

# Hidratáció a gyógyszertervezésben

BÖRZSEI Rita, ZSIDÓ Balázs Zoltán, SZÉL Viktor és HETÉNYI Csaba\*

*Farmakoinformatikai Tanszék, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Általános Orvostudományi Kar,  
Pécsi Tudományegyetem, Szigeti út 12, 7624 Pécs, Magyarország.  
National Laboratory for Drug Research and Development, Magyar tudósok krt. 2., 1117 Budapest, Magyarország.*

## 1. Bevezetés

A célpont-ligandum kölcsönhatások számítása a racionális gyógyszertervezés kulcskérdése. A tervezés során a kölcsönhatások szerkezetének és energiájának leírására egyaránt szükségünk van. A célpont-ligandum komplexek a szervezetben leggyakrabban vizes közegben fordulnak elő. Ebből kifolyólag a vízmolekulák mind a célpont felszínén, mind a célpont-ligandum interfész régiójában megjelennek. A vízmolekulák térbeli pozíciójának és a vonatkozó energijárulékoknak a meghatározása ezért elengedhetetlen a célpont-ligandum komplex pontos számításához.

A helyzetet bonyolítja, hogy a vízmolekulák a ligandum kötődése során több szerepkörben feltűnnek. Ráadásul egymás között kialakított hidrogénkötésekkel hálózatot képeznek az oldott molekulák körül, és ennek a vízhálózatnak a megszűnése vagy átszerveződése (mobilitása) szintén befolyásolja a célpont-ligandum komplex stabilitását. A vízmolekulák három funkcionális csoportba sorolhatók aszerint, hogy milyen szerepet töltenek be a célpont-ligandum komplexben. A konzervált vízmolekulák a kötőzsebben vagy a ligandumhoz kötötten maradnak, és hidofil hidaló szerepet játszanak majd a kialakuló komplexben vagy a kötőzsebet töltik ki (1A ábra). A konzervált vízpozíciók termodinamikai és/vagy kinetikai stabilitással rendelkeznek és a kialakuló célpont-ligandum interfész alapvető alkotóelemivé válnak (1B ábra). A kiszorított (távozó) vizek a célpont vagy ligandum felszínén találhatók és kisebb stabilitással rendelkeznek. A ligandum bekötődése során, az kiszorítja őket a kedvezőtlen (általában hidrofób) al-kötőzsebből (piros nyilak, 1A ábra). A belépő vízmolekulák az oldat belsejéből (a bulk-ból) a ligandum bekötődés során épülnek be a komplexbe (kék nyilak, 1A ábra), ahol stabilizáló szerepet töltenek majd be a célpont-ligandum interfészben. Elhelyezkedésük (topológiájuk) alapján beágyazott, interfész, felszíni vagy bulk vizeket különíthetünk el (1B ábra). Általában a beágyazott és bizonyos interfész vízmolekulák határfelületi kapcsolatainak mértéke a legnagyobb, míg mobilitásuk a legkisebb. Az oldott anyagok autonóm (egyedi) partnereinek tekinthetők, és fontos szerepet töltenek be azok szerkezetében és stabilitásában. Ahogy a ligandum és az interfész mérete növekszik a vízmolekulák közötti hálózati kapcsolatok is nőnek. Ennek következtében az oldott

anyaggal egyre kisebb felületen érintkeznek, mobilitásuk növekszik és egymással nagy, laza ketrecszerű hálózatokat kezdenek kialakítani. A skála végén a nagy mennyiségű víz rendkívül dinamikus, szőlőfürt-szerű klaszterekből álló hálózatokba szerveződik, és így képezi a célpont-ligandum komplexeket körülvevő mobil, bulk közeget (1B ábra)<sup>1-3</sup>.

A jelen közleményben egy áttekintést adunk a vízmolekulák szerkezeti és energetikai szerepének számításáról (predikciójáról) a ligandum célpont-hoz történő kötődése során. Megjegyzendő, hogy az ismertetésre kerülő megközelítések nem csupán a célpont-ligandum komplexekre, de más molekuláris kölcsönhatásokra (host-guest komplexek, polimerek kölcsönhatásai, stb.) is adaptálhatók, ahol vizes közeg van jelen.

## 2. Hidrátszerkezetek számítása

A célpont-ligandum komplexekhez azok felszínére vagy a kötési interfészre kötődő vízmolekulák térbeli pozícióinak meghatározására rendelkezésünkre állnak mind kísérletes, mind elméleti módszerek. A kísérletes módszerek egyrészt szolgáltatják a vízmolekulák atomi pozícióit, másrészt elméleti módszerek validációjára is elengedhetetlen a használatuk. Mindezek ellenére a kísérletes módszerek önmagukban általában nem képesek jelenleg egy kavitások nélküli (komplett) hidrátszerkezet meghatározására. Például a röntgen-krisztallográfia esetén elmondható, hogy a vízmolekulák oxigénatomjainak elektronsűrűség-csúcsai sokszor kisebbek a környező fehérje atomokénál, így nehéz asszignálni az atomi pozícióikat egy röntgen-krisztallográfiás elektronsűrűség térképben<sup>4</sup>. Ezen túl, a röntgen-krisztallográfiára jellemző, hogy a fehérjék kristályba rendeződött szerkezete eltérhet az oldatbeli szerkezetüktől<sup>5</sup>, valamint a gyakran alkalmazott alacsony hőmérséklet is hatással van a vízmolekulákra<sup>6</sup>. Ezekon a hátrányokon a neutron-diffrakció javít<sup>7</sup>, de egyelőre ez még egy kevésbé elterjedten használt módszer<sup>8,9</sup> a célpont-ligandum kölcsönhatások esetében.

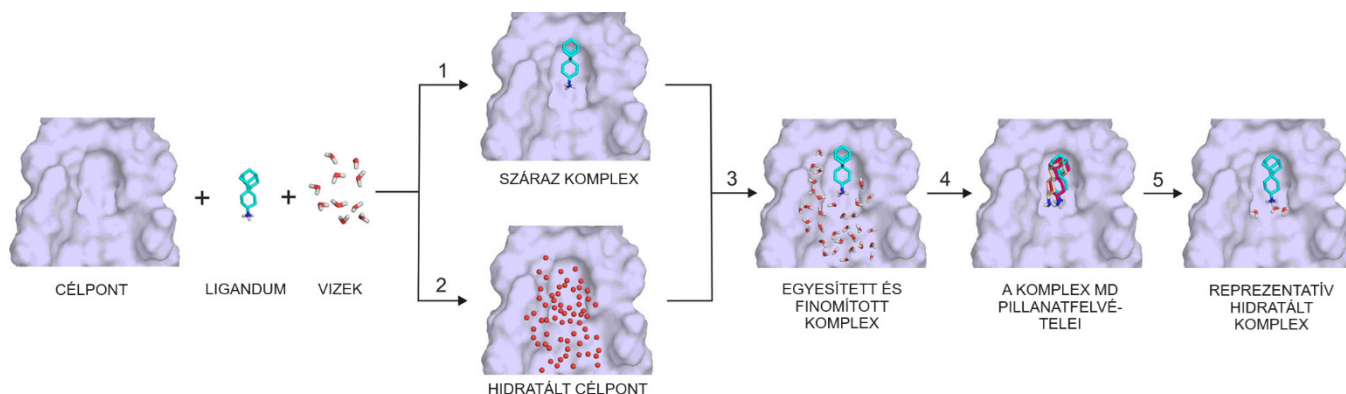
A célpont-ligandum komplexek hidratációs problémáinak számítására a kísérletes módszereket kiegészítő elméleti eljárások kerültek kidolgozásra.

\* Hetényi Csaba. Tel.: +3672536001/38201; e-mail: hetenyi.csaba@pte.hu



A kötősebben maradó/távozó (1A. ábra) vizek közötti distinkció nehéz feladat, mert ezeknek a vizeknek a célpont-ligandum komplex kialakulásának számítása (számítógépes dokkolás) során történő figyelembe vétele önmagában sem triviális<sup>2</sup>. Tekintettel arra, hogy a vízmolekulák és a ligandum egymás pozícióit egyaránt befolyásolják a kötősebben, nehéz eldönteni, hogy melyik stratégia helyes a hidrát szerkezet számításakor. Az, amelyik a) előbb a vizeket teszi be, vagy b) előbb a ligandumot teszi be a kötősebbe. Amennyiben először a vizek kerülnek elhelyezésre a kötősebben, szükség lenne kísérletes adatra a pontos számukról, illetve a hidrogén atomjaik orientációjáról. A ligandum elhelyezését elsőként választva pedig megakadályozzuk az interfész régióban lévő vízmolekulák bejutását a kötősebbe<sup>11</sup>. További probléma, hogy a számítógépes dokkolás során kölcsönhatási affinitás számítása (3. fejezet) is történik, amelynek során nem egyértelmű, hogy a vízmolekulákat a célpont, vagy a ligandum részeként helyes-e kezelni.

A probléma megoldására kidolgoztunk egy protokollt, amely a HydroDock<sup>12</sup> nevet kapta (2. ábra). A protokoll során a célpont kötősebében a ligandum és a vízmolekulák elhelyezése párhuzamosan történik, ez a 2. ábrán látható 1. és 2. lépésnek felel meg. Az első lépésben a ligandum „szá-raz-on” dokkolása történik, míg a második lépésben a kötősebb teljes, kavitásmentes hidrát szerkezetének elkészítése történik a MobyWat programmal, előre nem meghatározott számú vízmolekulával. Ezen a ponton fontos, hogy a hidrát szerkezet predikcióhoz használt programnak képesnek kell lennie a teljes apo célmolekula hidratálására, nem elégséges csak a kötési interfész régió vizeinek predikciója. A ligandummal és a vizekkel ellátott rendszert utána egyesíteni szükséges (3. lépés), amelynek során a ligandummal természetesen ütközni fognak egyes vízmolekulák, hiszen a teljes kötősebb került velük feltöltésre. A MobyWat program egy másik algorit-musa ezen ütköző vízmolekulákat eltávolítja.



**2. ábra.** A célpont (felület) és a ligandum (pálcikák) hidratált komplexének összeállítása a HydroDock protokoll segítségével. A HydroDock lépéseinek számozása a főszövegben szereplő magyarázatot követi. Az első lépés után a MobyWat nem minimalizált vízpozíciói piros gömbökként jelennek meg; egyébként a hidrogénezett és minimalizált vízmolekulákat pálcikákkal jelöltük. A harmadik lépés során az egyes vízpozíciók helyére a ligandum illeszkedik. Az érthetőség kedvéért a negyedik lépés után csak néhány MD pillanatkép látható a ligandum kötődési módjairól. Az ábra korábbi tanulmányunkból [12] került felhasználásra az American Chemical Society engedélyével.

A vízmolekulák oxigénjeire ezután hidrogéneket kell elhelyezni, a molekula dinamikai programok ezt véletlenszerű orientációban teszik meg, így a hidrogének beállítására elengedhetetlen molekula mechanikai szintű energia minimálás elvégzése. A protokoll további újdonsága ezen a ponton a szokásos legmeredekebb csökkenés (steepest descent) és konjugált gradiens (conjugated gradient) minimáló eljárásokon túl egy rövid molekula dinamikai lépés beiktatása, majd újabb két minimáló lépés elvégzése. Ezekkel a lépésekkel az influenza A vírus ioncsatornájában sikerült egyrészt megtalálni a kísérletesen meghatározott víz oxigén pozíciókat, valamint a hidrogének beforgatása is sikeres volt, hogy azok ne taszítsák az ioncsatorna gátló gyógyszerek pozitívan töltött funkciós csoportját. Az energia minimálást egy újabb, szintén viszonylag rövid molekula dinamikai lépés követi (4. lépés), majd az így kapott számos ligandum pozícióból egy reprezentáns kiválasztása

(5. lépés). A protokollt a kísérletesen egyedülként elérhető három darab virális ioncsatorna – csatornablokkoló gyógyszer szerkezeteken validáltuk, nevezetesen az influenza A vírus ioncsatornáját gátló adamantán vázas amfil vegyületek komplexein. Ezekkel kiváló egyezést értünk el, így elvégeztük a protokollt a SARS-CoV-2 vírus boríték fehérjeje által kialakított ioncsatornán is, ugyan ezekkel a vegyületekkel<sup>13</sup>. Kísérletes validálásra ebben az esetben egy NMR méréseken alapuló tanulmányt tudtunk felhasználni, amelyben az amantadin egy fluozott származékának kötődése esetében kimérték, hogy mely aminosav oldalláncok mozgása fokozódik. Ezzel a kísérletes tanulmánnyal is jó egyezéseket értünk el. Az előbbieken részletezett számításokban azt is sikerült szerkezeti alapon alátámasztanunk, hogy bizonyos célpontok esetében a vízmolekulák csaknem olyan fontos szerepet játszanak a ligandumok kötődésében, mint maga a célpont.

### 3. Kötődési affinitás számítása molekulamechanikai szinten

Gyógyszertervezéskor nemcsak a célpont-ligandum komplex szerkezeti ismerete, hanem a molekulák közti kölcsönhatás erőssége (kötődési affinitás) is fontos. Egyre több számítógépes módszert fejlesztenek, hogy a célpont-ligandum kötődés termodinamikai jellemzőit, vagyis a kötődési affinitást prediktálják. A kötődési reakció szabadentalpiaváltozása ( $\Delta G_b$ ) jól ismert kapcsolatban (1. egyenlet) áll annak entalpiaváltozásával ( $\Delta H_b$ ) és entrópiaváltozásával ( $\Delta S_b$ ), ahol  $T$  a termodinamikai hőmérséklet.

$$\Delta G_b = \Delta H_b - T\Delta S_b \quad (1)$$

Kísérletesen általában a kötődési reakció egyensúlyi állapotját határozzák meg, amelyből a  $\Delta G_b$  értéke könnyen számolható. A ligandum kötődésekor új határfelület képződik a két molekula között, mely során mind a célpont, mind a ligandum részben dehidratálódik, új kötések alakulnak ki köztük, valamint új hidratációs burok képződik a kialakult komplex körül. E kötésrendszerek átalakulását írja le a  $\Delta H_b$  komponens. A  $\Delta S_b$  a reakcióban részt vevő molekulák translációs, rotációs, stb. szabadsági fokaihoz rendelhető molekuláris rendezetlenség változását számszerűsíti. A gyógyszertervezés során mindhárom termodinamikai potenciálfüggvény változását érdemes nyomon követni, ezek együttesen jelentik a ligandum termodinamikai profilját (ujjlenyomatát)<sup>14–16</sup>.

Molekulamechanikai számításokkor erőtereket (force field) és kereső algoritmusokat alkalmazunk. Az erőter egy potenciálisenergia-függvény, mely elektronszerkezet nélküli, megfelelően paraméterezett atomtípusokból épül fel és a kovalens kötésben részt vevő atomok közti kötő (bonding) és nem-kötő (nonbonding) kölcsönhatások összegét határozza meg. Az erőtereket megkülönböztethetjük az alapján, hogy milyen típusú molekulákra/rendszerekre optimalizálták<sup>17–19</sup>. A kereső algoritmusok feladata, hogy megtalálják a potenciális energiafüggvény minimumait, vagyis azokat az optimális szerkezeti konformációkat, melyeknél a célpont-ligandum komplex energiája a legkisebb. A gyógyszertervezésben a vezérmolekula optimalizálásához a molekuláris dokkoló számításokat alkalmazzák leginkább, melyekkel nagyszámú kismolekula kötődését lehet gyorsan és hatékonyan tesztelni. A dokkoló programok<sup>20–23</sup> esetében a sztochasztikus Monte-Carlo módszereket<sup>24</sup> és a genetikai algoritmusokat<sup>25,26</sup> részesítik előnyben, melyek egy egyszerűsített potenciálisenergia-függvényen, ún. pontozó (scoring) függvényen keresnek minimumokat. A scoring függvények egyrészt segítenek megtalálni a ligandum optimális kötési módját, másrészt a kötőzsebbe dokkolt különböző ligandumok rangsorolását is a számított  $\Delta G_b$  értékek alapján tehetjük meg.

A termodinamikai számítások esetén a célpont-ligandum kötés energiájának meghatározásakor a hidratáció szerepe kulcsfontosságú, így a gyors dokkoló eljárások korlátja az implicit vízmodellek alkalmazása illetve a vízmodellek

teljes hiánya. A dokkoló programok scoring függvényei a nagyobb, sok torzióval rendelkező, peptidszerű ligandumok esetében irreális, pozitív kötési energiát eredményeznek. Ennek hátterében egyrészt a ligandum konformációs entrópiikus hozzájárulásának számítása, másrészt a ligandum-implicit bulk vízmolekulák alkotta H-hidak energetikai hozzájárulása áll. Előbbit a ligandumban lévő belső torziós szabadsági fokainak befagyásából, utóbbit pedig a ligandumban lévő H-kötésre alkalmas atomok konstanssá történő szorzatából számítják. Mindezekből látható, hogy a dokkoló programok scoring függvényei leginkább kis molekulájú ligandum termodinamikai paramétereinek becslésére alkalmasak, illetve nagyobb ligandumok esetén nem vagy részleges módosítások szükségesek, ahogy azt a több tanulmányunkban is megtettük<sup>27–30</sup>. Fontos azonban kiemelni, hogy a termodinamikai paraméterek pontatlansága ellenére, a molekuláris dokkolás ma is gyakran alkalmazott módszer a gyógyszertervezésben, ha nagy számú, kis molekulát kell akár szerkezeti, akár energetikai szempontból összehasonlítani.

Pontosabb termodinamikai paramétereket kaphatunk, ha explicit vízmodellek alkalmazásával a vízmolekulák irányított H-kötéseiből adódó termodinamikai hozzájárulásokat is tudjuk valószerűen számolni. Ebben az esetben a molekulamechanikai módszerek közül a determinisztikus molekula dinamikai (MD) számításokat kell alkalmazni. Ilyenkor, akár magának az oldószernek a célpont-ligandum komplex kötődéséhez történő hozzájárulása is pontosan számítható. Ciklodextrinokkal végzett számítások során például három féle, oldószerrel alkotott intermolekuláris kölcsönhatás (ciklodextrin-víz, ligandum-víz, víz-víz) entalpiikus hozzájárulását különítettük el<sup>31</sup>, melyek számértékileg összemérhetők a ciklodextrin-gyógyszer interakció entalpiikus hozzájárulásával. A vízhez köthető entrópiikus hozzájárulás nagyságrendileg összemérhető a  $\Delta G_b$ -vel, így ez is megerősíti az explicit vízmodell használatának szükségességét a  $\Delta G_b$  számítások pontossága szempontjából. A kapott eredmények felhasználásával a ciklodextrin-alapú nanoszerkezetek felépülésének termodinamikai alapjait is sikeresen tanulmányoztuk. A ciklodextrin dimerek alapvető építőkövei molekuláris nyakláncoknak illetve nanocsöveknek, melyek felépülését a ciklodextrinnel kölcsönható, a monomerek között hidaló funkciót betöltő, kisebb ligandumok elősegíthetik<sup>31</sup>. Az így léterjött molekuláris rendszerek termodinamikai változásai MD alapú számításokkal nyomonkövethetők, prediktálhatók<sup>32</sup>.

### 4. A kötődési affinitás számítása kvantummechanikai szinten

A célpont-ligandum kötés molekulamechanikai leírásának korlátai elsősorban abból fakadnak, hogy a partnerek közötti kölcsönhatásban kulcsszerepet játszó elektronokat (explicit módon) nem tudja kezelni. Mivel a kvantummechanika (QM) természeténél fogva az elektronpályák leírásával foglalkozik, ezért az elektronikus jellegű nemkovalens kölcsönhatások kezelésére elméleti szempontból

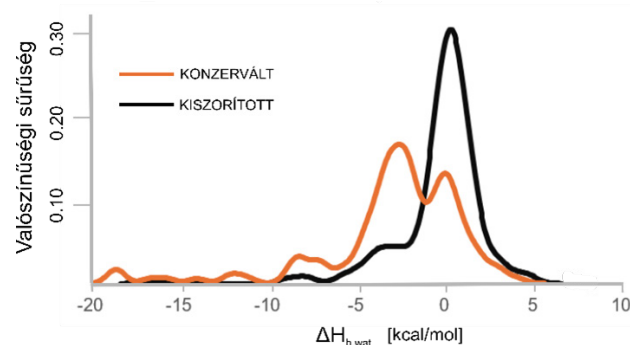
a legideálisabb megközelítésnek tekinthető. A kölcsönhatás pontos leírása mellett megemlítendő, hogy módszerei nem igényelnek erőtér parametrizálást<sup>33</sup>, azonban az elterjedt formalizmusok (Hartree-Fock, sűrűségfüggvény elmélet) számításigénye jelentős. Az utóbbi évtizedekben a számítógépek teljesítményének folyamatos növekedése lehetővé tette a kvantummechanikai módszerek elterjedését a gyógyszertervezési eljárásokban<sup>34</sup> különösképp a célpont-ligandum kölcsönhatás számításában<sup>35</sup>. Azonban a biomolekuláris rendszerek nagy mérete továbbra is hátráltató tényező a módszerek rutinszerű alkalmazásában. Ennek áthidalására gyorsabb számításokat eredményeznek a szemi-empirikus módszerek<sup>36</sup>, amelyek a legnagyobb számításigényű integrálok értékeit magasabb szintű QM módszerek értékeivel vagy közelítő formulákkal helyettesítik, továbbá a számítások jobb skálázhatóságára is kínálnak megoldást<sup>37</sup>. A népszerű parametrizálások között megemlítendő a PM6-D3H4(X)<sup>38,39</sup>, PM7<sup>40</sup>, valamint PM7-ORG<sup>41</sup> módszerek.

A számítások ideje tovább csökkenthető, ha csak a ligandumot és közvetlen környezetét kezeljük QM módszerekkel. Ez történhet a ligandum és kölcsönható célpont aminosav egységek komplexből történő kivágásával (fragmentáció)<sup>42</sup>, valamint QM/MM módszerekkel<sup>43</sup>, amelyek során a távolabbi célpont részeket MM szinten számítjuk. A QM számítások a célpont-ligandum komplex, a különálló célpont és ligandum szerkezeteken történnek és úgynevezett végpont módszer szerint becsülik a kölcsönhatás entalpiikus részét ( $\Delta H_b$ ). Az egyes módszerek az entalpiikus QM hozzájárulás mellett egyéb szolvatációs és entrópiikus tagokat alkalmaznak formuláikban a kötődési szabadentalpia ( $\Delta G_b$ ) pontosabb leírására. Elterjedt kombináció valamely szemi-empirikus módszer COSMO(2) implicit szolvatációs modellel<sup>44,45</sup> és a komplex fragmentálásával kiegészítve<sup>46-48</sup>. Cavasotto és mtsai. például hagyományos dokkoló programokat jelentősen meghaladó dúsulási tényezőket ért el 10 célpontra kiterjedő szűrési alkalmazásban PM7/COSMO és ligandum rotációs entrópiát figyelembe vevő protokolljával<sup>48</sup>. Pecina és mtsai. módszere PM6-D3H4X/COSMO2 szintű entalpiikus, valamint konformációs, protontranszfer és rotációs entrópia tagokkal kapott jó átlagos korrelációkat ( $R^2=0.69$ ) kísérletes  $\Delta G_b$  adatokkal és bizonyult pontosabbnak megannyi klasszikus pontozó függvényénél diverz célpont-ligandum adatkészleten<sup>49</sup>.

Habár a környező oldószerközeg hatásait az implicit modellek sikeresen kezelik, a célpont-ligandum rendszerekben sokszor előfordulnak olyan specifikus vízmolekulák, amelyek kölcsönhatást közvetítő szerepet látnak el a partnerek között és explicit modellezésük nélkülözhetetlen. A célpont-ligandum határfelület vizei prediktálhatók MD-alapú klaszterező módszerekkel, mint például a csoportunk által fejlesztett MobyWat program<sup>10,11</sup>, amellyel különböző méretű hidratációs héjak hatását vizsgáltuk a kötődési entalpiaváltozásra PM7/COSMO kombinációval egybekötve<sup>50</sup>. Legutóbbi munkánkban<sup>51</sup> PM7/COSMO számításokat végeztünk prediktált explicit vizekkel, amelyből származó  $\Delta H_b$ -t egy ligandum alapú deskriptorral egészítettük ki.

QMH-L módszerünk jó korrelációkat ért el kísérletes  $\Delta H_b$  és  $\Delta G_b$  értékekkel szemben egyaránt ( $R^2=0.93$  és  $0.60$ ). A tanulmány érdekessége, hogy a QM minimalizálást jóval gyorsabb ISCF számításra cserélve a módszer áteresztőképessége nagyságrendekkel megnövelhető megőrizve pontosságát. Továbbá a vizsgált ligandumok mérettartományát különösen szélesnek választottuk ( $120 < M_r < 3300$ ), jócskán meghaladva a területen jellemző értékeket ( $M_r < 1000$ ).

Egy másik tanulmányunkban megmutattuk, hogy az egyedi vízmolekulákra számított kötési entalpiaváltozás ( $\Delta H_{b,wat}$ ) értékek alapján a konzervált és a kiszorított/távozó vizek a célpont-ligandum komplexekben elkülöníthetők. A módszert több mint 1000 egyedi vízpozícióra kalibráltuk és teszteltük. A szabad és ligandumhoz kötött célpontok teljes hidratációs struktúrából kiindulva QM számítások segítségével kiszámítottuk az egyes vízmolekulák  $\Delta H_{b,wat}$  értékeit. A statisztikai értékelés kimutatta, hogy a pontszámok alapján meg lehet különböztetni egyes konzervált és a kiszorított/távozó vízmolekulákat<sup>52</sup> (**3. ábra**), ugyanakkor marad egy átmeneti populáció is, ahol termodinamikai alapon nehéz döntést hozni. (**3. ábra**)



**3. ábra.** A konzervált és kiszorított vízmolekulák  $\Delta H_{b,wat}$  értékeinek eloszlásábrái. A  $\Delta H_{b,wat}$  görbéket a QM-számításokon alapuló adatok felhasználásával készülték. Az ábra korábbi tanulmányunkból [52] került felhasználásra az American Chemical Society engedélyével.

Pontosságuknak és növekvő gyorsaságuknak köszönhetően a QM módszerek fejlesztése és alkalmazása gyógyszertervezési eljárásokban továbbra is aktív területnek ígérkezik a területen dolgozó kutatók körében, amelyet több közelmúltbeli összefoglaló közlemény is alátámaszt<sup>53,54</sup>.

## 5. Összefoglalás

A hidratáció szerepét sokáig elhanyagolták a gyógyszertervezés során és jórészt a célmolekula és a ligandum között létrejövő kölcsönhatások optimalizálására törekedtek. Az utóbbi évtizedekben nyilvánvalóvá vált, hogy ez az optimalizációs folyamat nem tud hatékonyan működni az egyedi vízmolekulák szerepének figyelembe vétele nélkül. E dolgozatunkban gyors áttekintést adtunk a hidratáció szerepéről, valamint a tervezés során ennek kapcsán felmerülő gyakorlati problémák megoldásáról szerkezeti és energetikai szinten egyaránt. A célpont-ligandum kötési affinitások

számítása kapcsán a széleskörűen alkalmazott molekulamechanikai eljárások mellett kitértünk a legmodernebb kvantummechanikai megközelítésekre is.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatás a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, valamint az az Európai Unió (RRF-2.3.1-21-2022-00015 számú project) támogatásával készült. Köszönjük a Digitális Kormányzati Fejlesztés és Projektmenedzsment Kft.-nek, hogy hozzáférést biztosított számunkra a magyarországi Komondor HPC szuperszámítógép-infrastruktúrához.

### Hivatkozások

- Zsidó, B. Z.; Hetényi, C. The Role of Water in Ligand Binding. *Current Opinion in Structural Biology* **2021**, *67*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.08.002>
- Zsidó, B. Z.; Bayarsaikhan, B.; Börzsei, R.; Szél, V.; Mohos, V.; Hetényi, C. The Advances and Limitations of the Determination and Applications of Water Structure in Molecular Engineering. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (14), 11784. <https://doi.org/10.3390/ijms241411784>
- Zsidó, B. Z.; Hetényi, C. Water in Drug Design: Pitfalls and Good Practices. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2025**, *20* (6), 745–764. <https://doi.org/10.1080/17460441.2025.2497912>
- Finney, J. L.; Eley, D. D.; Richards, R. E.; Franks, F. The Organization and Function of Water in Protein Crystals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **1997**, *278* (959), 3–32. <https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0029>
- Halle, B. Protein Hydration Dynamics in Solution: A Critical Survey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2004**, *359* (1448), 1207–1328. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1499>
- Halle, B. Biomolecular Cryocrystallography: Structural Changes during Flash-Cooling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (14), 4793–4798. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308315101>
- Levitt, M.; Park, B. H. Water: Now You See It, Now You Don't. *Structure* **1993**, *1* (4), 223–226. [https://doi.org/10.1016/0969-2126\(93\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0969-2126(93)90011-5)
- Tanaka, T.; Ikeya, T.; Kamoshida, H.; Suemoto, Y.; Mishima, M.; Shirakawa, M.; Güntert, P.; Ito, Y. High-Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (22), 7284–7288. <https://doi.org/10.1002/anie.201900840>
- Kono, F.; Kurihara, K.; Tamada, T. Current Status of Neutron Crystallography in Structural Biology. *Biophys Physicobiol* **2022**, *19*, 1–10. <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v19.0009>
- Jeszenői, N.; Horváth, I.; Bálint, M.; van der Spoel, D.; Hetényi, C. Mobility-Based Prediction of Hydration Structures of Protein Surfaces. *Bioinformatics* **2015**, *31* (12), 1959–1965. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv093>
- 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* (1), 148–158. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00638>
- Zsidó, B. Z.; Börzsei, R.; Szél, V.; Hetényi, C. Determination of Ligand Binding Modes in Hydrated Viral Ion Channels to Foster Drug Design and Repositioning. *J Chem Inf Model* **2021**, *61* (8), 4011–4022. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00488>
- Mandala, V. S.; McKay, M. J.; Shcherbakov, A. A.; Dregni, A. J.; Kolocouris, A.; Hong, M. Structure and Drug Binding of the SARS-CoV-2 Envelope Protein Transmembrane Domain in Lipid Bilayers. *Nat Struct Mol Biol* **2020**, *27* (12), 1202–1208. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00536-8>
- Klebe, G. Applying Thermodynamic Profiling in Lead Finding and Optimization. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (2), 95–110. <https://doi.org/10.1038/nrd4486>
- Geschwindner, S.; Ulander, J.; Johansson, P. Ligand Binding Thermodynamics in Drug Discovery: Still a Hot Tip? *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (16), 6321–6335. <https://doi.org/10.1021/jm501511f>
- Ferenczy, G. G.; Keserű, G. M. Thermodynamics Guided Lead Discovery and Optimization. *Drug Discovery Today* **2010**, *15* (21–22), 919–932. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.013>
- Xu, P.; Guidez, E. B.; Bertoni, C.; Gordon, M. S. Perspective: Ab Initio Force Field Methods Derived from Quantum Mechanics. *The Journal of Chemical Physics* **2018**, *148* (9), 090901. <https://doi.org/10.1063/1.5009551>
- Ponder, J. W.; Case, D. A. Force Fields for Protein Simulations. *Adv Protein Chem* **2003**, *66*, 27–85. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(03\)66002-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(03)66002-x)
- Vanommeslaeghe, K.; Guvench, O.; Jr, A. D. M. Molecular Mechanics. *Current Pharmaceutical Design* **20** (20), 3281–3292. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990600>
- Salmaso, V.; Moro, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (11), 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Pinzi, L.; Rastelli, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2003**, *32*, 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>
- Deák I. *Véletlenszám-generátorok és alkalmazásuk*; Akadémiai Kiadó: Budapest, 1986.
- Holland, J. H. Outline for a Logical Theory of Adaptive Systems. *J. ACM* **1962**, *9* (3), 297–314. <https://doi.org/10.1145/321127.321128>
- Goldberg, D. E.; Holland, J. H. Genetic Algorithms and Machine Learning. *Machine Learning* **1988**, *3* (2), 95–99. <https://doi.org/10.1023/A:1022602019183>
- Fodor, K.; Harmat, V.; Hetényi, C.; Kardos, J.; Antal, J.; Perczel, A.; Patthy, A.; Katona, G.; Gráf, L. Extended Intermolecular Interactions in a Serine Protease-Canonical Inhibitor Complex Account for Strong and Highly Specific Inhibition. *J Mol Biol* **2005**, *350* (1), 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.039>

28. Hetényi, C.; Paragi, G.; Maran, U.; Timár, Z.; Karelson, M.; Penke, B. Combination of a Modified Scoring Function with Two-Dimensional Descriptors for Calculation of Binding Affinities of Bulky, Flexible Ligands to Proteins. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (4), 1233–1239. <https://doi.org/10.1021/ja055804z>
29. Balogh, B.; Hetényi, C.; Keserű, M. G.; Mátyus, P. Structure-Based Calculation of Binding Affinities of A2A-Adrenoceptor Agonists. *ChemMedChem* **2007**, *2* (6), 801–805. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600251>
30. Hetényi, C.; Maran, U.; Karelson, M. A Comprehensive Docking Study on the Selectivity of Binding of Aromatic Compounds to Proteins. *J Chem Inf Comput Sci* **2003**, *43* (5), 1576–1583. <https://doi.org/10.1021/ci034052u>
31. Zhang, H.; Tan, T.; Hetényi, C.; van der Spoel, D. Quantification of Solvent Contribution to the Stability of Noncovalent Complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9* (10), 4542–4551. <https://doi.org/10.1021/ct400404q>
32. Zhang, H.; Tan, T.; Hetényi, C.; Lv, Y.; van der Spoel, D. Cooperative Binding of Cyclodextrin Dimers to Isoflavone Analogues Elucidated by Free Energy Calculations. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **2014**, *118* (13), 7163–7173. <https://doi.org/10.1021/jp412041d>
33. Söderhjelm, P.; Genheden, S.; Ryde, U. Quantum Mechanics in Structure-Based Ligand Design. In *Protein-Ligand Interactions*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012; pp 121–143. <https://doi.org/10.1002/9783527645947.ch7>
34. Raha, K.; Peters, M. B.; Wang, B.; Yu, N.; Wollacott, A. M.; Westerhoff, L. M.; Merz, K. M. The Role of Quantum Mechanics in Structure-Based Drug Design. *Drug Discovery Today* **2007**, *12* (17), 725–731. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.006>
35. Ryde, U.; Söderhjelm, P. Ligand-Binding Affinity Estimates Supported by Quantum-Mechanical Methods. *Chem Rev* **2016**, *116* (9), 5520–5566. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00630>
36. Maia, J. D. C.; Urquiza Carvalho, G. A.; Manguiera, C. P. Jr.; Santana, S. R.; Cabral, L. A. F.; Rocha, G. B. GPU Linear Algebra Libraries and GPGPU Programming for Accelerating MOPAC Semiempirical Quantum Chemistry Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3072–3081. <https://doi.org/10.1021/ct3004645>
37. Stewart, J. J. P. Application of Localized Molecular Orbitals to the Solution of Semiempirical Self-Consistent Field Equations. *International Journal of Quantum Chemistry* **1996**, *58* (2), 133–146. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-461X\(1996\)58:2<133::AID-QUA2>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-461X(1996)58:2<133::AID-QUA2>3.0.CO;2-Z)
38. Řezáč, J.; Hobza, P. A Halogen-Bonding Correction for the Semiempirical PM6 Method. *Chemical Physics Letters* **2011**, *506* (4), 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.03.009>
39. Řezáč, J.; Hobza, P. Advanced Corrections of Hydrogen Bonding and Dispersion for Semiempirical Quantum Mechanical Methods. *J Chem Theory Comput* **2012**, *8* (1), 141–151. <https://doi.org/10.1021/ct200751e>
40. 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), 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>
41. Stewart, J. J. P.; Stewart, A. C. A Semiempirical Method Optimized for Modeling Proteins. *J Mol Model* **2023**, *29* (9), 284. <https://doi.org/10.1007/s00894-023-05695-1>
42. Himo, F. Quantum Chemical Modeling of Enzyme Active Sites and Reaction Mechanisms. *Theor Chem Acc* **2006**, *116* (1), 232–240. <https://doi.org/10.1007/s00214-005-0012-1>
43. Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (7), 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>
44. 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**, No. 5, 799–805. <https://doi.org/10.1039/P29930000799>
45. Kříž, K.; Řezáč, J. Reparametrization of the COSMO Solvent Model for Semiempirical Methods PM6 and PM7. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59* (1), 229–235. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00681>
46. Nikitina, E.; Sulimov, V.; Zayets, V.; Zaitseva, N. Semiempirical Calculations of Binding Enthalpy for Protein–Ligand Complexes. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1002/qua.10778>
47. Pecina, A.; Meier, R.; Fanfrlík, J.; Lepšík, M.; Řezáč, J.; Hobza, P.; Baldauf, C. The SQM/COSMO Filter: Reliable Native Pose Identification Based on the Quantum-Mechanical Description of Protein–Ligand Interactions and Implicit COSMO Solvation. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (16), 3312–3315. <https://doi.org/10.1039/C5CC09499B>
48. Cavasotto, C. N.; Aucaer, M. G. High-Throughput Docking Using Quantum Mechanical Scoring. *Front. Chem.* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00246>
49. Pecina, A.; Fanfrlík, J.; Lepšík, M.; Řezáč, J. SQM2.20: Semiempirical Quantum-Mechanical Scoring Function Yields DFT-Quality Protein–Ligand Binding Affinity Predictions in Minutes. *Nat Commun* **2024**, *15* (1), 1127. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45431-8>
50. Horváth, I.; Jeszenői, N.; Bálint, M.; Paragi, G.; Hetényi, C. 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* (18), E4384. <https://doi.org/10.3390/ijms20184384>
51. Szél, V.; Zsidó, B. Z.; Jeszenői, N.; Hetényi, C. Target–Ligand Binding Affinity from Single Point Enthalpy Calculation and Elemental Composition. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, *25* (46), 31714–31725. <https://doi.org/10.1039/D3CP04483A>
52. Szél, V.; Zsidó, B. Z.; Hetényi, C. Enthalpic Classification of Water Molecules in Target–Ligand Binding. *J. Chem. Inf. Model.* **2024**, *64* (16), 6583–6595. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00794>
53. Kairys, V.; Baranauskienė, L.; Kazlauskienė, M.; Zubrienė, A.; Petrauskas, V.; Matulis, D.; Kazlauskas, E. Recent Advances in Computational and Experimental Protein–Ligand Affinity Determination Techniques. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2024**, *19* (6), 649–670. <https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2349169>
54. Ginex, T.; Vázquez, J.; Estarellas, C.; Luque, F. J. Quantum Mechanical-Based Strategies in Drug Discovery: Finding the Pace to New Challenges in Drug Design. *Current Opinion in Structural Biology* **2024**, *87*, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2024.102870>

## Hydration in drug design

A structural and thermodynamic description of target-ligand interactions is a crucial aspect in drug design. In addition, water molecules in different hydration shells (bulk, surface, interface, buried) have various structural and energetic contributions in the complex. In this paper, we provide an overview of the calculation (prediction) of the structural and thermodynamic role of water molecules during ligand binding. Accurate determination of the spatial water positions in a target-ligand complex is not a trivial task. Experimental approaches often cannot provide void-free hydrated (complete) structures. Therefore, theoretical methods have been developed to complement experimental methods for calculating hydration problems in target-ligand complexes. Using the explicit water models is a good alternative to identify the role of each water molecule in ligand binding. For this purpose, molecular dynamics (MD)-based computational tools like MobyWat were introduced.

During computational docking of a ligand to the target, distinguishing between the conserved and replaced waters is also challenging. Protocols like HydroDock can answer these challenges.

Besides knowing the structure of the target-ligand complex, it is also important to calculate the target-ligand binding affinity (free energy of binding in terms of thermodynamics). In thermodynamic calculations, hydration also plays a key role. In drug design, molecular docking of several thousand small molecules is commonly used to optimize the lead molecule. The rapid docking methods with implicit or without any water models lead to inaccurate results. Furthermore, especially in the case of larger, highly flexible, peptide-like ligands, the scoring functions of docking programs result in unrealistic binding affinities. If explicit water models are used in combination with MD calculations in which the contribution of the solvent itself to the target-ligand complex binding is also considered, more accurate thermodynamic quantities can be obtained. For example, in calculations performed with cyclodextrins, we separated the enthalpic contributions of three types of intermolecular interactions formed with the solvent (cyclodextrin-water, ligand-water, water-water), which are numerically comparable to the enthalpic contribution of the cyclodextrin-drug interaction. The entropic contribution associated with

water is comparable in magnitude to the binding free energy, thus confirming the necessity of using an explicit water model for the accuracy of thermodynamics calculations. Using the results obtained, we also successfully studied the thermodynamic basis of the formation of cyclodextrin-based nanostructures.

As electronic contributions play a key role in the interaction between the partners, quantum mechanics (QM) can be considered the most precise approach from a theoretical point of view. Due to the continuous increase in computer performance, QM methods in drug design have recently gained more attention, especially in the calculation of target-ligand interactions. However, the large size of biomolecular systems still hinders the routine application of these methods. To overcome this, semi-empirical QM-based methods have been recently introduced for target-ligand calculations, mostly with PM7-like parametrization.

Although implicit water models (like COSMO) successfully handle the effects of the surrounding solvent medium in QM, target-ligand systems often contain specific water molecules that mediate interactions between partners, and explicit modeling of these molecules is essential. In our latest work, we performed PM7/COSMO calculations with explicit waters predicted by MobyWat. Our QMH-L method achieved good correlations in a wide size range for the ligands (up to an MW of 3300) with experimental thermodynamics values. Fast ISCF calculations allow the use of QMH-L in a high-throughput manner.

The role of hydration has long been neglected in drug design, and most efforts have been made to optimize the interactions between the target molecule and the ligand. In recent decades, it has become obvious that this optimization process cannot function effectively without taking into account the role of individual water molecules. In this paper, we have given a quick overview of the role of hydration and the solution of practical problems arising in this regard during design, both at the structural and energetic levels. In addition to the widely used molecular mechanics methods, we have also discussed the most modern quantum mechanical approaches in calculating target-ligand binding affinities.