

Στρατηγικές και τεχνολογίες αιχμής στην ανακάλυψη φαρμάκων: NMR και *in silico* μέθοδοι



Μαρία Ζερβού
Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας
Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
mzervou@eie.gr

What is nuclear magnetic resonance (NMR) and what can we do with it?

<https://www.youtube.com/watch?v=H-SQFSynKOk>

This video, produced for the occasion of the official opening of the uNMR-NL research facility at the Bijvoet Center for Biomolecular Research of Utrecht University in the Netherlands, shows how, with NMR spectroscopy, we can determine the structure of molecules to help develop the materials, food and medicine of the future.

Περιγραμματα Διάλεξης

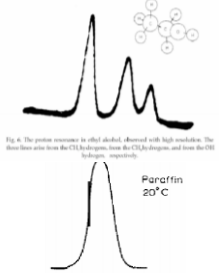
- NMR basics*
- Διαδικασία ανάπτυξης νέου φαρμάκου και εργαλεία επίσπευσης των αρχικών σταδίων
- Case Studies**

* Το μέρος NMR basics δεν αποτελεί εξεταστέα ύλη, είναι μια εισαγωγή στις γενικές αρχές της Φασματοσκοπίας NMR

** Δεν απαιτείται η διεξοδική γνώση του κάθε case study αλλά μόνο το πεδίο εφαρμογής που περιγράφει.

NMR basics



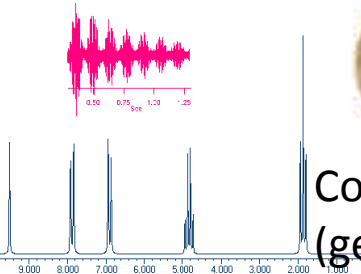


The Nobel Prize in Physics 1952

Felix Bloch, E. M. Purcell



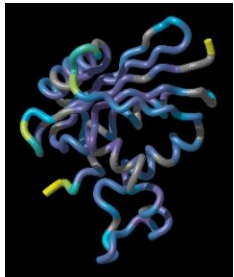
“For their development of new methods for **nuclear magnetic precision measurements** and discoveries in connection therewith”



1991: Nobel Prize in Chemistry

Prof Dr R.R. Ernst

Contribution to the invention of **Fourier transform (FT) NMR**
(generate and detect several frequencies in parallel)

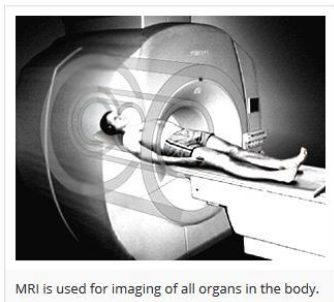


The Nobel Prize in Chemistry 2002

John B. Fenn, Koichi Tanaka, Kurt Wüthrich



“For the development of methods for **identification and structure analyses of biological macromolecules**”



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2003

Paul C. Lauterbur, Sir Peter Mansfield



“For their discoveries concerning **magnetic resonance imaging**”

Nuclear Magnetic Resonance



Ένταση μαγνητικού πεδίου

7.05 - 23.5 Tesla

Συχνότητα συντονισμού πυρήνων ^1H

300 MHz – 1 GHz

Magnetic Resonance Imaging



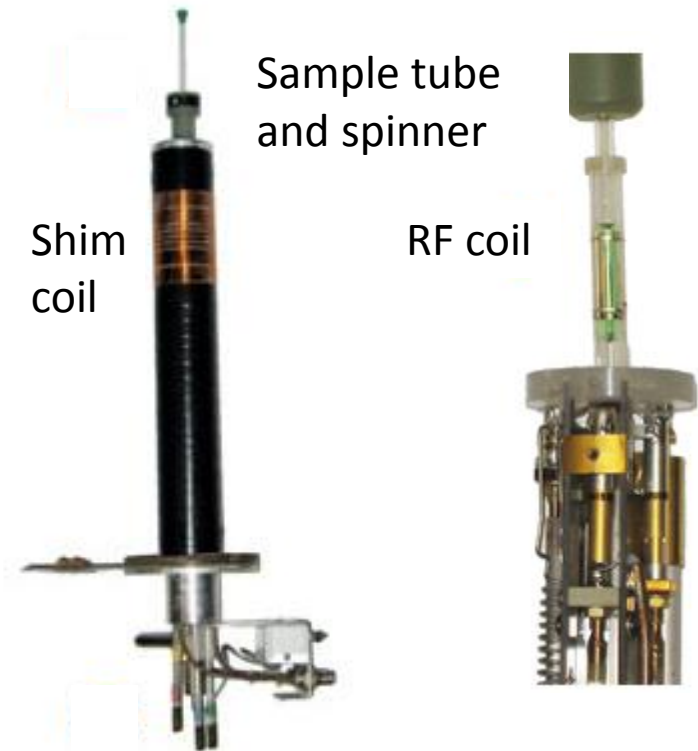
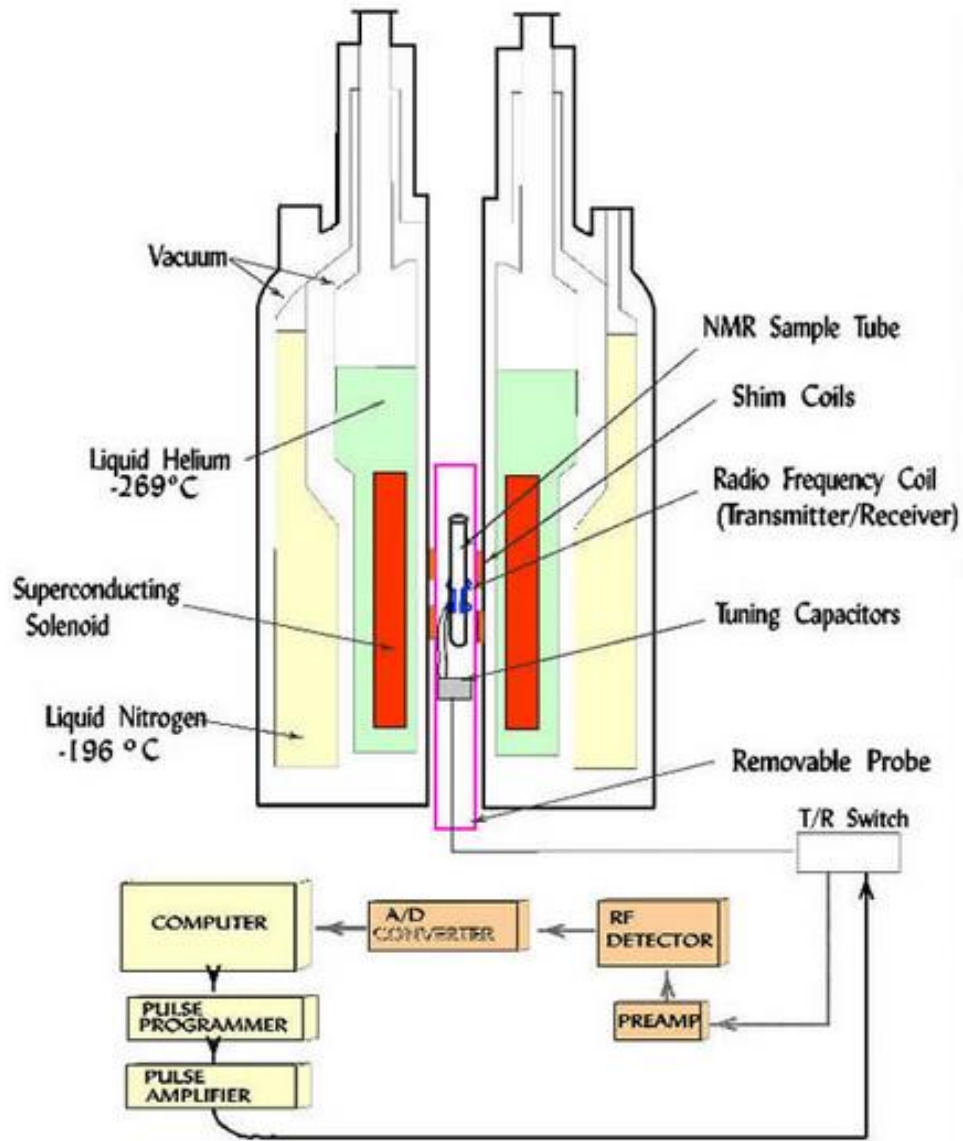
Ένταση μαγνητικού πεδίου

0.2 - 3 Tesla

Συχνότητα συντονισμού πυρήνων ^1H

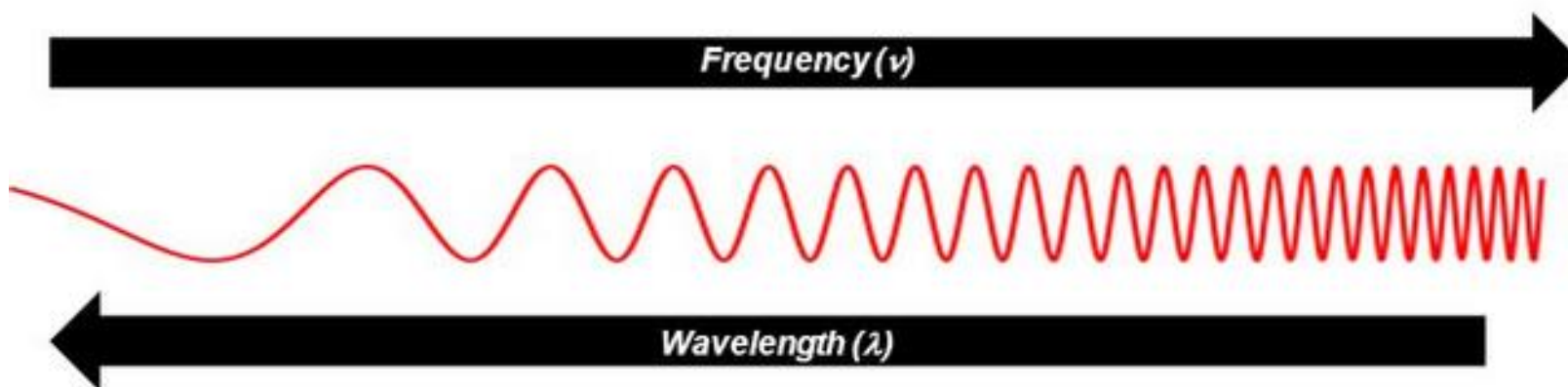
8.5 MHz – 127,7 MHz

Γήινο μαγνητικό πεδίο 25 – 65 μT



Regions of Electromagnetic Spectrum

| | Radio-waves Region | Microwaves Region | Infra-red Region | Visible Region | Ultra-violet Region | X-ray Region | γ -ray Region |
|----------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|
| Frequency (HZ) | $10^6 - 10^{10}$ | $10^{10} - 10^{12}$ | $10^{12} - 10^{14}$ | $10^{14} - 10^{15}$ | $10^{15} - 10^{16}$ | $10^{16} - 10^{18}$ | $10^{18} - 10^{20}$ |
| Wavelength | 10m – 1 cm | 1 cm – 100 μ m | 100 μ m – 1 μ m | 700 – 400 nm | 400-10 nm | 10nm – 100pm | 100pm – 1 pm |
| | (NMR, ESR) | Rotational Spectroscopy | Vibrational spectroscopy | Electronic Spectroscopy | Electronic Spec. | | |
| Energy | 0.001 – 10 J/mole | Order of some 100 J/mole | Some 10^4 J/mole | Some 100 kJ/mole | Some 100s kJ/mole | $10^7 - 10^9$ J/mole | $10^9 - 10^{11}$ J/mole |



- Το spin (**ιδιοστροφορμή**) αποτελεί ένα είδος “εσωτερικής ή εγγενούς” στροφορμής των στοιχειωδών σωματιδίων.

Τα φερμιόνια (e^- , p^+ και n) χαρακτηρίζονται από ημιακέραιο spin ($=1/2$)

- **Περισσότες αρ. p^+ ή/και $n \rightarrow I$ (πυρηνικό spin) $\neq 0 \longrightarrow$ μαγνητικά ενεργοί πυρήνες**

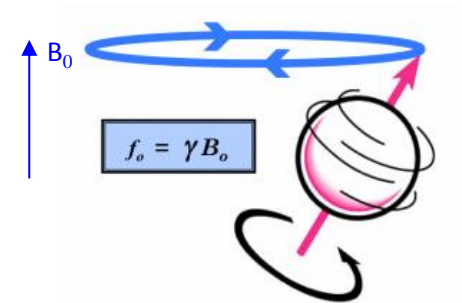
^1H ($I=1/2$), ^{13}C ($I=1/2$), ^{31}P ($I=1/2$), ^{15}N ($I=1/2$), ^2H ($I=1$),

- Κλασσική Φυσική: Φορτισμένο σωματίο σε περιστροφική κίνηση συμπεριφέρεται σαν ένας μικρός μαγνήτης
- Κβαντική Φυσική: Φορτισμένο σωματίο με εσωτερική στροφορμή συμπεριφέρεται ως ένα μικροσκοπικό μαγνητικό δίπολο, εμφανίζοντας “εσωτερική μαγνητική διπολική ροπή” (intrinsic magnetic moment).

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \hbar \mathbf{I} \quad \gamma = \text{γυρομαγνητικός λόγος}$$

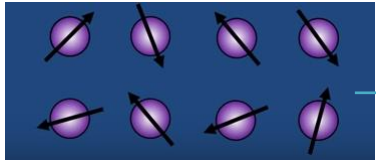
Συνέπεια: Εντός μαγνητικού πεδίου \mathbf{B}_0 , το άνυσμα της μαγνητικής ροπής του εξαναγκάζεται σε μεταπτωτική κίνηση γύρω από τη διεύθυνση \mathbf{B}_0 (Larmor precession) με συχνότητα χαρακτηριστική για κάθε είδος πυρήνα (συχνότητα Larmor)

(Μηχανικό ανάλογο: η κίνηση της σβούρας υπό την επίδραση της βαρύτητας)



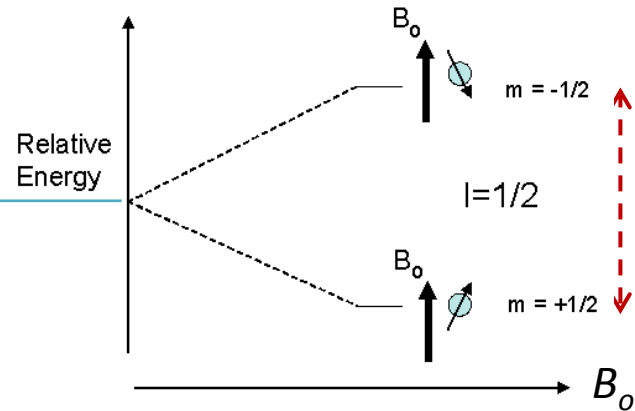
Απουσία μαγνητικού πεδίου:

Τυχαίος προσανατολισμός των μαγνητικών διπολικών ροπών. Όλοι οι προσανατολισμοί ίσης ενέργειας

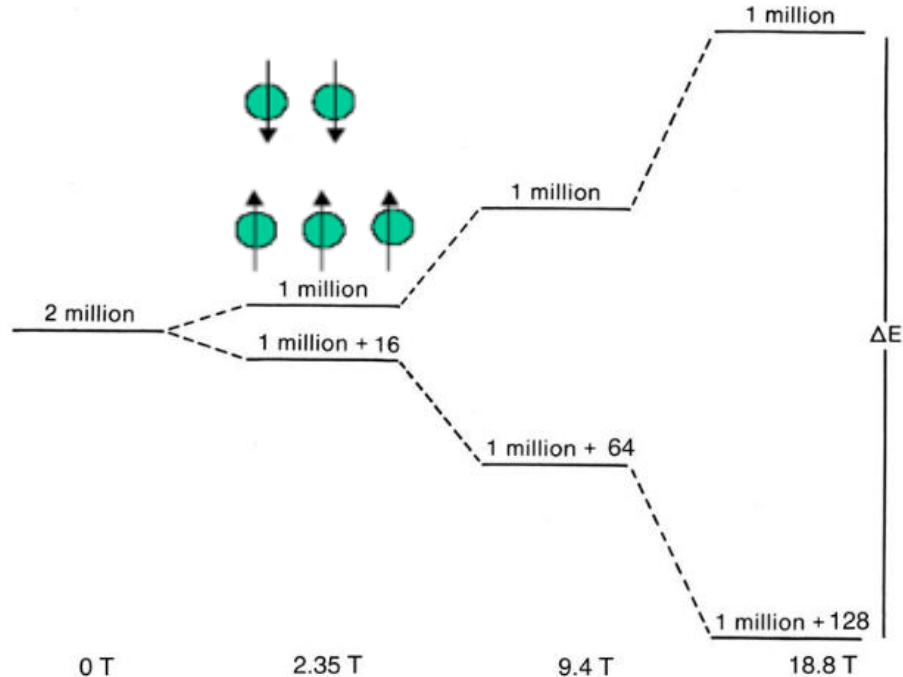


Εφαρμογή μαγνητικού πεδίου:

Τα επίπεδα της ενέργειας διαχωρίζονται σε (2l+1) στάθμες



$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = \hbar \omega_0 = h \nu_0$
 $\omega_0 = |\gamma| B_0$ συχνότητα Larmor

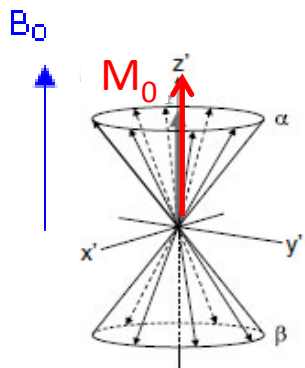


Το φαινόμενο NMR οφείλεται σε ένα πολύ μικρό πληθυσμιακό πλεόνασμα της χαμηλότερης ενεργειακής στάθμης $\sim B_0$

Κατανομή Boltzmann

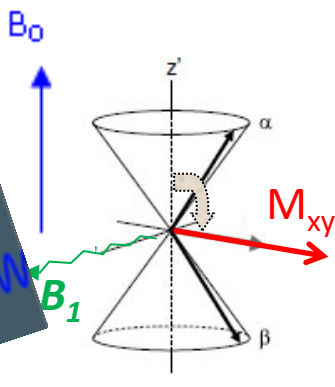
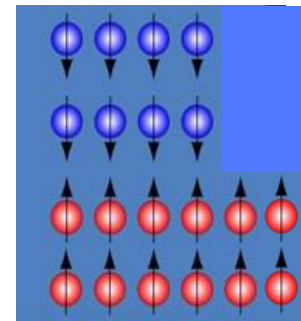
$$\frac{N_{upper}}{N_{lower}} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} = e^{\frac{-\hbar \omega}{kT}}$$

NMR at a glance...

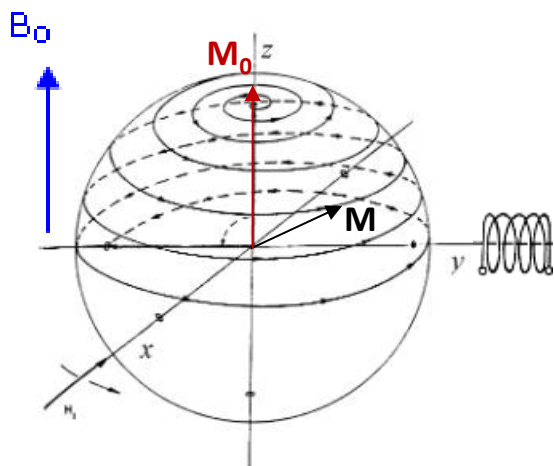
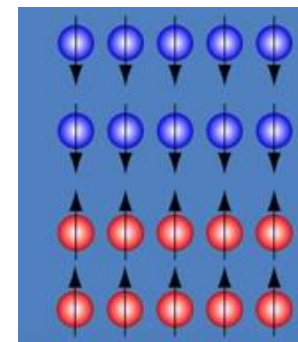


Πληθυσμός σε θερμική ισορροπία

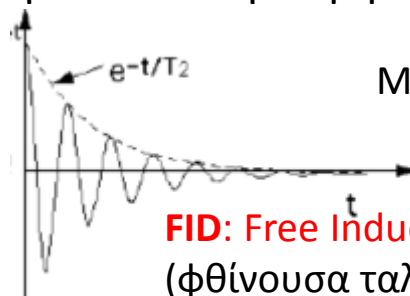
Εμφάνιση μακροσκοπικής μαγνήτισης κατά μήκος του B_0 λόγω του ελαφρώς πλεονάζοντα πληθυσμού της βασικής στάθμης



Διέγερση: Εφαρμογή RF παλμού επάγει H/M πεδίο και εφόσον η συχνότητα του H/M πεδίου ταυτίζεται ακριβώς με τη συχνότητα Larmor ο πληθυσμός των δύο ενεργειακών σταθμών εξισώνεται.

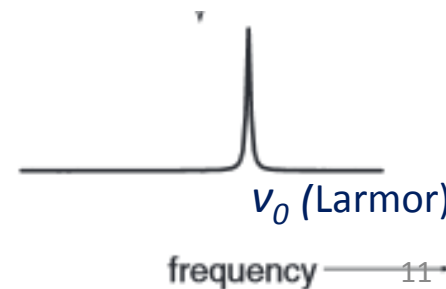


Εφησυχασμός: Με την παύση H/M ακτινοβολίας το σύστημα επιστρέφει στην αρχική του κατάσταση. Η ενέργεια που έχει απορροφηθεί εκπέμπεται και ανιχνεύεται μέσω της τάσης που επάγεται σε συγκεκριμένα πηνία.



FID: Free Induction Decay
(φθίνουσα ταλάντωση)

Μετασχ. Fourier

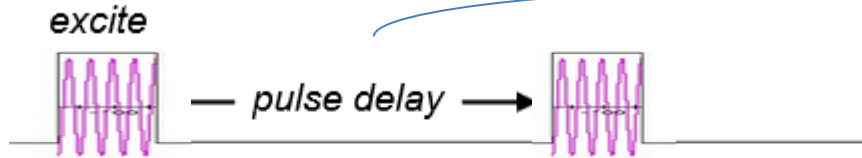




The Typical Pulsed NMR Experiment

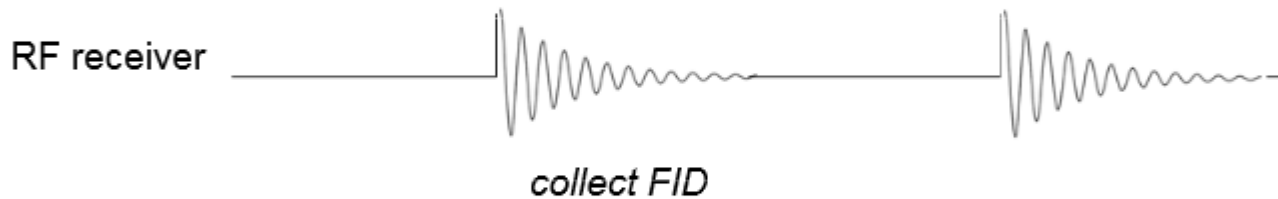
Διέγερση:

Παλμός διαμορφωμένος από τη συχνότητα συντονισμού των πυρήνων
(=συχν. Larmor ~ RF)

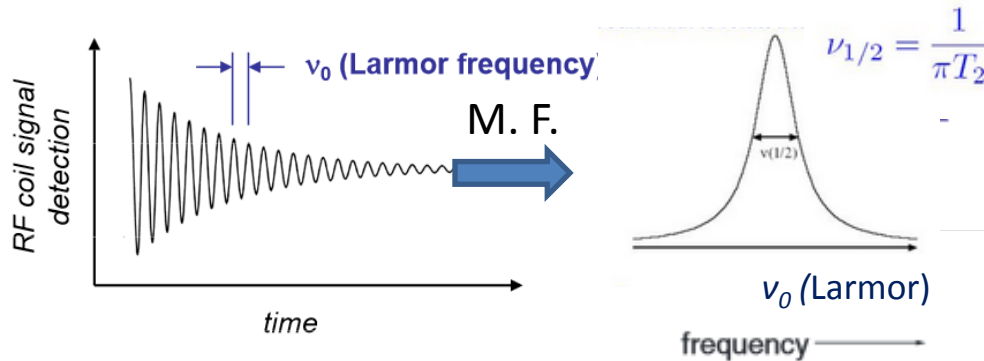


Αποδιέγερση:

Παύση παλμού και εφησυχασμός πυρήνων
Εκπομπή ενέργειας που έχει απορροφηθεί υπό τη μορφή της FID



The Free Induction Decay



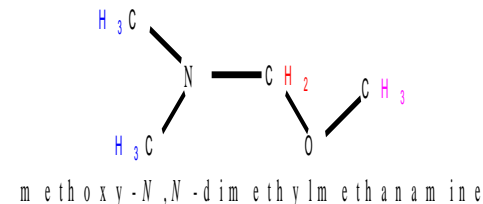
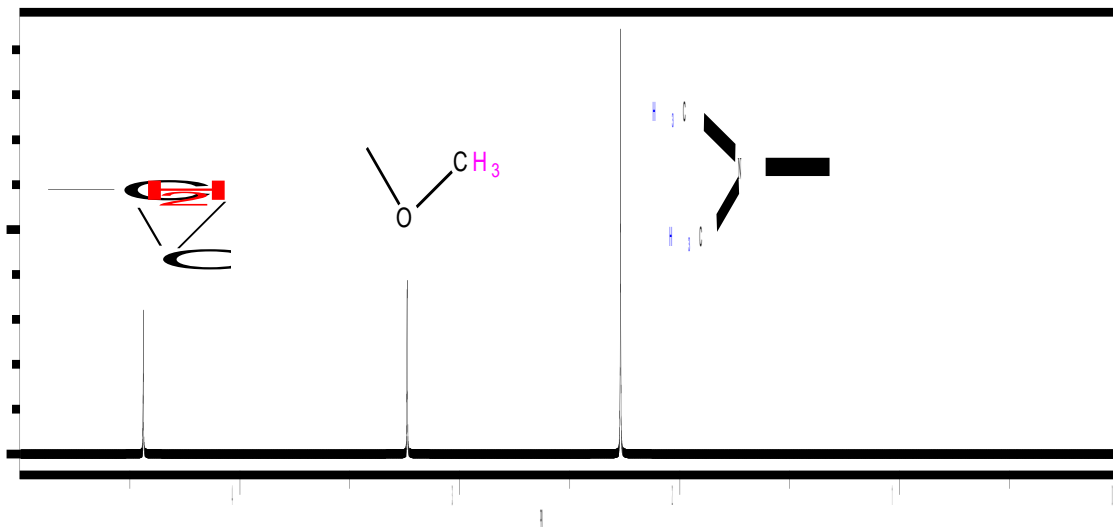
Το ημίσειο εύρος της φασματικής κορυφής είναι $1 / \pi T_2 \sim 1/\tau_c$
 τ_c (*rotational correlation time*): ο χρόνος που απαιτείται για την περιστροφή του μορίου κατά 1 radian και εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου

Μεγάλα βιομόρια $\rightarrow \tau_c \gg \gg \rightarrow T_2 \gg$
 \rightarrow άρα φασματικές γραμμές πολύ διευρυμένες

Μικρά μόρια $\rightarrow \tau_c \ll \ll \rightarrow T_2 \ll$
 \rightarrow άρα φασματικές γραμμές πολύ στενές

Το αναλογικό σήμα (κυματοσυνάρτηση στο πεδίο του χρόνου) μετασχηματίζεται κατά Fourier αποδίδοντας το φάσμα στο πεδίο συχνοτήτων.

Πληροφοριακό περιεχόμενο φάσματος ^1H NMR



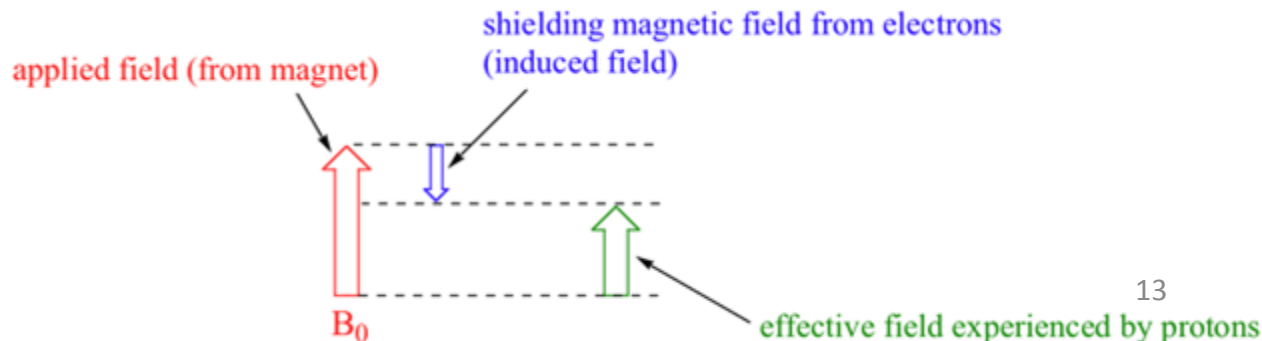
σημάτων \rightarrow # διαφορετικών τύπων H (χημικά ισοδύναμα)

2: 3: 6 Ολοκλήρωση \rightarrow # H σε κάθε σήμα

Χημική μετατόπιση φασματικής κορυφής: εξάρτηση από το ηλεκτρονικό περιβάλλον του πυρήνα

← αποθωράκιση πυρήνα (>> χημική μετατόπιση)

Θωράκιση πυρήνα (<< χημική μετατόπιση) →

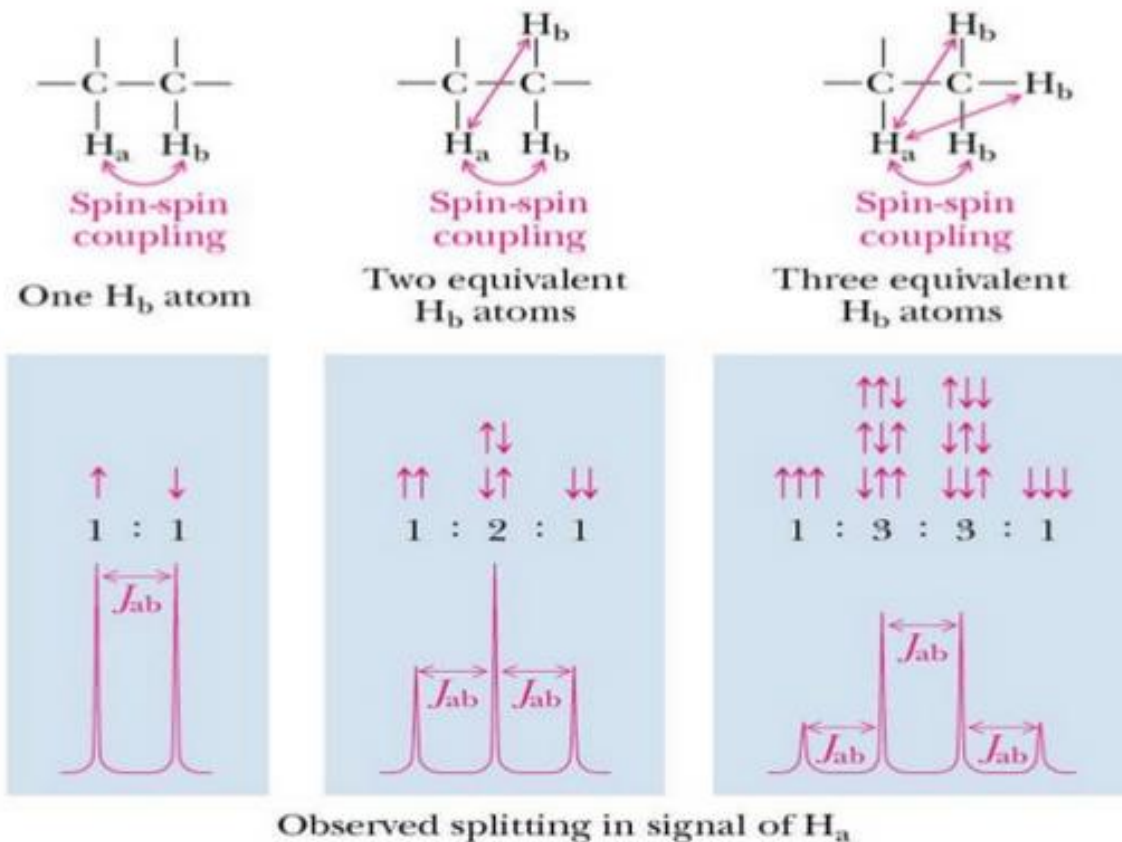


Πληροφοριακό περιεχόμενο φάσματος ^1H NMR

- splitting pattern ανάλογα με τον αριθμό γειτονικών H

J σύζευξη (βαθμωτή ή spin-spin) ή J^3_{HH} σύζευξη : μη ισοδύναμα H σε γειτονικά άτομα C

Πυρήνες έως τρεις δεσμούς μακριά μπορούν να επηρεάσουν ο ένας το τοπικό μαγνητικό πεδίο που "αισθάνεται" ο άλλος λόγω του διαφορετικού προσανατολισμού των spins με αποτέλεσμα τη διάσχιση των κορυφών συντονισμού. Η πληροφορία μεταφέρεται από τα δεσμικά ηλεκτρόνια. (κανόνας n+1)



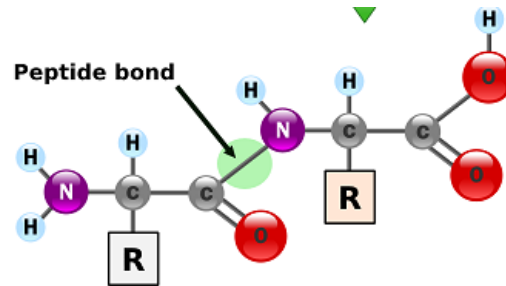


^1H NMR too complicated? \rightarrow overlap

χ -Conopeptide MrIA is a 13-residue peptide (NGVCCGYKLCHOC)

isolated from the venom of marine snail *Conus Marmoreus*.

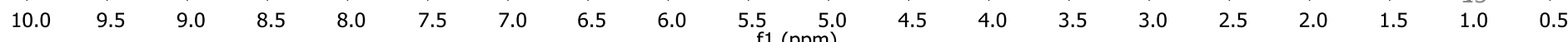
χ -MrIA has been found to inhibit the norepinephrine transporter (NET) with potential applications in the treatment of pain.



^1H αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων
H₂O

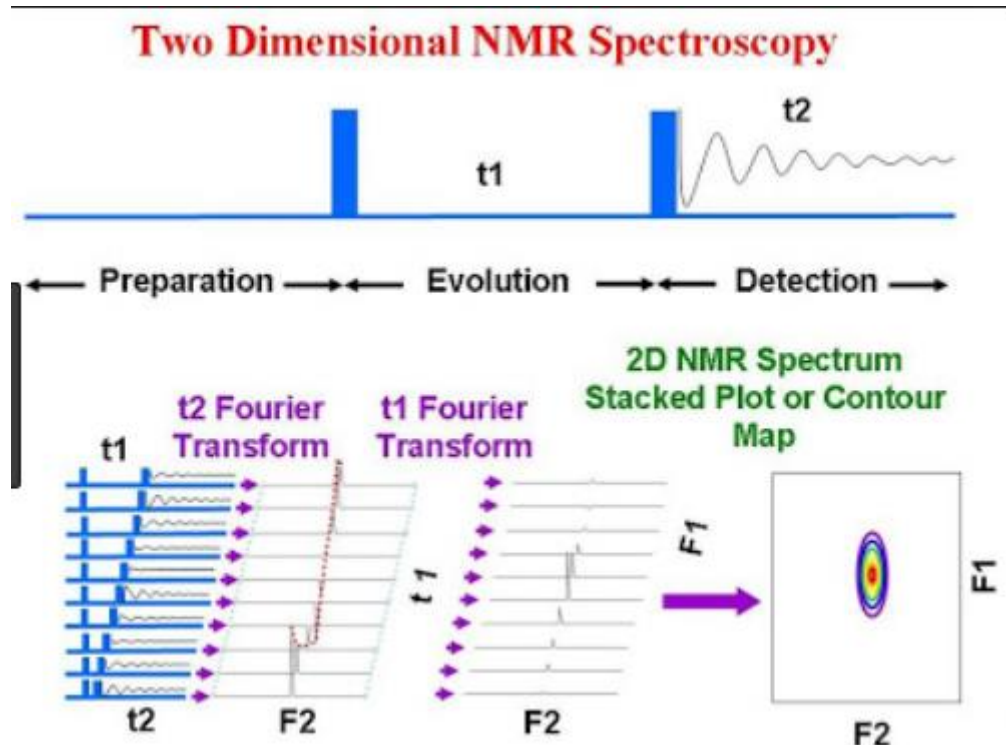
Αμιδικά πρωτόνια NH σκελετού & αρωματικά ^1H πλευρικών αλυσίδων

H α

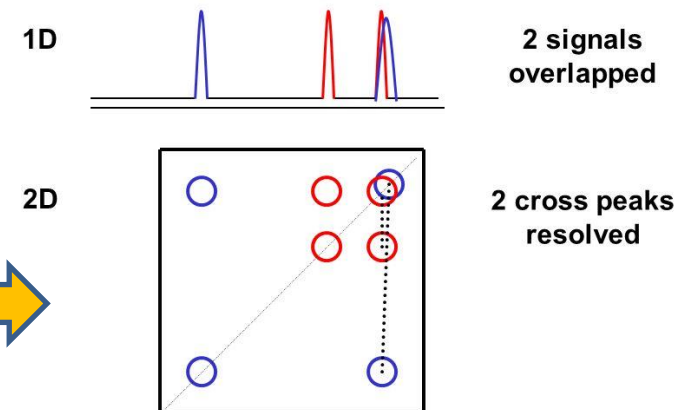




Εισαγωγή 2^{ης} διάστασης 2D-NMR



Η εισαγωγή 2^{ης} διάστασης θα βοηθήσει στη διεκρίνιση αλληλεπικαλυπτόμενων φασματικών κορυφών



Συλλέγεται μια σειρά FIDs κατά τη χρονική περίοδο t_2 ως συνάρτηση του χρόνου εξέλιξης, $t_1 \rightarrow S(t_1, t_2)$

(κατά τη μεταβλητή αυτή χρονική περίοδο t_1 , οι πυρήνες αφήνονται να αλληλεπιδράσουν)

Κάθε μία από αυτές τις FIDs μετασχηματίζεται κατά Fourier ως προς t_2 δίνοντας ένα σύνολο 1D NMR φασμάτων $\rightarrow S(t_1, F_2)$.

Αυτή η σειρά φασμάτων έχει κωδικοποιησει τι συνέβη κατά την περίοδο εξέλιξης.

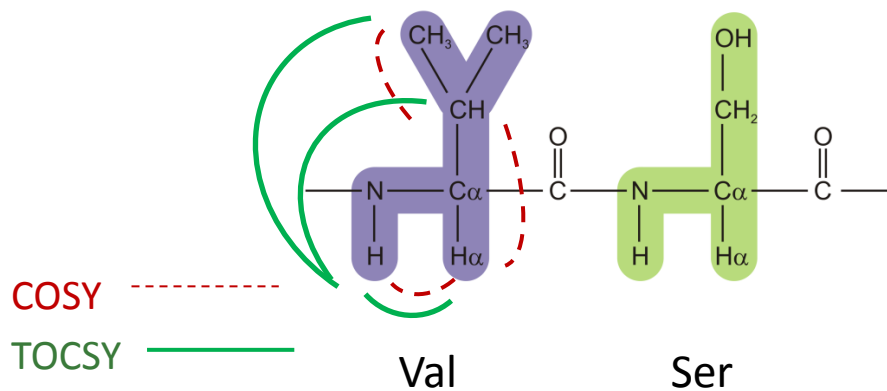
Η πληροφορία αποκωδικοποιείται κάνοντας ένα δεύτερο Μετασχ. Fourier ως προς την περίοδο εξέλιξης, t_1 .

Λαμβάνεται ένας τοπογραφικός χάρτης $S(F_1, F_2)$ συσχετίζοντας τις αν/χες φασματικές κορυφές.



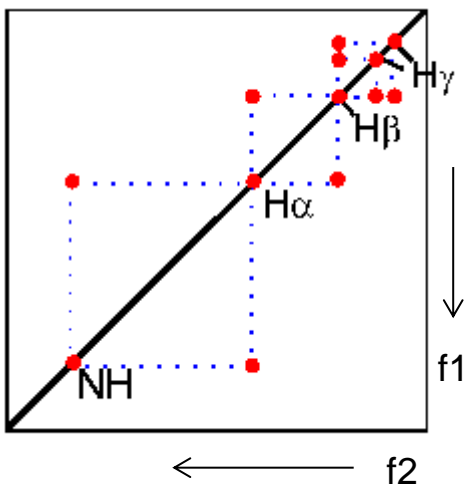
2D φασματοσκοπία NMR ως εργαλείο για την επίλυση δομής

Η διέγερση μεταφέρεται μέσω των δεσμών κατά μήκος της αμινοξικής ακολουθίας ενώ η παρουσία του καρβονυλικού άνθρακα του αμιδικού δεσμού, ο οποίος δεν περιλαμβάνει πρωτόνιο λειτουργεί ως διακόπτης



2D COSY (COrrelation SpectroscopY)

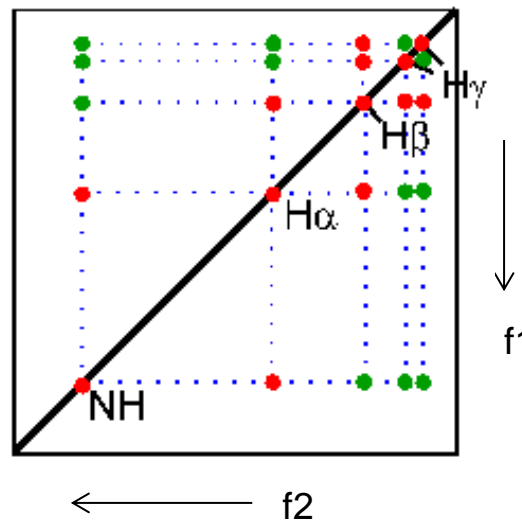
Συσχετίζει εκτός διαγωνίου τα ^1H με J^3_{HH} σύζευξη



2D ^1H - ^1H COSY φάσμα της Val

2D TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

Συσχετίζει όλους τους πυρήνες ^1H του αμινοξέος (ίδιο spin system) αρκεί να υπάρχει J^3_{HH} σύζευξη μεταξύ τους (να μην διακόπτεται το spin system από τεταρτοταγείς ^{13}C).



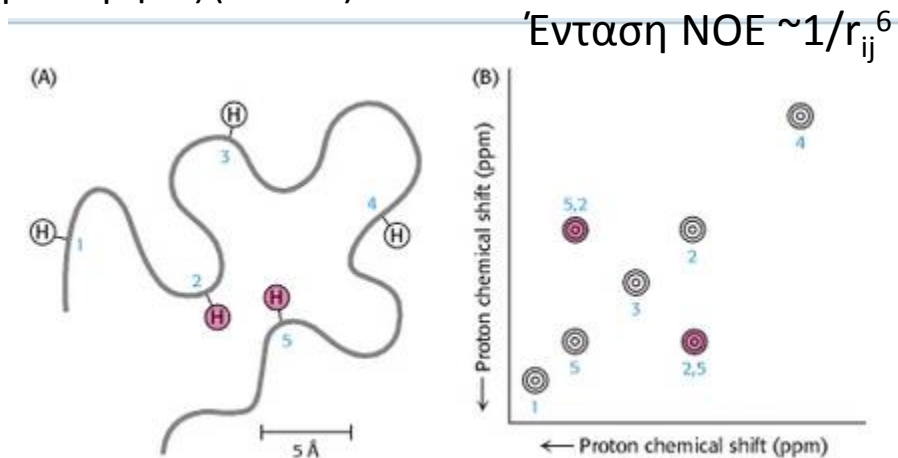
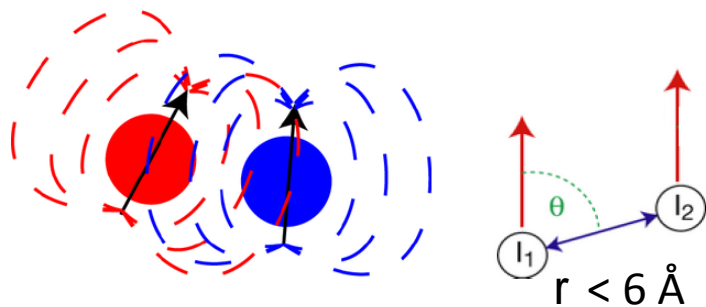
2D ^1H - ^1H TOCSY φάσμα της Val



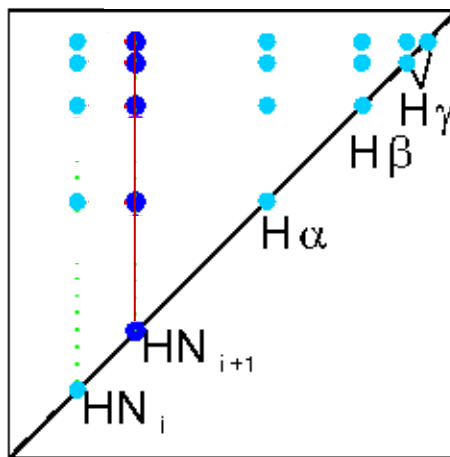
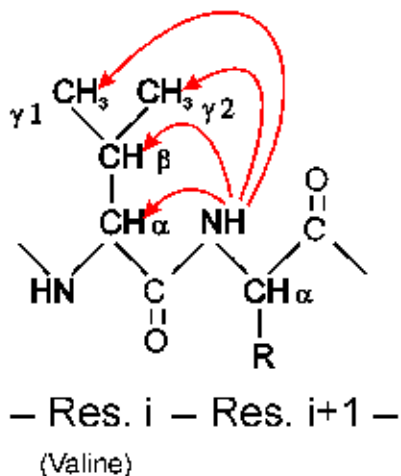
2D φασματοσκοπία NMR ως εργαλείο για την επίλυση δομής

Nuclear Overhauser Effect (NOE) φαινόμενο

Διπολική σύζευξη: Αλληλεπίδραση πυρήνων μέσω χώρου, δίνει πληροφορίες για την χωρική εγγύτητα των δυο πυρήνων. Λόγω της μαγνητικής διπολικής ροπής του, κάθε πυρήνας παράγει ένα μαγνητικό πεδίο, το οποίο επηρεάζει το μαγνητικό πεδίο που «αισθάνονται» οι κοντινοί του στο χώρο πυρήνες ($r < 6 \text{ \AA}$)



Dipeptide Fragment

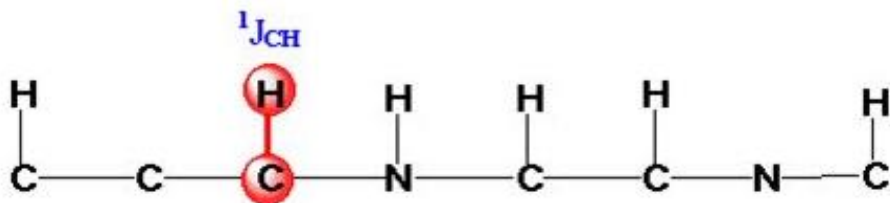


TOCSY
NOESY

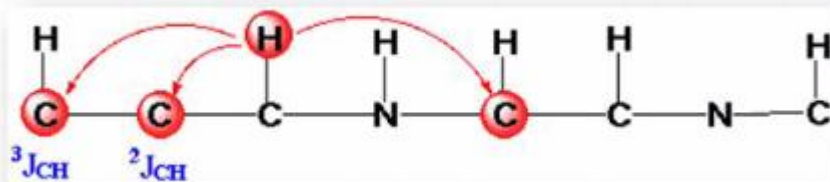


2D φασματοσκοπία NMR ως εργαλείο για την επίλυση δομής

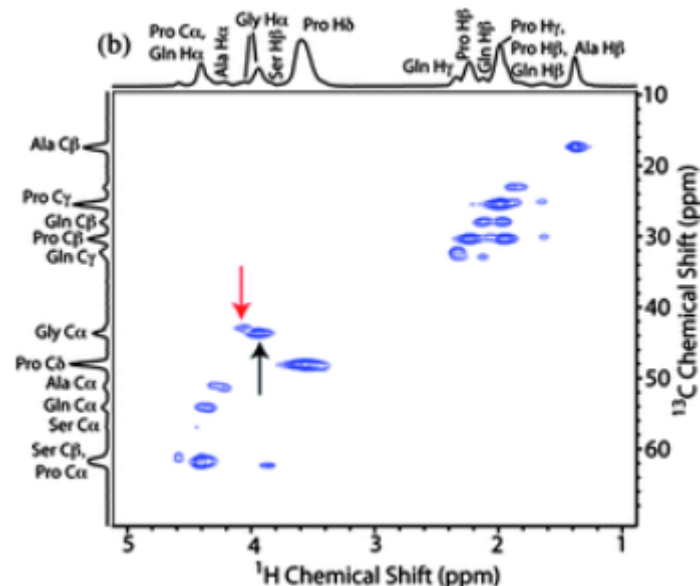
Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία



2D 1H - ^{13}C HSQC
(Heteronuclear Single-Quantum Correlation)



2D 1H - ^{13}C HMBC
(Heteronuclear Multiple Bond Correlation)



Διαδικασία ανάπτυξης νέου φαρμάκου και εργαλεία επίσπευσης των αρχικών σταδίων



Διαδικασία ανάπτυξης νέου φαρμάκου και εργαλεία επίσπευσης των αρχικών σταδίων

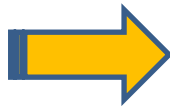
Αναγνώριση
Στόχου
target
identification

hit screening
(100 nM–5 μM)
lead identification
(nM)

Βελτιστοποίηση
ένωσης-οδηγού
(lead
optimization)



Σαφής διασύνδεση
στόχου*-ασθένειας



- Gene expression profiling: Genomics
- Focused Proteomics
- Metabolic pathways analysis: Molecular Biology
- Phenotypic analysis
- Genetic association

Κλωνοποίηση

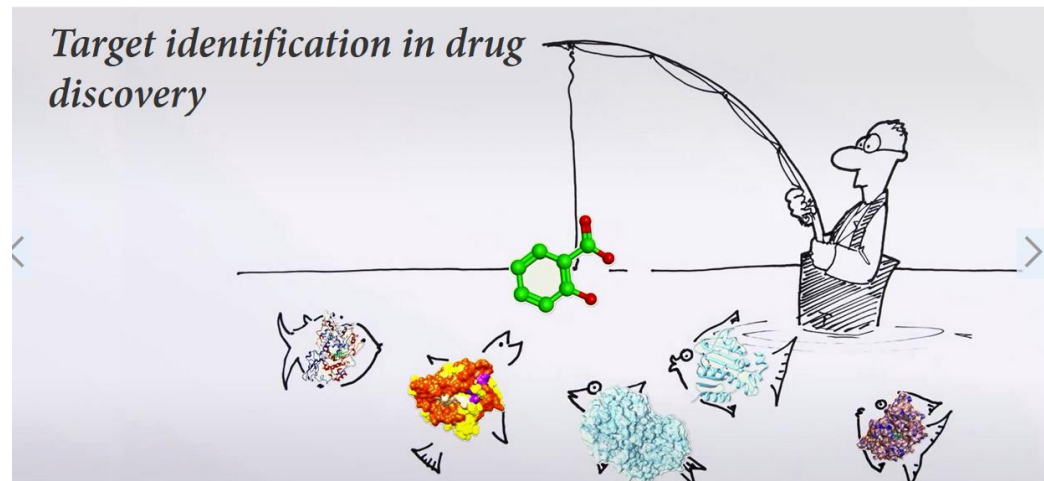
Έκφραση

3D δομή (x-ray, NMR)

Επιβεβαίωση

Στόχου (π.χ. Knockout
Κυτταρικά μοντέλα)

*Ενας στόχος φαρμάκου (druggable target) είναι μία πρωτεΐνη, πεπτίδιο ή νουκλεϊνικό οξύ, η δράση του οποίου μπορεί να διαμορφωθεί από ένα φάρμακο (μικρού MW μόριο ή βιολογικό μόριο όπως αντίσωμα ή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη)

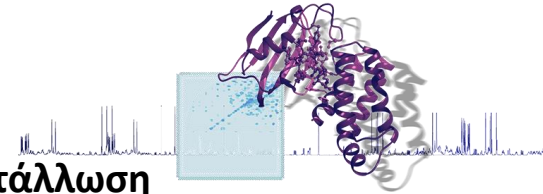


Γιατί χρειάζεται να διευκρινιστεί η 3D δομή (στερεοδιάταξη ή δευτεροταγής δομή) του πρωτεϊνικού στόχου?

(η αλληλουχία των αμινοξέων στην πρωτεΐνη -πρωτοταγής δομή- είναι γνωστή)

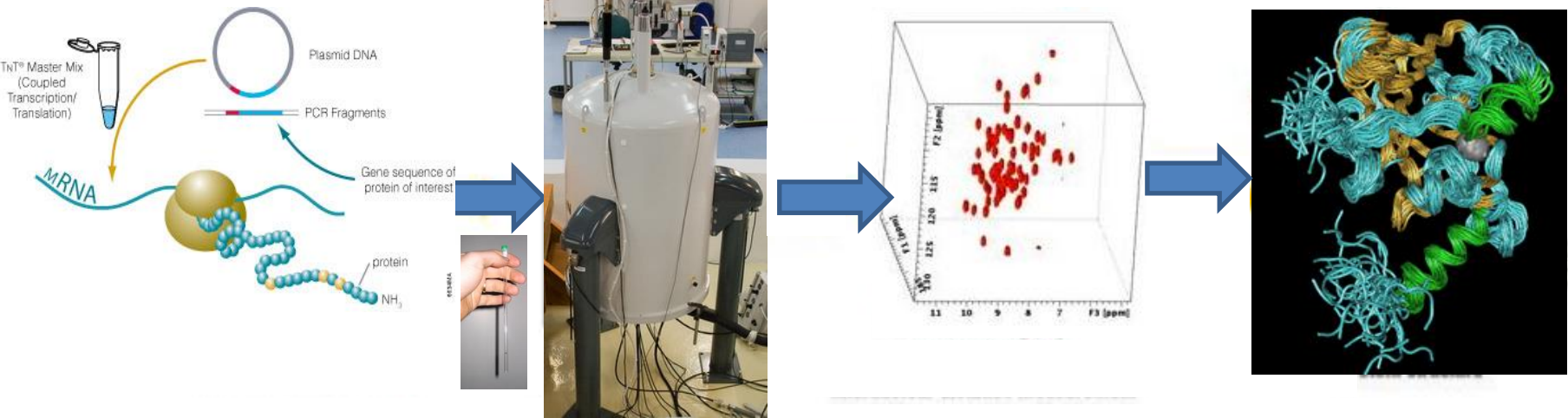
- Η επίσπευση των αρχικών σταδίων ανάπτυξης ενός φαρμάκου απαιτεί τον ορθολογικό σχεδιασμό ligands που θα προσδένουν στο ενεργό κέντρο του πρωτεϊνικού στόχου και εν δυνάμει θα διαμορφώνουν τη δράση του προκαλώντας το επιθυμητό αποτέλεσμα

Και γιατί χρειάζεται να διευκρινιστεί η 3D δομή του πρωτεϊνικού στόχου με NMR?



- Δεν υπάρχει κρυσταλλική δομή ή/και είναι δύσκολη η κρυστάλλωση
- Μελέτη δυναμικής συμπεριφοράς πρωτεΐνης σε συνθήκες που προσομοιάζουν το βιολογικό περιβάλλον
 - διαμορφωτικές αλλαγές
 - αναδίπλωση,
 - δομή της πρωτεΐνης στο διαλύτη πιθανά διαφέρει από την κρυσταλλική π.χ. διμερισμός παρουσία βιοδραστικού μορίου
 - Δυνατότητα ανάλυσης δομής σε μικυλλιακό περιβάλλον (Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες)
- Δομικά τμήματα της πρωτεΐνης με αυξημένη διαμορφωτική ευελιξία δεν είναι παρατηρήσιμα με x-ray. Το NMR μπορεί να δώσει τη δυναμική πληροφορία που σχετίζεται με τις περιοχές αυτές
- In-cell NMR (πληροφορία για την πρωτεΐνη μέσα σε περιβάλλον ζωντανού κυττάρου)
Διεργασίες όπως η αναδίπλωση της πρωτεΐνης, η πρόσδεση μετάλλων, η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών καταγράφονται σε ατομικό επίπεδο

Τυπική πορεία διεκκρίνησης 3D δομής πρωτεϊνικού στόχου με NMR



Υπερέκφραση σε βακτηριακές καλλιέργειες (χρήση επισημασμένων θρεπτικών υλικών) ^{15}N , ^{13}C ισοτοπική επισήμανση της πρωτεΐνης και με ^2H (MW>20 kDa)

300-600 μL διάλυμα

0,1-3 mM πρωτεΐνης σε buffer

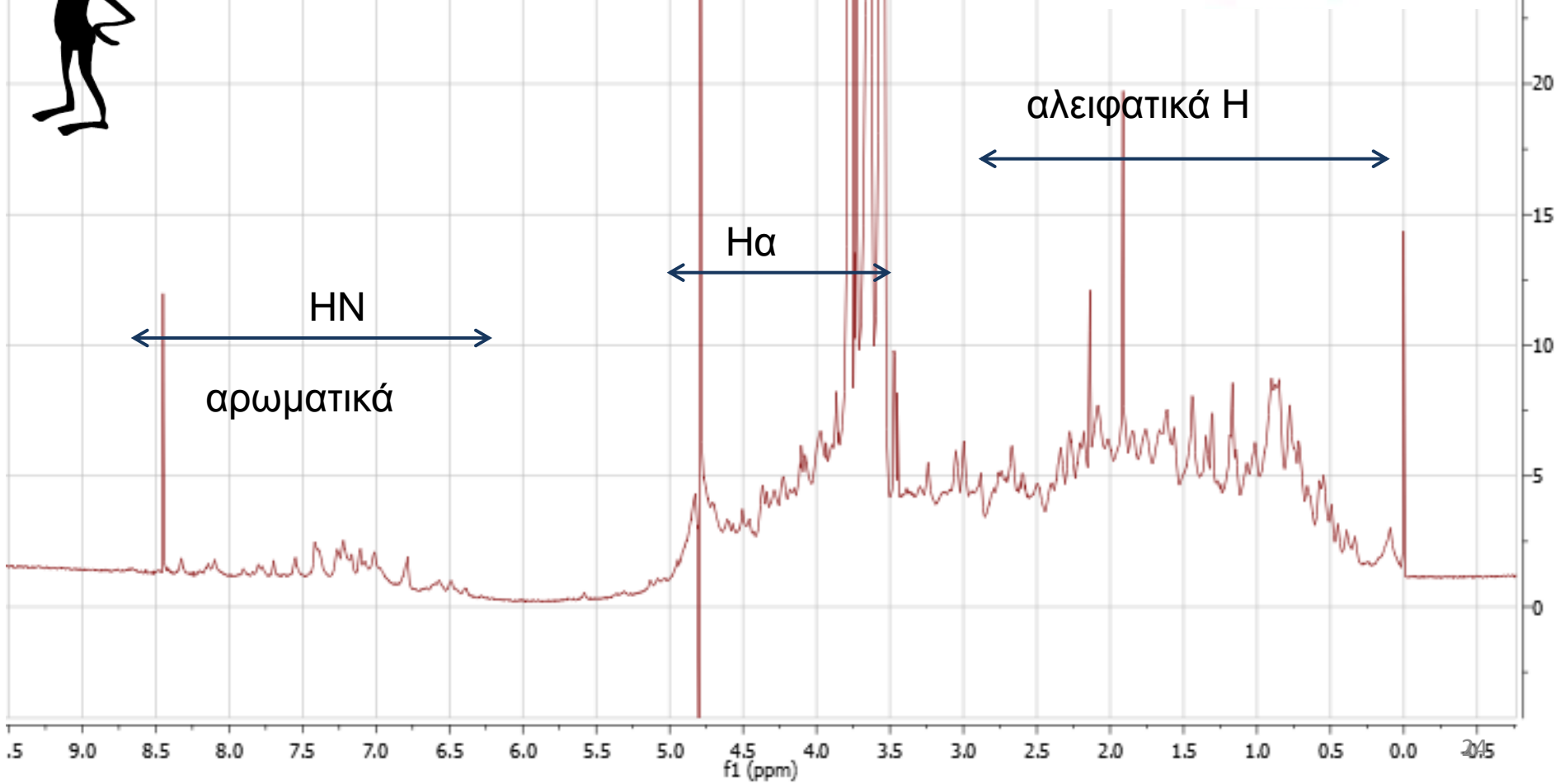
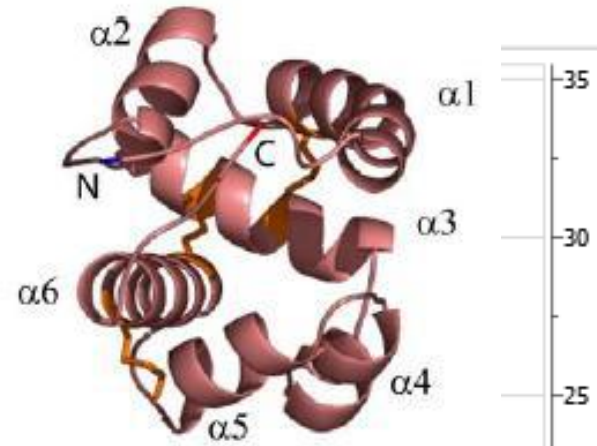
2D και 3D πειράματα NMR για τη χαρτογράφηση της αμινοξικής ακολουθίας (NMR resonance assignment) και τη μέτρηση ενδοατομικών αποστάσεων (NOESY NMR) ~50 kDa το όριο προσδιορισμού δομής

Επίλυση της 3D δομής με μελέτες Μοριακής Δυναμικής (Οι ενδοατομικές αποστάσεις τίθενται ως περιοριστικοί παράγοντες προκειμένου να περιοριστεί η διαμορφωτική ευελιξία της πρωτεΐνης και να ληφθεί η σωστή αναδίπλωση) 23

Πρωτεΐνη OBP1 - οσφρητική
πρωτεΐνη κουνουπιού
Anopheles gambiae, φορέα της
ελονοσίας (125 αα - 14,5 kDa)
 ^{15}N , ^{13}C επισημασμένη



Too complicated-strong overlap

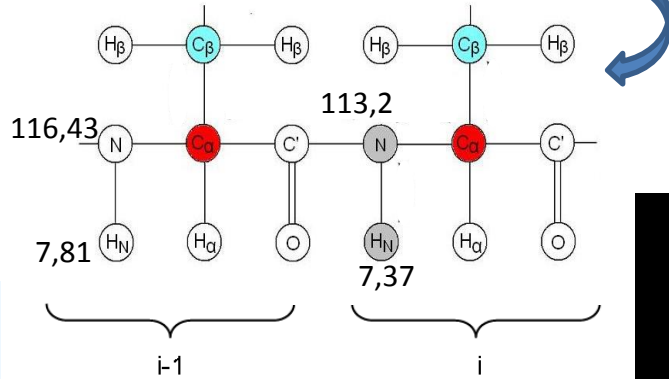




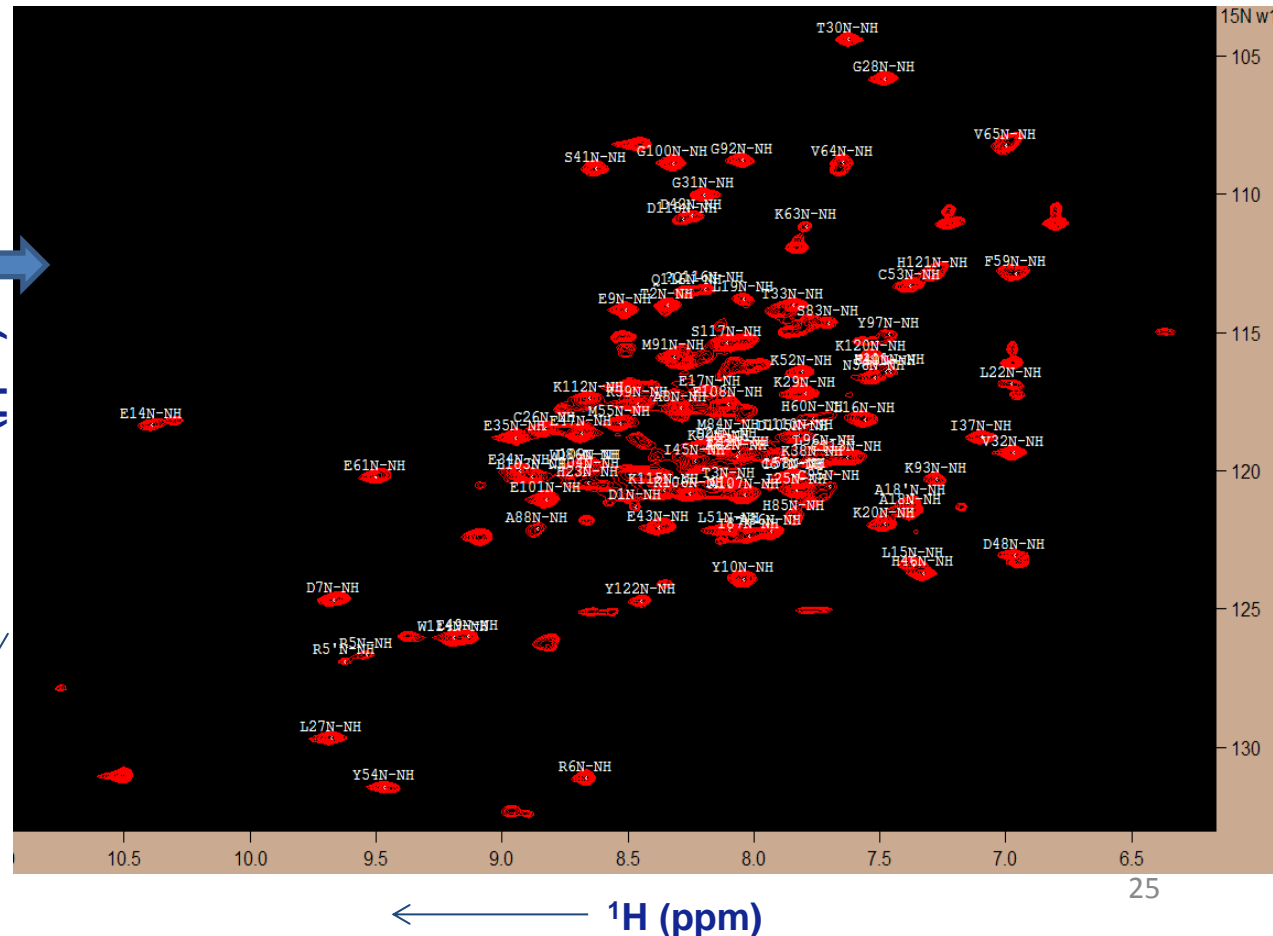
2D φασματοσκοπία NMR

^1H - ^{15}N -HSQC (2D) το πλέον βασικό πείραμα

διευκρινίζουμε τις χημικές μετατοπίσεις των αμινομάδων (N, H_N) κατά μήκος του σκελετού



Πρωτεΐνη OBP1 *A. gambiae* (^{15}N -HSQC map, 117 traces)



Το κάθε ίχνος αντιστοιχεί σε μία αμινομάδα του σκελετού ή των πλευρικών αλυσίδων

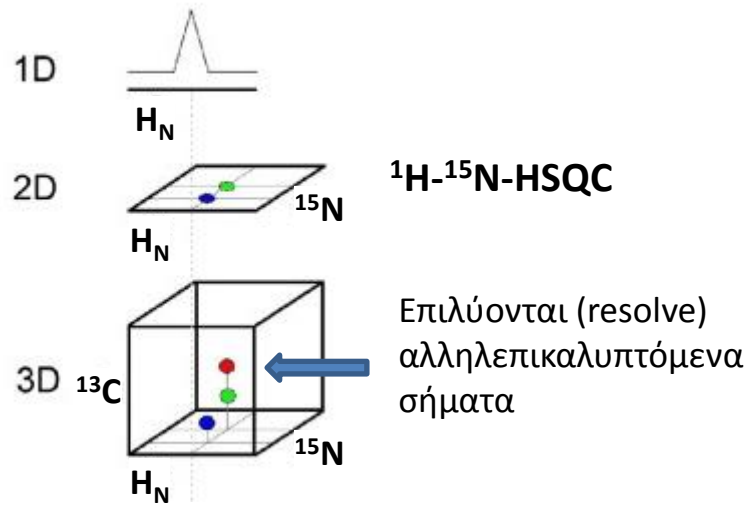


too complex...
για assignment
Πολλά αλληλεπικαλυπτόμενα ίχνη

Η χαρτογράφηση απαιτεί 3D πειράματα

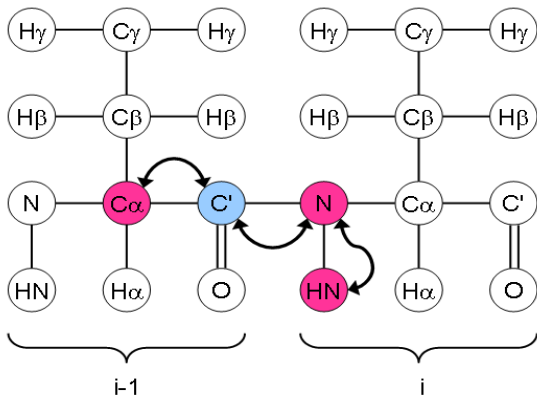


Προσθήκη τρίτης διάστασης (^{13}C)



Για παράδειγμα το ακόλουθο 3D πείραμα

HN(CO)CA (3D)



Συσχετίζει το αμιδικό πρωτόνιο H_N του i - αμινοξέως με το γειτονικό πυρήνα ^{15}N και τον C_α πυρήνα του προηγούμενου αμινοξέως $i-1$ (οι πυρήνες που εικονίζονται με ροζ χρώμα.)

Η παρένθεση υποδηλώνει ότι η διέγερση μεταφέρεται μόνο μέσω του καρβονυλικού ^{13}C στο C_α

του προηγούμενου αμινοξέως $i-1$

Η πορεία μεταφοράς της διέγερσης

και κατ' επέκταση οι πυρήνες που συσχετίζονται καθορίζεται από την παλμοσειρά που χρησιμοποιείται με βάση τις συζεύξεις μεταξύ των πυρήνων

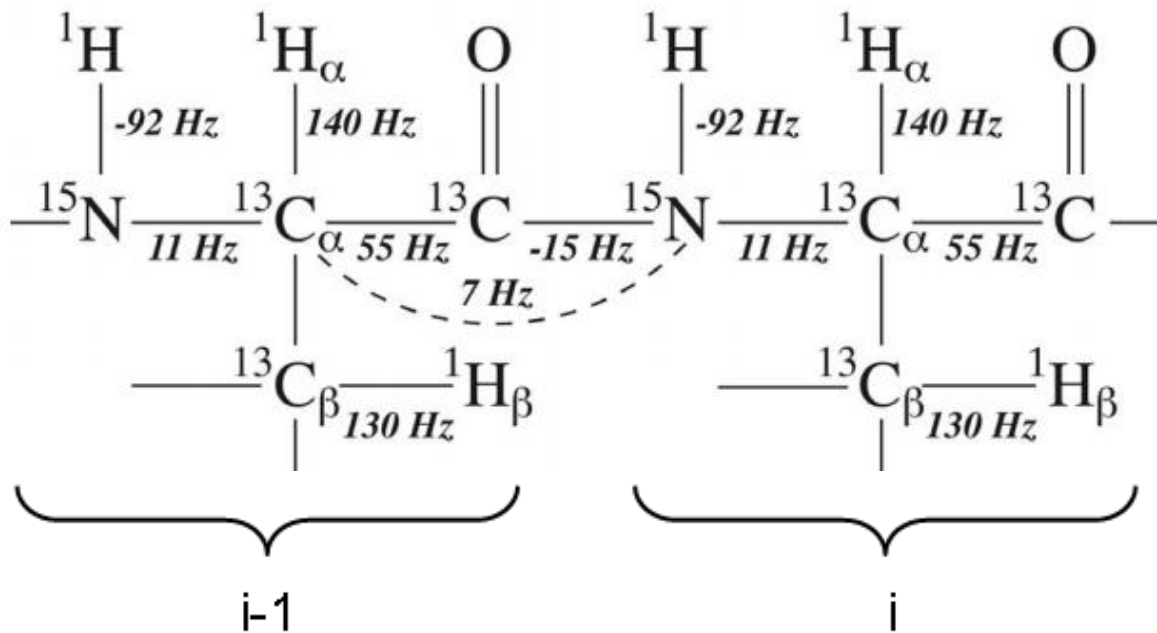
→ βλ. επόμενη διαφάνεια



Τα nD πειράματα ($n>1$) στο βιομοριακό NMR «χτίζονται» με βάση την τιμή της βαθμωτής σύζευξης J των πυρήνων που θέλουμε να συσχετίσουμε.

Οι επιμέρους τιμές καθορίζουν το μονοπάτι μεταφοράς της διέγερσης στους πυρήνες ενδιαφέροντος μέσω αντίστοιχων χρονικών περιόδων εξέλιξης που εισέρχονται στις παλμοσειρές του κάθε πειράματος

1J and 2J Couplings in Proteins



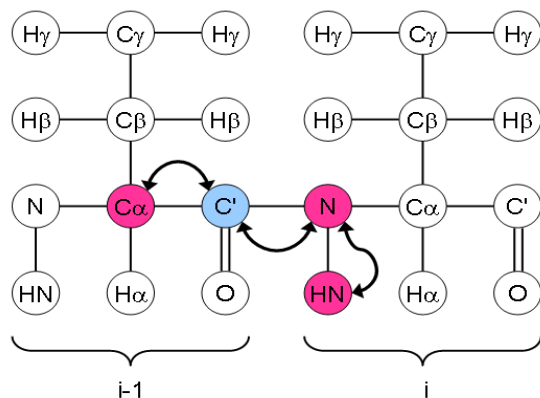
Αλληλουχία 2 γειτονικών αμινοξέων $i-1, i$



Συνδυασμός inter- και (inter- and intra-) 3D πειραμάτων για την ταυτοποίηση του σκελετού της αμινοξικής ακολουθίας (backbone sequential assignment)
→ μόνο έτσι μπορώ να ταυτοποιήσω τα άτομα του σκελετού του κάθε αμινοξέως και να τα συνδέσω με τα άτομα του γειτονικού αμινοξέως ώστε να «βαδίσω» κατά μήκος της πρωτεΐνης

Inter-residue connections

διαμοιοξικές συσχετίσεις
HN(CO)CA (3D)

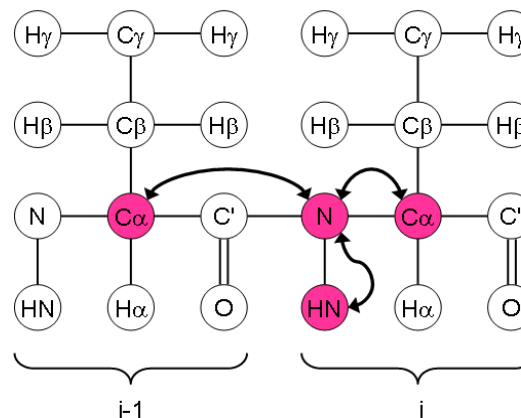


Συσχετίζει το H_N του i- αμινοξέως με το γειτονικό πυρήνα ^{15}N και τον C_α πυρήνα του προηγούμενου αμινοξέως i-1

Inter- and intra-residue connections

ενδοαμινοξικές & διααμινοξικές συσχετίσεις

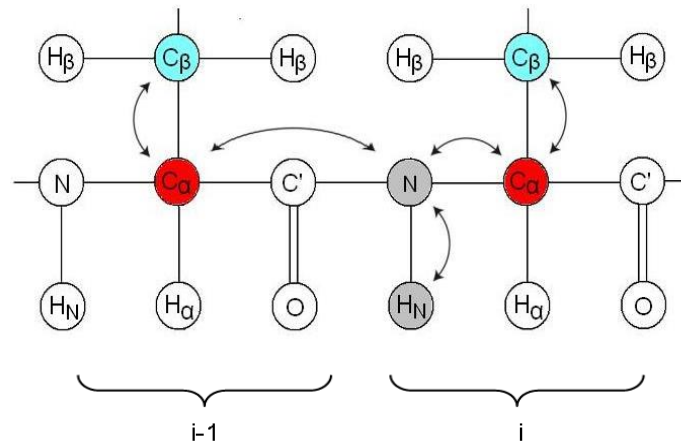
HNCA (3D)

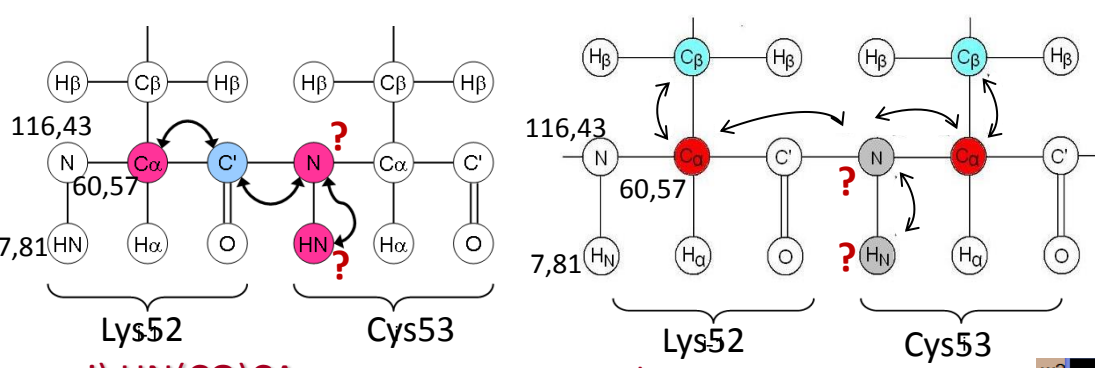


Συσχετίζει το H_N του i- αμινοξέως με το γειτονικό πυρήνα ^{15}N και τους C_α (ή και C_β) πυρήνες του τρέχοντος i αλλά και του προηγούμενου αμινοξέως i-1

OR

HNCACB

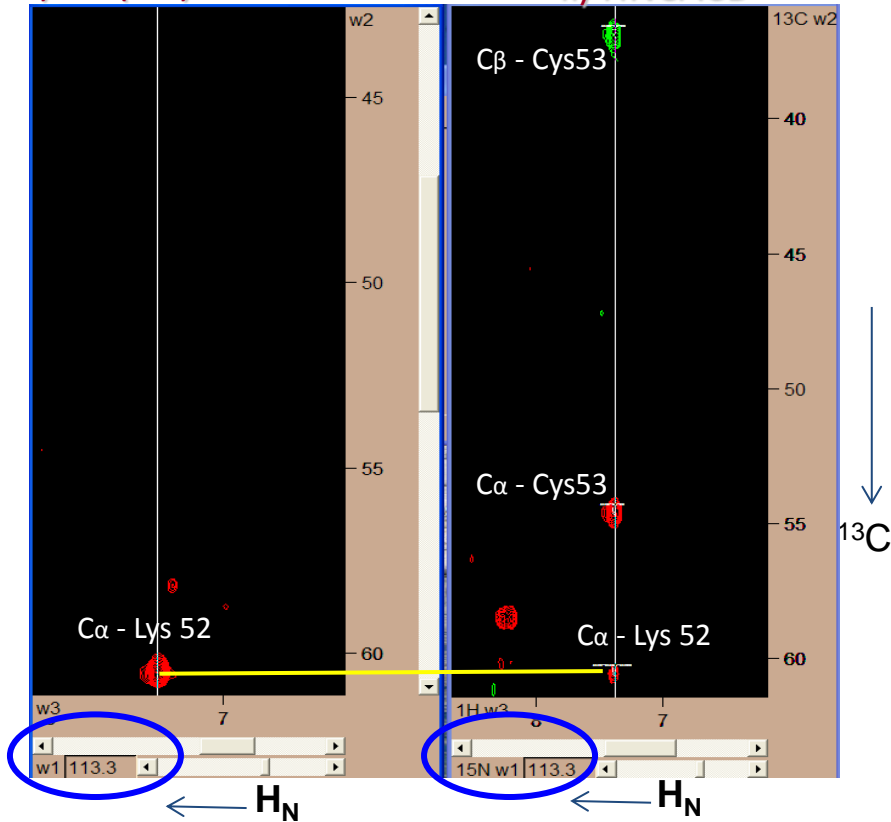




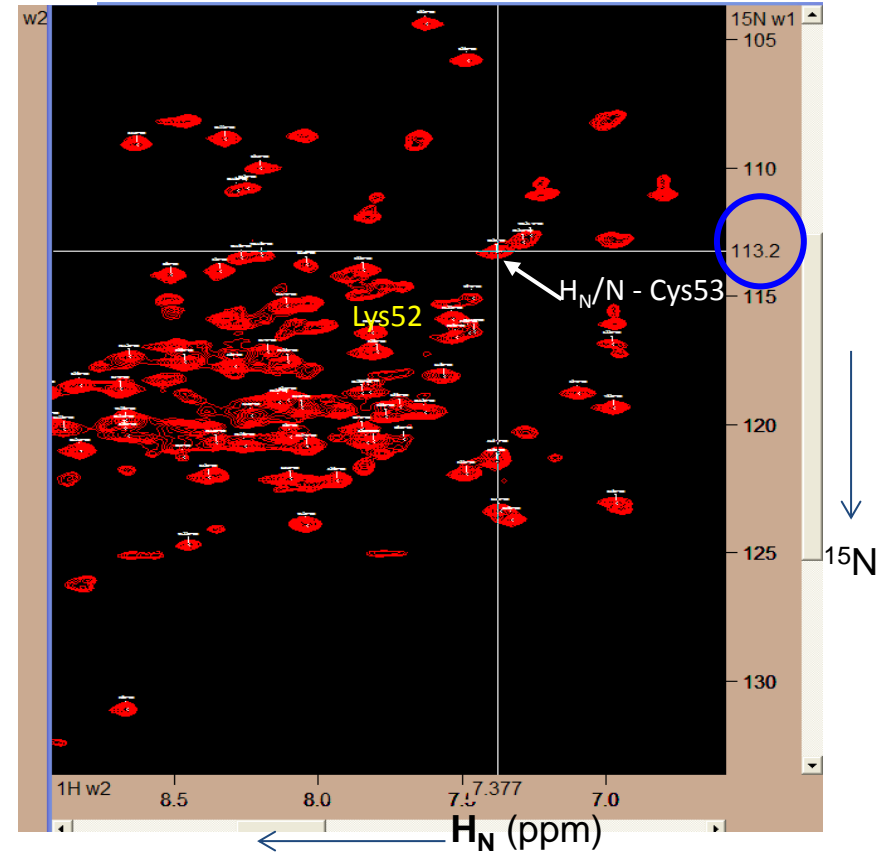
Στρατηγική ταυτοποίησης
 ένα παράδειγμα συνδυασμού 3D πειραμάτων:
 i) inter-residue και
 ii) inter- και intra-residue

i) HN(CO)CA

ii) HNCACB



15N-HSQC



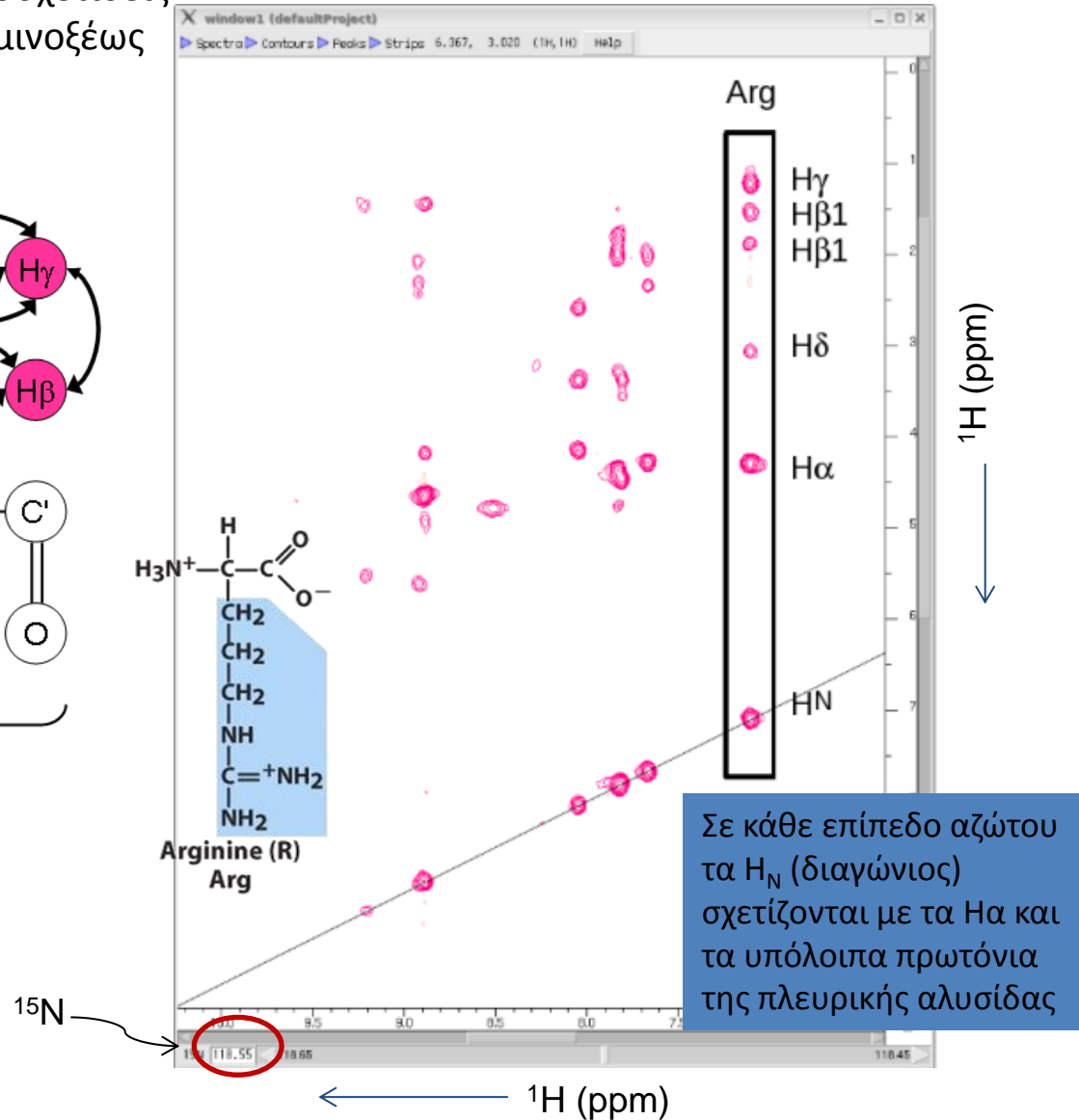
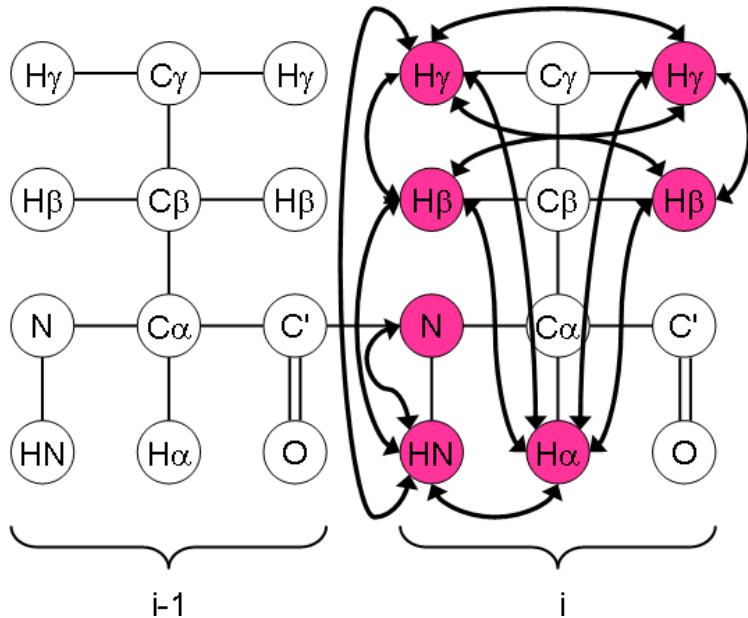
Έχοντας ταυτοποιήσει τη Lys52 (^{15}N , H_N , $\text{C}\alpha$) ψάχνουμε κατ' αντιπαράθεση τα πειράματα HN(CO)CA και HNCACB ώστε να εντοπίσουμε το κοινό επίπεδο ^{15}N (μπλε κύκλος) στο οποίο θα βρούμε κοινό ίχνος (κίτρινη γραμμή) \rightarrow $\text{C}\alpha$ της Lys52
 Έτσι εξάγουμε τις τιμές $^{15}\text{N}=113,3$ και $\text{H}_\text{N}=7,377$ για το επόμενο αμινοξύ (Cys53). Τα επιπλέον ίχνη στο HNCACB (επί της λευκής κάθετης γραμμής) καταγράφουν τις χημικές μετατοπίσεις των $\text{C}\alpha=54,5$ και $\text{C}\beta=36,9$ της (Cys53). Παρατηρείστε επίσης ότι στο πείραμα HNCACB, το ίχνος $\text{C}\alpha$ -Cys53 έχει μεγαλύτερη ένταση από το ίχνος $\text{C}\alpha$ -Lys52 γιατί η σύζευξη $\text{H}_\text{N}(i)$ - $\text{C}\alpha(i-1) <$ σύζευξης $\text{H}_\text{N}(i)$ - $\text{C}\alpha(i)$

Ταυτοποίηση πλευρικών ομάδων (side chain assignment)

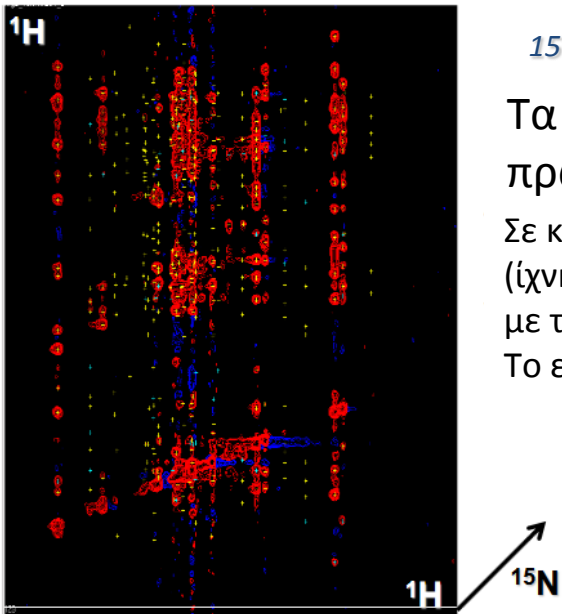
Εχοντας ταυτοποιήσει όλες τις αμινομάδες της πρωτεΐνης θα πρέπει να ταυτοποιηθούν και τα πρωτόνια των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων.

Το πείραμα ^{15}N TOCSY HSQC δίνει τις intra συσχετίσεις κατά μήκος όλου του spin system του κάθε αμινοξέως

^{15}N -TOCSY-HSQC (3D)



Επίλυση 3D δομής πρωτεΐνης με βάση τα NOE σήματα



¹⁵N-NOESY-HSQC (3D)

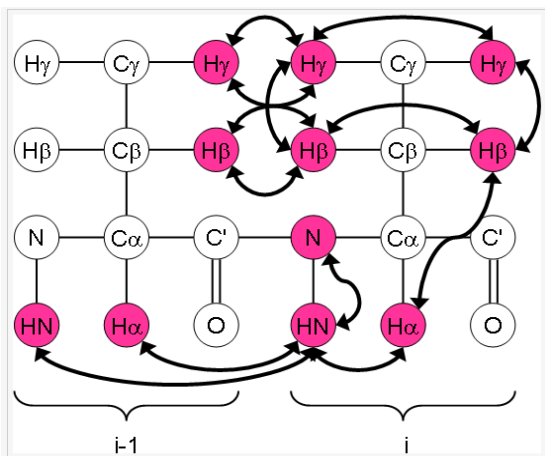
Τα αμιδικά πρωτόνια H_N συσχετίζονται με όλα τα πρωτόνια της πρωτεΐνης που βρίσκονται σε απόσταση < 5-6 Å.

Σε κάθε επίπεδο (τιμή) ¹⁵N καταγράφουμε για τα αμιδικά πρωτόνια (ίχνη διαγωνίου), όλα τα ίχνη εκτός διαγωνίου που τα συσχετίζουν με τα πρωτόνια της πρωτεΐνης

Το εμβαδόν (η ένταση) του ίχνους εξαρτάται από την ενδοατομική απόσταση

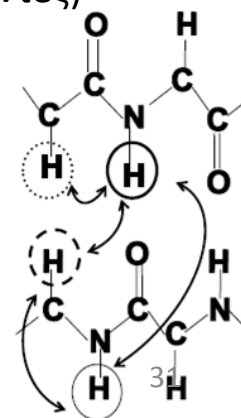
$$\text{Ένταση NOE μεταξύ πυρήνων } i, j \sim 1/r_{ij}^6$$

Εκτός από τις προφανείς intra- και ακολουθιακές συζεύξεις (i-1 → i)

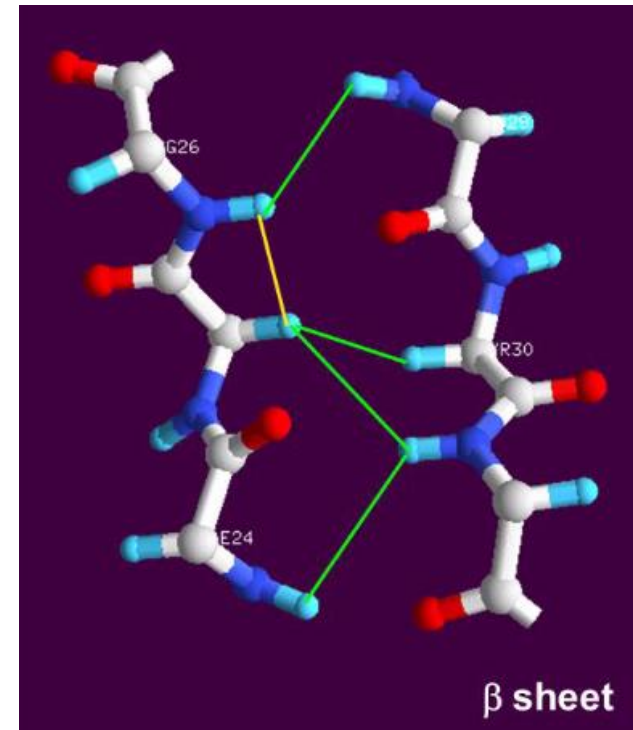
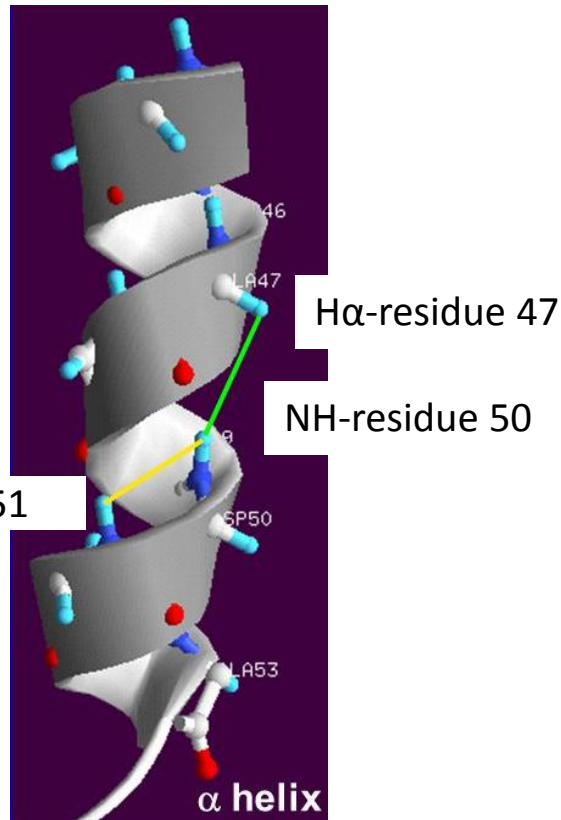


το πείραμα μας δίνει κρίσιμη πληροφορία αποστάσεων που θα καθοδηγήσει τις μελέτες Μοριακής Δυναμικής που ακολουθούν για τη διευκρίνιση της 3D διαμόρφωση της πρωτεΐνης (οι αποστάσεις τίθενται ως περιοριστικοί παράγοντες)

NOE αλληλεπιδράσεις αμιδικών πρωτονίων με γειτονικά α-πρωτόνια αλλά και μη γειτονικά στο σκελετό που όμως χωρικά βρίσκονται σε απόσταση < 5-6 Å



Επίλυση 3D δομής πρωτεΐνης με βάση τα NOE σήματα (ένα παράδειγμα)



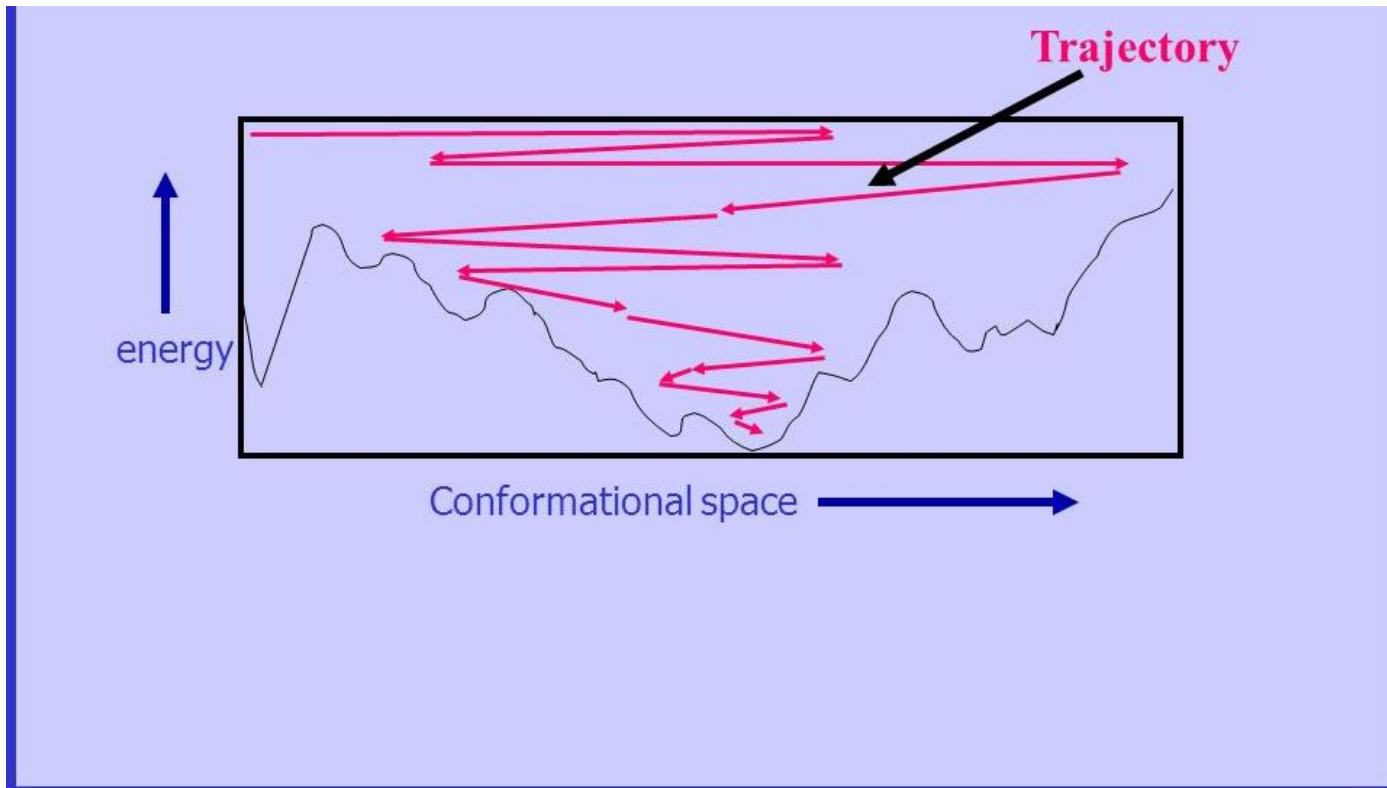
Ισχυρά σήματα NOE μεταξύ γειτονικών στο σκελετό αμιδικών πρωτονίων $H_N^i-H_N^{i+1}$ (κίτρινο) και μεταξύ $H_N^i-H_N^{i+3}$ (πράσινο) είναι χαρακτηριστικά για το μοτίβο α -έλικας

Ισχυρά σήματα NOE μεταξύ γειτονικών στο σκελετό $H_N^i-H_N^{i+1}$ (κίτρινο) και μεταξύ μη γειτονικών στο σκελετό πρωτονίων (πράσινο \rightarrow ανήκουν στους γειτονικούς κλώνους του β -φύλλου) είναι χαρακτηριστικά για το μοτίβο β -πτυχωτού φύλλου

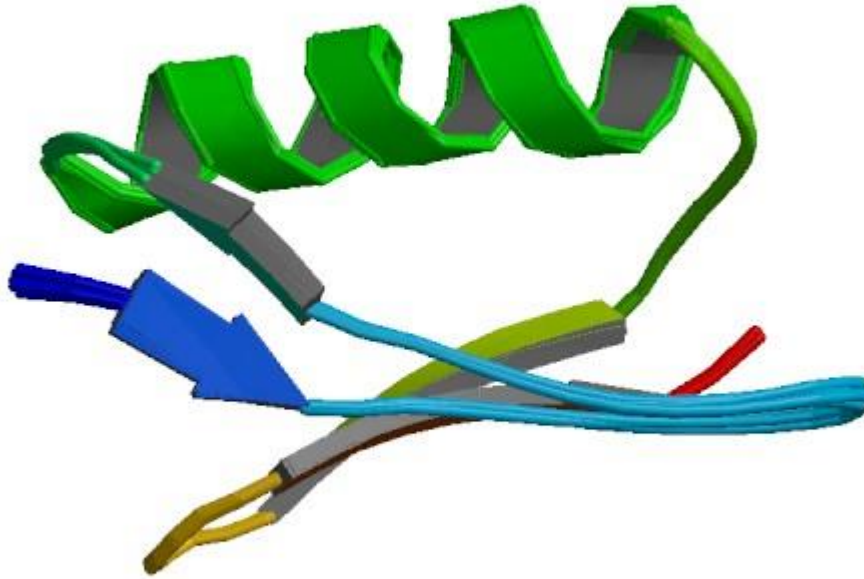
Μοριακή Δυναμική: Τεχνική προσομοίωσης που βασίζεται στην επίλυση των κλασικών εξισώσεων κίνησης για ένα σύστημα N σωματιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι δεσμικές (έκταση δεσμών, κάμψη δεσμών, στρέψη δεσμών) και μη δεσμικές (vdW και Coulomb).

Στο σύστημα δίνονται αρχικές θέσεις και ταχύτητες (αρχική κινητική ενέργεια υπό την έννοια της αύξησης της θερμοκρασίας T) και καταγράφεται η χρονική του εξέλιξη. Η τροχιά εξέλιξης που λαμβάνεται (**trajectory**) μας πληροφορεί για το σύνολο των διαμορφώσεων που μπορεί να λάβει η πρωτεΐνη.

Εφαρμογή Μοριακής Δυναμικής με τη μέθοδο **Simulated Annealing** στοχεύει στην υπερπήδηση των ενεργειακών φραγμών και την εύρεση του γενικού ενεργειακού ελαχίστου (global minimum). Έτσι αρχικά η θερμοκρασία του συστήματος αυξάνεται πολύ και στη συνέχεια ελαττώνεται προς το μηδέν πολύ αργά.



This video shows a **Restrained Molecular Dynamics structure determination of protein 1GB1 from nmr**



<https://www.youtube.com/watch?v=KBiVkWIOxTs>

- Η επίσπευση των αρχικών σταδίων ανάπτυξης ενός φαρμάκου απαιτεί τον ορθολογικό σχεδιασμό ligands που θα προσδέσουν στο ενεργό κέντρο του πρωτεϊνικού στόχου
- Έτσι είναι απαραίτητη η γνώση της 3D δομής του πρωτεϊνικού στόχου
- Όταν δεν υπάρχουν κρυσταλλικά δεδομένα ή συντρέχουν οι λόγοι της διαφάνειας #22, η 3D δομή μπορεί να διευκρινιστεί με εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR και υπολογιστικών μεθόδων (μοριακής δυναμικής)
- Λόγω μεγάλης αλληλεπικάλυψης σημάτων και αυξημένης πολυπλοκότητας εφαρμόζονται 3D πειράματα (bio NMR)
- ~50 KDa το όριο προσδιορισμού 3D δομής με NMR
- Τα κύρια βήματα που ακολουθούνται είναι:
 - i) ταυτοποίηση του σκελετού της αμινοξικής ακολουθίας (χημικές μετατοπίσεις ^{15}N , H_N , Ca του κάθε αμινοξέως- protein backbone assignment)
 - ii) ταυτοποίηση των πρωτονίων H_α και των υπολοίπων πρωτονίων των πλευρικών ομάδων (side chain assignment)
 - iii) εξαγωγή ενδοατομικών αποστάσεων με βάση τα NOE σήματα
 - iv) εφαρμογή μοριακής δυναμικής με χρήση των ενδοατομικών αποστάσεων ως περιοριστικούς παράγοντες για να περιοριστεί η διαμορφωτική ευελιξία της πρωτεΐνης

Όμως το NMR δεν εφαρμόζεται μόνο για να διευκρινιστεί η 3D δομή του πρωτεϊνικού στόχου....

Κατά τα επόμενα στάδια ανάπτυξης φαρμάκου το NMR μπορεί να εφαρμοστεί ως screening assay (έλεγχος πρόσδεσης) για την ανακάλυψη βιοδραστικών μορίων που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη (hit identification) ή ακόμα και σε μελέτες βελτιστοποίησης (hit-to-lead / lead optimization)

Ανάλογα με τη μέθοδο screening που εφαρμόζεται (target ή ligand-based) απαιτείται ή όχι αν/χα η ταυτοποίηση του σκελετού της αμινοξικής ακολουθίας (συγκεκριμένα η γνώση των χημικών μετατοπίσεων των αμινομάδων)

Διαδικασία ανάπτυξης νέου φαρμάκου και εργαλεία επίσπευσης των αρχικών σταδίων

Αναγνώριση
Στόχου
target
identification

hit identification
(100 nM–5 μM)
lead compound
(nM)

Βελτιστοποίηση
ένωσης-οδηγού
(lead
optimization)

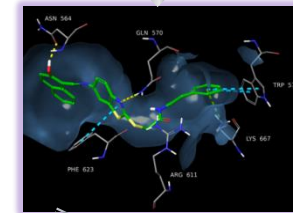
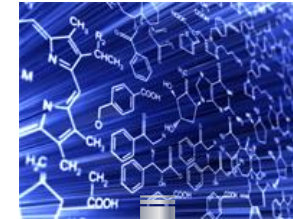


βιβλιοθήκη μορίων (πραγματική ή
εικονική/ drug-like, lead-like, fragment-like,
πεπτιδομιμητικά, φυσικά προϊόντα)

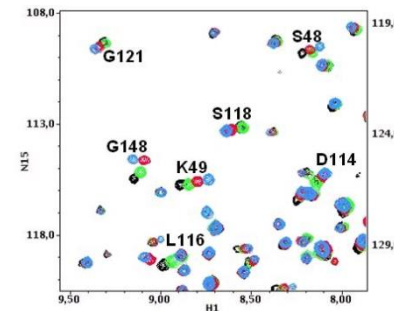
CADD (Computer-Aided Drug Design
Σχεδιασμός φαρμάκων
με μεθόδους υπολογιστικής χημείας)
Εικονική σάρωση (virtual screening)
In silico πρόσδεση (docking)
Πρόβλεψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων (Φίλτρα
ADMET)

x-ray (Structure Based Drug Design)
NMR (έλεγχος πρόσδεσης,
Ιδιαίτερη εφαρμογή στο
fragment based drug design)

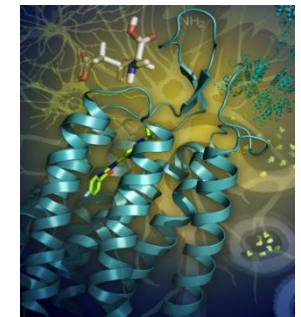
Ανάπτυξη συστήματος ελέγχου
(βιοχημικό / κυτταρικό assay)
Έλεγχος επιλεκτικότητας
(selectivity profiling)



In silico docking



NMR



x-ray³⁷

HOME

ABOUT

SERVICES

PRODUCTS

RESEARCH

DOWNLOADS

ORDERING

CONTACTS

Drug-like Green collection

Our drug-like Green Collection compound library (about **176,000** compounds in total) was prepared on the basis of **Screening Compounds for prompt delivery** and pre-formatted by **Lipinski's Rules of Five**:

- LogP from -1 to 5
- MW from 160 to 500
- Number of H-donors from 0 to 5
- Number of H-acceptors from 0 to 10
- Number of NO₂ groups from 0 to 2

From the library were removed:

- compounds with reactive groups,
- biologically unstable compounds,
- compounds containing any atom different to O, N, C, H, Br, Cl, F, or S.

General Fragments Library

The summary of the OTAVAch chemicals General Fragments Library characteristics:

| Parameter | Value |
|---------------------------|-------|
| MW | < 300 |
| CLogP | < 3 |
| Number of Rotatable Bonds | ≤ 3 |
| Number of H Donors | ≤ 3 |
| Number of H Acceptors | ≤ 4 |
| PSA | < 80 |
| Number of Rings | > 0 |
| LogSw | > -5 |
| Sum of Halogen Atoms | ≤ 4 |

Lead-like library

Compounds in this library have:

- LogP between -1 and 4
- molecular weight from 160 to 400
- number of H-donors 4 or less
- number of H-acceptors 8 or less
- number of rotatable bonds 8 or less
- number of aliphatic or aromatic rings from 1 to 4

From the library were removed:

- compounds with reactive groups
- biologically unstable compounds

Compounds containing any atom different to O, N, C, H, Br, Cl, F, or S

Swiss Institute of
Bioinformatics

Click2Drug

[Directory](#) [Bibliography](#) [Encyclopedia](#) [Citations](#) [Contacts](#) [Disclaimer](#)

Directory of Tools

Databases

Chemical structure rep.

Molecular modeling

Homology modeling

Binding site prediction

Docking

Screening

Target prediction

Ligand design

Binding free energy

eSARation

ADME Toxicity

Mobile applications

Last additions

Tag cloud

FAQ

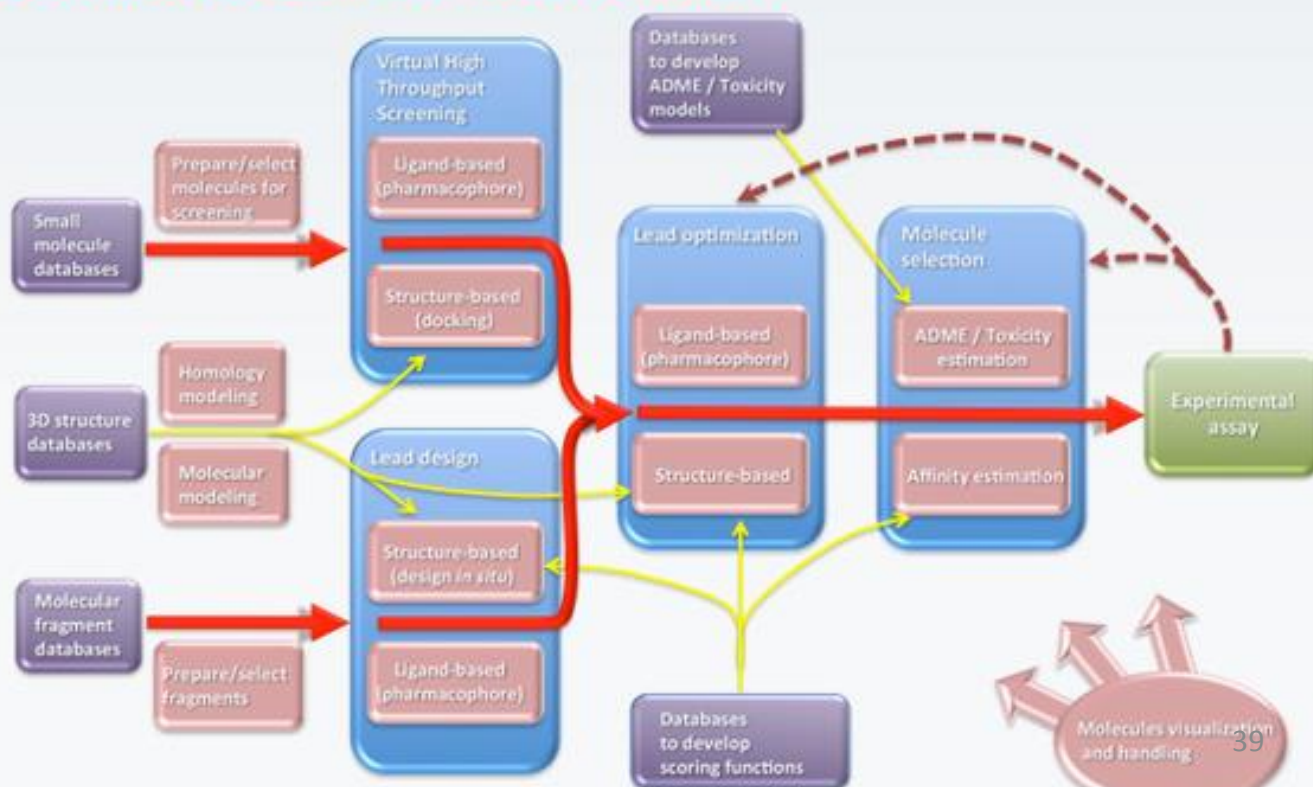
Directory of computer-aided Drug Design tools

Click2Drug contains a comprehensive list of computer-aided drug design (CADD) software, databases and web services. These tools are classified according to their application field, trying to cover the whole drug design pipeline. If you think that an interesting tool is missing in this list, please contact us

G+1 52

Updated on 7/18/2014. Currently 777 links. [Show all links](#) / [Hide all links](#).

Click on the following picture to select tools related to a given activity:

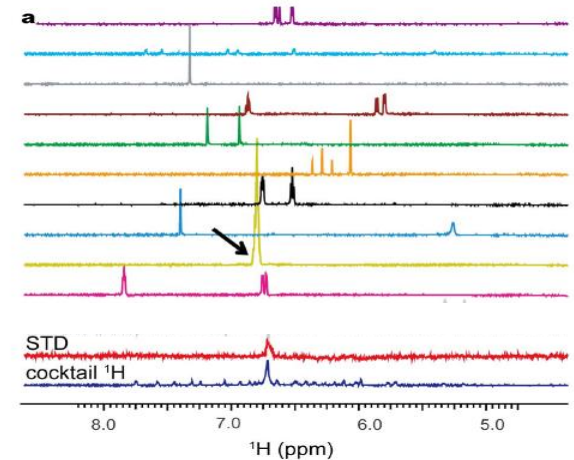


Το NMR ως εργαλείο ελέγχου πρόσδεσης (screening assay)

Πείραμα Διαφορικής Μεταφοράς Μαγνήτισης (Saturated Transfer Difference- ^1H STD NMR)

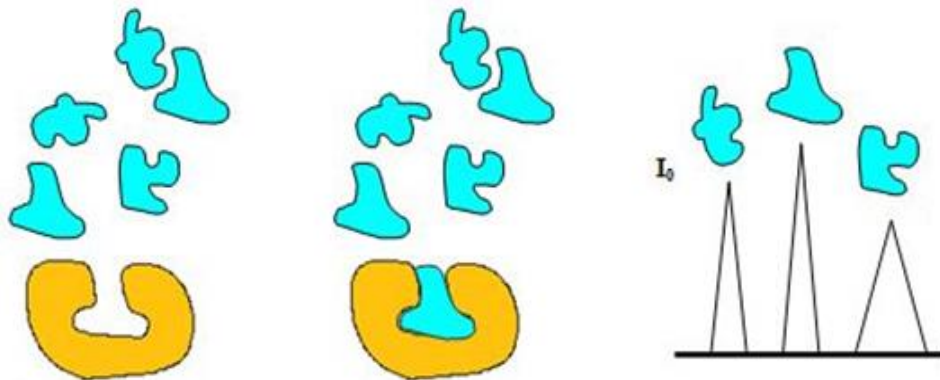
(monitors ligand binding $K_d \sim \text{mM} - \mu\text{M}$)

- Διερεύνηση πρόσδεσης βιβλιοθήκης μορίων (primary screening assay)
- Το NMR μπορεί να διακρίνει την ασθενή πρόσδεση fragment-like μορίων με ασθενή $K_D \sim 5\text{mM}$ τα οποία θα βελτιστοποιηθούν στη συνέχεια (ιδιαίτερη εφαρμογή στο Fragment based drug design)
- Έλεγχος για βιοδραστικούς μεταβολίτες σε εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων
- Αλληλεπιδράσεις μικρών μορίων με συμπλέγματα πρωτεϊνών που σχηματίζονται σε διάλυμα

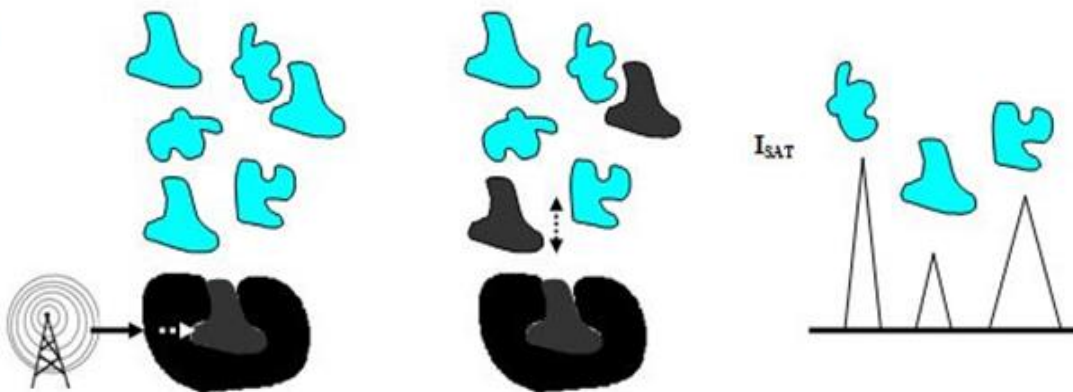


^1H STD NMR

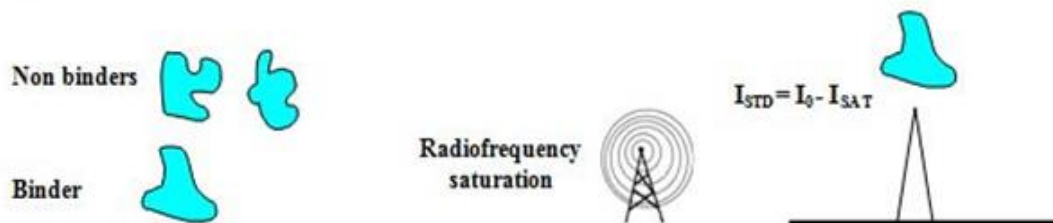
A.



B.



C.



A. Φάσμα Αναφοράς ^1H STD-REF (cocktail ^1H)

Το φάσμα ^1H cocktail περιλαμβάνει τις κορυφές συντονισμού όλων των μικρών μορίων (πιθανών προσδετών) που περιέχονται στο διάλυμα με την πρωτεΐνη

B. Εκλεκτική ακτινοβολή της πρωτεΐνης διεγείρει τους πυρήνες ^1H της.

Η διεγερση επάγεται μόνο στα άτομα του προσδέτη (αλληλεπιδρά μέσω NOE φαινομένου με τα ^1H των αμινοξέων του ενεργού κέντρου). Κατά την απελευθέρωσή του στο διάλυμα, ο προσδέτης μεταφέρει την πληροφορία της πρόσδεσης.

Η αποδιέγερση του αποδίδει φασματικές κορυφές διευρυμένες και με μικρότερη ένταση (γιατί αλληλεπιδράσε με το μεγάλο βιομόριο $\rightarrow \tau_c \gg \gg \text{άρα } T_2 \gg \gg$, βλ. διαφάνεια #12) και άρα διαφοροποιημένες σε σχέση με το REF φάσμα. Οι φασματικές κορυφές των μορίων που δεν προσέδεσαν στο ενεργό κέντρο είναι αμετάβλητες.

C. Φάσμα ^1H STD Η διαφορά των δύο φασμάτων περιέχει μόνο τις φασματικές κορυφές του προσδέτη

¹H STD NMR

Καταγραφή των κορυφών συντονισμού των μικρών μορίων – υποψήφιων προσδετών στο βιολογικό στόχο (**Ligand observed NMR**)

- Για τη λήψη ικανοποιητικού σήματος NMR θα πρέπει το κέντρο πρόσδεσης να καταληφθεί από τον μέγιστο δυνατό αριθμό μορίων του προσδέτη, τα οποία στη συνέχεια θα μεταφέρουν την πληροφορία πρόσδεσης κατά την αποδιέγερσή τους στο διάλυμα. Γι' αυτό απαιτείται:

(α) **Η γρήγορη εναλλαγή μεταξύ της ελεύθερης και της δεσμευμένης κατάστασης του προσδέτη.** Η μέθοδος ¹H STD-NMR δεν ενδείκνυται για πολύ ισχυρή πρόσδεση όπου εξαιτίας της μακράς παραμονής στο κέντρο πρόσδεσης, η πληροφορία της πρόσδεσης δεν μεταφέρεται στο διάλυμα.

Αποτελεσματική εφαρμογή για τιμές της σταθεράς αποδέσμευσης στο εύρος

$$10 \text{ nM} < K_D < 10 \text{ mM}$$

(β) **Η αυξημένη συγκέντρωση του προσδέτη στο διάλυμα σε σχέση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης.**

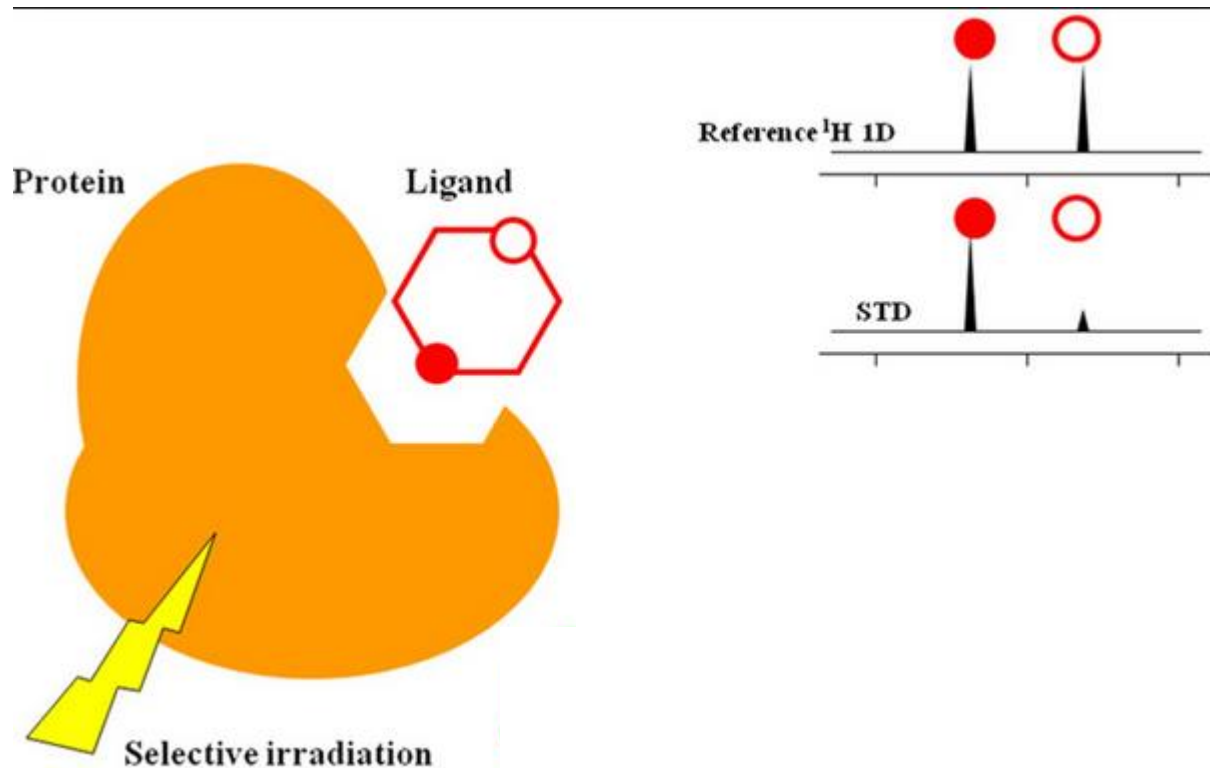
[L]: [T] ~ 100:1 όπου [L]:ligand, η συγκέντρωση του μικρού μορίου
[T]:target, η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού στόχου.

- Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η μικρή ποσότητα πρωτεΐνης που απαιτείται και ότι δεν υπάρχει περιορισμός στο μοριακό βάρος

$$[T] \sim 1\text{-}50 \text{ }\mu\text{M} , \text{ MW μπορεί να είναι και } >100\text{kDa}$$

^1H STD NMR – Group Epitope mapping

Το STD NMR μπορεί να διακρίνει δομικές μονάδες του προσδέτη που αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης (πληροφορία για τα φαρμακοφόρα τμήματα του προσδέτη)

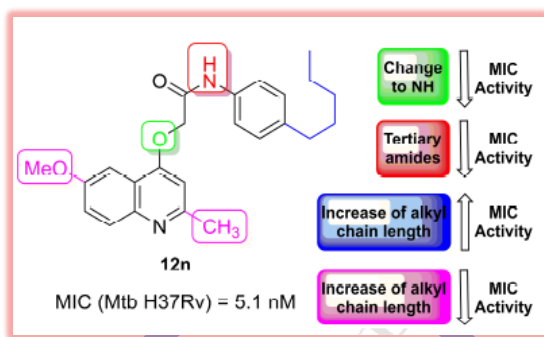


Διαδικασία ανάπτυξης νέου φαρμάκου και εργαλεία επίσπευσης των αρχικών σταδίων

Αναγνώριση
Στόχου
target
identification

hit screening
(100 nM–5 μM)
lead identify
(nM)

Βελτιστοποίηση
ένωσης-οδηγού
(lead
optimization)



Early ADME
Early Toxicology

x-ray
NMR

υπολογιστική χημεία

Κυκλική διεργασία κατά
το στάδιο βελτιστοποίησης
ένωσης οδηγού

Φαρμακευτική Χημεία (σύνθεση
μεγάλου αρ. ενώσεων)

↓ εξαγωγή πληροφορίας

SAR (Σχέσεις δομής-δράσης)

→ ↑δραστηκότητα
↑επιλεκτικότητα

Υπολογιστική χημεία
x-ray / NMR

Εξαγωγή πληροφορίας για την
βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων
του ligand στο κέντρο πρόσδεσης

Βελτιστοποίηση ADMET

Π.χ. διαλυτότητα, διαπερατότητα
μεμβράνης, βιοδιαθεσιμότητα (ισχύς
πρόσδεσης στην αλβουμίνη), σημεία
μεταβολισμού (από τα ένζυμα CYP),
τοξικότητα (παρεμπόδιση καρδιακών
hERG K⁺ channels)

In silico πρόβλεψη

In vitro και *in vivo* έλεγχοι

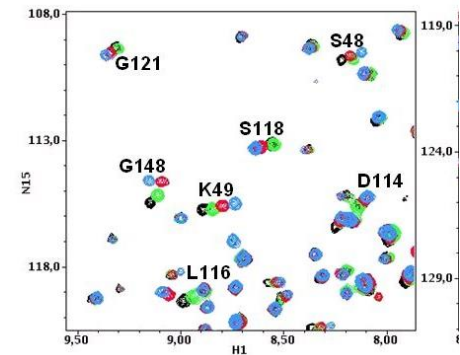
Το NMR ως εργαλείο χαρτογράφησης των αλληλεπιδράσεων του ligand με την πρωτεΐνη

Πείραμα: 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC chemical shift mapping (protein-observed NMR)
Χαρτογραφούνται οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων της πρωτεΐνης (στο κέντρο πρόσδεσης) που προκαλούνται με την πρόσδεση του ligand

Εφαρμογές:

- Εύρεση κέντρου πρόσδεσης όταν αυτό είναι άγνωστο
- Αναγνώριση πολλαπλών κέντρων πρόσδεσης
- SAR by NMR (ιδιαίτερη εφαρμογή στο Fragment based drug design)
- Βελτιστοποίηση *in silico* μοντέλων

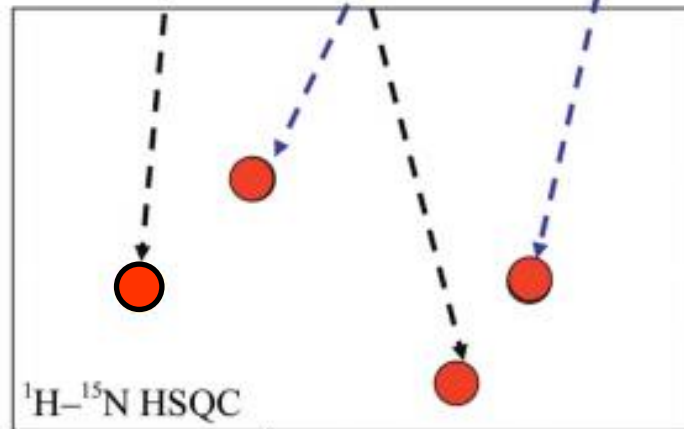
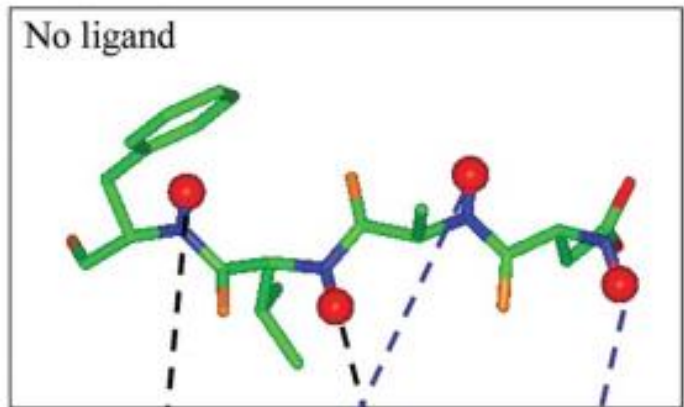
Βελτιστοποίηση hit to lead



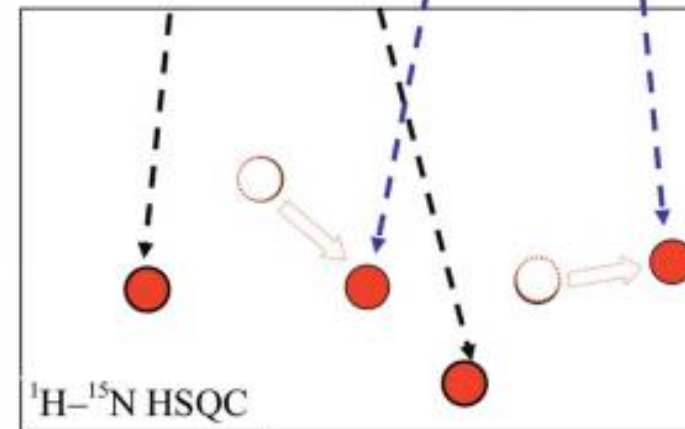
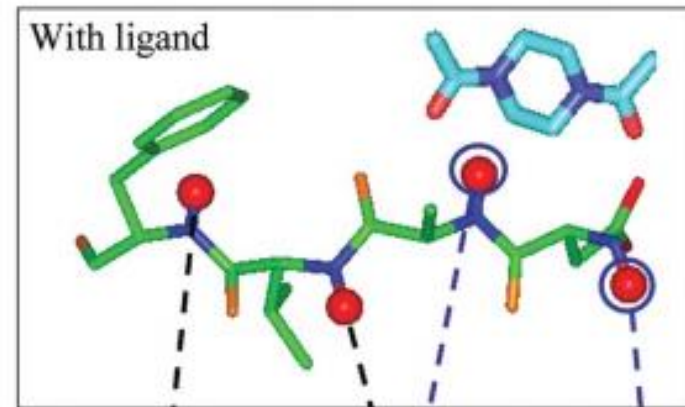
Διαταραχές στις χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ των αμινομάδων του ενεργού κέντρου κατά την πρόσδεση του μικρού μορίου

Chemical Shift Perturbations

2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC chemical shift mapping



^1H
(a)



^1H
(b)

2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC chemical shift mapping

Καταγράφονται τα 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC ίχνη της πρωτεΐνης απουσία και παρουσία του ligand (Target based method)

- Προϋποθέσεις του πειράματος

(α) **ήδη χαρτογραφημένη** αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης (γνώση των χημικών μετατοπίσεων των αμινομάδων)

(β) ^{15}N -ισοτοπική επισήμανση του μακρομοριακού στόχου

Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται κατά τους πρωταρχικούς ελέγχους δέσμευσης μορίων, λόγω των προαναφερθέντων απαιτήσεων αλλά αποτελεί ισχυρό εργαλείο κατά το στάδιο

- της επαλήθευσης ενός εν δυνάμει προσδέτη
- Της βελτιστοποίησης ενός μορίου-οδηγού

εφόσον πέρα από την πληροφορία της δέσμευσης παρέχει δομικές πληροφορίες για το σύμπλοκο προσδέτη-υποδοχέα.

Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα των δύο μεθόδων screening με NMR

ΣΥΝΟΨΗ

| Μέθοδος | ¹ H STD NMR | 2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC NMR |
|----------------------------|--|--|
| ποσότητα πρωτεΐνης | 1-50 μM | 0.1-1 mM |
| ποσότητα μικρού μορίου | [L]: [T] ~ 100:1 | [L]: [T] = 1:1 |
| Μέγεθος πρωτεϊνικού στόχου | Δεν υπάρχει ανώτατο όριο | < 50 kDa (λόγω εκτεταμένης αλληλεπικάλυψης σημάτων) |
| Επισήμανση πρωτεΐνης | ΟΧΙ | Απαραίτητη η επισήμανση τουλάχιστον με ¹⁵ N , ¹³ C και με ² H (MW>20 kDa) |
| Δομικές πληροφορίες | Η μέθοδος διακρίνει κρίσιμα φαρμακοφόρα του προσδέτη | Η μέθοδος αναγνωρίζει το κέντρο πρόσδεσης και μπορεί να δώσει πληροφορία ακόμα και για τον τρόπο πρόσδεσης |

Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα των δύο μεθόδων screening με NMR

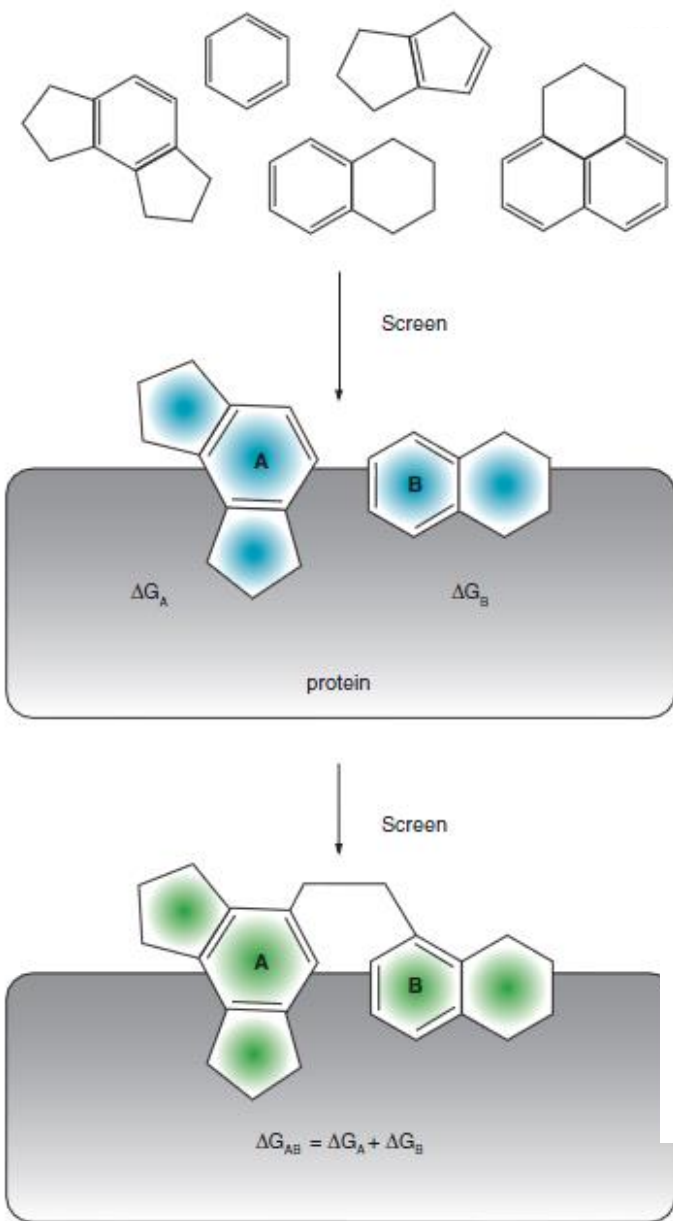
ΣΥΝΟΨΗ

| Μέθοδος | ¹ H STD NMR | 2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC NMR |
|--|--|---|
| Εύρος συγγένειας πρόσδεσης για την ανίχνευση | 10 nM < KD < 10 mM Μόρια με πολύ ισχυρή συγγένεια πρόσδεσης μπορεί να δώσουν ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα λόγω της μακράς παραμονής τους στο κέντρο πρόσδεσης (δεν μεταφέρεται η πληροφορία στο διάλυμα) | Δεν υπάρχει όριο |
| Εκλεκτικότητα πρόσδεσης | Η μέθοδος δεν μπορεί να διακρίνει τη μη εκλεκτική πρόσδεση και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδές θετικό αποτέλεσμα. Η τιτλοδότηση με γνωστό προσδέτη και πειράματα ανταγωνισμού μπορεί να άρουν την αμφιβολία. | Η μέθοδος διακρίνει καθαρά την εκλεκτικότητα της πρόσδεσης (πληροφορία για το κέντρο πρόσδεσης) |
| Διαλυτότητα σε buffer | Περιοριστικός παράγοντας και για τις δυο μεθόδους | |



- Εφαρμογές του βιομοριακού NMR ως μέθοδο screening**
- Βιβλιοθήκης fragments (μικρών τμημάτων μορίων)
SAR-by-NMR
 - Δυναμικών βιβλιοθηκών μορίων

Fragment-based Drug design (FBDD): Σχεδιασμός βιοδραστικών μορίων με χρήση μικρών τμημάτων (fragments)



Μικρού MW μόρια (MW ~100-250) χωρίς διαμορφωτική ευελιξία, "privileged structures" χρησιμοποιούνται ως πρότυπα τα οποία με περαιτέρω παραγοντοποίηση οδηγούν σε νέους προσδέτες πρωτεϊνών

Η σταθερά πρόσδεσης του νέου μορίου που προκύπτει από την σύνδεση των επιμέρους τμημάτων είναι ίση με το γινόμενο των σταθερών πρόσδεσης των επιμέρους ασθενών προσδετών.

Άρα ιδανικά το νέο μόριο θα είναι πολύ ισχυρός προσδέτης

$$\Delta G_{AB} = \Delta G_A + \Delta G_B, \quad RT \ln(K) = - \Delta G_{AB}, \quad K_{AB} = K_A \times K_B$$

$$K_A = 2 \times 10^{-3}, \quad K_B = 5 \times 10^{-3}, \quad K_{AB} = 1 \times 10^{-7}$$

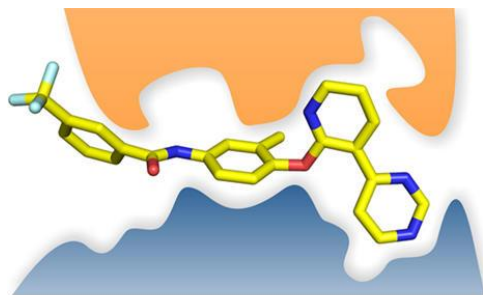
mM mM nM

Πλεονεκτήματα του FBDD

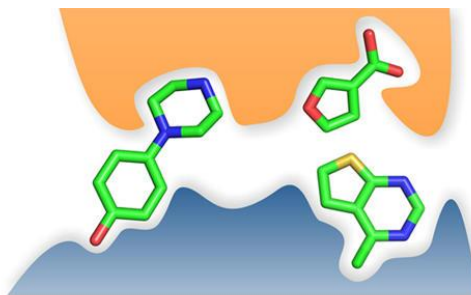
- Αποτελεσματικότερη διερεύνηση του χημικού χώρου (chemical space) και αύξηση πιθανότητας εύρεσης hit
 - ✓ # drug-like molecules (~30 heavy atoms) $\rightarrow 10^{63}$ χημικές δομές > # αστεριών στο σύμπαν
 - \rightarrow Το virtual screening μιας βιβλιοθήκης 10^6 μορίων είναι εξαιρετικά πεπερασμένο υποσύνολο του αχανούς χώρου των δυνατών χημικών δομών
 - ✓ Fragments < 17 heavy atoms (C, O, S, F, Br, I) $\rightarrow 166 \times 10^9$ συνδυασμοί χημικών δομών
 - \rightarrow Πιο πιθανός ο εντοπισμός βιοδραστικής ένωσης σε virtual screening βιβλιοθήκης 10^6 μορίων (Συνήθως οι βιβλιοθήκες των fragments αποτελούνται από μερικές χιλιάδες μόρια)
- Η αύξηση της μοριακής πολυπλοκότητας δεν συνάδει με την αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης του ligand (ligand efficiency)

Τα fragments που αναδεικνύονται hits γενικά χρησιμοποιούν όλα τα δομικά τους τμήματα για να αλληλεπιδράσουν ευνοϊκά με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (H-bonds, lipophilic interactions).

Τα μεγάλα μόρια (drug-like MW>500) πιθανά δεν χρησιμοποιούν κατά το βέλτιστο τρόπο όλα τα δομικά τους τμήματα για να αλληλεπιδράσουν ευνοϊκά στη θήκη της πρωτεΐνης.



HTS hit



Fragment hit

Αριστερά: Hit από screening drug-like μορίων

Δεξιά: Hits από screening fragment-like μορίων. Οι αλληλεπιδράσεις τους μπορεί να είναι λιγότερες αλλά είναι περισσότερο βελτιστοποιημένες (better fit)

Πλεονεκτήματα του FBDD

- Βελτιστοποίηση της συγγένειας πρόσδεσης με στόχο ένα υποψήφιο φάρμακο χαμηλού MW

Φυσικά η συγγένεια πρόσδεσης (affinity) των fragments είναι μικρή (πιθανά high mM) συνεπώς στη συνέχεια απαιτούνται μια σειρά από βήματα βελτιστοποίησης προς την ορθολογική αύξηση του μεγέθους του μορίου. Η σύνδεση επιμέρους fragments που προσδένουν σε γειτονικά sub-sites της πρωτεΐνης (διαφάνεια # 51) αποτελεί μία από τις μεθόδους που εφαρμόζονται.

Ο στόχος είναι η αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης (\rightarrow low nM) ενώ το MW πρέπει να διατηρηθεί όσο το δυνατόν μικρότερο.

\rightarrow Μεγάλη αύξηση στο MW έχει επίπτωση στο ADMET profile (π.χ. δυσχεραίνει τη διαλυτότητα, αυξάνει τον αριθμό των σημείων μεταβολισμού του φαρμάκου)

- Η ορθολογική επεξεργασία των fragments προς ένα lead compound καθοδηγείται από τον ακόλουθο τύπο που εκφράζει την αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης ως συνάρτηση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ανά heavy atom (αποτελεί μία νόρμα ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε τη συγγένεια πρόσδεσης διαφορετικού μεγέθους μορίων)

$$LE = \frac{\Delta G}{HAC} = \frac{-RT \ln(K_d)}{HAC} \approx \frac{-RT \ln(IC_{50})}{HAC}$$

DG: binding free energy

K_d : Dissociation bonding constant

IC_{50} : inhibitor concentration required to inhibit 50% enzyme activity

HAC: # heavy atoms

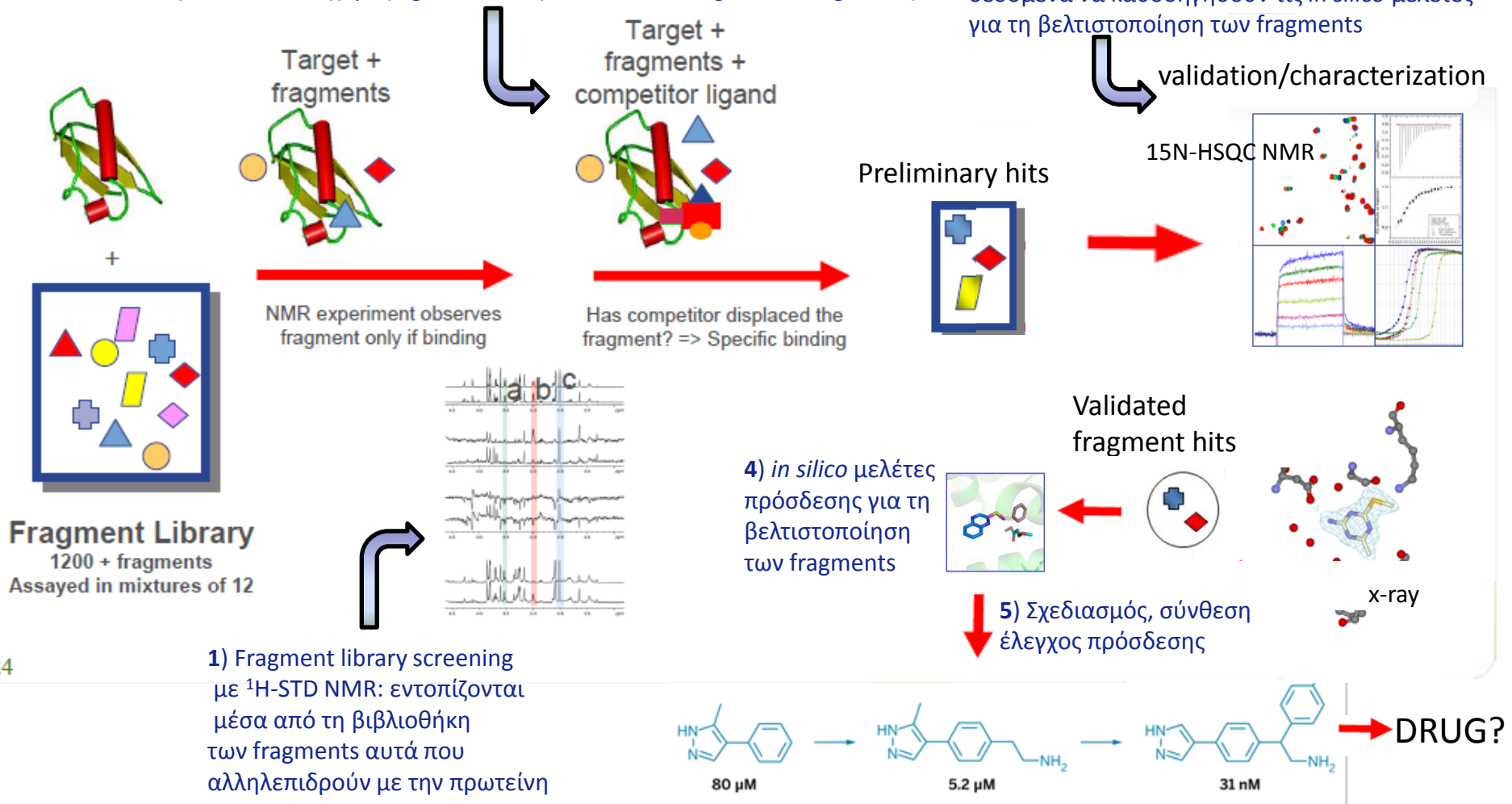
Στόχος του FBDD είναι να δίνεται προτεραιότητα για περαιτέρω βελτιστοποίηση σε fragments με **LE ~ 0.3 kcal mol⁻¹ atom⁻¹** ή και μεγαλύτερη.

(η τιμή αντιστοιχεί στο LE που έχει ένα φάρμακο MW=500 Da, 36 HAC, K_d = 10 nM)

Στην επόμενη διαφάνεια απεικονίζεται η στρατηγική που ακολουθείται γενικά από τις φαρμακευτικές εταιρίες που εφαρμόζουν fragment based drug design και αναλύεται πως το NMR μπορεί να συμβάλλει ως screening assay για τον εντοπισμό βιοδραστικών fragments

2) προσθήκη στο διάλυμα με την πρωτεΐνη και τα binding fragments ενός γνωστού για το συγκεκριμένο στόχο ligand (competitor) επιβεβαιώνει το specific binding στο active site (στο STD NMR μόνο οι φασματικές κορυφές του competitor αφού σαν πιο ισχυρός ligand εκτοπίζει από το binding site τα fragments)

3) Η πρόσδεση των fragments επιβεβαιώνεται και χαρακτηρίζεται η ισχύς πρόσδεσής τους (K_D) με χρήση αρκετών βιοφυσικών μεθόδων. Διευκρινίζεται ο τρόπος πρόσδεσης (binding mode) με 15N HSQC NMR ή/και x-ray ώστε τα πειραματικά δεδομένα να καθοδηγήσουν τις *in silico* μελέτες για τη βελτιστοποίηση των fragments



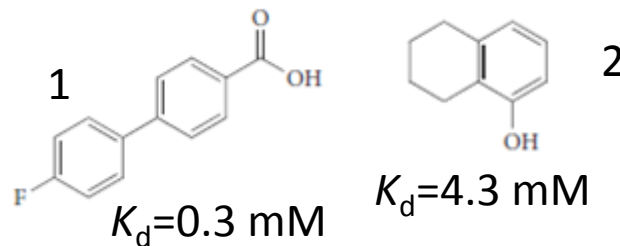
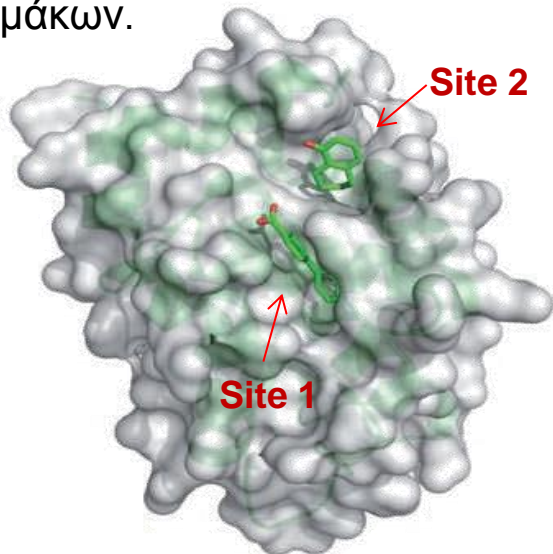
Στις επόμενες 2 διαφάνειες απεικονίζεται ένα επιτυχές παράδειγμα εφαρμογής ^{15}N HSQC NMR στον εντοπισμό 2 fragments που προσδένουν ασθενώς σε γειτονικές θήκες στην πρωτεΐνη Bcl-XL.

Το linking των fragments και περαιτέρω μελέτες βελτιστοποίησης οδήγησε στο πρώτο φάρμακο που χορηγείται κατά της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Venetoclax) (FDA approved 2016)

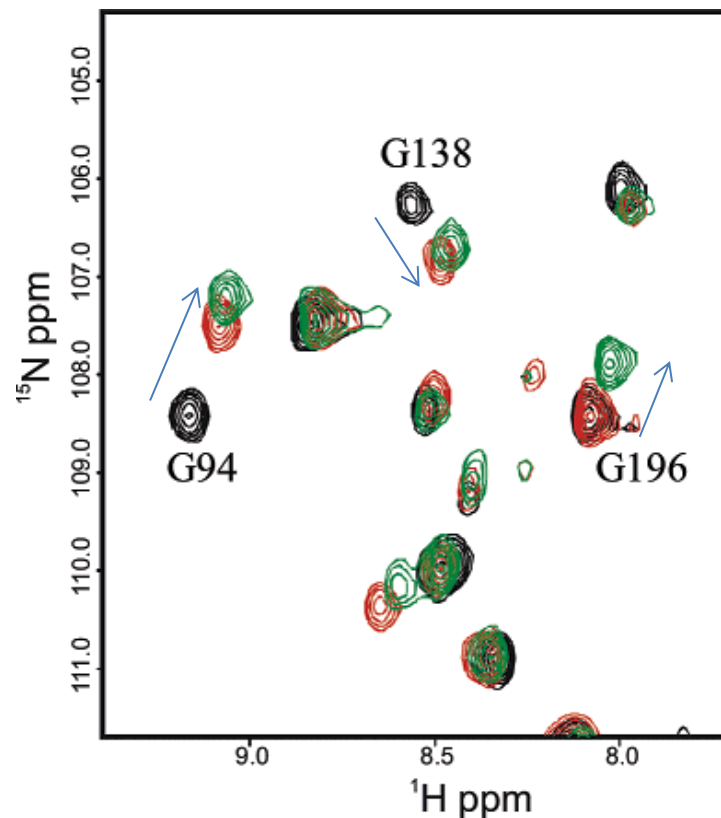
SAR (Structure Activity Relationship) by NMR: Ο όρος αναφέρεται γενικά στη χρήση του NMR (^{15}N HSQC NMR) για τον εντοπισμό hits από fragments που προσδένουν σε γειτονικά sites και την περαιτέρω βελτιστοποίηση σε lead μέσω σύνδεσής τους (βλέπε και διαφάνεια #51)

SAR by NMR : Ισχυροί αναστολείς Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών

Η Bcl- XL είναι αντιαποπτωτική πρωτεΐνη, υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκίνους και συμβάλλει στην έναρξη του όγκου, στην εξέλιξη και στην εκδήλωση αντίστασης σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Επομένως, αποτελεί στόχο υψηλού ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων.

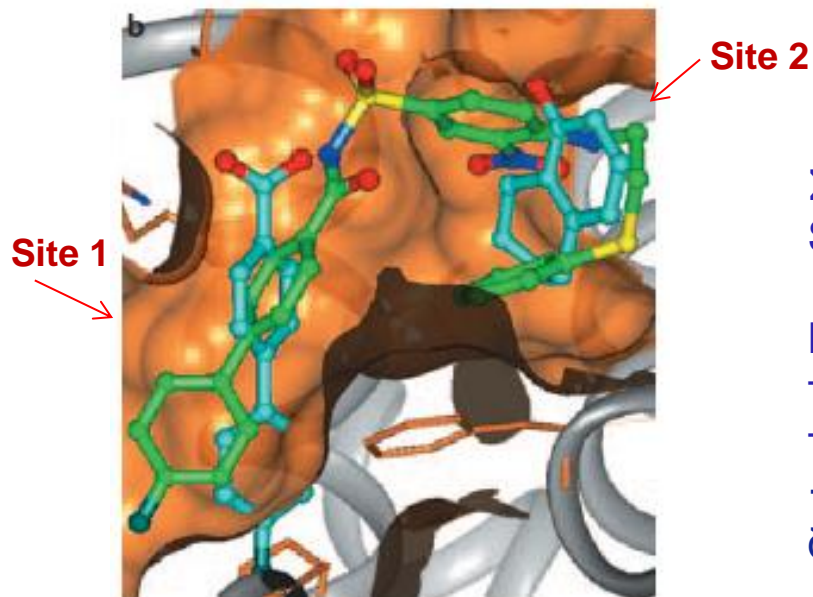


Οι ερευνητές της Abbott Laboratories σάρωσαν με ^{15}N HSQC NMR μια βιβλιοθήκη fragments και εντόπισαν 2 μόρια να προσδέονται ασθενώς σε γειτονικές θήκες στην πρωτεΐνη.



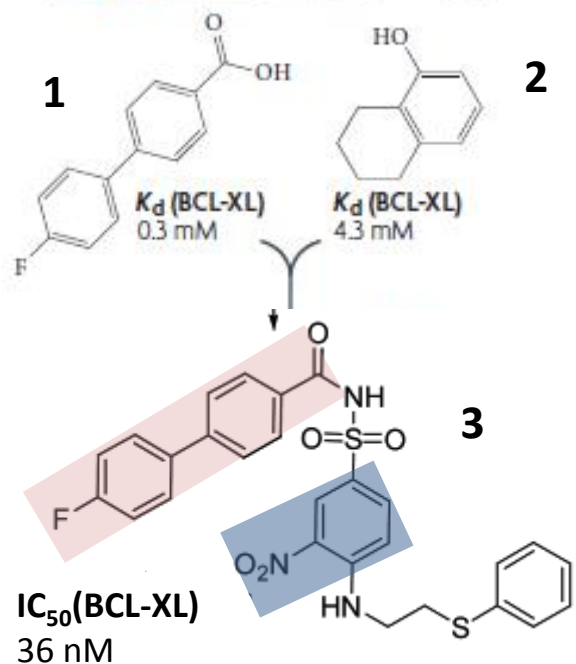
^{15}N -HSQC (expansion): Bcl-xL alone (μαύρα ίχνη), Προσθήκη του fragment 1 στο διάλυμα προκαλεί τη μετατόπιση των G138, G94 (κόκκινα ίχνη)
Στο ίδιο διάλυμα προστίθεται επιπλέον και το fragment 2 (πράσινα ίχνη) διαταράσσοντας περαιτέρω τα προηγούμενα αμινοξέα (εφόσον βρίσκονται στη διεπιφάνεια μεταξύ των 2 γειτονικών sites) αλλά προκαλεί επιπλέον και τη μετατόπιση της G196 (αμινοξύ του site 2).

SAR by NMR : Ισχυροί αναστολείς Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών

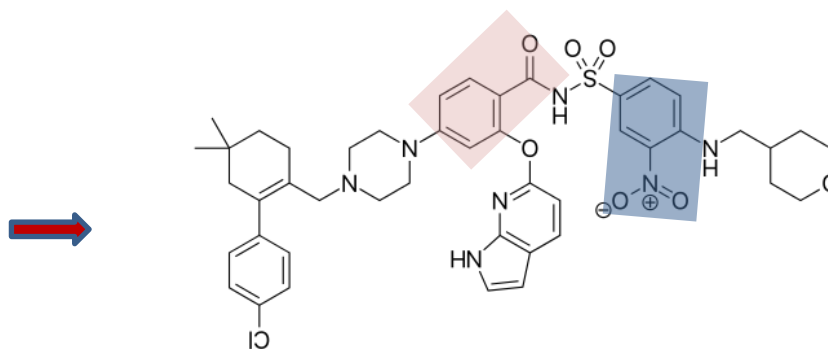


Σύνδεση των fragments και συστηματικές μελέτες SAR οδήγησε στον ισχυρό αναστολέα **3**.

Περαιτέρω βελτιστοποίηση του φαρμακολογικού προφίλ οδήγησε στο φάρμακο που χορηγείται κατά της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Venetoclax) → αποτέλεσμα συστηματικής βελτιστοποίησης των δύο fragments!!!



ABT-199(Venetoclax)
FDA Approved (2016) against CLL chronic lymphocytic leukemia



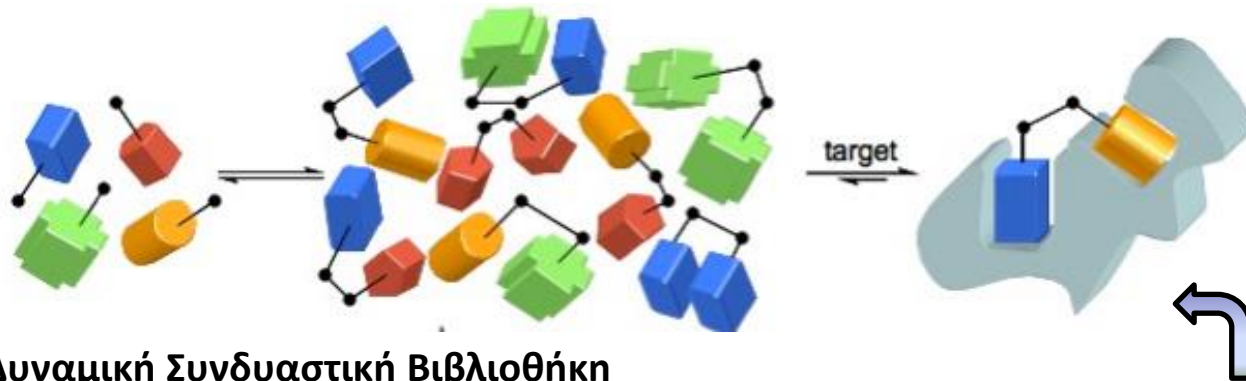
Ο βέλτιστος τρόπος σύνδεσης των fragments ώστε να προκύψει ligand με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης δεν είναι πάντα προφανής.

Στις επόμενες διαφάνειες έχουμε ένα παράδειγμα νέων Δυναμικών προσεγγίσεων (Δυναμική Συνδυαστική Βιβλιοθήκη, Dynamic Combinatorial Library -DCL) στο Fragment based drug design που ξεπερνούν αυτή τη δυσκολία.

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση μιας πρωτεΐνης-στόχου ως υπόστρωμα (template) για την επιλογή και τη σύνδεση (assembly) των βέλτιστων συνδυασμών fragments.

Το ^1H STD-NMR χρησιμοποιείται για να αναδείξει τους βέλτιστους συνδυασμούς fragments σύμφωνα με την επιλογή του πρωτεϊνικού στόχου.

Δυναμικές προσεγγίσεις (template assisted) στο Fragment-based Drug design



Δυναμική Συνδυαστική Βιβλιοθήκη (Dynamic Combinatorial Library -DCL):
τα αντιδρώντα fragments είναι στο διάλυμα σε δυναμική ισορροπία με τα προϊόντα που συντίθενται.

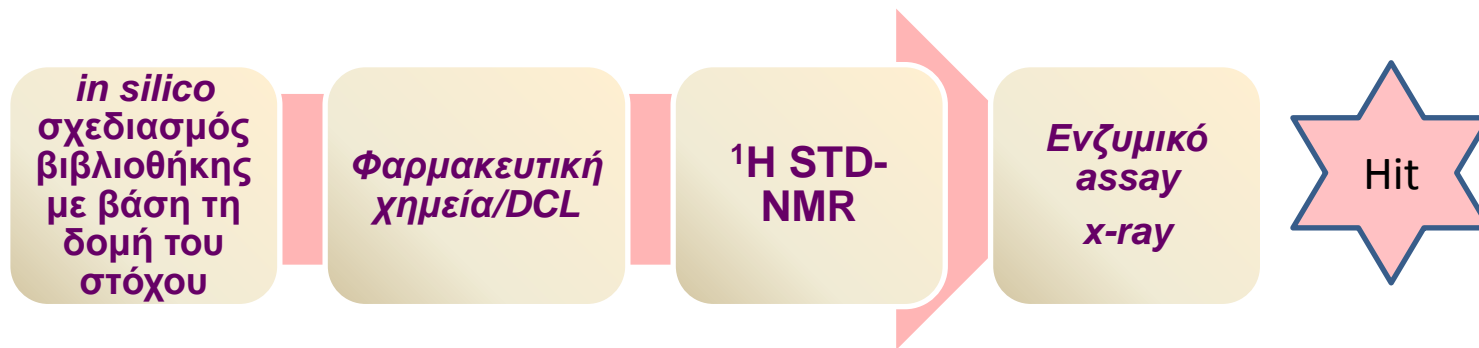
Η προσθήκη ενός βιολογικού στόχου όπου προσδέουν ένα ή περισσότερα μέλη της βιβλιοθήκης, διαταράσσει την ισορροπία και η DCL ανταποκρίνεται επιλέγοντας να ενισχύσει τη σύνθεση των μελών που προσδέουν (αρχή Le Chatelier)

Νέοι αναστολείς της ασπαρτικής πρωτεάσης Ενδοθειαπεψίνης (Endothiapepsin)

Οι ασπαρτικές πρωτεάσες εμπλέκονται σε αρκετές ασθένειες όπως η υπέρταση, η ελονοσία, το AIDS.

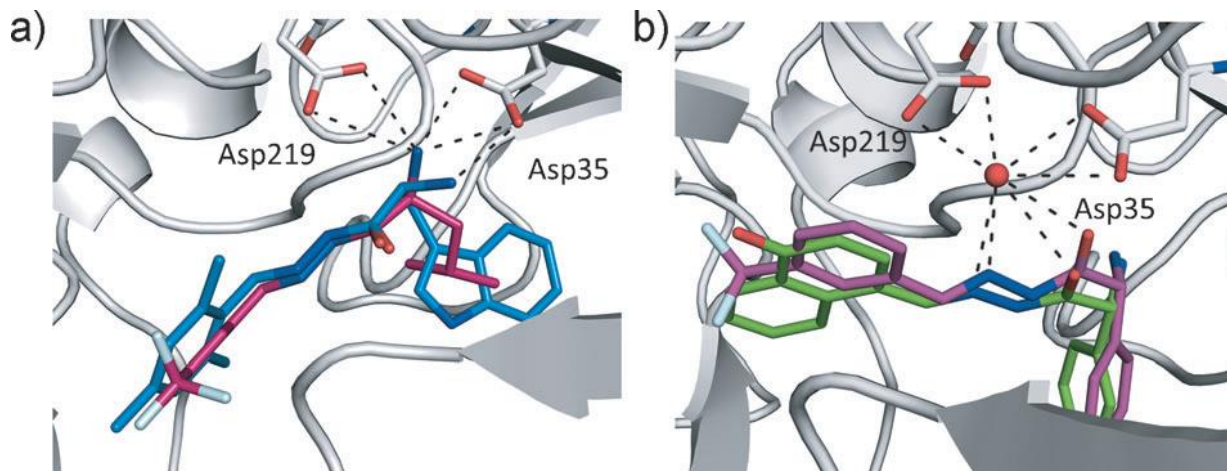
Το ένζυμο της ενδοθειαπεψίνης (απομονώνεται από το μύκητα ascomycete *Endothia parasitica*) χρησιμοποιείται ως μοντέλο στην ανάπτυξη αναστολέων των ασπαρτικών πρωτεασών.

(έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη αναστολέων της ρενίνης με αντιυπερτασική δράση και της β-σεκρετάσης (BACE) που εμπλέκεται στη νόσο Αλτσχάιμερ)



Στη μελέτη αυτή εφαρμόσαμε μια Ολοκληρωμένη προσέγγιση για την ανακάλυψη νέων αναστολέων της ενδοθειαπεψίνης βασιζόμενοι σε αρχικές *in silico* μελέτες που έδειξαν ότι οι ακυλιδραζόνες (βλ. επόμενη διαφάνεια) μπορούν να σχηματίσουν ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης

Νέοι αναστολείς της ασπαρτικής πρωτεάσης Ενδοθειαπεψίνης (Endothiapepsin)



Οι ασπαρτικές πρωτεάσες χρησιμοποιούν δυο εντόνως συντηρημένα Asp στο καταλυτικό κέντρο τους για τη διάσπαση των πεπτιδικών υποστρωμάτων τους.

Αρχικές *in silico* μελέτες έδειξαν ότι οι ακυλδραζόνες αποτελούν μια ελκυστική επιλογή ως πιθανοί αναστολείς δεδομένης της παρουσίας του αμιδικού δεσμού που μπορεί να συνεισφέρει είτε ως δότης είτε ως δέκτης σε δεσμό-Η απευθείας ή μέσω H₂O με τα Asp αμινοξέα του ενεργού κέντρου.

Σχηματισμός ακυλδραζονών από υδραζίδια και αλδεΐδες

Υδραζίδια

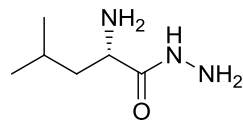
Αλδεΐδες

Ακυλδραζόνες

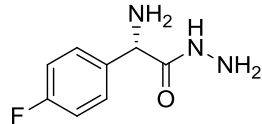


Αυτός ο δεσμός (N=C→imine type) είναι εξαιρετικά ασταθής σε υδατικό διάλυμα (που ενδιαφέρει για τις βιολογικές εφαρμογές). Έτσι οι ακυλδραζόνες (προϊόντα) είναι σε δυναμική ισορροπία με τις αρχικές δομικές μονάδες τους (αντιδρώντα), τα υδραζίδια και τις αλδεΐδες

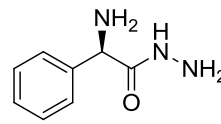
Επιλέχθηκαν ως αρχικά μέλη της δυναμικής βιβλιοθήκης 5 υδραζίδια (H1-H5) και 5 αλδεύδες (A1-A5) με δυνατότητα σχηματισμού 25 ακυλυδραζονών (όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί τους) → *in silico* μελέτες είχαν επιβεβαιώσει ότι όλοι αυτοί οι συνδυασμοί μπορούσαν να προσδέσουν στο ενεργό κέντρο της ενδοθειαπεψίνης



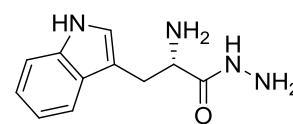
H1



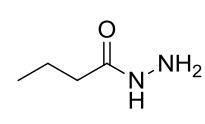
H2



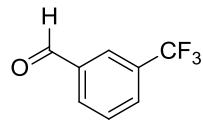
H3



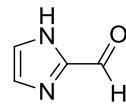
H4



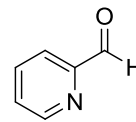
H5



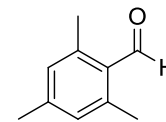
A1



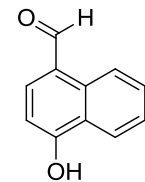
A2



A3

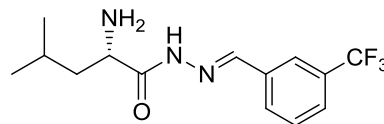
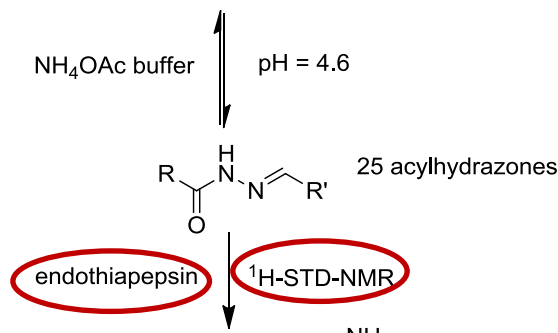


A4

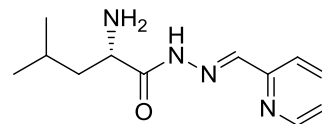


A5

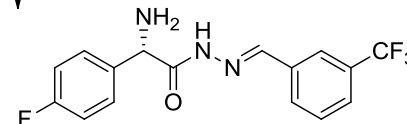
Στο διάλυμα προστέθηκε η ενδοθειαπεψίνη. Από τα 25 μέλη της δυναμικής βιβλιοθήκης που μπορούσαν να σχηματιστούν, το ¹H-STD NMR αναγνώρισε μόνο 8 μέλη ως ισχυρούς προσδέτες στο ένζυμο (η ενζυματική επιλογή μετατόπισε την ισορροπία της δυναμικής βιβλιοθήκης ενισχύοντας τη σύνθεση αυτών των 8 μελών της)



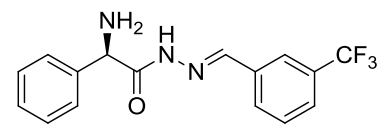
(S)-H1-A1



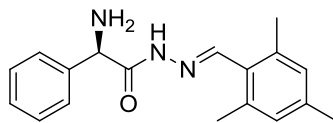
(S)-H1-A3



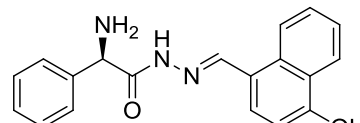
(S)-H2-A1



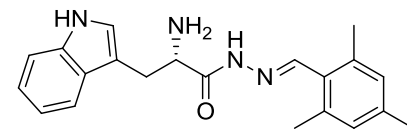
(R)-H3-A1



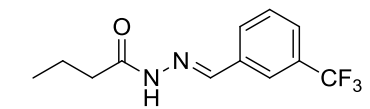
(R)-H3-A4



(R)-H3-A5

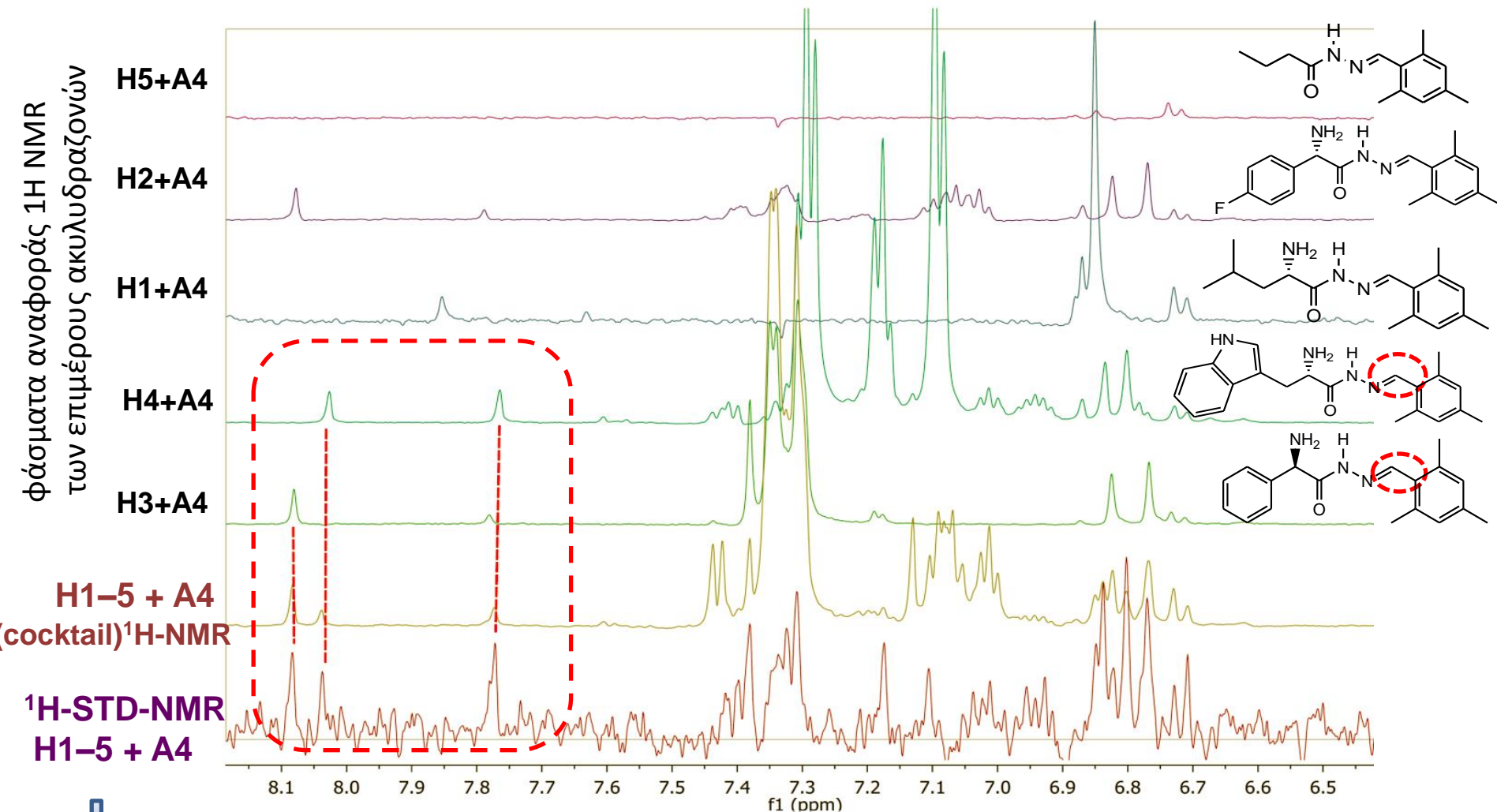


(S)-H4-A4



H5-A1

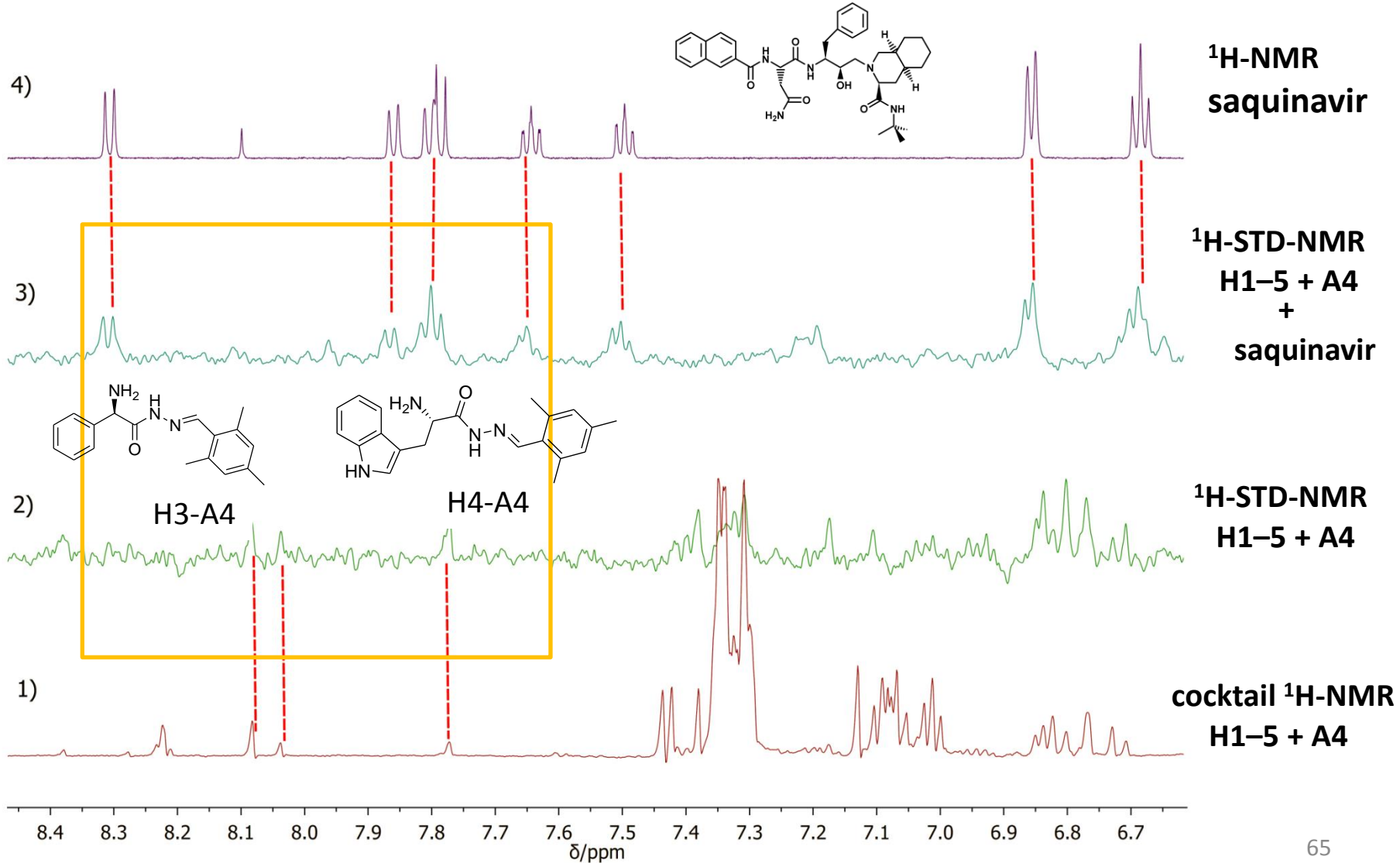
Παράδειγμα: Πώς αντιδρά η Δυναμική υποβιβλιοθήκη (H1-H5)+A4 στην παρουσία της ενδοθειαπεψίνης?



➤ Το ¹H-STD NMR αναγνωρίζει μόνο τα ιμινο-¹H (E/Z ισομερή) των μελών **H4A4** και **H3A4** παρουσία του ενζύμου υποδηλώνοντας ότι δεν ενισχύεται η σύνθεση των υπολοίπων μελών της υποβιβλιοθήκης.

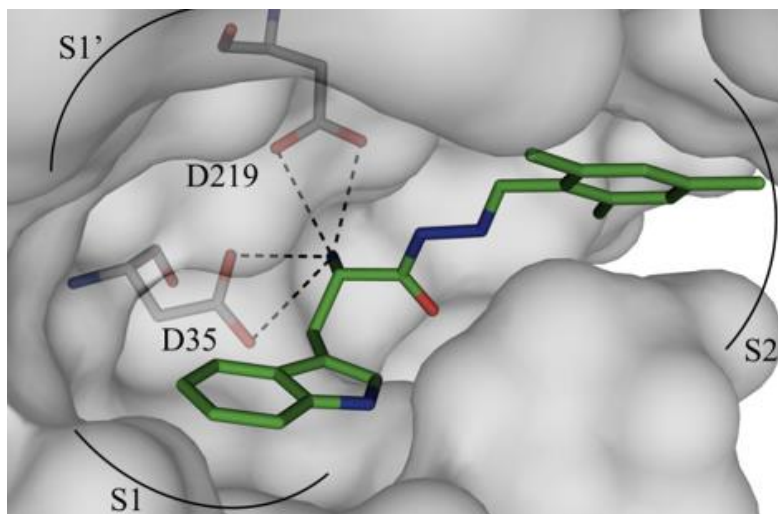
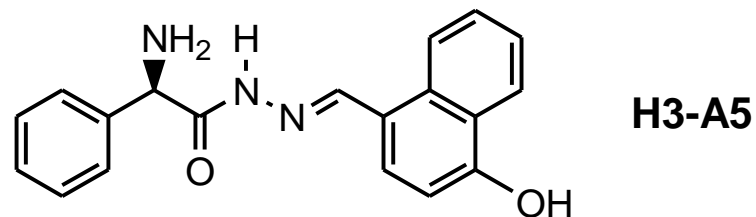
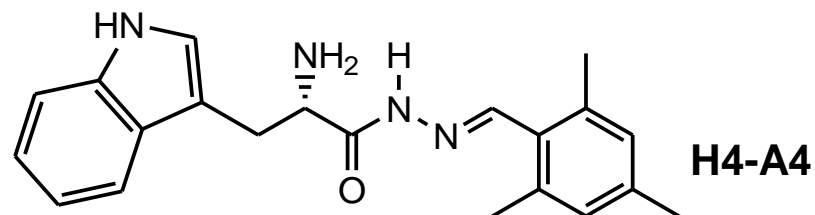
Επιβεβαίωση επιλεκτικής πρόσδεσης (specific binding) με πειράματα ανταγωνισμού (competition studies).

Προσθήκη saquinavir (ισχυρός αναστολέας ασπαρτικών πρωτεασών ($K_i=48$ nM)) στο διάλυμα της υποβιβλιοθήκης (H1-H5)+A4 με την ενδοθειαπεψίνη. → Εξαφάνιση των κορυφών των **H3-A4** και **H4-A4** και εμφάνιση των κορυφών του ισχυρού αναστολέα saquinavir → Προσδέχονται στο ίδιο κέντρο



Το ενζυμικό *in vitro* assay επιβεβαίωσε τη δραστηριότητα των νέων αναστολέων αναδεικνύοντας δύο ισχυρούς αναστολείς (low μM)

| Inhibitor | IC_{50} [μM] |
|------------------|------------------------------------|
| (S)-H4-A4 | 12.8 ± 0.4 |
| (R)-H3-A5 | 14.5 ± 0.5 |
| (S)-H1-A1 | 150 ± 17 |
| (S)-H2-A1 | 177 ± 13 |
| (R)-H3-A4 | 206 ± 19 |
| (R)-H3-A1 | 352 ± 13 |
| (S)-H1-A3 | 365 ± 95 |
| H5-A1 | insoluble |



Χ-ray μελέτες επιβεβαίωσαν το θεωρητικά προβλεπόμενο τρόπο πρόσδεσης στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου

(S)-H4-A4 in complex with endothiapepsin

Βιβλιογραφία

1. Biomolecular NMR: a chaperone to drug discovery Marco Betz, Krishna Saxena and Harald Schwalbe
Current Opinion in Chemical Biology 2006, 10:219–225
2. REVIEW-Principles of early drug discovery
JP Hughes, S Rees, SB Kalindjian and KL Philpott
3. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors,
Bernd Meyer and Thomas Peters. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, No. 8
4. SAR by NMR: Putting the Pieces Together . P.J. Hajduk. *Molecular Interventions* , 2006, issue 5, vol 6, p. 267
5. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age
Nat Rev Drug Discov. 2008 September ; 7(9): 738–745.
6. NMR-based screening: a powerful tool in fragment-based drug discovery
Jochen Klages, Murray Coles and Horst Kessler. *Analyst*, 2007, 132, 692–705 | 693
7. Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. D. E. Scott, A. G. Coyne, S. A. Hudson, and C. Abell.
[Biologydx.doi.org/10.1021/bi3005126](https://doi.org/10.1021/bi3005126) | *Biochemistry* XXXX, XXX, XXX–XXX
8. Dynamic template-assisted strategies in fragment-based drug discovery. M. F. Schmidt and J. Rademann. *Trends in Biotechnology* Vol.27 No.9.
[doi:10.1016/j.tibtech.2009.06.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.06.001)