

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**Tvorba virtuální knihovny syntetických látek
pro praktické využití v molekulově modelovací studii**

Diplomová práce

Jitka Vávrová

Vedoucí práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

Prohlášení autora:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 14. 5. 2021

.....

Jitka Vávrová

Poděkování

V souvislosti s vypracováním diplomové práce bych ráda poděkovala své školitelce PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. za její rady a podporu. Dále svým rodičům Haně a Miroslavovi za to, že mi byli oporou a motivací studium dokončit. Poděkování patří i doc. PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. za výuku předmětu Základy molekulového modelování léčiv a PharmDr. Martinovi Juhásovi za podporu při vypracování experimentální části diplomové práce.

Tato kvalifikační práce vznikla za podpory grantu SVV 260 547.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Pracoviště: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Diplomant: **Jitka Vávrová**

Vedoucí práce: **PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.**

Název práce: **Tvorba virtuální knihovny syntetických látek pro praktické využití v molekulově modelovací studii**

Návrh a vývoj léčivé látky je proces vyžadující analýzu velkého množství dat. Vytvoření virtuální knihovny syntetických látek poskytuje přístup k primárním údajům ohledně struktury sloučenin, výsledků studií biologické aktivity a molekulovým deskriptorům nezbytným pro predikci podobnosti léčivým látkám. Chemické databáze nacházejí své uplatnění ve virtuálním screeningu, který představuje moderní strategii počítačem asistovaného návrhu léčiv (z angl. Computer Assisted Drug Design, CADD). Molekulové dokování je jednou z možných metod.

Databáze byla vytvořena v programu Microsoft Excel a zahrnuje různé strukturní typy sloučenin, např. deriváty pyrazinu, rhodaninu, thiazolidin-2,4-dionu a 1,2,4-oxadiazolu, které byly připraveny v rámci výzkumné skupiny Návrh a vývoj nových antimikrobiálních léčiv. Molekuly jsou dostupné v řádkovém zápisu vhodném pro molekulové dokování.

Pro ukázkou konkrétního využití této databáze byla provedena molekulově modelovací studie v programu Molecular Operating Environment (MOE). Bylo provedeno molekulové dokování se třemi potenciálními cílovými molekulami pro léčivé látky (lidskou aldosareduktasou, mykobakteriálními enzymy β -hydroxyacyl-ACP dehydratasou a tyrosinfosfát-fosfatasou B). Cílem studie bylo zkoumání interakcí a skóre jednotlivých malých molekul. Výsledky ukázaly na některé sloučeniny, kterým by v následném výzkumu mohla být věnována větší pozornost.

Byla vytvořena virtuální knihovna obsahující celkem 317 sloučenin. Její výhodou je možné následné využití pro akademické a vědecké účely, např. pro budoucí molekulově modelovací studii nebo jiné přístupy CADD.

Abstract

Charles University, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: **Jitka Vávrová**

Supervisor: **PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.**

Title of Diploma Thesis: **Creation of a virtual library of synthetic compounds for practical use in a molecular modelling study**

Drug development is a process requiring the analysis of a large amount of data. Creating a virtual library of synthesized compounds provides access to primary data concerning structure, results of biological activity studies, and molecular descriptors necessary for drug-like prediction. Chemical databases are usually used in virtual screening, which is a modern strategy of Computer Assisted Drug Design (CADD). Molecular docking is one of the methods.

Microsoft Excel was used to create the database, which includes different structural types, e.g., pyrazine, rhodanine, thiazolidin-2,4-dione, and 1,2,4-oxadiazole derivatives prepared in the research group Design and Development of New Antimicrobial Agents. Molecules are available in a spreadsheet containing all compounds in a line-notation ready-to-dock format.

To demonstrate this database's actual usage, a molecular modelling study was performed using the software Molecular Operating Environment (MOE). This study included molecular docking with three selected potential drug targets (human aldose reductase, mycobacterial β -hydroxyacyl-ACP dehydratase and mycobacterial phosphotyrosine phosphatase B). The aim of the study was to examine interactions and score of individual small molecules. Results emphasized compounds that could be of interest to upcoming real screening.

The virtual library of total 317 compounds was created and can be used for academical and scientific use, e.g., for a future molecular modelling study or for other CADD approaches.

1 Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
2 Úvod a cíl práce	8
3 Teoretická část	9
3.1 Chemoinformatika	9
3.1.1 Historie tvorby knihoven látek.....	9
3.1.2 Databázové zdroje v chemii.....	10
3.1.3 Zobrazení sloučenin	11
3.1.4 Molekulové deskriptory	15
3.1.5 Pravidla pro predikci vlastností léčivých látek	18
3.1.6 Hit molekuly, lead-likeness, drug-likeness	20
3.2 Molekulové modelování	22
3.2.1 Molekulová mechanika	22
3.2.2 Kvantová mechanika.....	22
3.2.3 Využití metod.....	23
3.2.4 Konformační analýza	23
3.2.5 Počítačem asistovaný návrh léčiv	25
3.3 Molekulové dokování	27
3.3.1 Obecné schéma dokovacího procesu	28
3.3.2 Umístění a vyhledávací algoritmus.....	28
3.3.3 Skórovací funkce	28
4 Metodická část	30
4.1 Tvorba virtuální knihovny látek	30
4.1.1 Ukázka tvorby vstupu do databáze – sloučenina č. 64 – CH0aa	32
4.1.2 Legenda tabulky.....	33
4.2 Molekulově modelovací studie.....	36

4.2.1	Příprava ligandu a receptoru	37
4.2.2	Dokování a validace.....	37
4.2.3	Hodnocení výsledků dokování.....	38
5	Experimentální část.....	39
5.1	Statistika databáze	39
5.1.1	Aktivní a neaktivní sloučeniny (M. TBC)	39
5.2	Molekulové dokování	43
5.2.1	Dokování pyrazinových analog chalkonů do enzymu β -hydroxyacyl-ACP dehydratasa z <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43
5.2.2	Dokování derivátů kyseliny rhodaninoctové a derivátů thiazolidin-2,4-dionu do enzymu aldosareduktasa ALR2.....	50
5.2.3	Dokování všech sloučenin z virtuální knihovny látek do enzymu mykobakteriální tyrosinfosfát proteinfosfatasa B	61
6	Závěr	70
7	Literatura.....	71
	Seznam použitých zkratk	78
	Seznam obrázků.....	80
	Seznam tabulek.....	82

2 Úvod a cíl práce

Návrh a vývoj léčivých látek je dlouhodobý proces, během kterého dochází zpravidla k nashromáždění velkého množství dat. Tvorba virtuální knihovny látek je jedním z chemoinformatických přístupů, který umožňuje tato data roztřídit, uložit, vyhledávat v nich a sdílet je mezi pracovními skupinami. Jednou z praktických možností uplatnění virtuální knihovny látek je její využití pro virtuální screening. Hlavní metodou pro tento přístup je tzv. molekulové dokování.

Cílem teoretické části práce bylo shrnout poznámky o tvorbě chemických databází a získat přehled o jejich následném využití. Byla provedena stručná rešerše o metodě molekulového modelování. Cílem experimentální části bylo navrhnout a vytvořit funkční knihovnu chemických molekul založenou na látkách reálně dostupných v rámci výzkumné skupiny Návrh a vývoj nových antimikrobiálních léčiv. Část látek byla tímto způsobem zpracována již v předchozí práci Legae G. B. Kebakuile.¹

Práce obsahuje i ukázkou využití této knihovny prostřednictvím molekulově modelovací studie vybraných sloučenin z databáze. Cílové molekuly pro virtuální screening byly navrženy na základě předchozích zkušeností a literární rešerše.

3 Teoretická část

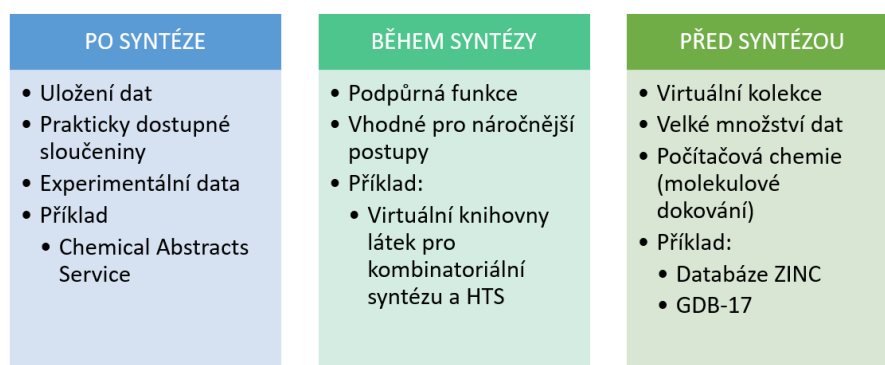
3.1 Chemoinformatika

Návrh a vývoj léčivých látek je dlouhodobým procesem, který vyžaduje zpracování velkého množství dat.² Touto problematikou se blíže zabývá chemoinformatika, věda spojující přístupy chemie a výpočetní techniky. Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) ji definuje jako vědu o zacházení, třídění, ukládání, vyhledávání a vyhodnocování informací o chemických látkách; tyto informace jsou následně využívány k analýze, získávání a extrahování dat nebo ke strojovému učení.³

3.1.1 Historie tvorby knihoven látek

Počátky chemoinformatiky jsou často spojovány s využitím kombinatoriální chemie pro návrh a vývoj léčivých látek. Principem je syntéza velkého množství sloučenin tvořících kombinatoriální knihovnu látek. Následně dochází k testování aktivity velkého množství sloučenin vůči cílové molekule, především metodou tzv. screeningu s vysokou propustností (High-Throughput Screening; HTS).⁴

Původně listinné databáze chemických sloučenin často vznikaly jako výstupy po provedení syntézy a publikaci výsledků. Nejznámějším příkladem je referátový časopis Chemical Abstracts, který je nyní dostupný v rámci platformy SciFinder. Virtuální kolekce chemických látek začaly vznikat na podporu kombinatoriální syntézy, jako podklady pro HTS a případnou opětovnou syntézu některého z produktů. Postupně začal návrh *in silico* databázových systémů hrát důležitou úlohu již ve fázi před zahájením syntézy látek. Mezi výhody tohoto postupu patří snížení nákladů spojených se syntézou látek a využití databází pro metody počítačové chemie. Některé databáze si kladou za cíl charakterizaci tzv. chemického prostoru. Stručný vývoj byl shrnut na Obr. 3-1.^{4,5}



Obrázek 3-1 Postupný vývoj vytváření knihoven chemických sloučenin

3.1.2 Databázové zdroje v chemii

Databáze představují organizované kolekce dat. Základem je obvykle jejich zpracování do tabulky. Informace o konkrétní látce jsou ukládány ve formě záznamů (představují řádky tabulky), ke kterým náleží definovaná sada polí (představují sloupce). Každému záznamu je přiřazen tzv. primární klíč, který záznam jednoznačně identifikuje, např. identifikační číslo nebo kód. Podle tohoto primárního klíče lze záznam vyhledat nebo na něj jednoduše odkazovat. V oblasti vědeckých článků je obecně používán tzv. DOI (Digital Object Identifier), sloužící k jednoznačné identifikaci umístění dokumentu na webu.⁶

Databázové zdroje je možné rozdělit např. na plnotextové, bibliografické a faktografické. Plnotextové (fulltextové) databáze představují sadu dokumentů, jež je možné díky indexaci jednoduše prohledávat. Databáze jsou provozovány nejčastěji vydavatelstvími, patentovými úřady, případně veřejnými institucemi. Obsahují primární zdroje informací, tedy nejčastěji články referátových časopisů, vědecké patenty, kvalifikační práce, atd. Přístup k plným textům pak může být omezen předplatným nebo příslušností k vědecké nebo vzdělávací instituci.⁶ Jedná se např. o Wiley Online Library nebo SpringerLink.^{7,8}

Bibliografické (citační) zdroje poskytují seznam informací o publikacích. Každý konkrétní článek charakterizují bibliografickými údaji – jménem autora, názvem časopisu, rokem vydání, ročníkem a číslem časopisu, počtem stránek apod. Bibliografické databáze většinou neposkytují plné znění publikace, ale často jsou propojeny odkazem na plnotextovou databázi. Bibliografické databáze představují např. Web Of Science a Scopus.^{9,10}

Faktografické databáze extrahují konkrétní fakta ze sekundárních a primárních zdrojů. Ve farmaceutické chemii to mohou být např. informace o chemických sloučeninách, jejich vzorce, molekulové deskriptory, fyzikální a spektrální data, návrhy syntézy, případné údaje o biologické aktivitě a farmakologických vlastnostech. Faktografické databáze patří mezi terciární zdroje informací.⁶ Příklady představují PubChem a SciFinder.^{11,12}

V současnosti se jednotlivé druhy databází překrývají a poskytovatelé databázových serverů v oblasti chemie se snaží nabízet co největší množství informací a rozmanité nástroje pro vyhledávání, analýzu i export dat.^{6,13}

3.1.2.1 Příklady databází zaměřených na sloučeniny

Následující přehled byl zvolen vzhledem k tématu a využití v diplomové práci, databází je samozřejmě mnoho a podrobnosti o nich lze dohledat v již zpracovaných přehledových člancích.^{6,14} U každé databáze je uvedena její internetová doména, poskytovatel a údaj o počtu

sloučenin, ve kterém jsou zahrnuty organické a anorganické, případně organokovové sloučeniny. Nejsou uvedeny počty sekvencí DNA.

**Tabulka 3-1 Dostupné databáze sloučenin
Komerční**

Databáze, doména	Poskytovatel	Počet sloučenin
SciFinder scifinder.cas.org	American Chemical Society	178 milionů ¹⁵
Reaxys reaxys.org	Elsevier	> 148 milionů ¹⁶

Volně dostupné

Databáze, doména	Poskytovatel	Počet sloučenin
PubChem pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	National Center for Biotechnology Information	109,8 milionů ¹⁷
CHEMBL ebi.ac.uk/chembl/	European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute	2 miliony ¹⁸
ZINC zinc.docking.org	University of California, San Francisco, USA	230 milionů (3D) 750 milionů (2D) ¹⁹
GDB-17 gdb.unibe.ch/downloads/	University of Berne, Switzerland	166,4 miliard ²⁰

Z dalších databází využívaných ve farmaceutické chemii a zaměřujících se především na malé molekuly lze uvést např. Enamine, Cambridge Structural Database nebo ChemSpider. Všechny údaje potřebné pro návrh léčiv většinou nelze najít v jedné databázi, a proto je výhodné prohledávat více zdrojů a zároveň informace (např. o chemické struktuře, stereochemii, tautomerii) ověřovat a kriticky posuzovat.¹⁴

3.1.3 Zobrazení sloučenin

Pro zápis sloučenin do virtuálních databází se obvykle používá 2D a 3D formát. Dále byly vyvinuty tzv. lineární zápisy, které se zabývají převedením sloučenin do jednoduchých řádkových zápisů (1D).

3.1.3.1 2D zobrazení sloučenin

Dvojměrný zápis sloučenin lze označit také jako topologický, protože vychází ze spojování atomů přímkami, které znázorňují vazby, čímž je charakterizována topologie molekuly. Příkladem 2D zobrazení může být kreslení struktur na papír, *in silico* jsou poté využívány sofistikované programy, jako např. ACD/ChemSketch²¹ nabízející volně dostupnou i komerční verzi, komerční ChemDraw Professional a ChemDoodle.^{22,23} Tyto programy fungují na bázi algoritmů a nástrojů kreslení, umožňují vytvořit systematický název sloučeniny a vypočítat některé deskriptory.^{2,24}

3.1.3.2 3D zobrazení sloučenin

Prvními 3D zpodobněními chemických sloučenin byly pravděpodobně molekulové modely vytvářené pomocí drátků a korálků, dále pomocí chemických stavebnic. Dnes mohou být generovány výpočetně, při čemž jsou relativní pozice atomů vytvořeny přiřazením hodnot v kartézském systému souřadnic. 3D zobrazení molekul je možné získat experimentálně, jako např. metodou rentgenové krystalografie, NMR spektroskopie nebo 3D elektronové mikroskopie. *Teoretický a* experimentální přístup lze kombinovat, k sestavení 3D obrazu lze využít knihovnu 3D fragmentů a jejich následnou kompilaci. Dalším způsobem je metoda homologního modelování na základě podobnosti již popsané 3D struktury enzymu.^{25,26}

3D obrazy struktur se dále využívají pro různé metody počítačového návrhu léčiv. Jejich správné sestavení se poté odráží na kvalitě výsledků molekulově-modelovacích studií.²⁵

3.1.3.3 Lineární zápisy sloučenin

S rozvojem chemoinformatických přístupů docházelo i ke snaze charakterizovat molekuly jednoduchými zápisy, které by umožňovaly vyhledávání struktur, ukládání do databází a přenášení mezi jednotlivými počítačovými aplikacemi. Lineární zápisy vychází z tzv. spojovacích tabulek (z angl. connection tables), které umožňovaly zakódovat zápis molekuly do formy tabulky, ve které byly označeny jednotlivé atomy, jejich vazby a pořadí těchto vazeb.²⁷

Cílem linearizace bylo zjednodušeně zapsat strukturní vlastnosti molekuly do jednoho řádku, který by umožňoval snadné ukládání a přenos dat. Mezi příklady systémů pro lineární zápis molekul patří SMILES, InChI, InChI Key a SMARTS.²⁷

3.1.3.3.1 SMILES

Název SMILES je akronymem pro Simplified Molecular Input Line Entry Specification a označuje systém vytvořený v 80. letech 20. století. Vychází z běžného zapisování sloučenin do řádku (např. CH₃-CH₂-CH₂-CH₃), tento formát však dále zjednodušuje. Atomy se v kódu označují svými symboly, je možné je umístit do hranatých závorek a specifikovat u nich počet vodíků, náboj a izotop, např. [CH₄] nebo [Zn⁺⁺]. Prvky patřící do tzv. organické podmnožiny je však dovoleno psát s vynecháním hranatých závorek a počtu vodíků, pokud počet připojených vodíků nebo jiných atomů odpovídá jejich definované vaznosti. Atomy v aromatických sloučeninách se píšou malými písmeny. Větvení atomů je značené kulatými závorkami. U cyklických struktur se pro zápis používá jejich rozpojení – chybějící vazba je vyznačena číslicí. Znázornění typů vazeb je uvedeno v tabulce, jednoduché vazby je možné vynechávat. Systém umí zaznamenat i izomerii na dvojně vazbě pomocí symbolů / a \ a stereoizomerii v případě sp³ uhlíků pomocí znaku @ vyjadřujícího orientaci proti směru hodinových ručiček a @@ po směru hodinových ručiček, viz Tab. 3-2.^{27,28}

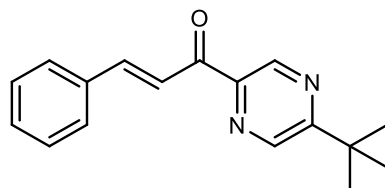
Tabulka 3-2 Vyjádření vazeb v systému SMILES

Typ vazby	symbol
jednoduchá	-
dvojná	=
trojná	#
aromatická	:

Nevýhodou systému je, že pro jednu sloučeninu může existovat více různých typů zápisů. Např. pro benzen lze získat celkem tři typy zápisu – s použitím malých písmen (c1ccccc1), ve formě Kekulého vzorce (kombinace jednoduchých a dvojných vazeb C1=CC=CC=C1) a s využitím znázornění aromatické vazby pomocí dvojtečky (C:1:C:C:C:C1). Problém také nastává při zápisu, pokud sloučeninu čteme zleva doprava a následně obráceně – dojdeme ke dvěma různým zápisům, které jsou ale formálně správné. Situaci zlepšilo využití tzv. kanonického formátu SMILES, který nastavuje pravidla očíslování atomů sloučeniny, aby došlo k získání pokaždé stejného zápisu pro jednu chemickou entitu.²⁷

Výhodou je naopak jeho srozumitelnost a dostupnost. Původní verze sice nebyla zamýšlena k volnému užití, ale aktualizovaná forma OpenSMILES ano.²⁹ Dále lze SMILES využívat pro přesun zápisu sloučeniny mezi aplikacemi. Editory grafické podoby struktur umožňují převádění mezi SMILES zápisem a nákresem sloučeniny. Patří sem programy jako např. ChemDraw, ale také grafické editory, které bývají součástí programů pro molekulové

modelování. Příklad kódu SMILES (Obr. 3-2) byl vytvořen pomocí programu ChemDraw Professional, který preferuje zápis benzenových jader ve formě Kekulého vzorce.



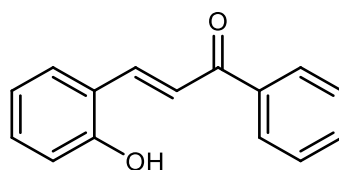
O=C(/C=C/C1=CC=CC=C1)C2=NC=C(C(C)(C)C)N=C2
(E)-1-(5-*tert*-butylpyrazin-2-yl)-3-fenylprop-2-en-1-on.

Obrázek 3-2 Příklad konkrétního zápisu SMILES z databáze: Sloučenina CH1b.

3.1.3.3.2 InChI

InChI (International Chemical Identifier) je formátem lineárního zápisu, který vznikl ve spolupráci organizací IUPAC a NIST. Objevil se okolo roku 2005, ve snaze o vytvoření objektivního identifikátoru sloučeniny, který popisuje její strukturu a zároveň je unikátní pro každou sloučeninu. Dalším rozdílem oproti SMILES je, že byl od začátku navrhován jako volně dostupný systém – zdrojový kód InChI software je volně ke stažení.³⁰

Jedná se o kanonický systém, který strukturu popisuje do detailu a umožňuje i porovnávání struktur. Číslování atomů postupuje podle sumárního vzorce, pro uvedenou sloučeninu jsou číslovány uhlíky 1–15, kyslíky 16 a 17. Vodíkům se čísla nepřirazují. Identifikátor se dělí do vrstev (layers), které se oddělují lomítkem. InChI musí povinně obsahovat vrstvy sumárního vzorce, konektivity (c) a vodíků (h). Nepovinný je zápis vrstvy stereochemie (může obsahovat podvrstvu t pro tetrahedrická centra, podvrstvu b pro izomerii na dvojně vazbě), dále vrstvy náboje (q), protonace (p) a další.³¹



(E)-1-fenyl-3-(2-hydroxyfenyl)-prop-2-en-1-on

InChI=1S/C15H12O2/c16-14-9-5-4-8-13(14)10-11-15(17)12-6-2-1-3-7-12/h1-11,16H/b11-10+

↓
sumární vzorec

↓
c – konektivita

↓
h – vodíky

↓
označení systému Standard InChI

↓
stereochemie

Obrázek 3-3 Příklad konkrétního zápisu SMILES z databáze: Sloučenina Ac0c.

Výhodou systému InChI je jeho unikátnost pro jednotlivé sloučeniny, volná dostupnost, charakterizace systému do detailu a jeho neustálý vývoj. Samotní tvůrci však přiznávají některé limity – ne všechny typy stereochemie a tautomerie lze v InChI zaznamenat, pro velké molekuly jako např. monoklonální protilátky systém nefunguje zatím vůbec. Konverze mezi grafickým nákresem sloučeniny, InChI a opětovným vytvořením grafického nákrese nebyla původně zamýšlena, přesto ji lze provést; výsledky konverze však nemusí být totožné. Oproti SMILES je uživatelsky méně čitelný a obsahuje větší počet znaků. Hašováním InChI vznikl identifikátor InChI Key.^{27,31}

3.1.4 Molekulové deskriptory

Molekulové deskriptory popisují vlastnosti molekuly pomocí matematických hodnot, které jsou vyjádřeny zpravidla číselně. Podle definice IUPAC se jedná o parametry, které charakterizují specifické strukturní nebo fyzikálně-chemické aspekty sloučenin.³² Deskriptory jsou důležitým nástrojem chemoinformatiky a umožňují kvantitativně hodnotit a porovnávat vlastnosti molekul matematickými a statickými metodami.

Deskriptory molekul vychází z matematické teorie grafů, či z chemických odvětví (fyzikální, kvantová, organická chemie). Využití nacházejí především ve farmaceutické chemii k predikci farmakokinetických parametrů léčiva v organismu. Při vývoji léčiv je možné využít deskriptory pro modelování QSAR, tedy kvantitativních vztahů mezi aktivitou a strukturou a obdobně QSPR, kvantitativních vztahů mezi vlastností a strukturou. Při obou metodách dochází k využití statistiky a analýzy dat k vytvoření predikčních modelů pro předpovídání biologické aktivity a vlastností látek. Deskriptory také slouží jako parametry vyhledávání a filtrování v knihovnách chemických látek.³³

3.1.4.1 Rozdělení

Molekulové deskriptory lze rozdělit do dvou základních skupin – **fyzikálně-chemické** deskriptory, které vycházejí z experimentálního měření (např. $\log P$, molární refraktivita), a **teoretické deskriptory**, které se odvíjí od způsobu reprezentace molekuly. Teoretické deskriptory lze dále klasifikovat podle počtu dimenzí dané reprezentace (např. 0D, 1D, 2D, 3D, 4D deskriptory). Rozřazení je nutno vnímat pouze orientačně, neboť některé fyzikálně-chemické deskriptory mohou být teoreticky predikovány, jako např. $c\log P$.^{33,34}

Výpočet teoretických deskriptorů je výhodný pro svoji rychlost, časovou dostupnost i relativně nízkou cenu, která se odvíjí od použitého nástroje (ruční výpočet, kalkulátor, počítačový program). Experimentálně získané deskriptory mohou přinášet jedinečné informace

o molekule, ale mohou je doprovázet statistické odchylky v přesnosti nebo ovlivnění podmínkami experimentu. Molekulové deskriptory by měly splňovat jisté požadavky – nezávislost na číslování atomů (případně by měly využít kanonické číslování), nezávislost na pozici sloučeniny v prostoru, jasná definice deskriptoru a jeho jednotek, nabývání vhodné číselné hodnoty (možná je úprava např. logaritmicací).³³

3.1.4.2 Příklady molekulových deskriptorů

V praktické části této diplomové práce byly použity výpočty molekulárních deskriptorů, které byly získané v programech ChemDraw Professional a Molecular Operating Environment (MOE).^{35,36}

1. Relativní molekulová hmotnost

Patří do skupiny tzv. 0D deskriptorů, pro jejichž výpočet je používán sumární vzorec. Jedná se o sumu relativních atomových hmotností všech atomů v molekule.

2. Počet atomů

Vyjadřuje celkový počet atomů v molekule.

3. Počet těžkých atomů

Vyjadřuje celkový počet atomů v molekule kromě atomů vodíku.

4. Molární refraktivita

Míra celkové polarizovatelnosti 1 molu látky, je závislá na refraktivním indexu (n), hustotě (ρ) a molekulární hmotnosti (MW). Molární refraktivita souvisí s objemem molekuly, ale také s Londonovými disperzními silami, které hrají roli v interakci léčiv s biologickými cíli.³⁴

$$MR = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \frac{MW}{\rho}$$

5. Vypočtená molární refraktivita

Jedná se o fyzikálně-chemický deskriptor odvozený od molární refraktivity.³³ Pro potřeby virtuální knihovny byla vypočtena na základě lineárního modelu vycházejícího z jedenácti deskriptorů navrženého autorem programu MOE Labutem.³⁷

6. Počet akceptorů vodíkové vazby – HBA (Hydrogen-bond acceptor)

Akceptorem vodíkové vazby je volný elektronový pár na elektronegativním atomu. Mezi skupiny nesoucí silné HBA patří karboxylátová skupina, mezi středně silné karboxyl, hydroxyl, terciární amin nebo keton, mezi slabé alkylsulfanylová skupina a další.²

7. Počet donorů vodíkové vazby – HBD (Hydrogen-bond donor)

Donorem vodíkové vazby je atom nesoucí parciální kladný náboj, zpravidla vodík navázaný na elektronegativní atom. Příklady skupin nesoucích HBD jsou hydroxyskupiny, thiolové skupiny, primární, sekundární a protonované aminoskupiny. Některé z nich (–OH, –NH₂ apod.) mohou vystupovat jako HBA i HBD.²

8. Počet volně otáčivých vazeb – NRot (Number of rotatable bonds)

9. Polární povrch – PSA (Polar surface area)

Polární povrch molekuly je definován jako suma ploch polárních atomů. Jedná se např. o atomy kyslíku, dusíku, síry a k nim připojených vodíků. Patří mezi 3D deskriptory a umožňuje predikci schopnosti pasivního transportu léčiva přes buněčné membrány. Konkrétní využití našel ve studiích intestinální absorpce léčiv nebo přechodu přes hematoencefalickou bariéru.³⁸

10. Topologický polární povrch – TPSA (Topological polar surface area)

Teoretický deskriptor analogický k polárnímu povrchu. K výpočtu využívá definované příspěvky jednotlivých fragmentů molekul, jeho výpočet je oproti PSA méně náročný na čas. Hodnoty ve virtuální knihovně byly vypočítány v jednotkách Å² podle postupu popsáno v publikaci Ertla *et al.*³⁸

11. Rozdělovací koeficient – *P* (Partition coefficient)

Fyzikálně-chemický deskriptor sloužící k charakterizaci lipofility molekuly. Používá se ve formě $\text{Log}P$, tedy dekadického logaritmu rozdělovacího koeficientu sloučeniny mezi organickou fází a vodnou fází.³⁹

12. Vypočtený $\text{Log}P$ ($\text{cLog}P$)

Deskriptor založený na $\text{Log}P$. Pro získání jeho hodnot byl použitý výpočet získaný metodou QSPR podle rozšířené Hückelovy teorie vyvinutý autorem programu MOE, Paulem Labutem.^{37,40}

13. Disociační konstanta K_a

Disociační konstanta se využívá k charakterizaci acidity a bazicity látek. Z důvodu neprakticky velkých čísel se jako deskriptor používá její záporný dekadický logaritmus, tedy pK_a .

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$
$$pK_a = -\log \frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]}$$

Znalost pK_a umožňuje vypočítat koncentraci ionizované a neionizované formy konkrétní látky při jakémkoliv pH.³⁹ Program MOE používá výpočet pK_a na základě rozšířené Hückelovy teorie definované Gerberem⁴¹, čímž vypočítává teoretický deskriptor h_pK_a .³⁷

3.1.5 Pravidla pro predikci vlastností léčivých látek

Vývoj nových léčivých látek je časově a finančně náročný proces. V souvislosti s rozvojem kombinatoriální chemie a HTS metod docházelo k syntéze a testování mnoha sloučenin, které však často mívaly zcela nevhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, které zapříčinily selhání léčiva ve fázi I klinického hodnocení. Proto byla navržena pravidla, která si dala za cíl posunout vývoj směrem k větší pravděpodobnosti získání léčivé látky.⁴²

Koncept „drug-likeness“ lze volně popsat jako pravděpodobnost stát se léčivem na základě podobnosti se stávajícími léčivy. Existují určité vlastnosti sloučenin, které jsou vnímány jako výhodné a předurčují léčivo k budoucí úspěšnosti v klinických studiích. Hledána je především korelace mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiva a následnými farmakokinetickými aspekty (průběh absorpce, distribuce, metabolismu, eliminace).³⁹

Následující pravidla představují doporučení a nejsou ultimátní. Jedná se však o rychlé nástroje, které jsou postavené na vypočítaných deskriptorech, což snižuje finanční a časovou náročnost na určení základních farmakokinetických charakteristik. Pravidla mohou pomoci při rozhodování ohledně plánování syntézy látek, procesu výběru kandidátů na základě HTS nebo při počítačovém návrhu léčiv. Pravidla se uplatňují jako filtry látek z velkých chemoinformatických databází.³⁹

3.1.5.1 Lipinského pravidlo pěti, Rule of Five (Ro5)

Základní pravidlo, také známé jako „Pfizer rule“, bylo popsáno v roce 1996 a týká se perorálně podávaných léčivých látek. Zabývá se faktory pro jejich absorpci a permeabilitu,

jelikož se jedná o první aspekty farmakokinetiky, se kterými se léčivo musí vypořádat pro dosažení svého účinku.

Pravidlo definuje charakteristické vlastnosti, jejichž číselná rozmezí jsou spojena s číslovkou pět. V původním znění: „*Vyšší pravděpodobnost výskytu nízké absorpce a permeace je u molekul, které nesou následující znaky:*

- *relativní molekulová hmotnost > 500*
- *LogP > 5 (nebo MLogP > 4,15)*
- *> 5 donorů vodíkových vazeb (vyjádřených jako suma OH a NH skupin)*
- *> 10 akceptorů vodíkových vazeb (vyjádřených jako suma O a N)“⁴²*

Pravidla byla určena na základě analýzy databáze obsahující léčivé látky a před zveřejněním byla několik let uplatňována ve firmě Pfizer. Ve původním znění nebyly zahrnuty mezi donory vodíkových vazeb thiolové skupiny (–SH), obdobně mezi akceptory nebyla zahrnuta suma S atomů.

Lipinského pravidlo stojí na silných teoretických základech – zvýšením molekulové hmotnosti se snižuje intestinální absorpce a průchod léčiva přes hematoencefalickou bariéru. Čím větší je molekula, tím větší solvatační obal se okolo ní musí utvořit, a dochází tak ke snížení rozpustnosti ve vodě. Podobně, vyšší LogP indikuje sníženou rozpustnost ve vodě a může také negativně ovlivnit pohyb léčiva v organismu. Vzhledem k rozdílným způsobům výpočtů LogP je pravidlo upraveno pro experimentálně zjištěné i vypočtené hodnoty (MlogP – výpočet LogP podle Moriguchiho, který využívá počty lipofilních a hydrofilních atomů a výpočet optimalizuje zohledněním jedenácti korekčních faktorů).⁴²

Pokud látka vytváří hodně vodíkových vazeb, zlepšuje se její rozpustnost ve vodě, ale zároveň tyto vazby musí být přerušeny, aby mohlo dojít k průchodu přes biologické membrány. Zároveň jsou tyto skupiny, donory a akceptory vodíkových vazeb, zpravidla potřebné pro interakci s cílovými molekulami léčiva. Mezi vlastnostmi léčiva je tedy vhodné nacházet rovnováhu. Porušení jedné zásady z Pravidla pěti neznamena automaticky neúspěch kandidátní látky; ale přímo úměrně počtu porušení se zvyšuje pravděpodobnost výskytu problémů v oblasti absorpce a permeace.³⁹

3.1.5.2 Veberova pravidla

V roce 2002 byla publikována studie Vebera *et al.*, která se zabývala vlastnostmi ovlivňujícími biologickou dostupnost po perorálním podání látek u potkanů. Termín biologická dostupnost je důležitým farmakokinetickým faktorem. Vyjadřuje procentuální poměr množství látky, které se dostane do systémového oběhu, oproti podanému množství. Autoři polemizují

nad důležitostí molekulové hmotnosti a zaměřují se spíše na flexibilitu molekuly související s počtem volně otáčivých vazeb, a další parametry, jako je PSA nebo celkový počet donorů a akceptorů vodíkových vazeb.

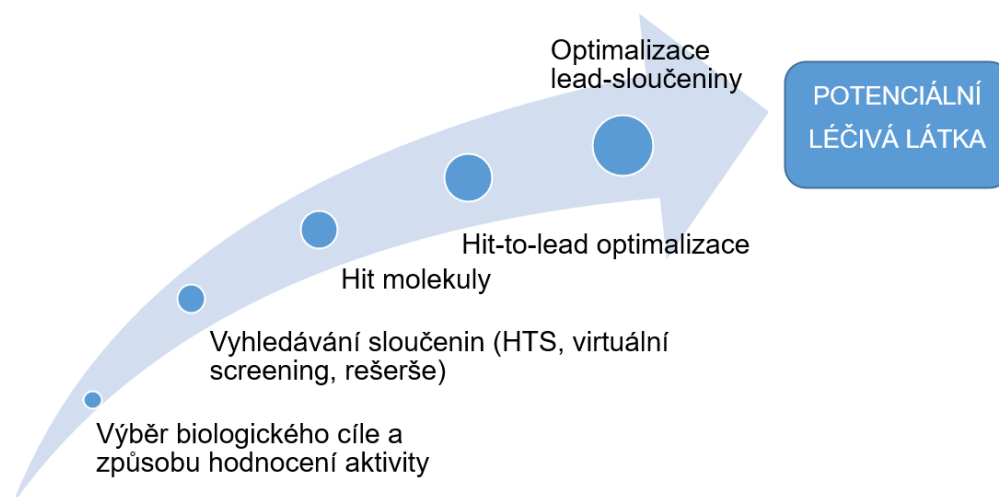
Veberova pravidla pro látky s vhodnou biologickou dostupností jsou následující:

- Počet volně otáčivých vazeb ≤ 10
- PSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$ nebo celkový počet akceptorů a donorů vodíku ≤ 12 ⁴³

Počty volně otáčivých vazeb nebo sumu akceptorů a donorů vodíku je možné spočítat ručně nebo pomocí software, pro výpočet PSA je využita metoda podle Ertla *et al.*³⁸ Velký polární povrch molekuly byl spojován s nízkou střevní absorpcí látek, vysoký počet volně otáčivých vazeb se snížením průchodu přes biologické membrány. Veberova pravidla jsou vnímána jako doplňující k Lipinského pravidlu.³⁹

3.1.6 Hit molekuly, lead-likeness, drug-likeness

Existují různé způsoby hledání nových potenciálních léčiv, jako jsou HTS metody, virtuální screening, vyhledávání mezi přírodními léčivy, rešerše vědecké literatury a další. Výstupem většiny těchto přístupů jsou tzv. hit molekuly, které obecně splňují požadované nároky – nejčastěji vykazují biologickou aktivitu.⁴⁴



Obrázek 3-4 Zjednodušené schéma vývoje nové léčivé látky, znázornění pojmů hit a lead

Z vyhledávání velkého množství sloučenin může vzejít nespočet hit molekul. Následujícím krokem může být třídění, při kterém dochází k selekci typů molekul, které jsou perspektivní k dalšímu testování. Pomocí chemických algoritmů lze látky rozřadit do skupin podle jednotlivých strukturních podtypů, případně lze vyloučit některé sloučeniny, které často

zkreslují výsledky screeningu.⁴⁴ Hit molekuly jsou považovány za základ pro výběr tzv. lead molekuly, někdy se pro tento proces úpravy používá termín hit-to-lead optimalizace.³⁹

Koncept „lead-likeness“ byl ustanoven po zavedení termínu drug-likeness a Lipinského pravidla pěti. Lead molekula (z angl. *lead* = vedení) představuje vedoucí strukturu, od které je možné odvodit potenciální kandidáty na novou léčivou látku. Při odvozování však dochází k přidávání dalších funkčních skupin, uhlovodíkových fragmentů nebo cyklů s cílem vylepšit účinnost a selektivitu. Tato další, tzv. lead optimalizace, vede k nárůstu velikosti molekuly a dalších souvisejících parametrů. Pokud byla počáteční molekula na hranici parametrů Lipinského pravidla pěti, po další optimalizaci již tato pravidla nespĺňovala a pravděpodobně se u ní vyskytly problémy s absorpcí nebo permeací. Proto byla pro lead molekuly postupně přijata vlastní pravidla, nejznámějším je Pravidlo tří (Rule of three).³⁹

Tabulka 3-3 Shrnutí vlastností lead-like a drug-like sloučenin, zpracováno podle Di *et al.*³⁹

Lead-like sloučeniny	Drug-like sloučeniny
<ul style="list-style-type: none"> • Předlohové látky, od kterých je odvozována kandidátní látka s lepšími vlastnostmi (účinnost, selektivita, farmakokinetika) • Po optimalizaci stále splňuje požadavky drug-likeness 	<ul style="list-style-type: none"> • Látky splňující všeobecně uznávané charakteristiky jako již zavedené léčivé látky • Vyšší pravděpodobnost splnění požadavků pro absorpci a permeaci
Pravidlo tří (Rule of three)	Pravidlo pěti (Rule of five)
Podle prací autorů: Oprea <i>et al.</i> ⁴⁵ , Congreve <i>et al.</i> ⁴⁶	Podle prací autorů: Lipinski <i>et al.</i> ⁴² , Veber <i>et al.</i> ⁴³
<ul style="list-style-type: none"> • MW ≤ 300 • ClogP ≤ 3 • NRot ≤ 3 • Počet HBD ≤ 3 • Počet HBA ≤ 3 • PSA ≤ 60 Å² 	<ul style="list-style-type: none"> • MW ≤ 500 • ClogP ≤ 5 • Počet HBD ≤ 5 • Počet HBA ≤ 10 • NRot ≤ 10 • PSA ≤ 140 Å²

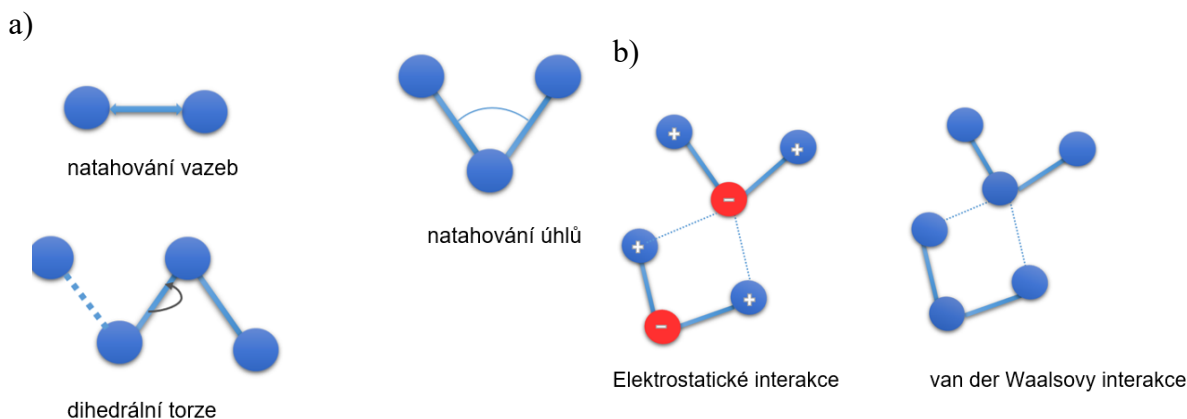
3.2 Molekulové modelování

Molekulové modelování (z angl. *molecular modelling*) se zabývá teoretickými a počítačovými způsoby, kterými můžeme napodobovat chování molekul a molekulových systémů. Definice IUPAC popisuje molekulové modelování jako zkoumání molekul a jejich vlastností pomocí počítačové chemie a grafických vizualizačních metod za účelem získání přijatelného 3D znázornění.⁴⁷

Molekulové modelování používá pro své výpočetní operace algoritmy, které umožňují vypočítat vlastnosti konkrétní molekuly. Tyto algoritmy využívají metody ze dvou fyzikálních odvětví – molekulové a kvantové mechaniky.²

3.2.1 Molekulová mechanika

Molekulová mechanika využívá rovnice na základě klasických fyzikálních zákonů, které aplikuje pouze na jádro, přičemž elektrony považuje za rovnoměrně rozprostřené okolo jádra. Výpočet na základě molekulové mechaniky je synonymem k výpočtu silového pole (z angl. *force field*) a vychází z předpokladu existence přirozených vazebných délek a úhlů, od kterých se molekuly odchyľují. Podle toho si můžeme atomy v molekule představit jako koule spojené pružinami. Silové pole znamená výpočet energie molekuly, která se skládá z vazebných příspěvků – natahování vazeb a úhlů, neplanárních a dihedralních torzí, ale také z nevazebných příspěvků – van der Waalsových a elektrostatických interakcí (Obr. 3-5).



Obrázek 3-5 Meziatomové interakce v molekulové mechanice, a) příspěvky vazeb, b) nevazebné příspěvky, podle Davise *et al.*⁴⁸

3.2.2 Kvantová mechanika

Kvantová mechanika využívá pro výpočty vlastností molekuly předpoklady kvantové fyziky. Oproti molekulové mechanice jsou jádra považována za nehybná; pozornost je věnována elektronům pohybujícím se okolo něj, což umožňuje vypočítat energii elektronů

odděleně. Existují dvě skupiny metod kvantové mechaniky – první skupina metod, tzv. *ab initio*, poskytuje podrobnější výpočty, neukládá žádná data, je časově náročnější, a proto omezena především na malé molekuly. Druhá skupina tzv. semiempirických metod se zabývá pouze valenčními elektrony, proto může být rychlejší a dostupná i pro velké molekuly, ale zároveň méně přesná.²

3.2.3 Využití metod

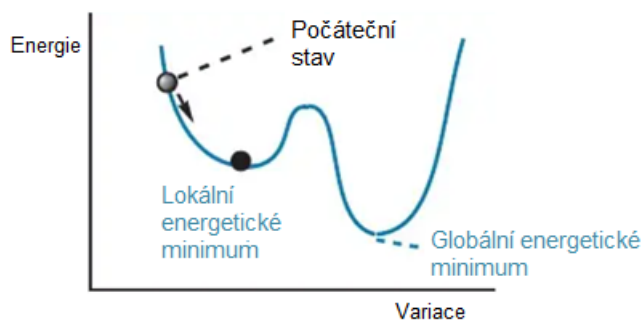
Příklady využití obou přístupů shrnuje Tab. 3-4.

Tabulka 3-4 Využití metod, zpracováno podle Patricka *et al.*²

Molekulová mechanika	Kvantová mechanika
<ul style="list-style-type: none"> • Energetická minimalizace • Hledání stabilní konformace • Výpočet energie pro konkrétní konformaci (např. aktivní konformaci léčiva) • Konformační analýza • Studium pohybu molekuly (molekulová dynamika) 	<ul style="list-style-type: none"> • Výpočet energie molekulových orbitalů • Parciální náboje atomů • Elektrostatické potenciály (rozložení elektronů v molekule) • Dipólové momenty

3.2.4 Konformační analýza

Každý 3D obraz molekuly zkonstruovaný v modelovacím programu by měl projít energetickou minimalizací, kdy dochází k úpravě délek vazeb, vazebných úhlů, torzních úhlů a nevazebných interakcí. Vzhledem k pouze mírným úpravám molekuly v případě energetické minimalizace obvykle dochází k nalezení nejbližšího energetického minima molekuly. Může se však jednat pouze o lokální energetické minimum, přičemž existuje i globální energetické minimum sloučeniny (Obr.3-6).



Obrázek 3-6 Lokální a globální energetické minimum, podle Patricka *et al.*²

Cílem konformační analýzy je vyhledání energeticky nejvýhodnějších konformací molekuly, pro něž je pravděpodobné, že se v nich molekula vyskytuje i v reálném (*in vivo*) prostředí.² Proto je možné generovat více konformací jedné molekuly a následně porovnávat jejich energii. Pro konformační analýzu existuje několik přístupů, které lze následně uplatnit i při molekulovém dokování.⁴⁹

3.2.4.1 Systematické vyhledávání

Otáčení jednotlivých vazeb vždy o definovanou velikost úhlu je systematický přístup, který umožňuje identifikovat všechny konformace molekuly. Celkový počet konformací se odvíjí od počtu otočitelných vazeb a velikosti úhlu, proces je tedy časově a výpočetně náročný, je možné ho zefektivnit vyfiltrováním zakrytých konformací nebo konformací s překryvy atomů. Po závěrečné energetické minimalizaci konformací mohou být výsledky uloženy do databáze.²

3.2.4.2 Stochastické přístupy – Monte Carlo, Metropolis, Genetické algoritmy

Stochastické přístupy využívají princip náhodného generování konformací. V případně zcela náhodného otáčení je stejný výpočetní čas věnovaný konformacím jak s vysokou i s nízkou energií. **Monte Carlo** je metoda, která po vytvoření každé náhodné konformace provede energetickou minimalizaci a výpočet energie konkrétní konformace. Energetické hodnoty se porovnají, stav molekuly s nižší energií se stává výchozí pro hledání další konformace. Tím umožňuje věnovat více výpočetního času konformacím v nižší energetické hladině. Nevýhodou je, že může dojít k zaměření pouze na určitou část konformačního prostoru, ve kterém se nemusí globální energetické minimum nacházet.^{2,49}

Metoda Metropolis (také známá jako *Simulated annealing*) byla vyvinuta s cílem zvýšení pravděpodobnosti nalezení globálního minima. Součástí metody je provedení několika cyklů vyhledávání pomocí algoritmu Monte Carlo. Dochází k simulaci chování molekuly v různých teplotních rozmezích a postupnému zaměřování metody na specifickou část konformačního prostoru s předpokládaným výskytem globálního energetického minima. Pro zvýšení přesnosti této metody je ideální cyklus se změnou teploty několikrát opakovat.^{2,49}

Genetické algoritmy jsou odvozeny od Darwinovy evoluční teorie. Na začátku je vytvořen set konformací, jejichž stabilita je následně ohodnocena pomocí metod molekulové mechaniky. Stabilnější konformace jsou vybrány jako „rodičovské“, následně dochází ke křížení, přičemž vazebné úhly konformací vystupují obdobně jako geny v chromozomu. U vznikající generace „potomků“ dochází k rekombinaci genů a bodovým mutacím.

Výhodnější konformace následně mohou sloužit jako další „rodičovská“ generace, proces může být opět opakován pro dosažení co nejstabilnější konformace.^{2,49}

3.2.4.3 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika se zaměřuje na simulaci pohybu atomů v rámci molekuly. Stejně jako v molekulové mechanice jsou atomy vnímány jako koule, se kterými program provádí simulaci jejich pohybu ve velmi krátkém definovaném časovém úseku (např. 1 femtosekunda). Následně je proces zastaven a je zhodnoceno zrychlení atomů a vypočteny délky vazeb, vazebné úhly, nevazebné interakce, apod. Časový rámec může být různý podle konkrétních záměrů experimentu, který je opět možné opakovat.^{2,49}

3.2.5 Počítačem asistovaný návrh léčiv

3.2.5.1 Definice a využití

Počítačem asistovaný návrh léčiv (Computer Assisted Drug Design, CADD) je disciplínou používající všechny počítačové techniky k objevu, návrhu a optimalizaci biologicky aktivních sloučenin s jejich možným využitím v podobě léčivých látek.⁴⁷

Možnosti CADD lze využít v různých stádiích vývoje léčivé látky. Mezi příklady patří především **virtuální screening** – z velkého množství sloučenin (např. virtuální knihovny látek) se snažíme získat podmnožinu pravděpodobně aktivních látek (hit molekul), které je možné poté experimentálně otestovat. Využívá konkrétní metody jako např. podobnostní vyhledávání, farmakoforové modelování, QSAR studie, molekulové dokování. Mezi další způsoby použití výpočetní techniky při návrhu a vývoji léčiv patří optimalizace lead sloučeniny nebo *de novo* design²⁴

3.2.5.2 Základní rozdělení

Počítačem asistovaný návrh léčiv můžeme rozdělit do dvou základních skupin:

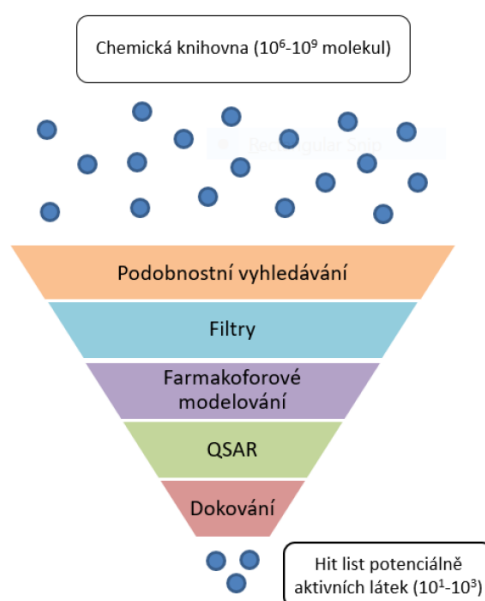
- 1) **Návrh léčiv založený na struktuře** (Structure Based Drug Design) – strategie vývoje zabývající se 3D strukturou cílové molekuly. Hlavní používanou metodou SBDD je molekulové dokování.
- 2) **Návrh léčiv založený na ligandu** (Ligand Based Drug Design) – zabývá se ligandy – tedy sloučeninami, která interagují s cílovou molekulou (např. inhibitory daného enzymu), hlavní používané přístupy jsou farmakoforové modelování, studie kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR), hledání na základě podobnosti.

Pro tyto skupiny se také objevuje termín strukturní a ligandový přístup v CADD.²⁴ Rozdělení však není striktní a existují i jiné návrhy rozdělení počítačového návrhu léčiv. Např. Solomon ve své publikaci⁵⁰ označuje metody jako **přímé** a **nepřímé** podle toho, zda je známá struktura cílové molekuly nebo ne. Dále navrhuje následující čtyři případy, které mohou v počítačovém návrhu léčiv nastat (viz Tab. 3-5):

Tabulka 3-5 Příklady metod CADD a jejich rozdělení podle Solomona⁵⁰

		Cílová molekula (enzym, receptor)	
		neznámá	známá
Sloučeniny (ligandy)	neznámé	Hledání na základě podobnosti Racionální screening	<i>De novo design</i>
	známé	Návrh léčiv založený na ligandu	Návrh léčiv založený na struktuře

Ve virtuálním screeningu lze uvedené metody navzájem kombinovat, pro dosažení optimálních výsledků lze méně náročné metody uplatnit na začátku, viz Obr. 3-7. Podobnostní vyhledávání a QSAR studie představují ligandové přístupy, dokování je typickým zástupcem SBDD. Farmakoforové modelování může být použito oběma způsoby – jako ligandová i strukturní metoda.²⁴



Obrázek 3-7 Příklad uspořádání virtuálního screeningu, Svozil²⁴

Virtuální screening představuje komplementární metodu ke zjišťování biologické aktivity. Umožňuje relativně rychle a s menší finanční náročností oproti HTS poskytnout hit molekuly, které mohou být následně prioritně testovány *in vitro* a *in vivo*, čímž se zefektivňuje hledání nových léčivých látek.^{2,24}

3.3 Molekulové dokování

Molekulové dokování patří mezi způsob návrhu léčiv na základě struktury. Termín molekulové dokování označuje proces počítačové simulace interakce dvou látek vystupujících jako ligand a receptor, při němž dochází k predikci konformace rovnovážného stavu a částečně i k predikci změny volné vazebné energie.⁵¹

Proces je založen na využití algoritmů a výpočtů molekulové mechaniky, kvantové mechaniky, konformační analýzy a dalších. Pro molekulové modelování je dostupný nespočet programů, volně dostupných (AutoDock 4, AutoDock Vina^{52,53}), pro akademické použití (DOCK)⁵⁴, komerčních (Glide, GOLD, MOE^{36,55,56}). Základní termíny molekulového dokování jsou popsány v Tab. 3-6.

Tabulka 3-6 Základní pojmy molekulového dokování

Pojem	Vysvětlení
Receptor	Cílová struktura, nejčastěji biologická makromolekula bílkovinné povahy. Obsahuje vazebné místo (angl. <i>binding site</i>), ve kterém „přijímá“ ligand.
Ligand	Látka, která se váže do vazebného místa receptoru. Nejčastěji malá molekula, může se však jednat i o protein.
Póza	Konkrétní vazebné uspořádání ligandu ve vazebném místě.
Umístění (angl. <i>placement</i>)	Počáteční fáze dokování, kdy dochází k umístění ligandu do vazebného místa a následnému vyhledávání vhodné konformace.
Vazebné uspořádání (angl. <i>binding mode</i>)	Může označovat vazebné uspořádání ligandu vzhledem k receptoru, ale také konformaci vazebného uspořádání dvojice ligand-receptor.
Skóre	Hodnocení vazebného uspořádání podle skórovací funkce.
Pořadí	Seřazení ligandů podle toho, s jakou pravděpodobností budou dobře interagovat s ligandem. Utváří se na základě skóre.
RMSD (root mean squared deviation)	Průměrná odchylka vzdálenosti atomových pozicí, v molekulovém dokování se používá k charakteristice vzdálenosti mezi sloučeninami.
Ångström [Å]	Jednotka vzdálenosti používaná pro měření velikostí atomů nebo délek chemických vazeb. 1 Å představuje 100 pm neboli 10 ⁻¹⁰ m.

3.3.1 Obecné schéma dokovacího procesu

První fází dokování je příprava receptoru a ligandu. Druhou fází je nastavení dokovacího protokolu, který vyžaduje správné přidělení rolí jednotlivým partnerům (přiřazení ligandů, receptoru a vazebného místa). V dokovacím protokolu se nastavuje výběr metody dokování, způsob umístění ligandu, vyhledávací algoritmus a skórovací funkce. Uživatel zvolí výstupní databázi, do které jsou uloženy výsledky dokování. Třetí fáze nastává po spuštění dokovacího protokolu, kdy program provádí výpočet. Čtvrtou fází je vyhodnocování pořadí výsledků a póz, které byly systémem nalezeny.^{2,37}

3.3.2 Umístění a vyhledávací algoritmus

Pro molekulové dokování je důležité, aby program dokázal molekulu správně umístit do vazebného místa, které bývá nejčastěji definováno podle ligandu, který je dostupný v dané krystalografické struktuře. Program MOE využívá umístění založené na shodě (z angl. *Matching algorithms*), které analyzuje tvar a velikost molekul a jejich funkční skupiny. Na základě těchto vlastností hledá komplementaritu mezi ligandem a receptorem. Metoda funguje na principu farmakoforu, tedy zobecněného modelu, který charakterizuje vlastnosti dané molekuly (tzv. *features*). Může se jednat např. o donory a akceptory vodíkových vazeb, záporně nebo kladně nabitě skupiny v molekule. Součástí také bývá analýza povrchu receptoru a navržení prostoru, který může ligand zaujmout.⁴⁹

Pro vyhledávání konformací se používají metody popsané v kapitole 3.2.4. Moderní strategií je vyhledání konformace ligandu pomocí náhodných nebo stochastických přístupů, a následná lokální optimalizace tohoto uspořádání pomocí molekulové dynamiky.⁴⁹

3.3.3 Skórovací funkce

Cílem skórovací funkce je teoreticky číselně ohodnotit vazebnou energii, která se uvolní při vzniku komplexu ligand-receptor. Výsledkem tohoto výpočtu je skóre, které je pro každou konkrétní pózu jiné. Zároveň platí, že čím více se uvolní energie, tedy čím nižší je teoretická vazebná energie, tím pravděpodobnější je vznik právě této pózy. V praxi se jedná o velmi komplexní termodynamický děj, který je obtížně popsatelný pomocí jednoduché funkce, proto neexistuje jedna universální a přesná skórovací funkce.⁵¹

Existují různé typy skórovacích funkcí, např. fyzikální, empirické, deskriptorové, funkce založené na znalostním potenciálu a strojovém učení.⁵⁷ V této práci byly použity **funkce fyzikální**, které jsou označovány také jako funkce na principu silových polí (z angl. *force-field based functions*). Vycházejí z molekulové mechaniky, příkladem jsou zmíněné London dG

a GBVI/WSA dG skóre.³⁷ Funkce na principu silových polí obecně vypočítávají teoretickou vazebnou energii jako sumu různých energetických příspěvků vycházejících z proměny délek vazeb, velikostí vazebných úhlů, rotace kolem dihedrálních úhlů a dále van der Waalsových a elektrostatických interakcí (viz kap. 3.2.1).⁵¹

Fyzikální funkce se neustále vyvíjejí s cílem zlepšení přesnosti jejich predikce, např. funkce GBVI/WSA dG byla vytvořena podle obecného Bornova modelu (z angl. *Generalized Born*) pro solvataci a podle objemové integrace (z angl. *Volume Integral*). Do výpočtu vazebné energie tedy kromě elektrostatických interakcí zahrnuje i změnu energie související s rozpouštěním ve vodném prostředí. Zkratka WSA značí zahrnutí příspěvek výpočtu povrchu vazebného místa.^{49,58}

4 Metodická část

4.1 Tvorba virtuální knihovny látek

Data o sloučeninách byla extrahována z vybraných vědeckých a kvalifikačních prací vytvořených na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy v laboratoři doc. RNDr. Veroniky Opletalové, Ph.D. (Tab. 4-1)

Tabulka 4-1 Seznam zdrojů pro vytvoření databáze

1. OPLETALOVÁ, V. et al. Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco*, **2002**, *57*, 135–144.
2. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M. et al. Synthesis and biological evaluation of some ring-substituted (*E*)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Pharm. Univ. Carolinae* **2005**, *XXXIII*, 31–43.
3. OPLETALOVÁ, V. et al. Synthesis and biological evaluation of (*E*)-3-(nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, **2006**, *71*, 44–58.
4. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M. et al. Novel pyrazine analogs of chalcones: Synthesis and evaluation of their antifungal and antimycobacterial activity. *Molecules*, **2015**, *20*, 1104–1117.
5. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M. et al. Novel halogenated pyrazine-based chalcones as potential antimicrobial drugs. *Molecules* **2016**, *21* (11), 1–16.
6. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M. et al. Chalcones and their pyrazine analogs: synthesis, inhibition of aldose reductase, antioxidant activity, and molecular docking study. *Monatsh. Chem.*, **2018**, *149*, 921–929.
7. OPLETALOVÁ, V. et al. 5-Alkyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-alkyl-2-pyrazinecarbonitriles and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic intermediates for antiinflammatory agents. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, **1991**, *61*, 1093–1101.
8. Doležel, J. Deriváty thiazolu jako potenciální léčiva. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013.
9. OPLETALOVÁ, V. et al. Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: Cellular iron chelation mediating cytotoxic activity. *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, *21*, 1878–1889.
10. DOLEŽEL, J. et al. Rhodanineacetic acid derivatives as potential drugs: Preparation, hydrophobic properties and antifungal activity of (5-aryllalkylidene-4-oxo-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)acetic acids. *Molecules*, **2009**, *14*, 4197–4212.
11. OPLETALOVÁ, V. et al. Synthesis and characterization of (*Z*)-5-arylmethylidenerhodanines with photosynthesis-inhibiting properties. *Molecules*, **2011**, *16*, 5207–5227.
12. Chlupáčová, M. Chalkony jako potenciální léčiva. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2006.
13. Chlupáčová, M. Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva II. Diplomová

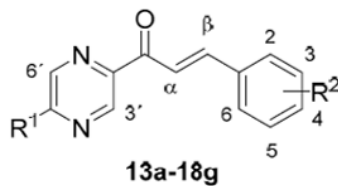
- práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2001.
14. Dušková, A. Syntéza derivátů thiazolidin-2,4-dionu jako potenciálních léčiv. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2020.
 15. Horká, M. Amidoximy jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva I. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011.
 16. Katirtzi, A. Amidoximes as intermediates for synthesis of potential drugs. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015.
 17. Oravcová, D. Amidoximy jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva II. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017.
 18. Hariková, M. Deriváty amidoximů jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
 19. Kolčárková, L. Amidoximy jako potenciální léčiva II. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
 20. Lukáčová, M. Amidoximy jako potenciálně léčiva III. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
 21. Džámová, P. Oxadiazoly jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016.

Byly vybírány především sloučeniny, u kterých bylo provedeno testování na biologickou aktivitu, a také hlavní meziproducty reakcí (např. pyrazin-2-karboxamidy, pyrazin-2-karbonitrily). Některé meziproducty byly vynechány. Výsledky studií biologické aktivity byly zpracovány do databáze se zaměřením na inhibiční aktivitu proti vybraným mykobakteriálním, bakteriálním a fungálním kmenům. Dále byly zahrnuty výsledky inhibiční aktivity vůči enzymu aldoseduktase. V menším rozsahu jsou obsaženy výsledky testů antioxidační aktivity, inhibice fotosyntézy chloroplastů špenátu a inhibice tvorby chlorofylu v řase *Chlorella vulgaris*. Některé výsledky zjištěné pouze pro úzkou skupinu látek, jako např. antiagregační působení chalkonů, nebyly do databáze zahrnuty.

Pro tvorbu databáze byl použit program Excel 365 (Microsoft®, Washington, USA). Vzorce byly kresleny a analyzovány pomocí programu ChemDraw Professional 17.1 (PerkinElmer Informatics, Waltham, USA). Pro výpočet molekulových deskriptorů byl použit program MOE 2019.01 (Chemical Computing Group, Montreal, Kanada). Do řádků databáze jsou uloženy sloučeniny ve formě vstupů, a k nim jsou přiřazeny příslušné informace. Sloučeniny jsou charakterizovány číselným pořadím, primárním klíčem vhodným pro vyhledávání v databázi je laboratorní kód. První řádek obsahuje legendu k informacím uloženým ve sloupcích virtuální knihovny.

4.1.1 Ukázka tvorby vstupu do databáze – sloučenina č. 64 – CH0aa

- 1) Získání informací z vědecké práce (Obr. 4-1):

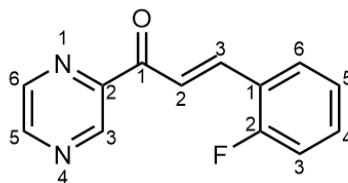


R ²	R ¹						
	H	<i>tert</i> -butyl	isobutyl	butyl	propyl	isopropyl	pentyl
2-F	13a	13b	-	-	13e	-	-
4-F	14a	14b	-	-	-	-	-
2-Cl	15a	15b	-	-	-	-	-
4-Cl	16a ^a	16b ^a	16c ^a	16d ^a	16e ^a	16f ^b	-
2-Br	17a	17b	17c	17d	17e	17f	-
4-Br	18a	18b	18c	18d	18e	18f	18g

(2E)-3-(2-Fluorophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-one (13a).

Obrázek 4-1 CH0aa v článku Kučerové-Chlupáčové et al, 2016. ⁵⁹

- 2) Konstrukce vzorce sloučeniny v ChemDraw. Generování informací v polích Sumární vzorec, SMILES kód, Systematický název, Molekulová hmotnost (Obr. 4-2).



(E)-3-(2-fluorophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-one

Chemical Formula: C₁₃H₉FN₂O

Exact Mass: 228,07

Molecular Weight: 228,23

Obrázek 4-2 Nákres vzorce CH0aa v ChemDraw

- 3) Kopírování informací do tabulky Excel 365.
- 4) Vyhledávání dalších informací v primárním zdroji a dalších publikacích zahrnutých v Tab. 4.1
- 5) Výpočet molekulových deskriptorů v programu MOE.

4.1.2 Legenda tabulky

Kategorie 1: Základní informace o sloučenině (Obr. 4-3)

Číslo sloučeniny	Laboratorní kód	Pořadí v článku	Označení sloučeniny v článku		Sumární vzorec		Název struktury		Molekulová hmotnost		První autor	Rok publikace	Další zdroj	
			Struktura	SMILES	vzorec	SMILES	hmotnost	Zdroj	1	2				
64	CH0aa	1	13a	(E)-3-(2-fl	C13H9FN2	O=C/C=C/	(2E)-3-(2-f	228,23	Marta Kuč	2016	10.3390/molecules21111421			

Obrázek 4-3 Sloučenina CH0aa, základní informace

Číslo sloučeniny – číslo charakterizující pořadí sloučeniny

Laboratorní kód – kód sloučeniny, který byl přiřazen během syntézy

Pořadí v článku – pořadí sloučeniny v článku nebo kvalifikační práci, na něž je odkaz uveden v poli Zdroj

Označení sloučeniny v článku – číslo nebo kombinace čísla a písmene, pod nímž vystupuje v článku nebo kvalifikační práci uvedené v poli Zdroj

Název struktury – získaný z článku nebo kvalifikační práce (jazyk ponechán podle původního zdroje)

Sumární vzorec, SMILES kód, Systematický název, Relativní molekulová hmotnost – vypočteno nebo generováno v ChemDraw

První autor, Rok publikace – první autor publikace nebo autor klasifikační práce uvedené v poli Zdroj

Rok publikace – vztahuje se k poli Zdroj

Zdroj, Další zdroj 1, Další zdroj 2 – odkazy na články ve formě čísla DOI nebo označení kvalifikační práce

Kategorie 2: Výsledky antimykobakteriální aktivity (Obr. 4-4)

M.TBC	MIC M. aurum	MIC M. avium	MIC M. kansasii	MIC M. smegmatis
Inhibice %	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
6,25 µg/ml	72h	24h	24h	48h
*12,5 µg/ml				
**6,5 µg/ml				
	12,5	100	12,5	15,625

Obrázek 4-4 Sloučenina CH0aa, antimykobakteriální aktivita

M. TBC Inhibice % - procentuální vyjádření inhibice *Mycobacterium tuberculosis*. Hvězdičkou jsou odlišeny koncentrace látky, při kterých byla inhibice zkoumána (bez hvězdičky 6,25 µg/ml, *12,5 µg/ml, **6,5 µg/ml). Procentuální inhibice byla určována zpravidla u sloučenin hodnocených v rámci programu TAACF (z angl. *Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility*), která mezi lety 1994–2010 bezplatně prováděla testy antimykobakteriální aktivity.

MIC (µg/ml) – *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *Mycobacterium tuberculosis* H37RV CNCTC My 331/88, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ITM-M00 9431)

Konkrétní informace o zdrojích kultur a bližší informace o testování lze dohledat v publikaci uvedené v poli Zdroj, případně Další zdroj 1, Další zdroj 2.

MIC M. aurum (µg/ml) 72h – *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366)

MIC M. avium (µg/ml) 24h – *M. avium* 80, ATCC 15 769, v roce 2016 *M. avium* 152 3

MIC M. kansasii (µg/ml) 24h – *M. kansasii* 235/80

MIC M. smegmatis (µg/ml) 48h – *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607)

V průběhu tvorby práce bylo přejmenováno na *Mycolicibacterium smegmatis*, vzhledem k původnímu členění ponecháno v kategorii antimykobakteriální aktivity.⁶⁰

Kategorie 3: Výsledky inhibice aldosareduktasy (Obr. 4-5)

MIC M. smegmatis (µg/ml) 48h	Inhibice ALR2 IC ₅₀ (µM)	SA 24h S
15,625		125

Obrázek 4-5 CH0aa, inhibice ALR2

ALR2 IC₅₀ (µM) – enzym aldosareduktasa 2

Kategorie 4: Antibakteriální aktivita vůči vybraným kmenům (Obr. 4-6)

MIC/IC ₉₅ (μmol/l)																			
SA	SA	MRSA	MRSA	SE	SE	EF	EF	EC	EC	KP	KP	KP-E	KP-E	SEMA	SEMA	PA	PA		
24h	48h	24h	48h	h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	h	Oh	24h	48h
125	250	250	250	31,25	125	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	ND	ND	>500	>500	ND	ND

Obrázek 4-6 CH0aa – Antibakteriální aktivita

Vyjádřena jako MIC/IC₉₅ (μmol/l), zahrnutý kmeny: SA – *Staphylococcus aureus*; MRSA – methicilin resistantní *Staphylococcus aureus*; SE – *Staphylococcus epidermidis*; EF – *Enterococcus faecalis*; EC – *Escherichia coli*; KP – *Klebsiella pneumoniae*; KP-E – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní; SEMA – *Serratia marcescens*, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, ACI – *Acinetobacter baumannii*.

Kategorie 5: Antifungální aktivita vůči vybraným kmenům (Obr. 4-7)

MIC (μmol/l)																			
CA	CA	CT	CT	CK	CK	CG	CG	TA	TA	AF	AF	AC	AC	TI	TI	CP	CP	Afla	Afla
24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	(TB)	(TB)	24h	48h	(LC)	(LC)	(TM)	(TM)	24h	48h	24h	48h
15,63	62,5	250	>500	15,62	125	62,5	125	125	125	250	>500	>500	>500	250	250	ND	ND	ND	ND

Obrázek 4-7 CH0aa, antifungální aktivita

Vyjádřena jako MIC (μmol/l), zahrnutý kmeny: CA – *Candida albicans*; CT – *Candida tropicalis*; CK – *Candida krusei*; CG – *Candida glabrata*; TA (TB) – *Trichosporon asahii* (*beigelii*); AF – *Aspergillus fumigatus*; AC (LC) – *Absidia corymbifera* (*Lichtheimia corymbifera*); TI (TM) – *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes*); CP – *Candida parapsilosis*; AFla – *Aspergillus flavus*.

4.1.2.1 Testy inhibice chloroplastů špenátu, inhibice produkce chlorofylu (Obr. 4-8)

IC ₅₀ (μmol/l)	
OER inhibice špenát	Inhibice produkce chlorofylu <i>C. vulgaris</i> Antioxidační aktivita (-ΔA/s)

Obrázek 4-8 CH0aa, další výsledky

OER inhibice špenát – rychlost vývoje kyslíku (z angl. *Oxygen evolution rate*)

Inhibice produkce chlorofylu – zkoumáno u řasy *Chlorella vulgaris*
Antioxidační aktivita – testována v souvislosti s inhibicí ALR2.

4.1.2.2 Deskriptory (Obr. 4-9)

Pozn.	Molekulární deskriptory															
Počet atomů	Počet těžkých atomů	Nrot	HBA	HBD	h_logP	h_mr	h_pKa	logP (o/w)	mr	TPSA	Molekulová hmotnost	Lipinski druglike	Porušení Lip. prav.	Oprea leadlike	Porušení Opr. prav.	
PA 24/48h	26	17	3	3	0	3.0794473	6.3785925	14	1.90753	6.4516964	42.849998	228.226	1	0	1	0

Obrázek 4-9 CH0aa – molekulové deskriptory

Počet atomů, Počet těžkých atomů, Nrot, HBA, HBD, h_LogP, h_mr, h_pKa, LogP (o/w), mr, TPSA, Molekulová hmotnost, Lipinski drug-like, Porušení Lip. pravidla, Oprea lead-like, Porušení Opr. pravidla (viz kap. 2.1.4.2, 2.1.6.2)

Deskriptory byly vypočítány pomocí programu MOE. Program také umí vyhodnotit, zda sloučeniny vyhovují Lipinského pravidlu nebo Opreovu pravidlu. Těmto sloučeninám a sloučeninám porušujícím jedno až dvě pravidla přiřadil v daném sloupci hodnotu 1. U sloučenin, která pravidlům nevyhovují, je následně přiřazeno do příslušného sloupce Porušení číslo, které odpovídá počtu porušených pravidel.

4.1.2.3 Poznámka

V poli poznámka je prostor k doplnění přechozích kategorií, upřesnění informací ohledně způsobu získání výsledku testů nebo nepřesnosti v určení autora sloučeniny.

4.1.2.4 Kontrola databáze

Pomocí funkcí podmíněného formátování byla databáze zkontrolována na duplikáty. Byly objeveny duplikátní záznamy od sloučenin CH10d a CH10e. V databázi byl ponechán pouze jeden záznam od každé sloučeniny.

4.2 Molekulově modelovací studie

Molekulové dokování bylo provedeno v programu MOE 2019.01 (Chemical Computing Group, Montreal, Kanada). Jedná se o interaktivní software pro počítačovou chemii a molekulové modelování, který lze využít pro metody návrhu léčiv založeného na struktuře i ligandu, ale i pro biologické a bioinformatické přístupy.³⁷

4.2.1 Příprava ligandu a receptoru

Sloučeniny vystupující jako ligandy byly přemístěny z virtuální knihovny do prostředí MOE. K tomuto kroku byla vytvořena jednoduchá tabulka ve formátu CSV, který obsahoval laboratorní kódy vybraných sloučenin a korespondující kódy SMILES. Výhoda zápisu SMILES spočívá v možnosti zakódovat do něj izomerii a stereochemii sloučeniny, která je potřeba pro jeho rekonstrukci do 3D formátu, virtuální knihovna tak obsahuje molekuly ve formátu ready-to-dock.

Ligandy byly uloženy do databáze programu MOE, následně byla provedena kontrola a fixace izomerie na dvojně vazbě. Databáze byla připravena na dokování pomocí funkcí Wash, Partial Charges a Energy Minimization. První jmenovaná umožňuje protonizaci sloučenin, druhá vypočítá sloučeninám jejich parciální náboje pro predikci reaktivity, třetí hledá jejich energeticky výhodnou konformaci (Kap. 3.2.4).

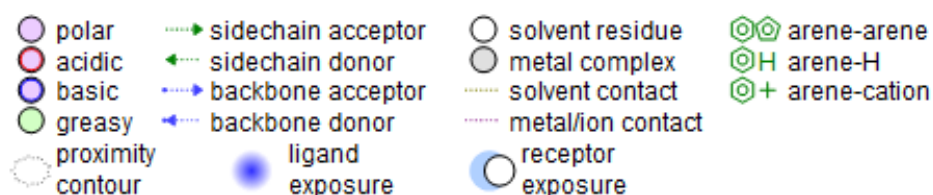
Receptory použité v této práci byly ve formě krystalografického obrazu získány z Protein Data Bank, která je volně přístupnou databází spravovanou Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, USA.²⁶ Program MOE je s touto databází plně propojen. Součástí výběru krystalografické struktury receptoru byla validace kvality krystalografického obrazu. Před dokováním byly provedeny úpravy pomocí funkce Sequence Editor, např. odstranění nepotřebných jednotek proteinu, vykrytalizovaných iontů nebo vybraných molekul rozpouštědla. Bylo provedeno odstranění chyb v krystalografické struktuře proteinu pomocí nástroje Structure Preparation; zpráva o nalezených chybách byla uložena. Dále byl použit nástroj QuickPrep, který kromě jiných funkcí provede především nezbytnou protonaci receptoru a energetickou minimalizaci.

4.2.2 Dokování a validace

Průběh dokování je nastaven pomocí dokovacího protokolu, pro všechny provedené pokusy bylo vybráno umístění Triangle Matcher, první skórování pomocí funkce London dG a druhé, finální skórování pomocí funkce GBVI/WSA dG. Ještě před samotným dokováním bylo provedeno opětovné dokování původního ligandu do receptoru, tzv. redokování. Tento proces slouží je zjištění, zda zvolený program dokáže nalézt pózu redokovaného ligandu co nejpodobnější vzhledem ke konformaci původně vykrytalizovaného ligandu. Porovnávají se vzdálenosti mezi korespondujícími atomy těchto konformací. Vyjadřují se pomocí průměrné kvadratické odchylky (RMSD viz Tab. 3-6) Obecně může být metoda dokování akceptována, pokud je RMSD redokované pózy nižší než 2 Å.^{61,62}

4.2.3 Hodnocení výsledků dokování

Po skončení dokování jsou výsledky ve formě jednotlivých póz sloučenin uloženy do databáze. Ve 3D rozhraní programu MOE lze prohlížet konformace ligandu ve vazebném místě receptoru. Konkrétní póza může být porovnávána s konformací původního vykrytalizovaného ligandu. Dále mohou být měřeny energetické příspěvky jednotlivých interakcí. Pro přehlednější studium byly vygenerovány 2D interakční diagramy, vysvětlivky jsou na obr. 4-10. Znárodnění kroužku, v němž se nachází kód aminokyseliny, určuje její charakteristiku – polární, kyselá, bazická, nepolární. Zelená šipka značí interakci s aminokyselinovým zbytkem, modrá šipka naopak interakci se základní kostrou aminokyselinového řetězce. Směr šipky značí akceptor nebo donor vodíkové vazby. Odlišnou barvu mají kroužky, v nichž se nachází rozpouštědlo nebo ionty, interakce s rozpouštědlem je vyznačena oranžovou přerušovanou čarou, iontová vazba pak spíše červenou. Dva symboly aromatických jader značí π - π interakci, obdobnými symboly je pak označena π -H interakce nebo π -kation interakce. V posledním řádku nalezneme vysvětlivky k celkovému rozložení receptoru a ligandu: šedou přerušovanou čarou je ohraničeno vazebné místo, tmavě modrou barvou jsou podbarveny struktury vystavené ligandu a světle modrou struktury vystavené receptoru.



Obrázek 4-10 Legenda interakčního diagramu (MOE)

5 Experimentální část

5.1 Statistika databáze

5.1.1 Aktivní a neaktivní sloučeniny (M. TBC)

- Počet sloučenin: 317
- Počet sloučenin aktivních při *in vitro* testování inhibice *M. tuberculosis* (podmínkou bylo $MIC \leq 6,25 \mu\text{g/ml}$ nebo procento inhibice v hodnocení TAACF $\geq 90 \%$ - pokud bylo, tak byla většinou testována i MIC)

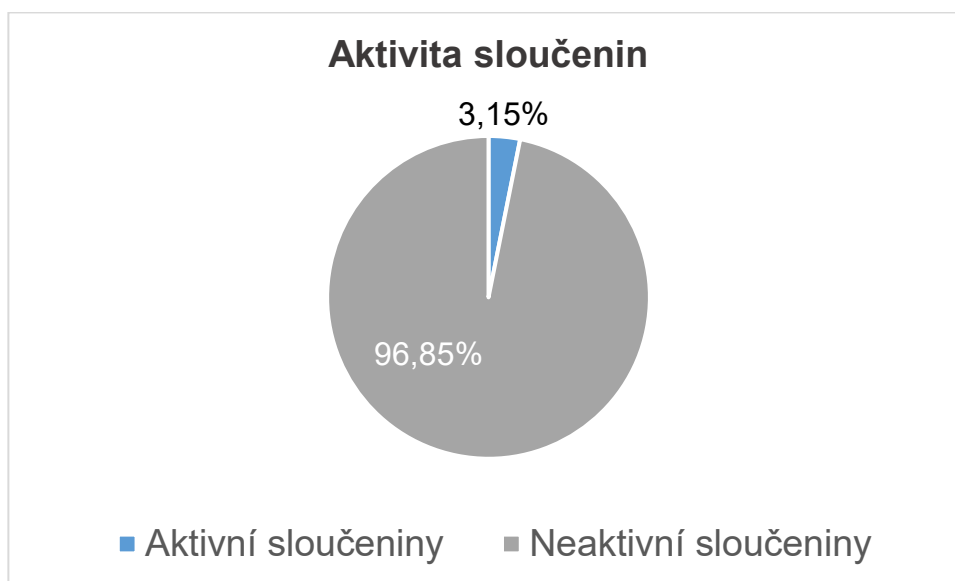
Aktivní sloučeniny ($MIC \leq 6,25 \mu\text{g/ml}$): 9

Aktivní sloučeniny ($\geq 90 \%$ inhibice a nebyla testována MIC) 1

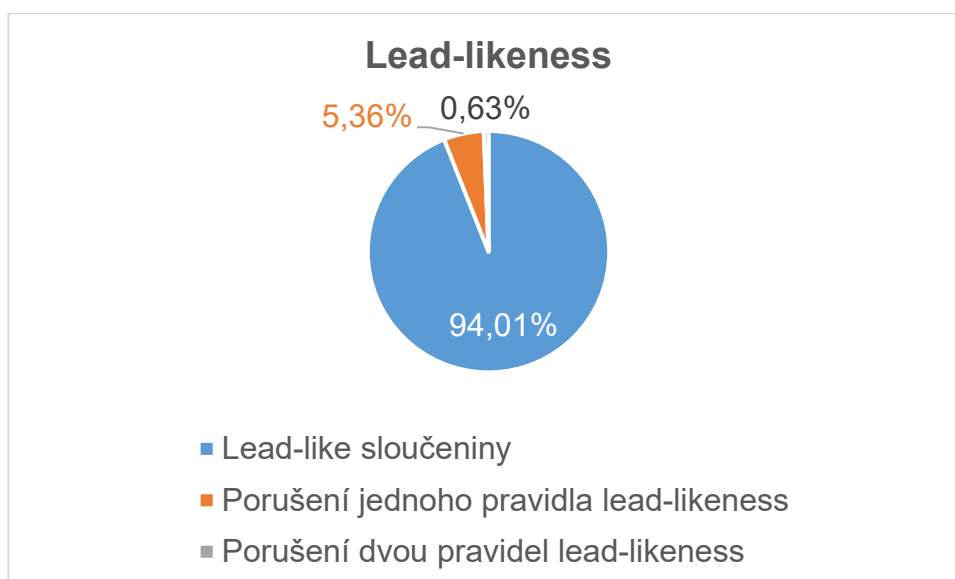
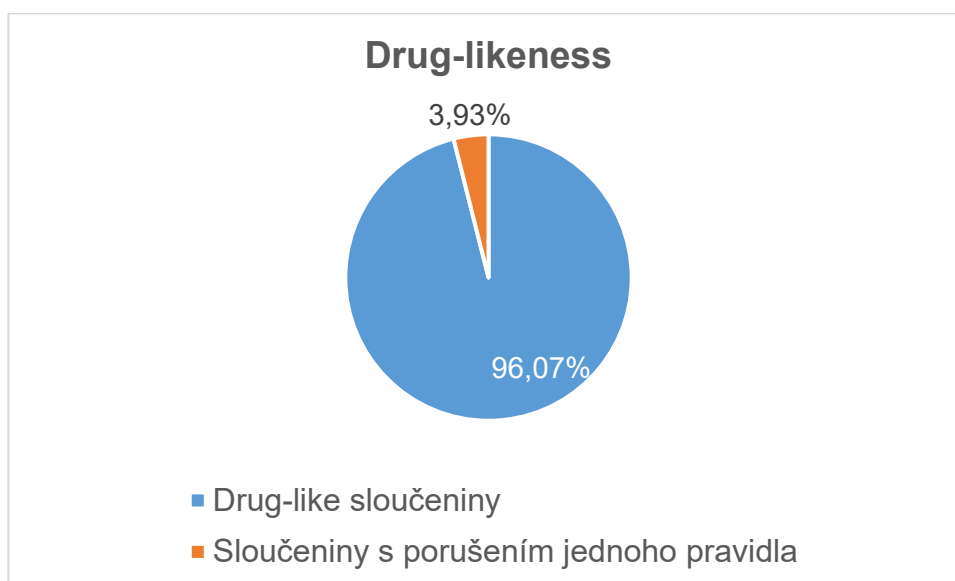
Aktivní sloučeniny celkem: 10

- Počet neaktivních sloučenin nebo sloučenin netestovaných na antimykobakteriální aktivitu

Neaktivní sloučeniny: 307



5.1.1.1 Drug-likeness a lead-likeness



5.1.1.2 Statistické zhodnocení deskriptorů

Základní deskriptivní statistická analýza byla uplatněna na všechny vypočítané deskriptory (Tab. 5-1). Modře podbarvené hodnoty platí pro všechny sloučeniny z databáze, dále jsou hodnoty rozdělené na sloučeniny aktivní a neaktivní.

Tabulka 5-1 Statistické zhodnocení deskriptorů

	Minimum	Maximum	Průměr	Směrodatná odchylka	Medián
Počet atomů	11	55	31,55	8,36	30
<i>Aktivní</i>	26	40	34,9	5,32	37,5
<i>Neaktivní</i>	11	55	31,44	8,42	30
Počet těžkých atomů	8	26	18,06	3,57	18
<i>Aktivní</i>	17	23	20,6	1,78	21
<i>Neaktivní</i>	8	26	17,98	3,58	18
Nrot	1	12	3,96	2,15	4
<i>Aktivní</i>	3	5	4,2	0,63	4
<i>Neaktivní</i>	1	12	3,95	2,19	4
HBA	1	8	3,44	1,06	4
<i>Aktivní</i>	3	4	3,1	0,32	3
<i>Neaktivní</i>	1	8	3,45	1,08	4
HBD	0	3	0,74	0,72	1
<i>Aktivní</i>	0	1	0,1	0,32	0
<i>Neaktivní</i>	0	3	0,76	0,72	1
h_logP	-0,89	7,189	2,925	1,367	3,007
<i>Aktivní</i>	2,971	4,796	3,809	0,599	3,736
<i>Neaktivní</i>	-0,89	7,189	2,896	1,376	2,978
h_pKa	3,31	14	11,64	2,95	14
<i>Aktivní</i>	7,76	14	13,38	1,97	14
<i>Neaktivní</i>	3,31	14	11,59	2,97	14
mr	2,98	11,17	7,25	1,55	7,09
<i>Aktivní</i>	6,88	8,93	8,02	0,81	8,3
<i>Neaktivní</i>	2,98	11,17	7,23	1,56	7,05
TPSA	17,07	153,54	67,54	24,11	94,7
<i>Aktivní</i>	42,85	88,67	67,78	22,83	75,88
<i>Neaktivní</i>	17,07	153,54	67,53	24,19	64,7
Molekulová hmotnost	105,1	385,47	260,79	50,98	265,39
<i>Aktivní</i>	244,68	345,24	287,38	30,23	290,82
<i>Neaktivní</i>	105,1	385,47	259,92	51,31	264,33

5.1.1.3 Diskuze

Z porovnání průměrných hodnot pro aktivní a neaktivní sloučeniny vyplývá, že aktivní sloučeniny mají přibližně o čtyři atomy více, z čehož dva jsou těžkými atomy. Od toho se odvíjí i vyšší průměrná molekulová hmotnost aktivních sloučenin (387,38 g/mol). Dále vlastní průměrně o jeden akceptor vodíkové vazby méně. Aktivní sloučeniny se vyznačují přibližně o jednotku vyšším LogP, jedná se o spíše lipofilnější sloučeniny v rámci databáze. Aktivní sloučeniny se dále vyznačovaly nepatrně vyšší molární refraktivitou a až na výjimky

neobsahovaly donory vodíkových vazeb. Počty HBA, Nrot a hodnoty TPSA nabývaly podobných hodnot jak mezi aktivními, tak i neaktivními sloučeninami.

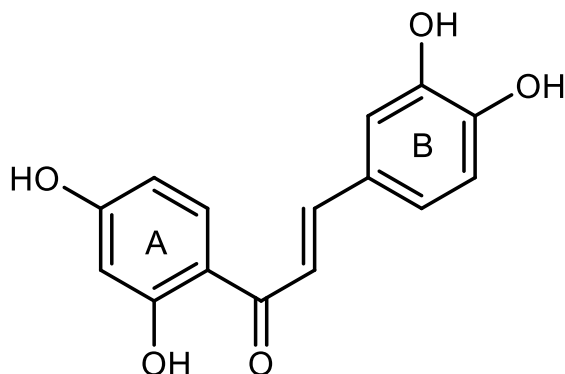
Molární refraktivita léčivých látek byla hodnocena ve studii Ghose *et al.*⁶³, která se zabývala statistickou analýzou molekulových deskriptorů léčivých látek databázi Comprehensive Medicinal Chemistry (CMC).⁶⁴ Osmdesát procent látek z této databáze mělo hodnotu MR mezi 40 a 130, průměrná hodnota byla 97. Látky z připravené virtuální knihovny toto kritérium nesplňují a výsledky výpočtů programu MOE se celkově pohybují v jiných hodnotách. Lze usuzovat, že v případě programu MOE byl použit jiný typ výpočtu než ve zmíněné studii.

Přibližně 96 % sloučenin odpovídalo svými vypočtenými vlastnostmi Lipinského pravidlu pěti. Zbývá 4 % sloučenin pravidla porušila. Opreovu pravidlu pro lead-like sloučeniny⁴⁵ odpovídalo 94,01 % sloučenin. 5,36 % sloučenin porušilo jedno a 0,63 % dvě tato pravidla. Nevýhodou tohoto stavování byla nejasná definice Lipinského a Opreova pravidla a také různé metody, které program MOE pro výpočet molekulových deskriptorů používá. Lze tedy obtížněji zpětně definovat, která konkrétní pravidla sloučeniny porušují. Je možné porovnat hodnoty průměrné a mediánové sloučeniny (Tab. 5-2) s definovanými hranicemi pro pravidla drug-likeness a lead-likeness. Průměrné i mediánové hodnoty deskriptorů zcela vyhovují Pravidlu pěti. U sloučenin v databázi je však vysoce pravděpodobné, že nesplňují tyto přísnější hranice tzv. Pravidla tří, především u deskriptorů HBA, Nrot, TPSA a ClogP.

Tabulka 5-2 Hodnoty průměrné a mediánové sloučeniny v porovnání s Pravidly pěti a tří podle Di a Kernse³⁹

Deskriptor	MW	HBA	HBD	NRot	TPSA	CLogP
Průměr	260,79	3,44	0,74	3,96	67,54	2,925
Medián	265,39	4	1	4	94,7	3,007
Pravidlo pěti	≤ 500	≤ 10	≤ 5	≤ 10	≤ 140	≤ 5
Pravidlo tří	≤ 300	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 60 Å	≤ 3

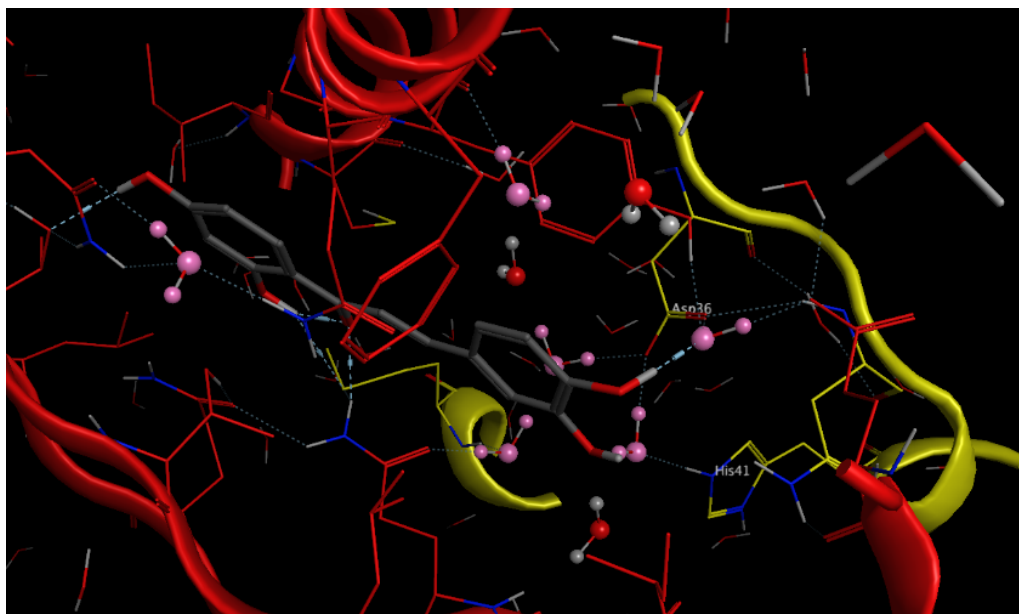
al. pro schopnost *in vitro* inhibice růstu *M. bovis BCG* a byl látkou s nejnižší hodnotou MIC oproti ostatním zkoumaným flavonoidům.⁶⁶



butein (*E*)-1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-(3,4-dihydroxyfenyl)prop-2-en-1-on
MIC₉₉ (*M. bovis BCG* 43 µg/ml (157 µM))⁶⁶

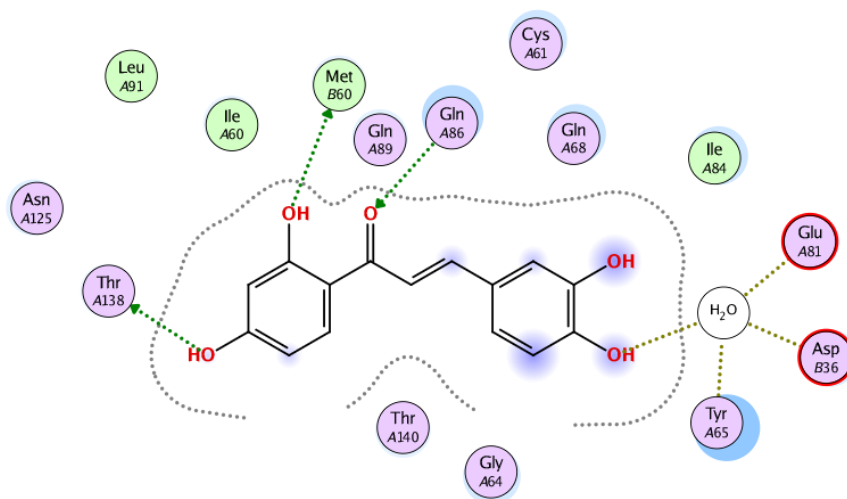
Obrázek 5-2 Chalkon butein s vyznačenými kruhy A a B

Prostřednictvím Protein Data Bank byly získány a prohlíženy záznamy 4RLJ, 4RLW, 4RLT a 4RLU vycházející ze společné krystalografické publikace.⁶⁵ Pro experiment byl vybrán 4RLW⁶⁷, obraz byl zjištěn krystalografickou metodou rentgenové difrakce, a disponoval rozlišením 2,20 Å. Následně byl protein upravován v programu MOE, podjednotka HadA byla zabarvena červeně, HadB žlutě. Byly upraveny molekuly vody (Obr. 5-3), růžově označené molekuly byly ponechány, ostatní pomocí inverzního výběru odstraněny.



Obrázek 5-3 Vazebné místo proteinu 4RLW, ligand butein (šedá) v obklopení molekulami vody.

Ligand butein v krystalografickém obrazu 4RLW interagoval s HadAB dehydratasou následovně: Hydroxyskupiny na kruhu A vystupovaly jako donory vodíkových vazeb pro interakci s aminokyselinovými zbytky ThrA138 a MetB60, oxoskupina charakteristická pro chalkony byla akceptorem vodíkové vazby s GlnA86. 4-Hydroxyskupina na kruhu B interagovala vodíkovou vazbou s molekulou vody propojenou s aminokyselinami GluA81, AspB36 a TyrA65 (viz obr. 5-4).

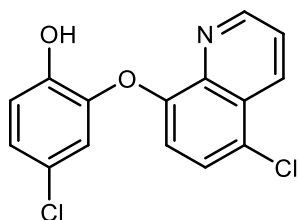


Obrázek 5-4 Interakční diagram buteinu (4RLW)

5.2.1.2 Příprava databáze malých molekul

Z knihovny virtuálních látek byly vybrány pyrazinové deriváty chalkonu z vybraných publikací^{59,68-71}. Z 98 molekul byly vybráno 8 sloučenin (CH1c, CH2l, CH0f, CH0i, CH1i, CH10f, CH10i), které měly nejvyšší procento inhibice *M. tuberculosis*, a zároveň u nich byla stanovena MIC (hodnoceny v systému TAACF). K těmto přidány další dvě látky (CH1w, CH1y) z vybraných publikací^{68,69}. Vedle sloučenin připravených na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy byly do experimentu zahrnuty prototypy možných antimykobakteriálních látek NAS-91 a NAS-21, jejichž pravděpodobným mechanismem účinku je inhibice β -hydroxyacyl-ACP dehydratasy (Obr. 5-5).⁷²

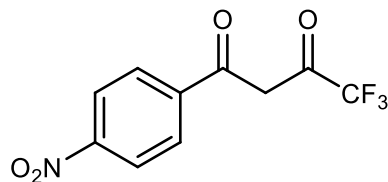
NAS-91



4-chlor-2-[(5-chlorochinolin-8-yl)oxy]fenol

MIC (*M. bovis BCG*) = 25 µg/ml

NAS-21



4,4,4-trifluor-1-(4-nitrofenyl)butan-1,3-dion

MIC (*M. bovis BCG*) = 50 µg/ml

Obrázek 5-5 Sloučeniny NAS-91 a NAS-21⁷²

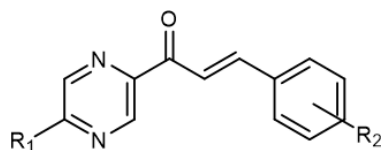
5.2.1.3 Redokování původního ligandu

Opětovným dokováním původního ligandu byla získána póza s nejnižším RMSD 1,8966 Å, čímž byla splněna podmínka validace.

5.2.1.4 Výsledky

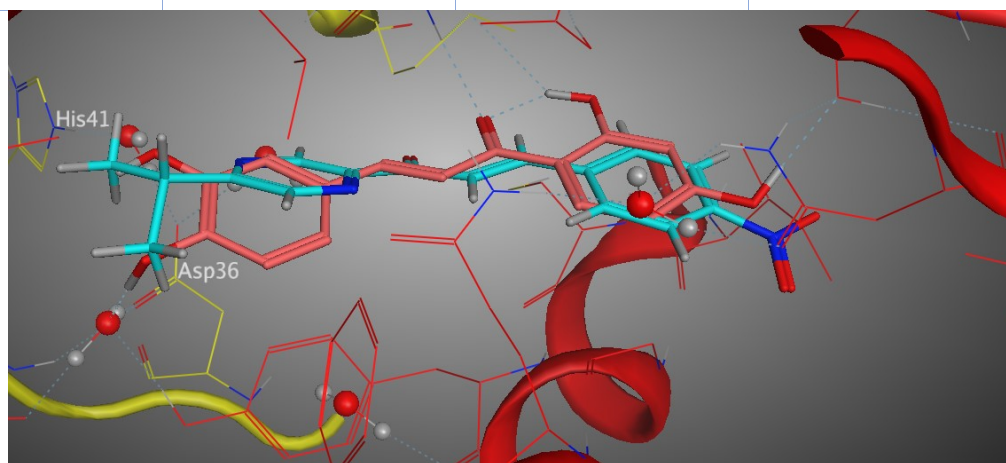
Připravená vstupní databáze obsahovala 12 sloučenin, po úpravě se rozrostla na 13 tzv. vstupů (od sloučeniny CH1c zde byly 2 protomery). Všechny sloučeniny dosahovaly záporné hodnoty skóre a bylo získáno celkem 20 póz, které byly ohodnoceny skóre -7 a méně. Pro zhodnocení výsledků bylo vybráno 5 nejlepších póz s ohledem na tři podmínky: nejnižší skóre, výhodné interakce, sterické působení v rámci vazebného místa poblíž katalytické domény enzymu. Výsledky byly zpracovány do tabulky 5-3 a obrázků 5-6 až 5-9.

**Tabulka 5-3 Tabulka skóre a interakcí derivátů
(*E*)-3-fenyl-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-onu**

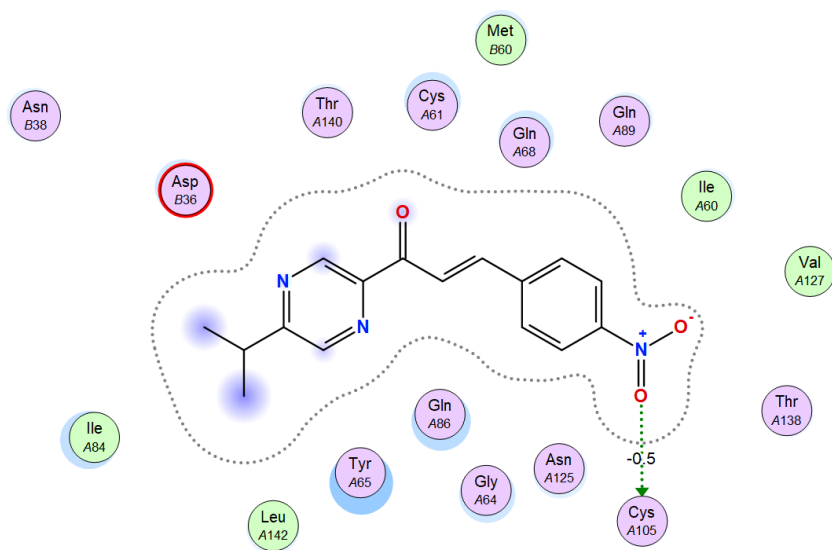


Kód látky	R ₁	R ₂
CH10i	isopropyl	4-NO ₂
CH10f	isopropyl	2-NO ₂
CH1i	<i>terc</i> -butyl	2-Cl
CH1y	<i>terc</i> -butyl	2-Br
CH1w	<i>terc</i> -butyl	2-Cl

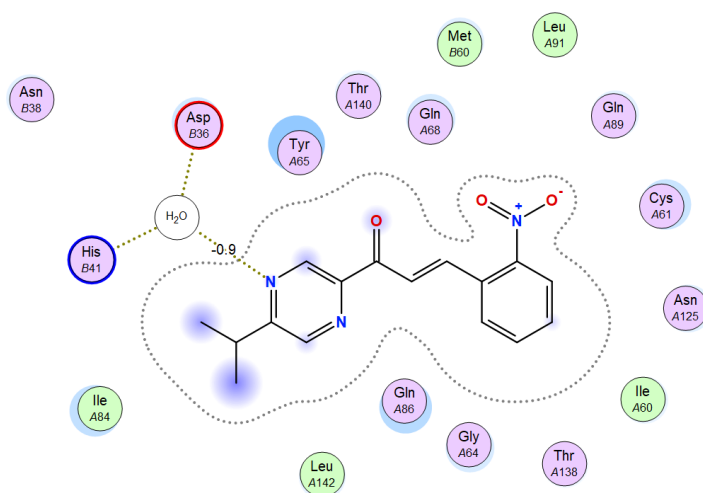
Kód sloučeniny	Skóre	Interakce	MIC
CH10i	-7,8143	CysA105	6,25 µg/ml
CH10f	-7,6763	H ₂ O	6,25 µg/ml
CH1i	-7,6195	CysA105	0,78 µg/ml
CH1y	-7,2971	H ₂ O	6,25 µg/ml
CH1w	-7,2709	H ₂ O	6,25 µg/ml



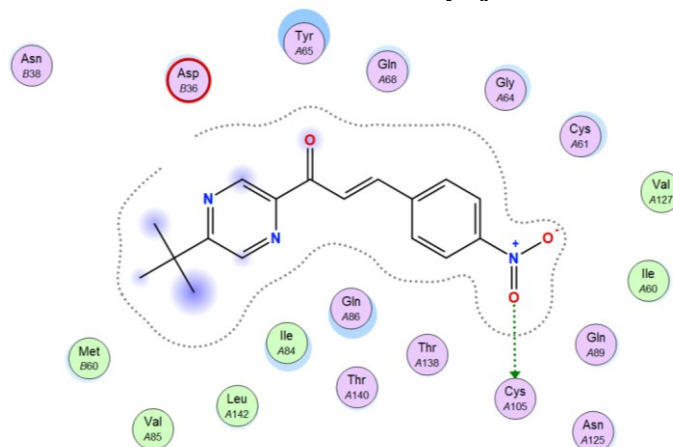
Obrázek 5-6 Pozice ligandu CH10i (tyrkysová) ve vazebném místě oproti původnímu ligandu (lososová).



Obrázek 5-7 CH10i –vodíková vazba s CysA105

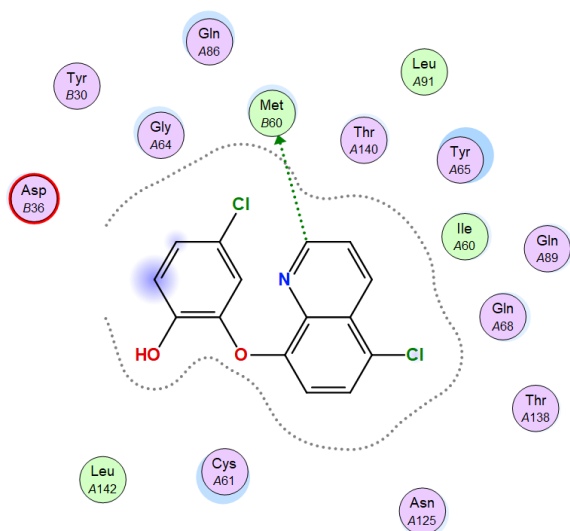


Obrázek 5-8 CH10f – vodíková vazba s vodou napojenou na HisB41 a AspB36

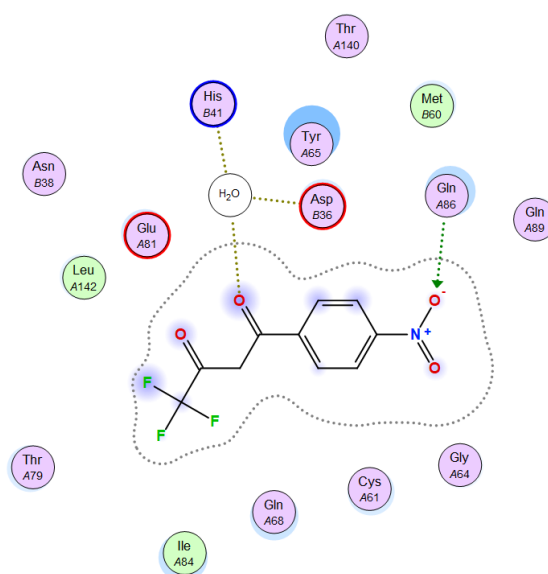


Obrázek 5-9 CH1i – slabá vodíková vazba s CysA105

Pózy sloučenin NAS-91 a NAS-21 byly ohodnoceny méně vyhovujícím skóre a v pořadí se umístily až za všemi pyrazinovými deriváty chalkonů (viz Obr. 5-10 a 5-11).



Obrázek 5-10 NAS-91
Skóre -6,2539
 Vodíková vazba s MetB60



Obrázek 5-11 NAS-21
Skóre -6,0371
 Vodíková vazba s vodou (HisB41; AspB36)

5.2.1.5 Diskuze výsledků

Všechny sloučeniny z podskupiny pyrazinových analog chalkonů se dokázaly dobře umístit do vazebného místa a jejich vygenerované pózy byly ohodnoceny vyhovujícím skóre. Oproti inhibitorům ze skupiny chalkonů, které byly zkoumány v publikaci Dong et al.⁶⁵, však došlo k vytvoření zcela jiných interakcí. Sloučeniny z řad pyrazinových analog chalkonů však vykazují inhibiční vlastnosti vůči *M. tuberculosis* zjištěné *in vitro*. Lze tedy usuzovat, že inhibice β -hydroxyacyl-ACP dehydratasy HadAB může být jedním z více mechanismů účinku těchto sloučenin.

Ukázalo se, že sloučeniny s pyrazinem substituovaným rozvětvenými uhlovodíkovými zbytky, jako jsou isopropyl, *tert*-butyl, získaly nejnižší hodnoty skóre. Tento fakt naznačuje, že díky rozvětveným uhlovodíkovým řetězcům dokážou zaujmout energeticky výhodnější prostorové uspořádání. Zároveň je možné, že tyto objemnější substituenty stericky brání navázání právě vznikající mykolové kyseliny a tímto mechanismem mohou přispívat k inhibici enzymu; toto však hodnota skóre neodráží.

První tři úspěšné sloučeniny byly na benzenovém jádře substituovány elektrony odtažující nitroskupinou, následující dvě sloučeniny pak bromem a chlorem. Tato substituce patrně výhodně mění rozložení elektronů oproti původně společně vykrystalizovanému buteinu, který je substituovaný hydroxyskupinami, což mu umožnilo navázat jiné vodíkové vazby. V případě zkoumané databáze sloučenin byla právě nitroskupina akceptorem vodíkové vazby s CysA150, konkrétně u sloučenin CH10i a CH1i.

O významnosti interakcí sloučenin CH10f, CH1y a CH1w s molekulou vody spojenou dalšími vodíkovými vazbami s katalytickou dyádou aminokyselin HisB41 a AspB36 lze polemizovat vzhledem k malé přesnosti lokalizace této molekuly rozpouštědla v prostředí *in silico* modelování oproti reálnému enzymu. V krystalografické studii Donga *et al.* butein interagoval s putativní molekulou vody navázanou na His-Asp dyádu, jako přesný mechanismus inhibice HadAB dehydratasy studovaných látek typu chalkonů vědci identifikovali především obstrukci kanálu pro navázání mykolové kyseliny.⁶⁵

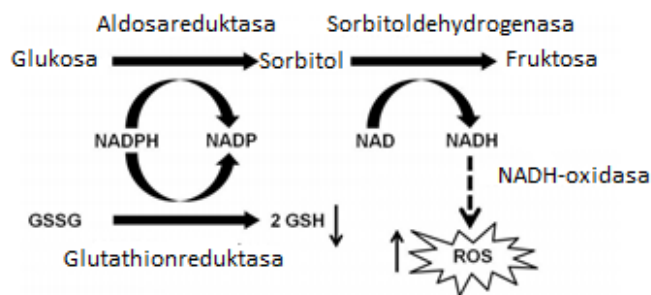
U sloučenin NAS-91 a NAS-21 byly identifikovány jiné typy interakcí oproti zkoumaným sloučeninám i oproti vykrystalizovanému ligandu. NAS-91 vytvořila konformaci s nekoplanárním uspořádáním obou jader uprostřed kanálu, v němž by NAS-91 měla inhibovat navázání mastných kyselin; interagovala pouze jednou vodíkovou vazbou s MetB60.⁷²

Pro další určení bližších informací o vztahu mezi strukturou a účinkem těchto sloučenin by bylo možné provést reálnou inhibiční esej a také prozkoumat možnosti pronikání sloučenin přes odolnou mykobakteriální stěnu.

5.2.2 Dokování derivátů kyseliny rhodaninoctové a derivátů thiazolidin-2,4-dionu do enzymu aldosareduktasa ALR2

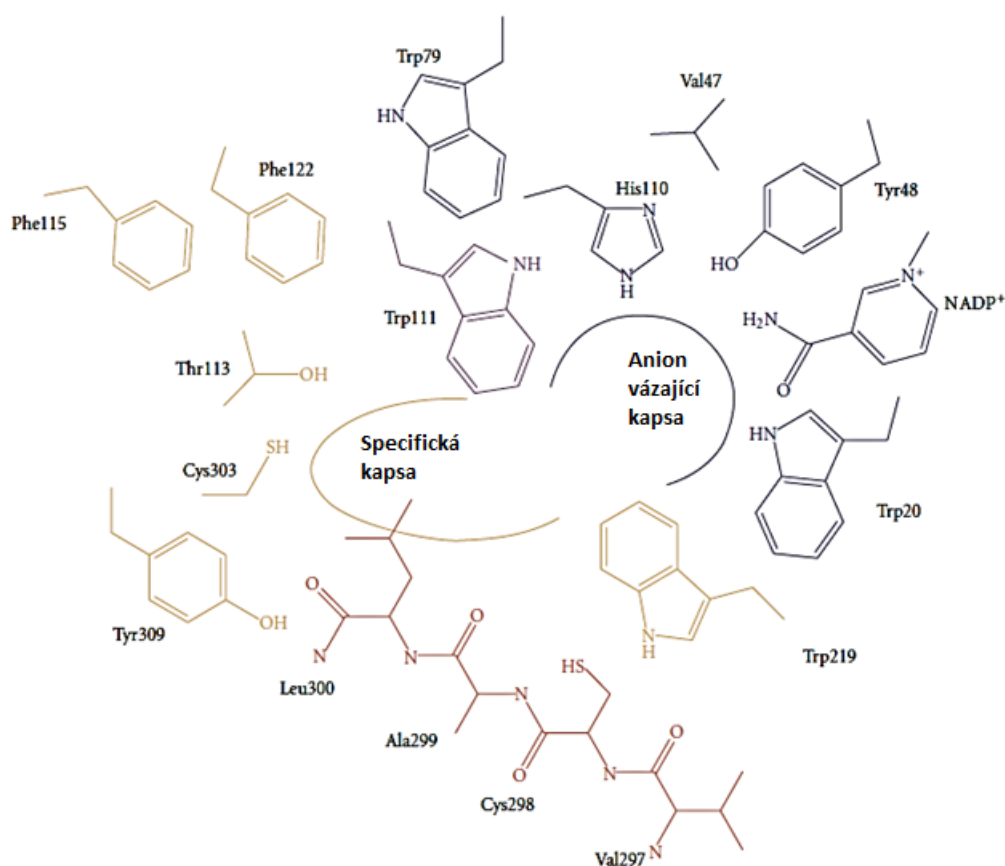
5.2.2.1 Aldosareduktasa 2

Diabetes mellitus je metabolickým onemocněním, které vzniká na podkladě nedostatečné produkce insulinu nebo jeho nedostatečného účinku v důsledku inzulinové rezistence. V patogenezi neuropatických komplikací diabetu hraje roli enzym aldosareduktasa 2 (ALR2). Jedná se o první enzym polyolové cesty, která způsobuje přeměnu D-glukosy na sorbitol (Obr. 5-12).⁷³ Právě akumulace sorbitolu bývá spolu s vyčerpáním systému NADPH/NADP⁺ a vznikem volných radikálů označována za jednu z příčin vzniku diabetických komplikací; proto ALR2 představuje možný terapeutický cíl.⁷⁴



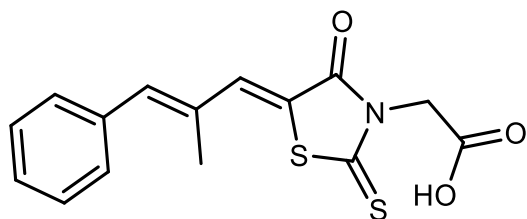
Obrázek 5-12 Schéma polyolové cesty, podle lit.⁷³

ALR2 (EC 1.1.1.21, AKR1B1) je monomerní protein s 8 prameny paralelního střídajícího se α a β uspořádání. Obsahuje dvě odlišná vazebná místa – jedno sloužící pro vazbu substrátu a druhé pro inhibici enzymu. Druhé zmíněné se také označuje jako vazebné místo inhibitorů aldosareduktasy (ARI), a nachází se v blízkosti nikotinamidové skupiny kofaktoru NADPH. Byly v něm identifikovány následující části: anion-vázající kapsa a specifická kapsa (Obr. 5-13).⁷⁴

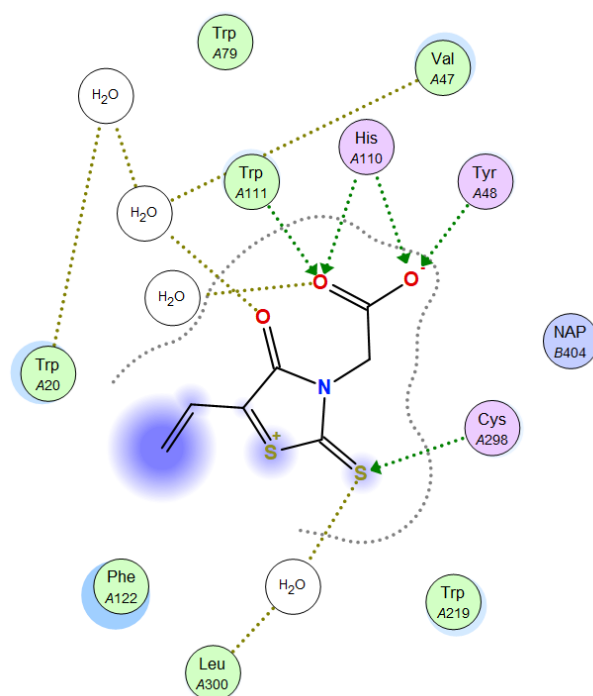


Obrázek 5-13 Schéma uspořádání aminokyselin ve vazebném místě ARI, podle Hymavati et al.⁷⁴

Existuje množství látek zkoumané pro jejich inhibici ALR2, zatím jedinou klinicky využívanou látkou je epalrestat (Obr. 5-14), registrovaný pro použití v některých zemích Asie, včetně Japonska, kde byl vyvinut.^{75,76} Pro molekulové dokování byl vybrán krystalografický obraz 4JIR⁷⁷, získaný metodou rentgenové krystalografie v rozlišení 2 Å.⁷⁸ Na základě poskytovaných informací o kvalitě byla struktura shledána validní. Obsahuje pouze fragment epalrestatu (Obr. 5-15). K dispozici nebyl jiný obraz obsahující celou strukturu epalrestatu, tento fragment byl shledán dostačujícím pro studium interakcí *in silico*.



2-[(5Z)-5-[(E)-3-fenyl-2-methylprop-2-enyliden]-4-oxo-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl]octová kyselina



Obrázek 5-14 Epalrestat

Obrázek 5-15 Interakce fragmentu epalrestatu s ALR2 (4JIR)

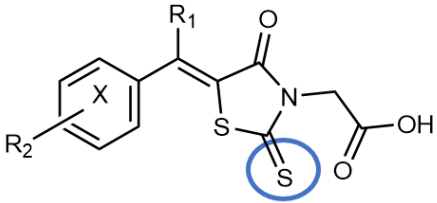
Interakce epalrestatu s ALR2 zahrnují především vodíkové vazby karboxylátové skupiny s AMK zbytky Trp111, His110, Tyr48. Thioxoskupina (nebo též sulfanylidenová skupina) je akceptorem vodíkové vazby Cys298. Dochází i k interakcím s molekulami vody pocházejícími z krystalografické struktury, některé z těchto molekul jsou navázané na aminokyseliny postranního řetězce (Trp20, Leu300)

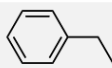
5.2.2.2 Příprava databáze malých molekul

Jako první set ligandů byly pro experiment vybráno devět derivátů 4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny, které představují podsekcí virtuální knihovny látek (Tab. 5-2). Druhý set ligandů tvořilo devět derivátů (2,4-dioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)octové kyseliny, které byly odvozeny od látek z prvního setu nahrazením

2-thioxoskupiny 2-oxoskupinou. V případě druhého setu ligandů se zatím nejedná o sloučeniny prakticky dostupné v naší laboroři. Celkem bylo dokováno 18 sloučenin. Sloučeniny byly v programu MOE upraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.1. Byla zafixována Z-izomerie na dvojně vazbě.

Tabulka 5-4 Deriváty 4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny



Kód látky	X	R1	R2
HPb2	C	H	H
HPt2	2-N	H	H
HPu2	3-N	H	H
HPv2	4-N	H	H
HPs-2	2,4-N	H	H
HP-02	2,4-N	CH ₃	H
HP-32	2,4-N	CH ₃	butyl
HP-12	2,4-N	CH ₃	t-butyl
HP-152	2,4-N	CH ₃	

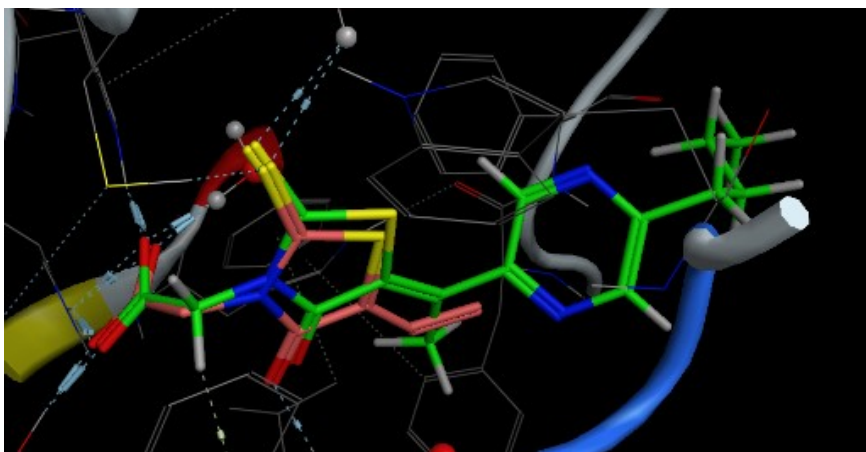
5.2.2.3 Redokování původního ligandu

Bylo provedeno opětovné dokování ligandu epalrestatu s RMSD = 0,2433 Å.

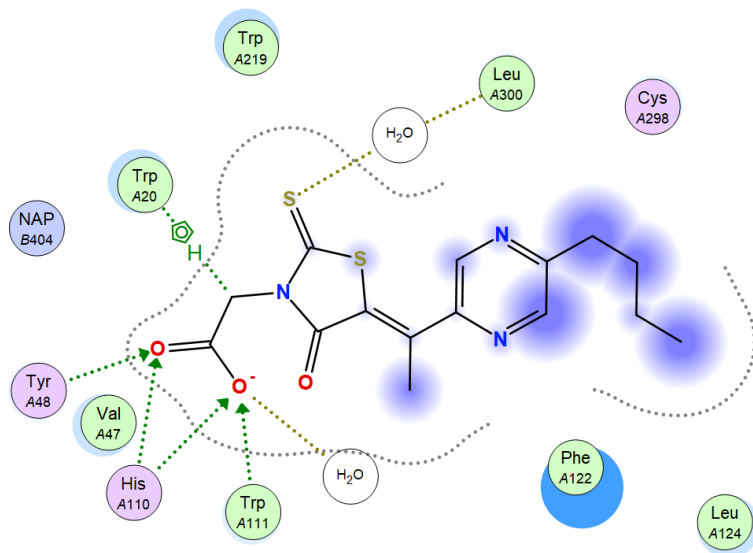
5.2.2.4 Výsledky dokování

Deriváty (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny

Všechny deriváty dokázaly zaujmout pózy s hodnotami skóre v rozmezí -5,170 až -7,039. Pózu s nejnižším skóre **-7,039** zaujal derivát pod laboratorním kódem HP-32 (Obr. 5.16 a 5-17).



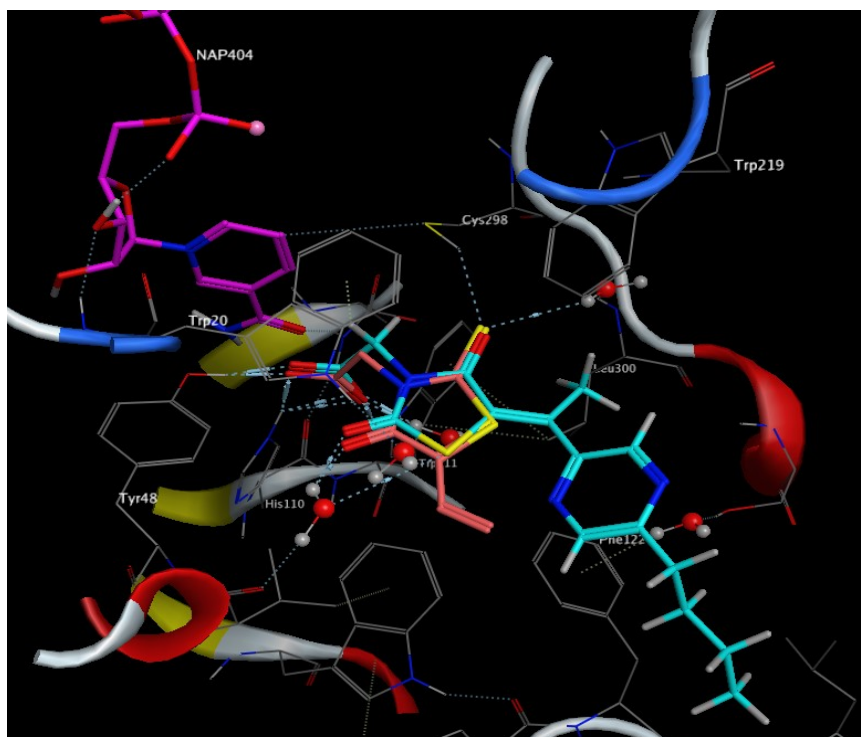
Obrázek 5-16 HP-32 (zelená) ve vazebném místě ALR2, porovnání s epalrestatem (lososová)



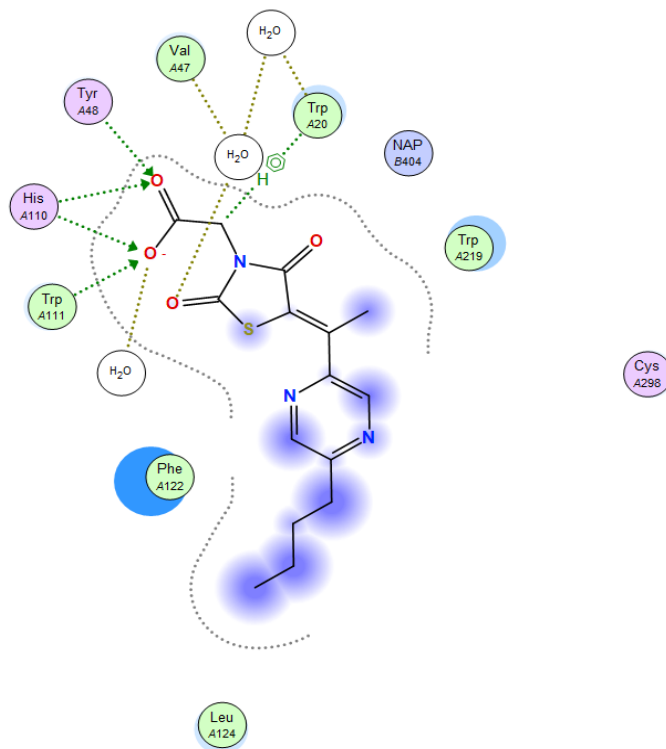
Obrázek 5-17 Interakční diagram HP-32 ve vazebném místě ALR2.

Deriváty (2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny

Skóre všech dokovaných sloučenin se pohybovala od -5,3600 do -7,2542. Ze všech 46 vytvořených vazebných uspořádání byly vybrány pózy s nejnižším skóre od každé unikátní sloučeniny.



Obrázek 5-18 2-oxo derivát HP-32 (tyrkysová) společně s fragmentem ligandu epalrestatu (lososová). Vyznačen kofaktor NADP (fuchsiová).



Obrázek 5-19 Interakční diagram 2-oxo derivátu HP-32 ve vazebném místě ALR2

Tabulka 5-5 Skóre a interakce sloučenin

Laboratorní kód	Skóre optimální pózy	Vodíkové interakce	Skóre izosteru	Vodíkové interakce izosteru
HP-32	-7,0392	His110; Trp111; Tyr48; W-Leu300; Trp20	7,2542	His110; Trp111; Tyr48; Trp20
HP-152	-6,9442	His110; Trp111; Tyr48; Trp20	-7,1685	His110; Trp111; Tyr48; Trp20
HP-12	-6,8053	His110; Trp111; Tyr48; Cys298	-7,1123	His110; Trp111; Tyr48; Trp20
HPt2	-6,7437	His110; Trp111; Tyr48; Cys298	-6,6420	His110; Trp111; Tyr48; Cys298
HPu2	-6,7186	His110; Trp111; Tyr48; Cys298	-6,6215	His110; Trp111; Tyr48
HPb2	-6,6820	His110; Trp111; Tyr48; Cys298	-6,6509	His110; Trp111; Tyr48; Cys298
HPs-2	-6,5096	His110; Trp111; Tyr48; Cys298; Trp20	-6,6329	His110; Trp111; Tyr48; Cys298
HPv2	-6,3264	His110; Trp111; Tyr48; Cys298	-6,6900	His110; Trp111; Tyr48; Trp20; Cys298
HP-02	-5,9150	His110; Trp111; Tyr48;	-6,6940	His110; Trp111; Tyr48; Trp20
Epalrestat	-7,0887	His110; Trp111; Tyr48; Cys298		

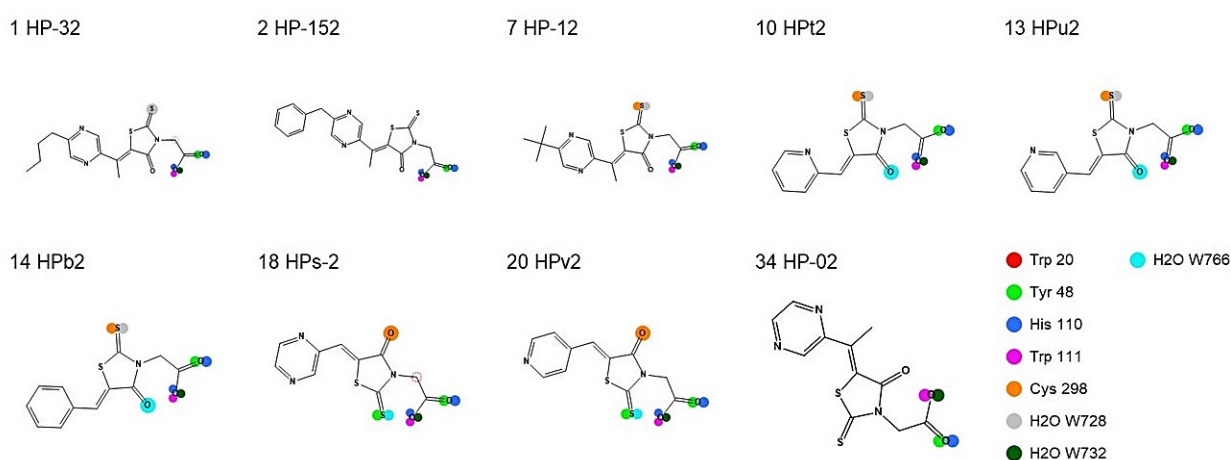
5.2.2.5 Diskuze výsledků

Zkoumané deriváty získaly nízké hodnoty skóre, póza derivátu HP-32 měla skóre srovnatelné s epalrestatem. Mezi jejich hodnotami skóre a interakcemi s receptorem bylo možné pozorovat pouze malé rozdíly (Tab. 5-5).

Mezi deriváty (4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny vynikal derivát **HP-32** (Obr. 5-18 a 5-19), který měl velmi podobné interakce jako původní ligand epalrestat. Jeho póza splňuje podmínku interakcí se třemi klíčovými aminokyselinovými zbytky Tyr48, His110, Trp111. Oproti epalrestatu se u HP-32 objevila jiná slabá interakce π -elektronů Trp20

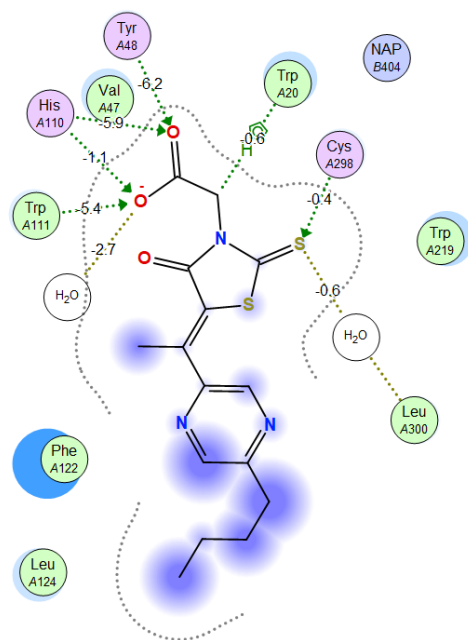
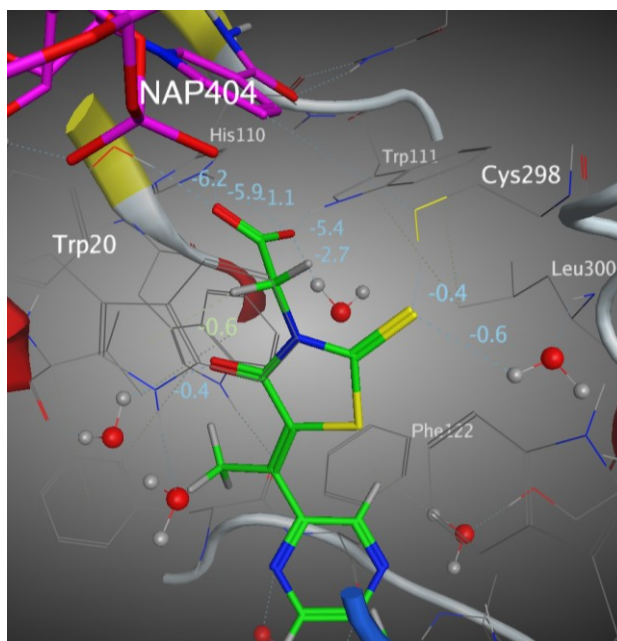
a s methinem mezi karboxylátovou skupinou a rhodaninovým kruhem. Interakce s Trp20 byla navázána i v případě jiných sloučenin. Další interakcí derivátu HP-32 byla vodíková vazba thioxoskupiny s vodou, která je spojena s aminokyselinou Leu300 patřící do specifické kapsy enzymu ALR2.

Zhodnocení výsledků dokování pomocí Protein Ligand Interaction Fingerprints analýzy (PLIF) ukázalo, že interakce na karboxylové skupině byly stejné pro všechny zkoumané pózy, kromě posledního derivátu HP-02, kde karboxylátový anion byl akceptorem vodíkové vazby od Trp111 a také molekuly vody W732 (Obr. 5-20).



Obrázek 5-20 PLIF analýza 2D struktury ligandů spolu s vyznačenými interakcemi a barevnou legendou reagujících AMK zbytků a tří molekul vody

Kromě karboxylátové skupiny interagovala v některých případech i thioxoskupina, a to jako akceptor vodíkové vazby od Cys298. Tato interakce, kterou vykazuje i molekula epalrestatu, byla nalezena u téměř všech nejlepších póz derivátů rhodaninoctové kyseliny, kromě prvních dvou – **HP-32 a HP-152**. Interakce byla skryta těsně pod limitem nastaveným pro rozeznání vodíkové vazby (-0,4 kcal/mol oproti -0,5 kcal/mol). Program MOE umožňuje i výpočet teoretických energií jednotlivých vodíkových vazeb, pro porovnání – energie vazeb na karboxylátové skupině dosahují hodnot cca -5,9 kcal/mol (4-21). Interakci Cys298 s thioxoskupinou lze považovat za méně významnou z hlediska síly a teoreticky by ji bylo možné najít u všech hodnocených póz.



Obrázek 5-21 Výpočty energetických příspěvků interakcí sloučeniny HP-32

Možné využití inhibitorů ALR2 v praxi je otázkou nejen aktivity, ale také jejich selektivity oproti ostatním enzymům z rodiny oxidoreduktas, např. aldehydreduktase ALR1. Ve vazebném místě enzymu ARL2 se nachází aminokyselinová rezidua, která patří do tzv. anion-vázající kapsy, jedná se o Trp111, Trp79, His110, Val47, Tyr48, Trp20, která zároveň obklopují kofaktor NADP⁺ a jsou tedy místem interakcí látek typu derivátů rhodaninoctové kyseliny (vč. epalrestatu). Byla popsána i tzv. kapsa specifity nebo selektivity, zahrnující rezidua Trp219, Val297, Cys298, Ala299, Leu300, Tyr309, Cys303, Thr113, Phe122 a Phe115.⁷⁴

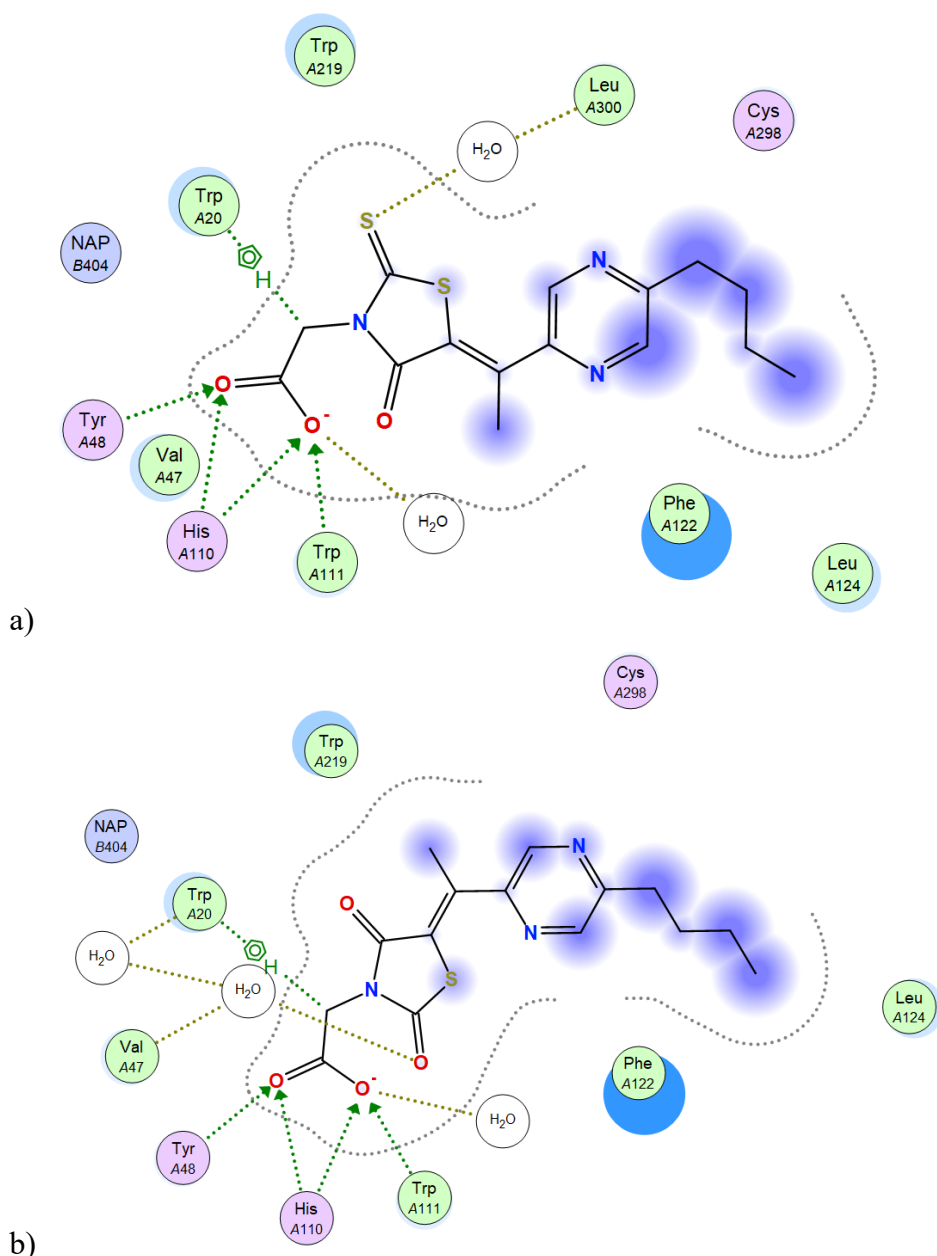
Šest ze zkoumaných látek bylo testováno na selektivitu mezi ALR2 a ALR1 (Tab. 5-6), nejvyšší faktor selektivity (SF) byl prokázán u derivátu **HP-12** (182). U této látky byla při dokování přítomna vodíková vazba s Cys298 již při hranici 0,5 kcal/mol. Interakce s aminokyselinovým zbytkem z tzv. specifické části by mohla být příčinou vysokého faktoru selektivity, jedná se však o velmi slabou interakci. Interakci se stejnou energetickou hodnotou navázalo i několik dalších sloučenin, např. HPt-2, HPs-2, které však měly faktor selektivity o 1 řád nižší (39, 20).⁷⁶

Tabulka 5-6 Porovnání *in silico* a *in vitro* aktivity vůči ALR2, Kučerová-Chlupáčová⁷⁶

Laboratorní kód	Skóre nejlepší pózy	IC ₅₀ (uM)		Faktor selektivity
		ALR2	ALR1	
HP-32	-7,0392	0,041±0,008	5,74 ±1,83	140
HP-152	-6,9442	0,148±0,007	4,27±0,53	29
HP-12	-6,8053	0,073±0,002	13,30±3,25	182
HPt2	-6,7437	0,112±0,003	4,40±1,47	39
HPu2	-6,7186	ND	ND	ND
HPb2	-6,6820	ND	ND	ND
HPs-2	-6,5096	0,490±0,100	9,73±1,09	20
HPv2	-6,32637	ND	ND	ND
HP-02	-5,9150	0,240±0,106	21,90 ± 9,5	91
Epalrestat	-7,0887	0,227±0,019	36,32±2,82	160

V tabulce 5-6 jsou ligandy seřazeny podle nejnižšího dosaženého skóre, poslední je referenční epalrestat. Sloučenina HP-32 měla nejnižší skóre i nejnižší IC₅₀, a to dokonce nižší než referenční epalrestat. Selektivita vůči podtypu ALR2 však byla oproti epalrestatu nižší. Druhá nejúspěšnější sloučenina podle skóre, HP-152, sice měla lepší hodnotu IC₅₀ oproti epalrestatu, ale selektivitu vykazovala nízkou. Třetí v pořadí, sloučenina HP-12 měla o něco vyšší IC₅₀ oproti HP-32, ale faktorem selektivity překonala i referenční epalrestat.

Skupina derivátů (2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octových kyselin dosáhla při dokování nepatrně energeticky výhodnějšího skóre, než původní skupina látek obsahujících thioxoskupinu. Všechny zkoumané látky interagovaly s aminokyselinami His110, Trp111, Tyr48, stejně jako jejich předlohy. Většina látek interagovala ještě s jednou další aminokyselinou, a právě v této interakci se často lišila oproti předloze. Jednalo se o vodíkovou vazbu mezi π elektrony jádra Trp20, u dalších sloučenin pak o slabou vodíkovou vazbu směrem k Cys298. Po snížení hodnoty energie potřebné pro rozeznání vodíkové vazby na 0,4 kcal lze interakci s Cys298 opět odhalit u všech nejlepších pól unikátních ligandů.



Obrázek 5-22 Porovnání interakčních diagramů; a) HP-32, b) 2-oxo derivát HP-32.

Při porovnání HP-32 a odpovídajícího derivátu (2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny se látky shodovaly v důležitých interakcích, výměnou sирné skupiny za kyslíkatou bylo dosaženo pouze malé obměny ve vodíkových vazbách. Oxoskupina interagovala s jinou molekulou vody, která byla spojena s Val47. Rozdíl tedy můžeme spatřit pouze ve skóre přiřazeném jednotlivým vodíkovým vazbám, které měl 2-oxo derivát HP-32 nepatrně nižší.

Došlo také ke změně v pořadí sloučenin, první tři úspěšné sloučeniny však zůstaly stejné v obou sítích ligandů, tedy HP-32, HP-152, HP-12. Na základě molekulově modelovací studie je tyto sloučeniny možné doporučit k budoucí syntéze a testování jejich aktivity vůči ALR2.

5.2.3 Dokování všech sloučenin z virtuální knihovny látek do enzymu mykobakteriální tyrosinfosfát proteinfosfatasa B

5.2.3.1 Mykobakteriální tyrosinfosfát proteinfosfatasa B (MptpB)

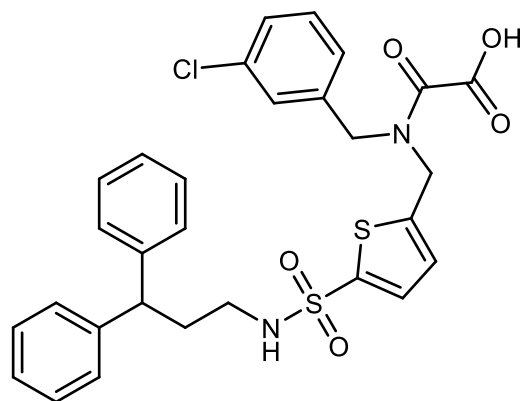
Tyrosinkinasy a tyrosinfosfatasy patří mezi klíčové enzymy v buněčné signalizaci. Mykobakteriální PtpB (z angl. *Mycobacterium* phosphotyrosin phosphatase B) patří mezi proteiny vylučované patogenem *M. tuberculosis* do hostitelské buňky, kde pozměňuje buněčnou signalizaci. Ve studii Sigha *et al.* bylo pomocí mutace genu pro MptpB objasněno, že bez této fosfatasy není *M. tuberculosis* schopné přežít v aktivovaných lysozomech morčete.⁷⁹ Podrobnější mechanismus byl zkoumán ve studii Fan *et al.*, a bylo potvrzeno, že MptpB přispívá k přežití *M. tuberculosis* v makrofázích.⁸⁰

Výhodou MptpB jako terapeutického cíle v léčbě tuberkulózy je, že případný inhibitor pro svůj účinek nemusí procházet odolnou buněčnou stěnou *M. tuberculosis*. Nutno je však brát v potaz, že inhibitory MptpB nebudou vykazovat svůj účinek v klasických hodnoceních antimykobakteriální aktivity kultivací.⁸¹ Přestože vývoj účinného inhibitoru MptpB zůstává výzvou, studie Vickersové *et al.* z roku 2018 na zvířecím modelu popisuje možnosti inhibitorů MptpB podpořit intracelulární účinek isoniazidu a rifampicinu a předkládá výsledky napovídající možnému užití inhibitorů MptpB v léčbě TBC i samostatně.⁸² Byly popsány inhibitory tohoto enzymu, včetně derivátů chalkonu s IC_{50} v řádu mikromolů.⁸³

Pro molekulové dokování byla vybrána krystalografická struktura 2OZ5 z PDB, byla získána metodou RTG krystalografie s rozlišením 2 Å.^{84,85} Druhým dostupným krystalografickým obrazem v této databázi je 1YWF stejného autora, s rozlišením 1,71 Å.^{86,87} Na základě obsahu vykrystalizovaného ligandu byla vybrána struktura 2OZ5, zároveň disponovala lepším hodnocením v dalších hodnotách charakterizujících kvalitu krystalografické struktury. Při zkoumání této struktury bylo zjištěno, že při vazbě ligandu dochází ke změně konformace enzymu a k posunu některých aminokyselinových zbytků o přibližně 27 Å.⁸⁵ Přesto byla struktura 2OZ5 vybrána pro molekulové dokování i v dalších publikovaných článcích.^{81,88}

MptpB je heterodimerní enzym obsahující rozsáhlé vazebné místo s primární kapsou vázající fosfátovou skupinu a dvěma sekundárními kapsami, které nejsou přítomny u lidských fosfatas.⁸² V obrazu 2OZ5 interaguje se dvěma molekulami ligandu OMTS (Obr. 5-23). Jedna z nich se váže proximálně ke katalytické aminokyselině Cys160, toto vazebné místo bylo vybráno k dalšímu studiu, neboť hodnoty RMSD u opětovně dokovaného ligandu byly nižší

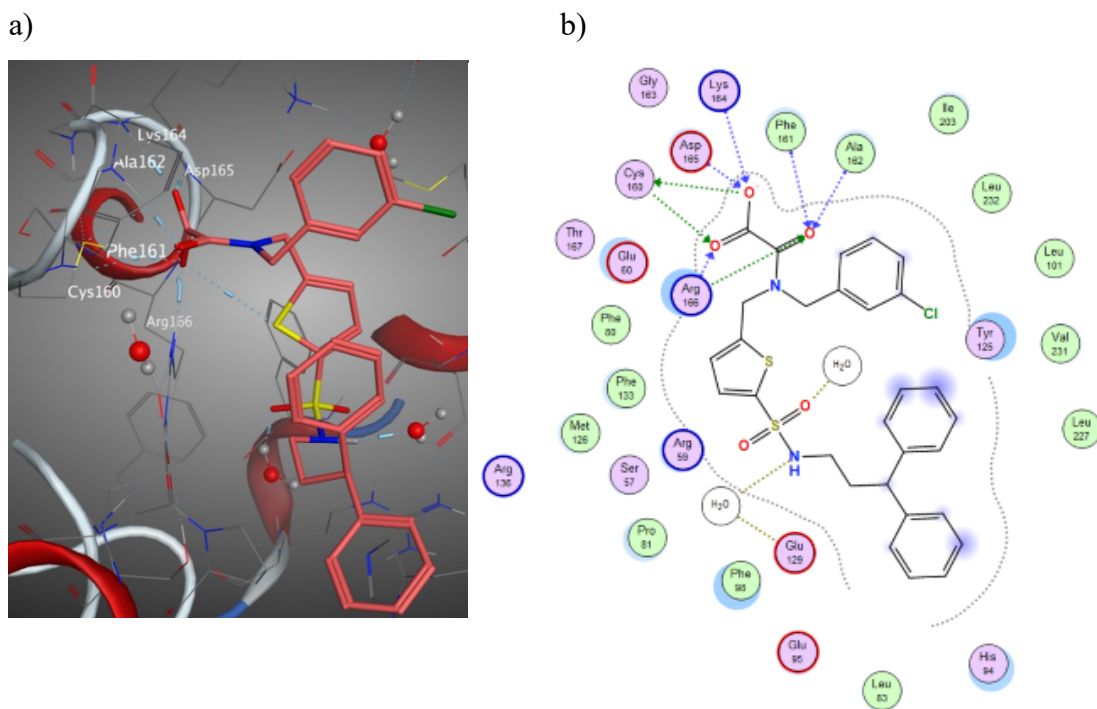
(0,2748 Å) oproti distálnímu vazebnému místu. Podobný postup byl vybrán v článku Zhanga *et al.*⁸¹



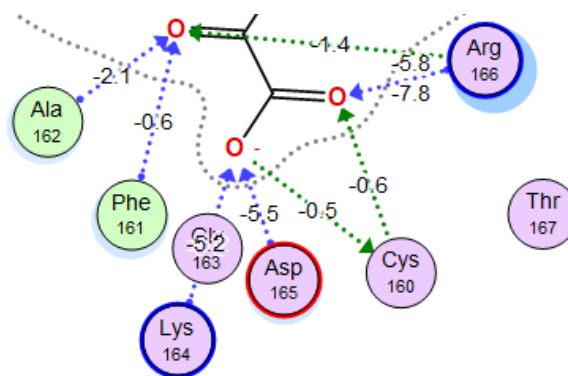
2-[(3-chlorobenzyl){5-[N-(3,3-diphenylpropyl)sulfamoyl]-2-thienyl}methyl)amino]-2-oxooctová kyselina

Obrázek 5-23 Ligand (oxalylaminomethylen)thiopen sulfonamid (zkráceně OMTS)⁸⁵

Ligand OMTS patří mezi mimetika tyrosinfosfátu, která jsou odvozena od oxalátové kyseliny.⁸⁸ Vykazoval vůči enzymu MptpB IC_{50} $0,44 \pm 0,05 \mu M$.⁸⁵ Konkrétně oxalylaminoskupina vytváří klíčové interakce s enzymem MptpB (Obr. 5-24 a 5-25).



Obrázek 5-24 a) OMTS ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram sloučeniny



Obrázek 5-25 Interakce oxalátové skupiny ligandu OMTS, vypočítané příspěvky k vazebné energii

Nejsilnější interakcí byla vodíková vazba s Arg166, poté Asp165, Lys164 a Ala162. S katalytickou aminokyselinou Cys160 došlo k navázání slabé vodíkové interakce, stejně jako s Phe161.

5.2.3.2 Dokování všech sloučenin z databáze

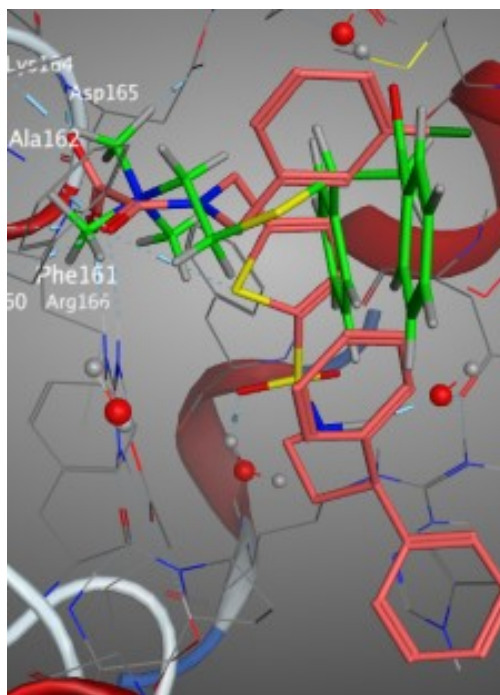
Po úpravě databáze všech ligandů standardním způsobem bylo nutné zhodnotit čas trvání dokování 317 molekul. Pro zrychlení procesu bylo spuštěno dokování přes tzv. Batch soubor, který umožnil využít více jader procesoru, čímž zvýšil výkon počítače a zrychlil simulaci. Oproti původně odhadnutému času 24 hodin tedy dokování trvalo 1,5 hodiny.

5.2.3.3 Výsledky

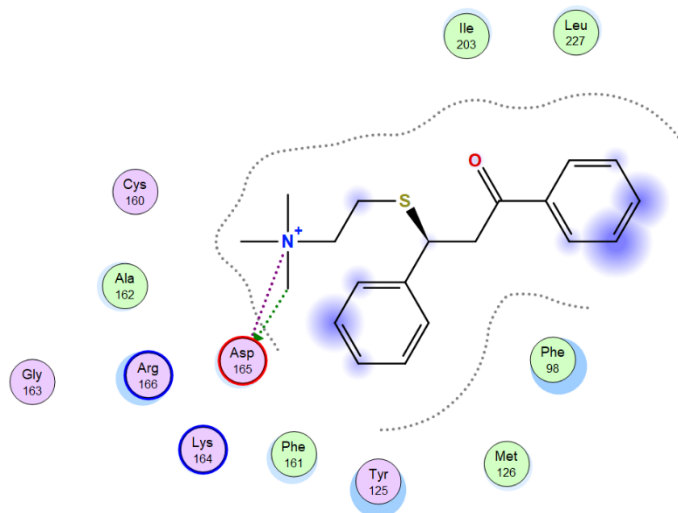
Celkově pózy nabývaly skóre od -12,5748 do -3,8794. Deset póz ohodnocených nejnižším skóre bylo dále vyhodnocováno (Obr. 5-26 až 5-28, Tab. 5-7)

1. Ch0-S14 skóre -12,5748.

a)



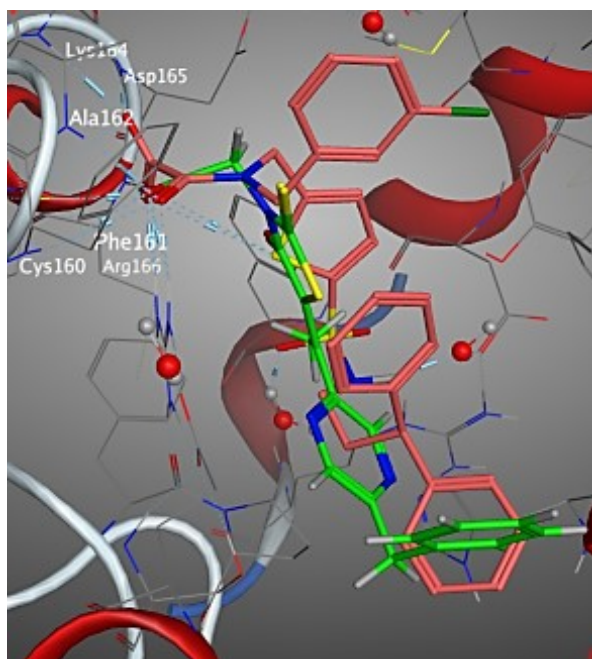
b)



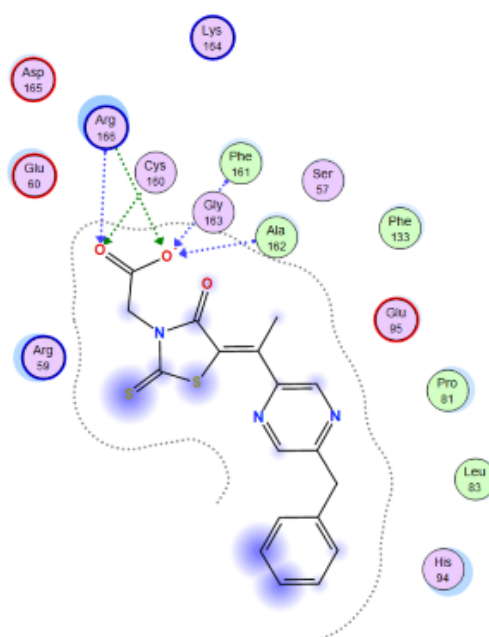
Obrázek 5-26 a) Konformace Ch0-S14 (zelená) oproti OMTS (lososová) ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram Ch0-S14

2. HP-152 skóre -8,1236.

a)



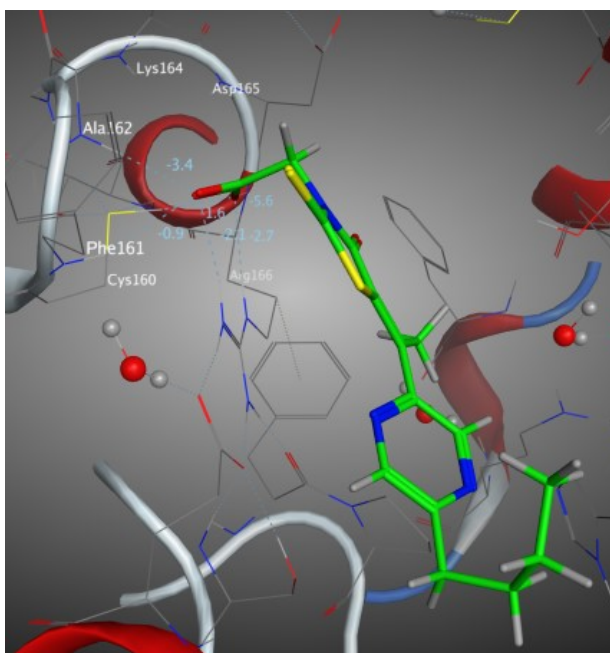
b)



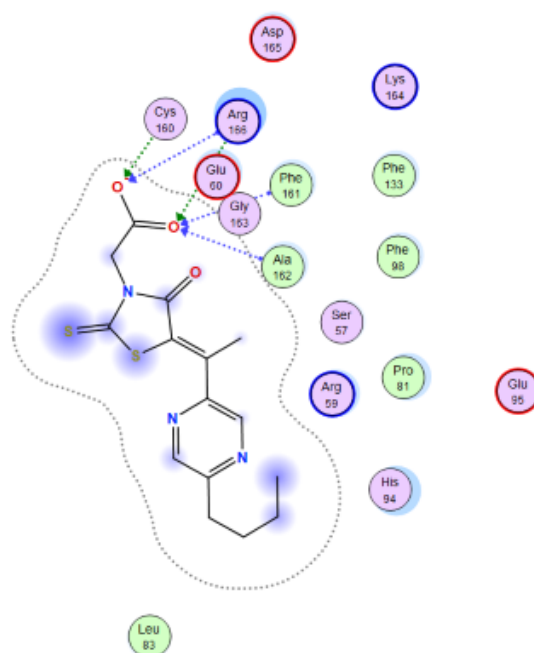
Obrázek 5-27 a) Konformace HP-152 (zelená) oproti OMTS (lososová) ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram HP-152

3. HP-32 skóre -8,0097

a)

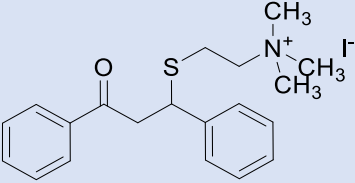
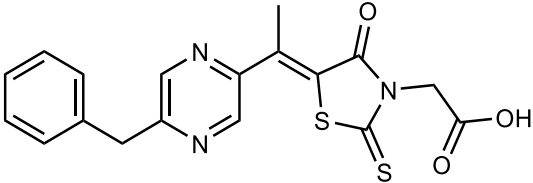
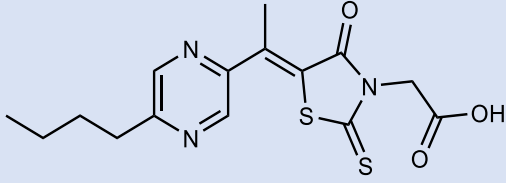
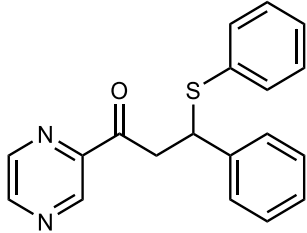
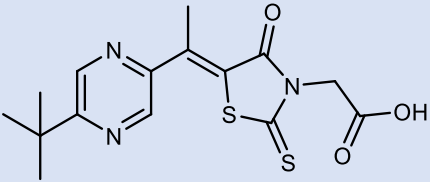
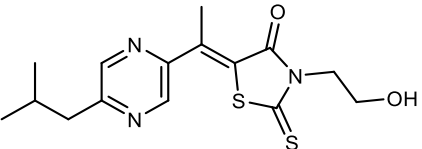


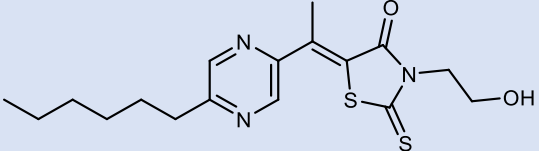
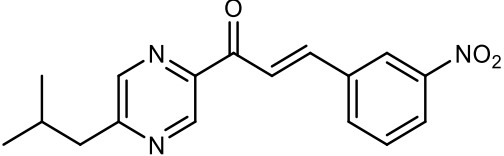
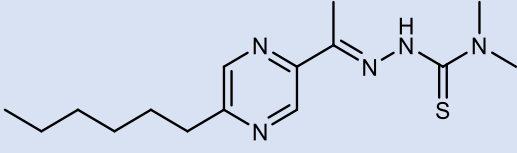
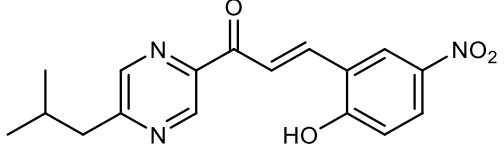
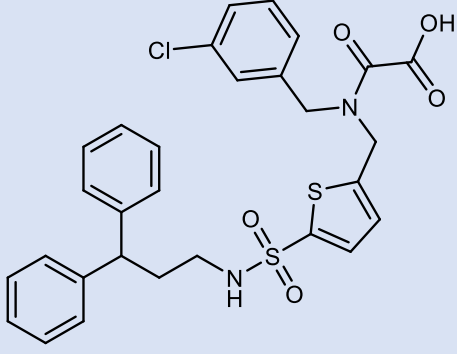
b)



Obrázek 5-28 a) Konformace HP-32 (zelená) oproti OMTS (lososová) ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram HP-32

Tabulka 5-7 Tabulka skóre a interakcí

Pořadí	Lab. kód	Struktura	Skóre	Interakce
1.	Ch0-S14	 <p>2-(1,3-difenyl-3-oxopropyl-1-sulfanyl) ethyltrimethylamonium-jodid</p>	-12,5748	Asp165
2.	HP-152	 <p>(Z)-2-(5-[1-(5-benzylpyrazin-2-yl)ethyliden]-4-oxo- 2-thioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina</p>	8,1236	Arg166, Phe161, Ala162, Cys160
3.	HP-32	 <p>(Z)-2-(5-[1-(5-butylpyrazin-2-yl)ethyliden]-4-oxo- 2-thioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina</p>	-8,0097	Arg166, Phe161, Ala162, Cys160
4.	Ch0-S10	 <p>3-fenyl-3-(fenylsulfanyl)-1-(pyrazin-2-yl)propan-1-on</p>	-7,8329	Tyr125
5.	HP-12	 <p>(Z)-2-(5-(1-[5-(<i>tert</i>-butyl)pyrazin-2-yl]ethyliden)-4-oxo-2- thioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina</p>	-7,6185	Arg166, Phe161, Ala162, Cys160
6.	HP-21	 <p>(Z)-3-(2-hydroxyethyl)-5-(1-[5-isobutylpyrazin-2-yl]ethyliden)- 2-thioxothiazolidin-4-on</p>	-7,4627	Arg166

7.	HP-141	 <chem>C1=CN(C=C(C1)C(=O)N(CS1)S1)C=C(C=C1)C2=CN(C=CN2)CCCCC</chem> (Z)-5-[1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethyliden]-3-(2-hydroxyethyl)-2-thioxothiazolidin-4-on	-7,3896	Arg166, Ala162
8.	CH2j	 <chem>CC(C)CC1=CN(C=C(C1)C(=O)C=C(C=C2)C=C(C=C2)[N+](=O)[O-])N=C2N=CN=C2</chem> (E)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-3-(3-nitrofenyl)prop-2-en-1-on	-7,3801	Arg166, Cys160, Asp165, Lys164
9.	TSC-14b	 <chem>C1=CN(C=C(C1)C(=O)N(C)C)C=C(C=C2)C=CN(C2)CCCCC</chem> (E)-2-[1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethyliden]-N,N-dimethylhydrazin-1-karbothioamid	-7,3489	Arg 166, Ala162, Lys164, Asp165, Cys160
10.	CH2k	 <chem>CC(C)CC1=CN(C=C(C1)C(=O)C=C(C=C2)C=C(C=C2)O)N=C2N=CN=C2</chem> (E)-3-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on	-7,3082	Arg166, Cys160
	Původní ligand OMTS	 <chem>CC(=O)OCCN(Cc1ccc(Cl)cc1)CSc2cc(S(=O)(=O)NCCc3ccccc3)cc2</chem> 2-[(3-chlorbenzyl)({5-[N-(3,3-difenypropyl)sulfamoyl]-2-thienyl)methyl)amino]-2-oxooctová kyselina	-11,5974 (redock)	Arg166, Phe161, Ala162, Cys160, Lys164

5.2.3.4 Diskuze

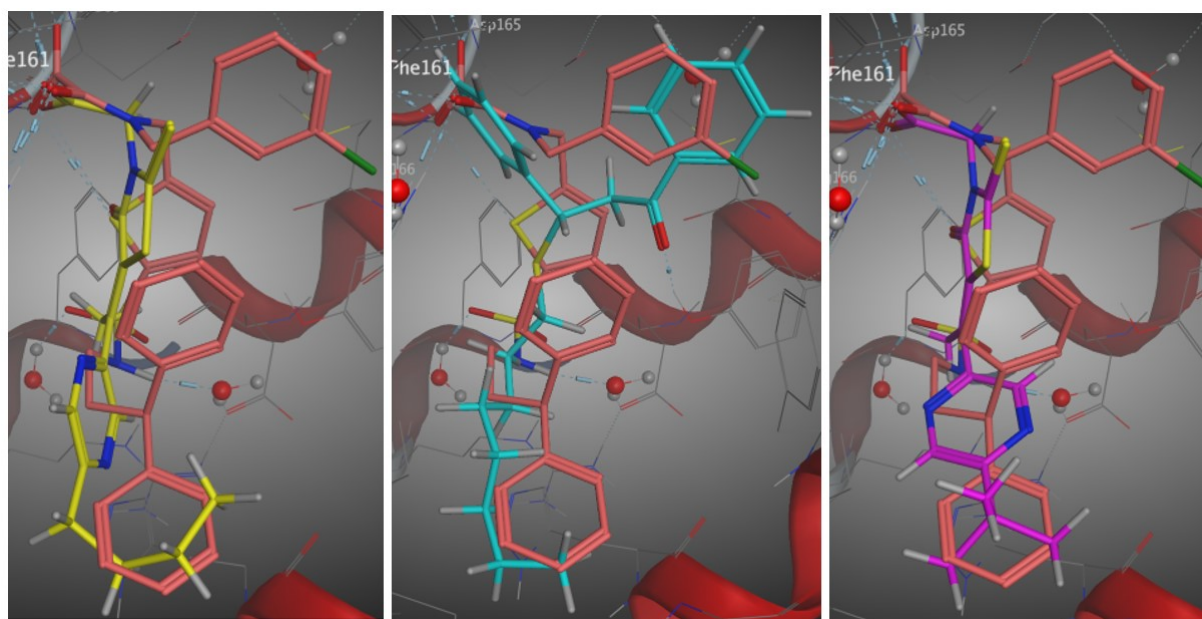
Z dokování všech 317 sloučenin bylo analyzováno deset nejlepších pól unikátních ligandů. Jejich skóre se pohybovala ve velmi dobrých rozmezech -12,5748 až -7,3082.

Sloučenina s nejnižším skóre **Ch0-S14** navázala při dokování iontovou interakcí prostřednictvím amoniového iontu s Asp165. Zároveň měla slabou interakci prostřednictvím vodíkové vazby s dusíkem Asp165. Iontová vazba zapříčinila nejlepší skóre této sloučeniny,

jedná se obecně o silnější interakci oproti vodíkové vazbě. Asp165 je jednou z několika AMK, se kterými reagoval původní ligand OMTS. Sloučenina je charakteru amoniové soli, což by pravděpodobně mohlo způsobit její sníženou prostupnost přes biologické membrány a tím nízkou absorpci.

U druhé sloučeniny **HP-152** interagovala karboxylová skupina, jejíž kyslíky byly akceptory vodíkových vazeb aminokyselin Arg166, Phe161, Ala162 a Cys160. Třetí v pořadí byla molekula **HP-32**, která byla na rozdíl od HP-152 substituována butylem. V porovnání s předchozí sloučeninou došlo i ke stejným interakcím s aminokyselinami Arg166, Phe161, Ala162 a Cys160. Pouze Arg166 vystupoval v nepatrně jiné pozici ve vztahu ke kyslíkům karboxylové skupiny. Zelenou barvou je v interakčním diagramu vyznačená vodíková vazba týkající se postranního řetězce aminokyseliny, modrou je vyznačená vazba týkající se kostry řetězce aminokyseliny.

Konformaci lze na Obr. 5-29 sledovat u poz sloučenin HP-32, Ch0-S10 a HP-12.



Obrázek 5-29 Zleva: Třetí nejlepší póza (HP-32) žlutě, čtvrtá nejlepší póza (Ch0-S10) tyrkysovou a pátá nejlepší póza (HP-12) fuchsiovou.

Obvyklou interagující částí molekul byla karboxylová skupina, která většinou vytvářela podobné interakce jako oxalátová skupina ve sloučenině OMTS. Objevily se však i jiné interakce – např. iontová vazba amoniové skupiny v případě sloučeniny Ch0-S14, interagující nitroskupina v případě sloučeniny CH-2j nebo thioxoskupina derivátu thiosemikarbazonu TSC-14b.

Co se týče uspořádání ligandu ve vazebném místě, první póza v pořadí zaujala zcela odlišné uspořádání oproti původnímu ligandu. Deriváty rhodaninoctové kyseliny (v pořadí 2.,

3., 5. a další) se již přibližovaly konformaci původního ligandu (Obr. 5-29). Vizuálně nejpodobnější se zdála být čtvrtá nejlepší póza (Ch0-S10), která však vystupovala jako akceptor vodíkové vazby Tyr125 a nevyskytla se u ní interakce s žádnou aminokyselinou typickou pro známý inhibitor OMTS.

Slabinou tohoto experimentu bylo dokování pouze do jednoho ze dvou vazebných míst enzymu a také fakt, že enzym prochází konformační změnou po navázání původního ligandu OMTS. Proto není možné dost dobře predikovat interakce ligandů a enzymů *in silico*.

6 Závěr

Byla úspěšně vytvořena virtuální knihovna 317 látek a provedena statistická analýza z hlediska vybraných deskriptorů důležitých pro design léčiv. Využití bylo demonstrováno v rámci molekulově modelovací studie, která zahrnovala molekulové dokování do tří cílových makromolekul.

Při dokování vybraných pyrazinových derivátů chalkonu do β -hydroxyacyl-ACP dehydratasy HadAB byly zkoumány sloučeniny, které vykázaly *in vitro* inhibici *M. tuberculosis*. Bylo zjištěno, že tento enzym by mohl být jejich potenciálním cílem, bylo by však nutné tuto hypotézu experimentálně ověřit v podrobnější studii. V experimentu byly zkoumány i známé inhibitory tohoto enzymu.

Dalším studovaným enzymem byla lidská ALR2, která se zapojuje do metabolismu glukosy během diabetu, což přináší nežádoucí dlouhodobé komplikace. Dříve připravené deriváty kyseliny (4-thioxo-2-oxothiazolidin-3-yl)octové vykázaly *in vitro* submikromolární aktivitu a vysokou selektivitu vůči ALR2. Tyto látky strukturně příbuzné klinicky používanému léčivu byly dokovány do ALR2 společně se svými 2-oxo deriváty jako kyslíkatými izostery. Výsledky studie predikovaly, že deriváty (2,4-diooxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny by mohly rovněž vykazovat nízké IC_{50} hodnoty, proto by bylo vhodné je připravit a tuto predikci laboratorně ověřit.

Dokování všech sloučenin z databáze do enzymu MptpB vyhodnotilo jako sloučeninu s nejnižším skóre derivát Ch0-S14, který ve vazebném místě enzymu navázal iontovou interakci. Další sloučeniny HP-152, HP-32 a HP-12, které měly sice již méně výhodné skóre, při dokování navázaly podobné interakce jako původní ligand. Některé sloučeniny z databáze tedy vykázaly teoretické předpoklady pro afinitu k enzymu. Výsledky virtuálního screeningu je vždy nutné ověřovat reálným screeningem.

7 Literatura

1. Kebakuile, L. G. B. Creation and analysis of in-house database of pyrazine derivatives with potential antimycobacterial activity. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
2. Patrick, G. L.; Spencer, J. (Eds) *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 6th Edition. Oxford University Press, 2017. ISBN 978-0198749691
3. MARTIN, Y. C. et al. Glossary of terms used in computational drug design, part II (IUPAC Recommendations 2015). *Pure Appl. Chem.* **2016**, *88*, 239–264.
4. LEACH, A. R.; HANN, M. M. The *in silico* world of virtual libraries. *Drug Discov. Today* **2005**, *5*, 326–336.
5. WALTERS, W. P. Virtual Chemical Libraries. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 1116–1124.
6. JINDŘICH, J. Databázové zdroje v chemii. *Chem. Listy* **2017**, *111*, 731–737.
7. Wiley Online Library | Scientific research articles, journals, books, and reference works. [Online] [Citováno: 3. 5. 2021] <https://onlinelibrary.wiley.com/>.
8. Springer. [Online] [Citováno: 3. 5. 2021] <https://link.springer.com/>.
9. Web Of Science. [Online] [Citováno: 3. 5. 2021] <https://www.webofknowledge.com>.
10. Scopus. [Online] [Citováno: 3. 5. 2021] <https://www.scopus.com>.
11. PubChem. [Online] [Citováno: 3. 5. 2021] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
12. SciFinder ® Login. [Online] [Citováno: 3. 5. 2021] <https://scifinder.cas.org/>.
13. BHARTI, N. et al. Review and Comparison of the Search Effectiveness and User Interface of Three Major Online Chemical Databases. *J. Chem. Educ.* **2016**, *93*, 35.
14. LIAO, C., et al. Software and resources for computational medicinal chemistry. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1057–1085.
15. CAS Content | CAS. [Online] [Citováno: 17. 3. 2021] <https://www.cas.org/about/cas-content>.
16. Reaxys - An expert-curated chemistry database. [Online] [Citováno: 3. 5. 2021] <https://www.elsevier.com/solutions/reaxys>.
17. PubChem Statistics. [Online] [Citováno: 18. 3. 2021] <https://pubchemdocs.ncbi.nlm.nih.gov/statistics>.
18. ChEMBL Database. [Online] [Citováno: 18. 3. 2021] <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>.
19. ZINC. [Online] [Citováno: 18. 3. 2021] <https://zinc15.docking.org/>.
20. RUDDIGKEIT, L. et al. Enumeration of 166 Billion Organic Small Molecules in the Chemical Universe Database GDB-17. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2864–2875.

21. Structure Drawing Software for Academic and Personal Use | ACD/ChemSketch.
[Online] [Citováno: 25. 3. 2021]
<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/index.php>.
22. ChemDraw - PerkinElmer. [Online] [Citováno: 25. 3. 2021]
<https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw/>.
23. ChemDoodle | Chemical Drawing Software. [Online] [Citováno: 25. 3. 2021]
<https://www.chemdoodle.com/>.
24. SVOZIL, D. Virtuální screening. *Chem. Listy* **2017**, *111*, 738–746.
25. Höltje, H.-D., Folkers, G., Mannhold, R., Kubinyi, H., Timmerman, H. (Eds)
Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. 3rd edition Wiley-VCH,
Weinheim, 2008. ISBN 978-3527315680
26. BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*(1), 235–
242.
27. JIRÁT, J.; SVOZIL, D. Lineární reprezentace chemických struktur. *Chem. Listy* **2017**,
111, 710–715.
28. WEININGER, D. SMILES, a Chemical Language and Information System: 1:
Introduction to Methodology and Encoding Rules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**,
28(1), 31–36.
29. OpenSMILES Home Page. [Online] [Citováno: 14. 3. 2021] <http://opensmiles.org/>.
30. Downloads of InChI Software - InChI Trust. [Online] [Citováno: 14. 3. 2021]
<https://www.inchi-trust.org/downloads/>.
31. HELLER, S. R. et al. InChI, the IUPAC International Chemical Identifier. *J.*
Cheminform. **2015**, *7*, 23.
32. BUCKLE, D. R. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC
Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1725–1758.
33. NOVOTNÝ, J.; SVOZIL, D. Popis a určování molekul s pomocí molekulárních
deskriptorů. *Chem. Listy* **2017**, *111*, 716–723.
34. TODESCHINI, R. & CONSONNI, V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics.*
Molecular Descriptors for Chemoinformatics. 2nd Edition. Wiley-VCH, Weinheim
2009. ISBN 978-3-527-31852-0.
35. PerkinElmer Informatics. ChemDraw Professional 17.1.
36. Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE), *2019.01*.
(2021).

37. Chemical Computing Group Inc. Uživatelská příručka Molecular Operating Environment (MOE) 2019.01. (2021).
38. Ertl, P. *et al.* Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3714–3717.
39. Di, L.; Kerns, E. (Eds). *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. 1st Edition. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2008. ISBN 9780123695208
40. IŞIK, M. *et al.* Assessing the accuracy of octanol–water partition coefficient predictions in the SAMPL6 Part II log P Challenge. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2020**, 34, 335–370.
41. GERBER, P. R. Charge distribution from a simple molecular orbital type calculation and non-bonding interaction terms in the force field MAB. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, 37–51.
42. LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, 46, 3–26.
43. VEBER, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615–2623.
44. HUGHES, J. P. *et al.* Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 162, 1239–1249.
45. OPREA, T. I. *et al.* Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41, 1308–1315.
46. CONGREVE, M., *et al.* "Rule of Three" for fragment-based lead discovery? *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 876–877.
47. VAN DE WATERBEEMD, H. *et al.* Glossary of terms in computational drug design (IUPAC Recommendations 1997). *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 1137–1152.
48. Davis, A., Ward, S. E (Eds). *The Handbook of Medicinal Chemistry: Principles and Practice*. 1st Edition. Royal Society of Chemistry, London, 2015.
49. MENG, X.-Y. *et al.* Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **2012**, 7, 146–157.
50. SOLOMON, K. A. *Molecular Modelling and Drug Design*. MJP Publishers, Chennai, India, 2008.
51. ŠÍCHO, M.; SVOZIL, D. Molekulové dokování jako nástroj pro virtuální návrh léčiv.

- Chem. Listy* **2017**, *111*, 754–759.
52. MORRIS, G. M. *et al.* Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
 53. TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31* (2), 455–461.
 54. ALLEN, W. J. *et al.* DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *J. Comput. Chem.* **2015**, *36*, 1132–1156.
 55. Glide | Schrödinger. [Online] [Citováno: 26. 4. 2021]
<https://www.schrodinger.com/products/gleide>.
 56. GOLD - Protein Ligand Docking Software - The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). [Online] [Citováno: 26. 4. 2021]
<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/Components/Gold/>.
 57. LI, J. *et al.* An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* **2019**, *11* 320–328.
 58. LABUTE, P. The Generalized Born/Volume Integral implicit solvent model: Estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1693–1698.
 59. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M. *et al.* Novel halogenated pyrazine-based chalcones as potential antimicrobial drugs. *Molecules* **2016**, *21*, 1–16
 60. YAMADA, H. *et al.* Mycolicibacterium smegmatis, basonym Mycobacterium smegmatis, expresses morphological phenotypes much more similar to Escherichia coli than Mycobacterium tuberculosis in Quantitative Structome Analysis and Cryotom Examination. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1922.
 61. HEVENER, K. E. *et al.* Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 444–460.
 62. Kirchmair, J. *et al.* Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection - What can we learn from earlier mistakes? *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2008**, *22*, 213–228.
 63. GHOSE, A. K. *et al.* A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68.

64. CMC-3D Comprehensive Medicinal Chemistry. [Online] [Citováno: 2. 5. 2021] <http://www.akosgmbh.de/accelrys/databases/cmc-3d.htm>.
65. DONG, Y. *et al.* Molecular basis for the inhibition of β -hydroxyacyl-ACP dehydratase HadAB complex from mycobacterium tuberculosis by flavonoid inhibitors. *Protein Cell* **2015**, *6*, 504–517.
66. BROWN, A. K. *et al.* Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase II. *Microbiology* **2007**, *153*, 3314–3322.
67. RCSB PDB - 4RLW: Crystal Structure of (3R)-hydroxyacyl-ACP dehydratase HadAB hetero-dimer from Mycobacterium tuberculosis complexed with Butein. [Online] [Citováno: 2. 5. 2021] <https://www.rcsb.org/structure/4RLW>.
68. OPLETALOVÁ, V. *et al.* Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* **2002**, *57*, 135–144.
69. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of some ring-substituted (E)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Pharm. Univ. Carolinae* **2005 XXXIII**, 31–43.
70. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ M. *et al.* Novel pyrazine analogs of chalcones: Synthesis and evaluation of their antifungal and antimycobacterial activity. *Molecules* **2015**, *20*, 1104–1117.
71. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ M. *et al.* Chalcones and their pyrazine analogs: synthesis, inhibition of aldose reductase, antioxidant activity, and molecular docking study. *Monatsh. Chem.* **2018**, *149*, 921–929.
72. GRATRAUD, P. *et al.* Antimycobacterial Activity and Mechanism of Action of NAS-91. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1162–1166.
73. TANG, W. H. *et al.* Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front. Pharmacol.* **2007**, *3*, 87.
74. HYMAVATI, V. K.; ELIZABETH SOBHIA, M. Implication of Crystal Water Molecules in Inhibitor Binding at ALR2 Active Site. *Comput. Math. Methods Med.* **2012**, *2012*, 1–11.
75. RAMIREZ, M. A.; BORJA, N. L. Epalrestat: An Aldose Reductase Inhibitor for the Treatment of Diabetic Neuropathy. *Pharmacotherapy* **2008**, *28*, 646–655.
76. KUCEROVA-CHLUPACOVA, M. *et al.* (4-Oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetic acids as potent and selective aldose reductase inhibitors. *Chem. Biol. Interact.* **2020**, *332*,

- 109286.
77. RCSB PDB - 4JIR: Crystal Structure Of Aldose Reductase (AKR1B1) Complexed With NADP+ And Epalrestat. [Online] [Citováno: 2. 5. 2021] <https://www.rcsb.org/structure/4JIR>.
 78. ZHANG, L. *et al.* Inhibitor selectivity between aldo-keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: Role of Trp112 (Trp111). *FEBS Lett.* **2013**, 587, 3681–3686.
 79. SINGH, R. *et al.* Disruption of MptpB impairs the ability of Mycobacterium tuberculosis to survive in guinea pigs. *Mol. Microbiol.* **2003**, 50, 751–762.
 80. FAN, L. *et al.* MptpB promotes mycobacteria survival by inhibiting the expression of inflammatory mediators and cell apoptosis in macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, 8, 171.
 81. ZHANG, D. *et al.* Docking- and pharmacophore-based virtual screening for the identification of novel Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (MptpB) inhibitor with a thiobarbiturate scaffold. *Bioorg. Chem.* **2019**, 85, 229–239.
 82. VICKERS, C. F. *et al.* Structure-Based Design of MptpB Inhibitors That Reduce Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Survival and Infection Burden in Vivo. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 8337–8352.
 83. FANZANI, L. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Low Molecular Weight Phosphatases (MPtpA and MPtpB): From Biological Insight to Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2015**, 22, 3110–3132.
 84. RCSB PDB - 2OZ5: Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB in complex with the specific inhibitor OMTS. [Online] [Citováno: 2. 3. 2021] <https://www.rcsb.org/structure/2OZ5>.
 85. GRUNDNER, C. *et al.* Structural Basis for Selective Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. *Structure* **2007**, 15, 499–509.
 86. RCSB PDB - 1YWF: Crystal Structure of Mycobacterium Tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. [Online] [Citováno: 2. 3. 2021] <https://www.rcsb.org/structure/1YWF>.
 87. GRUNDNER, C., Ng, H. L. & Alber, T. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. *Structure* **2005**, 13, 1625–1634.
 88. RUDDRARAJU, K. V. *et al.* Highly Potent and Selective N-Aryl Oxamic Acid-Based Inhibitors for Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase B. *J. Med.*

Chem. **2020**, *63*, 9212–9227.

Seznam použitých zkratek

2D	Dvojměrné
3D	Trojměrné
ACP	Acyl carrier protein
ALR1	Aldehydreduktasa 1
ALR2	Aldosareduktasa 2
AMK	Aminokyselina
ARI	Inhibitory aldosareduktasy
ATCC	American Type Culture Collection
CADD	Computer-Aided Drug Design
CAMD	Computer-Aided Molecular Design
CAS	Chemical Abstracts Service
CMC	Comprehensive Medicinal Chemistry
CNTCC	Česká národní sbírka typových kultur
CSV	Comma Separated Value
DOI	Direct Object Identifier
FAS	Fatty acid synthase
HBA	Akceptor vodíkové vazby
HBD	Donor vodíkové vazby
IC ₅₀	Poloviční inhibiční koncentrace
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
LBDD	Ligand Based Drug Design
<i>M. TBC</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MptpB	Mykobakteriální tyrosinfosfát-proteinfosfatasa B
MW	Molekulová hmotnost
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NRot	Počet volně otáčivých vazeb
OMTS	(Oxalylaminomethylen)-thiofen sulfonamid
PLIF	Protein Ligand Interaction Fingerprints
PSA	Polární povrch molekuly

QSAR	Quantitative Structure Activity Relationships
QSPR	Quantitative Structure Property Relationships
RMSD	Root Mean Squared Deviation
Ro3	Rule of three
Ro5	Rule of five
ROS	Reactive oxygen species
RTG	Rentgenová
SBDD	Structure Based Drug Design
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
TAACF	Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility
TPSA	Topologický polární povrch molekuly

Seznam obrázků

Obrázek 3-1 Historický pohled na vytváření knihoven chemických sloučenin.....	9
Obrázek 3-2 Příklad konkrétního zápisu SMILES z databáze: Sloučenina CH1b.	14
Obrázek 3-3 Příklad konkrétního zápisu SMILES z databáze: Sloučenina Ac0c.....	14
Obrázek 3-4 Zjednodušené schéma vývoje nové léčivé látky, znázornění pojmů hit a lead...	20
Obrázek 3-5 Meziatomové interakce v molekulové mechanice, a) příspěvky vazeb, b) nevazebné příspěvky, podle Davise <i>et al.</i> ⁴⁸	22
Obrázek 3-6 Lokální a globální energetické minimum, podle Patricka <i>et al.</i> ²	23
Obrázek 3-7 Příklad uspořádání virtuálního screeningu, Svozil ²⁴	26
Obrázek 4-1 CH0aa v článku Kučerové-Chlupáčové et al, 2016. ⁵⁹	32
Obrázek 4-2 Nákres vzorce CH0aa v ChemDraw	32
Obrázek 4-3 Sloučenina CH0aa, základní informace	33
Obrázek 4-4 Sloučenina CH0aa, antimykobakteriální aktivita.....	33
Obrázek 4-5 CH0aa, inhibice ALR2	34
Obrázek 4-6 CH0aa – Antibakteriální aktivita.....	35
Obrázek 4-7 CH0aa, antifungální aktivita.....	35
Obrázek 4-8 CH0aa, další výsledky	35
Obrázek 4-9 CH0aa – molekulové deskriptory	36
Obrázek 4-10 Legenda interakčního diagramu (MOE).....	38
Obrázek 5-1 Schéma dehydratace vznikající mykolové kyseliny pomocí enzymu β -hydroxyacyl-ACP dehydratasy, z lit. ⁶⁵	43
Obrázek 5-2 Chalkon butein s vyznačenými kruhy A a B.....	44
Obrázek 5-3 Vazebné místo proteinu 4RLW, ligand butein (šedá) v obklopení molekulami vody.....	44
Obrázek 5-4 Interakční diagram buteinu (4RLW)	45
Obrázek 5-5 Sloučeniny NAS-91 a NAS-21 ⁷²	46
Obrázek 5-6 Pozice ligandu CH10i (tyrkysová) ve vazebném místě oproti původnímu ligandu (lososová).	47
Obrázek 5-7 CH10i –vodíková vazba s CysA105	48
Obrázek 5-8 CH10f – vodíková vazba s vodou napojenou na HisB41 a AspB36.....	48
Obrázek 5-9 CH1i – slabá vodíková vazba s CysA105	48
Obrázek 5-10 NAS-91.....	49
Obrázek 5-11 NAS-21.....	49

Obrázek 5-12 Schéma polyolové cesty, podle lit. ⁷³	51
Obrázek 5-13 Schéma uspořádání aminokyselin ve vazebném místě ARI, podle Hymavati et al. ⁷⁴	51
Obrázek 5-14 Epalrestat	52
Obrázek 5-15 Interakce fragmentu epalrestatu s ALR2 (4JIR).....	52
Obrázek 5-16 HP-32 (zelená) ve vazebném místě ALR2, porovnání s epalrestatem (lososová)	54
Obrázek 5-17 Interakční diagram HP-32 ve vazebném místě ALR2.....	54
Obrázek 5-18 2-oxo derivát HP-32 (tyrkysová) společně s fragmentem ligandu epalrestatu (lososová). Vyznačen kofaktor NADP (fuchsiová).....	55
Obrázek 5-19 Interakční diagram 2-oxo derivátu HP-32 ve vazebném místě ALR2	55
Obrázek 5-20 PLIF analýza 2D struktury ligandů spolu s vyznačenými interakcemi a barevnou legendou reagujících AMK zbytků a tří molekul vody.....	57
Obrázek 5-21 Výpočty energetických příspěvků interakcí sloučeniny HP-32	58
Obrázek 5-22 Porovnání interakčních diagramů; a) HP-32, b) 2-oxo derivát HP-32.....	60
Obrázek 5-23 Ligand (oxalylaminomethylen)thiofen sulfonamid (zkráceně OMTS) ⁸⁵	62
Obrázek 5-24 a) OMTS ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram sloučeniny.....	62
Obrázek 5-25 Interakce oxalátové skupiny ligandu OMTS, vypočítané příspěvky k vazebné energii.....	63
Obrázek 5-26 a) Konformace Ch0-S14 (zelená) oproti OMTS (lososová) ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram Ch0-S14.....	64
Obrázek 5-27 a) Konformace HP-152 (zelená) oproti OMTS (lososová) ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram HP-152	64
Obrázek 5-28 a) Konformace HP-32 (zelená) oproti OMTS (lososová) ve vazebném místě MptpB; b) Interakční diagram HP-32	65
Obrázek 5-29 Zleva: Třetí nejlepší póza (HP-32) žlutě, čtvrtá nejlepší póza (Ch0-S10) tyrkysovou a pátá nejlepší póza (HP-12) fuchsiovou.....	68

Seznam tabulek

Tabulka 3-1 Dostupné databáze sloučenin.....	11
Tabulka 3-2 Vyjádření vazeb v systému SMILES.....	13
Tabulka 3-3 Shrnutí vlastností lead-like a drug-like sloučenin, zpracováno podle Di <i>et al.</i> ³⁹	21
Tabulka 3-4 Využití metod, zpracováno podle Patricka <i>et al.</i> ²	23
Tabulka 3-5 Příklady metod CADD a jejich rozdělení podle Solomona ⁵⁰	26
Tabulka 3-6 Základní pojmy molekulového dokování	27
Tabulka 4-1 Seznam zdrojů pro vytvoření databáze	30
Tabulka 5-1 Statistické zhodnocení deskriptorů	41
Tabulka 5-2 Hodnoty průměrné a mediánové sloučeniny v porovnání s Pravidly pěti a tři podle Di a Kernse ³⁹	42
Tabulka 5-3 Tabulka skóre a interakcí derivátů (<i>E</i>)-3-fenyl-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-onu	47
Tabulka 5-4 Deriváty 4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny.....	53
Tabulka 5-5 Skóre a interakce sloučenin	56
Tabulka 5-6 Porovnání <i>in silico</i> a <i>in vitro</i> aktivity vůči ALR2, Kučerová-Chlupáčová ⁷⁶	59
Tabulka 5-7 Tabulka skóre a interakcí	66