Utjecaj strukturnih značajki antitumorskih inhibitora histon deacetilaze

Morić, Sandra

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:834148

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb







Sandra Morić

Utjecaj strukturnih značajki antitumorskih inhibitora histon deacetilaza (HDACi) na njihovu toksičnost - QSAR istraživanja

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Milene Jadrijević-Mladar Takač.

Ovom prilikom zahvalila bih svojoj mentorici izv. prof.dr.sc. Mileni Jadrijević-Mladar Takač na iznimnom strpljenju, pomoći i te usmjeravanju pri pisanju ovog rada.

Željela bih također zahvaliti i svojim najbližima te kolegama i prijateljima na neizmjernoj potpori koju su mi pružali tijekom studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1
1.1. Histon-deacetilaze (HDAC).....3
1.1.1. Acetilacija i deacetilacija histona.....5
1.1.2. Inhibitori histon-deacetilaza (HDACi).....7
1.2. Odnos strukture i djelovanja.....9
1.3. Bioraspoloǵivost i ADMET.....11
1.3.1. CYP enzimi i metabolizam lijekova.....12
1.3.2. Toksiļnost.....16
1.3.2.1. *In silico* predviĽanje toksiļnosti.....18
1.4. Lipinski pravilo 5.....19
2. OBRAZLOÇENJE TEME.....21
3. MATERIJALI I METODE.....23
4. REZULTATI I RASPRAVA.....32
4.1. QSAR istraǵivanja odnosa izmeĽu molekulskih deskriptora i ADMET svojstava ispitivanih molekula.....48
5. ZAKLJUĻAK.....51
6. LITERATURA.....53
7. SAÇETAK/SUMMARY.....60
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card.....61

1. UVOD

Terapija raka danas predstavlja jedan od najveći h izazova suvremene medicine zbog kompleksne etiologije same bolesti. Uzroci raka su nepoznati, zapravo se radi o kombinaciji mnogobrojnih čimbenika kao što su npr. genetska podložnost te čimbenici s kojima se čovjek susreće tijekom svakodnevnog života (kancerogeni iz dima, hrane, okoliša,...). Ono što je svim čimbenicima zajedničko jest da induciraju mutacije gena i izazivaju genske defekte u obliku aktivacije onkogena ili pak inhibicije tumor-supresorskih gena. Kao posljedica genskih defekata mogu nastati abnormalni signalni putevi u stanici - stanica može postati neosjetljiva na signale koji inhibiraju rast. Moguće su također abnormalnosti u regulaciji staničnog ciklusa koje uzrokuju nekontroliranu diobu stanice i širenje tumorskog tkiva, pri čemu je poremećen mehanizam programirane stanične smrti (apoptoze) te stoga stanice postaju besmrtne. Stanice tumorskog tkiva sposobne su također stvarati vlastite krvne žile (angiogeneza), što im omogućuje daljnje neometano preživljavanje, te invaziju okolnih tkiva i metastaziranje (Cooper, 2000).

Liječenju raka pristupa se na različite načine, zavisno o vrsti i lokalizaciji. Moguća je uporaba zračenja (radioterapija), antitijela (imunoterapija), genska terapija, primjena hipertermije (zagrijavanje tumora), hormonska terapija, fizičko uklanjanje (kirurgija) i liječenje citostaticima (kemoterapija).

Prema klasičnoj podjeli, citostatici/antitumorski lijekovi dijelili su se na kemoterapijske tvari (alkilirajuće tvari, antimetaboliti, inhibitori topoizomeraze itd.), hormonsku terapiju (steroidi, antiestrogeni, antiandrogeni, inhibitori aromataze) i imunoterapiju (interferon, interleukin-2, cjepiva), međutim detaljnijim saznanjima o biologiji tumorske stanice proširene su terapijske mogućnosti stoga je predložena nova podjela antitumorskih lijekova (Espinosa i sur., 2003) temeljem meta koje ovi lijekovi ciljaju u tumorskoj stanici:

1. lijekovi koji izravno interferiraju sa sintezom tumorske DNA, poput derivata dušikovog iperita (ciklofosfamid, ifosfamid, melfalan, klorambucil, bendamustin), derivata nitrozouree (karmustin), triazenskih spojeva (dakarbazin, temozolomid), antibiotika (bleomicin, mitomicin) te spojeva koji sadrže platinu (cisplatin, karboplatin, oksaliplatin);

2. lijekovi koji ciljaju proteine povezane s tumorskom DNA, poput antraciklinskih antibiotika (doksorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoksantron), podofilotoksina

(etopozid, tenipozid), inhibitora topoizomeraze I (topotekan, irinotekan, rubitekan), antimetabolita (metotreksat, trimetreksat, 5-fluorouracil, kapecitabin, citarabin, fludarabin, gemcitabin);

3. lijekovi koji utječu na specifične gene te ih modificiraju, kao što su steroidi (prednizolon, deksametazon), antihormoni (tamoksifen, fulvestrant, flutamid, bikalutamid, anastrozol, letrozol, goserelin, buserelin, triptorelin), retinoidi (ATRA, fenretidin, beksaroten), interferon-α i genska terapija;

4. lijekovi koji ciljaju membranske receptore tumorskih stanica, kao što su monoklonska protutijela koja djeluju na ekstracelularnu domenu receptora (rituksimab, ibritumomab, alemtuzumab, trastuzumab, cetuksimab), te tzv. male molekule koje djeluju na intracelularnu domenu receptora (gefitinib, erlotinib);

5. lijekovi koji svoje djelovanje ispoljavaju u citoplazmi tumorskih stanica, kao što su inhibitori signalnih puteva u tumorskoj stanici (imatinib) i inhibitori tubulina (vinkristin, vinblastin, vinorelbin, paklitaksel, docetaksel);

6. lijekovi koji ciljaju endotel i ekstracelularni matriks tumorskih stanica, poput talidomida i karboksiamid-triazola koji inhibiraju endotelne faktore rasta, bevazicumaba i endostatina koji inhibiraju receptore endotelnih stanica, te marimastata i vitaksina koji inhibiraju metaloproteinaze i integrinske receptore u ekstracelularnom matriksu.

Promjene u ekspresiji onkogena i/ili tumor-supresorskih gena te posljedični nastanak tumora nisu uvijek posljedica mutacija. Transkripcijska regulacija epigenetičkim čimbenicima također može biti uzrok tumorskim promjenama u stanici. Epigenetika se definira kao nasljedne promjene funkcije gena koje nisu posljedica mijenjanja nukleotidnog slijeda u DNA. Metilacija DNA i modifikacija histona identificirane su kao dva glavna procesa odgovorna za epigenetičke promjene funkcije gena (Ediriweera i sur., 2019).

1.1. Histon-deacetilaze (HDAC)

Histoni su alkalni proteini u eukariotskim stanicama koji zajedno s DNA tvore strukturu zvanu kromatin, od koje se sastoje kromosomi. Osnovna građevna jedinica kromatina jest nukleosom kojeg čini 146-147 baznih parova (bp) DNA omotanih oko oktamera kojeg čine po dva od svakog pojedinog histona: H2A, H2B, H3 i H4. Nukleosomi su međusobno povezani veznom DNA različitih duljina združenom s povezujućim (*linker*) histonom H1 (Mariño-Ramírez i sur., 2005).

Acetilacija histona posredovana je histon-acetil-transferazama (HAT), dok je deacetilacija posredovana histon-deacetilazama (HDAC). Obje skupine enzima ciljaju lizinske ostatke u histonskom 'repu'. HAT se dijele na individualne enzime HAT1, TFIIIC90[1], TAF1[2], SRC1[3], ACTR[4], p160[5] i CLOCK[6], te na porodice p300/CPB[7] (u koju spadaju p300 i CPB), GNAT[8] (u koju spadaju hGCN5[9], PCAF[10] i ELP3[11]) i MYST[12] (u koju spadaju TYP60[13] i MYST1-4). (Schneider i sur, 2013) U skupinu konvencionalnih (klasičnih) histon-deacetilaza nalazi se jedanaest enzima ovisnih o ionu cinka kao kofaktoru i podijeljenih u četiri klase zavisno o njihovoj homologiji, lokalizaciji u stanici i katalitičkoj aktivnosti (Kim i Bae, 2011).

HDAC klase I (HDAC1, 2, 3 i 8) primarno su lokalizirani u jezgri, sadrže ion cinka kao kofaktor u aktivnom mjestu i smatraju se klasičnima, o cinku ovisnima HDAC.

HDAC4, 5, 6, 7, 9 i 10 lokalizirani su u jezgri i citoplazmi i čine klasu II. Klasa II može se podijeliti u dvije podklase, klasu IIa i IIb. Enzimi klase IIa (HDAC4, 5, 7 i 9) prebacuju se između jezgre i citoplazme i lokalizirani su u specifičnim tkivima kao što su mozak, srce i mišići. Enzimi klase IIb (HDAC6 i 10) lokalizirani su većinom u citoplazmi.

HDAC klase III su, za razliku od konvencionalnih HDAC, sirtuini. Kod sisavaca ih je otkriveno sedam (SIRT1-7). To su o nikotinamid-adenin-dinukleotidu (NAD^+) ovisne protein-

[1] TFIIIC90 - podjedinica transkripcijskog faktora IIIC od 90 kDa
[2] TAF1- transkripcijski inicijacijski faktor, podjedinica 1
[3] SRC1 - koaktivator nuklearnih receptora 1 (NCOA1), često zvan koaktivatorom steroidnih receptora
[4] ACTR - koaktivator nuklearnih receptora 3 (NCOA3), zvan i koaktivatorom steroidnih receptora 3 (SRC-3)
[5] p160 - porodica koaktivatora nuklearnih/steroidnih receptora (SRC)
[6] CLOCK - transkripcijski faktor za kojeg se smatra da utječe na cirkadijalni ritam
[7] P300/CPB - histon acetiltransferaza p300 i CREB-vezujući protein
[8] GNAT - Gnc5-povezane *N*-acetiltransferaze
[9] hGNC5 - Gnc5-povezana *N*-acetiltransferaza
[10] PACF - faktor povezan s P300/CBP
[11] ELP-3 - katalitička podjedinica elongatorskog kompleksa histon acetiltransferaze
[12] MYST - porodica nazvana po enzimima MOZ, Ybf2, Sas3 i Tip60
[13] TYP-60 - histon acetiltransferaza KAT5, kodirana genom KAT5

deacetilaze lokalizirane unutar jezgre (SIRT1, SIRT6 i SIRT7), unutar mitohondrija (SIRT3, SIRT4 i SIRT5) te unutar citoplazme (SIRT2).

Klasu IV čini samo HDAC11 koji je lokaliziran u mozgu, srcu, bubrezima, skeletnim mišićima i testisima.

Fiziološka uloga HDAC izoformi određena je studijama *knock-out*[14] i transgenih miševa te RNA interferencijom (RNAi). Enzimi klase I (HDAC1, 2, 3, 8) reguliraju diferencijaciju, inhibiciju rasta i apoptozu kanceroznih stanica. HDAC6 (enzim klase IIb) inducira acetilaciju tubulina[15], mikrotubula i Hsp90[16], što upućuje da bi mogao biti terapijska meta pri liječenju neurodegenerativnih bolesti i karcinoma. Enzimi klase IIa vežu se na jedinstvene proteine koji reguliraju epigenetički proces. HDAC4 je regulator hipertrofije hondrocita[17] i ima ključnu ulogu u regulaciji skeletogeneze i stanične smrti neurona. HDAC5 i 9 reguliraju srčanu funkciju i mogu inducirati srčanu hipertrofiju. Regulacija krvotvornog integriteta i razvitka T-stanica pripisuje se HDAC7.

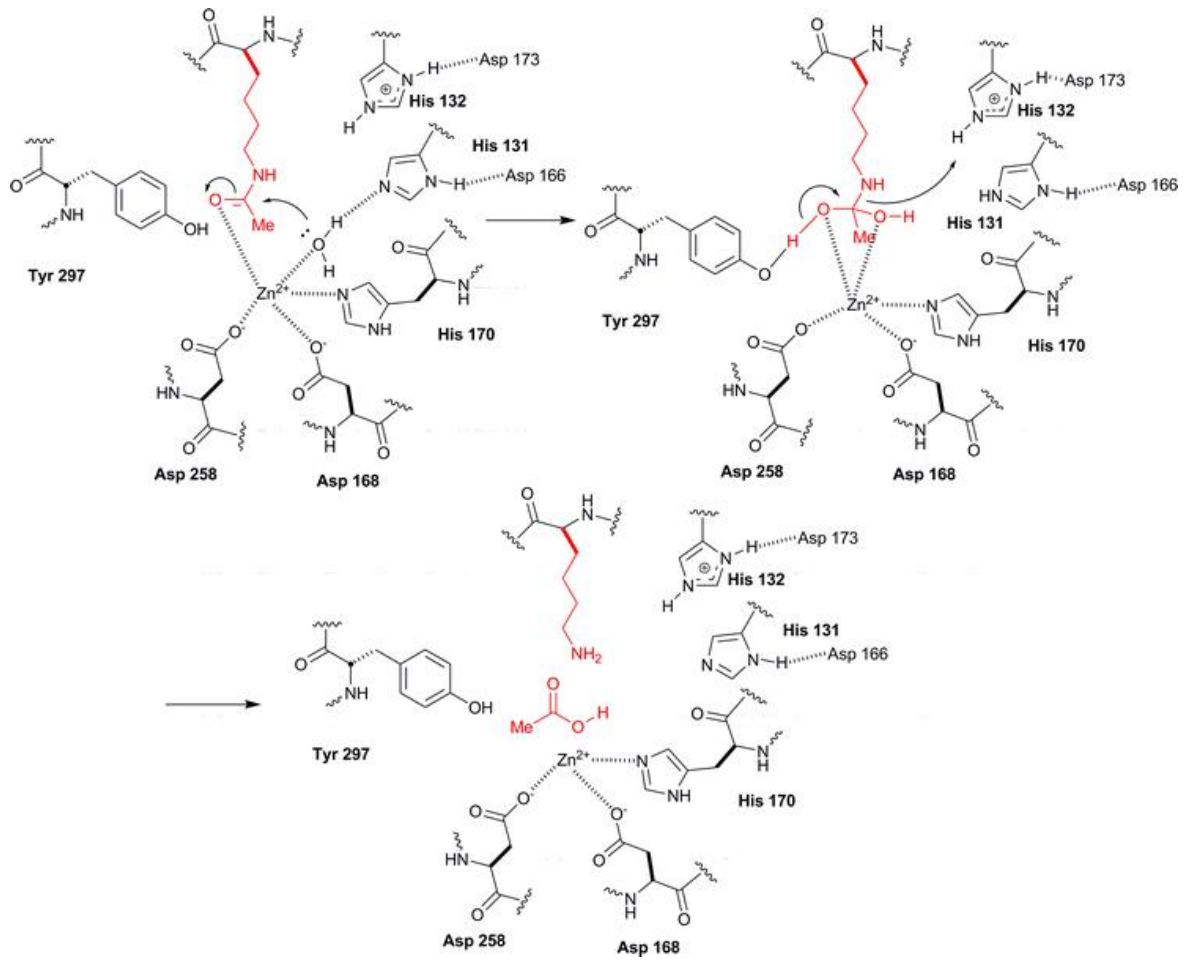
[14] *Knockout* ili knock-out miš - genetski modificiran miš (Mus musculus) kojemu je prilikom istraživanja inaktiviran (knocked out) postojeći gen zamjenom s drugim genom ili umetanjem umjetno sintetizirane DNA.
[15] Tubulin - Ďili ß-tubulin, polimerizira se u mikrotubule, glavne komponente eukariotskog citoskeleta
[16] Hsp90 - protein toplinskog šoka 90
[17] Hondrocit - zrela, diferencirana stanica hrskavičnog tkiva koja sudjeluje u njegovom održavanju

1.1.1. Acetilacija i deacetilacija histona

Negativno nabijena DNA ļvrsto se veģe na pozitivno nabijen histon karakteriziran Ůamino skupinom lizinskog ostatka. Acetilacija histona neutralizira pozitivan naboj Ůamino skupine lizinskog ostatka i slabi interakciju s negativno nabijenom DNA, pri ļemu kondenzirani heterokromatin[18] prelazi u dekondenzirani eukromatin[19]. Eukromatin tako postaje podloģan vezanju regulatornih proteina i RNA polimeraze[20], te posljediļno transkripciji gena. Deacetilacija histona pomoĺu HDAC jaļa interakciju s DNA, zatvara strukturu kromatina te na taj naļin transkripcija gena postaje nemoguĺa (Adcock i sur., 2005).

Pretpostavljeni mehanizam deacetilacije histona polazi od acetiliranog lizinskog ostatka koji koordinira s ionom cinka u aktivnom mjestu histon-deacetilaze. Slijedi nukleofilni napad molekule vode i stvaranje tetrahedralnog intermedijera od kojeg se zatim odvaja molekula octene kiseline te lizinski ostatak postaje slobodan i deacetiliran (Newkirk i sur., 2009). (Slika 1)

[18] Heterokromatin - ļvrsto pakirana (kondenzirana) DNA kromatina
[19] Eukromatin - relaksirana (dekondenzirana) DNA kromatina
[20] RNA polimeraza - enzim koji sintetizira RNA prema DNA kalupu



Slika 1. Pretpostavljeni mehanizam deacetilacije histona (Newkirk i sur., 2009)

Osim histona, HDAC reguliraju acetilaciju nekih ne-histonskih proteina kao što su tubulin, p21[21] i p53[22], što sugerira da su ti enzimi također uključeni u određene stanične događaje (Kim i Bae, 2011). Studije pokazuju prekomjerno eksprimirane HDAC tijekom različitih bolesti kao što su upalne i neurodegenerativne bolesti i različite vrste karcinoma. Prekomjerno eksprimirane HDAC osobito su karakteristične za karcinom dojke (Ediriweera i sur., 2019). Stoga HDAC inhibitori imaju velik potencijal za terapijsku primjenu.

[21] p21 - o ciklinu ovisan inhibitor kinaza, jedan od glavnih meta aktivnosti p53
[22] p53 - tumorski protein/stanični tumorski antigen 53, u zdravoj stanici služi kao tumorski supresor, međutim u tumorskim stanicama njegova je funkcija poremećena

1.1.2. Inhibitori histon-deacetilaza (HDACi)

Otkriven je niz uļinkovitih, strukturalno raznolikih inhibitora histon-deacetilaza. Radi se o prirodnim produktima i sintetskim spojevima, od kojih neki inhibiraju sve histon-deacetilaze, dok su drugi izoformno selektivni. Iako mehanizam djelovanja inhibitora histon-deacetilaze zasad nije posve razjaġnjen, kliniļki su validirani na onkoloġkim pacijentima s malignim hematoloġkim bolestima (npr. kutani T-staniļni limfom). 2006. i 2009. godine dva su inhibitora histon-deacetilaze, vorinostat i romidepsin, odobreni od strane ameriļke Agencije za hranu i lijekove, za liječ enje kutanog T-staniļnog limfoma. Inhibitore histon-deacetilaze karakterizira dobra podnoġljivost i kliniļka uļinkovitost u liječ enju hematoloġkih tumora, no slabije su uļinkoviti kada se koriste kao monoterapija u liječ enju ļvrstih tumora (Kim i Bae, 2011).

Osim deacetilacije histona, HDAC inhibitorima se pripisuju i drugi mehanizmi citotoksiļnosti poput ometanja funkcije ġaperonskih proteina[23], stvaranja slobodnih radikala, induciranja oġteć enja DNA, pozitivne regulacije inhibitora napredovanja staniļnog ciklusa (npr. p21), te promoviranja apoptoze (Bose i sur., 2014).

Prema strukturi i mehanizmu djelovanja HDAC inhibitori se mogu podijeliti u pet skupina (Eckschlager i sur., 2017):

1. hidroksamske kiseline (Slika 3),

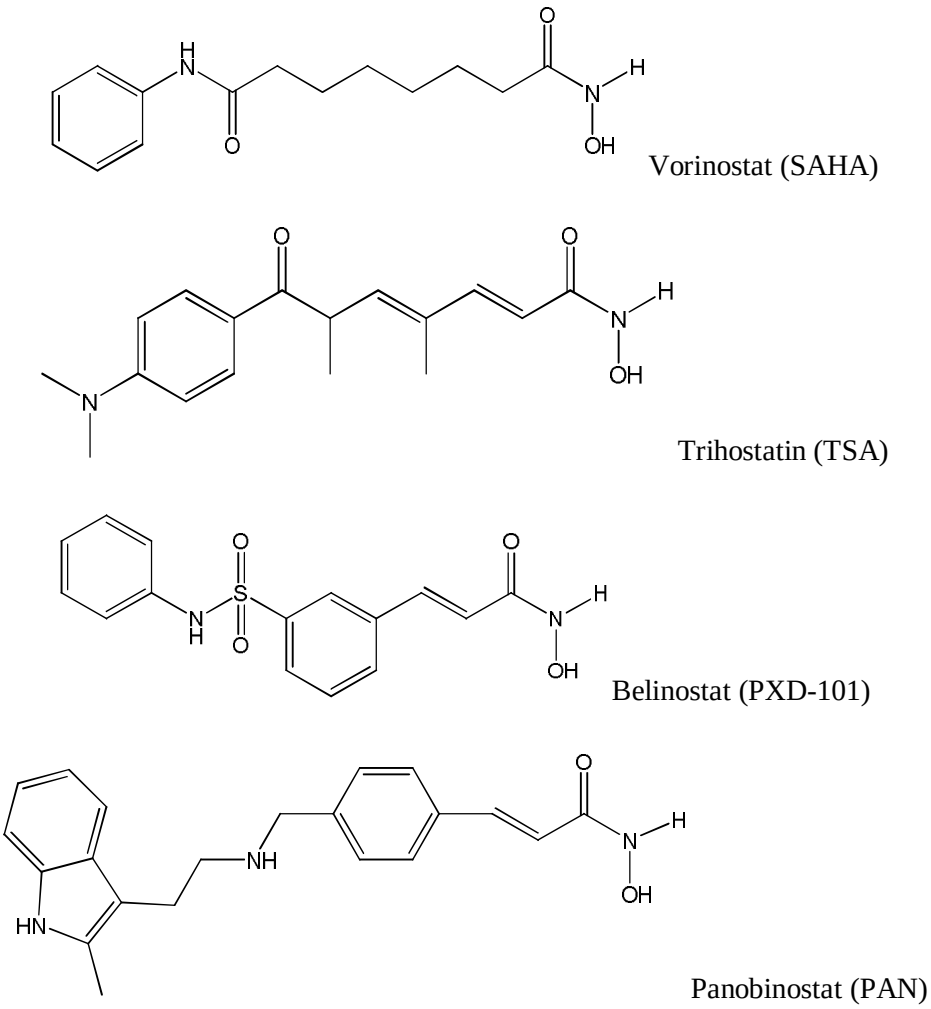
2. ciklič ki tetrapeptidi,

3. alifatske kiseline,

4. benzamidi i

5. inhibitori sirtuina.

[23] Ġaperonski proteini - porodica proteina koja sudjeluje u stabilizaciji nepravilno smotanih proteina. Takva stabilizacija pomaġe pri procesima kao ġto su translokacija, razgradnja i smatanje.

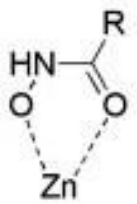


Slika 2. HDAC inhibitori derivati hidroksamske kiseline



Slika 3. OpÍa struktura HDAC inhibitora derivata hidroksamske kiseline

Svi inhibitori histon-deacetilaze koji sadrže hidroksamsku skupinu posjeduju tri zajedničke strukturne značajke: cink-vezujuću skupinu (slika 4), skupinu odgovornu za prepoznavanje površine aktivnog mjesta enzima, te ravnolančanu alkilnu ili arilnu poveznicu koja povezuje prve dvije skupine.



Slika 4. Stvaranje kelata između hidroksamske kiseline i iona cinka (Zn^{2+}). Hidroksamska skupina služi kao bidentatni ligand koji stvara kelat s ionom cinka u aktivnom mjestu histon-deacetilaze za što su potrebna dva atoma kisika: karbonilni i kisik iz hidroksamske skupine (prilagođeno prema Jacobsen i sur., 2010).

1.2. Odnos strukture i djelovanja

Odnos strukture potencijalnog lijeka i njegovog djelovanja (engl. *structure-activity relationship*, SAR) je bitan aspekt otkrića novih lijekova, od primarnog *screeninga* do optimizacije vodećeg spoja (engl. *lead compound*[24]). Istraživanje odnosa strukture i djelovanja započinje utvrđivanjem postoji li takav odnos uopće u određenoj skupini molekula. Potom se prelazi na raščlanjivanje detalja jednog ili više SAR metoda te uporaba dobivenih informacija kako bi se ispitivane molekule potencijalno mogle strukturno modificirati na način da se određena svojstva ili djelovanja optimiraju. Ovakva istraživanja uglavnom se primjenjuju u cilju poboljšanja djelovanja molekule, reduciranja njene toksičnosti te osiguravanje optimalne bioraspoloživosti.

Kvantitativan odnos strukture i djelovanja (engl. *quantitative structure-activity relationship,* QSAR) odnosi se na koreliranje strukture potencijalnog lijeka s njegovom biološkom aktivnošću te konstruiranje prediktivnih modela biološke aktivnosti potencijalnog lijeka

[24] *Lead compound* - kemijski spoj s biološkom ili farmakološkom aktivnošću koja sa sobom nosi potencijalnu terapijsku korist, no može biti potrebna modifikacija strukture kako bi se aktivnost pojačala

korištenjem molekulskih deskriptora. Molekulski deskriptori (MD) su parametri elektronskih svojstava, hidrofilnosti/lipofilnosti, steričkih efekata i topologije molekule koji se mogu odrediti eksperimentalno ili teorijski pomoću računalnih programa. Dobiveni podaci se potom podvrgavaju obradi i izradi statističkih QSAR modela (Isarankura-Na-Ayudhya i sur., 2009). QSAR modeli smanjuju potrebu za ispitivanjima potencijalnog lijeka na životinjama, daju uvid u svojstva potencijalnog lijeka (uključujući i metabolite i proizvode razgradnje) te na taj način štede vrijeme i novac potreban za laboratorijska ispitivanja. QSAR mogu biti ili statistički modeli uspostavljeni na temelju već dostupnih podataka eksperimentalnih ispitivanja za određenu skupinu kemijskih tvari, ili metode utemeljene na pravilima (SAR) temeljem literaturnih informacija i dostupnih podataka o ispitivanjima (http://www.saxocon.eu). Koncept QSAR-a je koristan pri koreliranju molekulskih informacija ne samo s biološkom aktivnošću već i s drugim fizikalno-kemijskim svojstvima pa se u tom slučaju koristi izraz kvantitativni odnos strukture i svojstava (engl. *quantitative structure-property relationship*, QSPR) (Isarankura-Na-Ayudhya i sur., 2009). Isti se principi mogu primijeniti i u toksikološke svrhe. Kvantitativni odnos strukture i toksičnosti (engl. *quantitative structure-toxicity relationship*, QSTR) odnosi se na prediktivne modele koji povezuju varijacije u molekularnim strukturama s toksičnošću. Postoje mnoge primijenjene tehnike modeliranja u QSTR-u, kao što su metoda parcijalnih najmanjih kvadrata, umjetne neuronske mreže i regresija glavnih komponenti (PCR) (Deeb i Goodarzi, 2012).

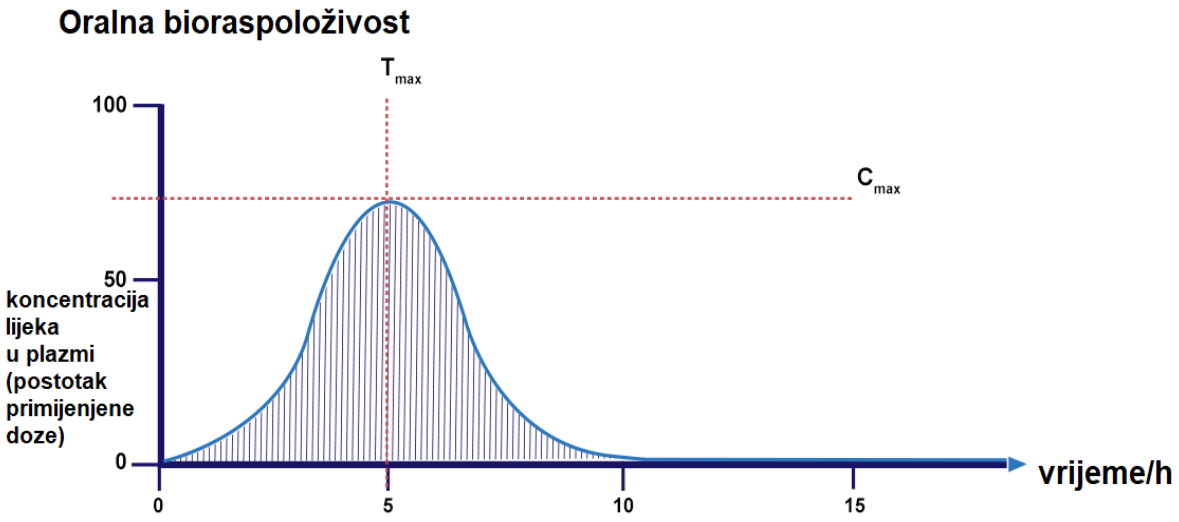
Istraživanjem optimalne duljine alifatskog lanca inhibitora histon deacetilaze otkriveno je da su najučinkovitiji derivati hidroksamske kiseline dugi šest ugljikovih atoma, te da se učinkovitost smanjuje skraćivanjem duljine lanca: 6 > 7 > 5 > 4 (Rajak i sur, 2014). Rezultati ispitivanja također su otkrili da su derivati sa zasićenim ugljikovim lancima učinkovitiji od onih nezasićenih. Dodatkom Ω-metilne skupine vezane za hidroksamsku skupinu znatno se smanjuje učinkovitost, dok β-metilacija pojačava selektivnost prema histon-deacetilazama. Zamjena zasićenog ugljikovog lanca između cikličke poveznice i hidroksamske skupine nezasićenim lancem stvara djelotvornije analoge, dok grananje smanjuje učinkovitost. Supstitucija hidroksamske skupine rigidnom cikličkom skupinom (npr. azolnom ili tiazolnom skupinom) također smanjuje aktivnost. Skupina odgovorna za prepoznavanje površine aktivnog mjesta enzima obično je hidrofobnih svojstava koja stupa u interakciju s rubnim aminokiselinama na enzimu. Aminokiselinski slijed koji okružuje aktivno mjesto kod različitih histon-deacetilaza razlikuje se od ostalih domena i predstavlja veliki potencijal za stvaranje selektivnih inhibitora.

1.3. Bioraspoloživost i ADMET

Prilikom istraživanja novih lijekova velika se pozornost pridaje istraživanju njihove bioraspoloživosti. Pojam bioraspoloživosti odnosi se na opseg u kojem aktivni oblik lijeka ili njegov metabolit doseže sistemski krvotok kako bi pristupio mjestu djelovanja. Uz bioraspoloživost usko su vezani pojmovi apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije lijeka (ADME). Svaki od tih parametara na svoj način pridonosi konačnoj bioraspoloživost lijeka (Doogue i Polasek, 2013). Katkad se promatranim parametrima dodaje i potencijalna ili stvarna toksičnost (T) ispitivane tvari, pri čemu se akronim proširuje na ADMET i apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija i toksičnost (Kerns i Di, 2016).

Bioraspoloživost se obično procjenjuje određivanjem vršne koncentracije lijeka u krvnoj plazmi, vršnog vremena (vremena u kojem se postigne vršna koncentracija lijeka u plazmi), i površine ispod krivulje odnosa koncentracije lijeka u plazmi i vremena (AUC - engl. *area under curve* = površina ispod krivulje). Koncentracija u plazmi raste proporcionalno s apsorpcijom, a vršna koncentracija u plazmi postiže se kad eliminacija dostigne apsorpciju. Međutim, eliminacija lijeka započinje čim se lijek pojavi u krvotoku, stoga procjenjivanje bioraspoloživosti temeljem određivanja vršne koncentracije može biti neprecizno. Vršno vrijeme se najčešće koristi kao pokazatelj apsorpcije - što je apsorpcija sporija, vršno vrijeme će biti dulje, odnosno biti će potrebno više vremena da se postigne vršna koncentracija lijeka u plazmi.

AUC je najpouzdaniji pokazatelj bioraspoloživosti - proporcionalna je ukupnoj količini lijeka koji nepromijenjen stigne u plazmu.



Slika 5. Odnos koncentracije lijeka u plazmi i vremena nakon jednokratne peroralne primjene lijeka pri čemu je površina ispod krivulje osjenčana i predstavlja procijenjenu bioraspoloživost, a T_{max} je vrijeme u kojem je postignuta vršna plazma koncentracija lijeka (C_{max}) (prilagođeno prema http://www.eupati.eu, pristupljeno 15.5.2019.).

P-glikoprotein. Humani P-glikoprotein (ABCB1) je primarni transporter za više lijekova (eng. *multi-drug transporter*) lokaliziran u plazmatskim membranama koji hidrolizom ATP-a dobiva energiju za izbacivanje (efluks) ksenobiotika (lijekova i štetnih tvari) iz stanice. Prilikom istraživanja novih lijekova važno je ispitati je li potencijalni lijek supstrat P-glikoproteina jer djelovanjem P-glikoproteina na lijek on može biti u kratkom roku izbačen iz stanice čime će njegov učinak biti onemogućen, što za posljedicu ima smanjenu bioraspoloživost (Al-Shawi i Omote, 2005).

1.3.1. CYP enzimi i metabolizam lijekova

Glavno mjesto metabolizma lijekova jest u jetri. Biotransformacija je prisutna i u drugim tkivima, no s manjom zastupljenošću. Premda se biotransformacijom lijekovi u pravilu inaktiviraju, metaboliti nekih lijekova su farmakološki aktivni, ponekad i djelotvorniji od ishodne tvari, za razliku od prolijekova koji su neaktivne molekule koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju do aktivnih metabolita što je posebno korisno ako se aktivni oblik na taj način efikasnije isporučuje na mjesto djelovanja ili smanji toksičnost roditeljskog lijeka (http://www.medicinenet.com).

Lijekovi se biotransformiraju oksidacijom, redukcijom, hidrolizom, hidracijom, konjugacijom, kondenzacijom ili izomerizacijom, a cilj svakog od ovih procesa je olakšavanje njihovog izlučivanja. Stupanj biotransformacije pojedinih lijekova se interindividualno razlikuje. Na te individualne osobitosti utječu genetski čimbenici, prateće bolesti (posebice kronične bolesti jetre i zatajenje srca) te interakcije (osobito one koje su posljedica indukcije ili inhibicije metabolizma) (Tracy i sur, 2016).

Biotransformacija se obično odvija u dvije faze. Reakcije faze I su reakcije funkcionalizacije (unosi se nova funkcionalna skupina), a odnose se primjerice na oksidaciju, redukciju, hidrolizu molekule, odnosno na stvaranje nove ili modificiranje već postojeće funkcionalne skupine. Reakcijama hidroksilacije ili monooksigenacije nastaju metaboliti većinom u obliku netoksičnih alkohola ili fenola.
Reakcije faze II se odnose na spajanje molekule lijeka s jednom endogenom tvari ili endokonom[25] (npr. glukuronska, sulfatna kiselina ili glicin). Metaboliti nastali reakcijama konjugacije su polarniji i brže se izlučuju urinom i žuči od metabolita I. faze. Neki lijekovi podliježu samo reakcijama I. ili II. faze, a neki objema fazama, i ovi brojevi ne ukazuju na redoslijed, već na prirodu reakcija.

Najvažniji enzimski sustav odgovoran za biotransformacije I. faze je citokrom P450 (CYP450), nazvan tako zbog činjenice da je vezan na membrane u stanici te sadrži hemski pigment koji apsorbira svjetlost na valnoj duljini 450 nm kada je izložen ugljičnom monoksidu. CYP450 je mikrosomska superporodica izoenzima koji kataliziraju metabolizam velikog broja ksenobiotika[26] uključujući i lijekove. Kao izvor elektrona služi NADPH (citokrom P450 reduktaza, flavoprotein koji prenosi elektrone s NAPDH, reduciranog oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata, na citokrom P450). Iako postoji više od pedeset CYP450 enzima, 90% lijekova metabolizira se putem CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 i CYP3A5. Ovi enzimi su uglavnom eksprimirani u jetri, no prisutni su i u tankom crijevu, plućima, posteljici i bubrezima.

Lijekovi stupaju u interakcije s CYP sustavom na nekoliko načina. Lijek može biti metaboliziran pomoću jednog CYP enzima (npr. metoprolol pomoću CYP2D6) ili više njih

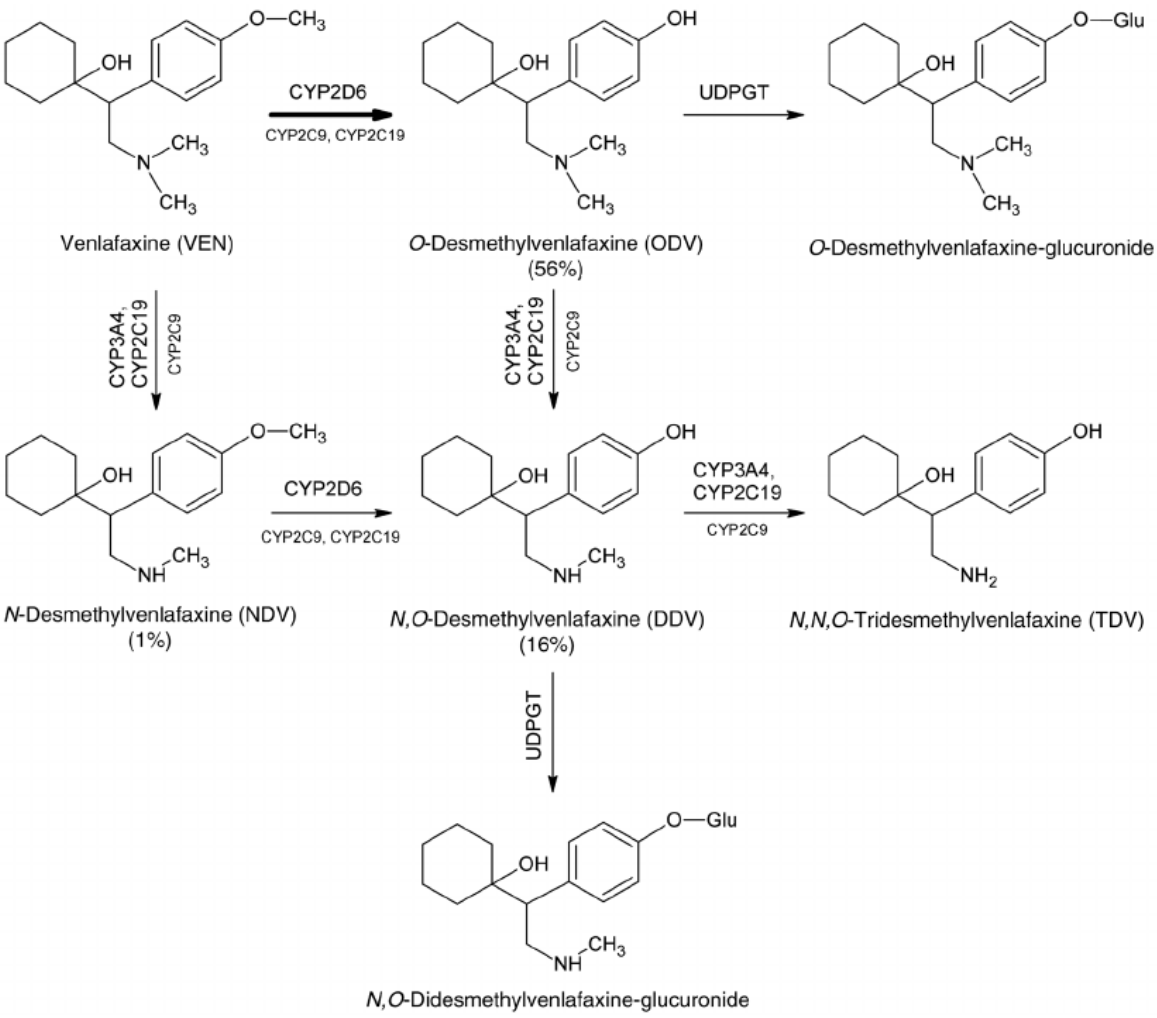
[25] endokon (eng. *endocon*) ï je endogena konjugirajuća tvar, dio konjugiranog metabolita koji je izveden kao prirodni produkt metabolizma

[26] ksenobiotik - bilo koja strana tvari ili egzogena kemikalija koje tijelo ne prepoznaje, kao što su lijekovi, zagađivači, kao i neki prehrambeni aditivi i kozmetika

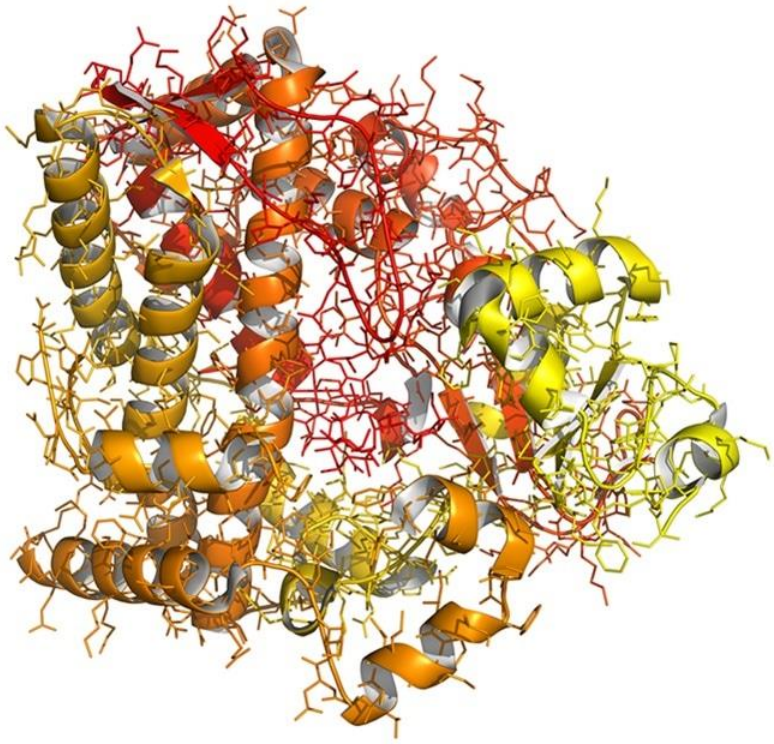
(npr. varfarin pomoću CYP1A2, CYP2D6 i CYP3A4). Lijekovi koji uzrokuju metaboličke interakcije mogu biti induktori ili inhibitori CYP enzima. Inhibitori blokiraju metaboličku aktivnost jednog ili više CYP enzima ovisno o primijenjenoj dozi i sposobnosti vezanja samog inhibitora na enzim. Inhibitorni učinak javlja se neposredno nakon primjene lijeka.

Induktori pojačavaju aktivnost CYP enzima potičući i njihovu dodatnu sintezu. Za razliku od inhibicije, indukcija se javlja odgođeno obzirom na vrijeme poluživota lijeka. Smanjenje koncentracije lijeka metaboliziranog pomoću CYP2C9 može se javiti unutar 24 sata nakon primjene rifampicina, lijeka s kratkim vremenom poluživota, no može se javiti i do tjedan dana kasnije nakon primjene fenobarbitala, induktora s dugim vremenom poluživota.

Prilikom primjene CYP450 induktora ili inhibitora potreban je poseban oprez. Ciljani lijek bi trebao biti zamijenjen drugim lijekom ili bi se doza trebala prilagoditi obzirom na promjene metabolizma lijeka. Također, standardne terapijske doze lijeka mogu uzrokovati nuspojave vezane uz povećanu koncentraciju lijeka u serumu ukoliko osoba slabo metabolizira lijek ili je CYP450 inhibitor dodan u terapiju (Lynch i Price, 2007). Primjer za takvu interakciju jest istodobna primjena venlafaksina i propafenona. Venlafaksin se primarno metabolizira putem CYP2D6 te je također supstrat P-glikoproteina, dok je propafenon supstrat i inhibitor CYP2D6 i P-glikoproteina. Inhibicijom CYP2D6 s propafenonom dolazi do povećane koncentracije venlafaksina u plazmi što za posljedicu ima nuspojave u vidu halucinacija i psihomotorne agitacije (Palleria i sur., 2013). Slične interakcije primijećene su i pri istodobnoj primjeni tioridazina i propranolola (CYP2D6), omeprazola i diazepama (CYP2C19), tolbutamida i fenitoina (CYP2C9) te diltiazema i ciklosporina (CYP3A).



Shema 1. Pretpostavljene reakcije metabolizma venlafaksina (VEN) u ljudi. Podebljana strelica oznaḷ ava glavni metaboliḷ ki put. Glavni enzimi koji kataliziraju pojedini korak metabolizma navedeni su iznad strelica veĺ im fontom. CYP - citokrom P450; UDPGT - uridin difosfat-glukuronoziltransferaza.)



Slika 6. Kemijska struktura CYP3A4, jednog od enzima citokrom P450 enzimskog sustava (https://www.news-medical.net/).

1.3.2. Toksičnost

Već ina lijekova postiže svoj terapijski uč inak modifikacijom homeostaze organizma (izuzetak su antimikrobni lijekovi i antiparazitici koji djeluju izravno na uzroč nike bolesti). Neki lijekovi kao npr. atropin, tubokurarin, ergot alkaloidi i dikumarol imaju terapijska svojstva koja su otkrivena sluč ajno, kao posljedica sluč ajnih ili namjernih otrovanja. Stoga ne iznenaĎuje č injenica da su gotovo svi lijekovi sposobni prouzroč iti štetne uč inke ako se uzmu u dovoljno velikoj dozi (Waller i Sampson, 2018).

Toksič nost lijekova može se pojaviti tijekom primjene uobič ajenih terapijskih doza ili kao rezultat akutnog trovanja. U nekim sluč ajevima toksič nost se javlja u već ine pacijenata zbog same prirode lijeka kojeg koriste u terapiji (npr. citotoksič ni lijekovi korišteni u kemoterapiji), no znatna toksič nost je za već inu lijekova ipak rijetka ukoliko se primjenjuju u preporuč enim terapijskim dozama. Postoje znač ajne interidividualne razlike meĎu ljudima koje utječ u na pojavu neoč ekivanih reakcija na lijekove, te se rizik od toksič nosti može smanjiti ukoliko se pri izboru lijeka i njegove doze u obzir uzmu te razlike, kao što su npr. dob, tjelesna težina, tijek same bolesti itd. Genetič ki faktori bi takoĎer trebali biti uzeti u obzir. Smanjenjem doze

ili promjenom lijeka smanjit će se intenzitet neočekivanih reakcija ili će one u potpunosti prestati.

Neželjene reakcije na lijek (engl. *adverse drug reactions*. ADR) mogu se ugrubo podijeliti na dva glavna tipa:

- tip A (engl. *augmented* - povećane) - te reakcije su obično povezane s primijenjenom dozom lijeka i mogu se predvidjeti obzirom na farmakološke i biokemijske učinke lijeka ili njegovih metabolita.

- tip B (engl. *bizarre* - bizarne, nepredvidive) - ove reakcije nisu povezane s primijenjenom dozom lijeka, idiosinkratske su i nepredvidive. Često su imunološke prirode.

Ovo je poprilično gruba klasifikacija koja u obzir ne uzima prolazak vremena od uzimanja lijeka kao ni individualnu podložnost osobe da reagira na lijek. Postoje još neke klasifikacije reakcija npr. C (engl. *continuing* - kontinuirane), D (engl. *delayed* - odgođene), E (engl. *end-of-use* - po prestanku korištenja lijeka), F (engl. *failure of therapy* - neuspjeh terapije) i G (engl. *genomic/genetic* - genomske/genetičke).

Biokemijska toksičnost se odnosi na neželjene reakcije ili oštećenje tkiva uzrokovano interakcijom lijeka ili njegovog aktivnog metabolita sa staničnim strukturama, najčešće makromolekulama kao što su strukturni proteini ili enzimi. Za većinu registriranih lijekova ova vrsta toksičnosti otkrije se tijekom pretkliničkih ispitivanja na životinjama te se dalje prati tijekom kliničkih istraživanja npr. praćenjem promjena koncentracije jetrenih ili mišićnih enzima u serumu (Waller i Sampson, 2018).

U nekim slučajevima, poznavanje mehanizma djelovanja molekule lijeka pomoglo je osmisliti njegov specifičan antidot ili neku drugu vrstu liječenja ovakve vrste toksičnosti. Npr. poznato je da tiolna (-SH) skupina endogenog tripeptida glutationa može prevenirati oštećenje tkiva uzrokovano visoko reaktivnim kemijskim vrstama kao što je npr. toksični metabolit paracetamola, *N*-acetil-para-benzokinon-imin (NAPQI). Priroda staničnog oštećenja je u korelaciji sa stabilnošću reaktivne kemijske vrste. Izrazito nestabilni metaboliti mogu se kovalentno vezati na enzime i inaktivirati ih, dok oni stabilniji mogu difundirati do teže dostupnih mjesta u stanici (npr. DNA) i pokrenuti promjene kao npr. kancerogenezu.

Lijek se može eliminirati iz organizma u izvornom obliku ili u obliku inaktivnih metabolita, pri čemu nema opasnosti od štetnih učinaka. Druga opcija jest konverzija u reaktivni metabolit. On se može spontanim raspadanjem, deaktivacijom uz pomoć enzima ili

citoprotektivnim signalnim putevima pretvoriti u inaktivni produkt. Ukoliko se to ne dogodi, reaktivni metabolit moġe se kovalentno vezati za DNA i izazvati mutacije i kancerozne promjene, ili se kovalentno vezati na proteine pri ļemu dolazi do nekroze stanice, upalnih reakcija i drugih ġtetnih posljedica (Waller i Sampson, 2018).

Metabolizmom putem CYP-a mogu nastati reaktivni metaboliti ukoliko molekula posjeduje odreĽene funkcionalne skupine koje podlijeġu konverziji u reaktivne kemijske vrste. Te funkcionalne skupine su npr. tiofeni i drugi heterociklič ki prstenovi koji sadrġe sumpor, furani, anilini, nitrobenzeni, hidrazini i neki derivati karboksilnih kiselina. TakoĽer, CYP-om proizvedeni elektrofilni kinoidni produkti (kinoni, kinon-imini, kinon-metidi itd.) nekih spojeva poput npr. paracetamola mogu se kovalentno vezati za makromolekule ili uzrokovati oksidativni stres ġto za posljedicu ima hepatotoksič nost. Neki od tih lijekova su diklofenak, nefazodon, trazodon, takrin, amodiakvin i lapatinib (Baillie i Rettie, 2011).

1.3.2.1. *In silico* predviđanje toksičnosti

In silico toksikoloġke metode (engl. *in silico toxicology,* IST) su raļunalne tehnike koje analiziraju, simuliraju, vizualiziraju ili predviĽaju toksič nost kemijskih spojeva. IST obuhvaĆa svu metodologiju za analizu kemijskih i bioloġkih svojstava baziranu na kemijskoj strukturi koja predstavlja stvaran ili pretpostavljen kemijski spoj. *In silico* pristup se ļesto kombinira s drugim metodama ispitivanja toksič nosti, meĽutim u posljednje vrijeme *in silico* pristup se sve viġe poļinje koristiti za generiranje informacija o procjenama toksič nosti s manje potrebe za izvoĽenjem ispitivanja *in vitro* i *in vivo*.

IST koristi modele koji se mogu kodirati unutar softverskih alata za predviĽanje potencijalne toksič nosti kemikalije i, u nekim situacijama, za kvantitativno predviĽanje toksič ne doze ili potencije. Ovi modeli temelje se na eksperimentalnim podacima, odnosima strukture i aktivnosti i znanstvenim spoznajama. Postoje brojne različ ite situacije u kojima in silico metode imaju vaġnu ulogu u procjeni opasnosti postojeĆ ih kemikalija ili novih tvari koje se razvijaju i koje bi imale koristi od razvoja toksikoloġkih protokola *in silico*. To uključ uje:

- izvanredne situacije u kojima je potrebno brzo razumijevanje potencijalnih toksikoloġkih posljedica izloġenosti u nedostatku postojeĆ ih podataka o toksikoloġkim ispitivanjima;
- ogranič enu dostupnost ispitivane tvari;
- teġku izvedivost laboratorijskih ispitivanja;

- kompleksnost ispitivane tvari i nemogućnost njezine sinteze i
- situacije u kojima je manje zahtjevan i jeftiniji pristup potrebniji od eksperimentalnog rada.

IST metode su jedan pristup za generiranje dodatnih informacija za nadopunjavanje i konačno povećanje pouzdanosti procjene rizika, uključujući i razumijevanje strukturne i/ili mehaničke osnove koja može doprinijeti idejama za racionalno projektiranje novih kemikalija, razvoj testne strategije ili cjelokupnu procjenu težine dokaza. IST sama po sebi podržava načelo 3R (engl. *replacement, refinement, reduction* = zamjena, usavršavanje, smanjivanje) koje se odnosi na upotrebu životinja u istraživanju. Korištenjem IST metoda nastoji se zamijeniti ili barem minimizirati upotrebu životinja u istraživanju.

IST će igrati sve značajniju ulogu u procjeni kemikalija u nizu situacija izloženosti kemikalijama koje imaju potencijal utjecati na javno zdravlje. Kao što je za očekivati, kvaliteta i količina eksperimentalnih podataka će varirati, kao i raspoložive *in silico* metode. Na primjer, eksperimentalni podaci mogu potjecati iz različitih izvora, studija, protokola i laboratorija koji koriste ili ne koriste standarde dobre laboratorijske prakse. Prihvaćeni kriteriji odabira moraju se definirati za eksperimentalne podatke i *in silico* metode, za dosljednu i ujednačenu uporabu. Razvoj IST protokola podržat će uporabu i usvajanje *in silico* metoda na isti način na koji *in vitro* i *in vivo* smjernice testiranja podržavaju uporabu i usvajanje tih testova (Myatt i sur., 2018).

1.4. Lipinski pravilo 5

Da bi neka molekula lijeka postigla povoljnu oralnu bioraspoloživost, tj. da se postigne željena brzina i stupanj apsorpcije ljekovite tvari iz farmaceutskog oblika ako je dan *per os*, ona treba imati odgovarajuća svojstva koja su definirana Lipinski pravilom 5. Chris Lipinski i suradnici su 1997. predložili koncept danas poznat kao Lipinski pravilo 5 (Lipinski i sur., 1997), u pokušaju da stvore opće smjernice koje opisuju parametre karakteristične za molekule sa slabom apsorpcijom i permeabilnošću. Prema tom pravilu, slaba apsorpcija i permeabilnost, te posljedično i loša svojstva lijeka, vjerojatnija su ukoliko molekula lijeka posjeduje dva ili više od sljedećih kriterija: i) više od pet donora vodikove veze (H-veze); ii) relativnu molekulsku masu, $M_r > 500$; iii) lipofilnost tj. log P > 5; te zbroj donora i akceptora vodikove veze (eng. *hydrogen bond donors and acceptors*), HBD + HBA > 10 (Petit i sur., 2012).

Uspostavljena su i druga pravila za predviđanje poželjnih svojstava molekule lijeka, npr. Veberovo pravilo prema kojem molekula mora posjedovati 10 ili manje rotacijskih veza, polarnu površinu manju ili jednaku 140 $Å^2$ te zbroj donora i akceptora vodikove veze manji ili jednak 12, Ghoseovo pravilo koje postavlja određene granice za relativnu molekulsku masu i lipofilnost potencijalnog lijeka, Feherovo i Schmidtovo koje uz relativnu molekulsku masu i lipofilnost u obzir uzima i broj kiralnih centara u molekuli potencijalnog lijeka, itd. (Garcia-Sosa i sur., 2012), međutim Lipinski pravilo 5 i dalje nailazi na široku primjenu zbog svoje konceptualne jednostavnosti te jednostavnosti izračuna promatranih parametara. Također, pokazalo se da molekule koje su u skladu s Lipinski pravilom 5 imaju manji stupanj propadanja tijekom kliničkih ispitivanja te uspješno prolaze stroge toksikološke i kliničke sigurnosne prepreke (Leeson i Springthorpe, 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Terapijske mogućnosti u liječenju raka ubrzano se poboljšavaju zadnjih godina. Broj odobrenih antitumorskih lijekova stalno raste. U zadnjih pet godina odobrena su 63 nova lijeka (http://www.iqvia.com). Pogotovo se velika pažnja pridaje imunoonkologiji i lijekovima koji djeluju putem imunosnog sustava. Od 14 novih antitumorskih aktivnih tvari odobrenih samo 2017. godine, sve su bile ciljana terapija, a 11 lijekova je FDA klasificirala u napredne terapije.

U ovom trenutku veliki je broj novih tvari protiv raka u kliničkim ispitivanjima. Neki od njih pripadaju klasičnim skupinama kemoterapije, dok su drugi prvi predstavnici novih skupina antitumorskih lijekova klasificiranih prema biološkim metama koje ovi lijekovi ciljaju. Mete mogu biti u tumorskoj stanici ili u drugim elementima koji su u interakciji s tumorskom stanicom (endotel, ekstracelularni matriks, imunološki sustav, stanice domaćina). Napredak u polju genomike i molekularne biologije omogućio je uspješnu identifikaciju abnormalnih proteina u stanicama raka koji su privlačne mete za antitumorsku terapiju. Budući da su ovi proteini prekomjerno eksprimirani ili disregulirani u stanicama raka u usporedbi s normalnim stanicama, pretpostavlja se da će ciljanje ovih proteina uskoro dovesti do razvoja njihovih inhibitora koji će biti relativno netoksični za normalne stanice. Međutim, pokazalo se da tvari koji ciljaju abnormalne proteine u stanicama raka ispoljavaju jednaku učestalost i ozbiljnost toksičnosti kao i tradicionalne citotoksične tvari, s glavnom razlikom u prirodi toksičnih učinaka. Prema tome, klasični simptomi kemoterapijske toksičnosti kao što su alopecija, mijelosupresija, mukozitis, mučnina i povraćanje bivaju zamijenjeni vaskularnim, dermatološkim, endokrinim, koagulacijskim, imunološkim, očnim i plućnim poremećajima. Ove i druge potencijalne toksične učinke treba istražiti i prepoznati u ranoj fazi razvoja novih lijekova, te u daljnjem razvoju lijeka spriječiti preinakom ispitivane molekule i/ili odabirom nove vodeće molekule, te optimalno upravljati potencijalnim toksičnim profilom (Dy i Adjei, 2013).

U posljednje vrijeme razvijeni su brojni inhibitori enzima kao bioloških meta, npr. HDAC u pogledu njihove kemijske strukture: hidroksamske kiseline, benzamidi, ciklički peptidi i lanci masnih kiselina. Ove molekule su više ili manje specifične za jedan i/ili nekoliko HDAC ili jednu ili različite HDAC klase. Do danas je FDA odobrila samo 4 molekule za terapiju protiv raka: i) vorinostat (SAHA) i ii) romidepsin (FK288) za kožni limfom T-stanica (CTCL) 2006. i 2009., iii) panobinostat (LBH589) za periferni TCL (PTCL) i multipli mijelom u 2014. i

2015. i iv) belinostat za PTCL 2014. godine (Yoon i Eom, 2016). Glavni razlozi za tako mali broj HDAC inhibitora koji se koriste u terapiji protiv raka je njihova visoka toksiļnost i niska specifiļnost. U tijeku je veliki napor kako bi se identificirali bolji i specifiļniji kandidati, a viġe od 350 kliniļkih ispitivanja (zatvorenih ili regrutnih, https://clinicaltrials.gov/) trenutno procjenjuju uļinke HDACi-a, samostalno ili u kombinaciji s prethodno koriġtenim lijekovima, u brojnim patologijama, osobito u raku. Glavni ciljevi ovih ispitivanja su: i) testirati nove kombinacije opisanih lijekova protiv raka (antiproliferativne molekule, inhibitori kinaza, DNMTi[27], HMTi[28], HDMi[29]é) s HDACi i njihov uļinak na progresiju raka, i ii) identificirati nove HDACi koji pokazuju manju toksiļnost i poveĺanu specifiļnost.

Cilj ovog rada je *in silico* istraġiti farmakokinetiļka (ADMET) svojstva odabranih inhibitora histon deacetilaza (n = 31) koji sadrġe hidroksamsku skupinu, a koji se nalaze u razliļitim pretkliniļkim i kliniļkim fazama istraġivanja, kako bi se dobio uvid u njihov sigurnosni profil te istraġila potencijalna toksiļnost.

[27] DNMTi - inhibitori DNA metiltransferaze
[28] HMTi - inhibitori histon metiltransferaze
[29] HDMi - inhibitori histon demetilaze

3. MATERIJALI I METODE

HDAC inhibitori istraženi u ovom radu su odabrani iz komercijalno dostupne baze podataka www.selleckchem.com (http://www.selleckchem.com/HDAC.html). Različita fizikokemijska i toksikološka svojstva predviđena su i analizirana korelacijskim studijama korištenjem molekulskih deskriptora i ADMET svojstava. Svi parametri su izračunati i QSAR analiza je provedena korištenjem računalnog programa ADMET Predictor™ 8.5 Inc. (Simulations Plus, SAD) (http://www.simulations-plus.com).

U ovom radu su predviđena ADMET svojstva izabranih HDAC inhibitora (Tablica 1-3) te su predviđeni i analizirani njihovi parametri kao što su:

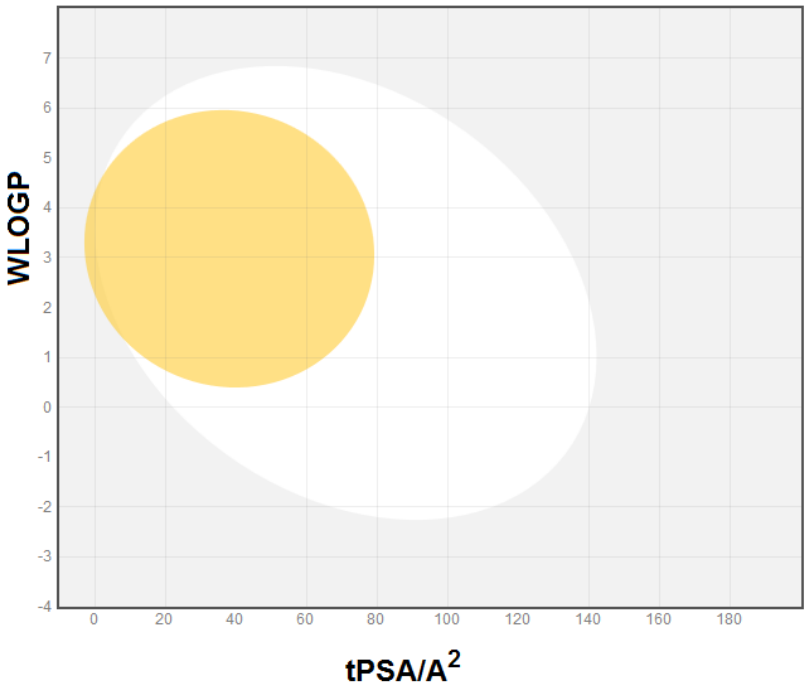
- ADMET_Risk - sveukupni ADMET rizik,
- S+Absn_Risk - rizik slabe apsorpcije ili apsolutni rizik,
- CYP_Risk - rizik od metabolizma ili CYP rizik i
- TOX rizik - rizik od sveukupne toksičnosti.

ADMET rizik podrazumijeva svojstva koja bi mogla predstavljati prepreku dobroj oralnoj bioraspoloživosti lijeka, a nastaje kao posljedica procesa koji se odnose na apsorpciju, distribuciju (raspodjelu), metabolizam, eliminaciju i toksičnost. On predstavlja zbroj svih navedenih rizika, tj. apsolutnog rizika, CYP rizika, i TOX rizika. Apsolutni rizik predstavlja rizik od apsorpcije male frakcije primijenjene doze, CYP rizik predstavlja rizik od ekstenzivnog metabolizma putem CYP450 enzima, dok TOX rizik predstavlja mogućе mehanizme toksičnosti lijeka uključujući mutagenost i kardiotoksičnost (TOX_hERG). Također je za svaku molekulu uz pomoć istog računalnog programa istraženo odstupanje od Lipinski pravila 5.

Rezultati istraživanja dobiveni uz pomoć softvera ADMET Predictor™ 8.5 Inc. (Simulations Plus, SAD) uspoređeni su s rezultatima dobivenima pomoću komercijalno dostupnog web alata SwissADME (http://www.swissadme.ch) koji također omogućuje predviđanje ADMET svojstava malih molekula te njihovu sličnost s lijekom (eng. *drug-likeness*). Alatom SwissADME HDAC inhibitorima ispitana je lipofilnost u obliku konsenzusnog logP (Daina i sur., 2017), broj donora i akceptora vodikovih veza, inhibicija za metabolizam lijekova važnih CYP enzima te odstupanje od Lipinski pravila 5.

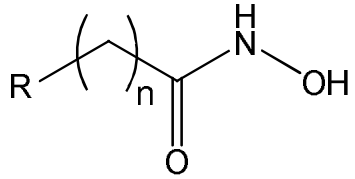
Za svaku od tri skupine HDAC inhibitora takoĽer je izraļunat i prikazan njihov BOILED-Egg model (od eng. *Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method*) koji s obzirom na lipofilnost/hidrofilnost molekula predviĽa moguĺnost njihove gastrointestinalne apsorpcije kao i prelazak krvno-moģdane barijere. BOILED-Egg prikazan (Slika 7) je kao dijagram ovisnosti WLOGP (logP po Wildmanu i Crippenu) (Wildman i Crippen, 1999) i tPSA (*topological polar surface area*) (Prasanna i Doerksen, 2009), dva molekulska deskriptora koji ovise o lipofilnosti/hidrofilnosti molekule.

BOILED-Egg model dobiven putem web alata SwissADME predviĽa odnos izmeĽu molekule i P-glikoproteina. Molekule koje nisu supstrat P-glikoproteina na dijagramu ĺe biti oznaļene crveno, a koje jesu bit ĺe oznaļene plavo. Ģuta regija predstavlja fizikalno-kemijski prostor za molekule koje imaju najveĺu vjerojatnost dobre gastrointestinalne apsorpcije, dok bijela regija predstavlja molekule koje imaju najveĺu vjerojatnost prelaska krvno-moģdane barijere. Ģuta i bijela regija nisu meĽusobno isključuļive, odnosno spojevi koji pripadaju ģutoj regiji pripadaju takoĽer i bijeloj.

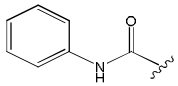
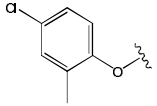
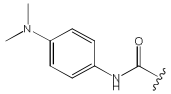
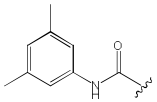
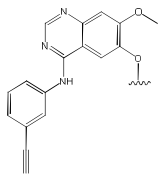


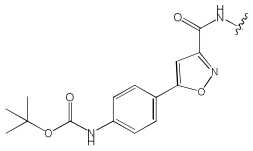
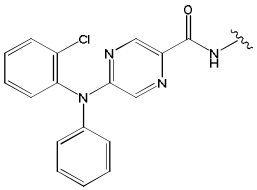
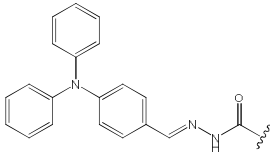
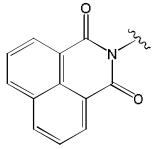
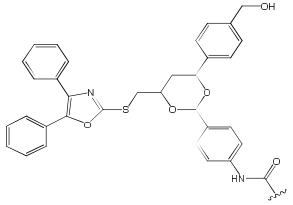
Slika 7. Prikaz BOILED-Egg modelnog dijagrama.

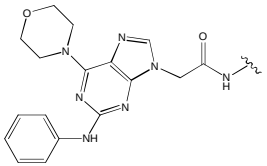
Tablica 1. HDAC inhibitori s hidroksamskom skupinom na kraju alifatskog lanca



Opća formula

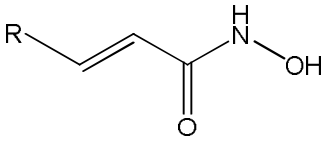
Br.	Naziv inhibitora	Kemijska struktura	Broj CH_2 skupina	SMILES*	IUPAC naziv	Ref.
1	Vorinostat		6	C1=CC=C(C=C1)NC(=O)CCCCCCC(=O)NO	*N*'-hidroksi-N-feniloktandiamid	Schölz i sur., 2015
2	Droksinostat		3	C1=C(C=C(C(=C1)OCCCC(NO)=O)C)Cl	4-(4-kloro-2-metilfenoksi)-*N*-hidroksibutanamid	Tang i sur, 2013
3	M344		6	ONC(=O)CCCCCCNC(=O)c(cc1)ccc1N(C)C	4-(dimetilamino)-*N*-[7-(hidroksiamino)-7-oksoheptil]benzamid	Liu i sur., 2014
4	LMK-235		6	CC1=CC(C)=CC(C(NOCCCCCC(NO)=O)=O)=C1	*N*-[[6-hidroksiamino)-6-oksoheksil]oksi]-3,5-dimetilbenzamid	Yun i sur, 2016
5	CUDC-101		6	COC1=C(C=C2C(=C1)N=CN=C2NC3=CC=CC(=C3)C#C)OCCCCCCC(=O)NO	7-((4-((3-etinilfenil)amino)-7-metoksi-6-kinazolinil)oksi)-N-hidroksiheptanamid	Wichapong i sur., 2014
6	CAY10603		6	ONC(=O)CCCCCCNC(=O)c1noc(c1)c1ccc(cc1)NC(=O)OC(C)(C)C	2-metil-2-propanil[4-(3-[[7-(hidroksiamino)-7-oksoheptil]karbamoil]-1,2-oksazol-5-il)fenil]	Wang i sur., 2016

7	Rikolinostat		6	C1=CC=C(C=C1)N(C2=CC=CC=C2)C3=NC=C(C=N3)C(=O)NCCCCCCC(=O)NO	2-difenilamino-N-[7-(hidroksiamino)-7-oksoheptil]-5-pirimidinkarboksamid	Dhanyamraju i sur., 2015
8	Citarinostat		6	C1=CC=C(C=C1)N(C2=CC=CC=C2Cl)C3=NC=C(C=N3)C(=O)NCCCCCCC(=O)NO	2-((2-klorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroksiamino)-7-oksoheptil)pirimidin-5-karboksamid	Huang i sur., 2017
9	WT161		6	ONC(CCCCCCC(N/N=C/C(C=C1)=CC=C1N(C2=CC=CC=C2)C3=CC=CC=C3)=O)=O	8-{(2E)-2-[4-(difenilamino)benziliden]hidrazino}-N-hidroksi-8-oksooktanamid	Hideshima i sur., 2016
10	Skriptaid		5	C1=CC2=C3C(=C1)C(=O)N(C(=O)C3=CC=C2)CCCCCC(=O)NO	1,3-dioksobenzo[*de*]izokinolin-2-il)-*N*-hidroksiheksanamid	Shan i sur, 2014
11	Tubacin		6	C1C(OC(OC1C2=CC=C(C=C2)CO)C3=CC=C(C=C3)NC(=O)CCCCCCC(=O)NO)CSC4=NC(=C(O4)C5=CC=CC=C5)C6=CC=CC=C6	*N*-[4-(4-{[(4,5-difenil-1,3-oksazol-2-il)sulfanil]metil}-6-[4-(hidroksimetil)fenil]-1,3-dioksan-2-il)fenil]-N'-hidroksioktandiamid	Schölz i sur., 2015

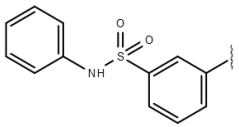
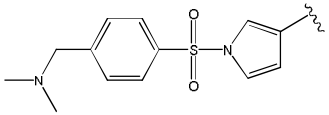
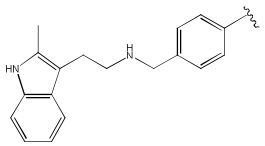
12	PURINE HA		5	O=C(CCCCCNC(=O)Cn4cnc3c(Nc1ccccc1)nc(N2CCOCC2)nc34)NO	*N*-hidroksi-6-(2-(2-morfolino-6-(fenilamino)-9H-purin-9-il)acetamido)heksanamid	Wang i sur., 2014

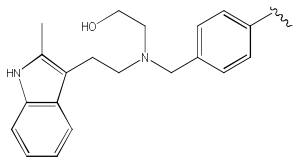
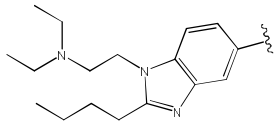
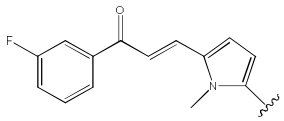
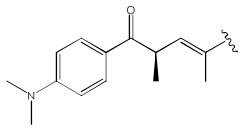
*SMILES - od eng. *simplified molecular-input line-entry system* (https://en.wikipedia.org/wiki/Simplified_molecular-input_line-entry_system, pristupljeno 7. prosinca 2018.)

Tablica 2. HDAC inhibitori s hidroksamskom skupinom na kraju nezasićenog alifatskog lanca



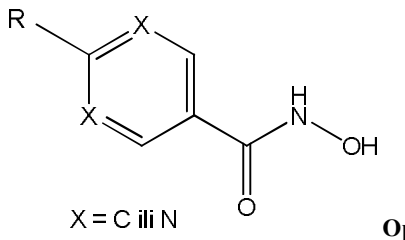
Opća formula

Br.	**Naziv inhibitora**	**Kemijska struktura**	**SMILES**	**IUPAC naziv**	**Ref.**
13	Belinostat		C1=CC=C(C=C1)NS(=O)(=O)C2=CC=CC(=C2)C=CC(=O)NO	*N*-hidroksi-3-[3-(fenilsulfamoil)fenil]akrilamid	Bantscheff i sur., 2011
14	Resminostat		CN(C)CC1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)N2C=CC(=C2)C=CC(=O)NO	3-[1-({4-[(dimetilamino)metil]fenil}sulfonil)-1H-pirol-3-il]-N-hidroksiakrilamid	Lucas i sur., 2018
15	Panobinostat		CC1=C(C2=CC=CC=C2N1)CCNCC3=CC=C(C=C3)C=CC(=O)NO	*N*-hidroksi-3-[4-({[2-(2-metil-1H-indol-3-il)etil]amino}metil)fenil]akrilamid	Bantscheff i sur., 2011

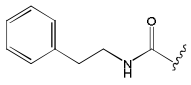
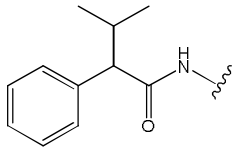
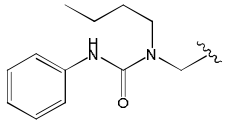
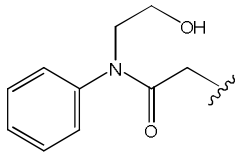
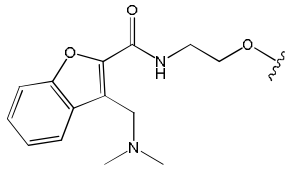
16	Dacinostat		C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)CCN(CCO)CC3=CC=C(C=C3)C=CC(=O)NO	*N*-hidroksi-3-[4-({(2-hidroksietil)[2-(1H-indol-3-il)etil]amino}metil)fenil]akrilamid	Bantscheff i sur., 2011
17	Pracinostat		CCCCC1=NC2=C(N1CCN(CC)CC)C=CC(=C2)/C=C/C(=O)NO	(2E)-3-{2-butil-1-[2-(dietilamino)etil]-1H-benzimidazol-5-il}-N-hidroksiakrilamid	Wei i sur., 2014
18	MC1568		CN1C=C(/C=C/C(C2=CC(F)=CC=C2)=O)C=C1/C=C/C(NO)=O	(2E)-3-{4-[(1E)-3-(3-fluorofenil)-3-okso-1-propen-1-il]-1-metil-1H-pirol-2-il}-N-hidroksiakrilamid	Ueki i sur., 2013
19	Trihostatin A		O=C([C@H](C)/C=C(C)/C=C/C(NO)=O)C1=CC=C(N(C)C)C=C1	(2*E*,4*E*,6*R*)-7-(4-(dimetilamino)fenil)-*N*-hidroksi-4,6-dimetil-7-okso-2,4-heptadienamid	Schölz i sur., 2015

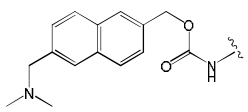
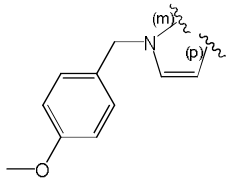
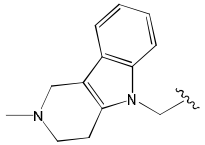
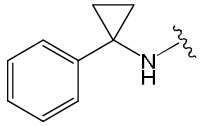
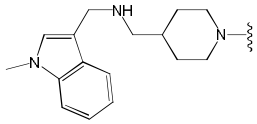
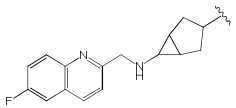
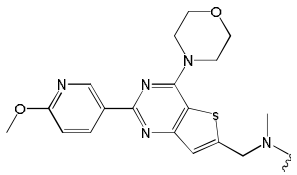
*SMILES ï od eng. *Simplified Molecular-Input Line-Entry System* (https://en.wikipedia.org/wiki/Simplified_molecular-input_line-entry_system, pristupljeno 7. prosinca 2018.)

Tablica 3. HDAC inhibitori s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri



Opća formula

Br.	**Naziv inhibitora**	**Kemijska struktura**	**SMILES**	**IUPAC naziv**	**Ref.**
20	BRD73954		ONC(C1=CC=CC(C(NCCC2=CC=CC=C2)=O)=C1)=O	*N*-hidroksi-*N*'-(2-feniletil)izoftalamid	Olson i sur., 2013
21	AR42		CC(C)C(C1=CC=CC=C1)C(=O)NC2=CC=C(C=C2)C(=O)NO	*N*-hidroksi-4-[(3-metil-2-fenilbutanoil)amino]benzamid	Bjornsson i sur., 2014
22	Neksturastat A		CCCCN(CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NO)C(=O)NC2=CC=CC=C2	4-[[butil(fenilkarbamoil)amino]metil]-*N*-hidroksibenzamid	Valdez i sur., 2016
23	HPOB		OCCN(C(CC1=CC=C(C(NO)=O)C=C1)=O)C2=CC=CC=C2	*N*-hidroksi-4-{2-[(2-hidroksietil)(fenil)amino]-2-oksoetil}benzamid	Li i sur., 2016
24	Abeksinostat		O=C(NO)c3ccc(OCCNC(=O)c2oc1ccccc1c2CN(C)C)cc3	3-[(dimetilamino)metil]-*N*-{2-[4-(hidroksikarbamoil)fenoksi]etil}-1-benzofuran-2-karboksamid	Schölz i sur., 2015

25	Givinostat		CCN(CC)CC1=CC2=C(C=C1)C=C(C=C2)COC(=O)NC3=CC=C(C=C3)C(=O)NO	{6-[(dietilamino)metil]-2-naftil}metil[4-(hidroksikarbamoil)fenil]karbamat	Wei i sur., 2014
26	PCI34051		O=C(NO)C1=CC=C2C(N(CC3=CC=C(OC)C=C3)C=C2)=C1	*N*-hidroksi-1-(4-metoksibenzil)-1H-indol-6-karboksamid	Schölz i sur., 2015
27	Tubastatin A		CN1CCC2=C(C1)C3=CC=CC=C3N2CC4=CC=C(C=C4)C(=O)NO	*N*-hidroksi-4-[(2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-5H-pirido[4,3-b]indol-5-il)metil]benzamid	Wang i sur., 2014
28	ACY-738		O=C(NO)C(C=N1)=CN=C1NC2(CC2)C3=CC=CC=C3	*N*-hidroksi-2-[(1-fenilciklopropil)amino]-5-pirimidinkarboksamid	Regna i sur., 2016
29	Kvizinostat		CN1C=C(C2=CC=CC=C21)CNCC3CCN(CC3)C4=NC=C(C=N4)C(=O)NO	*N*-hidroksi-2-[4-[[(1-metilindol-3-il)metilamino]metil]-1-piperidinil]-5-pirimidinkarboksamid	Ueki i sur., 2013
30	CHR3996		C1C2C(C2NCC3=NC4=C(C=C3)C=C(C=C4)F)CN1C5=NC=C(C=N5)C(=O)NO	2-(6-{[(6-fluoro-2-kinolinil)metil]amino}-3-azabiciklo[3.1.0]heks-3-il)-N-hidroksi-5-pirimidinkarboksamid	Smith i sur., 2015
31	CUDC907		CN(CC1=CC2=C(S1)C(=NC(=N2)C3=CN=C(C=C3)OC)N4CCOCC4)C5=NC=C(C=N5)C(=O)NO	*N*-hidroksi-2-[{[2-(6-metoksi-3-piridinil)-4-(4-morfolinil)tieno[3,2-d]pirimidin-6-il]metil}(metil)amino]-5-pirimidinkarboksamid	Petrilli i sur., 2014

Tablica 4. Inhibitori histon deacetilaza (HDACi) i njihove specifiļne minimalne inhibitorne koncentracije preuzete sa stranice www.selleckchem.com (pristupljeno 7. prosinca 2018.)

Br.	IC	HDAC	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC8	HDAC9	HDAC10	HDAC11	HD1	HD2
1	10 nM	+++													
2	2.47 εM; 1.46 εM				+			+		+					
3	100 nM	++													
4	11.9 nM; 4.2 nM	+++				+++	+++								
5	4.4 nM; 2.4 nM; 15.7 nM	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+++	+	++	++	+++			
6	2 pM			++++										++	
7	5 nM		++	++	++			++++		++					
8	2.6 nM; 46 nM		+++	+++	+++			++++		++				++++	+++
9	0.4 nM; 8.35 nM; 15.4 nM		++++	+++				++++							
10	-	ã													
11	4 nM							++++							
12	-														
13	27 nM				+			+		+					
14	42.5 nM; 50.1 nM; 71.8 nM; 877 nM		+++		++			++							
15	5 nM	++++													
16	32 nM	+++													
17	40-140 nM (osim za HDAC6)		++	++	+++	++	+++	+	++	++	++	+++	++		
18	100 nM														
19	1.8 nM	++++													
20	36 nM; 120 nM							+++		++					
21	30 nM	+++													
22	5 nM							++++							
23	56 nM		+	+	+			++		+		+++			
24	7 nM		++++	+++	++++			+++		+		+++			
25	10 nM; 7.5 nM; 16 nM		+											++++	+++
26	10 nM									+++					
27	15 nM							+++							
28	1.7 nM							++++							
29	0.11 nM (HDAC1)		++++	++++	++++	++++	++++			++++		++++	++++		
30	-														
31	1.7 nM; 5 nM; 1.8 nM; 2.8 nM; 19 nM		++++	++++	++++			+++				++++	++++		

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati istraživanja ovog rada prikazani su u 5 dijelova.

U tablicama 5-7 nalaze se ADMET parametri ispitivanih spojeva predviđeni softverom ADMET Predictor™. Shemama 2-7 prikazane su odabrane metaboličke reakcije HDACi katalizirane CYP enzimima. Slijedi interpretacija BOILED-Egg dijagrama za pojedine podskupine HDACi te usporedba rezultata dobivenih softverom ADMET Predictor™ s onima dobivenima web alatom SwissADME, te naposljetku QSAR istraživanja odnosa između molekulskih deskriptora i ADMET svojstava ispitivanih molekula.

Tablica 5 prikazuje predviđene ADMET parametre za inhibitore histon-deacetilaze koji sadrže hidroksamsku skupinu na kraju alifatskog lanca, tipa vorinostata. Prema dobivenim podacima, gotovo svima od tih dvanaest spojeva broj rotacijskih veza stvara prepreku dobroj bioraspoloživosti. Iznimka su LMK-235 i droksinostat. Za vorinostat i M344 predviđen je jedino broj rotacijskih veza kao prepreka dobroj bioraspoloživosti.

CUDC-101, rikolinostat, citarinostat i WT161 pokazuju rizik od ekstenzivnog klirensa, ekstenzivnog metabolizma putem CYP3A4, te inhibicije metabolizma testosterona i midazolama putem CYP3A4. Kod rikolinostata, citarinostata, WT161 i skriptaida predviđena je karcinogenost u štakora te hepatotoksičnost. Mutagenost je predviđena kod CUDC-101, WT161 te skriptaida. Veličina molekule kao prepreka dobroj bioraspoloživosti predviđena je kod CAY10603, citarinostata, WT161, tubacina i purinske hidroksamske kiseline. Najlošiji profil imaju WT161 (predviđeni parametri koji stvaraju prepreku dobroj bioraspoloživosti i dobroj sličnosti s lijekom jesu: veličina molekule, broj veza koje slobodno rotiraju, prevelika lipofilnost, niska topljivost u vodi, kardiotoksičnost, kancerogenost u štakora, hepatotoksičnost, mutagenost, ekstenzivan metabolizam putem CYP3A4, ekstenzivan klirens te inhibicija metabolizma testosterona putem CYP3A4) i tubacin (predviđeni parametri koji stvaraju prepreku dobroj oralnoj bioraspoloživosti i dobroj sličnosti s lijekom su: veličina molekule, broj veza koje slobodno rotiraju, previše akceptora vodikovih veza, prevelik naboj, prevelika lipofilnost, niska permeabilnost, niska topljivost u vodi, niska koncentracija nevezanog lijeka u plazmi, kardiotoksičnost, kancerogenost u štakora, ekstenzivan metabolizam putem CYP3A4, ekstenzivan klirens te inhibicija metabolizma testosterona i midazolama putem CYP3A4).

Svi spojevi osim WT161 i tubacina zadovoljavaju Lipinski pravilo 5, WT161 odstupa prevelikom lipofilnoću (logP>5, tj. logP = 5.45), dok tubacin ne zadovoljava molekulskom masom (M_r > 500, tj. M_r = 721.9).

Za spoj LMK-235 predviđeni ADMET rizik, TOX rizik i apsolutni rizik jednaki su nuli, što znači da je spoj prema predviđanjima najbolji izbor kao potencijalni lijek iz skupine inhibitora histon deacetilaze s hidroksamskom skupinom na kraju alifatskog lanca.

Prema tablici 6, većina HDAC inhibitora s hidroksamskom skupinom na kraju nezasićenog alkilnog lanca tipa belinostata pokazuju nisku permeabilnost. Iznimka su MC1568 i trihostatin A. Za panobinostat i dacinostat predviđen je ekstenzivan metabolizam putem CYP2D6, dok se belinostat predviđeno ekstenzivno metabolizira putem CYP2C9. Inhibiciju metabolizma testosterona putem CYP3A4 pokazuju belinostat, dacinostat, MC1568 i trihostatin A. Belinostat i MC1568 pokazuju mogućnost hepatotoksičnost, dok mogućnost mutagenost pokazuju panobinostat, dacinostat, MC1568 i trihostatin A. Najlošiji profil iz ove skupine HDAC inhibitora ima dacinostat, za kojeg je uz već navedenu lošu permeabilnost, mutagenost, ekstenzivan metabolizam putem CYP2D6 i inhibiciju metabolizma testosterona putem CYP3A4 predviđena i kardiotoksičnost te kancerogenost u štakora. Kancerogenost u štakora je predviđena također i za panobinostat.
Najpovoljnije parametre pokazuju resminostat i pracinostat za koje nisu predviđene druge prepreke dobroj bioraspoloživosti osim niske permeabilnosti. Također, niti jedan spoj iz ove skupine ne odstupa od Lipinski pravila 5.

Tablica 7 prikazuje ADMET parametre predviđene za HDAC inhibitore s hidroksamskom skupinom izravno vezanoj na aromatskoj jezgri. Od jedanaest spojeva, za četiri je predviđen sveukupan ADMET rizik jednak nuli što znači da ne postoje rizici smanjene bioraspoloživosti, kao ni toksičnosti ni ekstenzivnog metabolizma. To su BRD7394, AR42, HPOB i PCI34051. Za neksturastat A predviđen je ekstenzivan metabolizam putem CYP2C19 i CYP3A4. Za abeksinostat predviđena je inhibicija metabolizma testosterona putem CYP3A4 i ekstenzivan metabolizam putem CYP2D6. Kvizinostat se prema predviđanjima također ekstenzivno metabolizira putem CYP2D6. Kancerogenost u štakora predviđena je za givinostat, ACY-738, kvizinostat, CHR3996 i CUDC907. Za CHR3996 predviđena je također i mutagenost i inhibicija metabolizma testosterona putem CYP3A4. Najlošiji profil ima CUDC907 za kojeg prepreku dobroj bioraspoloživosti i dobroj slični s lijekom prema predviđanjima predstavljaju veličina molekule, prevelik broj akceptora vodikove veze,

preveliki naboj, kancerogenost u miševa i inhibicija metabolizma testosterona putem CYP3A4. Slijedi ga givinostat za kojeg prepreku dobroj bioraspoloživosti i dobrom *drug-likeness* prema predviđanjima predstavljaju broj veza koje slobodno rotiraju, loša permeabilnost, kardiotoksičnost i inhibicija metabolizma testosterona putem CYP3A4. Za kvizinostat, osim već spomenutog ekstenzivnog metabolizma putem CYP2D6, predviđena je i loša permeabilnost, prevelik volumen distribucije, kancerogenost u štakora, te inhibicija metabolizma testosterona putem CYP3A4. Tubastatin A pokazuje moguću kardiotoksičnost, dok je za ACY-738 predviđena moguća kancerogenost u štakora.

CUDC907 odstupa od Lipinski pravila 5 prevelikom molekulskom masom (M_r > 500, tj. M_r = 508.56), te zbrojem donora i akceptora vodikove veze većim od 10 (HBA+HBD=11).

Tablica 5. Odabrani parametri za HDAC inhibitore s hidroksamskom skupinom na kraju alifatskog lanca (**1** ï **12**)

Br. spoja	**ADMET rizik**	**ADMET kod**	**Apsolutni rizik**	**Kod apsolutnog rizika**	**TOX rizik**	**TOX kod**	**CYP rizik**	**CYP kod**	**Odstupanja od LP5**	**LP5 kod**
1	0,5	RotB	0,5	RotB	0	-	0	-	0	-
2	0,399	2C19	0	-	0	-	0,399	2C19	0	-
3	0,5	RotB	0,5	RotB	0	-	0	-	0	-
4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
5	3,332	RotB, MUT, 3A4, CL, ti	1	RotB	1	MUT	1,332	3A4, CL, ti	0	-
6	3,664	*Size*, RotB, ch, Peff, ti	2,664	*Size*, RotB, ch, Peff	0	-	1	ti	0	-
7	4,554	RotB, Xr, HEPX, 3A4, CL, ti	1	RotB	1,298	Xr, HEPX	2,256	3A4, CL, ti	0	-
8	5,367	*Size*, RotB, K_{ow}, hERG, Xr, HEPX, 3A4, CL, ti	1,595	*Size*, RotB, K_{ow}	1,406	hERG, Xr, HEPX	2,366	3A4, CL, ti	0	-
9	9,533	*Size*, RotB, K_{ow}, S_w, hERG, Xr, HEPX, MUT, 3A4, CL, ti	3,48	*Size*, RotB, K_{ow}, S_w	3,61	hERG, Xr, HEPX, MUT	2,443	3A4, CL, ti	1	LP
10	2,697	Xr, HEPX, MUT	0	-	2,697	Xr, HEPX, MUT	0	-	0	-
11	13,639	*Size*, RotB, HBA, ch, K_{ow}, Peff, S_w, fu, hERG, rat, Xr, 3A4, CL, mi, ti	6,742	*Size*, RotB, HBA, ch, Kow, Peff, Sw	1,899	hERG, rat, Xr	4	3A4, CL, mi, ti	2	Mw, LP
12	4,405	*Size*, RotB, HBA, ch, 3A4, ti	3,258	*Size*, RotB, HBA, ch	0	-	1,147	3A4, ti	1	NO

Tablica 6. Odabrani parametri za HDAC inhibitore s hidroksamskom skupinom na kraju nezasićenog alkilnog lanca (**13** ï **19**)

Br. spoja	**ADMET rizik**	**ADMET kod**	**Apsolutni rizik**	**Apsolutni kod**	**TOX rizik**	**TOX kod**	**CYP rizik**	**CYP kod**	**Odstupanja od LP5**	**LP5 kod**
13	3,181	Peff, HEPX, 2C9, ti	0,521	Peff	1	HEPX	1,661	2C9, ti	0	-
14	0,67	Peff	0,67	Peff	0	-	0	-	0	-
15	3,721	Peff, Xr, MUT, 2D6	0,721	Peff	2	Xr, MUT	1	2D6	0	-
16	4,169	Peff, hERG, Xr, MUT, 2D6, ti	0,866	Peff	2,318	hERG, Xr, MUT	0,985	2D6, ti	0	-
17	0,331	Peff	0,331	Peff	0	-	0	-	0	-
18	3	HEPX, MUT, ti	0	-	2	HEPX, MUT	1	ti	0	-
19	1,493	MUT, ti	0	-	1	MUT	0,493	ti	0	-

Tablica 7. Odabrani parametri za HDAC inhibitore s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri (**20** ï **31**)

Br. spoja	**ADMET rizik**	**ADMET kod**	**Apsolutni rizik**	**Apsolutni kod**	**TOX rizik**	**TOX kod**	**CYP rizik**	**CYP kod**	**Odstupanja od LP5**	**LP5 kod**
20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
21	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
22	0,622	2C19, 3A4	0	-	0	-	0,622	2C19, 3A4	0	-
23	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
24	1,33	2D6, ti	0	-	0	-	1,33	2D6, ti	0	-
25	4,151	RotB, Peff, hERG, Xr, ti	1,151	RotB, Peff	2	hERG, Xr	1	ti	0	-
26	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
27	1	hERG	0	-	1	hERG	0	-	0	-
28	0,575	Xr	0	-	0,575	Xr	0	-	0	-
29	2,199	Peff, V_d, Xr, 2D6, ti	0,72	Peff	0,757	Xr	0,634	2D6, ti	0	-
30	2,552	Xr, MUT, ti	0	-	1,672	Xr, MUT	0,88	ti	0	-
31	4,886	*Size*, HBA, ch, Xr, Xm, ti	2,368	*Size*, HBA, ch	1,518	Xr, Xm	1	ti	2	Mw, NO

Legenda:

CL - ekstenzivni klirens

1A2 - ekstenzivan metabolizam putem CYP1A2

3A4 - ekstenzivan metabolizam putem CYP3A4

2C9 - ekstenzivan metabolizam putem CYP2C9

2D6 - ekstenzivan metabolizam putem CYP2D6

hERG - kardiotoksičnost (inhibicija hERG kalcijskih kanala)

HEPX - hepatotoksičnost

K_{ow} - lipofilnost (koeficijent razdjeljenja oktanol/voda)

mi - inhibicija metabolizma midazolama putem CYP3A4

MUT - mutagenost

Peff - niska permeabilnost ; fu - nizak udio nevezanog lijeka u plazmi

rat - akutna toksičnost u štakora ; X_r - karcinogenost u štakora ; X_m - karcinogenost u miševa

Size - veličina molekule

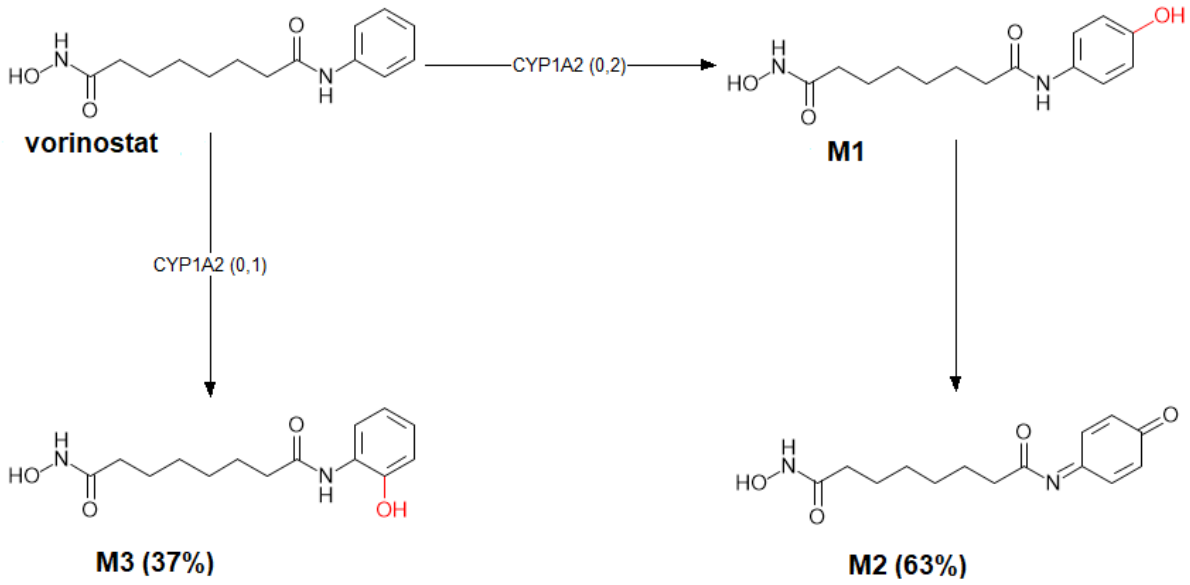
S_w - topljivost u vodi

ti - inhibicija metabolizma testosterona putem CYP3A4

V_d - volumen distribucije

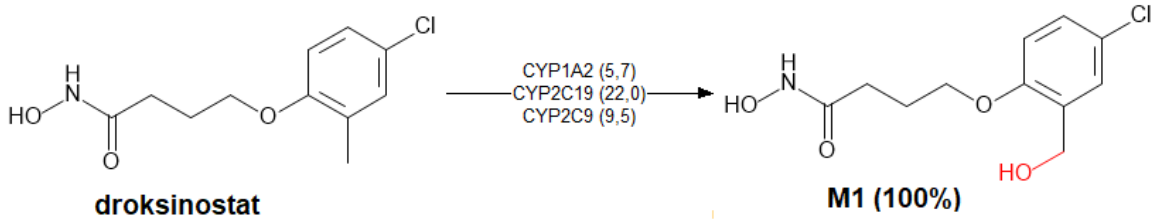
ch - prevelik parcijalni naboj ; HBA - akceptori vodikove veze ; HBD - donori vodikove veze

CYP metabolizam odabranih HDACi s hidroksamskom skupinom na zasićenom alifatskom lancu



Shema 2. PredviĽene reakcije biotransformacije vorinostata i njegovi metaboliti (M1 ï M3)

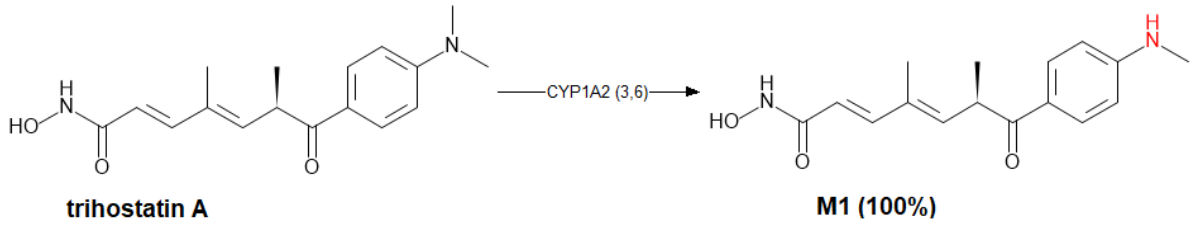
Vorinostat je supstrat CYP1A2 i podlijeģe hidroksilaciji aromatske jezgre u *para*-poloģaju (63%) (M1 metabolit) ili *orto*-poloģaju (37%) (M3-metabolit) . Iz produkta hidroksiliranog u para poloģaju moģe nastati toksiļ ni kinonimin (M2 metabolit). TakoĽer moģe nastati i od orto hidroksiliranog M3, no nije naveden u ovom prikazu. Toksiļ no djelovanje kinona ispoljava se u vidu alkiliranja makromolekula s dostupnim nukleofilnim skupinama (npr. sulfhidrili). (Monks i Jones, 2002.)



Shema 3. Predviđene reakcije biotransformacije droksinostata i njegov metabolit (M1)

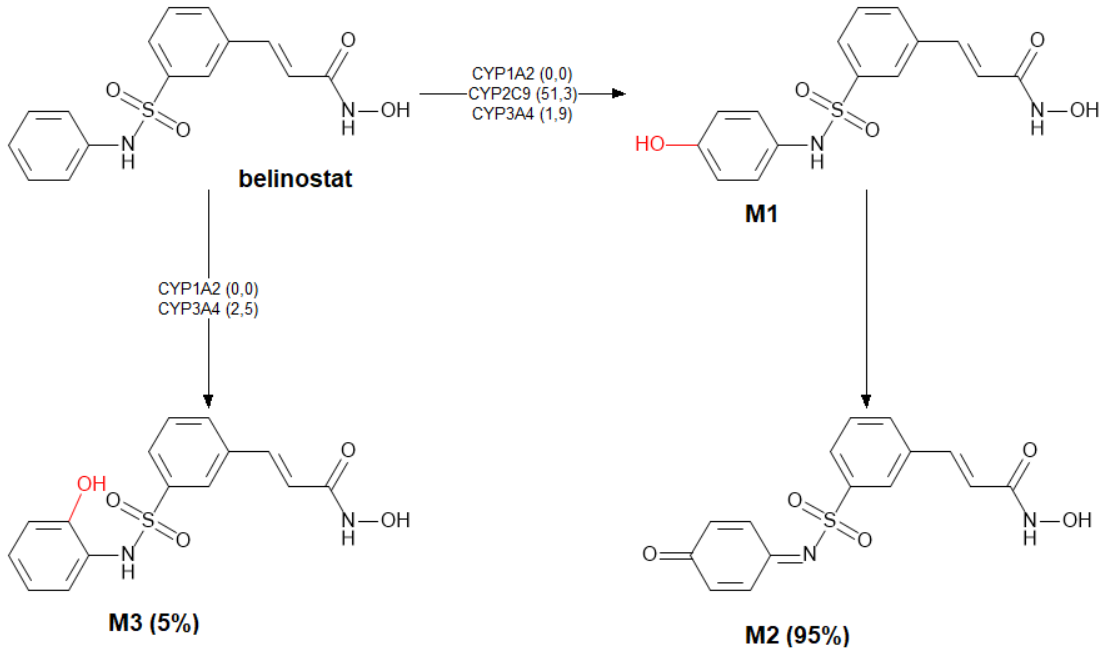
Droksinostat podliježe hidroksilaciji metilne skupine na benzenskom prstenu pomoću CYP1A2, CYP2C19 i CYP2C9.

CYP metabolizam odabranih HDACi s hidroksamskom skupinom na nezasićenom alifatskom lancu



Shema 4. Predviđene reakcije biotransformacije trihostatina A i njegov metabolit (M1)

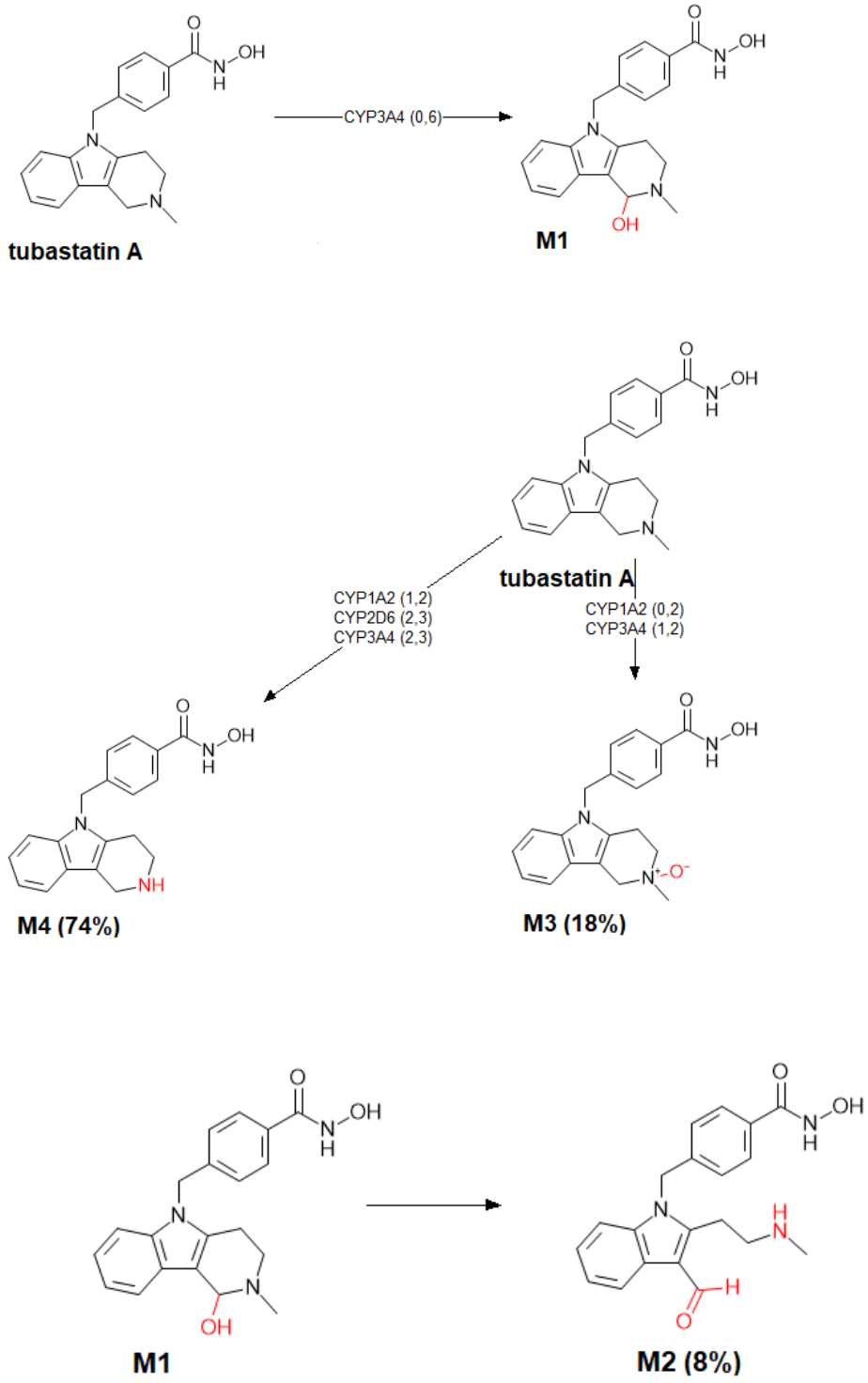
Trihostatin A podliježe *N*-demetilaciji pomoću CYP1A2, čime nastaje metabolit u obliku sekundarnog amina.



Shema 5. Predviđene reakcije biotransformacije belinostata i njegovi metaboliti (M1-M3)

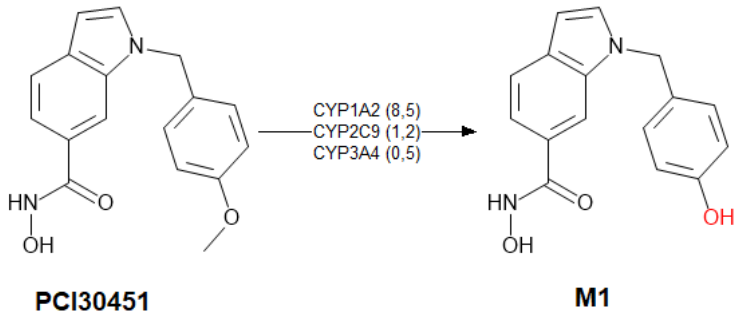
Belinostat (komentar kao kod vorinostata i panobinostata, ref. eksperimentalnih ispitivanja metabolizma) podliježe hidroksilaciji u *orto*-položaju (pomoću CYP1A2 i CYP3A4) i *para*-položaju (pomoću CYP1A2, CYP2C9 i CYP3A4). Vjerojatnost nastanka toksičnog kinonskog metabolita iz hidroksiliranog produkta jest 95%.

CYP metabolizam odabranih HDACi s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri



Shema 6. Predviđene reakcije biotransformacije tubastatina A i njegovi metaboliti (M1-M4)

Tubastatin A uglavnom podliježe oksidativnoj *N*-demetilaciji na piperazinskom prstenu pomoću CYP1A2, CYP2D6 i CYP3A4 (M4). U manjoj mjeri (18%) moguća je i *N*-oksidacija pomoću CYP1A2 i CYP3A4 (M3), hidroksilacija piperazinskog prstena pomoću CYP3A4 (M1) te daljnje otvaranje prstena i nastajanje aldehida i sekundarnog amina (M2). Vjerojatnost nastanka ovakvog minornog metabolita jest 8%.



PCI30451 **M1**

Shema 7. Predviđene reakcije biotransformacije PCI30451 i njegov metabolit (M1)

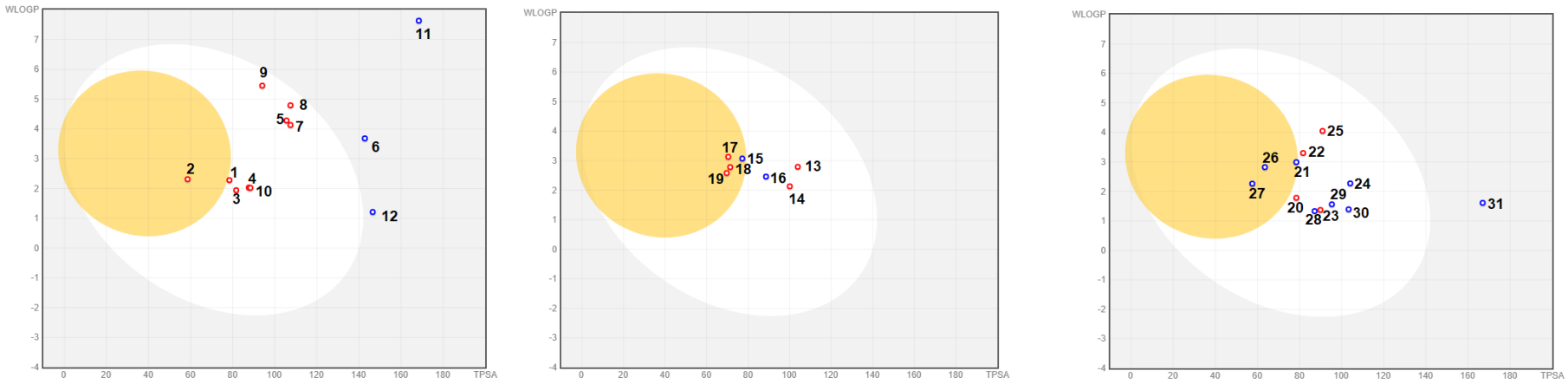
PCI30451 podliježe isključivo oksidativnoj *O*-demetilaciji pomoću CYP1A2, CYP2C9 i CYP3A4 pri čemu nastaje metabolit sa slobodnom OH-skupinom.

Interpretacija BOILED-Egg dijagrama dobivenih web alatom SwissADME

Prema BOILED-Egg dijagramu za HDAC inhibitore koji sadrže hidroksamsku skupinu na zasićenom alifatskom lancu, devet molekula (vorinostat, droksinostat, M344, LMK-235, skriptaid, rikolinostat, CUDC101, citarinostat, WT161) nisu supstrati P-glikoproteina dok tri (CAY10603, tubacin i purinska hidroksamska kiselina) jesu (Slika 24a), što za posljedicu ima moguću smanjenu bioraspoloživost. Droksinostat pokazuje veliku vjerojatnost prelaska krvno-moždane barijere (žuta regija), što implicira moguću korist u liječenju tumora središnjeg živčanog sustava, dok citarinostat, WT161, CUDC-101, rikolinostat, LMK-235, skriptaid i M344 pokazuju veliku vjerojatnost dobre gastrointestinalne apsorpcije (bijela regija). Vorinostat se nalazi na granici bijele i žute regije što označava veliku vjerojatnost za dobru gastrointestinalnu apsorpciju i prijelaz krvno-moždane barijere. CAY10603, tubacin i purinska hidroksamska kiselina ne nalaze se ni u jednoj od ove dvije regije te su također supstrati P-glikoproteina što ih ne čini dobrim izborom za moguću terapijsku tvar.

Prema BOILED-Egg modelu za HDAC inhibitore koji sadrže hidroksamsku skupinu na nezasićenom alifatskom lancu, pracinostat, MC1568, panobinostat i trihostatin A pokazuju veliku vjerojatnost za prelazak krvno-moždane barijere (Slika 24b), što implicira moguću korist u liječenju tumora središnjeg živčanog sustava. Belinostat, resminostat i dacinostat pokazuju veliku vjerojatnost za dobru gastrointestinalnu apsorpciju. Panobinostat i dacinostat su supstrati P-glikoproteina te je posljedično moguća njihova smanjena bioraspoloživost. Belinostat, resminostat, pracinostat, MC1568 i trihostatin A nisu supstrati P-glikoproteina.

Prema BOILED-Egg modelu za HDAC inhibitore s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri, AR42, PCI34051 i tubastatin A pokazuju veliku vjerojatnost za prelazak krvno-moždane barijere (Slika 24c). Givinostat, neksturastat A, BRD7394, ACY-738, HPOB, kvizinostat, CHR3996 i abeksinostat pokazuju veliku vjerojatnost dobre gastrointestinalne apsorpcije. Za CUDC907 nije predviđena dobra gastrointestinalna apsorpcija kao ni prelazak krvno-moždane barijere. Uz to, ovaj spoj je i supstrat P-glikoproteina što ga ne čini dobrim izborom za moguću terapijsku tvar. Supstrati P-glikoproteina također su i AR42, PCI43051, tubastatin A, ACY-738, kvizinostat, CHR3996 i abeksinostat, što za posljedicu ima moguću smanjenu bioraspoloživost. Givinostat, neksturastat A, BRD7394 i HPOB ne podliježu djelovanju P-glikoproteina.



a) b) c)

Slika 7. BOILED-Egg dijagram za HDAC inhibitore: a) koji sadrže hidroksamsku skupinu na zasićenom alifatskom lancu, b) koji sadrže hidroksamsku skupinu na nezasićenom alifatskom lancu i c) s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri.

Usporedba rezultata dobivenih komercijalnim softverom ADMET Predictor™ i slobodno dostupnim web alatom SwissADME

ADMET Predictor predviđa odstupanje od Lipinski pravila 5 za WT161, purinsku hidroksamsku kiselinu i tubacin A iz prve skupine HDACi, dok SwissADME isto predviđa samo za potonja dva.

SwissADME za HDAC inhibitore s hidroksamskom skupinom na nezasićenom lancu predviđa nisku permeabilnost (nizak logP) te nisu zabilježena odstupanja od Lipinski pravila 5. ADMET Predictor predviđa inhibiciju metabolizma testosterona putem CYP3A4 za belinostat i dacinostat, međutim SwissADME ne predviđa inhibiciju CYP3A4 ni za jedan spoj iz ove skupine.

Rezultati dobiveni softverom ADMET Predictor i SwissADME za HDAC inhibitore s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri slažu se u pogledu zadovoljavanja Lipinski pravila 5. Međutim, SwissADME predviđa poprilično nisku permeabilnost za spojeve iz ove skupine dok ADMET Predictor predviđa nisku permeabilnost samo za givinostat i kvizinostat.

Tablica 8. SwissADME parametri za inhibitore histon deacetilaze koji sadrže hidroksamsku skupinu na zasićenom alifatskom lancu

Br. spoja	**HBD**	**HBA**	**log P**	**CYP1A2 inh**	**CYP2C19 inh**	**CYP2C9 inh**	**CYP2D6 inh**	**CYP3A4 inh**	**Lipinski odst.**
1	3	3	1.92	ne	ne	ne	ne	ne	nema
2	2	3	2.36	da	ne	ne	ne	ne	nema
3	3	3	1.81	ne	ne	ne	ne	ne	nema
4	3	4	2.09	ne	ne	ne	ne	ne	nema
5	3	6	3.74	ne	da	da	da	da	nema
6	4	7	2.83	ne	ne	ne	ne	da	nema
7	3	5	3.16	ne	da	da	da	da	nema
8	3	5	3.71	ne	da	da	da	da	nema
9	3	4	4.45	ne	da	da	da	ne	nema
10	2	4	2.29	ne	ne	ne	ne	ne	nema
11	4	8	6.05	da	da	ne	ne	da	Mw>500
12	4	7	1.17	ne	ne	ne	ne	da	N/O>10

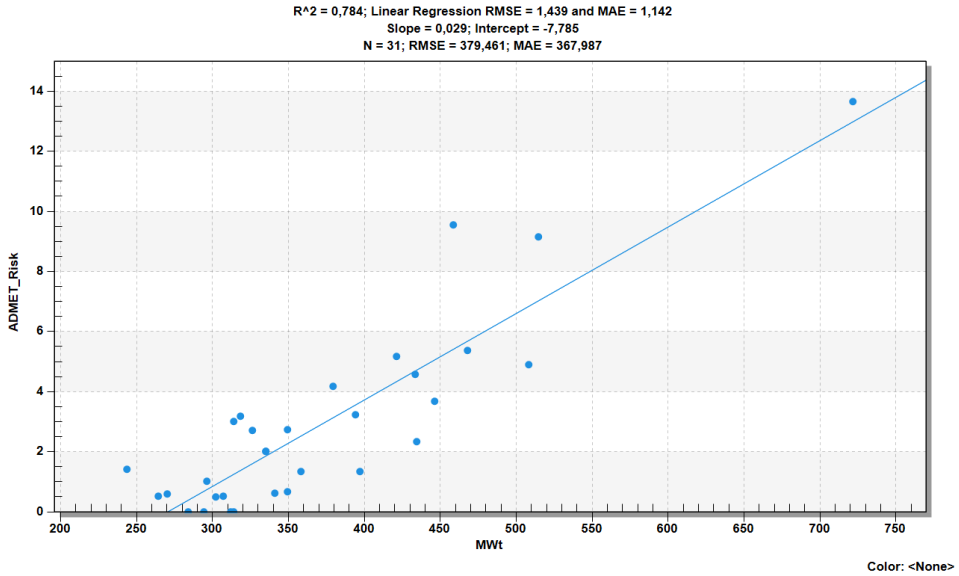
Tablica 9. SwissADME parametri za inhibitore histon deacetilaze koji sadrže hidroksamsku skupinu na nezasićenom alifatskom lancu

Br. spoja	**HBD**	**HBA**	**log P**	**CYP1A2 inh**	**CYP2C19 inh**	**CYP2C9 inh**	**CYP2D6 inh**	**CYP3A4 inh**	**Lipinski odst.**
13	3	4	1.47	ne	ne	ne	ne	ne	nema
14	2	5	1.28	ne	ne	ne	ne	ne	nema
15	4	3	2.98	da	ne	ne	da	ne	nema
16	4	4	2.52	ne	ne	ne	da	ne	nema
17	2	4	2.94	ne	ne	ne	ne	ne	nema
18	2	4	2.16	ne	ne	ne	ne	ne	nema
19	2	3	2.25	ne	ne	ne	ne	ne	nema

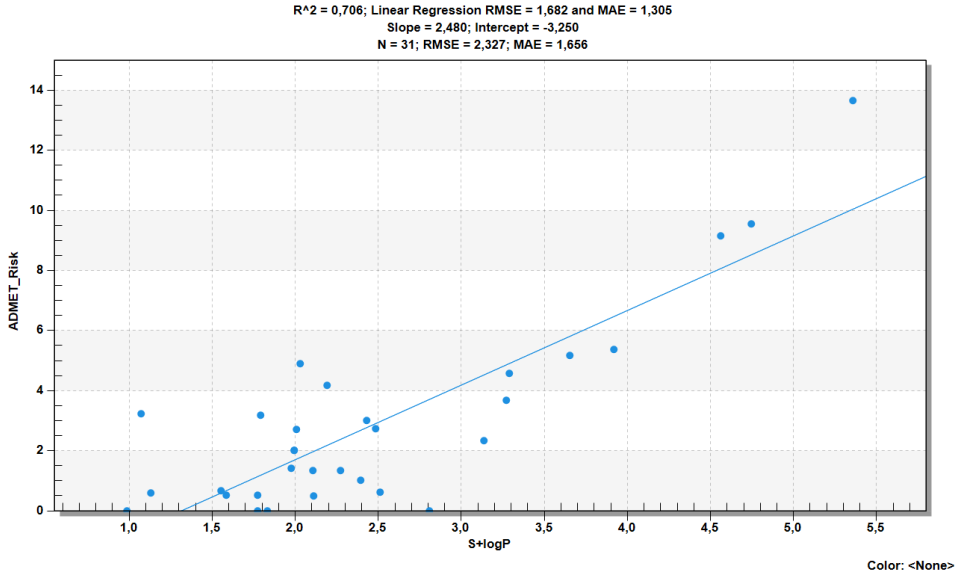
Tablica 10. Odabrani SwissADME parametri za inhibitore histon deacetilaze s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri

Br. spoja	**HBD**	**HBA**	**log P**	**CYP1A2 inh**	**CYP2C19 inh**	**CYP2C9 inh**	**CYP2D6 inh**	**CYP3A4 inh**	**Lipinski odst.**
20	3	3	1.98	ne	ne	ne	ne	ne	nema
21	3	3	2.68	ne	ne	ne	ne	ne	nema
22	3	3	2.61	ne	ne	da	ne	ne	nema
23	3	4	1.41	ne	ne	ne	ne	ne	nema
24	3	6	2.18	ne	ne	da	da	da	nema
25	3	5	3.46	ne	da	da	da	ne	nema
26	2	3	2.25	da	ne	ne	da	ne	nema
27	2	3	2.25	da	ne	ne	da	ne	nema
28	3	4	1.37	da	ne	ne	ne	ne	nema
29	3	5	1.64	ne	ne	ne	da	ne	nema
30	3	7	1.51	ne	ne	ne	da	da	nema
31	2	9	1.60	ne	ne	da	ne	da	Mw>500, N/O>10

4.1. QSAR istraživanja odnosa između molekulskih deskriptora i ADMET svojstava ispitivanih molekula

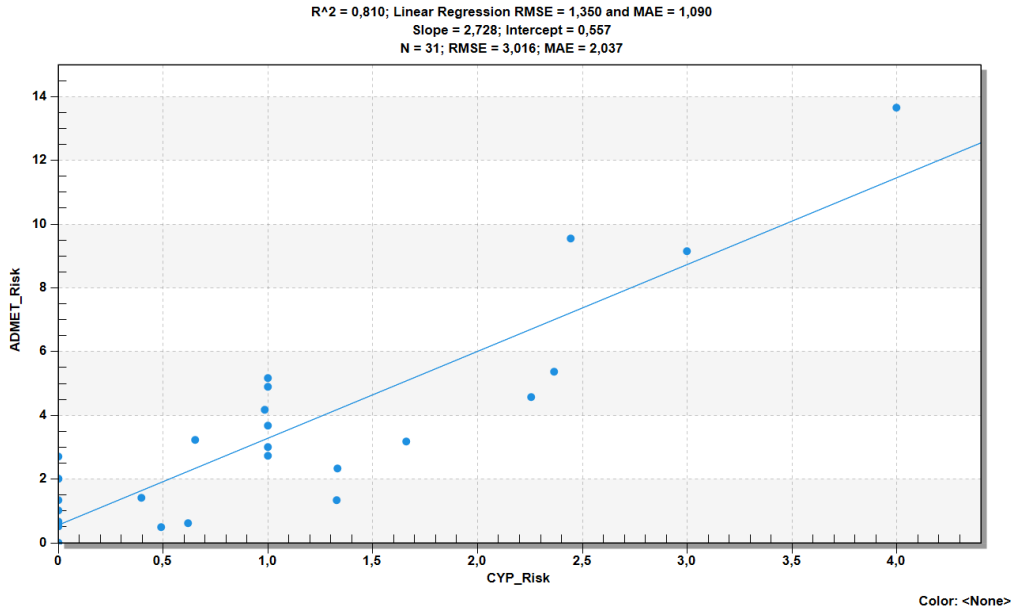


Slika 8. Korelacija ADMET rizika i molekulskih masa ispitivanih HDACi. Koeficijent determinacije[30] (R^2) iznosi 0,784. Srednja apsolutna pogreška[31] iznosi 1,142 dok srednja kvadratna pogreška[32] iznosi 1,439. Jednadžba pravca glasi y=0,029x-7,785.

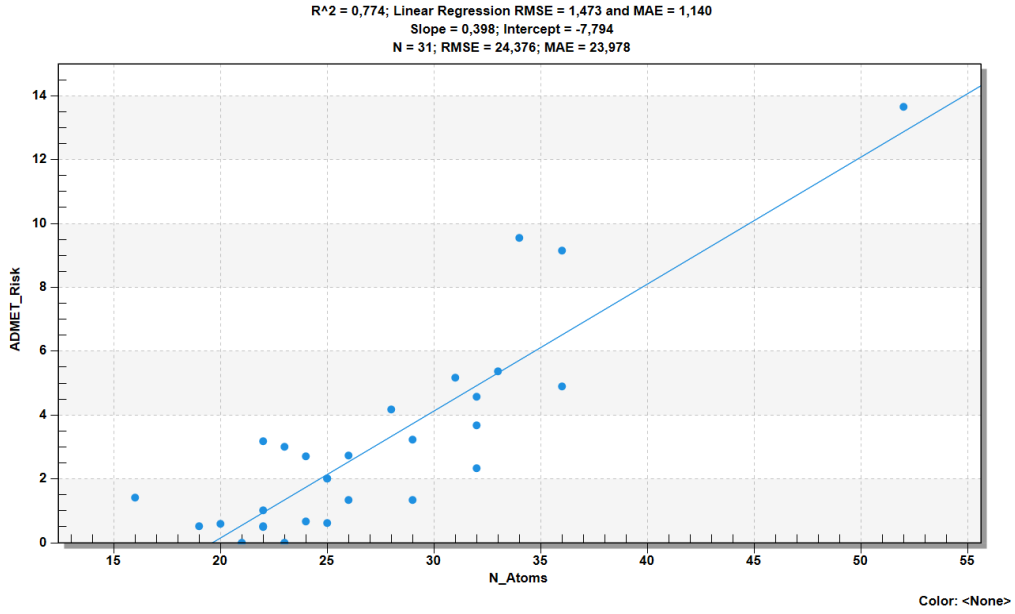


Slika 9. Korelacija ADMET rizika i lipofilnosti ispitivanih HDACi. Koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,706. Srednja apsolutna pogreška iznosi 1,305 dok srednja kvadratna pogreška iznosi 1,682. Jednadžba pravca glasi y=2,480x-3,250.

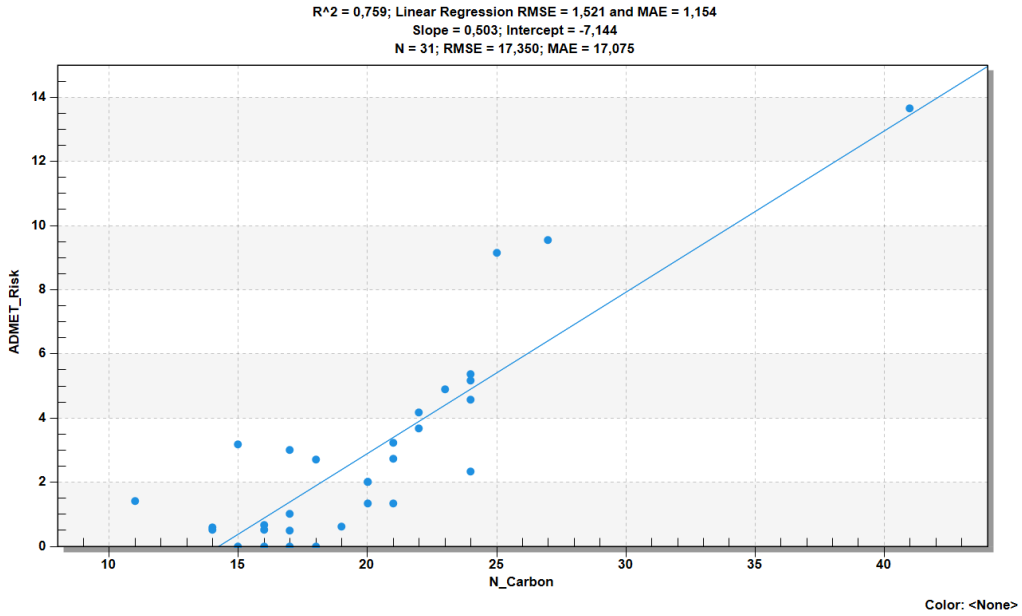
[30] Statistička mjera koja predstavlja udio varijance za zavisnu varijablu koja se objašnjava nezavisnom varijablom ili varijablama u regresijskom modelu.
[31] Mjera razlike između dvije kontinuirane varijable.
[32] Mjera razlike između predviđenih vrijednosti i promatranih vrijednosti.



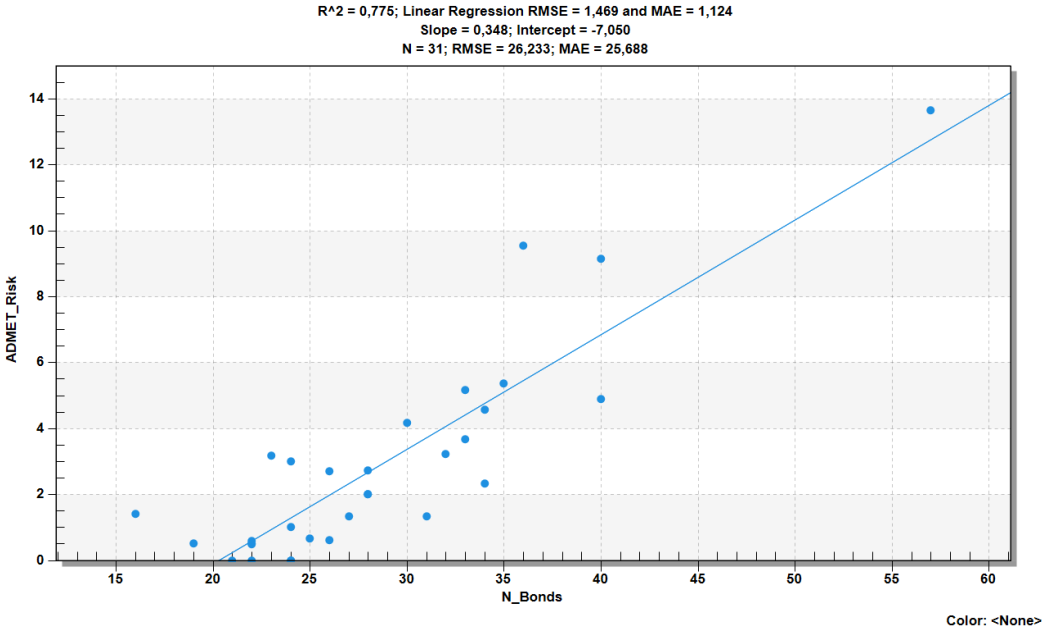
Slika 10. Korelacija ADMET rizika i CYP rizika za ispitivane HDACi. Koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,810. Srednja apsolutna pogreška iznosi 1,090 dok srednja kvadratna pogreška iznosi 1,350. Jednadžba pravca glasi y=2,728x+0,557.



Slika 11. Korelacija ADMET rizika i broja atoma u molekulama ispitivanih HDACi. Koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,774. Srednja apsolutna pogreška iznosi 1,140 dok srednja kvadratna pogreška iznosi 1,473. Jednadžba pravca glasi y=0,398x-7,794.



Slika 12. Korelacija ADMET rizika i broja atoma ugljika u molekulama ispitivanih HDACi. Koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,759. Srednja apsolutna pogreška iznosi 1,154 dok srednja kvadratna pogreška iznosi 1,521. Jednadžba pravca glasi y=0,503x-7,144.



Slika 13. Korelacija ADMET rizika i broja veza u molekulama ispitivanih HDACi. Koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,775. Srednja apsolutna pogreška iznosi 1,124 dok srednja kvadratna pogreška iznosi 1,469. Jednadžba pravca glasi y=0,348x-7,050.

5. ZAKLJUČAK

Zbog svoje niske specifičnosti HDAC inhibitori se naveliko istražuju u svrhu otkrivanja specifičnijih molekula, koje bi s obzirom na pojedine mete koje ciljaju mogle naći primjenu u terapiji niza bolesti kao što su parazitske, upalne i neurodegenerativne bolesti, a što nadilazi okvir ovog rada.

U okviru ovog diplomskog rada ispitana su farmakokinetička svojstva odabranih inhibitora histon deacetilaze (n = 31) s hidroksamskom skupinom i koji se nalaze u različitim predkliničkim i kliničkim ispitivanjma u cilju njihove primjene u antitumorskoj terapiji.

Pomoću računalog programa ADMET Predictor™ predviđeni su različiti molekulski deskriptori i ADMET parametri koji su korišteni u QSAR analizama s ciljem evaluacije povezanosti strukturnih značajki s potencijalnim toksičnim učincima i sigurnosnim profilom ispitivanih HDAC inhibitora.

Istraživane molekule mogu se svrstati u tri podskupine strukturnih analoga s hidroksamskom skupinom: a) na kraju zasićenog alifatskog lanca (**1 - 12**), b) na kraju nezasićenog lanca (**12 - 19**) i c) na aromatskoj jezgri (**20 - 21**).

Interpretacijom BOILED-Egg dijagrama za sve tri podskupine HDAC inhibitora ustvrđeno je da većina spojeva pokazuje veliku vjerojatnost dobre gastrointestinalne apsorpcije, što ukazuje na mogućnost primjene *per os*. Pojedini spojevi također pokazuju vjerojatnost prelaska krvno-moždane barijere što implicira potencijalnu korist u terapiji tumora središnjeg živčanog sustava.

Pojedinim HDAC inhibitorima s hidroksamskom skupinom na kraju zasićenog alifatskog lanca predviđena je hepatotoksičnost (spojevi 7, 8, 9 i 10), kardiotoksičnost (spojevi 8, 9 i 11) i mutagenost (spojevi 5, 9 i 10), kao i inhibicija za metabolizam lijekova važnog CYP3A4 (spojevi 5, 7, 8, 9, 11 i 12). Ističe se LMK-235 (spoj 4) s ADMET rizikom i apsolutnim rizikom jednakim nuli.

HDAC inhibitorima s hidroksamskom skupinom na nezasićenom alifatskom lancu predviđena je slaba permeabilnost (spojevi 13, 14, 15, 16 i 17) što im posljedično otežava apsorpciju te je za pojedine spojeve predviđena hepatotoksičnost (spojevi 13 i 18), kardiotoksičnost (spoj 16) i mutagenost (spojevi 15, 16, 17 i 19).

U skupini HDAC inhibitora s hidroksamskom skupinom na aromatskoj jezgri istiļu se spojevi 20, 21, 23 i 26 kao spojevi s ADMET rizikom i apsolutnim rizikom jednakim nuli ģto ukazuje na njihov terapijski potencijal. Dvama spojevima iz ove skupine (spojevi 25 i 27) predviĽena je kardiotoksiļnost. CHR3996 (spoj 30) je potencijalno mutagen.

Mnogi od ispitanih HDAC inhibitora inhibiraju CYP enzime vaģne za metabolizam lijekova ģto sugerira potreban poveĺani oprez prilikom istovremenog lijeļenja s drugim lijekovima koji se metaboliziraju pomoĺu istih enzima.

Promatranjem CYP metaboliļkih reakcija ustvrĽeno je da neki HDAC inhibitori metabolizmom putem CYP enzima mogu stvarati toksiļne kinonske metabolite. To vrijedi za vorinostat iz podskupine HDAC inhibitora s hidroksamskom skupinom na zasiĺenom alifatskom lancu, te za belinostat iz podskupine HDAC inhibitora s hidroksamskom skupinom na nezasiĺenom alifatskom lancu.

QSAR istraģivanjima ispitivanih molekula HDACi pronaĽena je linearna korelacija ADMET rizika s molekulskim masama ispitivanih HDACi, ģto znaļi da s poveĺanjem molekulske mase HDACi postoji poveĺan rizik od apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije. Linearna korelacija takoĽer postoji i izmeĽu ADMET rizika i lipofilnosti ispitivanih molekula HDACi. S poveĺanjem lipofilnosti oļekuje se bolja apsorpcija.

Rezultate vezane uz CYP metabolizam HDACi dobivene putem softvera ADMET Predictor^{TM} i web alata SwissADME potvrĽuje QSAR korelacija ADMET rizika s CYP rizikom. Korelacijom ADMET rizika s CYP rizikom dobiven je linearan odnos, ģto znaļi da postoji pozitivna korelacija izmeĽu sveukupnog ADMET rizika i podlijeganja HDAC inhibitora CYP metabolizmu.

Korelacija je pronaĽena i izmeĽu ADMET rizika i broja atoma u molekulama ispitivanih HDACi, te izmeĽu ADMET rizika i broja veza u molekulama ispitivanih HDACi.

Linearna korelacija takoĽer postoji izmeĽu ADMET rizika i broja ugljikovih atoma u molekulama ispitivanih HDACi, ģto se slaģe s dosad objavljenim istraģivanjima prema kojima se uļinkovitost HDACi smanjuje sa skraĺenjem duljine alifatskog lanca.

6. LITERATURA

Adcock IM, Barnes PJ, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *European Respiratory Journal*, 2005, 25:552-563. doi: 10.1183/09031936.05.00117504

ADMET Property Prediction | QSPR | Physicochemical | ADME, 2019, http://www.simulations-plus.com/software/admetpredictor/, pristupljeno 15.5.2019.

Al-Shawi MK, Omote H. The Remarkable Transport Mechanism of P-glycoprotein: A Multi-drug Transporter. *J Bioenerg Biomembr*, 2005, 489-496. doi: 10.1007/s10863-005-9497-5

Baillie TA, Rettie AE. Role of Biotransformation in Drug-Induced Toxicity: Influence of Intra and Inter-Species Differences in Drug Metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(1)15-29.

Bantscheff M, Hopf C, Savitski MM, Dittmann A, Grandi P, Michon AM, Schlegl J, Abraham Y, Becher I, Bergamini G, Boesche M, Delling M, Dümpelfeld B, Eberhard D, Huthmacher C, Mathieson T, Poeckel D, Reader V, Strunk K, Sweetman G, Kruse U, Neubauer G, Ramsden NG, Drewes G. Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(3):255-65. doi: 10.1038/nbt.1759

Bioavailability and bioequivalence, 2015., https://www.eupati.eu/pharmaceutical-development/bioavailability-and-bioequivalence/, pristupljeno 15.5.2019.

Bjornsson HT, Benjamin JS, Zhang L, Weissman J, Gerber EE, Chen YC, Vaurio RG, Potter MC, Hansen KD, Dietz HC. Histone deacetylase inhibition rescues structural and functional brain deficits in a mouse model of Kabuki syndrome. *Sci Transl Med*, 2014, 6(256):256ra135. doi: 10.1126/scitranslmed.3009278

Cooper GM. The Development and Causes of Cancer. U: The Cell: A Molecular Approach. Sinauer Associates, 2000.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7:42717. doi: 10.1038/srep42717

Deeb O, Goodarzi M. In silico quantitative structure toxicity relationship of chemical compounds: some case studies. *Curr Drug Saf*, 2012, 7(4):289-97.

Definition of Prodrug, 2017., https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=23992 , pristupljeno 15.5.2019.

Dhanyamraju PK, Holz PS, Finkernagel F, Fendrich V, Lauth M. Histone deacetylase 6 represents a novel drug target in the oncogenic Hedgehog signaling pathway. *Mol Cancer Ther*, 2015, 4(3):727-39. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0481

Doogue MP, Polasek TM. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther Adv Drug Saf*, 2013, 4(1), 5-7. DOI: 10.1177/2042098612469335

Dy GK, Adjei AA. Understanding, Recognizing, and Managing Toxicities of Targeted Anticancer Therapies. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63:249-279.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7), 1414. DOI: 10.3390/ijms18071414

Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Emerging role of histone deacetylase inhibitors as anti-breast-cancer agents. *Drug Discov Today*, 2019, 24(3):685-702. doi:10.1016/j.drudis.2019.02.003

Espinosa E, Zamora P, Feliu J, Gonzalez Baron M. Classification of anticancer drugs - a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev,* 2003, 29:515-523. doi:10.1016/S0305-7372(03)00116-6

Garcia-Sosa AT, Maran U, Hetenyi C. Molecular Property Filters Describing Pharmacokinetics and Drug Binding. *Curr Med Chem*, 2012, 19:1646-1662.

Global Oncology Trends 2018 - IQVIA, 2018, https://www.iqvia.com/en/institute/reports/global-oncology-trends-2018, pristupljeno 15.5.2019.

Glossary of Common Site Terms - ClinicalTrials.gov, 2019, https://clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/glossary , pristupljeno 15.5.2019.

Hideshima T, Qi J, Paranal RM, Tang W, Greenberg E, West N, Colling ME, Estiu G, Mazitschek R, Perry JA, Ohguchi H, Cottini F, Mimura N, Görgün G, Tai YT, Richardson PG, Carrasco RD, Wiest O, Schreiber SL, Anderson KC, Bradner JE. Discovery of selective small-molecule HDAC6 inhibitor for overcoming proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(46):13162-13167. doi: 10.1073/pnas.1608067113

Huang P, Almeciga-Pinto I, Jarpe M, Van Duzer JH, Mazitschek R, Yang M, Jones SS, Quayle SN. Selective HDAC inhibition by ACY-241 enhances the activity of paclitaxel in solid tumor models. *Oncotarget*, 2017, 8(2):2694-2707. doi: 10.18632/oncotarget.13738

Isarankura-Na-Ayudhya C, Naenna T, Nantasenamat C, Prachayasittikul V. A practical overview of structure-activity relationship. *EXCLI Journal*, 2009, 8:74-88.

Jacobsen JA, Major Jourden JL, Miller MT, Cohen SM. To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2010, 1803(1), 72-94. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.08.006

Kerns EH, Di L. Toxicity Methods. U: Drug-Like Properties: Concept, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization. 2016, str. 433-445.

Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res.*, 2011, 3(2):166-179.

Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Disc*, 2007, 6(11):881-890. doi: 10.1038/nrd2445

Li ZY, Li QZ, Chen L, Chen BD, Zhang C, Wang X, Li WP. HPOB, an HDAC6 inhibitor, attenuates corticosterone-induced injury in rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells by inhibiting mitochondrial GR translocation and the intrinsic apoptosis pathway. *Neurochem Int*, 2016, 99:239-251. doi: 10.1016/j.neuint.2016.08.004

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv Drug Delivery Rev*. 1997, 23:3-25

Liu J, Edagawa M, Goshima H, Inoue M, Yagita H, Liu Z, Kitajima S. Role of ATF3 in synergistic cancer cell killing by a combination of HDAC inhibitors and agonistic anti-DR5

antibody through ER stress in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(2):320-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.184

Lucas J, Hsieh TC, Halicka HD, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Upregulation of PD-L1 expression by resveratrol and piceatannol in breast and colorectal cancer cells occurs via HDAC3/p300-mediated NF-əB signaling. *Int J Oncol,* 2018, 53(4):1469-1480. doi: 10.3892/ijo.2018.4512

Lynch T, Price A. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interaction, and Adverse Effects. *Am Fam Physician.* 2007, 1;76(3):391-396.

Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics*, 2005, 2(5):719-29. doi:10.1586/14789450.2.5.719

Monks TJ, Jones DC. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr Drug Metab*, 2002, 3(4):425-38.

Moriguchi I, Hirono S, Liu Q, Nakagome I, Matsushita Y. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(1):127-130. doi: doi/10.1021/ci700257y

Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Hasselgren, C. In Silico toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 96:1-17. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.04.014.

Newkirk TL, Bowers AA, Williams RM. Discovery, biological activity, synthesis and potential therapeutic utility of naturally occuring histone deacetylase inhibitors. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(10), 1293. doi: 10.1039/b817886k

Olson DE, Wagner FF, Kaya T, Gale JP, Aidoud N, Davoine EL, Lazzaro F, Weïwer M, Zhang YL, Holson EB. Discovery of the first histone deacetylase 6/8 dual inhibitors. *J Med Chem*, 2013, 56(11):4816-20. doi: 10.1021/jm400390r

Palleria C, Di Paolo A, Giofrè C, Caglioti C, Leuzzi G, Siniscalchi A. De Sarro G, Gallelli L. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *J Res Med Sci*, 2013, 18(7): 601ï 610.

Petit J, Meurice N, Kaiser C, Maggiora G. Softening the Rule of Five - where to draw the line? *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(18):5343-51. doi: 10.1016/j.bmc.2011.11.064

Petrilli AM, Fuse MA, Donnan MS, Bott M, Sparrow NA, Tondera D, Huffziger J, Frenzel C, Malany CS, Echeverri CJ, Smith L, Fernández-Valle C. A chemical biology approach identified PI3K as a potential therapeutic target for neurofibromatosis type 2. *Am J Transl Res*, 2014, 6(5): 471ï 493.

Prasanna S, Doerksen RJ. Topological polar surface area: a useful descriptor in 2D-QSAR. *Curr Med Chem*, 2009, 16(1), 21-41.

Rajak H, Singh A, Raghuwanshi K, Kumar R, Dewangan PK, Veerasamy R, Sharma PC, Dixit A, Mishra P. A structural insight into hydroxamic acid based histone deacetylase inhibitors for the presence of anticancer activity. *Curr Med Chem*, 2014, 21(23), 2642-64.

Regna NL, Vieson MD, Luo XM, Chafin CB, Puthiyaveetil AG, Hammond SE, Caudell DL, Jarpe MB, Reilly CM. Specific HDAC6 inhibition by ACY-738 reduces SLE pathogenesis in NZB/W mice. *Clin Immunol*, 2016, 162:58-73. doi: 10.1016/j.clim.2015.11.007

Shan L, Xing S, Yang HC, Zhang H, Margolick JB, Siliciano RF. Unique characteristics of histone deacetylase inhibitors in reactivation of latent HIV-1 in Bcl-2-transduced primary resting CD4+ T cells. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(1):28-33. doi: 10.1093/jac/dkt338

Schneider A, Chatterjee S, Bousiges O, Selvi BR, Swaminathan A, Cassel R, Blanc F, Kundu TK, Boutillier AL. Acetyltransferases (HATs) as Targets for Neurological Therapeutics. *Neurotherapeutics*, 2013, 10(4), 568ï 588. doi:10.1007/s13311-013-0204-7

Schölz C, Weinert BT, Wagner SA, Beli P, Miyake Y, Qi J, Jensen LJ, Streicher W, McCarthy AR, Westwood NJ, Lain S, Cox J, Matthias P, Mann M, Bradner JE, Choudhary C. Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(4):415-423.

Smith EM, Zhang L, Walker BA, Davenport EL, Aronson LI, Krige D, Hooftman L, Drummond AH, Morgan GJ, Davies FE. The combination of HDAC and aminopeptidase inhibitors is highly synergistic in myeloma and leads to disruption of the NFəB signalling pathway. *Oncotarget*, 2015, 6(19):17314-27

Tang J, Cho NW, Cui G, Manion EM, Shanbhag NM, Botuyan MV, Mer G, Greenberg RA. *Nat Struct Mol Biol,* 2013, 20(3):317-25. doi:10.1038/nsmb.2499

Tracy TS, Chaudhry AS, Prasad B, Thummel KE, Schuetz EG, Zhong XB, Tien YC, Jeong H, Pan X, Shireman LM, Tay-Sontheimer J, Lin YS. Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44(3):343-51. doi: 10.1124/dmd.115.067900

Ueki N, Lee S, Sampson NS, Hayman MJ. Selective cancer targeting with prodrugs activated by histone deacetylases and a tumour-associated protease. *Nat Commun*, 2013, 4:2735. doi: 10.1038/ncomms3735

Valdez BC, Li Y, Murray D, Brammer JE, Liu Y, Hosing C, Nieto Y, Champlin RE, Andersson BS. Differential effects of histone deacetylase inhibitors on cellular drug transporters and their implications for using epigenetic modifiers in combination chemotherapy. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 63829ï 63838. doi: 10.18632/oncotarget.11561

Waller DG, Sampson AP. Drug Toxicity and Overdose. U: Medical Pharmacology and Therapeutics, 2018., 659-673. doi: 10.1016/b978-0-7020-7167-6.00053-1

Wang B, Rao YH, Inoue M, Hao R, Lai CH, Chen D, McDonald SL, Choi MC, Wang Q, Shinohara ML, Yao TP. Microtubule acetylation amplifies p38 kinase signalling and anti-inflammatory IL-10 production. *Nat Commun*, 2014, 5:3479. doi: 10.1038/ncomms4479

Wang J, Sun F, Han L, Hou X, Pan X, Liu R, Tang W, Fang H. Design, synthesis, and preliminary bioactivity studies of substituted purine hydroxamic acid derivatives as novel

histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *Med Chem Commun,* 2014, 5(12):1887-1891. DOI: 10.1039/c4md00203b

Wang Z, Hu P, Tang F, Xie C. HDAC6-mediated EGFR stabilization and activation restrict cell response to sorafenib in non-small cell lung cancer cells. *Med Oncol*, 2016, 33(5):50. doi: 10.1007/s12032-016-0765-5

Wei DG, Chiang V, Fyne E, Balakrishnan M, Barnes T, Graupe M, Hesselgesser J, Irrinki A, Murry JP, Stepan G, Stray KM, Tsai A, Yu H, Spindler J, Kearney M, Spina CA, McMahon D, Lalezari J, Sloan D, Mellors J, Geleziunas R, Cihlar T. Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing. *PLoS Pathog*, 2014, 10(4):e1004071. doi: 10.1371/journal.ppat.1004071

What are Cytochrome P450 Enzymes?, 2019., https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Cytochrome-P450-Enzymes.aspx, pristupljeno 20.6.2019.

What is QSAR?, 2019., http://www.saxocon.eu/medico/what-is-qsar/, pristupljeno 20.5.2019.

Wichapong K, Rohe A, Platzer C, Slynko I, Erdmann F, Schmidt M, Sippl W. Application of docking and QM/MM-GBSA rescoring to screen for novel Myt1 kinase inhibitors. *J Chem Inf Model*, 2014, 54(3):881-93. doi: 10.1021/ci4007326

Wildman SA, Crippen GM. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J Chem Inf Comput Sci*, 1999, 868-873.

Yoon S, Eom GH. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Chonnam Med J*, 2016, 52(1):1-11. doi: 10.4068/cmj.2016.52.1.1

Yun T, Yu K, Yang S, Cui Y, Wang Z, Ren H, Chen S, Li L, Liu X, Fang M, Jiang X. Acetylation of p53 Protein at Lysine 120 Up-regulates Apaf-1 Protein and Sensitizes the Mitochondrial Apoptotic Pathway. *J Biol Chem*, 2016, 291(14):7386-95.

7. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada istražena su fizikalno-kemijska i toksikološka svojstva odabranih antitumorskih HDAC inhibitora (n = 31) koji sadrže hidroksamsku skupinu, te su provedene QSAR korelacijske studije korištenjem molekulskih deskriptora i ADMET svojstava u svrhu procjene potencijalne toksičnosti i sigurnosti terapijske primjene ovih molekula. Rezultati istraživanja pokazuju da se molekulski deskriptori i ADMET svojstva mogu uspješno primijeniti u predviđanju potencijalnih toksičnih učinaka ispitivanih HDAC inhibitora.

Within this diploma thesis, the physico-chemical and toxicological properties of selected anti-tumor HDAC inhibitors (n = 31) that contain a hydroxamic moiety were investigated and QSAR correlation studies were performed using molecular descriptors and ADMET properties to evaluate the potential toxicity and safety of the therapeutic application of these molecules. The results of these studies revealed that the use of molecular descriptors and ADMET parameters can be successfully applied in predicting the potential toxic effect of investigated HDACIs.

8. Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ STRUKTURNIH ZNAČAJKI ANTITUMORSKIH INHIBITORA HISTON DEACETILAZA (HDACI) NA NJIHOVU TOKSIČNOST - QSAR ISTRAŽIVANJA

Sandra Morić

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada istražen je odnos fizikalno-kemijskih svojstva i parametara toksičnosti odabranih antitumorskih inhibitora (n=31) histon deacetilaza (HDACi) koji sadrže hidroksamsku skupinu, te su provedene QSAR korelacijske studije korištenjem molekulskih deskriptora i ADMET svojstava u svrhu procjene potencijalne toksičnosti i sigurne terapijske primjene ovih inhibitora. Rezultati istraživanja su pokazali da se molekulski deskriptori i ADMET svojstva mogu uspješno primijeniti u predviđanju potencijalnih toksičnih učinaka ispitivanih HDAC inhibitora.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 62 stranica, 21 grafički prikaz, 10 tablica i 58 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: HDAC, HDACi, ADMET, sigurnosni profil, toksičnost, QSAR

Mentor: **Dr. sc. Milena Jadrijević-Mladar Takač**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Milena Jadrijević-Mladar Takač**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Irena Žuntar, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Monika Barbarić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

8. Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
A. Kovaļ iĺ a 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EFFECT OF STRUCTURAL FEATURES OF ANTITUMOR HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS (HDACI) ON THEIR TOXICITY - QSAR STUDIES

Sandra Morić

SUMMARY

In the frame of this diploma work, the relationship between physico-chemical properties and toxicity parameters of selected anti-tumor HDAC inhibitors (n = 31) that contain a hydroxamic acid moiety were investigated and the QSAR correlation studies were performed using molecular descriptors and ADMET properties to evaluate the potential toxicity and safety profile of the therapeutic application of these inhibitors. The results of these studies revealed that the use of molecular descriptors and ADMET parameters can be successfully applied in prediction of the potential toxic effects of investigated HDACIs.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 62 pages, 21 figures, 10 tables and 58 references. Original is in Croatian language.

Keywords: HDAC, HDACi, ADMET Predictor^{TM}, safety profile, toxicity, QSAR

Mentor: **Milena Jadrijević-Mladar Takač**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Milena Jadrijević-Mladar Takač**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Irena Žuntar, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Monika Barbarić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.