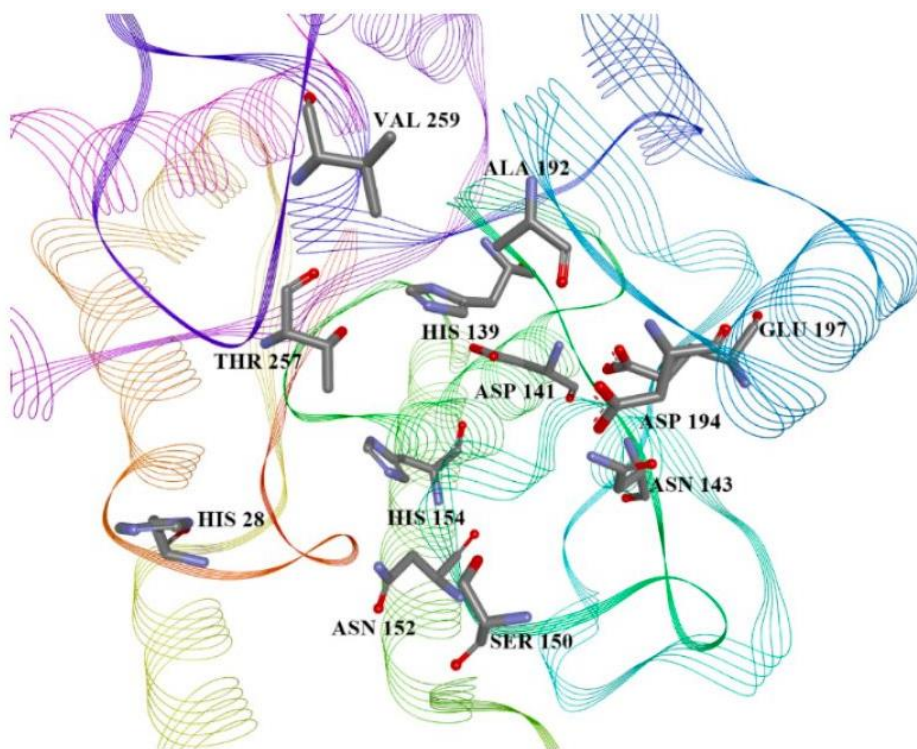
**Tabela 10:** Lista kandidata sa izračunatim energijama vezivanja; Pred.- predviđene  $pIC_{50}$ ; Vrednosti se odnose na doking program i navode se ovim redom: Vina, Glide, AD4, MM/GBSA.

Redni broj kandidata	$pIC_{50}$ pred.	Doking u <i>LaARG</i> [kcal mol <sup>-1</sup> ]	Lista aminokiselina koji učestvuju u interakciji	Doking u <i>HsARG</i> [kcal mol <sup>-1</sup> ]
13	5.777	-7,6; -5,53; -4,88; -30,80	HIS28, THR257, ASN143, ASP141, HIS139, ALA192	-6,4; -4,40; -4,77; -32,18
22	5.667	-6,8; N/A; -4,51; N/A	ASN143, ASP141, HIS139, VAL259	-6,5; -4,83; -3,82; -36,08
28	5.167	-6,6; -5,16; -4,75; -32,15	ASN143, HIS139, THR257	-6,0; -4,07; -3,98; -31,69
38	5.054	-7,0; -5,14; -4,01; -35,12	ASP141, ASN152, THR257, ASP194	-6,9; -5,35; -4,60; -38,47
39	5.465	-6,8; -5,23; -4,59; -39,11	SER150, ASN143, ASP194, ALA192, THR257	-6,5; -4,09; -5,19; -24,99
42	5.738	-6,6; -5,61; -5,08; -36,63	HIS139, ASN152, THR257	-6,8; -3,84; -4,01; -32,88
50	5.122	-6,3; -5,04; -4,32; -49,23	SER150, ASN152, HIS139, VAL259, ALA192	-7,2; -3,96; -4,35; -18,30
56	5.283	-6,6; -5,64; -4,32; -35,87	ASN152, HIS154, HIS139, ASP141, VAL259	-6,0; -5,38; -4,15; -33,92
59	5.204	-7; -4,88; -5,59; -32,81	ASN143, GLU197, THR257, HIS139	-6,7; -5,61; -4,44; -32,44
64	5.673	-6,7; -4,04; -4,39; -40,30	SER150, HIS139, ALA192, VAL259	-6,0; -N/A; -3,89; N/A



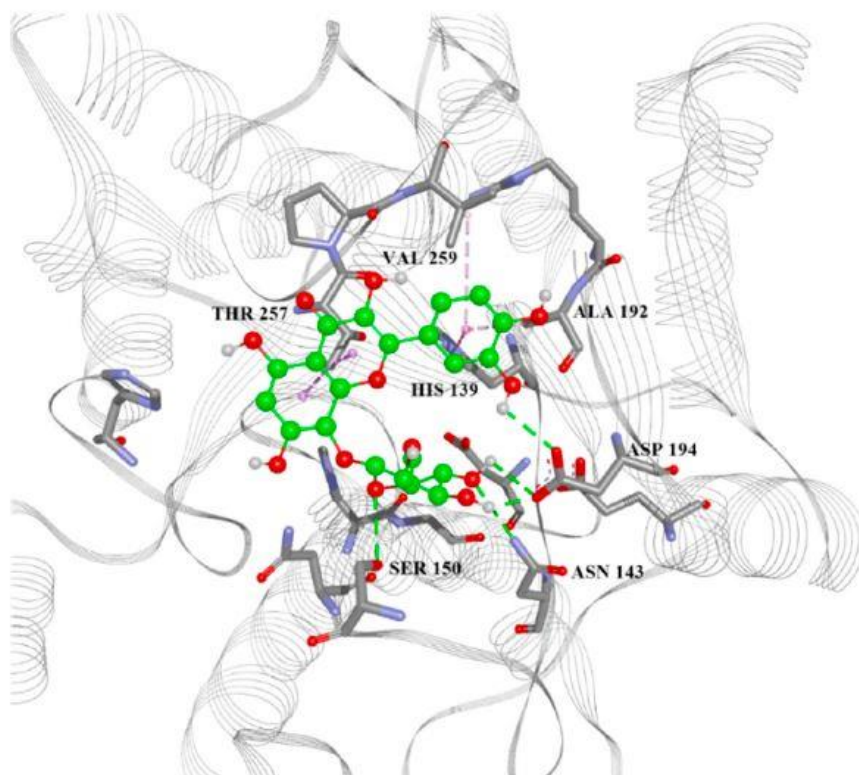
Od deset jedinjenja prikazanih u *Tabeli 10*, najbolje energije interakcije imaju ona sa rednim brojevima **13**, **39** i **22**. Zaključci analize na osnovu doking poza su u saglasnosti sa zaključcima SAR analize koji su racionalizovani primenom PLS modela. Izuzev **8** i **59** za Glide, **42** i **50** za Vina, **38**, **39** i **50** za AD4, **13** i **38** za MM/GBSA jedinjenja pokazuju jaču energiju interakcije sa *La*ARG u odnosu na *His*ARG. Rezultat je potvrđen na osnovu prosečne vrednosti primenom četiri različita doking algoritma. Osim jedinjenja **58**, jedinjenja su pokazala specifičnost kao što je predviđeno na osnovu analize PLS promenljivih.

Slaganje promenljivih 3D-QSAR modela i položaja bočnih ostataka pristunih u vezivnom mestu se može zaključiti analizom, *Slika 10*. Bočni ostaci koji učestvuju u interakciji sa ligandom su ASN, SER, THR, a slažu se sa latentne promenljivama za hidrofilne probe. Druga grupa bočnih ostataka je HIS, VAL i ALA, a ona odgovara hidrofobnim, tj. aromatičnim probama PLS latentnih promenljivih. Par hidrofobnih aminokiselina (ALA, VAL) prikazanih na *Slici 10*, odgovara DRY-DRY promenljivama. Sterna odbijanja odgovaraju DRY-N1, N1-TIP, O-TIP. Par hidrofilnih interakcija odgovara N1-N1 i O-N1. Promenljiva TIP-TIP može odgovarati i konturi hidrofilne i hidrofobne grupe. Vrednosti rastojanja iz *Tabele 9*, odgovaraju poziciji bočnih ostataka aminokiselina u okviru aktivnog mesta arginaze, kao i jačini interakcije u zavisnosti od poze i oblika liganda.



**Slika 10.** Vezivno mesto *La*ARG, homolognog modela, sa naznačenim bočnim ostacima koji učestvuju u receptor-ligand reakcijama

Bočni ostaci koji učestvuju u interakciji sa ligandom su identifikovani na osnovu ko-kristalisanog liganda iz modela strukture arginaze. Tačnije, receptor-ligand interakcije iz rezultata dokinga kandidata **39**, se podudaraju onim kod 2(S)-amino-6-boronoheksanskom kiselinom (ABH) što se može primetiti na osnovu strukturnih podataka arginaze *L. mexicana* (PDB oznaka 4iu0) [118]. Doking poza kandidata 39 u vezivnom mestu *La*ARG je prikazana na *Slici 11*.



**Slika 11.** Doking poza najboljeg kandidata **39** u aktivno mesto *LdARG*, sa označenim intermolekulskim interakcijama. Vodonične veze (zeleno); aromatične/hidrofobne interakcije (lila)

#### 4.1.5. Karakterizacija kandidata

Za 10 najboljih kandidata smo izračunali potencijal interakcije sa ciljnim mestima, grupe anti-targeta. Rezultat anti-target dokinga kandidata je predstavljen u vidu matrice i prikazan na *Slici 12*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
<b>13</b>	■	■	■	■	■	3.5	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	1.5	8.0
<b>22</b>	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	2.5	■	■	■	■	■	2.0	7.5
<b>28</b>	■	■	■	■	■	2.0	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	1.0	6.0
<b>38</b>	■	■	■	■	■	4.0	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	0.0	7.0
<b>39</b>	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	0.0	6.0
<b>42</b>	■	■	■	■	■	2.5	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	1.5	7.0
<b>50</b>	■	■	■	■	■	2.5	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	1.0	6.5
<b>56</b>	■	■	■	■	■	2.0	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	1.0	6.0
<b>59</b>	■	■	■	■	■	4.0	■	■	■	■	■	3.0	■	■	■	■	■	0.0	7.0
<b>64</b>	■	■	■	■	■	4.0	■	■	■	■	■	2.0	■	■	■	■	■	1.0	7.0

**Slika 12.** Matrica potencijalnih receptor-ligand interakcija. Šema: crno-1.0; sivo - 0.5; belo - 0.0. Kolone: Glide XP PXR, B: Glide XP SULT, C: Glide XP CYP 2a6, D: Glide XP 2c9, E: Glide XP CYP 3a4, F: Ukupno za Glide XP, AD4 PXR, H: AD4 SULT, I: AD4 CYP 2a6 J: AD4 CYP 2c9, K: AD4 CYP 3a4, L: Ukupno za AD4, M: vina PXR, N: Vina SULT, O: Vina CYP 2a6, P: Vina CYP 2c9, Q: Vina CYP 3a4, R: Ukupno za Vina, S: ukupno za sve tipove algoritama.

Na slici anti-target matrice su abecedno označena ciljna mesta dejstva u kombinaciji sa vrstom programa za doking, korišćenog za proračun receptor-ligand interakcije. U rezultatima postoji konsenzus, iako je u pitanju primena različitih doking algoritama. Analizom dobijenih rezultata, ustanovili smo da ni jedna vrednost za energiju veze ne prelazi granicu od  $-7,7$  kcal mol<sup>-1</sup> u slučaju interakcije jedinjenja sa CYP P450 2A6, nezavisno od izbora doking programa. Najzastupljenije interakcije kandidata predložene su za SULT i CYP P450 3a4. Za kandidata sa rednim brojem **13** izračunata je najveća vrednost za energiju interakcije. Trivijalni naziv za kandidata **13** je ent-epikatehin-3-O-galat. Za ovo jedinjenje postoji dokumentovana inhibitorna aktivnost na rast lajšmanije vrste *L. mexicana* u formi promastigot, što je izmereno eksperimentalno, iz ekstrakta prirodnih flavonoida, proizvoda sekundarnog metabolizma vrste *B. crassifolia* [144]. Veze između flavonoida kao proizvoda sekundarnog metabolizma i organizama koji vrše biosintezu flavonoida, su dokumentovane u KNApSACK bazi podataka [145]. Zbog toga što je aktivno mesto arginaze konzervirano u visokom procentu, nezavisno od vrste lajšmanije, vrlo je verovatno da je kandidat **13** dobar kandidat za *in vitro* ispitivanja.

Kandidati **28**, **39** i **56** pokazuju slabe interakcije sa grupom anti-targeta, tj. vrednosti energija interakcije su  $< 3,0$  kcal mol<sup>-1</sup> nezavisno od izbora doking programa. S obzirom da je aktivno mesto izozima arginaze konzervirano, na osnovu anti-target karakterizacije, može se pretpostaviti da će izabrani kandidati pokazati inhibitornu aktivnost na različitim tipovima *Leishmania* spp. Sa druge strane, inenzitet interakcije procenjen na osnovu anti-targetiranja treba smatrati umerenim. Umeren intenzitet pokazuje sposobnost kandidata da intereaguju sa metaboličkim enzimima i budu uklonjeni iz organizma, tako da je dodatno smanjen rizik pojave neželjenog dejstva.

Na kraju smo za kandidate izračunali ADMET osobine. Broj rizika prema ADMET deskriptorima za apsorpciju, metabolizam (CYP), mutaciju, pravilo 5 Lipinskog i toksičnost smo prikazali u *Tabeli 11*. Numeričke vrednosti upisane u tabelu označavaju ukupan broj rizika po ADMET kategorijama. Treba navesti da svi kandidati na osnovu prosečnog ADMET rizika koji je  $> 7$ , pripadaju grupi od 10% WDI (engl., *World Drug Index*). Referentna vrednost je postavljena na osnovu računice ADMET rizika od 2,260 za komercijalno dostupne terapeutike [146].

**Tabela 11:** Izračunati rizici za kandidate iz serije flavonoida.

Kandidat	Oznaka	ADMET	APSORP	CYP	MUT	Pravilo5	TOX
13	TOP1	9	5	0	3	2	1
22	TOP2	10+	5	0	3	2	1
28	TOP3	10	5	0	4+	2	1
38	TOP4	9	5	0	3	2	1
39	TOP5	9	5	0	3	2	1
42	TOP6	8	5	0	m_3	2	1
50	TOP7	10	5	0	2	2	1
56	TOP8	11	5	2	0	1	1
59	TOP9	9	5	0	4	2	1
64	TOP10	9	5	0	s_3	2	1

Kolona ADMET – ukupan broj rizika izvedenih iz APSORP (aprospcioni rizici), CYP (metabolički rizici) i TOX (rizici toksičnosti); MUT - rizici mutacija

Numeričke vrednosti u *Tabeli 11*. odgovaraju broju predviđenih i različitih klasa rizika za svakog kandidata. Za kolonu ADMET, broj rizika odgovara: (8) – Size, HBD, HBA, ch, Peff, Xr-, Xm-, MUT; (9) – Size, HBD, HBA, ch, Peff, hERG-, Xr-, Xm-, MUT; (10) – Size, HBD, HBA, ch, Peff, hERG-, Xr-,

Xm-, HEPX-, MUT; (10+) – Size, HBD, HBA, ch, Peff+, hERG-, Xr-, Xm-, HEPX-, MUT; (11) – Size, HBD, HBA, ch, Kow-, Peff+, Sw-, Xr-, Xm-, 2C9 i CL.

Skraćenice za parametre rizika se odnose na veličinu molekula (Size), broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodonične veze, naelektrisanje (ch). U ovom slučaju, veličina molekula je pokazatelj da jedinjenje ne podleže pasivnoj apsorpciji u gastrointestinalnom traktu (GIT-u). Vežano za apsorpciju navedene su oznake za permeabilnost (Peff), lipofilnost (Kow) i rastvorljivost u vodi (Sw). Oznake X se odnose na pojavu kancerogenosti kod pacova (Xr) i miša (Xm). Dodatak minus i plus znaka za parametar, pokazuje da su za proračun korišćene vrednosti koje prevazilaze referentni interval za dati rizik (engl., *out-of-scope*) predviđanja i zbog toga skalirane faktorom od 0,5. U slučaju kada je uz rizik dodat minus (npr. Peff-), vrednost (Peff) koja je skalirana na referentni interval je manja od praga, pa u tom slučaju ne dovodi do pojave rizika (u ADMET i APSORP).

Za kolonu APSORP, kod (5) odgovara parametrima – Size, HBD, HBA, ch i Peff. Za kolonu CYP, parametar (2) odgovara 2C9 i CL oznakama. Oznaka 2C9 označava visoki klirens za dati CYP izozim, a CL oznaku za mikrozomalni klirens. Za kolonu MUT, broj rizika je: (2) – S\_97, m102; (3) – S\_97, S102, NIHS; (m\_3) – m\_97, S102, NIHS; (s\_3) – S\_97, m102, NIHS; (4) – S\_97, S\_98, S102, NIHS; (4+) – S\_97, S102, m102- i NIHS. Parametri ukazuju na potencijal mutagenosti na osnovu Ejmsovog testa nad različitim mutantima *Salmonella Typhimurium* (TA98, TA98, TA102...) sa (m\_xxx) i bez aktivacije mikrozoma jetre pacova, kao i NIHS („Nacionalni Insistut Zdravstvenih Nauka”, Japan) klasifikacionionog modela. Za pravilo 5, broj rizika kandidata je (2) usled Hb (broj vodoničnih veza > 5) i NO (broj atoma azota i kiseonika > 10), a (1) usled Hb. Konačno za TOX rizike, broj (1) odgovara neželjenom dejstvu koje uzrokuju MUT parametri.

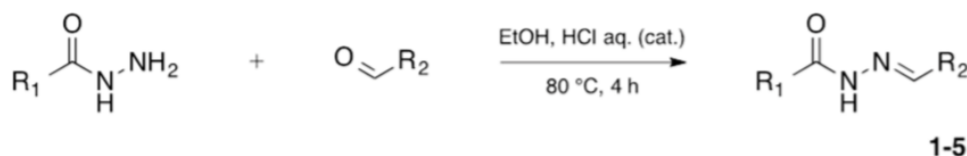
Odnose strukture i osobina TOP kandidata smo ispitali upotrebom modula MedChem designer. Parametri za apsorpciju (Peff) zavise od glikozidnog prstena. U ovim strukturama metilenhidroksid na položaju 3 smanjuje permeabilnost molekula u većoj meri nego hidroksid na istom položaju. Dodatni doprinos smanjenju permeabilnosti potiče od ketoenola na kvarcetin. Ova funkcionalna grupa bi takođe bila razlog pozitivnom Ejmsovom testu, kako se pokazalo na osnovu vrednosti parametra MUT\_NIHS dobijene u okviru programa MedChem designer.

## 4.2. Mikrobicidna aktivnost derivata oksidiazola i indolizina na lajšmanije

Pokazalo se da su oksadiazoli potentni agensi sa dejstvom na lajšmanije [28,31]. Takođe se pokazalo da su derivati indolizina antimikrobni agensi, koji ispoljavaju inhibitorno dejstvo na lajšmanije [35-6]. U ovoj studiji pokušali smo da odgovorimo na pitanje da li se mehanizam dejstva oksadiazola i indolizina odnosi na receptor-ligand interakcije sa arginazom lajšmanija. Hipoteza je formirana na osnovu potvrde o inhibiciji enzima poliamin-tripanonion metabolizma koji je spicifičan za rast parazita [48]. Veliki potencijal leži u ciljanom razvoju inhibitora derivata N-acilhidrazona, oksadiazola i indolizina. Potencijal ovih tipova jedinjenja se zasniva na dokumentovanim rezultatima ispitivanja antimikrobne aktivnosti, kao i pogodnosti sinteze velikog broja derivata različitih osobina. U ovoj studiji predložena je serija novih oksadiazola i indolizina, među kojima su i jedinjenja sa potencijalnom aktivnošću na arginazu lajšmanije. Iz nove serije jedinjenja, primenom VS protokola koji obuhvata EIIP/AQVN, 3D-QSAR modele i doking, određeni broj je sintetisan radi *in vitro* ispitivanja na vrsti *L. donovani*. Tri kandidata su pokazala značajnu aktivnost [147].

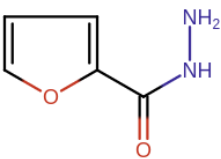
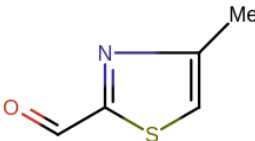
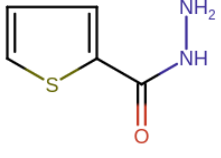
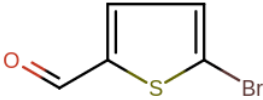
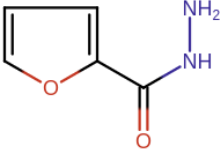
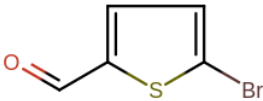
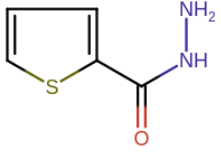
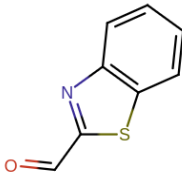
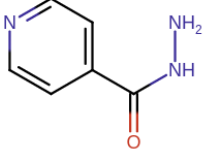
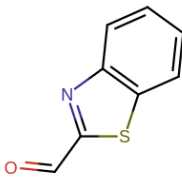
### 4.2.1. Postupak sinteze derivata 1,2,4-oksadiazola

N-acetilhidrazoni su važna grupa jedinjenja za dizajn inhibitora i mogu se sintetisati konvencionalnim [33] i nekonvencionalnim metodama [34-5]. Osnovna struktura N-acetilhidrazona je sama po sebi biološki aktivna, a služi kao prekursor za sintezu različitih jedinjenja. Nova grupa jedinjenja koja se može sintetisati su 1,2,4-oksadiazoli. Prekusori za dalji rad, N-acetilhidrazoni **1-5** su pripremljeni automatizovanom sintezom. Jedinjenja smo sintetisali refluksom ekvimolarne smeše hidrazida i aldehida u etanolu i u prisustvu hlorovodonične kiseline kao katalizatora reakcije (reakciona *shema* 2). Taloge sa čvrstom supstancom smo prečišćavali metodom filtracije, paralelno u četiri serije po 50 jedinjenja, i uspeli da izolujemo oko 200 jedinjenja. Strukture sintetisanih jedinjenja su prikazane u *Tabeli* 12. Čistoća je određena primenom LC/MS.



**Shema 2.** Automatizovana sinteza acilhidrazona **1-5**. Ostaci za jedinjenja koja su izolovana: R<sub>1</sub> = furan, tiofen, piridin; R<sub>2</sub> = 4-metil-tiazol, 2-bromo-tiofen, benzotiazol

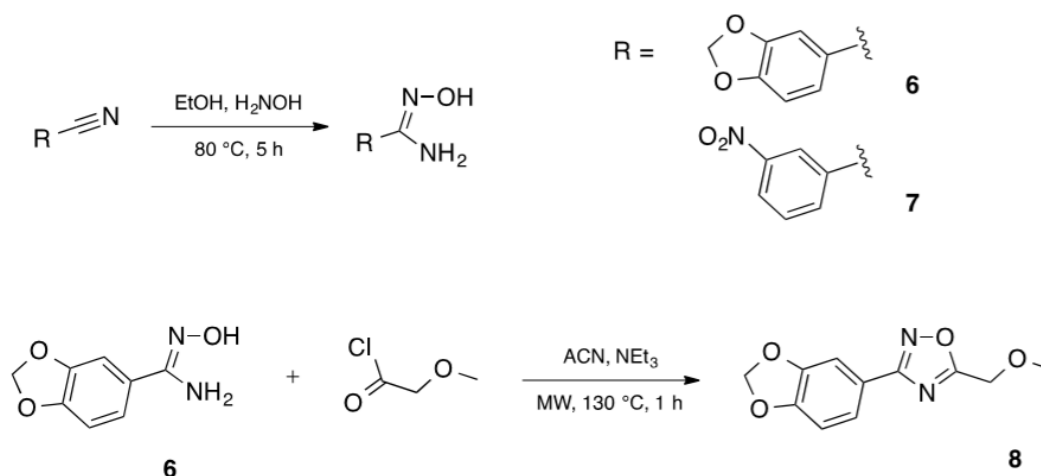
Tabela 12: Izolovani acilhidrazoni.

Redni broj	Hidrazid	Aldehid	Prinos (%)	Čistoća (%)
1			61	92
2			72	99
3			71	99
4			100	99
5			70	92

Kraj Tebele 12.

Jedinjenja 1,2,4-oksadiazola pripadaju 5-članjoj heteroaromatičnoj klasi hemijski jedinjenja. Od različitih metoda dobijanja [148], u ovom radu je opisana sinteza iz amidoksima i derivata karboksilne kiseline.

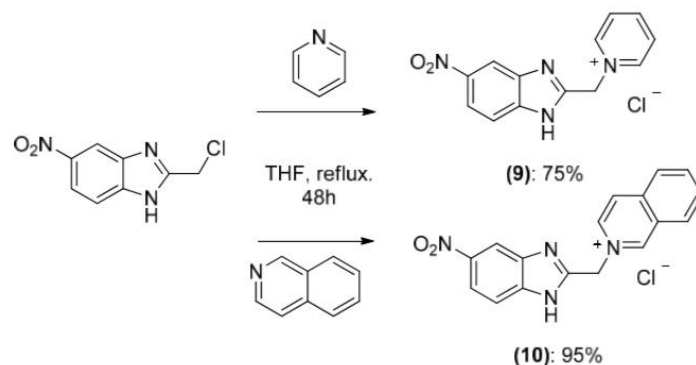
Sinteza 3-[3,4-(metilendioksi)fenil]-5-(metoksimetil)-1,2,4-oksadiazola (jedinjenje **8**) je izvršena u dva koraka, sa prinosom od 90%. Reakcija počinje sintezom amidoksima (jedinjenje **6**) iz 3,4-(metilendioksi)benzoničila i hidrosilamina. U drugom koraku, jedinjenje **6** metoksiacetil hlorid učestvuju u reakciji ciklizacije koja je katalizovana mikrotalasnim zračenjem, *shema 3*. Kandidat **8** je sintetisan u toka programa sinteze male molekulske arhive, usled čega je ustanovljen protokol koji omogućava automatizaciju i paralelizaciju reakcija. U prvom koraku sinteze polazi se od 3-nitrobenzoničila, pri čemu nastaje 3-nitrobenzoamidoksim u visokom prinosu.



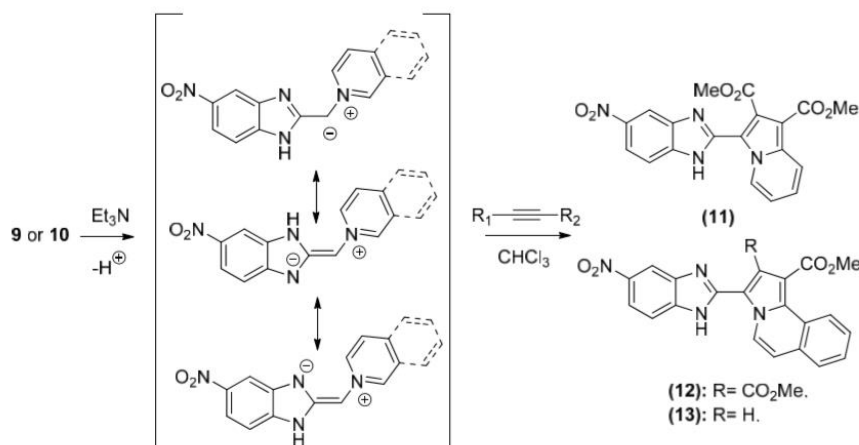
Shema 3. Reakcije automatizovane sinteze amidoksima **6**, **7** i 1,2,4-oksadiazola **8**.

#### 4.2.2. Postupak sinteza derivata indolizina

Reakcija 1,3-dipolarne cikloadicije azometin ilida koji sadrži grupu sa atomom azota u 6-članom prstenu, kao što su piridin i izohinolin je primenjena za dobijanje jedinjenja kandidata derivata indolizina. Jedinjenja **9**, 1-((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piridin-1-ijum hlorid i **10**, 2-((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)izohinolin-2-ijum hlorid, smo pripremili reakcijom smeše piridina/izohinolina sa 2-(hlorometil)-5-nitro-1H-benzo[d]imidazolom, *shema 4* [136-7]. Jedinjenja **9** i **10** podležu reakciji dehidrohalogenizacije u prisustvu trietilamina u hloroformu pri čemu nastaju odgovarajući piridinijum **9** (75%) i izohinolinijum **10** (95%). U narednom koraku nakon tretmana sa DMAD ili metil propionatom na sobnoj temperaturi preko noći, uz doradu i nakon hormatografije na koloni, dobili smo derivate indolizina **11** (u prinosu od 25%) i benzoindolizina **12** (28%) i **13** (27%). Reakcija je prikazana na *shemi 5*. Spektralna i analitička karakterizacija jedinjenja upotrebom <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>H NMR, MS i IR je data u prilogu (Prilog 1).



**Shema 4.** Sinteze 1-((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piridin-1-ijum hlorida **9** i 2-((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)izohinolin-2-ijum hlorida **10**.



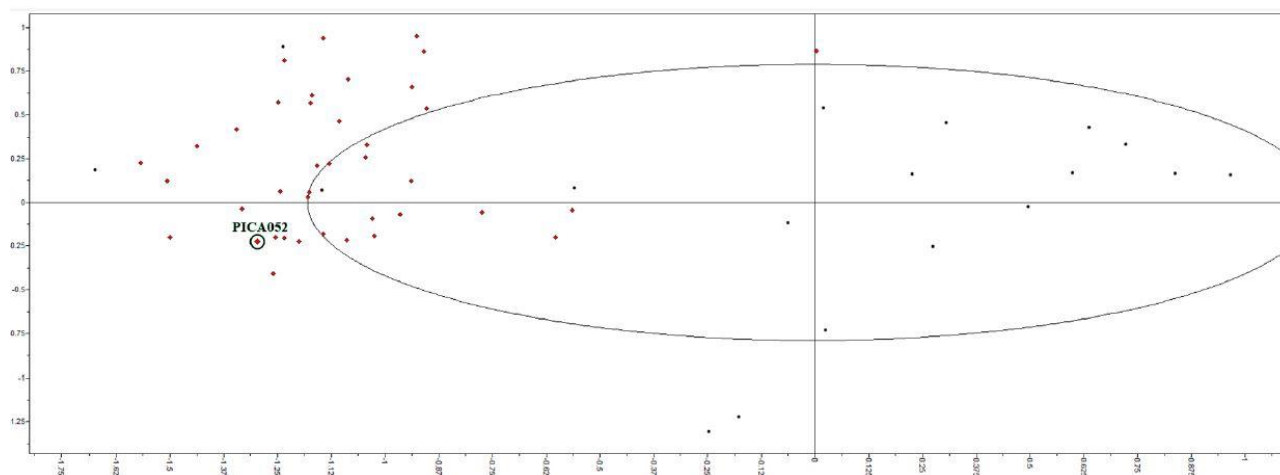
**Shema 5.** Sinteza derivata indolizina **11-13**.

Nedostatak paralelizacije, koja podrazumeva da je mehanizam reakcije sinteze generalizovan, jeste da dobijeni prinosi nisu optimalni. U našem slučaju, nizak prinos smo dobili za jedinjenja **11-13**, koji varira u intervalu od 25-28% nakon metode prečišćavanja. Nerastvornost hloridnih soli može biti drugi od razloga za dobijanje niskog prinosa. Istraživačka grupa sa Univerziteta u Tuluzu, zahvaljujući kojem je pristup arhivi oksadiazola i indolizina bio omogućen, intenzivno radi na poboljšanju protokola automatizovane sinteze. Napredak koji se očekuje tiče se koraka 1,3 dipolarne cikloadicije upotrebom ilida. Fokus je na razvoju nekonvencionalne sinteze derivata indolizina na osnovu kojih bi bila omogućena priprema manjih serija dizajniranih jedinjenja za ispitivanje aktivnosti.

#### 4.2.3. Odabir kandidata za *in vitro* ispitivanja

Za jedinjenja iz arhive derivata oksadiazola i indolizina smo izračunali EIIP/AQVN vrednosti nakon čega smo izvršili odabir kandidata po kriterijumu opisanom u poglavlju 4.1.1. Kriterijum za odabir, tj. filter jedinjenja je opisan vrednostima za EIIP 3,130-3,580. Parametar za AQVN je interval vrednosti iznosi 0,09-0,134. Ukupno 39 kandidata zadovoljava kriterijum za dalju selekciju. Za ta jedinjenja smo izračunali  $\text{pIC}_{50}$  vrednosti upotrebom 3D-QSAR modela inhibitora arginaze lajšmanije. Potom smo na osnovu dobijenih parametara, tj. (1) PLS vrednosti jedinjenja, *Slika 13* i (2) rankiranja po  $\text{pIC}_{50}$  izvršili finalni odabir. Za sledeći korak odbačeno je 74% jedinjenja.

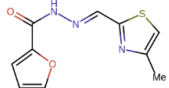
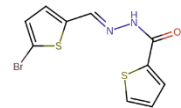
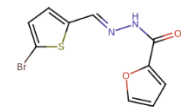
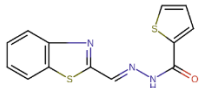
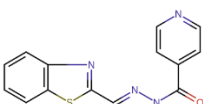
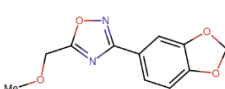
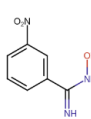
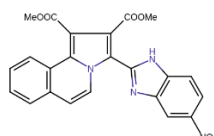




**Slika 13.** PLS vrednosti za 39 kandidata (crveno) i jedinjenja skupa za trening modela (crno). Kandidat (2) sa najboljom PLS vrednošću je označen (PICA052).

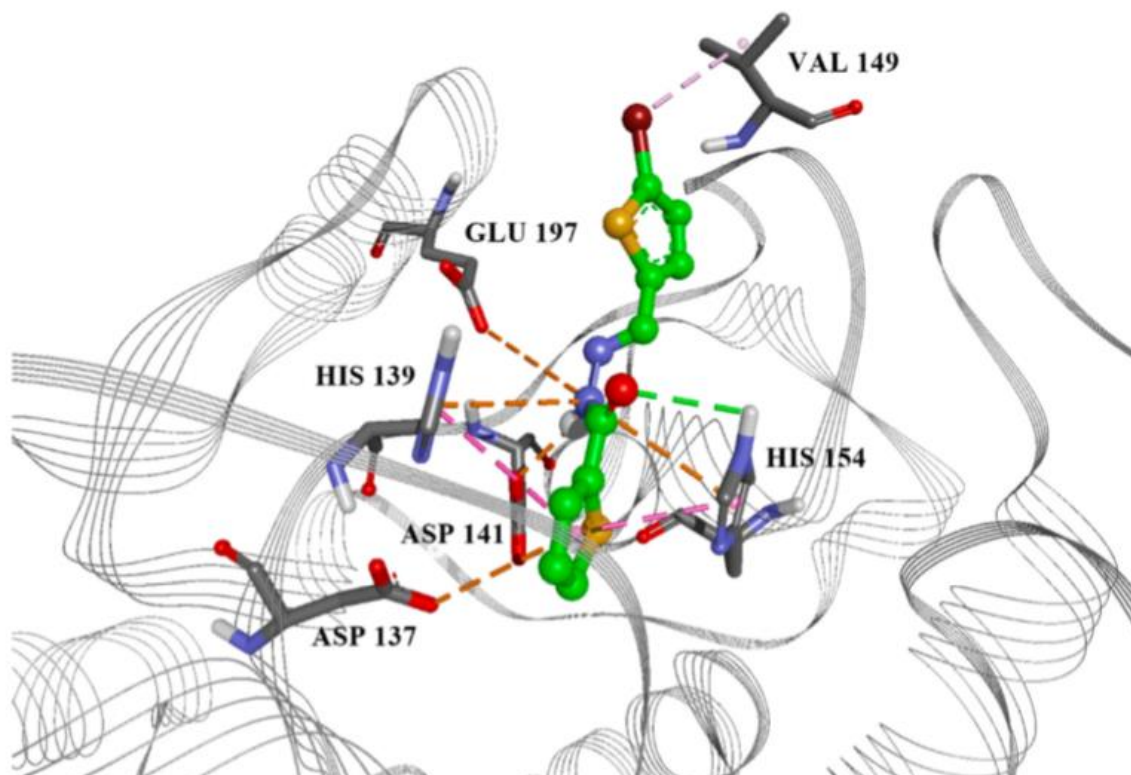
Rezultat za dobijenu aktivnost smo potvrdili upotrebom metode zasnovane na strukturi receptora, doking kandidata u modele *LaARG* i *HsARG*. Ukupno 10 kandidata je dokovano. Na osnovu dokinga, za 8 kandidata imamo jasan odnos energije interakcije koji se može racionalizovati kroz specifičnost na tip arginaze. Kandidati **2, 3, 4, 8 i 12** pokazuju potencijal za specifičnost interakcije, sa tipom arginaze lajšmanije, što se pokazuje sa razlikama energija interakcije od 0,3 do 0,8 kcal mol<sup>-1</sup> u odnosu na humanu. Rezultati sa izračunatim pIC<sub>50</sub> i doking energijama interakcije, prikazani su u *Tabeli 13*. U ovom radu je umesto koncenzusa vrednosti od doking programa korišćena samo jedan program (AD4) s obzirom da se na osnovu prethodnih rezultata pokazano da različiti doking algoritmi daju slične rezultate.

**Tabela 13:** Rezultati virtuelnog skrininga jedinjenja derivata oksidiazola i indolizina.

Redni broj	Kod	AQVN	EIIP	Struktura	Pred. pIC <sub>50</sub>	$\Delta G^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <i>LaARG</i>	$\Delta G^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <i>HsARG</i>
17	1	3,280	0,125		3,85	-6,0	-5,9
21	2	3,304	0,129		3,77	-5,8	-5,0
22	3	3,304	0,129		3,94	-6,2	-5,8
23	4	3,357	0,134		3,55	-6,3	-6,2
24	5	3,267	0,123		3,54	-6,4	-6,3
25	8	3,259	0,122		3,77	-7,4	-6,8
26	7	3,400	0,134		5,39	-7,4	-7,3
38	12	3,300	0,128		3,94	-7,6	-6,8

Kraj Tabele 13.

Na *Slici 14* je prikazana doking poza kandidata **2** u aktivnom mestu modela *LaARG*. Ovaj kandidat je pokazao najveći inhibitorni potencijal na osnovu *in vitro* testiranja aktivnosti, a takođe se pokazao kao jedan od boljih kandidata dobijenih VS skriningom. Doking poza je u saglasnosti sa prethodno definisanom interpretacijom receptor-ligand interakcija, izvedenom iz kristalografskih podataka arginaze *L. mexicana*. Ono što je specifično za ovu receptor-ligand interakciju je bočni ostatak GLU197 koji formira elektrostatički potencijal sa hidrazinom. Postoji mogućnost da je ova interakcija ključ za racionalizaciju boljeg prepoznavanja kandidata sa arginazom lajšmanije u odnosu na humanu. Razlika afiniteta prema *LaARG* i *HsARG* iznosi  $0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ .



**Slika 14.** Doking poza kandidata **2** u modelu *LaARG*. Isprekidane linije su obojene po tipu interakcije: vodonična veza (zeleno), elektrostatičke interakcije (naranžasto), hidrofobne interakcije (lila).

#### 4.2.4. *In vitro* ispitivanje

Aktivnost kandidata iz *Tabele 13* na lajšmanije smo testirali *in vitro*. Zbog nemogućnosti izolovanja i prečišćavanja arginaze, odabrani kandidati su *in vitro* testirani merenjem inhibicije rasta *L. donovani* (ćelijskih linija LV9) u formi amastigota. Rezultate inhibitorne aktivnosti smo prikazali u *Tabeli 14*. Citotoksičnost za ćelije makrofaga je prikazana u  $CC_{50}$ .

**Tabela 14:** Mikrobicidna aktivnost na lajšmanije i citotoksičnost kandidata testirana *in vitro*.

Redni broj kandidata	IC <sub>50</sub> ± SD (μM) amastigota	IC <sub>50</sub> ± SD (μM) inf. makrofagi	RAW 264,7 CC50 ± SD (μM)	SI = CC <sub>50</sub> / IC <sub>50</sub> inf. makrofagi
2	1,09 ± 0,12	2,18 ± 0,12	4,87 ± 0,39	2,2
3	>100	>100	>100	-
4	12,50 ± 0,62	11,22 ± 0,62	16,34 ± 1,42	1,4
5	61,52 ± 5,99	55,22 ± 4,77	>100	>1,8
1	11,89 ± 1,87	6,25 ± 1,89	13,87 ± 2,11	2,2
8	59,86 ± 6,45	51,26 ± 4,35	>100	>1,9
7	51,21 ± 4,98	47,24 ± 3,21	-	>2,1
12	>100	>100	>100	-
AmB	0,20 ± 0,08	0,11 ± 0,09	5,36 ± 0,52	48,7

Inf. makrofag – makrofagi inficirani lajšmanijom u formi amastigota

Kako je prikazano u *Tabeli 14*, 6 od 8 kandidata ima značajnu *in vitro* aktivnost. Većina kandidata pokazuje toksičnost na makrofag. Najpotentniji inhibitori pokazuju blagu toksičnost sa vrednostima za CC<sub>50</sub> u intervalu 4-16 μM. Za tri kandidata pokazalo se da je indeks selektivnosti > 2.

Od kandidata, **2** ima najbolju vrednost IC<sub>50</sub>. U *Tabeli 14* je prikazan spektar aktivnosti sa vrednostima za IC<sub>50</sub> u intervalima 1-2 i 55-61 μM. Kvalitet kandidata se procenjuje na osnovu indeksa selektivnosti (SI, CC<sub>50</sub> za makrofag/IC<sub>50</sub>) za amastigote koji treba biti ≥ 2 i IC<sub>50</sub> na amastigote unutar makrofaga < 5 μM. Rezultat *in vitro* testiranja pokazuje da je selektivnost kandidata **2** manja 25 puta od referentne vrednosti za AmB.

Analizom odnosa strukture i aktivnosti, zamena tiofena (kandidata **4**) piridinskim prstenom (kandidat **5**) je vezana za gubitak aktivnosti do pet puta, a takođe i drastično smanjenje citotoksičnosti. Najaktivniji kandidat **2**, kao i ostali kandidati pokazuje blagu toksičnost. U strukturi kandidata **2** postoje dva tiofena. Zamenom jednog tiofena (kand. **2**) za furan (kand. **3**) dovodi do potpunog gubitka aktivnosti i citotoksičnosti. Zamena bromotiofena (kand. **2**) za benzotiazol (kand. **4**) je pokazala petostruko smanjenje aktivnosti na lajšmanije i četverostruku redukciju vrednosti za citotoksičnost. Zamenom bromotiofena (kand. **3**) metilbenzotiazolom (kand. **1**) povećava i aktivnost i citotoksičnost. U ovom trenutku može se doneti zaključak da su ove veličine u korelaciji za sve izmene zasnovane na strukturi funkcionalnih motiva.

Po fenotipno zasnovanom skriningu za kandidata **2** je izračunata vrednost IC<sub>50</sub> od 2,18 μM, skoro 20 puta veća od referentne vrednosti za AmB. Aktivnost kandidata je 7 puta manja od aktivnosti leka miltefozin (0,31 μM) [22]. Mehanizam dejstva hemijske serije derivata okdidiazola i indolizina nas podstiče na primenu farmakomodulacije sa ciljem smanjenja citotoksičnosti, a povećanju mikrobicidne aktivnosti kandidata na lajšmanije.

#### 4.2.5. Karakterizacija kandidata

Za 8 najboljih kandidata je izvršeno anti-targetiranje. Na osnovu matrice prikazanoj na *Slici 15*, prikazan je trend u slaganju receptor-ligand interakcija svih kandidata sa svakim od ciljnih mesta. Nijedan kandidat nije prešao graničnu vrednost za CYP 2A6, 2C9 i 3A4. Nešto više potencijalnih interakcija označeno je za PXR i SULT za kandidate **3**, **5** i **12**.

	PXR	SULT	CYP 2a6	CYP 2c9	CYP 3a4	Total
<b>2</b>						0
<b>3</b>						1
<b>4</b>						0
<b>5</b>						1
<b>1</b>						0
<b>8</b>						0
<b>7</b>						0
<b>12</b>						0.5

**Slika 15.** Interakciona matrica između kandidata i ciljnih meta. Vrednosti polja su: 1.0 (crno), 0.5 (sivo) i 0.0 (belo). Pun naziv enzima iz naziva kolona: PXR – pregnan-X-receptor; SULT – sulfotransferaza; CYP 2a6 – citohrom P450 2a6; CYP 2c9 – citohrom P450 CYP 3a4; Total – PXR + SULT + CYP 2a6 + CYP 2c9 + CYP 3a4

Na osnovu kolone ukupne vrednosti (Total), izdvajamo kandidate sa 1.0, tj. kandidate **3** i **5**. Svi kandidati daju negativan rezultat na PAINS, podležu pravilu 5 Lipinskog, a ADMET rizike smo prikazali u *Tabeli 15*. Prosečna vrednost ADMET rizika za ovu grupu iznosi 3,37 a to spada u 90% WDI. Na osnovu ovog rezultata, potencijal kandidata kao terapeutika je veći u odnosu na tip flavonoida, koji je opisan u potpoglavlju 3.1. Broj ADMET rizika je mali, pa bi optimizacija na osnovu QSPR modela bila izvodljiva.

**Tabela 15:** Izračunati rizici za kandidate iz serije oksadiazola i indolizina.

Kod	ADMET	APSORP	CYP	MUT	TOX
<b>2</b>	2	0	0	4	2
<b>3</b>	5	1	1	3	2
<b>4</b>	4	1	0	3	2
<b>5</b>	6	1	1	4	3
<b>1</b>	4	1	0	4	3
<b>8</b>	1	0	1	2	0
<b>7</b>	2	0	0	6	2
<b>12</b>	8	4	1	4	2

Kolona ADMET – ukupan broj rizika iz APSORP (aproscioni rizici) CYP (metabolički rizici) i TOX (rizici toksičnosti); MUT-rizici mutacija.

Numeričke vrednosti u poljima označavaju ukupan broj rizika po ADMET kategorijama. ADMET rizici se odnose na oznake Xm (kancerogeno po ćelije miša) i MUT, a javljaju se kod 90% jedinjenja kandidata. Kod kandidata **4** i **5** postoji naznaka za Xr (kancerogeno po ćelije pacova). Na osnovu izloženog postavlja se pretpostavka da bi ova jedinjenja dala pozitivan rezultat za mutaciju upotrebom Ejmsovog testa. Što se tiče apsorpcije, oznake Sw (rastvorljivost u vodi) i fu (nevezana frakcija u krvnoj plazmi) se javljaju za jedinjenja od **2** do **8**. Rastvorljivost jedinjenja je zbog toga potrebno dodano optimizovati. Oznake rizika za kandidate **7**, **8** i **12** su 1A2, HEPX i Size. Oznaka za potencijalnu inhibiciju 1A2 CYP enzima je diskutabilna s obzirom da nije u saglasnosti sa rezultatima anti-target matrice interakcija sa P450 enzimima, iako je za ovaj slučaj potrebna dorada protokola, usled nedostatka modela za 1A2 izozim u grupi anti-targeta. Sa druge strane, vrednosti interakcije se podudaraju za druge izozime dobijene anti-targetiranjem, *Slika 15*. Gledano na rizike metabolizma, Cl (sistemski *in vitro* klirens putem mikrozoma jetre CYP\_HLM\_CLint u vrednostima od 90 do 150 ili hepatocita HEP\_hCLint u vrednostima od 60 do 90, dobijeno na osnovu WDI modela) se javlja kod kandidata **2** i **4**.

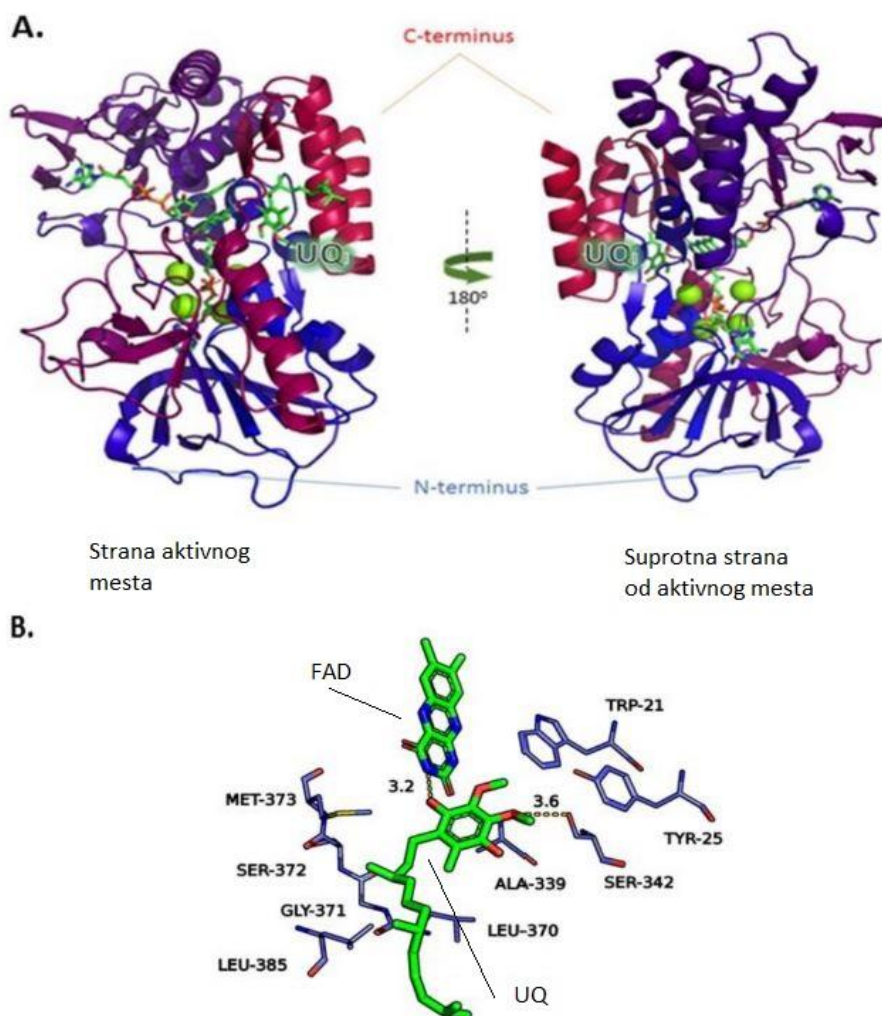
Za sva jedinjenja ove grupe postoji rizik od mutagenosti, kako je pokazano oznakama M100, m102 S535 i NIHS. Interesovalo nas je poreklo toksičnih rizika Xr, Xm koji se javljaju za sva jedinjenja. Izvršili smo analizu senzitiviteta strukture (SSA) upotrebom MedChem dizajnera u okviru ADMET Predictor-a. Za određena jedinjenja (**1**, **2**, **3** i **4**) smo dobili da se najučestalija oznaka za mutaciju odnosi na tiofen. Proveru za mutagenost smo dobili na osnovu NIHS modela. Dodatno, zamena ovog fragmenta za pirimidin ima uticaj na vrednost Sw, kako se pokazalo analizom parametara za jedinjenja **4** i **5**. Dakle, uklanjanje tiofena iz strukture, kako je predloženo u okviru ovog poglavlja, bi bio odgovarajuć korak za optimizaciju jedinjenja kandidata, koje bi potencijalno imalo uticaj i na poboljšanje ADMET osobina kandidata.

### 4.3. Mikrobicidna aktivnost 6-metoksi-hinaldina na lajšmanije

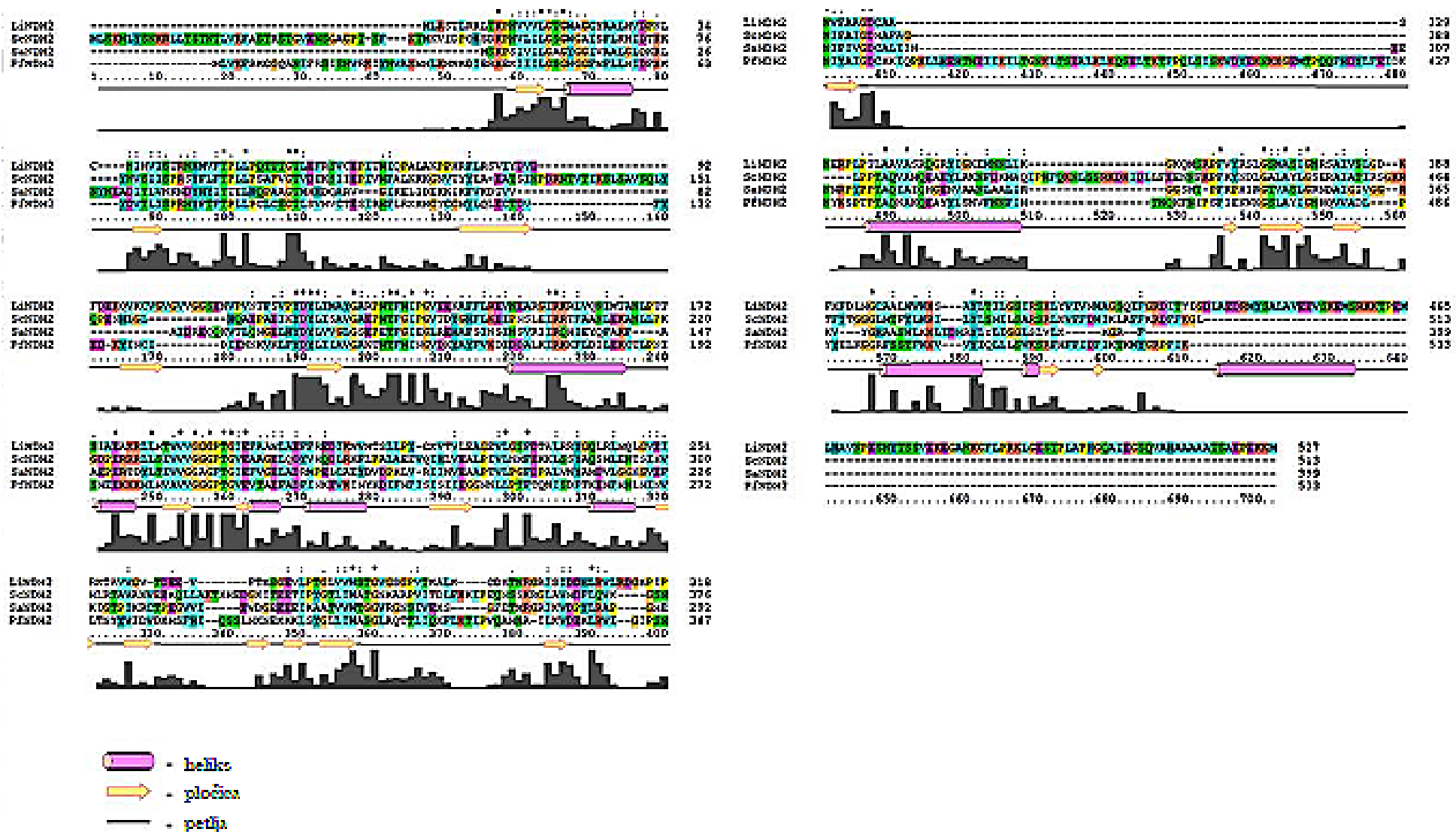
Jedan on načina pretrage jedinjenja, malih molekula koji bi pokazali efikasno i selektivno dejstvo na parazita je ono u kojem se najpre definiše ciljno mesto. Na taj način, daje se prednost razvoju inhibitora sa pretpostavljenim mehanizmom dejstva, a takvo ciljno mesto, budući da se eksprimira isključivo u parazitu, umanjuje rizik od pojave neželjenog dejstva u domaćinu. Enzim respiratornog lanca NDH-2 je esencijalan za proliferaciju patogena i specifičan za mikroorganizme, te je odabran kao ciljno mesto dejstva inhibitora rasta lajšmanije. U ovoj studiji cilj je bio identifikovati kandidate, radi testa aktivnosti na NDH-2. Početni broj kandidata za odabir je bio 550.000, a primenom modela zasnovanih na strukturi liganda i receptora kao filtera u okviru VS, odabrano je 23 kandidata. U prvom koraku jedinjenja su filtrirana na osnovu farmakofornog 3D modela. Taj model smo prethodno formirali pouputrebom strukture HDQ derivata, čija je inhibitorna aktivnost izmerena na *Pf*NDH-2. Na osnovu dostupnih strukturnih informacija formirali smo model za *L*NDH-2 upotrebom homolognog modelovanja. Po tom modelu, izvršili smo doking potencijalnih kandidata, uz optimizaciju uslova za dobijanje sve boljih rezultata. Potvrdu o aktivnosti i specifičnosti smo dobili na osnovu *in vitro* testiranja na ćelijskoj liniji *L. infantum*. Eksperimenti *in vitro* su sprovedeni na ćelijskim linijama parazita u formi amastigot i promastigot vrste *L. infantum*. Rezultat specifičnosti dobili smo iz *in vitro* testova na NDH-2 vrste *S. aureus* [149]. Jedan kandidat – supstituisani 6-Metoksi-kvinaldin, pokazao je aktivnost *in vitro* kao inhibitor rasta *L. infantum* [150].

#### 4.3.1. Model *L*NDH-2

Homologni model *L*NDH-2 sa dokovanom konformacijom ubikvinona u aktivnom mestu UQ-1 i koji je u kontaktu sa izoaloksazinom, je prikazan na *Slici 16*. Sličnost u sekvenci modela sa kristalnim strukturama mustri iznosi 33% *Sc*NDH-2 za i 27% za *Sa*NDH-2. Poravnanje sekvenci izozima NDH-2 koje su bile dostupne u toku izvođenja eksperimenata, pokazalo je da postoji homologija sa sličnošću koja je izvan *twilight zone*. Rezultati višestrukog poravnanja sekvenci su prikazani na *Slici 17*, a statistika modela *Tabelama 16. i 17.*



**Slika 16.** (A) Struktura homolognog modela *L*NDH-2 u dve orijentacije, prikazana od C-terminusa (crveno) do N-terminus (plavo); uz  $Mg^{2+}$  jone (zeleno), NADH, FAD i ubikvinon (boja po tipu atoma). (B) *L*NDH-2 vezivno mesto za ubikvinon UQ-1; Ubikvinon okružen bočnim ostacima u prečniku od 5 Å, uključujući flavin (FAD). Interakcije koje su označene crticama, odgovaraju elektrostatskoj interakciji UQ-FAD (3.2 Å) i vodoničnoj vezi UQ-SER342 (3.4 Å).



Slika 17. Poravnanje sekvenci *Lj*NDH-2, *Sa*NDH-2, *Pf*NDH-2 i *Sa*NDH. Uz poravnanje prikazani su domeni sa motivima sekundarne strukture, za heliks (lila, valjak), nabranu (narandžasto, strelica), petlja (sivo, linija). Prikaz neuređenosti je u vidu histograma (0-neuređeno do 100 % uređeno)



**Tabela 16:** Vrednosti dobijene poravnanjem sekvenci za model *L*NDH-2 i izozime NDH-2.

<i>L</i> NDH-2 *	Dužina poravnanja	Br. idenitčnih aminokiselina	% identičnosti	Br. sličnih aminokiselina	% sličnosti
<i>S</i> cNDH-2	625	128	20,48	97	36,00
<i>S</i> aNDH-2	542	117	21,59	76	35,61
<i>P</i> NDH-2	642	118	18,38	92	32,71

\* model *L*NDH-2 kao prvi član para.

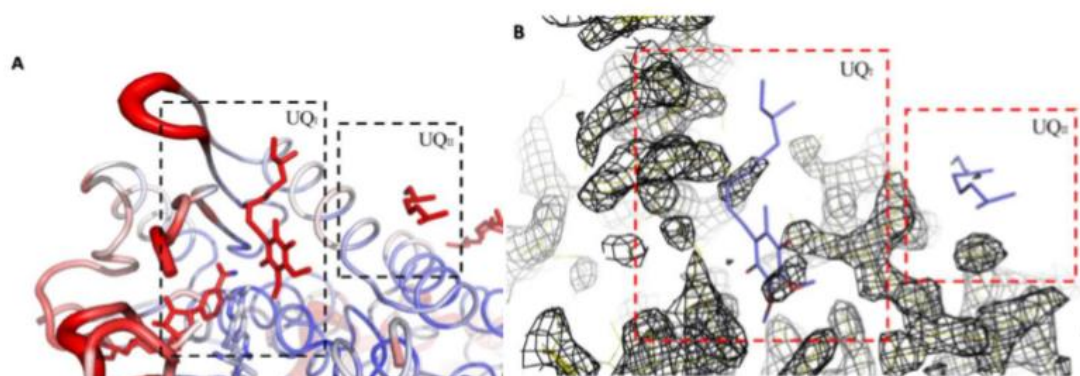
**Tabela 17:** Statistika superpozicije parova sekvenci *L*NDH-2, *S*cNDH-2 (4g73) i *S*aNDH-2 (4xdb).

RMSD	sa 4g73	% poravnanja	sa 4xdb	% poravnanja
Svi atomi	0,277 Å	74	2,822 Å	85
C $\alpha$ -niz	0,923 Å	91	1,331 Å	58

Domen u intervalu od 50 do 70 je konzerviran u izozimima i obuhvata vezivno mesto za supstrate i kofaktor. Motiv GxGxxG je pronađen u svim sekvencama. Ujedno, konzervirani domen pronalazimo u intervalu od 175 do 195 aminokislina. Ovaj domen sadrži beta nabrane strukturne motive, koji su odgovorni za interakciju sa FAD. Svi parovi sekvenci zadovoljavaju uslov od 15% identičnosti, radi primene u dokingu. Izračunali smo da je vezivno mesto *L*NDH-2, UQ-1 u proseku 66,33 % slično sa UQ-1 struktura mustri. Vezivno mesto UQ-2 nismo koristili za doking u toku ove studije.

Razlika u vezivnom mestu na osnovu primarne sekvence i poravnanja koje se odnosi na *L*NDH-2 i *S*aNDH-2 je nedostatak AQxAxQ motiva. Smatra se da dva glutaminska bočna ostatka iz ovog motiva imaju ulogu u vezivanju hinona, kao što je već diskutovano u opštem delu [150]. Sa druge strane, bočni ostaci SER342 i TYR25 su jedinstveni za UQ-1 u *L*NDH-2. Dodatno, strukturnom analizom topologije homolognog modela *L*NDH-2 pronađen je nešto veći procenat hidrofobnih aminokiselina u odnosu na ostale vrste NDH-2, što može biti povod za razmišljanje o razlikama mikro-okruženja za grupu NDH-2 izozima. Na taj način postiže se i specifičnost u prepoznavanju sa malim molekulima. Dva domena ARG368-MET373 i VAL383-LEU385 daju aktivnom mestu *L*NDH-2 hidrofobne osobine, *Slika 18*.



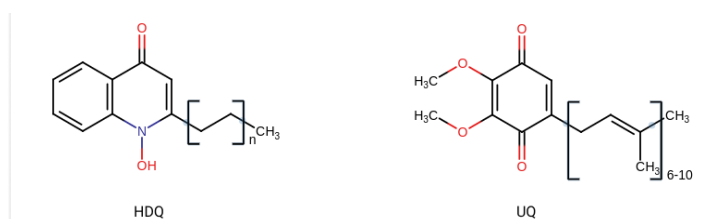


**Slika 19.** (A) Struktura *S. cerevisiae* NDH-2 na osnovu B-faktora sa vezivnim mestima UQ-1 i UQ-2. U vezivnom mestu nalaze se UQ, FAD i NADH u formi trojnog kompleksa. Shema za kvantifikaciju pouzdanosti položaja atoma: od viših vrednosti (belo) ka nižim vrednostima (crveno). Obrada slike izvršena je u pymol-u. (B) Prikaz CCP4 mape (elektronske gustine) na osnovu *fofi* formata za *S. cerevisiae* NDH-2.

Inicijalne simulacije potvrđuju da se mehanizam elektronskog transfera može obavljati na više načina. Joni i enzimi u susedstvu (alternativna oksidaza) mogu uticati na mobilnost određenih NDH-2 domena (petlji prvenstveno na C-terminusu) – što predstavlja osnov za dalje izučavanje mehanizma *L. thermophilus* NDH-2.

#### 4.3.2. Primena farmakofornog modela

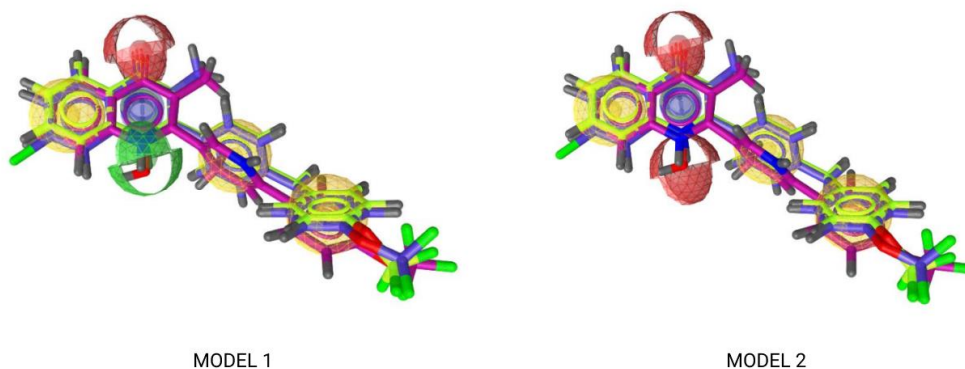
Za potrebe skrininga arhive od 500.000 jedinjenja u multifunkcionalnom formatu sa većim brojem konformacija, 3D farmakoforni model se pokazao efektivnim [152]. Kriterijum za odabir skupa jedinjenja za trening farmakofornog modela je bio (1) sličnost po strukturalnoj osnovi ubikvinona i (2) aktivnost jedinjenja ka tipu NDH-2 enzima. Jedinjenja koja smo pronašli da zadovoljavaju kriterijum su derivati HDQ nanomolarne inhibitorne aktivnosti na NDH-2, *Slika 20*.



**Slika 20.** Prikaz struktura HDQ i ubikvinona (UQ)

Od 10 modela koji su dobijeni na osnovu trening skupa i koji su rankirani na osnovu *pharmacophore-fit* i *atom-shape-overlap* vrednosti, odabrali smo dva sa najboljim rankom. Kriterijum za odabir je bila mogućnost pretrage šireg hemijskog prostora. Optimizovani 3D farmakoforni model 1 se sastoji od 3 hidrofobna elementa, 1 donora vodonične veze, 1 akceptora vodonične veze i aromatičnog prstena. Model 2 čine 3 hidrofobna elementa, 2 akceptora vodonične veze i element aromatičnog prstena, *Slika 21*. Modeli 1 i 2 se razlikuju po jednom farmakofornom elementu čije se pozicije geometrijski podudaraju. Tako smo postigli kombinovan model za skrining jedinjenja koja mogu na istoj poziciji ispoljiti i donorske i akceptorske osobine vodonične veze. Na taj način, postavili smo kriterijum klasifikacije hemijskog prostora u 3 kategorije – jedinjenja koja su odabrana modelom 1, modelom 2 ili kombinovanim modelom. U toku evaluacije modela, dobili smo da je prvi krug u selekciji kandidata tri puta rigidniji, tj selektivniji

odnosu na model 2 pri upotrebi kao inicijalnog modela za VS protokol. Zbog toga smo u okviru VS protokola, najpre koristili model 1, a potom model 2. Odbacili bismo sva jedinjenja koja ne zadovoljavaju kriterijum slaganja sa oba modela. Nakon pretrage, dobili smo 4.423 kandidata različitog hemijskog tipa. Za pretragu KI arhive bilo je potrebno 17 h.



**Slika 21.** Farmakoforni modeli 1 i 2 superponirani sa HDQ derivatima. Prikazani farmakoforni elementi su hidrofobna proba (žuto), H-donor (zeleno), H-akceptor (crveno) i aromatična proba (plavo)

#### 4.3.3. Doking u strukturni model *L*NDH-2

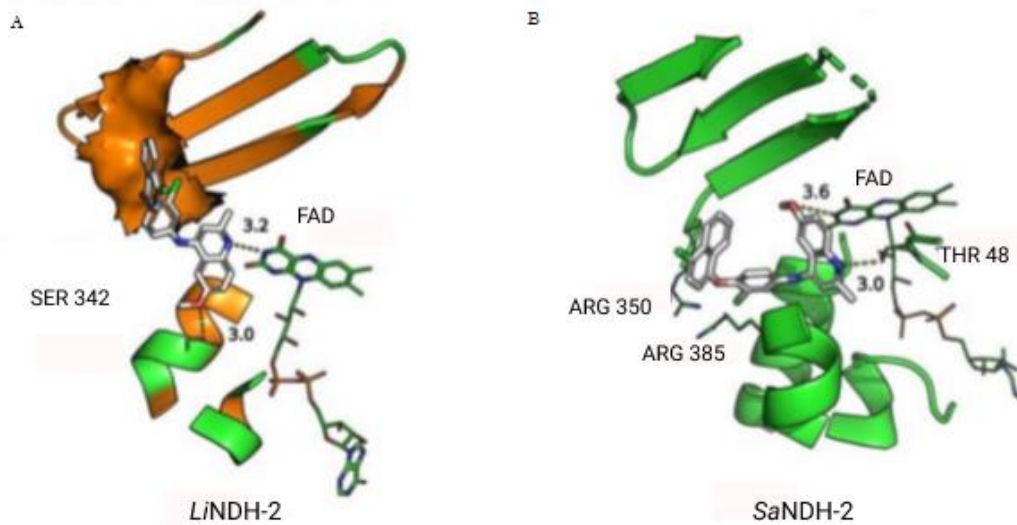
Posle skrininga uz pomoć farmakofornih modela, izvršili smo skrining dokingom jedinjenja u model *L*NDH-2. Najveći broj kandidata ima GoldScore u intervalu od 60 do 90 što smo uzeli za optimalni interval u odnosu na rezultate ponovnog dokinga i dokinga UQ i HDQ derivata. Serija dokinga i ponovnog dokinga za UQ i aktivna jedinjenja, služila nam je za optimizaciju procedure u smislu uvođenja ograničenja i dodatnih parametara za postizanje ispravnosti receptor-ligand interakcije.

Centar aromatičnog prstena ubikvinona je uzet za referentnu tačku računa RMSD kokristalisanog UQ (*S*NDH-2), za poređenje rezultata dokovanja UQ u odabrane strukturne modele (*S*NDH-2 i *L*NDH-2). Srednja vrednost RMSD iznosi 1,740 Å, a prosečna vrednost GoldScore-a je 82,8. Srednja vrednost za RMSD na osnovu *Tabele 18*, ukazuju na razlike u konformacionom prostoru UQ-1 *L*NDH-2 i *S*NDH-2.

**Tabela 18:** Doking poza UQ u *L*NDH-2 u odnosu na pozu liganda u *S*NDH-2.

Doking poza	1	2	3	4
RMSD od nativne konformacije (Å)	1,9159	1,950	1,245	1,754

Od 54 kandidata za koje su pronađene receptor-ligand interakcije u tom značajnom intervalu vrednosti, reprezentativan doking za kandidata **15** je prikazan na *Slici 22*.



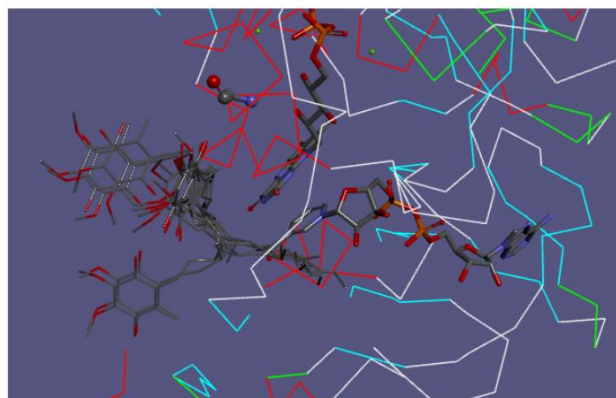
**Slika 22.** Doking poza kandidata **15**, derivata 6-metoksi-hinaldina u modelu (A) *Lj*NDH-2 i (B) *Sa*NDH-2. Hidrofobni džep je prikazan konturom koju čini  $\beta$ -nabrani domen (narandžasto)

Kandidat **15** formira vodonične veze sa izoaloksazinskim prstenom (FAD) i SER324, koje se slažu sa UQ referentom pozom. Dodatno, grupa hlornaftalen-1-il-oksifenil je pozicionirana u okviru hidrofobnog domena, koji obuhvata sekevence ALA397-LEU407 i GLY371-LEU385 (*Slika 17*,  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -pločice obojene narandžasto). Vrednost GoldScore za kandidata **15** iznosi 79,25 što je merljivo srednjoj vrednosti GoldScore za ubikvinon od 82,00 (srednja vrednost GoldScore dobijena proračunom za više doking poza koje se prvenstveno razlikuju po konformaciji hidrofobnog alkilnog niza). Analizom doking poze kandidata **15**, zaključujemo da postoji interakcija sa amidom izoaloksazinskog prstena (FAD) formiranjem vodonične veze, specifična interakcija koju pronalazimo između receptora i endogenog liganda, UQ. Dodatno, identifikovali smo interakciju sa bočnim ostatkom THR48 u slučaju dokinga u strukturi model *Sa*NDH-2, *Slika 22* (B).

Potom je uz pomoć ponovnog dokinga uočeno da hidroksilna grupa sa bočnog ostatka SER342 učestvuje u interakciji formiranjem vodonične veze ili OH- $\pi$  elektrostatičkog privlačenja. Za 54 kandidata smo pronašli da interaguju sa TYR25 i zanimalo nas je da li ovaj bočni ostatak igra važnu ulogu u specifičnoj interakciji sa *Lj*NDH-2. Pokazali smo da, pošto je TYR25 u blizini SER324, postoji mogućnost da služi dodatnom prepoznavanju liganda i da ima pozitivan doprinos na stabilnost receptor-ligand kompleksa. Razlika u doking pozi i energiji vezivanja je značajna ( $p < 0,05$ ), kako je dobijeno na osnovu serije doking testiranja sa UQ-1 modela *Lj*NDH-2 primenom tačkastih mutacija u UQ-1. Na *Slici 23* su prikazane vrednosti GoldScore, i nekoliko doking poza dobijenih primenom GOLD fitness funkcije. H1 označava rezultate dokinga UQ u mutirano aktivnom mestu *Lj*NDH-2, UQ-1; Ho označava rezultate dokinga bez mutacije bočnih ostataka. Pored vidljivih nedostataka u koncenzusu doking poze, značajnost razlike u GoldScore vrednostima smo proverili primenom t-testa i dobili razliku srednjih vrednosti reda veličina 2 puta (T: 2,2148; p-vrednost: 0,044;  $\alpha$ -vrednost: 0,05).

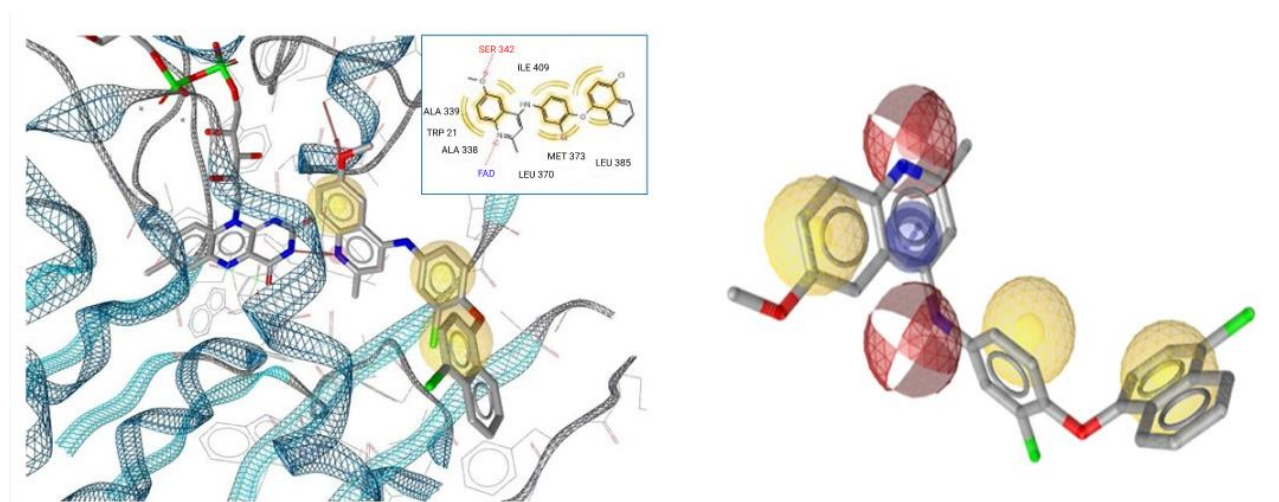


<u>Ho (Ser342,Tyr25)</u>	<u>H1</u>
64.1708	66.303
61.1928	65.8198
66.7914	63.7807
66.8341	63.2555
65.5948	62.5137
65.4237	60.5077
65.7175	59.7846
65.6428	58.5946
...	...



**Slika 23.** Doking kandidata u mutirano UQ-1 vezivno mesto (mutacija TYR25 i SER342 sa ALA).

Većina doking konformacija se podudara sa farmakofornim modelom, kako je prikazano na *Slici 24* za kandidata **15**. Na osnovu toga zaključujemo da konformacija jedinjenja, dobijena na osnovu modela zasnovanog na strukturi liganda, liči na aktivnu konformaciju jedinjenja. Pokazalo se da je potrebno uračunati sistem dimerne strukture da bi se saigurnošću pronašla aktivna konformacija [153]



**Slika 24.** Farmakoforni modeli generisani na osnovu doking poze za kandidata **15** (levo) i superpozicija kandidata sa farmakofornim modelom 2.

Odabir kandidata *in silico*, izveli smo na osnovu vrednosti farmakofornog slaganja, doking energije vezivanja i geometrijskog koncenzusa, *Tabela 19*. GoldScore je kombinovana vrednost udela energije za receptor-ligand interakcije: energiju vodonične veze, energiju Van der Waals (VdW) interakcije i to eksterne VdW i interne VdW (one koje doprinose energiji liganda) i energiju torzionog napona za konformaciju liganda. Prvi red se odnosi na vrednosti za UQ, uzete kao reference. Nakon uklanjanja reaktivnih interferirajućih agensa (PAINS), dobili smo 23 kandidata. Vrednosti za kandidate su prikazane u *Tabeli 19*. Strukture kandidata su prikazane u prilogu (Prilog 3).

**Tabela 19:** Rezultat VS protokola za kandidate od 1 do 23.

Redni broj	PharmFit	MGOLD	#	PharmFit	MGOLD
0	50	82,2020	12	46,83	67,7245
1	48,20	77,0948	13	46,33	71,5431
2	47,40	70,1445	14	50,63	71,7209
3	46,62	68,6828	15	47,45	78,1460
4	49,46	66,2059	16	47,72	74,7354
5	47,02	68,0114	17	49,78	74,0712
6	48,01	70,5697	18	49,80	69,5730
7	47,28	68,8073	19	49,45	72,3705
8	46,25	70,3457	20	46,10	68,6448
9	49,57	66,1346	21	46,04	63,6864
10	47,41	82,3300	22	46,53	61,6798
11	46,43	68,1445	23	47,52	67,3533

PharmFit – *pharmacophore fit i atom-shape overlap*; MGOLD – srednja vrednost GoldScore za tri najbolje konformacije dobijene dokingom.

#### 4.3.4. In vitro ispitivanje

Mikrobicidna aktivnost predloženih kandidata je inicijalno testirana na strukturno sličnoj rekombinantnoj *Sa*NDH-2, jer izolovana *Li*NDH-2 nije bila dostupna u tom trenutku. Većina kandidata je pokazala zanemarljivu inhibitornu aktivnost na rast *S. aureus*, Tabela 20. Razlog tome pronalazimo u kompleksnoj prirodni receptor-ligand interakcije i u nedostatku podataka, poznatih ograničenja modela za skrining i diverziteta među izozimima.

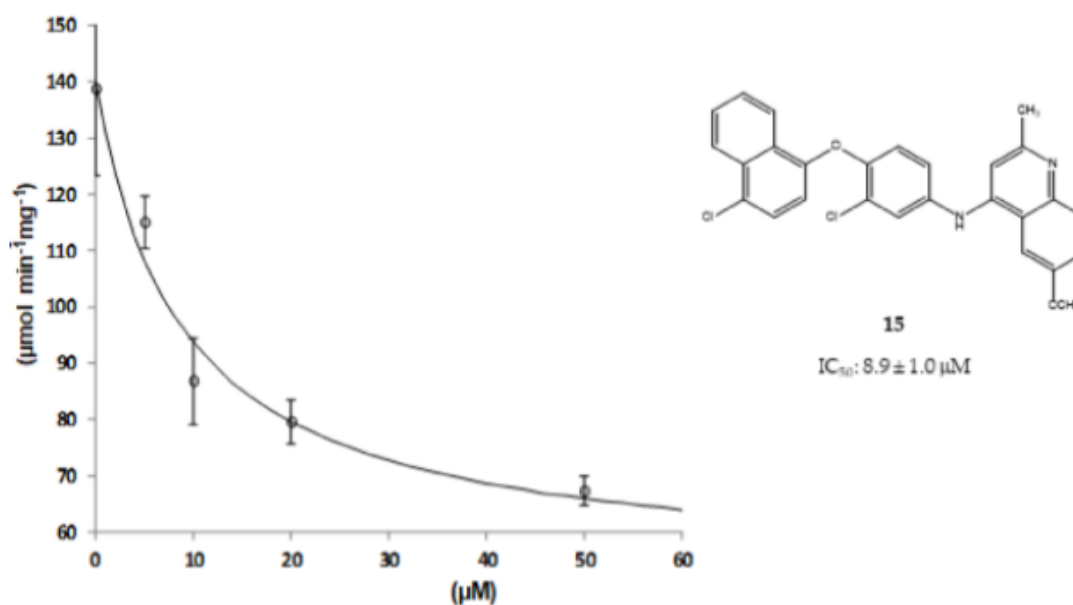
**Tabela 20:** Rezultati testa inhibitorne aktivnosti za 23 kandidata dobijenih virtuelnim skriningom za *Li*NDH-2, prikazani kao relativna aktivnost (RA %) na *Sa*NDH-2. RA je izmerena za 20  $\mu$ M kandidata u odnosu na 100% referentnu vrednost u odsustvu inhibitora.

Redni broj	RA	Redni broj	RA	Redni broj	RA	Redni broj	RA
1	93	7	86	13	86	19	92
2	75	8	99	14	93	20	84
3	71	9	80	15	49	21	94
4	74	10	92	16	87	22	86

Redni broj	RA	Redni broj	RA	Redni broj	RA	Redni broj	RA
5	86	11	83	17	91	23	88
6	89	12	95	18	86		

Kraj Tabele 20

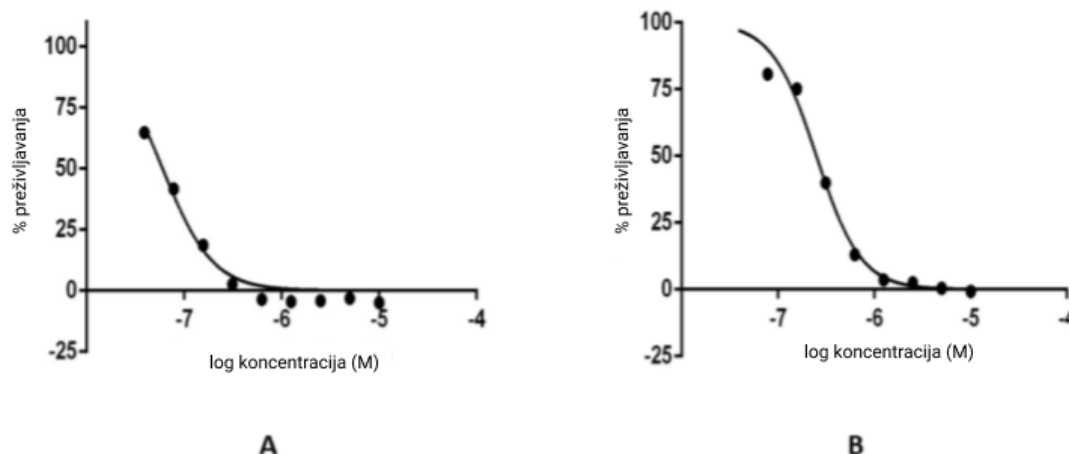
Testiranje aktivnosti kandidata **15** (supstituisani 6-metoksi-hinaldin) je pokazalo značajne rezultate na inicijalnom testiranju sa *Sa*NDH-2. Relativna aktivnost ovog jedinjenja iznosi 49% pri 20  $\mu$ M koncentraciji. Izračunali smo  $K_i^{app}$  analizom kinetike stabilnog stanja i dobili vrednost od  $8,9 \pm 1,0 \mu$ M. Kandidat **15** je prihvaćen kao potencijalni inhibitor u mikromolarnom intervalu aktivnosti, *Slika 25*.



**Slika 25.** Analiza stabilnog stanja aktivnosti *Sa*NDH-2 u prisustvu kandidata **15**. Grafik predstavlja odnos aktivnosti od koncentracije jedinjenja.

Zbog prirode dobijenih rezultata, interesovalo nas je koliko kandidat **15** može uticati na rast vrste *L. infantum*. Iz grupe kandidata su odabrani **11** i **20** koji su služili kao negativne probe u daljem testiranju. Potom smo izmerili potencijal mikrobicidne aktivnosti na lajšmanije na prirodne vrste *L. infantum* u formi amastigot i promastigot. Ujedno, cilj ovog eksperimenta je bio da se proverí mikrobicidna aktivnost na lajšmanije u odnosu na određivanja *in vitro* aktivnosti iz prethodnih postupaka. Na *Slici 26*, prikazan je grafik sa tipičnim mikrobicidnim efekatom na lajšmanije za kandidata **15**. Vrednosti  $IC_{50}$  su za formu promastigota u intervalu 0,03-0,05  $\mu$ M, a za formu amastigot u intervalu 0,2-0,3  $\mu$ M što smo dobili merenjem inhibitorne aktivnosti na vrsti *L. infantum*, *Tabela 21*.





**Slika 26.** Zavisnost mikrobicidnog efekta na lajšmanije od koncentracije kandidata 15 za (A) promastigote i (B) amastigote divljeg tipa vrste *L. infantum*

Kandidat **15** kao rezultat studije, predstavlja polazno jedinjenje za dalji razvoj ciljanih inhibitora rasta lajšmanija. Važan eksperiment za dalji razvoj inhibitora je merenje citotoksičnosti kandidata **15** kod sisara. Za kandidata **15**, prethodno je pronađena mikrobicidna aktivnost na *P. falciparum* i druge mikroorganizme. Mikrobicidna aktivnost na lajšmanije je izmeren na mutantima vrste *L. mexicana* (koja je u deficitu transportera glukoze) [154-6]. To je potvrda da je ovo jedinjenje model za dalji razvoj inhibitora rasta *Leishmania* spp. Kao dodatak i smernice za razvoj inhibitora, odgovarao bi prikaz ADMET profila kandidata **15**.

**Tabela 21:** Rezultati merenja inhibicije rasta prirodne vrste *L. infantum* u prisustvu kandidata **11**, **15** i **20**. Naveden je interval  $IC_{50}$  vrednosti izveden iz tri nezavisna merenja.

Kandidat	Divlja vrsta <i>L. infantum</i>	
	Promastigote	Amastigote
11	5-10	>20
15	0,03-0,05	0,2-0,3
20	5-10	>20

#### 4.3.5. Karakterizacija kandidata

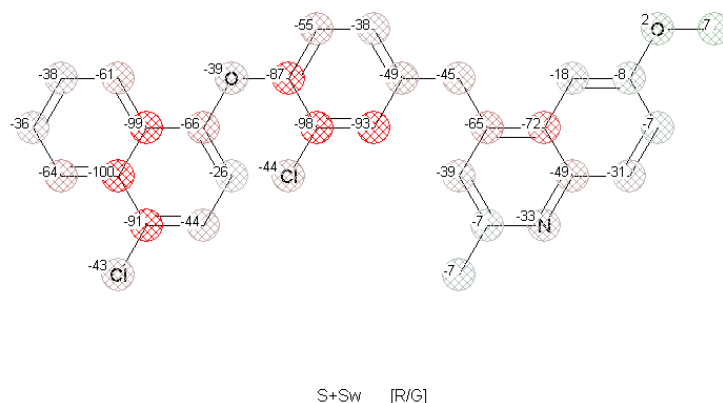
##### 1.1.2. Vrednost ADMET rizika za kandida Karakterizacija kandidata

Vrednost ADMET rizika za kandida **15** iznosi 9,22 (10% WDI) što ukazuje da kandidat **15** nema osobine leka. Osobine kandidata **15** su prikazana u *Tabeli 22*.

**Tabela 22:** Kategorije rizika za kandidata.

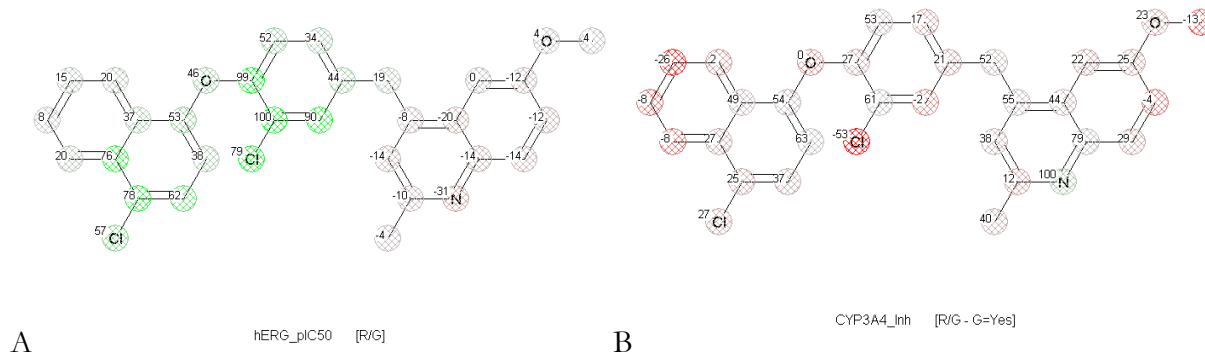
Kandidat	ADMET	APSORP	CYP	MUT	TOX
15	12	3	3	2	5

Parametri koji se odnose na ADMET rizik su  $K_{ow}$ ,  $S_w$ ,  $f_u$ ; hERG; rat;  $X_r$ ;  $X_m$ ; HEPX; Rizici smanjene apsorpcije su u vezi sa slabom rastvorljivošću ovog jedinjenja, koja bi takođe uticala na bioraspoloživost. Primenom modela za solubilnost ( $S+S_w$ ), dobili smo mapu zavisnosti strukture od osobina za kandidata **15**, *Slika 27*.



**Slika 27.** Supstituisani 6-Metoksi-hinaldin (kandidat **15**) mapiran po S+Sw modelu.

Na osnovu modela, kandidat **15** može pokazati toksičnost ka funkciji humanih jonskih kanala kalijuma kao i ispoljiti toksičnost prema hepatocitama. Oznaka fu odnosi se na distribucione osobine kandidata i zbog toga postoji rizik od pojave frakcije nevezane za albumin. Kandidat je potencijalni inhibitor eter-a-go-go gena (hERG). Takođe, tu su i izračunati rizici od kancerogenih i toksičnih efekata. Za rizik mutagenosti pretpostavlja se pozitivan Ejmsov test, što je izračunato primenom modela m\_97 i m100. Od CYP oznaka, pronalazimo interakcije sa 1A2; 3A4 pri čemu je kandidat 15 procenjen kao inhibitor CYP 3A4 izozima.



**Slika 28.** Prikaz supstituisanog 6-Metoksi-hinaldina, kandidata **15**, sa označenim osetljivim položajima funkcionalnih grupa, na osnovu QSPR modela hERG inhibitora (A) i CYP3A4 dostupnih (B) u ADMET Predictor SSA (engl., *Structure Sensitivity Analysis*) modulu.

Na osnovu analize senzitivnih delova strukture iznosimo sledeća opažanja: (1) na potencijal hERG inhibicije zavisi od fleksibilnosti strukture i prisustvu halogena, pozicije najznačajnijeg predviđenog doprinosa su označene zelenim na *Slici 28 A*. (2) Riziku interakcije sa 3A4 i visokom klirensu (Cl) doprinosi atom hlora: sa vrednošću od -53, što je prikazano na *Slici 28 B*. (3) Činjenica da su deskriptori za različite rizike vezani za isti deo strukture, daje mogućnost da se manjim strukturnim modifikacijama poboljšaju osobine jedinjenja.

## 5. Zaključak

Prvi rezultat ovog rada su dva protokola virtualnog skrining-a, sastavljenih od modela zasnovanih na strukturi liganda (pri čemu su korišćeni sledeći modeli: AQVN/EIIP, 3D-QSAR, farmakoforni model) i strukturi receptora (pri čemu su korišćeni modeli: homologni model enzima arginaze i enzima alternativne NADH dehidrogenaze). Razvoj protokola za virtuelni skrining imao je za cilj primenu za dobijanje kandidata počevši od velikog broja jedinjenja. Protokoli virtuelnog skrininga su se pokazali pouzdani i efikasni. Prednost razvijenih protokola se ogleda u ciljanom pretraživanju jedinjenja sa potencijalnom inhibitornom aktivnošću, čiji je mehanizam vezan za inhibiciju enzima. Odabir enzima, ciljnih mesta za razvoj inhibitora, je racionalizovan njihovom esencijalnom ulogom za rast i preživljavanje *Leishmania* spp.

Drugi rezultat, dobijen primenom VS protokola, je identifikacija 19 potencijalnih kandidata, hemijske klase flavonoida, oksadiazola, indolizina, aldoksima, N-acilhidrazona i hinaldina. Za neka od dobijenih jedinjenja opisani su postupci sinteze, *in vitro* metode za ispitivanje inhibitorne aktivnosti na rast *Leishmania* spp. i eksperimenti za ispitivanje specifičnosti dejstva.

Iz grupe flavonoida izdvaja se (-)-Epikatehin galat (CAS1257-08-5) koji se pokazao kao potencijalni inhibitor rasta vrste *L. amazonensis*. Kao prirodni proizvod, za ovo jedinjenje se očekuje da pokaže manje toksično dejstvo na ćelije domaćina i zbog toga ima potencijal za razvoj selektivnog terapeutika. Mehanizam dejstva, koji je u vezi sa inhibicijom arginaze, predstavlja osnov za razvoj specifičnog inhibitora. Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da je sistematizovana pretraga efikasna i reproducibilna. Primenom VS protokola opisanih u ovom radu, dobijaju se pouzdani kandidata za *in vitro* ispitivanje inhibitorne aktivnosti.

Iz grupe N-acilhidrazona izdvaja se N<sup>3</sup>-[(5-bromo-2-tiofenil)methilen]tiofen-2-karbohidrazid sa najboljim odnosom inhibitornog potencijalna i citotoksičnosti kako se pokazalo *in vitro* testiranjem (SI 2,2). Ovo jedinjenje predstavlja zanimljivu početnu strukturu za razvoj ciljanog inhibitora arginaze lajšmanija.

Iz grupe kandidata dobijenih na osnovu derivata hinolona, izdvaja se derivat 6-metoksi-hinaldina (N-[3-hloro-4-(4-hloronaftalen-1-il)oksifenil]-6-metoksi-hinaldin-4-amin) i kako je ranije utvrđeno, ova struktura ima potencijalno širok spektar mikrobicidnog dejstva. U ovom radu smo izračunali ADMET rizike za upotrebu u optimizaciji strukture jedinjenja, sa ciljem povećanja selektivnosti. Ono što bi karakterisalo terapeutike, reznvijene na osnovu strukturne hinolona je ustanovljen mehanizam dejstva kao inhibitora alternativne NADH dehidrogenaze.

Uz sve navedeno, opšti rezultat ove doktorske disertacije se ogleda u ispunjenju svih postavljenih zadataka sa ciljem *in silico* selekcije i *in vitro* ispitivanja inhibitora rasta *Leishmania* spp.

## 6. Literatura

- [1] Centar za kontrolu trovanja i prevenciju: „Parasites: Leishmaniasis”. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis> (podaci preuzeti u februaru 2016.).
- [2] Gradoni, L. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: Operational and research challenges. *Euro Surveill.* **2013**, 18, 20539.
- [3] WHO. Leishmaniasis: Fact Sheet N ° 375. 2014. Dostupna na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (podaci preuzeti u februaru 2016.).
- [4] Machado-Silva, A.; Guimarães, P.P.; Tavares, C.A.; Sinisterra, R.D. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: A patent landscape. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, 25, 247–260.
- [5] Rajasekaran, R.; Chen, Y.P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discov. Today* **2015**, 20, 958–968.
- [6] De Menezes, J.; Guedes, C.; Petersen, A.; Fraga, D.; Veras, P. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 2015, 815023.
- [7] Showler, A.J.; Boggild, A.K.; Protozoan Diseases: Leishmaniasis, Editor(i): Quah, S. R. International Encyclopedia of Public Health (2. izdanje). *Academic Press* **2017**, 97-102, ISBN 9780128037089.
- [8] Sunter, J.; Gull, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.* **2017** 7(9), 170165.
- [9] Ortega-Barria, E.; Romero, L.I; Leishmania Species (Leishmaniasis), Editor(i): Long, S. S. Principles and Practice of Pediatric Infectious Disease (3. izdanje), *W.B. Saunders*, **2008**, 1246-1253,
- [10] Allen, L.A.H. Microbicidal Mechanisms. Editor(i): Bradshaw, R. A.; Stahl P. D. Encyclopedia of Cell Biology. *Academic Press* **2016**, 766-775.
- [11] De, Menezes; J.P.; Saraiva; E.M.; da Rocha-Azevedo, B. The site of the bite:Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites Vectors* **2016**, 9,264.
- [12] Terrazas, C.; Oghumu, S.; Jha, B. K.; Natarajan, G.; Drew M.; Denkers, E.Y.; Satoskar, A. R.; McGwire, B. S. Subverting Immunity from the Inside: Strategies of Intracellular Survival Protozoans, Editor(i): Ratcliffe M.J.H. Encyclopedia of Immunobiology. *Academic Press* **2016**, 83-93.
- [13] Rafeh O. et al. Infection of Human Neutrophils With Leishmania infantum or Leishmania major Strains Triggers Activation and Differential Cytokines Release. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2019**, 9, 153.
- [14] Liu, D., & Uzonna, J. (2012). The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>
- [15] Panaro, M.A.; Brandonisio O, Sisto M, Acquafredda A, Leogrande D, Fumarola L, Mitolo V. Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. *Clin Exp Med.* **2001** 1(3), 137-43.
- [16] Lemaire, J.; Mkannez, G.; Guerfali F.Z.; Gustin C, Attia H, Sghaier RM; Sysco-Consortium, Dellagi K, Laouini D, Renard P. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to Leishmania major infection. *PLoS Negl Trop Dis.* **2013** 7(10), e2478.
- [17] Cabezas, Y.; Legentil, L.; Robert-Gangneux, F.; Daligault, F.; Belaz, S.; Nugier-Chauvin, C.; Tranchimand, S.; Tellier, C.; Gangneux, J.P.; Ferrières V. Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Org Biomol Chem.* **2015** 13(31), 8393-404.
- [18] Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* **2012**, 7, e35671.
- [19] Ritter, J.; Flower R., Henderson G. Loke Y. K., MacEwan, D. Rang, H. P.; Antiprotozal drugs:other protozoal infections and drugs used to treat them Editor(i): Boggild, A.K.; Rang & Dale's Pharmacology 9th Edition *Elsevier* **2018**, 707, 9.

- [20] Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.C.; Barrett, M.P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A.W.; Mwenechanya, R.; Papadopoulos, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *14*, e0006052.
- [21] Rahman, R.; Goyal, V.; Haque, R.; Jamil, K.; Faiz, A.; Samad, R.; Ellis, S.; Balasegaram, M.; Boer, M.D.; Rijal, S.; et al. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005635.
- [22] Croft, S.L.; Engel, J. Miltefosine—discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **2006** *100* Suppl 1:S4-8.
- [23] Hussain, H.; Al-Harrasi, A.; Al-Rawahi, A.; Green, I.R.; Gibbons, S. Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10369–10428.
- [24] Shakya N. et al. Drug Resistance in Leishmaniasis, Antileishmanial efficacy of fluconazole and miltefosine in combination with an immunomodulator—picroliv. *J Glob Infect Dis.* **2010** *2*(2), 167–176.
- [25] Rogers, M.; Kropf, P.; Choi, B.S.; Dillon, R.; Podinovskaia, M.; Bates, P.; Müller, I. Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000555.
- [26] Williams, C.; Espinosa, O.A.; Montenegro, H.; Cubilla, L.; Capson, T.L.; Ortega-Barría, E.; Romero, L.I. Hydrosoluble formazan XTT: Its application to natural products drug discovery for Leishmania. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *55*, 813–816.
- [27] Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 69–75.
- [28] Manjolin, L.C.; dos Reis, M.B.; Maquiaveli Cdo, C.; Santos-Filho, O.A.; da Silva, E.R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2253–2262.
- [29] Cruz Ede, M.; da Silva, E.R.; Maquiaveli Cdo, C.; Alves, E.S.; Lucon, J.F., Jr.; dos Reis, M.B.; de Toledo, C.E.; Cruz, F.G.; Vannier-Santos, M.A. Leishmanicidal activity of Cecropia pachystachya flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. *Phytochemistry* **2013**, *89*, 71–77.
- [30] Scotti, L.; Ishiki, H.; Mendonça Júnior, F.J.; Da Silva, M.S.; Scotti, M.T. In-silico analyses of natural products on leishmania enzyme targets. *Mini Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 253–269.
- [31] Lepesheva, G.I.; Hargrove, T.Y.; Rachakonda, G.; Wawrzak, Z.; Pomel, S.; Cojean, S.; Nde, P.N.; Nes, W.D.; Locuson, C.W.; Calcutt, M.W.; et al. VFV as a New Effective CYP51 Structure-Derived Drug Candidate for Chagas Disease and Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, 1439–1448.
- [32] Cottrell, D.M.; Capers, J.; Salem, M.M.; DeLuca-Fradley, K.; Croft, S.L.; Werbovetz, K.A. Antikinetoplastid activity of 3-aryl-5-thiocyanatomethyl-1,2,4-oxadiazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2815–2824.
- [33] Thota, S.; Rodrigues, D.A.; Murteira Pinheiro, P.S.; Lima, L.M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. N-Acylhydrazones as drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2797–2806.
- [34] Andrade, M.M.; Barros, M.T. Fast synthesis of N-acylhydrazones employing a microwave assisted neat protocol. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 245–247.
- [35] Oliveira, P.F.M.; Guidetti, B.; Chamayou, A.; André-Barrès, C.; Madacki, J.; Korduláková, J.; Mori, G.; Orena, B.S.; Chiarelli, L.R.; Pasca, M.R.; et al. Mechanochemical synthesis and biological C. evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity. *Molecules* **2017**, *22*, 1457.
- [36] Sharma, V.; Kumar, V. Indolizine: A biologically active moiety. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 3593–3606.
- [37] Jaisankar, P.; Pal, B.; Manna, R.K.; Pradhan, P.K.; Medda, S.; Basu, M.K.; Giri, V.S. Synthesis of antileishmanial(5R)-(-)-5-carbomethoxy-3-formyl-5, 6-dihydroindolo-[2, 3-a]-indolizine. *ARKIVOC* **2003** ix, 150–157.
- [38] Biagini, G.A.; Fisher, N.; Shone, A.E.; Mubarak, M.A.; Srivastava, A.; Hill, A.; Antoine, T.; Warman, A.J.; Davies, J.; Pidathala, C.; et al. Generation of quinolone antimalarials targeting the Plasmodium falciparum itochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 8298–8303.

- [39] Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, K., Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S., Kita, K. Identification of new inhibitors for alternative NADH dehydrogenase (NDH-II), *FEMS Microbiology Letters* **2009** 291(2), 157–161.
- [40] Morris, S. M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology* **2009** 157, 922–930.
- [41] Colotti, G.; Ilari, A. Polyamine metabolism in Leishmania: From arginine to trypanothione. *Amino Acids* **2011**, 40, 269–285.
- [42]
- [43] Ash, D.E. Structure and Function of Arginases, *The Journal of Nutrition* **2004** 134(10), 2760S–2764S.
- [44] Reguera, R.M.; Balaña-Fouce, R.; Showalter, M.; Hickerson, S.; Beverley, S.M. Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, 165, 48–56.
- [45] da Silva, E.R.; Castilho, T.M.; Pioker, F.C.; Tomich de Paula Silva, C.H.; Floeter-Winter, L.M. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase and its protein structure prediction. *Int. J. Parasitol.* **2002**, 32, 727–737.
- [46] Mortier, J., Prévost, J.R., Sydow, D. et al. Arginase Structure and Inhibition: Catalytic Site Plasticity Reveals New Modulation Possibilities. *Sci Rep* **2017** 7, 13616.
- [47] Girard-Thernier, C.; Pham, T.N.; Demougeot, C. The Promise of Plant-Derived Substances as Inhibitors of Arginase. *Mini Rev. Med. Chem.* 2015, 15, 798–808.
- [48] Marreiros, B.C.; Sena, F.P.; Sousa, F.M.; Batista, A.P.; Pereira, M.M. Type II NADH:quinone oxidoreductase family: Phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences. *Environ. Microbiol.* **2016**, 18, 4697–4709.
- [49] Elguindy, M.M.; Nakamaru-Ogiso, E. Apoptosis-inducing Factor (AIF) and Its Family Member Protein, AMID, Are Rotenone-sensitive NADH: Ubiquinone Oxidoreductases (NDH-2). *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 20815–20826.
- [50] Matus-Ortega, M. G.; Salmerón-Santiago, K.G.; Flores-Herrera, O.; Guerra-Sánchez, G.; Martínez, F.; Rendón, J.L., Pardo, J. P. The alternative NADH dehydrogenase is present in mitochondria of some animal taxa. *Comp Biochem Physiol.* **2011** 6(3), 256–63.
- [51] Tomas, A.; Ferreira, C.; Duarte, M. Alternative NADH dehydrogenase of Leishmania: A putative drug target for leishmaniasis. In Proceedings of the COST Action CM1307 2nd Conference, Beograd, Srbija, 26–28 Oktobar **2015**; p. 22.
- [52] Iwata, M.; Lee, Y.; Yamashita, T.; Yagi, T.; Iwata, S.; Cameron, A.D.; Maher, M.J. The structure of the yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) reveals overlapping binding sites for water- and lipid-soluble substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 15247–15252.
- [53] PDB 5jwa; Yang, Y.; Yu, Y.; Li, X.; Li, J.; Wu, Y.; Yu, J.; Ge, J.; Huang, Z.; Jiang, L.; Rao, Y.; et al. Target Elucidation by Cocrystal Structures of NADH-Ubiquinone Oxidoreductase of Plasmodium falciparum (PfNDH-2) with Small Molecule to Eliminate Drug-Resistant Malaria. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 1994–2005.
- [54] Yang, Y.; Yamashita, T.; Nakamaru-Ogiso, E.; Hashimoto, T.; Murai, M.; Igarashi, J.; Miyoshi, H.; Mori, N.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T.; et al. Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from Saccharomyces cerevisiae: Evidence for ternary complex mechanism. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 9287–9297.
- [55] Yano, T.; Rahimian, M.; Aneja, K.K.; Schechter, N.M.; Rubin, H.; Scott, C.P. Mycobacterium tuberculosis type II NADH-menaquinone oxidoreductase catalyzes electron transfer through a two-site ping-pong mechanism and has two quinone-binding sites. *Biochemistry* **2014**, 53, 1179–1190.
- [56] Blaza, J.; Bridges, H.; Aragão, D.; Dunn, E.; Heikal, A.; Cook, G.; Nakatani, Y.; Hirst, J. The mechanism of catalysis by type-II NADH:quinone oxidoreductases. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 40165.
- [57] Shiba, T.; Kido, Y.; Sakamoto, K.; Inaoka, D.K.; Tsuge, C.; Tatsumi, R.; Takahashi, G.; Balogun, E.O.; Nara, T.; Aoki, T.; et al. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 4580–4585.

- [58] PDB 4g73, 4g6g; Feng, Y.; Li, W.; Li, J.; Wang, J.; Ge, J.; Xu, D.; Liu, Y.; Wu, K.; Zeng, Q.; Wu, J.W.; et al. Structural insight into type-II mitochondrial NADH dehydrogenases. *Nature* **2012**, 491, 478–482.
- [59] Mihaleva VV, te Beek TA, van Zimmeren F, Moco S, Laatikainen R, Niemitz M, Korhonen SP, van Driel MA, Vervoort J. MetIDB: a publicly accessible database of predicted and experimental 1H NMR spectra of flavonoids. *Anal Chem.* **2013**, 85(18):8700-7
- [60] Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A.P.; Chambers, J.; De Veij, M.; Félix, E.; Magariños, M.P.; Mosquera, J.F.; Mutowo, P.; Nowotka, M.; Gordillo-Marañón, M.; Hunter, F.; Junco, L.; Mugumbate, G.; Rodriguez-Lopez, M.; Atkinson, F.; Bosc, N.; Radoux, C.J., Segura-Cabrera, A.; Hersey, A.; Leach, A.R. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res.* **2019** 47(D1):D930-D940.
- [61] Davies, M.; Nowotka, M.; Papadatos, G.; Dedman N, Gaulton, A.; Atkinson, F., Bellis, L.; Overington JP. ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Res.* **2015** 43(W1):W612-20.
- [62] Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research* **2019** 47(D1), D1102–D1109.
- [63] Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Guo, A.C.; Lo, E.J.; Marcu, A.; Grant, J.R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A; Chin, L.; Cummings, R.; Le, D.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2017** 46(D1), D1074-D1082
- [64] Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997** 25:3389-340.
- [65] PubChem Docs: PubChem Data Counts 2019. Dostupno na: <https://pubchemdocs.ncbi.nlm.nih.gov/statistics> (datum pristupa: 19.01.2022.)
- [66] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne P.E. RCSB PDB The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000** 28, 235-242.
- [67] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45:D158–D169.
- [68] Visco, D.P.; Chen, J.J. Chapter 11 - The Signature Molecular Descriptor in Molecular Design: Past and Current Applications. *Elsevier* **2016**, 39, 315-343.
- [69] Cocchi, M.; Menziani, M.C.; De Benedetti, P. G.; Cruciani, G. Theoretical versus empirical molecular descriptors in monosubstituted benzenes: A chemometric study. *Chemometr Intell Lab Syst* **1992** 14(1-3), 209-224.
- [70] Veljkovic, N.; Glisic, S.; Perovic, V.; Veljkovic, V. The role of long-range intermolecular interactions in discovery of new drugs. *Exp. Opin. Drug Disc.* **2011**, 6, 1263–1270.
- [71] Veljkovic, V. A Theoretical Approach to Preselection of Carcinogens and Chemical Carcinogenesis; Gordon & Breach: New York, NY, USA, **1980**.
- [72] Veljkovic, V.; Slavic, I. Simple general-model pseudopotential. *Phys. Rev. Lett.* **1972**, 29, 105–107.
- [73] Veljkovic, V.; Mouscadet, J.F.; Veljkovic, N.; Glisic, S.; Debyser, Z. Simple criterion for selection of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1226–1232.
- [74] Veljkovic, N.; Glisic, S.; Prljic, J.; Perovic, V.; Veljkovic, V. Simple and general criterion for “in silico” screening of candidate HIV drugs. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2013**, 14, 561–569.
- [75] Duran, A.; Zamora, I.; Pastor, M. Suitability of GRIND-Based Principal Properties for the Description of Molecular Similarity and Ligand-Based Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 2129–2138.
- [76] Pentacle, Verzija 1.0.7, Molecular Discovery Ltd., Perugia, Italy; **2009**.
- [77] Duran, A.; Comesaña G, Pastor, M. Development and validation of AMANDA, a new algorithm for selecting highly relevant regions in molecular interaction fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, 48 (9), 1813-1823.
- [78] Eriksson, L.; Antti, H.; Gottfries, J.; Holmes, E.; Johansson, E.; Lindgren, F.; Long, I.; Lundstedt, T.; Trygg, J.; Wold, S. Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm). *Anal Bioanal Chem.* **2004** 380(3), 419-29.

- [79] Tong, W.; Welsh, J. W.; Shi, L.; Fang, H.; Perkins, R. Structure-activity relationship approaches and applications. *Environ Toxicol Chem.* **2003** 22(8):1680-95.
- [80] Pinto, R. C. Chemometrics Methods and Strategies in Metabolomics. *Adv Exp Med Biol.* **2017**, 965, 163-190.
- [81] Grootveld, M. CHAPTER 1:Introduction to the Applications of Chemometric Techniques in ‘Omics’ Research: Common Pitfalls, Misconceptions and ‘Rights and Wrongs’ Metabolic Profiling: Disease and Xenobiotics, **2012** 1-34.
- [82] Eberly, L.E. Multiple linear regression. *Methods Mol Biol.* **2007**, 404, 165-87.
- [83] Hosmer D.W.; Lemeshow, S. Applied Logistic Regression (2. izdanje) **2000** Njujork, *Wiley*, str. 1-8.
- [84] Consonni, V.; Ballabio, D.; Todeschini, R. Comments on the definition of the Q2 parameter for QSAR validation. *J Chem Inf Model* **2009** 49(7):1668-78.
- [85] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 236, **2013**.
- [86] Kaserer, T.; Beck, K.R.; Akram, M.; Odermatt, A.; Schuster, D. Pharmacophore Models and Pharmacophore-Based Virtual Screening: Concepts and Applications Exemplified on Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Molecules* **2015**, 20, 22799-22832.
- [87] Wober, G.; Langer, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 160–169.
- [88] Hawkins, P. C. D.; Skillman, A. G.; Warren, G. L.; Ellingson, B. A.; Stahl M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database *J. of Chem. Inf.* **2010** 50 (4), 572-584.
- [89] Al-Quraishi, M. AlphaFold at CASP13. *Bioinformatics* **2019**, 35(22), 4862-4865.
- [90] Haddad, Y.; Adam, V.; Heger, Z. Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLoS Comput Biol.* **2020**, 16(4), e1007449.
- [91] Chung, S.; Subbiah, S. A structural explanation for twilight zone of protein sequence. *Structure* **1996**, 4, 1123–1127.
- [92] Bordogna, A.; Pandini, A.; Bonati, L. Predicting the accuracy of receptor-ligand docking on homology models. *J Comput Chem.* **2011** 32(1), 81-98.
- [93] Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* **1963** 7, 95–9.
- [94] Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J. The Phyre 2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, 10, 845–858.
- [95] Buchan, D.; Minneci, F.; Nugent, T.; Bryson, K.; Jones, D. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, W349–W357.
- [96] Jefferys B.R.; Kelley L A.; Sternberg M.J.E. Protein Folding Requires Crowd Control in a Simulated *Cell Mol Biol.* **2010** 397(5), 1329–1338.
- [97] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727–748.
- [98] Virtual Screening Workflow; Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, **2018**.
- [99] Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639–1662.
- [100] Trott, O.; Olson, A.J. Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010, 31, 455–461.
- [101] Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci.* **2019** 15;20(18):4574.
- [102] Houston DR, Walkinshaw MD. Consensus docking: improving the reliability of docking in a virtual screening context. *J Chem Inf Model.* **2013** Feb 25;53(2):384-90.
- [103] CSD System, CCDC Software Ltd. Cambridge, UK **2019**.
- [104] Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, **2018**.
- [105] García-Sosa, A.T.; Sild, S.; Maran, U. Docking and virtual screening using distributed grid technology. *QSAR Comb. Sci.* **2009**, 28, 815–821.
- [106] Pymol, Version 2.0; The PyMOL Molecular Graphics System; Schrödinger, LLC: New York,



- [107] Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shaw, D. E.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Francis, P.; Shenkin, P. S., "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy," *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 1739–1749
- [108] Prime MM/GBSA; Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, **2018**.
- [109] Spitzer, R.; Jain, A.N. Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *J Comput Aided Mol Des* **2012**, 26, 687–699.
- [110] Baell, J.; Walters, M.A. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* 2014, 513, 481–483.
- [111] Jonathan, B.; Baell, J.; Nissink, W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations *ACH Chem Bio*. **2018**, 13 (1), 36–44.
- [112] AP10.0, SimulationsPlus LLC, Lancaster, CA
- Olasupo, S.B.; Uzairu, A.; Adamu, G.S. et al. Computational Modeling and Pharmacokinetics/ADMET Study of Some Arylpiperazine Derivatives as Novel Antipsychotic Agents Targeting Depression. *Chem. Afr.* **2020** 3, 979–988.
- [113] Dearden, J.C. In silico prediction of aqueous solubility. *Expert Opin Drug Discov* **2006**, 1 (1), 31–52.
- [114] Tetko, I.V.; Poda, G.I. Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction. ed. Mannhold R., Weinheim, Germany, *Wiley-VCH* **2007**, 381–406
- [115] Mannhold, R.; Poda, G.I.; Ostermann, C.; Tetko I.V. Calculation of Molecular Lipophilicity: State of the Art and Comparison Methods. *J Pharm Sci.* **2008**, 98 (3), 84.
- [116] CM1307 - Targeted chemotherapy towards diseases caused by endoparasites. COST Action (Dostupno na: [www.costcm1307.org](http://www.costcm1307.org))
- [117] Fiser, A. Template-Based Protein Structure Modeling *Methods Mol Biol.* **2010** 673: 73–94.
- [118] PDB ID 4iu0 D'Antonio EL, Ullman B, Roberts SC, Dixit UG, Wilson ME, Hai Y, Christianson DW Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013** 535(2), 163–76.
- [119] PDB ID 2aeb Di Costanzo, L.; Sabio, G.; Mora, A.; Rodriguez, P.C.; Ochoa, A.C.; Centeno, F.; Christianson, D.W. Crystal structure of human arginase I at 1.29 Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc Natl Acad Sci* **2005** 102: 13058–13063.
- [120] Mysinger, M.; Carchia, M.; Irwin, J.; Shoichet, B. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 6582–6594.
- [121] Athanasiadis, E.; Cournia, Z.; Spyrou, G. ChemBioServer: a web-based pipeline for filtering, clustering and visualization of chemical compounds used in drug discovery. *Bioinformatics* **2012** 28(22), 3002–3.
- [122] PDB 4xdb Sena, F.V.; Batista, A.P.; Catarino, T.; Brito, J.A.; Archer, M.; Viertler, M.; Madl, T.; Cabrita, E.J.; Pereira, M.M. Type-II NADH:quinone oxidoreductase from *Staphylococcus aureus* has two distinct binding sites and is rate limited by quinone reduction. *Mol. Microbiol.* **2015**, 98, 272–288.
- [123] Arkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, 23, 2947–2948.
- [124] Stothard, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **2000**, 28, 1102–1104.
- [125] Lovell, S.C.; Davis, I.W.; Arendall, W.B., III; De Bakker, P.I.W.; Word, J.M.; Prisant, M.G.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. Structure validation by C $\alpha$  geometry: Phi, psi and C $\beta$  deviation. *Proteins* **2002**, 50, 437–450.
- [126] PSI|The Protein Model Portal. Available online: <http://www.proteinmodelportal.org/> (pristupljeno 10. marta 2016).
- [127] Pieper, U.; Webb, B.M.; Dong, G. Q., Schneidman-Duhovny, G., Fan, H., Seung Joong Kim, Natalia Khuri, Yannick G. Spill, Patrick Weinkam, Michal Hammel, John A. Tainer, Michael Nilges, Sali, A. MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Research* **2014**, 42, D336–46.

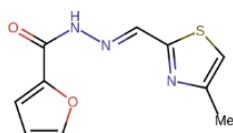
- [128] Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics* **2016** 54, 5.6.1-5.6.37.
- [129] Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* **1993** 26, 283-291.
- [130] García-Sosa, A.T. Hydration properties of ligands and drugs in protein binding sites: Tightly-bound, bridging water molecules and their effects and consequences on molecular design strategies. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 1388–1405.
- [131] García-Sosa, A.T.; Mancera, R.L. Free energy calculations of mutations involving a tightly bound water molecule and ligand substitutions in a ligand-protein complex. *Mol. Inf.* **2010**, 29, 589–600.
- [132] García-Sosa, A.T.; Mancera, R.L.; Dean, P.M. WaterScore: A novel method for distinguishing between bound and displaceable water molecules in the crystal structure of the binding site of receptor-ligand complexes. *J. Mol. Model.* **2003**, 9, 172–182.
- [133] García-Sosa, A.T.; Firth-Clark, S.; Mancera, R.L. Including tightly-bound water molecules in de novo drug design. Exemplification through the *in silico* generation of poly (ADP-ribose) polymerase ligands. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 624–633.
- [134] Lloyd, D.G.; García-Sosa, A.T.; Alberts, I.L.; Todorov, N.P.; Mancera, R.L. The effect of tightly bound water molecules on the structural interpretation of ligand-derived pharmacophore models. *J. Comput. Aid. Mol. Des* **2004**, 18, 89–100.
- [135] García-Sosa, A.T.; Sild, S.; Takkis, K.; Maran, U. Combined approach using ligand efficiency, cross-docking, and antitarget hits for wild-type and drug-resistant Y181C HIV-1 reverse transcriptase. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 2595–2611.
- [136] García-Sosa, A.T.; Maran, U. Improving the use of ranking in virtual screening against HIV-1 integrase with triangular numbers and including ligand profiling with Antitargets. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 3172–3185.
- [137] EMBL-EBI. ChEMBL. Dostupno online: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (pristup načinjen u decembru 2015).
- [138] Charlson, A.J.; Harington, J.S. The anti-inflammatory and analgesic activity of some benzimidazoles, and their ability to protect erythrocytes from hemolysis by silica powder. *Carbohydr. Res.* **1975**, 43, 383–387.
- [139] Alcalde, E.; Pérez-García, L.; Miravittles, C.; Rius, J.; Valentí, E. Heterocyclic Betaines. 13. Synthesis, Electronic and Molecular Structures of Methylenepyridinium and Methylenimidazolium Azolate Inner Salts. *J. Organ. Chem.* **1992**, 57, 4829–4834.
- [140] Sereno, D.; Lemesre, J.L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 972–976.
- [141] Vale-Costa, S.; Gomes-Pereira, S.; Teixeira, C.M.; Rosa, G.; Rodrigues, P.N.; Tomas, A.; Appelberg, R.; Gomes, M.S. Iron overload favors the elimination of *Leishmania infantum* from mouse tissues through interaction with reactive oxygen and nitrogen species. *PLOS* **2013** 7(2), e206.
- [142] Glisic S., Sencanski M., Perovic M, Stevanovic S. i García-Sosa A.T. Arginase Flavonoid Anti-Leishmanial in Silico Inhibitors Flagged against Anti-Targets. *Molecules* **2016**, 21, 589.
- [143] Lipiński, P.F.J.; Szurmak, P. SCRAMBLE'N'GAMBLE: a tool for fast and facile generation of random data for statistical evaluation of QSAR models. *Chem. Pap.* **2017**, 71, 2217–2232.
- [144] Balaraman, K.; Vieira, N.C.; Moussa, F.; Vacus, J.; Cojean, S.; Pomel, S.; Bories, C.; Figadère, B.; Kesavan, V.; Loiseau, P.M. In vitro and in vivo antileishmanial properties of a 2-n-propylquinoline hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin formulation and pharmacokinetics via intravenous route. *Biomed. Pharmacother.* **2015**, 76, 127–133
- [145] Afendi, F.M.; Okada, T.; Yamazaki, M.; Hirai-Morita, A.; Nakamura, Y.; Nakamura, K.; Ikeda, S.; Takahashi, H.; Altaf-Ul-Amin, M.; Darusman, L.K.; et al. KNApSAcK family databases: Integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.* **2012**, 53, e1
- [146] World Drug Index 2007/04; Thomson Reuters; (Dostupna na: [http://thomsonreuters.com/products\\_services/science/science\\_products/a-z/world\\_drug\\_index](http://thomsonreuters.com/products_services/science/science_products/a-z/world_drug_index))
- [147] Stevanovic, S.; Sencanski, M.; Danel, M.; Menendez, C.; Belguedj, R.; Bouraiou, A.; Nikolic K., Cojean, S.; Loiseau, P. M.; Glisic, S.; Baltas, M. and García-Sosa. A.T. Synthesis, In Silico, and In Vitro

- Evaluation of Anti-Leishmanial Activity of Oxadiazoles and Indolizine Containing Compounds Flagged against Anti-Target. *Molecules* **2015**, *24*, 1282
- [148] Bora, R.O.; Dar, B.; Pradhan, V.; Farooqui, M. 1,2,4-Oxadiazoles: Synthesis and Biological applications. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2014**, *14*, 355–369.
- [149] Bolognesi, M.L.; Lizzi, F.; Perozzo, R.; Brun, R.; Cavalli, A. Synthesis of a small library of 2-phenoxy-1,4-naphthoquinone and 2-phenoxy-1,4-antraquinone derivatives bearing anti-trypanosomal and anti-leishmanial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2272–2276.
- [150] Stevanovic S.; Perdih A.; Senčanski M.; Glišić S.; Duarte M; Tomás A. M.; Filipa V. Sena F. V.; Sousa F. M.; Pereira M. M. and Solmajer T. *In silico* discovery of a substituted 6-methoxy-quinalidine with leishmanicidal activity in leishmania infantum. *Molecules* **2018**, *23*: 772;
- [151] Sousa, F.M.; Sena, F.V.; Batista, A.P.; Athayde, D.; Brito, J.A., Archer, M., Oliveira, A.S.F., Soares, C.M., Catarino, T., Pereira, M.M. The key role of glutamate in the mechanism of type II NADH:quinone oxidoreductase of *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* **2017** *1858*: 823-832.
- [152] Vuorinen, A.; Schuster, D. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. *Methods.* **2015** *71*:113-34.
- [153] Stevanovic, S.; Glisic, S.; Sencanski M.; Mori M., Botta. Maurizio Study of Leishmanial type II NDH-2 dehydrogenase inhibition mechanism using molecular dynamics (MD). **2017** Second Training School of COST Action CM1307 Certosa di Pontignano, Siena, Italy.
- [154] Gamo, F.; Sanz, L.; Vidal, J.; de Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J.; Vanderwall, D.; Green, D.; Kumar, V.; Hasan, S.; et al. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **2010**, *465*, 305–310.
- [155] Plouffe, D.; Brinker, A.; McNamara, C.; Henson, K.; Kato, N.; Kuhen, K.; Nagle, A.; Adrián, F.; Matzen, J.; Anderson, P.; et al. In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 9059–9064.
- [156] Meister, S.; Plouffe, D.; Kuhen, K.; Bonamy, G.; Wu, T.; Barnes, S.; Bopp, S.; Borboa, R.; Bright, A.; Che, J.; et al. Imaging of Plasmodium liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* **2011**, *334*, 1372–1377.

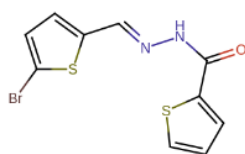
## 7. Prilozi

### 7.1. Prilog 1: Strukturna instrumentalna analiza derivata oksadiazola i indolizina

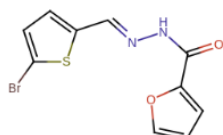
U nastavku navodimo spektralne parametre za sintetisana jedinjenja. Hemijska pomeranja su izražena u ppm, konstante kuplovanja (J) u Hz, oznake za multiplicitet signala: s (singlet), ps (proširen singlet), d (dublet), dd (dvostruki dublet), ddd (dvostruki dublet dubleta), t (triplet), m (multiplet).



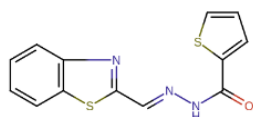
**N'-[(4-Metil-2-tiazolil)metilen]furan-2-karbohidrazon (1):** Čvrsta braon supstanca, prinos: 61 %, t.t. 121–124 °C, LC čistoća (254 nm): 92 %. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm: 12,22 (s, 1H); 8,62 (s, 1H), 8,00–7,93 (m, 1H), 7,41–7,33 (m, 2H), 6,73 (dd, J = 3,3; 1,5 Hz; 1H); 2,39 (d, J = 0,9 Hz; 3H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz; DMSO) δ ppm: 163,72; 157,80; 154,60; 153,93; 142,57; 116,86; 116,21; 115,16; 112,74; 112,38; 17,14. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, TOF) m/z: [M + H]<sup>+</sup> odgovara molekulskoj formuli C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S: 236,0494 (Pronađeno: 236,0494).



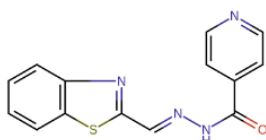
**N'-[(5-Bromo-2-tiofenil)metilen]tiofen-2-karbohidrazid (2):** Čvrsta sveložuta supstanca, prinos: 72%, t.t.: 195–198 °C. LC čistoća (254 nm): 99 %. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm: 11,89 (s, 1H), 8,58 i 8,20 (2 široka singleta, 1H); 8,05–7,93 (m, 1H); 7,88 (br, 1H); 7,33 (dd, J = 4,5; 0,6 Hz; 1H), 7,27 (d, J = 3,9 Hz; 3,9 Hz, 1H); 7,22 (dd, J = 5,1; 3,9 Hz; 1H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz; DMSO) δ ppm: 161,58; 158,40; 142,42; 141,41; 141,24; 138,50; 138,15; 135,65; 135,26; 133,46; 132,47; 131,98; 129,51; 128,60; 127,14; 115,25. HRMS (ES, TOF) m/z: [M + H]<sup>+</sup> odgovara molekulskoj formuli C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OS<sub>2</sub>Br: 314,9261. (Pronađeno: 314,9250)



**N'-[(5-Bromo-2-tiofenil)metilen]furan-2-karbohidrazid (3):** Čvrsta svetložuta supstanca, prinos: 71%, t.t.: 201–202 °C. LC čistoća (254 nm): 99 %. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm: 11,89 (s, 1H); 8,57 (br, 1H); 7,94 (s, 1H); 7,32–7,24 (m, 3H); 6,70 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm: 154,1; 146,5; 146,0; 142,1; 140,9; 131,5; 131,3; 115,1; 114,8; 112,1. HRMS (ES, TOF) m/z: [M + H]<sup>+</sup> odgovara molekulskoj formuli C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>SBr: 298,9490 (Pronađeno: 298,9492).

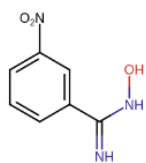


**N'-[(2-Benzotiazolil)metilen]tiofen-2-karbohidrazid (4):** Čvrsta svetložuta supstanca, prinos: 100%, t.t.: 231–234 °C. LC čistoća (254 nm): 99 %. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm: 12,37 (s, 1H); 8,74 i 8,42 (2 br, 1H), 8,20–8,12 (m, 1H); 8,12–7,87 (m, 3H); 7,55 (ddd, J = 14,7; 7,5; 1,5 Hz; 1H), 7,50 (ddd, J = 15,9; 7,5; 1,5 Hz; 1H); 7,27 (dd, J = 4,8; 3,6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz; DMSO) δ ppm: 165,52; 164,86; 161,86; 158,45; 153,62; 142,24; 138,56; 135,87; 134,63; 130,34; 128,77; 127,17; 127,04; 123,76; 123,00. HRMS (ES, TOF) m/z: [M + H]<sup>+</sup> odgovara molekulskoj formuli C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub>: 288,0265 (Pronađeno: 288,0277)

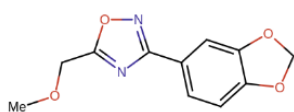


**N'-[(2-Benzotiazolil)metilen]piridin-4-karbohidrazid (5):** Beličasta čvrsta supstanca, prinos: 70%, t.t.: 234–237 °C. LC čistoća (254 nm): 92 %. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm: 12,64 (s, 1H); 8,88–8,81 (m, 2H); 8,79 (s, 1H); 8,21–8,11 (m, 1H); 8,11–8,03 (m, 1H); 7,92–7,82 (m, 2H); 7,61–7,47 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz DMSO) δ ppm: 164,7; 162,0; 153,1; 150,3; 143,3; 140,1; 134,1;

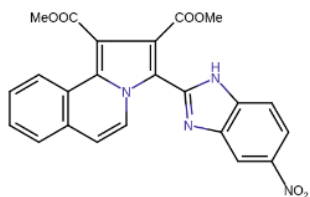
126,8; 126,7; 123,4; 122,6; 121,7. HRMS (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm: 164,7; 162,0; 153,1; 150,3; 143,3; 140,1; 134,1; 126,8; 126,7; 123,4; 122,6; 121,7. (ES, TOF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  odgovara molekulknoj formuli  $C_{14}H_{11}N_4OS$ : 283,0654 (Pronađeno: 283,0656).



**3-Nitrobenzamidoksim (7):** Čvrsta žuta supsanca, prinos: 100%, t.t.: 182-184 °C.  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm: 9,97 (s, 1H); 8,51 (m,  $J = 2,1$  Hz; 1H); 8,23 (ddd,  $J = 8,1; 2,4; 0,9$  Hz; 1H); 8,12 (ddd,  $J = 7,8; 1,5; 1,2$  Hz; 1H); 7,68 (t,  $J = 8,1$  Hz; 1H); 6,10 (s, 2H).  $^{13}C$ -NMR (75 MHz; DMSO)  $\delta$  ppm: 149,60; 148,22; 135,40; 132,04; 130,24; 123,93; 120,40. HRMS (DCI- $CH_4$ , TOF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  odgovara molekulknoj formuli  $C_7H_8N_3O_3$ : 182,0566 (Pronađeno: 182,0559).



**3-[3,4-(Metilendioki)fenil]-5-(metoksimetil)-1,2,4-oksadiazol (8):** Čvrsta svetlo smeđa supsanca, t.t. 56–57 °C. LC čistoća (254 nm): 98%.  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm: 7,58 (dd,  $J = 8,1; 1,8$  Hz; 1H); 7,45 (dd, O)  $\delta$  ppm: 7,58 (dd,  $J = 8,1; 1,8$  Hz; 1H); 7,45 (dd,  $J = 1,5; 0,3$  Hz; 1H); 7,09 (dd,  $J = 8,1; 0,3$  Hz; 1H) 6,14 (s, 2H); 4,80 (s, 2H); 3,42 (s, 3H).  $^{13}C$ -NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm: 176,5; 167,2; 150,1; 148,0; 122,1; 119,6; 109,0; 106,6; 101,9; 64,4; 58,8. HRMS (DCI- $CH_4$ , TOF)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  odgovara molekulknoj formuli  $C_{11}H_{11}N_2O_4$ : 235, 0719 (pronađeno: 235,0712).



**Dimetil 3-(5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)pirolo[2,1-a]izokvinolin-1,2-dikarboksilat (12):** Čvrsta beličasta supstanca t.t. 162 °C,  $R_f$ : 0.6 EP/THF (1:4 v/v), prinos: 28%.  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm: 11,75 (s, NH); 8,98 (d,  $J = 7,5$  Hz; H5), 8,59 (s, H4'); 8,35–8,26 (m, H10); 8,17 (d,  $J = 8,9$  Hz; H6'), 7,86-7,83 (m, H7+H7'), 7,65–7,62 (m, H8+H9), 7,33 (d,  $J = 7,5$  Hz; H6); 4,00 (s,  $CH_3$ ); 3,85 (s,  $CH_3$ ).  $^{13}C$ -NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm: 166,9 (CO),

164,1 (CO); 146,9 ( $C5'$ ); 143,4 (C2); 129,0 (CH8 + CH9); 128,9 (C11), 128,7 (C); 128,2 (CH7); 123,9 (C); 123,9 (CH10); 123,8 (CH5); 119,3 (C); 118,7 (CH6'); 117,5 (C3); 115,4 (CH7'); 115,3 (CH6); 113,1 (CH4'); 111,0 (C); 53,3 ( $CH_3$ ); 53,0 ( $CH_3$ ). HRMS (ES, TOF)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  odgovara molekulknoj formuli  $C_{23}H_{17}N_4O_6$ : 445,1148 (pronađeno: 445,1148). IR (ATR) ( $cm^{-1}$ ): 3399, 3109, 2990, 1727, 1686, 1519, 1340, 1210, 734.

## 7.2. Prilog 2: Rezultati kodiranja podataka, metoda validacije PLS modela

**Tabela 1p:** Kodiranje podataka kao metoda eksterne validacije.

Pristupni kod	pIC <sub>50</sub>	Kodiranje 1	Kodiranje 2	Kodiranje 3
CHEMBL3109443	6,05	4,91	1,45	4,86
CHEMBL583912	5,80	5,4	6,05	4,06
CHEMBL311498	5,77	3,89	5,8	4,26
CHEMBL250450	5,70	5,8	5,77	5,4
CHEMBL164	5,68	5,7	5,7	6,05
CHEMBL3109439	5,62	4,45	5,68	4,45
CHEMBL3109442	5,43	5,68	5,62	5,68
CHEMBL50	5,40	5,32	5,43	3,89
CHEMBL3109444	5,32	6,05	5,4	3,65
CHEMBL82242	4,91	3,65	5,32	4,91
CHEMBL361362	4,86	4,78	4,91	5,77
CHEMBL1078766	4,78	5,77	4,86	5,62
CHEMBL3109441	4,46	4,86	4,78	4,78
CHEMBL150	4,26	4,26	4,26	5,43
CHEMBL3109437	4,05	4,06	4,06	5,32
CHEMBL19074	3,92	5,62	3,92	5,7
CHEMBL3109440	3,89	5,43	3,89	5,8
CHEMBL3109438	3,65	3,92	3,65	3,92

**Tabela 2p:** Statistika modela nakon inicijalnog kodiranja podataka.

Komponenta	SSX	SSXa	SDEC	SDEP	R <sup>2</sup>	R <sup>2a</sup>	Q <sup>2a</sup>
1	26,57	26,57	0,5	0,64	0,56	0,56	0,28
2	17,07	43,64	0,44	0,7	0,1	0,66	0,13
3	14,49	58,13	0,37	0,8	0,1	0,76	-0,14
4	7,98	66,11	0,29	0,85	0,09	0,85	-0,28
5	7,81	73,92	0,25	0,8	0,04	0,89	-0,15

**Tabela 3p:** Statistika modela nakon drugog kodiranja podataka.

Komponenta	SSX	SSXa	SDEC	SDEP	R <sup>2</sup>	R <sup>2a</sup>	Q <sup>2a</sup>
1	35,61	35,61	0,61	0,72	0,34	0,34	0,09
2	24,02	59,64	0,55	0,67	0,12	0,45	0,2
3	10,39	70,03	0,51	0,68	0,09	0,54	0,18
4	7,62	77,65	0,48	0,73	0,05	0,59	0,06
5	8,51	86,16	0,46	0,83	0,03	0,63	-0,23

**Tabela 4p:** Statistika modela nakon trećeg kodiranja podataka.

Komponenta	SSX	SSXa	SDEC	SDEP	R <sup>2</sup>	R <sup>2a</sup>	Q <sup>2a</sup>
1	54,85	54,85	0,66	0,76	0,23	0,23	-0,03
2	7,7	62,55	0,22	0,59	0,68	0,91	0,38
3	10,99	73,55	0,16	0,47	0,04	0,95	0,6
4	5,83	79,37	0,13	0,44	0,02	0,97	0,65
5	4,02	83,4	0,11	0,4	0,01	0,98	-0,72

**Tabela 5p:** Statistika PLS modela za inhibitore *La*ARG.

Broj latentnih faktora	SSX	SSX <sub>acc</sub>	SDEC	SDEP	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>acc</sub>	Q <sup>2</sup> <sub>acc</sub>
1	28,31	28,31	0,45	0,61	0,64	0,64	0,34
2	12,94	41,25	0,13	0,33	0,33	0,97	0,81
3	7,95	49,20	0,08	0,25	0,02	0,99	0,89
4	13,21	62,41	0,05	0,24	0,01	1,00	0,89
5	11,59	74	0,04	0,23	0	1,00	0,90

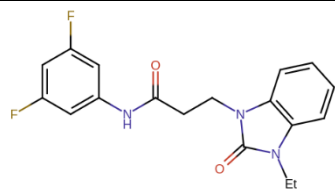
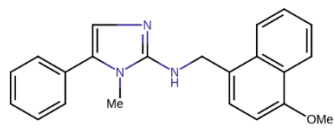
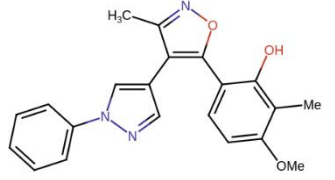
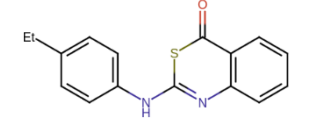
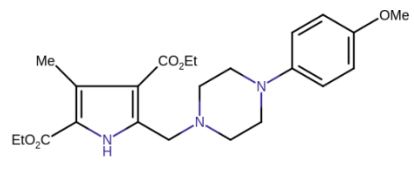
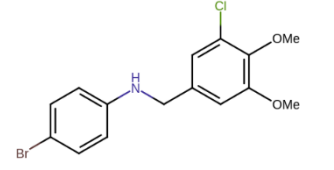
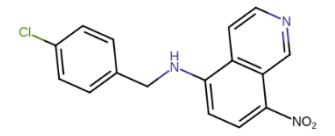
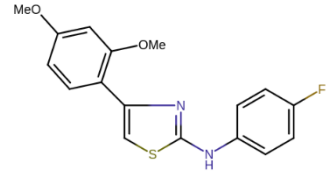
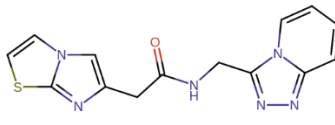
SSX—objašnjenje X promenljive; SSX<sub>acc</sub>—X akumulirano; SDEC—standardna devijacija greške u računima, SDEP—standardna devijacija greške u predikciji, R<sup>2</sup><sub>acc</sub>—kumulativna vrednost R<sup>2</sup>; Q<sup>2</sup><sub>acc</sub>—kumulativna vrednost Q<sup>2</sup>

### 7.3. Prilog 3: Kandidati dobijeni na osnovu modela LiNDH-2 i HDQ derivata

**Tabela 5p:** Lista jedinjenja dostupnih kandidata za *in vitro* testiranja mikrobicidne aktivnosti na lajšmanije korišćeni u ovoj studiji.

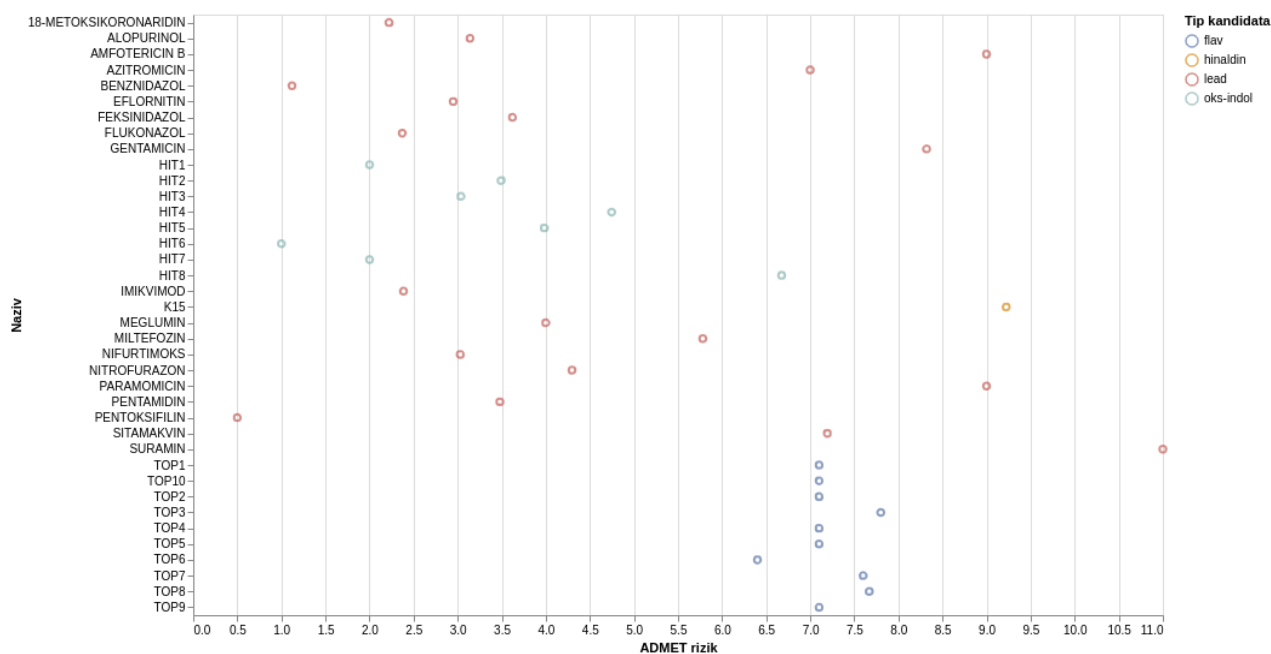
Redni broj	Struktura	Redni broj	Struktura
1		13	
2		14	
3		15	
4		16	
5		17	
6		18	
7		19	



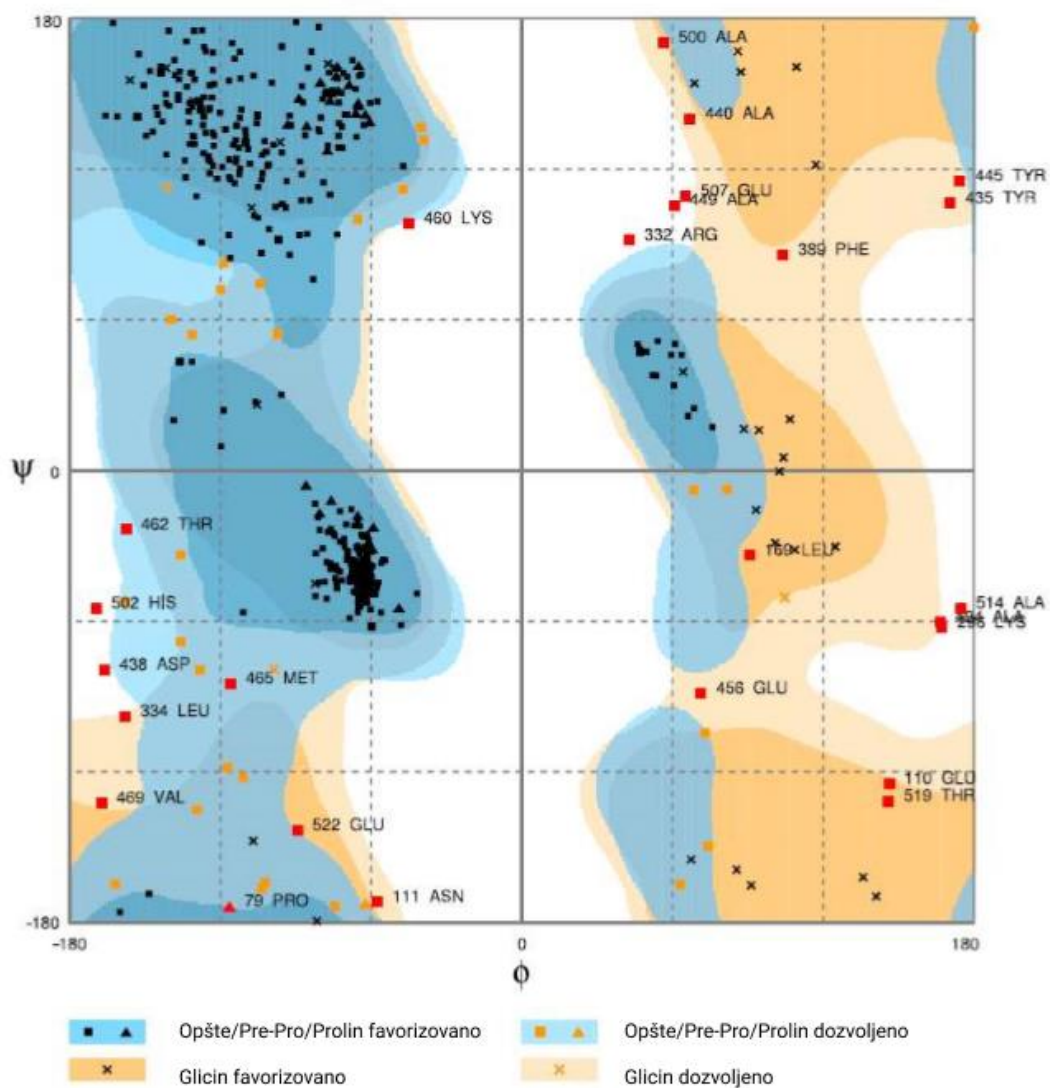
Redni broj	Struktura	Redni broj	Struktura
8		20	
9		21	
10		22	
11		23	
12			

Kraj Tabele 5p.

#### 7.4. Prilog 4: Raspodela ADMET rizika za kandidate koji su testirani *in vitro* i referentne terapeutike sa potvrdom o eksperimentalnoj aktivnosti na lajšmanije iz ChEMBL/DrugBank



**Slika 6p.** Raspodela ADMET rizika za terapeutike, eksperimentalna jedinjenja (ChEMBL, DrugBank) i jedinjenja kandidata za *in vitro* testiranje. Kandidati sa nazivom TOP (1-10) odnose se na hemijski tip flavonoida, a označeni su sa flav (teget). Kandidati sa nazivom HIT (1-8) odnose se na derivate oksadiazola i indolizina i označeni su sa oks-indol (plavo); Kandidat broj 15, skarčeno – K15 je derivat hinaldina (narandžasto). Jedinjenja terapeutika (ukupno 19) imaju oznaku za vodeće jedinjenje – lead (crveno).

7.5. Prilog 5: *Ramachandran*-ova mapa za dobijeni model *L*NDH-2Slika 7p. *Ramachandran*-ov dijagram za *L*NDH-2 model.

## **Biografija kandidata**

Strahinja Stevanović rođen je 28. novembra 1990. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovno školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Osnovne akademske studije na studijskom programu Diplomirani hemičar upisao je 2009/10. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Studije je završio sa prosečnom ocenom 8,19 (osam i 19/100), a završni rad pod nazivom „Metoda određivanja osobina malih molekula i njihova minimizacija u vodi” odbranio je 2. oktobra 2013. godine. Master akademske studije na studijskom program Master hemičar upisao je 2013/14. godine na Hemijskom fakultetu Univerzitetu u Beogradu. Studije je završio sa prosečnom ocenom 9.5 (devet i 50/100), a master rad pod nazivom „Postupak homolognog modelovanja dopaminskog D<sub>2</sub> receptora i procena kvaliteta modela” odbranio je 16. juna 2015. godine. Školske 2015/16 upisao je doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, na Katedri za farmaceutsku hemiju. Od septembra 2016. do 2018. radio je kao istraživač-pripravnik na Institutu za nuklearne nauke „Vinča” u laboratoriji za bioinformatiku i računarsku hemiju na projektu „Primena EIIP/ISM bioinformatičke platforme u otkrivanju novih terapijskih targeta i potencijalnih terapijskih molekula“ (br. projekta 173001). U tom periodu je učestvovao u evropskom programu za saradnju u domenu naučnih i tehničkih istraživanja - u okviru COST (engl. European Cooperation in Science and Technology) akcije CM1307 sa nazivom: „Targeted chemotherapy towards diseases caused by endoparasites“. Uspešno je obavio studentske boravke na Hemijskom institutu u Ljubljani, Slovenija, od 08. marta do 22. aprila 2016. godine i na Katedri za biotehnologiju, hemiju i farmaciju, Univerzitet u Sijeni, Italija, od 1. do 31. marta 2017. Pohađao je trodnevnu praktičnu školu računarskog dizajna anti-parazitskih lekova i *in silico* skrininga u organizaciji COST akcije CM1307, u Sijeni, Italiji.

**Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:**

1. **Stevanovic S.**; Sencanski M.; Danel M.; Menendez C.; Belguedj R.; Bouraiou A.; Nikolic K.; Cojean S.; Loiseau P. M.; Glisic S.; Baltas M. and García-Sosa A. T. Synthesis, *in silico*, and *in vitro* evaluation of anti-leishmanial activity of oxadiazoles and indolizine containing compounds flagged against anti-targets. *Molecules* 2019, 24: 2182 (M22)
2. **Stevanovic S.**; Perdih A.; Senčanski M.; Glišić S.; Duarte M; Tomás A. M.; Filipa V. Sena F. V.; Sousa F. M.; Pereira M. M. and Solmajer T. *In silico* discovery of a substituted 6-methoxy-quinolidine with leishmanicidal activity in leishmania infantum. *Molecules* 2018, 23: 772; (M22)
3. Glisic, S.; Sencanski, M.; Perovic, V.; **Stevanovic S.**; Garcia-Sosa, A.T. Arginase flavonoid anti-leishmanial *in silico* inhibitors flagged against anti-targets. *Molecules*, 2016, 21(5): 589. (M22)

**Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima:**

1. **Stevanovic S.**; Perdih A.; Glisic, S.; Solmajer, T. Design of novel NADH dehydrogenase inhibitors as antileishmanial agents. Presented at the 3 rd COST 1307 Action Conference, Madrid, Spain, Oct. 24-26, 2016. (M33)
2. **Stevanovic. S.**; Glisic, S.; Sencanski, M.; Mori, M.; Botta M. Study of leishmanial type II NDH2 dehydrogenase inhibition mechanism using molecular dynamics (MD). Poster presented at the 2 nd training school, COST 1307 Action, Siena, Italy, May 19-21, 2017. (M34)
3. **Stevanovic S.** Discovery of the phenolic monoterpene carvacrol binding sites in the nicotinic acetylcholine receptors (ion gated channels) within parasitic nematode. COST Action CM1307, Joint COST Action CM1307 2nd Conference / WG2 and WG3 Meetings. (M34)

## Izjava o autorstvu

Ima i prezime autora **Strahinja Stevanović**

Broj indeksa **6/15**

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

***In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania spp.***

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celosti 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 autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, \_\_\_\_\_

**Potpis autora**

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Strahinja Stevanović**

Broj indeksa **6/15**

Studijski program **doktor medicinskih nauka – farmacija**

Naslov rada ***In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania* spp.**

Mentori **dr sc. Katarina Nikolić**, vanredni profesor Univerziteta u Beogradu – Farmaceutuskog fakulteta i **dr sc. Milan Senčanski**, viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke Vinča

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 vezani za dobijanje akademskog naziva doktor 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.

U Beogradu, \_\_\_\_\_

**Potpis autora**

\_\_\_\_\_



## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

***In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania* spp.**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la 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/la.

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).

U Beogradu, \_\_\_\_\_

**Potpis autora**

\_\_\_\_\_

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.