doi: 10.2478/v10221-011-0025-0

Od matematike do razvoja zdravil

From mathematics to drug development

Dušanka Janežič¹

¹Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije,
Glagoljaška 8, 6000 Koper
Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno modeliranje, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana
e-pošta: dusa@cmm.ki.si

pregledni znanstveni članek

UDK:577:519.17

članek prispel: 2. 7. 2012; članek sprejet: 13. 7. 2012

citirajte članek kot / cite this article as:
Bilt – Ekon Organ Inform Zdrav 2012; 28(2): 97-110

Izvleček

Razvoj novih zdravil je dolgotrajen in drag proces, saj celotni postopek od ideje do končnega izdelka običajno zahteva vsaj deset let raziskav in več kot milijardo dolarjev. Z uporabo novih matematičnih pristopov in modernih računalnikov skušamo skrajšati in poceniti predvsem zgodnje faze razvoja, pri čemer nas zanimajo tarčne biološke molekule, ki so vpletene v potek različnih bolezni.

V Laboratoriju za molekularno modeliranje na Kemijskem inštitutu v Ljubljani razvijamo nova matematična orodja za uporabo na področju razvoja novih zdravil. Z algoritmi, ki temeljijo na teoriji grafov in metodah simulacije molekulske dinamike, preučujemo tarčne biološke molekule in pridobivamo pomembne podatke za optimiziranje zgodnjih stopenj razvoja novih zdravil.

Ključne besede: simulacija molekulske dinamike, teorija grafov, razvoj zdravil

Abstract

Drug development is a lengthy and expensive process that requires at least ten years of research and more than a billion dollars in resources from idea to final product. The use of new mathematical approaches and modern computer

technologies allows us to reduce the time and cost, mainly in the early stages of drug development. We are mostly interested in target biological molecules present in the course various diseases.

At the Laboratory for Molecular Modeling, National Institute of Chemistry in Ljubljana, we develop new mathematical tools to be used in the discovery of new drugs. With algorithms based on graph theory and molecular dynamics simulation we study target biological molecules and gather important data to optimise the early stages of drug development.

Key words: molecular dynamics simulation, graph theory, drug development

Uvod

Farmacevtska industrija se v zadnjih letih sooča z vsakovrstnimi naraščajočimi pritiski: javnost ji očita nemoralno pohlepnost in netransparentno poslovanje, regulacijski organi postavljajo vse strožje zahteve glede učinkovitosti in varnosti njihovih izdelkov, medtem ko ekonomisti tarnajo nad slabim razmerjem med vloženimi sredstvi in neposrednim dobičkom. Tudi delež generičnih pripravkov med predpisanimi zdravili vztrajno narašča, zato morajo takoj po izteku patentne zaščite originalnega zdravila njegovi razvijalci računati z nenadnim izpadom dohodka. Ocenjujejo, da so po izgubi patenta originatorske tovarne, tj. tovarne, ki proizvajajo originalno zdravilo, s prodajo novih izdelkov v povprečju sposobne nadomestiti le četrtno izpadlega dohodka.

Brez bistvenega izboljšanja produktivnosti pri razvoju novih zdravil tako trenutni poslovni model velikih farmacevtskih tovarn ne bo vzdržal dolgo, saj ta hip ne zagotavlja zadostne inovativnosti, s katero bi pokrili upad dohodkov po izteku patentov uspešnih zdravil. Za omenjeno stanje je ključno vztrajno zmanjševanje števila novih učinkovin, ki so jih za uporabo odobrile pristojne agencije za zdravila (FDA, EMEA in druge). V zadnjih letih je bilo z biološkimi pripravki vred odobrenih približno 20, pri čemer pa je potrebno poudariti, da je velika večina zgolj analogov že registriranih učinkovin. Število potencialno dobičkonosnih novih zdravil glede na vložena sredstva za razvoj strmo upada.

Sodobni razvoj novega zdravila poteka po utečenih in visoko reguliranih stopnjah, ki jih prikazujemo na Sliki 1. Stopnja odkrivanja učinkovin obsega različne eksperimentalne in računske pristope, s katerimi odkrivamo in ocenjujemo večje število spojin, ki imajo vezavno afiniteto do izbrane biološke tarčne makromolekule. Na tej stopnji za eno samo kasneje odobreno zdravilo povprečno analiziramo od 5.000 do 10.000 spojin, od katerih jih približno 250 preide v predklinične raziskave, ko na tkivnih vzorcih, živih živalih, pa tudi s pomočjo računalniških modelov preverjamo predvsem farmakokinetične in toksične lastnosti nove učinkovine. Preko predkliničnih raziskav se uspešno prebija le približno 2 % spojin, ki jih je nato

potrebno še patentno prijaviti in začeti klinične raziskave. V okviru kliničnih raziskav v treh fazah preverjamo zanesljivost, varnost in učinkovitost bodočega zdravila s strogo nadzorovanimi preizkusi na ljudeh – v prvi fazi na zdravih prostovoljcih, nato pa na naraščajočem številu bolnikov, ki jim je posamezna učinkovina namenjena. Za zdravilo, ki uspešno prestane klinične preizkuse, moramo nato pristojno agencijo zaprositi za dovoljenje za promet. Agencija natančno in podrobno preuči dokaze o zanesljivosti, varnosti in učinkovitosti na vseh stopnjah razvoja ter v primeru izpolnjevanja vseh regulatornih zahtev odobri trženje novega zdravila za določeno indikacijo. Spremljanje zdravila po prihodu na trg, t. i. farmakovigilančna oziroma četrta faza kliničnih raziskav, je nadvse pomembno predvsem za zaznavanje redkejših neželenih učinkov, vpliva genotipskih variacij na učinek zdravila ter interakcij s hrano in z drugimi zdravilnimi učinkovinami.

Slika 1. Shema stopenj pri razvoju zdravil s pripadajočimi časovnimi okvirji in z oceno povprečnih stroškov za posamezno stopnjo.

Na Sliki 1 prikazujemo časovni okvir in denar, potreben za uspešno dokončanje posameznih razvojnih stopenj. Novo zdravilo do prihoda na trg običajno zahteva 10–15 let raziskav in 800–1500 milijonov dolarjev. Slika 2 prikazuje podroben razrez stroškov za posamezno razvojno stopnjo. Vidimo lahko, da je končna cena še večja, saj upošteva tudi amortizirane stroške (povzeto po Nature Reviews Drug Discovery, (1)). Kar polovica cene razvoja nastane v zgodnjih fazah razvoja in predkliničnih raziskav; v teh fazah bi lahko z računalniškimi metodami in matematičnimi modeli bistveno zmanjšali tako trajanje raziskav kot tudi stroške. Druga polovica cene nastane v fazi kliničnih raziskav, ki jih zaradi kompleksnosti presnovnih poti in variabilnosti med posamezniki najbrž nikoli ne bo mogoče zaobiti ali nadomestiti s cenejšimi metodami.

Figure 2 | R&D model yielding costs to successfully discover and develop a single new molecular entity. The model defines the distinct phases of drug discovery and development from the initial stage of target-to-hit to the final stage, launch.

Vir: Paul et al. Nature Reviews Drug Discovery 9, 203-214 (2010)

Slika 2. Prikaz takojšnjih stroškov (peta vrstica od zgoraj) in amortiziranih stroškov (spodnja vrstica) za raziskave in razvoj pred vstopom nove zdravilne učinkovine na trg. Stroški so izraženi v milijonih dolarjev. Oznaka $p(TS)$ pomeni verjetnost prehoda v naslednjo stopnjo raziskav.

Pocenitev in povečanje produktivnosti pri razvoju zdravil je torej mogoče predvsem v zgodnjih stopnjah razvoja. Vse pomembnejšo vlogo namreč igrajo računski pristopi, ki jih razvijamo tudi v Laboratoriju za molekularno modeliranje na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Poleg klasičnih računalniških simulacij se v zadnjih letih intenzivno posvečamo uporabi teorije grafov pri študiju bioloških makromolekul. Z združevanjem obeh pristopov, optimizacijo molekulske dinamike ter razvojem graf-teoretičnih algoritmov (Slika 3) smo na poti k zaokroženi obravnavi biomolekulskega sistema, ki bo omogočila, da bomo o tarčnih biomolekulah pridobili neprecenljive podatke predvsem za zgodnje stopnje razvoja zdravil.

Metode

Molekularno modeliranje

Molekularno modeliranje preučuje lastnosti molekul tako, da jih poustvari kot računalniške modele in jih obravnava z uporabo različnih matematičnih pristopov. Je nepogrešljivo orodje pri teoretičnih raziskavah v naravoslovnih in tehničnih znanostih, kot so kemija, molekularna fizika, strukturna biologija in farmacija. Molekularno modeliranje uporabljamo za reševanje problemov strukture in dinamike molekul, snovi v gmoti, kemijskih in biokemijskih reakcij ter razvoja novih zdravil. Razvoj metod molekularnega modeliranja je tesno povezan z razvojem najmodernejših računalnikov.

Slika 3. Shema zaokrožene obravnave biomolekulskega sistema, ki vključuje molekulsko dinamiko in graf-teoretične pristope za izračun farmacevtsko zanimivih lastnosti tarčnih biomolekul.

Slika 4. Splošni princip delovanja molekularnega modeliranja.

Metode računalniške simulacije so se v zadnjih desetletjih zelo razširile pri raziskavah v molekularni kemiji, strukturni biologiji, pri študiju strukture raztopin

itd. Tolikšen razvoj metod je omogočil zlasti napredek pri eksperimentalnih tehnikah, kot so jedrska magnetna resonanca, rentgensko in nevtronsko sipanje, časovno ločljiva spektroskopija itd., ki terjajo vse podrobnejši vpogled v potek osnovnih fizikalnih in kemijskih procesov. Tovrstni vpogled je mogoče zagotoviti le s pomočjo računalniških simulacij. Za razumevanje strukturnih in dinamičnih lastnosti makromolekulskih sistemov je odločilno razumevanje osnovnih procesov na atomski ravni. Skokovit razvoj računskih metod in lahka dosegljivost zelo hitrih procesorjev omogočata modeliranje sistemov poljubnih velikosti.

Metode za simulacijo molekulske dinamike se razvijajo predvsem v smeri podaljševanja časovnega obsega simulacij in povečevanja modelnih sistemov, kar prispeva k razumevanju odnosa med strukturo in funkcijo bioloških makromolekul. Časovni obseg simulacij bi moral biti precej večji od sedanje nanosekundne skale, da bi lahko opisali kemijsko in biološko zanimive procese na mikrosekundni skali. Pričakujemo, da bo razvoj novih metod za simulacijo molekulske dinamike in njihova izvedba na vzporednih računalnikih pospešila simulacijo molekulske dinamike za več velikostnih redov. To bo omogočilo natančnejšo obravnavo znanih problemov in tudi obravnavo novih problemov.

V Laboratoriju za molekularno modeliranje na Kemijskem inštitutu v Ljubljani smo razvili simplektične algoritme, ki temeljijo na predpostavki, da lahko del celotnega gibanja molekule obravnavamo analitično. Pri tem smo uporabili dva osnovna pristopa. V prvem smo združili klasično teorijo molekulskih vibracij s formalizmom Liejevih operatorjev in izpeljali računsko učinkovit algoritem za simulacijo molekulske dinamike (*angl.* Split Integration Symplectic Method, SISM). (2-4) Ta pristop dovoljuje analitično obravnavo harmonskega gibanja, ki izhaja iz veznih interakcij znotraj posamezne molekule. V drugem pristopu smo na podoben način analitično obravnavali le razteg kemijskih vezi z vodikovimi atomi. Ta pristop, ki ga imenujemo tudi SISMH, še posebej odlikuje enostavna izvedba pri simulacijah molekularnih sistemov poljubne kompleksnosti. Oba pristopa smo nadalje optimizirali s povprečenjem (zgladitvijo) sunkov sil, ki niso vključene v analitični del integracijskega koraka in večinoma izhajajo iz neveznih interakcij dolgega dosega. Na ta način namreč izničimo komponente medmolekulskih sil v smereh, vzdolž katerih se vzbuja visokofrekvenčne anharmonske sile, s čimer še dodatno izboljšamo stabilnost omenjenih integracijskih metod.

Napovedovanje proteinskih vezavnih mest

Razvoj metod za molekularno modeliranje za preučevanje interakcij med proteini in različnimi molekulami je vse bolj aktualen, poganjajo pa ga nenehne izboljšave računalniške tehnologije. Vezavna mesta na proteinih so deli proteinskih površin, s katerimi se vežejo na druge molekule, določene s strukturo vezavnega mesta, in so specifične za posamezno vezavno mesto. Zaradi specifičnosti vezave se tridimenzionalna struktura vezavnih mest ohranja skozi evolucijo, zato so si v proteinih, ki opravljajo sorodne biokemijske funkcije, vezavna mesta podobna.

Kljub hitro rastočemu številu znanih proteinskih struktur v proteinski banki še vedno ne vemo dovolj o podobnostih med vezavnimi mesti na teh proteinih. V zadnjem času se uveljavlja ideja, da bi lahko odkrivanje teh podobnosti lahko uporabili tudi pri razvoju zdravil. Tako so pred kratkim ugotovili, da nekateri inhibitorji, ki se uporabljajo pri zdravljenju raka, izkazujejo tudi protibakterijsko delovanje. Do tega spoznanja so prišli tako, da so primerjali vezavna mesta proteinov, udeleženih pri nastanku raka, in proteinov, ki omogočajo razvoj bakterijske celične stene. Trenutne metode za primerjanje proteinskih vezavnih mest imajo še nekaj pomanjkljivosti in npr. ne upoštevajo dinamike vezavnih mest. Ob vezavi molekule liganda namreč pride do prerazporeditve atomov v vezavnem mestu, česar s statično obravnavo vezavnih mest ne moremo napovedati. Dinamična obravnava, ki jo predstavlja molekulska dinamika, med drugim omogoča izračun proste energije pri vezavi molekul v napovedana vezavna mesta.

Razvoj novih zdravil je trenutno usmerjen na nekaj sto znanih tarčnih proteinov, kljub temu, da naj bi bilo v proteinski bazi že sedaj nekaj tisoč potencialnih tarčnih proteinov. Zaradi tesne zveze med vezavnimi mesti in funkcijo proteinov pa metode za napovedovanje vezavnih mest na proteinih uporabljamo tudi za odkrivanje funkcij proteinov oziroma novih tarčnih proteinov. Z metodami za primerjavo vezavnih mest lahko pojasnimo, zakaj se določena zdravila vežejo s točno določenimi vezavnimi mesti, z drugimi pa ne. Na ta način lahko pojasnimo tudi nepričakovane in pogosto nezaželene učinke nekaterih zdravil.

Splošno uveljavljena strategija pri razvoju metod za napovedovanje proteinskih vezavnih mest je, da s pomočjo analize lastnosti proteinske površine za množico znanih proteinov določimo parametre, s pomočjo katerih lahko razlikujemo med proteinskimi vezavnimi mesti in ostalimi deli površine proteinov. Razvoj naših algoritmov za napovedovanje proteinskih vezavnih mest pa sloni na ideji, da najbolj ohranjeni del površine proteina v smislu ohranjanja fizikalno-kemijskih lastnosti sovпада z vezavnim mestom za ligande ali z vezavnim mestom za drug protein.

Razvili smo lasten algoritem za lokalno strukturno primerjavo in prileganje proteinov, ki jih imenujemo »proteinska vezavna mesta« (*angl.* Protein Binding Sites, ProBiS) (5). Z algoritmom ProBiS lahko določimo stopnjo ohranjenosti za vsako aminokislino na površini proteina, s tem pa tudi določitev vezavnih mest. Ker je površina proteina na mestu vezave z drugim proteinom navadno bolj ravna kot v vezavnih mestih za male organske molekule, ki se navadno nahajajo v votlinah znotraj proteina, je ta vezavna mesta z obstoječimi pristopi tudi težje napovedati. Naš algoritem lahko napoveduje tudi vezavna mesta na ravnih površinah, zato lahko proteinska vezavna mesta napovedujemo bolj nepristransko kot z drugimi znanimi metodami.

Algoritem ProBiS temelji na predstavitvi proteinskih površin z matematičnimi grafi. Molekule so naravni primer grafov, saj so sestavljene iz vozlišč (atomov) in povezav (vezi) med njimi. Teorijo grafov ProBiS uporablja na višji ravni abstrakcije: vozlišče predstavlja skupek atomov – funkcionalno skupino, povezava pa bližino

med vozlišči v realnem kemijskem prostoru. Takšen opis zajame tako geometrične kot tudi fizikalno-kemijske lastnosti površine proteina.

Podobnosti v strukturah proteinov lahko iščemo z iskanjem podobnosti med dvema proteinskima grafoma, ki je sorazmerna z velikostjo njunega največjega skupnega podgrafa. Tega lahko odkrijemo z iskanjem maksimalne klike v t. i. produktnem grafu (Slika 5). Maksimalna klika je popolnoma povezan podgraf danega grafa z maksimalnim številom vozlišč. Mi smo jo uporabili za napovedovanje vezavnih mest na proteinih. Razvili smo algoritem za iskanje maksimalne klike v neusmerjenem grafu (6), ki je do 10-krat hitrejši od primerljivih algoritmov.

Slika 5. Proces iskanja maksimalne klike v produktnem proteinskem grafu, sestavljenem iz dveh proteinskih grafov G1 in G2. Funkcionalne skupine so označene z DO, AC, ACDO, PI in AL ter predstavljajo donor vodikove vezi, akceptor vodikove vezi, mešani tip, tj. akceptor in donor vodikove vezi, aromatsko skupino in alifatsko skupino. Poiščemo maksimalno kliko v produktnem grafu, ki predstavlja največjo skupno podstrukturo v obeh proteinskih grafih.

Algoritem ProBiS se razlikuje od večine programov za iskanje strukturnih podobnosti v tem, da zna podobnosti najti tudi v primerih, ko se primerjani proteini razlikujejo v svojem splošnem zvitju, a imajo podobna vezavna mesta. Razvita orodja (7, 8) omogočajo napovedovanje vezavnih mest in iskanje tem mestom podobnih vezavnih mest v proteinski bazi. Omogočajo tudi napovedovanje vezave molekul na dani protein, tj. napovedovanje biološke aktivnosti molekul, kar je uporabno predvsem pri razvoju novih zdravil.

Rezultati

Spletna orodja ProBiS

Ob algoritmu ProBiS smo razvili tudi spletni strežnik (9) in podatkovno bazo, (10) ki sta prosto dostopna na naslovu *probis.cmm.ki.si* (Slika 6) in omogočata

napovedovanje proteinskih vezavnih mest ter primerjavo oziroma prileganje kristalografsko ali z NMR določenih proteinskih struktur iz proteinske baze. Podatkovna baza ProBiS vsebuje vnaprej izračunane primerjave proteinov za več kot 30.000 nepresežnih proteinskih struktur, do katerih je mogoč hiter dostop v nekaj sekundah.

ProBiS 2012 Protein Binding Sites Detection
As of Feb 11, 2012 your protein is compared with 29919 structures

e.g., PDB ID Search [HOME](#)

Introduction

- If you are new to ProBiS, you can watch the introductory video available here.

ProBiS-Tools

- ProBiS Tools Home
- Detect Structurally Similar Binding Sites
- Pairwise Local Structural Alignment
- RESTful Web Services
- Database Access

Help

- User's Guide
- User's Guide - HTML
- Examples

Download

- Non-redundant PDB (nr-PDB)

Citation

- Konc.J. and Janezic.D. ProBiS – 2012: Web Server and Web Services for Detection of Structurally Similar Binding Sites in Proteins. *Nucleic Acids Res.*, submitted.

Related Citations

- Konc.J., Cesnik.T., Trykowska.Konc.J., Pencina.M., Janezic.D. ProBiS-Database: Precalculated Binding Site Similarities and Local Pairwise Alignments of PDB Structures. *J. Chem. Inf. Mod.*, 2012, **52**, Doi:10.1021/je2005687.
- Konc.J. and Janezic.D. ProBiS algorithm for detection of structurally similar protein binding sites by local structural alignment. *Bioinformatics* 2010, **26**, 1160-1168.
- Konc.J. and Janezic.D. ProBiS: A web server for detection of structurally similar protein binding sites. *Nucleic Acids Res.* 2010, **38**, W436-W440.
- Konc.J. and Janezic.D. Protein-protein binding-sites prediction by protein surface structure conservation. *J. Chem. Inf. Mod.*, 2007, **47**, 940-944.
- Konc.J. and Janezic.D. An improved branch and bound algorithm for the maximum clique problem. *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.*, 2007, **58**, 569-590.

Protein Binding Sites Tools

ProBiS is an open server for the detection of structurally similar protein binding sites and pairwise local structural alignment.

Detect Structurally Similar Binding Sites

Input a query protein or a binding site and the ProBiS-algorithm will structurally compare the query independently of sequence or fold with 29919 non-redundant (>95% seq.id.) protein structures.

ProBiS allows:

- The detection of global or local similarities in proteins across folds
- The detection of structurally similar binding sites even on flat surfaces
- The detection of structurally conserved binding sites (fingerprints) of the query protein
- The accurate superimpositions of similarly or differently folded proteins

[Go To Input Page](#)

Pairwise Local Structural Alignment

Input two proteins or binding sites. The ProBiS-algorithm will compare the structures based on geometry as well as physicochemical properties and return their local structural alignment.

ProBiS allows:

- The sequence or fold independent alignment of two proteins
- The comparison of binding sites in cavities as well as on flat surfaces
- The accurate superimpositions of binding sites or entire proteins together with ligands

[Go To Input Page](#)

ProBiS-Web Server RESTful Web Services

The ProBiS RESTful Web Services interface allows an efficient programmatic access to the ProBiS web server from your scripts.

Features:

- The comparison of a binding site (defined by a ligand) against the non-redundant PDB
- The pairwise alignment and superimposition of PDB structures
- Fast response and no need to install any software

[Go To Instructions Page](#)

ProBiS-Database Access

ProBiS-Database is a repository of all-against-all local pairwise alignments of the non-redundant PDB composed of 29919 structures.

ProBiS-Database allows:

- Fast access to ~420 million pairwise local structural alignments
- You can do most of the things that you can do with 'live' ProBiS server (but faster)
- Widget to allow access to ProBiS-Database from other web pages
- ProBiS-Database RESTful web services interface (different to ProBiS-web server web services)

[Go To Instructions Page](#)

ProBiS in Brief

GDP binding site G protein alpha subunit P-loop alpha-beta binding site

3mol controls ☐ Show labels ☐ Show hetero ☐ Spacefill ☐ Spin

Variable Structurally conserved

Query structure is shown in 3mol colored by the structural similarity scores.

Contact

Your suggestions, questions, comments, or bug reports will help us to improve this site!

Name:

Comment:

ProBiS is developed at the National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia

Slika 6. Domača stran spletnega strežnika ProBiS (*probis.cmm.ki.si*).

Spletni strežnik ProBiS omogoča ugotavljanje strukturnih podobnosti med katero koli izbrano proteinsko strukturo (lahko je še ni v proteinski bazi) in proteini iz proteinske baze. Iskanje poteka na podlagi podobnosti v tridimenzionalni strukturi, ne da bi se zanašalo na že znana vezavna mesta in vstavljene ligande, upošteva pa

celotno površino proteina (Slika 7). Spletni strežnik ProBiS razpolaga z vnaprej izračunanimi rezultati in izboljšanim uporabniškim vmesnikom, kar omogoča primerjavo proteinskih površin in napoved vezavnih mest v nekaj sekundah.

Slika 7. Postopek primerjave površine dveh proteinov z iskanjem maksimalnih klik in določitvijo vezavnih mest z orodjem ProBiS.

Strežnik ProBiS je bil na povabilo avtorjev baze PDB (Protein Data Bank, www.rcsb.org) (11) uvrščen na seznam orodij za analizo proteinskih struktur na spletni strani RCSB PDB. Tu so na enem mestu zbrani najbolj uspešni programi, ki se uporabljajo za klasifikacijo novih, še neopredeljenih proteinov, predvsem tistih iz projektov strukturne genomike. Zaradi izjemne odmevnosti spletne strani RCSB so na povabilo spletne strani CCL (Computational Chemistry List) spletni strežnik ProBiS uvrstili tudi na njihov seznam računalniških orodij za analizo proteinov.

Uporabnik spletnega strežnika ProBiS najprej določi tarčni protein z vpisom kode PDB ali z izborom lastne datoteke PDB. V prvem primeru se v nekaj sekundah prikažejo vnaprej izračunani rezultati homolognega proteina neposredno iz nepresežne podatkovne baze ProBiS, tako da ne prihaja do ponovnih izračunov na že obdelanih proteinih. Če uporabnik izbere lastno datoteko, pride do izračuna *de novo*, ki traja dlje, lahko pa ga omejimo na določeno območje proteinske površine in s tem postopek pospešimo.

ProBiSova stran z rezultati (Slika 8) vsebuje model proteina, ki je obarvan glede na strukturno ohranjenost predelov proteinske površine, od neohranjenih modro obarvanih do močno ohranjenih rdeče obarvanih. Z rdečo so torej predstavljena najverjetnejša vezavna mesta. Dostopna je tudi tabela podobnih proteinov, ki so razvrščeni glede na izračunano Z-vrednost. Proteini z Z-vrednostjo, ki je večja od 2,0 so obarvani zeleno, tisti z vrednostjo med 1,0 in 2,0 pa rumeno. Večja kot je Z-vrednost, bolj so podobni primerjanemu proteinu in tako tudi bolj zaželeni v nadaljnjih analizah.

Slika 8. Primer strani z rezultati izračunov spletnega strežnika ProBiS: A) prikaz rdeče obarvanih strukturno ohranjenih delov površine; B) tabela podobnih proteinov, razvrščenih po Z-vrednosti; C) prikaz prekrivanja aminokislin v vezavnih mestih dveh nesorodnih proteinov; D) prikaz ujemanj aminokislin v tabeli; E) vgrajeni iskalnik; F) orodje za preureditev stolpcev v tabeli.

Uporaba orodij ProBiS za razvoj novih zdravil

Uporaba graf-teoretičnih metod pri razvoju novih zdravil v zadnjih letih že daje prve otipljive rezultate. V sodelovanju s farmacevtsko tovarno Lek prav zdaj poteka projekt iskanja mutacij na neki biološko pomembni proteinski molekuli, ki sodeluje z dvema pomembnima vezavnima partnerjema. Specifična vezava na enega od partnerjev, ki jo bo mogoče izvesti z dobro načrtovano mutacijo, bo nedvomno pomenil velik korak k odkritju novega biološkega zdravila.

ProBiS smo uporabili tudi pri natančnem določanju vezavnih mest na hemaglutininu, ki je potencialna tarča pri zdravljenju virusa gripe (12). Hemaglutinin se veže na receptor gostitelja, natančneje na sialno kislino, kar poskušajo z blokiranjem vezavnega mesta preprečiti. Dodaten izziv pri zasnovi cepiva proti virusu gripe v povezavi s hemaglutininom je njegova visoka mutabilnost. Kljub temu opažajo specifičnost pri vezavi na ptičji receptor LSTa in na človeški receptor LSTc. Med vsemi znanimi serotipi je ohranjeno zelo podobno mesto za vezavo sialne kisline. Izziv pri razvoju novih cepiv je iskanje ohranjenih epitopskih mest, na katere bi se lahko vezala protitelesa. Za prepoznavo takega mesta so uporabili prav ProBiS in druga bioinformacijska orodja. ProBiS je bilo edino orodje, ki je uspešno napovedalo dejansko vezavno mesto na korenu molekule hemaglutinina in tudi splošno območje površine, na katero se veže molekula protitelesa. Izsledki grafične metode bodo tako v veliko pomoč pri nadaljnjem odkrivanju široko učinkovitih protivirusnih cepiv.

Zaključek

Zaradi vse večjih pritiskov na proces razvoja zdravilnih učinkovin pred prihodom na trg se pojavlja potreba po učinkovitih, produktivnih in cenovno ugodnih metodah in postopkih. Predvsem v zgodnjih stopnjah raziskav lahko k napredku pomembno prispevajo računalniške in matematične metode, s katerimi znamo vse bolj ovrednotiti lastnosti, dinamiko in vezavo majhnih in velikih bioloških molekul.

Poleg klasičnih metod molekularnega modeliranja in simulacij molekulske dinamike pa v zadnjih letih stopajo v ospredje metode, osnovane na bolj abstraktnih predstavitev delcev snovi, kakršna je npr. teorija grafov. Učinkovito orodje, ki temelji na teoriji grafov, je spletni strežnik ProBiS, ki napoveduje vezavna mesta na površinah proteinov z znano strukturo. Pri tem uporablja lastno bazo podatkov, zgrajeno na podlagi informacij o strukturah vseh znanih in javno dostopnih proteinov. Vezavna mesta napoveduje na osnovi iskanja strukturnih podobnosti na površinah različnih proteinov, saj ohranjenost določene strukture nakazuje, da ima dotični površinski predel življenjsko pomembno funkcijo.

Primer učinkovite uporabe metode ProBiS je uspešna napoved doslej neopisanega vezavnega mesta za protitelesa na molekuli hemaglutinina, ki nam daje upanje na razvoj boljših, varnejših, široko uporabnih in cenejših protivirusnih cepiv.

Seveda pa samo s teorijo grafov kompleksnih biokemijskih procesov ne moremo vedno zadovoljivo opisati. Predvsem pri obravnavi konformacijskih sprememb, ki so ključni element medmolekulske vezave, se zatekamo k preizkušnim simulacijam molekulske dinamike. Z združevanjem pristopov simulacij molekulske dinamike in teorije grafov smo vedno bližje celostni obravnavi tarčnih biomolekul, o katerih bomo lahko pridobili neprecenljive podatke predvsem za zgodnje stopnje razvoja zdravil.

Slika 9. Molekula hemaglutinina H1 z označenim vezavnim mestom za protitelesa na korenu molekule (v kvadratu), ki ga je napovedala graf-teoretična metoda ProBiS.

Literatura

1. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9: 203-14.
2. Janežič D, Praprotnik M, Merzel F. Molecular dynamics integration and molecular vibrational theory. I, New symplectic integrators. *J Chem Phys* 2005; 122: 174101.
3. Praprotnik M, Janežič D. Molecular dynamics integration and molecular vibrational theory. II, Simulation of non-linear molecules. *J Chem Phys* 2005; 122: 174102.
4. Praprotnik M, Janežič D. Molecular dynamics integration and molecular vibrational theory. III, The IR spectrum of water. *J Chem Phys* 2005; 122: 174103.
5. Konc J, Janežič D. ProBiS algorithm for detection of structurally similar protein binding sites by local structural alignment. *Bioinformatics* 2010; 26(9): 1160-8.
6. Konc J, Janežič D. An improved branch and bound algorithm for the maximum clique problem. *MATCH Commun Math Comput Chem* 2007; 58(3): 569-90.
7. Konc J, Janežič D. ProBiS: a web server for detection of structurally similar protein binding sites. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(2): W436-40.
8. Konc J, Depolli M, Trobec R, Rozman K, Janežič D. Parallel-ProBiS: fast parallel algorithm for local structural comparison of protein structures and binding sites. *J Comput Chem* 2012; doi: 10.1002/jcc.23048.
9. Konc J, Janežič D. ProBiS-2012: web server and web services for detection of structurally similar binding sites in proteins. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(W1): W214-21.
10. Konc J, Česnik T, Trykowska Konc J, Penca M, Janežič D. ProBiS-Database: precalculated binding site similarities and local pairwise alignments of PDB structures. *J Chem Inf Mod* 2012; 52(2): 604-12.
11. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1): 235-42.
12. Yusuf M, Konc J, Trykowska Konc J, Khairudin NBA, Wahab HA, Janežič D. Accurate Hemagglutinin Binding Site Prediction with ProBiS. Poslano v objavo.