



# Modelowanie molekularne jako etap poszukiwania nowych substancji o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym

## Molecular modeling as a stage of searching for new substances with potential therapeutic significance

Magdalena Pisula , Ewelina Drózd , Elżbieta Chelmecka 

Zakład Statystyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

### STRESZCZENIE

Praca stanowi przegląd literatury dotyczącej modelowania molekularnego, ze szczególnym uwzględnieniem użycia nowoczesnych metod *in silico* we wczesnych etapach projektowania nowych substancji leczniczych. Jej celem jest omówienie znaczenia oraz uzasadnienie słuszności zastosowania oprogramowania komputerowego w procesie tworzenia nowych leków. Przedstawiono etapy, przez które przechodzi związek, aby mógł być uznany za dobrego kandydata na lek, oraz omówiono kolejne fazy postępowania podczas poszukiwania substancji metodami modelowania molekularnego. Wykazano, że modelowanie molekularne może być narzędziem przydatnym w procesie projektowania substancji leczniczych; jest to również istotny czynnik redukujący koszty oraz skracający czas poświęcony na badania nad nowym lekiem. W związku ze znaczną efektywnością metod komputerowych powinno się prowadzić prace w zakresie ich dalszego rozwoju.

### SŁOWA KLUCZOWE

projektowanie leków, modelowanie molekularne, *in silico*

### ABSTRACT

The paper is a review of the literature on molecular modeling, with particular emphasis on the use of modern *in silico* methods in the early stages of designing new medical substances. Its purpose is to discuss the significance and justification of using computer software in the process of creating new drugs. Therefore, the stages through which a compound must pass so that it can be considered as a good drug candidate were presented, and the subsequent stages in the process of searching for substances using molecular modeling methods were discussed. It has been demonstrated that molecular modeling can be a useful tool in the process of designing medicinal substances, as well as an important factor reducing the costs and shortening the time spent researching a new drug. Due to the considerable effectiveness of computer methods, work should be carried out in their further development.

### KEY WORDS

drug design, molecular modeling, *in silico*

Received: 10.07.2018

Revised: 02.08.2018

Accepted: 12.11.2019

Published online: 25.06.2020

Adres do korespondencji: Dr hab. n. farm. Elżbieta Chelmecka, Zakład Statystyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec, tel. +48 32 364 13 81, e-mail: echelmecka@sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

www.annales.sum.edu.pl



## WSTĘP

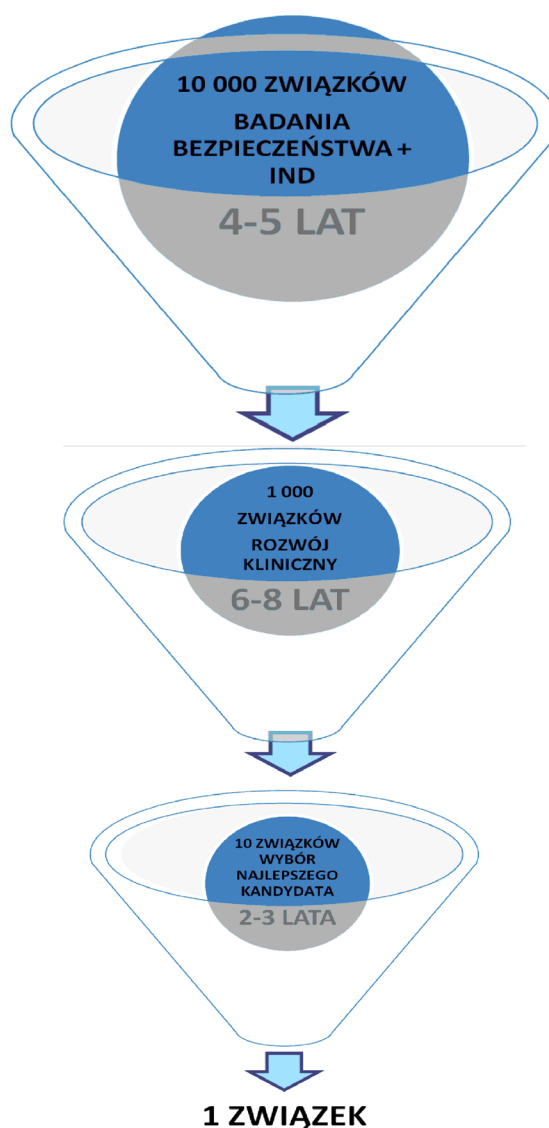
Wraz z upływem czasu poszukiwanie nowych związków o charakterze leczniczym stanowi coraz większą trudność. Jest to związane z rosnącymi kosztami badań, oczekiwaniami finansowymi wykwalifikowanej kadry pracowniczej oraz zaostrzeniami w procedurach eksperymentalnych. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że znaczna ilość zasobów naturalnych oraz istniejących związków syntetycznych została już wykorzystana [1]. W tej sytuacji pomocne są nowoczesne metody obliczeniowe, które umożliwiają przeprowadzenie dużej części początkowych badań w formie *in silico*. Zbiór tych metod można określić pojęciem modelowania.

Modelowanie molekularne to metoda, która pozwala na projektowanie układów cząsteczek *in silico* za pomocą komputera [2,3,4]. Bazuje na podstawach mechaniki kwantowej, chemii kwantowej i mechaniki klasycznej, a także na obliczeniach, dzięki którym możliwe jest modelowanie oraz symulacja oddziaływań molekuł w określonych warunkach. Tworzenie i badanie układów odbywa się na poziomie atomu, co pozwala na dokładne odtworzenie struktury i oddziaływań cząsteczek rzeczywistych, ponieważ generowane są konformacja oraz dynamika molekuł. Układy modelowe cząsteczek nie są traktowane tylko teoretycznie, gdyż podczas projektowania wprowadza się szereg wartości pochodzących z badań doświadczalnych lub obliczeń na poziomie chemii kwantowej.

Projektowanie molekularne znalazło szerokie zastosowanie w takich dziedzinach jak farmakologia, biochemia czy biologia strukturalna (m.in. w badaniach materiałowych, nanotechnologii oraz poznawaniu struktur, o których funkcji wiemy niewiele, ale znane są ich sekwencje), ma również szczególne znaczenie w modelowaniu nowych leków. Jednak główną zaletą metody jest jej koszt, podczas gdy klasyczne projektowanie nowego leku wiąże się z dużymi nakładami pieniężnymi oraz długotrwałymi etapami. Nowoczesne metody komputerowe znalazły zastosowanie w modelowaniu takich leków jak inhibitory proteaz, stosowanych w leczeniu zakażeń ludzkim wirusem niedoboru odporności. Ponadto metody modelowania molekularnego są pomocne w tworzeniu nowych leków skutecznych w leczeniu opornych zakażeń bakteryjnych oraz wspomagają badania nad kolejnymi lekami przeciwnowotworowymi [5].

Pierwszym krokiem w modelowaniu molekularnym jest znalezienie struktury wiodącej. W początkowych poszukiwaniach inspiracją są surowce naturalne, medycyna ludowa, a także związki syntetyczne, istniejące już leki, fizjologiczne ligandy i modulatory. Można się również posłużyć syntezą kombinatoryczną lub projektować za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (*nuclear magnetic resonance* – NMR). Proces zaczyna się więc od analizy budowy około 50 tysięcy do nawet 5 milionów związków (ryc. 1). Wstępne badania laboratoryjne obejmują 5–10 tysięcy substancji. Szacuje się, że tylko jeden zwią-

zek na tysiąc substancji przebadanych w pierwszym etapie uzyskuje pozytywne wyniki w testach i może zostać wprowadzony do badań klinicznych. Większość leków zostaje zdyskwalifikowana, ponieważ działa nie-selektywnie, częste są również problemy ze sposobem podania leku, jego odpowiednim stężeniem, działaniami niepożądanymi oraz interakcjami, jakie wywołuje stosowanie z innymi lekami lub z żywnością. Metody informatyczne, takie jak modelowanie molekularne, pozwalają na znaczne zawężenie liczby związków już na samym początku projektu, co wpływa na dużą oszczędność czasu oraz zdecydowaną redukcję kosztów [1].



Ryc. 1. Schemat obrazujący liczbę związków branych pod uwagę podczas kolejnych etapów badań nad lekiem.

Fig. 1. Diagram showing number of compounds taken into account during subsequent stages of drug research.

Komputerowe wspomaganie projektowania leków (*computer-aided drug design* – CADD) staje się coraz wydajniejszym i częściej stosowanym narzędziem [3,4].



Metody komputerowe nie pozwalają na przewidywanie ostatecznych struktur działających leków, ale umożliwiają wybór spośród olbrzymiej liczby związków podejrzanych o potencjalne działanie terapeutyczne, które będą najskuteczniej oddziaływać z receptorem. W pracy zostały przedstawione najważniejsze etapy, jakie obejmuje proces modelowania molekularnego.

### Droga wprowadzania leku na rynek

Poszukiwanie nowych rozwiązań, a także systematyczne badania nad rozwijaniem obszarów wiedzy już poznanej określa się mianem „badań i rozwoju” (Research & Development – R&D). W przypadku substancji leczniczych jest to dziedzina pochłaniająca znaczne nakłady finansowe światowych firm farmaceutycznych. Należy pamiętać, iż cały proces badawczy obciążony jest ogromnym ryzykiem niepowodzenia. Szacuje się, że tylko jedna spośród dziesięciu cząstek dopuszczonych do badań klinicznych zostaje po testach dopuszczona do obrotu [4,6]. Stale rosnące koszty związane są z większą wymaganą liczbą uczestników badań klinicznych, większą liczbą procedur badawczych oraz dużymi nakładami przeznaczanymi na proces rekrutacyjny, administrację oraz wynagrodzenia. Nie bez znaczenia pozostaje również konkurencja, ponieważ koszty poniesione przez producentów leków generycznych przy wprowadzeniu takiego leku mieszczą się w granicach około 40% kosztów leku oryginalnego. Etapy wprowadzania leku na rynek ilustruje rycina 2. Identyfikacja choroby obejmuje zdefiniowanie aktualnych potrzeb medycyny. Następnie dokonuje się rozpoznania potencjalnego punktu uchwytu dla leku. Dobry związek charakteryzuje się specyficnością działania, wobec czego punkt ten powinien zapewniać maksymalny efekt terapeutyczny przy jednoczesnym minimalnym wpływie na resztę ustroju. Omówiony proces zajmuje około 2 do 5 lat [7].

Kolejną fazą jest wykrycie substancji aktywnej, na co składa się identyfikacja cząsteczek wiodących, a spośród nich kandydata na lek. Inaczej etap ten określa się jako badania podstawowe lub laboratoryjne. Tradycyjnie polega on na syntezie nowego związku, modyfikacji już istniejącego lub wyizolowaniu substancji naturalnych z surowców roślinnych. Właśnie ta faza może być przyspieszona przez zastosowanie komputerowych metod modelowania molekularnego. Standardowo etap projektowania substancji aktywnej zajmuje, podobnie jak pierwszy etap, średnio od 2 do 5 lat [8].



Ryc. 2. Schemat przebiegu badań nad nowym lekiem, przed wprowadzeniem na rynek.

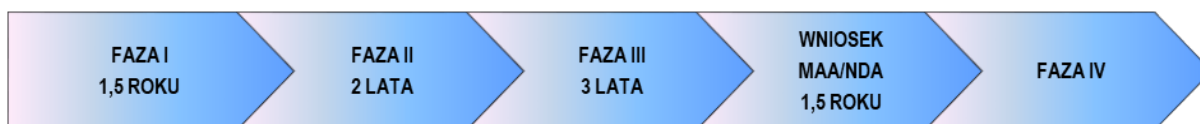
Fig. 2. Diagram of course of research on new drug, before launching on market.

Związek o potencjalnej skuteczności wchodzi następnie w fazę badań przedklinicznych. To pierwszy etap badań związany bezpośrednio z właściwą substancją. Początkowo przeprowadza się badania *in vitro* i *in vivo*, a jeżeli wyniki są satysfakcjonujące, dokonuje się badań na zwierzętach laboratoryjnych. Badania przedkliniczne zajmują średnio do 3 lat.

Ostatnim etapem prac badawczych są badania kliniczne, które mają na celu potwierdzenie działania farmakologicznego, właściwości klinicznych oraz farmakokinetycznych leku. Dąży się również do poznania działań niepożądanych i stale monitoruje bezpieczeństwo oraz skuteczność. Schemat przebiegu badań klinicznych ilustruje rycina 3.

Faza I badań klinicznych służy wstępnej ocenie bezpieczeństwa po pierwszym kontakcie potencjalnego leku z organizmem ludzkim. W badaniu bierze udział niewielka grupa zdrowych ochotników, licząca zwykle od 10 do 100 osób. Jest to faza stosunkowo krótka, lecz obciążona największym ryzykiem. Podczas doświadczenia uczestnicy są stale obserwowani i poddawani dokładnym badaniom. Pozwala to wysnuć wnioski na temat wchłaniania, wydalania, toksyczności oraz podstawowych interakcji. Na podstawie tych danych ustala się dawkowanie preparatu w dalszych fazach. Szacuje się, że na 100 związków przebadanych w fazie I zaledwie 70 przechodzi do kolejnej fazy badań.

W badaniach fazy II biorą udział chorzy ochotnicy, zazwyczaj w liczbie od 50 do 500. Wprowadza się wówczas analizę porównawczą działania kandydata na lek oraz placebo. Doświadczenie prowadzi się zwykle na podstawie podwójnie ślepej próby, czyli takiej, w któ-



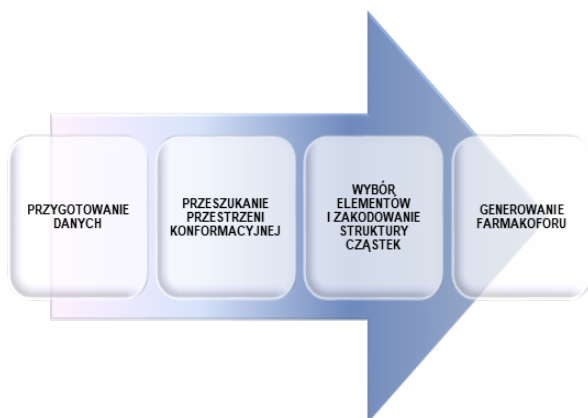
Ryc. 3. Schemat przebiegu badań klinicznych z uwzględnieniem średniego czasu trwania etapu; MAA (Marketing Authorisation Application) – wniosek o uzyskanie pozwolenia na dopuszczenie leku do obrotu na terenie Unii Europejskiej; NDA (New Drug Application) – wniosek dotyczący nowego leku po III fazie badań, obowiązujący na terenie Stanów Zjednoczonych.

Fig. 3. Diagram of course of clinical trials taking into account average duration of each stage. MMA (Marketing Authorisation Application) in European Union; NDA (New Drug Application) after III phase of testing, in force in the United States.



rej ani lekarz, ani pacjent, ani personel medyczny nie wiedzą, jaki związek jest podawany. Współcześnie, ze względów etycznych, grupie kontrolnej, która powinna otrzymywać placebo, podaje się leki będące standardowym leczeniem danej jednostki chorobowej. W badaniach II fazy ocenia się skuteczność leku w konkretnej grupie chorych oraz jego bezpieczeństwo, jak również parametry farmakokinetyczne, korelując je z płcią oraz wiekiem pacjenta. Definiowane są również zależność pomiędzy dawką a efektem terapeutycznym oraz dawkowanie substancji czynnej w kolejnych etapach badań. Faza III badań klinicznych jest prowadzona w grupie chorych ze wskazaniem do farmakoterapii, kwalifikowanych do uczestnictwa w doświadczeniu na podstawie konkretnych kryteriów. Są one tak dobrane, by populacja badana odzwierciedlała faktyczną populację chorych z daną jednostką chorobową. Liczba chorych wynosi od 1000 do 3000 lub więcej i uwarunkowana jest wymaganiami Europejskiej Agencji Leków (European Medicines Agency – EMA) lub Agencji Żywności i Leków (Food and Drug Administration – FDA). Faza III powinna ostatecznie dowieść skuteczności związku oraz bezpieczeństwa jego stosowania w terapii długociągłej. Po jej zakończeniu lek może zostać zarejestrowany i wprowadzony do obrotu za pomocą wniosku MAA (Marketing Authorisation Application – wniosek o uzyskanie pozwolenia na dopuszczenie leku do obrotu) na terenie Unii Europejskiej lub NDA (New Drug Application – wniosek dotyczący nowego leku po III fazie badań) na terenie Stanów Zjednoczonych. Szacuje się, że końcowy etap badań klinicznych pochłania aż 70% całkowitego budżetu przeznaczanego na wprowadzenie nowego leku.

Faza IV dotyczy leków zarejestrowanych i dopuszczonych do sprzedaży; stanowi kontrolę zasadności wszystkich wskazań oraz skierowania produktu leczniczego do różnych grup chorych. Obejmuje również weryfikację wcześniej nie ustalonych działań niepożądanych oraz dalszą ocenę skuteczności leku. Statystycznie ocenia się, że jedynie 1 na 5 leków poddawanych badaniom klinicznym sprawdza się we wszystkich fazach [9].



Ryc. 4. Kolejność zadań podczas budowania farmakoforu.  
Fig. 4. Order of tasks during pharmacophore building.

## Tworzenie farmakoforu

Farmakofor to model ilustrujący przestrzenne zależności między elementami wspólnymi dla ligandów, które mogą oddziaływać z danym receptorem. Generowanie farmakoforu w procesie modelowania molekularnego jest konieczne wówczas, gdy nie znamy struktury receptora, natomiast znana jest budowa kilku aktywnych ligandów. Kolejne kroki podczas budowania farmakoforu ilustruje rycina 4.

Pierwszym krokiem jest przygotowanie danych – analiza struktury chemicznej maksymalnie aktywnej i różnorodnej grupy związków chemicznych dla tego samego miejsca wiążącego. Należy również przypisać typy i ładunki poszczególnym atomom oraz rozstrzygnąć, czy konkretna grupa funkcyjna będzie akceptorem, czy też donorem protonu wiązania wodorowego.

Kolejnym etapem jest przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej; dla potrzeb projektowania molekularnego analiza zostaje dokonana zwykle tylko na poziomie konformacji o najniższych energiach potencjalnych. Wynika to z faktu, że większość cząsteczek aktywnych jest elastyczna i może występować właściwie w nieskończonej liczbie kształtów. Ponieważ konformacja, w jakiej ligand łączy się z receptorem, jest zazwyczaj nieznana, przestrzeń konformacyjna rozważanych molekuł musi zostać poddana analizie. Niektóre programy uwzględniają giętkość cząsteczek w trakcie budowania farmakoforu, inne zaś już na początku tworzą odmienne konformacje i zapisują je w celu wykorzystania w następnych krokach.

W dalszej kolejności dokonuje się wyboru elementów i kodowania struktury molekuł. Polega to na selekcji z każdej cząsteczki takich elementów, które mogą być przydatne w tworzeniu farmakoforu. Należy pamiętać, że farmakofor budują tylko elementy istotne dla oddziaływań międzycząsteczkowych. Mogą je stanowić grupy o wyjątkowych funkcjach, takie jak grupy hydrofobowe, o charakterze kwasowym lub zasadowym, czy też akceptory i donory wiązań wodorowych. Mogą to być również pojedyncze atomy, jak np. atom siarki.

Ostatnim zadaniem jest wygenerowanie farmakoforu. Jest on tworzony na podstawie analizy danych z poprzednich etapów i zestawieniu ich w taki sposób, aby dla wszystkich cząstek osiągnąć farmakofor maksymalny. Interpretacji dokonuje się za pomocą kilku metod, przy czym większość z nich opiera się na założeniu, że jeżeli grupa ligandów oddziałuje z tym samym miejscem wiązania, to istnieje duże prawdopodobieństwo, że będą one posiadać wspólny farmakofor. Nie zawsze jest to jednak założenie zgodne z prawdą, ponieważ znane są ligandy o bardzo wysokiej aktywności, które mogą nie zawierać jednego z elementów farmakoforu. Dlatego inną drogą rozwiązania tego problemu jest znalezienie najmniejszego zbioru elementów i odległości pomiędzy nimi; nie jest zatem konieczne, by każda cząsteczka zawierała wszystkie cechy farmakoforyczne. Spośród metod generowania farmakoforu wyróżniamy:



- metodę prostego przeszukiwania, opartą na analizie realnych kombinacji wzajemnie pasujących do siebie cech; badanie rozpoczyna się od tworzenia farmakoforów posiadających tylko po dwa wspólne dla wszystkich ligandów elementy w konkretnej odległości od siebie; w kolejnym etapie do znalezionych dwuelementowych farmakoforów dodaje się trzecią cechę i schemat modelowania powtarza się aż do momentu, w którym farmakofor posiada maksymalną liczbę wspólnych dla wszystkich ligandów cech;
- metodę algorytmów genetycznych, polegającą na utworzeniu struktur posiadających informacje na temat położenia elementów konkretnej cząsteczki w danej konformacji, tzw. „chromosomów”; molekula o najmniejszej liczbie elementów jest oznaczana jako wzorcowa; następnie dzięki losowym zmianom, takim jak rotacje i translacje, generowane są nowe „pokolenia chromosomów”; jeżeli nie uwzględniono zmienności konformacyjnej w poprzednich etapach, można uzyskać, również na drodze zmiany konformacji, kolejne pokolenia; w zależności od stopnia dokładności dopasowania zawartych w „chromosomach” elementów do struktury wzorcowej cząsteczki mogą one przeżywać dłużej lub krócej, wobec czego możliwe jest otrzymanie grupy, która w procesie „ewolucji” otrzymała najlepsze dopasowanie i na jej podstawie generowany jest farmakofor;
- metodę znajdowania największego podgrafu – w ten sposób działa oprogramowanie zapisujące struktury cząsteczek jako grafy; kryteria, na podstawie których z wygenerowanych wstępnie pozycji wybiera się ostateczny model, to m.in. liczba elementów w proponowanych farmakoforach; preferowane są farmakofory o jak największej liczbie pasujących cech.

Wynikiem analizy jest zazwyczaj kilka propozycji farmakoforów i dopiero odpowiednia ocena końcowa pozwala na dobranie właściwego. To niezwykle ważny etap w procesie otrzymywania nowych substancji leczniczych. W części spośród wykorzystywanych metod decydująca w wyborze odpowiedniego farmakoforu jest liczba cząstek, dla których stanowi on część wspólną. W takim wypadku może się okazać, że farmakofor czteroelementowy, reprezentatywny dla wszystkich ligandów z wyjątkiem jednego, jest mniej pożądanym niż farmakofor trójelementowy, ale wspólny dla wszystkich ligandów [10,11].

### Analiza QSAR

Metoda QSAR (*quantitative structure–activity relationship*) pozwala na określenie, które cechy ligandów wywierają najistotniejszy wpływ na ich aktywność. Jest nieocenionym narzędziem podczas modelowania molekularnego. Opiera się na porównaniu zależności między biologiczną aktywnością zbioru ligandów danego receptora a ich fizykochemicznymi parametrami. Na tej podstawie wyprowadza się równanie QSAR,

które jest matematycznym wymiarem analizowanej zależności [10,12].

Aby otrzymać równanie, konieczne jest sprowadzenie cech fizykochemicznych do formy liczbowej. W tym celu należy posłużyć się tzw. deskryptorami. Są to funkcje opisujące różne własności cząsteczek, np.:

- termodynamiczne:  $\log P$  (współczynnik podziału między wodę i oktanol), refraktywność molowa, hydrofobowość podstawników;
- pól molekularnych: potencjał elektrostatyczny i van der Waalsa na siatce;
- elektronowe: ładunek całkowity, moment dipolowy, efekt rezonansowy, efekt indukcyjny, polaryzowalność, energia HOMO i LUMO, ładunek całkowity, stała Hammetta;
- strukturalne: pole powierzchni, objętość, masa cząsteczkowa, liczba pierścieni aromatycznych, parametry sferyczne Tafta, liczba rotujących wiązań, wiązania wodorowe;
- konformacyjne: energie różnych konformacji i różnice między nimi;
- inne (np. oparte na teorii grafów).

### Poszukiwanie miejsca wiążącego

Ponieważ nie zawsze znana jest struktura krystalograficzna kompleksu ligand–receptor, etap znajdowania miejsca wiążącego jest jednym z istotniejszych kroków w projektowaniu skutecznego leku. Poszukiwanie tego miejsca na receptorze jest konieczne, gdy znana jest jedynie sekwencja aminokwasowa receptora, krystalografia natywnej formy receptora lub gdy zachodzi potrzeba znalezienia alternatywnego miejsca wiązania. Często dochodzi do sytuacji, w której na powierzchni receptora znajduje się kilka potencjalnych miejsc. Wówczas przydatna jest analiza uzyskanych rozwiązań kilkoma metodami lub wykonanie dokowania naturalnymi ligandami i dopiero na podstawie otrzymanych wyników wybiera się najodpowiedniejsze miejsce.

Metody służące do poszukiwania miejsca wiążącego dzieli się na homologiczne, solwatacyjne oraz dyskretne. Najczęściej wykorzystywane są metody homologiczne, które bazują na porównywaniu sekwencji aminokwasowej receptora z sekwencjami powiązanych białek. Metoda ta ma duże zastosowanie w momencie, gdy poszukiwane jest miejsce, które wiąże jego naturalny ligand. Występowanie fragmentu o małej zmienności w obrębie struktury aminokwasowej receptora może świadczyć, że właśnie w tym obszarze będzie występować miejsce wiązania. Możliwe jest również wykorzystanie baz białek podobnych strukturalnie, szczególnie w przypadku, gdy sekwencja receptora jest unikalna.

Metody solwatacyjne polegają na znajdowaniu wgłębień w powierzchni receptora, które są potencjalnymi miejscami wiązania. W tym celu białko receptorowe zostaje opłaszczone sferami, o wielkości odpowiadającej cząsteczkom wody. Następnie sfery, w których promieniu znajduje się mniejsza niż zadana w symulacji liczba atomów białek, są usuwane. Procesu tego dokonuje się cyklicznie, tak długo, aż liczba sfer odłożonych na powierzchni białka pozostaje stała.



Ostatnią możliwą ścieżką są metody dyskretne, inaczej oparte na siatkach, polegające na otoczeniu powierzchni receptora punktami w węzłach siatki sześcienniej. Kolejny krok stanowi eliminacja tych punktów, które w sześciennym obszarze o zadanym boku nie zawierają żadnego atomu białka. Dzięki temu uzyskuje się tylko punkty leżące w pobliżu powierzchni białka receptorowego. Następnie usuwane są punkty, w których sąsiedztwie, o innym niż wcześniej rozmiarze, znajduje się mniej niż określona liczba atomów białka. Pozostałe punkty zostają połączone w grupy. Grupy zawierające zbyt małą liczbę punktów są eliminowane, a pozostałe, jeśli zachodzi taka potrzeba, można scalić w większe zespoły. Wadą metody opartej na siatkach jest zależność orientacji i położenia struktury białkowej względem siatki; dużo lepiej sprawdza się ona w poszukiwaniu wąskich i głębokich szczelin. Niestety, nie zawsze prawidłowe zlokalizowanie miejsca wiążącego jest gwarancją sukcesu. Dzieje się tak, ponieważ często dochodzi do sytuacji, w której po związaniu liganda przez receptor struktura białka receptorowego podlega licznym zmianom konformacyjnym [13]. Dostępne są różne programy ułatwiające pracę w tym zakresie, m.in. DALI, LigandFit, LigSite, PASS [14,15,16,17].

### Przeszukiwanie baz danych

Dzięki molekularnym bazom danych możliwe jest przeszukanie milionów zgromadzonych w nich cząsteczek. Pozwala to często uniknąć kosztów, jakie generują kolejne etapy poszukiwań, np. dokowanie molekularne. Najkorzystniejsza sytuacja jest wtedy, gdy znana jest budowa receptora. Można wówczas skorzystać z poszukiwania na podstawie określonej struktury miejsca wiązania. Gdy nie jest jasne, jak wygląda farmakofor, można stworzyć zapytanie złożone ze zdefiniowanego obszaru, w obrębie którego powinny istnieć elementy liganda o konkretnych cechach [18,19]. Możliwe jest wtedy zastosowanie metody wyszukiwania dwuwymiarowego lub trójwymiarowego.

### Dokowanie molekularne

Dokowanie to metoda, która pozwala na odnalezienie sposobu ułożenia i konformacji liganda w obrębie miejsca wiążącego receptora. Umożliwia również ocenę siły wiązania kompleksu. Jest to proces złożony, ponieważ analizie poddaje się bardzo dużą liczbę ligandów przypadającą na jeden receptor (nawet do kilkunastu tysięcy). Dlatego też konieczne jest zastosowanie kompromisu między dokładnością dopasowania a szybkością oraz kosztem obliczeniowym, gdzie ważna jest wielkość przestrzeni konformacyjnej.

Aby rozpocząć proces dokowania, należy dokładnie poznać strukturę receptora, w tym również położenie miejsca aktywnego. Ważnym elementem jest także dostęp do bazy możliwych ligandów.

Istotnym zabiegiem optymalizującym przebieg procesu jest odpowiednie przygotowanie układu, mające na celu przede wszystkim uzdatnienie miejsca wiązania.

Szczególną uwagę należy poświęcić takim zagadnieniom jak:

- dodanie atomów wodoru do struktury krystalograficznej oraz upewnienie się co do ich kierunkowości; bardzo istotne jest to dla atomów wodoru, które będą tworzyć wiązania wodorowe, czyli tych połączonych z silnie elektroujemnymi pierwiastkami;
- określenie stanów protonacyjnych lizyny, argininy, histydyny, kwasu asparaginowego oraz kwasu glutaminowego, tzw. aminokwasów miareczkwalnych;
- przypisanie ładunków do atomów liganda oraz receptora.

Wiązanie się liganda z receptorem prowadzi zwykle do zmian konformacyjnych w obrębie obu tych cząsteczek. W zależności od tego, jak rozpatrujemy zmienność konformacyjną, wyróżnia się trzy sposoby dokowania: sztywne, giętkie i semi-giętkie. Dokowanie sztywne utrzymuje, że konformacja receptora i liganda nie podlega zmianom podczas dokowania, jedynie białko receptorowe podlega rotacjom i translacjom. Dokowanie semi-giętkie wykorzystuje możliwość, że konformacja receptora jest stała i niezmienna, a zmianom konformacyjnym, rotacjom i translacjom podlega tylko ligand. Polega ono na przeszukaniu przestrzeni konformacyjnej i wyliczeniu konformerów o największej stabilności, a następnie ich sztywnym dokowaniu. Metoda dokowania giętkiego zakłada, że zarówno receptor, jak i ligand podlegają zmianom konformacyjnym, dodatkowo ligand ulega rotacjom i translacjom. W rzeczywistości jednak dokowanie ogranicza się zwykle do łańcuchów bocznych aminokwasów w obrębie miejsca wiążącego receptora. Do dokowania wykorzystuje się najczęściej kilka konformacji receptora. Zwykle liczba zmian konformacyjnych zawęża się do tych, które występują w bibliotekach rotamerów. Mogą być one również wygenerowane z zastosowaniem metod dynamiki lub mechaniki molekularnej, tak by były to struktury o różnych stanach wyjściowych. Każda z owych konfiguracji, uznawana za sztywną, zostaje poddana dokowaniu liganda [20].

### Projektowanie nowych ligandów

Generowanie ligandów *de novo* to alternatywny sposób poszukiwania nowych związków, różniący się od poprzednich metod tym, że zamiast bazować na istniejących już molekułach, opiera się na znanej budowie receptora lub farmakoforu. Metoda ta w dużej mierze oparta jest na mechanizmach losowych. Wiąże się to z ogromną liczbą związków, które można zsyntetyzować, sięgającą nawet jednego googola ( $1 \cdot 10^{100}$ ). Jeśli dodatkowo przyjąć fakt, że każdy ze związków może występować w kilku konformacjach, liczba ta jest w rzeczywistości niemożliwa do przeszukania. Wobec tego stosuje się algorytmy polegające na wprowadzaniu przypadkowych zmian w obrębie budowy liganda oraz jego położenia, kolejno oceniając dopasowanie powstałej molekule do miejsca wiązania lub farmakoforu.



W taki sposób realnie jest znalezienie struktury charakteryzującej się najkorzystniejszymi właściwościami.

Analiza miejsca wiążącego stanowi istotny, pierwszy etap poszukiwań. Ma na celu znalezienie takich fragmentów, które będą stanowić miejsce kluczowych oddziaływań liganda z receptorem. Właściwości brane pod uwagę to m.in. oddziaływania hydrofobowe, elektrostatyczne, a także akceptory i donory wiązań wodorowych. Dzięki takiej analizie możliwe jest utworzenie mapy przestrzennej, na której zaznaczone są obszary korzystne. W zależności od rodzaju oprogramowania tworzenie mapy może się odbywać na podstawie rozpoznawania określonych fragmentów, np. definiując pozycję, w której powinno się umieścić donor wiązania wodorowego. Praca innych programów polega na tworzeniu siatek przestrzennych, których węzły stanowią punkty wypełniające miejsce wiązania w receptorze. Umieszcza się w nich na próbę różne molekuly, a następnie każdej przypisuje konkretną wartość energii oddziaływania.

Gdy nie ma możliwości poznania struktury miejsca wiążącego, stosuje się farmakofor. Jest on utworzony na podstawie zbioru znanych ligandów i stanowi bazę do konstrukcji mapy.

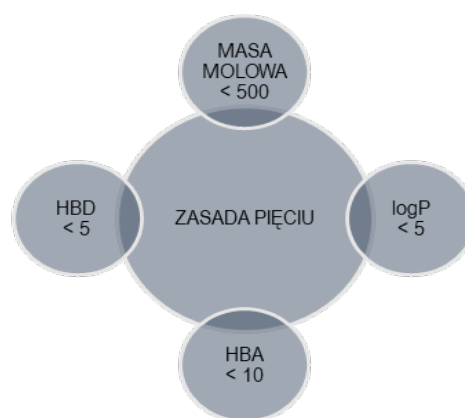
Konstruowanie ligandów zachodzi z poziomu pojedynczych atomów lub części z większych fragmentów, takich jak grupy funkcyjne czy pierścienie aromatyczne. Dla fragmentów takich definiowane są wartości różnych deskryptorów, miejsca łączenia z innymi fragmentami. Następnie na podstawie dopasowania do konkretnych obszarów miejsca wiązania receptora wybierane są te, które będą korzystne dla właściwości nowej cząsteczki. Budowanie i optymalizacja zachodzą stopniowo z wykorzystaniem następujących strategii:

- łączenie grup funkcyjnych, uprzednio dopasowanych do komplementarnych obszarów miejsca wiążącego;
- rozbudowa zarodka, czyli jednego fragmentu umieszczonego w miejscu wiązania, przez dołączanie kolejnych cząstek;
- chaotyczne mutacje, a więc translacje, rotacje, rozbudowa lub usuwanie w obrębie dołączonego fragmentu, dokonywane losowo;
- łączenie węzłów siatki, możliwie jak najkrótszą drogą, a następnie losowa optymalizacja powstałego twor.

Nierzadko metody te są łączone lub stosowane jedna po drugiej. Ocena nowo powstałych ligandów często zachodzi na bieżąco podczas tworzenia, niemniej duża część utworzonych cząstek musi zostać odrzucona ze względu na trudności w syntezie chemicznej, czy też niekorzystne właściwości farmakokinetyczne. Metoda projektowania nowych ligandów obejmuje również modyfikację już istniejących molekuł w kierunku zwiększenia ich powinowactwa do białka receptorowego [4,21,22,23].

Pomocna w rozważaniu korzystnych właściwości nowego leku może być również „zasada pięciu” Li-

piskiego (*rule of five* – RO5) [24]. Pozwala ona na ocenę związku chemicznego pod kątem jego potencjalnej aktywności jako leku doustnego. Reguła została sformułowana na podstawie wniosku, że większość substancji leczniczych stosowanych dotychczas drogą oralną stanowią cząsteczki względnie małe oraz umiarkowanie lipofilowe. Należy jednak zaznaczyć, że metoda nie pozwala przewidzieć, czy dany związek będzie aktywny farmakologicznie, a jedynie określić właściwości ważne z punktu widzenia farmakokinetyki, takie jak wchłanianie, dystrybucja, metabolizm oraz wydalanie. Reguła dotyczy takich właściwości fizycznych, jak masa molowa, logP, liczba akceptorów wiązań wodorowych (*hydrogen bond acceptor* – HBA) i donorów wiązań wodorowych (*hydrogen bond donor* – HBD) oraz ich konkretnych wartości, które ilustruje rycina 5. Ponieważ każdy warunek jest wielokrotnością liczby pięć, regułę nazywa się „zasadą pięciu”.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający warunki, jakie musi spełnić związek chemiczny, aby był zgodny z „zasadą pięciu” Lipińskiego.

Fig. 5. Diagram presenting conditions that chemical compound must meet to comply with Lipinski's rule of five.

## PODSUMOWANIE

Metody modelowania molekularnego mogą być pomocne w projektowaniu substancji leczniczych, jednak w procesach obliczeniowych nie wystarczy sama wiedza farmaceutyczna, konieczna jest biegłość w obsłudze programów komputerowych, znajomość systemów operacyjnych (np. Linux), czasami również umiejętność programowania. Wskazana jest ponadto bardzo dobra znajomość chemii oraz mechanizmów procesów zachodzących na powierzchni ligand–receptor. Praca związana z modelowaniem molekularnym to praca interdyscyplinarna i często ten etap projektowania leków prowadzony jest przez zespoły naukowców, specjalistów z różnych dziedzin. Niejednokrotnie warto jednak poświęcić czas na opanowanie wspomnianych umiejętności.

W porównaniu z tradycyjnymi metodami projektowania nowych leków, metody modelowania molekularnego umożliwiają znaczne skrócenie czasu podstawowych badań nad lekiem. Ponadto pozwalają na ograni-



czenie kosztów procesu, ponieważ nie ma konieczności przeprowadzania licznych eksperymentów w warunkach laboratoryjnych [6].

Praca została wykonana w ramach utrzymywania potencjału badawczego (badania statutowe): KNW-1-119/K/8/Z oraz KNW-1-162/N/9/Z.

---

#### Author's contribution

Study design – E. Chelmecka, M. Pisula  
Data collection – M. Pisula, E. Chelmecka  
Manuscript preparation – M. Pisula, E. Dróżdź, E. Chelmecka  
Literature research – M. Pisula, E. Chelmecka  
Schemes preparation – E. Dróżdź, M. Pisula  
Final approval of the version to be published – E. Chelmecka

---

## PIŚMIENICTWO

1. Wałęsa R., Broda M.A. Rola modelowania molekularnego w procesie poszukiwania nowych substancji chemicznych o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. *Lek w Polsce* 2014; 24(16): 46–49.
2. Nadendla R.R. Molecular modeling: a powerful tool for drug design and molecular docking. *Resonance* 2004; 9(5): 51–60.
3. Kore P.P., Mutha M.M., Antre R.V., Oswal R.J., Kshirsagar S.S. Computer-aided drug design: an innovative tool for modeling. *OJMC* 2012; 2(4): 139–148, doi: 10.4236/ojmc.2012.24017.
4. Ooms F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 2000; 7(2): 141–158.
5. Messaoudi A., Belguith H., Ben Hamida J. Homology modeling and virtual screening approaches to identify potent inhibitors of VEB-1  $\beta$ -lactamase. *Theor. Biol. Med. Model.* 2013; 10: 22–32, doi: 10.1186/1742-4682-10-22.
6. DiMasi J.A., Grabowski H.G., Hansen R.W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J. Health Econ.* 2016; 47: 20–33, doi: 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012.
7. Bodera P. Tworzenie nowych leków: miejsca docelowe i receptory. *Czas. Aptek.* 2009; 1(181): 13–20.
8. Moses H. 3rd, Matheson D.H., Cairns-Smith S., George B.P., Palisch C., Dorsey E.R. The anatomy of medical research: US and international comparisons. *JAMA* 2015; 313(2): 174–189, doi: 10.1001/jama.2014.15939.
9. Mahan V.L. Clinical Trial Phases. *IJCM* 2014; 5(21): 1374–1383, doi: 10.4236/ijcm.2014.521175.
10. Bielenica A., Kossakowski J. Zastosowanie metod obliczeniowych do wyznaczania budowy modeli farmakoforowych receptorów 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> oraz 5HT<sub>7</sub>. *Biul. Wydz. Farm. WUM* 2010; 1: 1–12.
11. Cortés A., Moreno E., Rodríguez-Ruiz M., Canela E.I., Casadó V. Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies. *Expert Opin. Drug Discov.* 2016; 11(7): 641–664, doi: 10.1080/17460441.2016.1185413.
12. Hansch L., Leo A., Hoekman D. Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
13. de Ruyck J., Brysbaert G., Blossey R., Lensink M.F. Molecular docking as a popular tool in drug design, an *in silico* travel. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* 2016; 9: 1–11, doi: 10.2147/AABC.S105289.
14. Phenix, online, <https://www.phenix-online.org> [Dostęp: 27.03.2020].
15. Dali. Protein Structure Comparison Server, online, <http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali> [Dostęp: 27.03.2020].
16. OmicX, online, <https://omictools.com/ligsitecsc-tool> [Dostęp: 27.03.2020].
17. GeneXplain, online, <http://genexplain.com/pass> [Dostęp: 27.03.2020].
18. Ferreira L.G., Dos Santos R.N., Oliva G., Andricopulo A.D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* 2015; 20(7): 13384–13421, doi: 10.3390/molecules200713384.
19. Gruca A. Bioinformatyczne bazy danych. Wydawnictwo PJWSTK. Warszawa 2010, s. 1–7.
20. Eweas A.F., Maghrabi I.A., Namaneh A.I. Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. *Der Pharma Chemica* 2014; 6(6): 211–228.
21. Jagiela D., Łuczak S. Modelowanie w chemii. *Laborant* 2011; 3: 27–30.
22. Huang P.S., Boyken S.E., Baker D. The coming of age of *de novo* protein design. *Nature* 2016; 537(7620): 320–327, doi: 10.1038/nature19946.
23. Rodrigues T., Hauser N., Reker D., Reutlinger M., Wunderlin T., Hamon J., Koch G., Schneider G. Multidimensional *de novo* design reveals 5-HT<sub>2B</sub> receptor-selective ligands. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015; 54(5): 1551–1555, doi: 10.1002/anie.201410201.
24. Lipinski C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* 2004; 1(4): 337–341, doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.