



---

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR

In silico módszerek a fragmens alapú  
gyógyszerkutatás támogatására

Tézisfüzet

Szerző: Vass Márton  
Témavezető: Keserű György Miklós



**RICHTER GEDEON**

Richter Gedeon Nyrt.  
Felfedező Kémiai Kutatólaboratórium

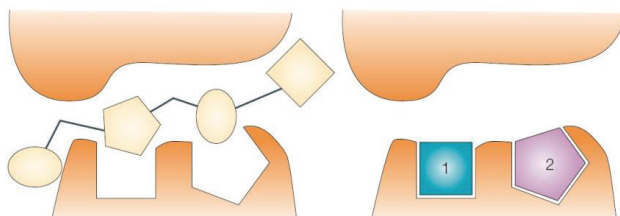
2014



# 1. Bevezetés és irodalmi háttér

A gyógyszerkutatás elsődleges célja a betegségek gyógyítása és megelőzése, egy gyógyszer kifejlesztése azonban hosszú és költséges folyamat, melyet magas kiesési arány jellemez. Nemrég szabadalmaztatott és piacra jutott vegyületek elemzése megmutatta, hogy azok fizikai-kémiai paraméterei jelentősen befolyásolják a vegyületek farmakokinetikai és farmakodinámiai profilját, mely gyakran áll a kiesés hátterében.<sup>1</sup> A vegyületek egyre magasabb molekulatömeggel és lipofilitással rendelkeznek, amit 'molekuláris elhízásnak' neveznek, és ami rosszabb orális felszívódással, mellékhatásokkal és toxicitással hozható összefüggésbe.

A fragmens alapú gyógyszerkutatás (FBDD) az utóbbi időben megjelent és elterjedt módszer, mely lehetővé teszi a vegyületek gyors optimalizálását a gyógyszerkutatásban fontos fizikai-kémiai paraméterek hatékony felügyelete mellett.<sup>2</sup> Ez a technológia a legújabb eredmények alapján képesnek mutatkozik a kiesési arány csökkentésére, és kismolekulák által korábban nehezen célba vehető gyógyszercélpontokon is sikeres gyógyszerjelölt molekulákat eredményez. A technológia magában foglalja a molekuláris fragmensek kiválasztási, szűrési és optimalizálási módszereit. A fragmensek poláris, kis molekulatömegű és alacsony komplexitású vegyületek, melyek optimális kölcsönhatások kialakítására képesek a célfehérjével, így jobb kiindulási pontként szolgálnak, mint a nagyáteresztő képességű szűrésben azonosított gyógyszerek találatok (1. ábra). Azonban a fragmensek sajátossága, hogy kisebb



**1. ábra.** Rossz minőségű HTS találat (bal) és jó minőségű fragmens találatok (jobb).<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Leeson, P.D., St-Gallay, S.A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 749.

<sup>2</sup> Rees, D.C., Congreve, M., Murray, C.W., Carr, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 660.

affinitással kötődnek a fehérjékhez, így szűrésük speciális biofizikai módszerekkel történik, és optimálásuk újszerű megközelítést igényel. A Vemurafenib, az első fragmens alapon kifejlesztett gyógyszer 2011-ben került piacra, és kifejlesztése mindössze 6 évbe telt.<sup>3</sup>

Mivel a legtöbb irodalomban leírt fragmens optimálási projekt felhasznált röntgen vagy NMR szerkezeti információt a célfehérjéről, a számítógépes gyógyszertervezési (CADD) módszerek is egyre fontosabb szerepet töltenek be a fragmens szűrés és optimálás támogatásában. *In silico* módszerek a fragmens alapú gyógyszerkutatás minden fázisában eredményesen alkalmazhatók, a fragmens könyvtárak összeállításától a találatok rangsorolásán keresztül azok szerkezet alapú optimálásig gyógyszerjelölt vegyületekké.

Számításos módszereket alkalmaznak biológiai szűrések adatelemzésére és ezek alapján fragmens könyvtár tervezési kritériumok felállítására saját vagy beszállítói vegyülettárakból. Ilyen például a gyakran alkalmazott 'hármasszabály' ( $MW < 300 \text{ Da}$ ,  $\log P < 3$ , H-kötés donor és akceptor szám  $\leq 3$ ), melyet Congreve javasolt.<sup>4</sup> Természetes vegyületek és gyógyszerek retroszintetikus és fragmens előfordulási analízise segítségével dúsíthatók a vegyülettárakban a kiemelten hatékony részszerkezetek és a gyógyszerkémikusok által jól művelhetőnek tekintett kémiai szerkezetek. A legfeljebb 17 nehéz atomot tartalmazó vegyületek teljes kémiai terének enumerációja is kibővítette a *de novo* fragmens alapú módszerek lehetőségeit.

Mivel a kísérleti szűrési módszerek áteresztő képessége korlátozott, hatékony virtuális fragmens szűrési technikák is szükségesek a biológiailag aktív vegyületek dúsítására. A molekuláris dokkolás a leggyakrabban alkalmazott virtuális fragmens szűrési módszer. Kimutatták, hogy a jelenleg rendelkezésre álló szoftverek mintavételezési módszerei megfelelőek valós fragmens kötőmódok generálására, azonban a pontozófüggvények hibája miatt a valós kötőmód kiválasztása sikertelen lehet.<sup>5</sup> E probléma kiküszöbölésére és az affinitás hatékonyabb becslésére nagyobb számítási kapacitást igénylő módszereket vizsgáltak. Ezen kívül a fehérje flexibilitása is

---

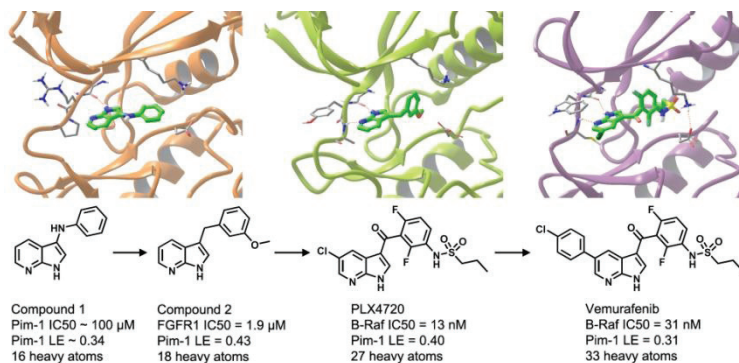
<sup>3</sup> Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 3041.

<sup>4</sup> Congreve, M., Carr, R., Murray, C., Jhoti, H. *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 876.

<sup>5</sup> Sándor, M., Kiss, R., Keserű, G.M. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 1165.

fontos szereppel bír a fragmensek kötődésében, azonban ennek hatását még nem vizsgálták virtuális fragmens szűrésben. Több sikeres szűrési kampányt leírtak az irodalomban enzim célpontokkal szemben, melyekben akár 50%-os találati arányt is elértek, valamint de Graaf<sup>6</sup> és Carlsson<sup>7</sup> legutóbb a H<sub>1</sub> és H<sub>3</sub> hisztamin valamint az A<sub>2A</sub> adozin G-fehérje kapcsolt receptorokkal (GPCR) szemben is sikeres virtuális fragmens szűrést végeztek. A GPCR-ek családjába a hét transzmembrán hélixből álló fehérjék tartoznak, melyek változatos extracelluláris ligandumokat képesek felismerni a fotonoktól és ionoktól a kis molekulákon és lipideken keresztül a peptid hormonokig és más fehérjéig. Szerkezet-meghatározásuk csak az utóbbi években vált elérhetővé, ami lehetővé tette a szerkezet alapú gyógyszertervezési módszerek alkalmazását erre a gyógyszerkutatás számára igen fontos fehérjecsaládra is, továbbá a még ismeretlen szerkezetű G-fehérje kapcsolt receptorok szekvencia hasonlóságon alapuló modellezése is lehetségessé vált.

A fragmens optimalizálást általában szerkezet alapú számítógépes támogatással végzik. Példaként a Vemurafenib optimalizálása látható a 2. ábrán. Az iteratív *de novo* fragmens alapú tervezés általános lépései a kiindulási fragmens kémiai környezetének enumerációja, majd a generált virtuális szerkezetek rangsorolása egy megfelelően



2. ábra. A Vemurafenib optimalizálása egy azaindol találatból 'növesztés' által.<sup>3</sup>

<sup>6</sup> de Graaf, C., Kooistra, A.J., Vischer, H.F. et al. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 8195.

<sup>7</sup> Chen, D., Ranganathan, A., Ijzerman, A.P., Siegal, G., Carlsson, J. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 2701.

választott célfüggvény alapján, mely tartalmazhatja az affinitás, szintetikus megvalósíthatóság, diverzitás, újszerűség, gyógyszer-szerűség, és ADMET jellemzők predikciós modelljeit. A két fő fragmens optimalizációs stratégia, a növesztés (egy találat tovább építése funkciók csoportonként) és az összekapcsolás (több egymáshoz közel kötődő fragmens esetén) közül az utóbbi nagyobb szintetikus kihívást jelent, így ennek támogatására a modellezési módszerek különösen szükségesek. Egyszerű, a farmakokinetikai jellemzőkre prediktív ún. ligand hatékonysági és lipofil hatékonysági mérőszámok használata is elterjedt, melyek segítségével hatékonyan felügyelhetők a korábban említett paraméterek az optimalizálás során. Az LE (a nehéz atomok hozzájárulása a kötődési szabadentalpiához), az LLE (az affinitás és logP közötti elválás mértéke) és a LELP (a logP és az LE hányadosa) a leggyakrabban használt ilyen mérőszámok.<sup>8</sup>

A Richter Gedeon Nyrt. Felfedező Kémiai Kutatólaboratóriumában végzett munkám során vizsgáltam az elérhető számítástechnikai módszereket, illetve újabb módszereket fejlesztettem ki a fragmens alapú gyógyszerkutatás támogatására. Munkámat a GPCR-ek fragmens találat azonosítási és optimalizációs lehetőségeire fókuszáltam.

Munkám első részében célom a GPCR célpontokkal szemben történő virtuális fragmens szűrési módszerek értékelése volt. Ez a munka módszerfejlesztéssel kezdődött kismolekulás adatkészlet felhasználásával, az eredményeket pedig fragmens szűrésben használtam fel. Mivel a GPCR családból egyelőre kevés célpont szerkezete ismert, mind kristályszerkezetek, mind homológia modellek alkalmazhatóságát vizsgáltam virtuális fragmens szűrésben. A fehérje konformációs flexibilitásának figyelembe vételének hatását is elemeztem mindkét kiindulási információ típus esetén, és összehasonlítottam az egy szerkezetet felhasználó virtuális szűrési módszerekkel. A módszerfejlesztést retrospektív adatkészleten végeztem, az eredményt azonban prospektív fragmens szűrésben használtam fel és a megerősített fragmens találatok egy későbbi optimalizációs projekt kiindulási pontjai lehetnek.

Munkám második részében összekapcsolásra alkalmas fragmens találatok számítógépes azonosítására alkalmas módszereket vizsgál-

---

<sup>8</sup> Hopkins, A.L., Keserű, G.M., Leeson, P.D., Rees, D.C., Reynolds, C.H. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, 13, 105.

tam. Ezért az elsődleges (ún. 'forró pont') kötőhelyre történő dokkoláson felül vizsgáltam egy egyszerű szekvenciális dokkolási protokoll hatékonyságát fehérjék másodlagos kötőhelyein kötött fragmensek modellezésében is. Ez a munka is módszerfejlesztéssel kezdődött kismolekulás adatkészleten, majd miután az eredmények biztatóak voltak, fragmens adatkészleten is vizsgáltam a módszer hatékonyságát. A munka során egy másik érdekes alkalmazási lehetőség, a citokróm P450 metabolikus enzim aktivátorok előrejelzésének lehetősége is felmerült. A másodlagos kötőhelyre történő dokkolást tovább vizsgálva alkalmaztam a protokollt a  $D_3$  dopamin receptor elsődleges és másodlagos kötőhelyére illeszkedő, összekapcsolásra alkalmas fragmensek azonosítására, valamint szerkezeti alapon magyaráztam az összekapcsolt szintetizált vegyületek szelektivitását a  $D_2$  dopamin receptorral szemben.

## 2. Módszerek

A munka első részében a Schrödinger modellezési programcsomag Prime moduljának használatával elkészültek a  $H_4$  hisztamin és az  $5HT_6$  szerotonin receptorok homológia modelljei a Protein Data Bank adatbázisból nyert alkalmas szerkezeti minták alapján. A  $D_3$  dopamin és  $CXCR_4$  kemokin receptorok röntgen szerkezeteit és irodalmi homológia modelljeit a Schrödinger csomag Protein Preparation Wizard alkalmazásával készítettem elő a dokkolásra, a kötőhely paramétereit a SiteMap alkalmazással számítottam. Ezek a szerkezetek szolgáltak kiindulásként minden atomot figyelembe vevő, membránba ágyazott, megkötések nélküli molekuladinamikai szimulációhoz a NAMD szoftver felhasználásával és a trajektóriákat az AmberTools csomag alkalmazásaival elemeztük és klasztereztük. A kiindulási és a szimuláció reprezentatív szerkezeteit retrospektív dokkolás alapú virtuális szűrésben értékeltem a GDD (GPCR csali molekula adatbázis) készlet felhasználásával egy szerkezeten alapuló és konszenzus pontozási kiértékelést is alkalmazva. A dokkolást a Schrödinger csomag Glide moduljával végeztem. A Richter Gedeon vegyülettárából általánosan használt kritériumok alapján fragmens könyvtárat választottam ki ChemAxon eszközök segítségével. Ezeket a vegyületeket prospektív virtuális fragmens szűrésben alkalmaztam

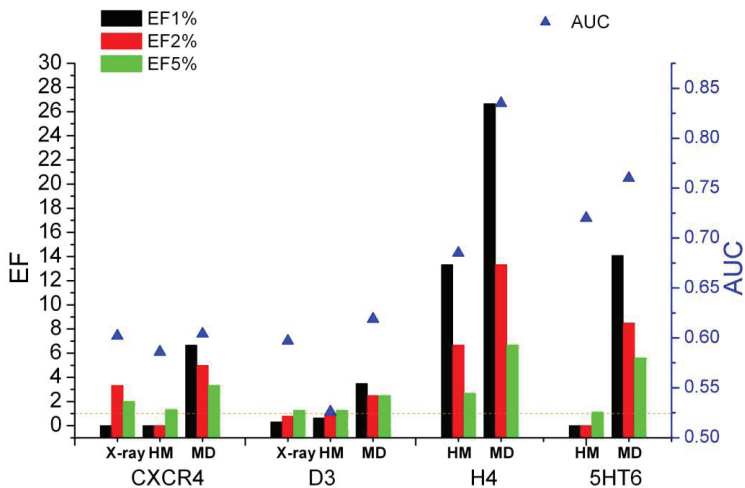
a D<sub>3</sub> dopamin és H<sub>4</sub> hisztamin receptorok korábbi szerkezeteivel szemben egyszerű és konszenzus pontozást is alkalmazva. A virtuális találatokat radioligand kötődési tesztben vizsgáltuk és az eredményeket a megerősített találati arány, ligand hatékonysági indexek, újszerűség és a kötőmód robusztussága alapján jellemeztem.

A munka második részében két vagy több ligandot tartalmazó fehérje komplexeket gyűjtöttem ki a Protein Data Bank adatbázisból egy saját szkript felhasználásával, továbbá fehérje - összekapcsolt fragmens szerkezeteket gyűjtöttem az irodalomból. A szerkezeteket a Schrödinger csomag Protein Preparation Wizard alkalmazásával készítettem elő. Egy egyszerű szekvenciális dokkolási protokollt dolgoztam ki a Glide modul és a Schrödinger csomaghoz írt Python API használatával. Ezzel a protokollal végeztem el először több gyógyszereszerű majd több fragmenszerű ligandum dokkolását a megfelelő fehérje szerkezetekbe, az eredményeket pedig a sikeres dokkolások arányával, a saját szerkezetbe történő és keresztdokkolás ligand atomi pozíciók RMSD-jével és a dokkolt kötőmódok vizuális elemzésével adtam meg. Végül a protokollt két, a Richter Gedeon vegyülettárból összeállított, fókuszált virtuális fragmens könyvtár dokkolására használtam a D<sub>3</sub> dopamin receptor kötőhelyére, valamint a D<sub>2</sub> dopamin receptor Prime modulall megalkotott homológia modelljébe. A legjobb pontszámot kapott fragmenseket virtuálisan összekapcsoltam és a kapcsolt molekulák szintézise után azokat radioligand kötődési tesztben vizsgáltuk. Ezek kötődési kölcsönhatásait és szelektivitását szerkezeti alapon magyaráztam.

## 3. Eredmények

### 3.1 Ortosztérikus ligandumok virtuális szűrése

A különböző receptor szerkezetek hatékonyságát a GDD készleten végzett retrospektív dúsulási tesztekben a dúsulási faktorokkal (EF), a hatásfokmérő karakterisztika (ROC) görbékkel és az ROC görbék alatti területtel (AUC) adtam meg mind a négy G-fehérje kapcsolt receptor röntgen szerkezeteire, homológia modelljeire és kb. 30-30 szisztematikusan illetve klaszterezéssel kiválasztott, az MD trajektóriát reprezentáló receptor szerkezeteire.



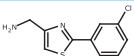
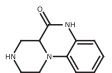
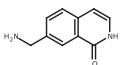
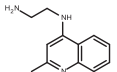
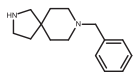
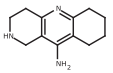
**3. ábra.** Dúsulási faktorok (színes oszlopok) és AUC értékek (kék háromszögek) a CXCR<sub>4</sub>, D<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, és 5HT<sub>6</sub> röntgen szerkezetekre (X-ray), homológia modellekre (HM) és a legjobb molekuladinamikai szerkezetekre (MD).

Ahogy a 3. ábrán látható, az MD legjobb szerkezetei minden esetben felülmúlták a kiindulási modelleket, függetlenül a célponttól és az alkalmazott kiértékelési módszertől (EF vagy AUC). A kiindulási szerkezetek közül a H<sub>4</sub> homológia modell volt az egyetlen, amely képes volt elválasztani az aktív és a csali molekulákat 13.3 dúsulási faktoral a rangsorolt ligand készlet 1%-ánál. A megfigyelések alapján az MD szimuláció során egy 'konszenzus kötőhely' alakul ki, mely nem őrzi meg teljesen az eredeti ligandummal kialakított kölcsönhatásokat, de képes különböző kemotípusokba tartozó aktív molekulák felismerésére és megfelelő pontozására. A dúsulási tesztek robusztusságának kiértékelésére az eredeti ligand készlet véletlenszerű felosztásával (harmadrésze osztás 10 alkalommal) végzett kétmintás t-próba szolgált a különböző forrásból származó szerkezetek között. A D<sub>3</sub> receptor esetén mind a homológia modell, mind a röntgen szerkezet és a legjobb MD szerkezet közötti különbség szignifikáns volt, a H<sub>4</sub>, CXCR<sub>4</sub> és 5HT<sub>6</sub> esetekre pedig a homológia modell és az MD szerkezet közötti különbség volt szignifikáns. A célpont osztályok relatív dúsulásai hasonlóak voltak az irodalomban mások által találtakhoz. Az MD szimulációból származó

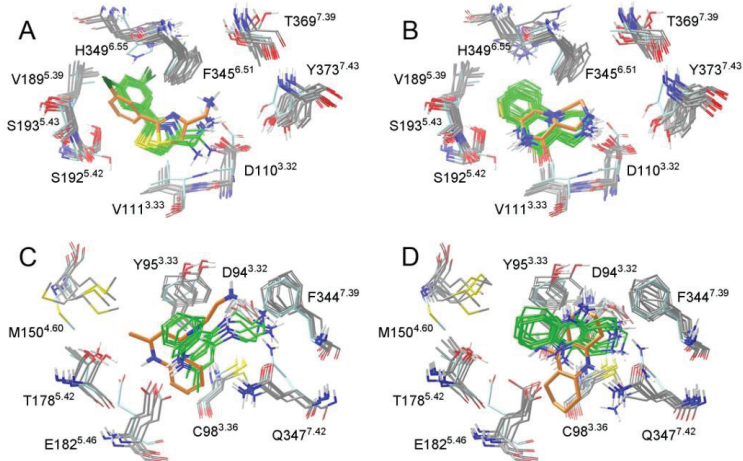
összes szerkezetre kiszámított SiteMap kötőhely paraméterek és a kapott dúsulási faktorok között nem találtam erős korrelációt. Ezen kívül a szisztematikus kiválasztással és klaszterezéssel kapott MD reprezentatív szerkezetek hatékonysága között nem volt számottevő különbség, és a legfeljebb 6 szerkezetet az összes lehetséges kombinációban alkalmazó sokaság alapú kiértékelés sem javította szignifikánsan az eredményeket.

Ezután a D<sub>3</sub> dopamin és H<sub>4</sub> hisztamin receptorok szerkezeteivel szemben prospektív virtuális szűrést végeztem a Richter Gedeon fragmens könyvtárral. Az egyedi kiindulási szerkezetek esetén a legjobb GlideScore pontszámot kapott 50 fragmenst választottam ki biológiai szűrésre. A sokaság alapú dokkolás esetén különböző adatösszesítési eljárásokat vizsgáltam. Megmutattam, hogy a rang átlag alapú és a konszenzus pontozási módszerek által legjobb helyre rangsorolt fragmens készletek között nagy az átfedés, és ezek alkalmazásával is kb. 50 fragmenst választottam ki biológiai szűrésre. A D<sub>3</sub> esetén 25 virtuális találat mutatott 20% feletti inhibíciót 10 µM-ban, ami 27% kombinált találati aránynak felel meg. Ezek közül 9 származott a kristályszerkezetbe való dokkolásból (18% találati arány) míg 18 a szerkezeti sokaságba történőből (32% találati arány),

**1. táblázat.** Néhány kiválasztott D<sub>3</sub> és H<sub>4</sub> fragmens találat kísérletileg meghatározott kötődési affinitása, valamint LE és LELP értéke. A találatok eredetét + jel jelöli.

lig.	szerkezet	célpont	K <sub>i</sub> / µM	LE	LELP	XRD/HM	MD
1		D <sub>3</sub>	0.17	0.66	3.7		+
2		D <sub>3</sub>	0.50	0.57	1.2	+	+
4		D <sub>3</sub>	1.1	0.63	0.7		+
10		H <sub>4</sub>	12.6	0.45	2.1	+	
15		H <sub>4</sub>	32.9	0.36	5.4	+	+
18		H <sub>4</sub>	75.1	0.37	2.3		+

mindössze 2 átfedő elemmel. A **2** és **4** fragmensek voltak a legkiemelkedőbbek ligandum hatékonyság ( $LE = -RT \ln(K_i)/HA$ , 0.3 feletti érték megfelelő) és lipofil hatékonyság ( $LELP = \text{clog}P/LE$ , 10 alatti érték megfelelő) szempontjából. A ChEMBL biológiai adatbázisban végzett hasonlósági keresés során ezek újszerű dopamin receptor kemotípusoknak adódtak. Az összesített adatok az 1. táblázatban láthatók. A  $H_4$  esetén valamivel kevesebb, 15 virtuális találat mutatott 20% feletti inhibíciót 10  $\mu\text{M}$ -ban, ami 18% kombinált találati aránynak felel meg. Ezek közül 11 a homológia modellbe (22% találati arány), míg 8 a sokaságba történő dokkolásból (16% találati arány) származott 4 átfedő elemmel. Az alacsonyabb találati arány és kötődési affinitás értékek a két receptor eltérő gyógyszerkémiaili megcélozhatóságát mutatja. A **10** és **18** fragmensek jó LE és LELP értékekkel rendelkeztek, **15** és **18** pedig újszerű hisztamin receptor kemotípusoknak adódtak. A röntgen szerkezet és a homológia modell is alkalmasnak bizonyult virtuális szűrésre, és e konkrét rendszerek esetében az utóbbi teljesített jobban. A munkának ebben a részében a sokaság alapú dokkolás nem mutatott nagyobb hatékonyságot, a módszerek kiegészítették egymást. A prediktált kötőmódok a 4. ábrán láthatóak. A  $D_3$  receptor esetén azt

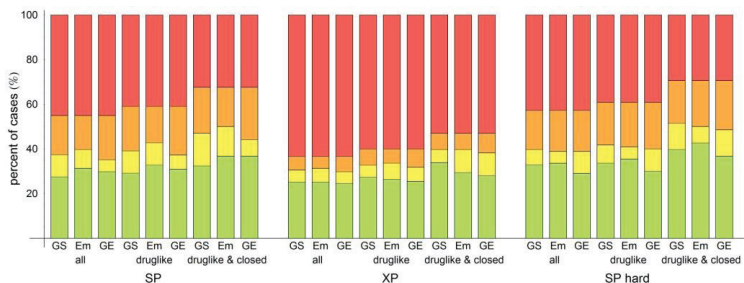


**4. ábra.** Néhány kiválasztott fragmens találat kötődési kölcsönhatásai. A) **1** és B) **2** a  $D_3$  receptor kötőhelyén; C) **10** és D) **18** a  $H_4$  receptor kötőhelyén. Egy szerkezetbe történő dokkolás eredményei: narancs, sokaságba történő dokkolás eredményei: zöld.

találtam, hogy az aktív fragmensek dokkolása az MD szimuláció több reprezentatív receptor konformációjába valamint a röntgen szerkezetbe is hasonló kötőmódokat eredményezett. A  $H_4$  receptor esetében a homológia modellbe valamint a konformációs sokaságba történő dokkolás eredményei nagyobb változatosságot mutattak, ami összefüggésbe hozható a fragmens találatok alacsonyabb kötődési affinitásával és ligandum hatékonyságával.

### 3.2 Másodlagos kötőhely virtuális szűrés

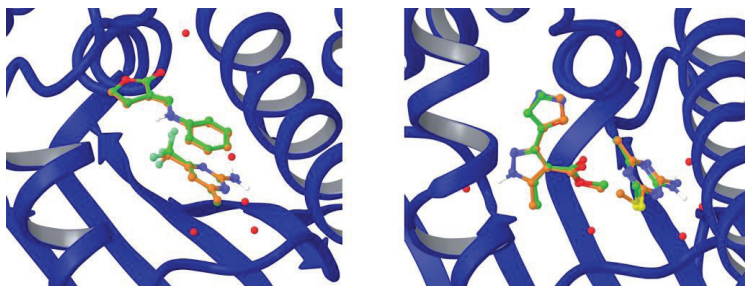
A munka következő részében egy szekvenciális dokkolási protokoll hatékonyságát elemeztem két vagy több kooperatívan kötött ligandum modellezése végett a Protein Data Bank adatbázisból kigyűjtött 129 fehérje komplex esetében. A legjobb dokkolt kötőmódok kissé magasabb átlagos RMSD értékeket mutattak az egy ligandum dokkoláshoz képest, ami nem meglepő, figyelembe véve a kötőhely és a ligandumok mérete közti különbséget. A sikeres dokkolások aránya az első dokkolási lépésben 78% volt (azaz előállt a kísérletileg meghatározott kötőmódhoz képest 2.0 Å-nél kisebb RMSD-jú dokkolt kötőmód) továbbá ha az első dokkolási lépés sikeres volt, akkor a második lépésben a sikeres dokkolások aránya 70% volt. Ha az első dokkolási lépés sikertelen volt, úgy a második is sikertelen volt az esetek 86%-ában. A sikeres dokkolási lépések számának várható értéke 1.37, azaz kettőnél több ligandum dokkolása általában sikertelen volt. Két ligandum dokkolása az esetek 55%-ában volt sikeres. Különböző pontozófüggvények használatának és a ligandum valamint a kötőhely paramétereinek hatását is vizsgáltam. A GlideScore (GS), Emodel (Em) és Glide Energy (GE) pontozófüggvényeket normál (SP) és extra (XP) pontosságú dokkolásban, valamint egy 'kemény' SP (az apoláris ligand atomokon van der Waals sugár skálázás nélküli) protokollal vizsgáltam. A gyógyszeryszerűséget a Lipinski kritériumok ( $MW < 500$  Da,  $\log P < 5$ , H-kötés donor és akceptor szám  $\leq 5$ ) alapján vettem figyelembe. A kötőhely zártságát a SiteMap *enclosure* paraméterének számításával becsültem, mely 0.78 feletti értékénél tekintettem az adott kötőhelyet zártnak. Két ligandum sikeres dokkolásának arányait mutatja az 5. ábra a különböző beállítások és paraméterek esetén.



**5. ábra.** Két ligandum szekvenciális dokkolásának kumulatív sikerességi arányai a különböző módszerek és az adatkészlet részhalmazai esetén. Az első póz sikerességi aránya: zöld, első 3 póz: sárga, összes póz: narancs, sikertelen esetek: piros.

Az extra pontosságú módszer rosszabbul teljesített, mint az SP, a 'kemény' SP pedig csak kismértékű javulást eredményezett. A gyógyszeryszerű vegyületekre korlátozva a kiértékelést szintén kismértékű javulást tapasztaltam, ha pedig ezen kívül csak a zárt kötőhelyeket vizsgáltam, a sikeres dokkolások aránya 68%-ra emelkedett.

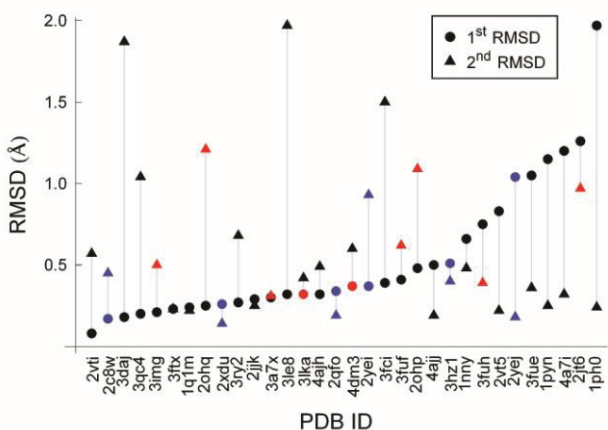
Két gyógyszerkémiailag érdekes szerkezetcsaládot vizsgáltam részletesebben: a gyógyszervegyületek lebontásáért felelős és a gyógyszerkölcsonhatások háttérében álló citokróm P450 enzimek, valamint a 90-alfa hő sokkfehérje (HSP90) szerkezeit, melyet potenciális rákellenes célpontként vizsgálnak. Az előző családot 9, az utóbbit 5 fragmensekkel kristályosított szerkezet képviselte az adatkészletben. A citokróm P450 készleten az SP és 'kemény' SP módszerek az Emodel pontozófüggvénnyel, egy kivételével az összes ligandumra szolgáltatott megfelelő kötőmotot.



**6. ábra.** Reprezentatív ligandum kötőmotdok a HSP90 komplexeiben (bal: 2qfo, jobb: 2yej). Dokkolt ligandum kötőmotdok: narancs, kísérletileg meghatározott kötőmotdok: zöld, vízmolekulák: piros gömbök.

A HSP90 készletben minden fragmensszerű ligandumot 1 Å alatti vagy ahhoz közeli RMSD-vel sikerült dokkolni, de csak ha a konzervált vízmolekulákat is figyelembe vettem a dokkolásnál. Az irodalomból is ismert, hogy ezek fontos szerepet töltenek be a fehérje-ligand kölcsönhatások közvetítésében. Néhány kötőmód a 6. ábrán látható.

A HSP90 készlet eredményi által ösztönözve egy fragmens adat-készletet is összeállítottam: 32 kooperatívan kötött vagy szintetikusán összekapcsolt fragmenst tartalmazó példát gyűjtöttem az irodalomból és alkalmaztam a szekvenciális dokkolási protokollt. A saját szerkezetbe történő dokkolás eredményei a 7. ábrán láthatók.

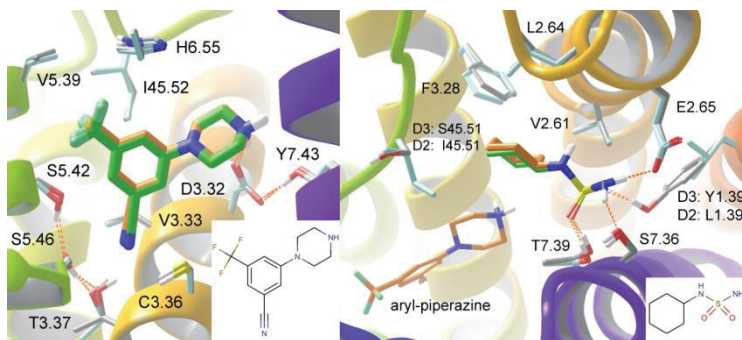


**7. ábra.** Két fragmens szekvenciális dokkolásának eredményei. A pontozási hibákat (Emodel pontozófüggvénnyel kapott rangszám > 1) piros jelölők, a konzervált vízmolekulák jelenlétében végzett dokkolásokat kék jelölők mutatják.

Amint látható, a Glide SP alapbeállítás szerinti mintavételezése megfelelő volt minden ligandum esetén: előálltak 2.0 Å alatti RMSD-vel rendelkező pózok. Ezen túlmenően a 64 esetből 49-ben (77%) 1.0 Å alatti RMSD-vel, míg 39 esetben (59%) 0.5 Å alatti RMSD-vel rendelkezett a dokkolt kötőmód. A kiemelkedő pontosság különösen fontos a virtuális fragmens összekapcsolás lehetősége szempontjából. Az első dokkolási lépésben csak 2 fragmens pontozása volt sikertelen (6%), míg a második lépésben 7 esetben találtam pontozási hibát (22%). A sikeres dokkolások ezen alacsonyabb aránya a másodlagos kötőhelyek kisebb specifitására vezethető vissza,

ellentétben az elsődleges 'forró pont' kötőhelyekkel. A módszert javasoltam a röntgenkristallográfiai szerkezetmegoldás segítésére abban az esetben, amikor ún. kottélokban végzik a fragmens szűrést. Keresztdokkolást 7 fehérje esetén végezhettem. Az első fragmensek dokkolási hatékonysága csak kismértékben mutatott gyengébb eredményt a saját szerkezetbe való dokkolással szemben, a második lépésben nagyobb hibát észleltem: a dokkolások 75%-a volt sikeres és az esetek 46%-ában 1.0 Å alatti RMSD-jű volt a dokkolt kötőmód.

Végül a szekvenciális dokkolási protokollt összekapcsolásra alkalmas fragmensek azonosítására használtam a D<sub>3</sub> receptor kötőhelyén és D<sub>2</sub> homológia modellt is felhasználtam, mivel szelektív D<sub>3</sub> antagonisták és parciális agonisták hatékonyak lehetnek skizofréria, depresszió és bipoláris mánia kezelésében. A bázikus fragmenseket tartalmazó könyvtár dokkolása az irodalomban leírtakhoz hasonló kötőmódokat eredményezett (lásd 8. ábra), melyek azonosak voltak a D<sub>3</sub> és D<sub>2</sub> receptorok esetén, összhangban az elsődleges kötőhely konzerváltságával. A másodlagos kötőhelyre dokkolt fragmensek közül egy ciklohexilaminoszulfonamid fragmens különösen robusztus kötőmódot mutatott, valamint a Tyr1.39 aminosavval olyan H-kötést alakított ki a D<sub>3</sub> kristályszerkezetben, amely nem jöhetett létre a D<sub>2</sub> szerkezetben, mivel ott ennek egy leucin felel meg (8. ábra). Három összekapcsolt molekula előállítására került sor, és az ezt a fragment tartalmazó vegyület valóban magas affinitással és a legnagyobb, 55-szörös szelektivitással rendelkezett a D<sub>3</sub> receptor javára.



**8. ábra.** Az elsődleges (bal) és a másodlagos (jobb) kötőhelyre dokkolt fragmensek kötőmódjai. A D<sub>3</sub> és D<sub>2</sub> kötőhelyek szürke és világoskék színnel egymásra illesztve, a ligandumok dokkolt kötőmódjai a két kötőhelyen narancs és zöld színnel.

## 4. Tézisek

1) Megmutattam, hogy ff99SB+GAFF erőterrel végzett, minden atomot figyelembe vevő, POPC membránba ágyazott, megkötések nélküli, ns időskálájú molekuladinamikai szimulációs trajektóriákból szisztematikus mintavételezéssel vagy klaszterezéssel választott egyedi szerkezetek jobban teljesítenek a kiindulási röntgen vagy homológia modell szerkezeteknél G-fehérje kapcsolt receptorokkal (GPCR) szemben végzett virtuális szűrésekben, és hogy a konszenzus kiértékelés nem javítja tovább a virtuális szűrés hatékonyságát [T1].

2) Megmutattam, hogy GPCR kristályszerkezetek, homológia modellek és molekula-dinamikai szimulációból kapott szerkezeti sokaságok használhatók prospektív virtuális fragmens szűrésben. Azonosítottam GPCR-eken ható újszerű, jó fiziko-kémiai paraméterekkel és ligandum hatékonysággal rendelkező, gyógyszerkémiail kiinduló pontként szolgáló fragmens vegyületeket virtuális fragmens szűrés alkalmazásával [T2].

3) Kidolgoztam és validáltam egy új, szekvenciális dokkolási eljárást összekapcsolásra alkalmas fragmensek azonosítására egy 129 kristályszerkezetből álló kismolekulás adatkészlet felhasználásával, melyen a legjobb protokollal a szerkezetek 68%-át sikeresen reprodukáltam, és még jobb hatékonyságot értem el a farmakológiai relevanciával bíró citokróm P450 szerkezeteken és a HSP90 fehérje fragmensekkel alkotott komplexein [T3].

4) A kidolgozott szekvenciális dokkolási eljárás kiemelkedő hatékonyságot mutatott fragmensekre, egy 32 kooperatívan kötött illetve kapcsolt fragmens - fehérje komplex kristályszerkezetből álló adatkészleten. Megmutattam, hogy a mintavételezés két fragmens dokkolása esetén is megfelelő, de a pontozás javítása szükséges a kevésbé specifikus másodlagos kötőhelyekre való dokkolás javítása végett, ami összhangban van a 'forró pont' elmélettel [T4].

5) Bemutattam a szekvenciális dokkolási eljárás alkalmazását prospektív esetben is egy GPCR, a D<sub>3</sub> dopamin receptor kötőhelyén kötődő, összekapcsolásra alkalmas fragmensek azonosításával. A három előállított összekapcsolt vegyület magas affinitással rendelkezett a D<sub>3</sub> receptoron, és a D<sub>2</sub> dopamin receptorral szembeni szelektivitásukat is megmagyaráztam szerkezeti alapon [T5].

## 5. Alkalmazási lehetőségek

A GPCR-eken történő virtuális fragmens szűrést az irodalomban még csak néhányan vizsgálták. Jelen munkában különböző módszereket vizsgáltam prospektív virtuális fragmens szűrésben és a bemutatott eredményeket a tudományos közösség más tagjai is felhasználhatják virtuális szűrési projektek tervezésénél. Megmutattam, hogy nem csak kristályszerkezetek, hanem megfelelő minőségű GPCR homológia modellek is eredményesen használhatók virtuális fragmens szűrésben, ami jelenleg különösen fontos, hiszen a GPCR család szerkezeti lefedettsége egyelőre alacsony. A munka során azonosított  $D_3$  dopamin és  $H_4$  hisztamin receptorokon ható fragmensek kedvező fiziko-kémiai tulajdonságokkal bírnak, így megfelelő kiindulási pontokként szolgálhatnak gyógyszerkémiai optimaláláshoz.

A több ligandum dokkolás egy érdekes terület, hiszen a jelenleg elérhető dokkoló szoftverek csak egy molekula konformációs keresésére képesek. Néhányan próbálkoztak több ligandum szimultán konformációs keresésének megoldásával, azonban megmutattam, hogy egy egyszerű szekvenciális dokkolási protokoll is megfelelő eredményeket szolgáltat a létező programokba való beavatkozás nélkül. A protokoll kifejezetten jó eredményeket adott többszörös fragmens dokkolás esetén, mivel úgy tűnik, a kooperatív fragmens kötődésnek természetes sorrendje van: először a 'forró pontokra' majd további kötőhelyekre. Ezek az eredmények ösztönözhetik a virtuális másodlagos kötőhely szűrési módszerek használatát. Első példaként az eljárást szelektív  $D_3$  ligandum tervezésére használtam fragmens összekapcsolás által, azonban a módszer más célpontokon is alkalmazható lesz.

## 6. Közlemények

### 6.1 Folyóirat cikkek

T1. Tarcsay, Á., Paragi, G., Vass, M., Jójárt, B., Bogár, F., Keserű, G.M. The impact of molecular dynamics sampling on the performance of virtual screening against GPCRs. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 2990-2999. (IF: 4.304)

T2. Vass, M., Schmidt, É., Horti, F., Keserű, G.M. Virtual fragment screening on GPCRs: a case study on dopamine D<sub>3</sub> and histamine H<sub>4</sub> receptors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 77, 38-46. (IF: 3.499)

T3. Vass, M., Tarcsay, Á., Keserű, G.M. Multiple ligand docking by Glide: implications for virtual second-site screening. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, 26, 821-834. (IF: 3.172)

T4. Vass, M., Keserű, G.M. Fragments to link. A multiple docking strategy for second site binders. *MedChemComm* **2013**, 4, 510-514. (IF: 2.722)

T5. Vass, M., Ágai-Csongor, É., Horti, F., Keserű, G.M. Multiple fragment docking and linking in primary and secondary pockets of dopamine receptors. *ACS Med. Chem. Lett.* Submitted. (IF: 3.311)

### 6.2 Könyvfejezet

1. Keserű, G.M., Makara, G., Vass, M. Fragment-based methods in drug design. in *In Silico Drug Discovery and Design: Theory, Methods, Challenges and Applications*, ed. C. Cavasotto. Taylor & Francis Group, LLC. Accepted.

### 6.3 Előadások

1. Vass, M., Tarcsay, Á., Keserű, G.M. Ligandumok kooperatív kötődésének *in silico* modellezése. Kémiai előadói napok **2010**, Szeged.

2. Vass, M., Tarcsay, Á., Keserű, G.M. Cooperative docking with Glide. Magyar Schrödinger Felhasználói Találkozó **2011**, Budapest.

3. Vass, M., Tarcsay, Á., Keserű, G.M. A Citokróm P450 heteroaktiváció *in silico* vizsgálata. Farmakoinetika és Gyógyszermetabolizmus Szimpózium **2012**, Galyatető.

4. Vass, M., Keserű, G.M. Multiple docking in support of the fragment linking strategy. Magyar Schrödinger Felhasználói Találkozó **2012**, Budapest.

5. Vass, M., Bogár, F., Jójárt, B., Keserű, G.M., Paragi, G., Tarcsay, Á. Molekuladinamikai szimulációval előállított fehérje konformációk alkalmazása G-fehérje kapcsolt receptorokon végzett virtuális szűrésekben. KeMoMo-QSAR szimpózium **2013**, Szeged.

6. Vass, M., Keserű, G.M., Schmidt, É., Horti, F. Virtuális fragmens szűrés technikák aminerg G-fehérje kapcsolt receptorokon. KeMoMo-QSAR szimpózium **2014**, Szeged.

### 6.4 Poszter

1. Vass, M., Keserű, G.M. Multiple fragment docking supporting the linking strategy. Fragments **2013**, STFC Rutherford Appleton Laboratory, Oxfordshire, UK.



