

VIRTUÁLNÍ SCREENING LÉČIV

VOJTĚCH SPIWOK^{a,b} a BLANKA KRÁLOVÁ^a

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika, ^b Chemický ústav – Centrum glykomiky, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko
chemspiw@savba.sk

Došlo 27.3.08, přijato 17.4.08.

Klíčová slova: vývoj léčiv, protein-ligand docking, farmakofor, chemoinformatika

Obsah

1. Úvod
2. Metodologie virtuálního screeningu
3. Virtuální screening v akademické sféře
4. Nové trendy ve virtuálním screeningu
5. Závěr

1. Úvod

Otázky přesnosti a praktické využitelnosti metod počítačové chemie jsou častým námětem diskusí mezi počítačovými a čistě experimentálními chemiky. Virtuální screening je přístup, který využívá metody molekulárního modelování a slouží k zefektivnění vývoje nových ligandů, nejčastěji léčiv. Na rozdíl od některých jiných postupů a metod počítačové chemie, které i přes různá očekávání zůstávají spíše akademickou záležitostí, je virtuální screening prakticky využíván farmaceutickým průmyslem a je jedním z výrazných úspěchů této oblasti chemie. Pro virtuální screening platí, že je často důležité najít kompromis mezi přesností a rychlostí použitých metod, neboť je nutné testovat velký počet molekul. Právě vyvažování přesnosti a počítačové náročnosti je faktor, který je nutné brát v úvahu při vývoji a aplikaci metod molekulárního modelování.

Vývoj léčiv a dalších biologicky aktivních látek (např. pesticidů) je někdy charakterizován jako hledání jehly v kupce sena, kdy jehlou je sloučenina s požadovanou biologickou aktivitou a přijatelnou toxicitou a kupkou sena je veliký soubor komerčně nebo synteticky dostupných sloučenin. Pokud máme k dispozici cíl léčiva (receptor, target), je prvním krokem hledání sloučeniny s afinitou, která ještě zpravidla nestačí k lékařskému použití, ale je již dostatečná jako výchozí bod pro další

optimalizace. Tato afinita k danému cíli je obvykle v řádu $\mu\text{mol l}^{-1}$ (disociační a inhibiční konstanty jsou v článku uvedeny v jednotkách koncentrace, což sice odporuje formalismu fyzikální chemie, ale je to praktické a ve farmaceutických vědách běžné). Tradiční metodou v této fázi hledání je robotizovaný screening vazebných, inhibičních nebo biologických aktivit, neboli „vysokoprůtočný“ screening (high throughput screening, HTS). Sloučeniny, jejichž aktivita je dostatečně podepřena pomocí HTS, dále slouží jako výchozí struktury (lead structures) pro vývoj sloučenin s vlastnostmi požadovanými pro léčiva, tedy silnějších ligandů, s nižší toxicitou a lepšími farmakokinetickými parametry.

Knihovny pro HTS mohou být získány např. sbíráním sloučenin „z polic“ mnoha syntetických chemiků nebo pomocí kombinatorické chemie. Dalším častým zdrojem jsou organismy, jako např. bakterie, rostliny, mořské organismy nebo etnofarmacie. Komerčně je v současnosti dostupných více než půl milionu sloučenin¹ v množství a kvalitě vhodné pro testování biologické aktivity. Vlastní HTS může být založený na nejrůznějších detekčních mechanismech, například FRET (fluorescence resonance energy transfer) nebo radioisotopových metodách. Společnou charakteristikou metod HTS je určitý kompromis mezi cenou a rychlostí na jedné straně a přesností na druhé straně, neboť je nutné testovat rozsáhlé knihovny sloučenin. Díky tomu z HTS vychází velké množství falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. HTS tedy v podstatě obohacuje knihovnu sloučenin tím, že vyřazuje neaktivní a zachytává aktivní sloučeniny s tím, že občas vyřadí nějakou aktivní či zachytí neaktivní.

2. Metodologie virtuálního screeningu

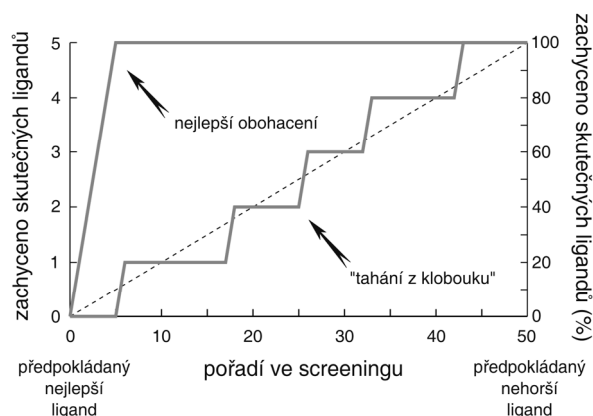
Alternativou k HTS je virtuální screening (VS), tedy obdoba HTS na počítači. Pomocí specializovaných programů je možné filtrovat sloučeniny podle předpověděné afinity k testovanému cíli, toxicity či farmakokinetické dostupnosti. VS poskytuje řadu falešně pozitivních a falešně negativních výsledků, ale v tomto směru je situace podobná jako u HTS. Mezi oběma přístupy existuje určitá rivalita, ale není pochyb o tom, že VS má významný potenciál jako metoda minimálně komplementární k HTS.

Jednou z nejčastěji používaných technik VS je tzv. „protein-ligand docking“. Posláním tohoto experimentu je předpověď, zda se testovaná sloučenina na daný protein váže, jak se váže (struktura komplexu) a jak silně se váže. Vychází se obvykle ze známé prostorové struktury receptoru a předpověděné prostorové struktury ligandu. Cílem docking experimentu zpravidla není modelovat proces vazby ligandu na protein, cílem je znát pouze výsledek. Obvyklou strategií dockingu je, že se ligand umístí do

stejného prostoru jako receptor. Následně je poloha ligandu optimalizována tak, aby bylo dosaženo minima volné energie. Kromě polohy ligandu je možné natáčet jeho vazby s volnou rotací. Celý tento proces, aby byl použitelný ve VS, musí trvat pro jeden ligand maximálně několik sekund. Volná energie je obvykle odhadována pomocí tzv. skórovací funkce (scoring function), což je empirická závislost volné energie interakce protein-ligand na konformaci jejich komplexu. Skórovací funkce byly vyvinuty na základě komplexů protein-ligand pro něž je známa jak experimentálně změřená volná energie interakce, tak i experimentálně změřená prostorová struktura komplexu.

Metodologie pro testování VS byla představena Caterinou Bissantz a spol.² Autoři testovali tři nástroje a sedm skórovacích funkcí na dvou receptorech (thymidinkinase a estrogenovém receptoru). Nejprve vytvořili knihovnu 990 sloučenin, které měly vlastnosti léčiv (drug-like). Do této databáze přidali několik známých ligandů obou receptorů. Pro každou sloučeninu v této virtuální knihovně vytvořili model prostorové struktury a poté provedli docking do daného receptoru. Výsledkem byl odhad volné energie vazby jednotlivých sloučenin na daný receptor. Sloučeniny pak bylo možné seřadit podle předpověděných volných energií.

Tento způsob hodnocení VS si můžeme ukázat na modelovém příkladu. Pokud bychom vytvořili virtuální knihovnu sloučenin tak, že bychom vzali pět skutečných ligandů a „smíchali“ je se 45 náhodně vybranými neaktivními sloučeninami, pak by v ideálním případě byly tyto skutečné ligandy seřazeny od prvního do pátého místa a byly by následovány neaktivními sloučeninami na 6.–50. místě. V nejhorším případě by bylo pět skutečných ligandů rozseto mezi dalšími 45 sloučeninami tak, jako by byly „tahány z klobouku“. Oba případy jsou ilustrovány na obr. 1.



Obr. 1. Modelový výsledek virtuálního screeningu 50 sloučenin, mezi nimiž bylo pět skutečných ligandů; v ideálním případě (nejlepší obohacení) je pět skutečných ligandů klasifikováno jako pět nejlepších ligandů. Nejhorší případ odpovídá „tahání z klobouku“ kdy nedochází k použitelnému obohacení

Caterina Bissantz a spol. např. pomocí programu Gold a jeho skórovací funkce vybrali cca 50 % skutečných ligandů thymidinkinasy mezi 5 % nejlépe skórovovaných sloučenin a všechny skutečné ligandy mezi 10 % nejlépe skórovovaných sloučenin. Obdobná situace byla i u estrogenového receptoru. Je tedy jasné, že pomocí virtuálního screeningu je možné z oné „kupky sena“ odstranit velkou část „sena“ a přitom odstranit co nejméně „jehel“.

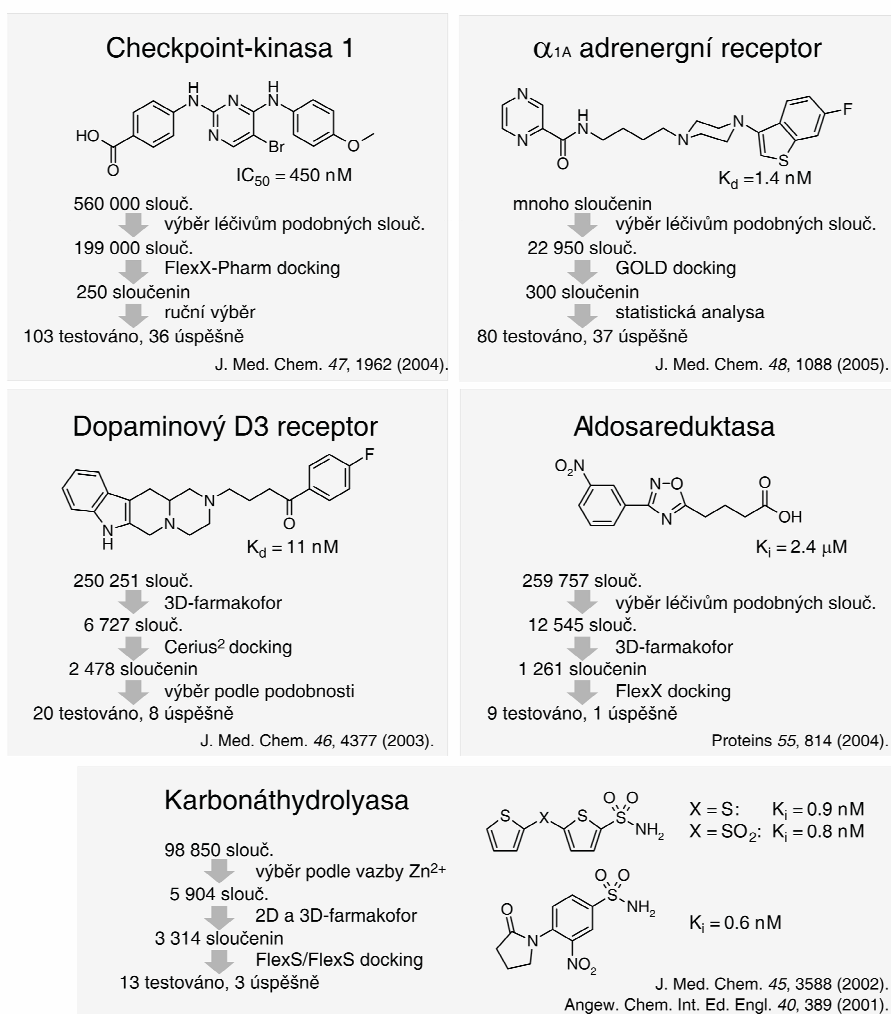
3. Virtuální screening v akademické sféře

Pro svou finanční nenáročnost se VS stal oblíbenou metodou v akademické sféře, kde většinou není možné konkurovat farmaceutickým společnostem s jejich mimořádně nákladnými technikami HTS. Několikrát byl na akademických pracovištích úspěšně aplikován postup, kdy byl proveden VS několika desítek tisíc komerčně dostupných sloučenin a obvykle několik desítek sloučenin vyhodnocených jako nejlepší bylo poté zakoupeno a experimentálně otestováno. Na obr. 2 jsou vyznačeny některé úspěchy této strategie vybrané Kubinyim⁹. Je vidět, že tato strategie vedla k vývoji nových, pro daný cíl dosud neznámých ligandů, a to pro nejrozličnější cíle léčiv, zahrnující jak membránové receptory, tak enzymy. Skupina Briana Shoicheta¹⁰ vytvořila databázi komerčně dostupných sloučenin známou pod zkratkou ZINC, která je připravena přímo pro účely VS. VS následovaný testováním vybraných sloučenin představuje jednu z nejúspěšnějších strategií vývoje ligandů v akademické sféře.

4. Nové trendy ve virtuálním screeningu

VS podobně jako HTS trpí tím, že některé typy sloučenin se buď vážou na skoro všechny proteiny, nebo z těchto screeningů vycházejí jako falešně pozitivní výsledky. Příkladem falešně pozitivních nálezů HTS jsou sloučeniny, které se vážou na proteiny kovalentně nebo tvoří agregáty. V oblasti VS byly vyvinuty filtry, které mají za úkol účinně odfiltrovat tyto promiskuitní nebo falešně pozitivní sloučeniny a tím zefektivnit VS nebo HTS. Další metodou, jak odlišit selektivní ligandy od neselektivních ligandů, je paralelní screening na více receptorech (cross docking). Existují některé časté anticíle léčiv (antitargets), tedy proteiny, jejichž ovlivnění léčivem vede k nežádoucím vedlejším účinkům. Mezi anticíle studované pomocí VS patří hERG (human ether-à-go-go related gene) draslíkový iontový kanál. Roche a spol.¹¹ byli pomocí VS schopni odfiltrovat sloučeniny, které inhibují tento iontový kanál a tím způsobují náhlou srdeční smrt.

Obračeným postupem dosud prezentovaného VS je reversní VS. Zatímco při klasickém VS testujeme interakce mnoha sloučenin s jedním receptorem, při reversním VS testujeme schopnost jedné sloučeniny interagovat s rozsáhlou knihovnou receptorů. Studovaný ligand je pomocí docking experimentu umístěn do každého z receptorů v této knihovně. Tento postup může být např. pou-

Obr. 2. Příklady ligandů nalezených pomocí VS^{3–8} (vybrané prof. Hugem Kubinyim⁹)

žit pro hledání endo- nebo exogenních ligandů pro receptory, jejichž ligandy nejsou známy (deorphanization). Bock a Gough¹² použili sekvenční 55 lidských G-protein-vázaných receptorů bez známého ligandu a vytvořili modely jejich prostorových struktur na základě experimentální struktury rhodopsinu. Takto vzniklé modely použili v docking experimentu s 34 753 léčivům podobnými sloučeninami. Tím získali 1 911 415 modelů komplexů protein-ligand. Pomocí metod strojového učení na základě porovnání se známými komplexy vybrali modely s nejpravděpodobnější interakcí. Výsledky této studie jsou v souladu s řadou experimentů, některé ale ještě čekají na experimentální ověření.

Snahy zvýšit účinnost HTS vedly k novým trendům, mezi něž patří snaha změřit v jednom screeningu co nejvíce parametrů. Tyto postupy HTS zahrnují např. fluorescenční buněčné studie, kdy je na jedné buňce možné změřit celou škálu biologicky relevantních veličin. Tento

trend se nevyhnul ani VS. Byla navržena celá řada postupů jak zefektivnit VS pomocí sofistikovaného zpracování jeho výsledků např. metodami vícerozměrné statistiky. Pomocí těchto technik zpracování dat (dolování dat, data mining) je rovněž možné integrovat výsledky VS a HTS.

Jak bylo naznačeno výše, receptor je při docking experimentu zpravidla rigidní. Je však známo, že u řady proteinů dochází ke konformačním změnám v důsledku vazby ligandu. Pokud by testovaný ligand vyžadoval jinou konformaci receptoru než je ta experimentálně změřená, pak by byl tento ligand falešně negativním výsledkem virtuálního screeningu. Zahrnutí flexibility receptoru do procesu docking experimentu je jednou z největších výzev v této oblasti. V posledních letech byly vyvinuty postupy, které zavádějí flexibilitu receptoru do již existujících programů, nebo využívají nové principy. Je nutné podotknout, že se jedná o složitý úkol, neboť ligand má sám o sobě šest stupňů volnosti (tři translační a tři rotační) a na každou vazbu

s volnou rotací připadá další stupeň volnosti. Pokud by měly být zahrnuty stupně volnosti mnoha stovek atomů receptoru, stal by se proces optimalizace neúnosně náročný. Ferrari a spol.¹³ tento problém vyřešili tak, že vzali v potaz několik předem vygenerovaných konformací receptoru. Pomocí virtuálního screeningu s použitím tohoto multikonformačního dockingu našli inhibitor aldosaředuktasy s IC_{50} rovnou 8 μM . Kromě flexibility receptoru patří mezi další výzvy dockingu další heterogenity receptoru či heterogenity ligandů, jako jsou například protonační stavy, tautomerie, konformace cyklických molekul a další.

Z předcházejících řádků může vyplynout, že protein-ligand docking je jedinou technikou virtuálního screeningu. Je však na tomto místě potřeba zmínit metody farmakoforové. Obecný význam slova farmakofor značí soubor strukturních prvků zodpovědných za účinnost léčiva. Farmakoforové metody na rozdíl od dockingu nejsou založené na struktuře receptoru, ale na strukturách známých ligandů. Kovalentní nebo trojrozměrné struktury známých ligandů (např. endogenních ligandů či dříve vyvinutých léčiv) jsou studovány s cílem najít strukturní prvky zodpovědné za jejich afinitu k receptoru. Tyto prvky jsou poté použity při filtrování velikých souborů sloučenin. Vedle farmakoforových technik musíme rovněž zmínit metody pro předpověď absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace léčiva (ADME) a toxikologických vlastností. Klasickými se v tomto směru stala Lipinského pravidla (pravidla pěti)¹⁴, tedy že molekula vlastností léčiva nesmí mít více než 5 donorů a 10 akceptorů vodíkových vazeb, nesmí mít molární hmotnost vyšší než 500 $g\ mol^{-1}$ a nesmí mít $\log P$ (dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě oktanol-pufr) vyšší než 5. Vzhledem k tomu, že jsou takovéto filtry velmi rychlé, je možné je použít v počátečních fázích virtuálního screeningu a tím zamezit zbytečnému testování pravděpodobně neaktivních sloučenin náročnějšími technikami v dalších fázích virtuálního screeningu.

5. Závěr

Otázkou, která je v souvislosti s VS často kladena, je, do jaké míry jsou tyto postupy aplikovány v současném průmyslovém vývoji léčiv. Tuto otázku není snadné zodpovědět hlavně díky tomu, že VS je používán komplementárně k HTS. Existují např. knihovny sloučenin, které jsou zacílené na určitou skupinu receptorů, např. G-protein vázaných receptorů, proteinkinas, enzymů a dalších skupin častých nebo do budoucna slibných cílů léčiv. Tato zacílení knihoven jsou prováděna filtrováním pomocí VS. Pro konkrétní potenciální léčivo je tedy nesnadné říci, do jaké míry bylo nalezeno díky VS a do jaké díky HTS. Jak demonstroval Shoichet a spol.¹⁵ jsou tyto dvě techniky komplementární. Budoucí vývoj VS bude záviset na porozumění fyzikálním principům interakcí protein-ligand. Zároveň schopnost VS konkurovat HTS bude samozřejmě závi-

set i na vývoji nových a vylepšování stávajících postupů HTS.

Poděkování patří Dr. Jurajovi Kóňovi za pečlivé přečtení rukopisu. Autoři děkují MŠMT ČR (MSM 6046137305) za finanční podporu.

LITERATURA

1. MDL® Available Chemical Directory, <http://www.mdli.com>, staženo 6.10.2008.
2. Bissantz C., Folkers G., Rognan D.: J. Med. Chem. 43, 4759 (2000).
3. Lyne P. D., Kenny P. W., Cosgrove D. A., Deng C., Zabudoff S., Wendoloski J. J., Ashwell S.: J. Med. Chem. 47, 1962 (2004).
4. Evers A., Klabunde T.: J. Med. Chem. 48, 1088 (2005).
5. Varady J., Wu X., Fang X., Min J., Hu Z., Levant B., Wang S.: J. Med. Chem. 46, 4377 (2003).
6. Kraemer O., Hazemann I., Podjarny A. D., Klebe G.: Proteins 55, 814 (2004).
7. Grüneberg S., Stubbs M. T., Klebe G.: J. Med. Chem. 45, 3588 (2002).
8. Grüneberg S., Wendt B., Klebe G.: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 40, 389 (2001).
9. <http://www.kubinyi.de>, staženo 6.10.2008.
10. Irwin J. J., Shoichet B. K.: J. Chem. Inf. Model. 45, 177 (2005).
11. Roche O., Trube G., Zuegge J., Pflimlin P., Alanine A., Schneider G.: ChemBioChem. 3, 455 (2002).
12. Bock J. R., Gough D. A.: J. Chem. Inf. Model. 45, 1402 (2005).
13. Ferrari A. M., Wei B. Q., Costantino L., Shoichet B. K.: J. Med. Chem. 47, 5076 (2004).
14. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J.: Adv. Drug. Deliv. Rev. 46, 3 (2001).
15. Doman T. N., McGovern S. L., Witherbee B. J., Kasten T. P., Kurumbail R., Stallings W. C., Connolly D. T., Shoichet B. K.: J. Med. Chem. 45, 2213 (2002).

V. Spiwok^{a,b} and B. Králová^a (^a Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Slovak Republic):
Virtual Screening

Virtual screening has become a successful alternative and complementary technique to experimental high-throughput screening technologies. This review summarizes major advantages of this approach. Current challenges of virtual screening, such as target flexibility, reverse screening and data mining are also presented. Examples of application of virtual screening in academic environment are given.