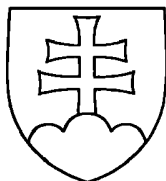


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 05.03.1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 09/036 184
(32) Dátum priority: 06.03.1998
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 12.03.2001
(86) Číslo PCT: PCT/US99/04967

(21) Číslo dokumentu:

1324-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int Cl.⁷:

G 01N 33/00

(71) Prihlasovateľ: ABBOTT LABORATORIES, CHAD Abbott Park, IL, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Nienaber Vicki L., Gurnee, IL, US;
Greer Jonathan, Chicago, IL, US;
Abad-Zapatero Celerino, Lake Forest, IL, US;
Norbeck Daniel W., Gray-slake, IL, US;

(74) Zástupca: Rott, Růžicka, Guttman, v o s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Vyhľadávanie a návrh ligandov röntgenovou kryštalografiou**

(57) Anotácia:
Röntgenová kryštalografia môže byť použitá na preverenie zlúčenín, ktoré nie sú známymi ligandmi pre biomolekuly, pre ich schopnosť viazať sa na cieľovú biomolekulu. Metóda spočíva v získaní kryštálu cieľovej biomolekuly; exponovaní kryštálu cieľovej biomolekuly jedným alebo viacerými testovacími vzorkami; a získaní röntgenového difrakčného záznamu kryštálu, aby sa zistilo, či sa vytvoril komplex ligand/receptor. Cieľová molekula je exponovaná testovacími vzorkami buď spoločnou kryštalizáciou biomolekuly v prítomnosti jednej alebo viacerých vzoriek, alebo je kryštál biomolekuly nasakovaný v roztoku jednej alebo viacerých testovacích vzoriek. Pri inom uskutočnení sa štruktúrne informácie o komplexoch ligand/receptor používajú na navrhovanie ligandov, ktoré sa viažu tesnejšie, ktoré sa viažu špecifickejšie, ktoré majú lepšiu biologickú aktivitu, alebo ktoré majú lepší bezpečnostný profil. Ďalej je opísané identifikovanie alebo navrhovanie biologicky aktívnych útvarov instantným procesom. Pri ďalšom uskutočnení sa kryštál biomolekuly, ktorý má ľahko prístupné aktívne centrum, tvorí spoločnou kryštalizáciou biomolekuly s biologicky odbúrateľným ligandom a degradovaním ligandu.

Vyhľadávanie a návrh ligandov röntgenovou kryštalografiou

Oblasť techniky

Röntgenová kryštalografia je užitočná na identifikáciu ligandov, ktoré sa viažu na cieľové molekuly receptora, a na navrhovanie ligandov so zlepšenou biologickou aktivitou pre cieľový receptor.

Doterajší stav techniky

Röntgenová kryštalografia (kryštalografia) je zavedenou, dobre preštudovanou technikou, ktorá poskytuje to, čo môže byť najlepšie opísané ako trojrozmerný obraz toho, ako molekula vyzerá v kryštáli. Vedci použili kryštalografiu na rozriešenie kryštálovej štruktúry mnohých biologicky významných molekúl. Kryštalografiou je možné študovať mnoho tried biomolekúl, vrátane, avšak nie len, proteínov, DNA, RNA a vírusov. Vedci opísali aj kryštálové štruktúry biomolekúl, ktoré nesú vo svojich receptoroch ligandy ("komplex ligand-receptor").

Ak je daný "obraz" cieľovej biomolekuly alebo komplexu ligand-receptor, môžu vedci vyhľadávať kapsy, alebo receptory, kde môže prebiehať biologická aktivita. Vedci potom môžu experimentálne alebo pomocou výpočtovej techniky pre receptory navrhovať ligandy s vysokou afinitou (alebo lieky). Výpočtové metódy boli alternatívne použité na vyhľadávanie vazby malých molekúl. Avšak tieto predchádzajúce pokusy sa streli s obmedzeným úspechom. Navrhovanie ligandov pomocou výpočtových metód sprevádza niekoľko problémov. Výpočtové metódy sú založené skôr na odhadovaných, než na presných určeníach vazbových energií a spočívajú na jednoduchých výpočtoch, keď sú porovnávané s komplexnými interakciami, ktoré vo vnútri biomolekuly existujú. Okrem toho výpočtové modely vyžadujú experimentálne potvrdenie, ktoré často dokáže, že modely nie sú vhodné a na reálnej cieľovej molekule nefungujú.

Okrem toho experimentálny návrh vysoko afinitného ligandu založený na "obrazu" komplexu ligand-receptor bol obmedzený na biomolekuly, ktoré už známe ligandy majú. Konečne, až nedávno vedci publikovali kryštalografické štúdie interakcií medzi rozpúšťadlami a cieľovými molekulami. Allen a spol., J.Phys. Chem., 100, 2605-11 (1996). Avšak tieto štúdie sú obmedzené na mapovanie miest pre rozpúšťadlo skôr než miest pre ligand. Bolo by žiaduce identifikovať priamo potenciálne ligandy a získať podrobnú informáciu o tom, ako sa ligand viaže a mení v cieľovej biomolekule. Okrem toho by boli žiaduce metódy na identifikáciu a/alebo navrhovanie ligandov, ktoré majú biologickú a/alebo farmaceutickú aktivitu vzhľadom na danú cieľovú molekulu.

Podstata vynálezu

Na vyhľadanie a identifikáciu zlúčenín, ktoré pre svoju schopnosť viazať sa na cieľ nie sú známymi ligandami pre cieľovú molekulu, môže byť použitá kryštalografia. Metóda (tu naďalej "CrystaLEADTM") zahrnuje získanie kryštálu cieľovej biomolekuly, exponovanie cieľa jedným alebo viacerými testovacími vzorkami, ktoré sú potenciálnymi ligandami pre cieľovú molekulu a stanovenie, či sa vytvoril komplex ligand/biomolekula. Cieľ sa exponuje potenciálnymi ligandami rôznymi spôsobmi, vrátane, avšak nie len, nasakovaním kryštálu v roztoku jedného alebo viacerých potenciálnych ligandov alebo spoločnou kryštalizáciou biomolekuly v prítomnosti jedného alebo viacerých ligandov.

Pri ďalšom uskutočnení sa využíva zistená štruktúrna informácia o komplexoch ligand-receptor na návrh nových ligandov, ktoré sa viažu pevnejšie, viažu sa špecifickejšie, majú lepšiu biologickú aktivitu alebo majú lepší profil bezpečnosti než známe ligandy.

Pri preferovanom uskutočnení sa využívajú knižnice "tvarovo rôznorodých" zlúčenín, aby sa umožnila priama identifikácia komplexu ligand-receptor, aj keď je ligand vystavený ako časť zmesi. Tým sa vyhne potrebe času na jeho spätné získanie zo zmesi. Tu sú simultánne docielené tri dôležité kroky. Vypočítaná funkcia elektrónovej hustoty priamo predstavuje väzbový

výsledok, identifikuje viazanú zlúčeninu a poskytuje podrobnú trojrozmernú (3-D) štruktúru komplexu ligand-receptor. Hneď ako bol zistený úspešný zásah, je možné tradičnými skriningovými metódami pri jednom uskutočnení vyhľadávať rad analógov alebo derivátov úspešnej zlúčeniny na tesnejšiu väzbu alebo lepšiu biologickú aktivitu. Iné uskutočnenie využíva úspešnú zlúčeninu a informáciu o štruktúre cieľovej zlúčeniny na vývoj analógov alebo derivátov s tesnejšou väzbou alebo lepšou biologickou aktivitou. Ešte v inom uskutočnení je komplex ligand-receptor vystavený dodatočným opakovaniam potenciálnych ligandov tak, že dve alebo viaceré úspešné zlúčeniny môžu byť spolu spojené, aby sa vytvoril účinnejší ligand.

Podrobný opis vynálezu

CrystaLEAD™ poskytuje účinnú vyhľadávaciu metódu na identifikáciu zlúčenín, ktoré sa budú viazať k cieľovej biomolekule. Tiež zlúčeniny môžu slúžiť ako vodidlá alebo oporné konštrukcie na navrhovanie ligandov a/alebo liečiv, ktoré prinášajú zlepšenú biologickú aktivitu pre cieľovú molekulu. Je treba poznamenať, že tesnejšie sa viažuce ligandy nemusia nevyhnutne poskytovať lepšiu biologickú aktivitu alebo tvoriť lepšie liečivo, aj keď je to všeobecným pravidlom. U slabo sa viažucich ligandov je možné, že vykazujú lepšiu biologickú aktivitu vďaka iným faktorom, než je tesnejšia väzba (napr. selektivite, biovyužitelnosti).

Kryštalografia bola široko využitá na posudzovanie receptor-ligand komplexov na navrhovanie liečiv na základe štruktúry. Na skúmanie takých komplexov sú známe ligandy obvykle presiaknuté do kryštálu cieľovej molekuly s následnou kryštalografiou komplexu. Aby sa získal vhodný kryštál je niekedy nutné kryštalizovať ligandy spolu s cieľovou molekulou.

Až dosiaľ nebola kryštalografia zahrňovaná do vyhľadávania potenciálnych ligandov navzdory detailnej informácii o štruktúre, ktorú poskytuje. Možné predsudky proti skriningu zlúčenín kryštalografiou predstavuje presvedčenie, že je metódou príliš komplikovanou alebo časovo náročnou, že vhodné kryštály sa problematcky získavajú, že dosiahnuteľné kryštály neznesú vsiak-

nutie viac než jednej zlúčeniny (omnoho menej zmesí desiatich alebo viacerých zlúčenín), že je potrebné príliš veľa biomolekuly, že by sa spotrebovalo príliš veľa času na rutinné vypestovanie kryštálov a že neustála výmena kryštálov na röntgenovom goniometri by bola zdĺhavá.

Avšak bežne dosiahnuteľná technológia prekonala mnohé z týchto pochopteľných prekážok. Napríklad kedysi boli získané cieľové molekuly len z prírodných zdrojov a niekedy boli nevhodné na kryštalizáciu vzhľadom na prirodzenú degradáciu a glykozyláciu. Okrem toho prírodná koncentrácia bola príliš nízka, aby sa získalo potrebné množstvo na kryštalizáciu vysoko čistého proteínu. S pomocou molekulárnej biológie môže byť exprimované a pre kryštalizáciu vyčistené veľké množstvo proteínu. Pokiaľ je to nutné, môže byť proteín aj znova prekonštruovaný, aby poskytol odlišné alebo lepšie kryštálové formy.

Ďalej sa stali ľahko dostupné výborné svetelné zdroje (synchrotrónová rádiácia) a citlivejšie detektory, takže čas na získanie dát bol dramaticky znížený z dní na hodiny alebo aj minúty. Navyše ďalej existujúce technológie, ktoré sú v tejto dobe menej rutinné, avšak skoro sa rutinnými môžu stať, umožňujú zbierky úplného súboru dát rádovo v sekundách alebo i v zlomkoch sekúnd (napr. Laue-ova difrakcia). J. Hajdu a spol., *Nature*, 329, 178-81 (1987). Rýchlejšie počítače a automatizovanejší softvér ohromne znížili čas potrebný na zber dát a analýzu. Konečne autori vynálezu zistili, že je možné na vyhľadávanie potenciálnych ligandov nasakovať alebo spoločne kryštalizovať zmesi zlúčenín. Ako sa opisuje nižšie, je teda kryštalografia teraz praktickou a prijateľnou metódou skríningu.

Pri CrystaLEADTM sa ligandy majúce kryštalickú formu identifikujú vystavením súboru malých molekúl buď jednotlivito alebo v zmesiach voči cieľovej molekule (napr. proteínu, nukleovej kyseline atď.) Potom sa získajú kryštalografické údaje, aby sa mohla porovnať mapa elektrónovej hustoty predpokladaného komplexu cieľová molekula-ligand s mapou elektrónovej hustoty cieľovej biomolekuly. Mapa elektrónovej hustoty poskytuje súčasne priamu evidenciu o ligandovej väzbe, identifikácii viazaného ligandu a detailnú 3-D štruktúru komplexu ligand-cieľová molekula. Vznik väzby môže byť takisto monitorovaný zmenami individuálnych reflexií v kryštalografických difrakčných zázna-

moch, o ktorých je známe, že sú citlivé na väzbu ligandu k aktívnemu centru. Toto môže slúžiť ako predbežné sito, ale nemalo by to byť prvoradou metódou voľby, pretože to poskytuje menej podrobné informácie o štruktúre.

Pozorovaním zmien v úrovni elektrónovej hustoty ligandu alebo intenzity určitých reflexií v difrakčných záznamoch ako funkciu koncentrácie ligandu buď ku kryštálu pridanému alebo po spoločnej kryštalizácii, je možné tiež určiť väzbové afinity ligandov pre biomolekuly. Väzbové afinity môžu byť takisto získané kompetitívnymi experimentmi. V tomto prípade nová zlúčenina(y) je(sú) nasiaknutá(é) alebo spoločne kryštalizovaná(é) s jedným alebo so sériou rozlične tvarovaných ligandov so známou väzbovou aktivitou. Pokiaľ sa známy ligand objaví v mape elektrónovej hustoty sú neznáme ligandy vo väzbe slabšie. Ak sa však u niektorých z nových zlúčenín zistí, že obstála v umiestení, bude ligandom s najtesnejšou väzbou. Menením koncentrácie alebo identity známeho ligandu môže byť pri CrystaLEAD™ stanovená väzbová konštanta pre úspešnú zlúčeninu.

Počet vyhľadávaných zlúčenín vychádza z požadovaného detekčného limitu, rozpustnosti zlúčeniny a množstva pridávaného organického rozpúšťadla, ktoré budú kryštály tolerovať. Presné počty závisia na každom kryštály. Napríklad pre typický kryštál, ktorý znáša 1 % pridávaného organického rozpúšťadla, by bol limit citlivosti pre simultánne vyhľadávanie 10 zlúčenín $K_d < 1,5$ mM. Pre 20 zlúčenín by bol limit citlivosti $K_d < 0,63$ mM. Avšak u kryštálov, ktoré znášajú vysoký prídavok organického rozpúšťadla (napr. 40 %) je možné vyhľadávať až 50 zlúčenín pri limite citlivosti $K_d < 1,5$ mM.

Pri najobvyklejšej aplikácii CrystaLEAD™ sa používa úspešný zásah či zlúčenina čoby vodidlo na určenie, ktoré zlúčeniny by mali byť testované na biologickú aktivitu pri navrhovaní liečiva na základe štruktúry. Potom podľa tradičnej lekárskej chémie sa získavajú deriváty alebo analógy, aby sa našiel najlepší ligand alebo liek.

Alternatívne môžu byť na navrhovanie analógov alebo derivátov úspešného zásahu využité priamo štruktúrne informácie nahromadené v procese vyhľadávania. Tento prístup vyjadruje príklad, keď je aktívne centrum zložené zo

základnej kapsy obklopenej rozličnými vedľajšími subcentrami a malými kapsami (Obrázok 1). Podrobná štruktúrna informácia o tom, ako je zlúčenina s receptorom viazaná, sa získa simultánne, keď je detegovaný úspešný zásah. Taká informácia je pre bežného odborníka užitočná na navrhovanie lepších ligandov. P. Colman, Curr. Opin. in Struct. Biology, 4, 868-74 (1994); J. Greer a spol., J. Med. Chem. 37, 1035-54 (1994); C. Verlinde a spol., Structure 15, 577-87 (1994). Úspešná zlúčenina najmä identifikuje analógy miesta na syntézu, ktoré by dovolili prístup ku okolitým subcentrám a malým kapsám. To dáva podnet na návrh nových zlúčenín, ktoré sa lepšie prispôbia aktívnemu centru. Okrem toho ďalej v prípadoch, kedy existuje súvislosť s funkciou štruktúry, môžu byť aktivitu zvyšujúce modely substitúcie priamo transferované na skelet nového vodidla na 3-D štruktúrálnej úrovni.

Iná ilustrácia (obrázok 2) sa týka cieľovej molekuly, ktorá má dve alebo viac oddelených káps, ktoré budú obsadzované fragmentmi. Tu je kryštalická cieľová molekula podrobená vyhľadávaniu ligandov, ktoré okupujú všetky z aktívnych miest buď postupne alebo simultánne. Pretože je väzbový prípad monitorovaný vizualizáciou štruktúr spolukryštálov, je miesto väzby ligandu identifikované priamo, a pre kompetičné experimenty nie je nutné potvrdzovať, že ligandy skutočne okupujú rôzne centrá na proteíne. Skrining pre ligandy, ktoré sa viažu do rozdielnych káps, zvlášť umožňuje, že sa vo svojich väzbových miestach prekrývajú. Hneď ako bolo zistené potenciálne vodidlo a súvislosť štruktúry s aktivitou, môžu byť určené väzby medzi každým z centier s využitím podrobnej štruktúrnej informácie a postupu väzby fragmentov, ako bolo skôr opísané pre produkciu nových ďaleko viac účinných ligandov. S. B. Shuker a spol., Science, 274, 1531-34 (1996); Verlinde a spol., Structure, 15, 577-87 (1994).

Pri tretej aplikácii prístupu zlučovania skeletu (nie je ukázaný), je aktívne centrum zložené z dvoch alebo viacerých subcentier. Kryštalický proteín je podrobený vyhľadávaniu ligandu/ligandov, ktorý/ktoré sa viaže/viažu cestou týchto subcentier a relatívnej väzbovej orientácie ligandu pozorovanej pri viacpočetných experimentoch. Tieto ligandy sa budú viazať okupovaním jedného alebo viacerých subcentier a prekrývaním štruktúr viacpočetných úspešných

zásahov môže byť navrhnuté jadro, ktoré bude uľahčovať prístup k rozličným subcentrá. Toto jadro bude potom slúžiť ako čerstvá, nová a účinnejšia zlúčenina čoby vodidlo, ktoré bude tiež slúžiť ako základný skelet v cykle označovania liečiva.

CrystaLEADTM postup viazaného fragmentu experimentálne realizuje postup fragmentu viazaného na základe štruktúry, ktorý len na výpočtovej úrovni publikoval Verlinde a spol. v J. Comput. Aided Mol. Des., 6, 131-47 (1992). Verlinde a spol. navrhujú ligandové fragmenty založené na matematických výpočtoch. Navrhnuté fragmenty boli potom analyzované na biologickú aktivitu. Pokiaľ sa fragmenty skutočne viažu, boli röntgenovou kryštalografiou stanovené ich 3-D štruktúry a navrhnutý partner na spojenie. Naopak CrystaLEADTM súčasne deteguje výsledok väzby a poskytuje experimentálne stanovenú 3-D štruktúru komplexu ligand-proteín. Vynález tiež umožňuje spôsob stanovenia asociačnej konštanty medzi cieľovou molekulou a jej ligandom. Vynález nevyžaduje špeciálne značkovanie cieľovej molekuly. Preto môže cieľová molekula zahŕňať proteíny, polypeptidy, nukleové kyseliny, nukleoproteíny alebo akúkoľvek vhodnú cieľovú molekulu, ktorá je izolovaná z prírodných zdrojov alebo rekombinačnými metódami z akéhokoľvek hostiteľského systému ako je vyvinutý alebo praktikovaný radovými odborníkmi.

Pri kryštalografickom skríningu existuje niekoľko výhod. Dôležitá výhoda predstavuje, že výsledok väzby je monitorovaný priamo, takže pravdepodobnosť klamných údajov sa znižuje blízko k nule. Kryštalografické údaje poskytujú trojrozmernú "momentku" elektrónovej hustoty komplexu ligand-receptor ukazujúcu, ktorá zlúčenina sa viaže a ako je viazaná.

Metóda je jedinečne citlivá na štruktúrne zmeny ako pri cieľovej molekule tak aj pri ligande. Sledovanie štruktúrnych zmien je rozhodujúce pre dizajn skeletu, ktorý zlučuje informáciu z rôznych štruktúr komplexu ligand-cieľová molekula. Jeden taký príklad nastáva, keď proteín mení štruktúru, aby sa prispôbil jednému ligandu, avšak štruktúrna zmena blokuje viazanie druhého ligandu. Podobne je určenie štruktúrnych zmien dôležité tiež preto, že keď sa pôvodné skelety viažu rôzne, nemusí byť možné zlúčiť ich do väčšieho skeletu.

Pretože je prípad väzby monitorovaný priamo, nevyžaduje CrystaLEAD™ špeciálne označené vzorky, skúšky alebo cieľové molekuly, ktoré by boli nepriamo citlivé na pripojenie ligandu. Pokiaľ sa dá získať kryštalická štruktúra cieľovej molekuly, dá sa CrystaLEAD™ použiť na skrining ligandov.

Ak sú zmesi zlúčenín navrhnuté s vhodnou diverzitou tvarov, znižuje vynález potrebu rozvinutia súprav, ktoré sú nasakované ako zmesi, pretože väzbový prípad je detegovaný priamo vyšetrením tvaru elektrónovej hustoty na väzbovom centre. Tvar elektrónovej hustoty teda identifikuje priamo aj väzbový prípad aj zlúčeninu. Alternatívne sa dá navrhnúť zmes, aby obsahovala zlúčeniny s anomálne rozptyľujúcimi atómami (napr. Br, S), ktoré môžu byť identifikované anomálnymi technikami skateringu. Ďalej vzhľadom na to, že CrystaLEAD™ priamo monitoruje väzbu, je veľmi vhodný najmä na študovanie cieľových molekúl, pre ktoré nie sú známe ligandy.

Pretože pri CrystaLEAD™ vypočítaná funkcia elektrónovej hustoty ukazuje "reálne priestorové usporiadanie" kryštálu, je možné sa zamerať priamo na oblasť záujmu. Aj keď nie je metóda obmedzená na aktívne centrum, môže byť teda väzba detegovaná exkluzívne na centre záujmu. Väzba na iných centrách, ktorá komplikuje analýzu vo väčšine väzbových testov, môže byť úplne vypustená zo zreteľa.

CrystaLEAD™ poskytuje tiež metódu na súčasné monitorovanie väzby na rôznych miestach. To znamená, že pre cieľovú molekulu, ktorá má viac káps, nevyžaduje vyhľadávanie pre druhé centrum skrining v prítomnosti prvého ligandu. Avšak vyhľadávanie pre druhé centrum môže byť vykonané v prítomnosti prvého ligandu, aby sa zistili spolupôsobiace ligandy.

CrystaLEAD™ je aplikovateľná pre akúkoľvek cieľovú molekulu, ktorú je možné získať v kryštalickej štruktúre. Podľa súčasnej literatúry to predstavuje akúkoľvek rozpustnú makromolekulu s molekulovou hmotnosťou medzi 5 000 a 200 000. Pravda toto rozmedzie sa v súlade s technologickými pokrokmi takmer denne rozširuje. Metóda je tiež citlivá na široký rozsah disociačných konštánt (< pikomolárnych až molárnych) Použitím citlivejších detekčných CCD kamier s anódovým zdrojom sú údaje zhromažďované menej ako

4 h až okolo 4 h. To dovoľuje vyhľadávanie tisícov zlúčenín na detektor za deň. Pri použití synchrotrónových zdrojov sa počet vyhľadávaných zlúčenín zvyšuje na násobky tisícov na detektor a s Laue-ovými metódami zhromažďovania údajov a testovania zmesí, môžu byť CrystaLEADTM údaje získané v sekundách alebo menej, čo umožňuje, že za deň môžu byť testované tisíce zlúčenín v jednom prúde. Preto viacpočetné detektory alebo jednoduché synchrotrónne zariadenia uľahčujú skutočne vysokokapacitný skrining.

Obrázok 3 vysvetľuje vynález. Kryštály cieľovej molekuly sú vystavené jednej alebo viacerých zlúčeninám nasiaknutím kryštálu alebo spolukryštalizáciou cieľovej zlúčeniny v prítomnosti jednej alebo viacerých zlúčenín. Potom boli zhromaždené kryštalografické údaje, spracované a konvertované na mapy elektrónovej hustoty, ktoré boli skúmané na dôkaz ligandovej väzby. Jedným spôsobom detegovania ligandovej väzby je porovnávanie štruktúry originálneho kryštálu so štruktúrou exponovaného kryštálu.

Nové cieľové zlúčeniny môžu byť kryštalizované za publikovaných podmienok alebo inými metódami v odbore bežne aplikovanými. Podobne môžu byť cieľové štruktúry dosiahnuteľné z databázy ako je Proteín Data Bank, alebo môžu byť stanovené bežne používanou metodológiou. Pokroky molekulárnej biológie a techniky proteínov urýchľujú kryštalizáciu cieľových zlúčenín, zatiaľ čo pokroky v zhromažďovaní údajov napomáhajú rýchlemu určeniu štruktúry pre neznáme štruktúry.

Kryštály, ktoré boli vystavené potenciálnym ligandom nasakovaním vyžadujú prístupné prázdne aktívne centrá. Kryštály s prázdny aktívnym centrom je možné získavať rôznymi metódami, vrátane ale nie len, kryštalizáciou v neprítomnosti ligandu, kryštalizáciou v prítomnosti ligandu viazaného na vzdialenom mieste alebo kryštalizáciou v prítomnosti nekovalentného ligandu, ktorý sa u cieľovej zlúčeniny hneď ako biomolekula kryštalizuje ľahko zriedi alebo vymení. Autori vynálezu získali kryštály biomolekuly novým spôsobom, kryštalizáciou biomolekuly v prítomnosti degradovateľného ligandu na aktívnom centre a potom degradáciou ligandu, hneď ako sa vytvoril kryštál. Alternatívne je možné vypestovať kryštály v prítomnosti zlúčenín, ktoré majú byť podrobené skriningu. Kryštály sa nechajú v prítomnosti zmesi, aby dosiahli

rovnovážny stav, v ktorom je väzba ligandov funkciou ich koncentrácie a väzbovej afinity.

Pri metóde nasakovania môže byť citlivosť metódy aproximovaná vzťahom jednoduchej rovnováhy, pretože koncentrácia proteínu v kryštáli môže byť vypočítaná a koncentrácia ligandu je známou veličinou. Napríklad koncentrácia proteínu s molekulovou hmotnosťou 25.000 (urokináza) v kryštáli sa vypočíta takto: v ortorombickej jednotkovej bunke (všetky uhly sú 90°), ktorá má objem $53 \times 53 \times 82 \text{ \AA}^3$, sú 4 molekuly; s použitím Avogadrovho čísla je koncentrácia 28 mM. Preto teda výsledkom zmesi zlúčenín majúcej pre každý ligand koncentráciu 6 mM bude vypočítaný limit citlivosti $K_d < 1,5 \text{ mM}$ (za predpokladu detekčného limitu okolo 80 %-ného obsadenia kryštálu).

Nasakované zmesi zlúčenín tiež naskoľujú otázku viacnásobného obsadzovania (viac než jeden ligand viažuci sa na sledované centrum). Pre prípad viacnásobného obsadzovania, kedy sa ligandy viažu do rôznych káps (viď obr. 2) je rozlíšenie pomocou CrystaLEDTM ľahké, pretože väzba na jednotlivých centrách môže byť individuálne rozpoznaná podľa máp elektrónovej hustoty. Pri situácii, kedy rozdielne ligandy súťažia o obsadenie toho istého centra, je možné na výpočet nárokov pre takúto väzbu využiť jednoduchý model kompetitívnej inhibície. Z empirického pozorovania sa má za to, že kryštalografia môže rozlíšiť situácie, pri ktorých obsadenie jedným inhibítorom je 80 % a druhým 20 %. Preto teda pomer väzbovej afinity, ktorý je väčší než štyri, by rezultoval do zjavného obsadenia len ligandom s vyššou afinitou. V opačnom prípade, kedy pomer väzbových konštánt dvoch zlúčenín v zmesi je menej než štyri, bude výsledná elektrónová hustota stredným priemerom dvoch oddelených hustôt a môže byť problematicky identifikovaná. Preto bude nutné vykonávať ďalšie experimenty nasakovania na rozvinutie zmesi (napr. brať do úvahy každú zlúčeninu v jednotlivých kryštáloch individuálne) len, keď pomer väzbových afínit je menší než štyri. Bude to stále rentabilné a účinné, pretože to práve určuje, že v zmesi sú prítomné najmenej dva úspešné zásahy

Zo zlúčenín, ktoré sa majú vyhľadávať sa vytvárajú knižnice. Na účely tejto diskusie sú knižnice veľké zmesi zlúčenín (100 - 10 000+) a môžu byť radené všeobecne alebo podľa štruktúry. Všeobecná knižnica je zostavená náhod-

ne, tj. je úplne rôznorodá čo do veľkosti, tvaru a funkčnosti. Štruktúrne radená knižnica je zameraná na konkrétnu funkčnú zmes alebo vedľajšie centrá medzi aktívnymi centrami cieľovej molekuly (napr. súbor, v ktorom všetky zlúčeniny obsahujú karboxylátovú funkciu má byť zameraný voči pozitívnemu náboju na aktívnom centre cieľovej molekuly).

V preferovanom uskutočnení je jeden z typov súboru rozdelený do menších skupín zmesí rôznych tvarov. Z toho dôvodu je zmes definovaná ako podskupina súboru, ktorá môže byť nasiaknutá alebo pestovaná s kryštálom. Zmes je stanovená tak, aby bola rôznorodá čo do tvarov pri vizuálnom preskúmvaní dvojdimenzionálnych chemických štruktúr alebo pri výpočtových programoch. Rôznorodosť tvarov v zmesi dovoľuje, aby bol viazaný ligand identifikovaný priamo z výslednej mapy elektrónovej hustoty (viď obr. 4). To eliminuje potrebu ďalších nasledujúcich experimentov na určenie, ktorá zlúčenina zo zmesi je úspešným zásahom (viazaná na cieľovú molekulu).

Ak sú testované zlúčeniny vo vode rozpustné, môžu byť na solubilizáciu zmesí pri kryštalizácii použité typické pufre a precipitačné roztoky a nasiaknuté do kryštálu. Zlúčeniny vo vode menej rozpustné sa rozpúšťajú individuálne vo vhodnom organickom rozpúšťadle na konečnú koncentráciu 2 M. Pri jednom z uskutočnení sa rozpustí vo 100 % DMSO, uchováva sa pri 4°C a miešajú zmiešaním zásobného DMSO pred expozíciou voči kryštálu. Tieto zmesi budú slúžiť pre väčšinu kryštalických systémov, v ktorých podmienky na pestovanie kryštálu nezahŕňujú organické reagenty. Typicky sa zlúčeniny nasakujú do finálnej, 1 - 10 %-nej koncentrácie DMSO a nechávajú sa do ustálenia rovnováhy s kryštalickým proteínom počas vopred určenej dĺžky času (4 - 24 h). Podľa tohto scenára je každý kryštál nasakovanou zmesou vystavený početným zlúčeninám. Niektoré podmienky rastu kryštálu môžu zahŕňať vysokú koncentráciu organického rozpúšťadla (40 - 50 %), ktorým sú obvykle deriváty alkoholov. V tomto prípade môžu byť súbory zlúčenín na kryštalizáciu rozpustené v organickom rozpúšťadle, ktoré pri nasakovaní experimente umožnia 40 - 50 % finálnu koncentráciu pre spolurozpúšťadlá. Tu by počet zlúčenín do zmesi pre nasakovanie mohol vzrastať.

Po nasiaknutí je každý kryštál vystavený kryoprotektantu, ako je 5 - 20 % glycerol v nasakovanom roztoku, pripevnený do nylónovej slučky a pod prúdom chladného dusíka (160 K) umiestnený do röntgenovej jednotky. Štúdie kryštálu môžu byť uskutočnené tiež pri teplote miestnosti alebo za podmienok, ktoré sú pre stabilitu kryštálov nevyhnutné. Na zrýchlenie tohto procesného kroku môže byť použité automatické pripevňovanie a prevodné zariadenie.

Kryštalografické údaje sa zbierajú a spracovávajú, keď každej reflexii (bodu) v difrakčnom zázname môže byť priradený index (h, k, l) a intenzita je meraná ako štandard v poli. Zdroje röntgenových lúčov môžu byť laboratórne generátory X-lúčov alebo synchrotrónové zdroje, ktoré dovoľujú snímanie difrakčných dát s vysokou rýchlosťou. Typicky môže laboratórny zber dát na kryštál zabráť od 30 minút do niekoľko hodín, zatiaľ čo pri použití synchrotrónnych zdrojov môže byť čas znížený. Na zlomky sekúnd sa zníži zber dát pre kryštál aplikáciou schém Laue-ovho snímania údajov.

Difrakčné dáta sú potom konvertované na mapy elektrónovej hustoty metódami, s ktorými sú bežní odborníci oboznámení. Mapy elektrónovej hustoty sú 3-D obrazy ligandov a/alebo cieľových biomolekúl.

Pre Fo-Fc mapy vypočítanej amplitúdy štruktúrneho faktora ($|F_c|$), ktoré sú získané zo známej kryštalickej štruktúry bez viazaného ligandu, sa odpočítajú od pozorovaných amplitúd ($|F_o|$). Táto mapa teda predstavuje priame odpočítanie údajov pochádzajúcich zo štruktúry natívneho proteínu od dát pochádzajúcich z kryštálov nasiaknutých v prítomnosti zmesi zo súboru. Výsledkom je mapa elektrónovej hustoty, ktorá má pozitívne a negatívne piky. Piky relevantné pre CrystaLEADTM sú tie pozitívne, ktoré sú priamym výsledkom väzby ligandu na sledované miesto v cieľovej molekule - to je prírastku ligandu do cieľovej biomolekuly. Na obrázku 3 je znázornená Fo-Fc mapa a jasne veľký pozitívny pík na aktívnom centre urokinázy. Tvar píku zodpovedá ligandu 2-amino-8-hydroxychinolínu. Ligand je znázornený, ako obsadzuje pozitívny rozdiel hustoty. Iné pozitívne piky zodpovedajú viazanému sulfátu (označené SO_4^{2-}) a viazaným molekulám vody (označené H_2O). Tento typ mapy je tiež veľmi citlivý na malé štrukturálne zmeny (označené Δ), čo ak je použité v spojení s 2Fo-Fc mapami, dovoľuje stanovenie podrobnej štruktúry celého

komplexu ligand-proteín. Na vypočítanie 2Fo-Fc máp sa ($|Fc|$) odpočíta od $2(|Fo|)$. Teraz je mapa pozitívna a má hustotu pre všetky atómy v molekule.

Prehliadka mapy na obr. 3 ukazuje identitu a štruktúru viazanej zlúčeniny. Najlepšie je, keď mapy exponovaných kryštálov sú porovnávané s mapami neexponovanej cieľovej molekuly, aby sa rozlíšila pozitívna hustota, ktorú je možné v Fo-Fc mape nájsť. Niekedy pri neprítomnosti viazaného ligandu okupujú aktívne centrum v kryštáli molekuly vody. Toto sa dá rozlíšiť ľahko, pretože viazané molekuly vody sú často orientované podľa geometrie konzistentnej s vodíkovou väzbou, a pretože nie sú spojené sieťou kovalentných väzieb. Výsledná mapa teda má sklon byť nespojitá tým, že indikuje rozpúšťadlo skôr než organickú zlúčeninu. Ak je v Fo-Fc alebo 2Fo-Fc mape stanovená hustota reprezentujúca organickú zlúčeninu, porovnáva sa trojrozmerný tvar s tvarom zlúčenín obsiahnutých v súbore a stotožnia sa s najlepšie vyhovujúcim. Alternatívne môžu tento proces automatizovať programy ako XFIT moduly QUANTA (Molecular Simulations Inc., Quanta Generating and Displaying Molecules, San Diego: Molecular Simulations Inc., 1997).

Ako sa zlepšuje schopnosť merať alebo spracovávať difrakčné intenzity, nemusí sa nevyhnutne vykonávať porovnávanie na mapách elektrónovej hustoty. Väzba sa dá detegovať jednoducho porovnávaním difrakčných záznamov exponovaných kryštálov a neexponovaných kryštálov. Vytvoriť mapu elektrónovej hustoty je teda potrebné len vtedy, ak je pri tomto predbežnom skríningovom postupe zaznamenaný prípad väzby.

Ako je vyššie uvedené, CrystaLEADTM môže byť aplikovaná na akýkoľvek biomolekulárny cieľ, pre ktorý je možné získať kryštalografickú štruktúru. Vzhľadom na jej širokú aplikovateľnosť je najlepšie ilustrovaná nižšie uvedenými príkladmi.

Príklady urokinázy a VanX predstavujú dva scenáre pre použitie CrystaLEADTM. U urokinázy majú rekonštruované mikroUK (μ UK) kryštály veľmi dobrú difrakciu a grupu vysokej priestorovej symetrie. Na rozdiel od toho u VanX je difrakcia slabšia a symetria nižšia. VanX vyžaduje teda dlhšiu dobu na snímanie dát. Okrem toho kryštály urokinázy majú jednu molekulu v asymet-

rickej jednotke, zatiaľ čo VanX ich má šesť. Väčšia asymetrická jednotka vyžaduje snímanie dát s väčším rozlíšením a čini preskúmavanie mapy ťažším. Avšak v prípade VanX neboli známe nesubstrátové napodobivé ligandy pred tými, ktoré boli objavené pomocou CrystaLEAD™. CrystaLEAD™ teda poskytuje novú nepeptidovú zlúčeninu ako vodidlo, ktoré je možné uplatniť v cykle objavovania liečiv. Pre urokinázu poskytuje CrystaLEAD™ novú primárnu štruktúru. Prihlasovatelia vynálezu boli pri využití existujúcej SAR a kryštálových štruktúr schopní rýchlo zvyšovať účinnosť primárnej štruktúry pre navrhnutie derivátu s vyššou afinitou, so zlepšenou biovyužitelnosťou než sú známe ligandy urokinázy.

Tieto príklady však ilustrujú preferované uskutočnenie predkladaného vynálezu a neobmedzujú nároky alebo opis. Normálny odborník si ľahko uvedomí, že u špecifikovaných uskutočnení môžu byť uskutočnené zmeny a modifikácie, bez toho aby došlo k odchýleniu od rozsahu platnosti a predmetu vynálezu. Konečne všetky citácie sú tu zahrnuté ako odkaz.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 ilustruje na štruktúre založený návrh liečiva, kde bola nájdená vodiaca zlúčenina a potom využitá ako konštrukcia na nesenie ďalších podielov, ktoré sa hodia do subcentier obklopujúcich hlavné centrum.

Obrázok 2 ilustruje postup väzby fragmentu u biomolekuly, ktorá má dve alebo viac priľahlých primárnych káps.

Obrázok 3 je náčrtom CrystaLEAD™, v ktorom je kryštál nasiaknutý roztokom rôznych potenciálnych ligandov (I₁-I₁₀), je zobrazená súprava dát röntgenovej difrakcie a transformovaná do mapy elektrónovej hustoty, ktorá sa skúma na väzbu zlúčenín.

Obrázok 4 ilustruje typickú zmes zlúčenín v 2-D a 3-D. 3-D obrázky sú teoretické 2Fo-Fc mapy elektrónovej hustoty, ktoré predstavujú "tvar" molekúl.

Obrázok 5 je primárna sekvencia ľudskej urokinázy.

Obrázok 6 ilustruje ako bol detegovaný úspešný zásah a identifikovaný podľa tvaru potom, keď bola urokináza nasiaknutá v roztoku obsahujúcom zmes potenciálnych ligandov. Obrázok 6A je počiatočná Fo-Fc mapa. Obrázok 6B ukazuje, ako sa zlúčenina viaže na aktívne centrum urokinázy. Obrázok 6C ilustruje aktívne centrum bez viazaného ligandu, keď nebola zo zmesi viazaná žiadna zlúčenina.

Obrázok 7 ilustruje úspešný zásah u urokinázy nasiaknutej v roztoku obsahujúcom zmes potenciálnych ligandov. Obrázok 7A je počiatočná Fo-Fc mapa. Obrázok 7B ukazuje, ako sa zlúčenina viaže na aktívne centrum urokinázy.

Obrázok 8 ilustruje úspešný zásah u urokinázy nasiaknutej v roztoku obsahujúcom zmes potenciálnych ligandov. Obrázok 8A je počiatočná Fo-Fc mapa. Obrázok 8B ukazuje ako sa zlúčenina viaže na aktívne centrum urokinázy.

Obrázok 9 ilustruje dva ďalšie úspešné zásahy u urokinázy nasiaknutej v roztoku obsahujúcom zmes potenciálnych ligandov. Obrázok 9A je Fo-Fc mapa pre silný ligand zo zmesi. Obrázok 9B je Fo-Fc mapa pre slabší ligand zo zmesi. Slabší ligand bol detegovaný až po odstránení silného ligandu zo zmesi.

Obrázok 10 ilustruje komparatívne kryštálové štruktúry medzi vodiacou zlúčeninou nájdenou pomocou CrystaLEADTM a sledovanou optimalizovanou zlúčeninou.

Obrázok 11 ilustruje úspešné zásahy, ktoré boli identifikované pre VanX.

Obrázok 12 ilustruje úspešný zásah pre urokinázu.

Obrázok 13 ilustruje kryštálovú štruktúru zlúčeniny 44 s ErmC.

Obrázok 14 ilustruje kryštálovú štruktúru zlúčeniny 45 s ErmC.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Urokináza

Urokináza, serínová proteáza, je silne zviazaná s nádorovými bunkami. Urokináza aktivuje plazminogén na plazmín, ktorý striedavo aktivuje matricu metaloproteáz. Plazmín a metaloproteázy degradujú extracelulárnu matricu a podnecujú rast nádoru a metastáz. Inhibítory, ktoré sú špecificky zacielené na urokinázu môžu teda slúžiť ako efektívne antikancerogénne činidlá.

Ľudská pre-urokináza je tvorená 411 aminokyselinami (obrázok 5). Verde a spol., Proc. Nat'l Acad. Sci., 81(5), 4727-31 (1984); Nagai a spol., Gene, 36(1-2), 183-8 (1985). Keď je aktivovaná proteolytickým štiepením na peptidovej väzbe Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹, vytvoria sa z enzýmu dva reťazce spojené jednoduchým disulfidickým mostíkom (Cys¹⁴⁸-Cys²⁷⁹). A-reťazec (zvyšky 1-158) obsahuje EGF podobnú doménu a kringeldoménu. B-reťazec (zvyšky 159-411) obsahuje katalytickú serín proteázovú doménu. Výsledkom ďalšej inkubácie urokinázy je ďalšie proteolytické štiepenie na peptidovej väzbe Lys¹³⁵-Lys¹³⁶ za vytvorenia urokinázy s nízkou molekulovou hmotnosťou. Kryštály tejto enzýmovej formy v komplexe s kovalentným inhibítorom Glu-Gly-Arg-chlórmetylketónom boli získané podľa Spraggona a spol., Strukture, 3, 681-91 (1995) a vykázali difrakciu pri 2,5 Å, rezolúciu na vysokoenergetickom synchrotrónovom zdroji. Avšak zlá kvalita difrakcie týchto kryštálov spolu s prítomnosťou kovalentne viazaného inhibítora činí aplikáciu CrystaLEAD™ problematickou.

Preparácia a štruktúra μ UK kryštálu

Na realizáciu CrystaLEAD™ bola ľudská urokináza prepracovaná, aby obsahovala len zvyšky 159-404 z B reťazca, kde Asn³⁰² bol zamenený za glutamín, aby sa odstránilo glykozylované miesto a Cys²⁷⁹ bol nahradený alaní-

nom, aby sa odstránila voľná sulfhydrylová skupina. Táto forma urokinázy (μ UK) sa ukázala plne aktívna a bolo zistené, že kryštalizuje v kryštalickej forme kompatibilnej s CrystaLEAD™. (Vid' tiež U. S. Patent č. 5,112,755, vydaný 12. mája 1992 pre Heynekera a spol.)

Preparácia vektorového konštruktu pBC-LMW-UK-Ala²⁷⁹

Mutanty ľudskej UK boli klonované vo vektore dicistronickej bakteriálnej expresie pBCFK12. Pilot-Matias a spol., Gene, 128 219-25 (1993). Na generovanie rôznych UK mutantov pomocou PCR boli použité nasledujúce oligonukleotidy:

SEQ. ID č.

SEKVENCIA PCR PRIMÉRU

1 5'-ATTAATGTCGACTAAGGAGGTGATCTAATGTTAAAATTTTCAGTGTGGCCAA-3'

2 5'-ATTAATAAGCTTTTCAGAGGGCCAGGCCATTCTCTTCCTTGGTGTGACTCCTGATCCA-3'

3 5'-ATTAATTGCGCAGCCATCCCGGACTATACAGACCATCGCCCTGCCCT-3'

Počiatočné klonovanie UK s nízkou molekulárnou hmotnosťou, v nasledujúcom označované LMW-UK (L^{144} - L^{411}) bolo uskutočnené s použitím ľudskej UK cDNA ako templátu a SEQ. ID č. 1 a 2 ako primérov v štandardnej PCR reakcii. Pomocou PCR rozmnožená DNA bola vyčistená na gély a digеровaná s restričnými enzýmami Sall a HindIII. Digerovaný produkt bol potom spojený s pBCFK12 vektorom predtým skráteným tými istými dvoma enzýmami, aby sa generoval exprimujúci vektor pBC-LMW-UK. Vektor bol transformovaný v DH5 α bunkách (Life Technologies, Gaithersburg, MD) a sekvencia bola potvrdená DNA sekvenovaním. Produkcia LMW-UK v baktérii bola analyzovaná SDS-PAGE a zymografiou, Granelli-Piperno a spol., J. Exp. Med., 148 223-34 (1978), ktorá meria aktiváciu plazminogénu s UK, že LMW-UK bola v E. coli exprimovaná, a že bola aktívna pri zymografickom teste bolo demonštrované gélom odfarbeným Brillantnou modrou G.

Úspech rýchlej expresie a detekcie LMW-UK v *E. coli* umožnil vykonávať analýzu mutagenézy UK s cieľom určiť jej minimálne funkčné štruktúry. Jeden mutant so zámenou Cys²⁷⁹ za Ala²⁷⁹ bol pripravený pomocou PCR so SEKV. č. 2 a 3. PCR produkt bol skrátенý s AvII a Hind III a použitý na nahradenie AvII a Hind III fragmentu v pBC-LMW-UK konštrukte. Výsledný pBC-LMW-UK-Ala²⁷⁹ konštrukt bol exprimovaný v *E. coli* a produkt preukázal, že je pri zymografii aktívny.

Klonovanie a expresia μ UK [UK(I¹⁵⁹-K⁴⁰⁴)A²⁷⁹Q³⁰²] v Bakulovíruse

μ UK (UK aminokyseliny Ile¹⁵⁹-Lys⁴⁰⁴, ktoré obsahujú Ala²⁷⁹Gln³⁰²) bola generovaná pomocou PCR s nasledujúcimi oligonukleotidovými primérmí:

SEQ. ID č.

SEKVENCIA PCR PRIMÉRU

- | | |
|---|--|
| 4 | 5'-ATTAATCAGCTCCGGATAGAGATAGTCGGTAGACTGCTCTTTT-3' |
| 5 | 5'-ATTAATCAGCTGAAAATGACTGTTGTGA-3' |
| 6 | 5'-ATTAATGTCGACTAAGGAGGTGATCTAATGTTAAAATTTTCAGTGTGGCCAA-3' |
| 7 | 5'-ATTAATGCTAGCCTCGAGCCACCATGAGAGCCCTGCT-3' |
| 8 | 5'-ATTAATGCTAGCCTCGAGTCACTTGTTGTGACTGCGGATCCA-3' |
| 9 | 5'-GGTGGTGAATTCTCCCAATAATGCCTTTGGAGTCGCTCACGA-3' |

Na mutáciu jediného glykozylovaného miesta (Asn³⁰²) v UK boli v dvoch PCR reakciách s pBC-LMW-UK-Ala²⁷⁹ ako templátmi použité oligonukleotidové priméry SEQ. ID č. 4 a 6 a SEQ. ID č. 5 a 8. Dva PCR produkty boli skrátенé reštrinkčným enzýmom Pvu II, zviazané s T4 DNA ligázou a použité ako templáty na generovanie LMW-UK-A²⁷⁹-Q³⁰². Medzi tým bola hlavná sekvencia natívnej UK napojená priamo na Ile¹⁵⁹ pomocou PCR so SEQ. ID č. 7 a 9 s použitím natívnej UK cDNA ako templátu.

Tento PCR produkt bol použitý ako primér spolu so SEQ. ID č. 8 v novej reakcii s LMW-UK- A²⁷⁹-Q³⁰² DNA ako templát na generovanie μ UK cDNA

μ UK bola skrátaná pomocou Nhe I a napojená na vektor transferu bakulovírusu pJVP10z skrátaný tým istým enzýmom. Vialard a spol., *J. virology*, 64(1), 37-50 (1990). Výsledný konštrukt pJVP10z- μ UK bol potvrdený štandardnými DNA sekvenčnými technikami.

Konštrukt pJVP10z- μ UK bol transferovaný do Sf9 buniek kalcium fosfátovou precipitačnou metódou s použitím BaculoGold súpravy od PharMingen (San Diego CA). Účinná μ UK aktivita bola zisťovaná v kultivačnom médiu. Jednotlivý rekombinantný vírus bol zbavený nečistôt štandardnými metódami a bola vytvorená veľká zásoba vírusu.

Expresia μ UK vo veľkom merítke bola realizovaná v inom rade hmyzích buniek, High-Five bunkách (Invitrogen, Carlsbad, Ca) v suspenzii pestovanej v Excel 405 sére bez média (JRH Biosciences, LeneXa, KS) v 2 l banke a trepanej pri 80 ot/min, 28°C. High-Five bunky boli vypestované na 2×10^6 buniek/ml, pri 0,1 multiplicity infekcie bol pridaný rekombinantný μ UK vírus a v kultivácii sa 3 dni pokračovalo. Supernatant kultúry bol zhromaždený ako východiskový materiál na čistenie. Aktivita μ UK v supernatante z kultivácie bola stanovená amidolýzou chromogénneho UK substrátu S2444, ktorého bolo 6 - 10 mg/litr. Claeson a spol., *Haemostasis*, 7, 76 (1978).

Expresia μ UK v *Pichia pastoris*

Na expresiu μ UK bol použitý expresívny vektor so syntetickou vodiacou sekvenciou. Expresívny vektor *Pichia* pHil-D8 bol konštruovaný modifikáciou vektoru pHil-D2 (Invitrogén) tak, aby obsahoval vedúcu sekvenciu pre sekréciu rekombinantného proteínu. Vodiaca sekvencia 5'-ATGTTCTCTCCAATTTTGT CCTTGGAAATTATTTTAGCTTTGGCTACTTTGCAATCTGTCTTCGCTCAGC CAGTTATCTGCACTACCGTTGGTTCCGCTGCCGAGGGATCC-3' (SEQ. ID č. 10) kóduje signál sekrécie PHO1 (znázornené jednoduchým podčiarnutím) operatívne napojený na pre-peptidovú sekvenciu (znázornené tučnými písmenami) pre KEX2 štiepenie. Na výstavbu pHil-D8 bola vykonaná PCR s použitím pHil-S1 (Invitrogén) ako templátu vzhľadom na to, že tento vektor obsahuje

sekvenciu kódujúcu PHO1, predný primér (SEQ. ID č. 11) zodpovedajúci nukleotidom 509-530 z pHil-S1 a reverzný primér (SEQ. ID č. 12) majúci nukleotidovú sekvenciu, ktorá kóduje druhú časť signálu sekrécie PHO1 (nukleotidy 45-66 zo SEQ. ID č. 10) a pre-peptidovú sekvenciu (nukleotidy 67-108 zo SEQ. ID č. 10). Sekvencie primérov (získaných od Operon Technologies, Inc., Alameda Ca) boli nasledujúce:

<u>SEQ. ID č.</u>	<u>SEKVENCIA PCR PRIMÉRU</u>
11	5'- GAAACTTCCAAAAGTCGCCATA-3'
12	5'-ATTAATGAATTCCTCGAGCGGTCCGGGATCCCTCGGCAGCGGAACC AACGGTAGTGCAGATAACTGGCTGAGCGAAGACGATTGCAAAGTA-3'

Rozmnoženie bolo uskutočnené za štandardných PCR podmienok. PCR produkt (približne 500 bp) bol vyčistený na gély, skráteneý pomocou BspI a EcoRI a po napojení na pHil-D2 skráteneý tými istými enzýmami. DNA bola transformovaná v bunkách E. coli HB101 a pozitívne klony boli identifikované digesciou s reštrikčným enzýmom a sekvenčnou analýzou. Jeden klon, ktorý mal správnu sekvenciu bol označený ako pHil-D8.

Nasledujúce dva oligonukleotidové priméry boli potom použité na rozmnoženie μ UK na klonovanie na pHil-D8.

<u>SEQ. ID č.</u>	<u>SEKVENCIA PCR PRIMÉRU</u>
13	5'- ATTAATGGATCCTTGGACAAGAGGATTATTGGGGGAGAATTCACCA-3'
14	5'-ATTAATCTCGAGCGGTCCGTCACTTGGTGTGACTGCGAATCCAGGGT -3'

PCR produkt bol získaný so SEQ. ID. č. 13 a 14 s použitím pJVP10z- μ UK ako templátu. Rozmnožený produkt bol skráteneý s BamHI a XhoI a po pripojení na pHil-D8 skráteneý tými istými dvoma enzýmami. Vznikajúci plazmid, pHilD8- μ UK bol potvrdený DNA sekvenovaním a použitý na transformáciu Pichia reťazca GS115 (Invitrogén) podľa inštrukcií dodávateľa. Transformované Pichia kolónie boli podrobené skrínngu na expresiu μ UK pestovaním v BMGY médiu a expresii v BMMY médiu ako je opisované dodávateľom (Invit-

rogén). Aktivita μ UK bola meraná s chromogénnym substrátom S2444. Úroveň expresie μ UK v *Pichia* v rozmedzí 30 - 60 mg/l bola vyššia než bolo vidieť u buniek bakulovírusu-High Five.

Čistenie μ UK

Supernatant z kultúry buniek buď High Five alebo *Pichia* bol zhromaždený do 20 l kontajneru. Boli pridané inhibítory proteázy, jódacetamid, benzamidín a EDTA do finálnej koncentrácie okolo 10 mM, 5 mM, respektíve 1 mM. Potom bol supernatant päťkrát zriedený pridaním 5 mM Hepes pufru pH 7,5 a pretlačený filtračnými membránami 1,2 μ a 0,2 μ . μ UK bol zachytený na membránovom adsorbéry Sartorius S 100 (Sartorius, Edgewood, NY) priechodom membránou rýchlosťou toku 50-100 ml/min. Po extenzívnom premývaní s 10 mM Hepes pufru pH 7,5, 10 mM jódacetamidu, 5 mM benzamidínu, 1 mM EDTA bol μ UK vymývaný z S 100 membrány roztokom s postupne stúpajúcim NaCl (20 mM až 500mM, 200 ml) v 10 mM Hepes pufru pH 7,5, 10 mM jódacetamidu, 5 mM benzamidínu, 1 mM EDTA. Eluát (~100 ml) bol desaťkrát zriedený do 10 mM Hepes pufru obsahujúceho inhibítory a naplnený na kolónu S20 (BioRad, hercules, CA). μ UK bol vymývaný roztokom dvadsaťnásobného objemu kolóny s postupne stúpajúcim NaCl (20 mM až 500mM, 200 ml). V pufroch použitých na eluovanie neboli žiadne inhibítory. Eluát bol potom päťkrát zriedený 10 mM Hepes pufru pH 7,5 a nasadený na heparín-agarózovu kolónu (Sigma). μ UK bol vymývaný roztokom s postupne stúpajúcim NaCl od 10 mM do 250 mM. Eluát μ UK (~50 ml) z heparínovej kolóny bol aplikovaný na benzamidín-agarózovú kolónu (40 ml) (Sigma, St. Louis. MO), ekvilibrovaný s 10 ml Hepes pufru pH 7,5, 200 ml NaCl. Kolóna bola potom premytá ekvilibračným pufrom a eluovaná 50mM AcONa, pH 4,5, 500 mM NaCl. Eluát μ UK (~30 ml) bol ultrafiltráciou koncentrovaný na 4 ml a aplikovaný na kolónu so Sephadexom G-75 (2,5 x 48 cm; Pharmacia[®] Biotech, Uppsala, Sweden) ekvilibrovanú s 20 mM AcONa, pH 4,5, 100 mM NaCl. Jediný hlavný pík obsahujúci μ UK bol zhromaždený a lyofilizovaný ako konečný produkt. Vyčistený materiál sa pri SDS-PAGE javil ako jediný hlavný pás

Vysoká kvalita μ UK kryštálov uľahčila určenie ich apo-trojdimezionalnej štruktúry röntgenovou kryštalografiou s rozlíšením 1,02 Å. Kryštály boli získané metódou parnej difúzie visiacej kvapky. Typické roztoky v banke pozostávali z 0,15 M LiSO_4 , 20 % polyetylénglykolu mol. hm. 4000 a sukcinátového pufru pH 4,8-6,0. Na prúžku viečka boli 2 μl roztoku z banky zmiešané s 2 μl roztoku proteínu a viečko bolo tesne uzavreté nad bankou. Kryštalizácia prebiehala počas 24 hodín pri približne 18 – 24 °C. Roztok proteínu obsahoval 6 mg/ml (0,214 mM) μ UK v 10 mM citráte pH 4,0, 3 mM p-karbetoxyfenyl ester-chloridu kyseliny ϵ -aminokaprónovej (inhibitor) s 1 % DMSO ko-solventu. O inhibítore používanom pri ko-kryštalizácii sa vie, že acyluje aktívne centrum serínu 195 a následne je enzymaticky deacylovaný, pretože 3-D röntgenová štruktúra kryštálov pestovaných v prítomnosti tejto zlúčeniny nevykazuje na aktívnom centre enzýmu zostávajúci inhibitor. Menegatti a spol., J. Enzyme Inhibition, 2, 249-59 (1989). Jediná prítomná hustota je tá, ktorá patrí viazaným molekulám rozpúšťadla. Vzhľadom na to, že μ UK nechce kryštalizovať v neprítomnosti inhibítora, má sa za to, že podstatou kryštalizácie je komplex metastabilný inhibitor : UK. Je dôležité, že výsledné μ UK kryštály sú zložené z enzýmu, ktorý má prázdne aktívne centrum, ktoré je ideálnym prípadom na implementáciu CrystaLEAD™.

Kryštály získané v týchto podmienkach patria do priestorovej grupy $P2_12_12_1$ s rozmermi bunkovej jednotky $a = 55,16$ Å, $b = 53,00$ Å, $c = 82,30$ Å a $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Difrakcii podliehajú nad 1,5 Å na zdroji s rotačnou anódou. Ďalej bola súprava natívnych dát pri rozlíšení 1,0 Å odobratá na Cornellovom vysokoenergetickom synchrotrónnom zdroji v Ithace, New York. Kryštalová štruktúra bola stanovená metódou molekulárnej zámény s použitím programu AMORE, Navaza, J. Acta Cryst., A50 : 157-163 (1994), so štruktúrou urokinázy s nízkym rozlíšením ako vyhľadávacou sondou. Spraggon a spol., Structure, 3, 681-691 (1995); PDB vstup ILMW Štruktúra bola zdokonalená s použitím programového súboru XPLOR. A. Brunger, X-PLOR (version 2.1) Manual, Yale University, New Haven CT (1990).

Skríning pre slabé bázy

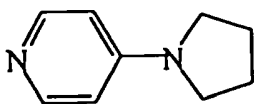
μ UK bol podrobený skríningu proti štruktúrne zaradenej v knižnici, aby bol nájdený primárny skelet, ktorý by mal priaznivé farmakokinetické vlastnosti. Pretože aktívne centrum urokinázy je zložené z jednej kapsy, ktorá obsahuje voľnú karboxylátovú skupinu vo forme asparagovej kyseliny (Asp^{189}), väčšina bežne známych štruktúr je silne bázická a obsahuje amidínové alebo guanidínové podiely. Bolo zistené, že zásaditá skupina je spojená vodíkovou väzbou ako soľ s Asp^{189} . To môže farmakologicky predstavovať problém vzhľadom na to, že je známe, že silné zásady znižujú orálnu biovyužitelnosť. Bol teda zvolený súbor obsahujúci slabo zásadité zlúčeniny, o ktorých nebolo pred tým známe, že by sa na urokinázu viazali.

Do knižnice dostupných chemikálií (ACD) bol umiestnený súbor slabých báz obsahujúci 61 zlúčenín s pK_a medzi okolo 1 a 9. Knižnica bola špecifikovaná do 9 zmesí s asi 6 až 7 tvarovo rozdielnymi zlúčeninami, ako bolo určené vizuálnym preskúmaním dvojdimenzionálnej chemickej štruktúry. Zmesi zlúčenín boli podrobené skríningu vyššie opísaným spôsobom. Konkrétne bola každá zlúčenina rozpustená v 100%-nom DMSO na konečnú koncentráciu okolo 2 M (alebo do nasýtenia pri menej rozpustných). Rovnaké objemy každej z 6 alebo 7 zlúčenín obsahujúcich zmes boli zmiešané na konečnú 0,33 M koncentráciu individuálnej zlúčeniny. Jednotlivé μ UK kryštály boli umiestnené do 50 ml 27%-ného PEG4000, 15,6 mM sukcinátu pH 5,4, 0,17 M LiSO_4 a bolo pridaných 0,5 - 0,8 ml zmesi zlúčenín, aby vznikla 1 až 1,6 %-ná DMSO a 3,3 až 5,2 mM konečná koncentrácia zlúčeniny. Za týchto podmienok je možné očakávať, že citlivosť experimentu je detekcia ligandov $K_d < 1,0$ mM. Kryštály sa nechali ekvilibrovať okolo 8 - 24 h.

Údaje boli snímané na Rigaku RTP 300 RC rotujúcom anódovom zdroji s RAXISII alebo MAR platňovým detektorom zobrazenia. Typické údaje spočívajú na 40 - 50 2° osciláciách s 2 - 5 min expozíciami. Typické údaje boli z 70 - 90 % kompletne pri rezolúcii 2,0 - 3,0 Å so z 13 - 26 % spojenými R-faktormi. Z toho dôvodu kvalita dát sa pohybuje od dobrej do zlej vďaka rýchlemu zápisu zberu dát. Avšak táto kvalita dát sa ukázala byť adekvátna na detekciu ligandov najmä vďaka vysokej kvalite východiskového modelu, ktorý

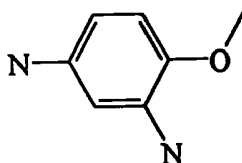
bol zdokonalený na rozlíšenie 1,5 Å ($R = 20,7\%$, $R_{\text{voľné}} = 25,3\%$). Dáta boli spracované programovým súborom DENZO, Otwinowski a spol., Methods in Enzymology, 276 (1996) a mapa elektrónovej hustoty bola spočítaná programom XPLOR.

Mapa elektrónovej hustoty bola preskúmaná na zariadení Silicon Graphics INDIGO2 s použitím programového súboru QUANTA 97 (Molecular Simulations Inc., Quanta Generating and Displaying Molecules, San Diego: Molecular Simulations Inc., 1997). Tvar hustoty na aktívnom centre bol opticky identifikovaný ako výsledok plynúci z jednej (alebo viacerých) zlúčenín v zmesi a indikujúci pozitívny zásah, alebo z usporiadania molekúl vody indikujúceho absenciu väzby. Na experimentoch, ktorých výsledkom bol pozitívny zásah, bola vhodná zlúčenina opticky presunutá do elektrónovej hustoty. Mapy elektrónovej hustoty boli tiež skúmané pre akékoľvek zmeny v štruktúre proteínu a pokiaľ boli pozorované, boli učené vhodné modifikácie. Po stupni preskúmania mapy zlúčeniny bola teda poznaná trojrozmerná štruktúra komplexu zlúčenina: proteín. Príklad s urokinázou využíval optický posun zlúčeniny do hustoty, pretože skrining bol ešte v malom merítku. Ak sa skrining zlúčenín rozšíri do väčšieho rozsahu, uľahčí automatické priradenie zlúčeniny do hustoty komerčné programy ako je XFIT modul QUANTA.



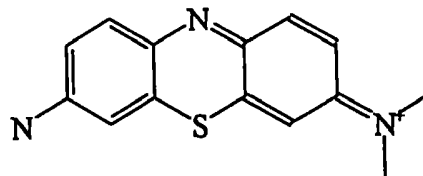
2456-81-7

1



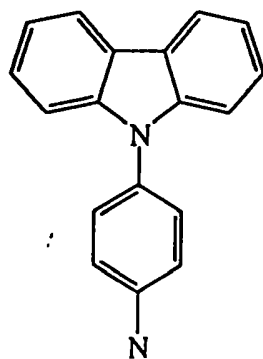
123333-56-2

2



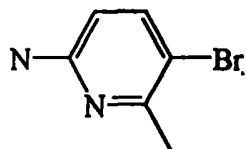
62298-43-5

3



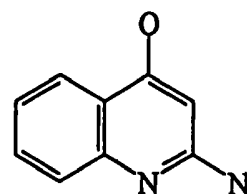
X-001

4



42753-71-9

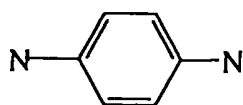
5



42712-64-1

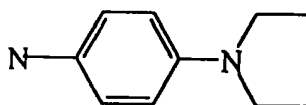
6

Obrázok 6 ukazuje príklad pozitívneho zásahu, zlúčeniny podrobené skrínungu sú očíslované 1 až 6 a Fo-Fc mapa elektrónovej hustoty na aktívnom centre je uvedená na obrázku 6A. Tvar hustoty identifikuje ligand ako zlúčeninu 5. Obrázok 6B ukazuje detailný spôsob väzby zlúčeniny v primárnej špecifickej kapse ako sa získal priamo interpretáciou CrystaLEADTM mapy elektrónovej hustoty. Vodík aminového dusíka sa viaže s karboxylom Asp¹⁸⁹ a vodík pyrimidylového dusíka sa viaže s karbonylom hlavného reťazca (Gly²¹⁸). Štruktúra ukazuje tiež, že ideálne miesto pre modifikáciu bude na pyridylovom metyle.



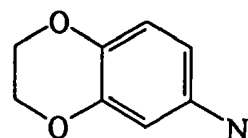
51-78-5

7



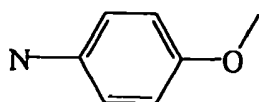
2198-58-5

8



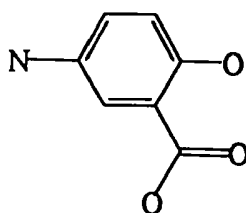
22013-33-8

9



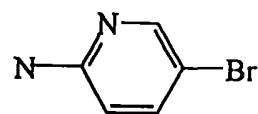
104-94-9

10



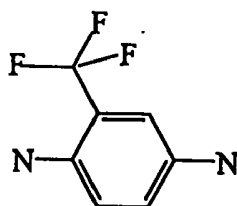
89-57-6

11



1072-97-5

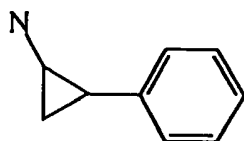
12



364-13-6

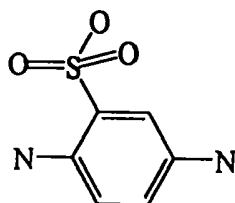
13

Iná zmes zlúčenín (zlúčeniny 7 až 13) nevykázala žiadny úspešný zásah. Výsledná mapa elektrónovej hustoty po nasiaknutí tejto skupiny neodpovedala niektorej z testovaných zlúčenín v tejto zmesi. Miesto toho zodpovedajú viazaným molekulám rozpúšťadla. Vid' obrázok 6C.



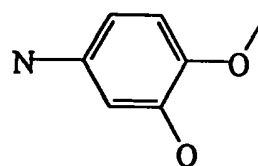
95-62-5

14



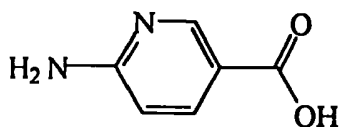
88-45-9

15



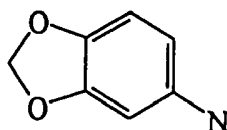
1687-53-2

16



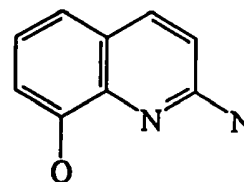
3167-49-5

17



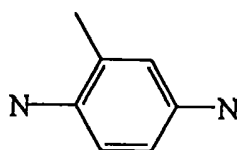
14268-66-7

18



70125-16-5

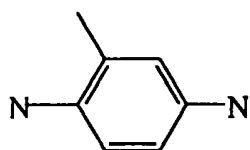
19



615-45-2

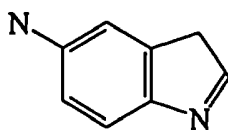
20

Obrázok 7 ukazuje iný príklad pozitívneho zásahu. Zo siedmich zlúčenín podrobených skríningu (14 - 20), Fo-Fc mapa uvedená na obrázku 7A indikuje, že je viazaná zlúčenina 19. Spôsob väzby vyobrazený na obrázku 7B indikuje, že sa 2-amino s vodíkovou väzbou viaže s Asp189 vedľajším reťazcom, a že 8-hydroxyl je ideálnou polohou na substitúciu vzhľadom na sprístupnenie priľahlej hydrofóbnej vedľajšej kapsy (v obrázku 7B označená ako S1 β). Obrázok 8 predstavuje iný zásah, kedy bolo zistené, že zlúčenina 22, 5-aminoindol, (obrázok 8A) sa viaže na urokinázu vodíkovou väzbou aminoskupiny s Asp189 (obrázok 8B). Zlúčeniny, ktoré boli podrobené skríningu boli zlúčeniny 21 - 27.



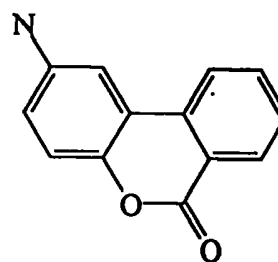
615-50-9

21



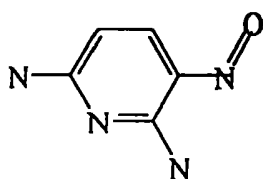
65795-92-8

22



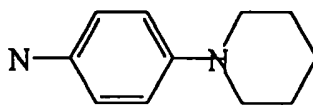
83527-99-5

23



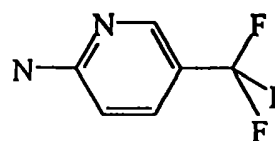
89323-10-4

24



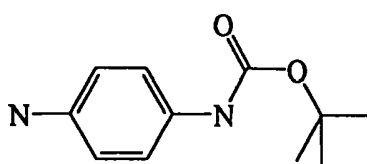
2359-60-6

25



74784-70-6

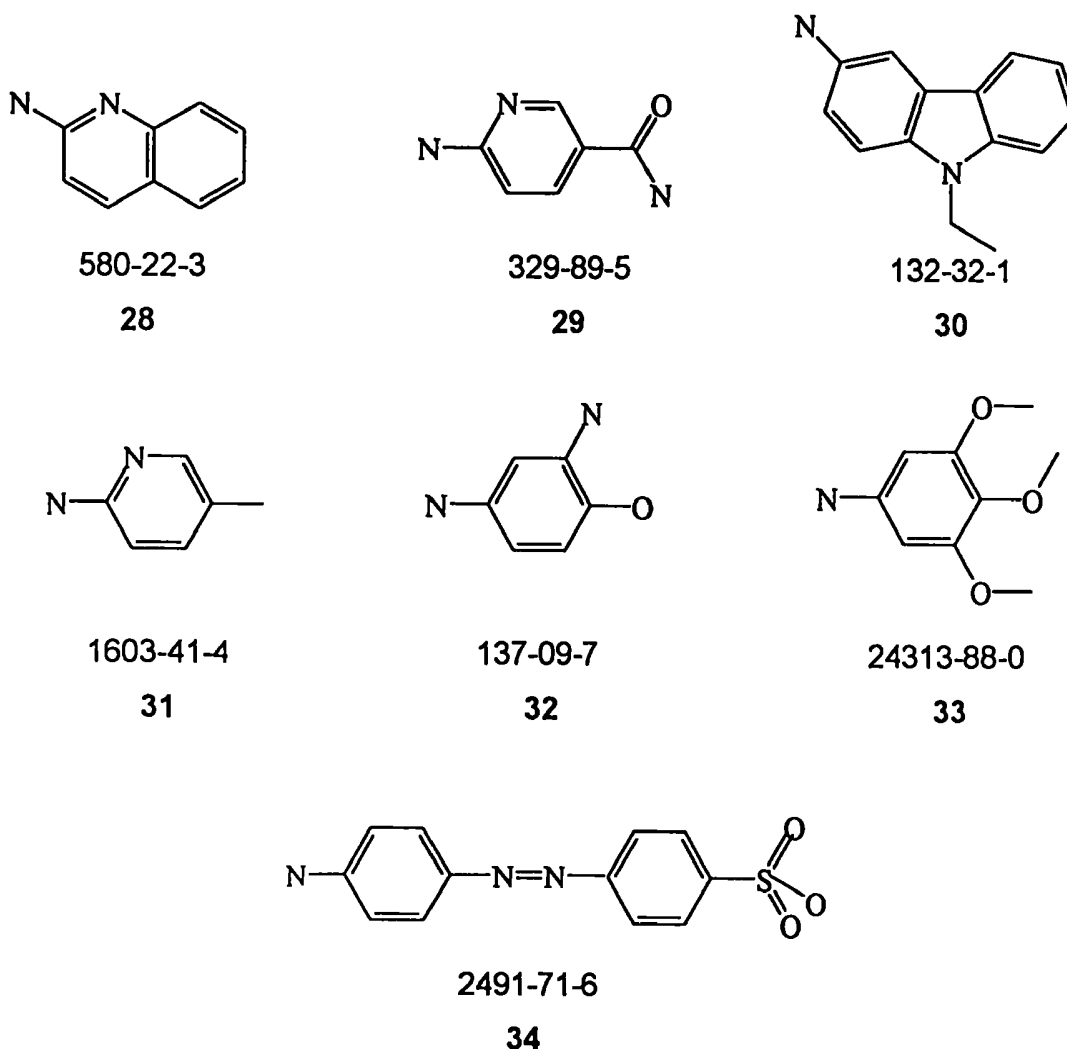
26



71026-66-9

27

Obrázok 9 ukazuje príklad, kedy bolo zistené, že sa z tej istej zmesi (zlúčeniny 28 - 34) viažu dve zlúčeniny bez problémov viacnásobného zaberania priestoru. Pri počiatočnom experimente, kedy bol kryštál nasakovaný v prítomnosti celej zmesi zlúčenín, bolo zistené, že sa viaže zlúčenina 28 (obrázok 9A). Okrem toho, keď bola slabšie sa viažuca zlúčenina 31 nasakovaná individuálne (na základe pred tým, pomocou CrysaLEAD™ stanovených súvislostí štruktúrnej aktivity), bolo tiež zistené, že sa viaže (obrázok 9B). Pokiaľ sa to žiada, pri typickejšej aplikácii metódy, aby sa detegoval slabší ligand zo zmesi, by sa set zlúčenín nasakovala znovu bez prítomnosti pevnejšie sa viažuceho ligandu.



Tabuľka 1 zahrnuje inhibičné konštanty pre každý úspešný zásah pri CrysaLEAD™ ako bolo stanovené chromogénnou aktivitou pyroGlu-Gly-Artg-pNA/HCl (S-2444, Chromogenix) Analýzy boli uskutočnené ako pri pH 6,5 (0,1 M NaPO₄) tak pri pH 7,4 (50 mM Tris) Ďalšie podmienky experimentu

boli 150 mM NaCl, 0,5 % detergentu Pluronic F-68, 200 mM S-2444 s konečnou koncentráciou 2,5 %. Bolo stanovené, že K_m substrát je 55 μM .

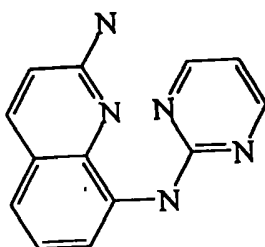
Tabuľka 1

Inhibičné konštanty a pK_a pre zásahy detegované pomocou CrystaLEAD™

Zlúčenina (CAS č.)	K_i (pH 6,5)	K_i (pH 7,4)	pK_a
5 (42753-71-9)	$>>500 \mu\text{M}$	$>>500 \mu\text{M}$	6,0*
19(70125-16-5)	56 μM	137 μM	7,3
22(65795-92-8)	200 μM	$>500 \mu\text{M}$	6,0*
28(580-22-3)	71 μM	136 μM	7,3
31(1603-41-4)	$>>500 \mu\text{M}$	$>>500 \mu\text{M}$	7,0*

- značí odhadované pK_a

Na základe aktivity a štruktúrnej informácie bola zlúčenina 19 zvolená ako zlúčenina vodidlo. Kryštalografická informácia udáva, že substitúcia v polohe 8 bude pripúšťať prístup k priľahlej hydrofóbnej kapse (S1 β), a teda mať za následok zvýšenie účinnosti. Na základe informácie o kryštalografii a väzbe zo série založenej na amidíne bola syntetizovaná zlúčenina 35 (8-aminopyrimidinylový analóg zlúčeniny 19). Výsledkom tejto modifikácie bol asi dvestonásobný vzrast väzbovej sily pri pH 6,5 (K_i pH 7,4 = 2,5 μM , K_i pH 6,5 = 0,32 μM). Experiment ukazuje, že CrystaLEAD™ môže poskytovať i hlavnú základnú konštrukciu aj podrobnú informáciu o štruktúre potrebnú na to, aby táto konštrukcia bola s využitím na štruktúre založeného dizajnu spracovaná na účinnejšiu zlúčeninu



Na obrázku 10 je uvedený prekryv kryštalickej zlúčeniny 35 : urokináza a materskej zlúčeniny 19. Prekryv ukazuje, že kruh aminopyridínu je viazaný do vedľajšej kapsy ($S1\beta$) ako bolo predpovedané, a že výsledkom tejto substitúcie je posunutie chinolínového kruhu k tomuto miestu.

Zlúčenina 35, 8-aminopyrimidyl-2-aminochinolín, bola testovaná tiež na orálnu biovyužiteľnosť. U zlúčeniny 35 bolo stanovené, že je u krýs z 30 - 40 % orálne biovyužiteľná, keď je podávaná v dávke 10 mg/kg. Výsledkom úspešnej implementácie CrystaLEAD™ je teda nová hlavná konštrukcia, ktorá v jednom cykle na štruktúre založeného dizajnu poskytla zlúčeninu majúcu dvostonásobný vzrast účinnosti a bolo o nej zistené, že je orálne biovyužiteľná.

Príklad 2

VanX

Vankomycín je liečivo, ktoré sa volí pri infekciách spôsobených streptokokovými alebo stafylokokovými bakteriálnymi kmeňmi, ktoré sú rezistentné voči β -laktámovým antibiotikám. Avšak i u tohto liečiva poslednej záchrany boli teraz zistené kmene baktérií rezistentných voči vankomycínu. Niektorí badatelia spojovali rezistenciu voči vankomycínu s metaloproteinázou VanX. VanX je súčasťou kaskády, ktorá vzniká pri náhrade terminálneho D-Ala-D-Ala podielu bakteriálneho peptidoglykánového reťazca (väzbové miesto pre vankomycín) za D-Ala-D-laktát. Výsledkom toho je tisícnásobný pokles väzby vankomycínu. Jedinými známymi inhibítormi VanX sú peptidy alebo peptidové deriváty ako fosfonátové alebo fosfinátové analógy D-Ala-D-Ala substrátu. Ako také nie sú vhodnými liečivami, pretože sú in vivo metabolizované a/alebo degradované. Počiatočné pokusy nájsť vhodné liečiva normálnymi skríningovými metódami neodhalili vhodný ligand. Autori prihlášky sa kvôli nájdeniu nepeptidovej vodiacej zlúčeniny na vývoj liečiva proti pôsobeniu týchto rezistentných kmeňov, postupne obrátili na CrystaLEAD™.

Preparácia VanX

E. coli W3110 obsahujúca plazmid pGW1, kde je vanX gén pod kontrolou IPTG-stimulovateľného tac promótoru, bola pestovaná pri 37°C v LB médiu obsahujúcom ampicilín (100 µg/ml) do absorbancie asi 1,3 - 1,5 pri 595 nm. Potom bol pridaný IPTG do konečnej koncentrácie 0,8 mM a bunky boli pestované ďalšiu 1,5 h.

Bunky boli zbierané 10 min centrifugovaním pri 6000 ot/min. Potom boli pelety resuspendované v ľadovo chladnom 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) obsahujúcom 0,01 % NaN₃, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM DTT (pufer A) a 25 jednotiek/ml benzonázy (Nicomed Pharma, Copenhagen, Denmark). Bunky boli lyzované pridaním keramických perál z oxidu zirkoničitého veľkosti 0,1 mikrónu ku zmesi lyzátu (objemy 1:1) v ultrazvukovom perlovom mlyne Bead Beater (Biospec) počas 1 – 3 minút. Mlyn Bead Beater pracoval v ľadom obloženom rezervoáry, aby lyzát zostával chladný. Potom bol lyzát dekantovaný od usadených sklenených perál. Na to boli perly prepláchnuté 1 - 2 objemami pufru pre lýzu a kvapaliny po prepláchnutí boli spojené s pôvodným lyzátom. Lyzát bol 30 minút centrifugovaný pri 25 000 g, aby sa usadilo rozrušené tkanivo buniek. Supernatant bol cez noc dialyzovaný pri 4°C v 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA a 1 mM DTT (pufer B).

Potom bol dialyzovaný lyzát nasadený na Q-sefarózovú kolónu s rýchlym tokom, predtým ekvilibrovanú pufrom A rýchlosťou milimetre za minútu. Kolóna bola dôkladne premytá pufrom A a následne s postupným lineárnym stupáním pufru B k pufru B + 0,5 M NaCl. Aktívne VanX frakcie z tohto kroku boli spojené, koncentrované a potom boli v pufri B aplikované na kolónu obsahujúcu Superose-75. VanX frakcie po priebehu kolónou so Superose boli potom v pufri A s rýchlosťou toku 2 ml/min aplikované na kolónu obsahujúcu Zdroj-Q. Kolóna bola premytá počiatočným pufrom niekoľkými objemami kolóny. Potom bol vymytý VanX proteín s miernym postupným stúpaním pufru A k pufru A + 25 mM NaCl. Aktívna VanX frakcia z tohto finálneho kroku bola filtrami Amicon koncentrovaná na konečnú koncentráciu okolo 15 mg/ml v pufri A. Pokiaľ

nie je uvedené inak, prebiehala predchádzajúca procedúra pri 4°C, ako vyčistený mal VanX proteín približne 95 %-nú čistotu a ľahko kryštalizoval.

Kryštalová štruktúra VanX

Kryštalová štruktúra VanX bola stanovená pri rozlíšení 2,2 Å niekoľkonásobnou izomorfnou zámenou. Bussiere a spol., *Molecular Cell*, 2, 75 - 84 (1998). Vyššie získaný rekombinantný proteín kryštalizoval metódou parnej difúzie sediacej kvapky v priestorovej grupe P2₁. Typické kryštály mali rozmery bunkovej jednotky $a = 83,4 \text{ Å}$, $b = 45,5 \text{ Å}$, $c = 171,4 \text{ Å}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$. $\beta = 104^\circ$ so šiestimi molekulami v asymetrickej jednotke. Typické roztoky v banke pozostávali z 0,1 M Mes pH 6,4, 0,24 M síranu amónneho a 20 % PMME 5000. Na mikromostíku pre sediacu kvapku (Hampton USA) boli 2 ml proteínu zmiešané s 2 ml roztoku z banky roztoku a komôrka bola viečkom tesne uzavretá. Kryštalizácia prebiehala pri 18°C a kryštály vyrástli do úplnej veľkosti približne za 2 - 3 dni. Roztok proteínu obsahoval 12 - 15 mg/ml (0,5 - 0,6 mM) VanX v 10 mM Tris, 15 mM DTT, pH 7,2. 3-D štruktúra pre kryštály vypestované za týchto podmienok vykazuje prázdne aktívne centrum, čo činí tento systém vysoko vhodný na aplikovanie CrystaLEAD™.

Aktívne centrum VanX má rozšírenú kapsu schopnú prispôbiť sa D-Ala-D-Ala substrátu. Kapsa obsahuje tiež katalytický zinok. VanX bol teda pre tento prípad podrobený najprv skríningu voči súborom zamareným na zinok, aby boli nájdené viacpočetné väzbové konštrukcie, ktoré by mohli byť zlúčené do jedinej vodiacej zlúčeniny. Skríningu boli podrobené tri na zinok zamerané súbory používajúce podiely aminokyselín, tiolov, hydroxámových kyselín alebo karboxylátov.

Skríning

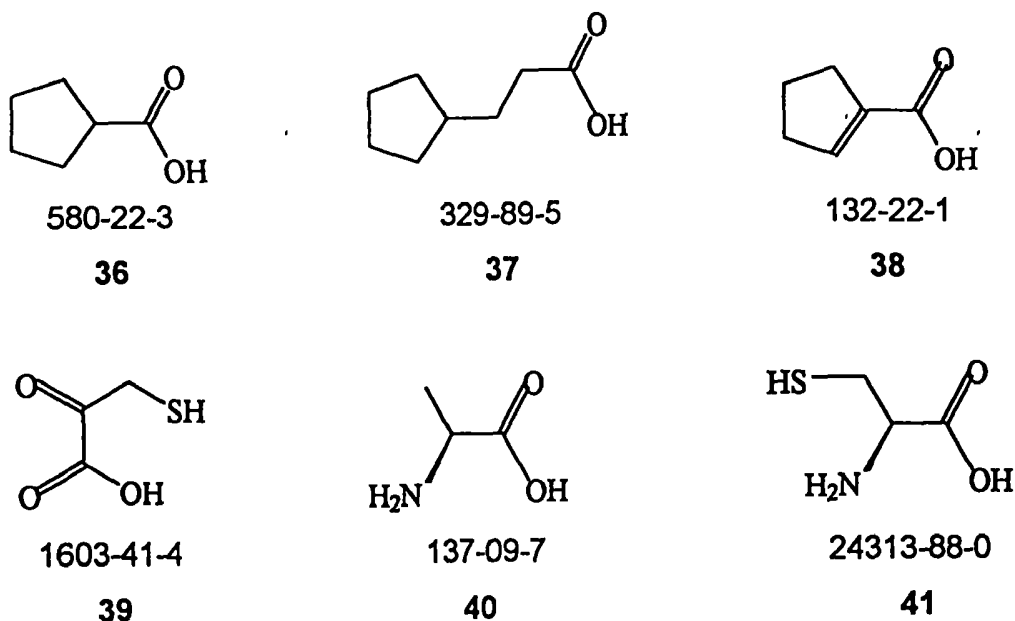
Knižnica aminokyselín pozostáva z 102 zlúčenín opticky čistých, komerčne dostupných, prírodných aj v prírode sa nevyskytujúcich aminokyselín.

Knižnica bola rozčlenená do 12 zmesí 8-10 tvarovo rozdielných zlúčenín a podrobená skríningu vyššie opísanou metódou. Konkrétne každá zlúčenina bola rozpustená v 100 %-nom DMSO na finálnu koncentráciu 2 M (alebo do nasýtenia u menej rozpustných). Rovnaké objemy každej zlúčeniny z každej zmesi boli zmiešané na konečnú individuálnu koncentráciu 0,33 M. Jednotlivé VanX kryštály boli umiestnené do 50 ml 0,1 M Mes pH 6,4, 0,24 M síranu amónneho, 20 % PMME 5000 a bolo pridaných 0,5-0,8 ml zmesi zlúčenín tak, že sa pre jednotlivú zlúčeninu získala konečná koncentrácia 1 až 1,6 % DMSO a 3,3 až 5,2 mM. Kryštály sa ponechali 3 - 4 h ekvilibrovať. Súborny tiolov, hydroxamových kyselín a karboxylátov boli pripravené a podrobené skríningu podobným spôsobom.

Dáta boli snímané na Rigaku RTP 300 RC rotujúcom anódovom zdroji s RAXISII, MAR doskovým detektorom zobrazenia alebo MAR CCD detektorom. Pre systémy s doskovým zobrazením spočívajú typické dáta na 90° osciláciách s 15 min expozíciami. Typické dáta boli z $>90\%$ kompletne pri rezolúcii 2,6 - 2,8 Å z 10 - 20 % spojenými R-faktormi. Bolo potrebné, aby sa adekvátne zobrazili a identifikovali inhibítormi v Fo-Fc alebo 2Fo-Fc mapách. Pre tieto mapy bol počiatočný model zdokonalený pri rozlíšení 2,1 Å ($R = 25\%$, $R_{\text{work}} = 28\%$). Dáta boli spracované programovým súborom DENZO a mapa elektrónovej hustoty bola spočítaná programom XPLOR. V prítomnosti zlúčenín z karboxylátového súboru sa ukázalo, že sa priestorová grupa $P2_1$ posunula do C_2 ($a = 170,6$ Å, $b = 47,5$ Å, $c = 83,6$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 104^\circ$). Pre túto formu obsahovala asymetrická jednotka trimér, čím sa znížil počet stupňov voľnosti tak, že dáta s nižším rozlíšením (3,0 Å) boli na zobrazenie vazby adekvátne.

Mapa elektrónovej hustoty bola preskúmaná na zariadení Silicon Graphics INDIGO2 s použitím QUANTA 97. Tvar hustoty na aktívnom centre bol opticky identifikovaný tvarom jednej (alebo viacerých) zlúčenín v zmesi, aby sa indikoval pozitívny zásah, alebo z usporiadania molekúl vody indikujúceho absenciu väzby. Pre experimenty, ktorých výsledkom bol pozitívny zásah, bola vhodná zlúčenina opticky presunutá do elektrónovej hustoty. Mapy elektrónovej hustoty boli tiež skúmané na akékoľvek zmeny v štruktúre proteínu a pokiaľ boli pozorované, boli v štruktúre učené vhodné modifikácie. Po stupni

preskúmania mapy s priradením zlúčeniny bola teda poznaná podrobná 3-D štruktúra komplexu zlúčenina: proteín.



Pri skriningu VanX bolo bežne detegovaných 6 úspešných zásahov (zlúčeniny 36 - 41). Obrázok ukazuje spôsob väzby reprezentatívnych zásahov. Vo všetkých prípadoch tvar elektrónovej hustoty identifikuje viažucu sa zlúčeninu. Obrázok 11A ukazuje zlúčeninu 39 viazanú karboxylátom koordinujúcim na aktívne centrum zinok. Obrázok 11B ukazuje zlúčeninu 36 viazanú s karboxylátom situujúcim zinok ku aktívnemu centru. Na obrázku 11C bolo tiež zistené, že sa zlúčenina 37 viaže prostredníctvom karboxylátu. Väzba zlúčeniny 39 a zlúčeniny 41 (nie je uvedené) nasvedčuje, že zinok aktívneho centra preferuje koordináciu s karboxylátom pred voľným tiolom. To viedlo ku skriningu karboxylátového súboru, kde boli nájdené ďalšie úspešné zásahy. Vo všetkých prípadoch boli zlúčeniny podrobované skriningu v zmesiach 7 - 10 a zásahy boli v mape elektrónovej hustoty priamo identifikované podľa tvaru. Tieto zásahy boli podobným spôsobom ako je opísané pre príklad urokinázy, priamo nasadzované do cyklu navrhovania liečiv na základe štruktúry.

Skríning so zmesami 100 zlúčenín

Aby sa zvýšil počet zlúčenín, ktoré by mohli byť v jednotke času podrobené skríningu pomocou CrystaLEAD™, bude preferovaným uskutočnením metódy vykonávať skríning zmesí so 100 zlúčeninami skôr než zmesí s 10. Výhodou tejto metódy je väčšie presadené množstvo zlúčenín s konkurujúcim znížením citlivosti detekcie úspešných zásahov. Okrem toho, vzhľadom na to, že sa bude viazať len najúčinnnejšia zlúčenina zo zmesi, môžu byť zanedbané slabšie zásahy. Keď je vyhľadávaniu pomocou CrystaLEAD podrobená všeobecná knižnica, napríklad ten, ktorý je úplne rozdielny čo do veľkosti, tvaru a funkčnosti, očakáva sa, že podiel úspešných zásahov je nízky. Preto je teda zarúčený hrubší skríning. Okrem toho, pokiaľ zásahy z tohto vyhľadávania budú účinnnejšími ligandami, budú slúžiť ako východiskové štruktúry pre dizajn založený na štruktúre. Pretože bude zmes zložená z 100 zlúčenín, je treba zmes starostlivo vybrať, aby sa zaistilo, že všetky zložky budú mať natoľko rôzny tvar, aby sa eliminovala potreba pre rozvinutie. Preto teda po detekcii zásahu môže byť nevyhnutné určité rozvinutie, aby sa zásah identifikoval.

Na test tejto špeciálnej metódy bola ku skupine 100 zlúčenín pridaná zlúčenina, o ktorej je známe, že sa viaže na μ UK. Tento známy ligand, zlúčenina 19, bola pôvodne odhalená metódou CrystaLEAD™ a bolo ukázané, že sa viaže na μ UK s K_i 56 μ M pri pH 6,5 a 137 μ M pri pH 7,4. Zmes 100 zlúčenín bola vytvorená zmiešaním 10 zmesí o 10 zlúčeninách. Konkrétne každá suchá zmes 10 bola rozpustená v 100 %-nom DMSO na konečnú koncentráciu 80-240 mM (alebo nasýtenie pre menej rozpustné). Rovnaké objemy každej zo zmesí 10 zlúčenín boli zmiešané na 8,0-24,0 μ M finálnu koncentráciu pre jednotlivú zlúčeninu a zmes bola doplnená zásobným roztokom zlúčeniny 19 v 100 %-nom DMSO tak, že konečná koncentrácia bola 18,0 mM. Jednotlivé kryštály μ UK boli umiestené do 50 μ l 27%-ného PEG 4000, 15 mM sukcinátu pH 5,4, 0,17 M LiSO_4 a bolo pridaných 0,5 μ l zmesi zlúčenín, aby dalo 1 % DMSO. Konečná koncentrácia každej zlúčeniny pri experimente nasakovania sa pohybovala 80-240 μ M, koncentrácia zlúčeniny 19 bola 180 μ M. Za týchto podmienok sa pre

citlivosť experimentu očakáva, že deteguje ligandy s $K_d < 20\text{-}60\ \mu\text{M}$. Kryštály boli ponechané ekvilibrovať 4 hodiny a 15 minút.

Dáta boli snímané na Argonne National Labs so zdokonaleným fotónovým zdrojom synchrotrónu ID vedenie lúča IMCA, vybavenom MarCCD kamerou. Dáta pozostávali zo 100 1° oscilácii s 7 sek expozíciami. Dáta boli z 87,4 % kompletne pri rezolúcii 1,6 Å s celkovo spojeným R-faktorom 5,4 %. Dáta boli spracované programovým súborom DENZO, Otwinowski a spol., Methods in Enzymology, 276 (1996) a mapa elektrónovej hustoty bola spočítaná programom XPLOR.

Mapa elektrónovej hustoty bola preskúmaná na zariadení Silicon Graphics INDIGO2 s použitím programového súboru QUANTA 97 (Molecular Simulations Inc., Quanta Generating and Displaying Molecules, San Diego: Molecular Simulations Inc., 1997). Tvar hustoty na aktívnom centre bol opticky identifikovaný ako výsledok plynúci z jednej zlúčeniny v zmesi a indikujúci pozitívny zásah, ktorý bol identifikovaný ako zlúčenina 19, ako ilustruje obrázok 12.

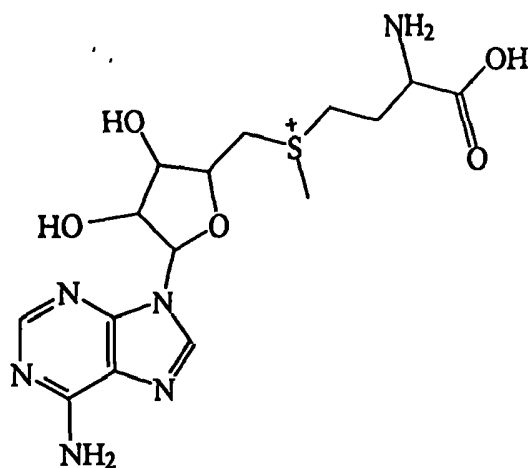
Táto metóda je výhodnejšia na zistenie určujúcej vodiacej zlúčeniny. Typické je, že vodiace zlúčeniny budú mať charakteristiky pevných ligandov (napríklad v rámci senzitivity metódy). Táto metóda teda umožňuje skrining nesmerovaného súboru 10 000 zlúčenín v časovom rámci 1 - 2 týždňov. Táto metóda by mohla byť používaná v spojení s inými metódami skriningu 10 - 20 zlúčenín v dobe kedy sa budú identifikovať slabšie ligandy. Tieto ligandy budú menej vhodné, aby slúžili ako určujúce vodiace zlúčeniny, môžu však byť pripojené na hlavný skelet, aby zvýšili účinnosť.

Príklad 4

Vyhľadávania ErmC' pomocou CrystaLead™

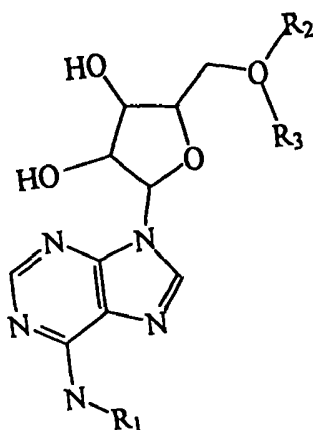
ErmC' je rRNA transferáza, ktorá prenáša metylovú skupinu z S-adenozyl-L-metionínu na N6 adenínu v cykle peptidyltransferázy u 23S rRNA.

Táto metylácia udeľuje antibiotickú resistenciu proti radu makrolidových antibiotík ako je široko predpisovaný erytromycín. Inhibíciou ErmC' je možné očakávať, že sa rezistencia obráti. Na návrh špecifického a účinného ErmC' inhibítora bol za cieľ vybraný kofaktor či väzbové centrum S-adenozyl-L-metionínu. S-Adenozyl-L-metionín je uvedený nižšie ako zlúčenina 42:



42

Kryštálová štruktúra ErmC' ukazuje, že aktívne centrum S-adenozyl-L-metionínu je zložené z dvoch káps, ktoré vyhovujú cyklickému systému adenínu a metionínu. Okrem toho je tu ešte tretia kapsa, do ktorej sa môže umiestniť rRNA adenín, ktorý podlieha metylácii. Aby sa na tomto centre potvrdilo SAR, bol vytvorený súbor adenínových analógov substituovaných na N6 a/alebo 5' hydroxyle. Polohy zmien v súbory sú reprezentované nižšie ako zlúčenina 43.



43

Expresia a čistenie ErmC'

Expresívny vektor pTERM31 bol skonštruovaný amplifikáciou ErmC' génu reťazovou reakciou polymerázy (PCR) a skôr ležiaceho kdsB cistronu z pERM-1. Subklonovanie PCR produktu v pET24+ (Novagen, Madison, WI) bolo uskutočnené s využitím BamHI a HindIII polôh obsiahnutých v PCR priméroch "s chvostom". Tento nový konštrukt umožnil expresiu ErmC' postupným napojovaním ku kdsB, riadeným T7lac promotórom. Plazmid pTERM31 bol transformovaný v kmeni *E. coli* BL219(DE3)/pLys (Novagen) a vzniknutý kmeň bol použitý na produkciu ErmC'. Transformované bunky boli pestované pri 27,5°C v Micros fermentore New Brunswick Scientific (Edison, NJ) obsahujúcom v množstve 10 l Superbroth (BIO 101, La Jolla, CA) doplnený kanamycínom, chlórampfenikolom a glukózou. Keď optická hustota dosiahla 1,10, bola pridaním 1 mM izopropyl- β -D-tiogalaktopyranozidu (IPTG) indukovaná expresia ErmC'. 400 minút po indukcii boli bunky zozbierané.

Zmrazená pasta z buniek (200 - 250 g) bola pri teplote miestnosti rozmrazená a znovu suspendovaná v 5 - 10 objemoch studeného pufru pre lýzu [50 mM Tris, 5 mM 1,4-ditiotreitolu (DTT), 1 mM fenylmetylsulfonátfluoridu (PMSF), 2 mM etyléndiamíntetraoctovej kyseliny (EDTA), 0,2 % Tritonu X-100, pH 7,8]. Bunky boli lyzované vo francúzskom lise a rozdrvené bunkové tkanivo bolo odstránené centrifugáciou. Supernatant bol cez noc dialyzovaný voči 20 l pufru Tris-DTT-glycerol-magnézium (TDGM), pH 7,8 (50 mM Tris, 5 mM DTT, 10 % glycerolu, 10 mM MgCl₂). Potom bol dialyzát aplikovaný na Sepharose Fast Flow kolónu (Pharmacia), ktorá bola pred tým ekvilibrovaná v TDGM pufry. Frakcie boli analyzované na aktivitu metyltransferázy a tie, ktoré obsahovali ErmC' boli zhromaždené, aplikované na TSK SP-5PW kolónu (TosoHaas, Montgomeryville, PA) a vymývané postupne stúpajúcim NaCl. Vyčistený proteín bol potom skoncentrovaný na membráne YM-10 (Amicon).

Kryštalová štruktúra ErmC'

Kryštály ErmC' boli vypestované metódou parnej difúzie visiacej kvapky. Kvapky obsahujúce 5-8 mg/ml ErmC' v 25 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 2

mM DTT, 10 obj.% glycerolu, pH 7,5 boli ekvilibrované proti rezervoáru obsahujúcemu 100 mM Tris, 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 % PEG 8000, pH 7,8. Kryštály sa objavili počas jedného dňa a do svojej úplnej veľkosti vyrástli počas týždňa. Kryštály patrili do priestorovej grupy P43212. Štruktúra ErmC' v tejto priestorovej grupe bola stanovená molekulárnou zámennou pri rozlíšení 2,2 Å s použitím kryštálovej štruktúry ErmC' v priestorovej grupe P6 (Bussiere a spol., Biochemistry, 37, 7103-7112). 3-D štruktúra pre kryštály vypestované za týchto podmienok vykazovala prázdne aktívne centrum, čím činí tento systém vysoko vhodným pre aplikáciu CrystaLEAD™.

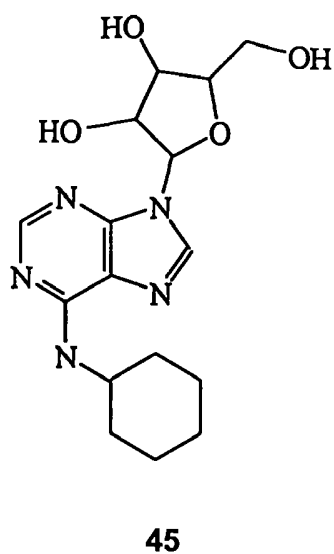
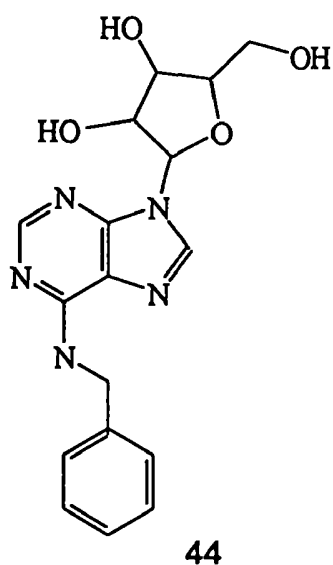
Skríning

Adenozínový súbor tvorilo 59 zlúčenín. Súbor bol rozdelený do 7 zmesí 8 - 9 tvarovo rozdielnych zlúčenín a bol podrobený skríningu metódou CrystaLEAD™. Konkrétne každá zlúčenina bola rozpustená v 100 %-nom DMSO na konečnú koncentráciu 1 M (alebo nasýtenie pre menej rozpustné). Rovnaké objemy každej zlúčeniny boli zmiešané, aby sa zostavila zmes 10 zlúčenín. Jednotlivé kryštály μUK boli umiestené do 50 μl 20 %-ného PEG 8000, 0,3 M síranu amónneho, 10 % glycerolu, pH 7,7 a bolo pridaných 0,5-0,8 μl zmesi zlúčenín, aby dalo 1 až 1,6 % DMSO a 3,3 až 5,2 μM finálnu koncentráciu pre jednotlivú zlúčeninu. Kryštály boli ponechané ekvilibrovať 3-4 h.

Dáta boli snímané na Rigaku RTP 300 RC rotujúcim anódovým zdrojom s RAXISII alebo MAR doskovým detektorom zobrazenia, alebo MAR CCD detektorom. Pre systémy s doskovým zobrazením spočívajú typické dáta na 15 - 20 2° osciláciách s 20-30 min expozíciami, zatiaľ čo pre CCD bolo 15 - 20 2° oscilácií exponovaných 8 - 15 minút. Typické použiteľné dáta boli z 80 - 90 % kompletne pri rezolúcii 3,4-3,6 Å a so spojenými R-faktormi 7 - 16 %. Bolo potrebné, aby sa adekvátne zobrazili a identifikovali inhibítory v Fo-Fc alebo 2Fo-Fc mapách. Pre tieto mapy bol počiatočný model zdokonalený na rozlíšenie 2,2 Å ($R=22\%$, $R_{\text{volné}}=22\%$). Dáta boli spracované programovým súborom DENZO a mapa elektrónovej hustoty bola spočítaná programom XPLOR.

Mapa elektrónovej hustoty bola preskúmaná na zariadení Silicon Graphics INDIGO2 s použitím programového súboru QUANTA 97. Tvar hustoty na aktívnom centre bol opticky identifikovaný tvarom z jednej alebo viacerých zlúčenín v zmesi indikujúcej pozitívny zásah, alebo z usporiadania molekúl vody indikujúceho absenciu väzby. Pre experimenty, ktorých výsledkom bol pozitívny zásah, bola vhodná zlúčenina opticky presunutá do elektrónovej hustoty. Mapy elektrónovej hustoty boli tiež skúmané na akékoľvek zmeny v štruktúre proteínů a pokiaľ boli pozorované, boli v štruktúre účinené vhodné modifikácie. Po stupni preskúmania mapy s priradením zlúčeniny, bola teda poznaná podrobná 3-D štruktúra komplexu zlúčenina: proteín.

Pri skríningu ErmC' adenzínových analógov boli detegované dva úspešné zásahy (zlúčeniny 44 a 45). Obrázky 13 a 14 ukazujú kryštálovú štruktúru komplexov zlúčenín 44 a 45 s ErmC'.



Tvar elektrónovej hustoty identifikoval viažucu sa zlúčeninu vo všetkých prípadoch. Bolo zistené, že hydrofóbná substitúcia sa viaže pozdĺž čiastočne exponovaného povrchu a naznačuje preferovanú interakciu, ktorá môže prispievať k väzbe týchto zlúčenín a umožňuje im vystupovať ako úspešný zásah. Žiadne úspešné zásahy, ktoré by mali substitúciu v 5' OH polohe neboli detegované. Zlúčenina skúmaná ďalej ku zlúčeninám 44 a 45, obsahuje na tejto hydrofóbnej polohe optimalizovaný indánový substituent.

Zoznam sekvencií

<110> Nienaber, Vicki
 Greer, Jonathan
 Abad-Zapatero, Celerino
 Norbeck Daniel

<120> VYHLÁDÁVANIE A NAVRHOVANIE LIGANDU RÖNTGE-
 NOVOU KRYŠTALOGRAFIU

<130> 6308.US.P1

<150> 09/036,184

<151> 1998-03-06

<160> 14

<170> FastSEQ pre Windows verse 3.0

<210> 1

<211> 51

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 1

attaatgtcg actaaggagg tgatctaag ttaaaatttc agtgtggcca a

51

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 2

attaataagc tttagaggg ccaggccatt ctcttccttg gtgtgactcc tgatcca
57

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 3

attaattgcg cagccatccc ggactatata gaccatcgcc ctgccct
47

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 4

attaatcagc tgctccggat agagatagtc ggtagactgc tcctttt
46

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 5

attaatcagc tcaaaatgac tgttgtga
28

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 6

attaatgtcg actaaggagg tgatctaag ttaaaatttc agtgtggcca a

51

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 7

attaatgcta gcctcgagcc accatgagag ecctgct

37

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 8

attaatgcta gcctcgagtc acttggtgtg actgcggatc ca

42

<210> 9

<211> 44

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 9

ggtggtgaat tctccccaa taatgccttt ggagtcgctc acga

44

<210> 10

<211> 111

<212> DNA

<213> Kvasinky Pichia Pastoria

<400> 10

atgttctctc caattttgctc ctgggaaatt attttagct tggctacttt gcaatctgctc

60

ttcgctcagc cagttatctg cactaccgtt ggttccgctg ccgagggatc c

111

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 11

gaaacttcca aaagtcgcca ta

22

<210> 12

<211> 92

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 12

attaatgaat tcctcgagcg gtccgggatc cctcggcagc ggaaccaacg gtagtgcaga

60

taactggctg agcgaagaca gattgcaaag ta

92

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 13

attaatggat ccttggacaa gaggattatt gggggagaat tcacca

46

<210> 14

<211> 47

<212> DNA

<213> Syntetická

<400> 14

attaatctcg agcgggtcgt cacttggtgt gactgcgaat ccagggt

47

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob identifikácie ligandu pre cieľovú biomolekulu, vyznačujúci sa tým, že zahrnuje
 - a) získanie kryštálu cieľovej biomolekuly;
 - b) exponovanie kryštálu cieľovej biomolekuly jednou alebo viacerými testovacími vzorkami;
 - c) získanie röntgenového difrakčného záznamu kryštálu, aby sa zistilo, či sa vytvoril komplex ligand/receptor.
2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že ďalej zahrnuje kroky získania röntgenového záznamu kryštálu cieľovej biomolekuly pred expozíciou testovacími vzorkami a porovnania röntgenových difrakčných záznamov cieľovej molekuly pred a po expozícii.
3. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že ďalej zahrnuje krok transformácie difrakčného záznamu na mapu elektrónovej hustoty.
4. Spôsob podľa nároku 3, vyznačujúci sa tým, že ďalej zahrnuje krok konverzie mapy elektrónovej hustoty na štruktúru.
5. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že cieľová biomolekula je exponovaná testovacou vzorkou nasiaknutím kryštálu cieľovej biomolekuly v roztoku, ktorý obsahuje testovaciu vzorku.

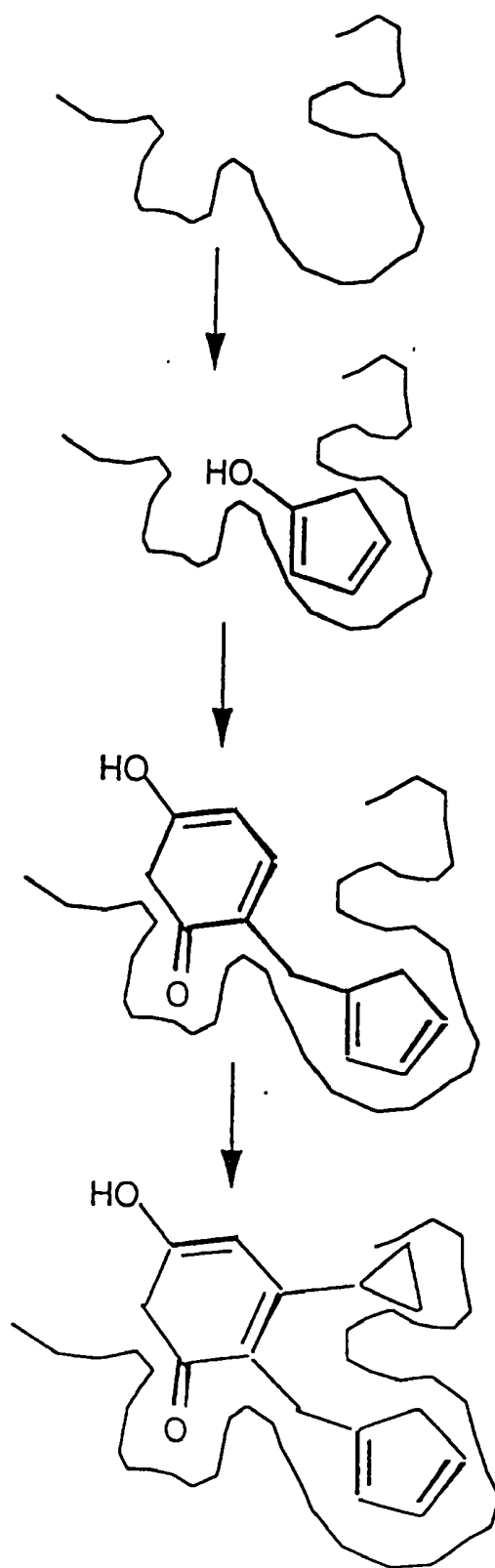
6. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že cieľová biomolekula je exponovaná testovacou vzorkou nasiaknutím kryštálu cieľovej biomolekuly v roztoku, obsahujúcom zmes testovacích vzoriek.
7. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že cieľová biomolekula je exponovaná testovacou vzorkou spoločnou kryštalizáciou kryštálu cieľovej biomolekuly s testovacou vzorkou.
8. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že cieľová biomolekula je exponovaná testovacími vzorkami spoločnou kryštalizáciou kryštálu cieľovej biomolekuly so zmesou testovacích vzoriek.
9. Spôsob podľa nároku 6, vyznačujúci sa tým, že testovacie vzorky v zmesi sú rozdielne tvarované.
10. Spôsob podľa nároku 8, vyznačujúci sa tým, že testovacie vzorky v zmesi sú rozdielne tvarované.
11. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že ligandom je biologicky aktívny útvar.
12. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že cieľom je polypeptid.
13. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že cieľom je rekonštruovaný polypeptid.

14. Biologicky aktívny útvar identifikovaný spôsobom podľa nároku 11.
15. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že ligandom je vodiaca zlúčenina.
16. Spôsob navrhovania ligandu pre cieľovú biomolekulu, vyznačujúci sa tým, že zahrnuje
 - a) získanie kryštálu cieľovej biomolekuly;
 - b) identifikovanie najmenej dvoch ligandov kryštálu cieľovej biomolekuly röntgenovým kryštalografickým skríningom;
 - c) určenie priestorovej orientácie ligandov, keď sú viazané na cieľovú biomolekulu; a
 - d) spojenie ligandov navzájom podľa priestorovej orientácie, aby sa vytvoril ligand.
17. Spôsob podľa nároku 16, vyznačujúci sa tým, že priestorová orientácia viazaných ligandov je určená vytvorením komplexu multi-ligand/cieľová molekula a vytvorením röntgenovej kryštálovej štruktúry komplexu multi-ligand/cieľová molekula.
18. Spôsob podľa nároku 16, vyznačujúci sa tým, že jeden ligand je na cieľovú molekulu viazaný pred tým, než sa na cieľovú molekulu viaže iný ligand

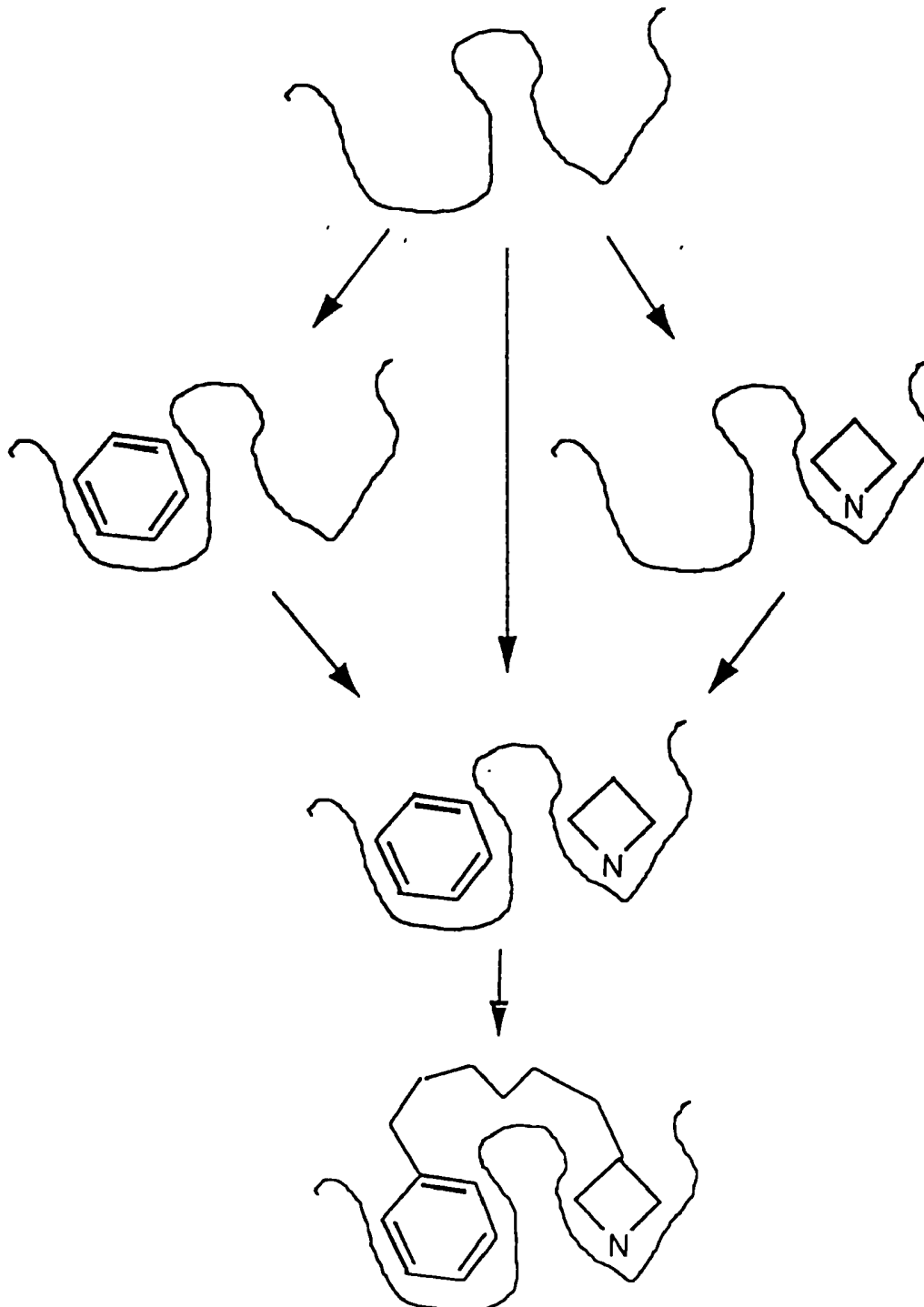
19. Spôsob podľa nároku 16, vyznačujúci sa tým, že ligandom je biologicky aktívny útvar.
20. Spôsob podľa nároku 16, vyznačujúci sa tým, že cieľom je polypeptid.
21. Spôsob podľa nároku 16, vyznačujúci sa tým, že cieľom je rekonštruovaný polypeptid.
22. Biologicky aktívny útvar navrhnutý spôsobom podľa nároku 19.
23. Spôsob podľa nároku 16, vyznačujúci sa tým, že ligandom je vodiaca zlúčenina.
24. Spôsob navrhovania ligandu pre cieľovú biomolekulu, vyznačujúci sa tým, že zahrnuje
 - a) získanie kryštálu cieľovej biomolekuly;
 - b) identifikovanie ligandu kryštálu cieľovej biomolekuly röntgenovým kryštalografickým skríningom;
 - c) vytvorenie derivátov ligandu.
25. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že ligandov je vodiaca zlúčenina.

26. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že ligandom je biologicky aktívna zlúčenina.
27. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že cieľom je polypeptid.
28. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že cieľom je rekonštruovaný polypeptid.
29. Vodiaca zlúčenina identifikovaná spôsobom podľa nároku 25.
30. Biologicky aktívna zlúčenina navrhnutá spôsobom podľa nároku 25.
31. Biologicky aktívna zlúčenina navrhnutá spôsobom podľa nároku 26.
32. Spôsob tvorenia kryštálu z biomolekuly, ktorý má ľahko prístupné aktívne centrum, vyznačujúci sa tým, že zahrnuje
 - a) spoločnú kryštalizáciu biomolekuly s odbúrateľným ligandom;
 - b) odbúranie ligandu hneď ako sa vytvorí kryštál.
33. Spôsob podľa nároku 32, vyznačujúci sa tým, že aktívne miesto biomolekuly odbúra ligand.

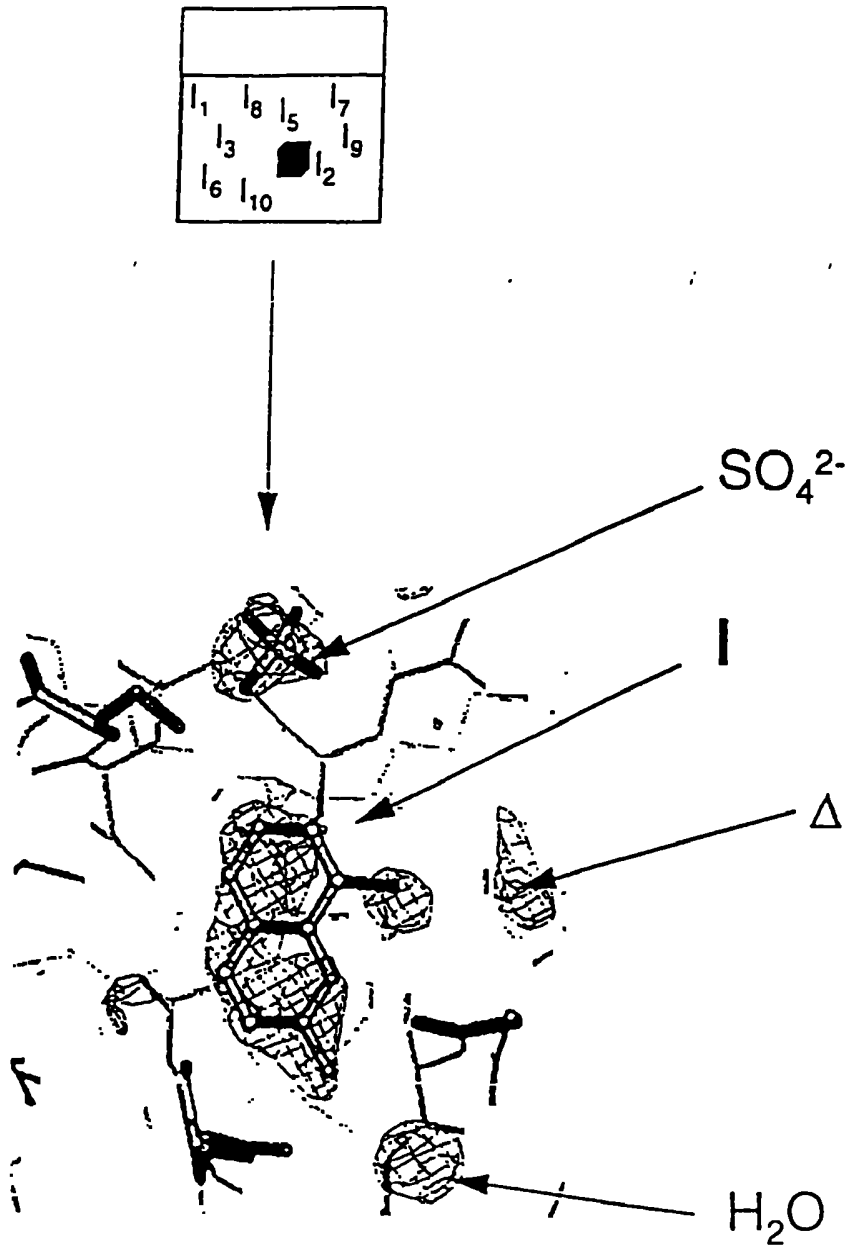
34. Spôsob podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že ďalej zahrnuje pridanie degradačných činidiel na odbúranie ligandu.
35. Spôsob podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že ligand sa odbúrava samovoľne.



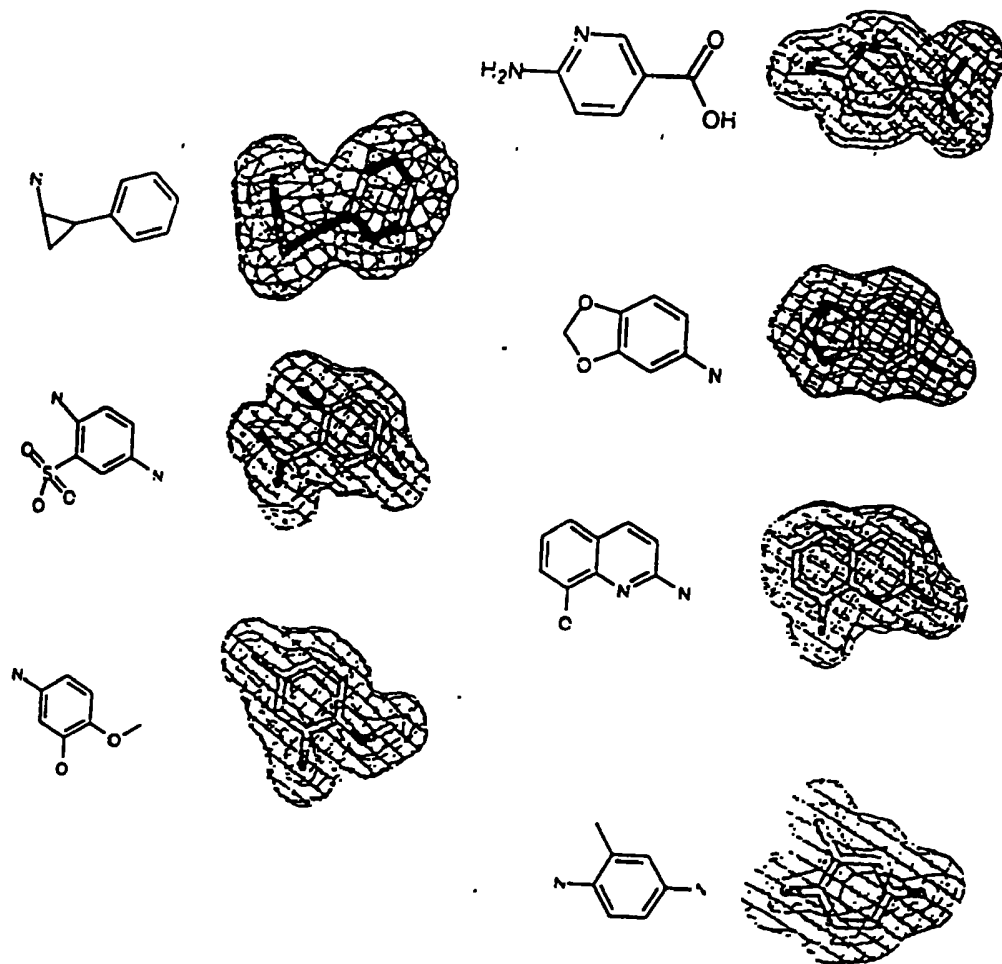
Obr. 1



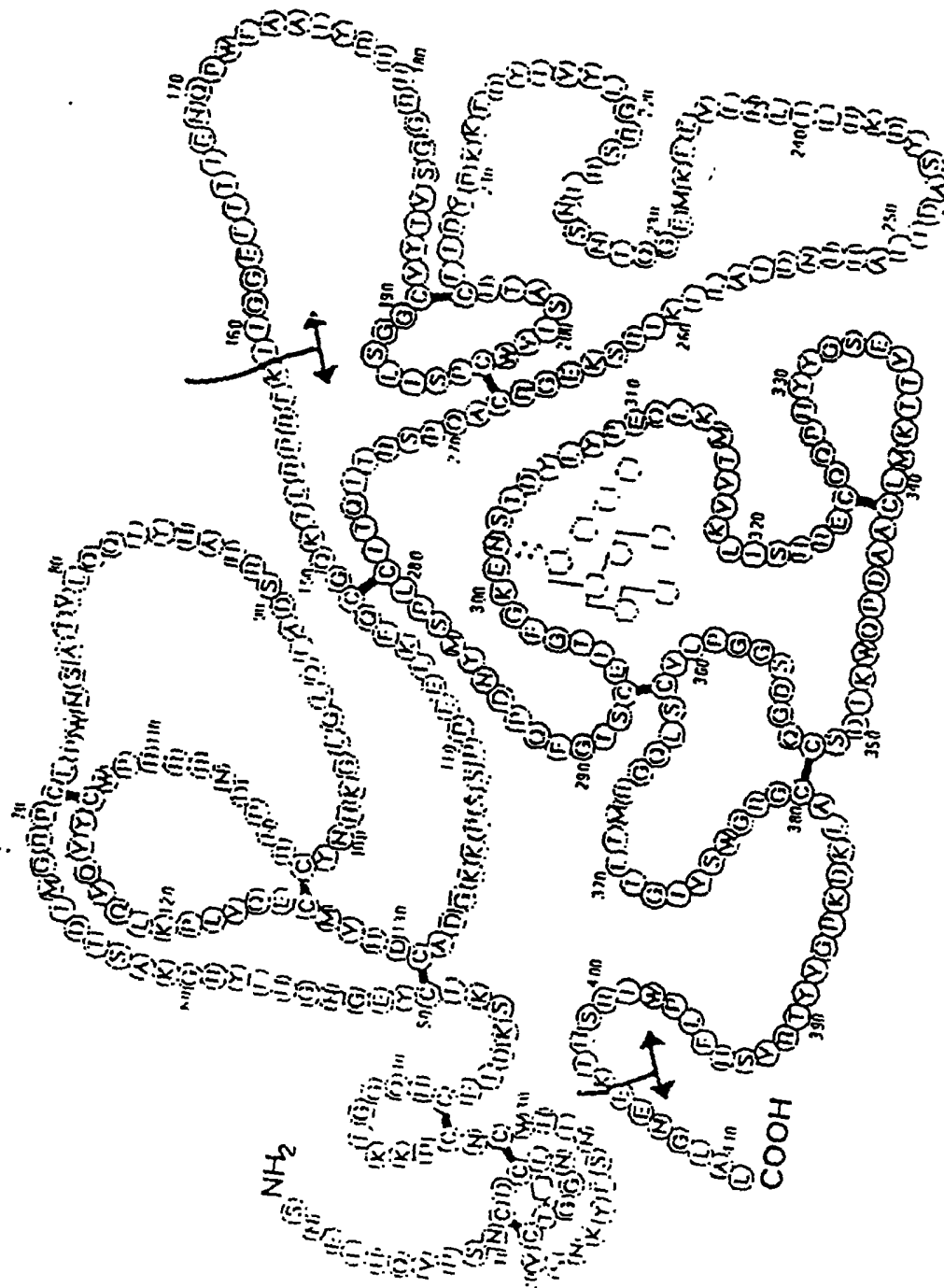
Obr. 2



Obr. 3

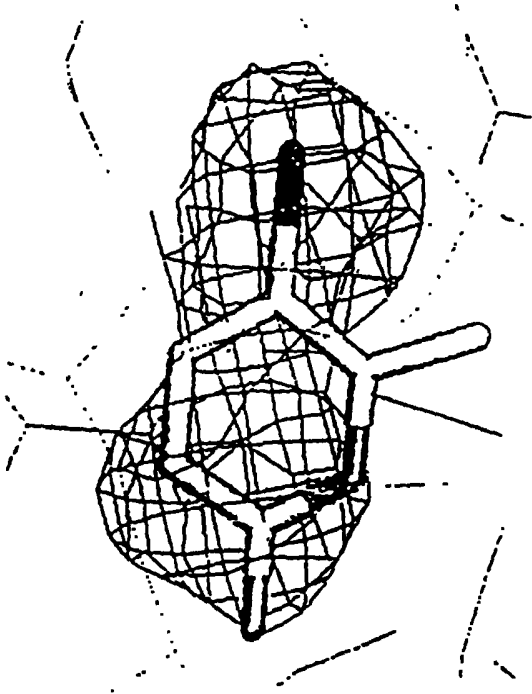


Obr. 4

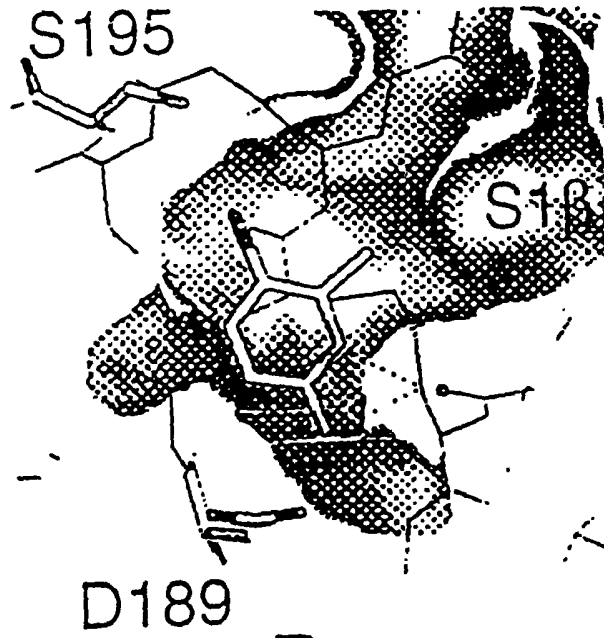


Obr. 5

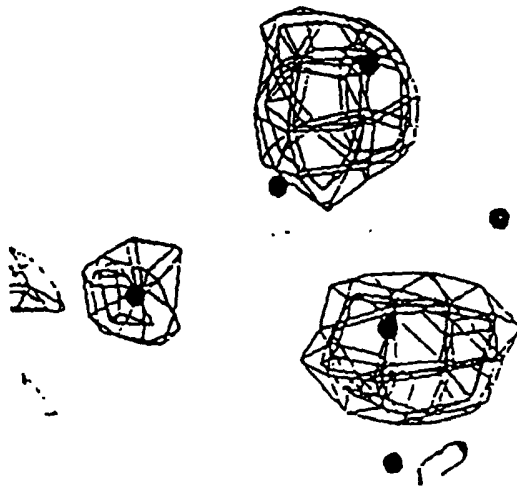
6/14



A.



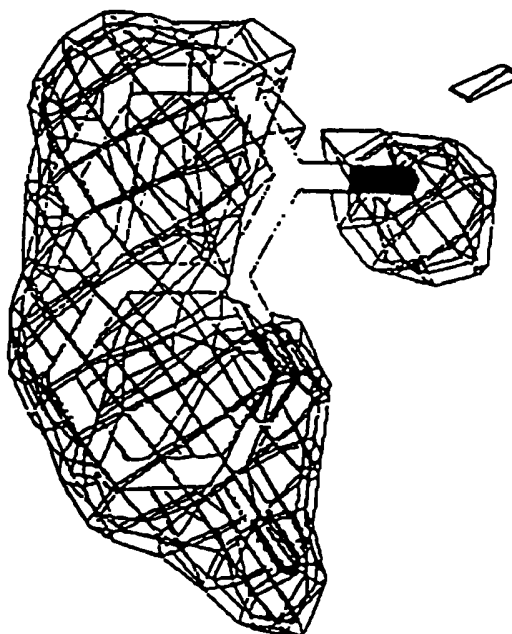
B.



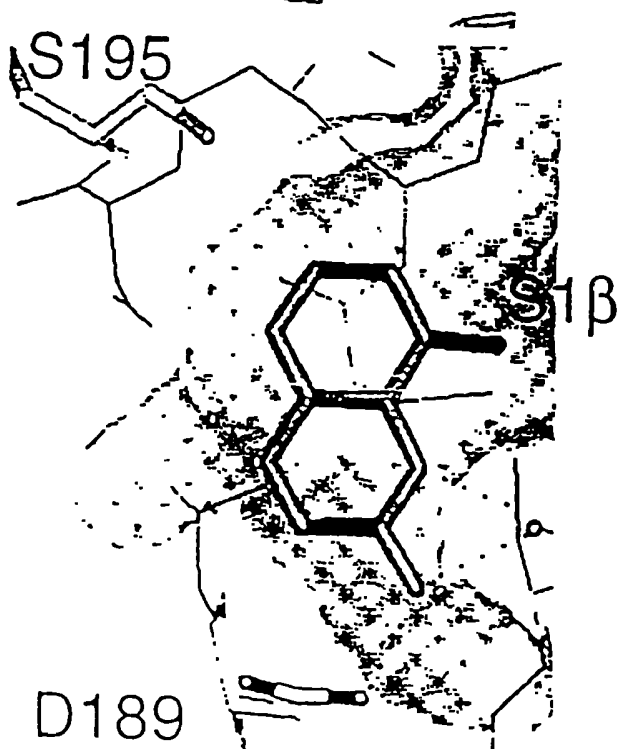
C.

Obr. 6

A.

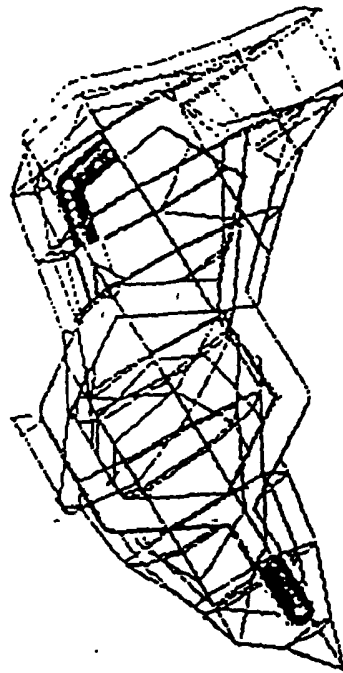


B.

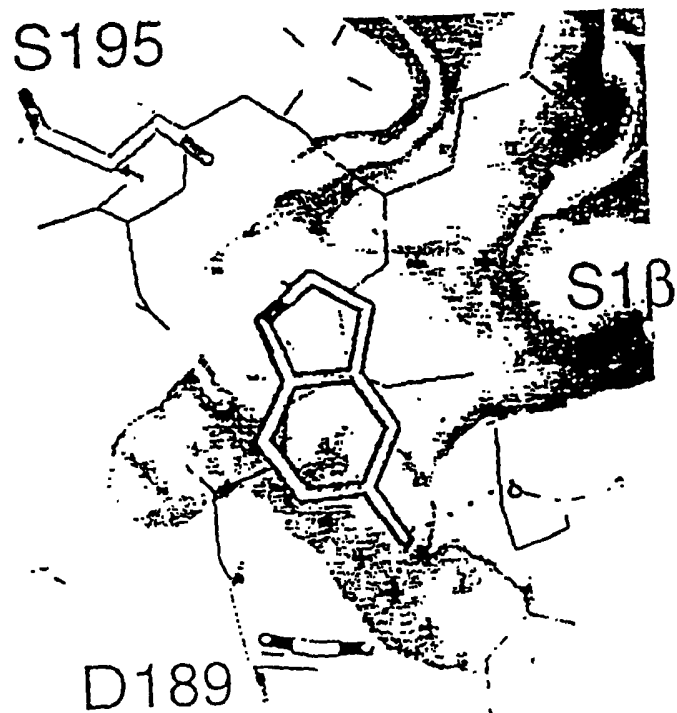


Obr. 7

A.

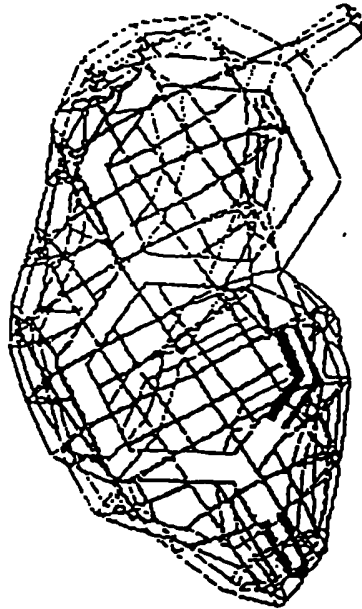


B.

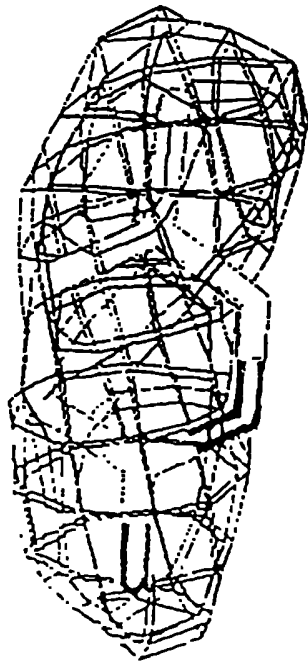


Obr. 8

A.



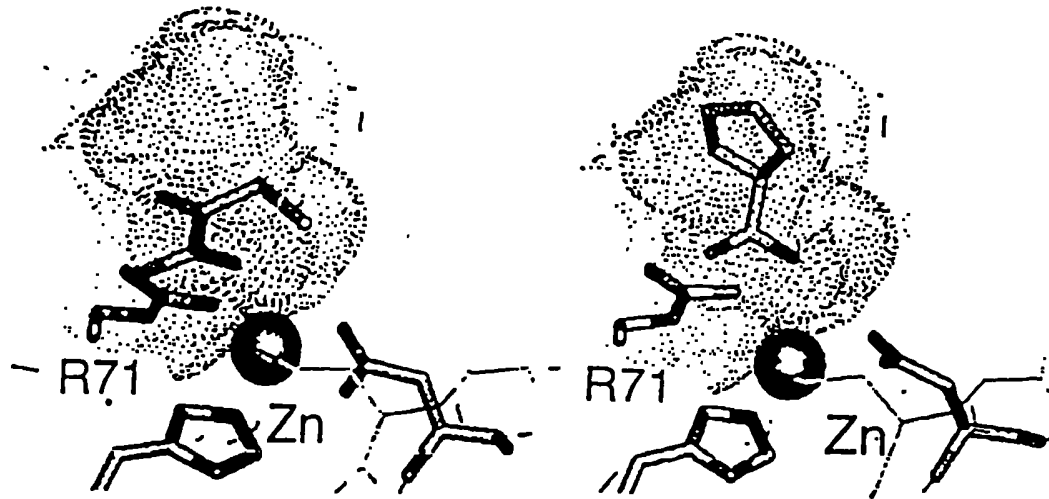
B.



Obr. 9

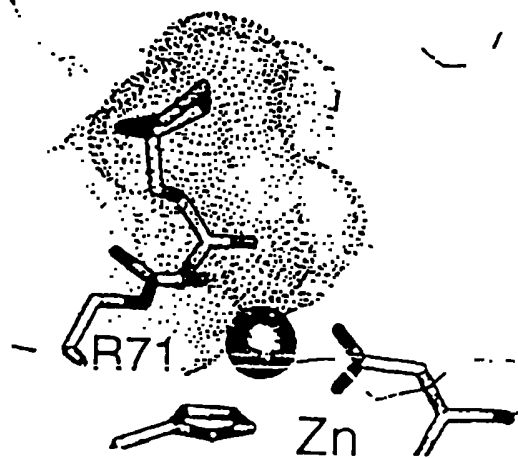


Obr. 10



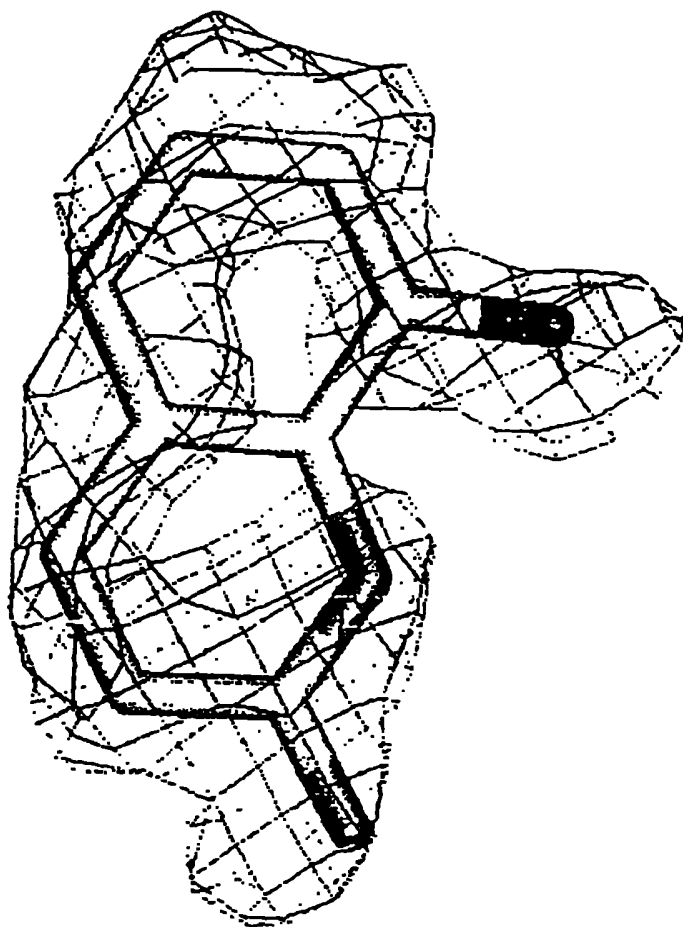
A.

B.

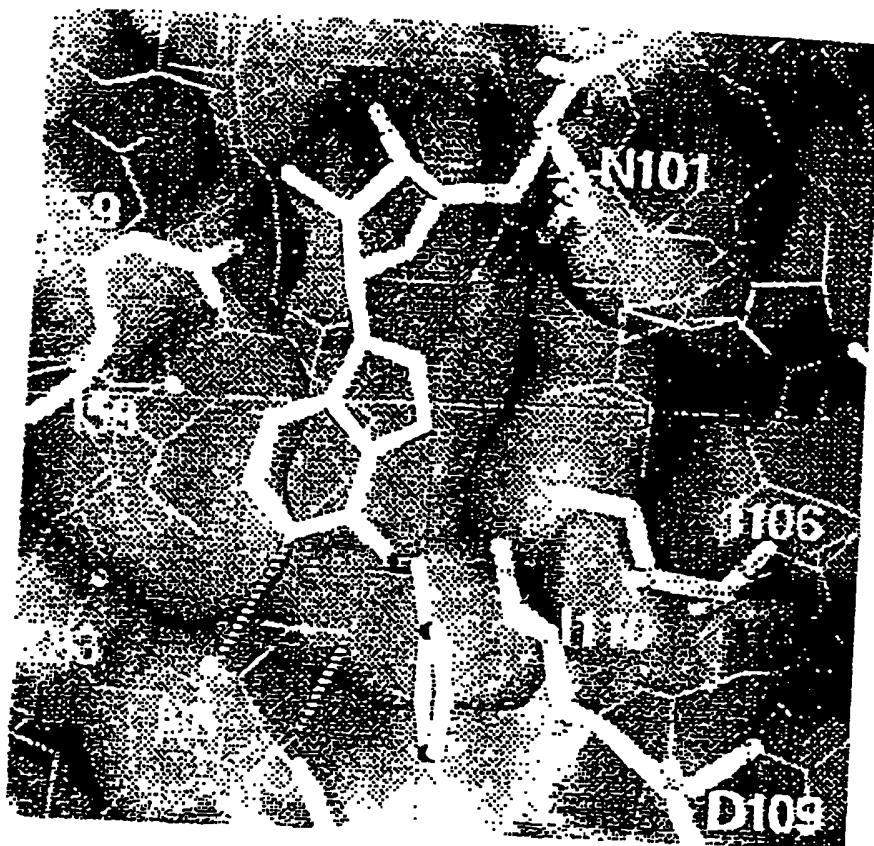


C.

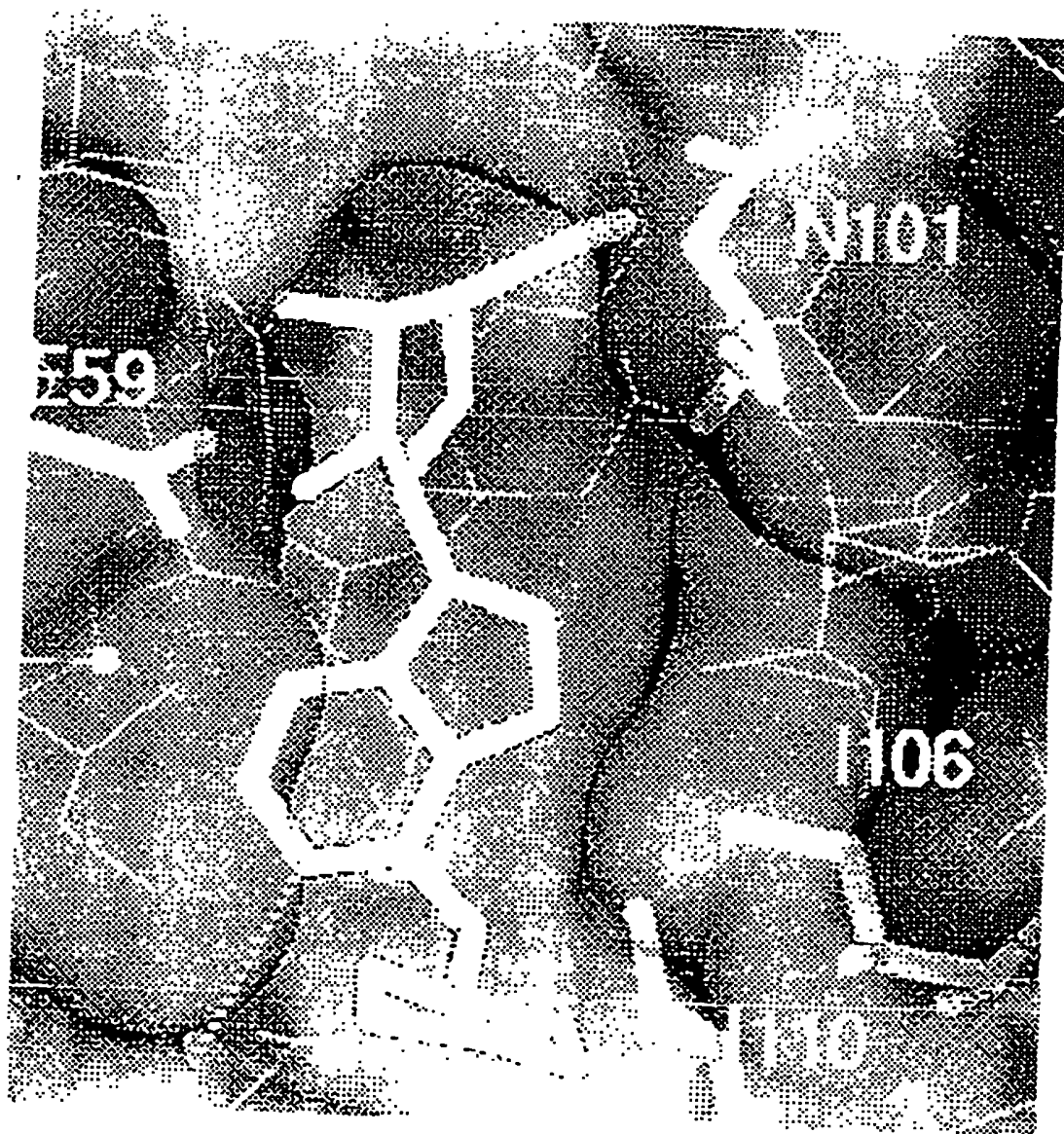
Obr. 11



Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14