

Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod

Integrated approach in the search of novel natural products as lead compounds using experimental and computer-based approaches

Marko Jukič, Andrej Perdih, Tomaž Šolmajer

Povzetek: Spojine naravnega izvora predstavljajo zgodovinsko najpomembnejši vir zdravilnih učinkovin, ki jih zajema sodobna *materia medica*. V zadnjih letih so na področju iskanja spojin vodnic naravnega izvora pričeli uspešno uporabljati sodobne integrirane pristope, ki združujejo eksperimentalne metode separacije, identifikacije in bioloških testiranj z računalniško podprtimi metodami načrtovanja in virtualnega rešetanja. Prispevek se osredotoča na predstavitev vloge računalniško podprtih metod v tem pristopu, poleg tega pa predstavlja tudi nekaj uspešnih primerov uporabe integriranega pristopa pri iskanju spojin vodnic naravnega izvora.

Ključne besede: spojine naravnega izvora, spojine vodnice, knjižnice spojin, integrirani interdisciplinarni pristopi, računalniška kemija

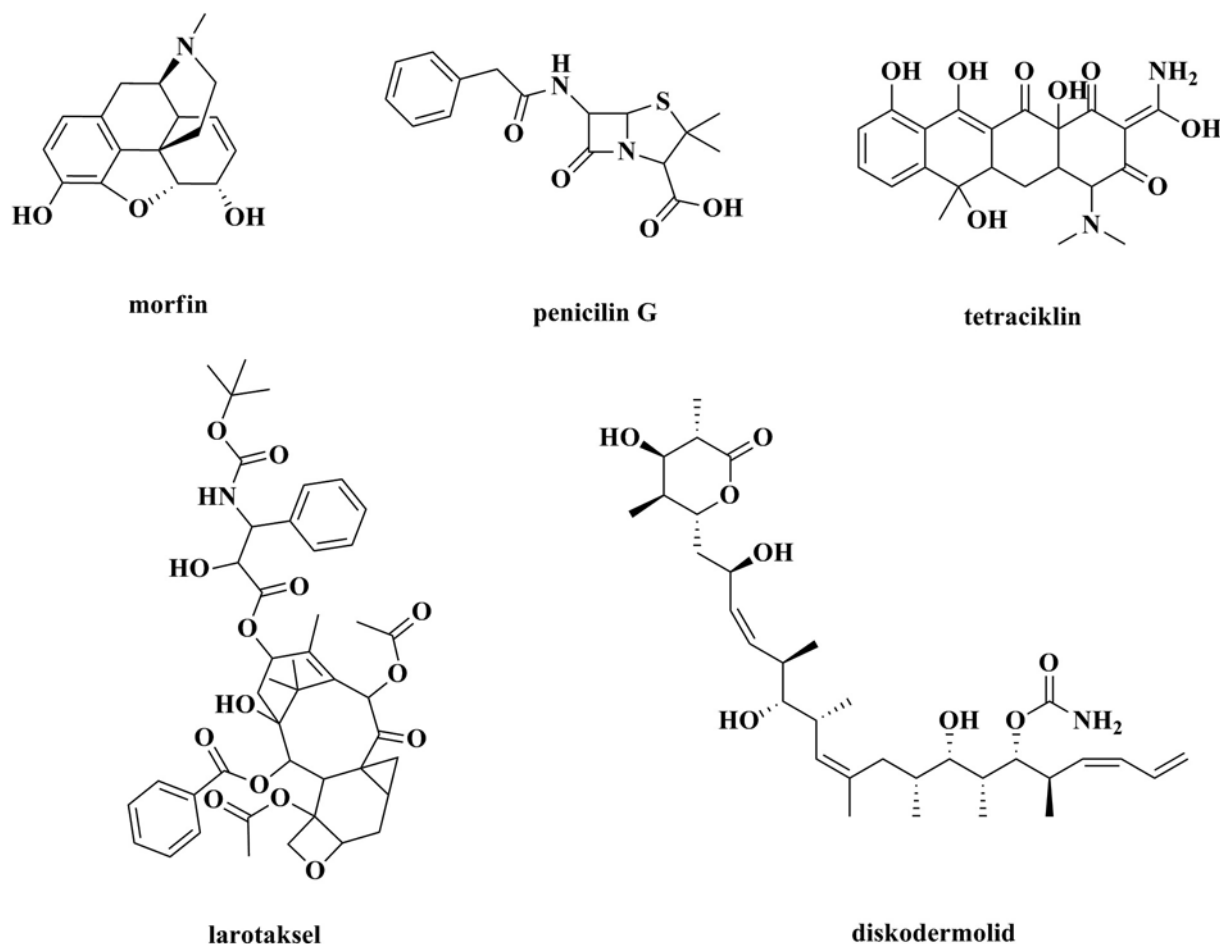
Abstract: Natural products are one of the most important sources of drug molecules now present in modern *materia medica*. Recently, when searching for novel lead compounds of natural origin, new integrated approaches were introduced that merge modern methods of separation, identification and biological assays with computer-assisted methods of drug design and virtual screening. This review is focused predominantly on the introduction of the computer-based approaches in this field. In addition, selected successful applications of the integrated approach in identifying novel natural products as lead compounds are presented.

Keywords: natural products, lead compounds, libraries of natural products, integrated approaches, computer-aided drug design

1 Naravne spojine kot zgodovinsko pomemben vir spojin vodnic

Skozi celotno zgodovino medicine zdravila naravnega izvora ostajajo ključnega pomena. Uporabljajo se lahko kot ekstrakti oz. kompleksne zmesi učinkovin ali kot izolirane zdravilne učinkovine naravnega izvora. Spojine naravnega izvora najdemo v mnogih zdravilih brez recepta, predstavljajo pa tudi enega izmed pomembnejših virov spojin vodnic, ki vodijo do zdravilnih učinkovin. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) ocenjuje, da približno 80 odstotkov svetovne populacije pri zdravljenju uporablja izključno zdravila naravnega izvora (1). Pri 974 novih učinkovinah, uvedenih med letoma 1981 in 2006, jih je bilo 60 odstotkov razvitih iz spojin naravnega izvora, če pa se omejimo samo na protibakterijske ter citotoksične spojine, je delež med 70 in 80 odstotki (2). Zdravilne učinkovine, razvite iz spojin naravnega izvora, v velikem številu nastopajo tudi na seznamih najbolje prodajanih zdravil (npr. skupina statinov, penicilinski in makrolidni antibiotiki, ciklosporin itd).

V začetku 19. stoletja je bilo izoliranih nekaj ključnih spojin naravnega izvora. Leta 1804 je Sertürner izoliral morfin, med leti 1817 in 1821 so Pelletier, Magendie in Caventou izolirali emetin, strihnin, kinin in kofein, deset let kasneje, leta 1831, pa Mein še atropin. Učinkovine rastlinskega izvora so pripomogle k napredku farmakologije, farmacije, razvoja zdravil ter vplivale tudi na razvoj sintezne organske kemije (npr. Willstätterjeva sinteza atropina leta 1901) (3). Po letu 1928, ko je Fleming odkril penicilin, so sledila številna rešetanja spojin naravnega izvora s ciljem iskanja protimikrobnih učinkovin. V sredini 20. stoletja so poleg rastlin pričeli raziskovati tudi druge naravne vire ter odkrili vrsto novih antibiotičnih učinkovin. Odkritju streptomicina, kloramfenikola in tetraciklinov iz aktinobakterij v 50-ih letih 20. stoletja je sledilo odkritje vankomicina ter cefalosporina C iz gliv. Kasneje so odkrili tudi kolhicin, izolirali vinka-alkaloide iz zimzelena ter taksol iz severnoameriške oz. grmaste tise. Poleg odkritih antibiotikov ter citostatikov lahko omenimo še antimalarike (artemisinin), imunosupresive (ciklosporin) ter antihiperlipidemike (npr. skupina statinov). Strukture nekaterih naštetih predstavnikov, tako že dolgo poznanih kot tudi novejših spojin, so predstavljene na sliki 1 (1,2,3).



Slika 1: Kemijske strukture morfina in penicilina G, skeleti terapevtskih skupin tetraciklinov in taksanov (npr. larotaksel) – pomembnih antibiotikov in protitumornih učinkovin in diskodermolid, aktualna spojina vodnica pri raziskavah protitumornih učinkovin, izolirana iz globokomorske spužve *Discodermia dissoluta*.

Figure 1: Chemical structures of morphine and penicillin G as classic drugs of natural origin, structures of tetracycline and taxane therapeutic groups (e.g. larotaxel) – important antibiotic and chemotherapeutic agents and discodermolide structure - lead compound in the research of novel chemotherapeutic agents isolated from marine sponge *Discodermia dissoluta*.

Kljub pomembni vlogi spojin naravnega izvora pri iskanju spojin vodnic ter razvoju zdravil, je v zadnjih desetletjih farmacevtska industrija zmanjšala obseg iskanja spojin vodnic med spojinami naravnega izvora in se bolj osredotočila na reševanje knjižnic majhnih sinteznih molekul kot primarnega vira izhodnih spojin (4). Zato obstaja več razlogov. Spojine naravnega izvora so zaradi svoje kompleksne kemijske strukture težje sintezno dostopne v večjih količinah. Razvoj kombinatorične kemije in tehnologija reševanja visokih zmogljivosti HTS (high-throughput screening) sta omogočila uporabo velikih sinteznih knjižnic za reševanje več milijonov sintezno dostopnih molekul. Nekoliko zmanjšan pa je bil tudi obseg raziskav reševanja spojin naravnega izvora, ki po kompleksnih protokolih ekstrakcije-separacije-izolacije-identifikacije vodijo do dostopnih naravnih spojin (5). Težavo pri reševanju spojin naravnega izvora predstavljajo predvsem sinergistični učinki spojin v začetnih grobih ekstraktih in so velik izziv za natančno identifikacijo in biološko ovrednotenje posameznih aktivnih spojin (5).

2 Spojine naravnega izvora kot vir vodnic

Spojine naravnega izvora (npr. biosintetizirani primarni/sekundarni metaboliti) imajo veliko prednosti pred sintezniimi molekulami. Opisujejo širši in bogatejši kemijski prostor v primerjavi s popolnoma sintezniimi knjižnicami spojin, imajo ugodnejše farmakokinetične lastnosti in so pogosto primernejše za nadaljnjo optimizacijo do spojin vodnic. Navedene lastnosti spojin naravnega izvora, opazen upad števila novih kemijskih entitet na tržišču in težave pri iskanju novih kemijskih razredov spojin so pomembno prispevali k ponovnemu velikemu zanimanju farmacevtske industrije za spojine naravnega izvora kot vira pri iskanju in načrtovanju izhodnih spojin vodnic (7). Slednje poleg širokega spektra farmakoloških učinkov pogosto izkazujejo tudi ugodne fizikalno-kemijske lastnosti, saj izhajajo direktno iz različnih bioloških sistemov, kjer igrajo ključno vlogo

Preglednica 1: Spojine naravnega izvora v različnih stopnjah razvoja zdravilnih učinkovin (povzeto po (11)).

Table 1: Natural products in various research stages of drug development (based on (11)).

Faza razvoja	Rastline	Bakterije	Glive	Živali	Semisintezne spojine	Skupaj
Predklinična testiranja	46	12	7	7	27	99
Klinična faza I	14	5	0	3	8	30
Klinična faza II	41	4	0	10	11	66
Klinična faza III	5	4	0	4	13	26
Pred-registracija	2	0	0	0	2	4
Skupaj	108	25	7	24	61	225

v obrambnih, zaščitnih, signalnih, razmnoževalnih ter drugih pomembnih vlogah (7).

Trenutne raziskave se poslužujejo tako dobro poznanih kot tudi še neraziskanih rastlinskih in mikrobioloških virov spojin, saj je bilo po trenutnih ocenah z biološkim testiranjem ovrednotenih manj kot 15 odstotkov višjih rastlinskih vrst, v širšem pomenu pa je eksperimentalno opisan le odstotek na zemlji prisotne biodiverzitete (8). Velik potencial kažejo tudi spojine, ki jih proizvajajo organizmi, ki jih podrobneje spoznavamo v zadnjem času, kot so npr. različni ekstremofili (organizmi, ki uspevajo v fizikalnih in geokemičnih pogojih, ki so škodljivi za večino drugih živih bitij), endofiti (v širši definiciji vsi organizmi, ki so prisotni v notranjosti rastline) ter številni morski organizmi (9).

V zadnjem času so odkrili nove razrede zdravilnih učinkovin in spojin iz različnih naravnih virov, ki so trenutno v kliničnih testiranjih. Okarakterizirali so zanimivo skupino epotilonov, izoliranih iz proteobakterij, ki predstavljajo alternativo taksanskim protitumorom učinkovinam. Diskodermodil iz morske spužve *Discodermia dissoluta* je izhodišče mnogih vodnic v raziskavah protitumorom učinkovin (slika 1). Konotoksin zikonotid iz morskih polžev *Conus magnus* se že uporablja pri novih pristopih terapije kronične bolečine (10). Trenutno se izvajajo raziskave identifikacije novih spojin vodnic naravnega izvora kot potencialnih zdravilnih učinkovin v preko 200 velikih raziskovalnih programih, ki se nahajajo v različnih stopnjah razvoja (11). Kot prikazuje preglednica 1, so to spojine naravnega izvora, pridobljene iz različnih virov, prevladujejo pa bakterijski in rastlinski viri. Dobra polovica spojin je še v predkliničnih raziskavah, toda tudi delež spojin, ki bodo kmalu vstopile v klinično uporabo, ni zanemarljiv.

Natančnejši pregled usmeritev raziskav po terapevtskih področjih, predstavljen v preglednici 2, pokaže, da so raziskovalni programi najbolj osredotočeni na iskanje novih protitumorom in protimikrobnih učinkovin, saj med 225 opisanimi raziskovalnimi programi prvo skupino zavzema 86, drugo pa 40 predstavnikov. Sledijo jim učinkovine z delovanjem na živčevje (22 preiskovanih molekul), gastrointestinalne (GI) in v kardiovaskularnem sistemu delujoče učinkovine (20 preiskovanih molekul), protivnetne biološko aktivne spojine ter druge. Iz pregleda preostalih raziskovanih aplikacij vidimo, da so spojine naravnega izvora uporabne praktično na vseh terapevtskih področjih (11).

Uporaba spojin naravnega izvora lahko predstavlja tudi nevaren poseg v naravno biodiverzitetu (npr. ogrožanje posamezne rastlinske vrste, potrebne za izolacijo aktivne spojine), zato velja omeniti nujno skrb za

preprečevanje okoljskih sprememb (12). Osnovni dokument zaščite predstavlja na Svetovni skupščini v Riu de Janeiru leta 1992 sprejet mednarodni pravno zavezujoči sporazum o biodiverziteti (Convention on Biological Diversity – CBD), ki postavlja v ospredje tri cilje: ohranitev prisotne biodiverzitete, samozadostno izkoriščanje naravnih virov in enakomerno razdelitev le-teh. V ta namen so Združeni narodi poimenovali obdobje med leti 2011 in 2020 »Desetletje biotske raznovrstnosti« (13).

Raziskave spojin naravnega izvora bodo v prihodnje vedno bolj sklopljene z že sedaj prisotnimi biotehnoškimi raziskavami (npr. biotehnoške metode omogočajo boljše ekspresijo in produkcijo izhodnih spojin), proteomiko in genomiko. Velik pomen pa bodo prispevale tudi nove učinkovite separacijske in analitske tehnike ter razvoj informacijskih orodij, ki omogočajo obdelavo velikih količin pridobljenih podatkov (10, 11, 14).

Iskanje vodnic med spojinami naravnega izvora je iz začetnih naključnih odkritij, temelječih na pomembnem znanju tradicionalne medicine tehnološko izredno napredovalo. Sodobni interdisciplinarni protokoli ekstrakcije in rešetanja spojin vodnic naravnega izvora temeljijo pretežno na kombinacijah različnih eksperimentalnih tehnik. Protokole v grobem delimo na začetno fazo pridobivanja grobih ekstraktov iz naravnih virov, kompleksno separacijo, ki ji sledi identifikacija, ter karakterizacija posameznih spojin. (leva stran slike 2). Ekstraktom s pomočjo bioloških testov na eni ali več sorodnih tarčah določajo biološko aktivnost (15). Na preiskovanih tarčah ovrednotijo tudi biološko aktivnost posameznih izoliranih in identificiranih spojin. V procesu zelo pogosto uporabljajo sklopljene separacijsko-analitske metode tekočinske kromatografije (LC), masno spektroskopijo (MS) in jedrsko magnetno resonanco (NMR). To so na primer sodobni separacijski sistemi, označeni s kraticami: LC-MS-MS in LC-MS-NMR, ki omogočajo hkratno separacijo in identifikacijo posameznih spojin iz začetnih ekstraktov. Nadaljnje sintezne ali polysintezne optimizacije lahko vodijo do spojin z optimalnimi lastnostmi. V preglednici 3 je prikazanih več uspešnih raziskovalnih programov, katerih ciljane učinkovine so trenutno v kliničnih študijah, nekatere pa so že vpeljane v terapijo (10, 11, 14).

Raziskave spojin naravnega izvora danes uspešno dopolnjujejo tudi računalniško podprti »in silico« pristopi načrtovanja in iskanja spojin vodnic. Ti pristopi so že dolgo uveljavljeni pri iskanju spojin vodnic iz knjižnic sintezno pridobljenih molekul (16). Integracijo teh metod z eksperimentalnimi metodami pri raziskavah spojin naravnega izvora shematsko predstavlja slika 2 (17, 18). Uporabo takšnega kombiniranega

Preglednica 2: Terapevtske indikacije preiskovanih spojin naravnega izvora na različnih stopnjah razvoja zdravilnih učinkovin (povzeto po (11)).

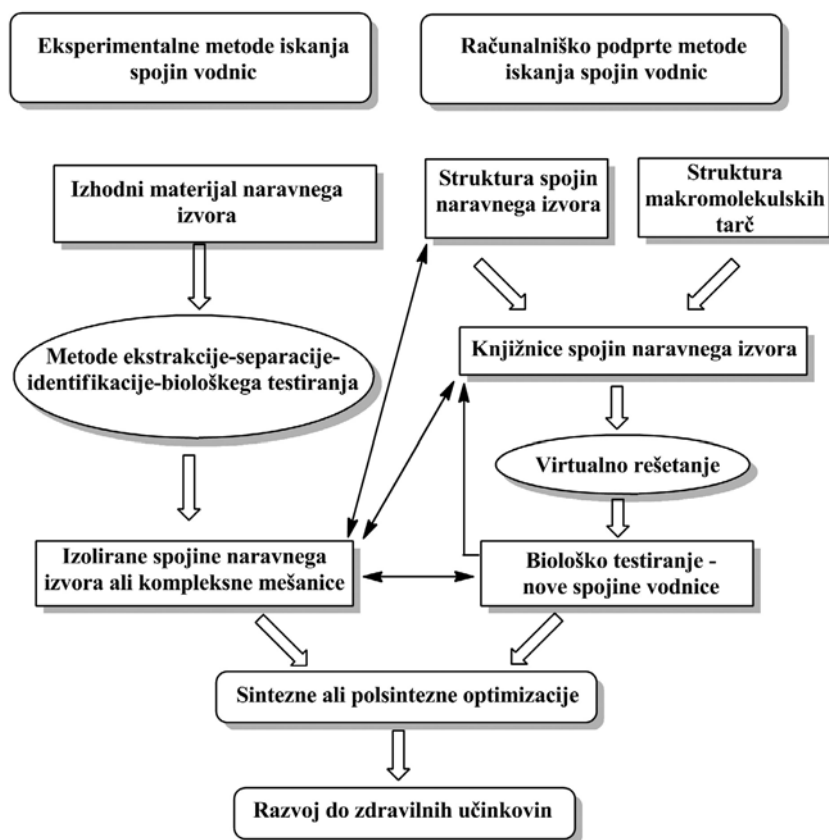
Table 2: Therapeutic areas of current natural product drug discovery programmes at various stages of drug development (based on (11)).

Faza razvoja	Predklinična testiranja	Klinična faza I	Klinična faza II	Klinična faza III	Predregistracija	Skupaj
1. Protitumorne učinkovine	34	15	26	9	2	86
2. Protimikrobne učinkovine	25	4	7	2	2	40
3. Učinkovine delujoče na živčevje	6	3	9	4	0	22
4. Učinkovine delujoče v kardiovaskularnem in GI sistemu	9	0	5	6	0	20
5. Protivnetne učinkovine	6	2	9	1	0	18
6. Učinkovine za bolezn presnove	7	3	6	1	0	17
7. Učinkovine za zdravljenje bolezni kože	7	1	2	0	0	10
8. Hormonsko delujoče učinkovine	3	0	2	1	0	6
9. Imunosupresivi	2	2	0	2	0	6
Skupaj	99	30	66	26	4	225

Preglednica 3: Primeri učinkovin iz naravnih produktov in derivatov, ki so trenutno v kliničnih testiranjih (povzeto po (10, 14)).

Table 3: Examples of natural product compounds and derivatives in various stages of clinical trials (based on (10, 14)).

Ime spojine INN	Vrsta spojine	Naravni vir	Klinična testiranja	Preiskovana indikacija
Zikonotid	sintezni analog izhodne spojine naravnega izvora	<i>Conus magnus</i>	Faza III	analgetična učinkovina
Rubitecan	polsintezna spojina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Faza III	protitumorna učinkovina
Anidulafungin	polsintezna spojina	<i>Aspergillus rugulosus</i>	V terapiji	protiglivična učinkovina
Everolimus	polsintezna spojina	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	V terapiji	imunosupresiv
Huperzin-A	naravna spojina	<i>Huperzia serrata</i>	Faza II	učinkovina za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni
Epotiloni	naravne spojine, polsintezne spojine, sintezni analogi izhodne spojine naravnega izvora	<i>Sorangium cellulosum</i>	Faza I - III	protitumorne učinkovina
Salinosporamid A	spojina naravnega izvora	<i>Salinispora tropica</i>	Faza I	protitumorna učinkovina
Criptoficin	spojina naravnega izvora	<i>Nostoc sp.</i>	Faza I	protitumorna učinkovina
Dolastatin 10	spojina naravnega izvora	<i>Cyanobacterium Symploca</i>	Faza II	protitumorna učinkovina
Dalbavancin	polsintezna spojina	<i>Nonomuraea sp.</i>	Faza III	protibakterijska učinkovina



Slika 2: Integracija eksperimentalnih in računalniško podprtih metod iskanja spojin vodnic iz spojin naravnega izvora (povzeto po (17, 18)).

Figure 2: Integration of experimental and computer-assisted methods in the identification of lead compounds from natural sources (based on (18)).

pristopa so omogočili v zadnjih letih dostopne zbirke podatkov o spojinah naravnega izvora, zbrane v različnih kemijskih knjižnicah, in razvoj orodij računalniško podprtega načrtovanja in virtualnega rešetanja, s katerimi lahko preiskujemo te knjižnice. Tako knjižnice kot orodja virtualnega rešetanja podrobno predstavljamo v naslednjih razdelkih. Izolirane spojine naravnega izvora in dostopni eksperimentalni podatki predstavljajo najpomembnejše robne pogoje za učinkovito uporabo računalniško podprtih metod (17).

3 Knjižnice spojin naravnega izvora

Kljub širokemu biološkemu in kemijskemu prostoru, ki ga pokrivajo spojine naravnega izvora, je bila njihova uporaba pri racionalnem računalniško podprtem načrtovanju spojin vodnic do nedavnega relativno omejena. To lahko pripisemo omejenemu dostopu do knjižnic okarakteriziranih in/ali biološko testiranih spojin naravnega izvora, ki bi se lahko uporabljale v eksperimentih virtualnega rešetanja. Šele v zadnjih letih se poleg knjižnic sinteznih molekul pojavljajo tako javno dostopni viri kot komercialni ponudniki knjižnic spojin, ki omogočajo dostop do specializiranih knjižnic spojin naravnega izvora. Z razvojem informacijske tehnologije je postala možna tudi obdelava velike količine podatkov, ki jih najdemo v takšnih knjižnicah. Knjižnice spojin ne vsebujejo le pregleda spojin in njihovih struktur, ampak tudi podatke o fizikalno-kemijskih lastnostih in eksperimentalne podatke o biološki aktivnosti na

različnih sistemih skupaj s pripadajočimi referencami do strokovne ali patentne literature (19).

3.1 Javno dostopne knjižnice in zbirke spojin naravnega izvora

Javno dostopne knjižnice spojin naravnega izvora preko svetovnega spleta omogočajo vpogled v zbirke spojin, njihove kemijsko-fizikalne lastnosti ter morebitne reference do primarne ali patentne literature. Nekatere najpomembnejše knjižnice tega tipa so zbrane v preglednici 4. DIOS knjižnica ima 9.676 vnosov ter je osnovana na zgodovinskem viru *De materia medica*, ki ga je zbral Pedanius Dioscorides v 1. stoletju. Knjižnica vsebuje naravne spojine iz preko 800 višjih rastlinskih vrst, ki so prisotne na področju Evrope. ChEBI (The Chemical Entities of Biological Interest) je knjižnica Evropskega inštituta za bioinformatiko ter vsebuje preko 6.000 spojin naravnega ter tudi sinteznega izvora. V NPD - Natural products database (del večje knjižnice spojin za virtualno rešetanje Zinc) je trenutno shranjenih preko 90.000 vnosov iz najrazličnejših naravnih virov. ChemBank, knjižnica National Cancer Institute's Initiative for Chemical Genetics, vsebuje 1,1 milijona malih molekul, med njimi tudi mnoge spojine naravnega izvora. Knjižnica omogoča tudi komercialni dostop do dela spojin ter vsebuje odsek s preko 6.000 biološko aktivnih spojinami naravnega izvora ter dostopnost do podatkov izvedenih bioloških testiranj. ChemID, knjižnica spojin s preko 350.000 vnosi ameriške National Library of Medicine, omogoča vpogled v prek 250.000 spojin s pripadajočimi fizikalno-kemijskimi

parametri in referenčnimi podatki. NCI knjižnica, ki jo zastopa The National Cancer Institute, združuje več knjižnic podatkov in nudi prost dostop do prek 250.000 spojin s pripadajočimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Prav tako je združenih več knjižnic v portalu PubChem, ki jih ureja ameriški National Institutes of Health (NIH), kjer lahko najdemo podatke za prek 2 milijona struktur malih molekul. Omeniti velja tudi združeno knjižnico SuperNatural s 50.000 spojinami naravnega izvora. Le-ta poleg vpogleda v lastnosti spojin in referenčno literaturo omogoča tudi komercialen dostop do vsakega vnosa v knjižnici (19).

3.2 Komercialne knjižnice in zbirke spojin naravnega izvora

Velik izbor spojin naravnega izvora nudijo tudi komercialne podatkovne zbirke (preglednica 4). Najpomembnejša vira podatkov o spojinah sta knjižnici CAS - Chemical Abstracts Service in Beilstein Database. Obe spremljata strokovno ter patentno literaturo od 19. stoletja do danes ter omogočata vpogled v prek 25 milijonov spojin. Spojine spremljajo ustrezne reference ter opisi fizikalno-kemijskih, analitskih in bioloških lastnosti. The Merck Index je prav tako pomembna referenčna enciklopedija z 11.000 monografijami, ki med drugim vsebujejo informacije o naravnih spojinah ter njihovih lastnostih, terapevtski in komercialni uporabi. Več knjižnic spojin obravnava tradicionalne kitajske zdravilne rastline, in sicer CHMD - Chinese Herbal Medicines Database, TCMD - Traditional Chinese Medicines Database, CHCD - Chinese

Herbal Constituents Database. Knjižnice vsebujejo od 7.000 do 10.000 vnosov s strukturnimi, farmakološkimi in botaničnimi referencami. BPCD - Bioactive Plants Compound Database ponuja 2.597 naravnih spojin različnih virov ter podatke o aktivnosti na 78 terapevtskih tarčah. AntiBase knjižnica Univerze v Göttingenu ponuja prek 30.000 spojin, izoliranih iz mikroorganizmov ter gliv. MNPD - Marine natural products database vsebuje 6.000 vnosov naravnih spojin iz okoli 10.000 morskih organizmov. The DNP - Dictionary of Natural Products, del knjižnice The Chapman & Hall/CRC Chemical Database, ponuja podatke o preko 200.000 spojin naravnega izvora, ki so strukturno klasificirane in vsebujejo reference, fizikalno-kemijske ter biološke podatke. RÖMPP Natural products je prav tako del kemijsko širše zastavljene knjižnice Thieme RÖMPP. Tu najdemo 6.000 spojin naravnega izvora s pripadajočimi strukturnimi in analitskimi informacijami. (20)

4 Uporaba računalniške (računske) kemije za iskanje spojin vodnic med spojinami naravnega izvora

V akademskih raziskavah in v farmacevtski industriji se računalniško podprte metode iskanja spojin vodnic danes rutinsko uporabljajo. Virtualno reševanje je krojni pojem za skupine metod, ki jih uporabljamo

Preglednica 4: Javno dostopne knjižnice spojin, ki vsebujejo podatke o spojinah naravnega izvora (povzeto po (17-20)).

Table 4: Public databases containing collections of natural products (based on (17-20)).

Ime knjižnice	Dostop na svetovnem spletu	Celotno število spojin	Število spojin naravnega izvora
ChEBI	www.ebi.ac.uk/chebi/	> 6.000	~3.500
NPD (Zinc)	zinc.docking.org/	> 90.000	~90.000
ChemBank	chembank.broadinstitute.org/	> 1.100.000	n.p.
ChemID	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/	> 350.000	~2.000
NCI	cactus.nci.nih.gov/	> 250.000	n.p.
PubChem	pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	> 2.000.000	n.p.
SuperNatural	bioinformatics.charite.de/supernatural/	> 50.000	~50.000

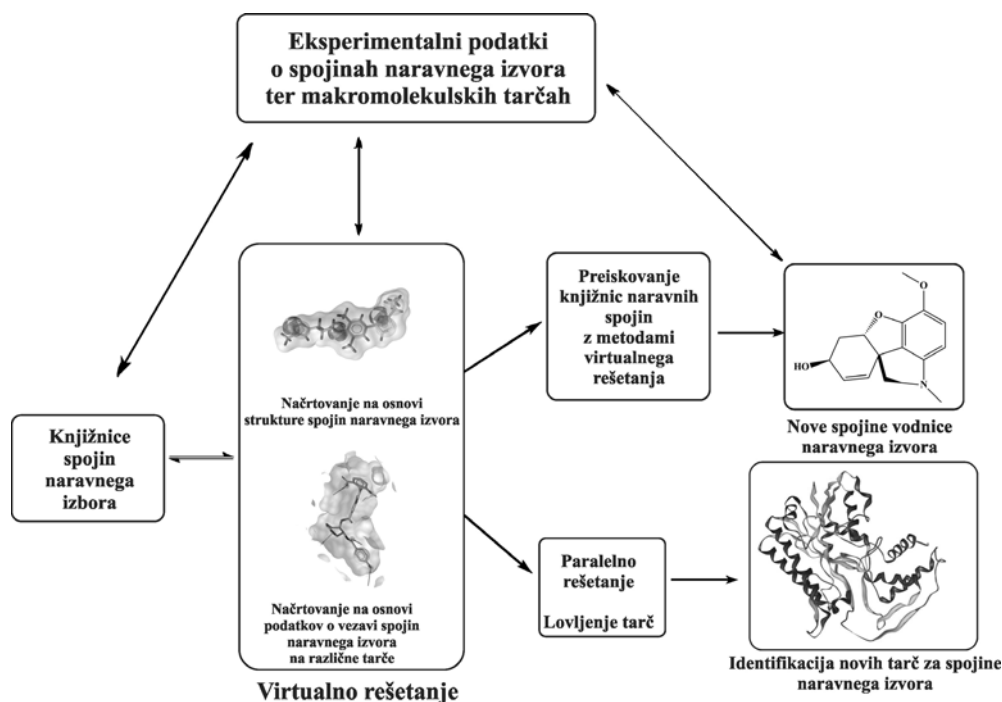
n.p. – trenutno ni dostopnega točnega podatka

Preglednica 5: Komercialne knjižnice spojin, ki vsebujejo podatke o spojinah naravnega izvora (povzeto po (17-20)).

Table 5: Commercially available databases containing collections of natural products (based on (17-20)).

Ime knjižnice	Dostop na svetovnem spletu	Celotno število spojin	Število spojin naravnega izvora
CAS	www.cas.org/expertise/cascontent/index.html	> 25.000.000	n.p.
Beilstein	www.reaxys.com/	> 10.000.000	> 150.000
The Merck Index	library.dialog.com/bluesheets/html/bl0304.html	> 10.000	n.p.
TCMD	www.cintcm.com/index.htm	> 7.000	> 7.000
AntiBase	www.wiley-vch.de/stmdata/antibase2011.php	> 30.000	> 30.000
DNP	dnp.chemnetbase.com/	> 200.000	> 200.000
RÖMPP	www.roempp.com/de/formate/encyclopedias/roempp.html	> 6.000	> 6.000

n.p. – trenutno ni dostopnega točnega podatka



Slika 3: Podrobnejša predstavitev integracije računalniško podprtih metod v raziskavah spojin vodnic naravnega izvora.

Figure 3: Detailed representation of the integration of computer-based methods in the natural products drug design research process.

pri avtomatiziranem računalniško podprtem preiskovanju velikih knjižnic spojin s ciljem iskanja novih spojin vodnic (16, 21). Z vse večjo dostopnostjo računalniške tehnologije se je danes ta metodološki pristop pospešeno uveljavil tudi pri reševanju spojin naravnega izvora, saj omogoča racionalno načrtovanje in usmeritev eksperimentalnega dela na izbrane nize spojin, ki zadostijo pogojem reševanja (slika 3) (16). Tak pristop je tudi ekonomsko in časovno učinkovitejši. Računalniška tehnologija tudi omogoča, da izračunamo fizikalno-kemijske lastnosti in ocenimo nekatere farmakokinetične in toksikološke parametre preiskovanih spojin (21). Najbolj pogosto uporabljamo pristope virtualnega reševanja, ki temeljijo na strukturi ligandov, ali makromolekulske tarče, paralelno virtualno reševanje in iz njega izpeljano metodo lovljenja tarč. Vsi računalniški pristopi morajo v vseh fazah upoštevati dostopne eksperimentalne podatke, pridobljene v različnih fazah raziskav spojin naravnega izvora (22).

4.1 Virtualno reševanje, ki temelji na strukturi liganda

S pomočjo znane kemijske strukture liganda z določeno biološko aktivnostjo na preiskovani tarči lahko iščemo kemijsko in biološko sorodne spojine. Uporabljamo lahko zelo enostavne dvodimenzionalne pristope, kjer primerjamo atome in vezi v molekulah iz preiskovanih knjižnic z referenčno molekulo. Metode reševanja lahko primerjajo obliko in volumen posameznih struktur in njihovo podobnost. Pogosto pa molekule med seboj primerjamo na osnovi zgrajenega farmakofornega modela (slika 3). Farmakoforni model opišemo kot zbirko steričnih in elektronskih lastnosti, ki so potrebne za zagotovitev optimalnih medmolekulskih interakcij s specifično biološko tarčo, ki vodijo do biološkega odziva. Tu ne govorimo o zbirki konkretnih funkcionalnih skupin, ampak ključne lastnosti molekule opišemo z bolj splošnimi farmakofornimi elementi (npr. ionski center, hidrofobna interakcija,

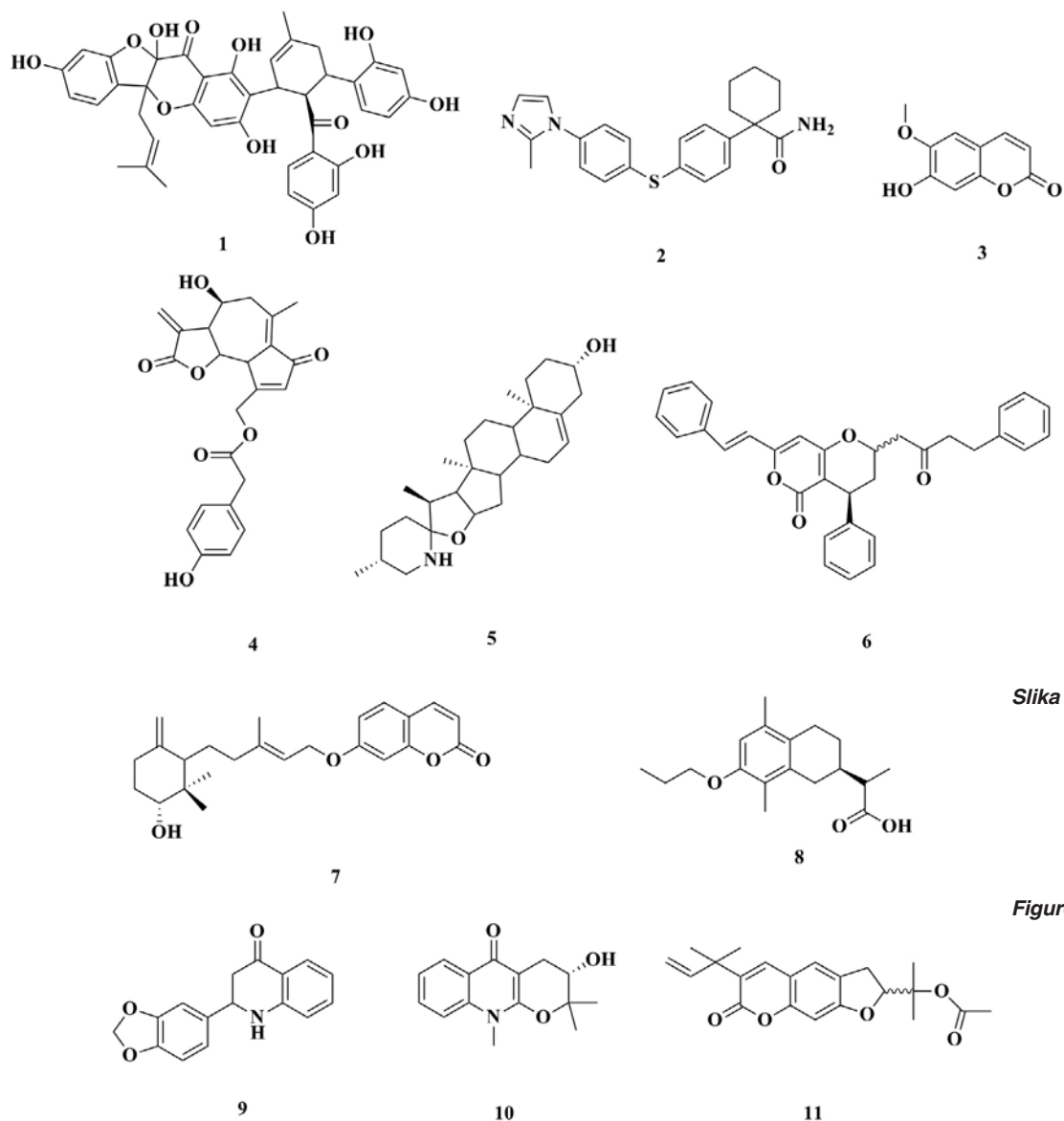
sterična omejitve, aromatski obroč itd.). Izdelani farmakoforni model je nekakšen skupni imenovalec bioaktivnih ligandov, ki ga uporabimo kot virtualno sito na preiskovani knjižnici spojin (16, 21).

4.2 Virtualno reševanje, ki temelji na strukturi tarče

Vse več bioloških makromolekul, ki predstavljajo tarče za razvoj zdravih učinkovin, ima določeno tudi svojo tridimenzionalno strukturo. V tem primeru je največkrat uporabljena metoda virtualnega reševanja sidranje molekul preiskovane knjižnice v aktivno mesto receptorja in ocena vezavne afinitete sidranih konformacij (slika 3). Poleg opisa struktur molekul v knjižnici in definirane aktivnega mesta je zelo pomemben učinkovit iskalni algoritem programa za sidranje, ki pravilno umesti preiskovane ligande v aktivno mesto, in robustna cenilna funkcija za razvrstitev izračunanih kompleksov po energiji interakcije liganda s tarčo (23). Druga možnost virtualnega reševanja je uporaba na strukturi temelječih farmakofornih modelov. V tem primeru farmakoforni model zgradimo na osnovi strukture kompleksa med ligandom naravnega izvora in tarčo, na kateri identificiramo ključne farmakoforne elemente, ki opisujejo interakcije spojine s tarčo. Z uporabo steričnih omejitev, ki jih izpeljemo iz strukturnih podatkov, pa med virtualnim reševanjem upoštevamo tudi prostorske omejitve preiskovanega aktivnega mesta tarče (20).

4.3 Paralelno virtualno reševanje in lovljenje tarč

Tehnologija paralelnega virtualnega reševanja uporablja zgoraj opisani metodologiji za reševanje ligandov na več tarčah hkrati (24). Na eni strani je tehnologija primerna za iskanje ligandov, kjer iščemo spojine, ki naj delujejo na več tarčah hkrati, še večkrat pa se tak pristop uporablja za



Slika 4: Primeri spojin vodnic naravnega izvora odkritih z integriranim pristopom računalniško podprtih in eksperimentalnih metod.

Figure 4: Examples of new natural products as lead compounds discovered by the integrated computer-based and experimental approach.

proučevanje vezave učinkovin na tarče, ki so odgovorne za neželene stranske učinke učinkovin, in za preučevanje nekaterih farmakokinetičnih-farmakodinamskih lastnosti. S paralelnim reševanjem lahko sočasno preučujemo interakcije učinkovin z ionskim kanalom hERG v srčnem tkivu (odgovornim za nevarne stranske učinke), vezavo na plazemske proteine in transportne kanalčke ter interakcije z metaboličnimi citokromskimi (CYP) encimi. Za uspešno paralelno reševanje moramo imeti dostop do bodisi kvalitetne knjižnice validiranih farmakofornih modelov, s katerimi predstavimo terapevtske tarče, bodisi do vseh tridimenzionalnih struktur preiskovanih tarč in programske opreme, ki omogoča tak tip reševanja (25).

Paralelno virtualno načrtovanje omogoča, da standardno paradigmo načrtovanja učinkovin pogledamo tudi z druge strani in uporabimo knjižnice spojin (ali pa posamezne molekule) skupaj z dostopno knjižnico farmakofornih modelov in/ali zbirki tridimenzionalnih struktur

makromolekulskih tarč z namenom identifikacije tarče, s katero bo preiskovana spojina najverjetneje interagirala. Temu pristopu pravimo lovljenje tarč (angl. »target fishing«) in je pri spojinah naravnega izvora, za katere želimo najti primerne tarče, še posebej zanimiva (25, 26).

5 Primeri uspešne identifikacije spojin vodnic med spojinami naravnega izvora z uporabo integriranih metod

Integrirane metode iskanja spojin, kjer skupaj uporabljamo računalniško podprte in eksperimentalne metode, so v raziskavah prisotne šele v zadnjih letih in večina spojin vodnic, ki so bile odkrite s tem pristopom, še ni vstopila v klinično uporabo (20). V nadaljevanju predstavljamo izbrane

primeri uspešne identifikacije spojin vodnic naravnega izvora iz različnih terapevtskih področij, ki so bile odkrite z opisanim integriranim pristopom. Strukture izbranih molekul so predstavljene na sliki 4.

Encimi, vpleteni v biosintezo prostaglandinov, prostaciklinov, levkotrienov ter tromboksanov kot metabolitov arahidonske kisline, so že tradicionalno privlačne tarče farmacevtskih raziskav. Med njimi so ciklooksigenaze (npr. encima COX-1, COX-2) ključni encimi v kompleksnem procesu vnetja. Nove spojine vodnice, ki bi delovale na te tarče, iščejo tudi med spojinami naravnega izvora. Za odkritje spojine **1** so izhajali iz strukture kompleksa zdravilne učinkovine (S)-flurbiprofena z encimom COX-1 ter njegovo aktivno mesto uporabili pri virtualnem reševanju knjižnice naravnih spojin DIOS. Spojina **1** spada v skupino spojin, izoliranih iz bele murve (*Morus alba*), ki se je v bioloških testih izkazala kot dober zaviralec COX encimov. Bela murva se pojavlja že v tradicionalni kitajski medicini v različnih protivnetnih zdravilnih pripravkih (27).

Podobno kot ciklooksigenaza tudi encim 5-lipooksigenaza (5-LOX) sodeluje v kaskadi arahidonske kisline. Katalizira prvi korak pretvorbe arahidonske kisline do levkotrienov, ki so tudi mediatorji pri vnetnih in alergijskih reakcijah. S pomočjo metode virtualnega reševanja, ki temelji na strukturi ligandov (za izgradnjo farmakofornega modela so uporabili 43 v literaturi že prisotnih zaviralcev encima 5-LOX), so preiskali knjižnico spojin naravnega izvora in po biološkem ovrednotenju zadetkov odkrili obetavne zaviralce encima 5-LOX (npr. spojina **2**), ki so jih z optimizacijo začetnega farmakofornega modela lahko še izboljšali (28).

Med zaviralci encima acetilholin esteraze (AChE) naravnega izvora se galantamin iz zvončka *Galanthus nivalis* L. uporablja v terapiji Alzheimerjeve bolezni. Pri iskanju novih AChE zaviralcev so zgradili na strukturi temelječ farmakoforni model, zasnovan osnovi določenega kompleksa galantamina z AChE, in preiskali dostopno knjižnico spojin naravnega izvora. Identificirali so najprej zaviralec skopoletin **3**, izoliran iz kranjske bunike (*Scopolia carnioolica*). Pri nadaljnjem virtualnem reševanju usmerjene knjižnice spojin navadnega potrošnika (*Cichorium intybus* L.) so odkrili še drug uspešen zaviralec encima AChE - spojino **4**. Separacija ekstraktov navadnega potrošnika je nadalje potrdila, da je za aktivnost ekstraktov odgovorna prav izbrana učinkovina (29).

Spojine z afiniteto do sigma receptorjev se nahajajo v začetnih stopnjah razvoja kot potencialne učinkovine za terapijo shizofrenije, depresije in kognitivnih motenj. S pomočjo načrtovanja na osnovi strukture znanih ligandov, ki se vežejo na sigma-1 receptor, so preiskali knjižnico spojin naravnega izvora ter ugotovili visoko afiniteto nekaterih alkaloidov solasodina (spojina **5**), solanidina in tomatidina do preiskovanega receptorja (30).

Veliko raziskovalnih programov uporablja integrirane metode tudi na področju iskanja protivirusnih spojin vodnic. Raziskave obravnavajo večino najpogostejših patogenih virusov, kot so: HIV-1, virusa influence A, B, SARS-koronavirusi, herpes virusi, rinovirusi in virus hepatitisa C (31). Predstavili bomo dva primera uporabe integriranega pristopa na aktualnem področju zaviralcev neuraminidaze za zdravljenje okužb z virusom gripe in pri iskanju učinkovin proti rinovirusom, ki povzročajo okužbe zgornjih dihal.

Na področju načrtovanja zaviralcev neuroaminidaze so preiskali spojine, izolirane iz ekstrakta semen rastline *Alpinia katsumadai*. Z uporabo integriranih metod molekulskega sidranja ter kompleksno načrtovanih

separacij ekstraktov so identificirali spojino katsumadain A (spojina **6**), ki deluje kot učinkovit inhibitor neuroaminidaze podtipa A/PR/8/34 virusa gripe H1N1. Aktivna spojina naravnega izvora izkazuje podoben način vezave kot v terapiji prisotni inhibitorji (npr. zanamavir, oseltamivir) (31).

Rinovirusi so RNA virusi in sodijo v družino *Picornaviridae*. Poznamo več kot 100 tipov, ki so pogosto odgovorni za okužbe zgornjih dihal (npr. prehladi, nahodi). Proteini plaščka virusa so ena izmed tarč za protivirusne učinkovine s potencialno uporabo pri zdravljenju prehlada. S pomočjo v literaturi objavljenih struktur kompleksov inhibitorjev plaščnega proteina človeškega rinovirusa HRV so zgradili farmakoforni model ter z njim preiskali DIOS knjižnico naravnih spojin. Dobljene zadetke v knjižnici so primerjali z zapisi tradicionalne medicine o aktivnosti spojin. Zadetke so izolirali iz ekstraktov začimbnice *Ferula assafoetida* ter ovrednotili aktivnost z biološkim testiranjem. Raziskave so identificirale seskviterpenske spojine (npr. spojina **7**) kot potencialne protivirusne učinkovine (33).

Receptorji PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) so transkripcijski faktorji, pomembni pri lipidnem signaliziranju in modulaciji imunskega odziva. Sodelujejo tudi z drugimi receptorji, ki regulirajo metabolizem lipidov. Agonisti podtipov PPAR- α in PPAR- γ receptorjev so uporabni v terapijah ateroskleroze, lipidemičnih motenj in kot peroralni antidiabetiki (tiazolidindioni npr. rosiglitazon). Veliko spojin z aktivnostjo na PPAR receptorjih najdemo tudi med naravnimi spojinami. Ti so na primer Δ -9-tetrahidrokanabinol, izoliran iz rodu *Cannabis*, carnosol iz *Rosmarinus officinalis*, resveratrol, izoliran iz roda *Veratrum*, in drugi. Na osnovi v literaturi opisanih agonistov PPAR γ so zgradili farmakoforni model ter z njim preiskali knjižnico spojin naravnega izvora. Med dobljenimi virtualnimi zadetki so identificirali aktivne spojine na osnovi skeleta α -santonina (spojina **8**) (34).

Za konec predstavljamo še uporabo metod paralelnega virtualnega reševanja in lovljenja tarč. Z namenom iskanja potencialnih terapevtskih tarč 16 sekundarnim metabolitom, izoliranih iz vinske rutice (*Ruta graveolens*), so izvedli paralelno virtualno reševanje knjižnice, ki je vsebovala 2208 farmakofornih modelov, ki predstavljajo skupaj 280 različnih terapevtskih tarč. Na podlagi *in-silico* interakcij metabolitov s tarčami je raziskovalna skupina identificirala tri tarče: acetilholin esterazo, plaščni protein človeškega rinovirusa HRV ter kanabinoidni receptor tipa 2, na katerih so sekundarni metaboliti izkazovali največjo aktivnost. Eksperimentalno ovrednotenje je potrdilo rezultate računalniško podprtih eksperimentov. Spojina **9** je dober zaviralec encima AChE, spojina **10** interagira s plaščnim proteinom HRV in spojina **11** se veže na kanabinoidni receptor tipa 2 (26).

6 Zaključek

Računalniško podprte metode načrtovanja in virtualnega reševanja skupaj z dostopnimi knjižnicami spojin naravnega izvora postajajo vse močnejša podpora uveljavljenim eksperimentalnim metodam ekstrakcije, separacije in identifikacije spojin vodnic med spojinami naravnega izvora. Z uporabo računalniško podprtih metod lahko sistematično obdelujemo velike količine strukturnih in bioloških podatkov in pridobimo pomembne podatke za uspešno identifikacijo novih zadetkov, ki predstavljajo prvi korak do novih zdravilnih učinkovin na različnih terapevtskih področjih. Za uspeh iskanja morajo biti metode računalniško podprtega načrtovanja tesno sklopljene z eksperimentalnimi tehnikami in dostopnimi

eksperimentalnimi podatki, ki tvorijo nov integriran pristop pri identifikaciji spojin vodnic naravnega izvora. S pomočjo tehnik paralelnega reševanja lahko identificiramo tudi nove makromolekulske tarče za izolirane spojine naravnega izvora. Integriran pristop omogoča boljše, racionalnejšo in učinkovitejšo uporabo spojin naravnega izvora, ki predstavljajo dragocen in pomemben vir novih zdravilnih učinkovin.

7 Literatura

1. Farnsworth NR, Akerele RO, Bingel AS et al. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Org* 1985; 63: 965-981.
2. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod* 2007; 70: 461-477.
3. Wilson RM, Danishefsky S J. Small Molecule Natural Products in the Discovery of Therapeutic Agents: The Synthesis Connection. *J Org Chem* 2006; 71: 8329-8351.
4. Butler MS. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J Nat Prod* 2004; 67: 2141-2153.
5. Neuman DJ. Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery. *J Med Chem* 2008; 51: 2589-2599.
6. Vuorela P, Leinonen M, Saikkuc P et al. Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1375-1389.
7. Rouhi AM. Rediscovering natural products. *Chem Eng News* 2003; 81: 77-91.
8. Saklani A, Kutty SK. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov Today* 2008; 13: 161-171.
9. Newman DJ, Cragg GM. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *J Nat Prod* 2004; 67: 1216-1238.
10. Li JWH, Vederas JC. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* 2009; 325: 161-165.
11. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 2008; 13: 894-901.
12. Kingston DGI. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *J Nat Prod* 2011; 74: 496-511.
13. Convention on Biological Diversity. <http://www.cbd.int/>. Dostop: 1. 5. 2011
14. Butler MS. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J Nat Prod* 2004; 67: 2141-2153.
15. Littleton J, Rogers T, Falcone D et al. Novel approaches to plant drug discovery based on high throughput pharmacological screening and genetic manipulation. *Life Sci* 2005; 78: 467-475.
16. Perdih A, Kotnik M, Oblak M et al. Uporaba računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farm vestn* 2010; 61: 195-202.
17. Rollinger JM, Langer T, Stuppner H. Strategies for Efficient Lead Structure Discovery from Natural Products. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1491-1507.
18. Rollinger JM, Langer T, Stuppner H. Integrated *in Silico* Tools for Exploiting the Natural Products' Bioactivity. *Planta Med* 2006; 72: 671-678.
19. Füllbeck M, Michalsky E, Dunkel M et al. Natural products: sources and databases. *Nat Prod Rep* 2006; 23: 347-356.
20. Schuster D, Wolber G. Identification of Bioactive Natural Products by Pharmacophore-Based Virtual Screening. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1666-1681.
21. Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 2004; 432 (7019): 862-865.
22. Langer T, Hoffmann RD. Virtual Screening: An Effective Tool for Lead Structure Discovery? *Curr Pharm Des* 2001; 7: 509-527.
23. Warren GL, Andrews CW, Capelli A et al. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J Med Chem* 2006; 49: 5912-5931.
24. Steindl TM, Schuster D, Laggner C et al. Parallel Screening: A Novel Concept in Pharmacophore Modeling and Virtual Screening. *J Chem Inf Model* 2006; 46: 2146-2157.
25. Kirchmair J, Distinto S, Schuster D, et al. Enhancing Drug Discovery Through *In Silico* Screening: Strategies to Increase True Positives Retrieval Rates. *Curr Med Chem* 2008; 15: 2040-2053.
26. Rollinger JM, Schuster D, Danzl B et al. *In silico* Target Fishing for Rationalized Ligand Discovery Exemplified on Constituents of *Ruta graveolens*. *Planta Med* 2009; 75: 195-204.
27. Rollinger JM, Bodensieck A, Seger C et al. Discovering COX-inhibiting constituents of *Morus* root bark: activity-guided versus computer-aided methods. *Planta Med* 2005; 71: 399-405.
28. Franke L, Schwarz O, Müller-Kuhr L et al. Identification of Natural-Product-Derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase Activity by Ligand-Based Virtual Screening. *J Med Chem* 2007; 50: 2640-2646.
29. Rollinger JM, Hornick A, Langer T. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopoletin Discovered by Virtual Screening of Natural Products. *J Med Chem* 2004; 47: 6248-6254.
30. Laggner C, Schieferer C, Fiechtner B et al. Discovery of High-Affinity Ligands of σ_1 Receptor, ERG2, and Emopamil Binding Protein by Pharmacophore Modelling and Virtual Screening. *J Med Chem* 2005; 48: 4754-4764.
31. Kirchmair J, Distinto S, Liedl, R et al. Development of Anti-Viral Agents Using Molecular Modeling and Virtual Screening Techniques. *Infectious Disorders – Drug Targets* 2011; 11: 64-93.
32. Grienke U, Schmidtke M, Kirchmair J et al. Antiviral Potential and Molecular Insight into Neuraminidase Inhibiting Diarylheptanoids from *Alpinia katsu-mandai*. *J Med Chem* 2010; 53: 778-786.
33. Rollinger JM, Steindl TM, Schuster D et al. Structure-Based Virtual Screening for the Discovery of Natural Inhibitors for Human Rhinovirus Coat Protein. *J Med Chem* 2008; 51: 842-851.
34. Tanrikulu Y, Rau O, Schwarz O et al. Structure-Based Pharmacophore Screening for Natural-Product-Derived PPAR γ Agonists. *ChemBioChem* 2009; 10: 75-78.