

Ispitivanje inhibitornog učinka derivata sintetskog peptidnog inhibitora na humanu kolagenazu fibroblasta metodom molekuskog sidrenja

Sentinella-Jerbić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:455254>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ana Sentinella-Jerbić

**Ispitivanje inhibitornog učinka derivata
sintetskog peptidnog inhibitora na humanu
kolagenazu fibroblasta metodom molekuskog
sidrenja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Hrvoja Rimca i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Kristine Pavić.

Zahvaljujem se svojem mentoru, doc. dr. sc. Hrvoju Rimcu, na uloženom trudu i stručnim savjetima prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala i mojoj sumentorici doc. dr. sc. Kristini Pavić na izdvojenom vremenu i ohrabrenju kad mi je to bilo potrebno. Posebno hvala mojoj obitelji na beskrajnom strpljenju i mom Borni na podršci tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	3
1.1. Suplementacija kolagenom u službi usporavanja znakova starenja	3
1.2. Uloga kolagena u održavanju zdravlja zglobova	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME	8
3. MATERIJALI I METODE	9
4. REZULTATI I RASPRAVA	10
4.1. Svojstva vezanja sintetskog peptidnog inhibitora u aktivno mjesto proteina 2TCL. 10	
4.2. Stvaranje novih derivata modifikacijom molekule sintetskog peptidnog inhibitora. 14	
4.3. Rezultati prvog kruga molekuskog sidrenja.....	15
4.4. Svojstva liganda 241; ligand-protein interakcije.....	18
4.5. Drugi krug molekuskog sidrenja; modifikacija liganda 241	20
4.6. Rezultati drugog kruga molekuskog sidrenja.....	23
4.7. Ligand 157.....	26
4.8. Ligand 303.....	29
4.9. Farmakokinetička predviđanja i mogućnosti daljnje modifikacije	32
5. ZAKLJUČAK	38
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	39
7. LITERATURA.....	40
8. SAŽETAK.....	44
8. SUMMARY	46
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Kolageni predstavljaju najzastupljeniju skupinu proteina u sisavaca (oko 30% ukupne proteinske mase). U organizmu imaju važnu strukturnu ulogu te utječu na proliferaciju, migraciju i diferencijaciju stanica putem različitih vrsta receptora. (Ricard-Blum, 2011)

Strukturne promjene kolagenâ i njihova osjetljivost na razgradnju povezane su s boranjem kože, propadanjem kostiju i hrskavice te kardiovaskularnim i respiratornim poremećajima. Tijekom starenja kolageni se modificiraju, što utječe na stabilnost vlakana i dovodi do njihove posljedične razgradnje posredovane matriksnim metaloproteinazama. To su enzimi koji najviše doprinose remodeliranju tkiva i samoj razgradnji kolagena. (Panwar i sur., 2018)

Mehanizam inhibicije enzima matriksne metaloproteinaze (konkretno MMP-1), predložen u ovome radu po uzoru na istraživanje Borkakoti i sur. (1994), a koji uključuje vezanje inhibitora u aktivno vezno mjesto enzima, doveo bi do sprječavanja katalitičkog djelovanja enzima. To bi rezultiralo produljenim poluvremenom života kolagena u organizmu te bi se na taj način održala vitalnost prethodno spomenutih, a vrlo važnih funkcija organizma.

1.1. Suplementacija kolagenom u službi usporavanja znakova starenja

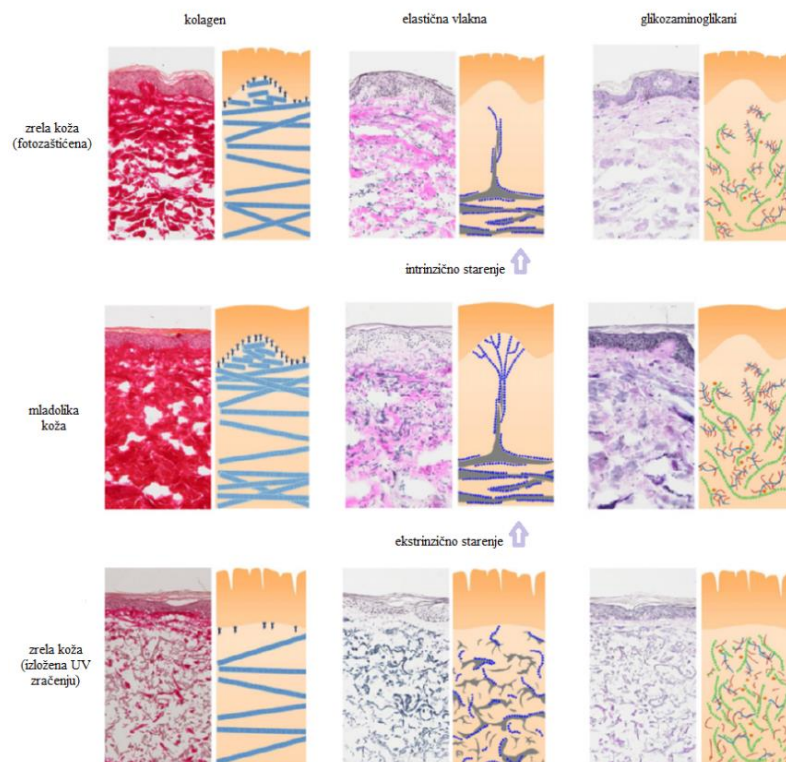
Koža je građena od dva osnovna sloja (epidermis i dermis), a ispod nje nalazi se potkožno masno tkivo (hipodermis). (Skendžić, 2016) Epidermis je vanjski sloj kože koji predstavlja barijeru između organizma i njegove okoline. Štiti organizam od štetnog utjecaja vanjskih čimbenika (poput ulaska patogena) i sprječava veća oštećenja DNA tako što proizvodi pigment melanin koji filtrira UV zračenje. Hipodermis pomaže pri zadržavanju topline tijela te predstavlja prostor za skladištenje energije. (www.hemed.hr)

U sastavu dermisa najbrojniji su fibroblasti koji provode biosintezu kolagena, elastina i drugih proteina izvanstaničnog matriksa te mukopolisaharida i enzima (primjerice kolagenaze). Mladolik izgled kože karakteriziran je organiziranim

kolagenskim vlaknima i funkcionalnim fibroblastima, dok je kod zrele kože smanjena biosinteza i povećana razgradnja kolagena te je njoj svojstveno propadanje fibroblasta.

Uslijed starenja, dermalni kolagen, elastin, glikozaminoglikani i proteoglikani prolaze kroz značajne procese remodeliranja (Slika 1). Smatra se da nakon 25. godine života biosinteza kolagena u organizmu značajno opada, a kronološkim starenjem dolazi do povećane razgradnje kolagena posredovane MMP-ovima te se sadržaj kolagena tako smanjuje za oko 2% godišnje. (Skendžić, 2016)

MMP-1 ili humana kolagenaza fibroblasta jedan je od glavnih sudionika razgradnje izvanstaničnog matriksa kože, čija je glavna komponenta kolagen. S godinama, vanjski čimbenici poput UV zračenja, pušenja ili izloženosti zagađenju iz okoliša, potiču ekspresiju enzima MMP-1 i stimuliraju njegovu aktivnost te tako posljedično dovode do brže degradacije kolagenskih vlakana i narušavanja integriteta kože što rezultira vidljivim znakovima starenja: boranje i obješenost kože te njezina smanjena elastičnost.



Slika 1. Remodeliranje izvanstaničnog matriksa u kronološki i fotoostarjeloj koži (prilagođeno iz Naylor i sur., (2011) uz dopuštenje izdavača).

U posljednje vrijeme bilježi se porast oralne, ali i topikalne suplementacije kolagenom. Kolagenski suplementi postali su važan alat pri usporavanju procesa starenja u području dermatologije i kozmetologije. (Al-Atif, 2022) Pretkliničke studije pokazale su stimulirajuće učinke oralno primijenjenih kolagenskih peptida na proizvodnju molekula izvanstaničnog matriksa u ljudskim fibroblastima. (Barati i sur., 2020) Tako potaknuti fibroblasti dovode do pojačanog stvaranja hijaluronske kiseline (pripada skupini glikozaminoglikana koji se nalaze u sastavu izvanstaničnog matriksa), koja povisuje sadržaj vlage u koži i hidrira ju. Fibroblasti također utječu i na pojačanu sintezu elastina, koji u kombinaciji s hijaluronskom kiselinom poboljšava izgled kože i čini ju elastičnijom i glađom. (Al-Atif, 2022)

1.2. Uloga kolagena u održavanju zdravlja zglobova

Superporodica kolagena sastoji se od 28 tipova kolagena koji se označavaju rimskim brojevima (I-XXVIII) kod kralježnjaka. Zajednička im je značajka da u strukturi sadrže trostruku uzvojnica, a njen udio u ukupnoj građi proteina varira od <10 % (kolagen XII) do 96% (kolagen I). Raznolikost kolagena dodatno je povećana mogućnošću postojanja nekoliko α lanaca, brojnošću molekularnih izoformi i supramolekularnih struktura jednog tipa kolagena te upotrebom različitih promotora i alternativnog prekrajanja (engl. *alternative splicing*). (Ricard-Blum, 2011)

Kolagen je vrsta vlaknastog proteina koji ima važnu ulogu u strukturi i funkciji mnogih tkiva u tijelu, uključujući hrskavicu u zglobovima. Kolagen tipa II primarni je strukturalni protein u hrskavici, tkivu koje štiti i podupire zglobove. U sastavu hrskavičnog tkiva nalaze se stanice hondrociti koje imaju ulogu izgradnje komponenata hrskavice, jedna od kojih je i sam kolagen. (www.plivazdravlje.hr) U dodacima prehrani, kolagen dolazi u nativnom (nehidroliziranom) i hidroliziranom obliku. Nativni kolagen tipa II, još nazivan i nehidrolizirani kolagen, je oblik kolagena koji se endogeno proizvodi u organizmu te zbog svoje trodimenzionalne strukture ima specifičan imunološki posredovan mehanizam poznat kao oralna tolerancija, a koji inhibira upalu i katabolizam tkiva na zglobnoj razini. Hidrolizirani kolagen, koji se često može pronaći u dodacima prehrani, predstavlja denaturirani protein kolagena tipa II koji je razgrađen na manje biološki aktivne peptidne molekule, a koje imaju olakšanu sposobnost prolaska u zglobno tkivo, gdje onda ostvaruju hondroprotektivne učinke. (Martínez-Puig i sur., 2023)

Glavna razlika između dva oblika kolagena je njihova molekulska masa i njihova potencijalna učinkovitost za različite svrhe. Hidrolizirani kolagen često se koristi u dodacima prehrani jer se vjeruje da manje peptide tijelo lakše može apsorbirati i iskoristiti, za razliku od prirodnog kolagena. (www.hsph.harvard.edu) Neka istraživanja su pokazala da dodaci hidroliziranog kolagena mogu pomoći poboljšanju izgleda kože (Al-Atif, 2022; de Miranda i sur., 2021; Bolke i sur., 2019), podupirati zdravlje zglobova i smanjiti simptome artritisa (Honvo i sur., 2020; García-Coronado, 2018; Bagchi, 2002) te pospješiti rast i oporavak mišića (Khatri i sur., 2021).

Nativni kolagen, s druge strane, prema Dill i Mörgelin (2020) smatra se učinkovitijim za poticanje regeneracije tkiva i zacjeljivanje rana. Oni su istraživali biološke dermalne predloške te njihov potencijal da potaknu prirodnu proliferaciju, usmjeravanje i prianjanje stanica. Posebno izraženi učinak bio je primijećen kod biomaterijala s najvećim sadržajem nativnih kolagenskih mreža. Pričvršćivanje stanica i proliferacija bili su značajno poboljšani kad su se u sastavu nalazile nativne kolagenske mreže. One su dovodile do prirodnije asimetričnije stanične morfologije koja omogućava bolju regeneraciju tkiva i smanjuje abnormalne procese stvaranja ožiljkastog tkiva.

Hijalina hrskavica je specijalizirano vezivno tkivo zglobova koje osigurava olakšani prijenos opterećenja te omogućava pokretljivost zglobova. Budući da zglobnoj hrskavici nedostaju krvne žile, limfni sustav i živci, ona ima ograničenu sposobnost zacjeljivanja. Ozljede zglobne hrskavice često se javljaju kao posljedica sportskih i rekreativnih aktivnosti, a ukoliko se one pravilno i na vrijeme ne liječe, mogu dovesti do razvoja ozbiljnih komplikacija te konačno i do degenerativnih bolesti zglobova poput osteoartritisa, kojemu su svojstveni bolovi u zglobovima, njihova smanjena pokretljivost i oticanje. (Alcaide-Ruggiero i sur., 2021) Smatra se kako bi opetovana oralna primjena kolagena tipa II, koji je važan za izgradnju te održavanje čvrstoće i oblika hrskavice, mogla pomoći kod smanjenja simptoma artritisa. Posebice se to odnosi na pokretljivost i funkciju zglobova, poboljšanje same kvalitete života i smanjenje bolova. (Martínez-Puig i sur., 2023)

Clifford i sur., (2018) istraživali su utjecaj primjene kolagenskih peptida na oporavak mišića nakon napornog treninga. Intenzivna tjelovježba sastavljena od ponavljajućih kontrakcija mišića može rezultirati višestrukim oštećenjem miofibrila i

okolnog izvanstaničnog matriksa. Izvanstanični matriks skeletnih mišića sastavljen je od nekoliko različitih tipova kolagena, integrina, proteoglikana i glikoproteina, koji u cjelini čine mrežu za prijenos miofibrilarnih sila duž mišićnih vlakana i pružaju strukturalni integritet. Od svih prethodno navedenih komponenti, kolagen se pokazao kao vrlo osjetljiv na mehanička opterećenja. Ono što su Clifford i sur. (2018) pratili, bila je promjena u markerima koji ukazuju na mišićno oštećenje. Zaključno su pokazali da je primjena kolagenskih peptida dovela do smanjenog mišićnog oštećenja, smanjenja zamora i bolova u mišićima, što otvara još jednu od mogućnosti primjene kolagena.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kolagen održava integritet zglobova te podupire njihovu pokretljivost, potiče mineralizaciju kostiju te održava elastičnost i mladolik izgled kože. Budući da se smatra esencijalnom tvari važnom za mnoge funkcije ljudskog organizma, činjenica da se njegova razina u organizmu tijekom života smanjuje dovoljan je razlog da se u posljednje vrijeme povećao interes za razvojem dodataka prehrani temeljenih na kolagenu.

Kako bi se njegova koncentracija u organizmu održala visokom što dulje tijekom životnog vijeka, osim egzogene nadoknade kolagena, ispituje se i mogućnost inhibicije enzima humane kolagenaze fibroblasta. Inhibiciju tog enzima istraživali su Borkakoti i sur. (1994) te su pronašli molekulu koja sprječava njegovo katalitičko djelovanje.

Cilj ovog istraživanja je bio modificirati molekulu dobivenu iz prethodno spomenute studije Borkakoti i sur. (1994) dizajniranjem derivata koji bi se jače vezali u aktivno mjesto enzima te potom računalno ispitati njihov inhibitorski potencijal pomoću molekuskog sidrenja mjereći energije vezanja molekula (ΔG).

3. MATERIJALI I METODE

Za potrebe ovog rada korištena je početna struktura molekule sintetskog peptidnog inhibitora preuzeta iz rada Borkakoti i sur. (1994) u pdb formatu (engl. *The Protein Data Bank file format*) koja, prema navedenom istraživanju, posjeduje svojstvo inhibicije humane kolagenaze fibroblasta (engl. *Human Fibroblast Collagenase*, HFC). Početna struktura je ručno modificirana pomoću računalnog programa Chimera 1.16 (Pettersen i sur., 2004), pri čemu je dobiveno 300 derivata. Ti su se derivati uz pomoć AutoDockTools programa i *prepare_ligand4.py* skripte (Morris i sur., 2009) preveli u pdbqt format potreban za sidrenje. Molekula receptora (pdb kôd 2TCL) je također bila pripremljena za sidrenje (svim atomima su pripisani Gasteigerovi naboji, nepolarni vodikovi atomi su stopljeni s pripadajućim ugljikovim atomima i određena je vrsta svim atomima) te je bila pohranjena u pdbqt formatu. Molekulsko sidrenje provedeno je pomoću računalnog programa AutoDock Vina (Trott i Olson, 2010) na računalu Intel® Core™ i5-10310U CPU @1.70 GHz s 64-bitnim Windows 10 Pro operacijskim sustavom.

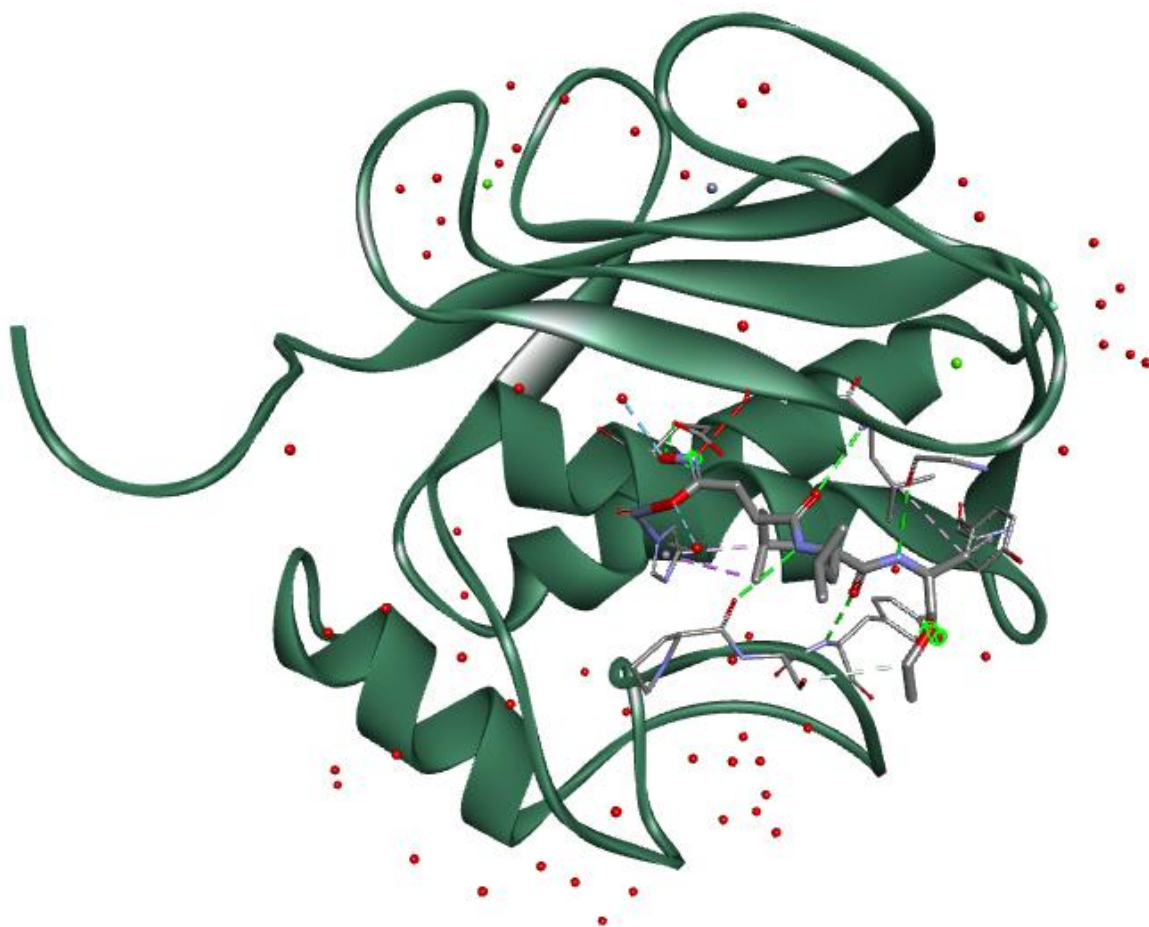
Nakon provedene evaluacije novostvorenih derivata, dobiveni su rezultati prvog kruga molekuskog sidrenja. Molekula s najnižom energijom vezanja (ligand 241) je uzeta kao spoj uzor za drugi krug molekuskog sidrenja te je na temelju nje predloženo još 465 dodatnih derivata, koji su bili podvrgnuti molekulskom sidrenju.

U računalnom programu Discovery Studio 2021 (BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio v21.1.020298, San Diego: Dassault Systemes, 2021) ispitane su vrste interakcija između ispitivanog liganda i aktivnog mjesta proteina 2TCL te njihova brojnost. Vizualni prikazi kompleksa 2TCL-ligand izrađeni su uz pomoć istog programa, dok su statistički prikazi energija vezanja liganada napravljeni u programu R 3.6.2. (R Core Team, 2018) s „ggplot2“ knjižnicom, uz primjenu RStudio 1.2.5033 sučelja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

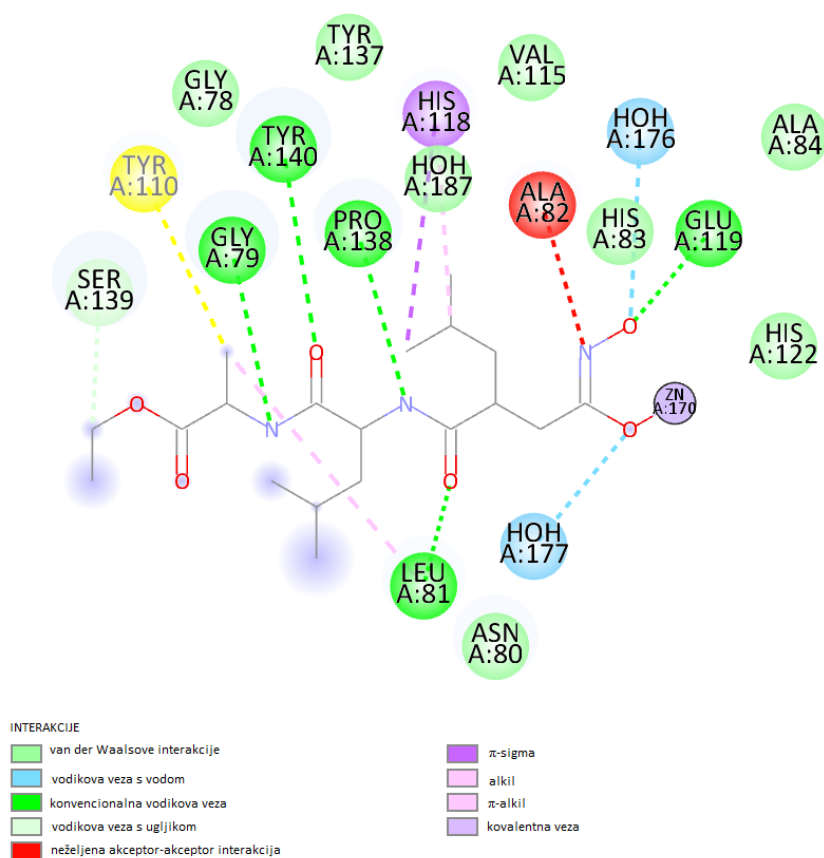
4.1. Svojstva vezanja sintetskog peptidnog inhibitora u aktivno mjesto proteina 2TCL

Energija vezanja početnog sintetskog peptidnog inhibitora iz istraživanja Borkakoti i sur. (1994) u aktivno mjesto proteina 2TCL dobivena računalnom analizom iznosi $\Delta G = -6,4 \text{ kcal mol}^{-1}$.



Slika 2. Strukturni prikaz kompleksa sintetskog peptidnog inhibitora i proteina 2TCL (izrađeno pomoću programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021).

Sintetski inhibitor s proteinom 2TCL ostvaruje 8 vodikovih veza, od kojih je pet konvencionalnih vodikovih veza, jednu čini ugljik-vodik vodikova veza, dvije su vodikove veze s vodom te su prisutne još tri vrste hidrofobnih interakcija (alkil-alkil, π -alkil, π -sigma). Strukturu kompleksa sintetskog inhibitora s proteinom 2TCL prikazuje Slika 2, dok su njihove međusobne interakcije vidljive na Slici 3. Vrste veza i njihove duljine prikazane su u Tablici 1.



Slika 3. Interakcije između sintetskog peptidnog inhibitora i aminokiselina u aktivnom mjestu enzima 2TCL (izrađeno uz pomoć programa Discovery Studio 2021).

Tablica 1. Pregled interakcija u koje stupa sintetski peptidni inhibitor s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima 2TCL (izrađeno uz pomoć programa Discovery Studio 2021).

Aminokiselina	Vrsta veze	Tip veze	Duljina veze (Å)
Ser139	vodikova veza	ugljik-vodik veza	3,72
Tyr110	hidrofobna interakcija	π -alkil	4,93
Gly79	vodikova veza	konvencionalna vodikova veza	2,82
Tyr140	vodikova veza	konvencionalna vodikova veza	2,76
Pro138	vodikova veza	konvencionalna vodikova veza	3,09
Leu81	hidrofobna interakcija	alkil-alkil	4,78
His118	hidrofobna interakcija	π -sigma	3,98
His118	hidrofobna interakcija	π -alkil	3,98
Leu81	vodikova veza	konvencionalna vodikova veza	3,02
Leu81	hidrofobna interakcija	alkil-alkil	4,78
HOH177	vodikova veza	konvencionalna vodikova veza	2,94
HOH176	vodikova veza	konvencionalna vodikova veza	2,82
Glu119	vodikova veza	konvencionalna vodikova veza	2,71

Vodikova veza se po jačini može svrstati između slabe nekovalentne i jake kovalentne veze (Karas i sur., 2020), odnosno smatra se da je jača od Van der Waalsovih sila, a slabija od ionskih i kovalentnih interakcija. Radi se o privlačnoj elektrostatskoj interakciji između elektronegativnog atoma jedne molekule (najčešće F, O ili N) i vodika druge/iste molekule koji je prethodno već povezan s relativno elektronegativnim atomom. (www.unacademy.com) Najvažnije svojstvo vodikove veze je dijeljenje protona između donorskog i akceptorskog atoma. (Logožar, 2019)

Uobičajena duljina vodikove veze između atoma donora i atoma akceptora iznosi 2.7-3.3 Å. (www.umass.edu) U pravilu vrijedi da što je vodikova veza kraća, to je njezina jakost veća, no jakost vodikove veze, osim o samoj duljini veze, ovisi i o kutu vezanja te naboju atoma koji u vezi sudjeluju. Slabe vodikove veze karakterizira duža duljina veze, proton koji se ne nalazi u sredini veze (asimetrična vodikova veza), nelinearno smješteni atomi (kut treba težiti 180° kako bi veza bila što jača, a duljina veze što kraća) te su pretežno elektrostatske prirode. S druge strane, jake vodikove veze su kratke, simetrične (proton se nalazi u sredini veze), linearne i kovalentnog karaktera. (Stanić, 2021)

U Tablici 2 prikazana su svojstva jakih, srednje jakih i slabih vodikovih veza uz napomenu da se podjele ne treba kruto držati jer nije strogo definirana, već isključivo služi za bolje predočenje heterogene prirode vodikovih veza (Stanić, 2021)

Tablica 2. Jake, umjerene i slabe vodikove veze prema Jeffreyjevoj klasifikaciji (prilagođeno iz Steiner, (2002) uz dopuštenje izdavača).

	jaka	umjerena	slaba
vrsta interakcije	izrazito kovalentna	većinom elektrostatska	elektrostat./disperz.
duljina veze [Å]	1.2 - 1.5	1.5 - 2.2	> 2.2
H --- A			
izduživanje X - H [Å]	0.08 - 0.25	0.02 - 0.08	< 0.02
X - H nasprem H --- A	X - H ≈ H --- A	X - H < H --- A	X - H << H --- A
X --- A [Å]	< 2.5	2.5 - 3.2	> 3.2
usmjerenje	jako	umjereno	slabo
vezni kutevi [°]	170 - 180	> 130	> 90
energija vezanja [kcalmol ⁻¹]	15 - 40	4 - 15	< 4
relativni IR pomak [cm ⁻¹]	25%	10 - 25%	< 10%
¹ H pomak prema višoj energiji	14 - 22	< 14	

Najjače vodikove veze koje se pojavljuju između sintetskog inhibitora i aminokiselina u aktivnom mjestu enzima 2TCL bile su s Glu119, Tyr140 te Gly79.

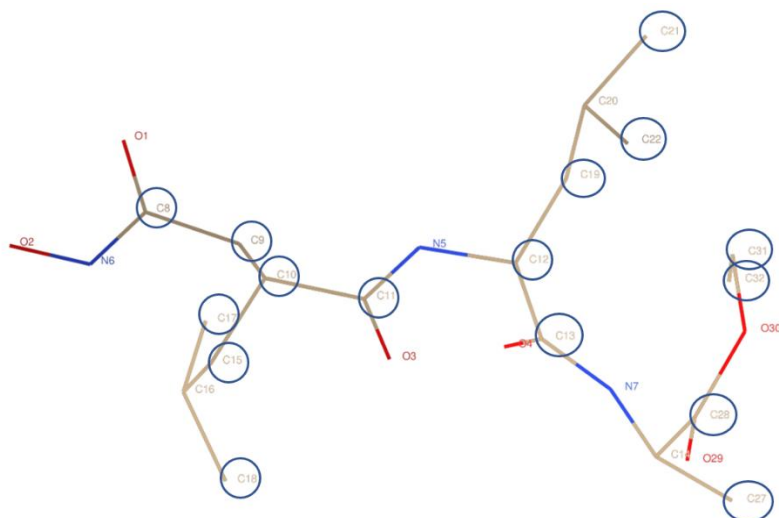
Hidrofobne se interakcije, s druge strane, ostvaruju između nepolarnih atoma. Povezivanjem nepolarnih molekula, odnosno dijelova molekula postiže se energetski povoljnije stanje nego da je svaka molekula ostala odvojena (okružena molekulama vode s kojima ne može tvoriti vodikovu vezu). Kod vezanja istraživanih liganda u aktivno mjesto proteina 2TCL pojavljuju se 3 vrste hidrofobnih interakcija – alkil-alkil (Leu81), π -alkil (Tyr110, His118) te π -sigma veza (His118).

Smatra se da su slabe međumolekulske interakcije, poput vodikovih veza i hidrofobnih interakcija, ključne za stabilizaciju energetski favoriziranih liganada u kompleksu s aktivnim mjestom enzima. (Patil i sur., 2010)

4.2. Stvaranje novih derivata modifikacijom molekule sintetskog peptidnog inhibitora

U prvom krugu molekuskog sidrenja modificirana je molekula sintetskog peptidnog inhibitora kako bi nastale jače interakcije s hidrofobnim, odnosno hidrofiličnim aminokiselinama u aktivnom mjestu proteina 2TCL te kako bi se postigla niža energija vezanja od one koju postiže sam sintetski peptidni inhibitor ($\Delta G = -6,4 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Različiti supstituenti varirani su na većini mogućih položaja početne molekule sintetskog peptidnog inhibitora (Slika 4). Počevši od onih jednostavnijih supstituenata (poput hidroksilne, metilne ili amino skupine) pa sve do heterocikličkih aromatskih struktura kako bi konačno nastalo 300 derivata.



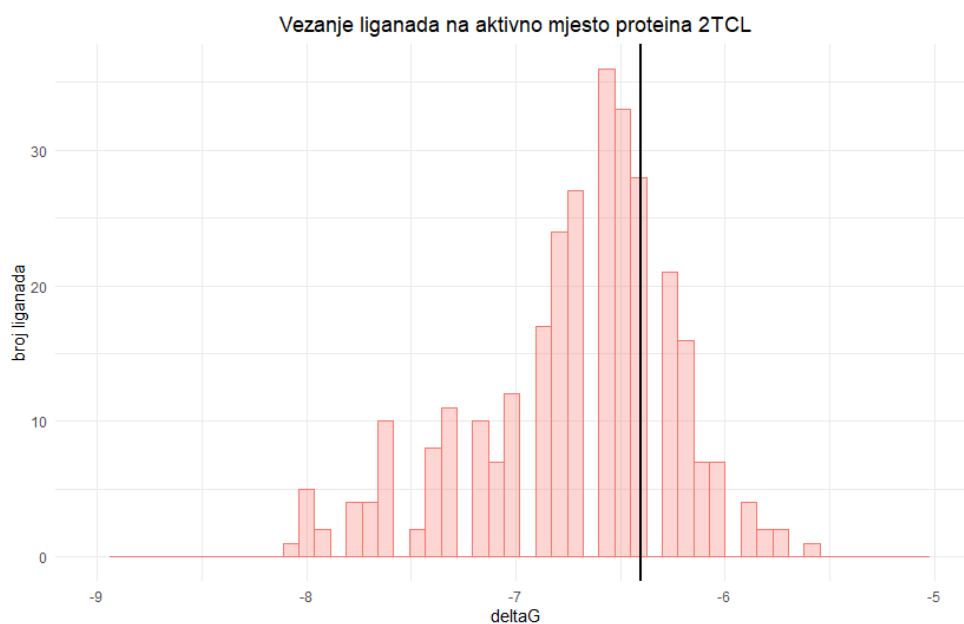
Slika 4. Mjesta modifikacije početnog sintetskog inhibitora.

4.3. Rezultati prvog kruga molekuskog sidrenja

Rezultati prvog kruga sidrenja pokazali su da bi se većina predloženih spojeva trebala jače vezati od početnog kristalogrfskog inhibitora (Slika 5.), čija konstanta vezanja iznosi $\Delta G = -6,4 \text{ kcal mol}^{-1}$.

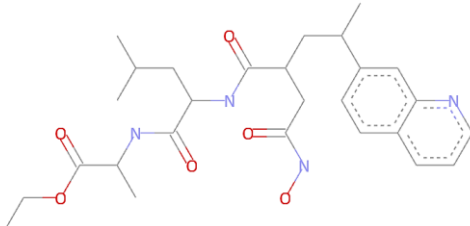
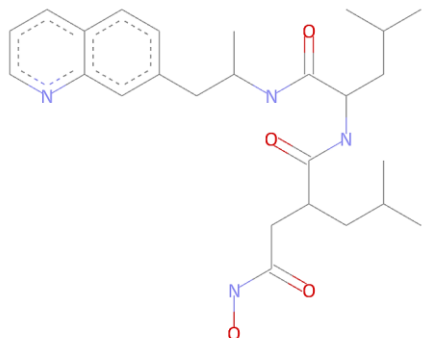
U prvom krugu molekuskog sidrenja, molekula liganda 241 pokazala se najuspješnijom s obzirom na to da njezina konstanta vezanja iznosi $\Delta G = -8,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, što je za $1,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ niže od one početnog kristalogrfskog inhibitora.

U Tablici 3 prikazani su najuspješniji ligandi, čija je energija vezanja u aktivno mjesto proteina 2TCL najniža.



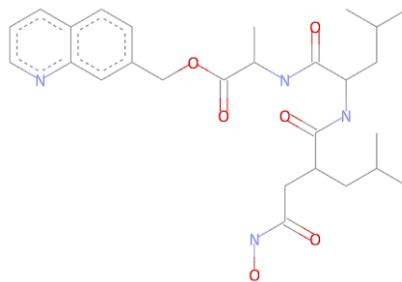
Slika 5. Grafički prikaz rezultata prvog kruga sidrenja u aktivno mjesto proteina 2TCL. Crna linija predstavlja energiju vežanja početnog sintetskog peptidnog inhibitora ($\Delta G = -6,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Ligandi koji se nalaze lijevo od crne linije jače se vežu u aktivno mjesto u odnosu na kristalografski inhibitor.

Tablica 3. Prikaz 10 najboljih liganada dobivenih u prvom krugu molekuskog sidrenja te njihove energije vežanja.

	Ligand	Struktura	ΔG [kcal mol ⁻¹]
1	241		-8,1
2	237		-8,0

3

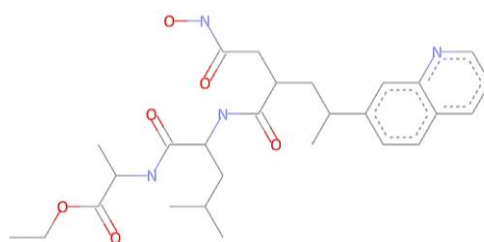
238



-8,0

4

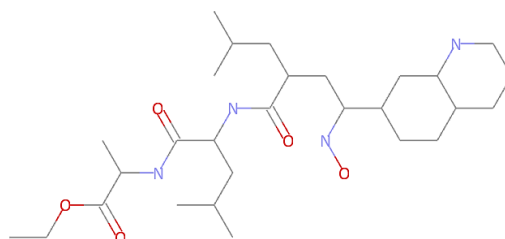
240



-8,0

5

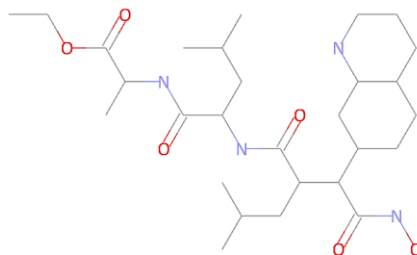
42



-8,0

6

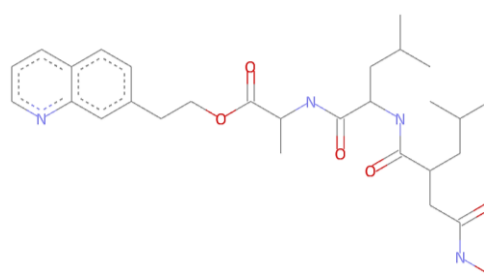
89



-8,0

7

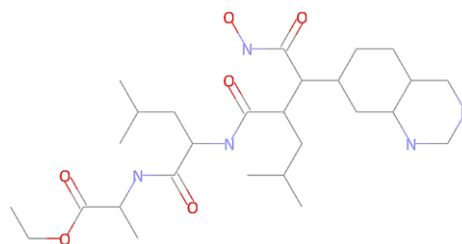
239



-7,9

8

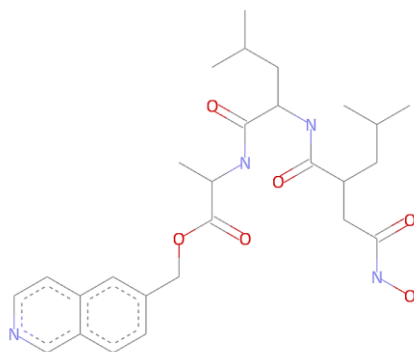
85



-7,9

9

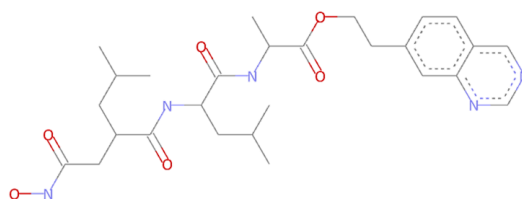
211



-7,8

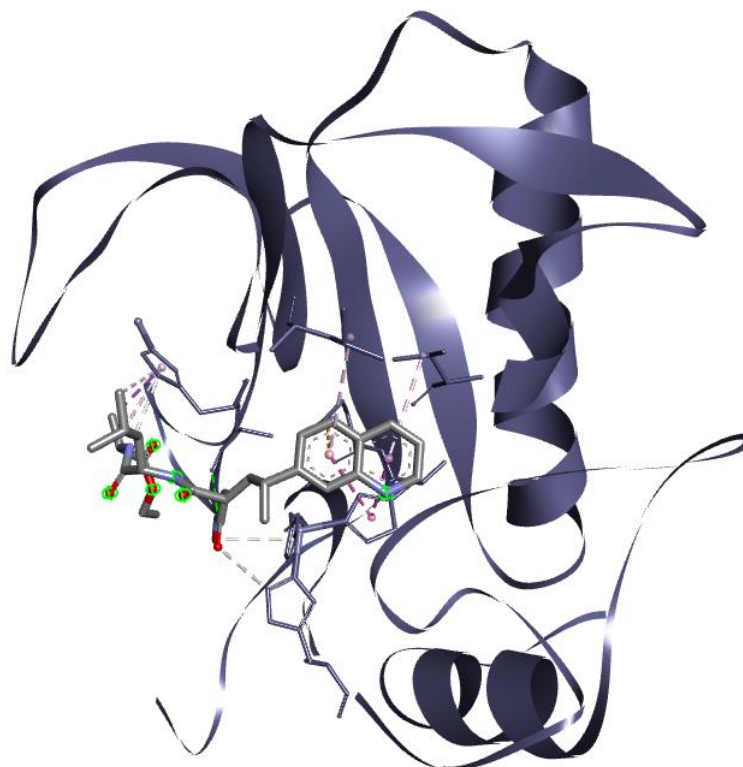
10

222



-7,8

4.4. Svojstva liganda 241; ligand-protein interakcije



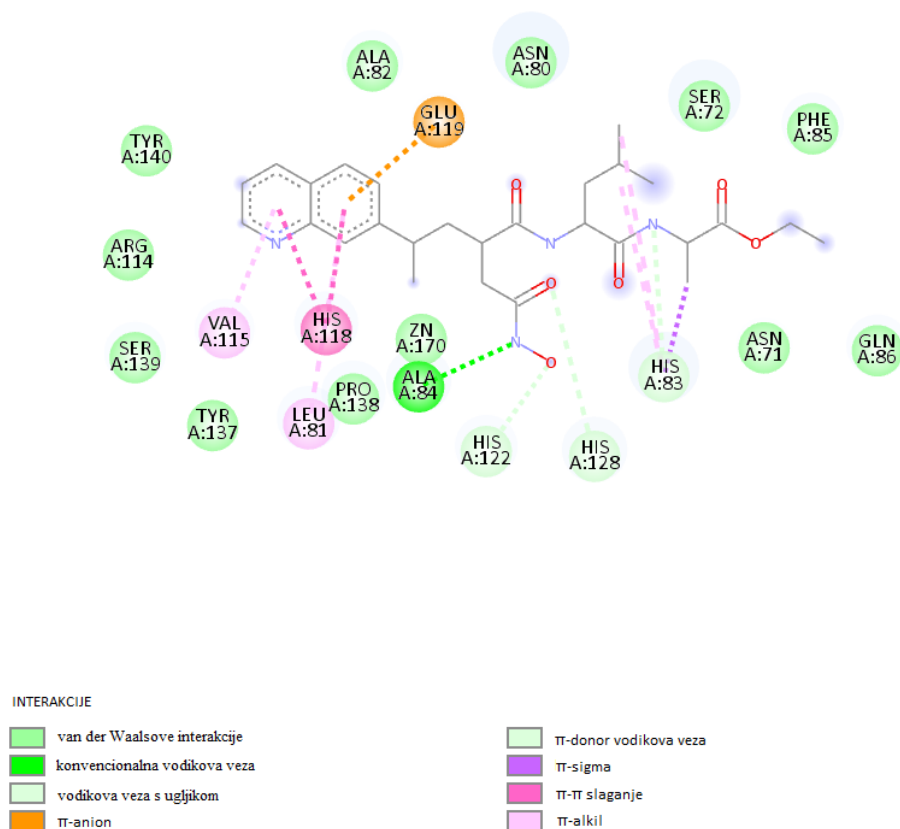
Slika 6. 3D prikaz liganda 241 u aktivnom mjestu enzima 2TCL.

Ligand 241 u kompleksu s proteinom 2TCL ostvaruje vodikove veze s aminokiselinama Ala84, His83, His122 i His128; hidrofobnu interakciju (π -alkil vezu) s Val115, Leu81 te His83; π - π slaganje s His118 (pi-pi slaganje ili poznatije kao „ π - π *stacking*“ predstavlja nekovalentnu interakciju između pi veza aromatskih prstenova, odnosno prema Jones i sur. (2012) „poravnavanje aromatskih skupina unutar molekula potaknuto preklapanjem π -orbitala uslijed njihovog međudjelovanja“); hidrofobnu interakciju (π -sigma vezu) s His83 i elektrostatsku π -anion interakciju s Glu119. Na slikama 6 i 7 vidljive su interakcije koje postiže ligand 241 s aktivnim mjestom 2TCL enzima.

Tablica 4. Pregled aminokiselina s kojima ligand 241 tvori vodikove veze.

Aminokiselina	Vrsta vodikove veze	Duljina veze (Å)
Ala84	konvencionalna	3,33
His83	π -donorska	3,86
His122	π -donorska	3,55
His128	ugljik-vodik veza	3,43

S obzirom na duljinu vodikovih veza, može se zaključiti da ligand 241 najjače interakcije s proteinom 2TCL ostvaruje preko dušika s karbonilnom skupinom Ala84 i preko kisika s dušikom imidazolskog prstena His128. Zatim slijedi interakcija preko kisika s π elektronskim oblakom imidazolskog prstena His122, a potom i preko dušika s π elektronskim oblakom imidazolskog prstena His83. Spomenute interakcije prikazane su na slici 6.

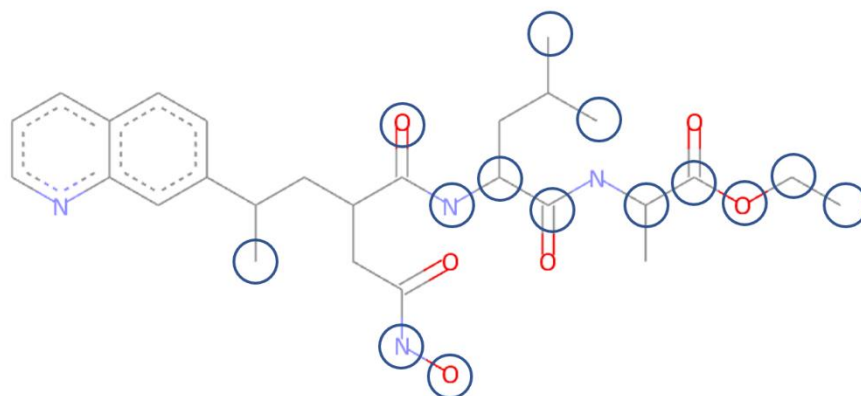


Slika 7. Prikaz interakcija koje ostvaruje ligand 241 s aminokiselinama u aktivnom mjestu proteina 2TCL.

4.5. Drugi krug molekuskog sidrenja; modifikacija liganda 241

Ligand 241, koji je u prvom krugu molekuskog sidrenja pokazao najnižu energiju vezanja, poslužio je zatim kao spoj uzor za dizajniranje novih 465 derivata u drugom krugu molekuskog sidrenja.

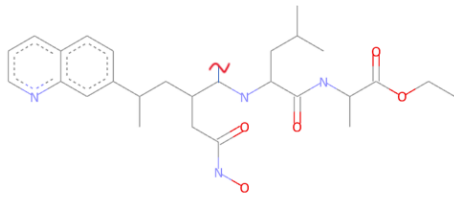
Novi ligandi su dobiveni modifikacijom liganda 241, u čiju su svrhu ponovno varirani različiti supstituenti na mjestima u molekuli koja to svojim rasporedom u aktivnom mjestu enzima 2TCL dozvoljavaju. Slika 8 prikazuje položaje na kojima je došlo do modifikacije molekule 241. Pregled nekih od funkcionalnih skupina koje su varirane kao supstituenti na različitim položajima molekule 241 vidljiv je u Tablici 5.



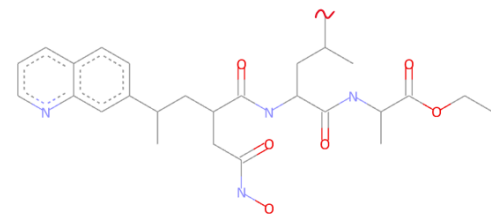
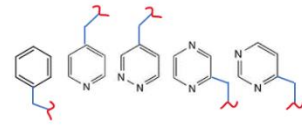
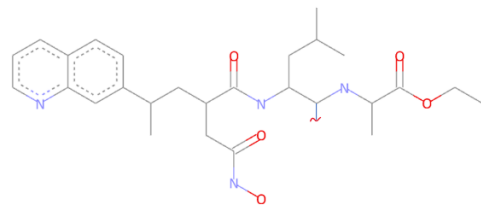
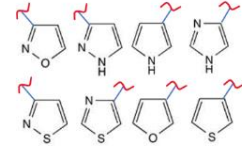
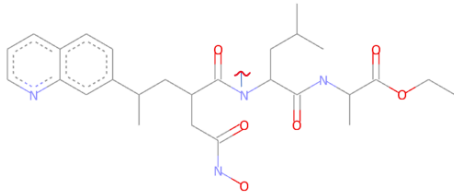
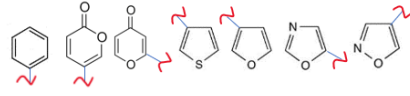
Slika 8. Položaji modifikacije liganda 241

Tablica 5. Pregled nekih od supstituenata koji su varirani na označenim položajima molekule liganda 241.

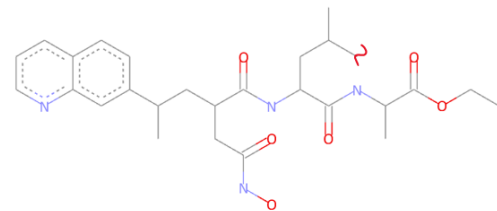
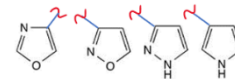
Položaj	Varirani supstituenti
	-Br, -Cl, -F, -I, -OH, -OCH ₃ , -SH, -NH ₂ , -NHCH ₃ , N(CH ₃) ₂ , -COCH ₃ , -COH, -COOH, -COOCH ₃ , -COOCH ₂ CH ₃ , -CONH ₂
	-CH ₂ Br, -CH ₂ Cl, CH ₂ F, -CH ₂ I, -CH ₂ OH, -CH ₂ OCH ₃ , -CH ₂ SH, -CH ₂ COH, -CH ₂ COCH ₃ , -CH ₂ COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CONH ₂ , -CH ₂ COOH, -CH ₂ COOCH ₃ , -CH ₂ COOCH ₂ CH ₃
	-CH ₂ F, -CH ₂ I, -CH ₂ OH, -CH ₂ SH, -CH ₂ NH ₂ , -N=O, -NHOH, -NHOCH ₃ , -NHOCH ₂ CH ₃ , -COOH, -COOCH ₃ , -COOCH ₂ CH ₃



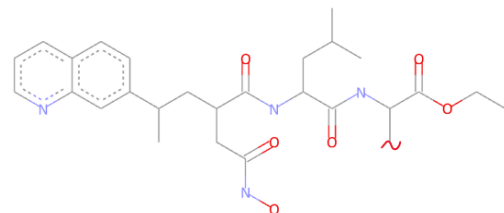
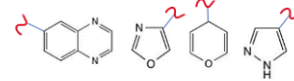
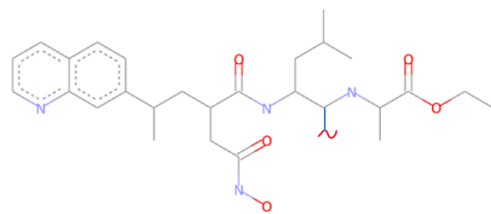
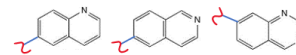
-Br, -Cl, -I, -OH, -CH₃, -CH₂CH₃,
-OCH₃, -OCH₂CH₃, -CONH₂, -CONHCH₃



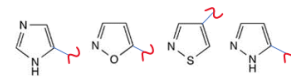
-OH, -OCH₂, -OCH₃

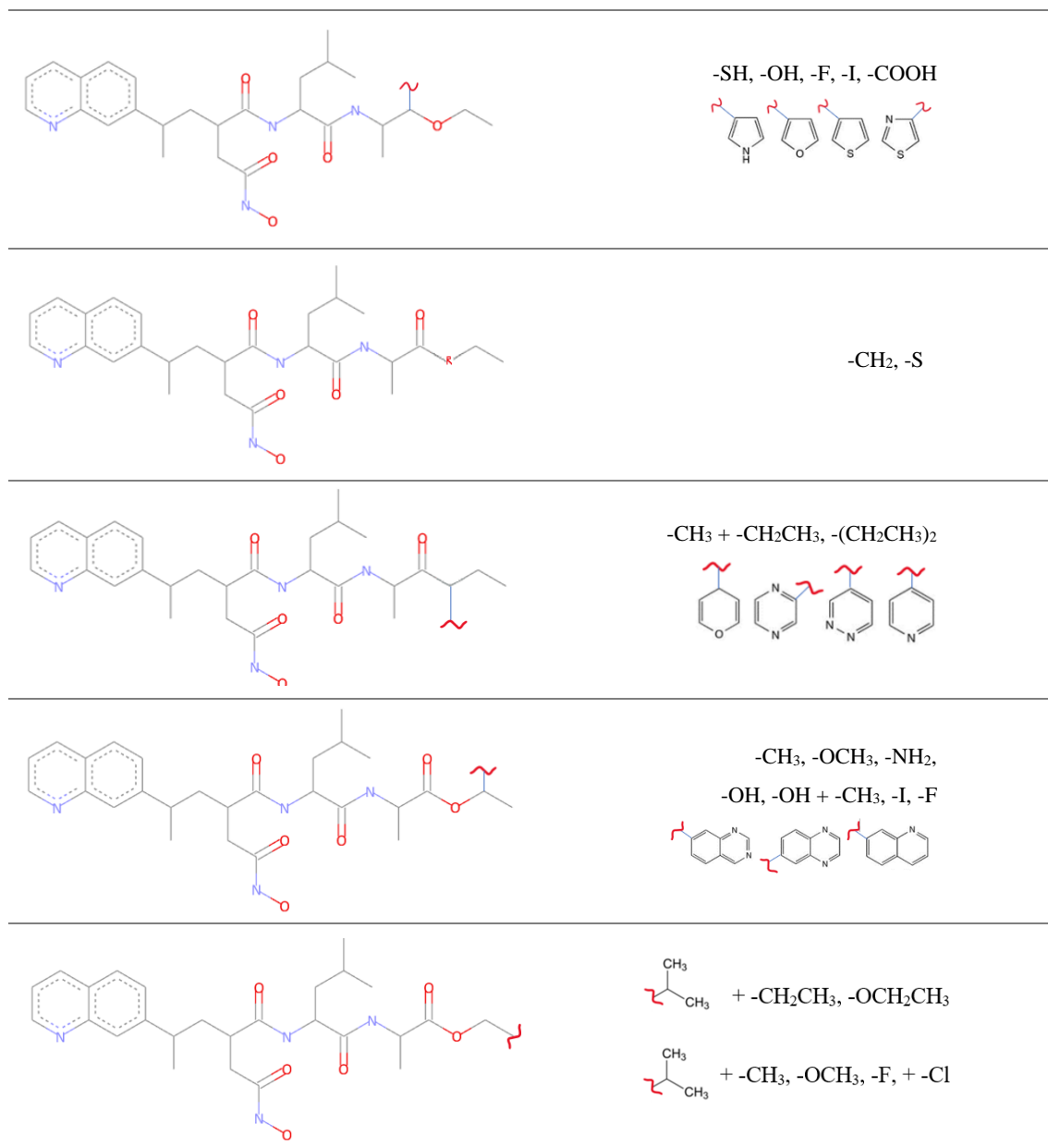


-C(O)H, -COOH,
-COOCH₃, -COOCH₂CH₃,
-CONH₂, -CONHCH₃



-Br, -Cl, -I, -F, -OH, -OCH₃,
-NH₂, -COOH, -CONH₂, -SH



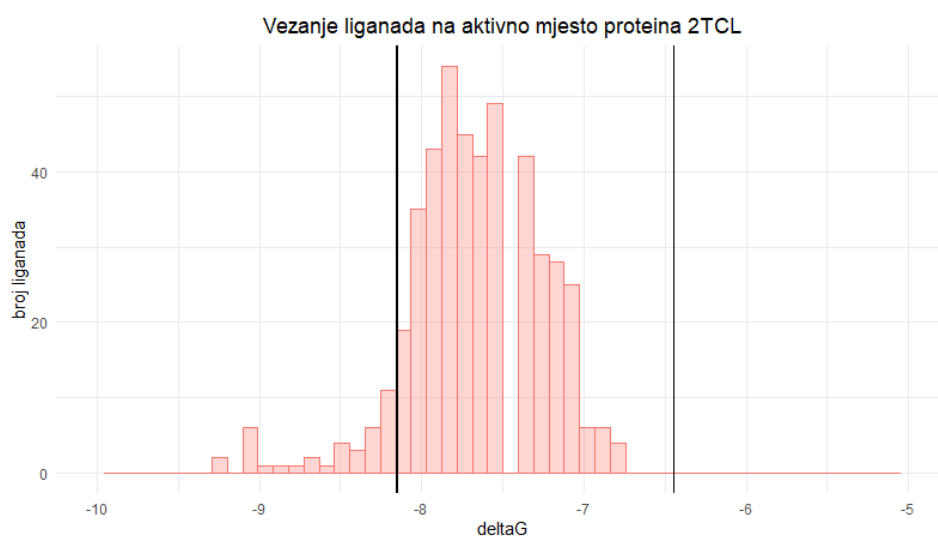


4.6. Rezultati drugog kruga molekuskog sidrenja

U usporedbi s rezultatom prvog kruga molekuskog sidrenja, u kojem je najbolji inhibitor imao konstantu vezanja $\Delta G = -8,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, molekule predložene u drugom krugu pokazuju još jače vezanje. Ovog puta bi se 38 predloženih spojeva trebalo jače vezati za aktivno mjesto enzima u usporedbi s najboljim ligandom iz prvog kruga. Dva najbolja liganda iz drugog kruga molekuskog sidrenja imaju konstante vezanja od $\Delta G = -9,2 \text{ kcal mol}^{-1}$.

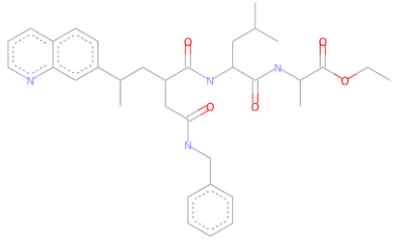
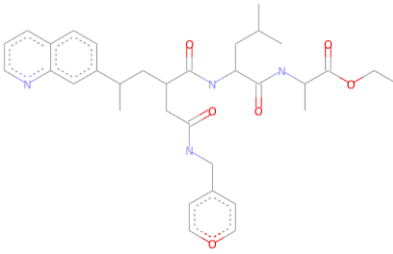
Na slici 9 vidljiv je grafički prikaz rezultata drugog kruga sidrenja. Tanka crna linija predstavlja energiju vezanja kristalografskog inhibitora, a deblja crna linija je energija vezanja

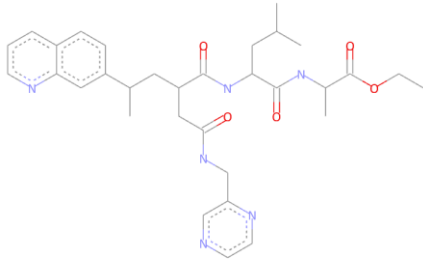
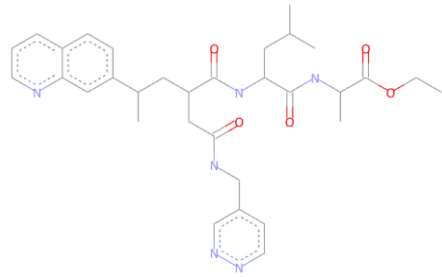
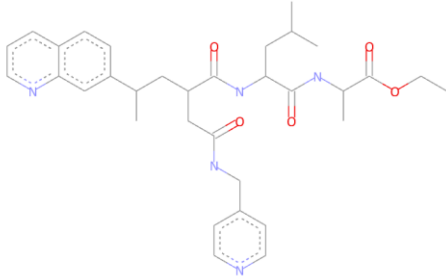
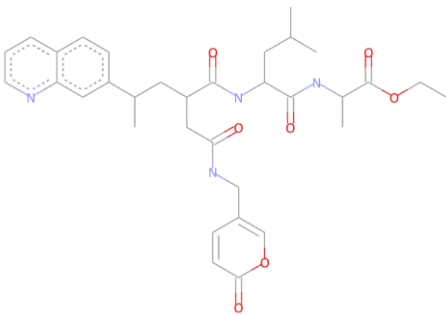
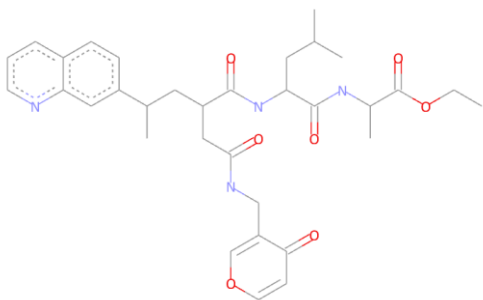
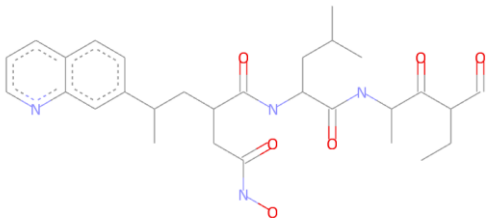
najboljeg liganda iz prvog kruga. Javlja se i mali pik kod najpotentnijih inhibitora, što se može pripisati točno pogodnom rasporedu funkcionalnih skupina koje pojačavaju vezanje.

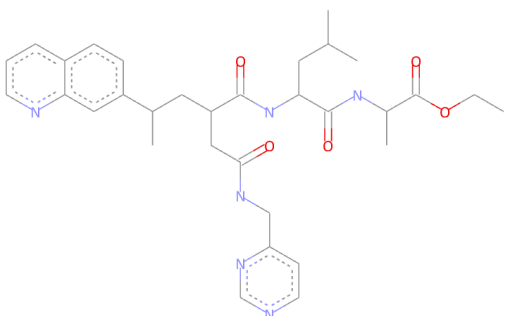
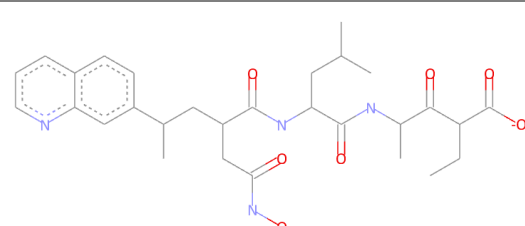


Slika 9. Grafički prikaz raspodjele energije vezanja novostvorenih liganada.

Tablica 6. Prikaz 10 najboljih liganada dobivenih u drugom krugu molekuskog sidrenja te njihove energije vezanja.

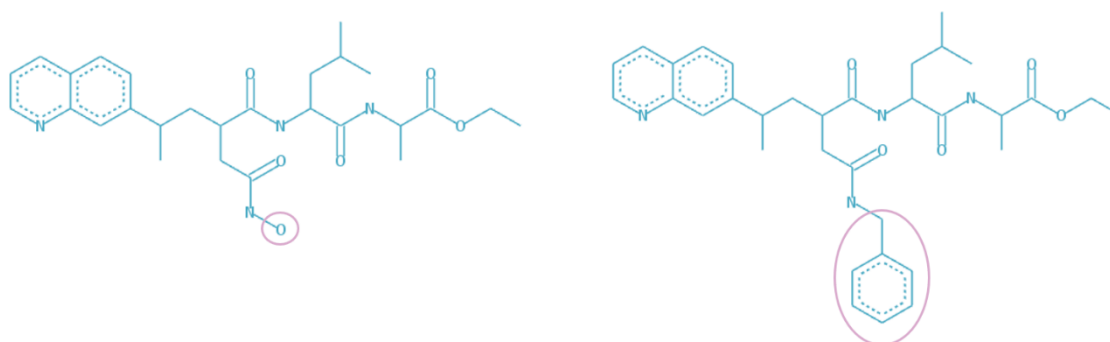
	Ligand	Struktura	ΔG [kcal mol ⁻¹]
1	157		-9,2
2	303		-9,2

3	311		-9,1
4	333		-9,1
5	343		-9,1
6	444		-9,1
7	68		-9,1
8	8		-9,1

9	352		-9,0
10	81		-8,9

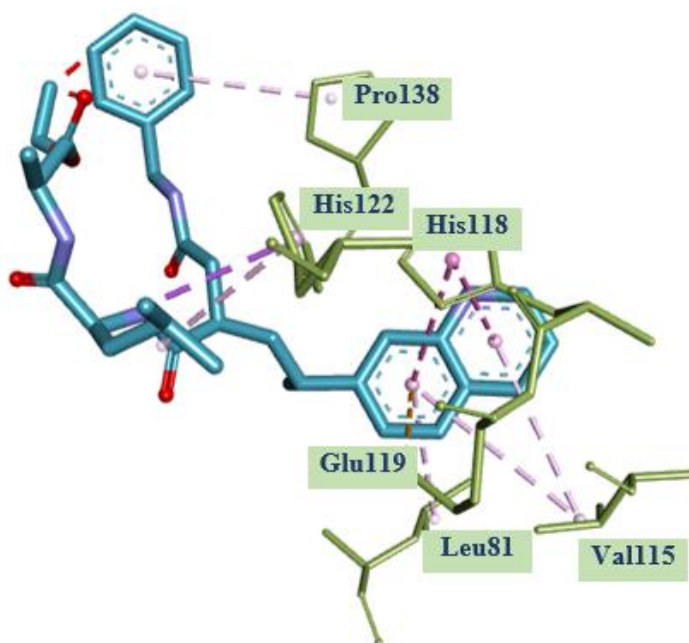
4.7. Ligand 157

Na slici 10 vidljiva je usporedba strukture najuspješnijeg liganda prvog kruga molekuskog sidrenja sa strukturom jednog od dva najuspješnija liganda drugog kruga molekuskog sidrenja (ligand 157). Ligand 157 dolazi u dvije vrlo slične konformacije koje obje daju $\Delta G = -9,2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Fleksibilni dio koji strši izvan veznog mjesta jedino je po čemu se dvije konformacije razlikuju.

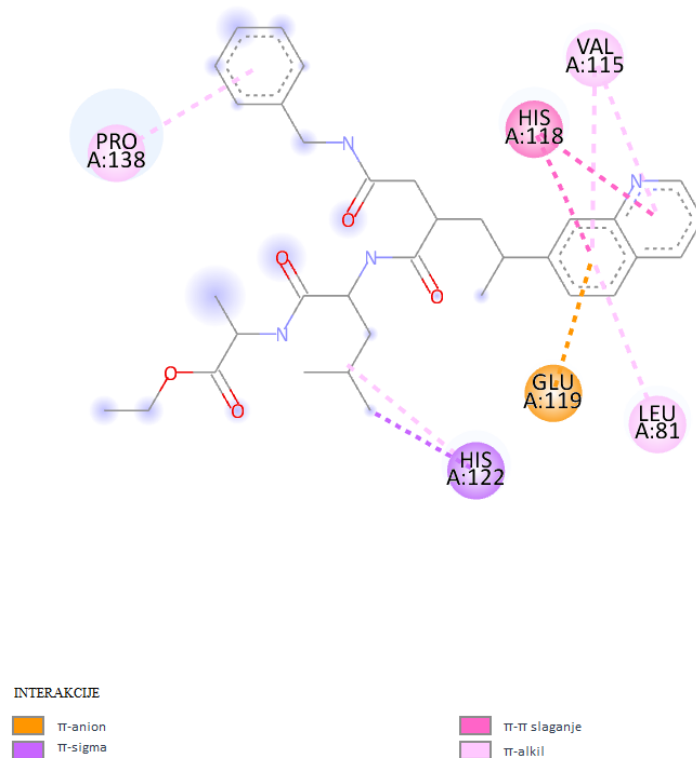


Slika 10. Usporedba strukture najuspješnijeg liganda prvog kruga (ligand 241) i drugog kruga (ligand 157) molekuskog sidrenja.

Jedna od konformacija liganda 157 (u nastavku vidljiva na slici 11) ostvaruje 9 interakcija s aktivnim mjestom proteina 2TCL od kojih je samo jedna elektrostatske prirode, a ostalo su hidrofobne interakcije (Slika 12). Elektrostatska (π -anion) interakcija nastaje između aromatske jezgre kinolina liganda 157 i kisika glutaminske kiseline aktivnog mjesta proteina. Od hidrofobnih interakcija, najveći udio čine π -alkil veze ostvarene preko aromatske jezgre kinolina s ugljikovim atomima Val115 i Leu81, ona stvorena preko ugljika s aromatskom jezgrom imidazola His122 te interakcija između aromatske jezgre benzena liganda 157 i pirolidina Pro138. Također se ostvaruje i jedna π -sigma veza preko ugljika s imidazolom His122 te dva π - π slaganja s His118 (između aromatskih jezgri kinolina i imidazola).

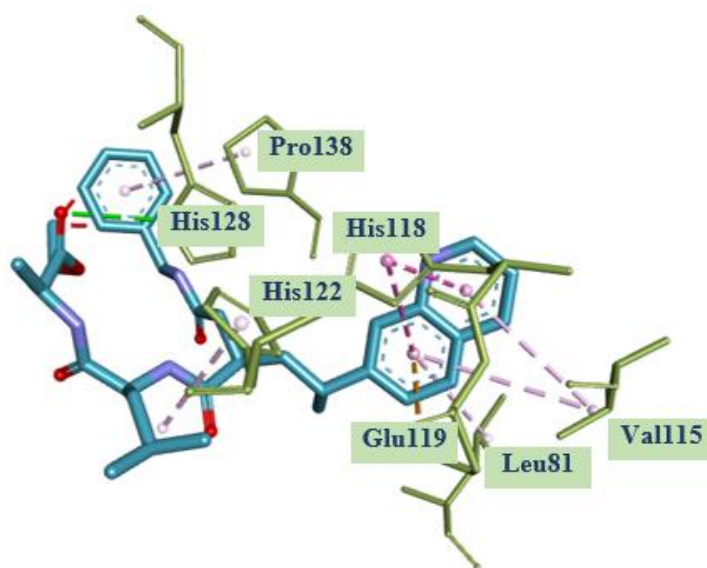


Slika 11. Interakcije jedne od konformacija liganda 157 s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima 2TCL.

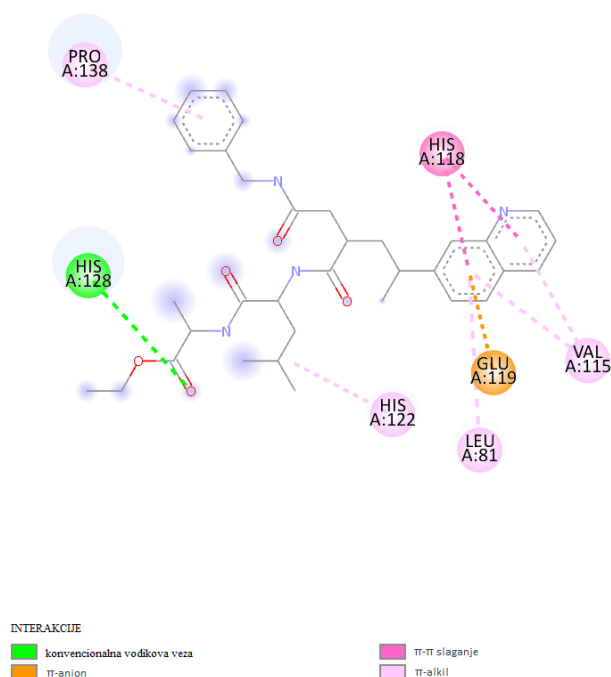


Slika 12. Vrste interakcija koje ostvaruje jedna od konformacija liganda 157 s aktivnim mjestom proteina 2TCL.

Druga konformacija liganda 157 (slika 13), uz već spomenute interakcije, stvara i jednu dodatnu vodikovu vezu preko kisika s imidazolom His128 duljine 3,39 Å.



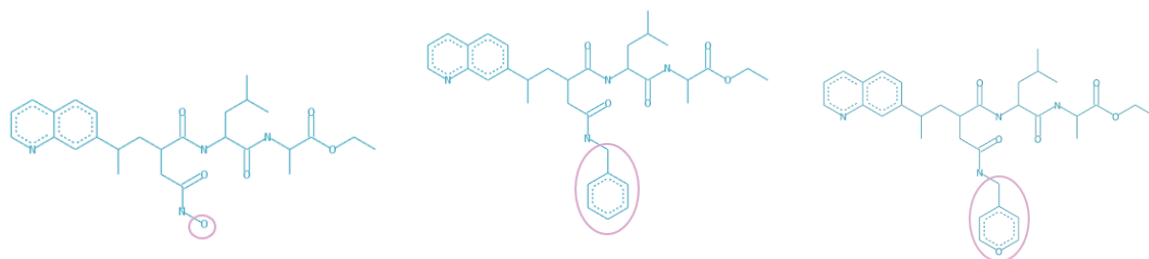
Slika 13. Interakcije druge konformacije liganda 157 s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima 2TCL.



Slika 14. Vrste interakcija koje ostvaruje druga konformacija liganda 157 s aktivnim mjestom proteina 2TCL.

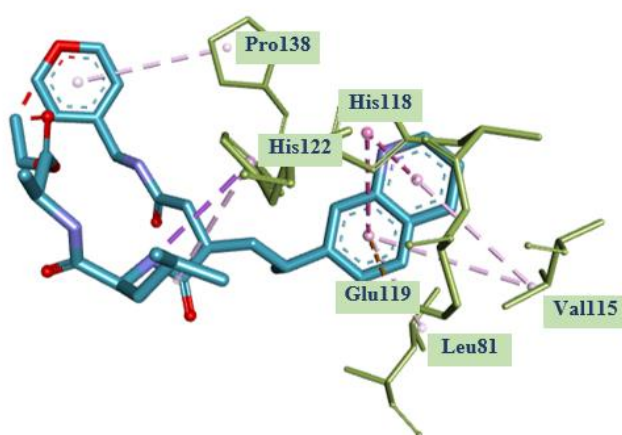
4.8. Ligand 303

Slika 15 prikazuje drugi najuspješniji ligand drugog kruga molekuskog sidrenja (ligand 303) te usporedbu njegove strukture sa strukturama liganda 241 i 157. Ligand 303 također dolazi u dvije vrlo slične konformacije, a koje obje daju $\Delta G = -9,2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Kao i konformacije liganda 157, tako se i ove razlikuju samo u fleksibilnom dijelu koji strši izvan veznog mjesta proteina.

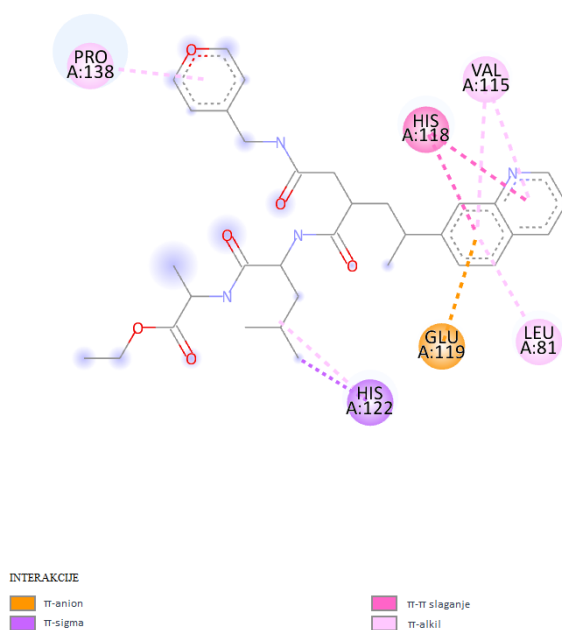


Slika 15. Usporedba strukture najuspješnijih liganada: prvog kruga (lijevo ligand 241) i drugog kruga (ligand 157 u sredini i ligand 303 desno) molekuskog sidrenja.

Jedna od dviju konformacija liganda 303 (Slika 16), koja odgovara prvoj konformaciji liganda 157, također ostvaruje 9 interakcija s aktivnim mjestom proteina 2TCL. S obzirom na to da se radi o gotovo identičnoj strukturi (razlikuju se samo u prstenu na dušikovom atomu – kod liganda 157 se radi o benzenu, dok je kod liganda 303 benzen pretvoren u piran), vrste interakcija koje se javljaju između liganda i aktivnog mjesta proteina su jednake (vidljivo na slikama 16 i 17). Iz tog razloga nije neočekivano da ta konformacija liganda 303 ostvaruje isto tako jednu elektrostatsku (π -anion) interakciju s Glu119 te nekoliko hidrofobnih interakcija, od kojih najviše π -alkil veza koje ostvaruje s Val115, Leu81, His122 i Pro138. Uz to, jedna π -sigma veza se stvara s His122 i još dva π - π slaganja s His118.

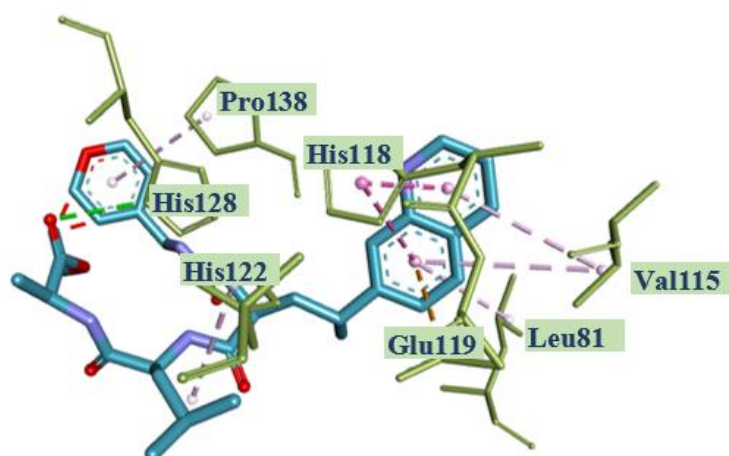


Slika 16. Interakcije jedne od konformacija liganda 303 s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima 2TCL.

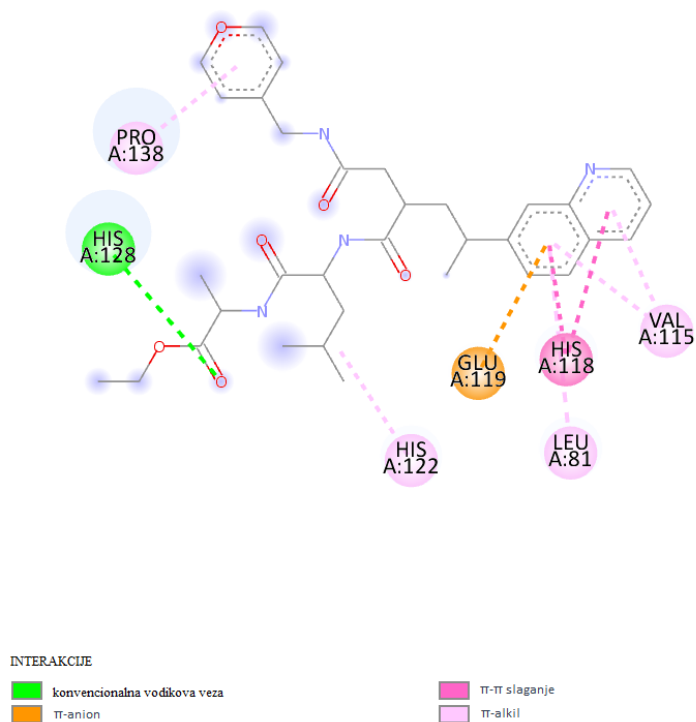


Slika 17. Vrste interakcija koje ostvaruje jedna od konformacija liganda 303 s aktivnim mjestom proteina 2TCL.

Na slici 18 vidljiva je druga konformacija liganda 303, koja uz već spomenute interakcije prve konformacije, ostvaruje još jednu dodatnu vodikovu vezu preko kisika s imidazolom His128 duljine 3,37 Å.



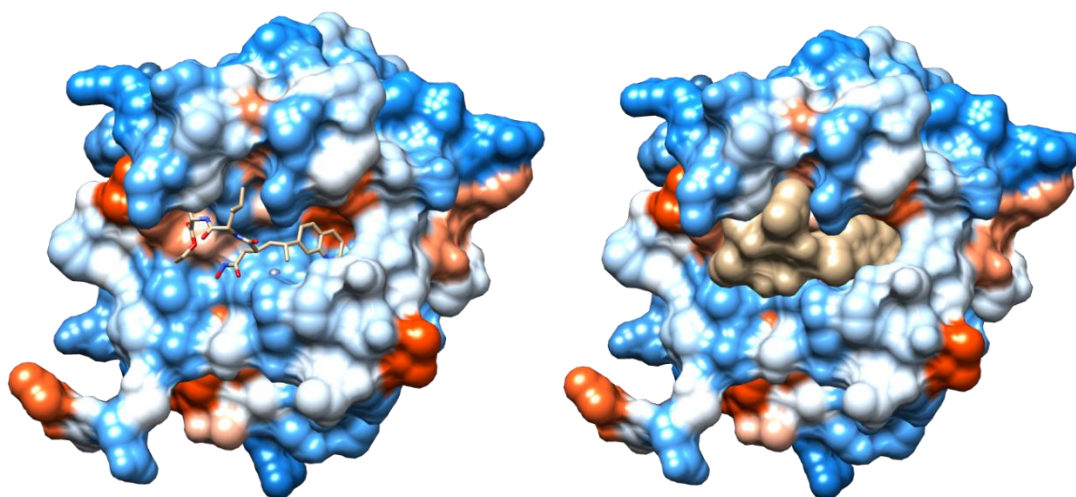
Slika 18. Interakcije druge konformacija liganda 303 s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima 2TCL.



Slika 19. Vrste interakcija koje ostvaruje druga konformacija liganda 303 s aktivnim mjestom proteina 2TCL.

4.9. Farmakokinetička predviđanja i mogućnosti daljnje modifikacije

Kod dizajniranja novih liganada pokazalo se važnim najprije proučiti svojstva aminokiselina u aktivnom mjestu proteina 2TCL. S obzirom na prisustvo i hidrofilnih (Glu119, His122, His128, His118) i hidrofobnih (Pro138, Leu81, Val115) aminokiselina, mogli su se dodavati mnogi različiti supstituenti i polarnog i nepolarnog karaktera. Također, aktivno vezno mjesto proteina 2TCL dovoljno je veliko da može primiti kompleksnije ligande koji, primjerice, u svojoj strukturi sadrže heterocikličke aromatske prstenove. Oni su često bili varirani kao supstituenti zbog svojstava proton donora i/ili akceptora kako bi se ostvarile što brojnije i jače ligand-protein interakcije. U nastavku se na slikama 20-22 može vidjeti popunjenost aktivnog veznog mjesta proteina 2TCL najuspješnijim ligandima prvog i drugog kruga molekuskog sidrenja. U tablicama 7-9 navedene su i usporedbe njihovih ADMET karakteristika s ADMET karakteristikama početne molekule sintetskog peptidnog inhibitora preuzete iz rada Borkakoti i sur. (1994).



Slika 20. Prikaz hidrofilne/hidrofobne površine proteina 2TCL u kompleksu s ligandom 241 (najuspješniji ligand prvog kruga molekuskog sidrenja). Hidrofobne aminokiseline su označene crvenom bojom, hidrofilne plavom bojom, a neutralne bijelom (izrađeno pomoću programa UCSF Chimera 1.6).

Ligand 241 svojom je veličinom i rasporedom atoma zauzeo velik dio veznog mjesta proteina 2TCL, popunivši tako većinu hidrofilnih područja u aktivnom mjestu enzima. U Tablici 7. moguće je vidjeti usporedbu strukturnih i ADMET karakteristika molekula početnog sintetskog peptidnog inhibitora i liganda 241.

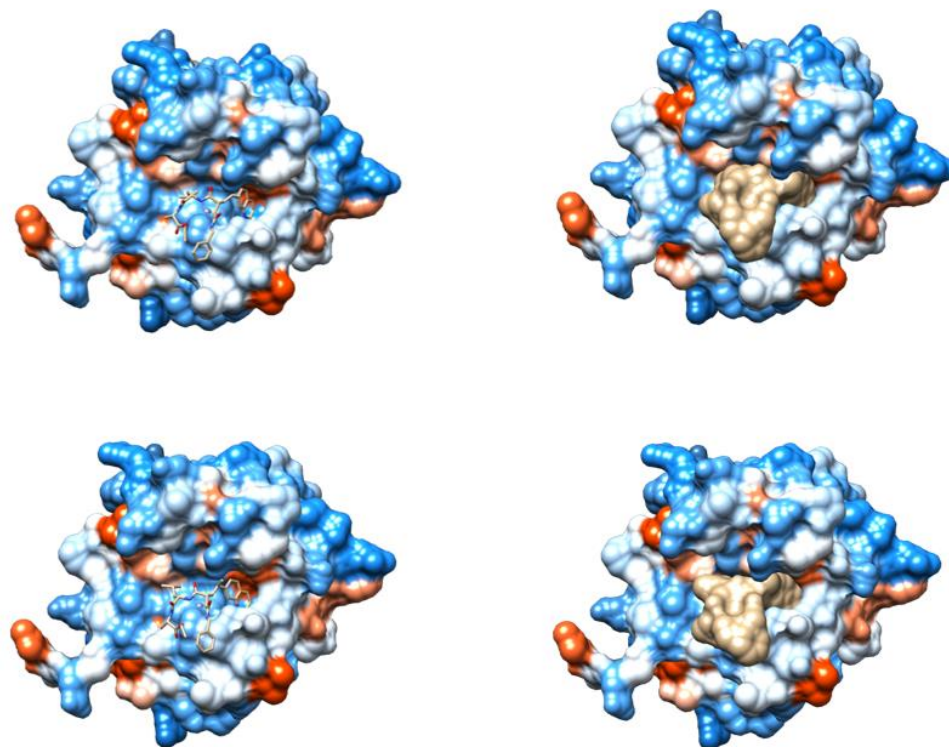
Tablica 7. Prikaz usporedbe strukturnih i ADMET karakteristika molekula početnog sintetskog inhibitora i liganda 241 (rezultati dobiveni pomoću web platforme ADMETlab 2.0).

	početna molekula sintetskog inhibitora	ligand 241
MOLEKULSKI DESKRIPTORI		
molekulska masa (M_w) [Da]	401,25	514,28
broj akceptora vodikovih veza	9	10
broj donora vodikovih veza	4	4
broj rotacijskih veza (nRot)	16	17
broj rigidnih veza (nRig)	4	15
fleksibilnost molekule (nRot/nRig)	4,000	1,133
broj prstenova u strukturi	0	2
broj atoma sadržan u najvećem prstenu	0	10
broj heteroatoma	9	10
formalni naboj	0	0
logP	2,424	3,359
logD	2,342	2,666
ADMET KARAKTERISTIKE		
Lipinskijeva pravila	+	+
P-gp inhibitor	+++	+++
P-gp supstrat	++	++
vezanje za proteine plazme (%)	43,325%	81,913%
volumen raspodjele	0,666	0,584
prolazak KMB	--	--
metabolizam	ne ide preko CYP enzima	CYP3A4 inhibitor
hepatotoksičnost	+	++
karcinogenost	---	--
respiratorna toksičnost	--	-

Promatrajući molekulske deskriptore, može se doći do zaključka da je ligandu 241, kako bi postao pravi lijek u smislu praktične primjene, potrebno dodatno optimizirati određena svojstva. Primjerice, preferira se da broj rotacijskih veza bude do 11 (u slučaju liganda 241 on iznosi 17), poželjan logP (kao mjera lipofilnosti molekule) je niži od 3 (3,359 kod liganda 241), uz to je ligand 241 i slab inhibitor CYP3A4 enzima, što ne mora nužno biti klinički značajno, ali je važno spomenuti s obzirom na to da može uzrokovati povišenje koncentracije lijekova u serumu koji se u organizmu putem tog enzima metaboliziraju. Također, jak je inhibitor, a ujedno i supstrat P-glikoproteina, što nije baš željena karakteristika lijeka (mogućnost povišene serumske koncentracije drugih lijekova i tvari u organizmu koje P-gp eliminira iz stanica putem efluksnog sustava (www.uptodate.com)). Uz sve prethodno navedeno, ima i visok stupanj vezanja za proteine plazme (gotovo 82%).

S druge strane ligand 241 posjeduje i neke dobre karakteristike, npr. nije karcinogen, ne prelazi krvno-moždanu barijeru te slijedi Lipinskijeva pravila, koja govore o vjerojatnosti da je lijek prikladan za oralnu primjenu kod ljudi). Lipinskijeva „pravila petice“ obuhvaćaju sljedeće uvjete: broj donora vodikovih veza ≤ 5 , broj akceptora vodikovih veza ≤ 10 , $M_w < 500$ i logP

≤ 5 (Lipinski i sur., 2001). Ukoliko jedno od svojstava molekule ne odgovara Lipinskijevim pravilima (u ovom slučaju M_w , koja iznosi 514,28) i dalje se smatra da su Lipinskijeva pravila zadovoljena, međutim, ukoliko više od jednog svojstva ne slijedi uvjete, smatra se da će to dovesti do lošije apsorpcije i/ili permeabilnosti samog lijeka. (www.admetmesh.scbdd.com)



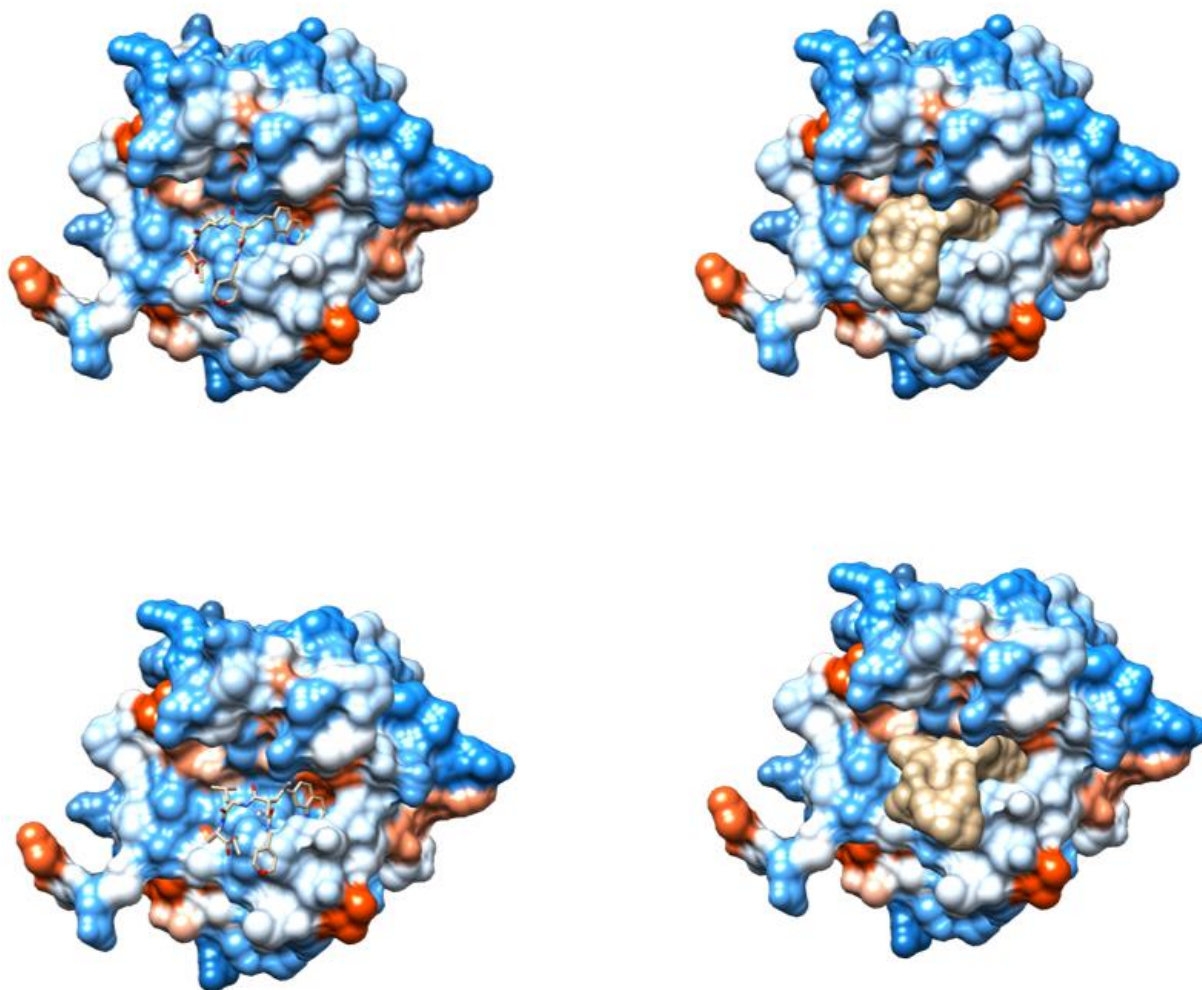
Slika 21. Prikaz hidrofилne/hidrofobne površine proteina 2TCL u kompleksu s prvom (gore) i drugom (dolje) konformacijom liganda 157 (jedan od dva najuspješnija liganda drugog kruga molekuskog sidrenja). Hidrofobne aminokiseline su označene crvenom bojom, hidrofилne plavom bojom, a neutralne bijelom (izrađeno pomoću programa UCSF Chimera 1.6).

Ligand 157 još bolje popunjava aktivno mjesto enzima 2TCL, odnosno zauzima još i veći udio hidrofилnog područja veznog mjesta enzima. Njegove dvije konformacije, zbog razlike u fleksibilnom dijelu molekule, ostvaruju jednu različitu interakciju. Jedna od konformacija stvara dodatnu π -sigma interakciju s His122, dok druga ostvaruje vodikovu vezu s His128. Tablica 8 prikazuje usporedbu strukturnih i ADMET karakteristika liganda 241 i liganda 157.

Tablica 8. Prikaz usporedbe strukturnih i ADMET karakteristika liganda 241 i liganda 157 (rezultati dobiveni pomoću web platforme ADMETlab 2.0).

	ligand 241	ligand 157
MOLEKULSKI DESKRIPTORI		
molekulska masa (M_w) [Da]	514,28	588,33
broj akceptora vodikovih veza	10	9
broj donora vodikovih veza	4	3
broj rotacijskih veza (nRot)	17	19
broj rigidnih veza (nRig)	15	21
fleksibilnost molekule (nRot/nRig)	1,133	0,905
broj prstenova u strukturi	2	3
broj atoma sadržan u najvećem prstenu	10	10
broj heteroatoma	10	9
formalni naboj	0	0
logP	3,359	5,065
logD	2,666	4,159
ADMET KARAKTERISTIKE		
Lipinskijeva pravila	+	-
P-gp inhibitor	+++	+++
P-gp supstrat	++	---
vezanje za proteine plazme (%)	81,913%	95,931%
volumen raspodjele	0,584	0,370
prolazak KMB	--	---
metabolizam	CYP3A4 inhibitor	CYP2C19 inhibitor, CYP2C9 inhibitor, CYP3A4 inhibitor
hepatotoksičnost	++	+++
karcinogenost	--	---
respiratorna toksičnost	-	--

Što se tiče liganda 157, neke ADMET karakteristike su poboljšane u odnosu na ligand 241; još je manje karcinogen i respiratorno toksičan te manje prelazi krvno-moždanu barijeru. Međutim, ligand 157 ne slijedi Lipinskijeva pravila (zbog molekulske mase koja prelazi 500 Da i logP koji je iznad 5), inhibitor je više CYP enzima (i to onih vrlo značajnih za metabolizam lijekova: CYP2C19, CYP2C9 te CYP3A4), u višem se postotku veže za proteine plazme (čak 96%) te mu je povećana hepatotoksičnost.



Slika 22. Prikaz hidrofилne/hidrofobne površine proteina 2TCL u kompleksu s konformacijama liganda 303 (jedan od dva najuspješnija liganda drugog kruga molekuskog sidrenja). Hidrofobne aminokiseline su označene crvenom bojom, hidrofилne plavom bojom, a neutralne bijelom (izrađeno pomoću programa UCSF Chimera 1.6).

Ligand 303 je na gotovo jednak način uklopljen u aktivno mjesto proteina 2TCL zbog iznimne sličnosti s ligandom 157 (razlikuju se isključivo u šesteročlanom aromatskom prstenu – kod liganda 157 to je benzen, dok je kod liganda 303 benzen zamijenjen piranom). U Tablici 9 se može vidjeti usporedba njihovih strukturnih i ADMET svojstava.

Tablica 9. Prikaz usporedbe strukturnih i ADMET karakteristika liganda 157 i liganda 303 (rezultati dobiveni pomoću web platforme ADMETlab 2.0)

	ligand 157	ligand 303
MOLEKULSKI DESKRIPTORI		
molekulska masa (M_w) [Da]	588,33	592,33
broj akceptora vodikovih veza	9	10
broj donora vodikovih veza	3	3
broj rotacijskih veza (nRot)	19	19
broj rigidnih veza (nRig)	21	21
fleksibilnost molekule (nRot/nRig)	0,905	0,905
broj prstenova u strukturi	3	3
broj atoma sadržan u najvećem prstenu	10	10
broj heteroatoma	9	10
formalni naboj	0	0
logP	5,065	3,970
logD	4,159	3,589
ADMET KARAKTERISTIKE		
Lipinskijeva pravila	-	+
P-gp inhibitor	+++	+++
P-gp supstrat	---	---
vezanje za proteine plazme (%)	95,931%	74,926%
volumen raspodjele	0,370	0,635
prolazak KMB	---	-
metabolizam	CYP2C19 inhibitor, CYP2C9 inhibitor, CYP3A4 inhibitor	CYP2C9 inhibitor, CYP3A4 inhibitor
hepatotoksičnost	+++	+++
karcinogenost	---	+++
respiratorna toksičnost	--	++

Bez obzira na iznimnu sličnost strukture liganda 157 i liganda 303, ipak je došlo do značajnijih promjena svojstava kod liganda 303. Smanjen je obujam metabolizma koji se odvija putem CYP enzima, smanjen je postotak vezanja za proteine plazme (sa 96% na 75%), molekula slijedi Lipinskijeva pravila (snižen je logP koji je sad prihvatljiviji) te se povećao broj akceptora vodikovih veza.

Međutim, uz te sada puno bolje karakteristike, usporedno je došlo i do nedopustivog povećanja karcinogenosti spoja, njegove respiratorne toksičnosti te se između ostaloga i blago povećala vjerojatnost prelaska krvno-moždane barijere.

Ako bi se molekula liganda 303 u budućnosti željela primjenjivati u farmakoterapijske svrhe, potrebno ju je dodatno modificirati na način da se njezina toksikološka svojstva i sigurnosni profil poboljšaju, budući da trenutna svojstva nisu dovoljno sigurna za primjenu u praksi.

5. ZAKLJUČAK

Početna molekula sintetskog peptidnog inhibitora, koja je pronađena u istraživanju Borkakoti i sur. (1994) i za koju se pokazalo da posjeduje inhibicijsko djelovanje na ljudsku kolagenazu fibroblasta (HFC), uzeta je kao molekula uzor za dizajniranje ukupno 765 novih derivata. Oni su potom podvrgnuti visokoprotočnom probiru putem molekuskog sidrenja na aktivno vezno mjesto enzima 2TCL.

Provedenim istraživanjem dobiveni su sljedeći rezultati:

- Najnižu energiju vezanja s aktivnim mjestom enzima, a koja iznosi $\Delta G = -9,2$ kcal mol⁻¹, postižu ligandi 157 i 303. To je razlika od čak 2,8 kcal mol⁻¹ u odnosu na početnu molekulu sintetskog inhibitora koja je imala $\Delta G = -6,4$ kcal mol⁻¹.
- Ligandi 157 i 303 ostvaruju manje vodikovih veza s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima, a više hidrofobnih i elektrostatskih interakcija.
- Računalnim predviđanjem farmakokinetičkih karakteristika, ADMET profili molekula liganada 157 i 303 ne pokazuju bolja svojstva u odnosu na ishodišnu molekulu predloženog sintetskog peptidnog inhibitora iz istraživanja Borkakoti i sur. (1994).

Na temelju dobivenih rezultata energije vezanja, može se zaključiti da su dizajnirani ligandi 157 i 303 vrijedni daljnjih razmatranja u farmakoterapijske svrhe, no uz obaveznu daljnju modifikaciju koja bi poboljšala ADMET svojstva ovih molekula, a posebice njihov sigurnosni profil.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ADMET	apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost
CYP	citokrom P450
HFC	engl. <i>Human Fibroblast Collagenase</i> , humana kolagenaza fibroblasta
KMB	krvno-moždana barijera
log <i>P</i>	logaritam partijskog koeficijenta neke tvari između n-oktanol i fosfatnog pufera pH 7,4
MMP	matriksna metaloproteinaza
<i>M_w</i>	engl. <i>Molecular Weight</i> , molekulska masa
PDB	računalni format datoteke (engl. <i>The Protein Data Bank file format</i>)
P-gp	P-glikoprotein

7. LITERATURA

ADMETlab 2.0, dostupno na: <https://admetmesh.scbdd.com>, pristupljeno: 30.05.2023.

Alcaide-Ruggiero L, Molina-Hernández V, Granados MM, Domínguez JM. Main and Minor Types of Collagens in the Articular Cartilage: The Role of Collagens in Repair Tissue Evaluation in Chondral Defects. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24), 13329.

Al-Atif H. Collagen Supplements for Aging and Wrinkles: A Paradigm Shift in the Fields of Dermatology and Cosmetics. *Dermatol Pract Concept.*, 2022, 12(1), e2022018.

Bagchi D, Misner B, Bagchi M, Kothari SC, Downs BW, Fafard RD, Preuss HG. Effects of orally administered undenatured type II collagen against arthritic inflammatory diseases: a mechanistic exploration. *Int J Clin Pharmacol Res*, 2002, 22(3-4), 101-10.

Barati M, Jabbari M, Navekar R, Farahmand F, Zeinalian R, Salehi-Sahlabadi A, Abbaszadeh N, Mokari-Yamchi A, Davoodi SH. Collagen supplementation for skin health: A mechanistic systematic review. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2020, 00, 1-10.

Bolke L, Schlippe G, Gerß J, Voss W. A Collagen Supplement Improves Skin Hydration, Elasticity, Roughness, and Density: Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Blind Study. *Nutrients*, 2019, 11(10), 2494.

Borkakoti N, Winkler FK, Williams DH, D'Arcy A, Broadhurst MJ, Brown PA, Johnson WH, Murray EJ. Structure of the catalytic domain of human fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Nat. Struct. Biol.*, 1994, 1, 106-110.

Clifford T, Ventress M, Allerton DM, Stansfield S, Tang JCY, Fraser WD, Vanhoecke B, Prawitt J, Stevenson E. The effects of collagen peptides on muscle damage, inflammation and bone turnover following exercise: a randomized, controlled trial. *Amino Acids*, 2019, 51(4), 691-704.

De Miranda RB, Weimer P, Rossi RC. Effects of hydrolyzed collagen supplementation on skin aging: a systematic review and meta-analysis. *Int J Dermatol.*, 2021, 60(12), 1449-1461.

Dill V, Mörgelin M. Biological dermal templates with native collagen scaffolds provide guiding ridges for invading cells and may promote structured dermal wound healing. *Int Wound J*, 2020, 17(3), 618-630.

García-Coronado J, Martínez-Olvera L, Elizondo-Omaña RE, Acosta-Olivo CA, Vilchez-Cavazos F, Simental-Mendía LE, Simental-Mendía M. Effect of collagen supplementation on osteoarthritis symptoms: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Int Orthop*, 2019, 43(3), 531-538.

Honvo G, Lengelé L, Charles A, Reginster J-Y, Bruyère O. Role of Collagen Derivatives in Osteoarthritis and Cartilage Repair: A Systematic Scoping Review With Evidence Mapping. *Rheumatol Ther*, 2020, 7(4), 703-740.

Hydrogen Bond Distances, dostupno na: <https://www.umass.edu/>, pristupljeno: 11.05.2023.

Inhibitors and inducers of P-glycoprotein (P-gp) drug efflux pump, dostupno na: <https://www.uptodate.com>, pristupljeno: 27.05.2023.

Jones RG, Ober CK, Hodge P, Kratochvíl P, Moad G, Vert M. Terminology for aggregation and self-assembly in polymer science (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.*, 2012, 85(2), 463-492.

Kajić, I. (2010) Uloga bioinformatike u dizajniranju lijekova. Seminar. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet elektrotehnike i računarstva

Karas LJ, Wu C-H, Das R, Wu JI-C. Hydrogen bond design principles. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, 2020, 10(6), e1477.

Khatri M, Naughton RJ, Clifford T, Harper LD, Corr L. The effects of collagen peptide supplementation on bodycomposition, collagen synthesis, and recovery from joint injuryand exercise: a systematic review. *Amino Acids*, 2021, 53, 1493–1506.

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 Deliv. Rev.*, 2001, 46, 3-26.

Logožar, I. (2019) Vodikove veze u derivatima enaminona. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (kemijski odsjek)

Martínez-Puig D, Costa-Larrión E, Rubio-Rodríguez N, Gálvez-Martín P. Collagen Supplementation for Joint Health: The Link between Composition and Scientific Knowledge. *Nutrients*, 2023, 15(6), 1332.

Medicinski rječnik: pojam hondrociti, Pliva zdravlje, dostupno na: <https://plivazdravlje.hr>, pristupljeno 20.04.2023.

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009, 30(16), 2785-91.

Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*, 2011, 69(3), 249-56.

Panwar P, Butler GS, Jamroz A, Azizi P, Overall CM, Brömme D. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.*, 2018, 65, 30-44.

Patil R, Das S, Stanley A, Yadav L, Sudhakar A, Varma AK. Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. *PLoS One*, 2010, 5(8), e12029.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.*, 2004, 25(13), 1605–1612.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria:Vienna, Austria 2018.

Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2011, 3(1), a004978.

Skendžić, Lj. (2016) Degenerativne promjene fibroblasta i kolagena uzrokovane kronološkim i fotostarenjem kože. Završni specijalistički rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutskobiokemijski fakultet

Stanić, P. (2021) Jake međumolekulske interakcije – prema kovalentnoj vezi. Seminar. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (kemijski odsjek)

Steiner T. The Hydrogen Bond in the Solid State. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, 41(1), 48–76.

Strength of the Hydrogen Bond, Unacademy, dostupno na: <https://unacademy.com>, pristupljeno: 11.05.2023.

Struktura i funkcija kože, Hrvatska elektronička medicinska edukacija (HeMED), dostupno na: <https://www.hemed.hr>, pristupljeno 14.04.2023.

The Hydrophobic Effect and Entropy Biochemistry MADE SUPER SIMPLE!, 2019, dostupno na: <https://www.youtube.com>, pristupljeno: 15.05.2023.

The Nutrition Source: Collagen, 2021, Harvard T.H. Chan School of Public Health, dostupno na: <https://www.hsph.harvard.edu>, pristupljeno: 12.04.2023.

Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.*, 2010, 31(2), 455-61.

8. SAŽETAK

Uzimajući u obzir čovjekov sve duži životni vijek, javlja se sve veća potreba za održavanjem optimalne razine kolagena tijekom još duljeg perioda života. Padom razine kolagena nakon 25. godine za otprilike 2% godišnje osoba se tijekom procesa starenja susreće s mnogim oslabljenim funkcijama organizma. Promjene su najprije vidljive u obliku boranja kože te njezine smanjene elastičnosti, a kasnije se mogu razviti i razne bolesti zglobova (artritis) s oticanjem i smanjenom pokretljivošću te poremećaji mineralizacije i gustoće kostiju, što sve zajedno dovodi do smanjene kvalitete života.

U ovom trenutku, najistraživanija mogućnost povećanja razine kolagena u organizmu je pomoću dodataka prehrani temeljenih na kolagenu. Tržište je trenutno zasićeno mnogim farmaceutskim oblicima kolagena, koji se dobivaju iz različitih životinjskih, posebice ribljih, izvora.

Cilj ovog istraživanja je skrenuti pažnju na malo drugačiji pristup održavanja koncentracija kolagena u organizmu, koji bi mogao biti puno učinkovitiji u praksi. Budući da je glavni razlog smanjenja razine kolagena u organizmu njegova povećana razgradnja posredovana enzimima matriksnih metaloproteinaza (MMP), smatra se da bi inhibicija upravo tih enzima dovela do sprječavanja razgradnje kolagena u organizmu te bi se na taj način očuvala razina endogenog kolagena tijekom puno duljeg životnog razdoblja.

Postojećim istraživanjem Borkakoti i sur. (1994) pronađen je sintetski peptidni inhibitor koji se veže u katalitičko mjesto enzima humane kolagenaze fibroblasta te posljedično sprječava razgradnju kolagena. Ovaj inhibitor je pokazao dobra i strukturna i ADMET svojstva, koja su poželjna kod razvoja novih lijekova. Vodeći se navedenim saznanjima, cilj ovog istraživanja bio je poboljšati vezanje inhibitora u aktivno mjesto enzima te tako postići jači inhibitoryni učinak. Metodom molekuskog sidrenja ispitivao se inhibitoryni učinak ukupno 765 molekula dizajniranih po uzoru na prethodno nađeni sintetski peptidni inhibitor, pri čemu je njihova struktura prilagođena prirodi aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima.

Rezultati istraživanja pokazuju da ligandi 157 i 303 posjeduju najbolji inhibitoryni učinak na ispitivani enzim s energijom vezanja od $\Delta G = -9,2 \text{ kcal mol}^{-1}$, što je za $2,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ niže od energije vezanja početne molekule sintetskog peptidnog inhibitora. Međutim, navedene

dvije molekule imaju ponešto lošija farmakokinetička svojstva od početne molekule, a ono što se istaknulo posebno lošim je njihov toksikološki profil. Dobivene molekule vrijedne su daljnjeg razmatranja s obzirom na izrazito povoljnu energiju vezanja u aktivno vezno mjesto enzima, međutim da bi bile primjenjive u praksi, moraju proći daljnju optimizaciju prvenstveno toksikoloških, a potom i farmakokinetičkih svojstava.

8. SUMMARY

Given the current trend of longer life expectancy, there is an increasing need to maintain an optimal collagen levels during an even more extended lifespan. Due to a decrease in collagen levels after the age of 25 by approximately 2% per year, a person encounters many weakened body functions during the process of aging. Firstly, changes are visible in the form of skin wrinkles and its reduced elasticity, but later on various joint diseases (like arthritis), as well as mineralization and bone density disorders can develop.

Currently, the most used method to increase collagen levels in the body is through collagen-based dietary supplements. The market offers a wide range of pharmaceutical collagen products derived from various animal (especially fish) sources.

The aim of this research was to draw attention to a slightly different approach to maintaining collagen concentrations in the body, which could be much more effective in practice. Particularly, since the main reason for the decrease in the collagen level in the body is the increased collagen breakdown mediated by matrix metalloproteinases (MMP) enzymes, it is believed that inhibition of these enzymes would lead to a prevention of collagen breakdown in the body, thus preserving the level of endogenous collagen during a much longer life expectancy.

The existing research by Borkakoti et al. (1994) found a synthetic inhibitor that binds to the catalytic site of the human fibroblast collagenase enzyme and consequently prevents collagen degradation. This molecule showed good structural and ADMET properties, desirable in new drug development. Based on these findings, the goal of this research was to improve the binding of the inhibitor to the enzyme active site and thus to achieve a stronger inhibitory effect. Using molecular docking, the inhibitory effect of a total of 765 new molecules was predicted. The molecules were designed based on the model of the previously found synthetic inhibitor and adapted to the nature of amino acid residues in the active site of the enzyme.

The research results show that ligands 157 and 303 have the best inhibitory effect on the tested enzyme with a binding energy of $\Delta G = -9.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, which is $2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ lower than the binding energy of the initial synthetic inhibitor. However, the aforementioned two molecules exhibit slightly inferior pharmacokinetic properties than the initial synthetic

inhibitor, with their toxicological profile being particularly concerning. The resulting molecules are worthy of further consideration due to the very favorable binding energy in the enzyme active site however, in order to be applicable in practice, they must undergo further optimization primarily of toxicological and then pharmacokinetic properties.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Ispitivanje inhibitornog učinka derivata sintetskog peptidnog inhibitora na humanu kolagenazu fibroblasta metodom molekuskog sidrenja

Ana Sentinella-Jerbić

SAŽETAK

Uzimajući u obzir čovjekov sve duži životni vijek, javlja se sve veća potreba za održavanjem optimalne razine kolagena tijekom još duljeg perioda života. Padom razine kolagena nakon 25. godine za otprilike 2% godišnje osoba se tijekom procesa starenja susreće s mnogim oslabljenim funkcijama organizma. Promjene su najprije vidljive u obliku boranja kože te njezine smanjene elastičnosti, a kasnije se mogu razviti i razne bolesti zglobova (artritis) s oticanjem i smanjenom pokretljivošću te poremećaji mineralizacije i gustoće kostiju, što sve zajedno dovodi do smanjene kvalitete života. U ovom trenutku, najistraživanija mogućnost povećanja razine kolagena u organizmu je pomoću dodataka prehrani temeljenih na kolagenu. Tržište je trenutno zasićeno mnogim farmaceutskim oblicima kolagena, koji se dobivaju iz različitih životinjskih, posebice ribljih, izvora. Cilj ovog istraživanja je skrenuti pažnju na malo drugačiji pristup održavanja koncentracija kolagena u organizmu, koji bi mogao biti puno učinkovitiji u praksi. Budući da je glavni razlog smanjenja razine kolagena u organizmu njegova povećana razgradnja posredovana enzimima matriksnih metaloproteinaza (MMP), smatra se da bi inhibicija upravo tih enzima dovela do sprječavanja razgradnje kolagena u organizmu te bi se na taj način očuvala razina endogenog kolagena tijekom puno duljeg životnog razdoblja. Postojećim istraživanjem Borkakoti i sur. (1994) pronađena je sintetski inhibitor koji se veže u katalitičko mjesto enzima humane kolagenaze fibroblasta te posljedično sprječava razgradnju kolagena. Ovaj inhibitor je pokazao dobra i strukturna i ADMET svojstva, koja su poželjna kod razvoja novih lijekova. Vodeći se navedenim saznanjima, cilj ovog istraživanja bio je poboljšati vezanje inhibitora u aktivno mjesto enzima te tako postići jači inhibitorni učinak. Metodom molekuskog sidrenja ispitivao se inhibitorni učinak ukupno 765 molekula dizajniranih po uzoru na prethodno nađeni sintetski inhibitor, pri čemu je njihova struktura prilagođena prirodni aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima. Rezultati istraživanja pokazuju da ligandi 157 i 303 posjeduju najbolji inhibitorni učinak na ispitivani enzim s energijom vezanja od $\Delta G = -9,2$ kcal mol⁻¹, što je za 2,8 kcal mol⁻¹ niže od energije vezanja početne molekule sintetskog inhibitora. Međutim, navedene dvije molekule imaju ponešto lošija farmakokinetička svojstva od početne molekule, a ono što se istaknulo posebno lošim je njihov toksikološki profil. Dobivene molekule vrijedne su daljnjeg razmatranja s obzirom na izrazito povoljnu energiju vezanja u aktivno vezno mjesto enzima, međutim da bi bile primjenjive u praksi, moraju proći daljnju optimizaciju prvenstveno toksikoloških, a potom i farmakokinetičkih svojstava.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 22 grafičkih prikaza, 9 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Gljučne riječi: kolagen, humana kolagenaza fibroblasta, 2TCL, molekuskog sidrenje

Mentor: **Doc. Dr. sc. Hrvoje Rimac**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. Dr. sc. Kristina Pavić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Doc. Dr. sc. Hrvoje Rimac**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. Dr. sc. Kristina Pavić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. Dr. sc. Mirela Matić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj, 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

A molecular docking study of synthetic peptide inhibitor derivatives as potential human fibroblast collagenase inhibitors

Ana Sentinella-Jerbić

SUMMARY

Given the current trend of longer life expectancy, there is an increasing need to maintain an optimal collagen levels during an even more extended lifespan. Due to a decrease in collagen levels after the age of 25 by approximately 2% per year, a person encounters many weakened body functions during the process of aging. Firstly, changes are visible in the form of skin wrinkles and its reduced elasticity, but later on various joint diseases (like arthritis), as well as mineralization and bone density disorders can develop. Currently, the most used method to increase collagen levels in the body is through collagen-based dietary supplements. The market offers a wide range of pharmaceutical collagen products derived from various animal (especially fish) sources. The aim of this research was to draw attention to a slightly different approach to maintaining collagen concentrations in the body, which could be much more effective in practice. Particularly, since the main reason for the decrease in the collagen level in the body is the increased collagen breakdown mediated by matrix metalloproteinases (MMP) enzymes, it is believed that inhibition of these enzymes would lead to a prevention of collagen breakdown in the body, thus preserving the level of endogenous collagen much during a much longer life expectancy. The existing research by Borkakoti et al. (1994) found a synthetic inhibitor that binds to the catalytic site of the human fibroblast collagenase enzyme and consequently prevents collagen degradation. This molecule showed good structural and ADMET properties, desirable in new drug development. Based on these findings, the goal of this research was to improve the binding of the inhibitor to the enzyme active site and thus to achieve a stronger inhibitory effect. Using molecular docking, the inhibitory effect of a total of 765 new molecules was predicted. The molecules were designed based on the model of the previously found synthetic inhibitor and adapted to the nature of amino acid residues in the active site of the enzyme. The research results show that ligands 157 and 303 have the best inhibitory effect on the tested enzyme with a binding energy of $\Delta G = -9.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, which is $2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ lower than the binding energy of the initial synthetic inhibitor. However, the aforementioned two molecules exhibit slightly inferior pharmacokinetic properties than the initial synthetic inhibitor, with their toxicological profile being particularly concerning. The resulting molecules are worthy of further consideration due to the very favorable binding energy in the enzyme active site however, in order to be applicable in practice, they must undergo further optimization primarily of toxicological and then pharmacokinetic properties.

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

Thesis includes: 47 pages, 22 figures, 9 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: collagen, human fibroblast collagenase, 2TCL, molecular docking

Mentor: **Hrvoje Rimac, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Pavić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Hrvoje Rimac, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Pavić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2023