

VILNIAUS UNIVERSITETO
FIZIKOS FAKULTETO
CHEMINĖS FIZIKOS INSTITUTAS

ERNESTAS URNIEŽIUS
**SULFONAMIDINIŲ JUNGINIŲ SAŲVEIKOS SU ŽMOGAUS KARBOANHIDRAZIŲ
IZOFORMOMIS ATPAŽINIMO, JUNGIMOSI GIMININGUMO IR SELEKTYVUMO
TYRIMAS**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Gyvybės ir cheminės fizikos studijų programa

Studentas

Ernestas Urniežius

Darbo vadovas

Prof. dr. Daumantas Matulis

Recenzentas

Doc. dr. Vytautas Klimavičius

Instituto direktorius

Prof. dr. (HP) Valdas Šablinskas

Vilnius 2022

Turinys

PADĖKA	3
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Karboanhidrazės	7
1.1.1. Karboanhidrazių klasės.....	7
1.1.2. Katalizinės savybės	9
1.1.3. CA slopinimas ir aktyvinimas	11
1.1.4. Biomedicininiai ir biotechnologiniai CA taikymai	13
1.2. Vaistų kūrimas.....	15
1.2.1. Vaistų savybės	15
1.2.2. Sulfonamidinių junginių taikymas ieškant CA slopiklių.....	19
1.3. Biofizikinių metodų, naudojamų vaistų kūrime, apžvalga	21
1.4. Biotermodinaminiai sąveikų parametrai vaistų kūrime.....	25
2. METODIKA	28
2.1. Junginių struktūrų virtuali atranka.....	30
2.2. Molekulių struktūrų panašumo žemėlapiai ir automatizuotas pakaitų žymėjimas.....	33
2.3. Koreliaciniai žemėlapiai ir grafikai	35
2.4. Ligandų selektyvumo baltymui įvertinimas	36
2.5. Molekulinio dokavimo metodika ir protokolai.....	37
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	40
3.1. Atrinkti sulfonamidiniai junginiai, pasižymintys didžiausiu jungimosi giminingumu CA II atžvilgiu	42
3.2. Koreliacijų tarp ligandų cheminių struktūrų ir jungimosi biotermodinamikos analizė.....	44
3.2.1. EA junginių grupės struktūros-afiniškumo koreliacijų analizė	47
3.2.2. VD junginių grupės struktūros-afiniškumo koreliacijų analizė.....	55
3.2.3. E junginių grupės struktūros-afiniškumo koreliacijų analizė	58
3.3. Molekulinio dokavimo rezultatai	62
4. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS IR DISKUSIJA.....	67
IŠVADOS	70
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	71
SANTRAUKA.....	81
SUMMARY	82
5. PRIEDAI	83
5.1. Struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo sugrupuotų koreliacijų diagramos	83
5.2. Potencialių naujų junginių struktūrų, identifikuotų po struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų analizės, molekulinio dokavimo rezultatai.	95

PADĖKA

Esu labai dėkingas savo darbo vadovui **prof. Daumantui Matuliui** už galimybę prisijungti prie **Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriaus** veiklos ir atlikti jame savo magistro baigiamąjį darbą. Taip pat už profesionalumą, pasitikėjimą, dėmesį, pozityvumą ir visus naudingus patarimus bei pastabas, kurios labai padėjo tobulinant *in silico* tyrimų metodikų pritaikymą, analizuojant biofizikines sąveikas, jų biotermodinaminius duomenis bei ruošiant šį baigiamąjį darbą.

Taip pat norėčiau padėkoti **dr. Editai Čapkauskaitei** už diskusijas ir patarimus, siekiant suprasti ir įvertinti sąveikas bei junginius iš organinės chemijos srities pusės.

Labai dėkoju doktorantei **Vaidai Paketurytei – Latvei** už apmokymą naudotis eksperimentiniais fluorescencinio terminio poslinkio ir izoterminės titravimo kalorimetrijos matavimų metodais, nustatant sąveikų biotermodinaminius parametrus ir visus naudingus patarimus analizuojant biofizikines sąveikas ir jų parametrus.

Taip pat dėkoju visam **Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriaus kolektyvui** už profesionalumą, gerą darbinę atmosferą ir naudingus patarimus bei įžvalgas diskusijų metu ir sukauptas žinias, be kurių nebūtų įmanoma atlikti šio darbo.

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

CA – karboanhidrazė

hCA – žmogaus karboanhidrazė

SPR – paviršiaus plazmonų rezonansas (angl. *Surface Plasmon Resonance*)

ITC – izoterminė titravimo kalorimetrija (angl. *Isothermal Titration Calorimetry*)

FTSA – fluorescencinis terminio poslinkio metodas (angl. *Fluorescence Thermal Shift Assay*)

BMR – branduolių magnetinis rezonansas (angl. *Nuclear Magnetic Resonance*)

MS – masių spektrometrija (angl. *Mass Spectrometry*)

T – Tanimoto koeficientas

AZM – acetazolamidas (angl. *Acetazolamide*)

BZM – brinzolamidas (angl. *Brinzolamide*)

DZM – dorzolamidas (angl. *Dorzolamide*)

EZA – etokszolamidas (angl. *Ethoxzolamide*)

ΔG – jungimosi Gibso energijos pokytis

ΔH – jungimosi entalpijos pokytis

ΔS – jungimosi entropijos pokytis

ΔG_{obs} – stebimosios jungimosi Gibso energijos pokytis

ΔG_{int} – tikrosios (intrinsinės) jungimosi Gibso energijos pokytis

K_b – jungimosi konstanta

K_d – disociacijos konstanta

K_m – Michaelio konstanta

k_{kat} – katalizinė konstanta

k_{on} – asociacijos spartos konstanta

k_{off} – disociacijos spartos konstanta

pK_a – protonizacijos konstanta (rūgšties disociacijos konstantos neigiamas logaritmas).

Me – metil

Ph – fenil

ND – nenustatyta vertė (angl. *not determined*)

IVADAS

Fermentai, kurių sudėtyje yra randami metalų jonai, ir jų slopikliai bei aktyvatoriai yra plačiai tyrinėjami ieškant pritaikymų biotechnologijos, gyvybės mokslų ir vaistų kūrimo srityse. Karboanhidrazės (CA) yra fermentai, kurių aktyviajame centre dažniausiai yra randamas cinko jonas ir kurie katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją į bikarbonatą ir protonus. CO₂ hidratacijos reakcija yra gyvybiškai svarbi įvairiems fiziologiniams ir biologiniams procesams. Dėl šios priežasties, karboanhidrazių izoformos tapo populiariu įvairių slopiklių, kurių pagrindu kuriami nauji vaistai, taikiniu.

Baltymų-ligandų sąveikos biotermodinamikos ir kinetikos tyrimuose bei vaistų kūrime yra naudojami įvairūs metodai, tačiau pagrindiniai šiuo metu taikomi biofizikiniai metodai yra: paviršiaus plazmonų rezonansas (SPR), izoterminė titravimo kalorimetrija (ITC), fluorescencinis terminio poslinkio metodas (FTSA), masių spektrometrija (MS) ir branduolių magnetinis rezonansas (BMR). *In silico* tyrimuose naudojami tokie metodai, kaip molekulinės dinamikos kompiuterinės simuliacijos, skirtos analizuoti atomų ir molekulių judėjimą ir molekulinis dokinimas, leidžiantis prognozuoti ligando jungimosi su baltymu konformacijas ir jungimosi energijas.

Potencialūs vaistai turėtų pasižymėti dideliu jungimosi giminingumu, specifiškumu ir selektyvumu vienai žmogaus karboanhidrazės izoformai ir neinhibuoti kitų svarbių izoformų, kurios nėra taikyns. Viena iš pagrindinių priežasčių, kodėl yra reikalingi atrankūs karboanhidrazių izoformų inhibitoriai, tai yra siekis, jog potencialus vaistas nesukeltų šalutinių efektų ir toksiško poveikio. Populiariausi šiuo metu tyrinėjami CA slopikliai yra sulfonamidiniai junginiai. Kadangi sulfonamidiniai CA inhibitoriai susiduria su selektyvumo konkrečioms karboanhidrazių izoformoms trūkumu, tam, kad jie būtų sėkmingai pritaikomi farmacijoje, reikia optimizuoti jų atrankumą ir specifiškumą konkreitiems izofermentams. Paieška būdų, kaip galima būtų optimizuoti ligandų chemines struktūras ir, remiantis struktūrinių pokyčių daroma įtaka biotermodinaminiais parametrais, jungimosi giminingumui bei selektyvumo pokyčiams, pagerinti atrankumą konkrečios izoformos atžvilgiu, yra vienas iš pagrindinių potencialių vaistų kandidatų kūrimo etapų.

Šiame darbe yra pateikiamas sulfonamidinių ligandų atpažinimo, jungimosi giminingumo ir selektyvumo žmogaus karboanhidrazių izoformoms tyrimas. Darbas atliktas Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje. Analizuojami duomenys yra gauti iš šiame skyriuje sukurtos ir tiriamos ligandų bibliotekos. Baltymų ir vaistų tyrimų skyriuje gaminami taikiniai - rekombinantinės karboanhidrazės, sintetiniai ligandai su tikslu rasti selektyvius slopiklius šiems taikiniams ir atliekami molekulinės biofizikos tyrimai, siekiant išmatuoti ligandų sąveikos su karboanhidrazėmis biotermodinaminis, kinetinius bei struktūrinius parametrus ir įvertinti parametru bei junginių struktūrų koreliacijas, siekiant sukurti naujus potencialius junginius.

Darbo tikslas:

Ištirti sulfonamidinių junginių atpažinimą, jungimosi giminingumą ir selektyvumą žmogaus karboanhidrazės II izoformai.

Darbo uždaviniai:

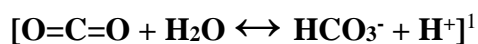
1. Apdoroti sulfonamidinių ligandų sąveikos su karboanhidrazių izoformomis biotermodinaminių parametrų, išmatuotų fluorescencinio terminio poslinkio metodu, duomenis, esančius tiriamoje ligandų bibliotekoje, atpažinimo, jungimosi giminingumo (afiniškumo) ir selektyvumo analizei.
2. Cheminės informatikos, bioinformatikos ir duomenų analizės metodų pritaikymas junginių cheminių struktūrų *in silico* atrankai, atvaizdavimui bei analizei ir ligandų atpažinimo, jungimosi giminingumo ir selektyvumo žmogaus karboanhidrazių izoformoms tyrimui.
3. Pritaikytais metodais ištirti sulfonamidinių junginių atpažinimą, jungimosi giminingumą ir atrankumą CA II visų kitų izoformų atžvilgiu, remiantis struktūros-afiniškumo (SAR) bei struktūros – selektyvumo koreliacijomis.
4. Įvertinus struktūros-afiniškumo bei struktūros-selektyvumo koreliacijų analizės metu gautus rezultatus ir išvadas, pasiūlyti galimas modifikacijas junginių cheminėse struktūrose arba naujas ligandų struktūras, kurios galėtų pasižymėti stipria ir selektyvia sąveika su CA II, ir molekulinio dokavimo metodu įvertinti potencialiausias iš jų.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karboanhidrazės

CO₂ yra labai svarbi molekulė visuose gyvybės procesuose ir, kadangi ji gaminama dideliais kiekiais daugelyje organizmų [1]–[5], išsivystė natūralūs katalizatoriai (fermentai), skirti tam, kad CO₂ organizme virstų į bikarbonatą.

Karboanhidrazės (CA) – tai fermentai, kurių aktyviajame centre dažniausiai yra randamas cinko jonas ir kurie egzistuoja visose gyvųjų organizmų karalystėse. Jie katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją¹ į bikarbonatą ir protonus. Tokio tipo reakcija yra labai svarbi įvairiems fiziologiniams procesams, kadangi rūgščių ir šarmų pusiausvyros (pH) homeostazė yra būtina gyvybei palaikyti.



Karboanhidrazės buvo atrastos 1933 metais nepriklausomai dviejų skirtingų mokslininkų grupių iš JAV (Pensilvanijos universiteto) [6] ir Jungtinės Karalystės (Kembrižo universiteto) [7]. Fermentai, kurių aktyviajame centre yra randami metalų jonai, ir jų aktyvumo modulatoriai (slopikliai ir aktyvatoriai) yra plačiai tyrinėjami ieškant taikymų tokiose srityse kaip biotechnologijos, gyvybės mokslai ir vaistų kūrimas.

Karboanhidrazės priklauso fermentų grupei, kurie yra vaistų, veikiančių kaip jų izofermentų slopikliai, taikynys ir taip pat katalizatorius biotechnologiniuose taikymuose, tokiuose procesuose, kaip pavyzdžiui CO₂ surinkimas. CA izofermentų inhibitorių pagrindu kuriami nauji vaistai yra pritaikomi, kaip įvairių ligų gydymo ir terapijos priemonės (pvz.: diuretikai, antiglaukominiai preparatai, vaistai nuo epilepsijos, nutukimo, priešvėžiniai vaistai ir t.t.).

1.1.1. Karboanhidrazių klasės

Organizmams visose gyvosios gamtos karalystėse (Bakterijų, Archėjų ir Eukarijų) reikia karboanhidrazių, kad galėtų suvaldyti ir apdoroti didelius CO₂ kiekius, susidariusius metabolinių reakcijų metu. CO₂ organizme yra apdorojamas jau anksčiau minėtos grįžtamos hidratacijos reakcijos į bikarbonatą ir protonus, o šį CO₂ virsmą, kai gaunami vandenyje tirpūs produktai iš lipofilinių dujų, katalizuoja būtent karboanhidrazės.

Dėl konvergentinės evoliucijos proceso, organizmai žemėje išvystė mažiausiai penkias skirtingas tokių fermentų šeimas: the α-CA, β-CA, γ-CA, δ-CA ir ζ-CA, ne tik tam, kad gebėtų susitvarkyti su dideliais kiekiais CO₂, susiformavusiais medžiagų apykaitos procesuose, bet ir valdyti galimus su tuo susijusius rūgščių ir šarmų pusiausvyros sutrikimus, atsižvelgiant į tai, kad anglies dioksido grįžtamojo hidratacijos reakcijoje susidarę produktai yra stiprų buferinį aktyvumą turintis

jonas (bikarbonatas), taip pat rūgštis (H^+ jonai). pH reguliavimas yra labai svarbus procesas visose gyvybės formose, nes daugelį biocheminių reakcijų pH griežtai reguliuoja.

α -CA daugiausia yra pasiskirsčiusi stuburiniuose gyvūnuose, grybuose, pirmuonyse, koraluose, dumbliuose ir žaliųjų augalų citoplazmoje, taip pat kai kuriose bakterijose. β -CA buvo rasta bakterijose, dumbliuose ir daugumoje grybų bei Archėjų. γ -CA buvo aprašyti Archėjuose, bakterijose ir augaluose. δ -CA randama jūriniame fitoplanktone, diatominiuose dumbliuose ir taip prisideda prie CO_2 perdirbimo. ζ -CA kol kas identifikuota tik jūriniuose diatominiuose dumbliuose (titnagdumbliai).

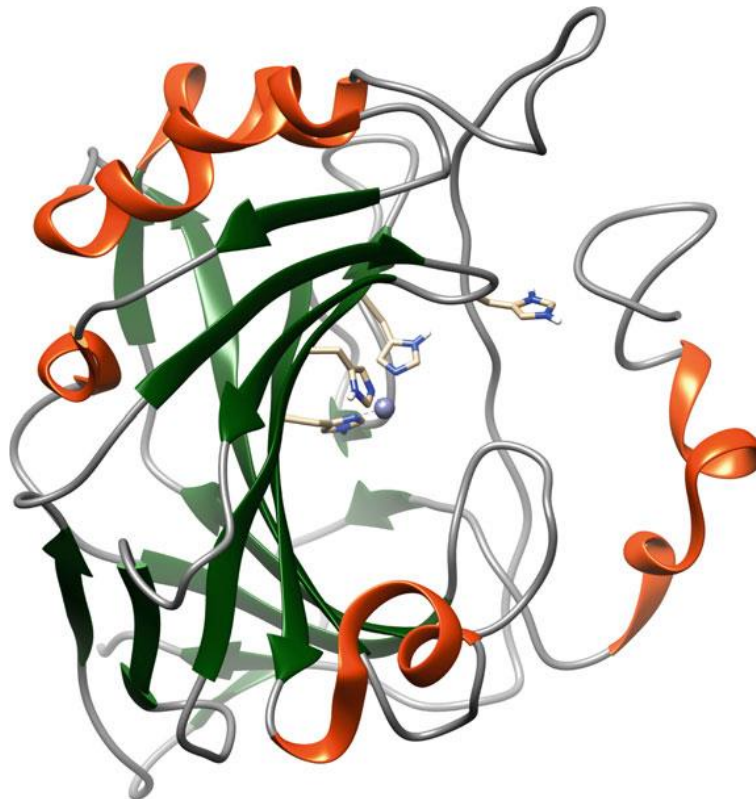
Visuose šiuose organizmuose CA atlieka svarbų fiziologinį vaidmenį, susijusį su: pH ir CO_2 homeostaze, CO_2 ir bikarbonato kvėpavimu bei transportavimu, elektrolitų sekrecija daugelyje audinių ir organų, biosintezės reakcijomis (pvz., gliukoneogenezė, lipogenezė ir ureagenezė, kai karboksilinimo reakcijos substratas veikia ne CO_2 , o bikarbonatą), kaulų rezorbcija, kalkėjimu ir tumorigeniškumu (visi šie procesai buvo išsamiai ištirti su stuburiniais gyvūnais). Dumbliuose, augaluose ir cianobakterijose CA vaidina svarbų vaidmenį fotosintezėje, koncentruodami CO_2 ir bikarbonatą. 1.1 lentelėje yra pateikti kinetiniai CO_2 hidratacijos reakcijos parametrai, kuriuos katalizuoja skirtingos CA, priklausančios įvairioms klasėms.

1.1 lentelė. Kinetiniai CO_2 hidratacijos reakcijos parametrai, kuriuos katalizuoja skirtingos CA, priklausančios įvairioms šeimoms [8]. Slopinimo duomenys su medicinoje pritaikomu sulfonamidu acetazolamidu taip pat pateikiami.

Izofermentas	Klasė	Organizmas	k_{kat} (s^{-1})	k_{kat}/K_m ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	K_i (acetazolamide) (nM)
hCA II	α	Žmogus	$1,4 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	12
SazCA	α	Bakterijos	$4,4 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	0.9
Can2	β	Grybelis	$3,9 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^7$	10.5
FbiCA 1	β	Augalai	$1,2 \cdot 10^8$	$7,5 \cdot 10^6$	27
PgiCA	γ	Bakterijos	$4,1 \cdot 10^8$	$5,4 \cdot 10^7$	324
TweCA	δ	Diatominiai dumbliai	$1,3 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^7$	83
Cd(II)-R1	ζ	Diatominiai dumbliai	$1,5 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$	82
Zn(II)-R1	ζ	Diatominiai dumbliai	$1,4 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	58

1.1.2. Katalizinės savybės

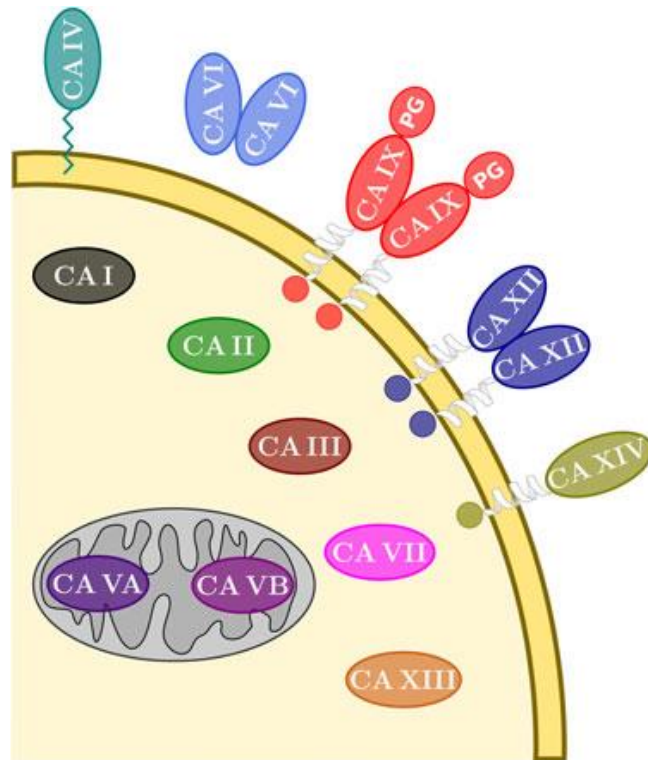
1972 metais buvo nustatyta pirmoji hCA II izoformos kristalinė struktūra [9]. Visos žmogaus karboanhidrazių izoformos turi didelį struktūrinį panašumą [10]. Jos turi apytiksliai 15 angstromų gylio kūgio formos aktyviojo centro plyšį, kur cinko jonas yra koordinuojamas trijų histidino liekanų His94, His96 ir His119 (amino rūgštys sunumeruotos pagal CA II) CA aktyviojo centro apatinėje dalyje [11]. Baltymas turi būdingą dešimties grandžių antiparalelinę β -klostę, papildytą keletu α -spiralių ir papildomų β -gijų (1.1 pav.).



1.1 pav. Žmogaus CA II izoformos struktūra [11].

Metalo jonas, šiuo atveju Zn^{2+} α klasės CA atveju, yra būtinas katalizei. α -CA yra labai universalios, jos gali katalizuoti įvairius kitus hidrolizinius procesus. α -CA katalizinis mechanizmas yra suprantamas išsamiai: aktyvusis centras susideda iš Zn^{2+} jono, kurį koordinuoja trys histidino liekanos, ir vandens molekulės arba hidroksido jono.

Žinduoliuose buvo aprašyta 15 skirtingų α -CA izoformų arba su CA susijusių baltymų (CARP), iš kurių 12 pasižymi kataliziniu aktyvumu ir kurių vietos ląstelėje (1.2 pav.) bei pasiskirstymas audiniuose ir organuose (1.2 lentelė) yra skirtingi.



1.2 pav. 12 katalitiškai aktyvių žmogaus karboanhidrazių izoformų pasiskirstymo vietos ląstelėje [12].

1.2 lentelė. Kinetiniai CO₂ hidratacijos reakcijos, katalizuojamos 15 žinduolių α -CA izofermentų (20 °C temperatūroje ir pH esant 7.5), parametrai, jų inhibavimo su AZM (acetazolamidas) duomenys (K_I) ir vieta ląstelėje bei pasiskirstymas audiniuose ir organuose (adaptuota iš [13], [14]). Čia k_{kat} – katalizinė konstanta, K_m – Michaelio konstanta.

Izofermentas	k_{kat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{kat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)	K_I (nM)	Vieta ląstelėje	Vieta audiniuose/organuose
hCA I	$2,0 \cdot 10^5$	4,0	$5,0 \cdot 10^7$	250	Citozolis	Eritrocitai, virškinamasis traktas
hCA II	$1,4 \cdot 10^6$	9,3	$1,5 \cdot 10^8$	12	Citozolis	Eritrocitai, akys, virškinamasis traktas, kaulų osteoklastai, inkstai, plaučiai, sėklidės, smegenys
hCA III	$1,0 \cdot 10^4$	33,3	$3,0 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	Citozolis	Skersaruožiai raumenys, adipocitai
hCA IV	$1,1 \cdot 10^6$	21,5	$5,1 \cdot 10^7$	74	Prisijungusi prie membranos	Inkstai, plaučiai, kasa, smegenų kapiliarai, gaubtinė žarna, širdies raumenys
hCA VA	$2,9 \cdot 10^5$	10,0	$2,9 \cdot 10^7$	63	Mitochondrijos	Kepenys
hCA VB	$9,5 \cdot 10^5$	9,7	$9,8 \cdot 10^7$	54	Mitochondrijos	Širdies ir raumenys, kasa, inkstai, nugaros smegenys, virškinamasis traktas
hCA VI	$3,4 \cdot 10^5$	6,9	$4,9 \cdot 10^7$	11	Sekretuojama (seilės/pienas)	Seilių ir pienu liaukos
hCA VII	$9,5 \cdot 10^5$	11,4	$8,3 \cdot 10^7$	2,5	Citozolis	Centrinė nervų sistema
hCA VIII*	-	-	-	-	Citozolis	Centrinė nervų sistema
hCA IX	$3,8 \cdot 10^5$	6,9	$5,5 \cdot 10^7$	25	Transmembraninė	Navikai, virškinamojo trakto gleivinė
hCA X*	-	-	-	-	Citozolis	Centrinė nervų sistema

hCA XI*	-	-	-	-	Citozolis	Centrinė nervų sistema
hCA XII	$4,2 \cdot 10^5$	12,0	$3,5 \cdot 10^7$	5,7	Transmembraninė	Inkštų, žarnyno ir reprodukinių organų epitelis, akys, navikai
hCA XIII	$1,5 \cdot 10^5$	13,8	$1,1 \cdot 10^7$	16	Citozolis	Inkstai, smegenys, plaučiai, žarnynas, reprodukciniai organai
hCA XIV	$3,1 \cdot 10^5$	7,9	$3,9 \cdot 10^7$	41	Transmembraninė	Inkstai, smegenys, kepenys

*h – žmogaus; * - hCA VIII, hCA X ir hCA XI yra katalitiškai neaktyvios.*

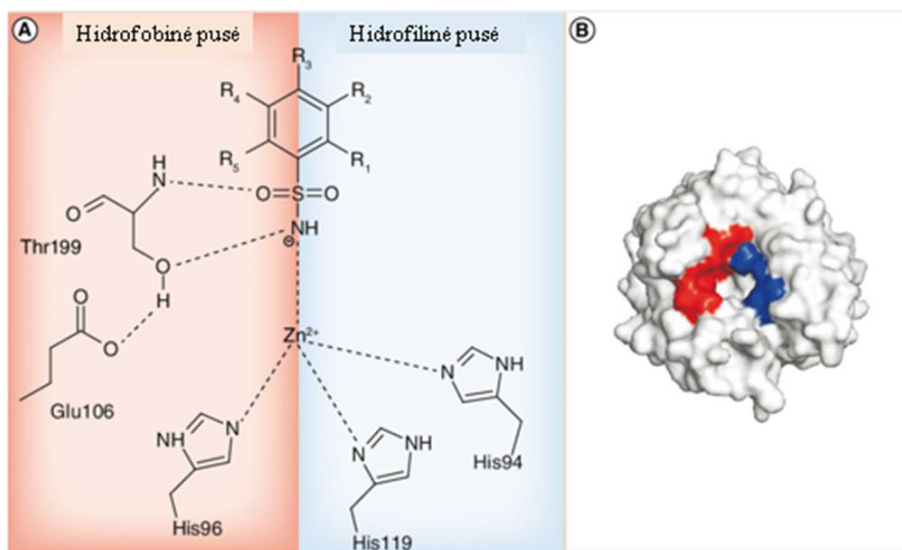
1.1.3. CA slopinimas ir aktyvinimas

Karboanhidrazių slopinimas ir aktyvinimas yra plačiai aprašyti ir gerai suprasti procesai. Šių fermentų inhibitoriai klinikinėje terapijoje yra naudojami jau ne vieną dešimtmetį, tačiau karboanhidrazių aktyvatoriai vis dar neturi plataus klinikinio pritaikymo [14].

Yra išskiriamos bent keturios inhibitorių, kurių taikynys yra žmogaus karboanhidrazių izoformos, klasės [8]:

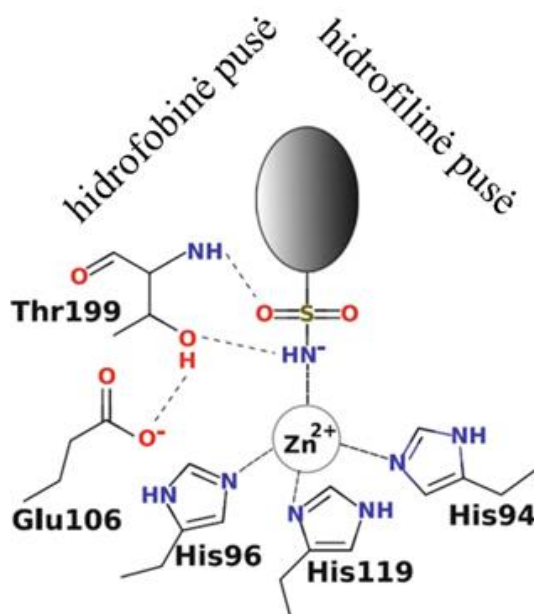
1. Prisijungiantys prie metalo jonų (neorganiniai anijonai), sulfonamidai ir jų izosterai (pvz.: sulfamatai ir sulfamidai), ditiokarbamatai ir jų izosterai, izosterinai (pvz., ksantatai), hidroksamatai ir kt.
2. Junginiai, kurie jungiasi nežinomu būdu (antriniai ir tretiniai sulfonamidai, imatinibas, nilotinibas ir t.t.).
3. Junginiai, kurie tvirtinasi prie cinko koordinuojamos vandens molekulės arba hidroksido jono (fenoliai, poliaminai, sulfokumarinai ir t.t.).
4. Junginiai, uždariantys aktyviojo centro įėjimą (kumarinai ir jų izosterai).

Erdvinė hCA II aktyviojo centro paviršiaus struktūra ir jos aminorūgščių artinys yra pavaizduoti 1.3 pav. Raudonai erdvinėje struktūroje pažymėta hidrofobinė dalis, o mėlynai – hidrofilinė. Hidrofobinę aktyviojo centro ertmės dalį sudaro aminorūgščių liekanos: Ile91, Phe131, Val121, Leu141, Val143, Leu198, Pro202, Leu204, Val207 ir Trp209, o hidrofilinę dalį riboja: Asn64, His64, Asn67 ir Gln92 (aminorūgštys numeruojamos pagal CA).



1.3 pav. (A) hCA II aktyviojo centro paviršiaus aminorūgščių artinys ir (B) erdvinė aktyviojo centro paviršiaus struktūra (adaptuota iš [15]).

Pirminiai sulfonamidai sukuria tiesioginį koordinacinį ryšį tarp CA cinko jono (Zn^{II}) ir sulfonamidinės grupės azoto atomo (1.4 pav.) [11]. Taip pat susidaro keli vandeniliniai ryšiai. CA izoformų aktyvūs centrai yra labai panašūs, turintys cinko joną koordinuojančius histidinus, tačiau šiek tiek skiriasi hidrofilines ir hidrofobines aktyvaus centro dalis ribojančios aminorūgštys. Tiesioginis koordinacinis ryšys tarp sulfonamido azoto ir Zn^{II} jono yra pagrindinis ramstis, nukreipiantis inhibitorių į CA aktyvų centrą. Įvairių sulfonamidinių junginių giminingumą ir selektyvumą pirmiausia lemia likusi inhibitoriaus dalis (1.4 pav. pavaizduota kaip pilka ovalo forma), t.y. įvairios funkcinės grupės prisijungusios prie sulfonamido ir sąveikaujančios su hidrofiline ir hidrofobine aktyviojo centro dalimis [11].



1.4 pav. Pagrindinės sulfonamidinių inhibitorių ir CA sąveikos (adaptuota iš [11]).

Kita vertus, CA aktyvatoriai jungiasi prie aktyviojo centro įėjimo. Šie junginiai, paprastai yra aminai, aminorūgštys ir oligopeptidai ir jie gali padėti protonų perkėlimo procesui, sustiprindami fermento aktyvumą [11].

1.1.4. Biomedicininiai ir biotechnologiniai CA taikymai

Pirmosios karboanhidrazės, kurios pradėtos tirti kaip vaistų taikiniai, buvo žmogaus karboanhidrazės, kurių, kaip jau minėta anksčiau, yra žinoma 15 skirtingų izoformų [13]. 1.5 pav. pavaizduotas penkių žmogaus CA izoformų struktūrų panašumas - jos persikloja beveik identiškai.



1.5 pav. Penkių žmogaus CA izoformų struktūrų pagrindų persiklojimas pavaizduotas skirtingomis spalvomis: CA I – mėlyna, CA II – pilka, CA VII – geltona, CA IX – raudona, and CA XII – žalia. Jų pagrindai persikloja beveik identiškai [12].

Karboanhidrazės yra inhibuojamos ir aktyvinamos įvairių junginių klasių, iš kurių labai svarbūs yra sulfonamidiniai junginiai. Dauguma tyrimų, ieškant CA inhibitorių ir aktyvatorių, pirmiausia buvo atlikti su žmogaus karboanhidrazių izoformomis. Dėl skirtingo jų katalitinio aktyvumo, giminingumo inhibitoriams ir, svarbiausia, pasiskirstymo ląstelėse bei audiniuose, šie fermentai yra susiję su daugybe patologijų ir jų slopinimas bei aktyvinimas gali turėti vis naujų terapinių pritaikymų. Su karboanhidrazių izoformomis siejamos ligos yra pateiktos 1.3 lentelėje, taip pat paminėtas jų anglies dioksido hidratacijos aktyvumas. Sulfonamidai ir sulfomatai (CA inhibitoriai)

yra jau naudojami, kaip diuretikai, antiglaukominiai vaistai, prieštraukuliniai vaistai, vaistai nuo nutukimo ir t.t. [14].

1.4 lentelė. Žmogaus CA izoformų fermentinis aktyvumas ir ryšys su ligomis [11].

Izoforma	CO ₂ hidratacijos aktyvumas	Susijusios ligos
CA I	Mažas	Hemolizinė anemija
CA II	Didelis	Gliaukoma, edema, aukščio liga
CA III	Labai mažas	-
CA IV	Didelis	Gliaukoma
CA VA	Vidutinis-didelis	Nutukimas
CA VB	Vidutinis	-
CA VI	Vidutinis	Dantų kariesas
CA VII	Didelis	Epilepsija, neuropatinis skausmas
CA VIII*	<i>Katalitiškai neaktyvi</i>	-
CA IX	Didelis	Vėžys
CA X*	<i>Katalitiškai neaktyvi</i>	-
CA XI*	<i>Katalitiškai neaktyvi</i>	-
CA XII	Vidutinis-mažas	Gliaukoma, vėžys
CA XIII	Mažas	Nevaisingumas
CA XIV	Vidutinis	-

* - CA VIII, CA X ir CA XI yra katalitiškai neaktyvios.

CA aktyvatoriai, panašiai kaip slopikliai, gali turėti farmakologinį pritaikymą senėjimui ar Alzheimerio ligai valdyti - tokiais sąlygomis, kai stebimas CA aktyvumo sumažėjimas smegenyse. Pagrindinis pirmosios kartos CA slopiklių trūkumas yra susijęs su tuo, kad jie mažai arba visai neturi selektyvumo CA izoformoms, o tai sukelia rimtą šalutinį poveikį visų patologijų, į kurias jie taikosi, gydymo metu. Tačiau pastaruoju metu atrandamos vis naujesnės ir perspektyvesnės inhibitorių klasės ir daugėja stiprių, izoformai selektyvių karboanhidrazių inhibitorių [16]. Kai kurie iš tokių inhibitorių vertinami kaip nauji vaistų kandidatai, ypač taikymuose tiriant izoformas CA IX ir CA XII, kurios susijusios su navikais.

Pastaruoju metu dėl CO₂ koncentracijos atmosferoje augimo ir su šiomis dujomis siejamo šiltnamio efekto, daugybė tyrimų buvo skirti CA biotechnologiniam panaudojimui [17], [18], iš kurių kai kurios buvo izoliuotos iš ekstremofilinių bakterijų [19], su tikslu panaudoti tokių fermentų didelį katalitinį aktyvumą CO₂ surinkimui. Toks naujas požiūris į CO₂ surinkimą gali padėti spręsti visuotinės klimato kaitos problemą išvengiant taršių sprendimo būdų, susijusių su aminų ar kitų reagentų naudojimu tokiems procesams [20].

1.2. Vaistų kūrimas

Ligandas tai yra junginys (dažniausiai maža molekulė), kuris suformuoja kompleksą su biomolekule tuo tikslu, kad atliktų specifinę biologinę paskirtį. Šio darbo atveju ligandai yra sulfonamidiniai junginiai. **Vaistas** tai yra cheminė ar biologinė medžiaga, kuri sukelia fiziologinį efektą patekusi į organizmą ir naudojama su tikslu gydyti, išvengti arba užkirsti kelią ligoms. Vaistas gali būti mažos molekulinės masės cheminis junginys arba biologinis junginys, pavyzdžiui, antikūnas arba rekombinantinis baltymas.

Jungimosi giminingumas apibūdina, kaip stipriai junginys prisijungia prie baltymo. **Selektyvumas** tai yra palyginamasis parametras, apibūdinantis tai, kaip ligandas labiau (atrankiau) jungiasi prie taikinio baltymo nei prie ne taikinio baltymo.

Molekulinis atpažinimas apibūdina baltymo gebėjimą atpažinti ligando molekulę per specifines sąveikas. Kitaip tariant, molekulinis atpažinimas apima specifines sąveikas tarp dviejų ar daugiau molekulių per nekovalentinius ryšius, pvz.: vandenilinius ryšius, metalų koordinavimą, hidrofobines sąveikas, van der Waals jėgas, π - π sąveiką, elektrostazines sąveikas ir t.t.

Aplinka, kurioje vaistai veikia, yra kompleksinė, su daugybe potencialių partnerių tarpmolekulinėms sąveikoms sudaryti. Baltymai, DNR, RNR, lipidai, metabolitai ir kitos mažesnės molekulės - visos jos turi potencialą sąveikauti su vaistu. Tam tikrais atvejais, galimybė sąveikauti su keliais taikiniai vienu metu gali būti ir vaisto pranašumas, tačiau, daugeliu atvejų, šių nenuspėjamų ir nekontroliuojamų sąveikų rezultatas yra nepageidaujami ir dažnai sunkūs šalutiniai efektai. Dėl šios priežasties, labai didelis jungimosi su taikiniu giminingumas ir didelis selektyvumas taikiniams yra labiausiai ieškomos vaistų molekulių (ligandų) savybės [21]. Todėl pirminiuose vaistų kūrimo etapuose siekiama atrinkti potencialiausius vaistų junginių kandidatus (angl. *Lead compounds*), kurie ne tik selektyviai jungtųsi prie konkretaus taikinio, bet ir turėtų pakankamą jungimosi su taikiniu stiprumą (jungimosi giminingumą).

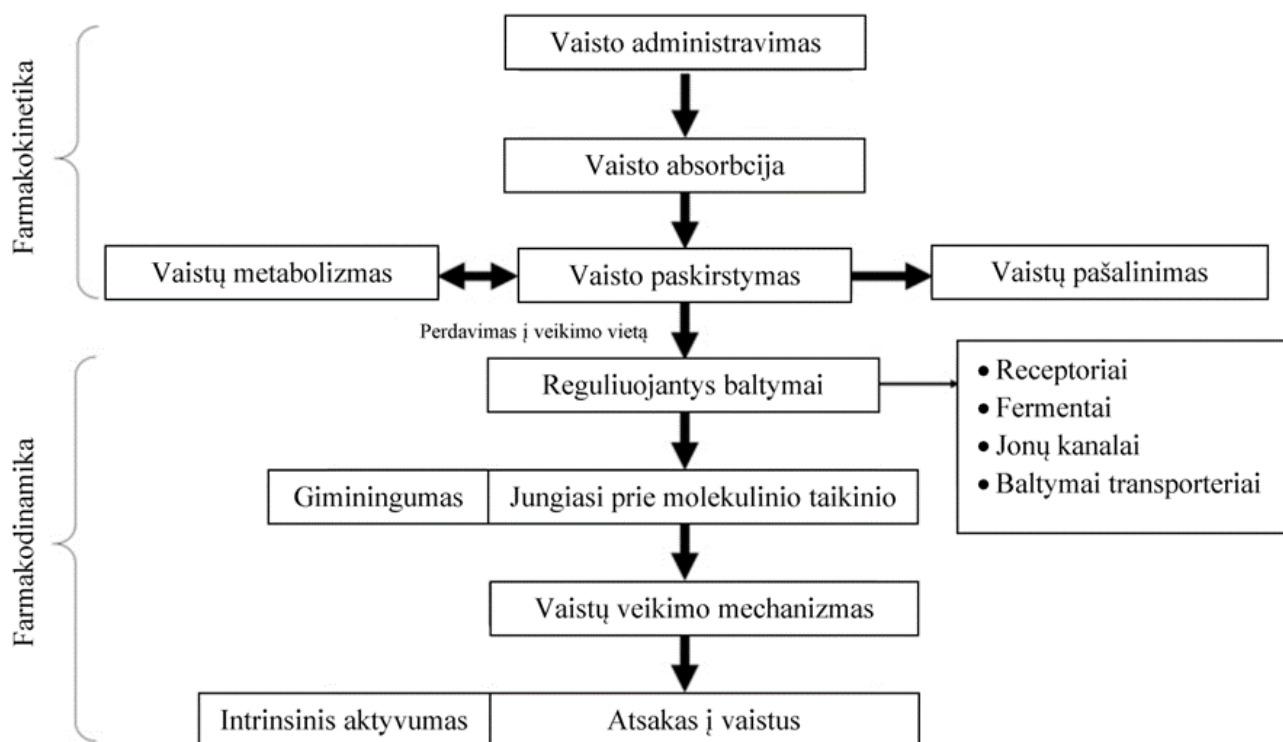
Racionalaus vaistų kūrimo tikslas yra sukurti mažas molekules, taikant kiekybinius metodus ir siekiant optimizuoti giminingumą [12]. Tai turėtų pagerinti cheminių junginių, kurie specifiskai, atrankiai, grįžtamai ir su dideliu jungimosi giminingumu sąveikautų su tiksliniu baltymu, vystymo efektyvumą.

1.2.1. Vaistų savybės

Farmakologija yra mokslas, tiriantis vaistų veikimą ir poveikį gyvosioms sistemoms bei vaistų ir organizmo tarpusavio sąveikas, su tikslu kurti vaistus, kurie yra vartojami ligoms gydyti ir profilaktikai. Pagrindinės dvi farmakologijos sritys yra: **farmakodinamika** ir **farmakokinetika**. Sąsajos tarp jų schema yra pateikta 1.6 pav.

Farmakodinamika apima tai, kokį poveikį vaistas turi žmogaus organizmui ir apibūdina tokias vaisto savybes, kaip: terapinis efektas (pvz.: kraujo spaudimo sumažinimas ar skausmo malšinimas), šalutiniai efektai, vieta, kur vyksta vaisto poveikis organizme ir veikimo mechanizmas (t.y. kaip vaistas veikia organizmą).

Farmakokinetika tiria kokybinius ir kiekybinius vaistų kitimus organizme (vaistų perėjimą per biologines membranas, absorbciją, rezorbciją, vaistų patekimo į organizmą kinetiką ir t.t.).



1.6 pav. Sąsajos tarp farmakokinetikos ir farmakodinamikos schema (adaptuota iš [14]).

Vaistai veikia tik esamų biologinių funkcijų spartą. Jie nepakeičia pagrindinio šių funkcijų pobūdžio, vykstančių procesų ir nesukuria naujų funkcijų. Pavyzdžiui, vaistai gali pagreitinti arba sulėtinti biochemines reakcijas, kurios priverčia raumenis susitraukti, inkstų ląsteles reguliuoti sulaikyto ar pašalinto vandens ir druskų kiekį ar nervus perduoti impulsus.

Vaistai negali atstatyti struktūrų ar funkcijų, kurias kūnas jau sugadino nepataisomai. Šis fundamentalus vaistų veikimo ribotumas labai apsunkina bandymus bandant gydyti audinius ardančias ar degeneracines ligas, tokias kaip: širdies nepakankamumas, artritas, raumenų distrofija, išsėtinė sklerozė, Parkinsono liga ir Alzheimerio liga. Nepaisant to, kai kurie vaistai gali padėti organizmui atsistatyti pačiam. Pavyzdžiui, sustabdę infekciją, antibiotikai gali leisti organizmui atitaisyti infekcijos padarytą žalą. Kai kurie vaistai yra hormonai, tokie kaip insulinas, skydliaukės hormonai, estrogenai ar kortizolis. Jais galima pakeisti natūralius hormonus, kurių trūksta organizme.

Dauguma ląstelių savo paviršiuje turi daugybę įvairių tipų receptorių. Receptorius yra molekulė su specifine trimate struktūra, kuri leidžia prisijungti prie receptoriaus tik tiems junginiams, kurie tiksliai telpa į receptorių. Receptoriai leidžia natūraliems junginiams, kurie yra organizme už ląstelės ribų, daryti įtaką ląstelės aktyvumui. Tokių junginių pavyzdžiai apima neurotransmitterius (cheminės medžiagos, kurios perneša informaciją tarp ląstelių nervų sistemoje) ir hormonus (cheminės medžiagos, kurios išskiriamos į kraujotaką vieno organo daryti poveikį kitam organui). Tokio poveikio paskirtis gali būti stimuliuoti arba slopinti (inhibuoti) procesams ląstelių viduje. Vaistai linkę imituoti šiuos natūralius junginius, tokiu pat būdu panaudodami receptorių. Pavyzdžiui, morfinas ir susiję skausmą malšinantys vaistai daro poveikį tiems patiems receptoriams smegenyse, kurie naudojami endorfinų (tai yra natūralūs junginiai, kurie gaminami organizmo tam, kad padėtų kontroliuoti skausmą).

Kai kurie vaistai jungiasi tik prie vienos rūšies baltymų, o kiti vaistai gali prisijungti prie kelių tipų baltymų visame kūne. Vaisto atrankumas (selektyvumas) dažnai gali būti paaiškintas tuo, kaip jis selektyviai jungiasi prie konkrečių baltymų.

Vaistai, nukreipti į receptorių, yra klasifikuojami kaip **agonistai** arba **antagonistai**. Agonistiniai vaistai aktyvina arba stimuliuoja receptorių, į kuriuos yra nusitaikę, sukeldami atsaką, kuris padidina arba sumažina ląstelės aktyvumą. Antagonistiniai vaistai blokuoja natūralių organizmo agonistų, dažniausiai neuromediatorių, priėjimą ar prisijungimą prie jų receptorių ir taip užkerta kelią arba sumažina ląstelių reakciją į natūralius agonistus.

Kai kurie vaistai yra nukreipti ne į receptorių, o į fermentus, kurie reguliuoja cheminių reakcijų greitį. Tokių fermentų pavyzdžiai galėtų būti jau 1.1 skyrelyje aptartos karboanhidrazės. Vaistai, nukreipti į fermentus, yra klasifikuojami kaip inhibitoriai arba aktyvatoriai. Pavyzdžiui, cholesterolio kiekį mažinantis vaistas lovastatinas slopina fermentą, vadinamą HMG-CoA reduktaze, kuris yra labai svarbus organizmo cholesterolio gamybai. Šalutinis antibiotiko rifampino poveikis yra fermentų, dalyvaujančių metabolizuojant geriamuosius kontraceptikus, aktyvinimas. Tokiu būdu jie pašalinami iš kūno greičiau nei įprasta, todėl gali būti neveiksmingi.

Vaistų ir baltymų sąveikos apima elektrostazines jėgas, van der Waalso jėgas, vandenilinius ryšius, hidrofobines sąveikas ir kt. Šių sąveikų stiprumo kitimas, taigi ir šilumos energija sistemoje, lemia vaisto ir baltymo asociacijos ir disociacijos laipsnį. Kovalentinis vaisto prisijungimas prie baltymo (pvz.: Fluorochinolonai, veikiantys bakterijas) sukelia negrįžtamą ryšį. Vis dėlto, dauguma baltymų-ligandų sąveikų yra grįžtamos: po kurio laiko vaistas išsijungia ir receptorių ar fermentas vėl pradeda veikti.

Vaisto veikimą lemia vaisto kiekis, pasiekiantis baltymą, ir jo bei jo baltymo traukos laipsnis (giminingumas) ant ląstelės paviršiaus. Prisijungę prie savo receptorių, vaistai skiriasi savo gebėjimu

sukelti poveikį (intrinisinis aktyvumas). Vaisto giminingumą ir intrinisinį aktyvumą lemia jo cheminė struktūra.

Selektyvumas yra laipsnis, kuriuo vaistas veikia tam tikrame taikinyje vietoje atžvilgiu kitų taikinių. Selektvumą sunku pasiekti, ypač taikiniams, priklausantiems didelėms struktūriškai ir funkciškai susijusių baltymų šeimoms. Itin didelis giminingumas ir selektyvumas yra dvi svarbios ir ieškomos vaistų molekulių savybės. Apskritai, labai didelis jungimosi giminingumas reikalauja palankių entalpinių ir entropinių indėlių [21]. Pagal selektyvumą vaistai skirstomi į tris tipus:

1. **Santykinai neselektyvūs vaistai** – paveikia daug įvairių audinių ir organų. Pavyzdžiui, atropinas, vaistas vartojamas atpalaiduoti virškinamojo trakto raumenis, taip pat gali atpalaiduoti akių ir kvėpavimo takų raumenis.
2. **Santykinai selektyvūs vaistai** – pavyzdžiui, nesteroidiniai antiuždegiminiai vaistai, tokie kaip aspirinas ir ibuprofenas, taikosi į bet kurią vietą organizme, kurioje yra uždegimas.
3. **Labai selektyvūs vaistai** paveikia daugiausia vieną organą arba sistemą. Pavyzdžiui, digoksinas, vaistas, vartojamas širdies nepakankamumui valdyti, daugiausia veikia širdį, padidindamas jos pumpavimo efektyvumą. Migdomieji yra nukreipti į tam tikras smegenų nervines ląsteles.

Vaisto poveikį galima įvertinti atsižvelgiant į jo stiprumą, veiksmingumą ir efektyvumą:

Vaisto stiprumas nurodo vaisto kiekį (įprastai išreikštą miligramais), reikalingą efektui sukelti, pavyzdžiui, skausmui malšinti ar kraujospūdžiui sumažinti.

Intrinisinis aktyvumas tai yra vaisto gebėjimas sukelti reakciją, kai jis prisijungia prie baltymo. Konformaciniai baltymų pokyčiai dėl vaistų užimamos jungimosi vietos sukelia biocheminius ir fiziologinius įvykius, apibūdinančius vaisto atsaką. Kai kuriuose audiniuose, agonistai, demonstruojantys didelį efektyvumą, gali pasiekti maksimalų efektą, net jei užimta tik nedidelė receptorių dalis.

Efektyvumas skiriasi nuo intrinisinio aktyvumo tuo, kad atsižvelgiama į tai, kaip vaistas veikia realiame pasaulyje. Klinikinių tyrimų metu efektyvus vaistas dažnai gali būti nelabai veiksmingas. Pavyzdžiui, vaistas gali būti labai efektyvus mažinant kraujospūdį, tačiau jo realus efektyvumas gali būti mažas, nes vaistas sukelia tiek daug šalutinių poveikių, kad žmonės jį vartoja rečiau nei turėtų arba visiškai nustoja vartoti. Taigi, efektyvumas paprastai būna mažesnis už intrinisinį aktyvumą.

Vaistų kūrimo sritis leido atrasti daugybę perspektyvių, bet prastai tirpių vaistų. Tokie vaistai negali būti absorbuojami organizmo efektyviai, taigi rezultatas – silpnas biologinis įsisavinimas. Kaip pagerinti biologinį prieinamumą ir vaistų tirpumą vandenyje yra vienas iš pagrindinių iššūkių vaistų kūrimo srityje [23].

Vaisto absorbcija priklauso nuo vaisto tirpumo lipiduose, jo formulavimo ir vartojimo būdo. Vaistas turi būti tirpus lipiduose, kad prasiskverbtų per membranas, nebent yra aktyviojo transporto sistema (pvz.: nanodalelės) arba jis yra toks mažas, kad galėtų praeiti per vandeninius kanalus membranoje [24].

Bevandenė vaisto forma turi geresnį tirpumą vandenyje nei hidratai todėl, kad hidratai jau yra sąveikoje su vandeniu ir dėl šios priežasties turi mažiau energijos kristalo suardymui. Yra įvairių būdų, kurie padeda pagerinti vaisto tirpumą (pvz.: vaisto dalelių dydžio mažinimas, nanospensija, surfaktantų naudojimas, druskos formavimas, kietoji dispersija ir t.t.) [25].

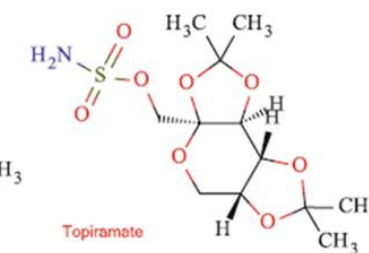
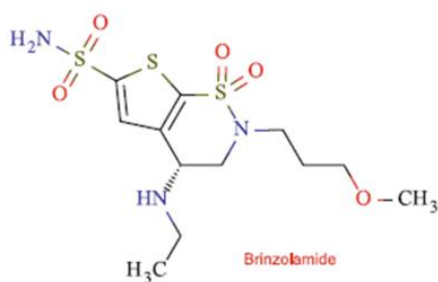
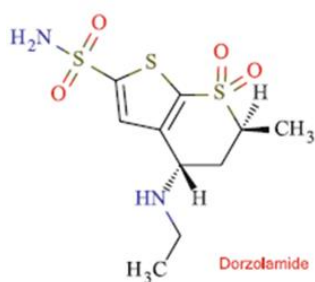
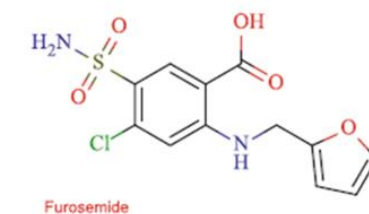
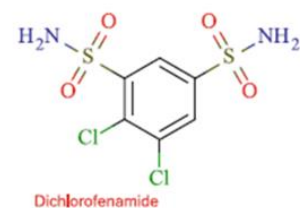
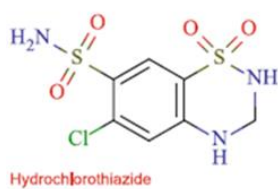
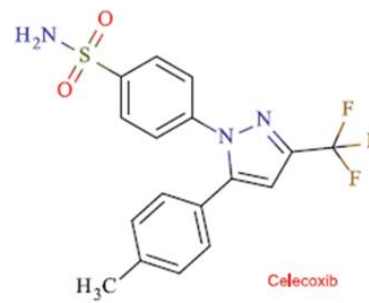
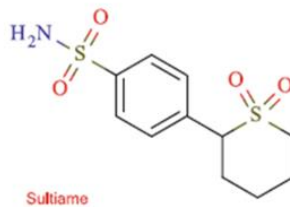
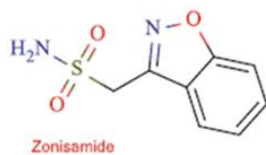
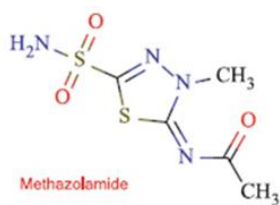
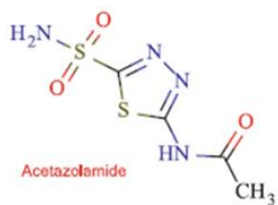
1.2.2. Sulfonamidinių junginių taikymas ieškant CA slopiklių

Karboanhidrazės yra svarbūs fermentai, todėl jų katalitinio aktyvumo slopinimas ir aktyvinimas mažų molekulių ligandais yra plačiai tiriamas. Keli skirtingi mechanizmai CA slopinimo buvo apibūdinti [26]. Pirmieji sintetiniai slopikliai buvo atrasti neužilgo po to, kai buvo atrastos karboanhidrazės. Tai buvo aromatiniai junginiai, turintys pagrindinę nepakeistą sulfonamidinę grupę [27]. CA slopinančius junginius galima išskirti į dvi pagrindines grupes: junginius, prisijungiančius prie cinko jono ir junginius, kurie nesudaro tiesioginio ryšio su kataliziniu cinko jonu (Zn^{2+}) [13].

Yra daugiau nei 20 mažų molekulių junginių, kurie naudojami kaip vaistai gydant su CA susijusias ligas, tačiau CA nebūtinai jų pirminis taikynys [11]. Populiarių vaistų, turinčių CA slopinimo aktyvumą, pavyzdžiai pateikti 1.7 pav.

Acetazolamidas, metazolamidas ir dichlorofenamidas yra naudojami kaip sisteminiai CA slopikliai, sergant glaukoma, edema ir kitomis su CA susijusiomis ligomis. Dorzolamidas ir brinzolamidas yra vietiniai vaistai glaukomai valdyti [14]. Zonisamidas, topiramatas, and sultiamas yra naudojami gydyti neurologiniams sutrikimams. Furesomidis, hidrochlorotiazidas ir indapamidas yra populiarūs diuretikai, o celekoksibas yra ciklooksigenazės (COX) inhibitorius.

Nei vienas iš šiuo metu CA aktyvumą slopinančių vaistų negali būti klasifikuojamas kaip labai selektyvus – pagal in vitro duomenis, jie inhibuoja kelias CA izoformas [11].



1.7 pav. Populiarių vaistų, naudojamų medicinoje ir pasižyminčių CA slopinimo aktyvumu, cheminės struktūros [11].

1.3. Biofizikinių metodų, naudojamų vaistų kūrime, apžvalga

Baltymų-ligandų sąveikas galima tirti įvairiais būdais, tačiau pagrindiniai biofizikiniai metodai, naudojami vaistų kūrime šiuo metu yra: paviršiaus plazmonų rezonansas (SPR), izoterminė titravimo kalorimetrija (ITC), fluorescencijos terminio poslinkio metodas (FTSA), masių spektrometrija (MS), paviršiaus plazmonų rezonansas (SPR) ir branduolių magnetinis rezonansas (BMR). Beveik visi iš jų gali suteikti išsamią informaciją apie jungimosi stiprumą ir specifiškumą.

Fluorescencinis terminio poslinkio metodas (dar kitaip žinomas kaip **diferencinė skenuojanti fluorimetrija**) yra greitas, didelio našumo ir nebrangus tyrimas, skirtas matuoti fluorescencijos pokytį išsiviniuojant baltymui [28]. Šis išsiviniojimas prasideda natyvioje baltymo fazėje ir yra sudarytas iš kelių tarpinių būsenų, kol galiausiai išsiviniojęs baltymas agreguojasi. Nors baltymų išsiviniojimas kartais gali turėti ir grįžtamąjį procesą, daugelis termiškai denatūruotų baltymų agreguojasi ir nusėda, todėl įvyksta negrįžtamas perėjimas. Mažos molekulinės masės ligandų prisijungimas gali padidinti baltymo terminį stabilumą, todėl norint šiuo metodu nustatyti sąveikos su baltymu parametrus yra vertinama lydimosi temperatūrų T_m poslinkio priklausomybė nuo ligando koncentracijos. Šis metodais ir jame naudojami grafikų aproksimavimo modeliai siekiant išgauti biotermodinaminius duomenis yra išsamiai aptarti [29] autorių. FTSA suteikia informaciją apie ligandų sąveikos su baltymais disociacijos konstantas. Šio metodo didžiausias pranašumas prieš kitus jungimosi biotermodinamikos tyrimų metodus yra didelis našumas ir reikalingi labai maži kiekiai baltymo. Dėl didelio efektyvumo ir našumo tiriant baltymų-ligandų sąveikų biotermodinamiką, jis yra labai plačiai naudojamas atliekant ligandų bibliotekų atranką [30].

Izoterminė titravimo kalorimetrija (ITC) yra analitinis metodas bei vienas iš pagrindinių biofizikinių metodų tarp molekulinėms sąveikoms analizuoti. Tai yra titrimetrinis metodas, kai reagento tirpalas (titrantas) reaguoja su analite. Šis metodas yra išsamiai aptartas [31] autorių.

ITC yra puikus įrankis siekiant apibūdinanti biomolekulių sąveikas, esant daugybei jungimosi giminingumų. ITC taikymo sritys yra labai įvairios, pavyzdžiui: baltymų-ligandų sąveikos biotermodinaminių parametrų nustatymas vaistų kūrime, baltymų reguliacijos ir funkcijos tyrimai, farmakologinių ir biotechnologinių taikinių charakterizavimas, vaistų pernašos sistemų vystymas, kokybės kontrolė baltymų ir biologinių medžiagų gamybos farmacijoje, kosmetikoje, maisto ir biotechnologijų pramonėje.

ITC registruoja baltymo tirpalo temperatūros pokyčius titruojant ligando tirpalu izoliuotoje kameroje [32]. Tai leidžia nustatyti įvairius termodinaminius parametrus, įskaitant sąveikos laisvąją Gibso energiją (ΔG), entalpiją (ΔH) ir entropiją (ΔS) bei šiluminės talpos pokytį (ΔCp).

Titravimas atliekamas esant pastoviam slėgiui ir temperatūrai, o tai reiškia, kad vienas ITC eksperimentas pateikia duomenis apie jungimosi entalpiją, pusiausvyros asociacijos konstantą ir stochiometriją, iš kurios galima apskaičiuoti jungimosi entropiją ir Gibso energiją. Taigi, vienas ITC

eksperimentas suteikia informaciją apie pagrindinius termodinaminius parametrus, susijusius su sąveikos procesu.

Paviršiaus plazmonų rezonanso metodas (SPR) yra veiksmingas, nereikalaujantis molekulinų žymenų optinis biojutiklinis metodas, skirtas realiuoju laiku stebėti ir analizuoti nekovalentines molekulinės sąveikas. Šis metodas yra labai efektyvus, kadangi vienu metu leidžia įvertinti ir biotermodinaminius, ir kinetinius sąveikų parametrus, o tobulėjant įrangai yra pasiektas ir palyginti didelis tyrimų našumas šiuo metodu. Paviršiaus plazmonai tai yra elektromagnetinės bangos, atsirandančios metalų/dielektrinių sąsajų paviršiuje. Šių optinių modų sužadavimo sąlygos yra labai jautrios dielektrinei aplinkai netoli šios sąsajos paviršiaus. Dėl mokslo pasiekimų šioje srityje ir technologinės pažangos kuriant paviršiaus plazmonų rezonanso biojutiklius, šie biojutikliai yra plačiai taikomi atliekant tyrimus akademinėse ir pramoninėse laboratorijose. Paviršiaus plazmonų rezonanso biojutikliai yra naudojami biochemijoje, fizikinėje chemijoje, biofizikoje, farmacijoje ir daugelyje kitų mokslo bei pramonės sričių.

SPR tiria tirpale esančios analitės (ligando) ir ant jutiklio paviršiaus imobilizuoto biomolekulinio atpažinimo elemento (baltymo) sąveiką. Jis leidžia tiesiogiai nustatyti jungimosi kinetinius parametrus, iš kurių termodinaminiai parametrai gali būti kiekybiškai įvertinti. Jeigu baltymas yra imobilizuojamas, tai tuomet tiriamos molekulės (analitės) tik maži kiekiai yra reikalingi, o tai yra didelis privalumas. Pagrindinis SPR trūkumas yra tas, kad reikia imobilizuoti vieną iš sąveikaujančių molekulių, o tai gali turėti įtakos baltymo ir ligando sąveikai.

Kadangi tyrimai, naudojantis šiuo metodu paremtais biojutikliais, yra atliekami be molekulinų žymenų, paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija nereikalauja fluoroforų, specializuotų reagentų (pvz.: fermento-substrato kompleksai) ar kitų specifinių žymenų tam, kad būtų išgautas regimosios spinduliuotės arba fluorescencinis signalas.

1983 metais pirmą kartą buvo eksperimentiškai pademonstruotas paviršiaus plazmonų rezonanso jutiklių praktinis pritaikomumas cheminiam ir biomolekuliniam aptikimui [33]. Nuo to laiko, paviršiaus plazmonų rezonanso (SPR) jutikliai sulaukė daug dėmesio dėl jų unikalų galimybių bei savybių (pvz.: labai didelio jautrumo) ir plataus spektro pritaikymų aplinkos stebėjimuose [34], maisto saugumo užtikrinime [35], vandens testavime [36], skysčių aptikime [37], dujų aptikime [38], biologiniuose jutikliuose [39] ir medicininėje diagnostikoje [40], įskaitant vaistų paiešką ir atranką [41], [42], biologinį vaizdinimą [43] bei cheminių medžiagų aptikimą [44], [45].

Per pastaruosius kelis dešimtmečius paviršiaus plazmonų rezonanso metodas buvo plačiai pritaikytas tiriant nekovalentines sąveikas, tokias kaip: baltymai-DNR, baltymai-ląstelės, RNR-DNR, DNR-DNR, baltymas-baltymas, baltymai-ligandai, mažos molekulės-makromolekulės (pvz.: receptorių-inhibitorių kompleksai), baltymai-peptidai, savitvarkių monosluoksnių sąveikos ir t.t.

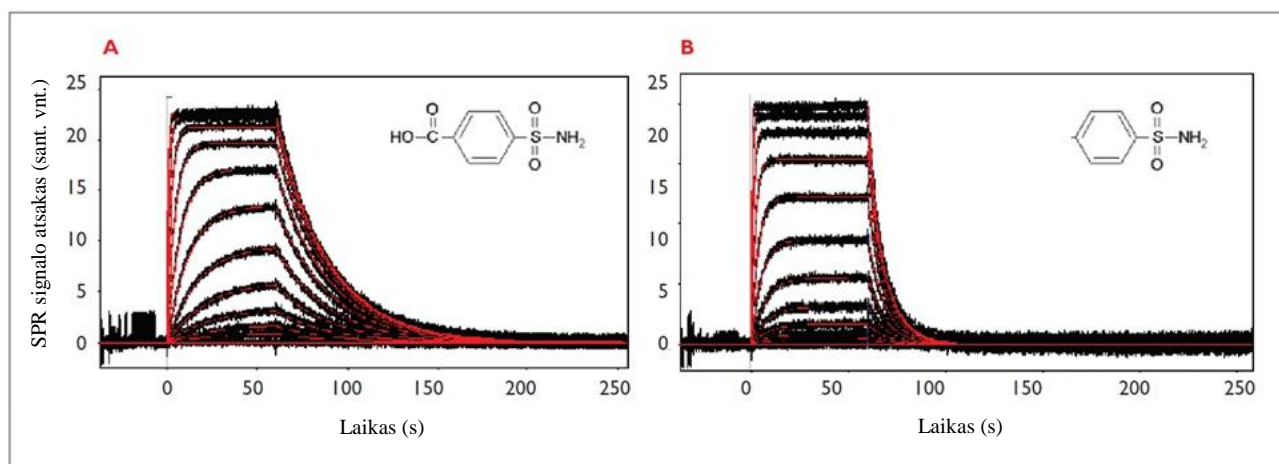
Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija taip pat buvo sėkmingai pritaikyta tirti plačiam spektrui molekulinę sistemų, pavyzdžiui: vakcinoms [46], DNR-vaistas [47], antikūnas–antigenas sąveikoms [48], angliavandeniai–RNR sąveikoms [49], baltymų konformaciniams pokyčiams [50], savitvarkiams monosluoksniams [51], baltymų–angliavandenių sąveikoms [52], terapinių baltymų imunogeniškumo atrankai ir patikrai [53], fosfolipidinėms pūslelėms [54] ir t.t.

Atliekant tyrimus paviršiaus plazmonų rezonanso metodu, galima gauti informaciją apie: sąveikos specifiškumą, jungimosi giminingumą, jungimosi kinetiką (pvz.: disociacijos ir asociacijos spartos konstantos), pasirinktų molekulių, esančių dominančiame mėginyje, koncentraciją ir keletą pagrindinių termodinaminių parametrų, įskaitant entropiją, entalpiją bei aktyvacijos energiją.

Kinetinės ir pusiausvyros jungimosi konstantos (t.y. asociacijos bei disociacijos spartos konstantos ir jungimosi giminingumas) yra labai svarbūs parametrai, apibūdinantys baltymų–ligandų sąveikas ir yra plačiai naudojami vaistų molekulių atrankoje ir kūrime. Išsprendus asociacijos ir disociacijos jungimosi kinetiką, pateikiamas išsamus komplekso susidarymo vaizdas. Ši informacija yra ypač naudinga nustatant vaidmenį, kurį atlieka specifinės funkcinės grupės tiek taikinyje (šiuo atveju fermente), tiek prie jo prisijungiančiame junginyje (ligando molekulėje) jungimosi metu.

Pavyzdžiui, 1.8 pav. parodytas dviejų struktūriškai skirtingų mažų molekulių (ligandų), prisijungiančių prie to paties fermento (karboanhidrazės II izoformos), matavimų rezultatų, gautų paviršiaus plazmonų rezonanso metodu, pavyzdys. Jis atvaizduoja šių dviejų junginių kinetikos skirtumą. Nors abiejų inhibitorių jungimosi giminingumai yra beveik identiški, asociacijos ir disociacijos kinetika skyrėsi net šešis kartus. Šie jungimosi funkcinio mechanizmo skirtumai būtų prarasti, jei reakcija būtų tiriama tik pusiausvyra paremtais metodais.

Kinetinės ir pusiausvyros jungimosi konstantos taip pat pateikia išsamią informaciją apie tam tikros molekulės paruošimo aktyvumą.



1.8 pav. Kinetinė dviejų struktūriškai susijusių mažų molekulių (ligandų), kurios atlieka inhibitorių funkciją, jungimosi prie karboanhidrazės II izoformos analizė naudojant „Biacore S51“ biojutiklį, kuris yra paremtas paviršiaus plazmonų rezonanso (SPR) metodu. Raudonos linijos rodo globalią atsako duomenų aproksimaciją 1:1 sąveikos modeliui (adaptuota iš [55]).

Masių spektrometrijoje (MS) yra naudojami įvairūs metodai jonizuoti junginius ar kompleksus ir vėliau išanalizuoti jų masės ir krūvio santykį. Naujausi pokyčiai ir pasiekimai MS srityje palengvino baltymų ir ligandų sąveikos tyrimą, leisdami aptikti ir charakterizuoti atskiras konformacines baltymų kompleksų būsenas [56].

Dėl didelio MS metodo jautrumo, tik labai maži bandinių kiekiai yra reikalingi. Tiriant baltymų pagrindo amido vandenilio ir deuterio mainus, galima gauti informacijos apie ligando prisijungimo epitopą, tačiau tai labiausiai tinka didesnio giminingumo ligandams. Be to, MS yra vienas iš nedaugelio metodų, leidžiančių tirti kompleksus dujų fazėje. Jungimosi energijos dujų fazėje ir tirpale palyginimas gali padėti suprasti baltymų-ligandų sąveikos jėgas ir, jeigu tiksliau, padėti nustatyti solvatacijos vaidmenį molekuliniam atpažinime baltymų paviršiuose [57].

Branduolių magnetinis rezonansas (BMR) išsivystė į puikų metodą, kuris leidžia gauti didelius kiekius duomenų apie tarpmolekulinius ir intramolekulinius procesus. BMR naudojimas baltymų-ligandų sąveikoms tirti yra plačiai aprašytas literatūroje [58], [59]. BMR privalumas, lyginant su kitais metodais, yra tai, jog jis suteikia priėjimą prie plataus spektro eksperimentų, kurie buvo optimizuoti įvairiais tikslais: jungimosi giminingumo ir specifiškumo nustatymui, jungimosi epitopų ant baltymo ir ant ligando identifikavimui ir t.t. Be to, kadangi eksperimentai atliekami su tirpalais, galimos fiziologinės ar beveik fiziologinės sąlygos. Kitas BMR pranašumas yra tai, kad jis neapsiriboja didelio giminingumo sistemomis, t.y. gali būti taikomas tiriant labai silpnas sąveikas (pvz.: mM diapazoną), kurioms kiti metodai dažniausiai netinka [60]. BMR eksperimentai baltymų ir ligandų sąveikoms tirti skirstomi į dvi pagrindines kategorijas: arba jas tiriant iš baltymo perspektyvos, arba iš ligando perspektyvos.

1.4. Biotermodinaminiai sąveikų parametrai vaistų kūrime

Jungimosi Gibso energijos pokytis (ΔG) yra sudarytas iš dviejų indėlių – entalpijos (ΔH) ir entropijos (ΔS) pokyčių, remiantis sąryšiu:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.1)$$

Norint pasiekti didelį jungimosi giminingumą, reikalingas Gibso energijos entalpinio ir entropinio indėlių (1.9 pav.) optimizavimas [61]. Kadangi baltymo ir ligando jungimasis reiškia, jog junginys iš vandeninės aplinkos perkeliamas į jungimosi vietą baltyme (aktyvųjį centrą), reikia atsižvelgti į desolvatacijos energiją, taip pat į vaisto molekulės ir jos taikinio sąveikos energiją [21]. Visų jungimosi metu susidarantių ir nutrūkstančių sąveikų energija prisideda prie entalpijos pokyčio, o visi su baltymo, junginio ir tirpiklio tvarkos pasikeitimais susiję procesai prisideda prie entropijos pokyčio.

Gibso energijos pokytis apibūdina Gibso energijos kitimą tarp prisijungusios ir laisvos būsenos. **Entalpijos pokytis** jungimosi metu pirmiausia yra susijęs su molekuline sąveika tarp baltymo, ligando ir tirpiklio molekulių, bet taip pat su konformaciniais pokyčiais ir buferinėmis reakcijomis [31]. Entalpijos pokytis atsiranda dėl nekovalentinių ryšių susidarymo arba nutrūkimo, kai jungimosi partneriai pereina iš laisvos į jungimosi būseną. **Entropijos pokytis** apibrėžiamas kaip molekulinis laisvės laipsnių pokytis tarp prisijungusios ir laisvos baltymo ir ligando būsenų. Jungimosi entropinio pokyčio indėlių sudaro solvatacijos, konformacinių ir transliacinių/rotacinių entropijos pokyčių suma (1.9 pav. (B)).

Jungimosi metu, skirtingos funkcinės grupės taip pat skirtingai prisideda prie entalpijos ir entropijos pokyčių. Termodinaminiai indėliai į stebimosios Gibso energijos pokytį gali būti eksperimentiškai išmatuoti izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu, tačiau šio metodo trūkumas yra palyginti mažas tyrimų našumas ir jam reikalingi pakankamai dideli baltymų kiekiai, todėl sunku sukaupti didelį kiekį duomenų apie entropinius ir entalpinis indėlius į stebimosios Gibso energijos pokytį, kurie labai naudingi struktūros-aktyvumo koreliacinės analizės metu. Didelio našumo metodai, reikalaujantys nedidelio kiekio baltymo, tokie kaip fluorescencinis terminio poslinkio metodas, neleidžia tiesiogiai išmatuoti ir jungimosi Gibso energijos pokytį, ir jos termodinaminius (entalpijos ir entropijos) indėlius. Tokių metodų, kurie tiesiogiai leidžia išmatuoti termodinaminius indėlius į Gibso energijos pokytį, našumo ir efektyvumo padidėjimas palengvintų molekulinio atpažinimo procesų analizę, pagerintų supratimą apie baltymų-ligandų sąveikų prigimtį ir palengvintų junginių struktūrų optimizavimą siekiant palankių jungimosi parametru.

Ligando jungimosi giminingumas su taikiniu gaunamas iš desolvatacijos ir baltymo-ligando sąveikos metu susidarantių ryšių ir dalyvaujančių jėgų indėlių balanso. Nėpolinės grupės gali sudaryti

van der Waals sąveikas su taikiniu, dėl kurių atsiranda nedideli entalpiniai indėliai, kurių dydis priklauso nuo junginio ir taikinio jungimosi vietos formos išpildomumo, o polinės grupės gali sudaryti vandenilinius ryšius, kurie gali turėti didesnę indėlį į jungimosi entalpijos pokytį. Tik stiprūs vandeniliniai ryšiai gali nepalankią polinių grupių desolvatacijos entalpiją ir prisidėti prie palankaus jungimosi entalpijos indėlio [21]. Įvairių junginių, kurie skiriasi pagal vieną funkcinę ir kurių jungimosi kompleksų kristalografinės struktūros yra žinomos [62], [63], ITC matavimai rodo, kad stiprūs vandeniliniai ryšiai gali prisidėti prie entalpinio indėlio į jungimosi Gibso energijos pokytį net iki -20 kJ/mol, o van der Waals sąveika, susijusi su metilo grupe, gali prisidėti net iki -5 kJ/mol.

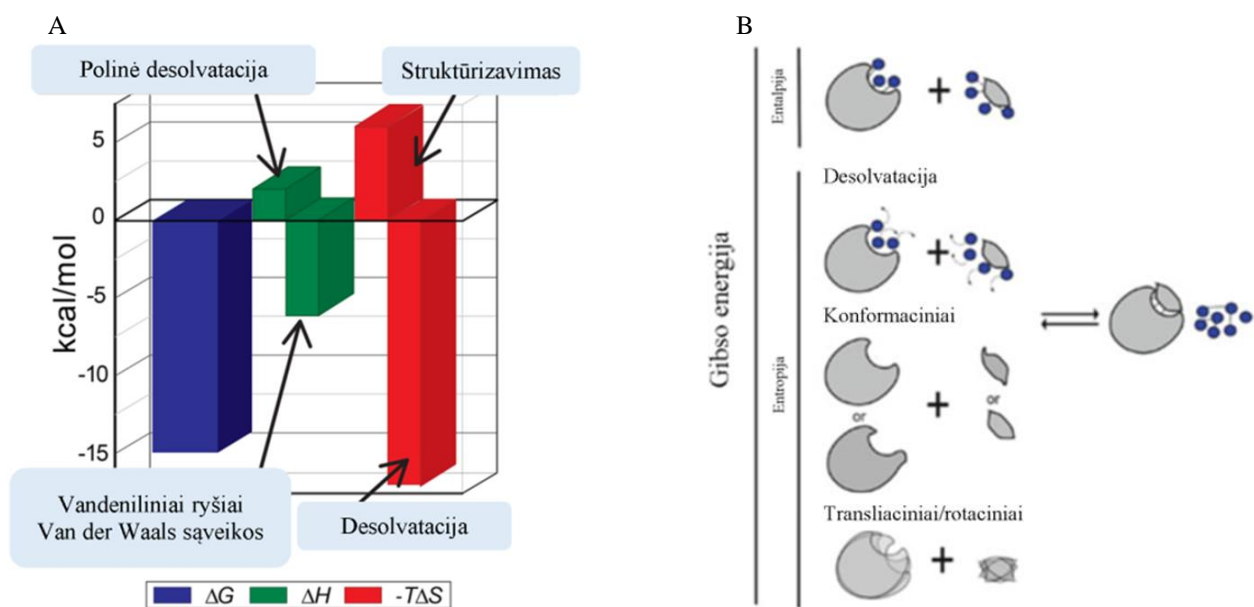
Sąveika tarp vaisto molekulės ir jos taikinio taip pat gali lemti konformacinės entropijos praradimą dėl baltymų liekanų ir pačios ligando molekulės struktūros. Junginio konformacinės entropijos praradimą galima sumažinti įvedant konformacinius apribojimus, pavyzdžiui, sumažinus struktūrinių pakaitų lankstumą. Konformaciniu požiūriu apribotas junginys turės geresnę jungimosi giminingumą taikiniui ir geresnę selektyvumą nei jo lankstus atitikmuo.

Kadangi skirtingos sąveikos turi skirtingus termodinaminius indėlius, du junginiai, turintys panašų giminingumą, gali turėti skirtingus selektyvumo profilius. Pagrindinis tikslas vaistų kūrime yra maksimaliai padidinti palankią sąveiką su taikiniu ir sumažinti junginio sąveiką su ne taikinio molekulėmis. Molekulinės atpažinimo procesų, kurie lemia junginių, turinčių panašų jungimosi giminingumą, selektyvumo skirtumus supratimas yra labai svarbus kuriant selektyvesnes vaistų molekules. Akivaizdu, kad visos sąveikos, prisidedančios prie jungimosi giminingumo, nevienodai prisideda prie selektyvumo. Stiprus jungimasis tarp ligando ir taikinio ne tik maksimaliai padidina van der Waalso sąveikos indėlį, bet ir sumažina tikimybę, kad ligandas bus vienodai gerai prisitaikęs prie taikinio ir ne taikinio molekulių, o jungimasis su netiksliniais baltymais nebus toks stiprus kaip su taikiniu.

Yra svarbu suprasti, kaip ligandas yra atpažįstamas jungimosi vietoje baltymo aktyviajame centre (pvz.: kokius cheminius ryšius jis sudaro su baltymo aktyviuoju centru, kokios sąveikos turi didžiausią įtaką biotermodinaminiais parametrais ir t.t.) ir kokios fizikocheminės priežastys leidžia pasiekti palankius jungimosi parametrus. Toks supratimas leistų racionaliai kurti naujus ligandus, kurie galėtų būti potencialūs nauji vaistų kandidatai, kadangi vaistų kūrimas vien tik *in silico* metodais vis dar nėra pasiekiamas [12]. Biotermodinaminių indėlių į jungimosi Gibso energijos pokytį nagrinėjimas, gali padėti suprasti molekulinio atpažinimo procesus.

Tam labai pasitarnauja ir rentgenostruktūrinės analizės metodu nustatytų ir išspręstų kristalografinių baltymų ir baltymų-ligandų kompleksų struktūrų duomenų bazės, tokios kaip pavyzdžiui RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>). Baltymų kristalinė struktūra leidžia suprasti skirtingų baltymų izoformų aktyviojo centro specifiką, identifikuoti ertmes jungimosi vietoje ir pasinaudojant šiuo supratimu, kurti cheminius junginius, kurie tiksliai tilptų į taikinio aktyvųjį centrą

(spynos ir rakto principas, angl. *The lock and key model* [64], [65]), užpildytų aktyviojo centro ertmės bei sudarytų siekiamus cheminius ryšius. Baltymų-ligandų kompleksų kristalinės struktūros leidžia suprasti jau esamų ligandų ir vaistų eksperimentiškai nustatytas pagrindines sąveikas su baltymo aktyviuoju centru, ligando sąveikos su jungimosi vieta konformacijas ir t.t. Tai yra labai svarbi informacija, kuriant naujus junginius - bandant paaiškinti struktūros-aktyvumo, struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijas ir iš jų analizės gautą informaciją.



1.9 pav. Skirtingų autorių pateikiamos Gibso energijos pokyčio termodinaminių indėlių koncepcijos. **(A)** Įprastinių termodinaminių indėlių diagrama, nagrinėjant baltymų-ligandų sąveikas vaistų kūrimo srityje. Palankios entalpinės sąveikos (ΔH ; žalios diagramos juosta) pirmiausia kyla dėl vandenilių ryšių ir van der Waals sąveikų. Nepalankus entalpinis indėlis atsiranda dėl polinių grupių desolvatacijos. Palankus entropinis indėlis ($T\Delta S$, raudoni stulpeliai) atsiranda dėl nepolinių ir polinių grupių desolvatacijos, o nepalankus entropinis indėlis atsiranda dėl liekanų struktūrizavimo baltyme arba pačiame junginyje. Santrumpa: ΔG , jungimosi Gibso energija (mėlynas stulpelis) (adaptuota iš [21]). **(B)** Pagrindiniai entalpinis (viršutinė paveikslėlio dalis) ir entropiniai (apatinė paveikslėlio dalis) baltymų-ligandų jungimosi proceso Gibso energijos indėliai. Entalpiniai indėliai pirmiausia atsiranda dėl ligando ir baltymo desolvatacijos bei sudaromų kontaktų tarp ligando ir baltymo, o entropinis indėlis yra susijęs su vandeniu, išsiskiriančiu į tirpiklį, bet taip pat apima ir papildomus veiksnius, tokius kaip konformaciniai ir transliaciniai/rotaciniai laisvės laipsniai. Ši indėlių koncepcija aptarta karboanhidrazių jungimosi su ligandais kontekste (adaptuota iš [31]).

2. METODIKA

Duomenims apdoroti ir analizuoti naudotos kompiuterinės programos:

- **PyCharm** - integruota kūrimo aplinka, skirta Python programavimo kalbai. Naudota Python 3.0 ir jo paketai, skirti matematinei, biofizikinei ir cheminei analizei bei mokslinių duomenų apdorojimui ir atvaizdavimui.
- **JupyterLab** - interaktyvi kūrimo aplinka, padedanti valdyti užrašus, duomenis, programinius kodus, konfigūruoti ir organizuoti darbo eigą.
- **RDKit** – atvirojo kodo cheminės informatikos programa Python aplinkoje (<https://www.rdkit.org/>).
- **OpenBabel 3.1.1** – atvirojo kodo cheminės informatikos programa [66] (http://openbabel.org/wiki/Main_Page).
- **Jmol** - atvirojo kodo Java priemonė cheminėms struktūroms ir makromolekulėms 3D formatu peržiūrėti ir dokavimo sritims valdyti (<http://www.jmol.org/>).
- **PyMOL** by Schrödinger – atvirojo kodo makromolekulių bei junginių struktūrų ir baltymų-ligandų sąveikų molekulinės vizualizacijos ir analizės sistema [67] (<https://pymol.org/>).
- **UCSF ChimeraX** - molekulinės vizualizacijos ir struktūrinės bei sąveikų analizės programa [68] (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>).
- **MGLTools** - programinės įrangos rinkinys, skirtas molekulinėms struktūroms vizualizuoti ir analizuoti bei ruošti dokavimo eksperimentus (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/>).
- **AutoDock Vina** – atvirojo kodo programa, skirta ligandų molekuliniam dokavimui makromolekulėse, siekiant prognozuoti ligandų sąveikos su jungimosi vieta konformacijas ir jungimosi energijas [69] (<https://vina.scripps.edu/>).
- **DockingApp** ir **DockingApp RF** – grafinės sąsajos programos, skirtos valdyti ir analizuoti molekulinio dokavimo bei virtualiosios atrankos (angl. *Virtual screening*) eksperimentus, atliekamus AutoDock Vina [70], [71] (<http://www.computationalbiology.it/software.html>).

Naudotos duomenų bazės:

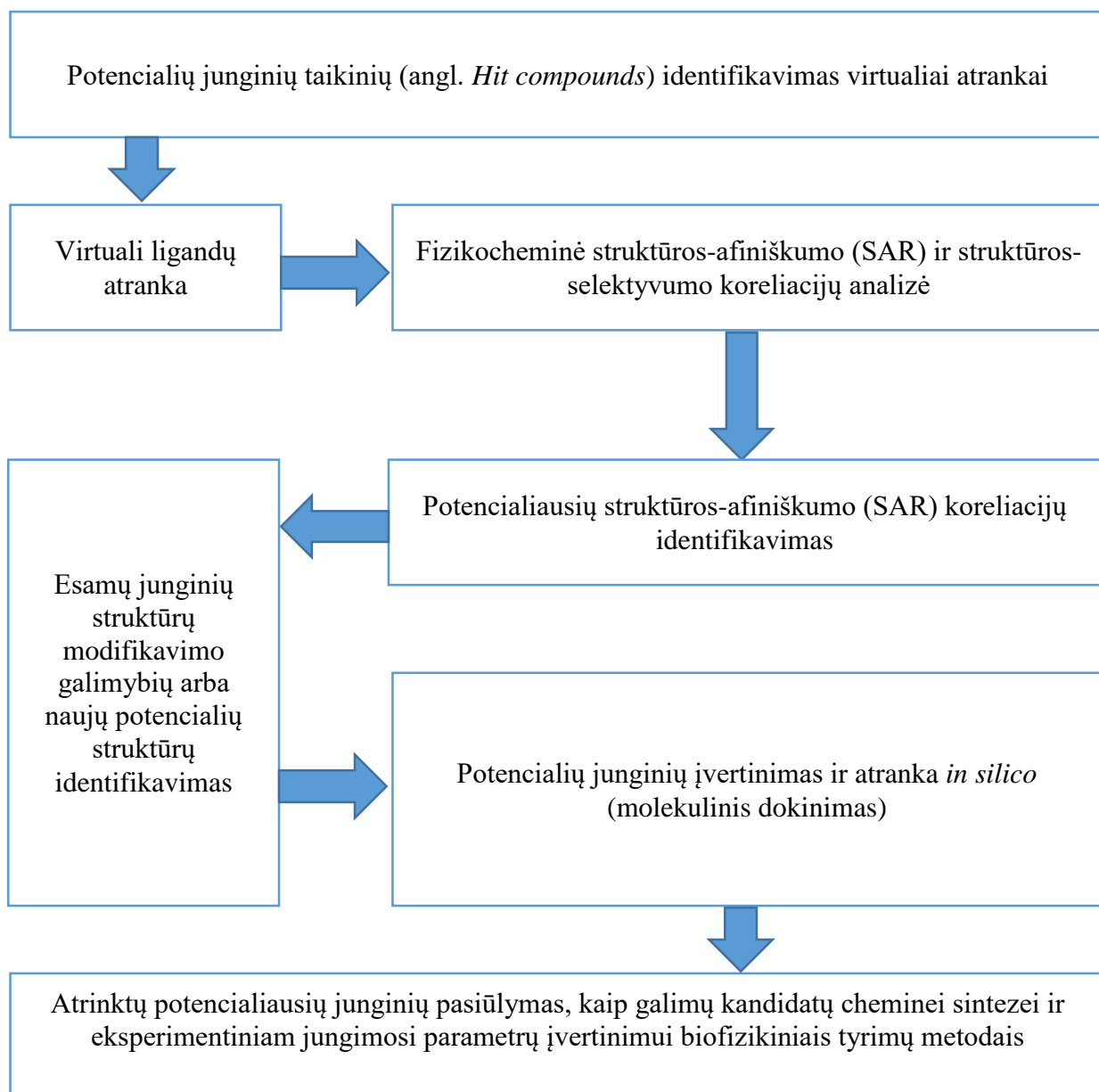
- **PDB** – baltymų duomenų bankas. Šioje duomenų bazėje yra publikuojamos baltymų ir jų kompleksų su ligandais 3d struktūros, informacija apie nustatytas struktūras, sąveikas, naudotus metodus (<https://www.rcsb.org/>).

2.1 pav. yra pavaizduota atliktų *in silico* tyrimų schema. Pirmiausia buvo atrinkti junginiai taikiniai (angl. *Hit compounds*) virtualiai atrankai, remiantis duomenimis apie ligandų sąveiką su CA II jungimosi giminingumus. Tuomet atlikta virtuali ligandų bibliotekos atranka, ieškant panašių junginių struktūrų į šiuos ligandus. Atrinkti junginiai sugrupuoti koreliacinei analizei pagal struktūrinį panašumą. Tuomet išanalizuotos struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijos, remiantis koreliaciniais grafikais. Atliktos analizės metu identifikuotos potencialiausios koreliacijos, kuriomis remiantis galima optimizuoti junginius siekiant pagerinti jungimosi giminingumą CA II ir selektyvumo profilį. Remiantis gautais rezultatais ir išvados iš koreliacinės analizės, identifikuotos struktūrų modifikavimo galimybės ir naujos potencialios junginių struktūros. Galiausiai, šios junginių struktūros įvertintos molekulinio dokavimo metodu, atlikus junginių virtualią atranką. Nustatyti potencialiausi junginiai, įvertinus jungimosi baltymo aktyviajame centre konformacijas ir jungimosi energijas.

Ligandų jungimosi aktyviajame centre konformacijų įvertinimas buvo vykdomas analizuojant kristalines CA II struktūras kompleksuose su panašios struktūros ligandais ir molekulinio dokavimo metodu gautus baltymo-ligando kompleksus, ieškant būdų, kaip galima būtų dar labiau optimizuoti struktūras. Tokia analizė paremta supratimu apie galimas fizikochemines sąveikas ir molekulinio atpažinimo mechanizmus. Molekulinio dokavimo metu gautų prognozuojamų ligando konformacijų aktyviajame baltymo centre analizė yra svarbesnė už vien tik prognozuojamų jungimosi energijų nustatymą, kadangi nepaisant to, jog dokavimo metodikos sparčiai tobulėja, tačiau jungimosi energijų nustatymo patikimumas yra diskutuotinas, o standartinės paklaidos nuo eksperimentiškai nustatytų verčių yra palyginti didelės.

Nustatyti potencialiausi junginiai (angl. *Lead compounds*), juos susintetinus ir įvertinus biofizikiniais eksperimentiniais metodais, sėkmės atveju pasižymėtų palankiais parametrais ir galėtų būti potencialūs kandidatai vystymui. Kitu atveju, būtų sukaupta nauja imtis junginių su eksperimentiškai nustatytais parametrais ir jiems galima būtų kartoti tyrimų schemą, siekiant optimizuoti dar labiau, kad būtų gauti dideliu jungimosi giminingumu CA II pasižymintys ir selektyvūs ligandai - potencialūs vaistų kandidatai.

Vis dėlto, reikia pabrėžti, kad *in silico* metodai, nors ir labai sparčiai tobulėja, tačiau vis dar turi daug ribotumų ir kol kas neįmanoma sukurti vaistų naudojant vien tik *in silico* metodus. Dažnai tiriant net ir tūkstančių ar milijonų junginių struktūrų duomenų bazes, nepavyksta rasti potencialių vaistų kandidatų taikiniui. Tačiau aprašyta *in silico* tyrimų schema yra paremta racionalaus vaistų kūrimo principais, analizuojamos eksperimentinių parametrų struktūrinės koreliacijos ir tik tuomet atliekama virtuali atranka *in silico* (molekulinio dokavimo), todėl toks tyrimo principų derinimas gali leisti pasiekti norimų rezultatų greičiau ir efektyviau, racionaliai analizuojant palyginti nedidelę imtį struktūriškai panašių junginių (nuo kelių šimtų iki kelių tūkstančių).



2.1 pav. *In silico* tyrimų schema.

Toliau pateikiami svarbiausi pritaikyti metodai biotermodinaminių duomenų koreliacinei analizei, ligandų *in silico* atrankai ir struktūrinėms jungimosi giminingumo bei selektyvumo koreliacijoms analizuoti.

2.1. Junginių struktūrų virtuali atranka

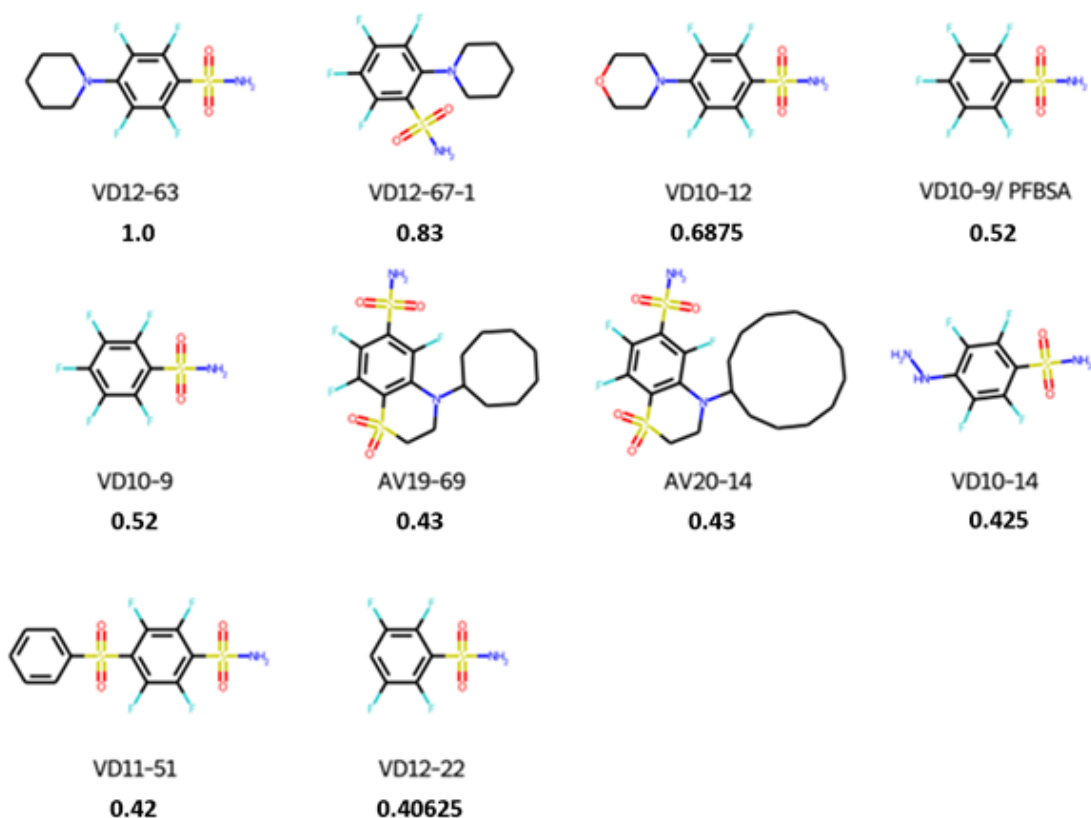
Tanimoto koeficientas (T) yra vienas iš populiariausių cheminės informatikos metodų panašios cheminės struktūros molekulių atrankai ligandų duomenų bazėse [72], [73]. Jis buvo taikytas ir šiame darbe, vykdant junginių atranką pagal struktūrinį panašumą tiriamoje ligandų bibliotekoje. Dvi struktūros paprastai laikomos panašiomis, jei $T > 0,85$. Tačiau, kai kalbame apie cheminių struktūrų panašumą, Tanimoto koeficientas $T \geq 0,7$ taip pat yra priimtinas, kad būtų galima daryti išvadą apie dviejų junginių struktūrinį panašumą. Molekulė su Tanimoto koeficientu lygiu 1 yra ta pati, kurios

atžvilgiu yra vykdoma panašių junginių struktūrų paieška. Jeigu ji irgi yra analizuojamų junginių imtyje ligandų duomenų bazėje, programa pirmiausia suras ją, nes akivaizdu, kad ji yra panašiausia į save.

Toliau junginiai yra rikiuojami pagal struktūrinį panašumą į etaloninę molekulę, kurios atžvilgiu vykdoma atranka ir apskaičiuojamas tokio struktūrinio panašumo koeficientas. Tanimoto koeficientas gaunamas padalijus cheminę struktūrą į chemines substruktūras ir gaunant santykį tarp dviejų skirtingų junginių bendrų, t.y. sutampančių, substruktūrų fragmentų ilgio (apskaičiuojamas tokių fragmentų kiekis) ir viso ilgio fragmentų, kurie apima visas substruktūras, kuriomis pasižymi abu junginiai kartu. Taigi, Tanimoto koeficientas yra apibrėžiamas kaip dviejų skirtingų cheminių struktūrų bendrų (sutampančių) substruktūrų fragmentų kiekis padalintas iš kombinuoto substruktūrų kiekio. Kuo didesnis šis santykis, tuo molekulė yra panašesnė į tą, pagal kurią yra vykdoma atranka.

Apibendrinant, Tanimoto indeksas yra skirtas cheminių struktūrų atrankai dideliuose junginių bibliotekose, skirtingų junginių substruktūrų lyginimui bei struktūrinei analizei ir patenka į intervalą (0;1] (koeficientui artėjant į nulį, molekulė bus mažiausiai panaši į etaloninę, o artėjant prie 1, panašiausia į molekulę, kurios atžvilgiu yra vykdoma atranka).

2.2 pav. pateiktas pagal Tanimoto koeficientą tiriamoje ligandų bibliotekoje atliktos junginių atrankos pavyzdys, ieškant panašiausių junginių struktūrų į ligando VD12-63 cheminę struktūrą. Pateikta 10 panašiausių junginių struktūrų, esančių ligandų bibliotekoje ir jos išrikiuotos panašumo ligandui VD12-63 mažėjimo tvarka. Tokios atrankos tikslas – palengvinti ir automatizuoti junginių atranką koreliacinei junginių struktūrų pokyčių ir jų daromos įtakos jungimosi giminingumui bei selektyvumo pokyčiams analizei. Tai ženkliai pagreitina ir palengvina paiešką būdų, kaip galima būtų optimizuoti ligandų struktūrą cheminiais pakaitais, kurie galėtų pagerinti atpažinimą, specifiskumą, jungimosi giminingumą ir selektyvumą norimam taikiniui. Junginiai išrikiuoti pagal Tanimoto indeksą mažėjimo tvarka (iš kairės į dešinę). Žemiau cheminių struktūrų pateikti junginių pavadinimai ir Tanimoto indeksai VD12-63 junginio atžvilgiu. Junginys su Tanimoto indeksu lygiu 1 yra tas pats VD12-63 ligandas, kurio atžvilgiu yra vykdoma atranka.



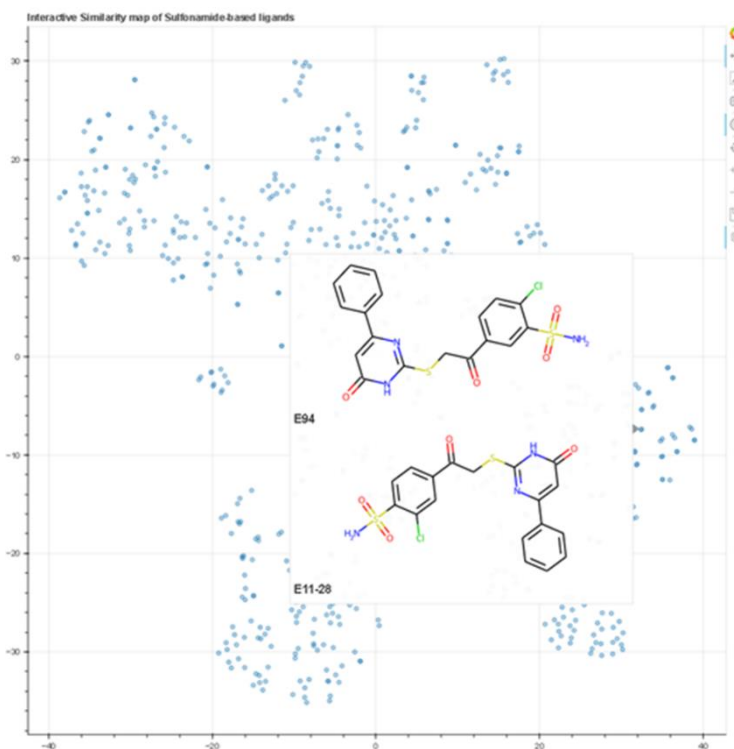
2.2 pav. Pavyzdys programa pagal Tanimoto koeficientą atliktos junginių paieškos ir atrankos ligandų bibliotekoje, ieškant panašiausių junginių struktūrų į ligando (VD12-63) visų kitų izoformų atžvilgiu struktūrą.

Junginių atranką (angl. *Virtual screening*) didelėse duomenų bibliotekose cheminės informatikos metodais galima vykdyti ne tik pagal įvairius panašumo indeksus (angl. *Similarity search*), tačiau ir pagal junginių pavadinimus, molekulinę masę, atominius skaičius, valentingumą, pasiskirstymo koeficientą ($\log P$, siekiant analizuoti tirpumą, kuris taip pat labai svarbus potencialiems vaistų kandidatams) ir daug kitų parametrų, kuriuos automatiškai apskaičiuoti galima naudojantis cheminės informatikos programiniais paketais.

Pasinaudojant cheminės informatikos programos RDKit paketu Python aplinkoje buvo parašyta programos kodas cheminių struktūrų paieškai bei atrankai tiriamoje ligandų bibliotekoje ir junginių struktūriniais panašumams bei skirtumams analizuoti ir atvaizduoti. Taip pat programos kodas papildytas kitais fragmentais, siekiant automatizuotai papildyti eksperimentinius biotermodinaminius junginių sąveikų su karboanhidrazių izoformomis duomenis (fluorescenciniu terminio poslinkio metodu nustatytas jungimosi konstantas ir stebimosios Gibso energijos pokytį) teoriniais duomenimis apie pačias junginių chemines struktūras, tokiais kaip: junginio molekulinė masė, atominis skaičius, pasiskirstymo koeficientas ($\log P$) ir pan. Pagal šiuos ir biotermodinaminius parametrus taip pat galima atlikti virtualią ligandų bibliotekos atranką.

Taip pat pritaikytas programos kodas atvaizduoti tiriamos ligandų bibliotekos sulfonamidinių junginių chemines struktūras, kaip interaktyvų cheminių struktūrų tarpusavio panašumo žemėlapi

(2.3 pav.), pasinaudojant RDKit ir kitais programiniais paketais Python aplinkoje. Tai palengvina struktūrų tarpusavio lyginimą. Kiekvienas taškas žemėlapyje žymi tam tikrą junginį, o arti vienas kito esantys taškai – panašiausias vienas į kitą junginius. Persiklojantys taškai žymi labai vienas į kitą panašius junginius, jie yra ryškesnės mėlynos spalvos šiame cheminių struktūrų žemėlapyje. Kaip pavyzdys pateiktos dvi cheminės struktūros E94 ir E11-28, kurias parodo šis žemėlapis viename iš persiklojančių taškų. Šie junginiai yra labai panašūs ir skiriasi tik tuo, jog viename pakaitas yra benzensulfonamido *meta* padėtyje, o kitame junginyje – *para* pozicijoje.



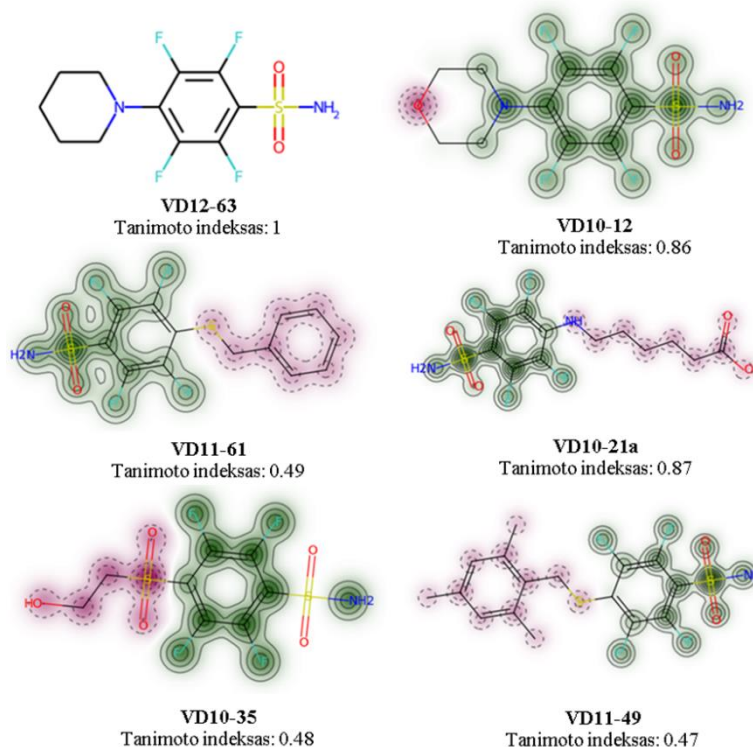
2.3 pav. Interaktyvus sulfonamidinių ligandų struktūrų tarpusavio panašumo žemėlapis, skirtas analizuoti ligandų bibliotekoje esančias chemines struktūras.

2.2. Molekulių struktūrų panašumo žemėlapiai ir automatizuotas pakaitų žymėjimas

Junginių struktūrų panašumo žemėlapiai yra vienas iš metodų, naudojamų cheminėje informatikoje, skirtas atvaizduoti molekulių tarpusavio panašumus ir skirtumus. Yra sugalvota daug įvairiausių būdų, kaip skaidyti molekules į fragmentus ir substruktūras, siekiant automatizuoti jų atranką bei struktūrinių panašumų ir skirtumų palyginimą. Tokio palyginimo prasmė molekulinės biofizikos tyrimuose yra palengvinti koreliacinę junginių struktūrinių pokyčių ir biotermodinaminių parametru tarpusavio priklausomybės analizę.

Molekulių struktūrų panašumo žemėlapiai ir jų panaudojimas RDKit yra išsamiai aprašytas [74] publikacijos autorių. Siekiant pritaikyti šiuos cheminių struktūrų panašumo žemėlapius, parašytas

trumpas Python programinis kodas RDKit aplinkoje skirtas atvaizduoti tiriamos ligandų bibliotekos sulfonamidinių junginių chemines struktūras šiuo metodu (2.4 pav.).



2.4 pav. Molekulių struktūrinio panašumo žemėlapių pavyzdys, gautas lyginant jų chemines struktūras su etalonine molekule (VD12-63), kurios atžvilgiu vykdyta struktūrinė analizė. Tanimoto indeksas nurodo kiekvienos iš šių molekulių struktūrinį panašumą į VD12-63 (žalia spalva pažymėti sutampantys struktūrų fragmentai (substruktūros), o rausva spalva – nesutampantys su etalonine molekule fragmentai).

Tokios cheminių struktūrų analizės tikslas yra cheminių struktūrų optimizavimas siekiant pagerinti potencialių vaistų kandidatų (atrinktų ligandų) jungimosi biotermodinaminius parametrus, afiniškumą bei atrankumą taikiniui ir tai yra labai svarbi vaistų kūrimo proceso dalis ir fundamentinis molekulinės biofizikos iššūkis.

Įvairūs cheminės informatikos metodai gali palengvinti ir gerokai pagreitinti šį procesą, automatizuojant visą kelią iki pat koreliacinės analizės. Koreliacinės analizės metu siekiama pastebėti, kokie cheminiai pakaitai ir jų padėties molekulėje, funkcinės grupės, net įvesti pavieniai atomai, galėtų padėti gauti palankiais biotermodinaminiais parametrais pasižymintį, selektyvų, stipriai su taikiniu besijungiantį ir specifiškumu izofermentui pasižymintį ligandą. Tam, kad palengvinti pakaitų žymėjimą koreliacinei analizei, pasinaudojant Python paketais ir RDKit cheminės informatikos programa Python aplinkoje, buvo parašytas programinis kodas, kuris leidžia automatizuotai išryškinti pakaitus skirtingomis spalvomis benzensulfonamido *orto*, *meta* ir *para* padėtyse. Šis automatizuotas pakaitų žymėjimas buvo panaudotas darbo rezultatuose analizuojamose

koreliaciniuose struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo grafikuose ir junginių, kurie buvo analizuoti molekulinio dokavimo metodu, cheminiu struktūrų atvaizdavimui.

2.3. Koreliaciniai žemėlapiai ir grafikai

Koreliaciniai žemėlapiai ir grafikai yra naudojami struktūros-aktyvumo koreliacijų (SAR) analizei ir norint optimizuoti chemines struktūras selektyvumo, jungimosi giminingumo ir kitų biotermodinaminių parametrų pagerinimui. Viena iš strategijų, kuria galima būtų vadovautis sudarant tokius koreliacinius žemėlapius ir aspektai, į kuriuos reikėtų atsižvelgti, yra išsamiai aptarti su praktiniais pavyzdžiais [75] autorių.

Molekulių struktūrinio panašumo žemėlapiai ir automatizuotas pakaitų žymėjimas gali būti puikūs įrankiai, papildantis koreliacinius žemėlapius ir grafikus bei išryškinantis cheminių struktūrų pokyčius, kurie gali lemti jungimosi giminingumo ir selektyvumo taikinio baltymui pokyčius. Tokie struktūrinių pakaitų identifikavimo bei žymėjimo metodai gali sutaupyti daug laiko vykdant koreliacinę analizę, automatizuojant vieną iš jos etapų.

Koreliaciniai žemėlapiai ir grafikai yra sudaromi labai panašiais principais. Šiame darbe pasirinkta naudoti koreliacines diagramas, kadangi tai yra patogiausias būdas analizuoti Gibso energijos pokyčio koreliacinę priklausomybę nuo junginių cheminių struktūrų pokyčių.

Pagrindiniai koreliacinių grafikų sudarymo principai:

- Koreliaciniuose grafikuose turi atsispindėti struktūriniai pokyčiai tarp skirtingų junginių, todėl labai palengvina pakaitų tarp gretimų molekulių koreliaciniame grafike išryškinimas. Strategija yra arba išryškinti sutampančius fragmentus tarp gretimų junginių koreliaciniame grafike, arba tuos, kurie skiriasi (t.y. struktūrinius pakaitus).
- Tarpusavyje lyginami junginiai koreliacijos grafike yra parenkami taip, kad būtų pakankamai didelio panašumo, jog aiškiai išryškėtų molekulių pagrindai, kurie tarpusavyje sutampa ir struktūriniai pakaitai, kuriais molekulės skiriasi. Didžiausią prasmę turi biotermodinaminių sąveikos su baltymu parametrų priklausomybės nuo nedidelių cheminės struktūros pokyčių analizė (e.g. vienas atomas, funkcinė grupė, pakaitas), kadangi tai padeda lengviau suprasti biotermodinaminių parametrų kitimo priežastis bei tai lemiančias fizikochemines sąveikas.
- Junginių pavadinimai ir cheminės struktūros, su išryškintais pakaitais, pateikiamos vienoje grafiko ašyje, o selektyvumo arba biotermodinaminių parametrų duomenys yra pateikiami kitoje grafiko ašyje. Koreliaciniame grafike pateikiami biotermodinaminiai duomenys gali būti: jungimosi arba disociacijos konstantos, entropijos, entalpijos arba Gibso energijų pokyčiai, selektyvumo parametrai (santykis tarp taikinio ir ne taikinio jungimosi konstantų

ar disociacijos konstantų arba Gibso energijų pokyčio (ΔG) skirtumas ($\Delta\Delta G$) tarp taikinio ir ne taikinio izoformų) ir t.t.

- Koreliaciniame grafike vienu metu gali būti pateikiami keli biotermodinaminiai parametrai ir analizuojama jų priklausomybė nuo struktūrinių pokyčių, pvz.: atvaizduojama Gibso energijos pokyčio priklausomybė ir entropijos bei entalpijos pokyčių indėlių priklausomybė ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).

Pagrindinis šiais principais sudaryto koreliacinio grafiko analizės tikslas yra identifikuoti, kaip nedideli junginių struktūriniai pokyčiai daro įtaką konkretiems biotermodinaminiam parametrams ir suprasti to fizikochemines priežastis, o tuomet atrinkti struktūrinius pakaitus, kurie integruoti į sutampančius junginių cheminių struktūrų fragmentus yra turi didžiausią vertę ir pagerina biotermodinaminis parametras, jungimosi giminingumą ar selektyvumą.

2.4. Ligandų selektyvumo baltymui įvertinimas

Selektyvumas tai yra palyginamasis parametras, parodantis kiek stipriau ligandas jungiasi prie taikinio baltymo atžvilgiu ne taikinio. Egzistuoja du pagrindiniai būdai, norint įvertinti junginio selektyvumą taikiniui (mūsų atveju fermento karboanhidrazės II izoformai kitų izoformų atžvilgiu):

- Gibso energijų pokyčio (ΔG) skirtumas ($\Delta\Delta G$) tarp taikinio ir ne taikinio izoformų. Kuo neigiamesnis skirtumas, tuo didesnis selektyvumas taikinio atžvilgiu. Jeigu skirtumas teigiamas, junginys yra visiškai neselektyvus taikiniui konkrečios ne taikinio izoformos atžvilgiu.
- Jungimosi konstantos (K_b) arba disociacijos konstantos (K_d) santykis tarp taikinio ir ne taikinio izoformų. Kuo didesnis santykis, tuo junginys selektyvesnis taikiniui.

Jungimosi konstantų lyginimo atveju, selektyvumas išreiškiamas kartais (kiek kartų stipriau jungiasi prie taikinio nei prie konkrečių ne taikinio izoformų). Gibso energijos pokyčio lyginimo atveju, apytiksliai -6 kJ/mol jungimosi giminingumo skirtumas tarp taikinio ir ne taikinio izoformų (jeigu eksperimentai atlikti fiziologinėje 37°C temperatūroje) rodo, jog junginys prie taikinio baltymo jungiasi apytiksliai 10 kartų stipriau nei prie ne taikinio (-12 kJ/mol atveju apytiksliai 100 kartų ir t.t.).

2.5. Molekulinio dokinimo metodika ir protokolai

Bioinformatikos metodai, tokie kaip molekulinis dokinimas, kuris leidžia prognozuoti ligandų jungimosi su aktyviuoju baltymo centru konformacijas ir jungimosi energetiką ir fizikiniai modeliavimo metodai (pavyzdžiui molekulinės dinamikos simuliacijos) leidžia įvertinti pagal struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų analizės rezultatus naujai sugalvotų cheminių struktūrų jungimosi specifika ir prognozuoti jungimosi giminingumą taikiniui. Tokiu būdu galima atrinkti potencialiausius naujai sugalvotus junginius ir tik tuomet juos siūlyti cheminei sintezei. Toliau susintetintų junginių biotermodinaminiai parametrai įvertinami įvairiais biofizikiniais metodais, tokiais kaip: fluorescencinis terminio poslinkio metodas, izoterminė titravimo kalorimetrija, paviršiaus plazmonų rezonansas ir kt.

Baltymo paruošimas

Pirmiausia baltymo (hCAII) kristalografinės struktūros aukštos rezoliucijos (0.9 angstromai) .pdb formato failas buvo gautas iš baltymų duomenų banko (RCSB PDB: <https://www.rcsb.org/structure/3KS3>). Pirminė šios struktūros publikacija pateikiama [76]. Tuomet dėl tikslumo pasirinkta MGLTools programinio paketo pagalba konvertuoti baltymą į dokinimui skirtą formato failą .pdbqt. Prieš atliekant konvertavimą buvo panaikintos vandens molekulės, kadangi tos vandens molekulės, kurios yra baltymo aktyviajame centre ar jo įėjime gali daryti įtaką molekulinio dokinimo prognozuojamoms konformacijoms ir jungimosi energijoms, dėl atsirandančios papildomų sąveikų galimybių dėl vandenilinių ryšių. Tuo atveju, jei tai būtų baltymo-ligando komplekso kristalografinė struktūra, taip pat būtų panaikintas komplekse esantis ligandas. Tuomet įvykdyta patikra dėl trūkstamų atomų struktūroje. Tuose aminorūgščių liekanose, kuriose buvo trūkstamų atomų, pasirinkta, jog programa sumodeliuotų ir papildytų baltymo struktūrą trūkstamais atomais. Paskutinis žingsnis buvo pridėti polinius vandenilius ir Kollman krūvius [77]. Paruošta baltymo struktūra išsaugota .pdbqt formatu dokinimui.

Ligandų paruošimas virtualiai atrankai

Remiantis koreliacijų analizės rezultatais ir išvadomis, buvo pasirinkti junginių farmakoforai ir juose įvedami pakaitai. Junginių struktūros išsaugotos SMILES formatu ir OpenBabel programa automatiškai konvertuotos į 3d formatą .pdb (t.y. sugeneruotos atsitiktinės 3d atomų koordinatės ir pridėti vandeniliai (nustatymas: pH 7.4)). Molekulinio dokinimo metu automatiškai pridėti Gasteiger krūviai [78], [79] ir kiti būtini parametrai dokinimui.

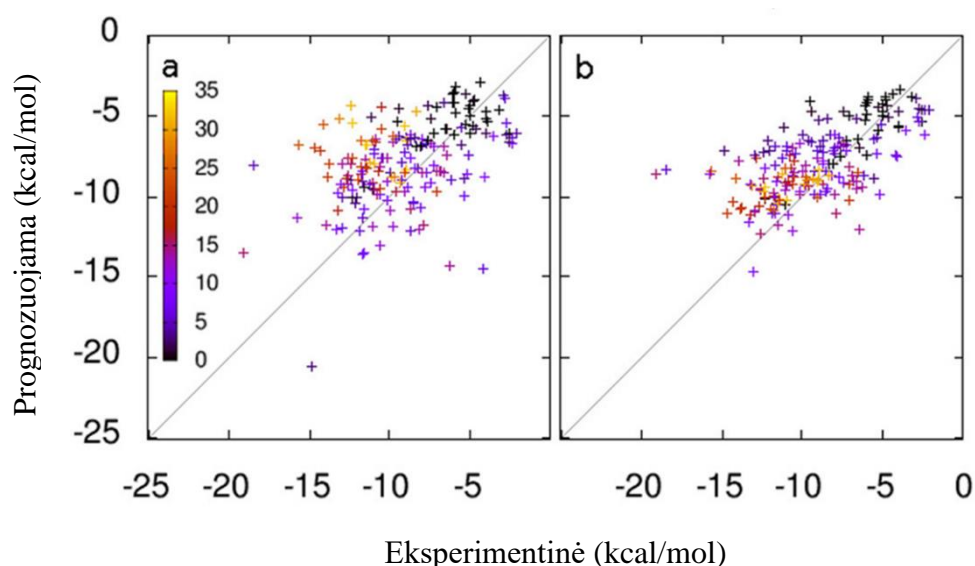
Molekulinio dokinimo eksperimento konfigūracijos paruošimas

DockingApp yra atvirojo kodo grafinės sąsajos programa, skirta lengviau valdyti AutoDock Vina molekulinio dokinimo eksperimentus [70]. Jos publikacijoje detaliam aprašyti naudojami molekulinio dokinimo protokolai. AutoDock Vina publikacijoje galima detaliam susipažinti su dokinimui naudojamu jėgų lauku, indėliais į nustatomą prognozuojamą jungimosi energiją ir įvertinimo funkcijomis (angl. *Scoring functions*). Tą patį, ką atlieka DockingApp, galima atlikti ir komandinėje eilutėje, tačiau DockingApp privalumas yra tai, jog ji palengvina dokinimo srities apsibrėžimą, iš karto vizualizuoja gautus rezultatus Jmol aplinkoje ir duoda apibendrintus rezultatus, kuriuos galima analizuoti ir atskirai. Šiuos rezultatus galima toliau analizuoti PyMOL ir UCSF ChimeraX programomis, tačiau DockingApp yra patogiau, jog yra galimybė identifikuoti trūkumus iš karto pasibaigus dokinimui ir nuspręsti, ar reikia kartoti dokinimo procedūrą, keisti parametru konfigūraciją ir t.t. Be to yra galimybė dokinti po vieną ligandą arba didelį kiekį iš karto, pasirenkant virtualią atranką ir tiesiog nurodant ligandų duomenų bazės aplanką.

Taigi, prieš pradėdant dokinimo tyrimą, pirmiausia buvo pasirinkta kontrolė – hCAII kompleksas su E2 ligandu kristalografinė struktūra (<https://www.rcsb.org/structure/3m98>). Šis ligandas yra susintetintas Biotermodynamikos ir vaistų tyrimų skyriuje ir žinoma jo eksperimentinė jungimosi Gibso energija su CAII. Tuomet sukonfigūruoti molekulinio dokinimo parametrai siekiant atkurti kaip įmanoma artimesnes ligando jungimosi konformacijas eksperimentiškai nustatytam baltymo – ligando kompleksui. Dokinimo sritis buvo apsibrėžta remiantis aktyviajame centre esančiomis aminorūgščių liekanomis (nurodytos cinko joną koordinuojančios ir hidrofiliškos bei hidrofobiškos aktyviojo centro sričių aminorūgštys).

Molekulinis dokinimas, kada fermento aktyviajame centre yra metalo jonas, šiuo atveju konkrečiai cinko jonas (Zn^{2+}), nėra toks trivialus, kadangi ruošiant baltymą dokinimo eksperimentams, metalų jonams automatiškai krūviai nepridedami. Prieš pradėdant eksperimentą, buvo atskirai apsibrėžtas krūvis cinko jonui. Galimų sprendimų yra įvairių, tačiau dokinimas su baltymais, turinčiais metalo jonus, vis dar išlieka pakankamai sudėtingas. Dokinimo su tokio tipo baltymais problematika yra išsamiai aptarta [80]. Spręsti šią problemą kuriami įvairūs modeliai ir tobulinami jėgų laukai. Vienas iš tokių modelių detaliam aprašytas [81]. Autoriai sukūrė ir pritaikė specialiai tam skirtą Autodock4Zn jėgų lauką, siekiant spręsti šią problemą. Jis yra įtrauktas į AutodockTools paketą ir galima juo naudotis atliekant molekulinį dokinimą su baltymais, turinčiais metalo joną aktyviajame centre, tačiau remiantis [82] palyginamąja dokinimo programų publikacija, buvo pasirinkta naudoti AutoDock Vina, dėl jos palyginti gero jungimosi konformacijų nustatymo tikslumo.

Verta atkreipti dėmesį, jog AutoDock Vina nurodomos standartinės jungimosi energijos prognozavimo paklaidos nuo eksperimentiškai nustatytų jungimosi energijų yra gautos remiantis [57] pateikiamais duomenimis. Autoriai atliko molekulinio dokavimo eksperimentus su didele baltymo-ligandų kompleksų imtimi, kuriems yra žinomos nustatytos eksperimentinės jungimosi energijos ir lygino jas su molekulinio dokavimo metu gautomis energijomis. Nustatyta standartinė AutodockVina paklaida nuo eksperimentinių verčių buvo 2.85 kcal/mol [69] ir anot autorių, tai palyginti maža standartinė paklaida dokavimo eksperimentams. Tam, kad tai pagrįstų jie palygino AutodockVina su įprasta Autodock programa (1.11 pav.). Šiame grafike matosi, jog AutodockVina tiksliau nustato jungimosi konformacijas, o to priežastis yra, jog AutodockVina geriau nustato teisingas konformacijas junginiams su didesniais kiekiais aktyvių rotacinių jungčių.



1.11 pav. Eksperimentinė ir prognozuojama laisvoji jungimosi energija (kcal/mol) (a) AutoDock, (b) Vina. Pridėta legenda rodo aktyvių rotacinių jungčių liganduose skaičių (adaptuota iš [69]).

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe yra pateikiamas sulfonamidinių ligandų molekulinio atpažinimo, jungimosi giminingumo ir selektyvumo CA II izoformai tyrimas. Analizuojami biotermodinaminių parametru duomenys yra gauti iš Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje sukurtos, vystomos ir tiriamos ligandų bibliotekos, kurios didelę dalį sudaro sulfonamidiniai junginiai. Šiame skyriuje gaminami taikiniai - rekombinantinės karboanhidrazės, sintetiniai ligandai su tikslu rasti atrankius slopiklius šiems taikiniams ir atliekami molekulinės biofizikos tyrimai, siekiant išmatuoti ligandų sąveikos su karboanhidrazėmis biotermodinaminius, kinetinius bei struktūrinius parametrus ir įvertinti parametru bei junginių struktūrų koreliacijas, siekiant optimizuoti junginius ir sukurti naujus potencialius ligandus.

Didžioji dalis analizuotų sąveikų jungimosi giminingumo duomenų, taip pat kai kurie kiti biotermodinaminiai parametrai (stebimųjų jungimosi entalpijos ir entropijos pokyčiai, tikrosios (intrinsinės) jungimosi biotermodinaminių parametru vertės) yra publikuoti [12] straipsnyje. Visi analizuojami biotermodinaminiai parametrai yra nustatyti fluorescenciniu terminio poslinkio metodu ties 37°C temperatūra (pH 7.0).

Vienas iš svarbiausių pirminių vaistų kūrimo etapų uždavinių – identifikuoti selektyvius, specifiskumu bei jungimosi stiprumu taikiniui pasižyminčius junginius – ligandus, kurie galėtų tapti potencialių naujų vaistų kandidatų pirmtakais (angl. *Lead-compounds*), tačiau tik nedidelė tokių junginių dalis praeina tolesnius vaistų kūrimo etapus.

3.1 pav. pateikti prieinamų ir taikomų gydyme (dažniausiai kaip diuretikai arba antiglaukominiai preparatai) CA II slopinimo aktyvumu pasižyminčių sulfonamidinių junginių pavyzdžiai. Šiuo metu taikomų CA II inhibitorių problema yra būtent tai, kad nors kai kurie iš jų ir pasižymi palyginti dideliu jungimosi giminingumu, tačiau jie nėra selektyvūs būtent CA II izoformai visų kitų izoformų atžvilgiu arba inhibuoja kelias izoformas ir todėl pasižymi tik daliniu selektyvumo profiliu CA II. Dėl šios priežasties yra labai aktualu atrasti selektyvius CA II inhibitorius atžvilgiu visoms 11 izoformų, siekiant pagerinti potencialaus vaisto efektyvumą ir sumažinti šalutinių efektu riziką. Iš tikrųjų, ligandų sąveikų su karboanhidrazėmis tyrimu tikslas idealiu atveju turėti selektyvius ir stipriai besijungiančius inhibitorius visoms 12 žmogaus karboanhidrazių izoformų, kadangi apie didžiąją dalį izoformų jau yra žinomos su jomis siejamos ligos, identifikuoti šių ligų molekuliniai mechanizmai arba bent jau jų modeliai. Mažiausiai yra žinoma apie CA III ir jos reikšmę, tačiau tai ir mažiausiu katalitiniu aktyvumu iš visų izoformų pasižyminti karboanhidrazė, todėl sąveikų su ja tyrimai yra sudėtingi.

Remiantis 3.1 lentelėje pateiktais duomenimis, gautais iš tiriamos ligandų bibliotekos, apie 3.1 pav. pateiktų pavyzdinių CA II slopinimo aktyvumu pasižyminčių ligandų jungimosi giminingumus

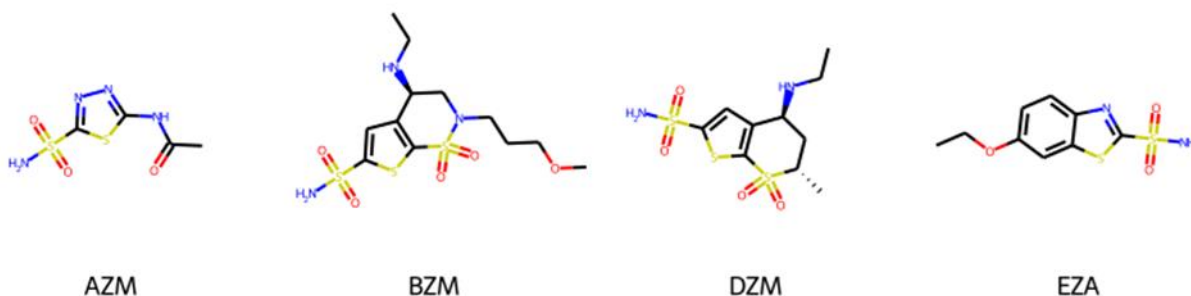
ir selektyvumo CA II profilius, galima aiškiai pastebėti medicinoje naudojamų CA II inhibitorių selektyvumo problemą. Nei vienas iš pavyzdyje pateiktų medicinoje naudojamų CA II slopiklių neturi pilno selektyvumo profilio CA II atžvilgiu visų kitų izofermentų. Didžiausiu jungimosi giminingumu CA II iš šių keturių junginių pasižymi brinzolamidas, o mažiausiu acetazolamidas (-43,5 kJ/mol). Acetazolamido jungimosi giminingumas su CA II yra ties riba tarp mikromolinio ir nanomolinio ligando (jeigu nagrinėtume disociacijos konstantas), o tai yra palyginti silpnas jungimasis potencialiam vaistui, kuris turėtų būti bent jau nanomolinis, o idealių ir potencialiausių inhibitorių atveju patekti į pikomolinių ligandų intervalą. Be to, acetazolamidas iš šių keturių junginių turi ir blogiausią selektyvumo CA II profilį (AZM jungiasi vienodai stipriai prie beveik visų izoformų).

Palankiausiu selektyvumo profiliu CA II iš šių junginių pasižymi dorzolamidas ir brinzolamidas, jie taip pat turi ir didelį jungimosi giminingumą su CA II, tačiau ir jie nėra selektyvūs visų izoformų atžvilgiu. Dorzolamidas, kaip ir brinzolamidas, nėra selektyvus CA II atžvilgiu CA VII, CA IX ir CA XIV.

Taigi, siekis yra pasiekti kuo geresnį selektyvumo profilį konkrečiai karboanhidrazei visų kitų izofermentų, kurie yra struktūriškai labai panašūs, atžvilgiu.

3.1 lentelė. Medicinoje naudojamų vaistų su CA II slopinimo aktyvumu pavyzdžiai ir jų sąveikos jungimosi giminingumai bei selektyvumo CA II profiliai atžvilgiu kiekvienos iš 11 CA izoformų (AZM – acetazolamidas, BZM – brinzolamidas, DZM – dorzolamidas, EZA – etokszolamidas). Skirtingos spalvos lentelėje rodo, kaip konkretus slopiklis selektyviai jungiasi prie CA II atžvilgiu kiekvienos iš izoformų. Kuo ryškesnė žalia spalva, tuo selektyvumas atžvilgiu konkrečios izoformos didesnis ($\Delta\Delta G$ vertė neigiamesnė).

Junginys	ΔG_{obs} , kJ/mol	Selektyvumas CA II atžvilgiu kiekvienos iš 11 CA izoformų ($\Delta\Delta G$, kJ/mol)										
		CA I	CA III	CA IV	CA VA	CA VB	CA VI	CA VII	CA IX	CA XII	CA XIII	CA XIV
AZM	-43.5	-10.1	-17.4	-1.6	-7.4	-2.9	-4.0	3.3	2.0	-2.6	-1.4	-0.7
EZA	-52.8	-6.6	-21.4	-10.7	-7.8	-4.9	-8.4	1.9	-1.0	-10.4	-7.0	-5.3
BZM	-59.0	-19.6	-24.0	-12.2	-23.3	-8.2	-19.1	0.8	-4.9	-9.4	-8.2	-2.0
DZM	-56.1	-22.6	-23.6	-10.5	-27.1	-11.0	-16.4	-0.3	-3.9	-8.7	-8.7	-2.0



3.1 pav. Medicinoje naudojamų vaistų su CA II slopinimo aktyvumu cheminių struktūrų pavyzdžiai. Po cheminėmis struktūromis nurodyti junginių pavadinimų sutrumpinimai (AZM – acetazolamidas, BZM – brinzolamidas, DZM – dorzolamidas, EZA – etokszolamidas).

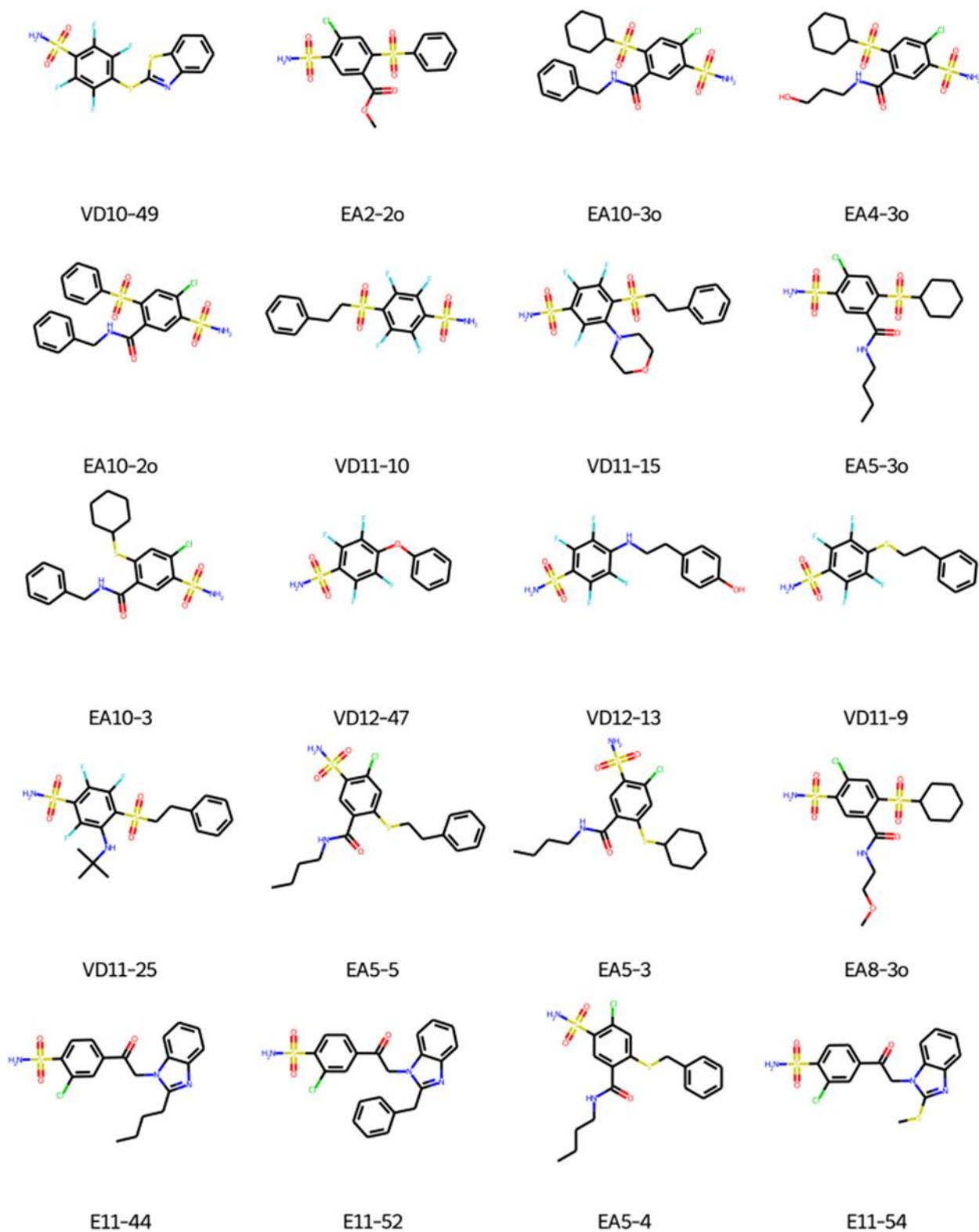
3.1. Atrinkti sulfonamidiniai junginiai, pasižymintys didžiausiu jungimosi giminingumu CA II atžvilgiu

Iš sulfonamidinių junginių bibliotekos buvo atrinkti 20 didžiausiu jungimosi giminingumu CA II atžvilgiu pasižyminčių junginių. Tai padėjo apsibrėžti potencialiausius junginius taikinius (angl. *Hit compounds*) ir pagal juos - cheminių struktūrų sritis, nuo kurių reikėtų pradėti panašių cheminių struktūrų virtualią atranką ir jų struktūros-afiniškumo koreliacijų analizę. 3.2 pav. pateiktos šių junginių struktūros, išrikiuotos mažėjimo tvarka pradedant nuo didžiausiu jungimosi giminingumu pasižyminčio ligando VD10-49. 3.2 lentelėje yra pateikti šių junginių selektyvumo CA II profiliai atžvilgiu kiekvienos iš 11 CA izoformų. Junginių laboratoriniuose pavadinimuose raidės (pvz.: *VD*, *EA*, *E*) žymi vieno ar kelių autorių, kurie susintetino šiuos junginius, inicialus. Nors visi 3.2 lentelėje pateikti junginiai pasižymi palyginti stipriu jungimusi su CA II, tačiau nei vienas neturi pilno selektyvumo CA II profilio, t.y. yra tik dalinai selektyvūs CA II atžvilgiu kai kurioms iš izoformų. Taigi, susiduriama su ta pačia problema, kaip ir anksčiau aptartų medicinoje naudojamų CA II slopinimo aktyvumu pasižyminčių vaistų atveju, kai selektyvumo profilis yra dalinis.

CA III yra mažiausiai katalitiškai aktyvi karboanhidrazė, jos biotermodinaminius duomenis yra sunkiausia išmatuoti iš visų izoformų ir jos funkcinė reikšmė nėra iki galo suprasta, todėl ji nėra tokia aktuali ir lentelėse bei koreliacinėse diagramose daug kur trūksta išmatuotų jos jungimosi su sulfonamidiniais ligandais duomenų.

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad CA II nėra būdinga stipri sąveika su sulfonamidiniais junginiais, kadangi tik ~22 % visų tirtų junginių ligandų bibliotekoje K_d yra mažesnės nei 10 nM. Tai reiškia, jog tik maždaug penktadalis sulfonamidinių junginių siekia nanomolinį ligando jungimosi stiprumą, reikalingą potencialiam vaistų kandidatui.

Norint iš 3.2 lentelės sužinoti konkretaus ligando jungimosi giminingumą su kiekvienu karboanhidrazės izofermentu, reikia iš CA II jungimosi giminingumo ΔG_{obs} (kJ/mol) atimti selektyvumą $\Delta \Delta G$ (kJ/mol) atžvilgiu konkretaus izofermento, kadangi vienas iš selektyvumo apibrėžimų yra jungimosi Gibso energijos pokyčio skirtumas tarp taikinio ir ne taikinio izoformos.



3.2 pav. 20 junginių, pasižyminčių didžiausiu jungimosi su CA II giminingumu, atrinktų iš tiriamos ligandų bibliotekos panaudojant pritaikytus cheminės informatikos metodus. Struktūros išrikiuotos jungimosi giminingumo mažėjimo tvarka (iš kairės į dešinę, pradedant VD10-49 junginiu, pasižyminčiu didžiausiu jungimosi giminingumu CA II). Po cheminėmis struktūromis nurodyti junginių pavadinimai.

3.2 lentelė. Atrinktų didžiausių jungimosi giminingumu CA II pasižyminčių junginių, esančių ligandų bibliotekoje, selektyvumo CA II profiliai atžvilgiu kiekvienos iš 11 CA izoformų (selektyvumas apskaičiuotas kaip stebimųjų Gibso energijų pokyčių skirtumas tarp taikinio izoformos ir visų kitų izoformų, matuojamas kJ/mol). Skirtingos spalvos lentelėje rodo, kaip konkretus inhibitorius selektyviai jungiasi prie CA II atžvilgiu kiekvienos iš izoformų. Kuo ryškesnė žalia spalva, tuo selektyvumas atžvilgiu konkrečios izoformos didesnis ($\Delta\Delta G$ vertė neigiamesnė). Šalia selektyvumo CA II profilių, nurodytas konkretaus junginio jungimosi giminingumas CA II.

Junginys	ΔG_{obs} , kJ/mol	Selektyvumas CA II atžvilgiu kiekvienos iš 11 CA izoformų ($\Delta\Delta G$, kJ/mol)										
	CAII	CA I	CA III	CA IV	CA VA	CA VB	CA VI	CA VII	CA IX	CA XII	CA XIII	CA XIV
VD10-49	-54.5	-1.2	ND	-18.1	-14.7	-2.9	-14.7	2.88	-5.3	-13.4	1.9	0.7
EA2-2o	-53.7	-13.1	-21.2	-8.6	-17.4	-7	-10.6	1.7	-3.4	-8.3	-4.7	0.1
EA10-3o	-53.4	-13.6	-21.4	-13.9	-16	-1.6	-12	-0.3	0.5	-5.2	-6.8	-2.1
EA4-3o	-53.3	-17.7	-26.7	ND	-18.6	-6.1	-18.3	-0.8	1.2	-5.4	-10	-4
EA10-2o	-52.9	-11.1	-18.5	-8.4	-23.4	-5.2	-11.1	4.4	0.1	-3.9	-6.7	-0.4
VD11-10	-52.8	4.2	ND	-19.6	-12.2	ND	-12.2	0	-7.4	-10.6	3	-5.9
VD11-15	-52.8	-11.3	ND	-17.8	-15.4	-3	-8.9	-1.8	-3.8	-12.4	-3.5	-3
EA5-3o	-52.5	-17.2	-22.4	-7.7	-18	0.6	-13.9	2.1	3.1	-1.5	-4.2	0.6
EA10-3	-52.5	-10.5	-20.7	-10.6	-12.4	0	-13	-1.6	0.6	0.9	-9.2	0.3
VD12-47	-52.2	7.1	ND	-16.1	-11.4	1.2	-14.2	1.2	-6	-8.9	1.2	-1.9
VD12-13	-52.1	3.1	ND	-13.8	-13.7	-0.4	ND	3.1	-4.9	-11.7	3.7	-3.6
VD11-9	-52.1	4.3	ND	-16	-12.3	2.8	-14.1	1.8	-3.2	-9.9	4.7	0.4
VD11-25	-52.1	-15.4	ND	-12.9	-15.6	3.1	-8.8	5.2	1.7	-9.5	-2.8	ND
EA5-5	-51.6	-17	-23.7	ND	-13.1	-0.8	-14.9	-1.8	1.2	0.9	-5.9	-3.3
EA5-3	-51.0	-13	-21.3	-1.7	-13	-3.1	-13.6	4.1	2.9	4.2	-5.9	0.6
EA8-3o	-50.9	-17.7	-23	-7.6	-12.5	-5.5	-14.2	0.1	2.5	-5.2	-7.6	-0.2
E11-44	-50.8	-0.5	-27.6	-15.5	-14.7	-14.1	-19.3	-0.5	-3.4	-9.6	0.2	-1.5
E11-52	-50.7	-2.8	-28.7	-15	-15.1	-19.2	-16	-2.8	-8.3	-10.5	-2.2	-3.3
EA5-4	-50.7	-16.6	-28.7	ND	-12.7	-3.5	-13.6	-1.6	-0.4	0.5	-8.3	-3.4
E11-54	-50.3	1.8	-28.3	-14.6	-12.9	-12.9	-22.7	-0.8	-3.4	-7.7	-2.6	-3.2

*ND – nenustatyta vertė.

3.2. Koreliacijų tarp ligandų cheminių struktūrų ir jungimosi biotermodinamikos analizė

Racionalaus vaistų kūrimo tikslas yra sukurti mažas molekules naudojantis kiekybiniais metodais, kuriais siekiama optimizuoti jungimosi giminingumą [12]. Tai yra vienas iš fundamentinių molekulinės biofizikos klausimų. Tokie metodai turėtų padėti pagerinti junginių, kurie specifiskai, selektyviai, grįžtamai ir su dideliu jungimosi giminingumu jungiasi prie taikinio baltymo. Kadangi dar nėra įmanoma išvystyti tokius junginius vien tik naudojantis *in silico* metodais, dėl įvairių šių metodų ribotumo ir supratimo apie molekulinio atpažinimo procesus trūkumo, todėl potencialiausi vaistų kandidatai atrandami atliekant didelio našumo ligandų ir jų sąveikos su baltymais duombazių virtualią atranką. Tokia atranka leidžia identifikuoti palankiomis sąlygomis pasižyminčius tikslinius junginius (angl. *Hit compounds*) ir į juos struktūriškai panašius kitus junginius, kurių struktūros-aktyvumo, struktūros-termodinamikos, struktūros-kinetikos ir struktūros-selektyvumo koreliacijų tyrimo metu, galima nustatyti palankiausias funkcines grupes ir cheminius pakaitus, kurie galėtų

padėti dar labiau pagerinti potencialių ligandų specifiškumą, selektyvumą, jungimosi giminingumą, kinetinius ir kitus svarbius parametrus taikinio baltymo atžvilgiu.

Vis dėlto, supratimas apie molekulinio atpažinimo procesus ir priežastis, kurios lemia palankesnius, pavyzdžiui, biotermodinaminius jungimosi parametrus, yra ribotas ir kartais sunku suprasti, kodėl labai mažas pokytis cheminėje struktūroje duoda didelį rezultatą palankesniems jungimosi parametrams. Norint tai suprasti, reikia analizuoti, kaip taikinio baltymas atpažįsta ligandą. Tam padeda supratimas apie fizikochemines sąveikas, kuriomis gali pasižymėti vienos ar kitos cheminės struktūros ir funkcinės grupės. Taip pat supratimui apie molekulinę sąveiką labai svarbu yra duomenų bazės, tokios kaip baltymų duomenų bankas (RCSB PDB), kuriuose yra pateikiamos kristalografinės baltymų struktūros, suteikiančios informaciją apie baltymo aktyvų centrą ir leidžiančios prognozuoti galimas tarpmolekulinę sąveiką tarp baltymo ir ligando. Ne mažiau svarbu ir nustatytos įvairių baltymų-ligandų kompleksų kristalografinės struktūros, kurios leidžia analizuoti konformacijas ir fizikochemines sąveikas jau prisijungusio prie baltymo ligando. Molekulinis dokimas taip pat padeda prognozuoti ligandų jungimosi konformacijas ir energijas ir atlikti virtualią potencialių vaistų kandidatų atranką.

Taigi, paieška būdų, kaip optimizavus molekulių chemines struktūras pagerinti ligandų atrankumą CA II ar bet kuriai kitai taikinio izoformai visų kitų izoformų atžvilgiu ir padidinti sąveikos stiprumą (jungimosi energiją) - tai yra vienas iš svarbiausių uždavinių potencialių naujų vaistų molekulių kandidačių (ligandų) paieškoje. Tai pasiekti padeda struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų analizė.

Identifikavus cheminius pakaitus, kurie leidžia pasiekti palankesnius biotermodinaminius parametrus bei geresnę atrankumą, ir priežastis, kurios tai nulemia, galima sugalvoti naujas potencialias chemines struktūras arba identifikuoti galimas palankias modifikacijas esamose struktūrose, įvertinti jas *in silico* metodais, tokiais kaip molekulinis dokimas, ir pasiūlyti jas susintetinti bei ištirti biofizikinius parametrus, tikintis atrasti potencialius vaistų kandidatus.

Sulfonamidinių junginių atpažinimui, jungimosi giminingumui ir selektyvumui CA II tirti buvo pasirinkta jungimosi stebimosios Gibso energijos, nustatytos fluorescenciniu terminio poslinkio metodu. Iš stebimosios Gibso energijos pokyčio (ΔG) koreliacinės priklausomybės nuo junginių struktūrinių pokyčių yra patogiu analizuoti ligando jungimosi giminingumą taikinio (CA II) izoformai ir lyginti jį su giminingumu kitų izoformų atžvilgiu. Taip yra stebimas ir selektyvumas, kurio skaitinę vertę galima nustatyti pagal 2.4 skyrelyje aprašytu būdu. Kuo didesnė teigiama skirtumo vertė, tuo labiau junginys yra neatrankus taikinio izoformai atžvilgiu ne taikinio izoformos. Kuo neigiamesnė Gibso energijos pokyčio skirtumo vertė, tuo junginys selektyvesnis taikiniui ne taikinio izoformos atžvilgiu.

Gibso energijos pokytis (ΔG) su jungimosi konstanta (K_b) siejasi formule (3.1):

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (3.1)$$

Čia ΔG – Gibso energijos pokytis, R – universalioji dujų konstanta, T – matavimų temperatūra (K), K_b – jungimosi konstanta.

Pagal K_b santykį tarp taikinio ir ne taikinio izoformų, galime nustatyti, kiek kartų selektyviau ligandas jungiasi prie taikinio izoformos atžvilgiu ne taikinio izoformos. Remiantis (3.1) formule, Gibso energijų pokyčių lyginimo atveju, apytiksliai -6 kJ/mol jungimosi giminingumo skirtumas tarp taikinio ir ne taikinio izoformų (jeigu eksperimentai atlikti fiziologinėje 37°C temperatūroje) rodo, jog junginys prie taikinio jungiasi apytiksliai 10 kartų stipriau nei prie ne taikinio.

Toliau aptariamos *Priedų* skyriuje 5.1 pav. – 5.22 pav. pateiktos sugrupuotos struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagramos, vaizduojančios struktūriškai panašių sulfonamidinių ligandų sąveikos su CA izoformomis stebimosios jungimosi Gibso energijos pokyčio (ΔG_{obs}) priklausomybę nuo junginių struktūrinių pokyčių. Balta linija diagramose žymi apytikslią stebimosios jungimosi Gibso energijos pokyčio nustatymo ribą fluorescenciniu terminio poslinkio metodu, kuomet tyrimai yra atliekami 37°C ($\Delta G_{obs} = -22$ kJ/mol).

Gretimų junginių koreliaciniuose grafikuose struktūriniai skirtumai (struktūrų dalys, kuriuose yra įvedami pakaitai) yra išryškinti skirtingomis spalvomis, remiantis tuo, kurioje benzonsulfonamido pozicijoje yra pakaitas (*para*, *orto*, *meta*). Baltos spalvos tarpai tarp kai kurių koreliacinių grafikų stulpelių rodo, kad junginio sąveikos biotermodinaminiai parametrai su konkrečiu izofermentu dar nėra nustatyti.

Sugrupuotų koreliacijų diagramos pateikiamos prieduose, skirtos išsamesniai konkrečių koreliacijų ir struktūrinių pokyčių analizei. Siekiant apibendrinti gautus rezultatus iš analizuotų sugrupuotų koreliacinių diagramų ir palengvinti jų aptarimo interpretaciją, pasirinkta šių koreliacinių diagramų duomenis atvaizduoti stebimosios jungimosi Gibso energijos pokyčių vertes atvaizduoti apibendrinančiomis duomenų koreliacinėmis diagramomis, pateikiamomis 3.3-3.6 pav.

Naudojantis šiomis apibendrintomis diagramomis, galima pasitikrinti aptariamų junginių sąveikų su karboanhidrazių izoformomis stebimųjų jungimosi Gibso energijos pokyčių vertes, lyginti jungimosi energijų parametrus, analizuoti konkretaus junginio selektyvumą taikinio izoformai CA II atžvilgiu visų kitų izoformų ir lyginti ligandų jungimosi stiprumą su konkrečia izoforma bei selektyvumą profilius tarpusavyje.

3.2.1. EA junginių grupės struktūros-afiniškumo koreliacijų analizė

EA junginių grupės sugrupuotos struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacinės diagramos yra pateiktos *Priedų* 5.1-5.11 pav. Šių sugrupuotų koreliacinių diagramų duomenis apibendrina 3.3 pav. ir 3.4 pav. pateiktos diagramos.

5.1 pav. pavaizduota **EA3-7** junginio ir jį struktūriškai panašių ligandų koreliacinė diagrama. Iš jo galime pastebėti, jog lyginant **EA3-7** ir **EA4-7** junginius, jie vienas nuo kito skiriasi tik tuo, jog **EA4-7** atveju benzensulfonamido *meta* padėtyje yra viena metileno grupė pailgintas pakaitas, sujungiantis benzeno žiedą su pakaito gale įvesta hidroksilo grupė. Dėl šio struktūrinio pokyčio, jungimosi giminingumas su CA II šiek tiek padidėja, tačiau selektyvumo profilis beveik nepakinta, kadangi analogiškai truputį padidėja ir jungimosi giminingumas su dauguma kitų izoformų (išskyrus CA I, su kuria jungimosi stiprumas truputį sumažėja).

Abiejų junginių atvejais didžiausias giminingumas yra su CA IX, o **EA3-7** junginio atveju stebimas ir pakankamai didelis sąveikos selektyvumas būtent su CA IX visų kitų ištirtų izoformų atžvilgiu, kadangi prie CA IX ligandas jungiasi ne mažiau nei apytiksliai 20 kartų (arba -7.8 kJ/mol) stipriau, nei prie visų kitų izoformų. Tačiau šis ligandas yra nanomolinis (~10 nM), todėl tai galėtų būti potencialus vaistų kandidatas, jeigu pavyktų pagerinti jungimosi giminingumą ir selektyvumą. Be to, yra trūkumas sąveikų tyrimo rezultatų su 3 izoformomis, todėl neaišku, ar jis yra selektyvus ir jų atžvilgiu. To priežastis yra tai, jog kai kurių ligandų ir baltymų sąveikas nėra taip trivialu išmatuoti. Vis dėlto, atsispiriant nuo šio junginio ir tiriant panašius jį naujus junginius su mažais struktūriniais pokyčiais, galėtų pavykti pasiekti didesnę giminingumą ir selektyvumą CA IX. Tai rodo struktūriškai į **EA3-7** panašus **EA4-3o** junginys, kurio jungimosi Gibso energija -54.5 kJ/mol, o tai jau artėja link labai stipraus jungimosi - pikomolinio ligando lygmens. Tačiau **EA4-3o** junginio atveju prarandamas selektyvumas CA IX kai kurioms iš izoformų (CA II, CA VII, CA XIV), todėl, norint jog tai būtų potencialus vaistų kandidatas, reikėtų pasiekti, jog selektyvumas būtų visų izoformų atžvilgiu.

Toliau, lygindami **EA4-7**, **EA3-3**, **EA4-3**, **EA3-3o** ir **EA4-3o** junginius, galime pastebėti, jog jungimosi su CA II giminingumui didelę įtaką turi **EA3-7** esančios amido grupės, sujungiančios benzensulfonamidą *para* padėtyje su cikloheksanu pakeitimas sulfanilo grupė. Jungimosi giminingumas padidėja apytiksliai -10 kJ/mol, t.y. arti 50 kartų, tačiau prarandamas selektyvumas, kadangi padidėja jungimosi giminingumas ir su daugeliu kitų izoformų. Vis dėlto, tai rodo, jog amido grupė yra palanki siekiant didesnio selektyvumo CA II, o sulfanilo grupė – didesnio giminingumo CA II. Lyginant **EA4-7**, **EA4-3** ir **EA4-3o** išryškėja, jog dar palankesnė jungimosi su CA II giminingumui yra sulfonilo grupė. Taip gali būti todėl, jog sulfonilo grupė turi galimybę sudaryti keturis vandenilinius ryšius kaip vandenilinio ryšio akceptorius su donoringomis vandenilinio ryšio grupėmis aktyviajame baltymo centre, t.y. po du vandenilinius ryšius abiem deguonies atomams. Be

to, sulfonilo grupė pasižymi stipresniu elektronų ištraukimo efektu, o tai yra svarbu jungimuisi su CA II jungimosi vieta. Vis dėlto, sulfanilo grupės pakeitimas sulfonilo grupe nepagerina selektyvumo CA II profilio, todėl siekiant išnaudoti sulfonilo grupę *para* padėtyje kaip jungimosi stiprumą su CA II didinančią grupę, reikėtų bandyti keisti cikloheksaną kitais cikliniais, heterocikliniais bei aromatiniais žiedais *para* padėtyje ir tirti, kokią įtaką jie daro sąveikos stiprumui, arba modifikuoti pakaitą *meta* padėtyje, atsižvelgiant į tai, jog amido grupė yra svarbi selektyvumui CA II.

Iš 5.2 pav. pateiktų koreliacijų galime pastebėti, jog **EA3-3o** junginio atveju benzonsulfonamido *para* padėtyje esančio cikloheksano pakeitimas į fenilo grupę (**EA3-2o**), nors ir padidina junginio hidrofobiškumą, tačiau sąveikos stiprumas su CA II beveik nepakinta (net šiek tiek sumažėja). **EA3-3o** esančio pakaito *meta* padėtyje pailginimas įvedus vieną papildomą metileno (-CH₂) grupę (**EA4-3o** junginys) -4 kJ/mol padidėja jungimosi afiniškumas CA II. Lyginant junginius **EA4-3o** ir **E4-2o**, galime pastebėti, jog pakeitus cikloheksaną benzeno žiedu *para* padėtyje sumažėja jungimosi giminingumas CA II. Selektyvumas beveik nepakinta. **EA12-3** ir **EA12-4o** junginiai skiriasi tuo, jog *para* padėtyje **EA12-3** turi sulfanilo grupės sujungtos su cikloheksanu pakaitą, o **EA12-4o** junginys atitinkamai sulfonilo ir fenilo grupę, sujungtas per vieną metilena. **EA12-4o** atveju matome, jog nors selektyvumo profilis truputį geresnis lyginant su junginio **EA12-3**, tačiau jungimosi giminingumas sumažėja apytiksliai -5 kJ/mol.

Pagal 5.3 pav. pateiktą į **EA9-11** struktūriškai panašių junginių koreliacinę diagramą matome, jog **EA9-11o** atveju pasikeičia tik benzonsulfonamido *para* padėtyje esanti pakaitą su benzeno žiedu sujungianti sulfanilo grupė į sulfonilo grupę (**EA9-11o** junginio atveju). Nei jungimosi giminingumui CA II, nei selektyvumui tai įtakos beveik neturi. Pakeitus **EA9-11** junginyje esanti pakaitą su viena metileno grupe ir prie jos prijungta hidroksilo grupe į cikloheksaną **EA9-3** atveju, matome, jog pakankamai ženkliai padidėja jungimosi giminingumas CA II, tačiau kartu padidėja ir daugeliui kitų izoformų, todėl nors jungimasis prie CA II yra stipresnis, bet selektyvumo profilis išlieka labai panašus.

Pakeitus cikloheksaną su benzonsulfonamidu sujungiantį sulfanilą (**EA9-3**) į sulfonilą (**EA9-3o**), dar labiau padidėja jungimosi giminingumas CA II, tačiau selektyvumo profilis išlieka beveik nepakitęs. Lyginant **EA10-3** ir **EA10-3o** junginius, matome, jog jie skiriasi tik tuo, jog vienas benzonsulfonamido *para* pozicijoje turi sulfanilo grupę, o kitas sulfonilo grupę. Toks pokytis šį kartą padidina jungimosi selektyvumą labai nežymiai, o selektyvumo profilis CA II išlieka toks nepalankus visoms izoformoms, išskyrus CA III, CA IV ir CA VA. Kaip matome, tiek sulfanilo, tiek sulfonilo grupė, nors ir leidžia padidinti junginio afiniškumą CA II, tačiau beveik nedaro įtakos selektyvumui.

Iš 5.4 pav. pavaizduotos koreliacijos diagramos galima pastebėti, jog lyginant **EA9-3o** junginį su **EA9-2o**, pastarasis vietoj cikloheksano *para* padėtyje esančiame pakaito turi fenilo grupę. Toks pokytis neturi didelės įtakos nei CA II selektyvumui, nei afiniškumui. Pailginus fenilo grupės pakaitą

viena metileno grupę (**EA9-4o**), jungimosi giminingumas sumažėja, o selektyvumas CA II labai nežymiai pasislenka į palankią pusę. Lyginant junginius **EA10-3o** ir **EA10-2o**, galime pastebėti, jog jie skiriasi tuo, jog pastarasis benzonsulfonamido *para* padėtyje turi prisijungusį ne cikloheksaną, o fenilo funkcinę grupę. Toks pokytis beveik nedaro įtakos jungimosi giminingumui su CA II.

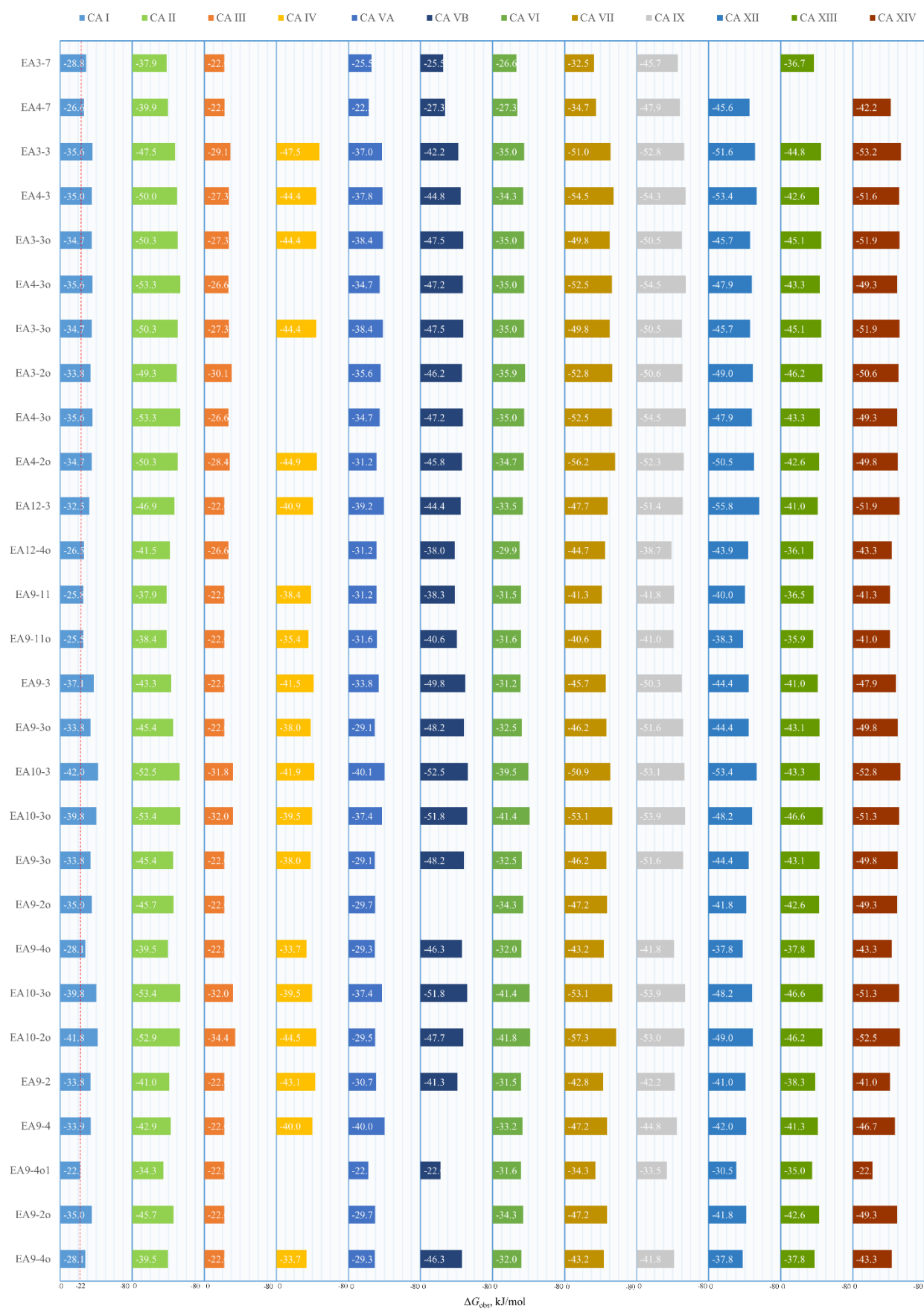
Remiantis 5.5 pav. pateiktomis koreliacijomis, galime pastebėti, jog junginys **EA9-2** nuo junginio **EA9-4** skiriasi benzeno žiedo *para* padėtyje sulfonamidinės grupės atžvilgiu esančiais pakaitais. **EA9-4** esantis pakaitas turi papildomą metileno grupę, sujungiančią pakaito sieros atomą su fenilo grupę. Kaip matome, nors junginio hidrofobiškumas truputį padidėja, tačiau sąveikos su CA II jungimosi giminingumas pakinta labai nežymiai (1.9 kJ/mol). Tačiau tokio jungimosi giminingumo ($\Delta G = -42.9$ kJ/mol) nepakanka potencialiam ligandui. Verta pažymėti, jog **EA9-2** palyginti selektyvus CA II atžvilgiu izofermentų CA I, CA III, CA VA ir CA VI, tačiau **EA9-4** atveju (t.y. minėtoje pozicijoje pridėjus metileno), nors jungimosi stiprumas beveik nepakinta, tačiau prarandamas selektyvumas CA VA atžvilgiu ir šiek tiek padidėja selektyvumas CA I. CA VA izoformos atžvilgiu selektyvumas prarandamas dėl to, jog ženkliai padidėja jungimosi su CA VA stiprumas pridėjus metileno grupę (ΔG pokytis: $\Delta \Delta G = -9.3$ kJ/mol). CA VA sąveikos su **EA9-4** jungimosi giminingumas galimai padidėja lyginant su EA9-2 dėl sąveikos su CA VA aktyviuoju centru specifikos, pvz.: šio junginio metileno grupė padidina junginio hidrofobiškumą ir lankstumą, todėl geriau išpildomas aktyvusis centras ir susiformuoja stipresnės hidrofobinė bei Van der Valso sąveikos su jungimosi vietos hidrofobine puse.

Lyginant **EA9-4o1** ir **EA9-2o** junginius, galima pastebėti, jog benzonsulfonamido *para* padėtyje esančios sulfonilo grupės (**EA9-4o1**) ir vienos metileno grupės pakeitimas sulfonilo grupę (**EA 9-2o**) ženkliai padidina jungimosi stiprumą su CA II ($\Delta \Delta G = -11.4$ kJ/mol). Tai galėjo lemti tai, jog sulfonilo grupė pasižymi stipresniu elektronų ištraukimo efektu nei sulfonilo grupė ir taip pat turi papildomą deguonies atomą, kuris gali sudaryti du papildomus vandenilio ryšius kaip ryšio akceptorius su donoringomis vandenilinio ryšio grupėmis. Taip pat metileno grupės panaikinimas sumažina junginio hidrofobiškumą ir konformacinį lankstumą, todėl galimai tai irgi turi įtakos sąveikai su CA II jungimosi vieta. Iš turimų duomenų taip pat matosi, jog šis struktūrinis pokytis suteikia ir palankesnę CA II selektyvumo profilį atžvilgiu CA I, CA III, CA VA ir CA VI izofermentų, tačiau junginys **EA 9-2o** išlieka neselektyvus CA VII, CAXII, CA XIII ir CA XIV izoformų atžvilgiu.

Jeigu lygintume **EA9-4** ir **EA9-2o** junginius, galime pastebėti, kad benzonsulfonamido *para* padėtyje esančios sulfonilo grupės ir su ja sujungto metileno (**EA9-4**) pakeitimas sulfonilo grupę tik šiek tiek padidina jungimosi giminingumą (-2.8 kJ/mol arba apytiksliai 3 kartais, jeigu lygintume jungimosi konstantas), nors sulfonilo grupė pasižymi ženkliai stipresniu elektronų ištraukimo efektu nei sulfonilo grupė ir gali sąveikauti sudarydama net keturis vandenilinius ryšius kaip vandenilinio ryšio akceptorius lyginant su sulfonilo grupę. Todėl galima daryti prielaidą, jog sąveikoje su CA II

jungimosi vieta svarbios ir kitos savybės, pavyzdžiui: junginio gebėjimas įgyti palankią jungimuisi konformaciją ir užpildyti aktyviojo centro ertmes (spynos ir rakto principas, angl. *The lock and key model*) bei sudaryti hidrofobines ir Van der Valso sąveikas su aktyviuoju centru per hidrofobines molekulės dalis. Selektivumas CA II pakito nežymiai, išskyrus tai, kad padidėjo atžvilgiu CA VA izoformos, kurios jungimosi giminingumas dėl šio pakaito ženkliai sumažėja.

Lyginant junginius **EA9-2o** ir **EA9-4o** matome, jog junginys **EA9-4o** skiriasi nuo junginio **EA9-2o** tik tuo, jog benzonsulfonamido *para* padėtyje esančiame pakaito, sujungiant sulfonilo grupę ir fenilo grupę, pridėta metileno grupė. Tačiau lyginant šių ligandų jungimosi stiprumą su CA II izofermento - pridėjus metileno grupę jis sumažėja -6.2 kJ/mol, t.y. **EA9-4o** jungiasi apytiksliai 10 kartų silpniau su CA II, nei **EA9-2o**. To priežastis gali būti, jog pridėjus papildomą metilena, nors junginio hidrofobiškumas ir padidėja, tačiau pats pakaitas pailgėja, yra lankstus ir benzeno žiedas, tuomet galimai nebetelpa į CA II aktyvų centrą bei sudaro silpnesnę hidrofobinę sąveiką su juo. Kalbant apie selektivumą, nei vienas iš šių junginių nepasižymi pilnu selektyvumo profiliu CA II, tačiau **EA9-2o** junginys, pasižymėdamas didesniu (~10 nM) jungimosi stiprumu su CA II ($\Delta G = -45.7$ kJ/mol), taip pat yra selektyvesnis CA II atžvilgiu 5 iš 11 ne taikinio CA izoformų (CA I, CA III, CA VA ir CA VI) ne mažiau nei -10.7 kJ/mol (t.y. ne mažiau nei apytiksliai 100 kartų stipriau jungiasi prie CA II nei prie visų paminėtų izoformų). Reikėtų taip pat pabrėžti, jog **EA9-2o** ir **EA9-4o** junginiai neturi pilno selektyvumo profilio ne tik CA II, bet nei vienai iš CA izoformų.



3.4 pav. EA junginių grupės sugrupuotas struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijos apibendrinanti diagrama (Priedų 5.1-5.5 pav.). Raudona punktyrinė linija pažymėta FTSA metodo matavimų riba.

5.6 pav. yra pavaizduota į **EA5-3o** junginį panašių ligandų koreliacinė diagrama. Matome, jog selektyvumo profiliai visiems junginiams yra ganėtinai panašūs ir nedideli struktūriniai pokyčiai (eterio įvedimas į alifatinę grandinę benzensulfonamido *meta* padėtyje ar *para* padėtyje esančio cikloheksano keitimas benzeno) junginių cheminėse struktūrose tik labai nežymiai pakeičia jungimosi giminingumą CA II. To priežastis gali būti tai, jog sulfonilo grupė *para* padėtyje turi didžiausią indėlį jungimosi su CA II giminingumui ir jis tuomet nusveria šiuos palyginti nežymius struktūrinius pokyčius.

Analizuojant koreliacijas pateiktas 5.7 pav. išryškėja, jog **EA5-7**, **EA8-7** ir **EA5-9** atveju, *para* padėtyje esančio pakaito jungimas su benzensulfonamidu per amino grupę yra palankus jungimosi selektyvumui CA II, tačiau šie junginiai pasižymi mažu jungimosi giminingumu. Vis dėlto, lygindami **EA5-7** junginį su **EA5-9** junginiu, galime pastebėti, jog didesnio ciklinio žiedo įvedimas *para* padėtyje padidina jungimosi giminingumą CA II, bet tuo pačiu yra išlaikomas selektyvumas CA II. Lyginant junginius **EA5-7**, **EA5-3** ir **EA5-3o** matome, jog visi benzensulfonamido *para* padėtyje pakaitai turi cikloheksaną, tačiau pakaitas yra sujungtas su amino, sulfanilo ir sulfonilo grupėmis. Amino grupės atveju turime silpną jungimąsi su CA II, bet palankesnę selektyvumo profilį. Sulfanilo ir sulfonilo atveju galima pastebėti, jog junginiai CA II nėra selektyvūs didžiosios dalies izoformų atžvilgiu. Tačiau sulfanilo grupė reikšmingai padidina jungimosi giminingumą, o, lyginant su sulfonilo grupe junginyje, ši dar šiek tiek labiau padidina jungimosi giminingumą CA II nei sulfanilas.

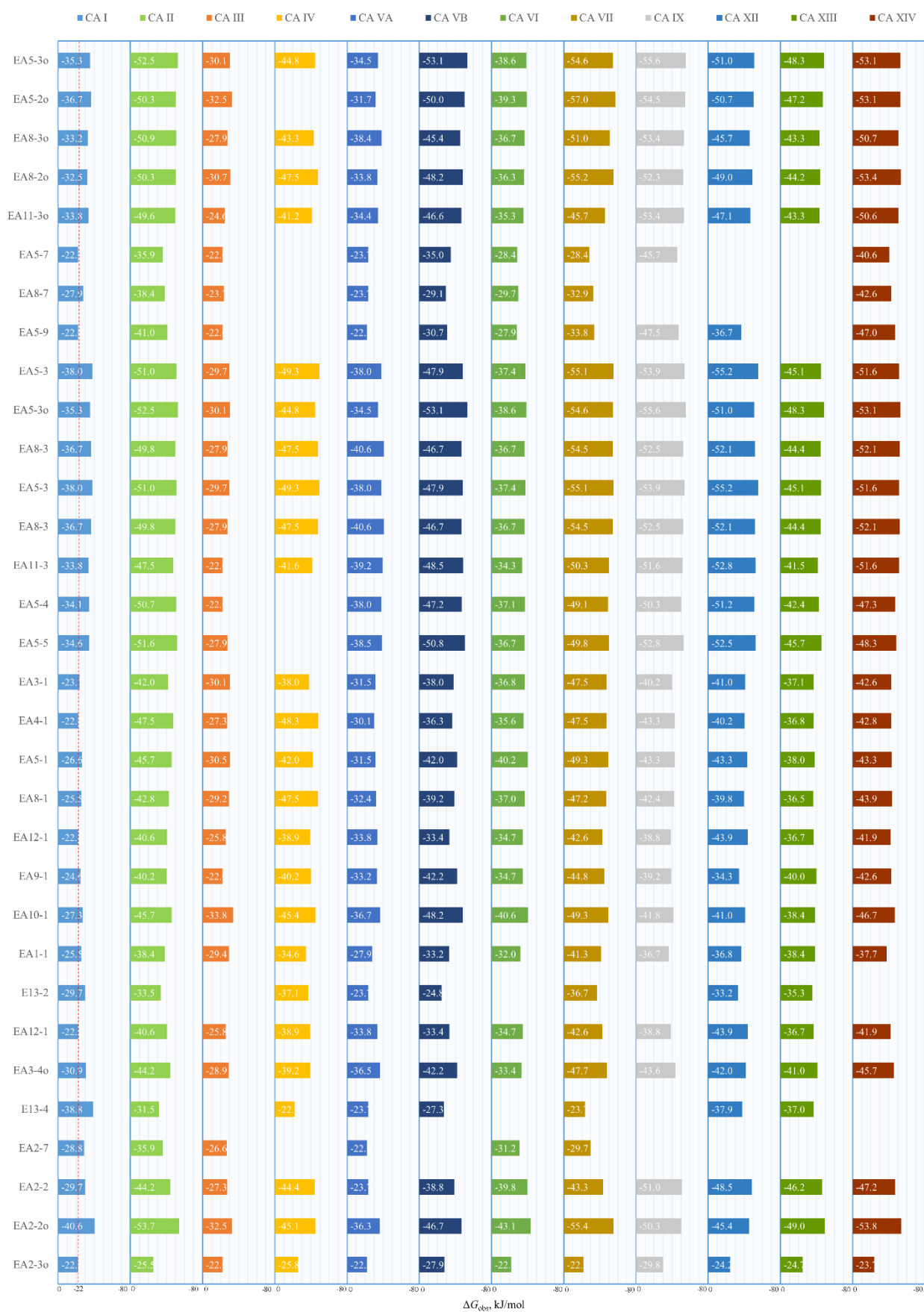
Nagrinėjant 5.8 pav. pateiktas koreliacijas pastebėta, jog pirmieji trys junginiai turi labai panašius jungimosi selektyvumo profilius ir jungimosi giminingumus CA II. Tačiau įdomesnė koreliacija pasirodo lyginant **EA5-3** junginį su **EA5-4** junginiu, kuris skiriasi tik tuo, jog vietoj cikloheksano įvesta fenilo grupė, taigi padidėja junginio hidrofobiškumas. Jungimosi giminingumas CA II abiem atvejais yra beveik identiškas, tačiau selektyvumas CA II pakinta į palankią pusę **EA5-4** junginio atveju. **EA5-5** junginys skiriasi nuo **EA5-4** tuo, jog įvedama papildoma metileno grupė benzensulfonamido *para* padėtyje esančiame pakaitai. Toks struktūrinis pokytis beveik neturi įtakos jungimosi giminingumui ir selektyvumui CA II.

Iš 5.9 pav. pavaizduotos koreliacinės diagramos galime pastebėti, jog lyginant **EA3-1** ir **EA4-1** junginius, pailginus benzensulfonamido *meta* padėtyje esantį pakaitą vos viena metilo grupe, ženkliai padidėja jungimosi giminingumas CA II, o afiniškumas kitoms izoformoms beveik nepakinta ir todėl junginys **EA4-1** turi pakankamai palyginti palankų selektyvumą CA II atžvilgiu didesnei daliai iš 11 izoformų. Analizuojant tolimesnius struktūrinius pokyčius, galime pastebėti, jog selektyvumo profiliai kitų grafike pateiktų junginių nėra palankūs CA II.

Remiantis 5.10 pav. pateiktomis koreliacijomis, galime pastebėti, jog **EA1-1** junginys skiriasi nuo **E13-2** pakaitu benzensulfonamido *para* padėtyje. **EA1-1** atveju turime chloro atomą *para* padėtyje, ir jis lemia didesnę jungimosi giminingumą CA II nei **EA13-2** pakaitas. **EA12-1** junginys

skiriasi nuo **EA1-1** junginio tuo, jog karboksilo grupė jame yra didesnio pakaito dalis, kuris yra sudarytas dar iš pailgintos alifatinės grandinės ir amido grupės šalia benzeno žiedo. Jungimosi giminingumas padidėja **EA12-1** junginio atveju ir panašu, jog tam galimai turi įtakos tiek alkilinės pakaito dalies indėlis į junginio hidrofobiškumą, tiek amido grupės indėlis į potencialias sąveikas su baltymo aktyviuoju centru sudarant vandenilinius ryšius per deguonies atomą, kaip vandenilinio ryšio akceptorių ir amino grupę, kaip vandenilinio ryšio tiek donorą, tiek akceptorių.

Analizuojant 5.11 pav. pateiktas koreliacijas svarbiausia pastebėti, jog lyginant **EA2-7** ir **EA2-2** junginius, jie skiriasi tik tuo, jog *para* padėtyje yra pakeista amino grupė į sulfanilo grupę. Nors junginio giminingumas pakankamai ženkliai padidėja, tačiau lygiagrečiai padidėja ir dalies kitų izoformų jungimosi energijos, todėl sulfonilo grupę turintis ligandas šiuo atveju yra neselektyvus CA II. **EA2-2o** junginio atveju, sulfanilo grupė pakeičiama į sulfonilo ir matome dar didesnę jungimosi giminingumo padidėjimą. Taip pat pasiekiamas palankesnis junginio selektyvumas CA II.



3.4 pav. EA junginių grupės sugrupuotas struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijos apibendrinanti diagrama (Priedų 5.6-5.11 pav.). Raudona punktyrinė linija pažymėta FTSA metodo matavimų riba.

3.2.2. VD junginių grupės struktūros-afiniškumo koreliacijų analizė

VD junginių grupės sugrupuotos struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacinės diagramos yra pateiktos *Priedų* 5.12-5.15 pav. Šių sugrupuotų koreliacinių diagramų duomenis apibendrina 3.5 pav. pateikta diagrama.

Iš 5.12 pav. galima pastebėti, jog lyginant **VD11-67** junginį ir **VD11-15** junginį, jie skiriasi tuo, jog benzonsulfonamido *para* padėtyje esanti sulfanilo grupė **VD11-15** atveju yra pakeičiama sulfonilo grupe ir **VD11-67** junginyje esantis pakaitas *orto* padėtyje yra perkeltas į *meta* padėtį **VD11-15** junginio atveju. Toks struktūrinis skirtumas nulemia tai, jog jungimosi giminingumas CA II padidėja labai reikšmingai nuo -31 kJ/mol **VD11-67** atveju iki -52.8 kJ/mol **VD11-15** atveju (t.y. apytiksliai net 4700 kartų padidėja jungimosi stiprumas lyginant jungimosi konstantas). Tokiam jungimosi giminingumo padidėjimui turi didelę reikšmę pakaito esančio *orto* padėtyje perkėlimas į *meta* padėtį todėl, kad iš kitų koreliacijų žinome, jog sulfanilo ir sulfonilo jungčių su benzonsulfonamido *para* padėtyje esančiu pakaitu indėliai į jungimosi su CA II giminingumą nesiskiria tiek ženkliai, jog vien tokio pokyčio užtektų tokiam jungimosi giminingumo padidėjimui. Taigi, pakaito esančio *orto* padėtyje **VD11-67** atveju perkėlimas į *meta* poziciją **VD11-15** atveju suteikia nemažą indėlį jungimosi giminingumui, todėl šis pakaitas yra palankesnis *meta* padėtyje. To priežastis taip pat galėtų būti ir tai, jog pakaitas *orto* padėtyje trukdo sąveikauti sulfonamidinei grupei su aktyviuoju centru.

Pagal 5.13 pav. pavaizduotą koreliacinę diagramą svarbiausia pastebėti koreliaciją tarp **VD12-43** ir **VD12-41** junginių ir kaip pakinta jungimosi energija dėl nedidelio struktūrinio pokyčio. **VD12-43** ir **VD12-41** junginiai abu turi pakaitą fluorinto benzonsulfonamido *meta* padėtyje ir tie pakaitai skiriasi tik dviejų deguonies eterių padėtimi tuose pakaituose esančiame benzeno žiede.

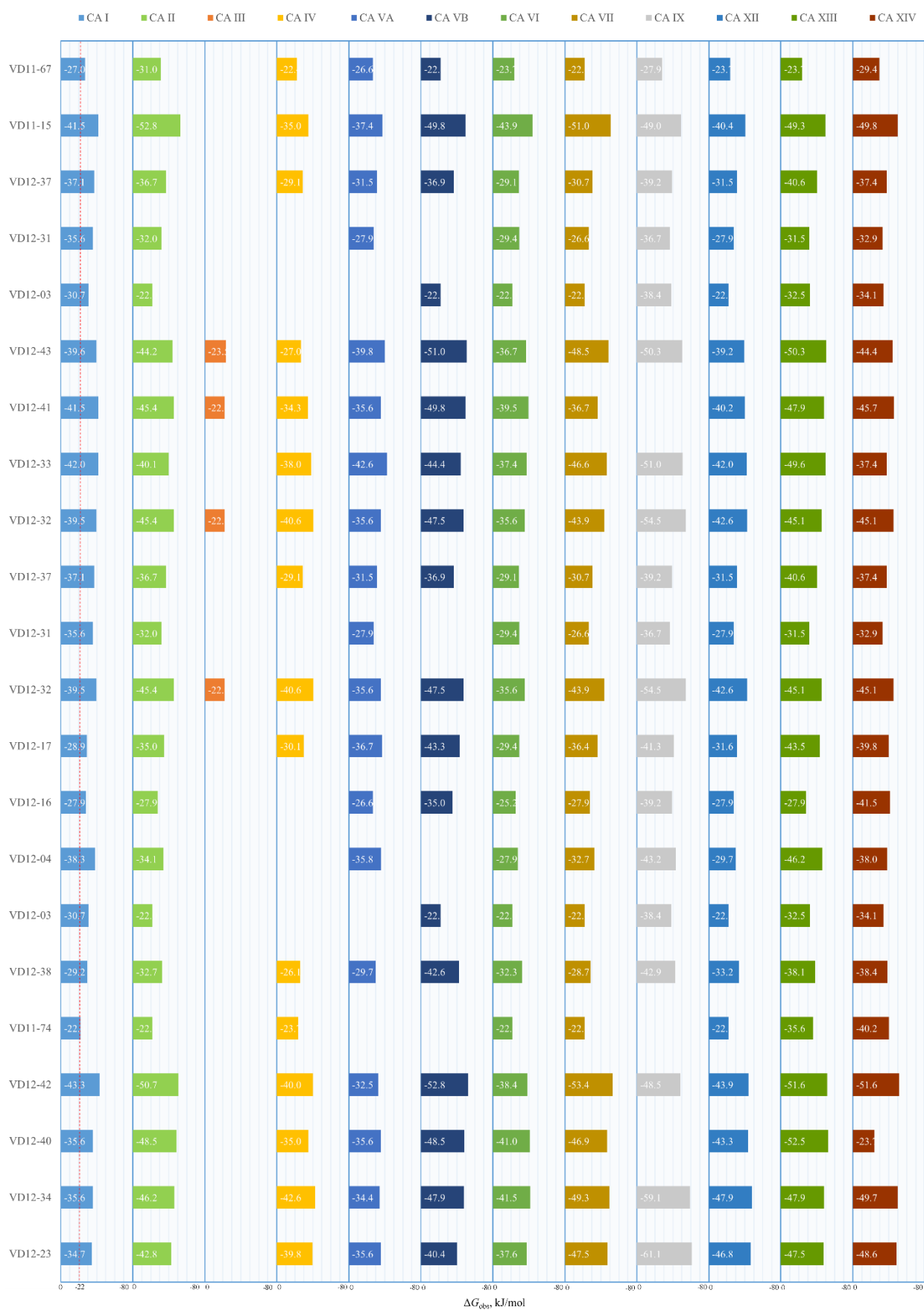
Atidžiai išsižiūrėjus, pastebėsime, jog **VD12-41** junginys pasižymi palankesniu selektyvumo profiliu ir jungimosi giminingumu CA II nei **VD12-43** junginys, o visa kuo šie junginiai skiriasi yra tai, jog **VD12-41** junginio benzeno žiede abu deguonies esteriai yra *orto* padėtyje, o **VD12-43** junginio atveju - *meta* ir *orto* padėtyse.

Iš 5.14 pav. koreliacinės diagramos svarbiausia pastebėti, jog lyginant **VD12-37** ir **VD12-31** junginius, jų pakaitai yra fluorinto benzonsulfonamido *meta* padėtyje ir skiriasi tik tuo, kurioje pozicijoje benzeno žiede atsiduria du deguonies esteriai. Tačiau užtenka net tokio nedidelio pokyčio, t.y. tiesiog pakeičiama funkcinės grupės pozicija benzeno žiede, ir tai lemia reikšmingus selektyvumo ir jungimosi giminingumo pokyčius įvairioms izoformoms.

VD12-17 ir **VD12-16** ši koreliacija irgi yra labai aiški, dvi deguonies eterių grupės **VD12-17** junginyje yra benzeno žiedo *para* ir *meta* padėtis, o **VD12-16** abi yra *orto* padėtyje. Lyginant biotermodinaminius parametrus, akivaizdu, jog **VD12-17** pasižymi didesniu jungimosi giminingumu

CA II nei **VD12-16**, taigi jungimuisi su CA II šiuo atveju matome, kad palankesnė yra deguonies eterių *orto* ir *meta* padėtis pakaito benzeno žiede.

Analizuojant 5.15 pav. pateiktą koreliacinę diagramą, galime identifikuoti, jog fluorintų benzensulfonamidų *para* padėtyje esantis pakaitas su sulfonilo grupe ir per du metilenus prijungtą hidroksilo grupę, yra labai palankus pakaitas CA IX izoformos selektyvumui atžvilgiu visų kitų ne izoformų ir suteikiantis didelį giminingumą. Palyginti su **VD12-42** junginiu, kuris turi fenilo grupę *para* padėtyje, tai yra **VD12-34** yra daug geresnis inhibitorius. Dar labiau pagerėja selektyvumo profilis ir padidėja jungimosi giminingumas su CA IX, *meta* padėtyje esančiame pakaito pakeičiant su benzeno žiedu sujungtą ciklopentaną į cikloheksaną.



3.5 pav. VD junginių grupės sugrupuotas struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijos apibendrinanti diagrama (Priedų 5.12-5.15 pav.). Raudona punktyrinė linija pažymėta FTSA metodo matavimų riba.

3.2.3. E junginių grupės struktūros-afiniškumo koreliacijų analizė

E junginių grupės sugrupuotos struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacinės diagramos yra pateiktos *Priedų* 5.16-5.22 pav. Šių sugrupuotų koreliacinių diagramų duomenis apibendrina 3.6 pav. pateikta diagrama.

5.16 pav. pateiktoje koreliacinėje diagramoje išryškėja, jog lyginant **E70** ir **E72** junginius, jų pakaitai *para* padėtyje beveik identiški, **E72** junginio pakaitas skiriasi tuo, jog turi bromo atomą prisijungusį prie benzeno žiedo. Kas yra įdomu, kad jungimosi giminingumai **E70** ir **E72** junginio, nepaisant šio pridėto bromo atomo, yra beveik identiški ir selektyvumo profilis taip pat labai minimaliai pakinta. Lyginant junginius **E11-31** ir **E11-33**, kurie turi analogiškus pakaitus tik benzonsulfonamidinės grupės *meta* padėtyje, galime pastebėti, jog **E11-33** junginys turintis pakaitą su bromu, pasižymi didesniu jungimosi giminingumu CA VI nei junginys be papildomo bromo atomo.

Pagal 5.17 pav. pateiktą koreliacinę diagramą, galime pastebėti, jog **E11-31** junginys lyginant su **E21** junginiu, skiriasi tik *orto* padėtyje pridėto chloro atomu, tačiau to užtenka, jog padidėtų jungimosi giminingumas CA II izoformai. **E11-30** junginys skiriasi nuo **E21** tuo, jog pakaitas iš *meta* padėties (**E21** junginys) perkeliamas į *para* padėtį (**E11-30** junginys). Tai nulemia jungimosi energijos CA II padidėjimą lyginant su **E21** junginiu.

Toliau, **E27** junginio atveju *meta* padėtyje esančiame pakaitė tarp imidazolo žiedo ir benzeno žiedo įterpiamas piridinas. Lyginant junginį su kitu *meta* padėtyje pakaitą turinčiu panašiu junginiu **E21**, akivaizdu, jog įterptas piridinas padidina jungimosi giminingumą ir jis susilygina su **E27** junginio, turinčio pakaitą *para* padėtyje jungimosi giminingumu. Lyginant **E11-31** ir **E11-35** junginius, galime pastebėti, jog dioksano prijungimas prie benzeno žiedo *meta* padėtyje esančiame pakaitė nepadaro jokios įtakos jungimosi energijai ir beveik nepakinta selektyvumo profilis. **E11-35** junginio pakaitą *meta* padėtyje perkėlus į *para* padėtį (**E71** junginys), padidėja jungimosi giminingumas CA II.

Remiantis 5.18 pav. pateikta koreliaciniu diagrama matome, jog lyginant **E11-73** junginį su **E11-75** junginiu, benzonsulfonamido *meta* padėtyje esančiame **E11-73** junginio pakaitė yra įvesta papildoma fenilo grupė, tačiau ji labai nežymiai padidina jungimosi stiprumą ir praktiškai nepakeičia selektyvumo profilio. **E11-73** junginio pakaitą perkėlus į *para* padėtį (**AR6** junginys), padidėja jungimosi giminingumas CA II. **E11-72** junginyje, lyginant su **AR6** junginiu, *orto* padėtyje yra įvestas chloro atomas ir tai nulemia pakankamai ženklų jungimosi afiniškumo su CA II padidėjimą. **E11-72** junginio pakaitą perkėlus į *meta* padėtį (**AR1** junginys), jungimosi giminingumas šiek tiek sumažėja.

Iš 5.19 pav. galime pastebėti, jog visi junginiai turi identišką struktūrinį pagrindą, tačiau **E11-61** junginys neturi chloro atomo *orto* padėtyje, o **E56** junginyje jis yra įvedamas. Jungimosi giminingumas CA II beveik nepakinta, o selektyvumas šiek tiek pablogėja, kadangi CA VA jungimosi giminingumas ženkliai išauga. Taigi išryškėja, jog šiuo minėtas struktūrinis pokytis turi ženkliai įtaką CA VA jungimosi giminingumui ir šis junginys tampa selektyvus atžvilgiu visų izoformų, su kuriomis sąveikos jau yra ištirtos. **E69** nuo pirmojo junginio skiriasi tuo, jog tas pats pakaitas *meta* padėtyje yra pakeičiamas į benzensulfonamido *para* padėtį. Dėl to ženkliai padidėja jungimosi su CA II giminingumas ir gaunamas palankesnis selektyvumo profilis. **E11-60** junginio atveju, lyginant jį su **E69**, jame yra *orto* padėtyje įvestas chloro atomas, kuris sumažino jungimosi giminingumą ir pablogino selektyvumą CA II.

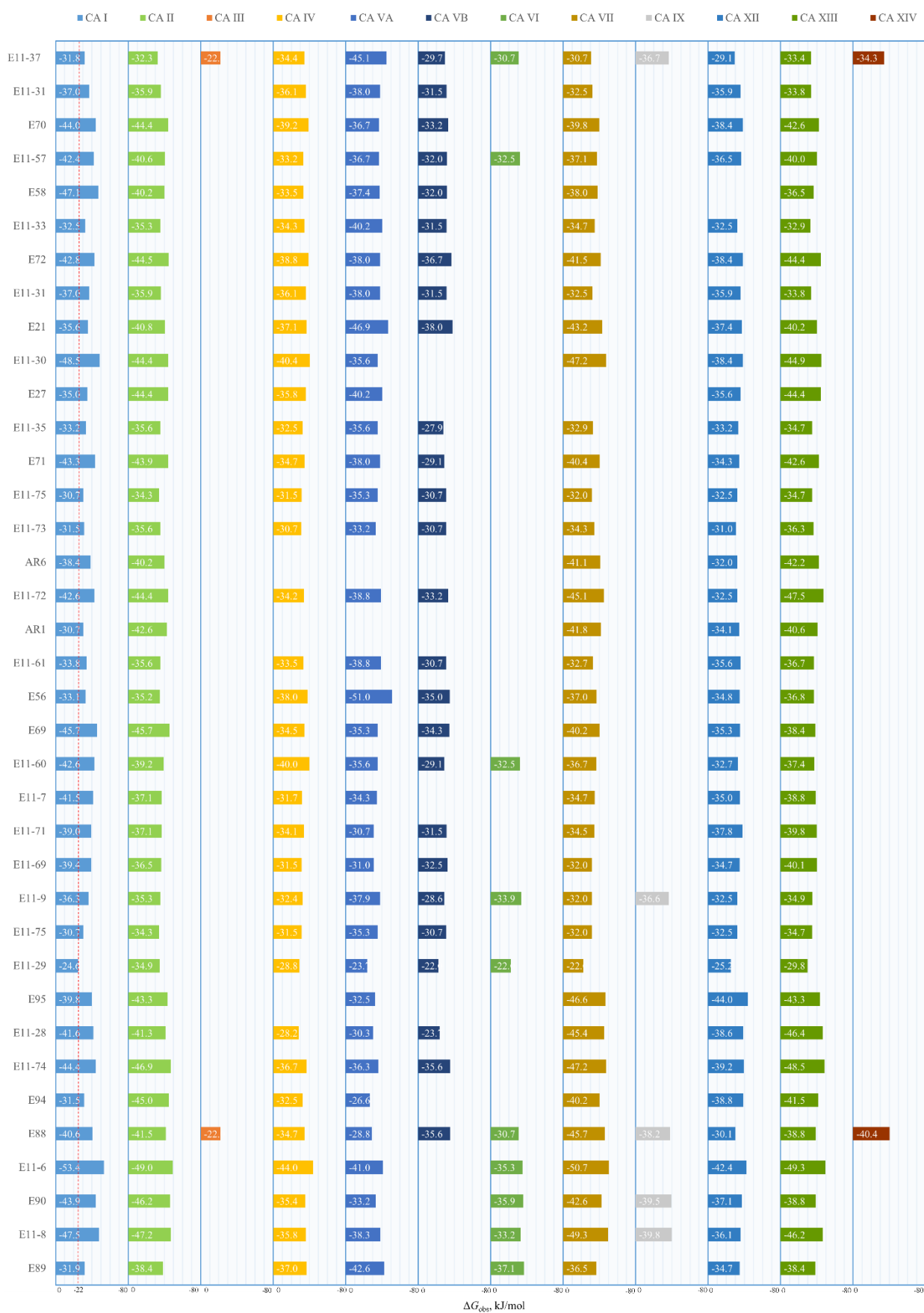
Remiantis 5.20 pav. reikėtų atkreipti dėmesį, jog **E11-7** junginys skiriasi nuo **E11-71** tuo, jog pastarajam pakaitė esančiam benzensulfonamido *meta* padėtyje yra įvesta papildoma metileno grupė. Jungimosi giminingumas CA II beveik nepakinta, o lyginant **E11-69** su **E11-71**, kuriame įvesta dar viena papildoma metileno grupė – tai irgi ne pakeičia jungimosi afiniškumo CA II. Selektvumo profiliai CA II visiems trimis junginiams yra labai panašūs. Taigi, pakaito ilginimas įvedant papildomas metileno grupes neduoda reikšmingo rezultato. **E11-9** yra pakeistas **E11-7** junginyje *meta* padėtyje benzensulfonamide esantis benzeno žiedas pirimidino žiedu. Tai nežymiai sumažina jungimosi CA II giminingumą ir taip pat pablogėja selektyvumo profilis.

Pagal 5.21 pav. pateiktą koreliacinę diagramą galime pastebėti, jog **E11-75** junginio atveju benzensulfonamido *meta* padėtyje esančiame pakaitė imidazolo pakeitimas pirimidonu (**E11-29**) beveik nepakeičia jungimosi su CA II energijos, tačiau dėl pirimidono įvedimo gauname palankesnę selektyvumo CA II profilį. **E11-29** ir **E95** skiriasi tik tuo, jog pakaitas yra ne *meta*, o *para* padėtyje **E95** atveju. Tai reikšmingai padidina jungimosi giminingumą CA II, tačiau prarandamas selektyvumas. **E11-28** atveju lyginant su **E95** įvedamas tik chloro atomas *orto* padėtyje benzensulfonamide, tačiau nors tai ir nežymiai sumažina jungimosi energiją, tačiau pagerina selektyvumo profilį. Lyginant **E11-75** ir **E11-74**, jie skiriasi tuo, jog pakaitas esantis **E11-75** *meta* padėtyje pakeičiamas į *para* padėtį ir *orto* padėtyje įvedamas chloro atomas. Tai žymiai padidina jungimosi giminingumą CA II ir pagerina selektyvumo profilį. Lyginant **E94** junginį su **E11-28** junginiu, pakaitas esantis **E11-28** *para* padėtyje įvedamas į *meta* padėtį **E94** junginio atveju. Šiuo atveju pakankamai ženkliai padidėja jungimosi giminingumas CA II ir gaunamas palankesnis selektyvumo profilis sprendžiant iš sąveikų, kurios šiuo metu yra ištirtos.

Iš 5.22 pav. pavaizduotos koreliacinės diagramos matome, jog net ypač mažas pokytis (įvestas chloro atomas *orto* padėtyje) **E88** junginio cheminėje struktūroje, lyginant su **E11-6** junginiu, ganėtinai ženkliai padidino jungimosi giminingumą CA II nuo -41.5 kJ/mol iki 49 kJ/mol, tačiau pablogėjo selektyvumo CA II profilis. Lyginant **E88** ir **E90** junginius, matome, jog pakeitus fenilo

grupę pirimidinu benzensulfonamido *para* padėtyje, **E90** junginio atveju pasiekiamas ne tik didesnis jungimosi giminingumas CA II, tačiau pasiekiamas ir palankesnis selektyvumo profilis.

Lyginant **E90** ir **E11-8** junginius, pridėjus benzensulfonamido *orto* padėtyje chloro atomą, jungimosi energijos ir bendras selektyvumo profilis CA II pakinta labai nežymiai. **E11-8** ir **E89** junginiai skiriasi tik tuo, jog tas pats pakaitas **E89** junginio atveju yra benzensulfonamido *meta*, o ne *para* padėtyje. Visgi, turimi duomenys apie kai kurių iš sąveikų jungimosi energijas leidžia spręsti, jog *meta* padėtis šiam pakaitui nėra palanki, kadangi ženkliai sumažėja jungimosi su CA II afiniškumas ir pablogėja selektyvumo profilis.

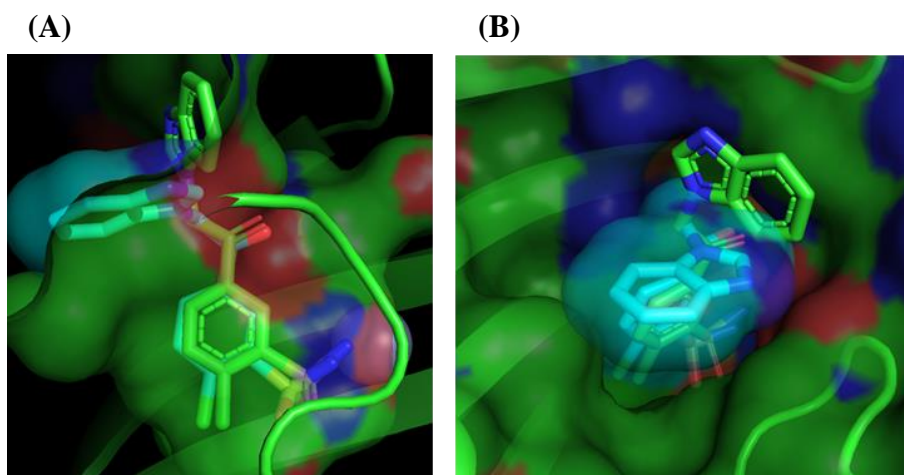


3.6 pav. E junginių grupės sugrupuotas struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijos apibendrinanti diagrama (Priedų 5.16-5.22 pav.). Raudona punktyrinė linija pažymėta FTSA metodo matavimų riba.

3.3. Molekulinio dokinimo rezultatai

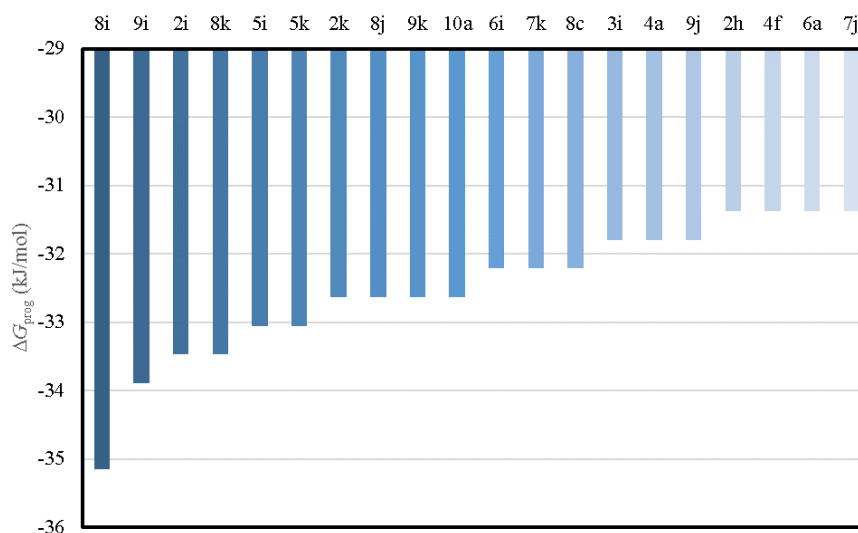
Molekulinio dokinimo metu nustatytų prognozuojamų jungimosi energijų rezultatų lentelė visiems tirtiems junginiams ir visų virtualios atrankos metu dokintų junginių struktūros su pažymėtais pakaitais yra pateikti *Priedų* 5.2 skyrelyje. Šiame skyrelyje kartu su tirtų ligandų dokinimo rezultatais pateikiami ir kontrolės rezultatai. Verta atkreipti dėmesį, jog nurodomos standartinės jungimosi energijos prognozavimo paklaidos nuo eksperimentiškai nustatytų jungimosi energijų verčių yra gautos remiantis [69] pateikiamais duomenimis.

Molekulinio dokinimo metodu buvo ištirta 110 junginių ir kontrolinis junginys, kurio baltymo-ligando kompleksas žinomas. Kaip kontrolė pasirinktas E2 junginys, kurio dokinimo konformacijos ir eksperimentinės kristalografinės konformacijos persiklojimas pateikiamas **3.7 pav.** Baltymo-ligando kristalografiniui kompleksui jungimosi Gibso energija yra žinoma ir lygi **-34,5 kJ/mol**. Nustatyta ligando sąveikos su CA II dokinimo prognozuojama jungimosi energija (**-32,2±11,92 kJ/mol** geriausiai konformacijai (konformacijos buvo įvertintos pagal cinko padėtį aktyviajame centre, žinant, jog svarbiausias yra sudaromas koordinacinis ryšys tarp sulfonamidinės grupės azoto ir karboanhidrazės aktyviajame centre esančio cinko jono).

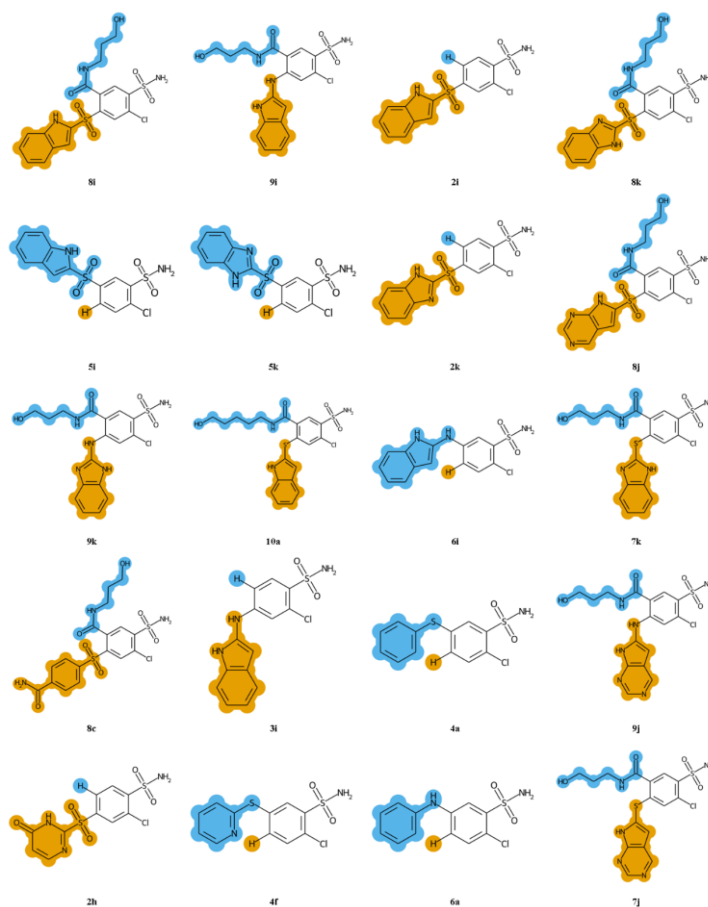


3.7 pav. E2 junginio konformacijų persiklojimas CA II aktyviajame centre. AutoDock Vina nustatyta konformacija (struktūra nuspalvinta žydra spalva) ir eksperimentinė konformacija kristalografiniame komplekse (žalia spalva, sutampa su baltymo). (A) Cinko jono ir sulfonamidinės grupės azoto padėtis prognozuojamame ir eksperimentiniame kompleksuose. (B) *Meta* padėtyje esančio pakaito padėtis aktyviojo centro įėjime, sąveikaujant su hidrofobine ir hidrofiline aktyviojo centro dalimis.

3.8 pav. pateikiami 20 junginių, kurie pasižymi didžiausia molekulinio dokimo metodu atliktos virtualios atrankos nustatyta prognozuojama jungimosi su CA II energija, afiniškumo diagrama. Šių junginių cheminės struktūros pateikiamos 3.9 pav.



3.8 pav. 20 junginių, pasižyminčių didžiausia molekulinio dokimo metu nustatyta prognozuojama jungimosi su CA II energija, afiniškumo diagrama.



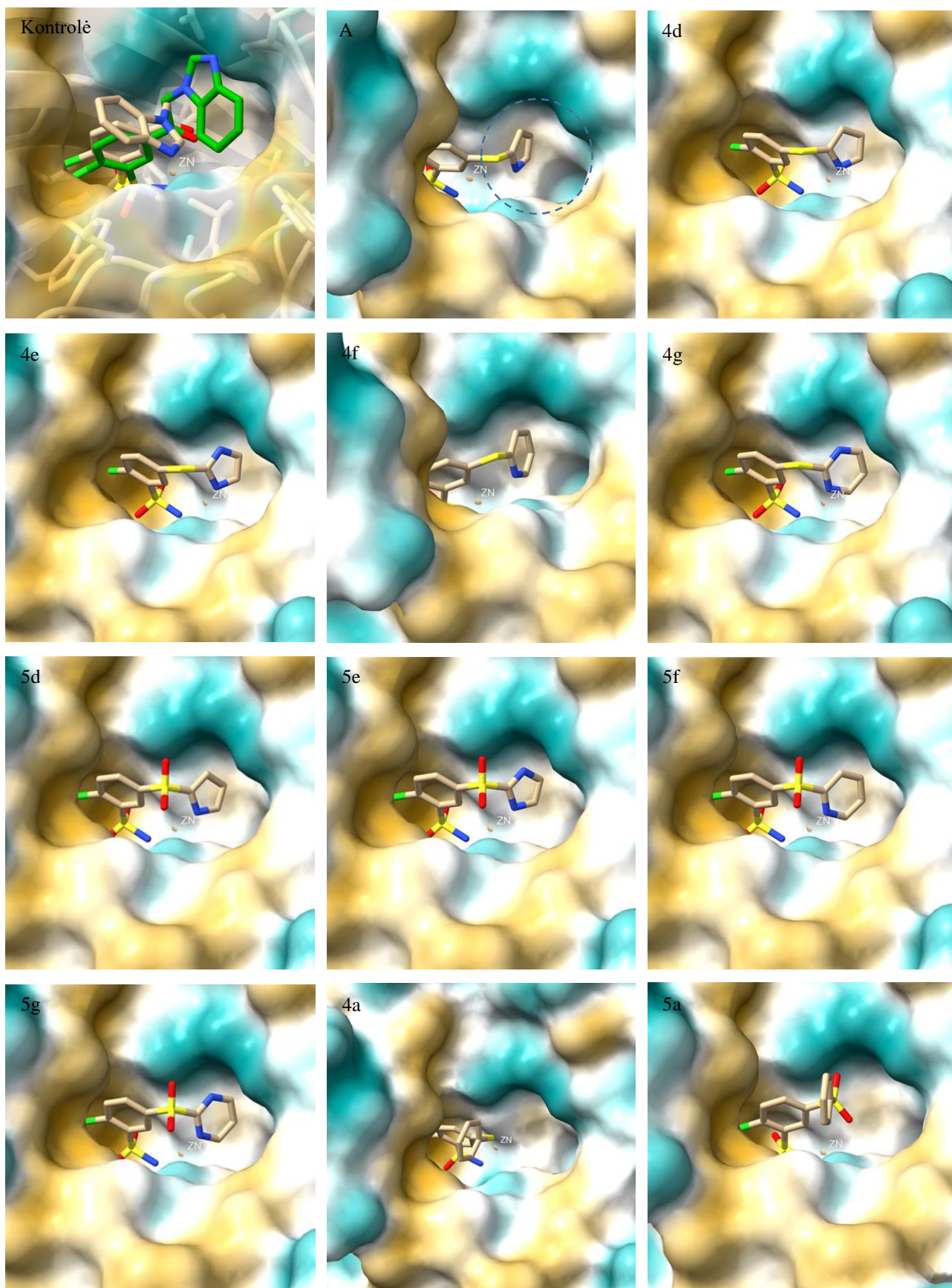
3.9 pav. 20 junginių, pasižyminčių didžiausia molekulinio dokimo metu nustatyta prognozuojama jungimosi su CA II energija.

3.10 pav. – 3.13 pav. pateiktos prognozuojamos jungimosi konformacijos CA II aktyviajame centre kai kuriems iš molekulinio dokavimo metodu tirtų junginių.

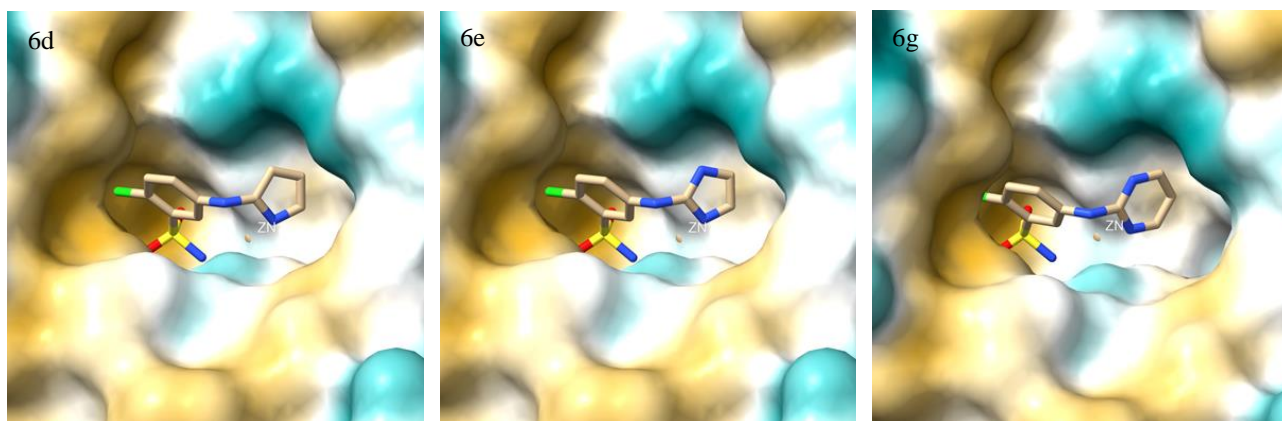
Analizuojant molekulinio dokavimo metu gautas junginių konformacijas pastebėta, jog benzonsulfonamidai, turintys *orto* padėtyje chloro atomą ir *meta* padėtyje per aminą, sulfidą arba sulfonilą prijungtą pirolo, imidazolo, piridino arba pirimidino žiedą galėtų būti struktūros naujiems inhibitoriams (3.10-3.11 pav.). Tam, kad būtų optimizuotos šios struktūros, galima būtų įvesti pakaitus benzonsulfonamido *para* padėtyje, tokiu būdu sustiprinant sąveikas su išorine aktyviojo centro dalimi ir jos hidrofobine bei hidrofiline pusėmis. Taip pat, naudinga būtų prijungti papildomas grupes prie *meta* padėtyje esančių pirolo, imidazolo, piridino arba pirimidino žiedų. Tokia prielaida paremta tuo, kad chloro atomas telpa į vieną iš nedidelių ertmių aktyviajame centre, o tiek minėti žiedai užpildo dalį kitoje pusėje esančios didesnės ertmės (ši aktyvaus centro ertmė pažymėta 3.8 pav. viršuje (A) dalyje).

3.12 pav. pateikta **9j** ir **9l** junginių prognozuojamų jungimosi konformacijų CA II aktyviajame centre iliustracijos. Matome, jog šie junginiai gerai išpildo aktyvų centrą, o *para* ir *meta* padėtyje esantys pakaitai, užpildydami išorinę jungimosi vietos dalį, turėtų sudaryti stiprias sąveikas su hidrofiline ir hidrofobine aktyvaus centro pusėmis. Tai galėtų pagerinti selektyvumą CA II izoformai, tačiau *meta* padėtyje esantys **9j** ir **9l** pakaitai remiantis geriausia prognozuojama jungimosi konformacija neužpildo vidinėje aktyvaus centro dalyje esančios didesnės ertmės (aktyvaus centro ertmė pažymėta 3.8 pav. viršuje (A) dalyje), o tai galėtų turėti įtaką jungimosi giminingumui. Tačiau remiantis analizuotomis kristalografinėmis panašios struktūros junginių kompleksų su CA II struktūromis, ši prognozuojama jungimosi konformacija nėra vienintelė galima **9j** ir **9l** *meta* padėtyje esantiems pakaitams, todėl teoriškai šie pakaitai gali išpildyti minėtą aktyvaus centro ertmę.

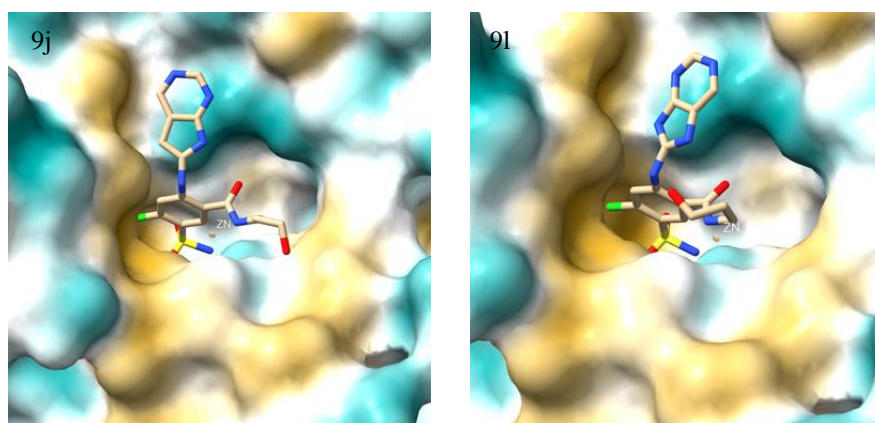
3.13 pav. pavaizduota **9k** junginio prognozuojama jungimosi konformacija CA II aktyviajame centre. (A) dalyje pavaizduota pilnas junginio ir CA II prognozuojamo komplekso artinys. (B) dalyje parodyta, kaip pakaitas *meta* padėtyje telpa į vieną iš aktyviojo centro ertmių. (C) dalyje pateiktas junginio, prisijungusio CA II aktyviajame centre, paviršiaus vaizdas, parodantis aktyviojo centro išpildymą. Kaip matome, šis junginys ne tik yra tarp didžiausią prognozuojamą jungimosi energiją turinčių junginių (3.8 pav.), bet ir puikiai išpildo aktyvų centrą, kadangi jo chloro atomas *orto* padėtyje telpa į vieną iš nedidelių ertmių aktyviajame centre, o pakaitas *meta* padėtyje išpildo kitoje pusėje esančią didesnę ertmę (3.13 pav. (B)). Taip pat matome, jog *para* padėtyje esantis pakaitas užpildo išorinę aktyvaus centro dalį (3.13 pav. (C)) ir todėl gali sudaryti potencialiai galėtų sudaryti papildomas sąveikas su hidrofobine ir hidrofiline aktyvaus centro dalimis, tokiu būdu padidinant jungimosi giminingumą ir selektyvumą CA II izoformai.



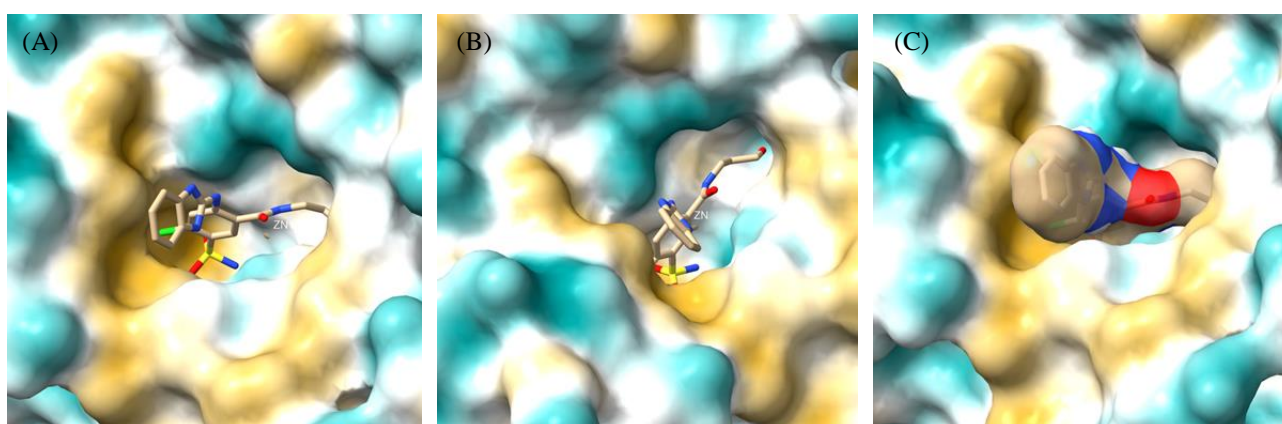
3.10 pav. Prognozuojamos jungimosi konformacijos CA II aktyviajame centre kai kuriems iš **4** ir **5** grupės junginių, turinčių įvestus pakaitus meta padėtyje. Kiekvieno jungimosi konformacijos paveikslėlio viršutinėje kairėje dalyje nurodyta junginio pavadinimas. Mėlyna spalva yra pažymėta hidrofilinė, o rusva spalva – hidrofobinė CA II aktyviojo centro dalys.



3.11 pav. Prognozuojamos jungimosi konformacijos CA II aktyviajame centre kai kuriems iš **6** grupės junginių, turinčių įvestus pakaitus meta padėtyje. Kiekvieno jungimosi konformacijos paveikslėlio viršutinėje kairėje dalyje nurodyta junginio pavadinimas. Mėlyna spalva yra pažymėta hidrofilinė, o rusva spalva – hidrofobinė CA II aktyviojo centro dalys.



3.12 pav. **9j** ir **9l** junginių prognozuojamos jungimosi konformacijos CA II aktyviajame centre. Junginių pavadinimai pateikti jungimosi konformacijos paveikslėlio viršutinėje kairėje dalyje. Mėlyna spalva yra pažymėta hidrofilinė, o rusva spalva – hidrofobinė CA II aktyviojo centro dalys.



3.13 pav. **9k** junginio prognozuojama jungimosi konformacija CA II aktyviajame centre. Junginių pavadinimai pateikti jungimosi konformacijos paveikslėlio viršutinėje kairėje dalyje. Mėlyna spalva yra pažymėta hidrofilinė, o rusva spalva – hidrofobinė CA II aktyviojo centro dalys.

4. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS IR DISKUSIJA

In silico tyrimuose dažniausiai numatytasis pH yra fiziologinis (pH 7.4), priklausomai nuo pasirinkto modeliavimo įrankio. Tai svarbus konfigūravimo parametras, įvertinantis protonavimo įtaką ir svarbus gaunamų dokavimo rezultatų tikslumui, todėl svarbu išlaikyti nuoseklumą pasirenkant šį ir kitus parametrus, kad galima būtų lyginti junginių parametrus gautus prie vienodų tyrimo sąlygų. Kiti modeliavimo parametrai taip pat turėtų būti sukonfigūruoti taip, jog *in silico* tyrimų sąlygos visiems tiriamiems ligandams būtų vienodos siekiant rezultatų patikimumo.

Dauguma molekulinio dokavimo programų turi nemažas paklaidas, kurios molekuliniam modeliavime nors ir skaitomos palyginti nedidelėmis, tačiau fizikochemine prasme turi didelę įtaką. Pasirinkta atlikti potencialiausių junginių atranką remiantis molekulinio dokavimo prognozuojamais jungimosi giminingumais taikinio izoformai, tačiau nevertinant *in silico* selektyvumo atžvilgiu ne taikinio izoformos. To priežastis būtent ir yra šios paklaidos, kurias nurodo naudotos molekulinio dokavimo programos AutoDock Vina autoriai. Šios programos publikacijoje nurodoma, jog AutoDock Vina prognozuojamos jungimosi energijos standartinė paklaida nuo eksperimentinių tyrimų rezultatų yra apytiksliai $\pm 2,85$ kcal/mol (t.y. apytiksliai $\pm 11,92$ kJ/mol). Žinome, jog jeigu tyrimai atliekami prie 37°C (pH 7.0), skirtumas tarp Gibso energijų siekiantis ~ 12 kJ/mol reikštų, jog jungimosi stiprumas pasikeičia ~ 100 kartų į stiprėjimo arba silpnėjimo pusę. Iš biofizikinės sąveikų vertinimo pusės, tai yra reikšmingas indėlis baltymų-ligandų sąveikų jungimosi giminingumui ir selektyvumui.

Taigi nors modeliavimo prasme tokia paklaida laikoma palyginti nedidelė, tačiau eksperimentinio sąveikų tyrimo prasme tai turi didelę fizikinę ir cheminę prasmę. Todėl pasirinkta vykdyti potencialiausių junginių atranką remiantis prognozuojama jungimosi energija su taikinio izoforma, tam kad identifikuoti potencialiausius stipriai prognozuojamu jungimusi su taikiniu pasižymintįs junginius darant prielaidą, kad tarp dideliu jungimosi giminingumu pasižymintįs junginių, kurie racionaliai gauti iš struktūros-selektyvumo koreliacijų analizės, atsiras ir selektyvumo padidėjimas taikinio izoformai.

Kita priežastis yra trūkumas eksperimentinių kristalografinių duomenų apie visų 12 izoformų aktyviuosius centrus. Norint nustatyti selektyvumo profilį, reikėtų dokinti su visomis 12 karboanhidrazių, praleidžiant nebent CA III, kuri pasižymi labai mažu katalitiniu aktyvumu ir vis dar nežinoma šios izoformos reikšmė organizme. Šiuo metu didžiausioje baltymų ir jų kompleksų su ligandais duombazėje RCSB PDB yra publikuojama bent po 1 kristalografinę karboanhidrazių izoformų ar jų komplekso su ligandu struktūrą 10 iš 12 karboanhidrazių izoformų. Tačiau iki šiol nėra nustatytų ir išspręstų kristalografinių struktūrų CA VA ir CA VB izoformoms, kurios yra biologiškai svarbios. Sumodeliuotų CA VA ir CA VB struktūrų yra, tačiau atliekant molekulinio dokavimo

eksperimentus su skirtingai gautomis (modeliuotomis ir eksperimentinėmis kristalografinėmis) struktūromis būtų nevienodos eksperimento *in silico* sąlygos, o tai leistų kelti klausimą dėl tokio tyrimo metu gautų rezultatų patikimumo ir tikslumo. Juolab įvertinant tai, jog molekulinio dokavimo metodai vis dar turi savo ribotumus, kurie nėra išspręsti net ir dinaminiam dokavime, kuriame integruojamos molekulinės dinamikos simuliacijos.

Tikrieji (intrinsiniai) jungimosi parametrai yra ne mažiau svarbūs analizuoti nei šiame darbe aptariami stebimųjų jungimosi Gibso energijų pokyčiai. Naudojant tikruosius jungimosi Gibso energijų pokyčius atmetama įtaka, kurią turi su baltymo-ligando jungimusi nesusijusios sąveikos jungimosi giminingumui (buferis ir baltymo bei ligando protonavimas) ir kitiems biotermodinaminiais parametrams. Gauti tikrieji (intrinsiniai) parametrai leidžia tiksliau ir svarbiausia patikimiau įvertinti pokyčių junginių cheminėse struktūrose įtaką jungimosi parametrams ir selektyvumui.

Problema išlieka, jog yra trūkumas nustatytų protonizacijos konstantų (pKa) verčių junginiams, todėl yra trūkumas nustatytų tikrųjų jungimosi parametrų duomenų. Dėl šios priežasties pasirinkta analizuoti stebimuosius jungimosi parametrus, kadangi kitu atveju būtų ženkliai sumažinta struktūros-afiniškumo koreliacijų analizės sritis. Vis dėl to, siekiant užtikrinti iš struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų analizės gautų pagrindinių rezultatų ir išvadų patikimumą, jos buvo tikrinamos ir su tikrųjų parametrų verčių priklausomybėmis nuo struktūrinių pokyčių. Tai buvo daroma su koreliacijomis, kurioms yra turimi duomenis apie tikruosius jungimosi parametrus. Stebimųjų ir tikrųjų jungimosi parametrų tikrųjų jungimosi parametrų nustatymo būdai ir modeliai bei šių parametrų palyginimas yra išsamiai aprašytas [83] publikacijos autorių.

Pagrindiniai rezultatai, gauti iš struktūros-biotermodinamikos koreliacijų analizės:

- Išanalizavus struktūros-jungimosi energijų koreliacijas paaiškėjo, jog tiek sulfanilo, tiek sulfonilo grupės įvedimas benzensulfonamido *para* padėtyje esančių pakaitų sujungimui su benzeno žiedu padidina ligandų jungimosi giminingumą CA II izoformai. To priežastis gali būti tai, jog abi funkcinės grupės pasižymi elektronų ištraukimo efektu, kuris yra svarbus sąveikai su jungimosi vieta. Sulfonilo grupės įvedimas *para* padėtyje labiau padidina jungimosi su CA II giminingumą nei sulfanilo grupės. To priežastis gali būti tai, jog sulfonilo grupė turi galimybę sudaryti papildomas sąveikas su fermento aktyviuoju centru – abu sulfonilo deguonies atomai gali sudaryti po du vandenilinius ryšius kaip vandenilinio ryšio akceptorius su donoringomis vandenilinio ryšio grupėmis aktyviajame baltymo centre. Be to, sulfonilo grupė pasižymi stipresniu elektronų ištraukimo efektu nei sulfido grupė.

- Nei sulfonilo, nei sulfanilo grupės įvedimas ženkliai nepagerina selektyvumo CA II profilio. Sulfanilo grupės pakeitimas sulfinilo grupe benzensulfonamido *para* padėtyje sulfonamidinės grupės atžvilgiu sumažina jungimosi giminingumą CA II atžvilgiu.
- Azotą turinčių funkcinių grupių įvedimas benzensulfonamido *para* arba *meta* padėtyse esančiuose pakaituose pagerina selektyvumo CA II profilį. Amino funkcinės grupės panaudojimas benzensulfonamido *para* padėtyje sujungti pakaitus su benzeno žiedu taip pat pagerina selektyvumą CA II, tačiau susilpnėja jungimosi giminingumas su CA II.
- Tiek imidazolo pakaito įvedimas benzensulfonamido *para* padėtyje, tiek pirimidono pakaito įvedimas benzensulfonamido *meta* padėtyje pagerina selektyvumo profilį CA II. Tačiau imidazolo pakaito įvedimas *meta* padėtyje arba pirimidono pakaito įvedimas *para* padėtyje atrankumo profilį CA II veikia priešingai, t.y. selektyvumas mažėja.
- Chloro įvedimas benzensulfonamido *orto* padėtyje padidina jungimosi su CA II giminingumą ir šiek tiek pagerina atrankumo CA II profilį. To priežastis - CA II aktyviajame centre esančios nedidelės ertmės, į vieną iš kurių telpa *orto* padėtyje esantis nedidelis chloro atomas ir tuomet junginys, geriau užpildydamas jungimosi vietą, sudaro stipresnę sąveiką (pagal spynos ir rakto modelį).

Pagrindiniai rezultatai, gauti iš molekulinio dokiniu atliktos virtualios atrankos:

- Molekulinio dokinimo metu tirta 110 junginių, gautų pagal identifikuotas struktūrines koreliacijas, aprašytas 3.2 rezultatų skyrelyje. Nustatyta 20 ligandų, kurie stipriausiai jungiasi su CA II.
- Analizuojant molekulinio dokinimo metu gautas junginių konformacijas pastebėta, jog benzensulfonamidai, turintys *orto* padėtyje chloro atomą ir *meta* padėtyje per aminą, sulfidą arba sulfonilą prijungtą pirolą, imidazolą, piridino ar pirimidino žiedą galėtų būti skeletinės struktūros naujiems inhibitoriams, įvedant pakaitus benzensulfonamido *para* padėtyje ir prijungiant papildomas grupes prie *meta* padėtyje esančių pirolą, imidazolą, piridino ar pirimidino žiedų. Tokia prielaida paremta tuo, kad chloro atomas telpa į vieną iš nedidelių ertmių aktyviajame centre, o pirolą, imidazolą, piridino ar pirimidino žiedai gali užpildyti dalį kitoje pusėje esančios didesnės ertmės.
- 9k junginys yra tarp didžiausiu virtualios atrankos metu gautu prognozuojamu jungimosi giminingumu pasižyminčių junginių ir puikiai išpildo aktyvųjį centrą, kadangi jo chloro atomas *orto* padėtyje telpa į vieną iš nedidelių ertmių aktyviajame centre, o pakaitas *meta* padėtyje išpildo kitoje pusėje esančią didesnę ertmę. Taip pat šio junginio *para* padėtyje esantis pakaitas užpildo išorinę aktyvaus centro dalį ir gali padidinti selektyvumą CA II.

IŠVADOS

- Išanalizavus struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijas paaiškėjo, tiek sulfanilo, tiek sulfonilo grupės įvedimas benzensulfonamido *para* padėtyje esančių pakaitų sujungimui su benzeno žiedu padidina ligandų jungimosi giminingumą CA II izoformai. Nei sulfonilo, nei sulfanilo grupės įvedimas sujungti benzensulfonamido *para* padėtyje esantiems pakaitams savaime ženkliai nepagerina selektyvumo CA II profilio, tačiau per šias funkcines grupes prisijungę pakaitai daro įtaką selektyvumo profiliui. Sulfonilo grupės panaudojimas *para* padėtyje esančių pakaitų jungimui labiau padidina jungimosi su CA II giminingumą nei sulfanilo grupės.
- Sulfanilo grupės pakeitimas sulfonilo grupe sujungiant pakaitus, esančius benzensulfonamido *para* padėtyje sulfonamidinės grupės atžvilgiu, ženkliai sumažina jungimosi giminingumą CA II atžvilgiu.
- Amino funkcinės grupės panaudojimas benzensulfonamido *para* padėtyje sujungti pakaitus su benzeno žiedu pagerina selektyvumą CA II, tačiau susilpnėja jungimosi giminingumas su CA II. Azotą turinčių funkcinių grupių, tokių kaip: aminos, amidas, pirolas, imidazolas, piridinas, pirimidinas ar pirimidonas, įvedimas benzensulfonamido *para* arba *meta* padėtyse esančiuose pakaituose padeda pagerinti selektyvumą CA II.
- Chloro įvedimas benzensulfonamido *orto* padėtyje sulfonamidinės grupės atžvilgiu padidina jungimosi su CA II giminingumą ir šiek tiek pagerina selektyvumo CA II profilį.
- Analizuojant molekulinio dokavimo metu gautas junginių konformacijas CA II aktyviajame centre pastebėta, jog benzensulfonamidai, turintys *orto* padėtyje chloro atomą ir *meta* padėtyje per aminą, sulfanilą arba sulfonilą prijungtą pirolo, imidazolo, piridino arba pirimidino žiedą, galėtų būti pagrindas naujoms inhibitorių struktūroms. Šių struktūrų optimizavimas, siekiant didelio jungimosi giminingumo ir selektyvumo CA II, galėtų būti pasiektas įvedant pakaitus benzensulfonamido *para* padėtyje ir prijungiant papildomas grupes prie *meta* padėtyje esančio pirolo, imidazolo, piridino arba pirimidino žiedo.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] D. Neri and C. T. Supuran, “Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 10, no. 10, pp. 767–777, Oct. 2011, doi: 10.1038/nrd3554.
- [2] C. T. Supuran, “Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 27, no. 6, pp. 759–772, Dec. 2012, doi: 10.3109/14756366.2012.672983.
- [3] C. T. Supuran, “Bacterial Carbonic Anhydrases as Drug Targets: Toward Novel Antibiotics?,” *Front. Pharmacol.*, vol. 2, 2011, doi: 10.3389/fphar.2011.00034.
- [4] C. T. Supuran and A. Scozzafava, “Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 15, no. 13, pp. 4336–4350, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.bmc.2007.04.020.
- [5] A. Bertucci, A. Moya, S. Tambutté, D. Allemand, C. T. Supuran, and D. Zoccola, “Carbonic anhydrases in anthozoan corals—A review,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 21, no. 6, pp. 1437–1450, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.bmc.2012.10.024.
- [6] W. C. Stadie and H. O’Brien, “THE CATALYSIS OF THE HYDRATION OF CARBON DIOXIDE AND DEHYDRATION OF CARBONIC ACID BY AN ENZYME ISOLATED FROM RED BLOOD CELLS,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 103, no. 2, pp. 521–529, Dec. 1933, doi: 10.1016/S0021-9258(18)75831-6.
- [7] N. U. Meldrum and F. J. W. Roughton, “Carbonic anhydrase. Its preparation and properties,” *The Journal of Physiology*, vol. 80, no. 2, pp. 113–142, Dec. 1933, doi: 10.1113/jphysiol.1933.sp003077.
- [8] C. T. Supuran and G. De Simone, “Carbonic Anhydrases: An Overview,” in *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts*, Elsevier, 2015, pp. 3–13. doi: 10.1016/B978-0-444-63258-6.00001-9.
- [9] A. Liljas *et al.*, “Crystal Structure of Human Carbonic Anhydrase C,” *Nature New Biology*, vol. 235, no. 57, pp. 131–137, Feb. 1972, doi: 10.1038/newbio235131a0.

- [10] M. Aggarwal, C. D. Boone, B. Kondeti, and R. McKenna, "Structural annotation of human carbonic anhydrases," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 28, no. 2, pp. 267–277, Apr. 2013, doi: 10.3109/14756366.2012.737323.
- [11] L. Baranauskienė and D. Matulis, "Overview of Human Carbonic Anhydrases," in *Carbonic Anhydrase as Drug Target*, D. Matulis, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 3–14. doi: 10.1007/978-3-030-12780-0_1.
- [12] V. Linkuvienė *et al.*, "Thermodynamic, kinetic, and structural parameterization of human carbonic anhydrase interactions toward enhanced inhibitor design," *Quart. Rev. Biophys.*, vol. 51, p. e10, 2018, doi: 10.1017/S0033583518000082.
- [13] C. Supuran, "Carbonic Anhydrases An Overview," *CPD*, vol. 14, no. 7, pp. 603–614, Mar. 2008, doi: 10.2174/138161208783877884.
- [14] C. T. Supuran, "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, no. 2, pp. 168–181, Feb. 2008, doi: 10.1038/nrd2467.
- [15] P. A. Colinas, "Next-generation phenol carbonic anhydrase inhibitors," in *Targeting Carbonic Anhydrases*, Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Science Ltd, 2014, pp. 82–96. doi: 10.4155/fseb2013.13.40.
- [16] V. Dudutienė *et al.*, "Isoform-Selective Enzyme Inhibitors by Exploring Pocket Size According to the Lock-and-Key Principle," *Biophysical Journal*, vol. 119, no. 8, pp. 1513–1524, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.bpj.2020.08.037.
- [17] H. Bose and T. Satyanarayana, "Microbial Carbonic Anhydrases in Biomimetic Carbon Sequestration for Mitigating Global Warming: Prospects and Perspectives," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 1615, Aug. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01615.
- [18] F. Migliardini *et al.*, "Biomimetic CO₂ capture using a highly thermostable bacterial α -carbonic anhydrase immobilized on a polyurethane foam," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 29, no. 1, pp. 146–150, Feb. 2014, doi: 10.3109/14756366.2012.761608.

- [19] H. Bose and T. Satyanarayana, “Carbonic Anhydrases of Extremophilic Microbes and Their Applicability in Mitigating Global Warming through Carbon Sequestration,” in *Extremophiles*, 1st ed., R. Durvasula and D. V. S. Rao, Eds. Boca Raton : Taylor & Francis, a CRC title, part of the Taylor & Francis imprint, a member of the Taylor & Francis Group, the academic division of T&F Informa plc, 2018.: CRC Press, 2018, pp. 249–276. doi: 10.1201/9781315154695-12.
- [20] C. T. Supuran, “Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnological use for CO₂ capture,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 28, no. 2, pp. 229–230, Apr. 2013, doi: 10.3109/14756366.2013.761876.
- [21] Y. Kawasaki and E. Freire, “Finding a better path to drug selectivity,” *Drug Discov Today*, vol. 16, no. 21–22, pp. 985–990, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.drudis.2011.07.010.
- [22] G. M. Currie, “Pharmacology, Part 1: Introduction to Pharmacology and Pharmacodynamics,” *J Nucl Med Technol*, vol. 46, no. 2, pp. 81–86, Jun. 2018, doi: 10.2967/jnmt.117.199588.
- [23] C. Zhang *et al.*, “Progress, challenges, and future of nanomedicine,” *Nano Today*, vol. 35, p. 101008, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2020.101008.
- [24] B. J. Pleuvry, “Factors affecting drug absorption and distribution,” *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, vol. 6, no. 4, pp. 135–138, Apr. 2005, doi: 10.1383/anes.6.4.135.63632.
- [25] S. Sareen, L. Joseph, and G. Mathew, “Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion,” *Int J Pharma Investig*, vol. 2, no. 1, p. 12, 2012, doi: 10.4103/2230-973X.96921.
- [26] C. T. Supuran, “How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 345–360, May 2016, doi: 10.3109/14756366.2015.1122001.
- [27] T. Mann and D. Keilin, “Sulphanilamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase,” *Nature*, vol. 146, no. 3692, pp. 164–165, Aug. 1940, doi: 10.1038/146164a0.

- [28] M. W. Pantoliano *et al.*, “High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery,” *SLAS Discovery*, vol. 6, no. 6, pp. 429–440, Dec. 2001, doi: 10.1177/108705710100600609.
- [29] V. Petrauskas, A. Zubrienė, M. J. Todd, and D. Matulis, “Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases by Fluorescent Thermal Shift Assay,” in *Carbonic Anhydrase as Drug Target*, D. Matulis, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 63–78. doi: 10.1007/978-3-030-12780-0_5.
- [30] M.-C. Lo *et al.*, “Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery,” *Analytical Biochemistry*, vol. 332, no. 1, pp. 153–159, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.ab.2004.04.031.
- [31] V. Paketurytė *et al.*, “Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases by Isothermal Titration Calorimetry,” in *Carbonic Anhydrase as Drug Target*, D. Matulis, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 79–95. doi: 10.1007/978-3-030-12780-0_6.
- [32] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L.-N. Lin, “Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter,” *Analytical Biochemistry*, vol. 179, no. 1, pp. 131–137, May 1989, doi: 10.1016/0003-2697(89)90213-3.
- [33] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing,” *Sensors and Actuators*, vol. 4, pp. 299–304, Jan. 1983, doi: 10.1016/0250-6874(83)85036-7.
- [34] A. Nooke *et al.*, “On the application of gold based SPR sensors for the detection of hazardous gases,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 149, no. 1, pp. 194–198, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.snb.2010.05.061.
- [35] V. Koubová *et al.*, “Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 74, no. 1, pp. 100–105, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0925-4005(00)00717-6.

- [36] C. Mouvet *et al.*, “Determination of simazine in water samples by waveguide surface plasmon resonance,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 338, no. 1, pp. 109–117, Feb. 1997, doi: 10.1016/S0003-2670(96)00443-6.
- [37] Y.-C. Cheng, W. Su, and J. Liou, “Application of liquid sensor based on surface plasma wave excitation to distinguish methyl alcohol from ethyl alcohol,” *OE*, vol. 39, no. 1, pp. 311–314, Jan. 2000, doi: 10.1117/1.602366.
- [38] G. J. Ashwell and M. P. S. Roberts, “Highly selective surface plasmon resonance sensor for NO₂,” *Electronics Letters*, vol. 32, no. 22, pp. 2089–2091, Oct. 1996, doi: 10.1049/el:19961376.
- [39] C. E. H. Berger and J. Greve, “Differential SPR immunosensing,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 63, no. 1, pp. 103–108, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0925-4005(00)00307-5.
- [40] T. T. Goodrich, H. J. Lee, and R. M. Corn, “Direct Detection of Genomic DNA by Enzymatically Amplified SPR Imaging Measurements of RNA Microarrays,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 13, pp. 4086–4087, Apr. 2004, doi: 10.1021/ja039823p.
- [41] M. A. Cooper, “Optical biosensors in drug discovery,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 1, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2002, doi: 10.1038/nrd838.
- [42] Y. Fang, “Label-Free Cell-Based Assays with Optical Biosensors in Drug Discovery,” *ASSAY and Drug Development Technologies*, vol. 4, no. 5, pp. 583–595, Oct. 2006, doi: 10.1089/adt.2006.4.583.
- [43] S. Fang, H. J. Lee, A. W. Wark, and R. M. Corn, “Attomole Microarray Detection of MicroRNAs by Nanoparticle-Amplified SPR Imaging Measurements of Surface Polyadenylation Reactions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 43, pp. 14044–14046, Nov. 2006, doi: 10.1021/ja065223p.
- [44] B. D. Gupta and R. K. Verma, “Surface Plasmon Resonance-Based Fiber Optic Sensors: Principle, Probe Designs, and Some Applications,” *Journal of Sensors*, vol. 2009, p. e979761, Aug. 2009, doi: 10.1155/2009/979761.

- [45] J. Homola, "Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 462–493, Feb. 2008, doi: 10.1021/cr068107d.
- [46] S. Hearty, P. J. Conroy, B. V. Ayyar, B. Byrne, and R. O’Kennedy, "Surface plasmon resonance for vaccine design and efficacy studies: recent applications and future trends," *Expert Review of Vaccines*, vol. 9, no. 6, pp. 645–664, Jun. 2010, doi: 10.1586/erv.10.52.
- [47] L. K. Wolf, Y. Gao, and R. M. Georgiadis, "Kinetic Discrimination of Sequence-Specific DNA–Drug Binding Measured by Surface Plasmon Resonance Imaging and Comparison to Solution-Phase Measurements," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 34, pp. 10503–10511, Aug. 2007, doi: 10.1021/ja0724011.
- [48] M. Ramakrishnan, K. K. Kandimalla, T. M. Wengenack, K. G. Howell, and J. F. Poduslo, "Surface Plasmon Resonance Binding Kinetics of Alzheimer’s Disease Amyloid β Peptide-Capturing and Plaque-Binding Monoclonal Antibodies," *Biochemistry*, vol. 48, no. 43, pp. 10405–10415, Nov. 2009, doi: 10.1021/bi900523q.
- [49] M. Hendrix, E. S. Priestley, G. F. Joyce, and C.-H. Wong, "Direct Observation of Aminoglycoside–RNA Interactions by Surface Plasmon Resonance," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 16, pp. 3641–3648, Apr. 1997, doi: 10.1021/ja964290o.
- [50] Z. Salamon, Y. Wang, M. F. Brown, H. A. Macleod, and G. Tollin, "Conformational Changes in Rhodopsin Probed by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," May 01, 2002. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00250a022> (accessed Jun. 02, 2021).
- [51] J. Rao, L. Yan, B. Xu, and G. M. Whitesides, "Using Surface Plasmon Resonance to Study the Binding of Vancomycin and Its Dimer to Self-Assembled Monolayers Presenting d-Ala-d-Ala," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 11, pp. 2629–2630, Mar. 1999, doi: 10.1021/ja9838763.
- [52] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, and R. M. Corn, "Surface Plasmon Resonance Imaging Studies of Protein-Carbohydrate Interactions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 20, pp. 6140–6148, May 2003, doi: 10.1021/ja034165u.
- [53] S. Mason, S. La, D. Mytych, S. J. Swanson, and J. Ferbas, "Validation of the BIACORE 3000 platform for detection of antibodies against erythropoietic agents in human serum samples,"

Current Medical Research and Opinion, vol. 19, no. 7, pp. 651–659, Jan. 2003, doi: 10.1185/030079903125002414.

- [54] L. S. Jung, J. S. Shumaker-Parry, C. T. Campbell, S. S. Yee, and M. H. Gelb, “Quantification of Tight Binding to Surface-Immobilized Phospholipid Vesicles Using Surface Plasmon Resonance: Binding Constant of Phospholipase A2,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, no. 17, pp. 4177–4184, May 2000, doi: 10.1021/ja993879v.
- [55] “Surface Plasmon Resonance’s impact on drug discovery – resolution, throughput and versatility – Drug Discovery World (DDW).” <https://www.ddw-online.com/surface-plasmon-resonances-impact-on-drug-discovery-resolution-throughput-and-versatility-1056-200304/> (accessed Jun. 02, 2021).
- [56] M. A. Baldwin, “Mass Spectrometers for the Analysis of Biomolecules,” in *Methods in Enzymology*, vol. 402, Elsevier, 2005, pp. 3–48. doi: 10.1016/S0076-6879(05)02001-X.
- [57] A. Dyachenko, M. Goldflam, M. Vilaseca, and E. Giralt, “Molecular recognition at protein surface in solution and gas phase: Five VEGF peptidic ligands show inverse affinity when studied by NMR and CID-MS,” *Biopolymers*, vol. 94, no. 6, pp. 689–700, 2010, doi: 10.1002/bip.21462.
- [58] L. Fielding, “NMR Methods for the Determination of Protein- Ligand Dissociation Constants,” *CTMC*, vol. 3, no. 1, pp. 39–53, Jan. 2003, doi: 10.2174/1568026033392705.
- [59] C. A. Lepre, J. M. Moore, and J. W. Peng, “Theory and Applications of NMR-Based Screening in Pharmaceutical Research,” *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 8, pp. 3641–3676, Aug. 2004, doi: 10.1021/cr030409h.
- [60] C. Dalvit, “NMR methods in fragment screening: theory and a comparison with other biophysical techniques,” *Drug Discovery Today*, vol. 14, no. 21–22, pp. 1051–1057, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.drudis.2009.07.013.
- [61] A. J. Ruben, Y. Kiso, and E. Freire, “Overcoming Roadblocks in Lead Optimization: A Thermodynamic Perspective,” *Chem Biol Drug Design*, vol. 67, no. 1, pp. 2–4, Jan. 2006, doi: 10.1111/j.1747-0285.2005.00314.x.

- [62] V. Lafont, A. A. Armstrong, H. Ohtaka, Y. Kiso, L. Mario Amzel, and E. Freire, “Compensating Enthalpic and Entropic Changes Hinder Binding Affinity Optimization,” *Chem Biol Drug Design*, vol. 69, no. 6, pp. 413–422, Jun. 2007, doi: 10.1111/j.1747-0285.2007.00519.x.
- [63] Y. Kawasaki *et al.*, “How Much Binding Affinity Can be Gained by Filling a Cavity?,” *Chemical Biology & Drug Design*, vol. 75, no. 2, pp. 143–151, Feb. 2010, doi: 10.1111/j.1747-0285.2009.00921.x.
- [64] R. U. Lemieux and U. Spohr, “How Emil Fischer was led to the lock and key concept for enzyme specificity,” *Adv Carbohydr Chem Biochem*, vol. 50, pp. 1–20, 1994.
- [65] P. Kokkonen, D. Bednar, G. Pinto, Z. Prokop, and J. Damborsky, “Engineering enzyme access tunnels,” *Biotechnology Advances*, vol. 37, no. 6, p. 107386, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.008.
- [66] N. M. O’Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, and G. R. Hutchison, “Open Babel: An open chemical toolbox,” *J Cheminform*, vol. 3, no. 1, p. 33, Dec. 2011, doi: 10.1186/1758-2946-3-33.
- [67] Schrödinger, LLC, “The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8,” Nov. 2015.
- [68] T. D. Goddard *et al.*, “UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis: UCSF ChimeraX Visualization System,” *Protein Science*, vol. 27, no. 1, pp. 14–25, Jan. 2018, doi: 10.1002/pro.3235.
- [69] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading,” *J Comput Chem*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, Jan. 2010, doi: 10.1002/jcc.21334.
- [70] E. Di Muzio, D. Toti, and F. Polticelli, “DockingApp: a user friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina,” *J Comput Aided Mol Des*, vol. 31, no. 2, pp. 213–218, Feb. 2017, doi: 10.1007/s10822-016-0006-1.

- [71] G. Macari, D. Toti, A. Pasquadibisceglie, and F. Polticelli, "DockingApp RF: A State-of-the-Art Novel Scoring Function for Molecular Docking in a User-Friendly Interface to AutoDock Vina," *IJMS*, vol. 21, no. 24, p. 9548, Dec. 2020, doi: 10.3390/ijms21249548.
- [72] T. T. Tanimoto, "Elementary mathematical theory of classification and prediction," 1958.
- [73] D. Bajusz, A. Rácz, and K. Héberger, "Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations?," *J Cheminform*, vol. 7, no. 1, p. 20, Dec. 2015, doi: 10.1186/s13321-015-0069-3.
- [74] S. Riniker and G. A. Landrum, "Similarity maps - a visualization strategy for molecular fingerprints and machine-learning methods," *Journal of Cheminformatics*, vol. 5, no. 1, p. 43, Sep. 2013, doi: 10.1186/1758-2946-5-43.
- [75] A. Zubrienė, V. Linkuvienė, and D. Matulis, "Maps of Correlations Between Compound Chemical Structures and Thermodynamics of Binding to 12 Human Carbonic Anhydrases: Towards Isoform-Selective Inhibitors," in *Carbonic Anhydrase as Drug Target*, D. Matulis, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 233–247. doi: 10.1007/978-3-030-12780-0_16.
- [76] B. S. Avvaru *et al.*, "A Short, Strong Hydrogen Bond in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase II," *Biochemistry*, vol. 49, no. 2, pp. 249–251, Jan. 2010, doi: 10.1021/bi902007b.
- [77] U. C. Singh and P. A. Kollman, "An approach to computing electrostatic charges for molecules," *J. Comput. Chem.*, vol. 5, no. 2, pp. 129–145, Apr. 1984, doi: 10.1002/jcc.540050204.
- [78] J. Gasteiger and M. Marsili, "A new model for calculating atomic charges in molecules," *Tetrahedron Letters*, vol. 19, no. 34, pp. 3181–3184, Jan. 1978, doi: 10.1016/S0040-4039(01)94977-9.
- [79] J. Gasteiger and M. Marsili, "Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges," *Tetrahedron*, vol. 36, no. 22, pp. 3219–3228, Jan. 1980, doi: 10.1016/0040-4020(80)80168-2.
- [80] X. Hu and W. H. Shelver, "Docking studies of matrix metalloproteinase inhibitors: zinc parameter optimization to improve the binding free energy prediction," *Journal of Molecular*

Graphics and Modelling, vol. 22, no. 2, pp. 115–126, Nov. 2003, doi: 10.1016/S1093-3263(03)00153-0.

- [81] D. Santos-Martins, S. Forli, M. J. Ramos, and A. J. Olson, “AutoDock4Zn: An Improved AutoDock Force Field for Small-Molecule Docking to Zinc Metalloproteins,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 8, pp. 2371–2379, Aug. 2014, doi: 10.1021/ci500209e.
- [82] Z. Wang *et al.*, “Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 18, pp. 12964–12975, 2016, doi: 10.1039/C6CP01555G.
- [83] A. Zubrienė and D. Matulis, “Observed Versus Intrinsic Thermodynamics of Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases,” in *Carbonic Anhydrase as Drug Target*, D. Matulis, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 107–123. doi: 10.1007/978-3-030-12780-0_8.

VILNIAUS UNIVERSITETO
FIZIKOS FAKULTETO
CHEMINĖS FIZIKOS INSTITUTAS

ERNESTAS URNIEŽIUS

**SULFONAMIDINIŲ JUNGINIŲ SAŲVEIKOS SU ŽMOGAUS KARBOANHIDRAZIŲ
IZOFORMOMIS ATPAŽINIMO, JUNGIMOSI GIMININGUMO IR SELEKTYVUMO
TYRIMAS**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Potencialūs vaistai turėtų pasižymėti dideliu jungimosi giminingumu, specifiskumu ir selektyvumu vienai žmogaus karboanhidrazės izoformai (CA) ir neinhibuoti kitų svarbių izoformų, kurios nėra taikinos. Viena iš pagrindinių priežasčių, kodėl yra reikalingi atrankūs ir stipriai jungimusi pasižymintys karboanhidrazių izoformų slopikliai – tai siekis, jog potencialus vaistas nesukeltų šalutinių efektų ir toksinio poveikio. Vieni iš populiariausių šiuo metu tyrinėjamų CA slopiklių yra sulfonamidiniai junginiai. Šio darbo tikslas buvo ištirti sulfonamidinių junginių atpažinimą, jungimosi giminingumą ir selektyvumą žmogaus karboanhidrazės II (CA II) izoformai.

Atliktas struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų tyrimas parodė, jog tiek sulfanilo, tiek sulfonilo grupės įvedimas benzensulfonamido *para* padėtyje esančių pakaitų sujungimui su benzeno žiedu padidina ligandų jungimosi giminingumą CA II izoformai. Nei sulfanilo, nei sulfanilo grupės įvedimas sujungti benzensulfonamido *para* padėtyje esantiems pakaitams savaime ženkliai nepagerina selektyvumo CA II profilio, tačiau per šias funkcines grupes prisijungę pakaitai daro įtaką selektyvumo profiliui. Sulfonilo grupės panaudojimas *para* padėtyje esančių pakaitų jungimui labiau padidina jungimosi su CA II giminingumą nei sulfanilo grupės. Sulfanilo grupės pakeitimas sulfanilo grupe sujungiant pakaitus, esančius benzensulfonamido *para* padėtyje sulfonamidinės grupės atžvilgiu, ženkliai sumažina jungimosi giminingumą CA II atžvilgiu. Amino funkcinės grupės panaudojimas benzensulfonamido *para* padėtyje sujungti pakaitus su benzeno žiedu pagerina selektyvumą CA II, tačiau susilpnėja jungimosi giminingumas su CA II. Azotą turinčių funkcinių grupių, tokių kaip: aminos, amidas, pirolas, imidazolas, piridinas, pirimidinas ar pirimidonas, įvedimas benzensulfonamido *para* arba *meta* padėtyse esančiuose pakaituose padeda pagerinti selektyvumą CA II. Chloro įvedimas benzensulfonamido *orto* padėtyje sulfonamidinės grupės atžvilgiu padidina jungimosi su CA II giminingumą ir siek tiek pagerina selektyvumo CA II profilį.

Išanalizavus molekulinio dokimo rezultatus ir gautas prognozuojamas jungimosi konformacijas CA II aktyviajame centre pastebėta, jog benzensulfonamidai, turintys *orto* padėtyje chloro atomą ir *meta* padėtyje per aminą, sulfanilą arba sulfonilą prijungtą pirolą, imidazolą, piridino arba pirimidino žiedą, galėtų būti pagrindas naujoms inhibitorių struktūroms. Šių struktūrų optimizavimas, siekiant didelio jungimosi giminingumo ir selektyvumo CA II, galėtų būti pasiektas įvedant pakaitus benzensulfonamido *para* padėtyje ir prijungiant papildomas grupes prie *meta* padėtyje esančio pirolą, imidazolą, piridino arba pirimidino žiedo.

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF PHYSICS
INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS

Ernestas Urniežius

**INVESTIGATION ON THE RECOGNITION, BINDING AFFINITY AND SELECTIVITY
OF SULFONAMIDE-BASED COMPOUNDS INTERACTIONS WITH HUMAN
CARBONIC ANHYDRASE ISOFORMS**

Master's thesis

SUMMARY

Potential drugs should have high binding affinity, specificity, and selectivity for one isoform of human carbonic anhydrase and should not inhibit other important non-target isoforms. One of the main reasons for the need of selective inhibitors of carbonic anhydrase isoforms is to ensure that the potential drug does not cause side effects and toxic effects. One of the most popular CA inhibitors that currently are under investigation are sulfonamide-based compounds. The aim of this study was to investigate the recognition, binding affinity, and selectivity of sulfonamide-based compounds for the human carbonic anhydrase II (CA II) isoform.

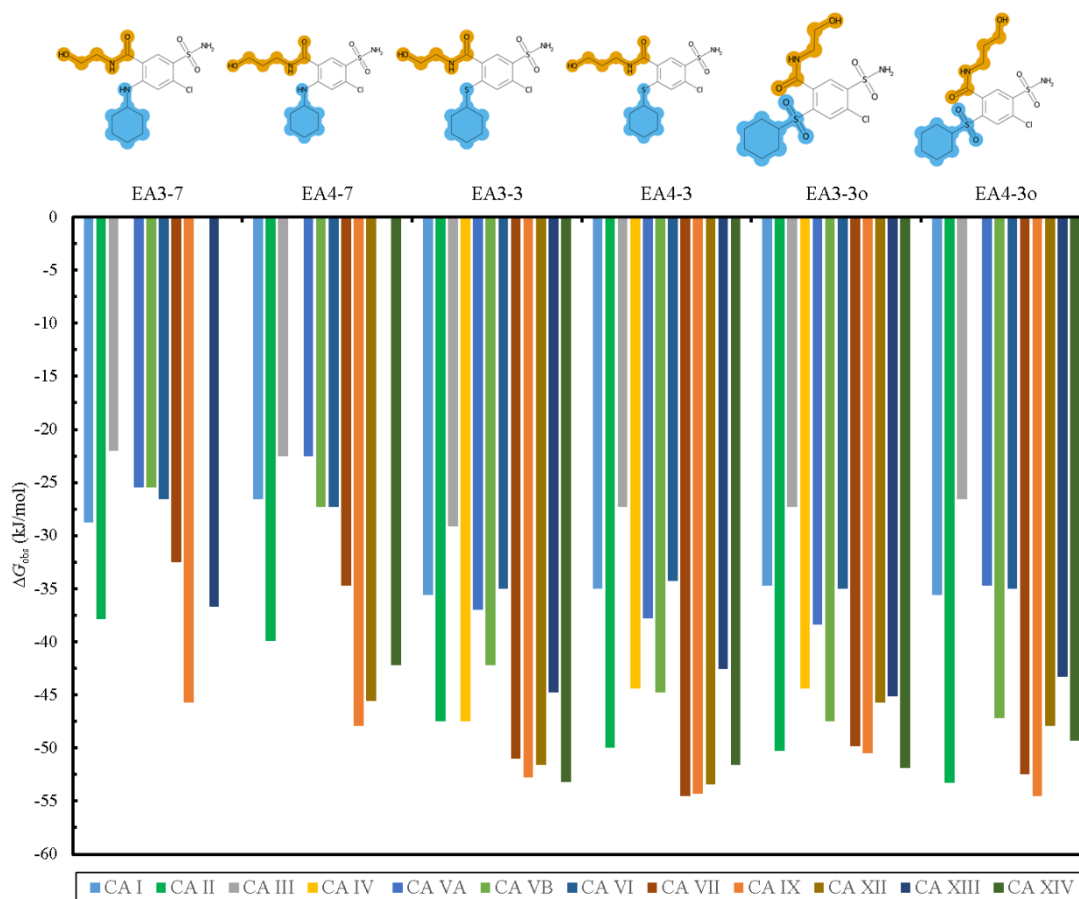
Performed investigation on the structure-affinity and structure-selectivity correlations has shown that the introduction of a sulfanyl or a sulfonyl group to link benzenesulfonamide *para* substituents to the benzene ring increases the binding affinity of the ligands for the CA II isoform. The introduction of either a sulfonyl or sulfanyl group to link benzenesulfonamide to the *para* substituents does not in itself significantly improve the selectivity for CA II, but the substituents attached through those functional groups affect the selectivity profile. The use of a sulfonyl group to link substituents in the *para* position increases the binding affinity for CA II more than the sulfanyl group. Substitution of the sulfanyl group with a sulfinyl group by linking the substituents in the *para* position of the benzenesulfonamide significantly reduces the binding affinity to CA II. The use of an amine functional group at the *para* position of the benzenesulfonamide to link the substituents to the benzene ring improves the selectivity for CA II, but decreases the binding affinity with CA II. The introduction of nitrogen-containing functional groups such as amine, amide, pyrrole, imidazole, pyridine, pyrimidine or pyrimidone in the substituents at the *para* or *meta* position of benzenesulfonamide helps to improve the selectivity for CA II. The introduction of chlorine at the *ortho* position of benzenesulfonamide increases the binding affinity for CA II and slightly improves selectivity for CA II.

Analysis of the molecular docking results and the predicted binding conformations at the CA II active site has shown that benzenesulfonamides containing chlorine at *ortho* position and pyrrole, imidazole, pyridine or pyrimidine ring at the *meta* position could provide a basis for a novel structures of inhibitors. Optimization of these structures to achieve high binding affinity and selectivity for CA II could be done by introducing substituents at the *para* position of the benzenesulfonamide and by attaching additional groups to pyrrole, imidazole, pyridine or pyrimidine ring at the *meta* position.

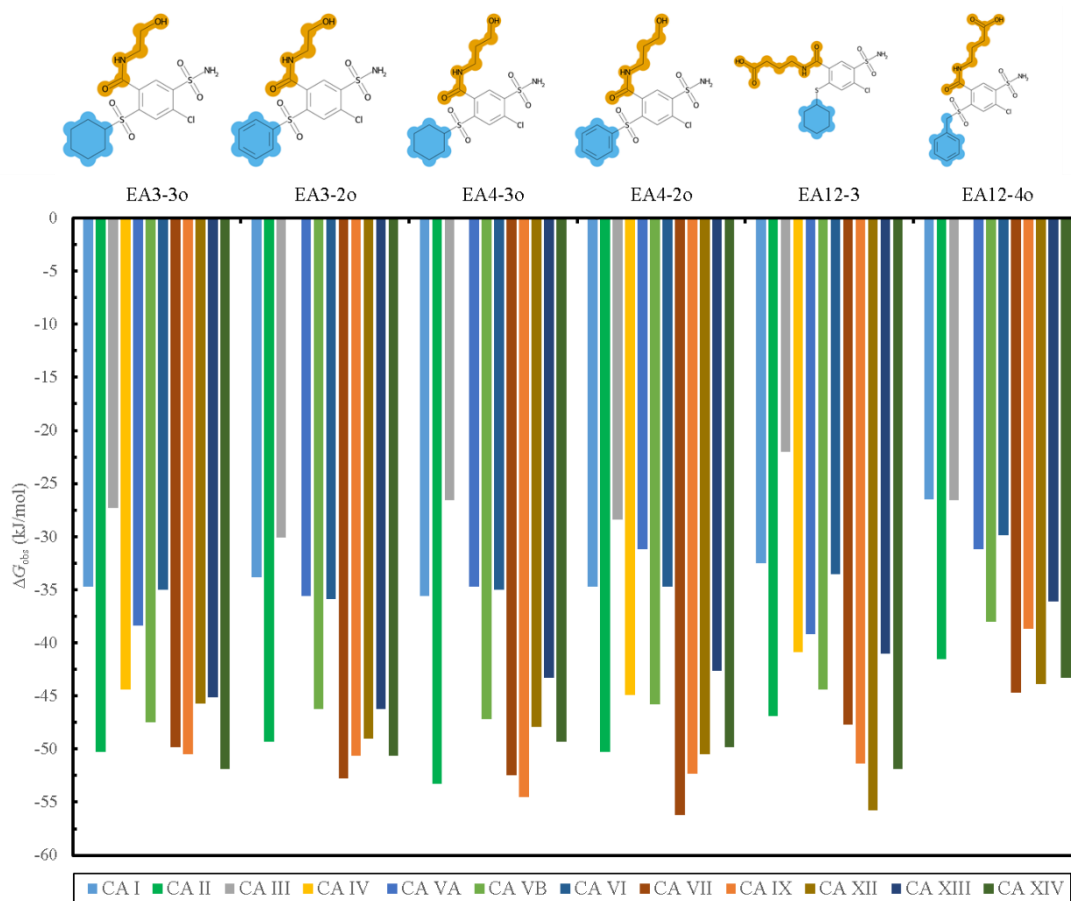
5. PRIEDAI

5.1. Struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo sugrupuotų koreliacijų diagramos

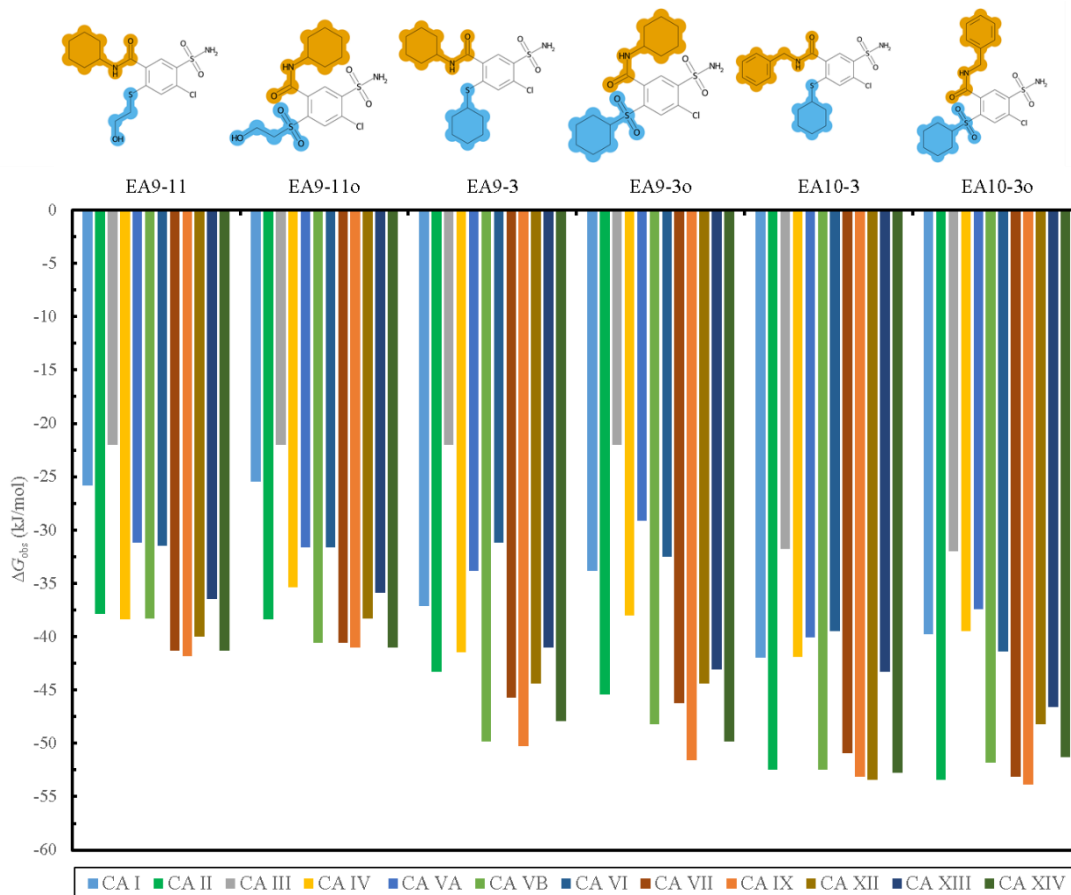
Junginių struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagramos, vaizduojančios į juos struktūriškai panašių sulfonamidinių ligandų sąveikas su CA izoformomis stebimosios Gibso energijos pokyčio (ΔG_{obs}) priklausomybę nuo junginių struktūrinių pokyčių. Balta linija diagramose žymi jungimosi giminingumo nustatymo ribą fluorescenciniu terminio poslinkio metodu, kuomet matavimų temperatūra yra 37°C ($\Delta G_{\text{obs}} = -22$ kJ/mol). Balti tarpai tarp jungimosi giminingumo konkrečioms izoformoms stulpelių rodo, kurioms sąveikoms dar nėra nustatytų stebimosios Gibso energijos pokyčių.



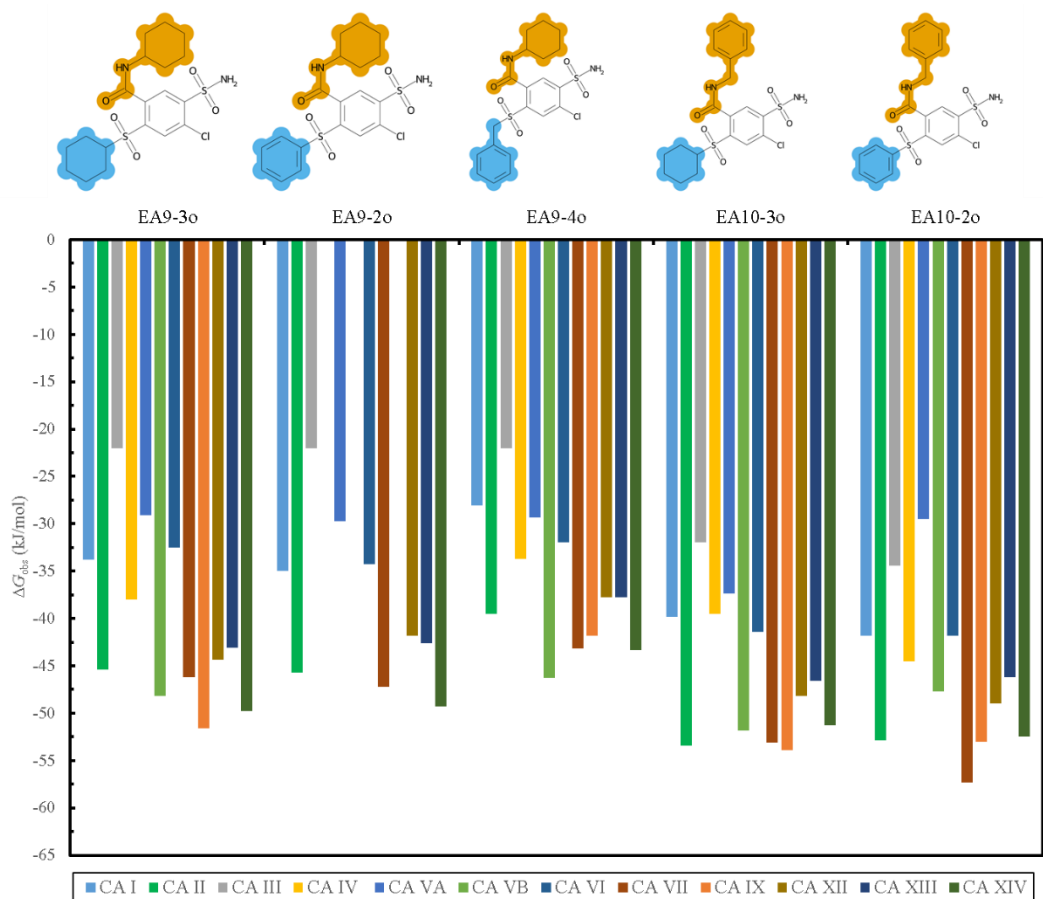
5.1 pav. EA3-7 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



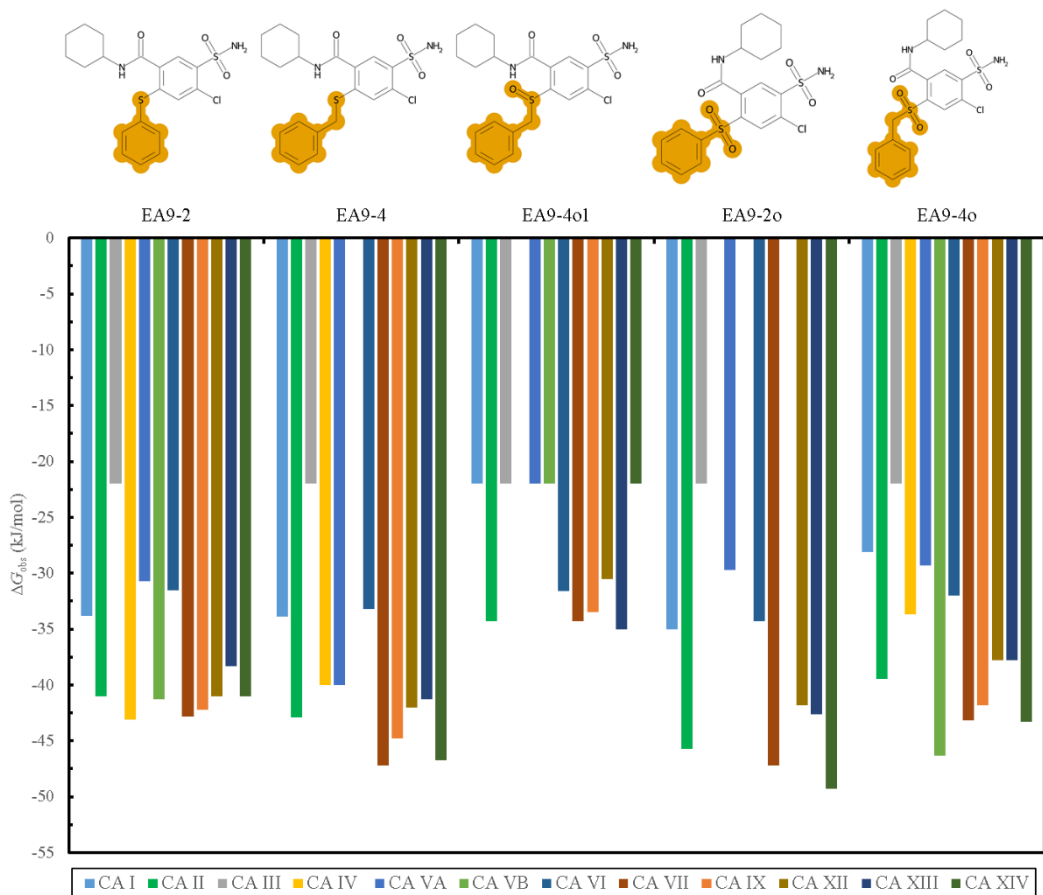
5.2 pav. EA3-3o junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



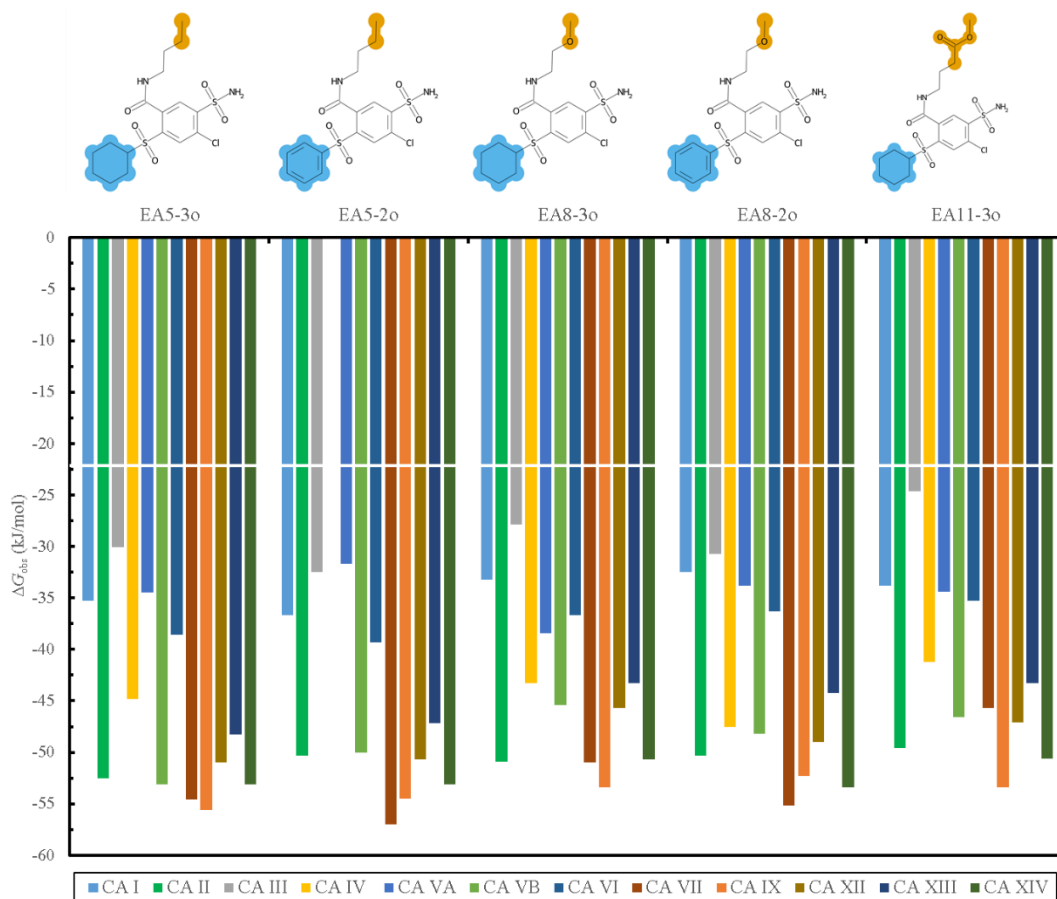
5.3 pav. EA9-11 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



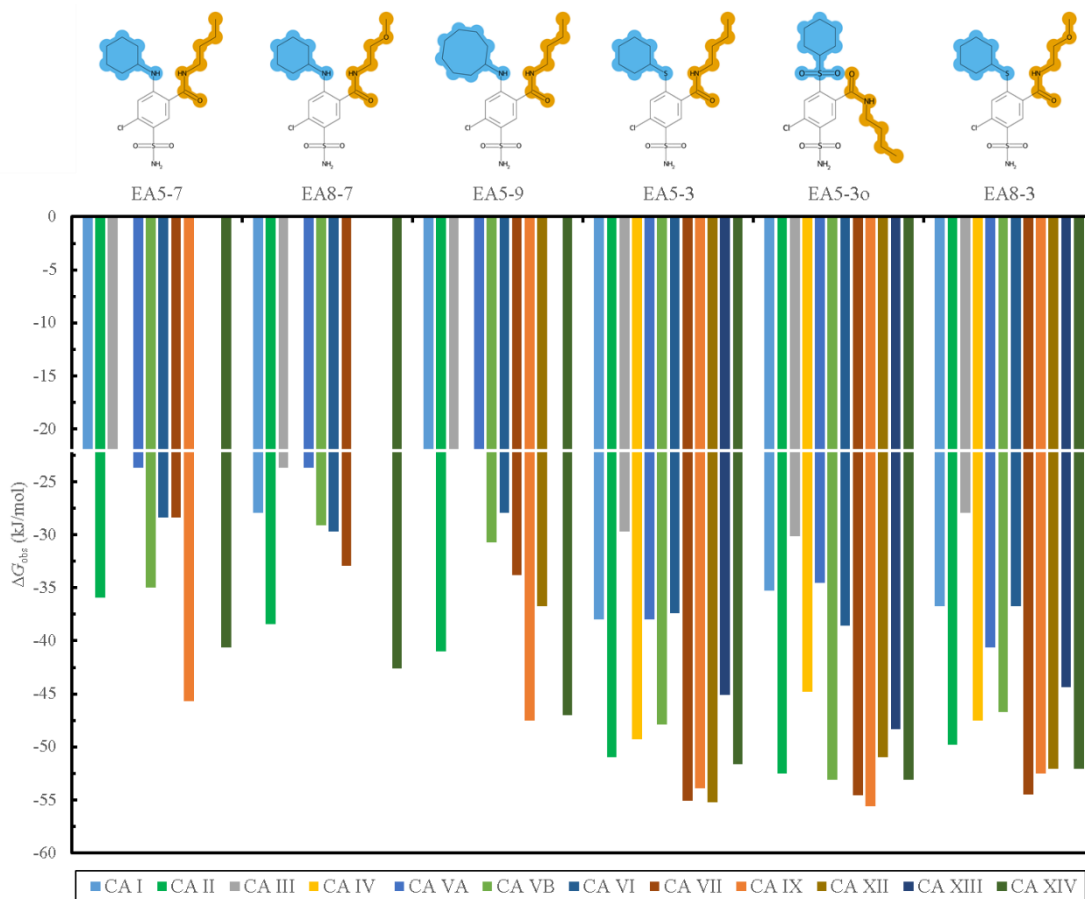
5.4 pav. EA9-3o struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo korelacių diagrama.



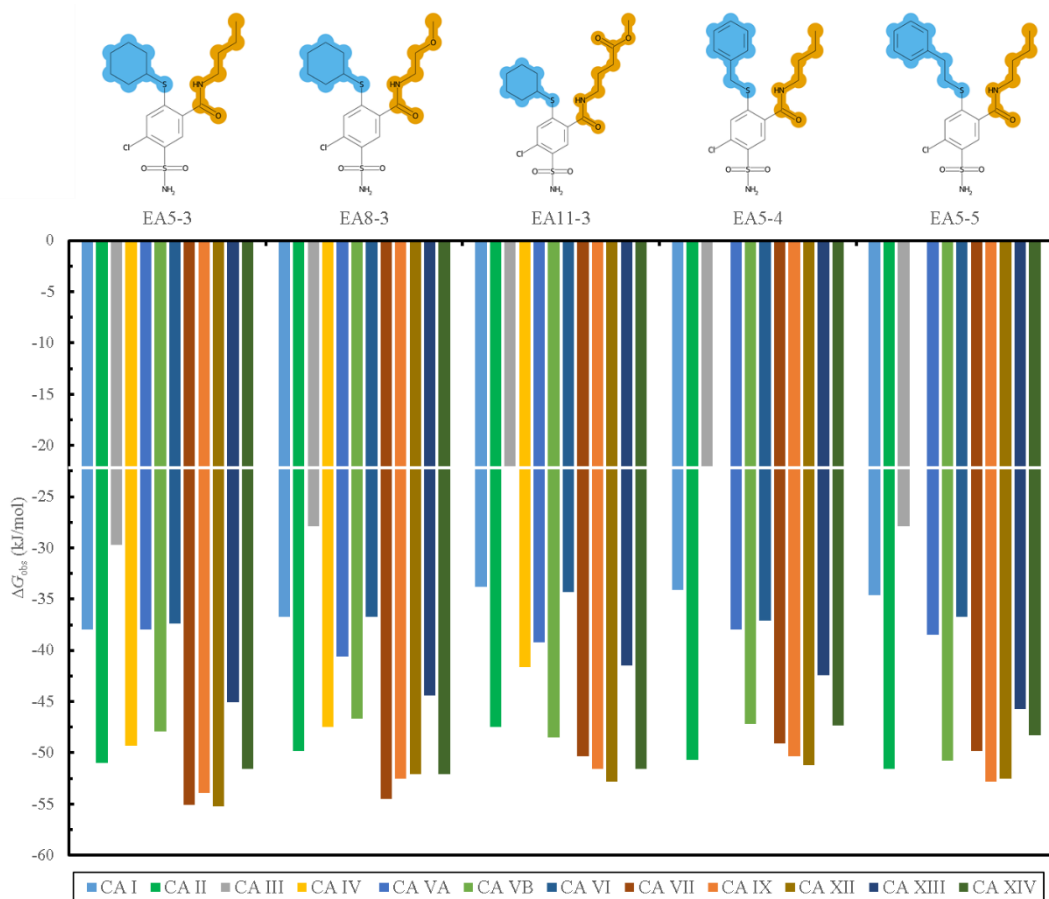
5.5 pav. EA9-2 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo korelacių diagrama.



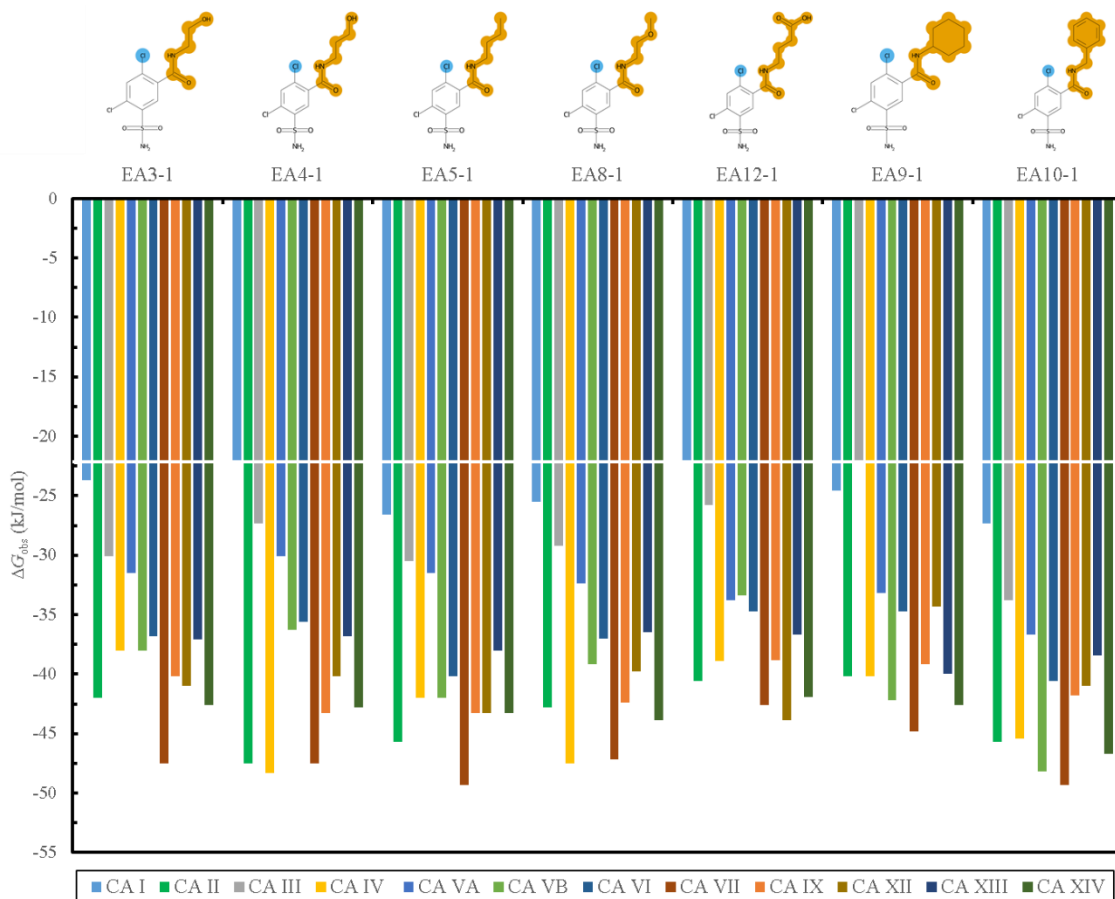
5.6 pav. EA5-3o junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



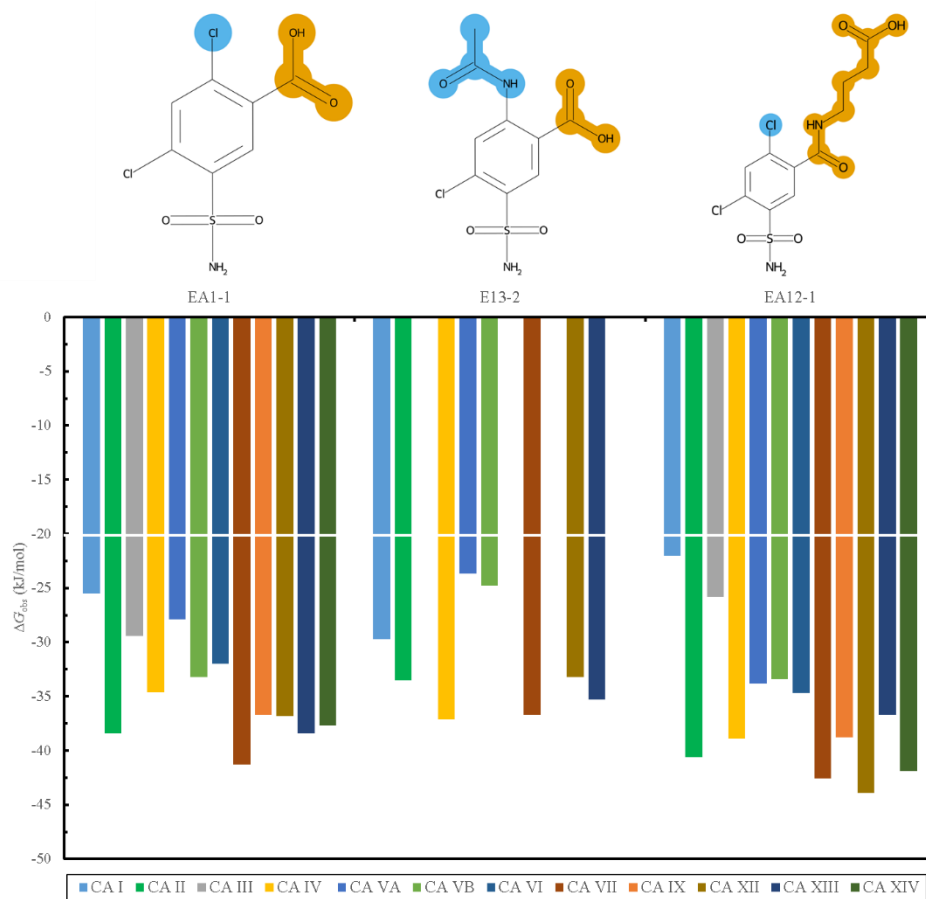
5.7 pav. EA5-7 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



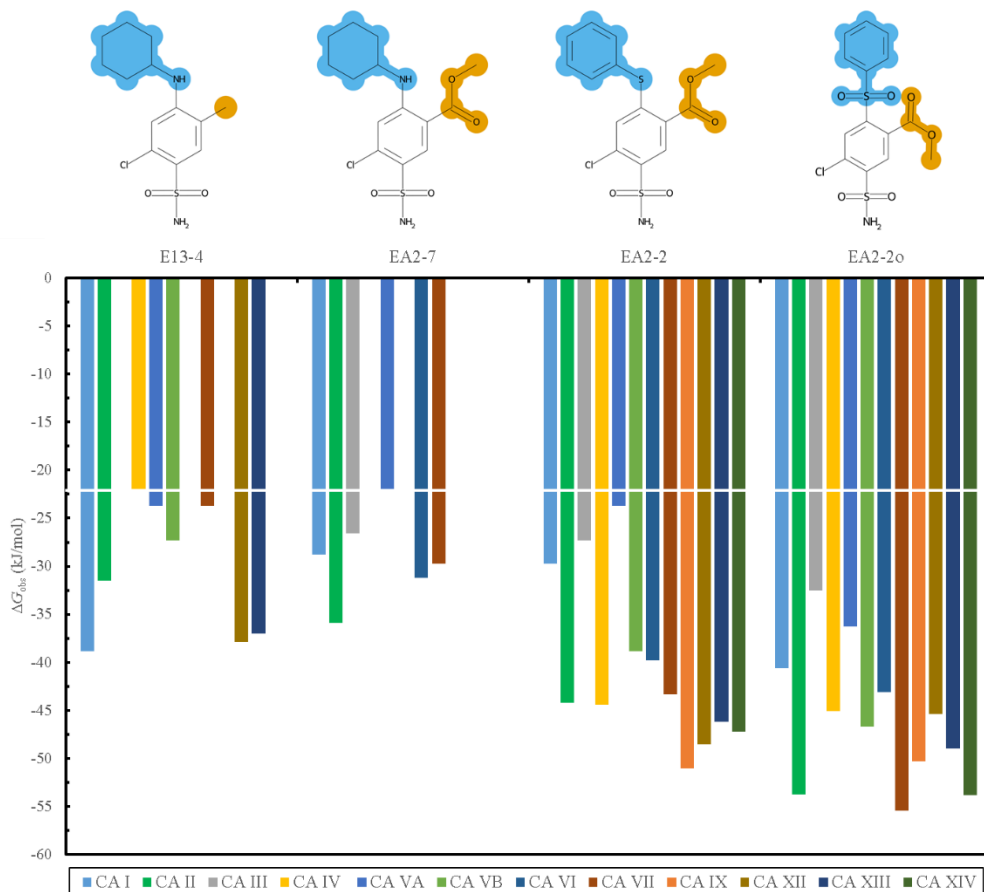
5.8 pav. EA5-3 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



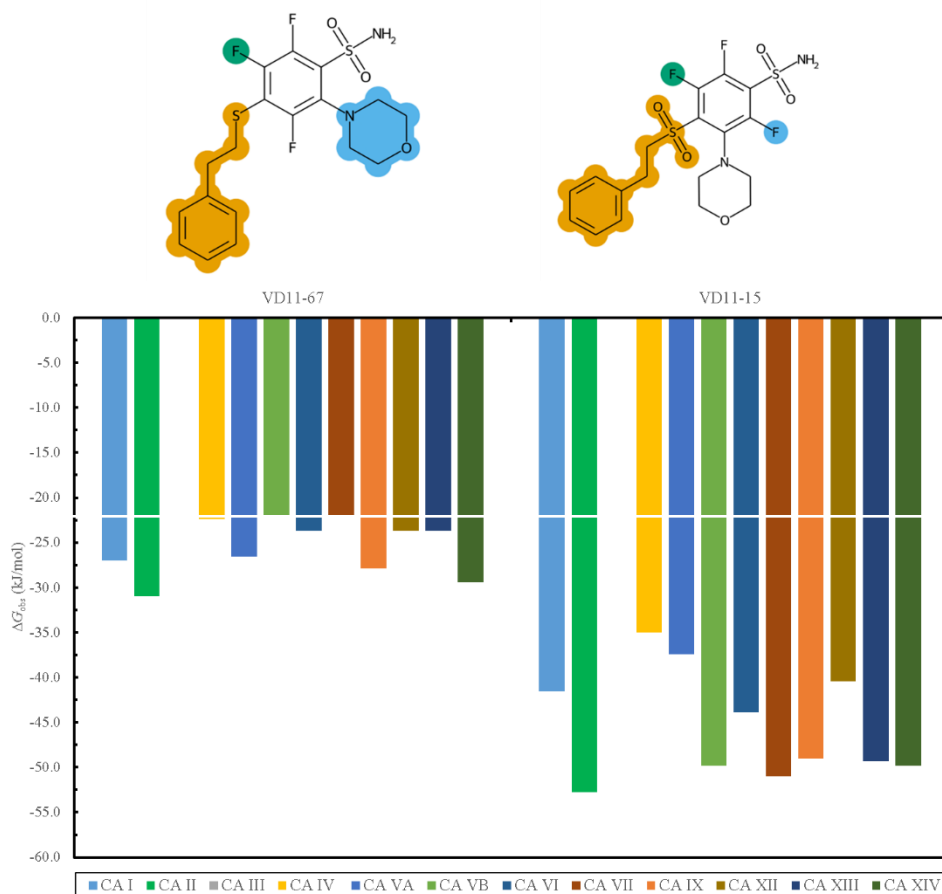
5.9 pav. EA3-1 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



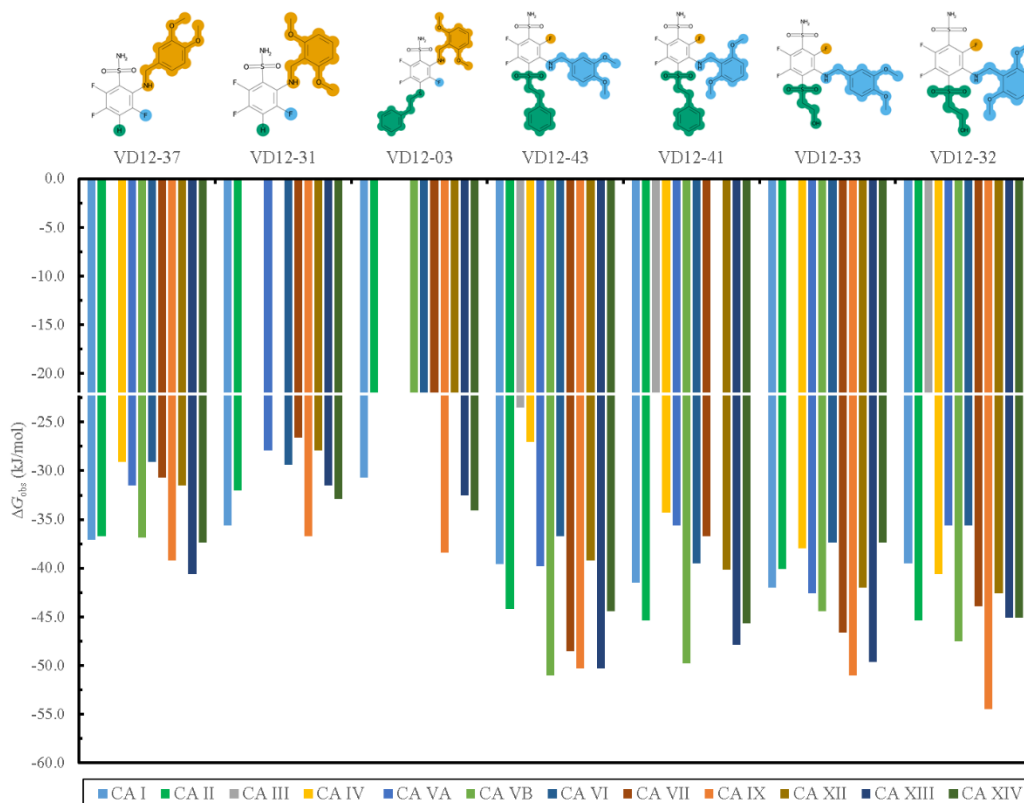
5.10 pav. EA1-1 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



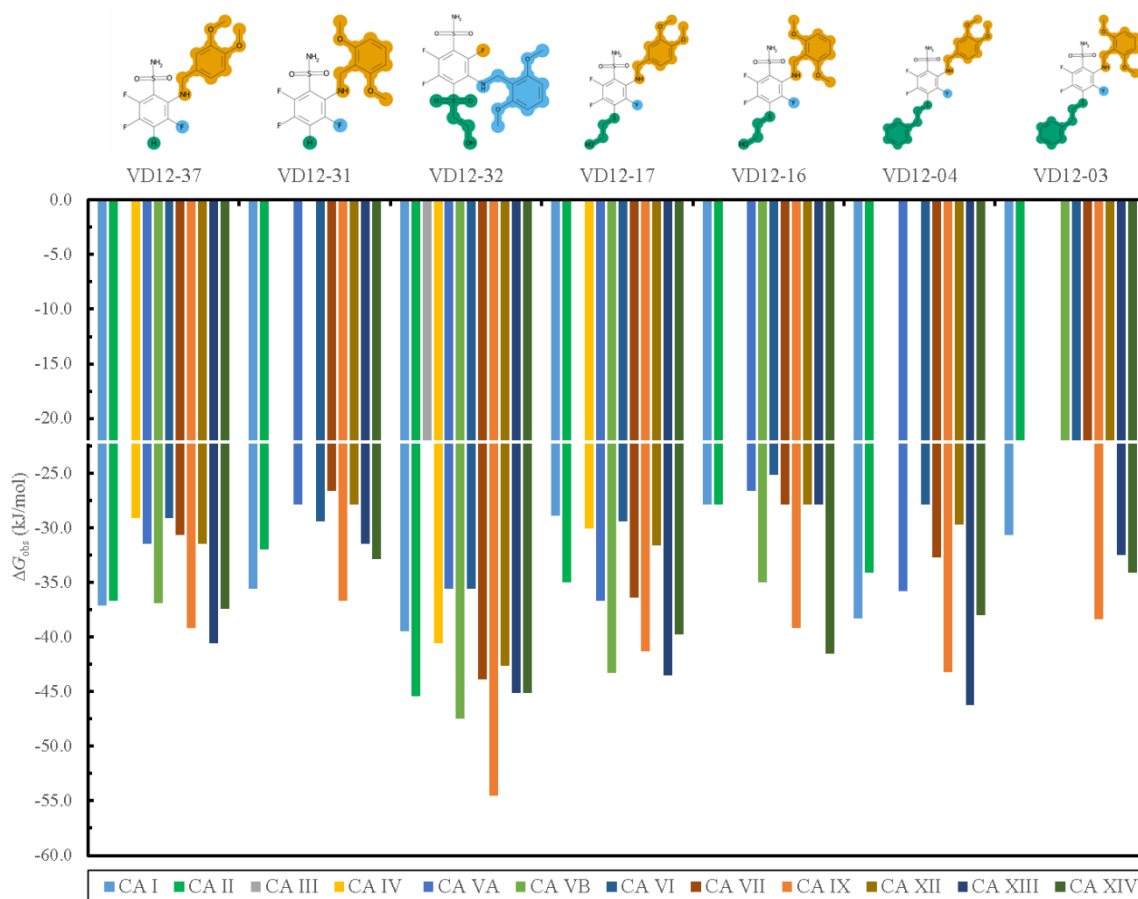
5.11 pav. E13-4 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



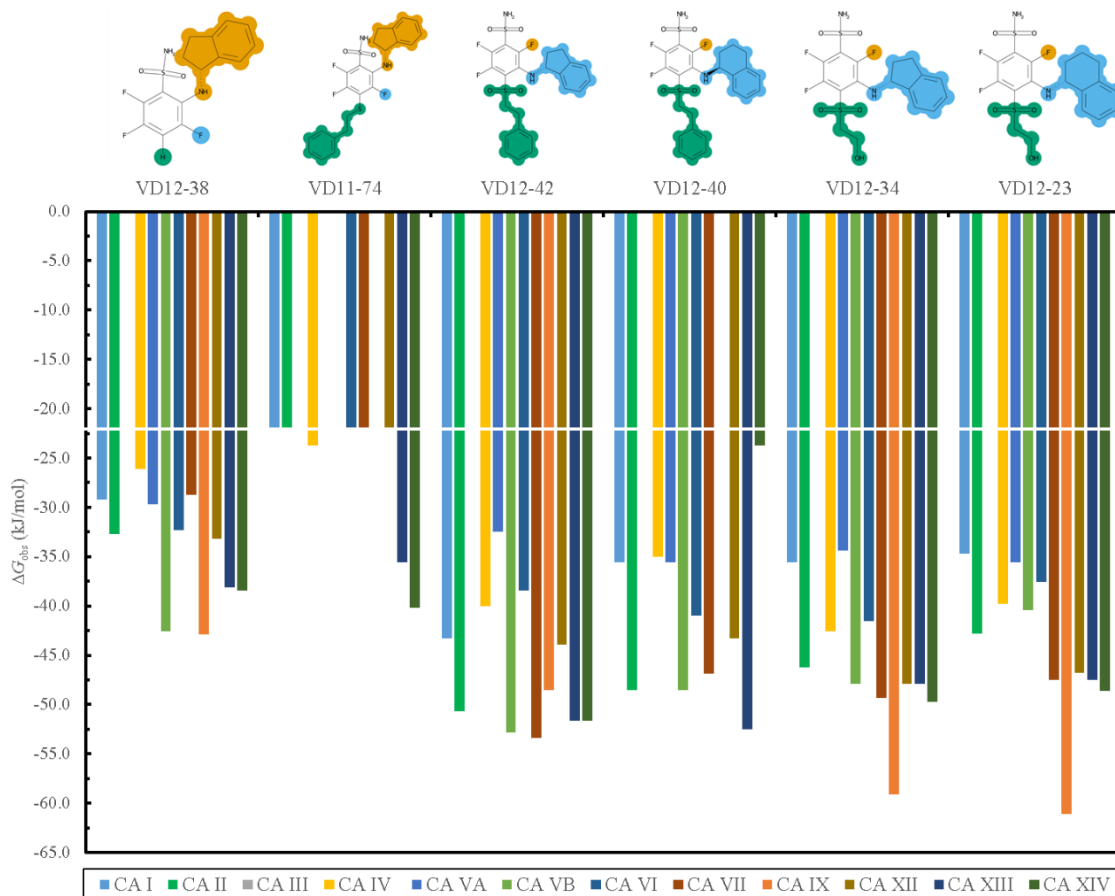
5.12 pav. VD11-67 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama, vaizduojanti sąveikas su CA izoformomis stebimosios Gibso energijos pokyčius (ΔG_{obs}) ir palyginanti jį su struktūriškai panašiu VD11-15 ligandu.



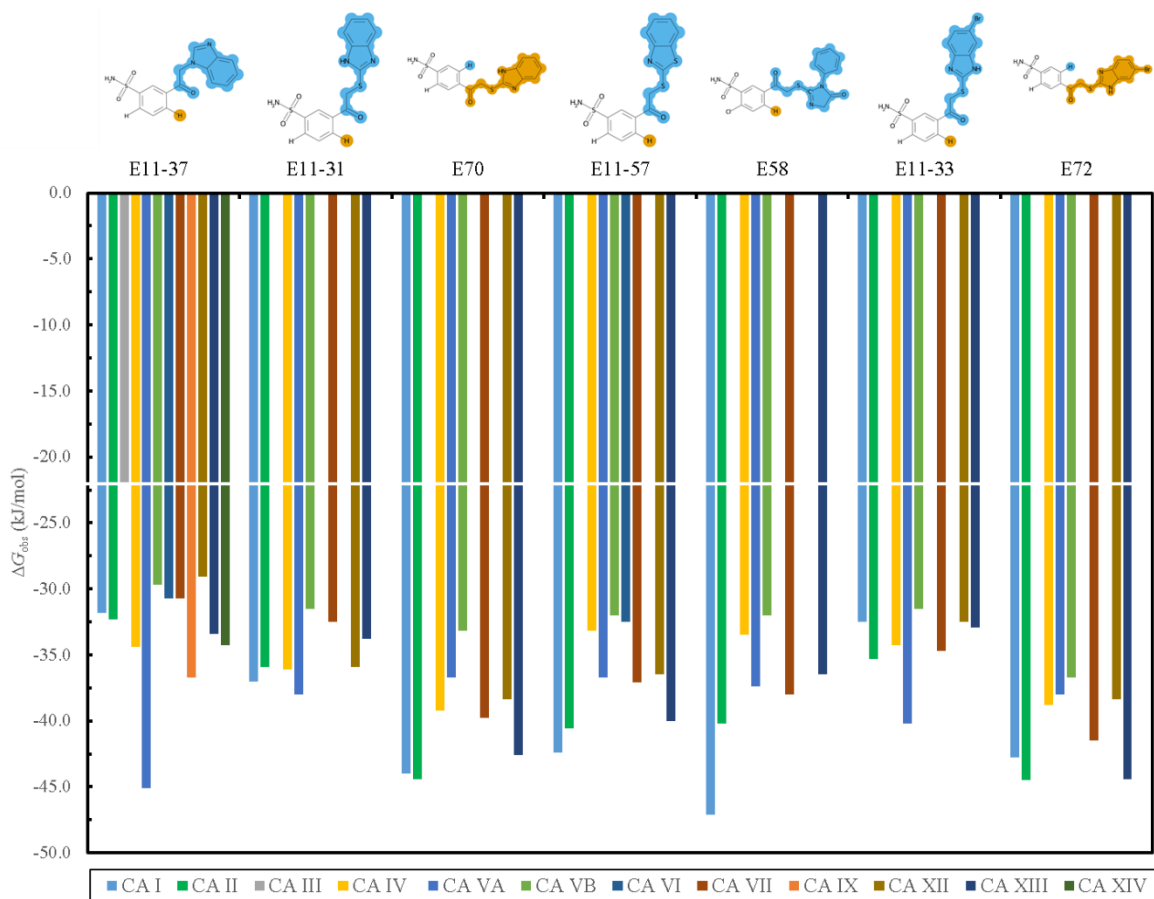
5.13 pav. VD12-37 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



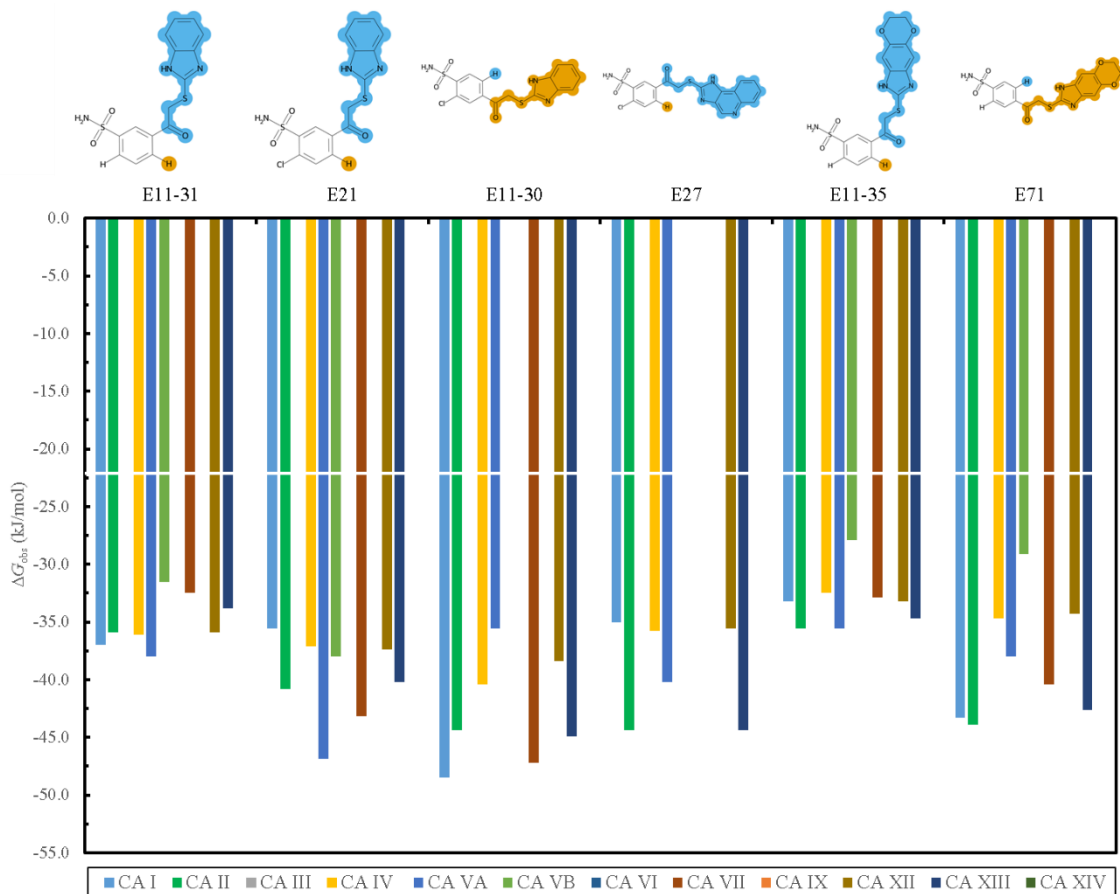
5.14 pav. VD12-37 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



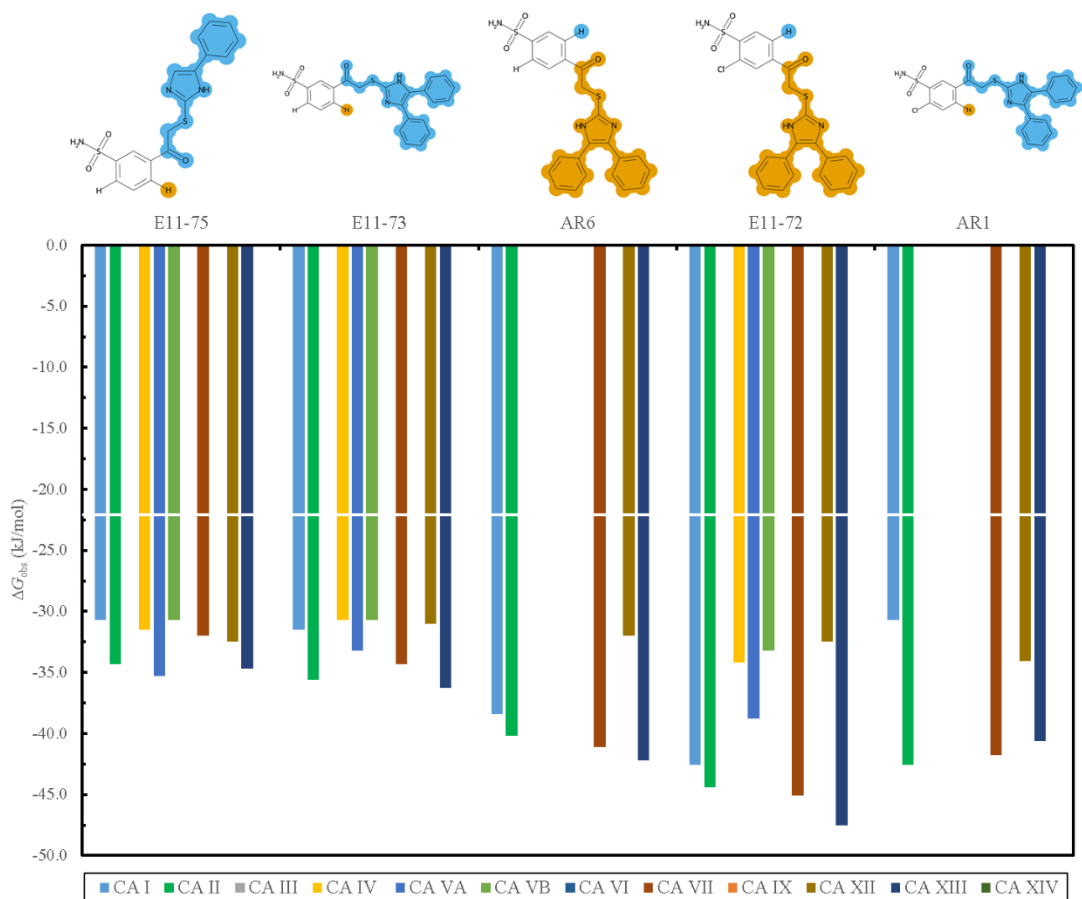
5.15 pav. VD12-38 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



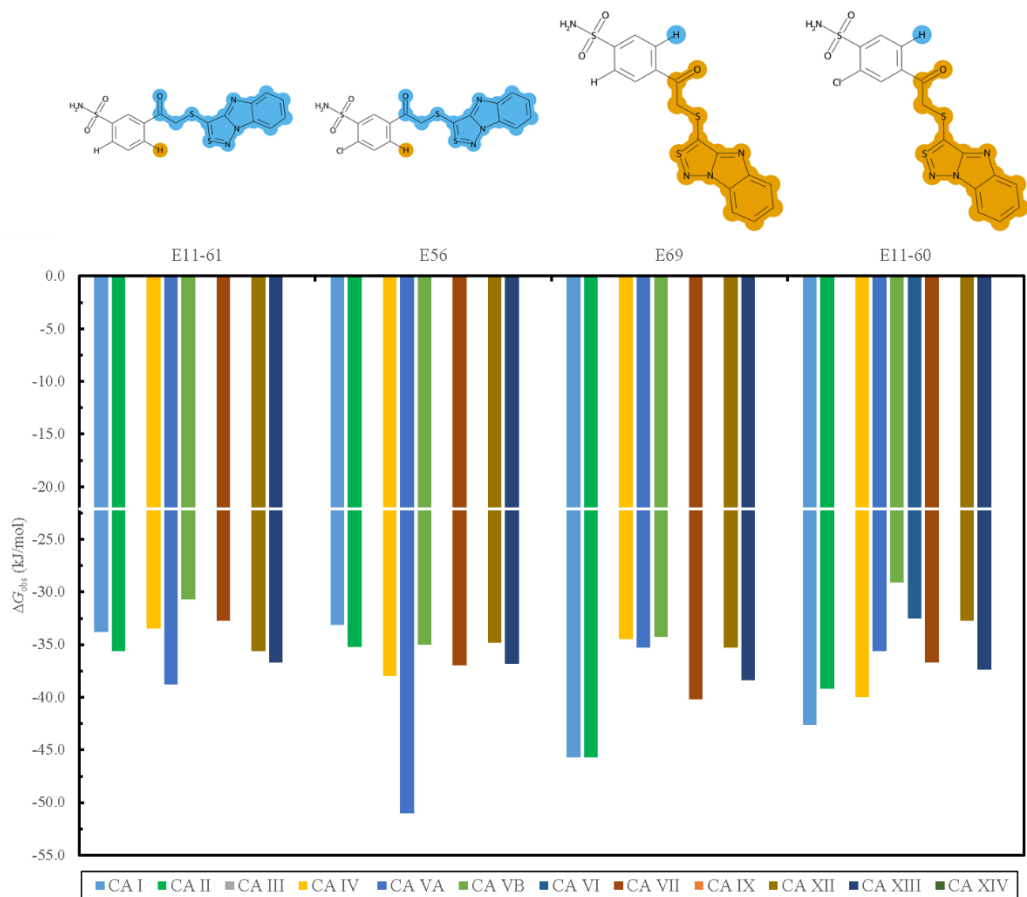
5.16 pav. E11-37 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



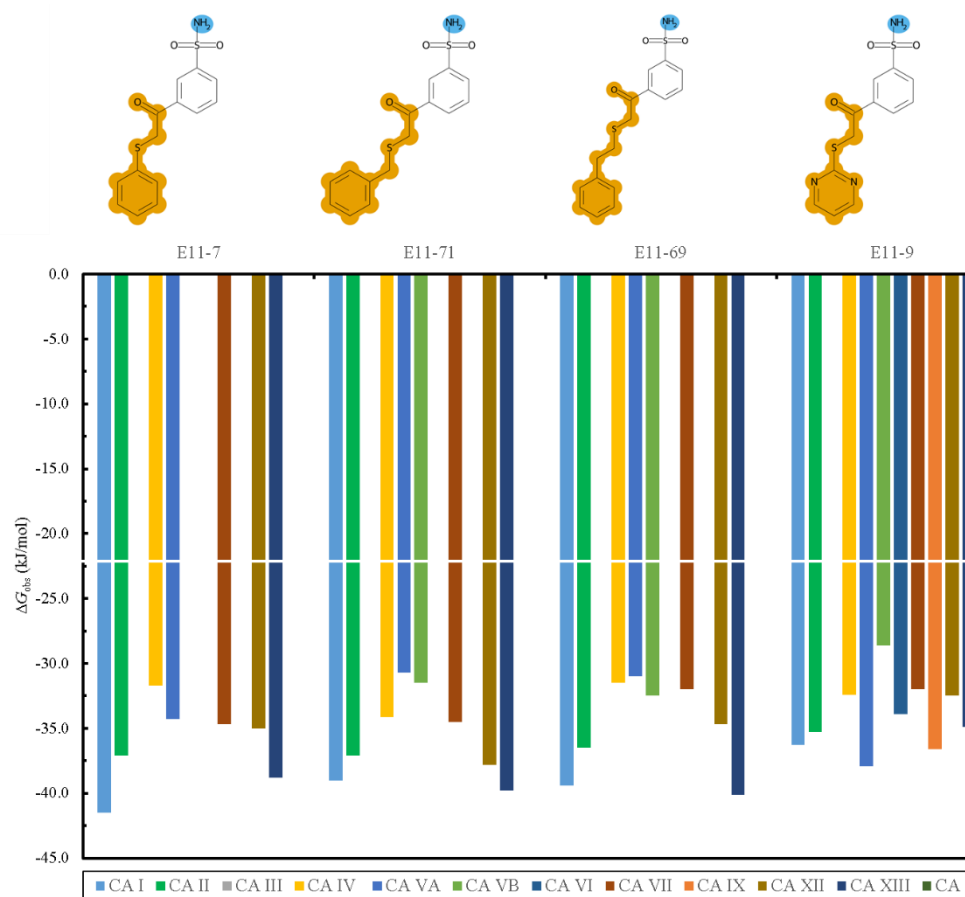
5.17 pav. E11-31 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



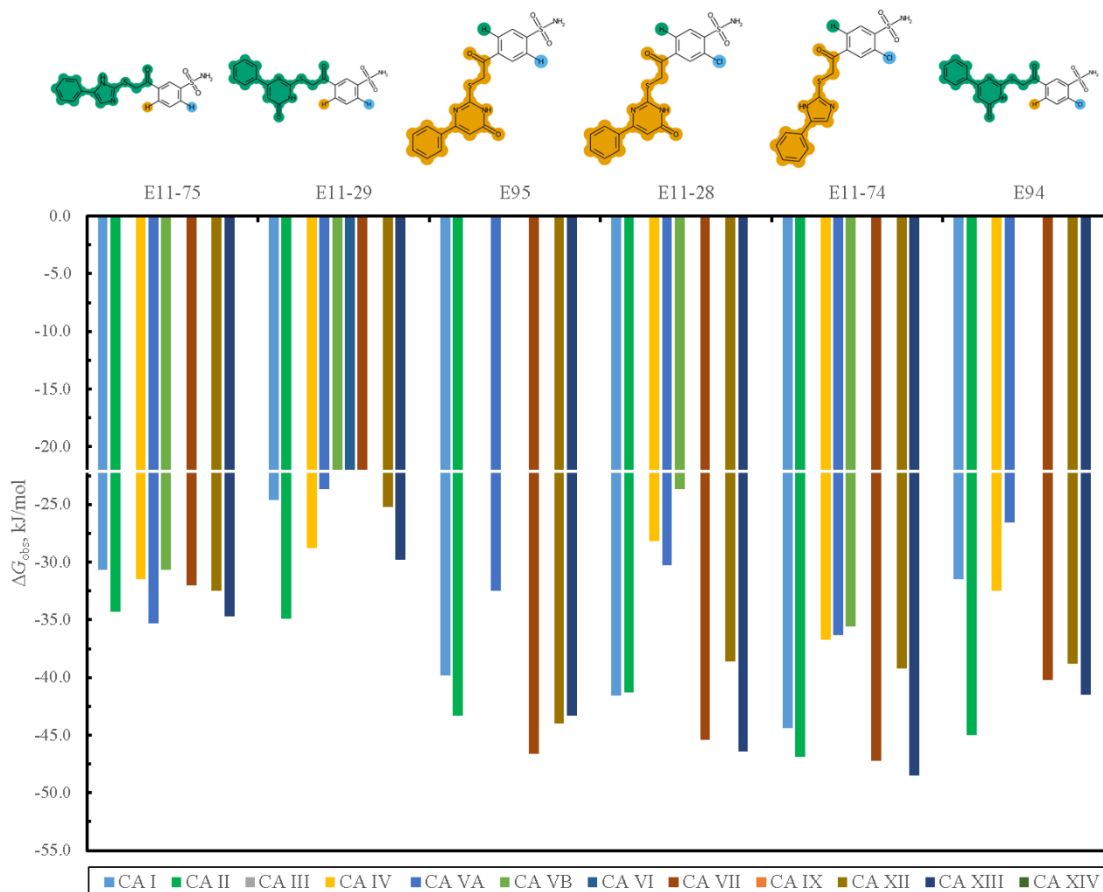
5.18 pav. E11-75 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo korelaciju diagrama.



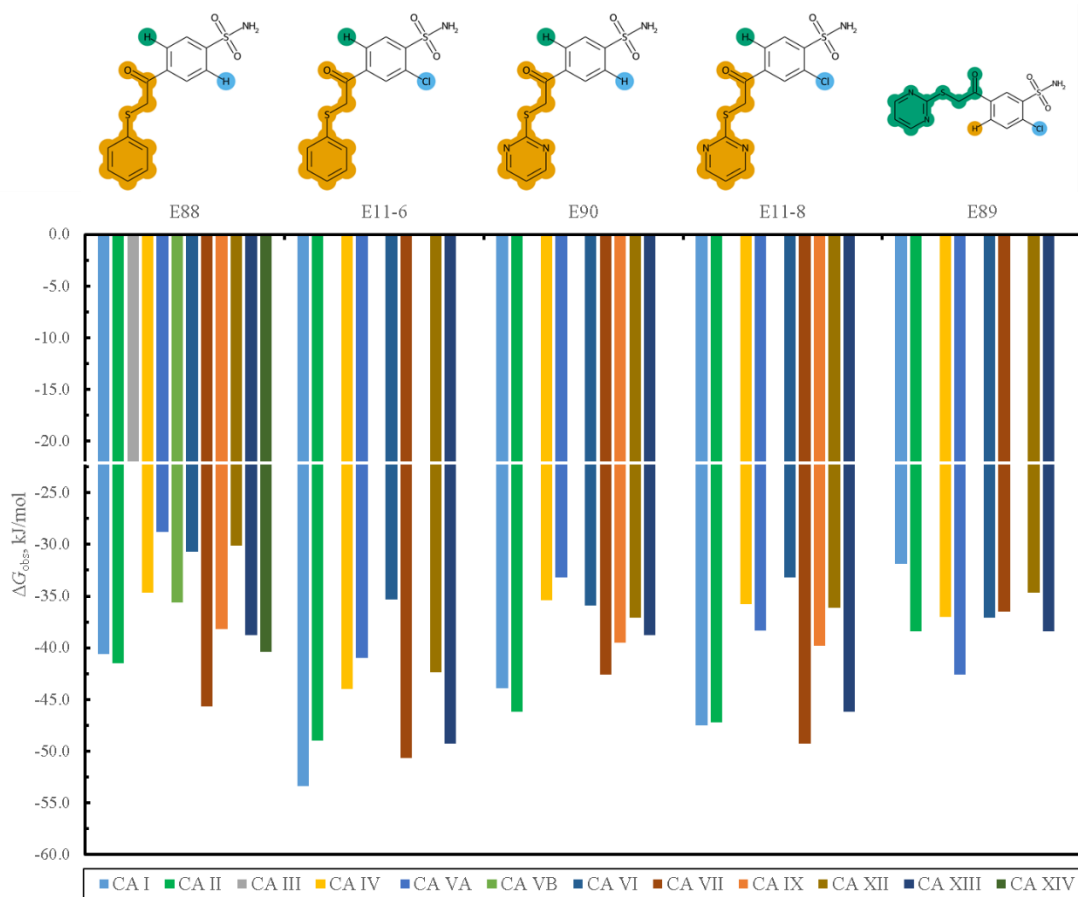
5.19 pav. E11-61 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo korelaciju diagrama.



5.20 pav. E11-7 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.

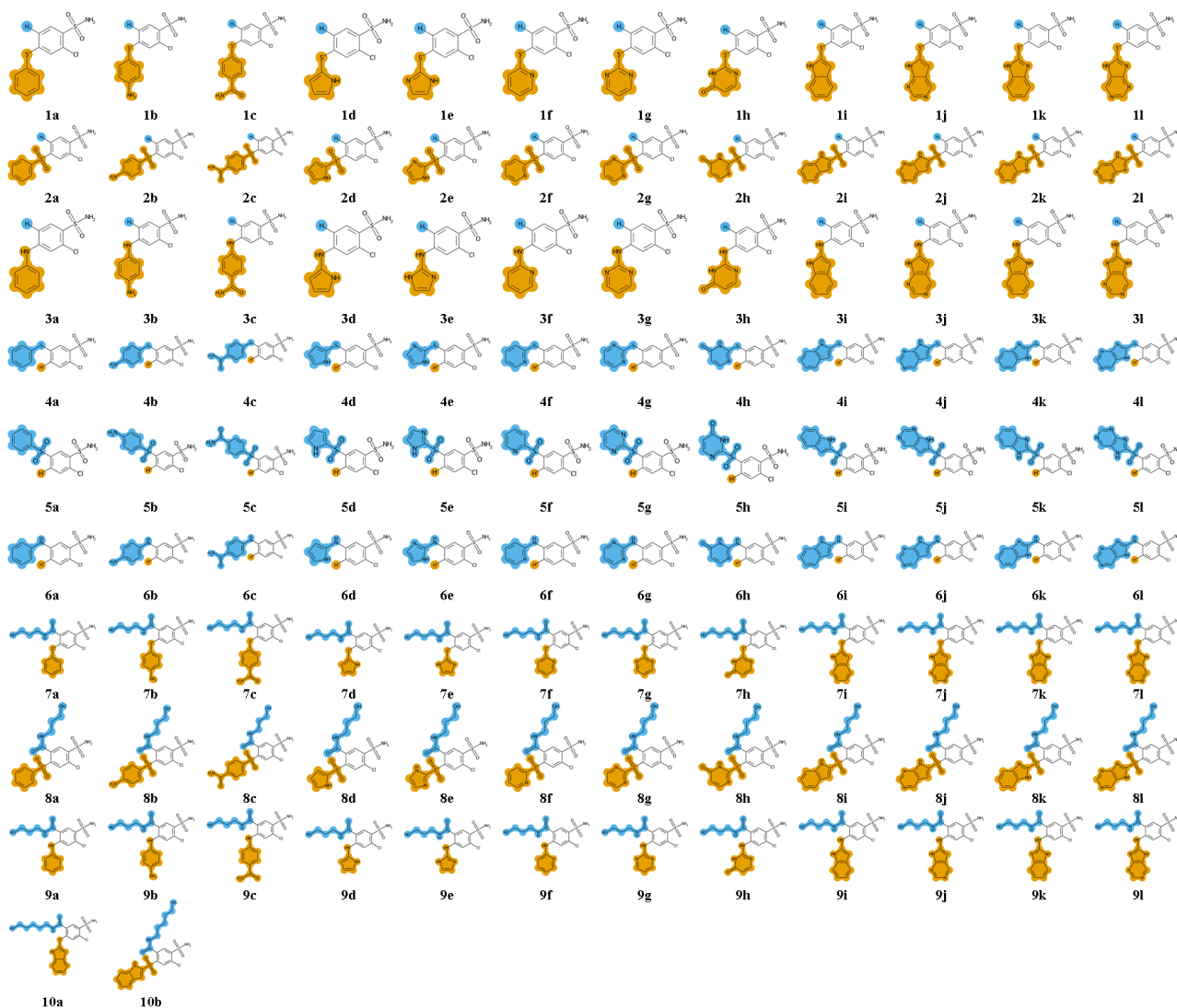


5.21 pav. E11-75 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.



5.22 pav. E88 junginio struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų diagrama.

5.2. Potencialių naujų junginių struktūrų, identifikuotų po struktūros-afiniškumo ir struktūros-selektyvumo koreliacijų analizės, molekulinio dokininimo rezultatai.



5.23 pav. Potencialių junginių cheminės struktūros tirtos molekulinio dokininimo metodu.

5.1 lentelė. Molekulinio dokininimo metu nustatytos junginių sąveikos su CA II prognozuojamos jungimosi energijos tiksliausiai junginio konformacijai. Kiekvienam junginiui buvo atlikta po 3 dokininimo pakartojimus, kurių kiekvieną sudaro 10 unikalų junginio konformacijų baltymo aktyviajame centre. Įvertinta molekulinio dokininimo programos standartinė prognozuojamų jungimosi energijų paklaida nuo eksperimentinių rezultatų (± 2.85 kcal/mol arba kitaip ± 11.92 kJ/mol), kuri yra pateikta [69] publikacijoje.

Nr.	Junginys	Jungimosi energija (± 11.92), kJ/mol	Viršutinė standartinės paklaidos riba (kJ/mol)	Apatinė standartinės paklaidos riba (kJ/mol)
Kontrolė	E2	-32.22	-44.14	-20.30
1	1a	-28.03	-39.95	-16.11
2	1b	-28.03	-39.95	-16.11
3	1c	-26.78	-38.70	-14.86
4	1d	-25.52	-37.44	-13.60

5	1e	-23.85	-35.77	-11.93
6	1f	-28.03	-39.95	-16.11
7	1g	-25.94	-37.86	-14.02
8	1h	-28.03	-39.95	-16.11
9	1i	-30.12	-42.04	-18.20
10	1j	-27.61	-39.53	-15.69
11	1k	-28.87	-40.79	-16.95
12	1l	-27.20	-39.12	-15.28
13	2a	-28.03	-39.95	-16.11
14	2b	-27.61	-39.53	-15.69
15	2c	-30.12	-42.04	-18.20
16	2d	-28.45	-40.37	-16.53
17	2e	-28.03	-39.95	-16.11
18	2f	-30.12	-42.04	-18.20
19	2g	-29.71	-41.63	-17.79
20	2h	-31.38	-43.30	-19.46
21	2i	-33.47	-45.39	-21.55
22	2j	-30.96	-42.88	-19.04
23	2k	-32.64	-44.56	-20.72
24	2l	-30.54	-42.46	-18.62
25	3a	-28.87	-40.79	-16.95
26	3b	-26.78	-38.70	-14.86
27	3c	-29.71	-41.63	-17.79
28	3d	-26.78	-38.70	-14.86
29	3e	-25.94	-37.86	-14.02
30	3f	-28.45	-40.37	-16.53
31	3g	-26.78	-38.70	-14.86
32	3h	-27.20	-39.12	-15.28
33	3i	-31.80	-43.72	-19.88
34	3j	-29.29	-41.21	-17.37
35	3k	-30.12	-42.04	-18.20
36	3l	-28.45	-40.37	-16.53
37	4a	-31.80	-43.72	-19.88
38	4b	-28.87	-40.79	-16.95
39	4c	-28.45	-40.37	-16.53
40	4d	-29.29	-41.21	-17.37
41	4e	-28.03	-39.95	-16.11
42	4f	-31.38	-43.30	-19.46
43	4g	-29.71	-41.63	-17.79
44	4h	-28.45	-40.37	-16.53
45	4i	-30.12	-42.04	-18.20
46	4j	-30.96	-42.88	-19.04
47	4k	-29.71	-41.63	-17.79
48	4l	-30.12	-42.04	-18.20

49	5a	-28.03	-39.95	-16.11
50	5b	-28.87	-40.79	-16.95
51	5c	-28.45	-40.37	-16.53
52	5d	-30.12	-42.04	-18.20
53	5e	-30.54	-42.46	-18.62
54	5f	-30.96	-42.88	-19.04
55	5g	-30.54	-42.46	-18.62
56	5h	-29.71	-41.63	-17.79
57	5i	-33.05	-44.97	-21.13
58	5j	-30.54	-42.46	-18.62
59	5k	-33.05	-44.97	-21.13
60	5l	-30.12	-42.04	-18.20
61	6a	-31.38	-43.30	-19.46
62	6b	-28.45	-40.37	-16.53
63	6c	-30.12	-42.04	-18.20
64	6d	-30.12	-42.04	-18.20
65	6e	-29.71	-41.63	-17.79
66	6f	-28.45	-40.37	-16.53
67	6g	-29.29	-41.21	-17.37
68	6h	-30.54	-42.46	-18.62
69	6i	-32.22	-44.14	-20.30
70	6j	-29.71	-41.63	-17.79
71	6k	-30.54	-42.46	-18.62
72	6l	-30.96	-42.88	-19.04
73	7a	-26.78	-38.70	-14.86
74	7b	-28.45	-40.37	-16.53
75	7c	-30.96	-42.88	-19.04
76	7d	-26.36	-38.28	-14.44
77	7e	-25.10	-37.02	-13.18
78	7f	-28.03	-39.95	-16.11
79	7g	-27.20	-39.12	-15.28
80	7h	-28.87	-40.79	-16.95
81	7i	-28.87	-40.79	-16.95
82	7j	-31.38	-43.30	-19.46
83	7k	-32.22	-44.14	-20.30
84	7l	-30.12	-42.04	-18.20
85	8a	-29.29	-41.21	-17.37
86	8b	-29.71	-41.63	-17.79
87	8c	-32.22	-44.14	-20.30
88	8d	-24.27	-36.19	-12.35
89	8e	-24.27	-36.19	-12.35
90	8f	-29.29	-41.21	-17.37
91	8g	-25.10	-37.02	-13.18
92	8h	-29.71	-41.63	-17.79

93	8i	-35.15	-47.07	-23.23
94	8j	-32.64	-44.56	-20.72
95	8k	-33.47	-45.39	-21.55
96	8l	-30.54	-42.46	-18.62
97	9a	-27.61	-39.53	-15.69
98	9b	-28.03	-39.95	-16.11
99	9c	-30.54	-42.46	-18.62
100	9d	-27.61	-39.53	-15.69
101	9e	-28.87	-40.79	-16.95
102	9f	-28.87	-40.79	-16.95
103	9g	-29.29	-41.21	-17.37
104	9h	-29.29	-41.21	-17.37
105	9i	-33.89	-45.81	-21.97
106	9j	-31.80	-43.72	-19.88
107	9k	-32.64	-44.56	-20.72
108	9l	-30.54	-42.46	-18.62
109	10a	-32.64	-44.56	-20.72
110	10b	-30.12	-42.04	-18.20