

## **Farmakofor Modellemeye Giriş**

**Farmakofor veya bir farmakofor model** bir ligandın uzaydaki sterik ve elektronik moleküler özelliklerinin soyut bir temsilini ya da bir bütünü tanımlar. Bu özellikler, istenen biyolojik yanıtın ortaya çıkması için bir biyolojik hedefle moleküler etkileşimi sağlamak için gereklidir.

### **Bu özellikler;**

- Hidrojen bağı donörü (D)
- Hidrojen bağı akseptörü (A)
- Aromatik halka (R)
- Hidrofobik özellik (H)
- Pozitif (P) iyonik özellik
- Negatif (N) iyonik özellik

Farmakofor modeller; tek bir ligand, bir ligand seti, ligand–hedef kompleksi veya apo formdaki bir hedeften (protein, enzim, DNA vb.) yola çıkılarak geliştirilebilmektedir. Biyolojik bir hedefe bağlandığı bilinen birden fazla ligand olduğunda, tüm ligandlardan elde edilen farmakofor bilgisini temsil edecek şekilde optimize edilmiş bir dizi hipotez geliştirilebilmektedir. Bu yaklaşımda, her bir ligand üzerindeki farmakofor özellikler tanımlanır ve konumları ve yönelimleri belirli kriterleri karşılayan ortak özellikler aranarak farmakofor hipotezler oluşturulmaktadır. Bu hipotezler; geometrik hizalanmaları, aktif bileşikler ve bir decoy seti (inaktif bileşik seti) içinden aktif ve inaktif bileşikler ile eşleşme durumu incelenerek değerlendirilebilmektedir.

**Uygulamanın amacı:** Deneysel olarak **anjiyotensin II tip 1 reseptör antagonisti** olduğu bilinen bir bileşik setinden farmakofor hipotezlerin geliştirilmesi, bu hipotezlerin aktif ve inaktif (decoy) bileşikler kullanılarak değerlendirilmesi ve bu model kullanılarak sanal tarama çalışmasının gerçekleştirilmesi.

**Kullanılan uygulama ve araçlar:** Farmakofor modelleme ve sanal tarama çalışmaları için **Schrödinger Phase** modülü kullanılacaktır.

Maestro'yu başlatmak için console açılarak **source /etc/bashrc &&maestro -SGL** kodu yazılır ve enter tuşuna basılır.

```
fikriyeozgencil@pharmacy02: ~  
fikriyeozgencil@pharmacy02:~$ source /etc/bashrc &&maestro -SGL  
  
*****  
Maestro Molecular Modeling Interface  
Maestro is a product of Schrödinger, Inc.  
Legal notices can be viewed by clicking Help->About Maestro  
*****  
.....
```

## 1. Eğitim Dosyalarının İndirilmesi ve Projenin Kaydedilmesi

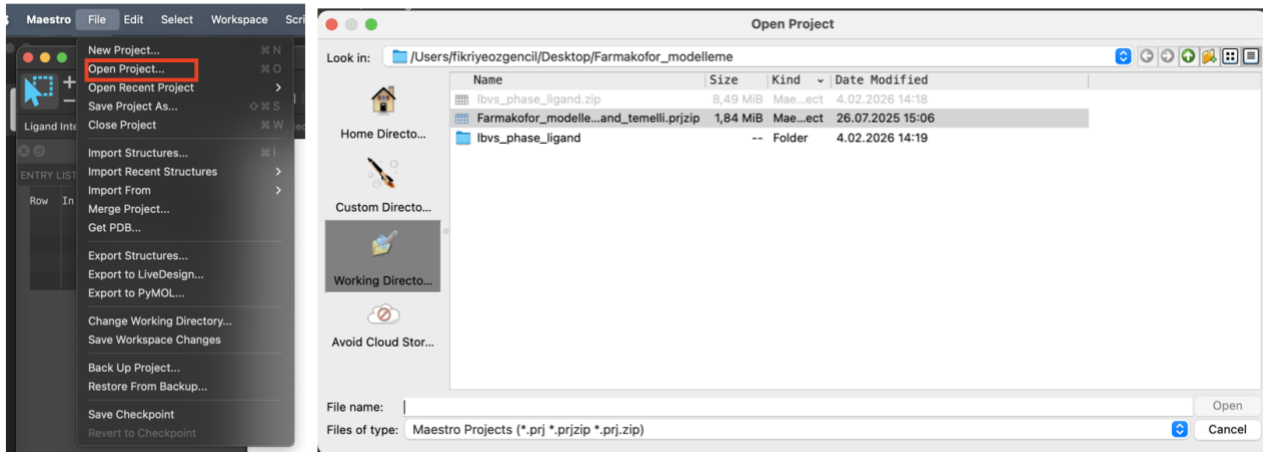
- Drive bağlantısı üzerinden (bağlantı verilecek)

**Farmakofor\_modelleme\_ligand\_temelli.prj.zip** adlı proje dosyası seçilen klasöre indirilir.

- Maestro File > Open Project menüsüne gidilir ve

**Farmakofor\_modelleme\_ligand\_temelli.prj.zip** adlı proje dosyası seçilerek Open düğmesine tıklanır.

-Açılan **Save scratch project** penceresinde OK'a tıklanır. **File > Save Project As** menüsüne gidilerek **Farmakofor\_modelleme\_ligand\_temelli** proje adı ile kaydedilir.



## 2. Farmakofor Hipotezlerin Geliştirilmesi

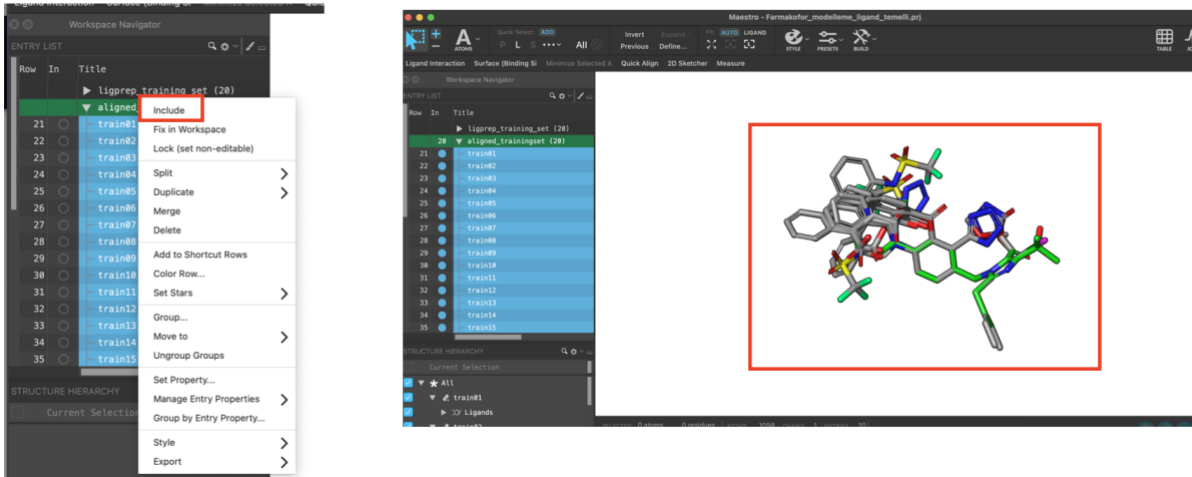
### 2.1. Çalışma (Training set) ve Test Setlerinin oluşturulması

20 adet anjiyotensin II tip 1 reseptör antagonisti bileşik ile bir **çalışma seti (training set)** oluşturulmuş ve proje dosyası içerisinde fizyolojik pH'a göre hazırlanmış ve uygulama için hazır olarak verilmiştir.

Hipotezlerin uygunluğunu değerlendirmek ve test etmek amacıyla literatürde bildirilmiş aktif ve inaktif (decoy) bileşiklerden oluşan bir **test seti** (44 aktif bileşik, 49 decoy (inaktif) bileşik)) hazırlanmış ve proje içerisinde hazır olarak verilmiştir.

### 2.2. Çalışma Setinin (Training set) hizalanması

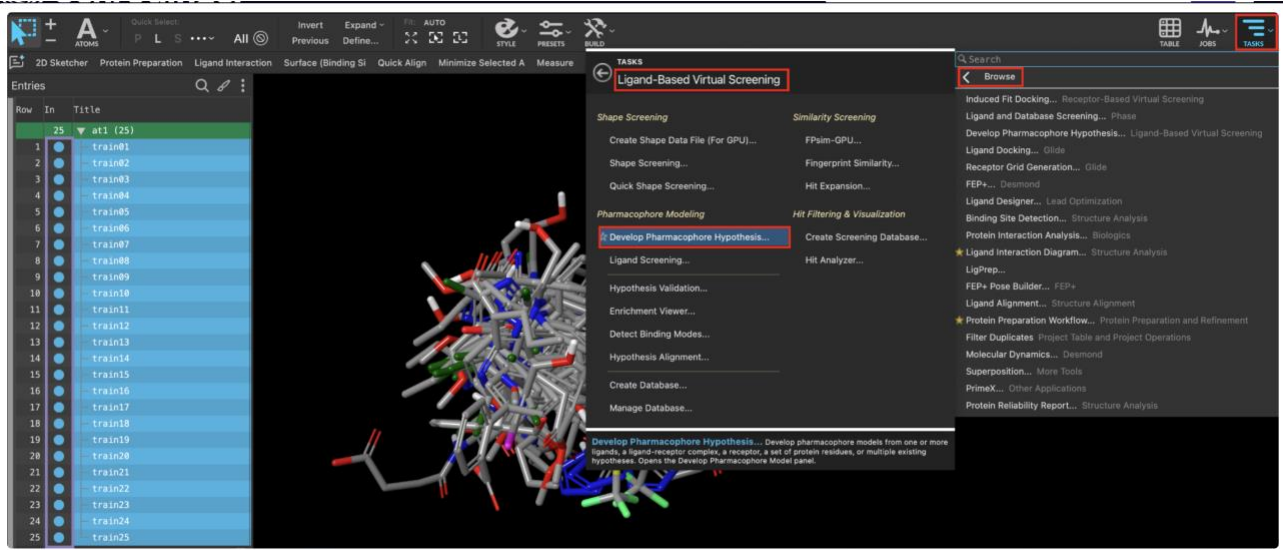
Farmakofor hipotezlerin oluşturulmasından önce çalışma setinin hizalanması gerekmektedir. Hizalama (aligning) bileşiklerin ortak yapısal özelliklerine göre farklı yöntemler ile yapılabilmektedir. Farmakofor hipotez oluşturma aşamasında kullanılacak modülde aynı zamanda bileşikler hizalanabilmektedir. İstenirse daha önce hizalanmış çalışma seti de kullanılabilir. Uygulama sırasında çalışma seti (**aligned\_trainingset**) daha önce ortak özellikleri temel alınarak hizalanmıştır. Verilen hizalanmış veri seti görselde belirtilen şekilde workspace içerisine alınır ve ders sırasında manuel olarak incelenerek, hipotez oluşturmadan önce ortak farmakoforik özelliklerin neler olabileceği tartışılır.



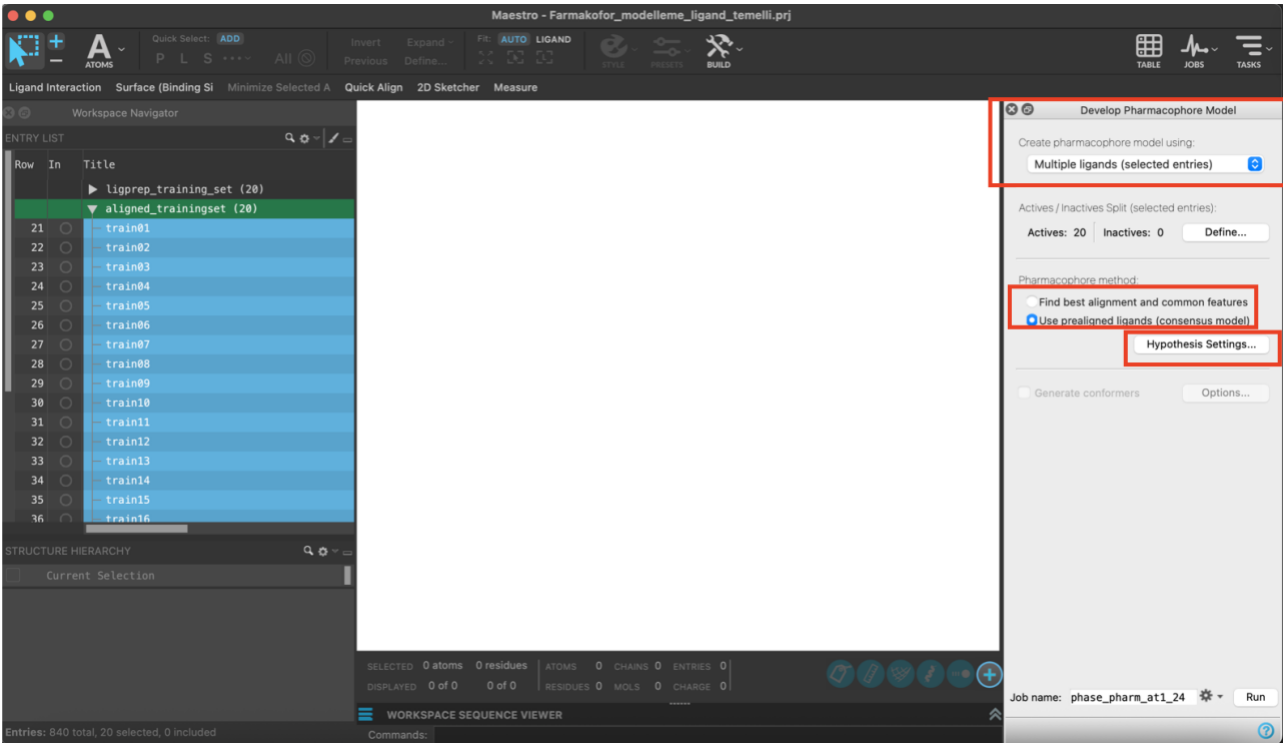
### 2.3. Hipotez Geliştirilmesi ve hipotez seçimi

Farmakofor hipotezlerin geliştirilebilmesi amacıyla;

**Tasks > Browse > Ligand-Based Virtual Screening > Develop Pharmacophore Hypothesis** aşamaları takip edilir ve **Develop Pharmacophore Hypothesis** paneli açılır.

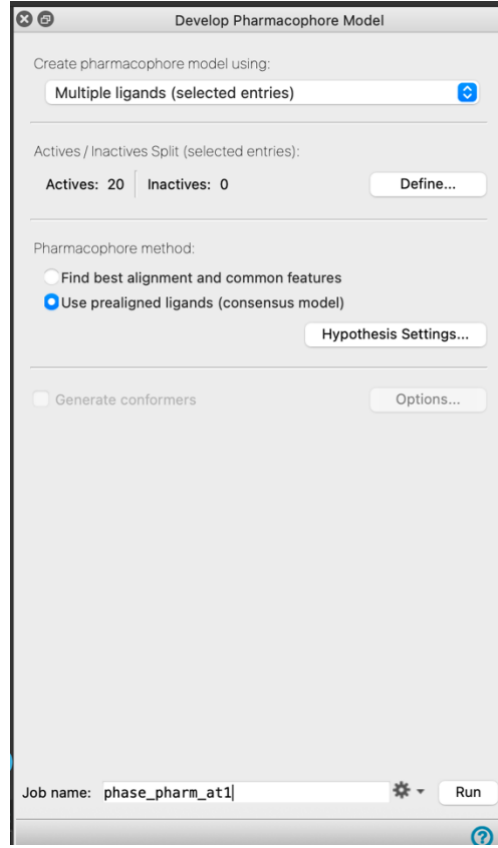
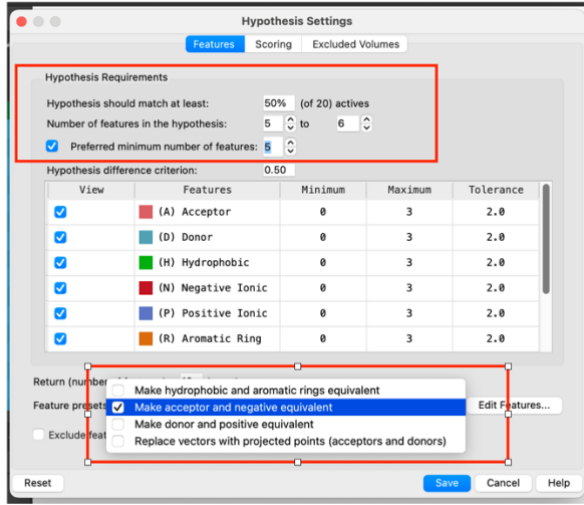


Farmakofor modeli oluşturmak için, **aligned\_training** set seçilerek **Develop Pharmacophore Hypoteis** panelinde yer alan “Multiple ligands (selected entries)” seçilir. Hizalanmış çalışma setinin kullandığını belirtmek amacıyla farmakofor metod “**use prealigned ligands**” olarak işaretlenir. **Develop Pharmacophore Model** panelinde hipotez ayarlarının yapılabilmesi amacıyla **Hypothesis Settings** butonuna tıklanır.

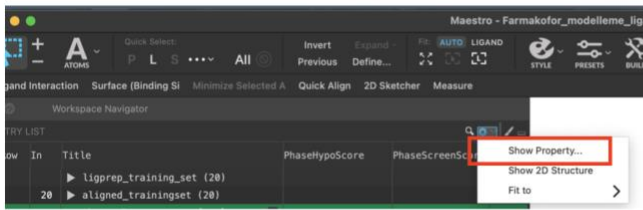


Hipotez ayarları görselde verildiği gibi ayarlanır ve kaydedilir. Bu ayarlamalara göre;

20 bileşiğin en az %50'sinin hipotezle uyumlu olması; hipotez içerisinde yer alan farmakoforik özelliklerin en az 5, en fazla 6 olması sağlanır. Ayrıca “make acceptor and negative equivalent” seçeneği işaretlenmelidir. Daha sonra dosya adı **phase\_pharm\_at1** olarak yazılarak Run butonuna basılır.

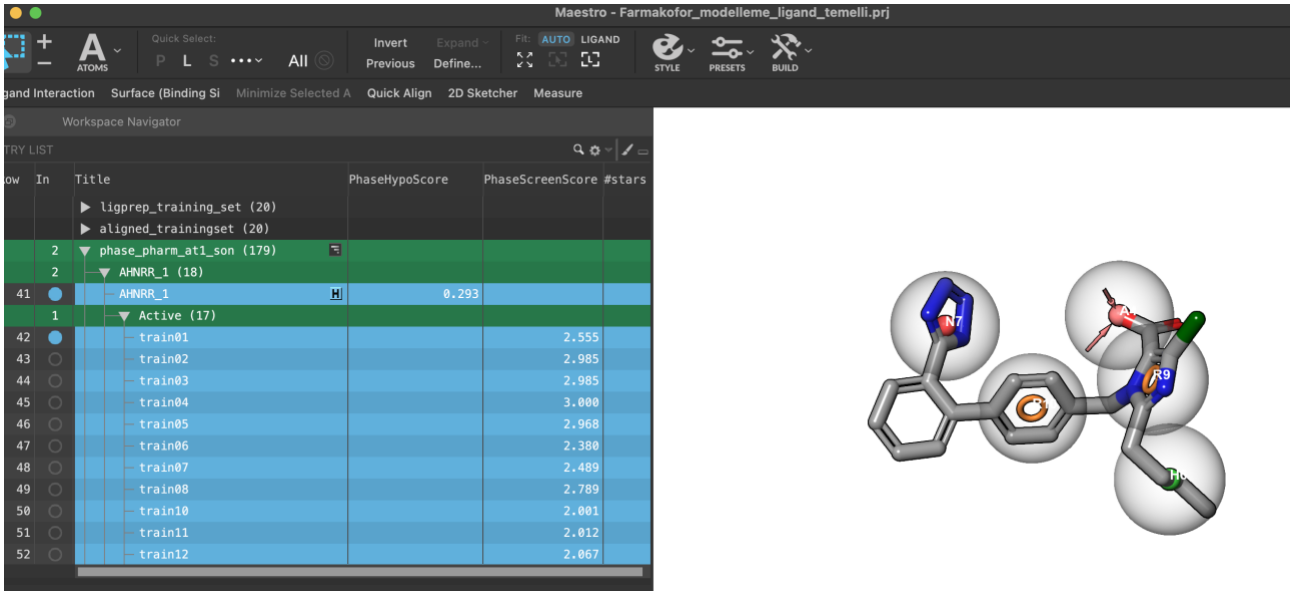


İşlem sonunda ulaşılan farmakofor hipotezler **PhaseHypoScore** adı verilen hipotez puanı ile değerlendirilir. Bu değeri ekranda görebilmek amacıyla **show property** tuşuna basılır PhaseHypoScore yazılarak özellik olarak hipotezlerin yanında görülmesi sağlanır.



OW	In	Title	PhaseHypoScore
		▶ ligprep_training_set (20)	
	20	▶ aligned_trainingset (20)	
		▼ phase_pharm_at1_son (179)	
		▶ AHNRR_1 (18)	0.293
		▶ AAHNR_1 (18)	0.292
		▶ HHNRR_1 (16)	0.291
		▶ AHNRR_1 (19)	0.289
		▶ AHNRR_1 (16)	0.285
		▶ HHNRR_2 (18)	0.281
		▶ AAHHR_1 (19)	0.273
		▶ AHNRR_2 (18)	0.272
		▶ AHNRR_2 (18)	0.266
		▶ AHNRR_3 (19)	0.265

Ayrıca hipotezlerin çalışma setinde yer alan bileşiklerin kaç tanesiyle oluşturulduğu görülebilmektedir. Uygulama sırasında hipotezlere bileşikler yerleştirilerek bileşiklerin hangi gruplarının farmakoforik özellikleri karşıladığı görsel olarak incelenir. (Bu aşamada incelemek istenen hipotez ve bileşik "include" seçeneği ile workspace içerisine alınır)



**Rapor yazımı sırasında kaç tane hipotez elde edildiği, skoru yüksek olan ilk 3 hipotezin hangi farmakoforik özelliği taşıdığı ve PhaseHypoScore değerleri belirtilmelidir.**

**Örnek: Toplam 10 hipotez oluşturulmuştur. Bunlardan en iyi 3 hipotez AHNRR, ..... ve .....'dır. PhaseHypoScore değerleri ..... olarak bulunmuştur. (Not: A: Akseptör, H: Hidrofobik, N: Negatif iyonize olabilen grup, R: Aromatik halka)**

En iyi üç farmakofor hipotez PhaseHypoScore değerine göre ilerideki basamaklar için seçilir. İstenirse hepsi de kullanılabilir.

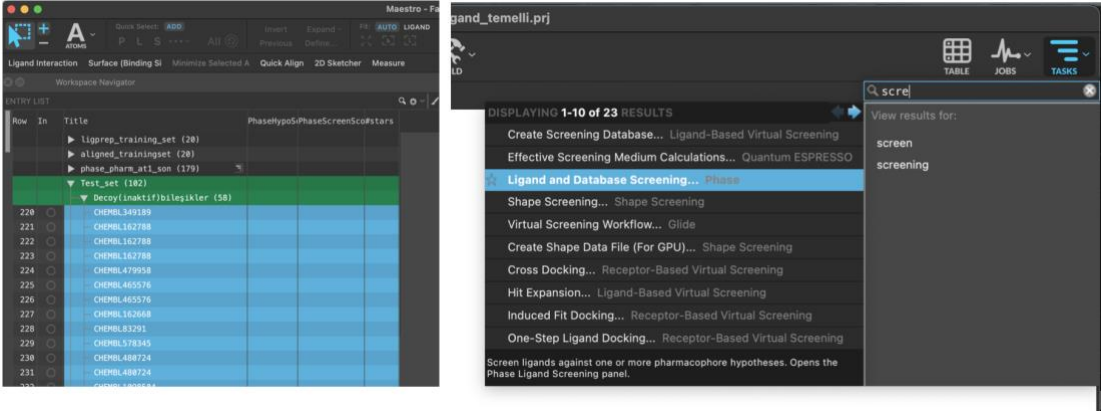
#### **2.4. Hipotezin test edilmesi ve en iyi hipotezin farmakofor model olarak seçilmesi**

Seçilen **en iyi üç hipotezin** değerlendirilmesi ve doğruluğunun test edilebilmesi amacıyla aktif ve inaktif bileşiklerden oluşan **test set (Test\_set) (44 aktif bileşik, 49 decoy (inaktif bileşik))** kullanılır. Bunun için test sette yer alan bileşikler elde edilen hipotezler ile taranır. Kaç tane aktif ve inaktif bileşiğin hipotezler ile uyumlu olduğu değerlendirilir. Bu aşamada dikkat edilecek hususlar;

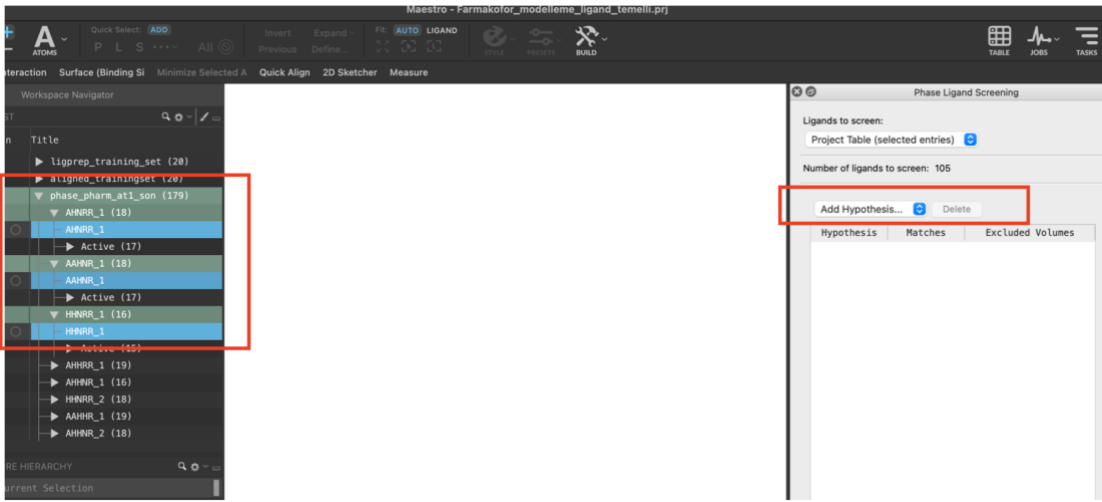
-Tarama sonunda bileşikler hipotezlere karşı uyumu **Phasescreenscore** adı verilen parametreye göre sıralanır. Skorun yüksek olması farmakofor modele uyumun daha iyi olduğunu göstermektedir. Bu aşamada aktif bileşiklerin model ile uyumunun, yani **Phasescreenscore** değerinin, inaktiflere göre daha yüksek olması beklenir.

-Ayrıca farmakofor model olarak seçilecek hipotezin aktif bileşikler ile uyumlu; inaktif bileşikler ile uyumlu olmaması beklenir.

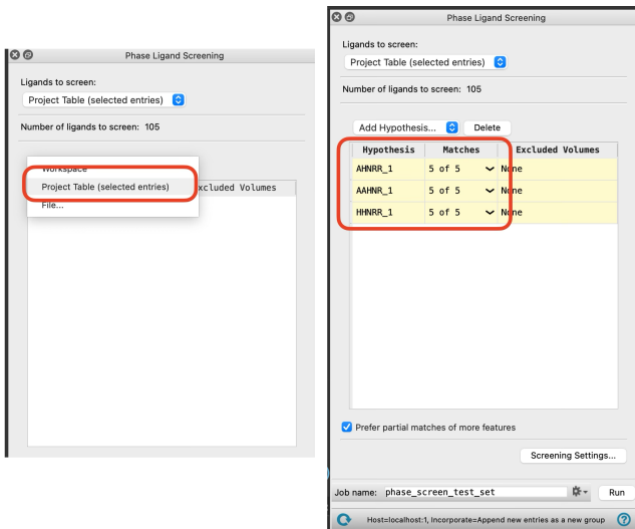
Hipotezin değerlendirilmesi aşamasında öncelikle **test\_set** seçilir. Daha sonra **Task** menüsünden **Ligand and Database Screening** paneli açılır.



Diğer yandan en iyi üç hipotez de seçilir ve panelde yer alan **Add Hypotesis** butonuna tıklanır.



Hipotezler eklendikten sonra taranan bileşiklerin hipotezde yer alan farmakoforik özelliklerin kaçıyla uyumlu olması gerektiği belirlenir. Uygulama sırasında her bir hipotez **(5 of 5)** olacak şekilde ayarlanır.



Dosya adı **Phase\_screen\_test\_set** olarak ayarlanarak **run** butonuna basılır.

1	▼	phase_screen_test_set (105)		
	▶	HHNRR_1 (30)	H	0.291
	▶	AAHNR_1 (37)	H	0.292
1	▶	AHNRR_1 (38)	H	0.293

Tarama sonucunda farklı hipotezler için elde edilen tarama sonuçları değerlendirilir. Aktif ve inaktif bileşiklerin ayırımını iyi yapabilen en verimli hipotez, **sanal tarama çalışmasında** kullanılmak üzere farmakofor model olarak seçilir.

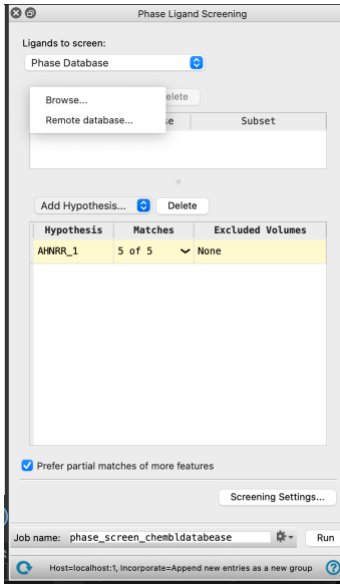
**Örnek: İlk hipotez** de test sette yer alan 93 bileşikten 37 bileşik AHNRR\_1 hipotezi ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu 37 bileşiğin ..... tanesi aktif ..... tanesi inaktif bileşikleri oluşturmaktadır. **Diğer hipotezler de bu şekilde değerlendirilir rapora yazılır. En iyi olduğu düşünülen hipotez farmakofor model olarak sanal tarama için kullanılmak üzere seçilir.**

### **3. Farmakofor temelli sanal tarama**

İlaç keşfinde sanal tarama, büyük veya küçük molekül kütüphanelerinin taranarak bir ilaç hedefine bağlanma olasılığı en yüksek olan yapıların belirlenmesi sürecidir. Sanal tarama **yapı-temelli, ligand-temelli ve hibrit (kombine) yöntemler** ile yapılabilmektedir.

Ligand-temelli sanal tarama farmakofor model kullanılarak yapılabilmekte ve farmakofor temelli temelli sanal tarama olarak da adlandırılabilir. Farmakofor temelli sanal taramada bileşik kütüphanesinde yer alan bileşikler elde edilen farmakofor model kullanılarak taranmakta ve bu farmakofor modele uyumlu bileşikler filtrelenmektedir. Ayrıca bu filtrelemeler neticesinde ulaşılan bileşiklerin ADME ve ilaç olabilirlik özellikleri de değerlendirilebilmektedir.

Uygulama sırasında önceki basamaklarda seçilen farmakofor model kullanılacak olup; bu model proje içerisinde hazır verilen ChemBL34 kütüphanesinde yer alan bileşikler (104 adet) taranacaktır. Daha önce hazırlanmış ChemBL34 kütüphanesinin taranması için, **Phase Ligand Screening** paneli açılır. Ligands to Screening için **Phase Database** veya **Project table** seçilir. Daha önce belirlenen farmakofor model **Add Hypotesis** kısmında eklenir ve **5 of 5** olarak ayarlanır. Dosya adı **phase\_screen\_ChemBL34** olarak yazılarak **Run** butonuna basılır.



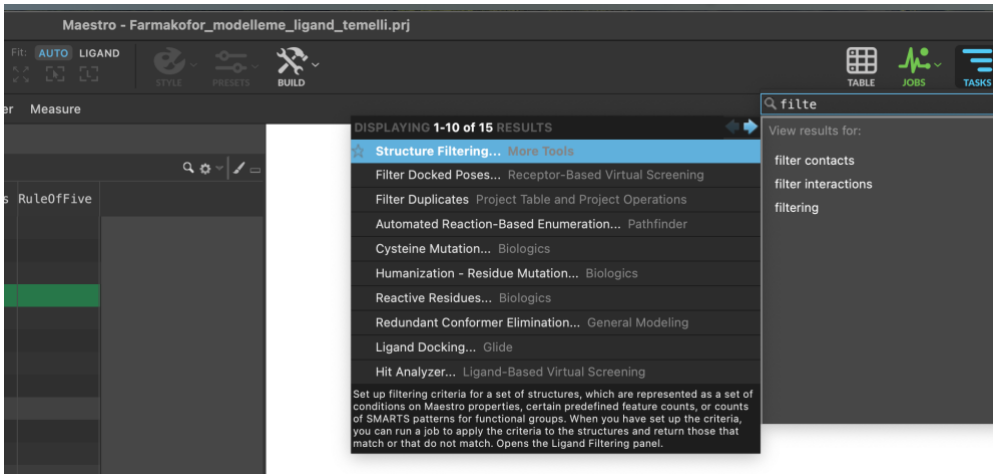
Tarama sonucunda farmakofor model ile uyumlu bileşikler sıralanır ve filtelenir. **Entry list** kısmına gelen **bileşiklerin sayısı** tespit edilir ve **rapora yazılır**.

Daha sonraki aşamada bileşikler ilaç olabilirlik özelliklerine filtelenir (Lipinski ve Veber Kuralları).

### Lipinski ve Veber Kuralları

Lipinski	Veber
Lipinski'ye göre, ilaç benzeri bir molekülün özellikleri şöyle olmalıdır;	Veber'e göre Lipinski kurallarına ek olarak ilaç benzeri bir molekülün özellikleri şöyle olmalıdır;
1- MA $\leq$ 500 Da	1- Döner Bağ Sayısı $\leq$ 10
2- CLogP $\leq$ 5	2. Polar Yüzey Alanı (PSA) $\leq$ 140 Å <sup>2</sup>
3- H-bağı donörü sayısı $\leq$ 5	
4- H-bağı akseptörü sayısı $\leq$ 10	

Bileşiklerin filtelenmesi amacıyla **Task** menüsüne gidilir. **Structure Filtering** modülü açılır.



phase_screen_ChemBL34_database (58)	
AHNRR_1 (58)	
AHNRR_1	
522	
523	CHEMBL12013
524	CHEMBL11840
525	CHEMBL11528
526	CHEMBL1206588
527	CHEMBL1206631
528	CHEMBL9549
529	CHEMBL3309646
530	CHEMBL501828
531	CHEMBL501828
532	CHEMBL4553666
533	CHEMBL554494
534	CHEMBL3310841
535	CHEMBL3311340
536	CHEMBL501828
537	CHEMBL501671
538	CHEMBL6407
539	CHEMBL9694
540	CHEMBL1181959

Farmakofor model ile uyumlu bileşikler seçilir (Hipotez seçilmeden sadece bileşiklerin seçimi sağlanır).

Use structures from: Project Table (57 selected entries)

Stop Scanning

Ligand matches if:  All criteria are satisfied  At least one criterion is satisfied

Matching ligands:  Retain  Remove  Set boolean property named:

Properties | General attributes | Functional group counts

Select a property:

Available properties:

aux (Maestro)  
stars (Maestro)  
ct format (Maestro)  
Date Added (Maestro)  
Date Modified (Maestro)

Show family: ALL

Property: i\_qp\_#rotor <= 10

Add

Filtering definitions and criteria:

```
# filter criteria
#
i_qp_RuleOfFive == 0
r_qp_PSA <= 140
i_qp_#rotor <= 10
```

Read Criteria File...

Job name: ligfilter\_ChemBL\_34\_filtered

Run

Host=localhost, Incorporate=Do not incorporate

Show family: **QikProp** olarak ayarlanır. **RuleOfFive**, **#rotor (rotatable bond numbers)** ve **PSA (polar surface area)** görselde belirtilen şekilde ayarlanır ve sırasıyla add butonu ile eklenerek, filtreleme kriteri olarak belirlenir. Dosya adı **ligfilter\_ChemBL34\_filtered** olarak belirlenerek **run** butonunun yanındaki ayarlar butonuna tıklanır. **Do not incorporate** yerine **Append new entries as a new group** seçilir ve **run** butonuna basılarak işlem başlatılır.

**Filtrelenen bileşik sayısı kaydedilir ve rapora yazılır.**

**Rapora ayrıca hangi kriterlere göre filtreleme yapıldığı belirtilmelidir.**

