

**A számítógépes dokkolás alkalmazása és fejlesztése:
a citokróm inhibitoroktól a virális ioncsatorna gátlókig**

Doktori (PhD) értekezés



Dr. Zsidó Balázs Zoltán

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Neurofarmakológia Program**

Doktori iskola vezető: **Prof. Dr. Pintér Erika**

Programvezető: **Prof. Dr. Pintér Erika**

Témavezető: **Dr. Hetényi Csaba**

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Farmakoinformatikai

Tanszék

OGYDHT

Pécs, 2022.

1. Az értekezés alapjául szolgáló folyóiratcikkek:

1. **Balázs Zoltán Zsidó**, Mária Balog, Nikolett Erős, Miklós Poór, Violetta Mohos, Eszter Fliszár-Nyúl, Csaba Hetényi, Masaki Nagane, Kálmán Hideg, Tamás Kálai, Balázs Bognár, Synthesis of spin-labelled bergamottin: a potent CYP3A4 inhibitor with antiproliferative activity. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 508. [IF: 5,923; Q1]
2. **Balázs Zoltán Zsidó**, Rita Börzsei, Viktor Szél, Csaba Hetényi. Determination of Ligand Binding Modes in Hydrated Viral Ion Channels to Foster Drug Design and Repositioning. *J. Chem. Inf. Model.* 61 (2021) 4011-4022 [IF: 4,956; Q1]

A dolgozat alapjául szolgáló folyóiratcikkek összesített impakt faktora: 10,879

Kumulatív impakt faktor: 43,749

Független hivatkozások (mtmt.hu): 17

2. Egyéb folyóiratcikkek:

3. **Zsidó, B.Z.**; Hetényi, C. The role of water in ligand binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2021, 67, 1–8. IF: 6,809, Q1
4. **Zsidó, B.Z.**; Hetényi, C. Molecular structure, binding affinity, and biological activity in the epigenome. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1–40. IF: 5,923, Q1
5. **Zsidó B.Z.**; Börzsei R.; Pintér E.; Hetényi C. Prerequisite Binding Modes Determine the Dynamics of Action of Covalent Agonists of Ion Channel TRPA1. *Pharmaceuticals*, 2021, 14, 988-1000. IF: 5,863, Q1
6. Mohos, V.; Fliszár-Nyúl, E.; Lemli, B.; **Zsidó, B.Z.**; Hetényi, C.; Mladěnka, P.; Horký, P.; Pour, M.; Poór, M. Testing the pharmacokinetic interactions of 24 colonic flavonoid metabolites with human serum albumin and cytochrome P450 enzymes. *Biomolecules* 2020, 10. IF: 4,879, Q1
7. Mohos, V.; Fliszár-Nyúl, E.; Ungvári, O.; Bakos, É.; Kuffa, K.; Bencsik, T.; **Zsidó, B.Z.**; Hetényi, C.; Telbisz, Á.; Özvegy-Laczka, C.; et al. Effects of chrysin and its major conjugated metabolites chrysin-7-sulfate and chrysin-7-glucuronide on cytochrome P450 enzymes and on OATP, P-gp, BCRP, and MRP2 transporters. *Drug Metab. Dispos.* 2020, 48, 1064–1073. IF: 3,231, D1

8. Fliszár-Nyúl, E.; Faisal, Z.; Mohos, V.; Derdák, D.; Lemli, B.; Kalai, T.; Sár, C.; **Zsidó, B.Z.**; Hetényi, C. ; Horváth, Á.; Helyes, Zs.; Deme, R.; Bogdán, D.; Czompa, A.; Matyus, P., Poór, M. Interaction of SZV 1287, a novel oxime analgesic drug candidate, and its metabolites with serum albumin. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, 333: 115945. **IF: 6,165, Q1**
9. **Zsidó B.Z.**; Hetényi C. A D-aminosavak élettani szerepéről: Előfordulásuk gyógyszerhatóanyagokban és étrendkiegészítőkből. *Gyógyszerészet*, **2021**, 5: 293.

3. Egyéb prezentációk:

1. Zsidó, Balázs Zoltán ;_Börzsei, Rita ; Hetényi, Csaba
Calculation of complex structures of protein targets using a fragment blind docking approach (2019) – **előadás** From Protein Complexes to Cell-Cell Communication, Esztergom, Magyarország 2019.10.27. - 2019.10.29.
2. Zsidó, Balázs Zoltán ; Hetényi, Csaba
A TRPA1 receptor ligandumokkal alkotott komplexeinek számítógépes vizsgálata – **előadás** Bioinformatika 2020 - Magyar Bioinformatikai Társaság Konferenciája
3. Zsidó, Balázs Zoltán ; Hetényi, Csaba
Investigation of the receptor-ligand complexes of TRPA1 receptor by computational approaches (2020) – **előadás** Online Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MedPECS) 2020
4. Zsidó, Balázs Zoltán ; Zsidó, András Norbert ; Botz, Lajos
„Real world” egészségügyi adatok felhasználása a gyógyszerterápia biztonságosságának vizsgálatára (2019) – **előadás** In: Kórházi Gyógyszerészek 2019. évi Szimpóziumán elhangzott előadások
5. Zsidó, Balázs Zoltán ; Zsidó, András Norbert ; Botz, Lajos
A valós-életbeli egészségügyi adatok hozzájárulása a nem kívánt gyógyszerhatások értelmezéséhez In: Magyar Kísérleti és Klinikai Farmakológiai Társaság III. Gyógyszer Innovációs Kongresszusán bemutatott poszterek kivonata (2019) p. 30758670 Paper: 30758670
6. Zsidó, Balázs Zoltán; Vida, Róbert György ; Botz, Lajos
Gyógyszerezéssel összefüggő problémák elemzése adattudományi metodikával In: Bódog, Ferenc; Csiszár, Beáta; Pónusz, Róbert (szerk.) Medical Conference

for PhD Students and Experts of Clinical Sciences : Book of Abstracts Pécs,
Magyarország : Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat (2018)
Paper: 30333870

7. Zsidó, Balázs Zoltán ; Botz, Lajos

Új módszer a nemkívánatos gyógyszerterápiás események felderítésére egy
klinikai rendszerben In: Kórházi Gyógyszerészek 2018. évi Szimpóziumán
elhangzott előadások és bemutatott poszterek absztraktgyűjteménye (2018) p.
30373037 Paper: 30373037

8. Bayarsaikhan, Bayartsetseg ; Hetényi, Csaba ; Zsidó, Balázs Zoltán

Evaluation of current peptide docking tools on systems of pharmaceutical
relevance. In: Molnár, Dániel; Molnár, Dóra (szerk.) XXIV. Tavasz Szél
Konferencia 2021: Absztraktkötet Budapest, Magyarország : Doktoranduszok
Országos Szövetsége (DOSZ) (2021) 667 p. pp. 516-516.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés.....	6
II. Irodalmi áttekintés.....	7
II.1. CYP450 enzimcsalád helye és szerepe a gyógyszertervezésben.....	7
II.2. Vizek szerepe a ligandumok gyógyszercélpontokhoz való kötődésében.....	11
III. Célkitűzések.....	19
IV. Módszerek.....	20
IV.1. Kis molekulák kötődése a CYP enzim fehérjékhez.....	20
IV.1.1. Ligandum előkészítés.....	20
IV.1.2. Target előkészítés.....	20
IV.1.3. Dokkolás.....	20
IV.2. HydroDock.....	21
IV.2.1. Kiindulási szerkezetek.....	21
IV.2.2. 1. lépés.....	23
IV.2.3. 2. lépés.....	25
IV.2.4. 3. lépés.....	27
IV.2.5. 4. lépés.....	30
IV.2.6. 5. lépés.....	30
IV.2.7. Kiértékelési kritérium.....	32
IV.2.8. Energiaszámítás.....	33
V. Eredmények.....	35
V.1. Kis molekulák kötődése a CYP enzim fehérjékhez.....	35
V.2. HydroDock.....	38
VI. Tézispontok.....	50
VII. Összefoglalás.....	51
VIII. Irodalomjegyzék.....	53

Rövidítések jegyzéke

AA	Amantadin
BM	Bergamottin
Citokróm P450	CYP450
COVID-19	Koronavírus betegség
EC2	SARS-CoV-2 vírus E transzmembrán fehérjéje
GPCR	G-protein kapcsolt receptor
GROMACS	Groeningen Machine for Chemical Simulations
HIV-1	Humán immundeficiencia vírus 1
ITC	Izotermális titrációs kalorimetria
M2A	Influenza A vírus M2 transzmembrán fehérjéje
MD	Molekula dinamika
PM7	Parameterized method 7
RA	Rimantadin
RMSD	Az átlagos deviáció négyzetek gyöke
SA	Spiro-adamantyl-amin
SARS-CoV-2	Súlyos akut légúti szindróma koronavírus 2
SD	Standard deviáció
SL-bergamottin	Jelölt bergamottin
TIP3	Three-site transferrable intermolecular potential

I. Bevezetés

A dokkolás egy olyan számítógépes eljárás, amely során a ligandumot a célpontján található kötőzsebre helyezi a program és kötési affinitást számol közben. A receptor-ligandum komplex előállításánál a ligandum konformációs mintavételezése és a pozíciók energiaszámítása párhuzamosan történik. A módszerfejlesztési tanulmányok az említett folyamatok problémáinak azonosítására és megoldására törekcszenek. A számítógépes dokkolás ismert nehézségei közé tartoznak a következők: a kiindulási (kísérletes) szerkezetek hibái [1–6], a receptor és a ligandum flexibilitása és mérete [7–11], a vízmolekulák megfelelő figyelembevétel [12–18], valamint a kísérletes adatok korrekt felhasználása, mint például a parciális töltéseké [10]. Ezekkel a problémákkal foglalkozunk a disszertáció alapjául szolgáló közleményekben. Az I. közleményben a metabolikus enzimek ligandum kötését vizsgáltuk. A CYP enzimcsalád fehérjeiben megtalálható központi hem vas ionjának a parciális töltésére fektettünk külön hangsúlyt. A kísérletes szerkezetben a ketokonazol imidazol nitrogénje 2.7 Å távolságra helyezkedett el a hem gyűrű Fe^{3+} ionjától [19], ahhoz, hogy ezt a kötődést dokkolással reprodukálni tudjuk elengedhetetlen volt egy gáz fázisú kvantum mechanikai számításal előállított paraméter szett [20], amely figyelembe vette a katalitikus ciklus különböző töltési állapotait. Az értekezés alapjául szolgáló II. közleményben pedig az interfész vízmolekulák dokkolás során történő figyelembevételével foglalkozik. Ebben mind a kísérleti vízpozíciók kijavítása, mind az explicit parciális töltés asszignációja elengedhetetlennek bizonyult a kísérletes ligandum pozícióval való egyezéshez. Az influenza A és a SARS-CoV-2 vírusok transzmembrán ioncsatornáit segítségével vizsgáltuk a vízmolekulák gyógyszerkötődésben játszott energetikai valamint szerkezeti szerepét illetve a gyógyszer repozícióra való hatásukat. Érdekes módon virális ioncsatornák esetében a vízmolekulák legalább olyan fontosnak bizonyultak a gyógyszerek kötődésében, mint maguk a fehérje célpontok.

Mindkét tanulmányban elsődleges szempontként vettük figyelembe, hogy biológiailag fontos, különböző betegségek kialakulásában meghatározó szerepet játszó rendszereken hajtsuk végre és teszteljük a módszereinket, ezeket a következő fejezetekben mutatjuk be.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. CYP450 enzimcsalád helye és szerepe a gyógyszertervezésben

Az emberi citokróm P450 (CYP450) enzimcsaládot 57 gén kódolja. A családot alkotó enzimek fiziológiás szerepköre rendkívül változatos, a gyógyszerek [19,21–28] és egyéb idegen kémiai anyagok, az arachidonsav és az eikozanoidok metabolizmusában is részt vesznek. Továbbá a koleszterin metabolizmusában és az epe bioszintézisében is fontos szerepet játszanak, a szteroid és D₃ vitamin szintézisben és metabolizmusban szintén, ahogy a retinolsav hidroxilációjában is [23,28,29]. A CYP450 enzimcsalád nem csak a májban működő gyógyszer metabolizáló enzim, élettani szempontból fontos enzimátikus reakciókban vesz részt, ezért az enzim polimorfizmusa, indukciója vagy éppen gátlása klinikailag releváns állapotok kialakulását okozhatja [19,21,22,24–29]. Az enzimcsaládot 1961-ben nevezték el, a pigmentjének abszorpciós spektruma 450 nm hullámhosszon maximumot mutat redukálva és szén-monoxidhoz kötve. Eleinte úgy gondolták, hogy egyetlen enzimről van szó, de az évek előrehaladtával sorban fedezték fel az újabb és újabb fehérjéket és funkciókat, amelyeket ellátnak. A CYP450 fehérjéket családokba és alcsaládokba osztják, aminosav szekvencia hasonlóság alapján. 40% feletti hasonlóság esetén egy családba (arab szám), 55% esetén pedig egy alcsaládba tartoznak a fehérjék (betű) [29]. Fontos kiemelni, hogy ugyan a CYP450 enzimcsalád mediálta gyógyszer-gyógyszer interakciók valóban jelentősek, de egy enziminduktor vagy inhibitor gyógyszer endogén szubsztrátok oxidációját, peroxidációját és redukcióját is befolyásolhatja [29]. Az idegen kémiai anyagok, vagy más néven xenobiotikumok lebontásáért felelős enzimek az első négy CYP450 családba tartoznak, ezen fehérjéket kódoló gének különböző allél változatai révén kialakulhatnak lassan, normálisan és ultra gyorsan metabolizáló enzimek. Ezen változatok már önmagukban, interakció nélkül eltérő terápiás hatást eredményeznek [25,26,29]. Az első négy családon túlmenően, a többi CYP450 enzimcsalád kizárólag endogén szubsztrátok metabolizmusában vesz részt, így ezen enzimeket kódoló gének eltérő haplotípusai szerepet játszanak különböző megbetegedésekben, például a CYP5A1 és a CYP8A1 gének mutációjával összefüggésbe hozható a pulmonáris hipertenzió, koronária artéria megbetegedés és véralvadási zavarok [29–31].

A disszertáció alapját képező I. tanulmányban a CYP3A4 enzimet vizsgáltuk számítógépes kémiai módszerekkel, ez az enzim a CYP3A5 mellett az emberi májban és béltraktusban leggyakrabban előforduló CYP enzim, több, mint 120 gyakran felírt gyógyszer metabolizmusában vesznek részt [19,23,24,26,27,29]. Klinikai szempontból kiemelkedő szerepe van egyes gomba ellenes szerek CYP3A4 által végzett metabolizmusának [19,29,32], gyorsan metabolizáló betegekben a gyógyszer nem éri el a terápiás plazmakoncentrációt, míg lassan metabolizáló betegek esetében a toxikus tartományt is elérheti a plazmakoncentráció, ugyanakkor dózis beadását követően. Mindamelllett, hogy a gyógyszerkincsünk jelentős hányadának metabolizmusában részt vesz a CYP3A4 enzim, és több polimorf módosulata is ismert, továbbá szubsztrátok tekintetében jelentős promiskuitást mutat [19]. Az enzim aktív centruma extrém mértékben flexibilis, a ligandum kötés hatására több, mint 80%-kal megnő a térfogata, és egy gomba ellenes szerből, a ketokonazolból két molekula befogadására is képes, az egyiket kovalensen kötve [19]. Releváns kísérleti adatok nélkül a célpont fehérje fokozott flexibilitásának a kezelése pusztán számítógépes módszerekkel nagy kihívást jelentene. Mindazonáltal a CYP3A4-ligandum kölcsönhatás molekuláris alapjai kulcsfontosságú információt jelenthetnek gyógyszertervezési eljárások során, az AstraZeneca kutatói szerint [19].

A fentiek tükrében kissé meglepő új trend a CYP enzim inhibitorok „racionális” tervezése [33–36]. Ezeket a vegyületeket úgynevezett „booster”-ként alkalmazzák, együttesen adminisztrált vegyületek plazma koncentrációjának növelésére. Az együttesen alkalmazott, kívánatos hatással rendelkező szer metabolizmusán kívül azonban számos endogén szubsztrát metabolizmusát is gátolják ezek az inhibitorok, így felhasználásuk inkább kerülendő [37]. Erre egy példa, a szintén AstraZeneca által végzett gyógyszertervezési projekt [38], amelyben egy piruvát dehidrogenáz kináz inhibitor vegyületet terveztek a kettes típusú diabetes mellitus orális kezelésére. A vezérvegyület tervezési fázisában a projektnek a CYP enzim gátlást, mint súlyos problémát azonosították a kutatók. Alapos szerkezeti vizsgálat után arra a következtetésre jutottak, hogy a vezérvegyületeik esetében nem lehetséges a CYP enzim gátlás csökkentése, az eredeti targethez való affinitás megőrzése mellett, és így ezt a vezérvegyület sorozatot elvetették, még a jóval költségesebb és időigényesebb fázis előtt, amelyben már csak a vezérvegyületek finomhangolása történik [37,38].

I. tanulmányunkban egy új *in vitro* antiproliferatív hatással rendelkező bergamottin származék, az SL-bergamottin CYP3A4 kötődését vizsgáltuk. A bergamottin egy a természetben előforduló furanokumarin vázas vegyület. Először a bergamot narancs

(*Citrus bergamia*) olajából mutatták ki. Együttesen a 6',7'-dihidroxibergamottinnal felelősek a jól ismert grapefruit lé interakció kialakulásáért együttesen alkalmazott gyógyszerekkel. A grapefruit lé több, klinikailag használatos gyógyszervegyület orális biohasznosulását nagy mértékben megemelte, ezekre példa: a dihidropiridinek, etilén-ösztadiol, midazolam, ciklosporin A és a lovasztatin. Ez a hatás elsősorban a CYP3A4 enzim aktivitásának gátlásával magyarázható. A bergamottin CYP3A4 enzim gátló hatását több ízben leírták. Egy tanulmányban furanokomarin vázas vegyületek CYP3A4 gátló szerkezet-hatás összefüggéseit vizsgálták. Úgy találták, hogy a furán gyűrű és az alkiloxi csoport szükségesek voltak a gátláshoz, valamint a 6', 7' pozícióban az alkenil csoportok hidrofil csoportra történő cseréje szintén növelte az enzimgátlás erősségét. Ezek alapján könnyű belátni, hogy a bergamottin kisebb mértékben képes gátolni a CYP3A4 enzimet, mint a 6',7'-dihidroxibergamottin, de számos egyéb CYP enzimet is gátol, mint például a CYP1A és 2B alcsalád enzimeit, és számos CYP2 családba tartozó enzimet is, például a CYP2D6-ot. A szekció elején említettek szerint az első négy (CYP1-4) család felelős a xenobiotikumok metabolizmusáért, a bergamottin ezen családokba tartozó enzimek egy jelentős részét gátolja. A metabolikus útvonalakon kívül azonban a bergamottin részt vesz számos daganatos betegségekhez köthető jelátviteli útvonal szabályozásában, aminek köszönhetően rendelkezik antiproliferatív hatással is. A signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) aktivációjának gátlása révén mellldaganatos és myelomás sejtvonalak proliferációját gátolta. A fibroszarkómás és tüdő daganatos sejtvonalakban a migrációt és inváziót gátolta. Szimvasztatinnal kombinálva pedig a myeloid leukémiás sejtek több sejtélettani folyamatát gátolta. A bergamottin pozitív hatásai lehetővé teszik, hogy természetes eredetű vezérvegyületként felhasználjuk a gyógyszertervezés során. Egy lehetséges módosítás a szabad gyököt tartalmazó nitroxid gyűrű beépítése a bergamottin hosszú alifás szénláncának végére, ahová a 6',7'-dihidroxibergamottin esetében a hidroxil csoportok kerülnének egyébként, előállítva az SL-bergamottint. A szabad gyököt tartalmazó nitroxid gyűrű párosítatlan elektronjai lehetővé teszik, hogy oxidációs és redukciós folyamatokban vegyen részt a vegyület, amelynek köszönhetően a nitroxid-tartalmú vegyületek potens antioxidáns hatással bírnak. Citotoxikus vegyületek, iszkémia-reperfúzió vagy gyulladás által okozott oxidatív stressz ellen a nitroxid csoportot tartalmazó vegyületek citoprotektív hatással bírnak. A piperidin-típusú nitroxid vegyületek pedig ezzel szemben, citotoxikus és oxidatív hatást fejtenek ki, viszont szelektíven daganatos sejteken. Összegezve, a természetes antioxidáns vegyületek nitroxid csoporttal való kiegészítése, jobb antioxidáns,

antiproliferatív, gyulladásgátló és citoprotektív vegyületeket alkot, az anyavegyületeknél. Azonban ezek – számítógépes módszerekkel történő – szűrése a CYP3A4 gátló hatásra a gyógyszertervezési folyamat fontos lépését képi.

II.2. Vizek szerepe a ligandumok gyógyszercélpontokhoz való kötődésében

A gyógyszerek célpontjaikhoz való kötődési mechanizmusának és pozíciójának precíz meghatározása illetve megismerése minden gyógyszertervezési folyamat kulcsfontosságú lépése. A vízmolekulák fontos szerepet játszanak a gyógyszerek kötődésében, így nem lenne szabad őket figyelmen kívül hagyni a gyógyszertervezési projektekben. A szerkezeti vizeket négy csoportba sorolhatjuk: i) az oldat vizei, ii) a fehérje belsejében lévő szerkezeti „eltemetett” vizek, iii) a komplex interfész régiójának hidaló vizei és iv) felszíni vizek [39]. A vizek kísérletes meghatározásához atomi felbontású módszerek szükségesek, amelyek korlátjai azonban megnehezítik a vizek szerepének pontos feltárását a biológiai komplexekben [17]. A kísérletes szerkezetek elsődleges forrása a röntgen krisztallográfia [40,41], a módszer folyamatos fejlesztés alatt áll az utóbbi években is, kombinálják neutron krisztallográfiával és kvantum kémiai finomításokkal is [42–44]. Mindezek ellenére, a pontos vízszerkezet meghatározás továbbra is a módszer Achilles sarka [17,18]. Az asszignált vízpozíciók pontossága és minősége sem magától értetődő, 2,3 millió kísérleti vízmolekula pozíciójának analízise során kiderült, hogy egy rendszer magas felbontása nem garantálja a vízszerkezetének pontosságát [45]. Ezen kísérletes nehézségek motiválták a számítógépes módszerek fejlesztését olyan víz pozíciók prediktálására, amelyek befolyásolják a gyógyszerek célpontjaikhoz való kötődését. Kétféle számítógépes módszert fejlesztettek ki, statikus és dinamikus. A statikus módszerek előzetes ismereteken alapulhatnak, és egy rács térképet használnak fel, vagy geometriai szabályokon alapulva építik fel a hidrát burkot. A dinamikus módszerek MD szimulációkon alapulnak, azok framjeinek explicit vízmolekuláit klaszterezik. Az interfész vizek meghatározása szerencsére a többihez viszonyítva a legegyszerűbb, hiszen az interfész vizek erős kötésekben vesznek részt, a target és a ligandum között eltemetve viszonylag kicsi a mozgási terük. Például a WaterMap [46], amely egy kereskedelmi forgalomban lévő módszer, 41 vízpozíción tesztelve bromodomáinok és aromás ligandumok interfész vizeinek 90%-át helyesen prediktálta 1,5 Å-n belül [47]. A nyílt forráskodú MobyWat [17,18] hasonló teljesítményt mutatott 344 interfész vízpozíción tesztelve változó méretű peptid és fehérje ligandumok esetében. A statikus módszerek is képesek lehetnek elérni a dinamikusok sikeres prediktálási arányait, a WarPP nevű program [48,49] 1500 fehérje-ligandum komplex csaknem 20 000 kísérletes vízpozícióját találta meg az előző dinamikus

módszerekhez mérhető sikerrel. Ezekon kívül egyéb statikus módszerek a Splash'em [50] és a HydraMap [51]. A felszíni vízpozíciók meghatározása nehezebb feladat. Az egyedi atomok elektron sűrűsége (EDIA) egy index, amelyet felhasználva egy kutatócsoport bemutatta, hogy a rosszul elhelyezett krisztallográfiás vízpozíciók 90%-a felszíni vizeket érint [45]. Mindazonáltal, a konzervált, alacsony β -faktorú felszíni vizek meghatározása könnyebb feladat. Ezek a vizek a ligandum kötődése során a targethez kötve maradnak [18,52], és egy MD tanulmány [53] szerint a target és a ligandum közötti hidaló vizek 77%-át alkotják. Ha a számítógépes predikciós módszerek nem csak a hidaló, de az egyéb, magasabb β -faktorú felszíni vizeket is prediktálják, akkor a sikeres predikció aránya 90%-ról 80%-ig visszaeshet [18]. A target belsejében „eltemetett” vízmolekulák rejtett kötőzsebekben találhatóak meg. A statikus 3D-RISM [54] és a dinamikus WAT-site [55] programok kombinációja azonban még ezeket a vizeket is képes sikeresen prediktálni [56]. A JAL nevű módszer, amely explicit oldószer MD-alapú számításán alapszik szintén képes volt a p53 tumor szupresszor fehérje szerkezetében sikeresen megtalálni ilyen vizeket [57]. A fentiek alapján látszik, hogy a MD-alapú módszerek alkalmasak „eltemetett”, interfész és felszíni vizek prediktálására is, képesek számítani az oldott anyag-víz és víz-víz kölcsönhatásokat, és megengedik az oldószerrel való kooperatív víz cserét is [5,17,57]. Továbbá, pontos eredményeket adnak [58], megismételhető eredményekkel [59] és nyílt forráskodú MD programok is elérhetőek [60]. A dokkolás közbeni vízszerkezet előállítása a nagy teljesítményű virtuális szkrínelés pontosságát nagyban javíthatná [61,62]. Erre az elmúlt időben több kísérlet is történt [63,64], amelyek ígéretesek, viszont a módszer teljes automatizálása még várat magára. Ezzel szemben a végpontok összehasonlítására léteznek alkalmas programok, amelyek a kezdeti ligandum nélküli és a végső, komplex (akár hasonló ligandumokkal) szerkezet hidrátszerkezetét hasonlítják össze, ezek páronkénti összehasonlítása [65] segít a konzervált és távozó vizek azonosításában és ezáltal a target-ligandum kölcsönhatás optimalizálásában.

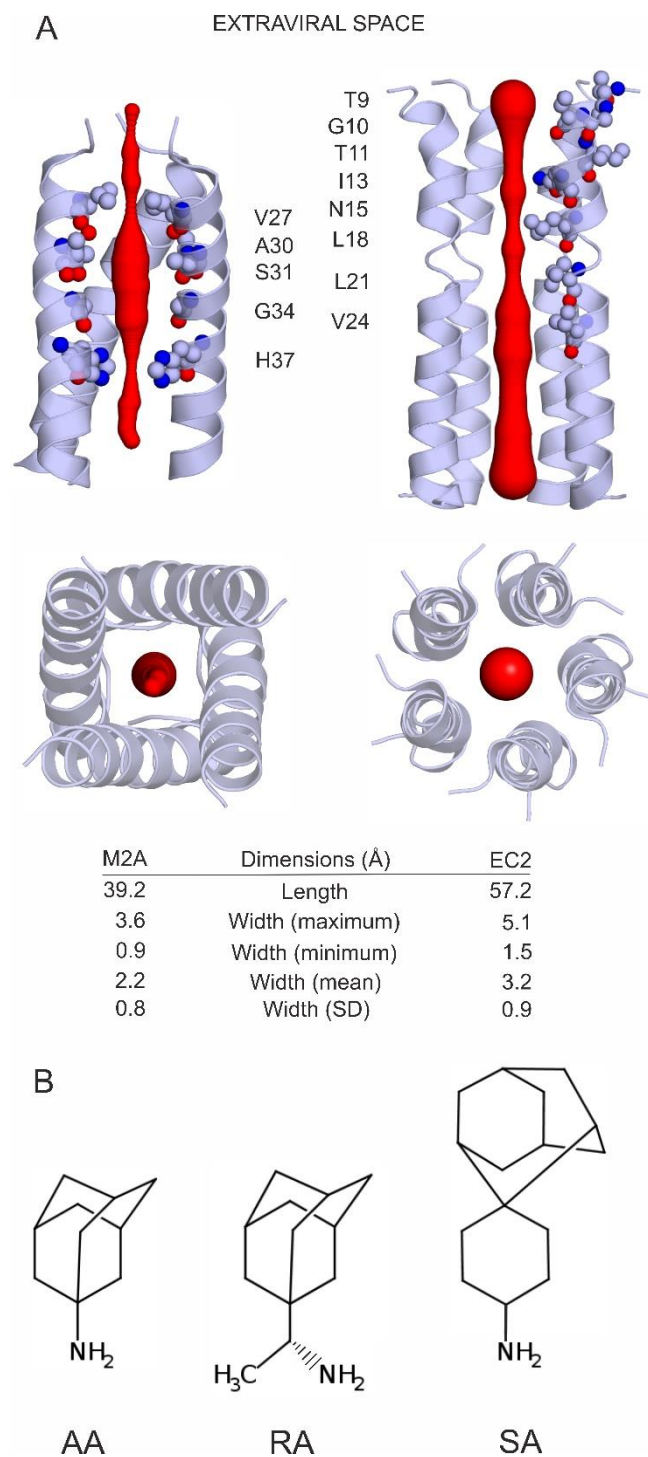
A target és ligandum közötti kötési affinitást a kötés során bekövetkező szabadenergia változás fejezi ki (ΔG_b). Ez az érték befolyásolható tervezetten, a ligandum olyan mértékű módosításával, amely már befolyásolja a komplex hidrát szerkezetet [15,18,70–75,52,58,62,65–69]. Például, H-kötések kialakítására képes funkciós csoportok ligandumhoz adásával stabilizálható a target-ligandum komplex. Ezek a funkciós csoportok vagy kölcsönhatásba lépnek a hidaló vízmolekulákkal, vagy kiszorítják azt, kedvezően hozzájárulva a kötési szabad entalpiához [70]. A kötési affinitást az entrópián

keresztül is lehet kedvezően befolyásolni, ha az új funkciós csoport a felszíni vizet az oldatba szorítja [73]. Az egyedi vízmolekulák hozzájárulása a ligandum kötődéséhez ezek alapján kulcsfontosságú a gyógyszertervezésben, azonban a kísérletes módszerek, mint például az izotermális titrációs kalorimetria (ITC), nem képesek a ΔG_b értékeket az egyedi vízmolekulák kontribúciójáig lebontani [45,67,76]. Explicit oldószer modelleket alkalmazó elméleti módszerek segíthetnek a probléma megoldásában. Például, az inhomogén folyadék szolváció elmélet (IFST) [75], alkalmazható egyéni kötőhelyek termodinamikai profiljának elkészítésére. Valamint MD szimulációkkal együtt a módszer alkalmas különböző ligandum módosítások víz kiszorító szerepének tanulmányozására [73]. Az említett tanulmányban azonban még nem sikerült jó korrelációt találni a ΔG_b értékekkel a vízkiszorítás hatására. Viszont egy másik tanulmányban [77] már sikeresen megtalálták a kiszorított vízmolekulák és a ΔG_b közti korrelációt. Ehhez a rács inhomogén szolvatációs elméletre (GIST, [78]) volt szükség. Azonban az irodalmi áttekintést követően ellentmondásokat fedeztünk fel az említett elméletek ΔG_b predikcióra való alkalmasságában [12,47,58,63,77,79–83]. Ezek tükrében a módszerek részletes, nagy teszt szettekben történő ellenőrzése és validálása még szükséges, jelenleg leginkább a gyógyszertervezésben fontos vízmolekulák kiválasztására tűnnek alkalmasnak [58]. Érdemes azonban megjegyezni, hogy az elméleti módszerek hibás bemeneti kísérletes szerkezetből csak hibás eredményeket tudnak számítani. Ha vízmolekulák nem megfelelően töltenek fel egy üreget a fehérjében, vagy éppen csapdába estek egy üregben nagy mértékben befolyásolja szabad energia perturbációs elméleti számításokat [74]. Ezzel szemben, prediktált explicit vízmolekulák kombinálva a COSMO [84] modellel és PM7 [85] szemi-empirikus paraméter szettel jó korrelációt eredményeztek kísérletes ΔH_b értékekkel [86].

A vízmolekulák egyéni hozzájárulásukon túlmenően, molekuláris hálózatba rendeződve is szerepet játszanak ligandumok kötődésében [39]. A hálózati, komplex adatok feldolgozását igénylő megközelítés is hozzájárulhat a gyógyszertervezéshez [87]. Kis ligandumok esetében még a manuális összehasonlítás is elegendő lehet, a ligandummentes és a ligandum-kötött target hidrátszerkezete között [65,88]. Nagyobb rendszerek esetében, mint például a fehérje-DNS kapcsolatok [41,89], már egy automatizált, gráfelméleten alapuló módszer szükséges a két állapot összehasonlítására [13,17]. Ez a megközelítés még épp kibontakozóban van, egy tanulmányban az aminosav interakciós hálózatot (RINspecter, [90]) használták a fehérje komplexek interfészeinek vizsgálatára. A vízmolekulák gráfhoz adása segítette a hálózatban résztvevő aminosavak felismerését.

Továbbá egy másik tanulmányban [17], statikus és dinamikus vízhálózatokat különböztettek meg egy gráf elméleten alapuló módszerrel. Míg a statikus vízhálózatoknak a komplex szerkezet stabilizálásában van szerepe [91–93], a dinamikus hálózatok a komplex destabilizálásában és különböző ligandumok kötődésében játszanak fontos szerepet [5,17,88,94]. Egy érdekes példa erre az emberi szervezeten belül megtalálható gyógyszercélpontok jelentős hányadát adó G-protein kapcsolt receptor (GPCR). A GPCR-ok kötőseibeiben kevés statikus vízmolekula található, a többi vízmolekula dinamikus hálózat részét képezi, amely hozzájárul a GPCR-ok által kötött ligandumok nagymértékű diverzitásához [94]. Egy MD-án alapuló tanulmány javasolta a vízmolekula klaszterek ligandummal történő befolyásolását, cseréjét az influenza A vírus M2 transzmembrán fehérjéje (M2A) esetében [95] a gyógyszertervezésben. Később egy másik kutatócsoport röntgen krisztallográfia és MD segítségével bemutatta [65], hogy adamantyl-amin típusú molekulák hogyan zavarják meg a vízszerkezetét az M2A csatornának, és ez által az ionvezetést, amely a vírus szaporodóképességének egy alapfeltétele. Mivel a különböző vírusok jelentős számban rendelkeznek transzmembrán ioncsatornával, így a gyógyszer repozicionálás számára jó kiindulási pontot jelenthet a fent említett tanulmány. A COVID-19 pandémia gyógyszer repozíciós tanulmányok sorozatát indította el [96–103]. A target célpontú gyógyszertervezés gyakran alkalmazott eljárás [104–108], amiben a nevéből adódóan a célpont szerkezete adja az alapot a ligandumok illesztésére és kiválasztására. A gyógyszer repozíció egy gyors gyógyszerfejlesztési stratégia, ilyenkor a gyógyszerek dinamikai, kinetikai, mellékhatás és toxicitási profilja már elérhető, ezekre nem kell sem időt, sem erőforrást fordítani, végeredményben ez egy gyors és olcsó módszert eredményez [109–111]. A SARS-CoV-2 vírus, és az általa okozott betegség, a COVID-19 ellen több gyógyszerjelöltnek is sikerült eljutnia a humán klinikai vizsgálatok fázisába [100,101,112,113]. Ezek közül volt olyan vizsgálat, amely sikeresen zárult, és a gyógyszerjelölt megkapta a sürgősségi használatra vonatkozó forgalombahozatali engedélyt több gyógyszerészeti hatóság által is, azonban igazi áttörést nem sikerült elérni a vírus gyógyszeres kezelésében. A repozíciós vizsgálatok általános sikertelenségét a régi és az új célpont közötti szerkezeti különbségek adhatják többek között. A HIV-1 vírus aktív enzim centruma eltér a SARS-CoV-2-étől, ami előre jelezte [114,115] a HIV-1 proteáz inhibitorok (lopinavir, ritonavir) repozíciós vizsgálatainak eredménytelenségét [98,101]. Egy tanulmány [116] elemezte 2010 és 2017 között a legnagyobb gyógyszerfejlesztő cégek adatait, és azt találta, hogy annak az esélye, hogy egy gyógyszerjelölt a humán klinikai vizsgálatok II. fázisából eléri

a forgalomba hozatali engedélyezést 15%, az I. fázisból pedig 7%. A megszakított humán klinikai vizsgálatok 80%-át a gyógyszerjelölt nem megfelelő biztonságossága vagy hatásossága okozza [116–119]. Értelemszerűen repozíciós vizsgálatok során a gyógyszer biztonságossága már nem vet fel kérdéseket. „Békehelyzetben” is, de egy pandémia alatt fokozottan nagy nyomás nehezedik a gyógyszerészeti hatóságokra, hogy a betegségek megoldására biztosítsanak gyógyszereket, mindamellet, hogy azok biztonságos felhasználásáról is meggyőződjenek [120]. Egy tanulmány [120] már 2008-ban felhívta arra a figyelmet, hogy az életet veszélyeztető, illetve nem veszélyeztető betegségek kezelésére szánt gyógyszerek forgalombahozatali engedélyezési eljárása a jövőben eltérhet egymástól. Ezek a körülmények vezettek a hydroxychloroquin, az azithromycin [121] és itolizumab [122] sürgősségi engedélyezéséhez a COVID-19 betegség kezelésére. Az utóbbi gyógyszert a humán klinikai vizsgálatok II. fázisában vizsgálták 30 fő részvételével mielőtt megkapta a sürgősségi forgalombahozatali engedélyét a COVID-19 betegség kezelésére [122]. Az említett példákkal szemben a boceprevir repozíciója a hepatitisz C vírus cisztein proteáz enzime és a SARS-CoV-2 szintén cisztein proteáza között racionális választás, amely *in vitro* kísérletekben jó eredményekhez vezetett [97]. A II. tanulmányunk megkezdése idejében a virális proteázok közötti gyógyszer repozíciós vizsgálatok voltak többségben, ezért egy másik fehérjét választottunk a SARS-CoV-2 vírus készletéből, amihez megpróbáltunk hasonlót keresni más vírusok proteomjában. A keresés során szerkezeti hasonlóságot fedeztünk fel az influenza A vírus M2 transzmembrán ioncsatornája (M2A) és a SARS-CoV-2 vírus E proteinje (EC2) között (**1. ábra**), továbbá funkciójukban is azonos a két transzmembrán fehérje, mindkettő kation csatorna [123,124].



1. ábra Az M2A és az EC2 ioncsatornák atomi felbontású szerkezetei, a csatornák tulajdonságai, és a repozíció során felhasznált ligandumok. A) Az M2A és EC2 ioncsatornákat szürke szalag ábrázolással mutatjuk az ábrán, a fontosabb aminosavakat kiemeltük gömb ábrázolással, és a 6BKK, valamint 7K3G szerinti elnevezésüket feltüntettük. A csatornák oldal és felülnézetből láthatók, a piros csatorna a közepén mutatja a ligandum számára átjárható terület formáját és méretét. A csatornák hossza,

és szélessége (minimum, maximum, átlag, szórás) is szerepel az ábrán. B) A repozíció során használt három ligandum Lewis képlete. Fiziológias körülmények között a vegyületek amino csoportja protonált állapotban van +1 töltéssel. A rimantadin R-enantiomerét használtuk a tanulmány során.

A gyógyszerészeti hatóságok által jóváhagyott, és régóta használt influenza elleni gyógyszerek és származékaik repozíciójának szerkezeti alapjait vizsgáltuk a tanulmányunkban (**II. tanulmány**). Ezek a vegyületek a következők: amantadin (Gocovri[®], Symmetrel[®]), rimantadine (Flumadine[®]) és spiro-adamantyl-amin (**1. B ábra**). Így ebben az esetben a régi célpont az M2A és az új az EC2. Az M2A esetében a hatásmechanizmus a csatorna kationvezetésének gátlásán alapszik, a három vegyület kötődésének a reprodukálása szolgált referenciának. Az amantadint eredetileg 2007-ben a SARS-CoV vírus ellen javasolták [124], és az új SARS-CoV-2 vírus ellen is használták betegek gyógyítására, pozitív hatásokról beszámolva [125–127]. Az EC2 homológ a SARS-CoV E proteinjével, mindkét fehérjének a vírus fejlődésében, felszabadulásában és a gazda szervezet gyulladás-válaszában van szerepe [123]. Az ioncsatorna blokkolása az amantadin-származékok, vagy hasonló amfipatikus molekulák által ígéretes stratégia a gyógyszerfejlesztésre [128,129], a vírusok esetén ritkaság számba menően, hosszútávon is, hiszen az EC2 mutációkra való hajlama alacsony, Indiában gyűjtött betegminták alapján [130]. 2020 végén meghatározták az EC2 csatorna atomi felbontású szerkezetét szilárd fázisú NMR vizsgálattal [123], ami jó kiindulási alap szerkezet-alapú gyógyszer repozíciós vizsgálatokhoz. Ugyan ez a tanulmány egy fluorozott amantadin származék kötődésén is vizsgálta, szintén NMR-es módszerrel, így ezt is fel tudtuk használni kísérletes validálásként a tanulmányunkhoz. Az EC2 csatornát 5 α hélix alkotja, amelyet a hélixek közötti aromás kölcsönhatások stabilizálnak. Az amantadin származékok befogadására alkalmas M2A pórus méretéhez hasonlít az EC2 pórusa, annak ellenére, hogy az M2A csak 4 hélixből áll, a két csatorna geometriája nagymértékű hasonlóságot mutat (**1. ábra**). Az amantadin származékok M2A-hoz kötődése során a víz molekuláknak meghatározó szerepe van [39,65], ezt, és a két csatorna hasonlóságát figyelembe véve, feltételeztük, hogy az EC2 esetében is a víz molekulák szerepének feltérképezése fontos lehet. A jelenleg elérhető EC2 szerkezet ligandum mentes formában, víz molekulák nélkül található meg a Protein Data Bankban [131]. Éppen ezért egy ligandummal és hidrát szerkezettel rendelkező atomi felbontású komplex megalkotása a későbbi gyógyszertervezés alapjául szolgálna. A jelenleg elérhető

módszerek számára egy ilyen szerkezet számítása nagy kihívást jelent, ezért fejlesztettük ki a HydroDock nevű módszerünket, amelynek segítségével reprodukáltuk az amantadinszármazékok kötődését a régi (M2A) targethez, valamint a víz molekulák és parciális töltések szerepét is vizsgáltuk. Az új célponton (EC2), pedig előállítottuk az eddig hiányzó atomi felbontású hidratált komplex szerkezeteket, reprezentatív gyógyszer kötési módokkal.

III. Célkitűzések

PhD munkám során a célpont-ligandum komplexek számítására szolgáló számítógépes dokkolási eljárás alkalmazását és továbbfejlesztését tűztem ki célul.

A számítógépes dokkolás jelenlegi formájában történő alkalmazhatóságát a CYP3A4 jelű, metabolizmusban kulcsszerepet játszó citokrómhoz, mint célponthoz történő ligandum kötődések esetében vizsgáljuk és egy már ismert szerkezetű és hatású ligandumot alapul véve az újonnan vizsgált ligandum hatására annak dokkolással előállított, atomi felbontású komplex-szerkezete alapján adunk magyarázatot.

A gyors dokkolási eljárások legnagyobb korlátját az indukált illeszkedés kezelése mellett a ligandum kötődésében részt vevő vízmolekulák helyzetének pontos meghatározása jelenti. Ezen vízmolekulák helyzetének és kölcsönhatásainak pontos ismerete nélkül egyes, arra érzékeny célpontoknál, mint például a virális ioncsatornák, a „száraz” dokkolásból származó célpont-ligandum komplex szerkezetek a gyógyszertervezés során félrevezetően rosszak lehetnek. A probléma kezelésére célul tűzzük ki a hidratált célpont-ligandum komplex szerkezet előállítását csupán a partnerek (célpont, ligandum, víz) önálló szerkezeteinek, mint bemenő információnak a felhasználásával.

IV. Módszerek

IV.1. Kis molekulák kötődése a CYP enzim fehérjékhez

IV.1.1. Ligandum előkészítés

A ketokonazol, bergamottin (BM) és az SL-BM szerkezetét a Maestro programmal [132] építettük meg, és a kvantum kémiai program csomaggal (MOPAC, [133]) energia minimalizáltuk, PM7 paraméterszett [85] alkalmazásával. Erőtér számításokat is a MOPAC program segítségével végeztük, az erő konstans mátrixok pozitívak voltak. AutoDock Tools [134] programmal Gasteiger-Marsili [135] parciális töltésekkel láttuk el a ligandumokat. Minden aktív torziós ponton a ligandum flexibilitást figyelembe vettük.

IV.1.2. Target előkészítés

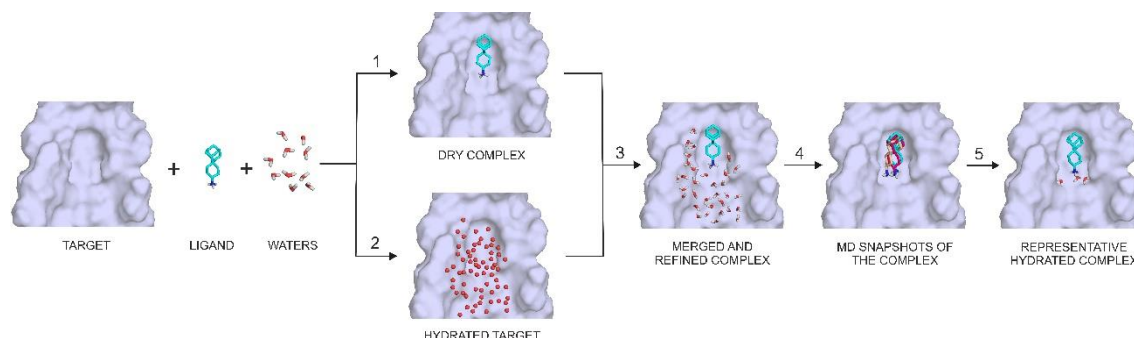
Target fehérjének a CYP3A4 ketokonazollal alkotott komplexét választottuk (PDB: 2v0m, [19]). A kötött ketokonazol molekulákat dokkolás előtt eltávolítottuk a szerkezetből. A hem atomi parciális töltéseit a [20] tanulmányból vettük át, mint ferri ötszörösen koordinált magas-spin töltési modellt. A fehérje többi részét Gasteiger-Marsili töltésekkel és poláris hidrogén atomokkal láttuk el az AutoDock Tools segítségével.

IV.1.3. Dokkolás

Minden ligandumot a CYP3A4 enzim aktív kötőhelyére dokkoltunk az AutoDock 4.2.6 program [134] segítségével. A grid doboz beállításai a következők voltak: $90 \times 90 \times 90$ grid pont, $0,375 \text{ \AA}$ közönként. Lamarcki genetikus algoritmus alkalmaztunk a globális kereséshez, a ligandum flexibilitás minden aktív torziós ponton engedélyezve volt. 10 párhuzamos dokkolást végeztünk, és a ligandum konformációk a számított kötési energia értékeik alapján kerültek rangsorolásra. RMSD értéket az elérhető krisztallográfias szerkezethez viszonyítva számítottunk.

IV.2. HydroDock

A **2. ábrán** láthatók a HydroDock módszer lépései, a Módszerek szekcióban ezek részletes kifejtése következik.



2. ábra Az M2A csatorna hidratált gyógyszert kötő komplexének előállításának lépései. Az ioncsatornát szürke felszíni ábrázolással jelöltük, az ábrán a keresztmetszete látható. A ligandum (SA) kék pálcika ábrázolással szerepel. A második lépés víz oxigén (hidrogének nélküli) pozícióit piros gömbök szemléltetik. A minimalizált komplexben a vizet piros-fehér pálcika ábrázolással mutatjuk már. A harmadik lépésben a vizek egy részét a ligandum kiszorítja. A negyedik lépésben csak néhányat mutatunk az összes dinamikus SA konformációból, az ábra áttekinthetőségét szem előtt tartva.

IV.2.1. Kiindulási szerkezetek

Az M2A AA-val, RA-val és SA-val alkotott komplex szerkezeteinek (6BKK, 6BKL, 6BMZ [65]) és a ligandum mentes, apo szerkezetnek (3LBW [136]) az atomi koordinátáit a Protein Data Bank (PDB)-ről töltöttük le (**1. Táblázat**). A szerkezetek A, B, C és D láncait, a hozzájuk tartozó ligandumot (az apo szerkezet kivételével), valamint a ligandumtól 5 Å távolságon belüli vízpozíciókat használtuk fel (**2. Táblázat**, utóbbiakat a HydroDock protokollban már nem, csak az azt megelőző validációs lépések során). Az EC2 szabad állapotú NMR szerkezetének [123] első modelljét használtuk (7K3G), a hidratált és a ligandum kötött komplex szerkezetek előállításához. A ligandumokat Maestro [132] programban építettük meg, a szemi-empirikus kvantum kémiai program csomaggal (MOPAC, [133]) energia minimalizáltuk a nyers szerkezeteket, PM7-es [85] paraméterszett használatával. A ligandumok topológiáinak előállításához szükséges elektrosztatikus potenciál töltéseket (RESP), RED-vIII.52 [137] programmal, és a geometria optimalizálást GAMESS [138] programmal végeztük. A kötésben lévő atomok paramétereit, valamint az atomtípusokat acpype és antechamber [139,140] programok segítségével állapítottuk meg. A fehérjék N-terminális végeit acetyl csoportokkal zártuk

le, míg a C-terminális végeiket imino-metil csoportokkal, szintén a Maestro program segítségével. A dokkolást megelőzően Gasteiger-Marsili [135] parciális töltésekkel láttuk el a célpontokat az AutoDock Tools [134] program segítségével. Az előkészítő lépések befejeztével a kapott célpont és ligandum szerkezeteket használtuk a HydroDock módszer kiindulási (input) szerkezeteiként.

1. Táblázat. A gyógyszer-kötő komplexek a szabad állapotú M2A csatornához viszonyított RMSD-je, az alfa szénatomok figyelembevételével.

	6BKK	6BKL	6BMZ
Apo szerkezethez viszonyított RMSD (Å)	0,39	0,39	0,22

2. Táblázat. A gyógyszer-kötő 6BKK komplex és a szabad állapotú M2A csatorna vízszerkezetének összehasonlítása az AA-tól 5,0 Å távolságon belüli vizekre.

6BKK víz sorszám #	Apo víz sorszám #	Távolság (Å)
A:w102	A:w100	0,5
Aw103	-	
D:w103	-	
D:w105	D:w119	0,6
D:w109	D:w122	1,9 ^a
B:w201	B:w104	0,4
B:w204	-	
C:w205	C:w117	0,3
B:w208	B:w112	1,6 ^a
C:w208	-	

^aA két víz molekula oxigén atomját összekötő vonal 90°-kal elfordult az apo vízszerkezet esetében az M2A függőleges tengelye mentén, ez eredményezi a nagyobb értékeket.

IV.2.2. 1. lépés

A száraz dokkolás során kétfajta dokkoló dobozt használtunk, a B doboz (**3. Táblázat**) a fehérje teljes felszínét borította, így blind dokkolást [10,11,141–144] végeztünk ezen esetekben, az A doboz csak a csatorna extravirális felét (**1. ábra**) borította. A dokkolások célpontjai a ligandum mentes M2A és EC2 szerkezetek voltak. Az M2A csatorna esetében mindig blind dokkolást alkalmaztunk. A kísérletes vízmolekulákat eltávolítottuk a szerkezetekből. A célpont szerkezeteket rigid testként kezeltük, a **3. Táblázatban** feltüntetett kivételek esetében az N15 oldallánc flexibilitást engedtük a dokkolás során, hogy vizsgáljuk a ligandumok képesek-e behatolni az extravirális térből az EC2 belsejébe. A grid térképet az AutoGrid segítségével állítottuk elő. A dokkoló (grid) dobozokat a célpontok közepére helyeztük, az M2A esetében 70, az EC2 esetében 90 grid pontot állítottunk be a tér minden irányába, 0,503 Å távolsággal (az A doboz esetében 0,375 Å). A blind dokkolás során az így előállított dokkoló dobozok a fehérjék teljes felszínét borították, és így a ligandum bejutását a csatornák belsejébe mind az extra- és intravirális oldalról lehetővé tették. A ligandum értelemszerűen a valóságban nem indulhat az intravirális oldalról, ezért az EC2 esetében az A dokkoló doboz csak az extravirális régióból engedte a bejutást a csatornába, továbbá az N15-ös oldallánc flexibilitása is azt a célt szolgálta, hogy a ligandum a csatorna belseje felé történő mozgását lehetővé tegyék. Mind a két csatorna esetében van elérhető kísérletes bizonyíték arra, hogy az AA (vagy annak származéka) képes bejutni a csatorna belsejébe [65,123].

3. Táblázat. A száraz dokkolások eredményei az EC2 csatorna esetében, az 5 Å távolságon belüli aminosavak feltüntetésével.

Kötő mód	Dokkoló doboz kódja*	N15 flexibilitás	EC2 aminosav (legközelebbi távolság, Å)
AA1	A doboz	Nincs	T11 (3,5), L12 (34,1), V14 (3,5), N15 (2,8)
AA2	A doboz	Nincs	T11 (4,5), L12 (4,2), V14 (3,9), N15 (2,8)
AA3	A doboz	Nincs	N15 (4,9), L18 (2,8), L19 (3,4), F20 (4,7), L21 (3,3), A22 (4,5)
AA4	B doboz	Szabad	V14 (4,7), N15 (2,8), S16 (4,8), L18 (3,4)
AA5	B doboz	Szabad	V14 (4,8), N15 (4,6), L18 (4,0), L21 (4,5)
RA1	B doboz	Nincs	L21 (4,2), A22 (5,0), V24 (3,9), V25 (3,3), L28 (3,2)
RA2	B doboz	Nincs	L18 (3,6), L19 (4,0), F20 (5,0), L21 (3,0), A22 (4,7)
SA1	B doboz	Nincs	L21 (5,0), V24 (3,0), V25 (3,2), L28 (3,0)

*A doboz: A szélek mérete: 0,375×90 Å, az EC2 fehérje extravirális részétől egészen az ioncsatorna közepéig ért, a középpont koordinátái: 10,991; -0,074 ; -0,009.

*B doboz: Az EC2 fehérje teljes felszínét beborította.

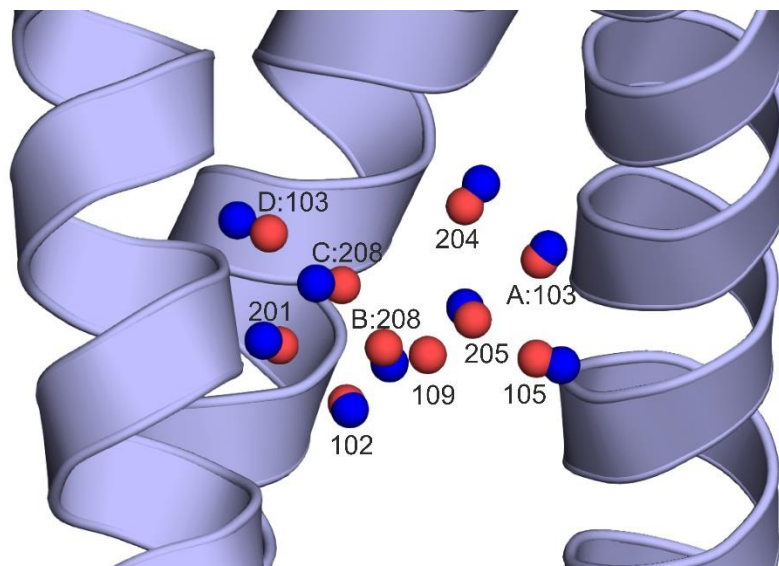
A dokkolási számításokat az AutoDock programmal [134] végeztük, a ligandumokat az OpenBabel programmal [145] láttuk el hidrogén atomokkal és Gasteiger-Marsili parciális töltésekkel. A ligandumokon az aktív torziós mozgásokat megengedtük. 100 dokkolási számítást végeztünk minden esetben, Lamarcki genetikus algoritmust és pszeudo Solis-West lokális keresést végeztünk, 300 iterációval és 25 millió energia értékeléssel, és 150es populáció mérettel [141,142]. A 100 ligandum kötődési módot klaszterekbe csoportosítottuk és rangsoroltuk a számított kötődési szabadenergiáik és szerkezeti

hasonlóságuk alapján. Az így előállított ligandum rankek száraz célpontjaikkal alkotott komplexeit használtuk a HydroDock módszer során, mint „száraz komplexekeket”. Mivel az M2A és EC2 is szimmetrikus fehérjék, így az egymással szimmetria tekintetében megegyező ligandum rankek közül a legkedvezőbb energiájút választottuk ki és használtuk fel a száraz komplexek előállítására. Az M2A esetében így 6 száraz komplex állt elő, 1-1 midhárom ligandum holo és apo szerkezetére történő dokkolásból. Az EC2 esetében pedig 5 AA, 2 RA és 1 SA (**3. Táblázat**) száraz komplex keletkezett. Ezeket a 3. lépésben használtuk fel.

IV.2.3. 2. lépés

Az ionszatórnák belső felszínének a hidrát szerkezetét MobyWat [17,18] program segítségével építettük meg, inputként szükséges volt egy MD trajektória fájl, amely tartalmazza az explicit vízmolekulákat. Ez az MD alapú módszer lehetővé teszi az összes víz-oldott anyag és víz-víz kölcsönhatás figyelembevételét, és egy olyan programot eredményez, amellyel a predikció során 90%-os pontosság feletti egyezést is el lehet érni a kísérletes víz oxigén pozíciókkal [17,18]. A száraz M2A (6BKK) és EC2 (7K3G) fehérjéket energia minimalizáltuk és elláttuk hidrogén atomokkal, sd és cg algoritmusokat alkalmazva, amelyek pontos beállításait a következő fejezetben részletezzük. A minimalizálás után egy 1 ns hosszúságú MD lépés következett. A szimulációs dobozt explicit TIP3P [146] parciális töltéssel rendelkező vízmolekulákkal töltöttük fel, valamint a töltés kiegyenlítés érdekében ellen-ionokat adtunk a rendszerhez (klorid és nátrium ionok). A konvergencia határértéket 10^3 és 10 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ –ben állapítottuk meg, a lépések maximális nagyságát pedig 0,5 és 0,05 nm-ben, az sd és cg lépések esetében. A pozíciós megkötésekre 10^3 kJ mol⁻¹ nm⁻² erő konstanst alkalmaztunk minden nehéz atomra. A számításokat GROMACS [60] program csomaggal végeztük, erőternek pedig AMBER99SB-ILDN [147] erőteret használtunk. A dinamika 2 fs nagyságú lépésekkel zajlott, összesen 1 ns hosszúságú volt. A hőmérséklet-csatoláshoz a sebesség újraszámító és a Parrinello-Rahman algoritmusokat használtuk. Az oldott anyag és az oldószer kapcsolása külön történt, a referencia hőmérséklet 300 K és a csatoló idő 0,1 ps volt. A nyomás-csatolás a Parrinello Rahman algoritmussal történt, az idő konstans 0,5 ps volt, az összenyomhatóság $4,5 \times 10^{-5}$ bar⁻¹ volt, a referencia nyomás pedig 1 bar. A hosszú sugarú elektrosztatikus kölcsönhatások számítására a részecskeháló Ewald-féle szummációját használtuk. A van der Waals és a Coulomb interakciók határértéke 11 Å

volt. A koordinátákat 1 ps-ként elmentettük, így 10^3 frame keletkezett. A pozíciós megkötésekre 10^3 kJ mol⁻¹ nm⁻² erő konstanst alkalmaztunk az oldott anyag nehéz atomjaira, az oldószerére nem. A periódus határokat figyelembe vettük az analízis előtt, és a hidratált oldott anyagok szerkezetét a doboz közepére visszaállítottuk. Minden frame-t a kiindulási szerkezetre illesztettük vissza a C α atomoknál fogva. A végső trajektóriát, ami tartalmazta az összes frame atomi koordinátáit bináris xdr fájl-lá alakítottuk. Az így előállt MD trajektória felhasználásával a MobyWat program segítségével számítottuk a felszíni víz oxigén atomok pozícióját. Ehhez a program inkluzív identitás alapú predikciós algoritmusát alkalmaztuk. A targettől való maximum távolságot 5 Å-nek, a predikciós és klaszterező toleranciát pedig 2,5 valamint 1 Å-nek vettük. A MobyWat program működése röviden: jelölt vízmolekulákat választunk az MD trajektória minden framejében egy kívánt távolsági limitet használva a targettől (dmax), utána egy okkupancia listát készítünk az összes víz ID-vel, és hogy ezek a vizek hányszor fordultak elő jelöltként a framekben. Majd klaszterezés következik, amely során meghatározzuk a klaszter különböző elemei közti távolságot (ctol). A legnagyobb klasztert kiválasztjuk, és a bele tartozó molekulák koordinátáinak átlagolásával előáll az első vízmolekula koordinátája. A következő lépésekben ez ismétlődik, és párhuzamosan ellenőrzésre kerül, hogy a következő vízmolekula nem esik-e a predikciós tolerancia távon belül (ptol) az előzőtől. Így előáll egy lista, amely tartalmazza a prediktált vízmolekulák O atom koordinátáit, jelen esetben az M2A (6BKK) és az EC2 (7K3G) fehérjékre. Az előbbi esetben, mivel voltak elérhető kísérletes víz O pozíciók, a MobyWat validációs módjával összevetettük a prediktált és a kísérletes víz O atom pozíciókat, a predikció 90%-os siker rátával végződött (**3. ábra**).



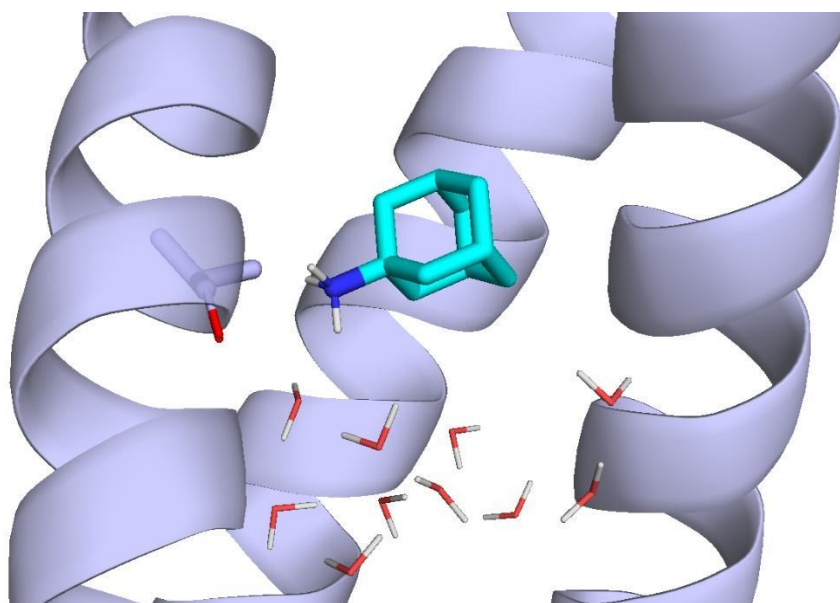
3. ábra A kísérletes víz O pozíciók (vörös gömbök) és a prediktált víz O pozíciók (kék gömbök) az M2A ioncsatorna esetében (6BKK). A kísérletes víz O pozíciókat a 6BKK szerinti elnevezés szerint tüntettük fel. Szűkre szalag ábrázolással látható az M2A ioncsatorna.

IV.2.4. 3. lépés

Az első két lépés eredményeinek összeolvasztásából készült el a hidratált, ligandumkötött komplex szerkezet, „nyers”, nem minimalizált verziója. A két lépés fehérjéit közös koordináta rendszerbe helyeztük, a Ca atomjaikon egymásra illesztettük őket, PyMol [148] program segítségével. Az összeolvasztás után ez a nyers komplex még tartalmazza a MobyWat által prediktált összes felszíni víz O pozíciót, amelyek közül néhány átfed az újonnan a szerkezetbe helyezett vizek nélkül dokkolt ligandum pozíciójával. A MobyWat program Editing funkciójával ezeket eltávolítottuk, hogy csak az interfész vizek maradjanak. Az így összeolvasztott nyolc EC2 komplex (**3. táblázat**) és hat M2A komplex (**5. táblázat**) energia minimalizálása a Refinement R protokoll szerint történt.

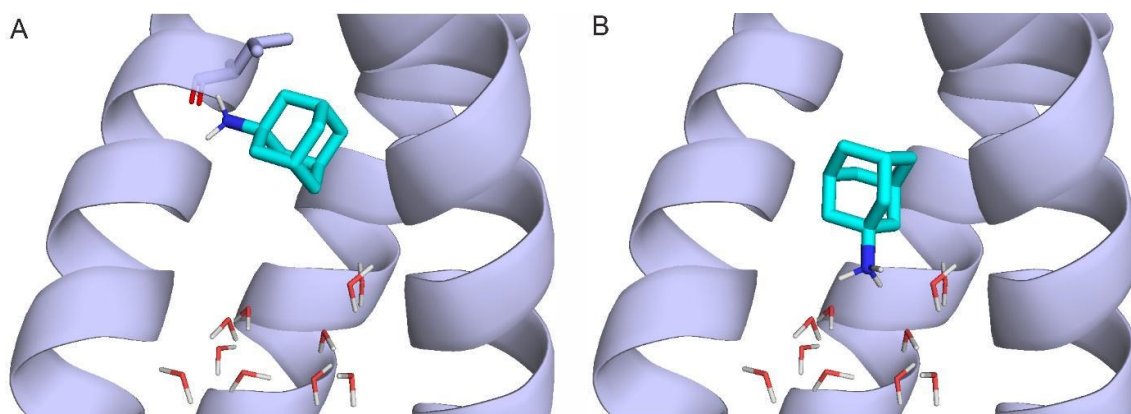
A Refinement S minimalizálás protokollt végül nem alkalmaztuk a HydroDock módszerben, viszont módszerfejlesztési szempontból fontos megemlíteni. A kísérletes interfész víz O pozíciókat az M2A target esetében, amelyek mind a ligandumtól, mind a targettől 5 Å távolságon belül voltak megtartottuk, a többit eltávolítottuk a szerkezetből. Az M2A szerkezetét a megtartott vízmolekulákkal egy dodekahedrális dobozba helyeztük, a távolság az oldott anyag és a doboz széle között 1 nm volt. A doboz üres részeit a GROMACS program segítségével explicit vízmolekulákkal töltöttük fel, TIP3P

parciális töltésekkel ellátva. A GROMACS pdb2gmx program segítségével adtunk hidrogén atomokat a víz O atomokra, illetve az oldott anyag atomjaira. A rendszer töltését nullára állítottuk be ellenionok segítségével. Az első lépésben sd optimalizálást hajtottunk végre (sd1), a konvergencia határértéket $10^3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ –ben állapítottuk meg. Ezt követte egy cg minimalizálás (cg1), $10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ konvergencia határértékkel. A pozíciós megkötésekre $10^3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ erő konstanst alkalmaztunk minden nehéz atomra mindkét lépésben (sd1+cg1). AMBER99SB-ILDN erőteret használtunk a számítások során. Ezt követően a Refinement S minimalizációs protokollban az első lépést ismételtük meg (sd2+cg2), azzal a különbséggel, hogy csak az alfa szénatomokra helyeztünk pozíciós megkötéseket. A **4. ábrán** látható, hogy az így előállt minimalizált vízszerkezet nem tette lehetővé a sikeres dokkolást, mert a hidrogén atomok a ligandum felé mutattak, a protonált amino csoport pozitív töltését taszították, így a kísérletes ligandum kötési pozíció reprodukálását nem tették lehetővé. Ezért fejlesztettük tovább a minimalizációs protokollt egy további lépéssel (Refinement R).



4. ábra A Refinement S minimalizációs protokoll eredménye az M2A csatorna esetében nem tette lehetővé a kísérletes ligandum kötési szerkezet reprodukálását. A ligandum a protonált amino csoportjával az A30 aminosav karbonyl oxigénje felé fordul el, mert a rosszul beállított hidrogének a vizeken taszítják a pozitív töltését. Az M2A fehérjét szürke szalagokkal ábrázoltuk, az AA ligandumot türkiz pálcikákkal ábrázoltuk, az A30 aminosavat szürke pálcikákkal, és a vízmolekulákat piros-fehér vékony pálcikákkal.

A 7. táblázat eredményei alapján a Refinement R minimalizációs protokollt választottuk a HydroDock 3. lépésének alapjául. Egy szempontban tér ez a Refinement S-től, az sd1+cg1 lépéseket nem egyből követi az sd2+cg2, hanem a kettő között még egy 100 ps hosszúságú MD szimuláció került beiktatásra: sd1+cg1+md+sd2+cg2. Az MD szimulációban csak az aminosavak alfa szénatomjaira helyeztünk pozíciós megkötéseket ebben az esetben. A hőmérséklet-csatoláshoz a sebesség újraszámítási algoritmust használtuk, 300 K referencia érték és 0.1 ps időkonstans mellett. A nyomást-csatolást a Parrinello-Rahman algoritmussal végeztük, 0.5 ps időkonstanssal, az kompresszibilitást $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ -nak vettük és 1 bar volt a referencia nyomás. Részecskeháló módszer Ewald-szerű összegzését használtunk a hosszútávú elektrosztatikus kötések számításához. Van der Waals és Coulomb interakciók cut-off értékét 11 Å-re állítottuk. A módszerfejlesztés során tettünk egy pilot kísérletet a Refinement R minimalizált vízmolekulák figyelembe vételére dokkolás során. Azonban ez nem képi a végső HydroDock módszer részét. A száraz dokkoláshoz viszonyítva annyiban tért el, hogy a minimalizált vízmolekulákat is meghagytuk a target oldalán. Érdekessége a módszernek, hogy a jól beállított hidrogén atomok sem bizonyultak elégségesnek ahhoz, hogy a dokkolás során jó eredményeket érjünk el (**5. ábra**), hanem az AutoDock által beállított Gasteiger-Marsili [135] parciális töltések helyett TIP3P parciális töltésrendszerrel kellett ellátni a vízmolekulákat (**3. táblázat**), hogy elérjük a **8. Táblázatban** bemutatott eredményeket.



5.ábra A vízmolekulák parciális töltésének hatása a dokkolás eredményére. A) A Gasteiger-Marsili parciális töltésekkel ellátott vízmolekulák O atomjai helyett a V27 aminosav karbonil O atomjával vesz részt ionos kölcsönhatásban az AA pozitívan töltött protonált amino csoportja. B) A TIP3P parciális töltésekkel ellátott vízmolekulák

hatására már nem aminosav gerinc karbonil O atomhoz kötődik az AA protonált aminos csoportja, hanem a vizek O atomjaihoz, ahogyan azt kísérletesen meghatározták [65].

A TIP3P víz O parciális töltése abszolút értékben kétszer akkora, mint a Gasteiger-Marsili parciális töltés, ami már így kedvezőbb kötési feltételeket biztosít a pozitív töltésű protonált aminos csoport számára, mint az aminosav gerinc karbonil O atomjai.

4. Táblázat. A Gasteiger-Marsili és a TIP3P parciális töltések eltérése a vízmolekulák O és H atomjainak esetében.

Víz parciális töltések	Gasteiger-Marsili	TIP3P
q(O)	-0,411	-0,820
q(H)	+0,205	+0,410

IV.2.5. 4. lépés

Az MD szimulációk a minimalizálási lépésben leírt beállításokkal történtek (Refinement R), a hosszuk pedig maximum 100 ns-ban volt meghatározva, de az **5. táblázat** tartalmazza a pontos értékeket. A C α atomok pozícióit kötöttük meg, az összes többi atom szabad mozgását engedjük. A Refinement R protokoll utáni minimalizált vízszerkezetet megtartottuk, a doboz többi részét pedig a GROMACS feltöltötte vizekkel. A komplexeket tartalmazó frameket a GROMACS trjconv programjával illesztettük egymásra a fehérje C α atomjain, és a kötött ligandum pozíciókról készült frameket külön fájlként gyűjtöttük 0,1 ns-ként (konformációs pool).

IV.2.6. 5. lépés

A konformációs pool-ból reprezentáns szerkezetet használtunk egy saját bash shell script segítségével. RMSD értékeket számítottunk a konformációs pool (**5. táblázat**) átlagos koordinátái által alkotott szerkezet és a konformációs pool egyes tagjai között, az átlagos szerkezetet használva referenciaként. A számítás során a legkisebb RMSD értékhez tartozó ligandum szerkezetet választottuk ki a poolból, mint reprezentatív szerkezetet. Ez a reprezentatív szerkezet az általunk javasolt végső kötési módja a ligandumnak a célpontjához. Mivel a száraz dokkolásnak több eredménye volt, ezért minden egyes kiindulási komplexhez tartozik egy reprezentatív szerkezet (**5. és 6. táblázatok**).

5. Táblázat. Az M2A száraz dokkolás által eredményezett ligandum pozíciók MD szimuláció utáni konformációs pooljai, valamint az átlagos szerkezetnek az individuális szerkezetekhez viszonyított átlagos RMSD értéke

Ligand	M2A konformáció	N _{pool}	Idő (ns)	Átlag (Å)	SD
AA	Holo	433	43,3	1,7	0,7
AA	Apo	460	46,0	1,7	0,7
RA	Holo	999	99,9	4,0	0,1
RA	Apo	826	82,6	1,7	0,7
SA	Holo	470	47,0	1,9	0,7
SA	Apo	760	76,0	1,2	0,4

Az EC2-re történt száraz dokkolás ligandum szerkezeteit, és a belőlük kiindult MD szimuláció reprezentatív szerkezeteit a **6. táblázat** foglalja össze.

6. Táblázat. Az MD szimulációk eredményei az EC2 csatorna esetében, az 5 Å távolságon belüli aminosavak feltüntetésével.

Kötési mód	EC2 aminosav (legközelebbi atom távolsága, Å)
AA1 ^a	T11 (4,8), L12 (4,2), I13 (4,4), V14 (3,9), N15 (3,8)
AA2 ^b	T11 (4,5), L12 (3,8), N15 (4,9)
AA3	L18 (4,3), L19 (4,4), L21 (3,8)
AA4	L12 (4,6), V14 (4,9), N15 (3,0), L18 (4,3)
AA5	L18 (3,7), L19 (4,5), L21 (4,4)
RA1	L18 (3,7), L21 (4,4), A 22 (4,9), V24 (4,6), V25 (3,9)
RA2	L18 (4,9), L21 (4,0), V25 (4,7)
SA1	L18 (4,4), L21 (4,3), A22 (5,0), V24 (4,9), V25 (4,1), L28 (5,0)

^a 23,6 ns után disszociált, így a reprezentatív szerkezetet az első 236 db MD snapshotból számítottuk.

^b 31,8 ns után disszociált, így a reprezentatív szerkezetet az első 318 db MD snapshotból számítottuk.

IV.2.7. Kiértékelési kritérium

Minden esetben a szerkezeti egyezést a dokkolt, vagy HydroDock reprezentatív szerkezetet a kísérletes szerkezethez viszonyítva határoztuk meg az átlagos eltérés négyzetével (RMSD), a következő egyenlet szerint:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |D_n - C_n|^2}$$

ahol, N a ligandum nehéz atomjainak száma, C a referencia szerkezet atomjának n-edik térvektora, D pedig a számított ligandum atom n-edik térvektora. A trigonális szimmetria mentén átfedő atomokat megegyezőnek tekintettük.

A dokkolt ligandum konformációkat szerkezetileg klasztereztük, és rangsoroltuk az AutoDock által számított kötési szabad energiájuk alapján. Ennek során a legkedvezőbb számított kötési energiájú ligandum szerkezetet kiválasztottuk és a 2 Å-ön belüli szomszédjaival alkotott egy klasztert. Majd egy következő rank nyílik meg a megmaradt konformációk számára, ahol hasonlóan történik a klaszterezés, amíg el nem fogynak a ligandum szerkezetek. Az alacsony rank-ek konformáció kedvező kötési energiát jelentenek. A legkedvezőbb kötési energiájú ligandum pozíciókat használtuk fel a HydroDock inputjaiként, viszont a HydroDock további lépéseiben már nem volt szükség ilyen rankek kialakítására.

IV.2.8. Energiaszámítás

A Lennard-Jones interakciós energiát a target és a ligandum között a következő egyenlet segítségével számítottuk:

$$E_{ij} = \sum_{ij}^{N_i N_L} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right]$$

$$A_{ij} = \varepsilon_{ij} R_{ij}^{12}; B_{ij} = 2\varepsilon_{ij} R_{ij}^6; R_{ij} = R_i + R_j; \varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$$

ahol, ε_i és ε_j a potenciálvölgy mélység egyensúlyi távolságban két megegyező atompár között, ε_{ij} a potenciálvölgy mélység egyensúlyi távolságban az i-edik (ligandum) és j-edik (target) atom között, R_{ij} az i-edik (ligandum) és j-edik (target) atommag közötti távolság egyensúlyi állapotban, r_{ij} a valóságos távolság az i-edik (ligandum) és j-edik (target) atomok között, N_T a target atomok száma, N_L a ligandum atomok száma. Az Amber 2012 erőter paramétereit használtuk [147]. A számítást száraz és hidratált targetek esetében is elvégeztük, a hidratált target esetében az explicit vízmolekulák a target részét képezték.

Az AutoDock scoring képlete az alábbi:

$$\Delta G_{AD} = W_{vdW} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbound} \sum_{ij} E_{(t)} \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\varepsilon_{(rij)_{nj}}} + W_{sol} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left(\frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)}$$

ahol, a W-vel jelölt kifejezések súlyozó konstansok, amelyek egy kísérletesen meghatározott szabadenergia szetthez történő kalibrációhoz kellenek. A ligandum atomok jelölése i, a fehérje atomoké j. Továbbá egy Lennard-Jones 12-6

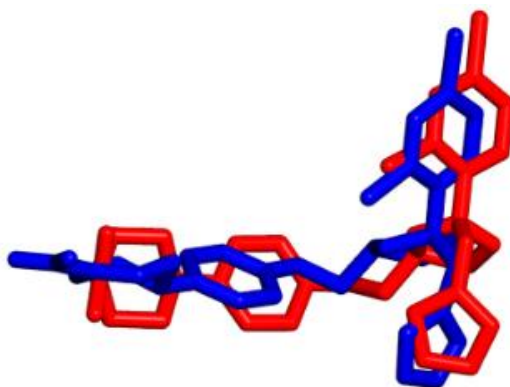
diszperziós/repulziós kifejezés, egy 12-10 h-kötési kifejezés és egy Coulomb elektrosztatikus potenciált tartalmaz a képlet. A és B paraméterek az Amber erőteréből származnak. $E(t)$ egy súlyozás, ami a t szögön alapul, a vizsgált és a célpont atomok között. C és D paraméterek a potenciálvölgy mélység számításához szükségesek. Az utolsó kifejezés egy deszolvatációs potenciál, V az adott atomot körbevevő atomok térfogata és S szolvatációs paraméter a súlyozáshoz. δ egy távolsági súlyozó faktor. Az i és j atomok közötti valódi távolságot pedig r jelöli.

V. Eredmények

V.1. Kis molekulák kötődése a CYP enzim fehérjékhez

A ketokonazol, bergamottin és SL-bergamottin a CYP3A4 enzim kötőzsebébe dokkoltuk, a hem gyűrű fölé. A ketokonazol dokkolása a módszer validálására szolgált, aminek a célja az volt, hogy egy krisztallográfias ligandum pozícióhoz közelítő számított kötési módot előállítsunk. A bergamottin és SL-bergamottin esetében a kötési módokat újonnan állítottuk elő a validált dokkolási eljárással.

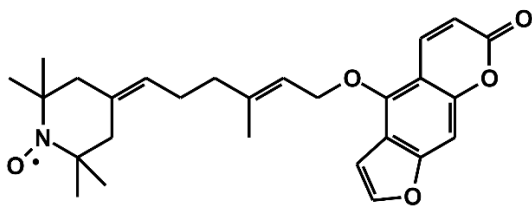
A ligandum kötött komplex CYP3A4 szerkezetben (2V0M), a ketokonazol a hem gyűrű vas ionjához kötődik az imidazol gyűrűjének nitrogén atomjával, az atom és az ion között a távolság 2,7 Å. A ketokonazol dokkolása a ligandum-mentes kötőzsebbe sikeresnek bizonyult a Módszerekben leírt dokkolási eljárással, 2,3 Å RMSD eltéréssel sikerült reprodukálni a krisztallográfias kötési módot (**6. ábra**), ami a szakirodalmi konszenzus elfogadható értéken belül ($\leq 2,5$ Å [149–151]) esik. Ezt az AutoDock scoringja alapján a második rankben sikerült elérni. A fő interakciókat is sikerült reprodukálni (**7. táblázat**): az F304 aminosav és a ketokonazol fenol gyűrűi párhuzamosak voltak egymással π - π kölcsönhatást kialakítva, az A370 aminosav pedig hidrofób kölcsönhatásba lépett a ketokonazol metil csoportjával. Az R372 aminosav pozitív töltésű oldallánca ionos kölcsönhatást alakított ki a ketokonazol parciálisan negatívan töltött oxo csoportjával.



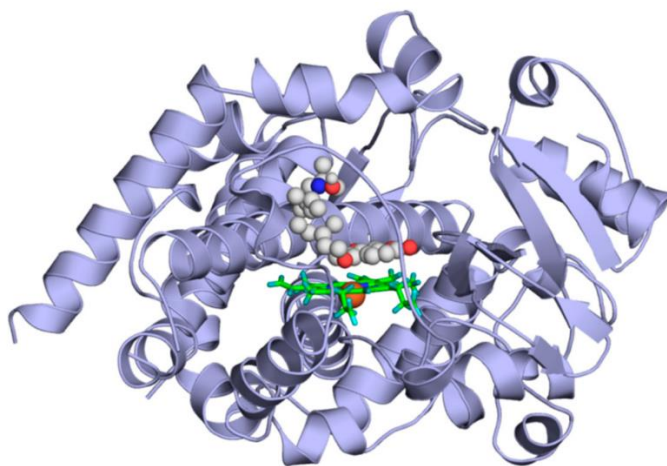
6. ábra A ketokonazol dokkolt (piros) és kísérletes (kék) kötődési módjának összehasonlítása.

A ketokonazol kötődésének sikeres reprodukálása után, a bergamottin és az SL-bergamottin (**7. ábra**) kötődésének számítására a ketokonazol esetében ismertett protokoll szerint jártunk el. Mindkét esetben az elsőként rangsorolt kötési mód nagyfokú hasonlóságot mutatott a ketokonazol kísérletes kötési pozíciójához. A ketokonazol

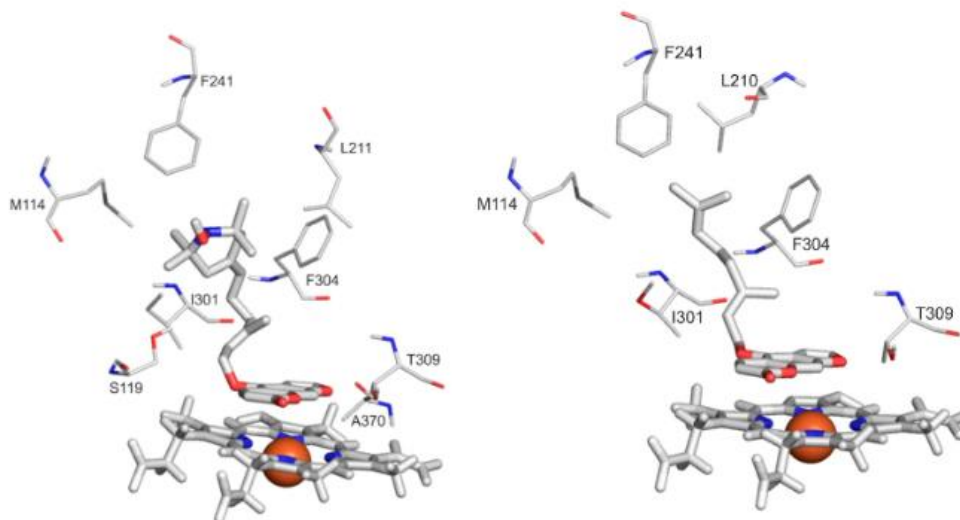
imidazol gyűrűjével megegyező helyen helyezkedett el a CYP3A4 enzim kötőzsebében, a hem gyűrű vas ionja felett a bergamottin és az SL-bergamottin furo[3,2-g]kromén-7-on gyűrűje (8. és 9. ábrák). Mindkét ligandum esetében a hem gyűrű vas ionjával kölcsönhatásba lépett a furán gyűrű oxigén atomja. A bergamottin esetében a kettő távolsága 4,0, míg az SL-bergamottin esetében 4,2 Å. Ebben a kötési módban mindkét ligandum furo[3,2-g]kromén-7-on gyűrűjének és hosszú alifás oldalláncának az elhelyezkedése megegyezett. A furo[3,2-g]kromén-7-on gyűrűk a hem síkjával párhuzamosak voltak, feltehetőleg π kölcsönhatást alakítottak ki a hem gyűrűvel, a ketokonazolhoz hasonlóan. A bergamottinnal 7, az SL-bergamottinnal 8 aminosav hatott kölcsön (7. táblázat), ezek közül 5 közös volt. A hidrofíl T309 aminosavval a furán oxigén hidrogén hidat alakított ki. A ligandumok metil csoportjai és az M114, F241, I301 és az F304 aminosavak oldalláncai között hidrofób kölcsönhatások alakultak ki. Az F304 aminosav mind a bergamottin, SL-bergamottin és a ketokonazol kötődésében fontos szerepet játszott.



7. ábra Az SL-bergamottin Lewis képlete.



8. ábra Az SL-bergamottin kötődése a CYP3A4 enzimhez. Kék szalag ábrázolással látható a fehérje, a ligandum szürke gömbökkel, a hem gyűrű zöld pálcikákkal és a vas ion narancssárga gömmbel látható. Az SL-bergamottin a CYP3A4 kötőzsebében helyezkedik el, a hem gyűrű felett, a vas ionnal ionos kölcsönhatást kialakítva.



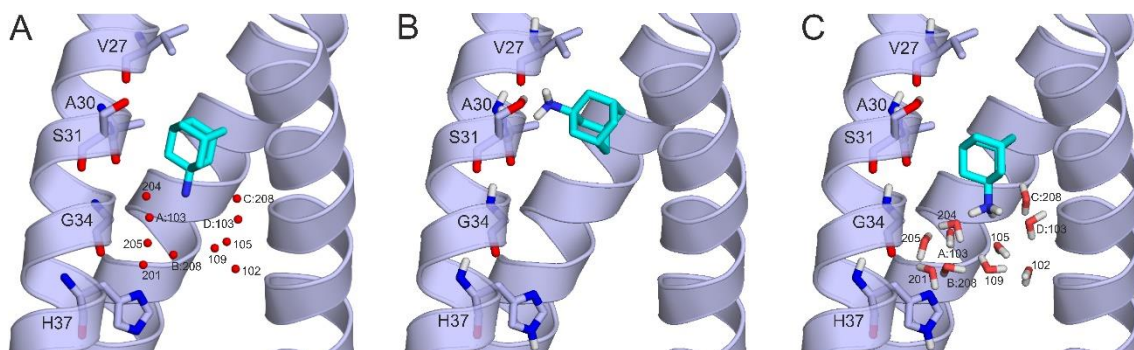
9. ábra Az *SL*-bergamottin (balra) és a bergamottin (jobbra) kötődése a CYP3A4 enzimhez. A két ligandum a CYP3A4 kötőzsebében helyezkedik el, a hem gyűrű felett, a vas ionnal ionos kölcsönhatást kialakítva. A ligandumok szürke pálcikákkal, a hem gyűrű szintén szürke pálcikákkal és a vas ion narancssárga gömmbel látható. A kölcsönható aminosavak szürke vastagított vonallal láthatóak, az egy betűs elnevezéseikkel és megfelelő sorszámukkal jelölve.

7. Táblázat. A ketokonazol, az *SL*-bergamottin és a bergamottin számítógépes dokkolásainak eredménye a CYP3A4 enzimre.

Ligandum	Ketokonazol	<i>SL</i> -bergamottin	Bergamottin
Rank	2	1	1
O-Fe táv (Å)	-	4.2	4
N-Fe táv (Å)	3.8	-	-
ΔG_{bind} (kcal/mol)	-9.4	-10.4	-9.2
	M114	+	+
	S119	+	
	L210		+
	L211	+	
	F241	+	+
A kölcsönható aminosavak listája	I301	+	+
	F304	+	+
	A305		+
	T309		+
	A370	+	+
	R372	+	
	G481	+	

V.2. HydroDock

A vízmolekulák fontos szerepet játszanak az amantadin kötődésében az M2A ioncsatornához [65], például a -6BKK szerinti elnevezésben-: A:w103 és a B:w204 az A30 aminosavnál, B:w201 és a C:w205 a G34 aminosavnál (**10. ábra**). Ezek az interfész víz molekulák hidakat képeznek a gyógyszermolekula pozitívan töltött protonált amino csoportja és az aminosavak negatív töltésű karbonil oxigén atomja között. A H37 aminosav víz molekuláival együtt egy stabil, 10 víz molekulából álló statikus H-kötési hálózatot képeznek, ahogy az a **10. ábra A** részén látható. Hasonlóan fontos szerepű víz molekulák dokkolás során történő figyelembevétele elengedhetetlen a pontos eredmények produkálásához [12,14,152,153].



10. ábra Az amantadin (pálcika ábrázolás, türkiz szén atomokkal), és az M2A (szürke szalag ábrázolás, a szemközti hélix nem szerepel az ábrán, az átláthatóság kedvéért) komplexe. A) A kísérletesen kimért komplex szerkezet (6BKK), az aminosavak pálcika, a víz oxigének gömb ábrázolással szerepelnek az ábrán, a kísérletes szerkezetnek megfelelő nevezéktan szerint. B) A víz molekulák nélküli dokkolás, a víz oxigének negatív töltésének hiányában a V27 aminosav karbonil oxigénjével és az S31 aminosav hidroxil csoportjával lép kölcsönhatásba a pozitív töltésű protonált amino csoport. C) A víz molekulák dokkolásba integrálásával kapott eredmények, a minimalizált víz molekulák pálcika ábrázolással szerepelnek az ábrán, a kísérletes szerkezet szerinti nevezéktannal jelölve. A kísérletes (A) gyógyszer kötési móddal egyezést mutat a számított kötési mód.

Az interfész víz molekulák szerepének vizsgálatára különböző számítógépes kémiai stratégiákat próbáltunk ki. Mind a három ligandum számítógépes dokkolását elvégeztük az M2A csatornára, az interfész víz molekulák integrálásának tesztelésére. Kontrollként

alkalmaztuk a víz molekulák nélküli dokkolást (**8. táblázat**). A kísérletes ligandumokat referenciának véve, átlagosan $3,7 \pm 0,7$ Å RMSD-t számoltunk a víz molekulák nélküli dokkolás eredményeként.

8. Táblázat A számítógépes dokkolással előállított és a kísérletes ligandum kötési pozíciók összehasonlítása az M2A target és az amantadin származékok esetében, víz molekulák nélkül

Ligandum	M2A konformáció	RMSD (Å)	Rank ^a
amantadin	Holo	3,3	1/1
amantadin	Apo	3,7	1/1
rimantadin	Holo	3,8	1/2
rimantadin	Apo	3,6	1/1
spiro-adamantyl-amin	Holo	4,8	1/3
spiro-adamantyl-amin	Apo	2,9	1/1
Átlag		3,7	
SD		0,7	

^aAz adott rank sorszáma/az összes keletkezett rank

Ez az átlag a szakirodalmi konszenzus szerint elfogadhatónak ítélt 2,5 Å-öt [149–151] meghaladja, ez alapján megállapítható, hogy a víz molekulák nélküli, száraz M2A fehérje önmagában nem megfelelő, ha számítógépes dokkolással kívánjuk előállítani a ligandum kötött komplex szerkezetet. A ligandum-mentes és a ligandum-kötött M2A fehérjék között nincs nagy eltérés (**1. Táblázat**), így a ligandum kötődése során nem lép fel az indukált illeszkedés jelensége. Ez alapján a célpont rigid testként való kezelése dokkolás során nem okozhat jelentős hibát. A szárazon dokkolt gyógyszer kötési mód esetén az adamantán csoportok pozíciója nem tér el lényegesen (**10. ábra A és B**), az RMSD eltérés mégis nagy (**8. táblázat**), amit a protonált amino csoport eltérő orientációja okoz. Az interfész hidaló víz molekulák hiányában [65], a V27 aminosav karbonil csoportjával és az S31 aminosav hidroxil csoportjával alakít ki kölcsönhatást a protonált amino csoport, ami végeredményben egy hibás orientációt okoz a kötőzseben belül. A víz molekulákat integráló, nedves dokkolás során a 10 kísérletes víz oxigén pozíciót felhasználtuk. A víz molekulák hidrogén atomjainak atomi koordinátáit kísérletes módszerrel nem lehet egyelőre meghatározni [41], így ezeket nekünk kellett előállítani elméleti módszerek

segítségével. Ezt a Módszerek fejezetben leírtak szerint energia minimalizálással végeztük, a ligandum-kötött szerkezetekben a ligandumokat meghagytuk az energia minimalizálás során, elősegítve a víz molekulák hidrogén atomjainak helyes orientációját. Kétféle minimalizációs protokollt próbáltunk ki, egyet, ami csak egyszerű energia minimalizációs lépéseket tartalmaz, valamint egyet, ami egy rövid MD szimulációt is. Az első protokollban minden nehéz atomot a krisztallográfias pozíciójukban rögzítettünk, csak a hidrogén atomok mozoghattak. Ahogyan a **4. ábrán** látható, a hidrogén atomok rossz orientációja miatt a dokkolás így sem volt sikeres. Az így kapott hibás hidrogén atom orientációt az eredeti, kísérletes szerkezet közeli kontaktjai okozhatták (**9. táblázat**).

9. Táblázat A minimalizált kísérletes, valamint MobyWat által prediktált víz oxigén pozíciók eltérése, az eredeti krisztallográfias pozícióktól (6BKK), a közeli kontaktok feltüntetésével. A Minimalizált víz molekulákat használtuk a nedves dokkolás során.

Víz # ^a	Közeli kontakt ^b	Refinement S (Å)	Refinement R (Å)	Prediktált (Å) ^c
A:w102		0,3	0,2	0,2
A: w103		0,6	1,6	0,9
D: w103		0,5	0,5	0,9
D:w105	D:w109	0,7	2,1	0,6
D:w109	C:w208, D:w105	0,9	1,0	2,1
B:w201	B:G34	1,0	1,0	0,6
B:w204		0,8	1,6	0,7
C:w205		0,4	0,9	0,5
B: w208		0,8	0,8	1,0
C: w208	D:w109	0,9	0,2	0,3

^aA 6BKK szerinti elnevezést használtuk.

^bA krisztallográfiás szerkezet közeli kontaktjainak listájába bekerült, ha egy víz molekula oxigén atomja és egy szomszédos aminosav nehéz atomja, vagy egy szomszédos víz molekula oxigén atomja közötti távolság kisebb volt, mint 2,75 Å.

^cA 6BKK szerkezet vízmolekuláit használtuk referenciaként.

A pozíciós megkötések miatt az első minimalizációs protokoll során ezek a közeli kontaktok megmaradtak, ez látható a **9. táblázatban** jelzett a kísérletes pozícióktól való kis víz oxigén távolságokból is. Így az első minimalizálás során a hidrogén kötésekkel álló hálózatot nem sikerült reprodukálni, ami lehetetlenné tette a kísérletes szerkezettel egyező kötési mód előállítását (**4. ábra**). Ez után a robosztus minimalizálási protokollt teszteltük, MD szimulációs lépéssel. A minimalizáció során a kísérletes vízmolekulák fele legalább 1 Å távolságra elmozdult az eredeti pozíciójából (**9. táblázat**). Ekkora mértékű elmozdulás már kijavította a közeli kontaktok problémáját és ki tudott alakulni egy hidrogén kötésekkel álló hálózat a víz molekulák között (**5. ábra**). Továbbá, a parciális töltések helyes asszignációja is nagy befolyással bírt az eredményekre. A TIP3P töltések [146] jó eredményt nyújtottak, míg a Gasteiger-Marsili [135] töltések nem (**5. ábra**). A rövid MD szimulációt tartalmazó Refinement R minimalizálási protokoll a TIP3P töltésekkel együtt a dokkolt kötési módok kiváló egyezést mutattak a kísérletes szerkezetek ligandum pozícióival ($1,2 \pm 0,3$ Å RMSD, **10. táblázat**).

10. Táblázat A vizes dokkolás eredményei a krisztallográfiás ligandum kötési pozíciókkal összehasonlítva az M2A target esetében. A vizeket a Refinement R minimalizálási protokollal és TIP3P explicit vízmodellel kezeltük

Ligandum	M2A konformáció	RMSD (Å)	Rank ^a
amantadin	Holo	1,2	1/1
amantadin	Apo	1,0	1/1
rimantadin	Holo	1,0	1/2
spiro-adamantyl-amin	Holo	1,7	1/1
Átlag (Holo)		1,2	
SD (Holo)		0,3	

^aAz adott rank sorszáma/az összes keletkezett rank

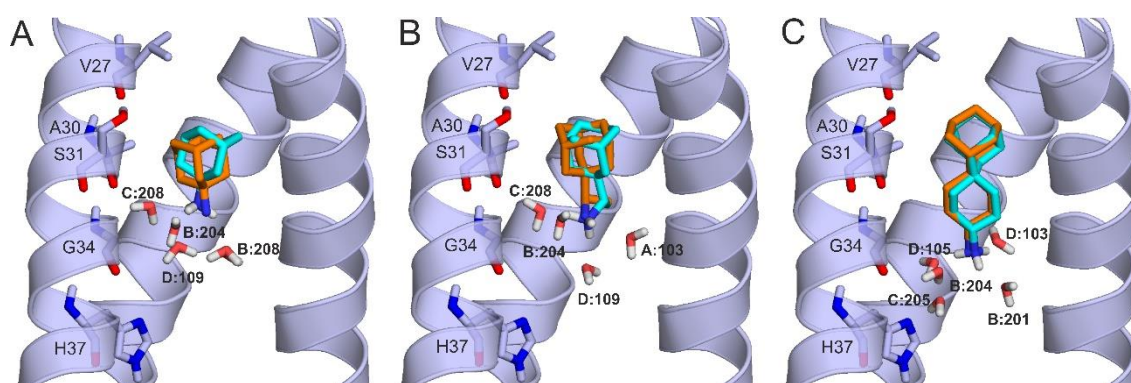
A rankek esetében látható, hogy vagy csak egy rank keletkezett, vagy a legjobb kötési energiához tartozó rank tartalmazta a szintén legjobb RMSD-jű kötési módot. A dokkolást az amantadin esetében az apo formájú M2A targetre is elvégeztük, hasonlóan jó eredményt kapva (**10. ábra C**, **10. táblázat**). A **8.** és **10. táblázatok** összehasonlításából látszik, hogy a megfelelően kezelt vízmolekulák egyébként azonos dokkolási beállítások mellett a nem elfogadható eredményeket kiválóná változtatják. A **9. táblázatból** pedig látható, hogy ha rendelkezésre állnak kísérletes víz oxigén pozíciók az még önmagában nem garantálja az eredmények javulását, két okból: (1) csak a víz oxigének pozíciói adottak, és a hidrogén atomok hiánya miatt azok orientációja nem, (2) a krisztallográfiás elektronsűrűségi térkép asszignációjának az ismert limitációi [1,18,154–161] hiányzó, vagy túl sok (overfitting) víz molekulát eredményezhetnek. A krisztallizációs artefaktumok [154] és a **9. táblázatban** ismertetett közeli kontaktok is a kísérletes szerkezet hibái közé tartoznak. Mindezek szükségessé teszik a kísérletes vízszerkezet robosztus módszerrel végzett energia minimalizációját nem csak az M2A esetében, hanem általánosságban is a gyógyszertervezés során. Valódi gyógyszer szkrínelési projekteknél [10,11] nincs az összes target és a rá tervezett ligandumok,

valamint interfész víz molekulák komplex szerkezetének kísérletes meghatározására lehetőség. Sokszor víz és ligandum mentes apo célpont fehérje kísérletes (vagy homológia modellezett) szerkezet az egyetlen kiindulási pont. Így a gyógyszer kötődésének összes említett szereplőjét egy komplex szerkezetté felépíteni nagy kihívást jelent a gyógyszertervezési projektekben [39]. Ezen kihívás megválaszolására alkottuk a HydroDock nevű módszert, és validáltuk az M2A targeten. A HydroDock öt lépésben a nulláról képes egy gyógyszer-kötött hidratált komplexet előállítani. Az első lépés egy gyors dokkolási eljárás, amelynek az eredményei a **8. táblázatban** láthatók. A második lépésben a hidrát szerkezetét építettük meg a célpontnak a MobyWat [17,18] program segítségével, a **9. táblázatban** látható, hogy 10-ből 9 víz oxigénjének a pozícióját sikeresen prediktálta a program 1,0 Å távolságon belül. A prediktált hidrátszerkezet a közeli kontaktoktól mentes volt, a Refinement R prokoll szerint láttuk el hidrogén atomokkal. A harmadik lépésben, az első két lépés eredményeit egyesítettük, a szárazon dokkolt ligandum kötési módot, a célpont fehérjét és a prediktált víz szerkezetet közös koordináta rendszerbe helyeztük, és a ligandummal átfedő vízpozíciókat töröltük a MobyWat program Editing módjával. Az így kapott szerkezeteket a negyedik lépésben MD szimulációnak vetettük alá, több száz ligandum konformációt alkotva (konformációs pool, **5. táblázat**). Az ötödik lépésben ebből a konformációs poolból statisztikai módszerekkel kiválasztjuk a reprezentatív ligandum szerkezetet, amely az általunk javasolt végső kötési mód (**11. táblázat, 11. ábra**).

11. Táblázat A HydroDock protokoll eredményeként kapott reprezentatív kötési módok összehasonlítása a krisztallográfiás ligandum pozíciókkal az M2A target esetében.

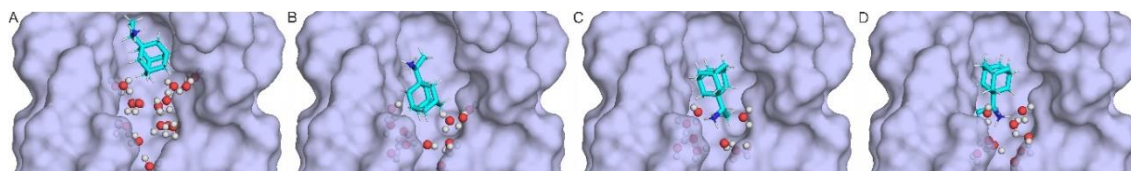
Ligandum	M2A konformáció	Reprezentatív szerkezet RMSD értéke (Å)	Átlag RMSD (Å)	SD RMSD (Å)
amantadin	Holo	0,7	1,8	0,7
amantadin	Apo	1,1	1,9	0,5
rimantadin	Apo	4,0	2,0	0,7
rimantadin	Apo	1,5	1,8	0,6
spiro-adamantyl-amin	Holo	2,6	1,7	0,9
spiro-adamantyl-amin	Apo	0,3	1,1	0,7

Az egyezések a krisztallográfias ligandum pozícióval a **11. táblázatban** és a **11. ábrán** láthatók. Kis molekulákról van szó (**1. ábra**), ezért rövid MD szimulációk alkalmazása is elégnek bizonyult, ezek részletei az **5. táblázatban** tekinthetők meg. A négy hélix a ligandumok mozgási terét behatárolták, így a konformációs pool tagjai egymástól nem tértek el nagyban a pozíciójukat tekintve, ez megkönnyíti a reprezentatív szerkezet kiválasztását. Ha ezeknél nagyobb, több flexiós ponttal rendelkező ligandumok a targetek felszínére kötődnek akkor hosszabb szimulációs idő válhat szükségessé [11]. A végső eredmények mindhárom esetben a kísérletes pozíciókkal [65] kitűnő egyezést mutatnak.



11. ábra A HydroDock által számított (türkíz) és a kísérletes (narancssárga) kötési módok összehasonlítása az M2A target (szürke szalag ábrázolás) esetében. A kölcsönható víz molekulák pálcika ábrázolással szerepelnek az ábrán és a 6BKK szerinti számozással láttuk el őket, a kölcsönható aminosavakat is pálcika ábrázolással tüntettük fel. A ligandumok sorrendje a következő: A) amantadin, B) rimantadin és C) spiro-adamantyl-amin.

A HydroDock negyedik lépésében (MD szimuláció), a ligandum kötési módok nagymértékű átrendeződésen mentek át, a második lépésben prediktált víz molekuláknak köszönhetően (**12. ábra**).

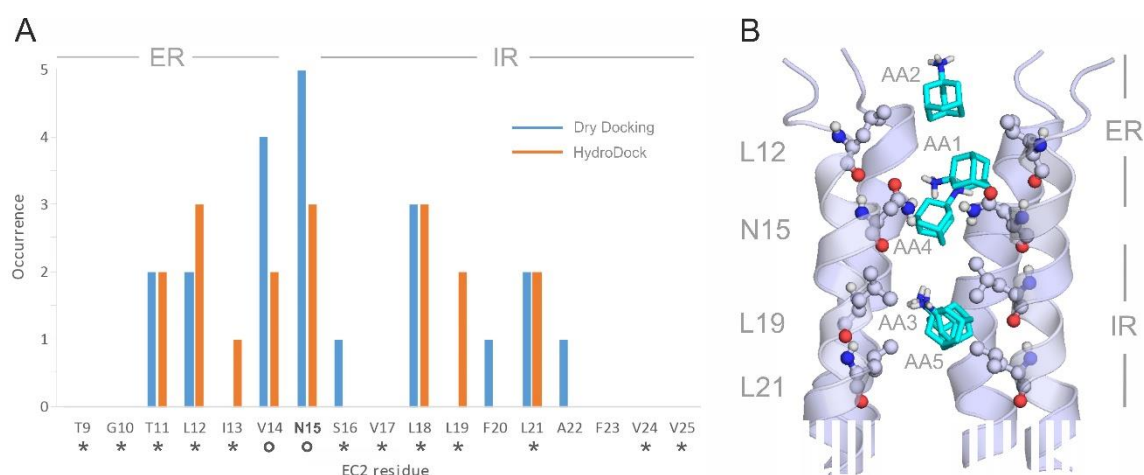


12. ábra A rimantadin (türkíz pálcikák) MD szimulációja az M2A ionsatornában (szürke felszíni ábrázolás). Az MD szimuláció A) 0., B) 1., C) 100. és D) reprezentatív frame-je. A rimantadin kezdetben fejjel lefelé helyezkedik el a csatornában, majd a szimuláció előrehaladtával átfordul 180 fokban a vízszintes tengelye körül, közben a csatorna belseje

felé vándorolva. Mindeközben a víz molekulák (piros-fehér gömbök) átrendeződnek úgy, hogy a rimantadin protonált amino csoportja számára egy ideális befogadó közeget biztosítsanak.

A **10. B ábra** és a **11. ábra** összehasonlításából látható, hogy a víz molekulák „horgonyzó” hatása amennyiben nem érvényesül a dokkolási eredmény téves. A HydroDock 4. lépésében a ligandumok a környező víz molekulákkal hidrogénhid kötési hálózatot alkottak (**12. ábra**), a hidrogénhidak a protonált amino csoport hidrogénjei és a víz molekulák oxigénjei között alakult ki. Ezáltal a krisztallográfiás kötési móddal megegyező pozíciót vettek fel. Érdekeség, hogy a rimantadin a krisztallográfiás kötési mód mellett egy alternatív fej-farok kötési módot is felvett, ami hozzájárul a **11. táblázat**ban látható magasabb RMSD értékéhez.

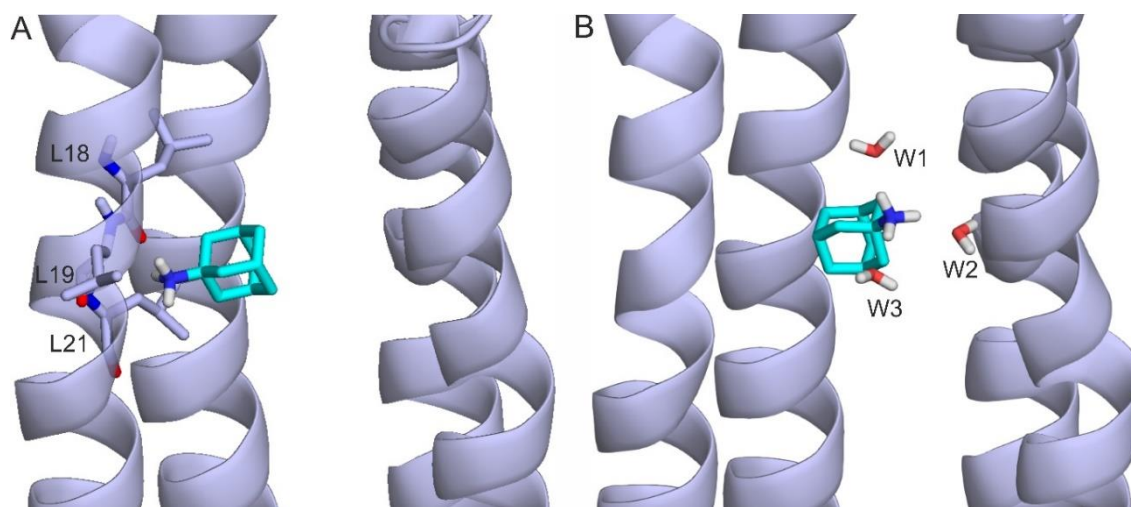
Az M2A targeten elért sikerek alapján úgy döntöttünk, hogy kiterjesztjük a HydroDock módszer használatát egy új rendszerre, az EC2-re (**1. ábra**). Kísérletes validációnak használtuk a kutatócsoport eredményeit, akik közölték a szilárd fázisú NMR szerkezetét is az EC2-nek (7K3G, [123]). A kutatócsoport NMR egy fluorozott amantadin származék és az EC2 kölcsönhatását vizsgálta NMR készülékkel, kémiai eltolódásos módszerrel. A kölcsönható aminosavak feltérképezésére dokkolást is használtak, az extravirális bemenettől egészen a poláris N15 aminosavig (**1. ábra**). A csoport apoláris belépő aminosavakat T11...13 azonosított NMR segítségével (**13. ábra**, csillagok) és például a poláris N15 aminosavat dokkolással (**13. ábra**, üres kör). A fluorozott amantadin származék nem tér el jelentősen az amantadintól, mindkét molekula rendelkezik egy nagy hidrofób fejcsoporttal és egy pozitív töltésű protonált amino csoporttal, ezért a két esetben hasonló kötési mód feltételezhető.



13. ábra A) Az EC2 aminosavak az 5 amantadin (türkíz pálcikák) kötési móddal való interakcióinak előfordulása (oszlopok), a száraz dokkolás után (kék oszlopok, **3. táblázat**) és a HydroDock után (narancssárga oszlopok, **6. táblázat**). A csillagok és az üres körök azokat az aminosavakat említik amelyeket kísérletesen NMR-rel, illetve dokkolással azonosított egy korábbi tanulmány [123], ebben a sorrendben. A csatorna belépési kötőrégiója (ER) és a csatorna belsejének kötőrégiója (IR) látszanak az ábrán. B) Az amantadin öt reprezentatív kötési módja AA1...5 (**6. táblázat**), az EC2 ioncsatornán (szürke szalag ábrázolás, alul elvágva). A kölcsönható aminosavakat gömb ábrázolással mutatjuk, és a 7K3G szerkezet szerinti nevezéktant használtuk.

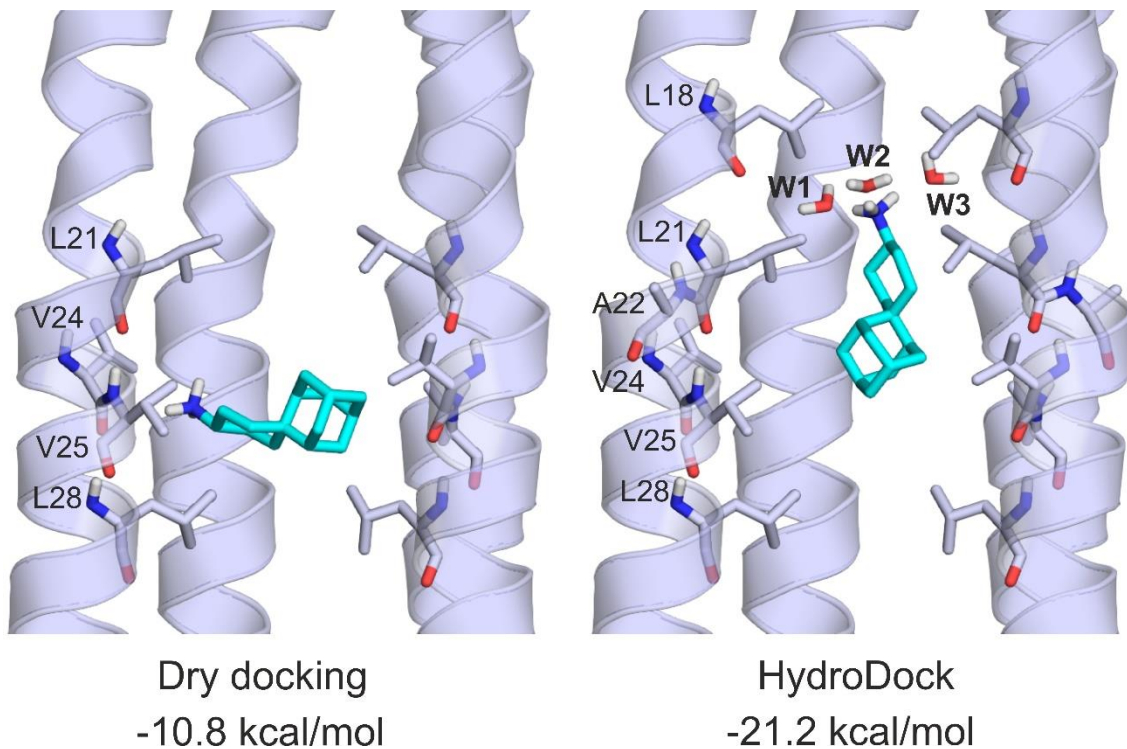
A három ligandum kötődését az EC2 csatornához a HydroDock segítségével állítottuk elő, a csatorna apo konformációját használva célpontként (7K3G). A kölcsönható aminosavakat a száraz dokkolás (**3. táblázat**) és a HydroDock után (**6. táblázat**) is listáztuk, valamint a **13. ábrán** is láthatók ezek az amantadin esetében 5 kiindulási szerkezet, 5 reprezentatív konformációt eredményezett (a 3. és az 5. majdnem teljesen átfed). A HydroDock által megtalált reprezentatív kötési módok jó egyezést mutatnak a kölcsönható aminosavak előfordulásában az NMR-alapú tanulmányban közöltekkel [123] (**13. ábra**). Az eredmények alapján két kötőrégió különböztethető meg az EC2 csatornán, az egyik az extravirális oldalról egy bemeneti régió, valamint a csatorna belseje felé egy belső kötési régió, a kettőt az N15 aminosav választja el, amelynek az oldallánca a csatorna belseje felé helyezkedik el. A dokkolás során a belső kötési régiót (IR) csak akkor sikerült elérni, ha az N15 oldallancát flexibilisnek vettük, és elmozoghatott, ez arra enged következtetni, hogy a kötési mechanizmus szempontjából fontos szerepe van az N15 aminosavnak. Az NMR-alapú tanulmány is erre a következtetésre jutott, és megállapították, hogy a kis molekuláknak az N15 felé nagy affinitást kell mutatniuk a csatornába történő belépés során [123]. Az M2A esetében ismertettekhez hasonlóan, az EC2 ioncsatorna ligandum kötésében is fontos szerepet játszanak a víz molekulák, ez látható a víz molekula nélküli, száraz dokkolási eredmények és a HydroDock utáni eredmények különbségén a **13. ábrán** a kék és narancssárga oszlopokat összehasonlítva. Az AA1,2 és 4 kötési módok az ER kötő régió L12 aminosavon centralizált hidrofób övszerű régióhoz kötődik, míg az AA3 és 5 kötési módok az IR régió L19 és L21 aminosavak által alkotott hidrofób övhöz. A szárazon dokkolt kötési módok és a HydroDock reprezentatív szerkezetei közti különbséget a **14. ábra** szemlélteti, a

ligandum protonált amino csoportja körüli hidrogén kötési hálózat megváltozik a víz molekulák hatására.



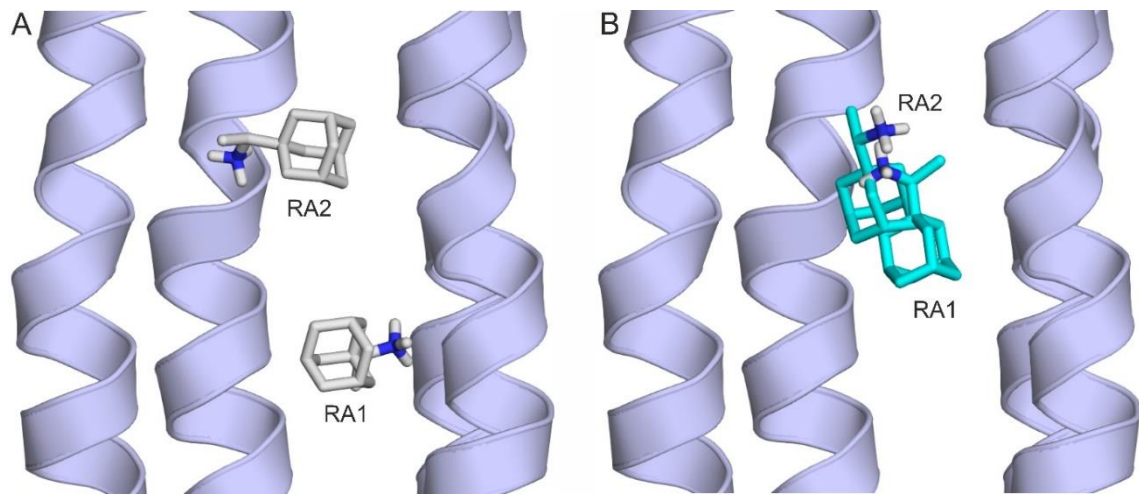
14.ábra Az amantadin (türkíz pálcikák) szárazon dokkolt és HydroDock reprezentatív szerkezete az EC2 csatornához (szürke szalag ábrázolás) kötődve. A kölcsönható aminosavak pálcika ábrázolással vannak feltüntetve és a 7K3G szerinti elnevezésükkel jelölve, a víz molekulák piros-fehér pálcika ábrázolással láthatók.

A hidrofób övek a kötési régiókon belül a ligandumok hidrofób fejrészét fogadják be, amíg az interfész víz molekulák a ligandumok csatornán belüli orientációját irányítják, az M2A-hoz hasonlóan. A spiro-adamantyl-amin első, SA1 nevű kötési módja esetében a szárazon dokkolt szerkezeten a molekula spiro-adamantyl részét egy több aminosavból álló hidrofób gyűrűrendszer fogadja be (**15. ábra**). A hidrofób interakciók azonban önmagukban nem elegendők a ligandum végső orientációjába irányításához, a száraz dokkolás során a molekula az EC2 tengelyére merőlegesen állt, az egyetlen hidrogén kötését pedig a V24 aminosav amid csoportjával alakította ki. A HydroDock explicit víz molekulái az EC2 tengelyével párhuzamos orientációba irányította a ligandumot, a protonált amino csoportja így már három hidrogén kötés is kialakított 1-1 víz molekulával, amelyek az ioncsatorna belső fala és a ligandum között képeztek hidat. A hidaló víz molekulák az SA számított kötési energiáját az EC2 csatornához csaknem megduplázták.



15. ábra A spiro-adamantyl-amin (türkiz pálcikák) kötődése az EC2 ioncsatornához (szürke szalag ábrázolás). Bal oldalt a szárazon dokkolt kötési mód látható, míg jobb oldalt az abból kiindult, végső reprezentatív HydroDock kötési mód. A kölcsönható aminosavakat a 7K3G szerinti elnevezésükkel jeleztük és pálcika ábrázolással mutatjuk. A víz molekulák piros-fehér pálcika ábrázolással szereplnek az ábrán. Az ábra alján a Lennard-Jones kölcsönhatási energiákat a Módszerek fejezetben található képlettel számítottuk.

A spiro-adamantyl-amin esetéhez hasonló megállapítások vonhatók le a víz molekulák ligandum kötésben játszott szerepéről a másik két ligandum esetében is (**14.** és **16. ábrák**). Az amantadin (**13. ábra**) és a rimantadin (**16. B ábra**) esetében is két különböző bemeneti szárazon dokkolt szerkezetből átfedő, nagyon hasonló eredmények születtek a HydroDock reprezentatív szerkezeteiként.



16. ábra A rimantadin (szürke és türkiz pálcikák) kötődése az EC2 ioncsatornához (szürke szalag ábrázolás). A) a szárazon dokkolt eredmények eltérő bemeneti szerkezetet szolgáltatnak a HydroDock módszer kiindulásának. B) A HydroDock reprezentatív kötési módjai az A ábra bemeneti szerkezeteiből kiindulva egymással átfednek.

VI. Tézispontok

A célkitűzésekben megfogalmazott törekvéseinknek megfelelően és az előzőekben vázolt részletes eredmények alapján doktori értekezésem legfontosabb eredményeit az alábbi tézispontokban foglalom össze.

1. Előállítottuk a bergamottin és az SL-bergamottin CYP3A4 enzimmel alkotott komplexeinek atomi felbontású szerkezeteit, a kötődési mechanizmusok sarokköveit.
2. A bergamottin és az SL-bergamottin atomi felbontású kötési módjainak (1. pont) ismeretében összehasonlító szerkezeti magyarázatot adtunk *in vitro* hatásukra. A kísérletes eredményekkel összhangban, a kedvezőbb kötési energiájú SL-bergamottin *in vitro* erősebben gátolja a CYP3A4 enzim működését a bergamottinnál.
3. Kimutattuk, hogy ligandumok kötésében a vízmolekulák megfelelő parciális töltésrendszere és hidrogén atomjaik pontos orientációjának használata elengedhetetlen a célpont-ligandum komplexek atomi felbontású szerkezetinek számításakor, azaz a dokkolás pontos elvégzéséhez.
4. Szisztematikus vizsgálatokkal meghatároztuk a molekulamechanikai számítások protokollját és paramétereit a száraz célpontra dokkolt ligandumok helyzetének finomításához.
5. HydroDock néven új protokoll került kidolgozásra, amely a ligandum dokkolás egyik legnagyobb korlátját, az explicit vízmolekulák hiányát kezeli influenza A és SARS-CoV-2 virális ioncsatorna célpontok esetében. Az eljárás a szárazon elvégzett dokkolás és a célpont explicit vizes hidratációjának ötvözésével (a 3. és 4. pontok tanulságait felhasználva) állítja elő a hidratált célpont-ligandum komplexeket.

VII. Összefoglalás

A PhD munkám során a számítógépes dokkolási módszerek alkalmazásánál kurrens célpontokra végzünk számításokat, amelyek sokakat érintő gyógyszerinterakciók és szintén sok életet érintő betegségekben, például a daganatok egyes fajtáinál fontosak, például a már megjelent tanulmányunkban az SL-bergamottin humán méhnyak daganatos sejtekre kifejtett szelektív toxikus hatása. A számítógépes dokkolás módszerét ezek fényében a forgalomban lévő gyógyszerek 80%-ának metabolizmusában érintett CYP3A4 enzimen alkalmaztuk, amely esetében egy ismert, erős gátló gyógyszer, a ketokonazol dokkolásával validáltuk a módszerünket, az elérhető kísérletes röntgen kristallográfiás komplex szerkezethez viszonyítva. Majd a validáció sikerességét követően egy új vegyület, az SL-bergamottin kötődését vizsgáltuk a módszerrel. Sikerült az *in vitro* kísérletes eredményekkel összhangban álló magyarázatot adnunk arra, hogy az anyavegyületénél, a bergamottinnál miért erősebb gátlója az SL-bergamottin a CYP3A4 enzimnek. Ezen felül, a kötődési mechanizmussal feltárt új ismeretek segítséget nyújthatnak a gyógyszertervezés során, ugyanis a legtöbb esetben már előre próbálják felderíteni a kutatók az új gyógyszerjelölt molekula lehetséges off-target kölcsönhatásait a szervezetben. A CYP3A4-hez való kötődés nem tűnik érzékenynek a szerkezeti vízmolekulákra, ezért ott a meglévő formában alkalmaztuk a számítógépes dokkolást, de ugyan ez a megközelítés nem lehetett volna sikeres a virális ioncsatornák esetében. Az influenza A vírus transzmembrán ioncsatornáján (M2A, [65]) ható gyógyszerek (amantadin, rimantadin) és egy másik rokon szerkezetű vegyület, a spiro-adamantyl-amin kötődését, majd repozíciójuknak lehetőségét vizsgáltuk a SARS-CoV-2 vírus ellen számítógépes módszerekkel. A két virális ioncsatorna esetében szembenéztünk a dokkolási eljárások legnagyobb korlátját jelentő indukált illeszkedéssel és a ligandum kötődésében részt vevő vízmolekulák helyzetének és parciális töltéseloszlásának pontos meghatározásával. A probléma kezelésére célul kitűzött hidratált célpont-ligandum komplex szerkezet előállítását egy új protokollal, a HydroDock-kal valósítottuk meg, amely jól ismert és népszerű, ingyenesen hozzáférhető számítógépes programcsomagok újszerű kombinálásán és alkalmazásán alapul. A HydroDock protokoll fejlesztése során megmutattuk, hogy bizonyos gyógyszer-célpontok esetében a száraz dokkolási eljárások megtévesztő eredményeket adnak, nem lehetnek alkalmasak egy gyógyszertervezési projekt kiindulási lépésének. A vízmolekulák megfelelő pozíciójának megtalálása, a

hidrogén atomjaik jó orientációba állítása és a helyes parciális töltésrendszer megválasztása után a dokkolások eredménye azonban a röntgen krisztallográfiás kísérletes komplex szerkezetekkel kiváló egyezést mutatott. A kifejlesztett protokoll, az influenza A víruson végzett sikeres validációját követően pedig az úgynevezett target-based drug design módszert alkalmazva a három amantadin származék repozícióját végeztük el a jelenleg sajnálatosan aktuális SARS-CoV-2 vírus E proteinjére. A víz molekuláknak ligandum kötődésében játszott szerepének tisztázására számos esetben szükség merül fel [39,65,162]. Így ez alapján reményeink szerint a HydroDock módszer a jövőbeli gyógyszertervezési projektek részét képezheti.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Carugo O: **Correlation between occupancy and B factor of water molecules in protein crystal structures.** *Protein Eng* 1999, **12**:1021–1024.
2. Carugo O: **How large B-factors can be in protein crystal structures.** *BMC Bioinformatics* 2018, **19**:61.
3. Carugo O: **Mobility of water and of protein atoms at the protein-water interface, monitored by anisotropic atomic displacement parameters, are largely uncorrelated.** *Amino Acids* 2020, **52**:435–443.
4. Finney JL: **The organization and function of water in protein crystals.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1977, **278**:3–32.
5. Halle B, Helliwell JR, Kornyshev A, Engberts JBFN: **Protein hydration dynamics in solution: A critical survey.** *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2004, **359**:1207–1224.
6. Halle B: **Biomolecular cryocrystallography: Structural changes during flash-cooling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:4793–4798.
7. Yuriev E, Agostino M, Ramsland PA: **Challenges and advances in computational docking: 2009 in review.** *J Mol Recognit* 2011, **24**:149–164.
8. Sun Z, Liu Q, Qu G, Feng Y, Reetz MT: **Utility of B-Factors in Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability.** *Chem Rev* 2019, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00290.
9. Antunes DA, Devaurs D, Kavraki LE: **Understanding the challenges of protein flexibility in drug design.** *Expert Opin Drug Discov* 2015, **10**:1301–1313.
10. Bálint M, Horváth I, Mészáros N, Hetényi C: **Towards Unraveling the Histone Code by Fragment Blind Docking.** *Int J Mol Sci* 2019, **20**:422.
11. Bálint M, Jeszenői N, Horváth I, Van Der Spoel D, Hetényi C: **Systematic exploration of multiple drug binding sites.** *J Cheminform* 2017, **9**.
12. Pastor M, Cruciani G, Watson KA: **A strategy for the incorporation of water molecules present in a ligand binding site into a three-dimensional quantitative structure - Activity relationship analysis.** *J Med Chem* 1997, **40**:4089–4102.
13. Brysbaert G, Blossey R, Lensink MF: **The inclusion of water molecules in residue interaction networks identifies additional central residues.** *Front Mol Biosci* 2018, **5**:1–7.
14. Verdonk ML, Chessari G, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Nissink JWM, Taylor RD, Taylor R: **Modeling water molecules in protein-ligand docking using GOLD.** *J Med Chem* 2005, **48**:6504–6515.
15. Bodnarchuk MS: **Water, water, everywhere... It's time to stop and think.** *Drug Discov Today* 2016, **21**:1139–1146.
16. Jeszenői N, Schilli G, Bálint M, Horváth I, Hetényi C: **Analysis of the influence of simulation parameters on biomolecule-linked water networks.** *J Mol Graph Model* 2018, **82**:117–128.
17. Jeszenői N, Bálint M, Horváth I, Van Der Spoel D, Hetényi C: **Exploration of Interfacial Hydration Networks of Target-Ligand Complexes.** *J Chem Inf Model* 2016, **56**:148–158.
18. Jeszenői N, Horváth I, Bálint M, Van Der Spoel D, Hetényi C: **Mobility-based prediction of hydration structures of protein surfaces.** *Bioinformatics* 2015, **31**:1959–1965.
19. Ekroos M, Sjögren T: **Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome**

- P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:13682–13687.**
20. Shahrokh K, Orendt A, Yost GS, Cheatham TE: **Quantum mechanically derived AMBER-compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle.** *J Comput Chem* 2012, **33**:119–133.
 21. Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Zsidó BZ, Hetényi C, Mladěnka P, Horký P, Pour M, Poór M: **Testing the pharmacokinetic interactions of 24 colonic flavonoid metabolites with human serum albumin and cytochrome P450 enzymes.** *Biomolecules* 2020, **10**.
 22. Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Ungvári O, Bakos É, Kuffa K, Bencsik T, Zsidó BZ, Hetényi C, Telbisz Á, Özvegy-Laczka C, et al.: **Effects of chrysin and its major conjugated metabolites chrysin-7-sulfate and chrysin-7-glucuronide on cytochrome P450 enzymes and on OATP, P-gp, BCRP, and MRP2 transporters.** *Drug Metab Dispos* 2020, **48**:1064–1073.
 23. Bezirtzoglou EEV: **Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its probiotic profile.** *Microb Ecol Heal Dis* 2012, **23**:1–10.
 24. Manikandan P, Nagini S: **Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review.** *Curr Drug Targets* 2017, **19**:38–54.
 25. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B: **Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact.** *Drug Metab Rev* 2009, **41**:89–295.
 26. Zanger UM, Schwab M: **Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation.** *Pharmacol Ther* 2013, **138**:103–141.
 27. van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ: **Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors.** *Cancer Treat Rev* 2009, **35**:692–706.
 28. McMillan DM, Tyndale RF: **CYP-mediated drug metabolism in the brain impacts drug response.** *Pharmacol Ther* 2018, **184**:189–200.
 29. Nebert DW, Russell DW: **Clinical importance of the cytochromes P450.** *Lancet* 2002, **360**:1155–1162.
 30. Hennan JK, Huang J, Barrett TD, Driscoll EM, Willens DE, Park AM, Crofford LJ, Lucchesi BR: **Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries.** *Circulation* 2001, **104**:820–825.
 31. Tuder RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF: **The pathobiology of pulmonary hypertension: Endothelium.** *Clin Chest Med* 2001, **22**:405–418.
 32. Zsidó BZ, Balog M, Erős N, Poór M, Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Hetényi C, Nagane M, Hideg K, Kálai T, et al.: **Synthesis of spin-labelled bergamottin: A potent CYP3A4 inhibitor with antiproliferative activity.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**.
 33. Samuels ER, Sevrioukova I: **Inhibition of Human CYP3A4 by Rationally Designed Ritonavir-Like Compounds: Impact and Interplay of the Side Group Functionalities.** *Mol Pharm* 2018, **15**:279–288.
 34. Samuels ER, Sevrioukova IF: **Rational design of CYP3A4 inhibitors: A one-atom linker elongation in ritonavir-like compounds leads to a marked improvement in the binding strength.** *Int J Mol Sci* 2021, **22**:1–23.
 35. Row EC, Brown SA, Stachulski A V., Lennard MS: **Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4.** *Org Biomol Chem* 2006, **4**:1604–1610.
 36. Dutkiewicz Z, Mikstacka R: **Structure-Based Drug Design for Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors.** *Bioinorg Chem Appl* 2018, **2018**.

37. Brändén G, Sjögren T, Schnecke V, Xue Y: **Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects.** *Drug Discov Today* 2014, **19**:905–911.
38. Patel B, Firkin CR, Snape EW, Jenkin SL, Brown D, Chaffey JGK, Hopes PA, Reens CD, Butters M, Moseley JD: **Process development and scale-up of AZD7545, a PDK inhibitor.** *Org Process Res Dev* 2012, **16**:447–460.
39. Zsidó BZ, Hetényi C: **The role of water in ligand binding.** *Curr Opin Struct Biol* 2021, **67**:1–8.
40. Susannah S, Ando N: **X-rays in the Cryo-EM Era: Structural Biology’s Dynamic Future.** *Biochemistry* 2018, **57**:277–285.
41. Zsidó BZ, Hetényi C: **Molecular structure, binding affinity, and biological activity in the epigenome.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**:1–40.
42. Weichenberger CX, Afonine P V., Kantardjieff K, Rupp B: **The solvent component of macromolecular crystals.** *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2015, **71**:1023–1038.
43. Koruza K, Mahon BP, Blakeley MP, Ostermann A, Schrader TE, McKenna R, Knecht W, Fisher SZ: **Using neutron crystallography to elucidate the basis of selective inhibition of carbonic anhydrase by saccharin and a derivative.** *J Struct Biol* 2019, **205**:147–154.
44. Malaspina LA, Wieduwilt EK, Bergmann J, Kleemiss F, Meyer B, Ruiz-López MF, Pal R, Hupf E, Beckmann J, Piltz RO, et al.: **Fast and Accurate Quantum Crystallography: From Small to Large, from Light to Heavy.** *J Phys Chem Lett* 2019, **10**:6973–6982.
45. Nittinger E, Schneider N, Lange G, Rarey M: **Evidence of water molecules - A statistical evaluation of water molecules based on electron density.** *J Chem Inf Model* 2015, **55**:771–783.
46. Schrödinger: **WaterMap.** 2020,
47. Nittinger E, Gibbons P, Eigenbrot C, Davies DR, Maurer B, Yu CL, Kiefer JR, Kuglstatter A, Murray J, Ortwine DF, et al.: **Water molecules in protein–ligand interfaces. Evaluation of software tools and SAR comparison.** *J Comput Aided Mol Des* 2019, **33**:307–330.
48. Schöning-Stierand K, Diedrich K, Fährrolfes R, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, Steinegger R, Rarey M: **ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces.** *Nucleic Acids Res* 2020, doi:10.1093/nar/gkaa235.
49. Nittinger E, Flachsenberg F, Bietz S, Lange G, Klein R, Rarey M: **Placement of Water Molecules in Protein Structures: From Large-Scale Evaluations to Single-Case Examples.** *J Chem Inf Model* 2018, **58**:1625–1637.
50. Wei W, Luo J, Waldispühl J, Moitessier N: **Predicting Positions of Bridging Water Molecules in Nucleic Acid-Ligand Complexes.** *J Chem Inf Model* 2019, **59**:2941–2951.
51. Li Y, Gao YD, Holloway MK, Wang R: **Prediction of the Favorable Hydration Sites in a Protein Binding Pocket and Its Application to Scoring Function Formulation.** *J Chem Inf Model* 2020, doi:10.1021/acs.jcim.9b00619.
52. García-Sosa AT, Mancera RL, Dean PM: **WaterScore: A novel method for distinguishing between bound and displaceable water molecules in the crystal structure of the binding site of protein-ligand complexes.** *J Mol Model* 2003, **9**:172–182.
53. Rudling A, Orro A, Carlsson J: **Prediction of Ordered Water Molecules in Protein Binding Sites from Molecular Dynamics Simulations: The Impact of**

- Ligand Binding on Hydration Networks.** *J Chem Inf Model* 2018, **58**:350–361.
54. Truchon JF, Pettitt BM, Labute P: **A cavity corrected 3D-RISM functional for accurate solvation free energies.** *J Chem Theory Comput* 2014, **10**:934–941.
55. Hu B, Lill AM: **WATsite: Hydration Site Prediction Program with PyMOL Interface.** *J Comput Chem* 2014, **35**:1255–1260.
56. Masters MR, Mahmoud AH, Yang Y, Lill MA: **Efficient and Accurate Hydration Site Profiling for Enclosed Binding Sites.** *J Chem Inf Model* 2018, **58**:2183–2188.
57. Pradhan MR, Nguyen MN, Kannan S, Fox SJ, Kwok CK, Lane DP, Verma CS: **Characterization of Hydration Properties in Structural Ensembles of Biomolecules.** *J Chem Inf Model* 2019, **59**:3316–3329.
58. Bucher D, Stouten P, Triballeau N: **Shedding Light on Important Waters for Drug Design: Simulations versus Grid-Based Methods.** *J Chem Inf Model* 2018, **58**:692–699.
59. Jeszenői N, Schilli G, Bálint M, Horváth I, Hetényi C: **Analysis of the influence of simulation parameters on biomolecule-linked water networks.** *J Mol Graph Model* 2018, **82**:117–128.
60. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC: **GROMACS: Fast, flexible, and free.** *J Comput Chem* 2005, **26**:1701–1718.
61. Zhong H, Wang Z, Wang X, Liu H, Li D, Liu H, Yao X, Hou T: **Importance of a crystalline water network in docking-based virtual screening: A case study of BRD4.** *Phys Chem Chem Phys* 2019, **21**:25276–25289.
62. Hu X, Maffucci I, Contini A: **Advances in the treatment of explicit water molecules in docking and binding free energy calculations.** *Curr Med Chem* 2018, **25**.
63. Maffucci I, Hu X, Fumagalli V, Contini A: **An efficient implementation of the Nwat-MMGBSA method to rescore docking results in medium-throughput virtual screenings.** *Front Chem* 2018, **6**:1–14.
64. Lu Q, Qi LW, Liu J: **Improving protein-ligand binding prediction by considering the bridging water molecules in Autodock.** *J Theor Comput Chem* 2019, **18**:1–12.
65. Thomaston JL, Polizzi NF, Konstantinidi A, Wang J, Kolocouris A, Degrado WF: **Inhibitors of the M2 Proton Channel Engage and Disrupt Transmembrane Networks of Hydrogen-Bonded Waters.** *J Am Chem Soc* 2018, **140**:15219–15226.
66. Bhattarai S, Pippel J, Scaletti E, Idris R, Freundlieb M, Rolshoven G, Renn C, Lee SY, Abdelrahman A, Zimmermann H, et al.: **2-Substituted α,β -Methylene-ADP Derivatives: Potent Competitive Ecto-5'-nucleotidase (CD73) Inhibitors with Variable Binding Modes.** *J Med Chem* 2020, **63**:2941–2957.
67. Geschwindner S, Ulander J: **The current impact of water thermodynamics for small-molecule drug discovery.** *Expert Opin Drug Discov* 2019, **14**:1221–1225.
68. Maurer M, Oostenbrink C: **Water in protein hydration and ligand recognition.** *J Mol Recognit* 2019, **32**:1–19.
69. Ratkova EL, Dawidowski M, Napolitano V, Dubin G, Fino R, Ostertag MS, Sattler M, Popowicz G, Tetko I V.: **Water envelope has a critical impact on the design of protein-protein interaction inhibitors.** *Chem Commun* 2020, **56**:4360–4363.
70. Chen D, Li Y, Zhao M, Tan W, Li X, Savidge T, Guo W, Fan X: **Effective lead optimization targeting the displacement of bridging receptor-ligand water molecules.** *Phys Chem Chem Phys* 2018, **20**:24399–24407.

71. Kunstmann S, Gohlke U, Broecker NK, Roske Y, Heinemann U, Santer M, Barbirz S: **Solvent Networks Tune Thermodynamics of Oligosaccharide Complex Formation in an Extended Protein Binding Site.** *J Am Chem Soc* 2018, **140**:10447–10455.
72. Li A, Gilson MK: **Protein-ligand binding enthalpies from near-millisecond simulations: Analysis of a preorganization paradox.** *J Chem Phys* 2018, **149**:1–15.
73. Krimmer SG, Betz M, Heine A, Klebe G: **Methyl, ethyl, propyl, butyl: Futile but not for water, as the correlation of structure and thermodynamic signature shows in a congeneric series of thermolysin inhibitors.** *ChemMedChem* 2014, **9**:833–846.
74. Wahl J, Smieško M: **Assessing the Predictive Power of Relative Binding Free Energy Calculations for Test Cases Involving Displacement of Binding Site Water Molecules.** *J Chem Inf Model* 2019, **59**:754–765.
75. Wahl J, Smieško M: **Thermodynamic Insight into the Effects of Water Displacement and Rearrangement upon Ligand Modifications using Molecular Dynamics Simulations.** *ChemMedChem* 2018, **13**:1325–1335.
76. Kairys V, Baranauskiene L, Kazlauskiene M, Matulis D, Kazlauskas E: **Binding affinity in drug design: experimental and computational techniques.** *Expert Opin Drug Discov* 2019, **14**:755–768.
77. Hüfner-Wulsdorf T, Klebe G: **Protein-Ligand Complex Solvation Thermodynamics: Development, Parameterization, and Testing of GIST-Based Solvent Functionals.** *J Chem Inf Model* 2020, **60**:1409–1423.
78. Balias TE, Fischer M, Stein RM, Adler TB, Nguyen CN, Cruz A, Gilson MK, Kurtzman T, Shoichet BK: **Testing inhomogeneous solvation theory in structure-based ligand discovery.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, **114**:E6839–E6846.
79. Sitkoff D, Sharp KA, Honig B: **Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models.** *J Phys Chem* 1994, **98**:1978–1988.
80. Abel R, Young T, Farid R, Berne BJ, Friesner RA: **Role of the active-site solvent in the thermodynamics of factor Xa ligand binding.** *J Am Chem Soc* 2008, **130**:2817–2831.
81. Genheden S, Mikulskis P, Hu L, Kongsted J, Söderhjelm P, Ryde U: **Accurate predictions of nonpolar solvation free energies require explicit consideration of binding-site hydration.** *J Am Chem Soc* 2011, **133**:13081–13092.
82. Zhang H, Yin C, Yan H, Van Der Spoel D: **Evaluation of Generalized Born Models for Large Scale Affinity Prediction of Cyclodextrin Host-Guest Complexes.** *J Chem Inf Model* 2016, **56**:2080–2092.
83. Bayden AS, Moustakas DT, Joseph-McCarthy D, Lamb ML: **Evaluating Free Energies of Binding and Conservation of Crystallographic Waters Using SZMAP.** *J Chem Inf Model* 2015, **55**:1552–1565.
84. Klamt A, Schüürmann G: **COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient.** *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1993, doi:10.1039/P29930000799.
85. Stewart JJP: **Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters.** *J Mol Model* 2013, **19**:1–32.
86. Horváth I, Jeszenői, Norbert MB, Gábor Paragi and Csaba Hetényi: **A Fragmenting Protocol with Explicit Hydration for Calculation of Binding Enthalpies of Target-Ligand Complexes at a Quantum Mechanical Level.** *Int*

- J Mol Sci* 2019, **20**.
87. Cheng F, Kovács IA, Barabási AL: **Network-based prediction of drug combinations**. *Nat Commun* 2019, **10**.
 88. Darby JF, Hopkins AP, Shimizu S, Roberts SM, Brannigan JA, Turkenburg JP, Thomas GH, Hubbard RE, Fischer M: **Water Networks Can Determine the Affinity of Ligand Binding to Proteins**. *J Am Chem Soc* 2019, **141**:15818–15826.
 89. Batra VK, Wilson SH: **Structure of a DNA polymerase abortive complex with the 8OG:dA base pair at the primer terminus**. *Commun Biol* 2020, **3**:8–11.
 90. Brysbaert G, Lorgouilloux K, Vranken WF, Lensink MF: **RINspector: A Cytoscape app for centrality analyses and DynaMine flexibility prediction**. *Bioinformatics* 2018, **34**:294–296.
 91. Maurer M, Hansen N, Oostenbrink C: **Comparison of free-energy methods using a tripeptide-water model system**. *J Comput Chem* 2018, **39**:2226–2242.
 92. Majewski M, Ruiz-Carmona S, Barril X: **An investigation of structural stability in protein-ligand complexes reveals the balance between order and disorder**. *Commun Chem* 2019, **2**.
 93. Schiebel J, Gaspari R, Wulsdorf T, Ngo K, Sohn C, Schrader TE, Cavalli A, Ostermann A, Heine A, Klebe G: **Intriguing role of water in protein-ligand binding studied by neutron crystallography on trypsin complexes**. *Nat Commun* 2018, **9**.
 94. Venkatakrishnan AJ, Ma AK, Fonseca R, Latorraca NR, Kelly B, Betz RM, Asawa C, Kobilka BK, Dror RO: **Diverse GPCRs exhibit conserved water networks for stabilization and activation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, **116**:3288–3293.
 95. Gianti E, Carnevale V, DeGrado WF, Klein ML, Fiorin G: **Hydrogen-Bonded Water Molecules in the M2 Channel of the Influenza A Virus Guide the Binding Preferences of AmmoniumBased Inhibitors**. *J Phys Chem B* 2015, **119**:1173–1183.
 96. Mucke HAM: **COVID-19 and the Drug Repurposing Tsunami**. *Assay Drug Dev Technol* 2020, **18**:211–214.
 97. Fu L, Ye F, Feng Y, Yu F, Wang Q, Wu Y, Zhao C, Sun H, Huang B, Niu P, et al.: **Both Boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease**. *Nat Commun* 2020, **11**:1–8.
 98. Kim J-W, Kim EJ, Kwon HH, Jung CY, Kim KC, Choe J-Y, Hong H-L: **Lopinavir-ritonavir versus hydroxychloroquine for viral clearance and clinical improvement in patients with mild to moderate coronavirus disease 2019**. *Korean J Intern Med* 2020, doi:10.3904/kjim.2020.224.
 99. Nutho B, Mahalapbutr P, Hengphasatporn K, Pattarangoon NC, Simanon N, Shigeta Y, Hannongbua S, Rungrotmongkol T: **Why are lopinavir and ritonavir effective against the newly emerged coronavirus 2019? Atomistic insights into the inhibitory mechanisms**. *Biochemistry* 2020, **59**:1769–1779.
 100. Horby PW, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Emberson J, Palfreeman A, Raw J, Elmahi E, Prudon B, et al.: **Lopinavir–ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial**. *Lancet* 2020, **396**:1345–1352.
 101. Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, Ruan L, Song B, Cai Y, Wei M, et al.: **A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19**. *N Engl J Med* 2020, **382**:1787–1799.
 102. Beck BR, Shin B, Choi Y, Park S, Kang K: **Predicting commercially available**

- antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model.** *Comput Struct Biotechnol J* 2020, **18**:784–790.
103. Wang J: **Fast Identification of Possible Drug Treatment of Coronavirus Disease-19 (COVID-19) through Computational Drug Repurposing Study.** *J Chem Inf Model* 2020, **60**:3277–3286.
 104. Eder J, Sedrani R, Wiesmann C: **The discovery of first-in-class drugs: Origins and evolution.** *Nat Rev Drug Discov* 2014, **13**:577–587.
 105. Moffat JG, Vincent F, Lee JA, Eder J, Prunotto M: **Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: An industry perspective.** *Nat Rev Drug Discov* 2017, **16**:531–543.
 106. Swinney DC, Anthony J: **How were new medicines discovered?** *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**:507–519.
 107. Lindsay MA: **Target discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**:831–838.
 108. Schenone M, Wagner BK, Clemons PA, Program B: **Biology and Drug Discovery.** *Nat Chem Biol* 2017, **9**:232–240.
 109. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Williams T, Latimer J, McNamee C, et al.: **Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations.** *Nat Rev Drug Discov* 2018, **18**:41–58.
 110. Ciliberto G, Mancini R, Paggi MG: **Drug repurposing against COVID-19: Focus on anticancer agents.** *J Exp Clin Cancer Res* 2020, **39**:1–9.
 111. Luo Y, Zhao X, Zhou J, Yang J, Zhang Y, Kuang W, Peng J, Chen L, Zeng J: **A network integration approach for drug-target interaction prediction and computational drug repositioning from heterogeneous information.** *Nat Commun* 2017, **8**.
 112. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, Hohmann E, Chu HY, Luetkemeyer A, Kline S, et al.: **Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report.** *N Engl J Med* 2020, **383**:1813–1826.
 113. Grein J, Ohmagari N, Shin D, Diaz G, Asperges E, Castagna A, Feldt T, Green G, Green ML, Lescure F-X, et al.: **Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19.** *N Engl J Med* 2020, **382**:2327–2336.
 114. Li G, De Clercq E: **Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV).** *Nat Rev Drug Discov* 2020, **19**:149–150.
 115. Ullrich S, Nitsche C: **The SARS-CoV-2 main protease as drug target.** *Bioorganic Med Chem Lett* 2020, **30**:127377.
 116. Dowden H, Munro J: **Trends in clinical success rates and therapeutic focus.** *Nat Rev Drug Discov* 2019, **18**:495–496.
 117. Harrison RK: **Phase II and phase III failures: 2013-2015.** *Nat Rev Drug Discov* 2016, **15**:817–818.
 118. Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite G, Pangalos MN: **Lessons learned from the fate of AstraZeneca’s drug pipeline: A five-dimensional framework.** *Nat Rev Drug Discov* 2014, **13**:419–431.
 119. Arrowsmith J: **Trial watch: Phase III and submission failures: 2007-2010.** *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**:87.
 120. Eichler HG, Pignatti F, Flamion B, Leufkens H, Breckenridge A: **Balancing early market access to new drugs with the need for benefit/ risk data: A mounting dilemma.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**:818–826.
 121. Guy RK, DiPaola RS, Romanelli F, Dutch R eE.: **Rapid repurposing of drugs for COVID-19.** *Science (80-)* 2020, **1**:1–9.
 122. Vaidyanathan G: **Scientists criticize use of unproven COVID drugs in India.**

- Nature* 2020, **587**:187–188.
123. Mandala V, McKay M, Shcherbakov A, Dregni A, Kolocouris A, Hong M: **Structure and Drug Binding of the SARS-CoV-2 Envelope Protein in Phospholipid Bilayers.** *Nat Struct Mol Biol* 2020, **27**:1202–1208.
 124. Torres J, Maheswari U, Parthasarathy K, Ng L, Liu DX, Gong X: **Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein.** *Protein Sci* 2007, **16**:2065–2071.
 125. Abreu GEA, Aguilar MEH, Covarrubias DH, Durán FR: **Amantadine as a drug to mitigate the effects of COVID-19.** *Med Hypotheses* 2020, **140**:109755.
 126. Aranda-Abreu GE, Aranda-Martínez JD, Araújo R: **Use of amantadine in a patient with SARS-CoV-2.** *J Med Virol* 2020, doi:10.1002/jmv.26179.
 127. Rejdak K, Grieb P: **Adamantanes might be protective from COVID-19 in patients with neurological diseases: multiple sclerosis, parkinsonism and cognitive impairment.** *Mult Scler Relat Disord* 2020, **42**.
 128. Jeppesen MG: **Amantadin has potential for the treatment of COVID-19 because it targets known and novel ion channels encoded by SARS-CoV-2.** [date unknown],
 129. Fink K, Nitsche A, Neumann M, Grossegeisse M, Eisele K, Danysz W: **Amantadine Inhibits SARS-CoV-2 In Vitro.** *Viruses* 2021,
 130. Hassan SS, Choudhury PP, Roy B, Jana SS: **Missense mutations in SARS-CoV2 genomes from Indian patients.** *Genomics* 2020, **112**:4622–4627.
 131. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, Feng Z, Gilliland GL, Iype L, Jain S, et al.: **The protein data bank.** *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2002, **58**:899–907.
 132. Schrödinger: **Maestro Schrödinger Release 2020-4.** [date unknown],
 133. James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA Home.: **MOPAC.** 2016,
 134. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ: **Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and empirical binding free energy function.** *J Comput Chem* 1998, **19**:1639–1662.
 135. Gasteiger J, Marsili M: **Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges.** *Tetrahedron* 1980, **36**:3219–3228.
 136. Acharya R, Carnevale V, Fiorin G, Levine BG, Polishchuk AL, Balannik V, Samish I, Lamb RA, Pinto LH, DeGrado WF, et al.: **Structure and mechanism of proton transport through the transmembrane tetrameric M2 protein bundle of the influenza A virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:15075–15080.
 137. Dupradeau FY, Pigache A, Zaffran T, Savineau C, Lelong R, Grivel N, Lelong D, Rosanski W, Cieplak P: **The R.E.D. tools: Advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building.** *Phys Chem Chem Phys* 2010, **12**:7821–7839.
 138. Schmidt MW, Baldrige KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JH, Koseki S, Matsunaga N, Nguyen KA, Su S, et al.: **General atomic and molecular electronic structure system.** *J Comput Chem* 1993, **14**:1347–1363.
 139. Sousa Da Silva AW, Vranken WF: **ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface.** *BMC Res Notes* 2012, **5**:1–8.
 140. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA: **Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations.** *J Mol Graph Model* 2006,

- 25:247–260.
141. Hetényi C, Van Der Spoel D: **Toward prediction of functional protein pockets using blind docking and pocket search algorithms.** *Protein Sci* 2011, **20**:880–893.
 142. Hetényi C, Van Der Spoel D: **Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues.** *FEBS Lett* 2006, **580**:1447–1450.
 143. Hetényi C, van der Spoel D: **Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site.** *Protein Sci* 2002, **11**:1729–1737.
 144. Shan YB, Kim ET, Eastwood MP, Dror RO, Seeliger MA, Shaw DA: **How Does a Drug Molecule Find Its Target Binding Site?** *J Am Chem Soc* 2011, **133**:9181–9183.
 145. O’Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR: **Open Babel.** *J Cheminform* 2011, **3**:1–14.
 146. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML: **Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.** *J Chem Phys* 1983, **79**:926–935.
 147. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA: **Development and testing of a general Amber force field.** *J Comput Chem* 2004, **25**:1157–1174.
 148. Warren L. DeLano: **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0** Schrödinger, LLC. [date unknown],
 149. Kevener HE, Zhao W, Ball DM, Babaoglu K, Qi J, White SW, Lee RE: **Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase.** *J Chem Inf Model* 2009, **49**:444–460.
 150. Castro-Alvarez A, Costa AM, Vilarrosa J: **The Performance of several docking programs at reproducing protein-macrolide-like crystal structures.** *Molecules* 2017, **22**.
 151. Mena-Ulecia K, Tiznado W, Caballero J: **Study of the differential activity of thrombin inhibitors using docking, QSAR, molecular dynamics, and MM-GBSA.** *PLoS One* 2015, **10**:1–21.
 152. Rarey M, Kramer B, Lengauer T: **The particle concept: Placing discrete water molecules during protein- ligand docking predictions.** *Proteins Struct Funct Genet* 1999, **34**:17–28.
 153. Huang N, Shoichet BK: **Exploiting Ordered Waters in Molecular Docking.** *J Med Chem* 2008, **58**:4862–4865.
 154. Søndergaard CR, Garrett AE, Carstensen T, Pollastri G, Nielsen JE: **Structural artifacts in protein-ligand X-ray structures: Implications for the development of docking scoring functions.** *J Med Chem* 2009, **52**:5673–5684.
 155. Ladbury JE: **Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design.** *Chem Biol* 1996, **3**:973–980.
 156. Kim KH: **Outliers in SAR and QSAR: 2. Is a flexible binding site a possible source of outliers?** *J Comput Aided Mol Des* 2007, **21**:421–435.
 157. Kim KH: **Outliers in SAR and QSAR : 3 . Importance of considering the role of water molecules in protein – ligand interactions and quantitative structure – activity relationship studies.** *J Comput Aided Mol Des* 2021, doi:10.1007/s10822-021-00377-7.
 158. Kim KH: **Outliers in SAR and QSAR: Is unusual binding mode a possible source of outliers?** *J Comput Aided Mol Des* 2007, **21**:63–86.
 159. Maveyraud L, Mourey L: **Protein X-ray crystallography and drug discovery.** *Molecules* 2020, **25**.

160. Wang R, Fang X, Lu Y, Yang CY, Wang S: **The PDBbind database: Methodologies and updates.** *J Med Chem* 2005, **48**:4111–4119.
161. Wang R, Fang X, Lu Y, Wang S: **The PDBbind database: Collection of binding affinities for protein-ligand complexes with known three-dimensional structures.** *J Med Chem* 2004, **47**:2977–2980.
162. Thomaston JL, Konstantinidi A, Liu L, Lambrinidis G, Tan J, Caffrey M, Wang J, Degrado WF, Kolocouris A: **inhibitor reveal the mechanism of adamantane resistance.** 2020, **59**:627–634.

X. Köszönetnyilvánítás

Eredményeinket az alábbi támogatások felhasználásával értük el és ezért köszönetet mondunk a következő szervezeteknek: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K123836, K134214), 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (NAP-2; Chronic Pain Research Group), EFOP-3.6.1.-16-2016- 0004 és GINOP 2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS”. A munka a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János kutatási ösztöndíja támogatásával készült el. Megköszönjük a Kormányzati Informatikai Fejlesztési Ügynökségnek (KIFÜ) a szuperszámítógépes infrastruktúrához való hozzáférést. A munkát támogatta az Innovációs és Technológiai Minisztérium, az Új Nemzeti Kiválóság Program keretében (ÚNKP-20-3-I, ÚNKP-21-3-II, ÚNKP-20-5, ÚNKP-21-5). A munkát támogatta a PTE ÁOK-KA No:2019/KA-2019-31. Az Európai Unió, Európai Szociális Alap támogatta a munkát a következő projekt név és kód alatt: Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs, EFOP-3.6.1-16-2016-00004.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Hetényi Csabának, akitől nagyon sokat tanultam, szakmai kérdéseimben és a munkám előre haladásában mindig készségesen segített. Külön köszönöm, hogy az ötleteim meghallgatta és a megvalósításukra törekedett. Köszönettel tartozom a Farmakoinformatikai Tanszék minden munkatársának, Szél Viktornak, Dr. Börzsei Ritának és Bayartsetseg Bayarshaikannak. Továbbá szeretném megköszönni az összes kollaborációs partnernek, elsősorban Dr. Bognár Balázsnak, Prof. Dr. Kálai Tamásnak, Dr. Poór Miklósnak, Dr. Mohos Violettnak, valamint Dr. Fliszár-Nyúl Eszternek, hogy kísérletes vizsgálataikkal emelték munkáim színvonalát. Végezetül hálával tartozom a családomnak, a páromnak és a barátaimnak, akik támogattak és lelkesítettek. Külön hálával tartozom Viának, aki társamként, barátomként mindig mellettem volt. Szeretném a dolgozatot néhai szeretett Nagymamám emlékének ajánlani.



Article

Synthesis of Spin-Labelled Bergamottin: A Potent CYP3A4 Inhibitor with Antiproliferative Activity

Balázs Zoltán Zsidó¹, Mária Balog², Nikolett Erős², Miklós Poór^{3,4}, Violetta Mohos^{3,4}, Eszter Fliszár-Nyúl^{3,4}, Csaba Hetényi¹ , Masaki Nagane⁵ , Kálmán Hideg², Tamás Kálai^{2,4} and Balázs Bognár^{2,*}

¹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, Medical School, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary; zsidobalazs@pte.hu (B.Z.); csabahete@yahoo.com (C.H.)

² Institute of Organic and Medicinal Chemistry, University of Pécs, Medical School, Honvéd utca 1, H-7624 Pécs, Hungary; maria.balog@aok.pte.hu (M.B.); erosniki93@gmail.com (N.E.); kalman.hideg@aok.pte.hu (K.H.); tamas.kalai@aok.pte.hu (T.K.)

³ Department of Pharmacology, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary; poor.miklos@pte.hu (M.P.); mohos.violetta@gytk.pte.hu (V.M.); eszter.nyul@aok.pte.hu (E.F.-N.)

⁴ János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság útja 20, H-7624 Pécs, Hungary

⁵ Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5201, Japan; nagane@azabu-u.ac.jp

* Correspondence: balazs.bognar@aok.pte.hu or bognar.balazs83@gmail.com; Tel.: +36-536-220

Received: 19 December 2019; Accepted: 10 January 2020; Published: 13 January 2020



Abstract: Bergamottin (BM, **1**), a component of grapefruit juice, acts as an inhibitor of some isoforms of the cytochrome P450 (CYP) enzyme, particularly CYP3A4. Herein, a new bergamottin containing a nitroxide moiety (SL-bergamottin, SL-BM, **10**) was synthesized; chemically characterized, evaluated as a potential inhibitor of the CYP2C19, CYP3A4, and CYP2C9 enzymes; and compared to BM and known inhibitors such as ketoconazole (KET) (3A4), warfarin (WAR) (2C9), and ticlopidine (TIC) (2C19). The antitumor activity of the new SL-bergamottin was also investigated. Among the compounds studied, BM showed the strongest inhibition of the CYP2C9 and 2C19 enzymes. SL-BM is a more potent inhibitor of CYP3A4 than the parent compound; this finding was also supported by docking studies, suggesting that the binding positions of BM and SL-BM to the active site of CYP3A4 are very similar, but that SL-BM had a better ΔG_{bind} value than that of BM. The nitroxide moiety markedly increased the antitumor activity of BM toward HeLa cells and marginally increased its toxicity toward a normal cell line. In conclusion, modification of the geranyl sidechain of BM can result in new CYP3A4 enzyme inhibitors with strong antitumor effects.

Keywords: bergamottin; nitroxide; CYP3A4 inhibition; anticancer activity

1. Introduction

Bergamottin (i.e., 5-geranoxypsoralen (**1**)) is a natural furanocoumarin that was originally detected in bergamot oil (*Citrus bergamia*) [1] and is mainly responsible, together with 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB, **2**), for "grapefruit juice/drug" interactions (Figure 1). Grapefruit juice has been found to cause a marked increase in the oral bioavailability of many therapeutic agents (e.g., dihydropyridines [2], ethinylestradiol [3], midazolam [4], cyclosporine A [5], and lovastatin [6]) primarily by inhibiting the CYP3A4 enzyme. Several mechanisms have been reported regarding the CYP3A4 inhibitory effect of bergamottin such as decreased protein expression or the reversible inhibition of the enzyme [7–10].

Row et al. studied the inhibitory effects of a series of furanocoumarin analogues on the CYP3A4 enzyme. They found that the furan ring and the alkyloxy group were necessary for inhibition, and hydrophilic groups at 6',7'-positions enhanced the potency compared to the alkenyl group [11].

Although bergamottin is a less potent CYP3A4 inhibitor than DHB [12], it is a stronger inhibitor of some other CYP subfamilies such as CYP1A and 2B [13]. Bergamottin was also found to inhibit CYP2A6, 2C9, 2C19, 2D6, and 2E1 enzymes in human liver microsomes [14].

Bergamottin appeared to be a potential anticancer agent against various tumor cell lines by the regulation of several cancer-related pathways [15]. Through the inhibition of STAT3 activation, BM inhibited the proliferation of breast cancer cells and multiple myeloma [16]. BM attenuated cell migration and invasion of fibrosarcoma and lung cancer cell lines [17,18]. In combination with simvastatin, BM suppressed the TNF- α -induced anti-proliferative and pro-apoptotic processes of KBM-5 myeloid leukemia cells [19].

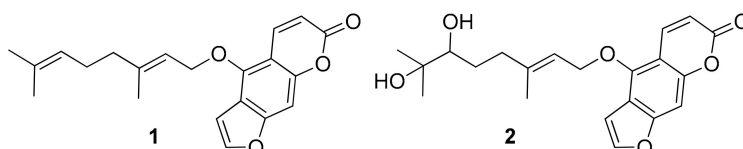


Figure 1. Chemical structures of bergamottin (1) and 6',7'-dihydroxybergamottin (2).

The unpaired electrons of stable nitroxide free radicals allow the nitroxides to take part in one-electron oxidation and reduction processes, which make nitroxides potent unnatural antioxidants [20]. As a consequence, nitroxides exert a cytoprotective action against oxidative stress induced by cytotoxic drugs or pathological processes, such as ischemia-reperfusion and inflammation [21–23]. However, some piperidine types of nitroxides also exert cytotoxic and pro-oxidant effects, particularly on cancer cells [24,25].

We have reported in several studies that the modification of biomolecules (caffeic acid phenethyl ester, resveratrol, and curcumin) with nitroxides for use as “in statu nascendi acting” antioxidants may be beneficial on their activity. For instance, better antioxidant, antiproliferative, anti-inflammatory and cell-protective compounds can be achieved by these modifications [26–31].

Herein, we report the synthesis, CYP (2C9, 2C19, and 3A4) enzyme inhibition, and the anticancer activity of a new paramagnetic bergamottin analog compared to the parent compound and known CYP inhibitors. Furthermore, CYP3A4 enzyme inhibition was also evaluated by docking studies.

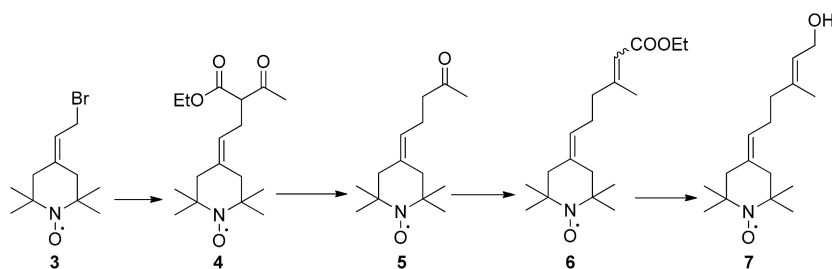
2. Results

2.1. Synthesis of Spin-Labelled Geraniol (7)

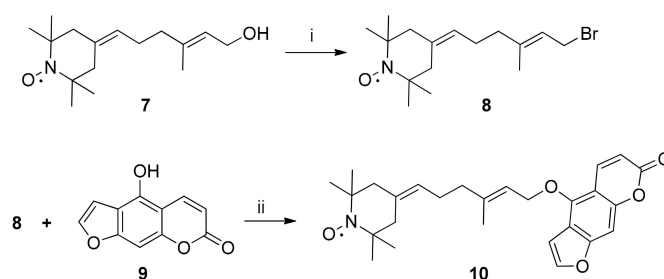
For the synthesis of nitroxide-modified geraniol (7), the first step was to alkylate the ethyl acetoacetate with paramagnetic allylic bromide (3) [32] in acetone and in the presence of K_2CO_3 at ambient temperature to obtain compound 4 with 67% yield. The ketoester was hydrolyzed with a NaOH/ethanol solution and then acidified with aq. H_2SO_4 . The elimination of CO_2 happened spontaneously to yield ketone 5, in which the Horner–Wadsworth–Emmons reaction with triethyl phosphonoacetate led to the formation of paramagnetic Z/E esters (6) at a 1:4 ratio. After purification, the reduction of E-ester 6 with sodium-bis (2-methoxyethoxy) aluminum hydride (SMEAH) in anhydrous toluene afforded E-4-(6-hydroxy-4-methyl-4-hexene-1-ylidene)-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (7, spin-labelled geraniol) (Scheme 1).

2.2. Synthesis of Spin-Labelled Bergamottin (10)

The alkylation of 4-hydroxy-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one (bergaptol, 9) may result in new bergamottin derivatives. To achieve a nitroxide ring motif containing bergamottin (10), paramagnetic geranyl bromide (8) was synthesized via the treatment of 7 with methanesulfonyl chloride and followed by LiBr. Bergaptol (9) was then alkylated with compound 8 in dry acetone in the presence of K_2CO_3 and catalytic amount of sodium iodide to afford SL-BM (10) (Scheme 2).



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) potassium carbonate, ethyl acetoacetate, 18-crown-6, anhydrous acetone, 24 h reflux, 67%; (ii) 10% aqueous NaOH, ethanol, 30 min reflux followed by 24 h stirring at room temperature, then 5% H₂SO₄, 59%; (iii) NaH, anhydrous toluene, triethyl phosphonoacetate, N₂ atmosphere, 30 min reflux, 45%; (iv) SMEAH, abs. toluene, N₂ atmosphere, −30 °C, then room temperature for 30 min, 83%.



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) dry CH₂Cl₂, triethylamine, methanesulfonyl chloride at −30 °C, then LiBr, anhydrous acetone, 40 °C, 30 min, 72%; (ii) anhydrous acetone, K₂CO₃, NaI (cat.), 40 °C, 24 h, N₂ atmosphere, 20%.

2.3. Inhibition of the CYP Enzymes by BM and SL-BM

BM proved to be a strong inhibitor of each CYP enzyme tested, while SL-BM showed considerable inhibitory effects toward the CYP2C19 and CYP3A4 enzymes (Figure 2). BM was a two-fold stronger inhibitor of CYP2C9 than the positive control warfarin (Table 1); the inhibitory effect induced by SL-BM was also statistically significant, but only a slight decrease in metabolite formation resulted (even at a four-fold concentration vs. the substrate). SL-BM was approximately two times weaker, while BM induced almost a seven-times stronger inhibitory effect toward CYP2C19 relative to the inhibitory effect of the positive control ticlopidine. Despite the fact that BM proved to be a considerably stronger inhibitor of both the CYP2C enzymes tested, SL-BM showed a significantly stronger inhibitory action toward CYP3A4 (Figure 2). BM and SL-BM were 1.7 and 8.5 times weaker inhibitors of CYP3A4 than the positive control ketoconazole (Table 1).

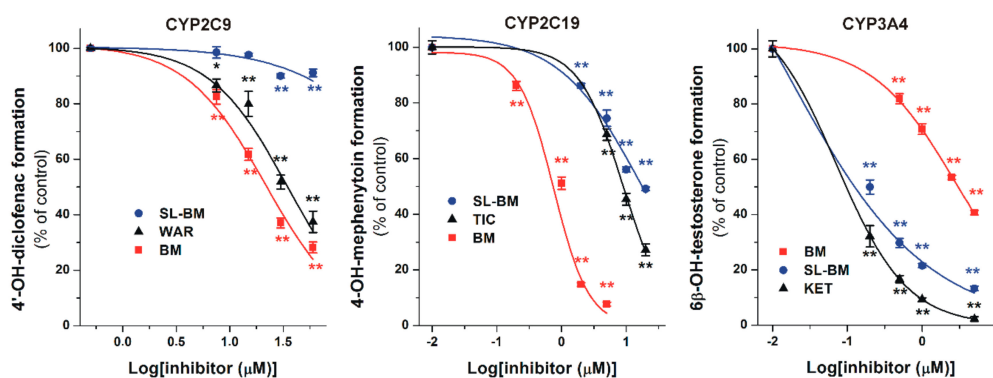


Figure 2. Concentration-dependent inhibitory effects of BM, SL-BM, and positive controls (WAR, warfarin; TIC, ticlopidine; KET, ketoconazole) towards the CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4 enzymes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Data points indicate the means obtained from triplicate incubations \pm SEM.

Table 1. Inhibition of the CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4 enzymes by BM, SL-BM, and positive controls.

CYP2C9 Assay	Substrate Concentration (μM)	IC ₅₀ (μM) ¹	IC _{50(re)} ²	α ³
Warfarin (positive ctrl)	15	29.4	1.96	1.00
Bergamottin	15	14.7	2.94	0.50
SL-Bergamottin	15	>60.0	>4.00	-
CYP2C19 Assay	Substrate Concentration (μM)	IC ₅₀ (μM) ¹	IC _{50(re)} ²	α ³
Ticlopidine (positive ctrl)	5	7.67	1.53	1.00
Bergamottin	5	1.01	0.20	0.13
SL-Bergamottin	5	14.6	2.92	1.90
CYP3A4 Assay	Substrate Concentration (μM)	IC ₅₀ (μM) ¹	IC _{50(re)} ²	α ³
Ketoconazole (positive ctrl)	5	0.24	0.05	1.00
Bergamottin	5	2.04	0.41	8.50
SL-Bergamottin	5	0.40	0.08	1.67

¹ IC₅₀: concentration of the inhibitor which induces 50% inhibition of the metabolite formation; ² IC_{50(re)}: IC₅₀ of the inhibitor divided by the substrate concentration; ³ α : IC₅₀ of the inhibitor divided by the IC₅₀ value of the positive control.

2.4. Modeling Studies

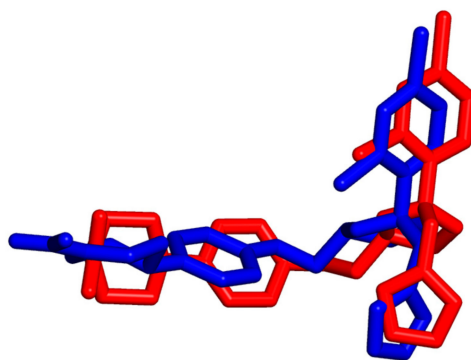
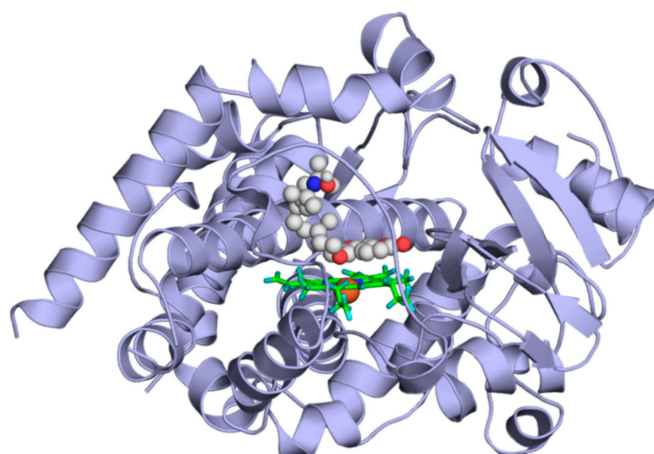
Ligands KET, BM, and **10** were docked to the binding pocket of CYP3A4, which is located above the heme ring. The docking of KET tested the applicability of the methodology for producing a close to crystallographic bound KET conformation. In the cases of BM and SL-BM, the binding modes were de novo, as described in the present study.

Binding mode of KET. According to the holo CYP3A4 crystallographic structure (Protein Data Bank (PDB) code 2v0m), KET (Table 2) is coordinated to the iron of the heme with a nitrogen of the imidazole ring, and the distance between the N atom and Fe³⁺ is 2.7 Å. Interacting amino acid residues are listed in Table 2. The heme-bound crystallographic ligand conformation of KET was used to verify the applicability of our computational docking protocol (see Methods for details) for the atomic resolution calculation of the KET binding mode. The docking of KET into the ligand-free binding pocket of the 2v0m structure was successful, and the crystallographic ligand binding mode of KET was reproduced at an RMSD value of 2.3 Å (Figure 3) in the top 2nd rank. The main interactions were reproduced. That is, the phenyl rings of F304 and KET were parallel, forming π - π interactions, and A370 formed a hydrophobic interaction with the methyl group of KET. The positively charged sidechain of R372 interacted with the partial negative charge of the oxo group of KET.

Binding modes of BM and SL-BM. To determine the binding modes of BM and SL-BM, the same docking protocol was applied as that used in the case of KET, as described in the previous paragraph. In both cases, the top 1st rank binding mode was very similar to that of KET (Figure 4). The furo[3,2-g]chromen-7-one ring was located above the heme occupying the subpockets of the imidazole ring of KET. The furan oxygen was coordinated to the heme for both ligands. The O-Fe³⁺ distances were 4.0 and 4.2 Å for compounds **10** and **1**, respectively (Figure 5). In the bound position, the furo[3,2-g]chromen-7-one ring of the ligands occupied the same subpocket and their side-chains were also in a similar position. The furo[3,2-g]chromen-7-one ring of the ligands was parallel to the heme, possibly forming π -stacking interactions, which was similar to KET (as described in the previous paragraph). Eight and seven amino acid residues were found to interact (Methods) with SL-BM and BM, respectively; of which five residues were common. Compounds **10** and **1** both interacted with CYP3A4 through H-bonds between the hydrophilic amino acid (T309) and the furan oxygen. Hydrophobic interactions occurred between the M114, F241, I301, and F304 amino acids and the methyl groups of the ligands. F304 played a role in the binding of each (KET, BM, and SL-BM) ligand (Table 2).

Table 2. Binding properties of the ligands to the CYP3A4 target. X represents the amino acid-ligand interactions.

Ligand	KET	SL-BM	BM
Rank of the docking of the ligand	2	1	1
O–Fe dist (Å)		4.2	4
N–Fe dist (Å)	3.8		
Calculated binding free energies ΔG_{bind} (kcal/mol) [33]	−9.4	−10.4	−9.2
List of interacting amino acidresidues	M114	X	X
	S119	X	
	L210		X
	L211	X	
	F241	X	X
	I301		X
	F304	X	X
	A305		X
	T309		X
	A370	X	X
	R372	X	
G481	X		

**Figure 3.** The docked (red) binding mode of KET overlaps with its crystallographic binding mode (blue), which is located above the heme ring (not shown).**Figure 4.** The binding mode of SL-BM (space-filling) as docked to the binding pocket of the CYP3A4 enzyme (light blue cartoon) above the heme ring (green sticks), where iron is represented as an orange sphere. Red spheres represent the oxygen, the blue sphere the nitrogen of SL-BM respectively.

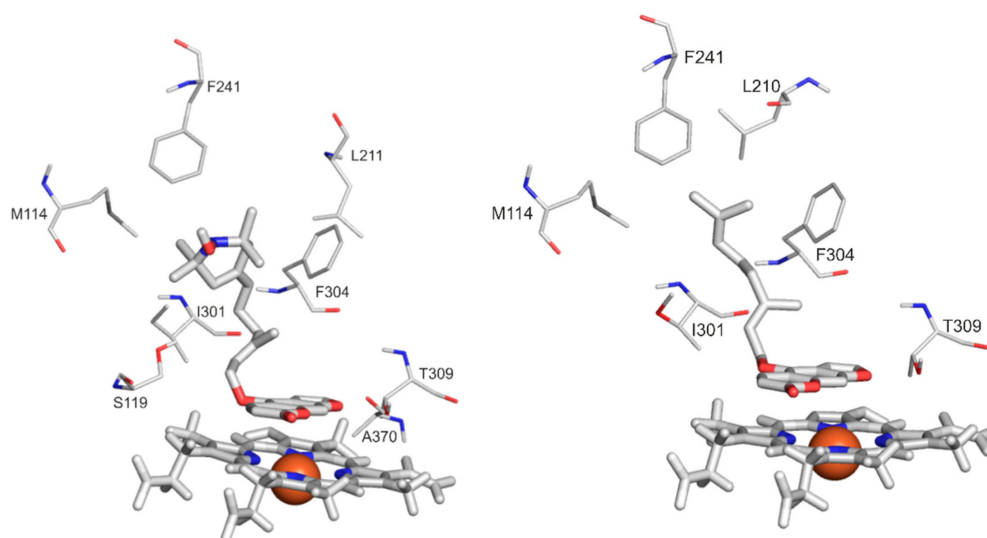


Figure 5. The close-up of the binding mode of SL-BM (left) and BM (right) (wide sticks) as docked to the binding pocket of the CYP3A4 enzyme above the heme ring (wide sticks) where iron is represented as an orange sphere. Interacting enzyme residues are labelled and shown as thin sticks.

2.5. Cytotoxicity of BM and SL-BM

The cytotoxicity of BM and SL-BM was analyzed by a WST Cell Viability & Proliferation assay performed using NIH3T3 (murine embryonic fibroblast) and HeLa (human cervix carcinoma) cells. Neither bergamottin nor SL-bergamottin showed a significant toxicity toward fibroblasts ($IC_{50} > 50 \mu M$). BM did not decrease the viability of the HeLa cells ($IC_{50} > 50 \mu M$); however, SL-BM induced a significant loss in the viability of the HeLa cell line ($IC_{50} = 17.32 \mu M$). These results demonstrate the selective toxicity of SL-BM toward cancer cells (Figure 6).

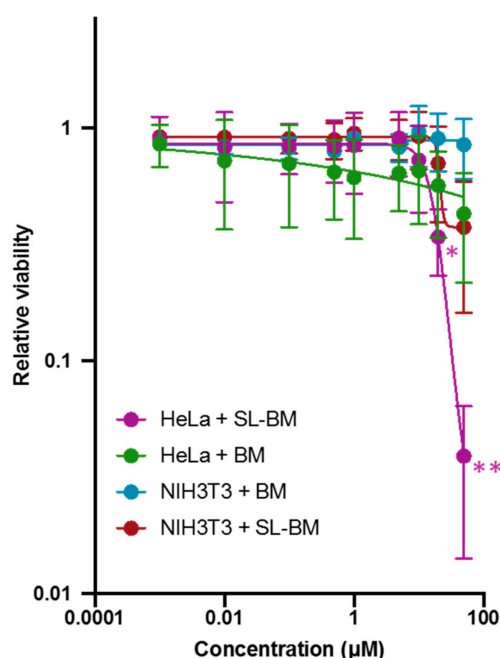


Figure 6. Concentration-dependent cytotoxic effects of BM and SL-BM on NIH3T3 fibroblasts and HeLa carcinoma cells. The cells were treated with BM or SL-BM for 24 h (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). The data points represent the means \pm SD ($n = 6$).

3. Discussion

A new nitroxide moiety containing bergamottin analog (**10**) has been synthesized and evaluated for use as an inhibitor of CYP (2C9, 2C19, and 3A4) enzymes and compared to bergamottin (**1**) and known inhibitors of these enzymes. The cytotoxicity toward cancer and noncancer cell lines was also investigated.

BM induced a 50% inhibition of the metabolite formation at 0.2- and 0.4-fold concentrations vs. the substrates in the CYP2C19 and CYP3A4 assays, respectively (Table 1). The IC₅₀ values of BM toward these enzymes were in the low micromolar range, which agrees well with the previously reported data [14,34–36]. Furthermore, BM proved to also be an inhibitor of CYP2C9, showing 50% inhibition of metabolite formation at approximately a three-fold concentration vs. the substrate. Previous studies also reported the significant inhibitory effect of BM on CYP2C9 enzymes [11,14,35–37]. As our results demonstrated, SL-BM only slightly inhibits CYP2C9 and is almost a 15-fold weaker inhibitor of CYP2C19 than BM (Table 1). However, SL-BM was a five-fold stronger inhibitor of CYP3A4 compared to BM, showing a strong inhibitory efficacy similar to that of the positive control ketoconazole. The enhanced inhibitory activity of SL-BM compared to that of BM was also supported by docking experiments, where the binding of SL-BM was more favorable than that of BM (ΔG_{bind} (−10.4 vs. −9.2 kcal/mol)). The difference in the inhibitory activities of SL-BM and BM may be attributed to the H-acceptor property of the nitroxide, as it was suggested by Row et al. [11].

BM and SL-BM seemed to be nontoxic to normal cells since they did not significantly decrease the viability of NIH3T3 fibroblasts in our toxicity assay. As far as we know, this is the first report about the anticancer activity of bergamottin toward HeLa cells. As shown in previous reports, although BM showed an inhibition effect on many cancer cell lines, such as HT-1080 fibrosarcoma [17], U266 multiple myeloma [18], HepG2 liver cancer, BGC-823 gastric cancer, HL-60 promyelotic leukemia [38], and A549 lung cancer cells [16], we did not observe BM to be significantly cytotoxic toward the HeLa cell line. Nevertheless, the insertion of a nitroxide moiety (**10**, IC₅₀ = 17.32 μM) resulted in the cancer-specific cytotoxic activity of the parent compound (**1**, IC₅₀ > 50 μM). Therefore, compound **10** may be a good starting point for the development of new CYP3A4 enzyme inhibitors with elevated anti-proliferative effects.

4. Materials and Methods

4.1. Chemistry

4.1.1. General

The mass spectra were recorded with a Thermoquest Automass Multi system (ThermoQuest, CE, Instruments, Milan, Italy) operated in EI mode (70 eV). Elemental analyses were carried out with a Fisons EA 1110 CHNS elemental analyzer (Fisons Instruments, Milan, Italy). The melting points were determined with a Boetius micro-melting point apparatus (Franz Küstner Nachf. K. G., Dresden, Germany). The ¹H NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 3 Ascend 500 system (Bruker BioSpin Corp., Karlsruhe, Germany) operated at 500 MHz, and the ¹³C NMR spectra were obtained at 125 MHz in CDCl₃ or DMSO-d₆ at 298 K. The “in situ” reduction of the nitroxides was achieved by the addition of five equivalents of hydrazobenzene (DPPH/radical). The IR spectra were obtained with a Bruker Alpha FT-IR instrument (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) with an ATR support on a ZnSe plate. Flash column chromatography was performed on Merck Kieselgel 60 (0.040–0.063 mm). Qualitative TLC was carried out on commercially available plates (20 cm × 20 cm × 0.02 cm) coated with Merck Kieselgel (Darmstadt, Germany) GF₂₅₄. Compound **3** [32], was synthesized as previously described. All the other reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Molar Chemicals (Halásztelek, Hungary) or TCI (Tokyo, Japan). ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of new compounds are available as supporting data (see Supplementary Materials).

4.1.2. Preparation of Compounds

Ethyl 2-acetyl-4-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-ylidene)butanoate (4): Potassium carbonate (11.09 g, 80.0 mmol), ethyl acetoacetate (6.50 g, 50.0 mmol), and 18-crown-6 (10 mg) were dissolved in anhydrous acetone (30 mL), allylic bromide (3) (2.61 g, 10.0 mmol) dissolved in dry acetone (10 mL) was added dropwise, and the mixture was stirred and refluxed for 24 h. The solvent was evaporated, the residue was partitioned between H₂O (25 mL) and CH₂Cl₂ (30 mL), after separation of the phases, the water phase was extracted with further CH₂Cl₂ (2 × 20 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, evaporated, and the residue was purified by column chromatography (hexane-Et₂O) to achieve compound 4 2.07 g (67%) as a red oil. R_f: 0.2 (hexane-Et₂O, 2:1), MS m/z (%): 310 (M⁺, 42), 166 (13), 135 (100), 107 (56). Anal. calcd. for C₁₇H₂₈NO₄. C 65.78; H 9.09; N 4.51, Found: C 65.55, H 9.36, N 4.42. IR (neat): $\bar{\nu}$ = 1738, 1714 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + (PhNH)₂): δ = 5.21 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 4.26 (q, 2H, J = 7.1 Hz), 3.53 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 2.67 (dt, 2H, J = 7.3, 2.1 Hz), 2.29 (s, 3H), 2.23 (s, 2H), 2.12 (s, 2H), 1.33 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.20, 1.17 (2s, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃ + (PhNH)₂): δ = 202.7, 169.5, 135.5, 121.1, 61.5, 60.2, 59.9, 49.5, 41.6, 29.2, 26.4, 14.2.

5-(1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ylidene)pentan-2-one (5): To the ethanolic (20 mL) solution of ketoester (4) (1.55 g, 5.0 mmol), 10% aqueous NaOH (20 mL) was added, and the mixture was refluxed for 30 min. After additional 24 h stirring at room temperature, the solvent was evaporated off and the residue was acidified with 5% H₂SO₄ and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic phases were dried (MgSO₄), filtered, evaporated, and purified by flash column chromatography (hexane-Et₂O) to yield compound 5 as a red oil, 702 mg (59%); R_f: 0.23 (hexane-Et₂O, 2:1). MS (EI): m/z (%) = 238 (M⁺, 41), 224 (100), 180 (16), 166 (60), 43 (100). Anal. calcd. for C₁₄H₂₄NO₂: C, 70.55; H, 10.15; N, 5.88. Found: C, 70.39; H, 10.21; N, 5.77. IR (neat): $\bar{\nu}$ = 1714, 1633 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + (PhNH)₂): δ = 5.23 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 2.50 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.35 (q, 2H, J = 7.4 Hz), 2.20 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.11 (s, 2H), 1.19, 1.17 (2s, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃ + (PhNH)₂): δ = 208.4, 133.4, 124.0, 60.3, 60.2, 49.4, 43.9, 41.6, 30.0, 22.0.

(E)-Ethyl 6-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ylidene)-3-methylhex-2-enoate (6): To a stirred suspension of NaH (96 mg, 4.0 mmol) in dry toluene (15 mL), triethyl phosphonoacetate (1.12 g, 5.0 mmol) was added at 0 °C under a N₂ atmosphere. After stirring for 10 min, 5 ketone (720 mg, 3.0 mmol) was added, and the mixture was stirred and refluxed for another 30 min. After cooling to room temperature, brine (20 cm³) and ether (20 cm³) were added, the organic phase was separated, and the aqueous phase was washed with ether (2 × 20 cm³). Then, the combined organic phase was dried (MgSO₄), filtered and evaporated, and the residue was purified by flash column chromatography (hexane-Et₂O) to yield 315 mg (34%) of compound 6 as a reddish-brown oil. R_f: 0.40 (hexane-Et₂O, 2:1); MS m/z (%) 308 (M⁺, 38), 278 (6), 166 (11), 74 (100). Anal. calcd. for C₁₈H₃₀NO₃: C, 70.09; H, 9.80; N, 4.54. Found: C, 70.19; H, 9.91; N, 4.60. IR (neat): $\bar{\nu}$ = 1713, 1648 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + (PhNH)₂): δ = 5.78 (s, 1H), 5.25 (t, 1H, J = 6.3 Hz), 4.24 (q, 2H, J = 7.1 Hz), 2.30–2.24 (m, 5H), 2.21 (s, 2H), 2.14 (s, 2H), 1.36 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.21 (s, 6H), 1.19 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃ + (PhNH)₂): δ = 166.8, 159.3, 133.2, 124.4, 116.0, 60.3, 60.2, 59.5, 49.5, 41.7, 41.2, 25.7, 18.9, 14.4.

(E)-4-(6-hydroxy-4-methylhex-4-en-1-ylidene)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxy (7): To a stirred solution of ester (6) (716 mg, 2.0 mmol) in abs. toluene (20 mL), SMEAH (1.21 g, 6.0 mmol) dissolved in toluene (10 mL) was added dropwise under N₂ at –30 °C. Then, the mixture temperature was allowed to rise to room temperature, and the reaction was stirred for a further 30 min. After completion of the reaction, the solution was added in portions to the mixture of 10 % NaOH (25 mL) and crushed ice (50 g). The phases were separated, and the aqueous phase was extracted with a mixture of THF/Et₂O (1:4) (3 × 20 mL). The combined organic phases were dried (MgSO₄), filtered, and evaporated. The title compound (7) was obtained after column chromatography (hexane-EtOAc) as a red oil (440 mg, 83%). R_f: 0.23 (hexane/EtOAc, 2:1), MS m/z (%) 266 (M⁺, 43), 95 (51), 74 (100), Anal. calcd. for C₁₆H₂₈NO₂: C, 72.14; H, 10.59; N, 5.26. Found: C, 72.31; H, 10.51; N, 5.37. IR (neat): $\bar{\nu}$ = 3412, 1670, 1098 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + (PhNH)₂): δ = 5.48 (dt, 1H, J = 6.9, 1.2 Hz), 5.26 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 4.21 (d,

2H, $J = 6.8$ Hz), 2.23–2.19 (m, 4H), 2.14–2.10 (m, 4H), 1.73 (s, 3H), 1.19 (s, 6H), 1.17 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + (\text{PhNH})_2$): $\delta = 139.2, 132.3, 125.3, 123.7, 60.3, 60.2, 59.4, 49.5, 41.6, 39.8, 25.9, 16.3$.

(E)-4-(6-bromo-4-methylhex-4-en-1-ylidene)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxy (8): To the stirred solution of compound 7 (532 mg, 2.0 mmol) and triethylamine (222 mg, 2.2 mmol) in dry CH_2Cl_2 (20 mL), after cooling to -30 °C, methanesulfonyl chloride (249.3 g, 2.2 mmol) was added dropwise. After the mixture temperature increased to room temperature, brine (20 mL) was added, the phases were separated, and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3×20 mL). The combined organic phases were dried over MgSO_4 , filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous acetone (30 mL), to which LiBr (522 mg, 6.0 mmol) was then added, and the mixture was stirred at 40 °C for 30 min. Water (20 mL) and Et_2O (15 mL) were added, and after separation, the water phase was extracted with further Et_2O (2×20 mL). The combined organic phases were dried over MgSO_4 , filtered, and evaporated to achieve paramagnetic geranyl bromide (8) as a reddish-brown oil with a 72% (410 mg) yield. MS m/z (%) 284/286 (M^+ , 5/2), 248 (6), 109 (13), 107 (21), 95 (40), 74 (100). NMR measurements cannot be performed without the loss of the bromide function in the presence of hydrazobenzene.

(E)-4-((6-(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ylidene)-3-methylhex-2-en-1-yl)oxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one (10): Bergaptol (9) (202 mg, 1.0 mmol) was dissolved in anhydrous acetone (10 mL), K_2CO_3 (276 mg, 2.0 mmol), NaI (19.5 mg, 0.13 mmol), and bromide 8 (427 mg, 1.5 mmol) were added and the mixture was stirred at 40 °C for 24 h under a N_2 atmosphere. After cooling to room temperature, brine (20 mL) and CH_2Cl_2 (20 mL) were added, the organic phase was separated, and the aqueous phase was washed with CH_2Cl_2 (2×20 mL). Then, the combined organic phase was dried (MgSO_4), filtered, evaporated, and the residue was purified by flash column chromatography (hexane-EtOAc) to yield the title compound 10 as red crystals, 90 mg (20 %). M.p.: 51–53 °C. R_f : 0.43 (hexane-EtOAc, 2:1). MS m/z (%) 450 (M^+ , 3), 435 (3), 420 (5), 202 (25), 98 (66), 74 (100) Anal. calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{NO}_5$: C 71.98; H 7.16; N 3.11. Found: C, 72.11; H, 7.20; N, 3.17. IR (neat): $\bar{\nu} = 1725, 1623, 1332$ cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + (\text{PhNH})_2$): $\delta = 8.19$ (d, 1H, $J = 9.8$ Hz), 7.60 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 7.20 (s, 1H), 6.96 (d, 1H, $J = 2.3$), 6.32 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz), 5.95 (dt, 1H, $J = 6.8, 1.0$ Hz), 5.23 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.97 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz), 2.24–2.18 (m, 6H), 2.10 (s, 2H), 1.75 (s, 3H), 1.18 (s, 6H), 1.16 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + (\text{PhNH})_2$): $\delta = 161.2, 158.1, 148.9, 144.9, 142.6, 139.5, 132.7, 124.8, 119.2, 114.2, 112.6, 107.5, 105.0, 94.2, 69.7, 60.3, 60.2, 49.5, 41.7, 39.8, 25.7, 16.7$.

4.2. CYP Inhibition Assays

4.2.1. Reagents

Testosterone, 6 β -hydroxytestosterone, ketoconazole, racemic warfarin, ticlopidine hydrochloride, CypExpressTM 2C9 kit, CypExpressTM 2C19 kit, and CypExpressTM 3A4 kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diclofenac, 4'-hydroxydiclofenac, S-mephenytoin, and 4-hydroxymephenytoin were obtained from Carbosynth (Compton, Berkshire, UK).

4.2.2. CYP Assays

Stock solutions of BM, SL-BM, and positive controls (each 5000 μM) were prepared in dimethyl sulfoxide (Fluka) and stored at -20 °C. The inhibitory effects of BM and SL-BM on the CYP2C9, 2C19, and 3A4 enzymes were examined using CypExpressTM assay kits by employing diclofenac, S-mephenytoin, and testosterone substrates, respectively. During these assays, racemic warfarin (2C9), ticlopidine (2C19), and ketoconazole (3A4) were applied as positive controls. The CYP2C9, 2C19, and 3A4 assays were performed as described in our previous studies [39–42].

The substrates and products were analyzed using the HPLC system comprising a pump (Waters 510; Milford, MA, USA), an injector (Rheodyne 7125) with a 20 μL sample loop, and a UV detector (Waters 486). The data were evaluated by employing Millennium Chromatographic Manager software (Waters). HPLC analyses of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac (CYP2C9 assay) [39,40],

S-mephenytoin, and 4-hydroxymephenytoin [42] as well as testosterone and 6 β -hydroxytestosterone (CYP3A4 assay) [41] were performed as described previously.

Data were derived from at least three independent experiments and represented as the mean \pm the standard error of the mean (SEM) values. The statistical significance ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) was established by employing a one-way ANOVA test (IBS SPSS Statistics, v. 21; Armonk, NY, USA). The metabolite formation (% of control) was plotted as a function of the logarithmic concentrations, and then the IC₅₀ values were determined using GraphPad Prism 8 software (San Diego, CA, USA).

4.3. Modeling Studies

4.3.1. Ligand Preparation

The raw ligand structures of ketoconazole, bergamottin (BM, **1**), and SL-BM (**10**) were built in Maestro [43] and energy-minimized with a quantum chemistry program package, MOPAC [33], with PM7 parametrization [44]. Force calculations were also performed using MOPAC, in which the gradient norm was set to 0.001, and the force constant matrices were positive and definite. Gasteiger–Marsilli partial charges were assigned in AutoDock Tools [45]. Flexibility was allowed on the ligand at all active torsions. These prepared structures were used for docking.

4.3.2. Target Preparation

Similar to a previous study [46], the holo structure of CYP3A4 in the complex with ketoconazole was used as a target. The atomic coordinates of the complex were obtained from the Protein Data Bank (PDB) with PDB code 2v0m. The bound ketoconazole molecules were removed prior to the docking calculations, and chain A was processed further as a target. The atomic partial charges of the heme were adopted as the ferric penta coordinate high-spin charge model from reference [47]. The rest of the target molecule was equipped with polar hydrogen atoms and Gasteiger–Marsilli partial charges in AutoDock Tools.

4.3.3. Docking

All the ligand structures were docked to the active site of CYP3A4 using AutoDock 4.2.6 [45]. The number of grid points was set to 90 \times 90 \times 90 using a 0.375 Å grid spacing. The Lamarckian genetic algorithm was used for the global search, and the flexibility of all active torsions was allowed on the ligand. Ten docking runs were performed, and the resulting ligand conformations were ranked by their free binding energy values. Representative docked ligand conformations were used for the subsequent evaluations, and a collection of interacting target amino acid residues with a 3.5 Å cut-off distance were calculated for heavy atoms. The root-mean-squared deviation (RMSD) values were calculated between the crystallographic and representative ligand conformations.

4.4. Cell Viability Assays

Murine embryonic fibroblast NIH3T3 cells were maintained in DMEM (Cat No. 043-30085, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) supplemented with 10% newborn calf serum (NBCS) at 37 °C and 5% CO₂. Human cervix carcinoma HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO₂. To determine the toxicity of BM and SL-BM, the WST-1 cell viability assay was employed as described previously [26]. The cells (NIH3T3: 2000 per well; HeLa: 5000 per well) were seeded into all the wells of 96-well plates. After 24 h, the medium was replaced, and the cells were treated with the test compounds for 24 h. Then, the cells were incubated with a WST-1 solution (3.6 μ g/ μ L WST-1, 70 ng/ μ L 1-methoxy phenazine methosulfate in 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid–KOH (pH 7.4); Dojindo, Kumamoto, Japan) for 1 h at 37 °C, and the absorbance of each well was recorded at 440 nm using a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific). The IC₅₀ values and statistical significance were calculated using GraphPad Prism 8 software (San Diego, CA, USA).

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/508/s1>.

Author Contributions: M.P., E.F.-N., and V.M. performed the CYP enzyme assays and carried out the corresponding HPLC analyses and evaluations. B.Z.Z. and C.H. carried out the docking studies. M.N. tested the cytotoxic activity of the compounds. M.B., N.E., K.H., T.K., and B.B. designed, synthesized, and chemically characterized the new compounds. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (FK124331: B.B K123836: B.Z. and C.H.). The research was financed by the Higher Education Excellence Programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary (TUDFO/47138/2019-ITM), within the programme of University of Pécs. C.H.'s work was supported by a grant co-financed by Hungary and the European Union (EFOP-3.6.2-16-2017-00008).

Acknowledgments: This paper was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. We acknowledge the computer time granted from the Governmental Information Technology Development Agency, Hungary.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Späth, E.; Kainrath, P. Über bergamottin und über die auffindung von limettin im bergamottöl (XXXIV. mitteil. über natürliche cumarine). *Eur. J. Inorg. Chem.* **1937**, *70*, 2272–2276. [[CrossRef](#)]
2. Bailey, D.G.; Spence, J.D.; Munoz, C.; Arnold, J.M.O. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet* **1991**, *337*, 268–269. [[CrossRef](#)]
3. Weber, A.; Jager, R.; Borner, A.; Klinger, G.; Volland, R.; Mathey, K.; Balogh, A. Can grapefruit juice influence ethinylestradiol bioavailability. *Contraception* **1996**, *53*, 41–47. [[CrossRef](#)]
4. Kuferschmidt, H.H.; Ha, H.R.; Ziegler, W.H.; Meier, P.J.; Krähenbühl, S. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1995**, *58*, 20–28. [[CrossRef](#)]
5. Ducharme, M.P.; Warbasse, L.H.; Edwards, D. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1995**, *40*, 485–491. [[CrossRef](#)]
6. Kantola, T.; Kivisto, K.T.; Neuvonen, P.J. Grapefruit juice greatly increases serum concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1998**, *63*, 397–402. [[CrossRef](#)]
7. Lown, K.S.; Bailey, D.G.; Fontana, R.J.; Janardan, S.K.; Adair, C.H.; Fortlage, L.A.; Brown, M.B.; Gao, W.; Watkins, P.B. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2545–2553. [[CrossRef](#)]
8. Bailey, D.G.; Arnold, J.; Arnold, O.; Spence, J.D. Grapefruit juice-drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *46*, 101–110. [[CrossRef](#)]
9. Schmiedlin-Ren, P.; Edwards, D.J.; Fitzsimmons, M.E.; He, K.; Lown, K.S.; Woster, P.M.; Rahman, A.; Thummel, K.E.; Fisher, J.M.; Hollenberg, P.F.; et al. Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug. Metab. Dispos.* **1997**, *25*, 1228–1233.
10. Guo, L.Q.; Fukuda, K.; Ohta, T.; Yamazoe, Y. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug. Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 766–771. [[PubMed](#)]
11. Row, E.C.; Brow, S.A.; Stachulski, A.V.; Lennard, M.S. Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1604–1610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ohnishi, A.; Matsuo, H.; Yamada, S.; Takanaga, H.; Morimoto, S.; Shoyama, Y.; Ohtani, H.; Sawada, Y. Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1369–1377. [[CrossRef](#)]
13. Olguín-Reyes, S.; Camacho-Carranza, R.; Hernández-Ojeda, S.; Elinos-Baez, M.; Espinosa-Aguirre, J.J. Bergamottin is a competitive inhibitor of CYP1A1 and is antimutagenic in the Ames test. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 3094–3099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. He, K.; Iyer, K.R.; Hayes, R.N.; Sinz, M.W.; Woolf, T.F.; Hollenberg, P.F. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 252–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jeong-Hyeon, K.; Frank, A.; Gautam, S.; Kwang, S.A. Pharmacological Utilization of Bergamottin, Derived from Grapefruits, in Cancer Prevention and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4048–4060. [[CrossRef](#)]

16. Kim, S.M.; Lee, J.H.; Sethi, G.; Kim, C.; Baek, S.H.; Nam, D.; Chung, W.S.; Kim, S.H.; Shim, B.S.; Ahn, K.S. Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells. *Cancer Lett.* **2014**, *354*, 153–163. [[CrossRef](#)]
17. Hwang, Y.P.; Yun, H.J.; Choi, J.H.; Kang, K.W.; Jeong, H.G. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by bergamottin via the inhibition of protein kinase C δ /p38 mitogen-activated protein kinase and JNK/nuclear factor- κ B-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 977–990. [[CrossRef](#)]
18. Wu, H.J.; Wu, H.B.; Zhao, Y.Q.; Chen, L.J.; Zou, H.Z. Bergamottin isolated from Citrus bergamia exerts in vitro and in vivo antitumor activity in lung adenocarcinoma through the induction of apoptosis, cell cycle arrest, mitochondrial membrane potential loss and inhibition of cell migration and invasion. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 324–332. [[CrossRef](#)]
19. Kim, S.M.; Lee, E.J.; Lee, J.H.; Yang, W.M.; Nam, D.; Lee, J.H.; Lee, S.G.; Um, J.Y.; Shim, B.S.; Ahn, K.S. Simvastatin in combination with bergamottin potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of NF-kappaB signalling pathway in human chronic myelogenous leukaemia. *Pharm. Boil.* **2016**, *54*, 2050–2060. [[CrossRef](#)]
20. Krishna, M.C.; DeGraff, W.; Hankovszky, H.O.; Sár, P.C.; Kálai, T.; Jeko, J.; Russo, A.; Mitchell, J.B.; Hideg, K. Studies of Structure–Activity Relationship of Nitroxide Free Radicals and Their Precursors as Modifiers Against Oxidative Damage. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3477–3492. [[CrossRef](#)]
21. Monti, E.; Cova, D.; Guido, E.; Morelli, R.; Oliva, C. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of adriamycin. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *21*, 463–470. [[CrossRef](#)]
22. Howard, B.J.; Yatin, S.; Hensley, K.; Allen, K.L.; Kelly, J.P.; Carney, J.; Butterfield, D.A. Prevention of Hyperoxia-Induced Alterations in Synaptosomal Membrane-Associated Proteins by N-tert-Butyl- α -Phenylnitron and 4-Hydroxy-2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (Tempol). *J. Neurochem.* **1996**, *67*, 2045–2050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Deres, P.; Halmosi, R.; Tóth, A.; Kovács, K.; Pálfi, A.; Habon, T.; Czopf, L.; Kálai, T.; Hideg, K.; Sümegi, B.; et al. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2005**, *45*, 36–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Suy, S.; Mitchell, J.B.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Kasid, U. Nitroxides Tempol and Tempo Induce Divergent Signal Transduction Pathways in MDA-MB 231 Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17871–17878. [[CrossRef](#)]
25. Suy, S.; Mitchell, J.B.; Samuni, A.; Mueller, S.; Kasid, U. Nitroxide tempo, a small molecule, induces apoptosis in prostate carcinoma cells and suppresses tumor growth in athymic mice. *Cancer* **2005**, *103*, 1302–1313. [[CrossRef](#)]
26. Nagane, M.; Yamashita, T.; Vörös, P.; Kálai, T.; Hideg, K.; Bognár, B. Synthesis and evaluation of paramagnetic caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogs. *Monatsh. Chem.* **2019**, *150*, 1513–1522. [[CrossRef](#)]
27. Kálai, T.; Borza, E.; Antus, C.; Radnai, B.; Gulyás-Fekete, G.; Fehér, A.; Sümegi, B.; Hideg, K. Synthesis and study of new paramagnetic resveratrol analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7311–7317. [[CrossRef](#)]
28. Dayton, A.; Selvendiran, K.; Meduru, S.; Khan, M.; Kuppusamy, M.L.; Naidu, S.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. Amelioration of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by an Anticancer-Antioxidant Dual-Function Compound HO-3867. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2011**, *339*, 350–357. [[CrossRef](#)]
29. Kálai, T.; Kuppusamy, M.L.; Balog, M.; Selvendiran, K.; Rivera, B.K.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. Synthesis of N-Substituted 3,5-Bis(arylidene)-4-piperidones with High Antitumor and Antioxidant Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5414–5421. [[CrossRef](#)]
30. Ravi, Y.; Selvendiran, K.; Naidu, S.; Meduru, S.; Citro, L.A.; Bognár, B.; Khan, M.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P.; et al. Pulmonary Hypertension Secondary to Left-Heart Failure Involves Peroxynitrite-Induced Downregulation of PTEN in the Lung. *Hypertension* **2013**, *61*, 593–601. [[CrossRef](#)]
31. Bognár, B.; Kuppusamy, M.L.; Madan, E.; Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. Synthesis and Biological Evaluation of Curcumin-Nitroxide-Based Molecular Hybrids as Antioxidant and Anti-Proliferative Agents. *Med. Chem.* **2017**, *13*, 761–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Stewart, J.J.P. *MOPAC2009, 2009*; Steward Computational Chemistry: Colorado Springs, CO, USA, 2008.
33. Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 1–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Girenavar, B.; Poulouse, S.M.; Jayaprakasha, G.K.; Bhat, N.G.; Patil, B.S. Furocoumarins from grapefruit juice and their effect on human CYP 3A4 and CYP 1B1 isoenzymes. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2606–2612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tassaneeyakul, W.; Guo, L.Q.; Fukuda, K.; Ohta, T.; Yamazoe, Y. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *378*, 356–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kimura, Y.; Ito, H.; Ohnishi, R.; Hatano, T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 429–435. [[CrossRef](#)]
37. Girenavar, B.; Jayaprakasha, G.K.; Patil, B.S. Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. *J. Food. Sci.* **2007**, *72*, 417–421. [[CrossRef](#)]
38. Liu, Y.; Ren, C.; Cao, Y.; Wang, Y.; Duan, W.; Xie, L.; Sun, C.; Li, X. Characterization and Purification of Bergamottin from Citrus grandis (L.) Osbeck cv. Yongjiazaoxiangyou and Its Antiproliferative Activity and Effect on Glucose Consumption in HepG2 cells. *Molecules* **2017**, *22*, 1227–1239. [[CrossRef](#)]
39. Poór, M.; Boda, G.; Needs, P.W.; Kroon, P.A.; Lemli, B.; Bencsik, T. Interaction of quercetin and its metabolites with warfarin: Displacement of warfarin from serum albumin and inhibition of CYP2C9 enzyme. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *88*, 574–581. [[CrossRef](#)]
40. Poór, M.; Boda, G.; Mohos, V.; Kuzma, M.; Bálint, M.; Hetényi, C.; Bencsik, T. Pharmacokinetic interaction of diosmetin and silibinin with other drugs: Inhibition of CYP2C9-mediated biotransformation and displacement from serum albumin. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *102*, 912–921. [[CrossRef](#)]
41. Mohos, V.; Bencsik, T.; Boda, G.; Fliszár-Nyúl, E.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Poór, M. Interactions of casticin, ipriflavone, and resveratrol with serum albumin and their inhibitory effects on CYP2C9 and CYP3A4 enzymes. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 777–784. [[CrossRef](#)]
42. Fliszár-Nyúl, E.; Mohos, V.; Bencsik, T.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Poór, M. Interactions of 7,8-Dihydroxyflavone with Serum Albumin as well as with CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, and Xanthine Oxidase Biotransformation Enzymes. *Biomolecules* **2019**, *9*, 655–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. LLC. *Schrödinger Release 2019-3: Maestro, Schrödinger*; LLC: New York, NY, USA, 2019; Available online: <https://www.schrodinger.com/maestro>. (accessed on 13 January 2020).
44. Kálai, T.; Szabó, Z.; Jekő, J.; Hideg, K. Synthesis of New Allylic Nitroxides via the Wadsworth-Emmons Reaction. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 443–452. [[CrossRef](#)]
45. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Liu, T.; Qian, G.; Wang, W.; Zhang, Y. Molecular docking to understand the metabolic behavior of GNF-351 by CYP3A4 and its potential drug–drug interaction with ketoconazole. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2015**, *40*, 235–238. [[CrossRef](#)]
47. Shahrokh, K.; Orendt, A.; Yost, G.S.; Cheatham, T.E. 3rd Quantum mechanically derived AMBER-compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 119–133. [[CrossRef](#)]



Determination of Ligand Binding Modes in Hydrated Viral Ion Channels to Foster Drug Design and Repositioning

Balázs Zoltán Zsidó, Rita Börzsei, Viktor Szél, and Csaba Hetényi*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00488>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

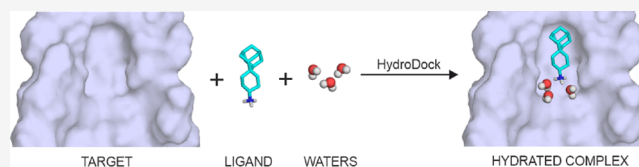


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Target-based design and repositioning are mainstream strategies of drug discovery. Numerous drug design and repositioning projects have been launched to fight the ongoing COVID-19 pandemic. The resulting drug candidates have often failed due to the misprediction of their target-bound structures. The determination of water positions of such structures is particularly challenging due to the large number of possible drugs and the diversity of their hydration patterns. To answer this challenge and help correct predictions, we introduce a new protocol HydroDock, which can build hydrated drug–target complexes from scratch. HydroDock requires only the dry target and drug structures and produces their complexes with appropriately positioned water molecules. As a test application of the protocol, we built the structures of amantadine derivatives in complex with the influenza M2 transmembrane ion channel. The repositioning of amantadine derivatives from this influenza target to the SARS-CoV-2 envelope protein was also investigated. Excellent agreement was observed between experiments and the structures determined by HydroDock. The atomic resolution complex structures showed that water plays a similar role in the binding of amphipathic amantadine derivatives to transmembrane ion channels of both influenza A and SARS-CoV-2. While the hydrophobic regions of the channels capture the bulky hydrocarbon group of the ligand, the surrounding waters direct its orientation parallel with the axes of the channels via bridging interactions with the ionic ligand head. As HydroDock supplied otherwise undetermined structural details, it can be recommended to improve the reliability of future design and repositioning of antiviral drug candidates and many other ligands with an influence of water structure on their mechanism of action.



INTRODUCTION

The COVID-19 pandemic has generated a tsunami in target-based drug design¹ and repositioning.² Target-based design is a widely used approach^{3–7} where the target structure serves as a reference point for fitting and selection of drug candidates. Repositioning is a cheap and fast strategy of drug discovery, as the pharmacological profile of known drugs is readily available with detailed information on their pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxicity, interactions, and side effects. The clinical repositioning trials of a number of known drugs were launched in the past year^{8–11} to test their applicability against the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Although a few drugs were approved for clinical use, the repositioning trials have not led to real breakthroughs against SARS-CoV-2.

The failure of repositioning trials can be largely attributed to the structural differences between the old and new targets. For example, the structural dissimilarities between the active sites of proteases of HIV-1 and SARS-CoV-2 forecasted^{12,13} the failure of recent repositioning trials^{8,14} of HIV-1 protease inhibitors lopinavir and ritonavir to SARS-CoV-2. Such painful lessons highlight the necessity of a careful structure-based design and repositioning to reduce the number of failed clinical trials.

In the present study, we investigate the structural basis of repositioning of FDA-approved drugs amantadine (AA,

Gocovri, Symmetrel) and its derivatives, rimantadine (RA, Flumadine) and spiroadamantyl amine (SA),^{15–20} (Figure 1b) to the ion channel formed by the transmembrane domain of the SARS-CoV-2 envelope protein (EC2, Figure 1a) as a possible “new” target. These AA derivatives were shown to inhibit the cation conductance of the M2 transmembrane ion channel of influenza A virus (M2A, Figure 1a),²¹ and the “old” target was also used as a reference in this study. AA was originally suggested¹⁶ against SARS-CoV and showed various beneficial effects in patients infected by the SARS-CoV-2^{18–20} as well. EC2 is homologous to the envelope protein of SARS-CoV¹⁶ and also functions as a cation-selective ion channel like M2A, playing a role in virus budding, release, and host inflammation response.¹⁵ The blocking of EC2 by AA derivatives or similar amphipathic molecules is a promising drug design strategy^{22,23} even on a longer term due to the low mutagenicity of EC2 found in mutated SARS-CoV-2 lineages collected from patients in

Received: May 6, 2021

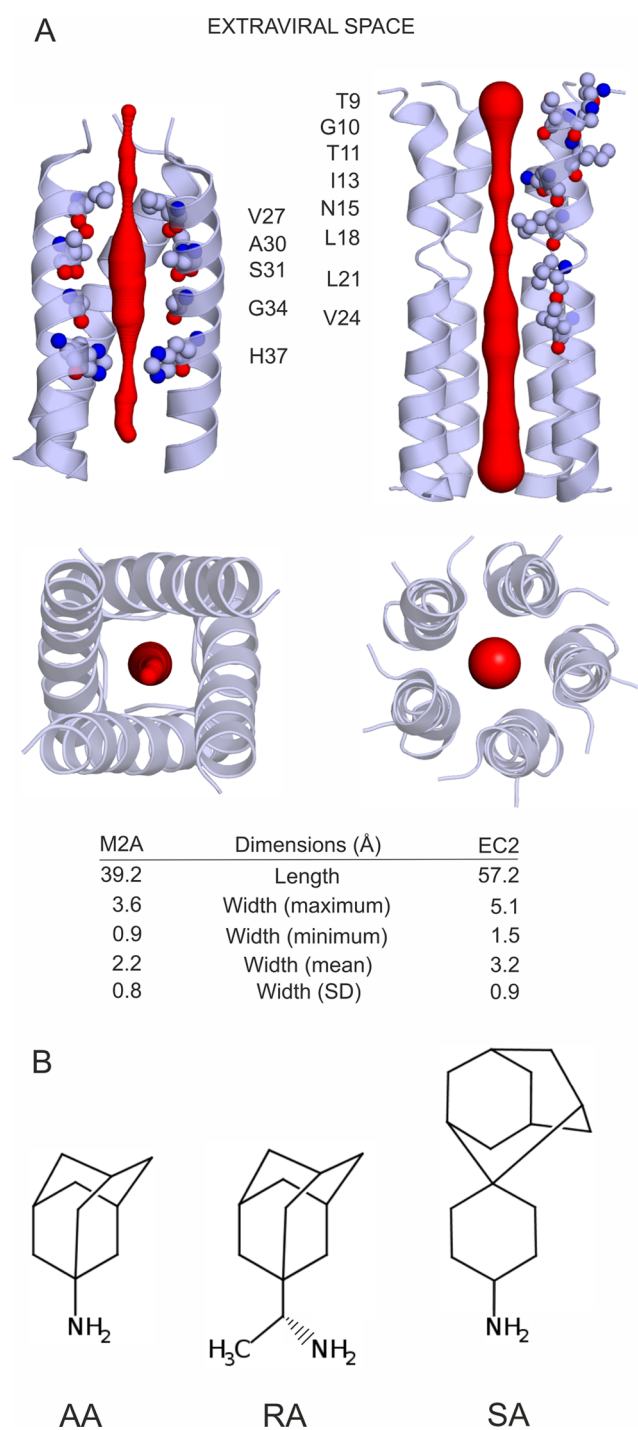


Figure 1. (A) M2A (left) and EC2 (right) ion channels shown as cartoon. The red cone represents the diameter of the ion channels. Interacting amino acids are labeled and shown as spheres in the side views at the top (a helix was deleted to show the interior of the channels). Top views from the extraviral space and lists of dimensions of the channels are shown at the bottom. (B) Lewis structures of the three AA derivatives investigated in the present study. Under physiological conditions, the amino group is protonated, resulting in a net charge of +1. *R*-rimantadine was used in the study, referred to as RA.

India.²⁴ Recently, the atomic resolution structure of EC2 (Figure 1a) was determined¹⁵ using solid-state NMR, providing a starting point for target-based design. The same study demonstrated the binding of fluorinated AA to EC2 as well.

The large pore¹⁵ of EC2 is formed in a pentameric helical bundle stabilized by interhelical aromatic stacking interactions.

The pore size of EC2 is comparable to that formed by the tetrameric bundle in M2A²¹ (Figure 1a), which captures the AA derivatives. The similar pore geometry of M2A and EC2 is just one structural factor if considering the repositioning of ligands between the two ion channels.

Their amino acid composition and water structure²⁵ are also key factors of ligand binding. The mediating role of water molecules was highlighted in the binding mechanism of AA derivatives to M2A.^{21,25} Considering the above similarity between M2A and EC2, one may expect that understanding the role of water molecules will be important in the case of EC2 as well. The available EC2 structure¹⁵ is an apo form without water and ligand molecules (Figure 1a), and therefore, it cannot supply any information on the possible mediating role of water molecules in ligand binding to EC2. Thus, an atomic resolution structure of the full complex with a bound ligand and water molecules (a hydrated holo structure) is necessary to foster correct repositioning and design to EC2.

As the full complex has not been solved at atomic resolution, we have to calculate the binding of the AA derivatives and the water structure from scratch, which is a challenging task for current methods.²⁵ To answer this challenge, we introduce a new protocol that will supply the water structure of the EC2 channel and also adopt docking and molecular dynamics steps to produce the representative binding modes of AA derivatives. The protocol will be tested on the old M2A target with available experimental complex structures as references and will be transferred to the new EC2 target. In this way, we will explore the role of water in binding of the AA derivatives and produce their key binding modes on the new EC2 target, supplying the necessary atomic resolution structures for repositioning and design.

METHODS

Input Structures. The atomic coordinates of M2A complexed with AA (6BKK), RA (6BKL), and SA (6BMZ)²¹ and the ligand-free structure of M2A (3LBW)²⁶ were acquired from the Protein Databank (PDB). A, B, C, and D chains and their corresponding ligand (except for the apo structure) and water molecules were used for protocol development and validation purposes (Sections “The Effect of Interfacial Water Molecules on Ligand Docking to the Influenza A M2A Channel” and “Construction of the Ligand-Bound, Hydrated Influenza A M2A Channel Structures from Scratch”). The EC2 NMR structure (first model of the 20) from ref 15 (7K3G) was used in Section “Ligand Binding Modes and the Water Structure in the EC2 Channel of SARS-CoV-2” to create the hydration structure and ligand binding modes from scratch.

Ligand Preparation. Ligands were built in Maestro.²⁷ The raw structures were energy-minimized using a semiempirical quantum chemistry program package, MOPAC²⁸ with PM7 parametrization.²⁹ The gradient norm was set to 0.001. The energy-minimized structures were submitted to force calculations; the force constant matrices were positive definite. Restrained electrostatic potential (RESP) charges were calculated with RED-vIII.S2³⁰ after geometry optimization by GAMESS.³¹ Acpype³² and antechamber^{32,33} were used to assign bound parameters and atom types for topology of ligands.

Target Preparation. The N-terminal ends of the ion channels were capped with acetyl groups and the C-terminal ends with imino-methyl groups using Maestro²⁷ and were subjected to

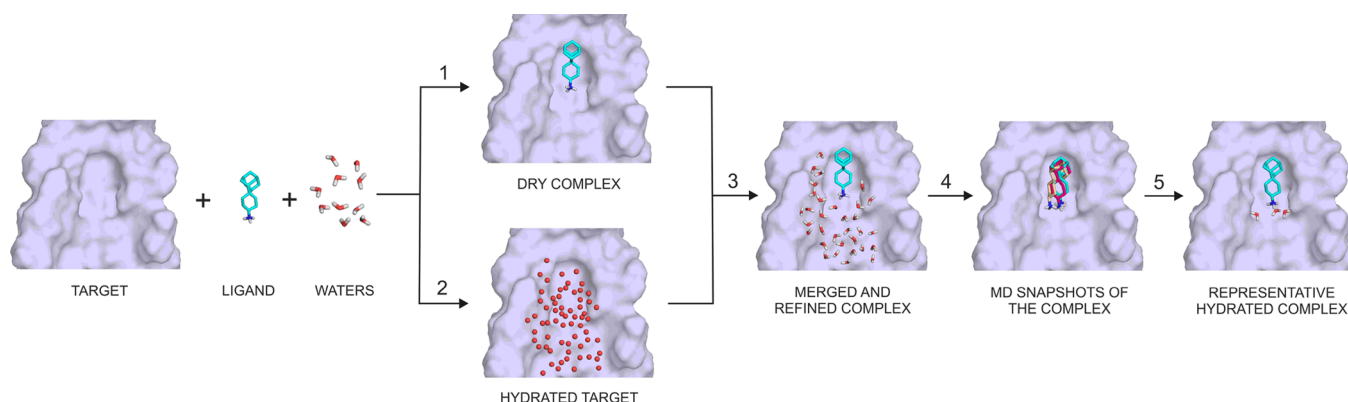


Figure 2. Assembly of the hydrated complex of the M2A channel (target, surface) and SA (ligand, sticks) from scratch using the HydroDock protocol. The numbering of steps of HydroDock follows the explanation in the main text. After the first step, nonminimized water positions from MobyWat^{40,41} are shown as red spheres; otherwise, sticks representation is used for hydrogenated and minimized waters. During the third step, some of the water positions are replaced by the ligand. For clarity, only a few MD snapshots of ligand binding modes are shown after the fourth step. Coordinate files of all snapshots are accessible in the [Supporting Information](#).

energy minimization in the merging step (Step 3). Hydrogen atoms and Gasteiger–Marsili partial charges³⁴ were added to the targets with AutoDock Tools.³⁵ After ligand and target preparation, the dry target and respective ligands were used as starting points of HydroDock (next section).

HydroDock. HydroDock is a new protocol shortly featured in Section 2 of [Results and Discussion](#). The steps of HydroDock are numbered in [Figure 2](#) and referred to in the following detailed descriptions using the same numbering as in [Results and Discussion](#).

Step 1. Dry Docking. Blind docking was performed as described before³⁶ for both targets M2A and EC2 (Box B, [Table S5](#)). During blind docking, the docking box covered the whole surface of the target. Focused docking was also used for EC2 when the box only covered the upper half of the protein (Box A, [Table S5](#)). The unliganded M2A and EC2 structures were used as targets of the blind and focused docking runs. No explicit water molecules were adopted from the PDB structures. The target was treated as a rigid body except that the flexibility of the N15 amino acid side chains was allowed on all helices of EC2 to allow the entrance of the ligand toward the intraviral regions ([Table S5](#)). AutoGrid 4.2³⁵ was used for grid map calculations. Grid boxes were generated around the entire M2A target. The grid boxes were centered on the target, and 70 (M2A) and 90 (EC2) grid points along all axes were set with 0.503 Å grid spacing (0.375 Å in Box A). The resulting docking box covered the entire M2A and EC2 in the case of blind docking and allowed the entrance of the ligands from both extra- and intraviral regions. To avoid artefacts and allow ligand entrance only from the extraviral space ([Figure 1a](#)), the docking box was reduced to only cover the upper half of EC2 (Box A, [Table S5](#)).

Molecular docking calculations were performed by AutoDock 4.2.³⁵ Hydrogen atoms and Gasteiger–Marsili³⁴ partial charges were added to the ligands with an OpenBabel³⁷ program package. All chemically relevant torsions of the ligands were enabled. One hundred blind docking runs were performed. The Lamarckian genetic algorithm and the pseudo-Solis and Wets local search with a maximum number of 300 iterations and 25 million energy evaluations and 150 population size were applied as in refs 38 and 39. The generated 100 ligand binding modes were clustered and ranked (see Section “[Evaluation Criteria](#)” for details) based on their calculated free energy of binding values and structural similarity. Representative ligand structures of each

rank in complex with their dry target structures were used as dry complexes. Due to the symmetry of both M2A and EC2, from among identical, symmetry-related rank representatives, the one with the lowest calculated binding free energy was selected and forwarded to the next steps of HydroDock.

In the case of M2A, a total of six representatives were found, one–one for all three AA derivatives on both holo and apo target forms ([Table 1](#)). In the case of EC2, five (AA1, ..., AA5, [Table S5](#)), two, and one representatives of AA, RA, and SA were found (eight in total) and forwarded to Step 3.

Table 1. Comparison of Computationally Docked and Experimental Binding Positions of Ligands AA, RA, and SA to a Dry M2A Target

ligand	M2A conformation	RMSD (Å)	rank ^a
AA	holo	3.3	1/1
AA	apo	3.7	1/1
RA	holo	3.8	1/2
RA	apo	3.6	1/1
SA	holo	4.8	1/3
SA	apo	2.9	1/1
mean		3.7	
SD		0.7	

^aSerial number of rank/count of all ranks.

Step 2. Building the Water Structure of the Inner Surface of the Target Channels. The water structure of the inner surface of the target channels was built using MobyWat,^{40,41} which requires an MD trajectory of a target in explicit water as an input. The MD-based evaluation of MobyWat allows consideration of all solute–water and water–water interactions and results in high success rates if compared with experimental structures.^{40,41}

Generation of MD Trajectories. The dry M2A (6BKK) and EC2 (7K3G) targets were energy-minimized by steepest descent and conjugate gradient algorithms as in Step 3 of HydroDock to prepare them for the 1 ns-long MD simulations. The simulation box was filled with explicit TIP3P⁴² water molecules, and counterions (sodium or chloride) were added to neutralize the system. Exit tolerance levels were set to 10³ and 10 kJ·mol⁻¹·nm⁻¹, while maximum step sizes were set to 0.5 and 0.05 nm for the steepest descent and conjugate gradient steps, respectively.

Position restraints were applied on solute heavy atoms at a force constant of $10^3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$. Calculations were performed with programs of the GROMACS⁴³ software package using the AMBER99SB-ILDN⁴⁴ force field. After energy minimization, 1 ns-long NPT MD simulation was carried out with a time step of 2 fs. For temperature coupling, the velocity rescale⁴⁵ algorithm was used. The solute and solvent were coupled separately with a reference temperature of 300 K and a coupling time constant of 0.1 ps. Pressure was coupled by the Parrinello–Rahman algorithm^{46,47} and a coupling time constant of 0.5 ps, compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$, and reference pressure of 1 bar. Particle mesh-Ewald summation⁴⁸ was used for long-range electrostatics. Van der Waals and Coulomb interactions had a cutoff at 11 Å. Coordinates were saved at regular time intervals of 1 ps, yielding 1×10^3 frames. Position restraints were applied on solute heavy atoms at a force constant of $10^3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$. Periodic boundary conditions were treated before analysis to make the solute whole and recover hydrated solute structures centered in the box. Each frame was fit to the original protein crystal structure using $C\alpha$ atoms. The final trajectory including all atomic coordinates of all frames was converted to portable XDR binary files equipped with name extension xtc.

MobyWat Calculations. From the MD trajectory, surface water positions were calculated with Mobywat's⁴⁰ all-inclusive identity-based (IDa) prediction algorithm. The maximum distance from the target (d_{max}), prediction, and clustering tolerances were set to 5, 2.5, and 1 Å, respectively. The MobyWat algorithm was described earlier.^{40,41} Briefly, candidate water molecules for all frames are selected based on a desired distance limit (d_{max}) from the target, and then an occupancy list is constructed containing every different water IDs on every line and the respective number of occurrences as candidates among all frames. Clustering is applied to all rows (all different water IDs) of the occupancy list using the ctoi parameter to define the distance between elements of the same cluster. The largest cluster is selected from all to give the first predicted water molecule by averaging the spatial coordinates of included molecules. In the further steps, clusters are selected in a descending order size-wise and checked if their distance is larger than the prediction tolerance from previously predicted water positions. After the above clustering, a list of water positions (prediction list) was produced as the O atom coordinates covering the surface of the EC2 (7K3G) and M2A (6BKK) channels. The hydrogens were added to the predicted water O atoms in a later step (Step 3 of HydroDock).

In the case of M2A, the predicted water oxygen positions were compared to the reference water molecules in the PDB structure 6BKK using the validation mode of MobyWat. The above settings were used with a match tolerance of 1.5 Å.

Step 3. Merging and Refinement. Merging. The outcomes of Steps 1 and 2 were combined to build the raw complex structures, that is, the hydrated, ligand-bound targets. For this, the complexes were placed in a common coordinate system by alignment of the target structure of the dry complex from Step 1 and the hydrated target structure from Step 2 using PyMol.⁴⁹ After alignment, a raw complex still contains all surface water molecules predicted by MobyWat. However, after the placement of the dry docked ligand structure into the fully hydrated target, some water molecules overlap with the ligand. The overlapping water molecules were removed by the editing mode of MobyWat,⁴⁰ and only interfacial water molecules were retained. The merged structures (see Step 1. Dry Docking) of the eight

EC2 complexes (Table S5) and six M2A complexes (Table 1) were then subjected to robust refinement.

Soft Refinement (Not Part of HydroDock and Used during Protocol Development) (Figure S1). The interfacial crystallographic water oxygen atoms within a d_{max} of 5.0 Å distance limit from both the ligand and the target were kept, as they bridge between the ligand and the amino acid residues of the protein; other waters were removed. The structure of the M2A channel with the water O atoms was placed in a dodecahedral box using a distance criterion of 1 nm between the solute and the box. Void spaces of the box were filled by explicit TIP3P water molecules by GROMACS.⁴³ Hydrogen atoms were added to water oxygen and solute atoms by the GROMACS program pdb2gmx. The system was neutralized by counterions. A steepest descent (steepest descent1) optimization was carried out,⁴⁰ with convergence threshold set to $10^3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$ followed by a conjugate gradient (conjugate gradient1) calculation, where the convergence threshold was set $10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$. Position restraints at a force constant of $10^3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ were applied on all heavy atoms in both steps. An AMBER99SB-ILDN⁴⁴ force field was used for the calculations. The steepest descent and conjugate gradient minimization steps were carried out once again (steepest descent2, conjugate gradient2), with the same settings⁴⁰ as in steepest descent1 and conjugate gradient1, with the exception that only backbone $C\alpha$ atoms were position restrained.

Robust Refinement Was Adopted as an Appropriate Protocol of HydroDock Based on the Good Docking Results (Table 3). Robust refinement has only one difference when compared to soft refinement; the steepest descent1+conjugate gradient1 step is not immediately followed by the steepest descent2+conjugate gradient2 steps, but first, a 100 ps-long MD simulation (md) is carried out (steepest descent1+conjugate gradient1+md+steepest descent2+conjugate gradient2). In the MD simulation, only backbone $C\alpha$ atoms were position-restrained. Notably, in a general application of HydroDock for systems with large flexibility on the target backbones, the use of a membrane model would be advisable instead of position restraining of the backbone. For temperature coupling, the velocity rescale algorithm was used. The solute and solvent were coupled separately with a reference temperature of 300 K and a coupling time constant of 0.1 ps. Pressure was coupled with the Parrinello–Rahman algorithm with a coupling time constant of 0.5 ps, compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$, and reference pressure of 1 bar. Particle mesh-Ewald summation was used for long-range electrostatics. Van der Waals and Coulomb interactions had a cutoff at 11 Å. Robust refinement resulted in the correct position of the experimental water molecules of M2A, with the right orientation of H atoms that led to the formulation of two water networks. Based on the success, robust refinement was adopted in Step 3 of HydroDock after merging.

Wet Docking (Not Part of HydroDock and Used during Protocol Development) to Choose the Sufficient Refinement Protocol and Validate It. In wet docking, every detail was set as in dry docking (Step 1 of HydroDock) except that refined water molecules were included. When compared to the experimental ligand positions, the Gasteiger–Marsili partial charges on the atoms of the water molecules yielded incorrect results (Figure S2). Thus, partial charges of the TIP3P explicit water model were used on all water molecules instead.

Step 4. Generating MD Snapshots of the Target–Ligand Complex. The MD simulations of the merged and refined complexes were carried out with the same settings described in

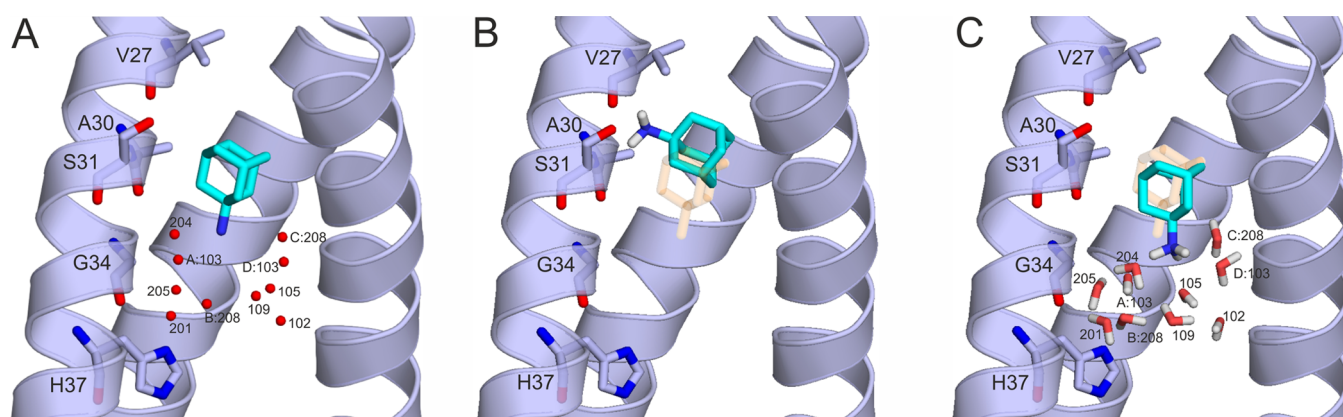


Figure 3. Complex of AA (sticks with teal carbon) bound to the M2A channel (cartoon and sticks with gray carbon, a frontal helix turned off for clarity). (A) Experimental binding mode in the PDB structure 6bkk with three H-bonds formed between the ligand protonated amino N and water O atoms. Water molecules are represented as red spheres and labeled by their chain IDs and/or residue numbers. (B) Result of “dry” docking of AA shows a shift of the positive protonated amino group of AA. Instead of the missing water molecules, interactions with the partially negative backbone carbonyl groups of V27 and A30 were formed. (C) Result of “wet” docking of AA is in a good agreement with the experimental binding mode of AA shown in panel A. The minimized water molecules are shown as thick lines and labeled according to the residue numbering in the PDB structure 6bkk. The crystallographic ligand binding position in (A) is also shown in (B) and (C) with transparent orange sticks for comparability.

the minimization procedure (robust refinement). The simulations were performed as listed in Table S4 and for 100 ns in the cases of M2A and EC2, respectively. Only the $C\alpha$ atoms of the proteins were restrained. The movements of the amino acid side chains, the ligand, and the solvent were allowed. The refined hydration structure was kept in the MD simulations; the rest of the simulation box was filled with water molecules by GROMACS. Complex snapshots were aligned by a GROMACS tool `trjconv` using their target $C\alpha$ atoms, and the bound ligand snapshots were separately generated as individual files from the MD trajectory file by 0.1 ns steps (conformation pool).

Step 5. The Selection of the Representative Ligand Binding Modes from the MD Trajectory File. An average ligand conformation was calculated from the conformation pool using a shell script provided in the Supporting Information file. RMSD values between the individual ligand pool structures and the average ligand pool structure were calculated according to eq 1, where the average pool conformation was used instead as a reference C in this case. A pool structure with the lowest RMSD value was selected as the representative ligand binding mode from the MD trajectory. A representative binding mode of the ligand is the suggested final binding mode to the target (M2A, EC2). Distinct binding modes produced by dry docking (Step 1) usually result in more than one representative structure after HydroDock.

Evaluation Criteria. Standard criteria^{50–54} were applied to evaluate the results of dry and wet docking and HydroDock. In all cases, the structural match of the calculated (docked or HydroDock representative, D in eq 1) binding mode to the crystallographic reference (C) was expressed as a root-mean-square deviation (RMSD) value according to eq 1⁵¹

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |\mathbf{D}_n - \mathbf{C}_n|^2} \quad (1)$$

In eq 1, N is the number of ligand heavy atoms, \mathbf{C} is the space vector of the n th heavy atom of the crystallographic reference ligand molecule, and \mathbf{D} is the space vector of the n th heavy atom of the calculated ligand conformation. Overlapping ligand conformations resulted by 120° turns around the trigonal

vertical axis were considered identical during RMSD calculations.

The ranking order was also shown in the cases of dry and wet docking trials. The docked ligand conformations were structurally clustered and ranked according to their AutoDock 4.2 binding free energy values, and the serial numbers of ranks are listed in Results and Discussion. During this procedure, the ligand structure with the lowest calculated free energy of binding was selected, and the neighboring docked ligand structures within 2 Å³⁸ were collected in the rank; then, a new rank is opened starting with an unused structure of the lowest calculated free energy of binding from the remaining structures, etc. until all 100 ligand structures were collected into ranks.⁴⁰ Ranks with a low serial number indicate an energetically favorable binding conformation. Note that in the case of HydroDock, representative binding modes were selected (Step 5) without the need of further ranking.

Calculation of Interaction Energy Values of SA-EC2 Complexes. The Lennard-Jones interaction energy (E_{ij}) was calculated between the target and ligand molecules according to eq 2

$$E_{ij} = \sum_{ij}^{N_T N_L} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right]$$

$$A_{ij} = \varepsilon_{ij} R_{ij}^{12}; B_{ij} = 2\varepsilon_{ij} R_{ij}^6; R_{ij} = R_i + R_j; \varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad (2)$$

In eq 2, ε_i and ε_j are the potential well depths in the equilibrium distance of atom pairs of identical types; ε_{ij} is the potential well depth in equilibrium between the i th (ligand) and j th (target) atoms; R_{ij} is the internuclear distance at equilibrium between i th (ligand) and j th (target) atoms; R_i and R_j are half equilibrium distances between ii and jj atom pairs of identical types, respectively; r_{ij} is the actual distance between the i th (ligand) and j th (target) atoms; N_T is the number of target atoms; and N_L is the number of ligand atoms. The Amber 2012 force field parameters were used.⁵⁶ The calculations were performed for dry and hydrated targets as well. In the case of the hydrated target, explicit water molecules were considered as part of the target.

RESULTS AND DISCUSSION

(1) The Effect of Interfacial Water Molecules on Ligand Docking to the Influenza A M2A Channel. Water molecules play a key role²¹ in binding AA and its derivatives to the influenza A M2A channel. For example, water (w) molecules A:w103, B:w204 (at A30) and B:w201, and C:w205 (at G34) form bridges between the positive protonated amino group of AA and the carbonyl oxygens of the amino acids (Figure 3a, the numbering of the PDB structure 6bkk is used). Together with other water molecules at H37, a static H-bonding network of 10 water molecules is formed, filling the channel cavity below AA (Figure 3a). Incorporation of such water molecules in docking calculations can be essential^{57–60} to obtain precise results.

To check this assumption, a systematic investigation of computational docking of all three ligands (AA, RA, and SA) was performed to the M2A channel using different approaches of handling interfacial water molecules. Targeting the dry M2A channel without any surface water molecules (Table 1) is the simplest approach and provides a basis for comparisons throughout this study. An average of 3.7 ± 0.7 Å root-mean-square deviation (RMSD) was calculated between the docked and crystallographic ligand conformations with the latter ones used as references. This value is above the RMSD of 1.5–2.0 Å considered acceptable in the literature^{50–54} and indicates that the dry M2A channel may not be an appropriate target for docking. The dry M2A channels in holo (ligand-bound) conformations did not yield significantly better results than the apo ones as docking targets. This follows from the high identity between the holo and apo target structures with an average superposition RMSD of $0.3 \text{ Å} \pm 0.1$ (Table S2). Thus, there is no considerable induced fit during ligand binding to the M2A channel, and the rigidity (Methods) of the target structure did not affect the result in these cases. In the docked structure (AA-Holo in Table 1), the adamantyl group of AA was close to the crystallographic position (Figure 3b). However, the lack of the abovementioned (Figure 3a)²¹ bridging water molecules resulted in a miscoordination of the protonated amino group to the carbonyl oxygen of V27 and the hydroxyl group of S31 (Figure 3b) and the large RMSD values of Table 1.

In the wet docking calculations, a set of functional water positions (Table 2 and Figure 3c) of the crystal structures was used together with the M2A channel as a target. As the coordinates of water hydrogen atoms were not available, a theoretical refinement was necessary to add and optimize their positions. During the refinements, the ligand was kept in the holo structure to help in the correct arrangements of water hydrogen atoms in contact with the protonated amino group.

Two refinement protocols (a soft and a robust one) were investigated. During the soft protocol (soft refinement), simple energy minimization steps were applied (Methods) for the water hydrogen atoms while the positions of all heavy atoms (including water oxygen) were restrained in their crystallographic positions. The docking of AA to the ligand-free, S-refined target still did not result in an acceptable RMSD (2.7 Å), which can be attributed to the incorrectly positioned water hydrogen atoms (Figure S1). A closer inspection of the S-refined target structure showed that the incorrect positioning of water hydrogen atoms was a consequence of several close contacts (Table 2) in the original crystallographic water structure.²¹ The close contacts were maintained by the position restraints during soft refinement, resulting in relatively small shifts from their crystallographic positions (Table 2), hindered reconstruction of

Table 2. Deviations of Refined Crystallographic and MobyWat-Predicted Water Positions Used in Wet Docking Calculations Measured from the Original Crystallographic Positions (PDB ID 6bkk) with Their Close Contacts Also Listed

water # ^a	close contact ^b	soft refinement (Å)	robust refinement (Å)	predicted (Å) ^c
A:w102		0.3	0.2	0.2
A:w103		0.6	1.6	0.9
D:w103		0.5	0.5	0.9
D:w105	D:w109	0.7	2.1	0.6
D:w109	C:w208, D:w105	0.9	1.0	2.1
B:w201	B:G34	1.0	1.0	0.6
B:w204		0.8	1.6	0.7
C:w205		0.4	0.9	0.5
B:w208		0.8	0.8	1.0
C:w208	D:w109	0.9	0.2	0.3

^aThe numbering of PDB structure 6bkk is used (see Table S1 for details of selection of reference structures). ^bClose contacts of the crystallographic structure were listed if the distance between the oxygen atom of the actual water molecule and a heavy atom of a neighboring residue or the oxygen of the neighboring water molecule was below 2.75 Å. ^cCrystallographic water positions of PDB structure 6bkk were used as reference; see also Table S1 for details on selection of reference crystallographic structures.

the interfacial H-bonding network, and atomic positions preformed to interact with AA (Figure S1). As docking of AA to the wet M2A target with soft refinement did not improve the dry results (Table 1), a robust protocol was also tested (robust refinement) including a molecular dynamics step with no restraints on the atoms. Robust refinement appropriately shifted half of the water molecules of Table 2 (A:w103, D:w105, D:w109, B:w201, and B:w204) to 1 Å or a larger distance (Table S3) from their crystallographic positions. In this way, their erroneous close contacts were eliminated, and their hydrogen atoms were arranged into correct orientations, resulting in a perfect H-bonding network. Some experimenting with the partial charge system on water molecules showed that TIP3P⁴² outperformed Gasteiger–Marsilli³⁴ partial charges (Figure S2). Robust refinement and TIP3P charges on water molecules yielded excellent docking results with an average RMSD of 1.2 ± 0.3 Å (Table 3) for all ligands. The low serial numbers/counts of the corresponding ranks indicate that the structural precision reflected by the low RMSD values was accompanied by the best

Table 3. Comparison of Computationally Docked and Experimental Binding Positions of Ligands AA, RA, and SA to the M2A Target Covered by Crystallographic Water Positions Subjected to a Robust Refinement Protocol and Equipped with Partial Charges of the TIP3P Explicit Water Model

ligand	M2A conformation	RMSD (Å)	rank ^a
AA	holo	1.2	1/1
AA	apo	1.0	1/1
RA	holo	1.0	1/2
SA	holo	1.7	1/1
mean (holo)		1.2	
SD (holo)		0.3	

^aSerial number of the rank/count of all ranks.

calculated binding free energies (or a single, homogeneous rank was produced). In the case of AA, docking to the wet, apo M2A channel structure was also performed after robust refinement. Similar to the holo results, an excellent RMSD of 1.0 Å was obtained (Figure 3c).

The results of Table 3 showed that appropriately placed and oriented water molecules are keys to precise docking results if compared with the insufficient outcomes of dry docking (Table 1). It was also found (Table 2) that the availability of crystallographic water positions alone cannot guarantee the success for two reasons. (1) Often, only oxygen positions are supplied, and water orientations are obviously not assigned due to the lack of hydrogen atoms. (2) There are also other limitations^{41,61–69} of assignment of the crystallographic density map, resulting in missing or too many water molecules (overfitting). Such problems often result in crystallization artefacts⁶⁷ and close contacts similar to those listed in Table 2. Thus, a robust theoretical refinement of experimental water structure is necessary in general and for correct calculation of complexes of all three ligands with the M2A channel in the present case.

(2) Construction of the Ligand-Bound, Hydrated Influenza A M2A Channel Structures from Scratch. In agreement with other studies,²⁵ the results of the previous section showed that docking calculations are very sensitive to even small errors in the water structure. In the previous examples (Table 2), a robust refinement of the measured water positions was necessary to achieve good docking results. In a real drug screening project,^{36,55} experiments cannot supply interfacial water positions and holo structures for all possible ligand molecules designed for the target binding pocket, and only an apo target structure is available for the docking calculations. Thus, only atomic coordinates of the individual components (ligand, target, and water) can be used for the construction work. It is a real challenge to bring all these partners together into a hydrated complex structure due to the difficulties of correct positioning of interfacial water molecules.²⁵

To address this challenge, we introduce HydroDock, a hybrid protocol that supplies the hydrated complex structure from scratch. HydroDock is composed of five steps (Figure 2 and Methods) and was tested on the M2A target and its ligands (Figure 1). Step 1 involved a fast docking calculation with results described in Table 1. In Step 2, the water structure of the surface of the target was built by MobyWat^{40,41} with high precision. MobyWat is a molecular dynamics (MD)-based method that can predict solute–water and water–water interactions as well. In the present case, the inner surface of the M2A target was completely hydrated and the calculated water positions were compared to the crystallographic reference ones as listed in Table 2. Nine out of ten water molecules were successfully predicted at a match threshold of 1.0 Å (see also Figure S3). The predicted hydration structure was a priori close contact-free and equipped with hydrogen atoms, which is necessary for correct docking calculations (Section “The Effect of Interfacial Water Molecules on Ligand Docking to the Influenza A M2A Channel” and Table 3). In Step 3, the results of the first two steps were merged into one structure and surface water molecules overlapping with the docked ligand were eliminated using the Editing mode⁴⁰ of MobyWat. In Step 4, the hydrated M2A–ligand complexes were subjected to molecular dynamics (MD) in a simulation box filled with explicit water molecules to generate a pool of several hundreds (N_{pool} in Table S4) of member conformations. Step 5 of HydroDock produces a

representative complex conformation statistically selected from the pool (see Methods for the details of all steps).

The matches of the representative ligand conformations to the crystallographic ones are listed in Table 4 and shown in Figure 4.

Table 4. Comparison of Computational and Experimental Binding Modes of Ligands AA, RA, and SA to the M2A Target^a

ligand	M2A conformation	RMSD of representative (Å)	mean RMSD (Å)	SD RMSD (Å)
AA	holo	0.7	1.8	0.7
AA	apo	1.1	1.9	0.5
RA	holo	4.0	2.0	0.7
RA	apo	1.5	1.8	0.6
SA	holo	2.6	1.7	0.9
SA	apo	0.3	1.1	0.7

^aThe computational binding modes were produced by the HydroDock protocol introduced in the present study.

For these small ligands (Figure 1b), the conformation pools were generated in relatively short MD simulations of 40–100 ns (Methods and Table S4) appropriate for the selection of the representatives. The search space was also restricted by the helical boundaries of the narrow M2A channel (Figure 1a), and therefore, the selection of representatives was not particularly challenging from the ligand conformation pools containing fairly uniform binding modes (Table 4 and Table S4). Notably, in our previous study,⁵⁵ we found that the generation of conformation pools in the cases of large, flexible ligands may require longer MD simulation times, especially if they bind to the target surface.

The final results (Table 4 and Figure 4) show excellent agreement with the experimental ligand conformations²¹ in all three cases. A closer inspection of the changes during the MD simulations (Step 4 of HydroDock) shows that ligand binding modes underwent considerable rearrangements due to their interactions with water molecules generated in Step 2. Due to the lack of the anchoring water molecules, dry docking (Step 1 of Hydrodock) produced misdocked binding modes exemplified by Figure 3a. During Step 4, all three ligands entered hydration networks of surrounding water molecules via their protonated amino groups that formed hydrogen bonds with water oxygen atoms (Figure 4). They also adopted their appropriate binding positions (Figure S4) with a rapid rotation and a slight downward movement toward the middle of the channel. Interestingly, besides the crystallographic binding mode, RA also adopted an alternative, parallel orientation corresponding to the higher RMSD of RA, holo in Table 4.

(3) Ligand Binding Modes and the Water Structure in the EC2 Channel of SARS-CoV-2. A recent study¹⁵ explored the interactions of fluoro-AA with EC2 on the basis of chemical shift perturbations from nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic measurements.

They also used docking calculations to map the anchoring residues during ligand entry from the extraviral space down to N15 of EC2 (Figure 1a).

The study identified a group of apolar entry residues T11...I13 by NMR (asterisks in Figure 5a) and others like N15 by docking calculations (empty circles), respectively. The fluoro-AA in ref 15 is only a slight modification of AA, both having a largely hydrophobic head group and a positively charged tail moiety (Figure 1b), and therefore, similar binding modes can be expected for both ligands on EC2.

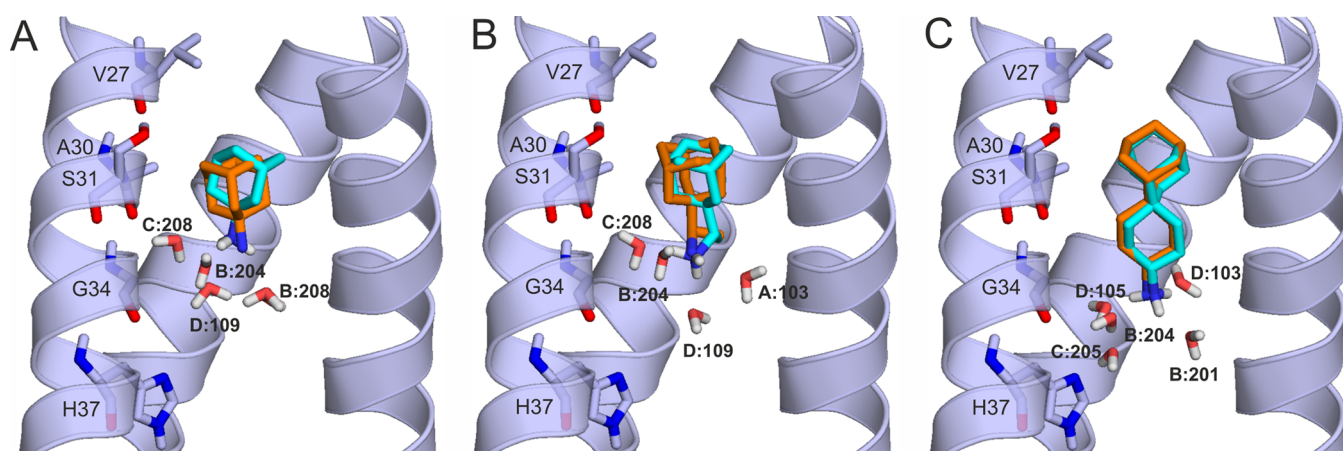


Figure 4. Representative binding modes of ligands (teal sticks for carbon atoms) (A) AA, (B) RA, and (C) SA in the complex with M2A (cartoon) produced by the HydroDock protocol. For comparison, crystallographic ligand binding modes (orange sticks for carbon atoms) are shown as references. Interacting M2A amino acids and water molecules are shown as sticks and labeled accordingly to the residue numbering of 6bkk.

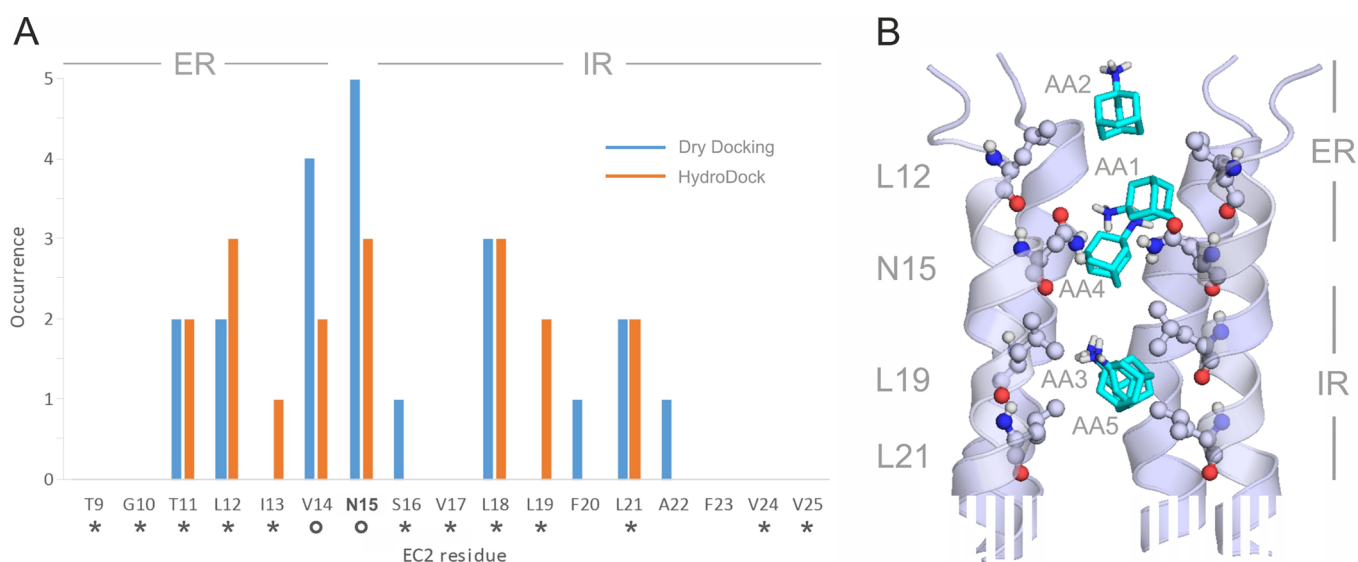


Figure 5. (A) Occurrence of EC2 amino acids interacting with AA in the five binding modes (bars) produced by dry docking (blue bars) and after refinement by HydroDock (orange bars) in the present study. Asterisks and circles indicate interacting amino acids identified by experiments and docking calculations, respectively, in a previous¹⁵ paper. Entrance and intrachannel binding regions are marked as ER and IR, respectively, at the top of the diagrams. (B) Five representative structures of binding modes AA1, ..., AA5 (teal sticks, Table S6) on EC2 (cartoon, truncated at the bottom). The interacting EC2 amino acids are shown as balls and sticks and labeled by their identifiers according to PDB structure 7k3g. ER and IR binding regions are also shown on the right side of the figure. Raw data are provided in Tables S5 and S6 in the Supporting Information.

Inspired by the above NMR-based study¹⁵ on EC2 and the good performance of HydroDock on the M2A channel (previous section), our protocol was applied to map the binding modes of the AA derivatives on the EC2 channel of SARS-CoV-2 (Figure 1). The binding modes of all three ligands (AA, RA, and SA) were mapped by HydroDock using the apo form EC2 as a target from ref 15. The interacting residues of EC2 were collected after dry docking (Figure 5a,b and Table S5) and for the final five representative binding modes produced by HydroDock (Figure 5a,b and Table S6) as well.

A good match was observed (Figure 5a) between the occurrence of EC2 residues involved in the binding modes of fluoro-AA identified in the NMR-based study¹⁵ and AA found by HydroDock in the present study. The results show two main binding regions (Figure 5a,b) of EC2, that is, an entrance region (ER) toward the extraviral space and an intrachannel region (IR) roughly divided by the gating residue N15. Our dry

docking calculations showed that the IR region was accessible only in the case if the side chain of the gating N15 was free to move during the docking (Table S5 and Methods), indicating that N15 has a key role in ligand binding mechanisms. The NMR-based study¹⁵ also emphasized the role of this gating residue and concluded that small molecular drug candidates should show high binding affinity to N15 during their entry into EC2.

Water molecules significantly influence the binding modes of ligands to their targets²⁵ (see also previous sections). As in the above M2A examples, HydroDock refinement of EC2 systems also involved structural hydration, energy minimization, and subsequent 100 ns-long MD simulations for all binding modes found in dry docking (Step 1 in Figure 2). The comparison of the binding pattern after dry docking (blue bars in Figure 5a) with that after HydroDock refinements (orange bars in Figure 5a) may shed light on the influence of water structure on ligand

binding to EC2. The hydrophobic belts of binding modes AA1, AA2, and AA4 (ER) and AA3 and AA5 (IR) maintained after HydroDock refinements (Figure 5a). The ER and IR binding regions consist of hydrophobic cores centered on residues L12 (ER) and L19 and L21 (IR), respectively. While the hydrophobic interactions appear in both dry docking and HydroDock results (Figure 5a), there are certain amino acids like L19 found by only one of the methods. In these cases, a rearrangement of the H-bonding system around the protonated amino group of AA was observed further as discussed in the next section and in Figure S5 in details.

The abovementioned hydrophobic belts of EC2 are necessary to accommodate the hydrocarbon heads of the amphipathic AA derivatives; interfacial water molecules help in the orientation of the ligands in the EC2 channel similar to their binding modes in M2A as discussed in the previous section. For example, in the first binding mode of SA (Figure 6 and Tables S5 and S6), its

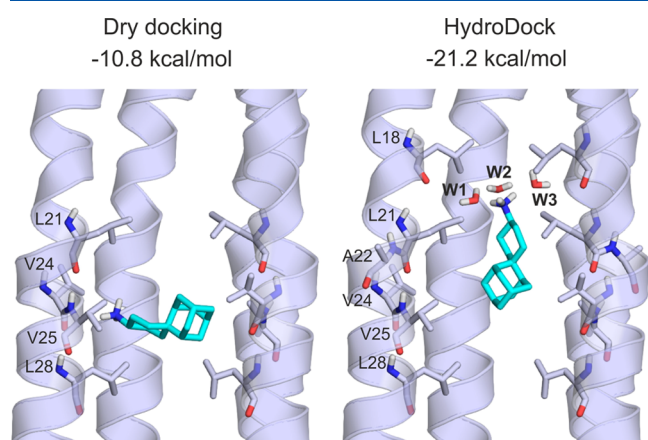


Figure 6. First binding mode of SA (teal sticks) to EC2 (cartoon) after dry docking (left) and HydroDock (right). Interacting amino acid residues are shown as sticks and labeled according to the 7k3g structure file. Water molecules are shown as red and white sticks and labeled as W1, ..., W3. Lennard-Jones interaction energies calculated (Methods) between the ligand SA and the (hydrated) target EC2 are shown at the top of the figure.

spiroadamantyl group is captured in a sandwich of hydrophobic side chains arranged in several belts in the EC2 channel (Figure 6). However, the hydrophobic interactions alone are not enough to obtain the final orientation of the ligand. Dry docking positioned SA perpendicular to the helical axes of the EC2 channel, and the only H-bonding interaction was formed with a backbone amide group of V24. HydroDock refinements that introduced explicit water molecules yielded a parallel orientation, and the protonated amino group formed three H-bonds with water molecules W1, ..., W3 bridging SA with the inner wall of EC2. This bridging system of waters found by HydroDock resulted in an almost doubled SA-EC2 interaction energy if compared with dry docking (Figure 6). Similar observations can be made for the role of water molecules in the binding of ligands AA (Figure S5) and RA as well.

CONCLUSIONS

Determination of water molecules mediating drug–target interactions is often missing or they are erroneously positioned due to inherent limitations of structure determination methods.²⁵ However, the COVID-19 pandemic showed that drug repositioning or design projects often fail due to such

structural errors, resulting in misprediction of drug–target interactions. The present study showed that precise positioning of interfacial water molecules is essential for correct calculation of interaction of viral channels with amphipathic ligands of the AA type. A new protocol, HydroDock, was introduced to build the hydrated target–ligand complex structures and help in the repositioning of the ligands between viral channels. In our examples, HydroDock built the hydrated complex structures from scratch and required only the apo target and ligand structures as inputs. The structures showed excellent agreements with experimental results. The atomic resolution complex structures showed that water plays a similar role in the binding of amphipathic AA derivatives to transmembrane ion channels of both influenza A (M2A) and SARS-CoV-2 (EC2). While the hydrophobic regions of the channels capture the bulky hydrocarbon group of the ligand, the surrounding waters direct its orientation parallel with the axes of the channels via bridging interactions with the ionic ligand head. Such elucidation of the role of waters is often requested,^{21,25,70} and therefore, future applications of HydroDock can be expected in the design and repositioning of drug candidates.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.1c00488>.

Wet docking result, wet docking of AA to M2A, the match between crystallographic reference water positions (red spheres) and the predicted water positions, the movement of RA (teal sticks) during MD simulations, the orientation of ligand AA after dry docking and HydroDock, RA1 and RA2 dry docked binding modes, comparison of holo (6BKK) and apo (3LBW) water structures, the structural fit of M2A targets, the movement of the water molecule, the statistics of generation of the ligand conformation pool, dry docked and HydroDock representatives of AA, RA, and SA (PDF)

Coordinate files of all snapshots of ligand binding modes, raw data of ER and IR binding regions, detailed instruction for evaluations (ZIP)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Csaba Hetényi – *Pharmacoinformatics Unit, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary*; orcid.org/0000-0002-8013-971X; Email: hetenyi.csaba@pte.hu

Authors

Balázs Zoltán Zsidó – *Pharmacoinformatics Unit, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary*

Rita Börzsei – *Pharmacoinformatics Unit, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School and Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary*

Viktor Szél – *Pharmacoinformatics Unit, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary*

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jcim.1c00488>

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

This work was funded by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (K123836 and K134214), 2017-1.2.1 NKP-2017-00002 (NAP-2; Chronic Pain Research Group), EFOP-3.6.1-16-2016-0004, and GINOP 2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS". This work was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

AutoDock (<http://autodock.scripps.edu/>), MobyWat (<http://mobywat.com/>), and GROMACS (<https://www.gromacs.org/>) are open source programs. Schrödinger's Maestro (<https://www.schrodinger.com/products/maestro>), MOPAC (<http://openmopac.net/>), GAMESS (<https://www.msg.chem.iastate.edu/gamess/>), acpype (<https://pypi.org/project/acpype/>), and antechamber (<http://ambermd.org/antechamber/ac.html>) are freely accessible programs for academic use. MOLEonline (<https://mole.upol.cz/>) and RED-vIII (<https://upjv.q4md-forcefieldtools.org/REDServer-Development/>) are accessible web servers. In-house scripts were used for average ligand structure calculation and RMSD comparisons between the average and the ligand conformations from the ligand pool and between the experimental and the ligand conformations from the ligand pool. A detailed instruction for these evaluations with a README file and the scripts are available in the Supporting Information. There is also an example for one system with all the ligand conformation pool files (sep*.pdb), the in-house scripts mentioned above, log files containing the results of the scripts, excel files created from the log files to help in evaluation, a reference pdb structure for RMSD calculation, the average ligand conformation file, and a fit.pdb file that was used for structure alignment with the gmxtor command line. There are three additional examples for energy minimization of the ligands in a separate folder, and all the pdb files were used to create the figures of the main text. A tutorial document, input, and output files are provided in a GitHub repository <https://github.com/csabahetenyi/HydroDock>.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the support from the Governmental Information Technology Development Agency, Hungary. The work was supported by the ÚNKP-20-5 and ÚNKP-20-3-I, New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology, and by the PTE ÁOK-KA no:2019/KA-2019-31. The project has been supported by the European Union, cofinanced by the European Social Fund. Project name and code: Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs, EFOP-3.6.1-16-2016-00004.

ABBREVIATIONS

EC2, SARS-COV-2 envelope protein E; M2A, influenza 2A transmembrane protein

REFERENCES

(1) Fu, L.; Ye, F.; Feng, Y.; Yu, F.; Wang, Q.; Wu, Y.; Zhao, C.; Sun, H.; Huang, B.; Niu, P.; Song, H.; Shi, Y.; Xuebing, L.; Wenjie, T.; Qi, J.;

Gao, G. F. Both Boceprevir and GC376 Efficaciously Inhibit SARS-CoV-2 by Targeting its Main Protease. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4417.

(2) Mucke, H. A. M. COVID-19 and the Drug Repurposing Tsunami. *Assay Drug Dev. Technol.* **2020**, *18*, 211–214.

(3) Eder, J.; Sedrani, R.; Wiesmann, C. The Discovery of First-in-Class Drugs, Origins and Evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 577–587.

(4) Moffat, J. G.; Vincent, F.; Lee, J. A.; Eder, J.; Prunotto, M. Opportunities and Challenges in Phenotypic Drug Discovery, An Industry Perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 531–543.

(5) Swinney, D. C.; Anthony, J. How Were New Medicines Discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 507–519.

(6) Lindsay, M. A. Target Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 831–838.

(7) Schenone, M.; Wagner, B. K.; Clemons, P. A.; Program, B. Biology and Drug Discovery. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *9*, 232–240.

(8) Cao, B.; Wang, Y.; Wen, D.; Liu, W.; Wang, J.; Fan, G.; Ruan, L.; Song, B.; Cai, Y.; Wei, M.; Li, X.; Xia, J.; Chen, N.; Xiang, J.; Yu, T.; Bai, T.; Xie, X.; Zhang, L.; Li, C.; Yuan, Y.; Chen, H.; Li, H.; Huang, H.; Tu, S.; Gong, F.; Liu, Y.; Wei, Y.; Dong, C.; Zhou, F.; Gu, X.; Xu, J.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Li, H.; Shang, L.; Wang, K.; Li, X.; Zhou, X.; Dong, X.; Qu, Z.; Lu, S.; Hu, X.; Ruan, S.; Luo, S.; Wu, J.; Peng, L.; Cheng, F.; Pan, L.; Zou, J.; Jia, C.; Wang, J.; Liu, X.; Wang, S.; Wu, X.; Ge, Q.; He, J.; Zhan, H.; Qiu, F.; Guo, L.; Huang, C.; Jaki, T.; Hayden, F. G.; Horby, P. W.; Zhang, D.; Wang, C. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1787–1799.

(9) Horby, P. W.; Mafham, M.; Bell, J. L.; Linsell, L.; Staplin, N.; Emberson, J.; Palfreeman, A.; Raw, J.; Elmahi, E.; Prudon, B.; Green, C.; Carley, S.; Chadwick, D.; Davies, M.; Wise, M. P.; Baillie, J. K.; Chappell, L. C.; Faust, S. N.; Jaki, T.; Jefferey, K.; Lim, W. S.; Montgomery, A.; Rowan, K.; Juszczak, E.; Haynes, R.; Landray, M. J. Lopinavir–Ritonavir in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY), a Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. *Lancet* **2020**, *396*, 1345–1352.

(10) Grein, J.; Ohmagari, N.; Shin, D.; Diaz, G.; Asperges, E.; Castagna, A.; Feldt, T.; Green, G.; Green, M. L.; Lescure, F.; Nicastrì, E.; Oda, R.; Yo, K.; Quiros-Roldan, E.; Studemeister, A.; Redinski, J.; Ahmed, S.; Bernett, J.; Chelliah, D.; Chen, D.; Chihara, S.; Cohen, S. H.; Cunningham, J.; Monforte, A. D.; Ismail, S.; Kato, H.; Lapadula, G.; L'Her, E.; Maeno, T.; Majumder, S.; Massari, M.; Mora-Rillo, M.; Mutoh, Y.; Nguyen, D.; Verweij, P. E.; Zoufaly, A.; Osinusi, A. O.; DeZure, A.; Zhao, Y.; Zhong, L.; Chokkalingam, A.; Elboudwarej, E.; Telep, L.; Timbs, L.; Henne, I.; Sellers, S.; Cao, H.; Tan, S. K.; Winterbourne, L.; Desai, P.; Mera, R.; Gaggari, A.; Myers, R. P.; Brainard, B. M.; Childs, R.; Flanagan, T. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 2327–2336.

(11) Beigel, J. H.; Tomashek, K. M.; Dodd, L. E.; Mehta, A. K.; Zingman, B. S.; Kalil, A. C.; Hohmann, E.; Chu, H. Y.; Luetkemeyer, A.; Kline, S.; Lopez de Castilla, D.; Finberg, R. W.; Dierberg, K.; Tapson, V.; Hsieh, L.; Patterson, T. F.; Paredes, R.; Sweeney, D. A.; Short, W. R.; Touloumi, G.; Lye, D. C.; Ohmagari, N.; Oh, M.; Ruiz-Palacios, G. M.; Benfield, T.; Fätkenheuer, G.; Kortepeter, M. G.; Atmar, R. L.; Creech, C. B.; Lundgren, J.; Babiker, A. G.; Pett, S.; Neaton, J. D.; Burgess, T. H.; Bonnett, T.; Green, M.; Makowski, M.; Osinusi, A.; Nayak, S.; Lane, C. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1813–1826.

(12) Li, G.; De Clercq, E. Therapeutic Options for the 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 149–150.

(13) Ullrich, S.; Nitsche, C. The SARS-CoV-2 Main Protease as Drug Target. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127377.

(14) Kim, J.-W.; Kim, E. J.; Kwon, H. H.; Jung, C. Y.; Kim, K. C.; Choe, J.-Y.; Hong, H.-L. Lopinavir–Ritonavir Versus Hydroxychloroquine for Viral Clearance and Clinical Improvement in Patients with Mild to Moderate Coronavirus Disease 2019. *Korean J. Intern. Med.* **2021**, *S253*.

(15) Mandala, V.; McKay, M.; Shcherbakov, A.; Dregni, A.; Kolocouris, A.; Hong, M. Structure and Drug Binding of the SARS-

- CoV-2 Envelope Protein in Phospholipid Bilayers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 1202–1208.
- (16) Torres, J.; Maheswari, U.; Parthasarathy, K.; Ng, L.; Liu, D. X.; Gong, X. Conductance and Amantadine Binding of a Pore Formed by a Lysine-Flanked Transmembrane Domain of SARS Coronavirus Envelope Protein. *Protein Sci.* **2007**, *16*, 2065–2071.
- (17) Brenner, S. R. The Potential of Memantine and Related Adamantanes Such as Amantadine, to Reduce the Neurotoxic Effects of COVID-19, Including ARDS and to Reduce Viral Replication Through Lysosomal Effects. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 2341–2342.
- (18) Abreu, G. E. A.; Aguilar, M. E. H.; Covarrubias, D. H.; Durán, F. R. Amantadine as a Drug to Mitigate the Effects of COVID-19. *Med. Hypotheses* **2020**, *140*, 109755.
- (19) Aranda-Abreu, G. E.; Aranda-Martínez, J. D.; Araújo, R. Use of Amantadine in a Patient with SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 110–111.
- (20) Rejdak, K.; Grieb, P. Adamantanes Might be Protective from COVID-19 in Patients with Neurological Diseases, Multiple Sclerosis, Parkinsonism and Cognitive Impairment. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *42*, 102163.
- (21) Thomaston, J. L.; Polizzi, N. F.; Konstantinidi, A.; Wang, J.; Kolocouris, A.; Degrado, W. F. Inhibitors of the M2 Proton Channel Engage and Disrupt Transmembrane Networks of Hydrogen-Bonded Waters. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 15219–15226.
- (22) Jeppesen, M. G., Amantadin has Potential for the Treatment of COVID-19 Because It Targets Known and Novel Ion Channels Encoded by SARS-CoV-2. *Research Square Preprint*, DOI: 10.21203/rs.3.rs-121743/v1.
- (23) Fink, K.; Nitsche, A.; Neumann, M.; Grossegeisse, M.; Eisele, K.-H.; Danysz, W. Amantadine Inhibits SARS-CoV-2 In Vitro. *Viruses* **2021**, *13*, 539–549.
- (24) Hassan, S. S.; Choudhury, P. P.; Roy, B.; Jana, S. S. Missense Mutations in SARS-CoV2 Genomes from Indian Patients. *Genomics* **2020**, *112*, 4622–4627.
- (25) Zsidó, B. Z.; Hetényi, C. The Role of Water in Ligand Binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *67*, 1–8.
- (26) Acharya, R.; Carnevale, V.; Fiorin, G.; Levine, B. G.; Polishchuk, A. L.; Balannik, V.; Samish, I.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H.; DeGrado, W. F.; Klein, M. L. Structure and Mechanism of Proton Transport Through the Transmembrane Tetrameric M2 Protein Bundle of the Influenza A Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 15075–15080.
- (27) Schrödinger. *Maestro Schrödinger*; Schrödinger, Release 2020–4.
- (28) Stewart, J. J. P. *Stewart Computational Chemistry*; Stewart: Colorado Springs, CO, USA H, MOPAC. 2016
- (29) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI, More Modifications to the NDDO Approximations and Re-Optimization of Parameters. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 1–32.
- (30) Dupradeau, F.-Y.; Pigache, A.; Zaffran, T.; Savineau, C.; Lelong, R.; Grivel, N.; Lelong, D.; Rosanski, W.; Cieplak, P. The R.E.D. tools, Advances in RESP and ESP Charge Derivation and Force Field Library Building. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7821–7839.
- (31) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A., Jr. General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363.
- (32) Sousa Da Silva, A. W.; Vranken, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 367.
- (33) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J. Mol. Graphics Modell.* **2006**, *25*, 247–260.
- (34) Gastegger, J.; Marsili, M. Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity—a Rapid Access to Atomic Charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219–3228.
- (35) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Bewley, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (36) Bálint, M.; Horváth, I.; Mészáros, N.; Hetényi, C. Towards Unraveling the Histone Code by Fragment Blind Docking. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 422.
- (37) O’Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.* **2011**, *3*, 33.
- (38) Hetényi, C.; Van Der Spoel, D. Blind Docking of Drug-Sized Compounds to Proteins With Up to a Thousand Residues. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1447–1450.
- (39) Hetényi, C.; van der Spoel, D. Efficient Docking of Peptides to Proteins Without Prior Knowledge of the Binding Site. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1729–1737.
- (40) Jeszenői, N.; Bálint, M.; Horváth, I.; Van Der Spoel, D.; Hetényi, C. Exploration of Interfacial Hydration Networks of Target-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 148–158.
- (41) Jeszenői, N.; Horváth, I.; Bálint, M.; Van Der Spoel, D.; Hetényi, C. Mobility-Based Prediction of Hydration Structures of Protein Surfaces. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 1959–1965.
- (42) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions For Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- (43) Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. GROMACS, Fast, Flexible, And Free. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718.
- (44) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- (45) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical Sampling Through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101.
- (46) Parrinello, M.; Rahman, A. Crystal Structure and Pair Potentials, a Molecular Dynamics Study. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45*, 1196–1199.
- (47) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals, A New Molecular Dynamics Method. *J. App. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190.
- (48) Darden, T.; Darrin, Y.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald, an N log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *12*, 10089–10092.
- (49) De Lano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*; Version 2.0 Schrödinger, LLC, 2002.
- (50) Kevener, H. E.; Zhao, W.; Ball, D. M.; Babaoglu, K.; Qi, J.; White, S. W.; Lee, R. E. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening Against Dihydropteroate Synthase. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 444–460.
- (51) Castro-Alvarez, A.; Costa, A. M.; Vilarrasa, J. The Performance of Several Docking Programs At Reproducing Protein-Macrolide-Like Crystal Structures. *Molecules* **2017**, *136*–150.
- (52) Mena-Ulecia, K.; Tiznado, W.; Caballero, J. Study of the Differential Activity of Thrombin Inhibitors Using Docking, QSAR, Molecular Dynamics, And MM-GBSA. *PLoS One* **2015**, *10*, No. e0142774.
- (53) Ramírez, D.; Caballero, J.; Is, I. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data. *Molecules* **2018**, *23*, 1038.
- (54) Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. Knowledge-Based Scoring Function to Predict Protein-Ligand Interactions. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 337–356.
- (55) Bálint, M.; Jeszenői, N.; Horváth, I.; Van Der Spoel, D.; Hetényi, C. Systematic Exploration of Multiple Drug Binding Sites. *Aust. J. Chem.* **2017**, *9*, 65–77.
- (56) Wang, J.; Cieplak, P.; Li, J.; Cai, Q.; Hsieh, M. J.; Luo, R.; Duan, Y. Development of Polarizable Models for Molecular Mechanical Calculations. 4. van der Waals Parametrization. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 7088–7101.
- (57) Verdonk, M. L.; Chessari, G.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Nissink, J. W. M.; Taylor, R. D.; Taylor, R. Modeling Water Molecules in Protein-Ligand Docking Using GOLD. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6504–6515.
- (58) Pastor, M.; Cruciani, G.; Watson, K. A. A Strategy for the Incorporation of Water Molecules Present in a Ligand Binding Site Into

a Three-Dimensional Quantitative Structure - Activity Relationship Analysis. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4089–4102.

(59) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. The Particle Concept, Placing Discrete Water Molecules During Protein- Ligand Docking Predictions. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1999**, *34*, 17–28.

(60) Huang, N.; Shoichet, B. K. Exploiting Ordered Waters in Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2008**, *58*, 4862–4865.

(61) Ladbury, J. E. Just Add Water! The Effect of Water on the Specificity of Protein- Ligand Binding Sites and its Potential Application to Drug Design. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 973–980.

(62) Carugo, O. Correlation Between Occupancy and B Factor Of Water Molecules in Protein Crystal Structures. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 1021–1024.

(63) Kim, K. H. Outliers in SAR and QSAR , 3 . Importance of Considering the Role of Water Molecules in Protein – Ligand Interactions and Quantitative Structure – Activity Relationship Studies. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2021**, 371.

(64) Kim, K. H. Outliers in SAR and QSAR, Is Unusual Binding Mode a Possible Source Of Outliers? *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2007**, *21*, 63–86.

(65) Kim, K. H. Outliers in SAR and QSAR, 2. Is a Flexible Binding Site a Possible Source of Outliers? *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2007**, *21*, 421–435.

(66) Maveyraud, L.; Mourey, L. Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery. *Molecules* **2020**, *25*, 1030–1048.

(67) Søndergaard, C. R.; Garrett, A. E.; Carstensen, T.; Pollastri, G.; Nielsen, J. E. Structural artifacts in protein-ligand X-ray Structures, Implications for the Development of Docking Scoring Functions. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5673–5684.

(68) Wang, R.; Fang, X.; Lu, Y.; Wang, S. The PDBbind Database, Collection of Binding Affinities for Protein-Ligand Complexes with Known Three-Dimensional Structures. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2977–2980.

(69) Wang, R.; Fang, X.; Lu, Y.; Yang, C. Y.; Wang, S. The PDBbind Database, Methodologies and Updates. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4111–4119.

(70) Thomaston, J. L.; Konstantinidi, A.; Liu, L.; Lambrinidis, G.; Tan, J.; Caffrey, M.; Wang, J.; Degrado, W. F.; Kolocouris, A. X-ray Crystal Structures of the Influenza M2 Proton Channel Drug-Resistant V27A Mutant Bound to a Spiro-Adamantyl Amine Inhibitor Reveal the Mechanism of Adamantane Resistance. *Biochemistry* **2020**, *59*, 627–634.