

Pro gradu -tutkielma

**Uusia fosfodiesteraasi 10A-estäjiä virtuaalisen
lääkeaineseulonnan avulla**

Elmeri Jokinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

29.08.2018

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia

Elmeri Jokinen: Uusia fosfodiesteriäsi 10A-estäjiä virtuaalisen
lääkeaineseulonnan avulla
Pro gradu -tutkielma: 42 s., 1 liitettä (1 s.)
Työn ohjaajat: Prof. Olli Pentikäinen ja FT, dosentti Pekka Postila
Tarkastajat: Prof. Jari Yläne ja FT Sanna Niinivehmas
Elokuu 2018

Hakusanat: Huntingtonin tauti, rationaalinen lääkeainesuunnittelu, skitsofrenia

Virtuaaliseulonnassa uusia potentiaalisia lääkkeitä pyritään tunnistamaan hyödyntämällä tietoa sairauteen liittyvän proteiinin rakenteesta ja ligandeista. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli käyttää virtuaaliseulontaa uusien fosfodiesteriäsi 10A (*engl. phosphodiesterase 10A, PDE10A*) - estäjien löytämiseksi. PDE10A toimii aivojen motorisia ja kognitiivisia toimintoja hallinnoivilla alueilla ja se on yhdistetty esimerkiksi skitsofrenian ja Huntingtonin taudin kehittymiseen. Työssä luotiin ligandin muodon ja elektrostaattiset ominaisuudet kuvaavia sitoutumismalleja sekä ligandipohjaisia, kvantitatiiviseen rakenneaktiivisuussuhteeseen perustuvia malleja. Malleilla seulottiin n. 140 000 lääkkeenkaltaista molekyyliä sisältänyt tietokanta. Lupaavimpien molekyylien sitoutumiskonformaatioiden tarkempaan arviointiin käytettiin telakointia ja sitoutumisenergiälaskentaa. Parhaan ennusteen saaneet molekyylit testattiin kokeellisesti ja näistä kolmelle määritettiin mikromolaarinen IC₅₀-arvo. Uusien PDE10A-estäjien aktiivisuuden ennustettiin perustuvan erityisesti Q716- ja Y683-aminohappojen kanssa muodostuneisiin vetysidoksiin. Tutkimuksen tulokset tarjoavat lähtökohdan uusien PDE10A:han kohdistuvien lääkeainemolekyylien kehittämiseen. Luodut sitoutumisennusteet mahdollistavat löydettyjen estäjämolekyylien sitoutumisominaisuuksien parantamisen hyödyntämällä kattavammin PDE10A:n sitoutumistaskussa havaitut potentiaaliset vuorovaikutuskohdat.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science
Cell and molecular biology

Elmeri Jokinen: Novel phosphodiesterase 10A inhibitors discovered by
virtual screening
MSc thesis: 42 p., 1 appendices (1 p.)
Supervisors: Prof. Olli Pentikäinen and PhD, Adj. Prof. Pekka Postila
Inspectors: Prof. Jari Yläanne and PhD Sanna Niinivehmas
August 2018

Key words: Huntington disease, rational drug design, schizophrenia

In virtual screening, information about the structure and ligands of a disease-related protein is used to identify new potential drug candidates. The aim of this study was to utilize virtual screening to discover novel phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibitors. PDE10A operates in regions of brain related to motoric and cognitive functions and it has been linked to several diseases, such as schizophrenia and Huntington's disease. In this study, models based on ligand shape and electrostatics and on ligand-based quantitative structure-activity relationship were created. The models were used to virtually screen a database of 140 000 drug-like molecules. Binding conformations of the most promising drug candidates were evaluated more precisely by using molecular docking and binding energy calculations. The best candidates were tested experimentally. Three new PDE10A inhibitors with micromolar IC_{50} -values were discovered. Activity of the new inhibitors was predicted to be based especially on hydrogen bonding with the Q716 and Y683 residues in the PDE10A binding cavity. The results of this study provide a starting point for development of new potent drug molecules for PDE10A. The binding predictions created in this study enable improvement of the binding properties of the discovered inhibitors by a more comprehensive utilization of the potential interaction sites observed in the PDE10A binding cavity.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	1
1.1 Syklisten nukleotidien fosfodiesterasit.....	1
1.2 Fosfodiesterasii 10A lääkeainekehityksen kohteena.....	4
1.3 Virtuaalinen lääkeaineseulonta	6
1.4 Tutkimuksen tavoitteet	8
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	10
2.1 Aineiston valmistelu.....	10
2.1.1 Ligandien valmistelu.....	10
2.1.2 Proteiimirakenteiden valmistelu	11
2.2 Virtuaaliseulonta.....	12
2.2.1 Farmakoforimallinnus.....	12
2.2.2 PANTHER-mallinnus ja seulonta.....	13
2.2.3 Kvantitatiivisen rakenne-aktiivisuussuhteen mallinnus	14
2.3 Sitoutumisennusteet	15
2.3.1 Telakointi.....	15
2.3.2 Energiaminimisaatio ja sitoutumisenergiälaskenta.....	16
2.4 Lääkeainekandidaattien valinta kokeellisiin testeihin	16
2.5 Kokeellinen testaus.....	17
2.6 Kuvat.....	18
3 TULOKSET	19
3.1 Farmakofori- ja PANTHER-seulonnalla 13 uutta potentiaalista PDE10A-estäjää.....	19
3.1.1 Aktiivisten PDE10A-estäjien päällekkäinasettelulla kolme rakenne-aktiivisuussuhdetta kuvannutta mallia.....	21

3.1.2 Lupaavimmat PDE10A-estäjäkandidaatit.....	24
3.2 Kolme uutta aktiivista PDE10A-estäjämolekyyliä.....	26
4 TULOSTEN TARKASTELU	31
5 JOHTOPÄÄTÖKSET	34
KIITOKSET	35
KIRJALLISUUS	36
LIITE 1. PDE10A-estäjäkandidaattien kokeellisten mittausten annosvastekäyrät .	43

SANASTO JA LYHENTEET

SANASTO

IC₅₀ Estäjämolekyylin konsentraatio, jossa entsyymin aktiivisuus puolittuu

pIC₅₀ IC₅₀-arvon negatiivinen kymmenkantainen logaritmi

LYHENTEET

cAMP Syklinen adenosiinimonofosfaatti (engl. *Cyclic adenosine monophosphate*)

cGMP Syklinen guanosiinimonofosfaatti (engl. *Cyclic guanosine monophosphate*)

CN Syklinen nukleotidi (engl. *Cyclic nucleotide*)

PDE Fosfodiesteraasi (engl. *Phosphodiesterase*)

PDB Protein Data Bank

HTS Suurikapasiteettinen seulonta (engl. *High-throughput screening*)

QSAR/FQSAR Kvantitatiivinen rakenne-aktiivisuussuhde (engl. *Quantitative structure-activity relationship*)

AAHHR Työssä käytetty farmakoforimalli

M-I/II/III Työssä käytetyt PANTHER-mallit I-III

MOL(1-13) Virtuaaliseulonnalla löydetyt molekyylit 1-13

RMSD Neliöllisen keskiarvon hajonta (engl. *Root mean square deviation*)

MM/GBSA engl. *Molecular mechanics/Generalized Born, surface area*

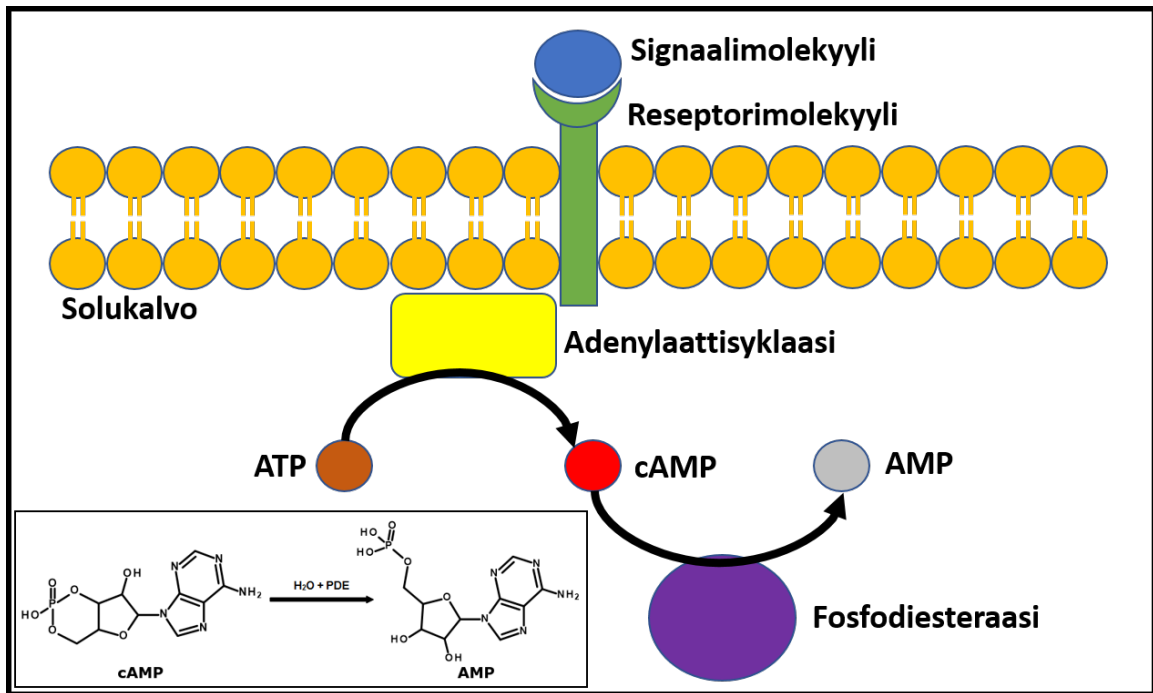
1 JOHDANTO

Syklinen adenosiinimonofosfaatti (engl. *Cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) ja syklinen guanosiinimonofosfaatti (engl. *Cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) ovat solunsisäisiä toisiolähettejä, joiden avulla välitetään useisiin elimistön toiminnan kannalta elintärkeisiin fysiologisiin prosesseihin liittyviä signaaleja. Syklisten nukleotidien (engl. *Cyclic nucleotide*, CN) välityksellä tapahtuva signaali on liitetty muun muassa solujen jakautumiseen ja erilaistumiseen, geeniekspressioon, tulehdusreaktion syntymiseen, apoptoosiin, neuroplastisiin prosesseihin sekä lukuisien metaboliatuotteiden synteisiin ja erityyseen kohdistuvaan säätelyyn (ks. katsausartikkeli Beavo ja Brunton 2002; ks. katsausartikkeli Maurice ym. 2014). Täten ei ole yllättävää, että cAMP- ja cGMP-välitteisen signaloinnin häiriöiden on osoitettu toimivan useiden erilaisten sairauksien taustatekijöinä (ks. katsausartikkeli Maurice ym. 2014). Tämä on tehnyt CN-välitteisillä signaalintireiteillä esiintyvistä toimijoista potentiaalisia kohteita lääkeainekehitykselle.

1.1 Syklisten nukleotidien fosfodiesterasit

Syklisten toisiolähettilien konsentraation säätely on tärkeä mekanismi signaloinnin tuottamien fysiologisten vasteiden hallinnassa. Merkittävä osa tästä säätelystä tapahtuu syklisten nukleotidien fosfodiesterasien (engl. *Cyclic nucleotide phosphodiesterase*, PDE) toimesta. Nisäkkäillä tavattavat PDE:t jaetaan 11 eri proteiiniperheeseen (PDE1-11), jotka eroavat toisistaan esimerkiksi primäärirakenteiltaan, substraattispesifisyyksiltään ja kudospaikoiltaan (ks. katsausartikkeli Maurice ym. 2014). PDE-perheet koostuvat jopa useista kymmenistä eri geenien koodaamista tai mRNA:n vaihtoehdoisella silmukoinnilla tuotetuista alatyypeistä. PDE:t koostuvat rakenteellisesti vaihtelevasta N-terminaalista säätelyalueesta sekä konservoituneesta C-terminaalista

katalyyttisestä domeenista. Yleisimmin säätelyalue rakentuu yhdestä tai kahdesta GAF-domeenista (PDE:t 2, 5, 6, 10 ja 11), jotka osallistuvat mm. proteiini-proteiini-vuorovaikutusten muodostumiseen sekä PDE:en katalyyttisen aktiivisuuden allosteriseen säätelyyn sitomalla cAMP:tä tai cGMP:tä (ks. katsausartikkeli Zoraghi ym. 2004; ks. katsausartikkeli Francis ym. 2011). PDE:iden substraattispesifisyys jakautuu seuraavasti: PDE:t 4, 7 ja 8 ovat cAMP-selektiivisiä, 5, 6 ja 9 ovat cGMP-selektiivisiä ja 1, 2, 3, 10 ja 11 kykenevät hydrolysoimaan molempia toisiolähetettä (ks. katsausartikkeli Maurice ym. 2014). PDE:iden katalysoimassa reaktiossa cAMP:n tai cGMP:n sisältämä 3'-5'-fosfodiesterisidos katkaistaan hydrolyysin avulla, jolloin molekyylin sykliisyys purkautuu ja tuotteena saadaan 5'-adenosiinimonofosfaattia tai 5'-guanosiinimonofosfaattia (Kuva 1). Reaktio johtaa siis CN-konsentraation laskuun, jonka seurauksena välitettävän signaalin voimakkuus vaimenee.



Kuva 1. Fosfodiesteraasien toiminta syklisten toisilähetien välityksellä tapahtuvan signaloinnin säätelyssä. cAMP:n tai cGMP:n välityksellä tapahtuvassa signaloinnissa solun ulkopuolisen signaalin (esim. hormoni tai hermosolujen välittäjäaine) ottaa tyypillisesti vastaan solukalvon G-proteiiniin (guaniinukleotidia sitova proteiini) liittyvä reseptori. Reseptorin aktivoituminen stimuloi solun sisäpuolelta, adenosiinitrifosfaatista (ATP) cAMP:tä tuottavaa adenyylaattisyklaasia tai guanosiinitrifosfaatista cGMP:tä tuottavaa guanyylaattisyklaasia. Sykliset toisilähetit välittävät vastaanotetun signaalin eteenpäin aktivoimalla erilaisia solun sisäisiä efektoreja, kuten proteiinkinaaseja ja ionikanavia, saaden aikaan vastaanotetun signaalin mukaisen fysiologisen vasteen. cAMP:n ja cGMP:n hydrolyysia katalysoivat PDE:t estävät toisilähetien vuorovaikutuksen mainittujen efektorien kanssa, vaimentaen signaalin voimakkuutta. PDE:en katalysoima cAMP:n hydrolyysireaktio on esitetty kuvan vasemmassa alareunassa. Muokattu artikkelista Chappie ym. 2012.

Kuten todettua, cAMP:n ja cGMP:n konsentraatiota säätelevät toimijat on jo pitkään nähty erittäin potentiaalisina kohteina uusien lääkeaineiden kehitykselle. Menestystä on saavutettu esimerkiksi astman ja diabeteksen hoidossa lääkkeillä, jotka aktivoivat cAMP:tä tuottavaa adenyylaattisyklaasia stimuloivia G-proteiiniin (guaniinukleotidia sitova proteiini) liittyviä reseptoreita (esim. salmeteroli, Tamm ym. 2012; eksendiini-4, Parkes ym. 2013). PDE:iden useissa tutkimuksissa osoitettu merkittävä rooli CN-konsentraation säätelyssä on johtanut myös PDE-estäjä-molekyylien kehitykseen CN-signaloinnin häiriöihin liitettyihin sairauksiin kohdistuviksi lääkeaineiksi (ks. katsausartikkeli Maurice ym. 2014). Tunnettuja PDE:ihin kohdistuvia lääkeaineita ovat esimerkiksi keuhkohtaumalääkkeenä

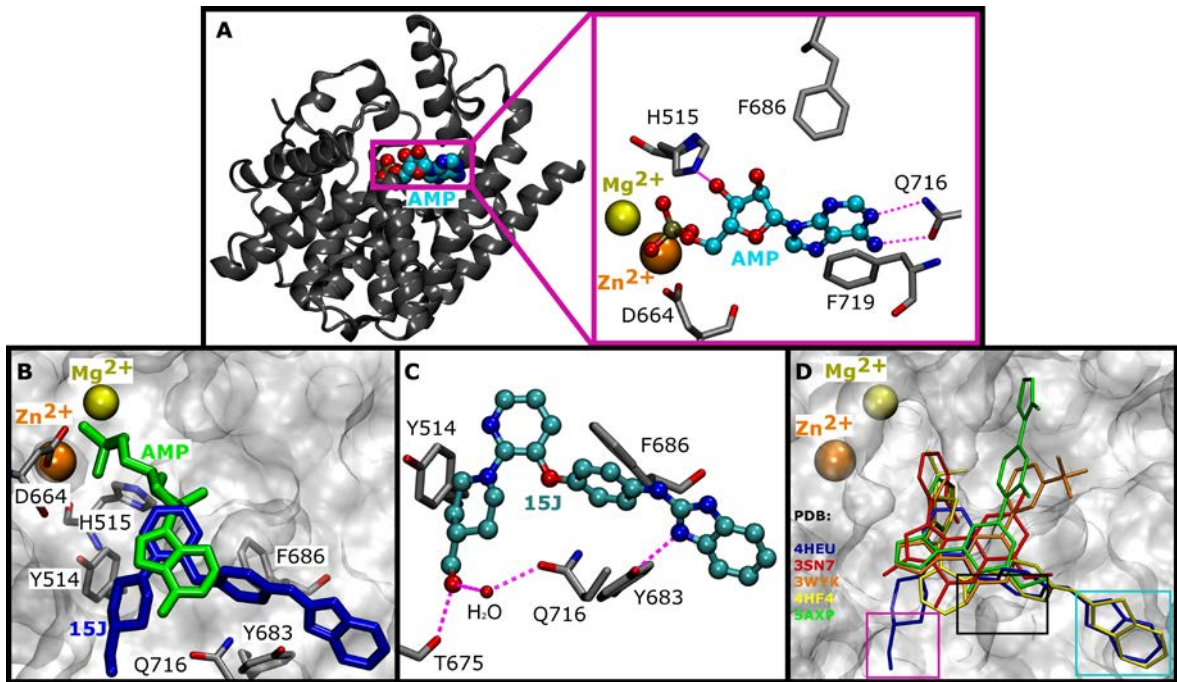
käytettävä PDE4-estäjä roflumilasti (kaupallinen nimi Daxas, Fabbri ym. 2009) sekä erektiohäiriön torjuntaan käytettävä PDE5-estäjä sildenafili (kaupallinen nimi Viagra, Boolell ym. 1996).

1.2 Fosfodiesteräsi 10A lääkeainekehityksen kohteena

Sekä cAMP:tä että cGMP:tä hajottava PDE10A (EC-numerot: 3.1.4.17 ja 3.1.4.35) löydettiin vuonna 1999 samanaikaisesti kolmen eri tutkimusryhmän toimesta (Fujishige ym. 1999; Loughney ym. 1999; Soderling ym. 1999). PDE10A ekspressoituu erityisesti aivojen tyvitumakkeiden motorisia ja kognitiivisia toimintoja säätelevillä alueilla, mikä on tehnyt siitä mielenkiintoisen kohteen erilaisiin psyykkisiin häiriöihin sekä hermoston rappeutumiseen johtaviin sairauksiin kohdistuvien lääkeaineiden kehitykselle (Lakics ym. 2010).

PDE10A:n inaktivaatiolla on havaittu muun muassa antipsykoottisia ja hermosoluja suojaavia vaikutuksia sekä poistogeenisissä että PDE10A-selektiivisillä estäjämolekyyleillä testatuissa jyrsijämalleissa (mm. Siuciak ym. 2006; Schmidt ym. 2008; Grauer ym. 2009; Giampa ym. 2010; Harada ym. 2017). Tämä on johtanut useiden PDE10A-estäjien skitsofreniaan ja Huntingtonin tautiin liittyviin kliinisiin tutkimuksiin (ks. katsausartikkeli Maurice ym. 2014). Odottamattomien haitallisten sivuvaikutusten ilmeneminen sekä mainittujen sairauksien kannalta riittämättömät lääkinnälliset vaikutukset ovat kuitenkin toistaiseksi estäneet myyntiluvan saaneen PDE10A:han kohdistuvan lääkeaineen kehityksen (ks. katsausartikkeli Heckman ym. 2016). Hiljattain löydettyjen uusien mahdollisten lääkinnällisten vaikutusten johdosta entsyymi nähdään kuitenkin edelleen potentiaalisena tutkimuskohteena. PDE10A-estäjille altistetuilla jyrsijöillä on havaittu esimerkiksi muistin tehostumista, ja myös PDE10A:n potentiaalista ylipainon ehkäisyyn liittyvän lääkityksen kohteena on saatu todisteita (Niccolini ym. 2015; Hankir ym. 2016). Tästä syystä, kuten myös aiempien kliinisten tutkimusten epäonnistumisten vuoksi, uudenlaisten PDE10A-estäjämolekyylien löytäminen on ensiarvoisen tärkeää toimivien lääkeaineiden kehityksen kannalta.

Jopa tuhansia PDE10A:n aktiivisia ligandeja tunnetaan ja näistä usean sitoutumiskonformaatiota PDE10A:n katalyyttisessä domeenissa voidaan tarkastella röntgensädekristallografisesti määritettyjen 3D-mallien avulla (ks. katsausartikkeli Chappie ym. 2012). Ligandeja ja PDE10A:n katalyyttisen domeenin kiderakenteita on vapaasti saatavilla esimerkiksi Protein Data Bank (PDB)-tietokannassa (Berman ym. 2000). PDE10A:n katalyyttisen domeenin ligandin sitoutumistasku sisältää kaksi metallikationia, joiden läheisyyteen molemmat substraatit, cAMP ja cGMP, asettavat fosfaattiryhmänsä (Kuva 2A). Estäjämolekyylit puolestaan sijoittuvat tyypillisesti metalli-ioneista katsottuna taskun vastakkaiselle laidalle (Kuva 2B ja D). Sekä substraatit että suurin osa tunnetuista estäjämolekyyleistä vuorovaikuttavat Q716:n kanssa vetysidoksilla ja F686:n sekä F719:n kanssa pakkautumalla näiden väliin aromaattisen rengasrakenteen avulla (Kuva 2A ja C). Q716:n vieressä on lisäksi Y683, jonka on havaittu muodostavan vetysidoksen joidenkin PDE10A-estäjien kanssa (Kuva 2C). Q716:n ja Y683:n muodostaman GLN-TYR-alueen lisäksi PDE10A-estäjien sitoutumisen kannalta mielenkiintoisia alueita ovat esimerkiksi aminohappojen P702, E711 ja G715 reunustama PDE10A:n selektiivisyystasku sekä T675:n ja Q716:n välinen, lisävetysidoksien avulla sitoutumista potentiaalisesti tehostava alue (THR-alue; Kuva 2D). PDE10A:n selektiivisyystaskua ei havaita PDE10A:n lisäksi muilla PDE-tyypeillä, mikä tekee siitä äärimmäisen hyödyllisen alueen PDE10A-estäjien selektiivisyyden tehostamiseen (Verhoest ym. 2009). Osa PDE10A-estäjistä ulottaa ryhmiä myös taskun keskiosaan, kohti mainittuja metalli-ioneita (Kuva 2D).



Kuva 2. PDE10A:n katalyyttinen domeeni ja sen tunnettuja ligandeja. A. PDE10A:n katalyyttisen domeenin rakenne ja adenosinimonofosfaatin (AMP) sitoutuminen. AMP on PDE10A:n katalysoiman reaktion tuote. Kuvassa PDB-rakenne 2OUN (Wang ym. 2007). B. AMP:n ja tunnetun PDE10A-estäjän (15J) sijoittuminen PDE10A:n ligandin sitoutumistaskussa. 15J:n PDB-rakenne 4HEU (Rzasa ym. 2012) C. PDE10A-estäjä 15J:n sitoutuminen. D. Viiden tunnetun PDE10A-estäjän sijoittuminen sitoutumistaskussa (PDB-rakenteet: 4HEU; 3SN7: Malamas ym. 2011; 3WYK: Kunitomo ym. 2014; 4HF4: Rzasa ym. 2012; 5AXP: Yoshikawa ym. 2015). Kuvaan on merkitty myös sitoutumisen kannalta tärkeitä ja siten lääkeainekehityksen kannalta mielenkiintoisia alueita. Violetilla on rajattu THR-alue, mustalla GLN-TYR-alue ja turkoosilla PDE10A:n selektiivisyystasku. Paneeleissa A ja C happi punaisella ja typpi sinisellä. Paneelissa A ligandin hiili turkoosilla ja kuvassa C sinivihreällä. Aminohappojen hiili on esitetty harmaalla molemmissa kuvissa. Vetysidokset on merkitty violeteilla katkoviivoilla.

1.3 Virtuaalinen lääkeaineseulonta

Rationaalinen lääkeainesuunnittelu on viimeisten vuosikymmenien aikana noussut yhä tärkeämmäksi lääkeainekehityksen suuntaukseksi perinteisen yritykseen ja erehdykseen perustuvan kokeellisen suurikapasiteettisen seulonnan (engl. *High-throughput screening*, HTS) rinnalle. Siinä missä HTS:ssä pyritään löytämään potentiaalisimmat lääkeainemolekyylit testaamalla kokeellisesti jopa miljoonia yhdisteitä ja arvioimalla näiden aikaansaamia biologisia vasteita, rationaalisessa lääkeainesuunnittelussa tutkitun sairauden aiheuttajaksi epäillyn proteiinin rakenne otetaan huomioon testattavien yhdisteiden valinnassa.

Rationaaliseen lääkeainesuunnitteluun olennaisesti kuuluvat tietokonepohjaisesti käytettävät virtuaaliset seulontamenetelmät, joiden avulla suurikokoisten molekyyli-tietokantojen arviointi pystytään tekemään äärimmäisen nopeasti ja kustannustehokkaasti kokeelliseen HTS:ään verrattuna (ks. katsausartikkeli Bajorath 2002). Virtuaaliseulonnan hyödyllisyys on osoitettu esimerkiksi tutkimuksessa, jossa saatiin aikaan kuusinkertainen aktiivisten ligandien rikastus angiogeeni-entsyymiin kohdistuneen HTS-kampanjan tuloksiin verrattuna (Jenkins ym. 2003). Onnistunut virtuaaliseulontaprojekti mahdollistaa siis kokeellisesti testattavien molekyylien määrän merkittävän vähentämisen, johtaen lääkeaine-etsinnän tehokkuuden kasvuun.

Virtuaaliseulontamenetelmät jaetaan perinteisesti rakenne- ja ligandipohjaisiin menetelmiin. Rakennepohjaiset menetelmät perustuvat saatavilla olevaan kohdeproteiinin rakenteeseen liittyvään tietoon, kuten esimerkiksi röntgenkristallografisesti määritetyissä 3D-malleissa nähtäviin proteiinin ja ligandin välisiin vuorovaikutuskohtiin. Rakennepohjaisista menetelmistä tunnetuimpana voidaan pitää telakointia, jossa ligandeja yritetään sovittaa kohdeproteiinin ligandin sitoutumistaskuun. Telakointialgoritmit käyttävät erilaisia sitoutumisaffiniteettia laskennallisesti kuvaavia pisteytysfunktioita, joiden avulla saadaan tuotettua ennuste kunkin ligandin optimaalisesta sitoutumiskonformaatiosta sekä arvio kyseisen konformaation sitoutumisen voimakkuudesta (mm. Jones ym. 1997; Friesner ym. 2004; Korb ym. 2009).

Ligandipohjaiset virtuaaliseulontamenetelmät ovat erityisen hyödyllisiä, jos riittävää määrää rakenteellista informaatiota kohdeproteiinista ei ole saatavilla. Ligandipohjaisten menetelmien käyttö vaatii, että kohdeproteiinille tunnetaan vähintään yksi ligandi, jonka aktiivisuus on kokeellisesti määritetty. Tunnettuja ligandipohjaisia menetelmiä ovat esimerkiksi farmakoforimallinnus sekä erilaisiin ligandeja kuvaaviin tekijöihin, kuten muotoon ja elektrostaattisiin ominaisuuksiin, perustuva samankaltaisuusvertailu (mm. Dixon ym. 2006a; Vainio ym. 2009). Ligandipohjaiset menetelmät eivät tyypillisesti vaadi yhtä suuria laskennallisia resursseja kuin rakennepohjaiset menetelmät. Toisaalta rakenteellisesti täysin

uudenlaisten aktiivisten molekyylien löytäminen on ligandipohjaisilla menetelmillä usein haastavaa.

Oman lisänsä virtuaaliseulontaan tuovat myös erilaiset koneoppimismenetelmät. Eräs suosituimmista koneoppimiseen perustuvista menetelmistä on kohteeseen sitoutuvien ligandien kvantitatiivisen rakenne-aktiivisuussuhteen (engl. *Quantitative structure-activity relationship*, QSAR) mallinnus. QSAR-mallinnus perustuu usean muuttujan lineaariseen regressioanalyysiin, jossa käytettävä algoritmi pyrkii löytämään korrelaation ligandijoukon rakenteellisia ominaisuuksia kuvaavien muuttujien ja kokeellisesti määritettyjen aktiivisuuksien väliltä. Toimivalla QSAR-mallilla voidaan ennustaa erilaisten rakenteellisten ominaisuuksien vaikutus ligandin aktiivisuuteen. QSAR-mallinnusta käytetään yleisesti esimerkiksi uusien lääkeainekandidaattien kemiallisen optimoinnin tukena (Lewis 2005).

Sekä rakenne- että ligandipohjaisilla menetelmillä on useissa tutkimuksissa onnistuttu löytämään uusia potentiaalisia lääkeainekandidaatteja (mm. Schuster ym. 2008; Markt ym. 2009). Virtuaaliseulonnan tyypillisenä ongelmana esiintyy kuitenkin sitoutumisen voimakkuutta arvioivien pisteytysfunktioiden hyvin tapauskohtainen toimivuus, joka usein näkyy kokeellisissa testeissä ns. väärinä positiivisina yhdisteinä. Tähän ongelmaan on onnistuttu tuomaan helpotusta yhdistämällä pisteytysfunktioita ja valikoimalla kokeellisiin testeihin molekyyliä, jotka menestyvät hyvin kaikkien käytettyjen funktioiden arvioinnissa (Charifson ym. 1999; Stahl ja Rarey 2001).

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Runsain määrin saatavilla oleva rakenne- ja ligandipohjainen informaatio tekee PDE10A:sta erinomaisen kohteen virtuaaliseulontaprojektille. PDE10A:lle on aiemmin tehty muun muassa farmakofori- ja telakointipohjaista virtuaaliseulontaa kohdistuen sekä katalyyttiseen domeeniin että entsyymin toimintaa säätelevään GAF-domeeniin (Garcia ym. 2017; Fan ym. 2018). Telakointia on käytetty myös

uusien kokeellisesti aktiiviseksi määritettyjen PDE10A-estäjien sitoutumiskonformaatioiden ennustamiseen (Codutti ym. 2017). Tämän tutkimuksen tavoitteet olivat:

1. Löytää uusia potentiaalisia PDE10A-estäjämolekyylejä virtuaaliseulonnan avulla.
2. Ennustaa parhaiden seulonnessa löytyneiden kandidaattien sitoutuminen ja testata ennusteiden perusteella lupaavimmat molekyylit kokeellisesti.
3. Arvioida löydettyjen aktiivisten PDE10A-estäjien potentiaalia uusiksi lääkeaineiksi kokeellisesti määritetyn tehokkuuden sekä laskennallisesti ennustettujen lääkkeenkaltaisten ominaisuuksien perusteella.

Tutkimuksessa testattiin erityisesti rakenne- ja ligandipohjaisen virtuaaliseulonnan yhdistävää PANTHER-menetelmää, jota ei ole aiemmin käytetty PDE10A-estäjien virtuaaliseulonnessa (Niinivehmas ym. 2015). PANTHER:n toimivuus ja erityisesti sen aktiivisten ja inaktiivisten molekyyliden erottelukyky on useissa tutkimuksissa osoitettu yhtä hyväksi tai paremmaksi kuin tunnetuilla telakointi- ja ligandipohjaisilla menetelmillä (Niinivehmas ym. 2011, 2015, 2016, 2018; Kurkinen ym. 2018; Rauhamäki ym. 2018; Rauhamäki ym. 2018). Lisäksi käytettiin jo aiemmin toimivaksi osoitettua ligandipohjaista farmakoforiseulontaa. Työn päähypoteesina oli, että tunnettujen PDE10A-estäjien fysikokemiallisiin ominaisuuksiin sekä PDE10A:n saatavilla olevaan rakenteelliseen informaatioon perustuvan virtuaaliseulonnan avulla löydetään uusia aktiivisia PDE10A-estäjiä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Aineiston valmistelu

2.1.1 Ligandien valmistelu

Työssä hyödynnettiin ennalta tunnettujen PDE10A-estäjämolekyylien kokeellisesti määritettyä aktiivisuusdataa. PDE10A-estäjien SMILES-rakenteet ja näiden tehokkuutta kuvaavat IC_{50} -arvot haettiin bioaktiivisia, lääkkeenkaltaisia pienmolekyylejä sisältävästä ChEMBL-tietokannasta (Bento ym. 2014; haettu 22.6.2016). IC_{50} -arvot muunnettiin logaritmiseen muotoon (pIC_{50}) kaavalla $-\log_{10}(IC_{50})$, jossa IC_{50} on yksikössä mol/l. Työn eri vaiheissa käytettiin kahta ChEMBL:stä haettua aktiivisten PDE10A-estäjien joukkoa, MJ1 ja MJ2. MJ1 koostui 78 molekyylistä, joiden pIC_{50} oli välillä 6,7 – 10,3 (Malamas ym. 2011). MJ2 koostui 53 molekyylistä, joiden pIC_{50} oli välillä 3,5 – 10,2 (Rzasa ym. 2012, 2014).

Ligandit valmisteltiin MAESTRO-käyttöliittymässä (v. 10.5.013, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Ligandien rakenteet käännettiin 3D-muotoon ja vetyatomit lisättiin MAESTRO:n LIGPREP-ohjelmalla (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), käyttäen OPLS3-voimakenttää, jonka on osoitettu ennustavan sitoutumisaffiniteetit laajalle joukolle proteiineja ja ligandeja hyvällä tarkkuudella (Harder ym. 2016). Ligandien ionisaatiot ja tautomerisaatiot määritettiin pH:ssa 7,4 EPIK:llä (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Shelley ym. 2007; Greenwood ym. 2010). Ylimääräiset molekyylit, kuten vesimolekyylit ja ionit, poistettiin. Jokaiselle ligandille tuotettiin enintään 32 stereoisomeeria ja rengasrakenteille valittiin yksi matalaenerginen konformaatio ligandia kohden.

LIGPREP:llä valmistelluille ligandeille tuotettiin lisäkonformaatioita MAESTRO:n CONFGEN:llä (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Watts ym. 2010). Konformaatioiden etsintään käytettiin "Intermediate"-etsintästrategiaa, joka tuottaa enintään 75 konformaatiota jokaista ligandin vapausastetta kohden, prosessin nopeuden kuitenkin liiaksi kärsimättä. MJ1:lle CONFGEN tuotti yhteensä 783 ja MJ2:lle 2502 konformaatiota.

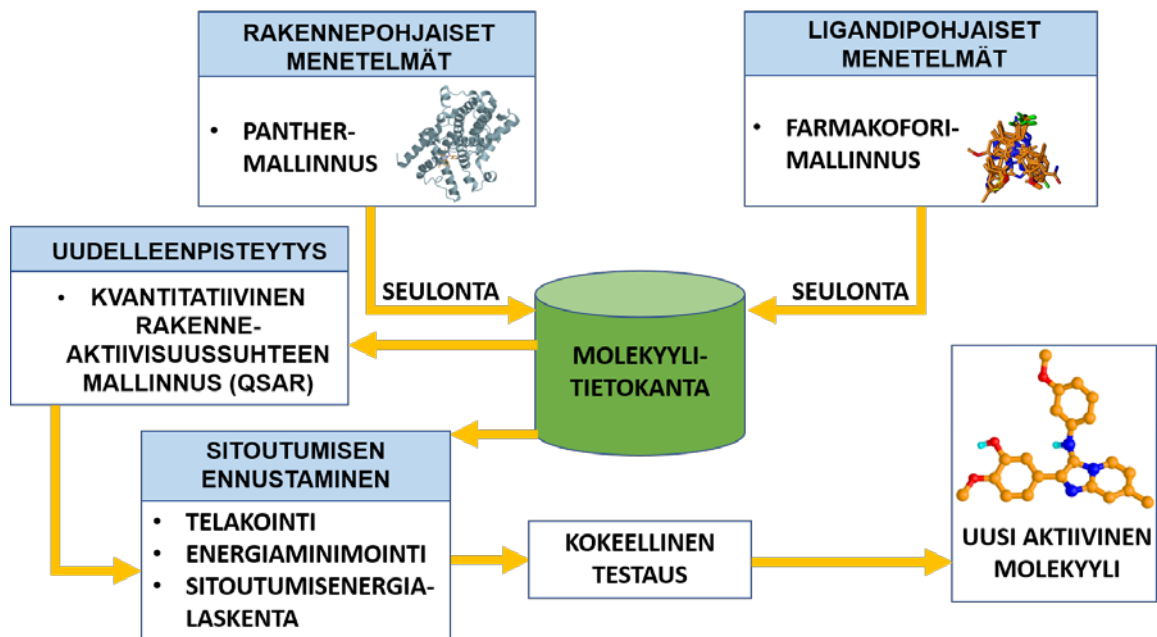
Kaikki työn aikana tehdyt seulonnat kohdistettiin n. 140 000 lääkkeenkaltaista molekyyliä sisältäneeseen SPECS-tietokantaan (Specs 10 mg, 4/2016, enintään 8 pyörivää sidosta, molekyylipaino 250-600 g/mol; www.specs.net). SPECS-tietokannan molekyylien valmistelu ja lisäkonformaatioiden tuotto tehtiin vastaavasti kuin edellä.

2.1.2 Proteiimirakenteiden valmistelu

Työssä käytetyt PDE10A-kiderakenteet saatiin PDB-tietokannasta (www.rcsb.org; Berman ym. 2000). Röntgensädekristallografisesti määritetyt PDB-rakenteet 3SN7 ja 4HEU valittiin käytettäväksi PANTHER-mallinnuksessa ja telakoinnissa (Malamas ym. 2011; Rzasa ym. 2012). 3SN7:n resoluutio oli 1,82 Å ja 4HEU:n 2 Å. Molemmat sisälsivät tehokkaan PDE10A-estäjän (3SN7: $IC_{50} = 0,7$ nM ja 4HEU: $IC_{50} = 0,097$ nM), jotka käyttivät sitoutumiseen osin eri alueita sitoutumistaskusta. Rakenteet visualisoitiin ja näiden $C\alpha$ -atomit aseteltiin päällekkäin BODIL-molekyylihallinnusympäristön VERTAA-ohjelman avulla (Lehtonen ym. 2004). Ennen PANTHER-mallinnusta rakenteisiin lisättiin vetyatomit pH:ssa 7,4 REDUCE-ohjelmalla (v. 3.24.130724; Word ym. 1999). Kaikkia telakointeja varten rakenteet valmisteltiin MAESTRO:n Protein Preparation Wizard-työkalulla (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Sastry ym. 2013). Sidoskulmat ja -pituudet tarkastettiin ja tarvittaessa korjattiin ja vetyatomit lisättiin. Sitoutumistaskun Mg^{2+} - ja Zn^{2+} -ionien ja ympäröivien atomien varaukset sekä näiden väliset sidokset optimoitiin. Puuttuvat aminohappojen sivuketjut lisättiin PRIME:llä (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Jacobson ym. 2002, 2004). Vesimolekyylit poistettiin kaikista rakenteista, koska näiden ei havaittu olennaisesti vaikuttavan telakointituloksiin. Samoin poistettiin kiteytykseen liittyvät ionit ja pienmolekyylit. Rakenteiden vetysidosverkostot optimoitiin ja histidiinien, aspartaattien ja glutamaattien protonaatiot ennustettiin pH:ssa 7,4 PROPKA:n avulla (Bas ym. 2008). Rakenteiden energiaminimoinnissa käytettiin OPLS3-voimakenttää. Minimoinnissa raskaiden atomien sijoittumisessa sallittiin enintään 0,3 Å:n poikkeama alkuperäiseen rakenteeseen verrattuna.

2.2 Virtuaaliseulonta

PDE10A-estäjien virtuaaliseulonta suoritettiin farmakofori- ja PANTHER-mallien sekä QSAR-mallien avulla. Jokaisella mallilla pyrittiin löytämään SPECS-molekyylitietokannasta tarpeeksi pieni määrä potentiaalisia PDE10A-estäjiä, jotta näiden sitoutumisen ennustaminen ja ennusteiden visuaalinen tarkastelu olisi laskentaresurssien ja ajankäytön kannalta järkevää. Työn kulku on esitetty alla (Kuva 3).



Kuva 3. PDE10A-estäjien virtuaaliseulontaprojektin kulku. Virtuaaliseulontaa tehtiin työssä farmakofori- ja PANTHER-malleilla. Farmakoforiseulonnan ja kahden PANTHER-seulonnan tulokset pisteytettiin uudelleen kyseisten mallien pohjalta luotujen QSAR-mallien avulla parhaiden seulontatulosten joukossa esiintyvien molekyylien fysikokemiallisten ominaisuuksien parantamiseksi. Kullakin mallilla löydettyjen lupaavimpien molekyylien sitoutuminen ennustettiin telakoinnin, energiaminimisaation ja sitoutumisenergiälaskennan avulla. Lopulliset valinnat kokeellisesti testattaviksi PDE10A-estäjäkandidaateiksi tehtiin sitoutumisennusteiden visuaalisen arvioinnin perusteella.

2.2.1 Farmakoforimallinnus

Farmakoforimallinnuksessa aktiivisten molekyylien päällekkäinasettelun perusteella etsitään aktiivisuuden selittävät farmakoforipisteet. Farmakoforipisteet kuvaavat aktiivisuuden kannalta merkityksellisiä sitoutumista edistäviä kemiallisia ryhmiä, kuten esimerkiksi vetysidoksen luovuttaja- ja

vastaanottajaryhmiä tai hydrofobisia ryhmiä, sekä näiden ryhmien avaruudellisen sijoittumisen toisiinsa nähden.

Ligandipohjainen farmakoforimalli tuotettiin MAESTRO:n PHASE-ohjelmalla (Dixon ym. 2006a, b). Malli muodostettiin MJ1:n avulla. Ligandien valmistelu ja konformaatioiden tuotto tehtiin LIGPREP:llä ja CONFGEN:llä vastaavasti kuin edellä. Molekyylit, joiden pIC_{50} oli vähintään 8,0 määritettiin aktiivisiksi ja molekyylit, joilla arvo oli alle 7,5 inaktiivisiksi. Mallilta vaadittiin viiden farmakoforipisteen käyttöä ja siihen tuli sisällyttää vähintään 35/42 aktiiviseksi luokitellusta molekyylistä. PHASE:n tuottamista malleista valittiin aktiivisia molekyylejä parhaiten edustanut (kelpoisuuspisteet 3,904) kaksi vetysidosvastaanottajaa (A), kaksi hydrofobista ryhmää (H) ja yhden aromaattisen renkaan (R) sisältänyt malli (AAHHR).

2.2.2 PANTHER-mallinnus ja seulonta

Yhteensä kolme eri PANTHER-mallia (M-I, M-II ja M-III) käytettiin SPECS-tietokannan seulontaan. PANTHER luo mallinnettavasta taskusta negatiivikuvan, joka kuvaa taskuun sopivan optimaalisen ligandin muodon ja mahdollisten elektrostaattisten vuorovaikutuskohtien sijainnit (Niinivehmas ym. 2015). Seulonta suoritetaan ligandien muotoa ja elektrostaattisia ominaisuuksia äärimmäisen nopeasti vertaavalla SHAEP-ohjelmalla (Vainio ym. 2009). SHAEP vertaa tutkittavia lääkeainekandidaatteja PANTHER-malliin ja pisteyttää molekyylit sen mukaan, kuinka hyvin nämä toteuttavat mallin muodon ja elektrostaattiset ominaisuudet. SHAEP tuottaa jokaiselle molekyylille myös mallin parhaiten toteuttavan konformaation, joka toimii samalla ennusteena molekyylin sitoutumiskonformaatiosta.

M-I luotiin PDB-rakenteen 3SN7 avulla. M-I:n keskipisteeksi asetettiin 3SN7:n ligandin keskusatomi. Mallin sallittiin ulottua 12 Å:n päähän keskipisteestä. Lisäksi malli rajattiin ulottumaan korkeintaan 1 Å:n päähän 3SN7:n ligandin äärirajoista. M-I:n neutraalien pisteiden määrää pienennettiin asettamalla C-atomien säteeksi 2,25 Å. Malliin sisällytettiin molekyylifragmentti, joka oli saatu

edellä kuvatun AAHHR-farmakoforiseulonnan parhaan molekyylin telakointituloksesta (FRAG1). Molekyyli valmisteltiin LIGPREP:llä ennen FRAG1:n eristystä kuten edellä. FRAG1:n sisältämät vetyatomit poistettiin. PANTHER:n tuottamat pisteet poistettiin fragmentin peittämältä alueelta.

M-II:n luonnissa käytettiin PDB-rakennetta 4HEU. M-II tuotettiin samoilla PANTHER-asetuksilla kuin M-I. Malliin sisällytettiin 4HEU:n ligandista eristetty hydroksyyliiryhmä, jonka peittämältä alueelta PANTHER:n luomat pisteet poistettiin. Hydroksyyliiryhmän atomeille asetettiin PANTHER:n varauskirjaston (charges.lib) mukaiset seriinin hydroksyyliiryhmän varaukset.

M-III tuotettiin muokkaamalla M-II:a. Hydroksyyliiryhmä poistettiin. Malliin lisättiin PDB-rakenteen 3SN7 ligandista eristetty fragmentti (FRAG2). Fragmentin kanssa päällekkäiset PANTHER:n tuottamat pisteet poistettiin. Lisäksi FRAG2:n ja poistetun hydroksyyliiryhmän välissä sijainneet pisteet poistettiin. FRAG2:n polaarisisille atomeille annettiin näitä lähellä olleen Q716:n aminoryhmän vetyjen ja Y514:n sivuketjun hapen PANTHER:n varauskirjaston mukaiset vastinvaraukset.

2.2.3 Kvantitatiivisen rakenne-aktiivisuussuhteen mallinnus

Työssä luotiin yhteensä kolme PDE10A-estäjien kvantitatiivista rakenne-aktiivisuussuhdetta kuvaavaa QSAR-mallia. Mallien luontiin käytettiin MAESTRO:n Field-Based QSAR-ohjelmaa (FQSAR; Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). FQSAR-mallissa aktiivisten molekyylien joukon perusteella luodaan kenttiä, jotka kuvaavat molekyylien fysikokemiallisten ominaisuuksien vaikutusta aktiivisuuteen. Kenttien sijaintien ja intensiteettien laskenta tehtiin Gaussin funktioon perustuvalla menetelmällä (Klebe ym. 1994; Klebe ja Abraham 1999). Viisi fysikokemiallista ominaisuutta arvioitiin: tilantäyttö, hydrofobisuus, elektrostaattiset ominaisuudet ja vetysidosten vastaanottajat sekä luovuttajat. Näiden ominaisuuksien ja aktiivisuuden välinen korrelaatio etsittiin monimuuttujamenetelmiin lukeutuvan PLS-analyysin (engl. *Partial least squares*) avulla. Mallit luotiin farmakoforimalli AAHHR:n sekä PANTHER-mallien I ja II avulla tehtyjen aktiivisten PDE10A-estäjien päällekkäinasettelujen perusteella ja

niitä käytettiin kyseisten mallien seulontatulosten uudelleenpisteytykseen. AAHHR- ja M-I-pohjaisten mallien päällekkäinasettelu tehtiin MJ1:llä ja M-II-pohjaisen mallin päällekkäinasettelu MJ2:lla. Malleja luotaessa 80 % aktiivisista molekyyleistä asetettiin koulutusjoukkoon, jonka pohjalta kukin malli luotiin. 20 % molekyyleistä asetettiin testijoukkoon, jota käytettiin mallin validointiin. Joukot luotiin satunnaisjaolla. Mallien kelpoisuutta arvioitiin koulutus- ja testijoukon kokeellisen ja ennustetun aktiivisuuden välistä korrelaatiota kuvaavien R^2 - ja Q^2 -arvojen avulla. Lisäksi mallien yliennustavuus pyrittiin välttämään MAESTRO:n tuottamaa R^2 Scramble-arvoa seuraamalla. Liian suuri R^2 Scramble (yli 0,5) tarkoittaa, että malli löytää rakenteen ja aktiivisuuden välisen korrelaation myös koulutusjoukolle, jossa ligandien aktiivisuusdata on sekoitettu. Tällainen malli on yliennustava eikä siten luotettava. Kunkin päällekkäinasettelun parasta mallia käytettiin SPECS-tietokannan molekyylien pIC_{50} -arvojen ennustamiseen.

2.3 Sitoutumisennusteet

Malleilla AAHHR, M-I, M-II ja M-III tehtyjen seulontojen parhaiden molekyylien sitoutuminen ennustettiin SHAEP-samankaltaisuusvertailun ja telakoinnin avulla. Lupaavimpien SHAEP- ja telakointitulosten sitoutumista arvioitiin lisäksi tarkemmin energiaminimisaation ja sitoutumisenergiälaskennan avulla.

2.3.1 Telakointi

Telakoinnit suoritettiin PLANTS-telakointiohjelmalla (Korb ym. 2009). Telakointikoordinaatit määritettiin kiderakenteiden alkuperäisten ligandien avulla. PLANTS-telakoinnissa käytettiin CHEMPLP-pisteytysfunktioita ja nopeusasetuksena tarkimman ennusteen mahdollistavia parametreja (speed 1-asetus). Osassa PLANTS-telakoinneista jokaiselle ligandille tuotettiin neljä parasta telakointikonformaatiota. Samaa ligandia edustavien konformaatioiden atomien sijoittumisen neliöllisen keskiarvon hajonnaksi (engl. *Root mean square deviation*, RMSD) sallittiin enintään 2,0 Å.

PLANTS:n on osoitettu tuottavan kiderakenteissa havaittavien ligandien sitoutumiskonformaatiot hyvällä tarkkuudella (RMSD < 2 Å; Korb ym. 2009). PLANTS:n suoriutuminen PDE10A-estäjän sitoutumiskonformaation ennustuksessa testattiin telakoimalla PDB-rakenteessa 3SN7 nähtävä estäjämolekyylä kyseiseen rakenteeseen. 3SN7:n ligandin sitoutumiskonformaatio ennustettiin RMSD-arvolla 0,56 Å, joka osoitti PLANTS:n käyttökelpoisuuden PDE10A:han kohdistuvien lääkeainekandidaattien sitoutumisen ennustamisessa. RMSD-arvo laskettiin vertaamalla telakoitua ja kiderakenteen sitoutumiskonformaatiota MAESTRO:ssa.

2.3.2 Energiaminimisaatio ja sitoutumisenergiälaskenta

Farmakofori- ja PANTHER-seulontojen tuloksia jälkikäsiteltiin MAESTRO:n PRIME MM/GBSA:lla (engl. *Molecular mechanics/Generalized Born, surface area*; Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Virtuaaliseulontatulosten jälkikäsitteilyn MM/GBSA:lla on aiemmin osoitettu olevan hyödyksi aktiivisten molekyylien tunnistuksessa (Niinivehmas ym. 2011). MM/GBSA:n avulla tuotettiin arviot lääkeainekandidaattien sitoutumisenergiasta. PANTHER-seulonnalla ja telakoinnilla tuotetuille ligandi-proteiinikomplekseille tehtiin energiaminimoinnit sitoutumiskonformaation tarkempaa visuaalista arviointia varten. Sitoutumisenergiälaskut ja energiaminimisaatiot suoritettiin käyttäen OPLS3-voimakenttää ja implisiittistä VSGB 2.1-solvaatiomallia (Li ym. 2011). Energiaminimisaatio tehtiin aminohapoille 4 Å:n säteellä ligandista. MM/GBSA:n antamia arvioita kunkin ligandin sitoutumisenergiasta verrattiin käytetyn rakenteen alkuperäiselle ligandille laskettuun sitoutumisenergiaan.

2.4 Lääkeainekandidaattien valinta kokeellisiin testeihin

AAHHR-seulontatulosten pIC₅₀-arvot ennustettiin FQSAR-mallilla. Tämän perusteella 75:n parhaan molekyylin sitoutuminen ennustettiin. Ligandipohjaisesti muodostetut farmakofori- ja FQSAR-mallit eivät sisällä tietoa kohdeproteiinin rakenteesta ja siten seulontatulosten mahdollisesta sitoutumisesta. Tämän takia

sitoutumisennusteet farmakoforiseulonnan tuloksille muodostettiin PLANTS-telakointiohjelman avulla. Molekyylit telakoitiin rakenteeseen 3SN7. Telakointituloksille tehtiin energiaminimisaatio ja sitoutumisenergian arviointi MM/GBSA:lla.

M-I:n ja M-II:n PANTHER-seulontojen 5000 parhaan molekyylin pIC_{50} -arvot ennustettiin FQSAR-malleilla. Energiaminimointi ja sitoutumisenergiälaskenta tehtiin FQSAR-mallien mukaan M-I:n 100 parhaan molekyylin ja M-II:n 47 parhaan molekyylin SHAEP-konformaatioille. M-III-seulonnan 100:lle SHAEP:n parhaiten pisteyttämälle molekyylille tuotettiin myös vaihtoehtoiset sitoutumisennusteet telakoimalla nämä rakenteeseen 3SN7 ja näille suoritettiin energiaminimisaatio ja sitoutumisenergian arviointi. Lopulliset valinnat kokeellisesti testattaviksi lääkeainekandidaateiksi tehtiin kunkin mallin tulosten sitoutumisennusteiden visuaalisen tarkastelun perusteella. Erityisesti etsittiin ligandin ja proteiinin välillä muodostuvia vety- ja halogeenisidoksia sekä hydrofobisia ja aromaattisten ryhmien välisiä vuorovaikutuksia. Myös MM/GBSA:n ennustamat sitoutumisenergiat otettiin huomioon valinnoissa.

Molekyylien soveltuvuutta PDE10A:han kohdistuviksi lääkeaineiksi arvioitiin myös MAESTRO:n QIKPROP-ohjelmalla (v. 5.1). Ohjelmalla ennustettiin valituille molekyyille QPlogBB-arvo, joka kuvaa molekyylin kykyä läpäistä veriaivoeste. Arvoa verrattiin ohjelman jakelijan (Schrödinger, USA) ilmoittamiin viitearvoihin, joiden mukaan 95 % tunnetuista lääkeainemolekyyleistä saa arvon välillä -3 - 1,2.

2.5 Kokeellinen testaus

Kokeellisiin testeihin valitut lääkeainekandidaatit testautettiin kaupallisella toimijalla (SB Drug Discovery, Glasgow, Iso-Britannia). PDE10A oli tuotettu bakulovirusekspressiosysteemissä. Molekyyleille määritettiin IC_{50} -arvot PDE-perheen entsyymiaktiivisuuden testauksessa yleisesti käytetyllä, 96-kuoppalevyllä sopivaan muotoon muokatulla, radiometrisellä mittauksella (Thompson ja Appleman 1971). Kontrollimittauksessa PDE10A-estäjänä käytettiin papaveriinia.

Papaveriinille määritettiin IC₅₀-arvoksi 147 nM, joka vastasi hyvin testaajan aiempia tuloksia, varmistaen kokeen toimivuuden. Aktiivisiksi PDE10A-estäjiksi määritettiin molekyylit, joiden mitattu IC₅₀-arvo oli pienempi kuin 100 µM.

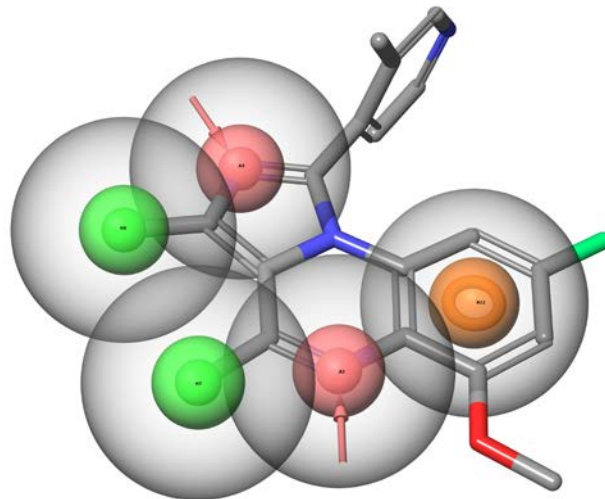
2.6 Kuvat

Työssä nähtävät kuvat tuotettiin ohjelmilla BODIL (v. 0.8.1; Lehtonen ym. 2004), VMD (v. 1.9.2; Humphrey ym. 1996), MOLSCRIPT (v. 2.1.2; Kraulis 1991), BIOVIA DRAW 2016 (Dassault Systèmes, San Diego, CA, USA, 2016), MAESTRO (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016) ja RASTER3D (v. 3.0.2; Merritt ja Bacon 1997).

3 TULOKSET

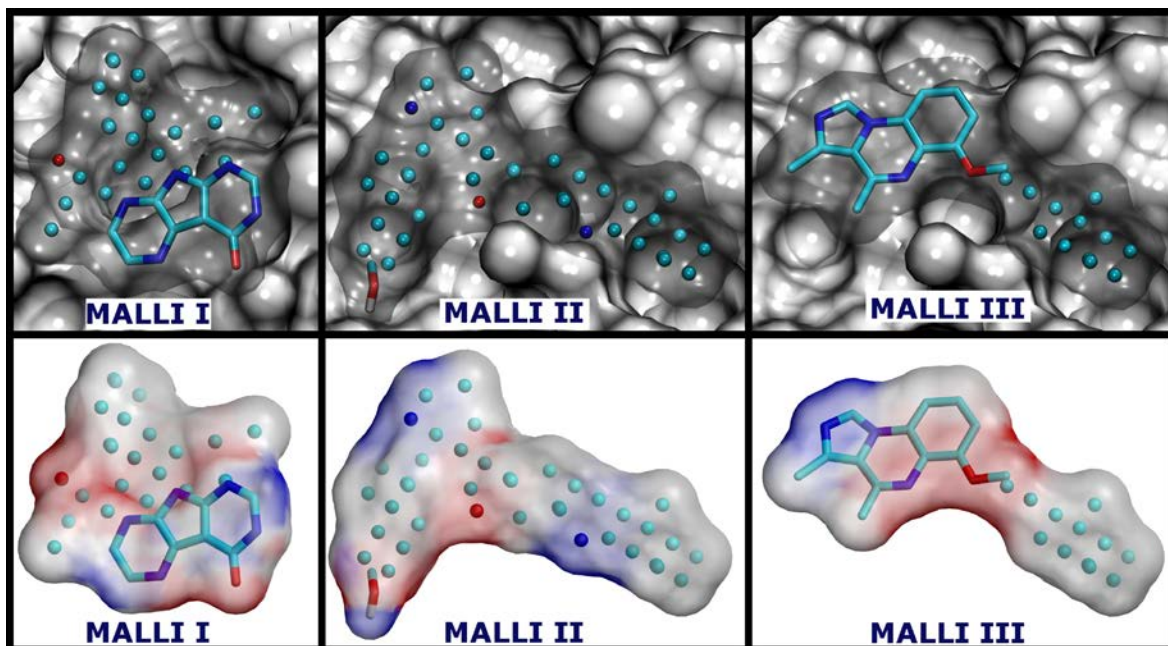
3.1 Farmakofori- ja PANTHER-seulonnalla 13 uutta potentiaalista PDE10A-estäjää

Ligandipohjaisesti tuotetulla AAHHR-farmakoforimallilla (Kuva 4) pyrittiin kuvaamaan aktiivinen PDE10A-estäjä MJ1:lle tehdyn päällekkäinasetteluun ja aktiivisuusdatan perusteella. AAHHR:n geometriassa olennaisena pidettiin erityisesti vetysidosvastaanottajan ja aromaattisen rengasrakenteen sijoittumista. Mallin toteuttavan molekyylin katsottiin muodostavan useissa PDE10A:n kiderakenteissa havaitut vuorovaikutukset Q716:n sekä F686:n ja F719:n kanssa. Toisen vetysidosvastaanottajan arvioitiin tehostavan sitoutumista Y514:n kanssa mahdollisesti muodostuvan vetysidoksen avulla. Hydrofobiset farmakoforipisteet mahdollistivat hydrofobiset vuorovaikutukset V668:n, I682:n ja L665:n kanssa. AAHHR:llä suoritettu SPECS-tietokannan seulonta tuotti yhteensä n. 14 000 osumaa.



Kuva 4. PDE10A-estäjien virtuaaliseulonnassa käytetty farmakoforimalli AAHHR. Kuvassa nähtävät värilliset pallot ovat farmakoforipisteitä. Vaaleanpunaiset farmakoforipisteet kuvaavat vetysidoksen vastaanottajia (A), vihreät hydrofobisia ryhmiä (H) ja oranssi aromaattista rengasta (R). Vetysidoksen vastaanottajiin liittyvät nuolet näyttävät suunnan, josta vetysidos vastaanotetaan. Mallin päälle on aseteltu PDB-rakenteessa 3SN7 nähtävä aktiivinen PDE10A-estäjä, joka kuului myös mallin muodostuksessa käytettyyn aktiivisten PDE10A-estäjien joukkoon. Hiili on esitetty harmaana, typpi sinisenä, happi punaisena ja fluori vihreänä.

PANTHER-malleilla M-I, M-II ja M-III (Kuva 5) etsittiin erityisesti molekyylejä, jotka pystyisivät muodostamaan vetysidoksia PDE10A-sitoutumistaskun GLN-TYR-alueella sekä pakkautumaan F686:n ja F719:n väliin useissa kiderakenteissa nähdyllä tavalla. Näihin vuorovaikutuksiin kykenevien molekyylien esiintymistä parhaiden seulontatulosten joukossa tehostettiin malleihin M-I ja M-III sisällytettyjen FRAG1:n ja FRAG2:n avulla (Kuva 5). Fragmenttien avulla malleihin saatiin kaksi vetysidoksen vastaanottajaa sopivalle etäisyydelle Q716:n aminoryhmään ja Y683:n hydroksyyliin nähden sekä aromaattinen rengas F686:n ja F719:n väliin. Kahta eri fragmenttia käyttämällä lisättiin seulontatulosten GLN-TYR-alueelle sijoittamien rakenteiden monipuolisuutta. M-II:n ja M-III:n ulottaminen PDE10A:n selektiivisyystaskuun mahdollisti taskuun hydrofobisia ryhmiä asettavien molekyylien löytämisen. M-II:n THR-alueelle ulottuvalla laajennoksella ja sen sisältämällä hydroksyyliinfragmentilla (Kuva 5) puolestaan pyrittiin lisäämään ligandien ja proteiinin välille muodostuvien vetysidosten määrää. Sopivien ryhmien löytäminen THR-alueelle osoittautui kuitenkin vaikeaksi. Yleisenä ongelmana THR-alueelle sijoittuneissa ryhmissä oli kyvyttömyys optimaaliseen vetysidosten muodostukseen läheisten Q716:n ja T675:n kanssa.



Kuva 5. PDE10A-estäjien virtuaaliseulonassa käytetyt PANTHER-mallit. Turkoosit pallot ovat neutraalisti, punaiset negatiivisesti ja siniset positiivisesti varautuneita PANTHER:n tuottamia pisteitä. Tikkuina on esitetty malleihin sisällytetyt, kiderakenteiden ligandeista eristetyt osat (mallissa I FRAG1, mallissa III FRAG2 ja mallissa II hydroksyyli ryhmä). Hiili turkoosilla, happi punaisella, typpi sinisellä ja vety valkoisella. Ylärivillä nähdään mallit I-III PDE10A:n ligandin sitoutumistaskussa. Mallin I taustalla on PDB-rakenne 3SN7 ja mallien II ja III taustalla rakenne 4HEU. Malleille on piirretty läpinäkyvät pinnat (läpinäkyvä harmaa). Alarivillä nähdään mallit I-III ja näiden potentiaalipinnat. Potentiaalipinnoilla punainen tarkoittaa negatiivista, sininen positiivista ja vaalea neutraalia varausta.

3.1.1 Aktiivisten PDE10A-estäjien päällekkäinasettelulla kolme rakenneaktiivisuussuhdetta kuvannutta mallia

M-I:n ja M-II:n parhaiksi arvioimat molekyylit eivät SHAEP:n tuottamien sitoutumisennusteiden perusteella vastanneet potentiaaliselle PDE10A-estäjälle asetettuihin vaatimuksiin. Erityisesti vetysidosten määrä jäi alhaiseksi useimmilla molekyyileillä. Toisaalta potentiaalisia molekyyilejä havaittiin myös melko alhaalla SHAEP:n määrittämässä paremmuusjärjestyksessä. AAHHR:n tapauksessa taas seulontatulosten suurta määrää oli syytä pienentää. Näistä syistä seulontatulosten uudelleenpisteytyksen hyvän validaation saaneilla FQSAR-malleilla ennakoitiin nostavan optimaalisempia vuorovaikutusprofiileja ilmentäviä molekyyilejä parhaiden tulosten joukkoon.

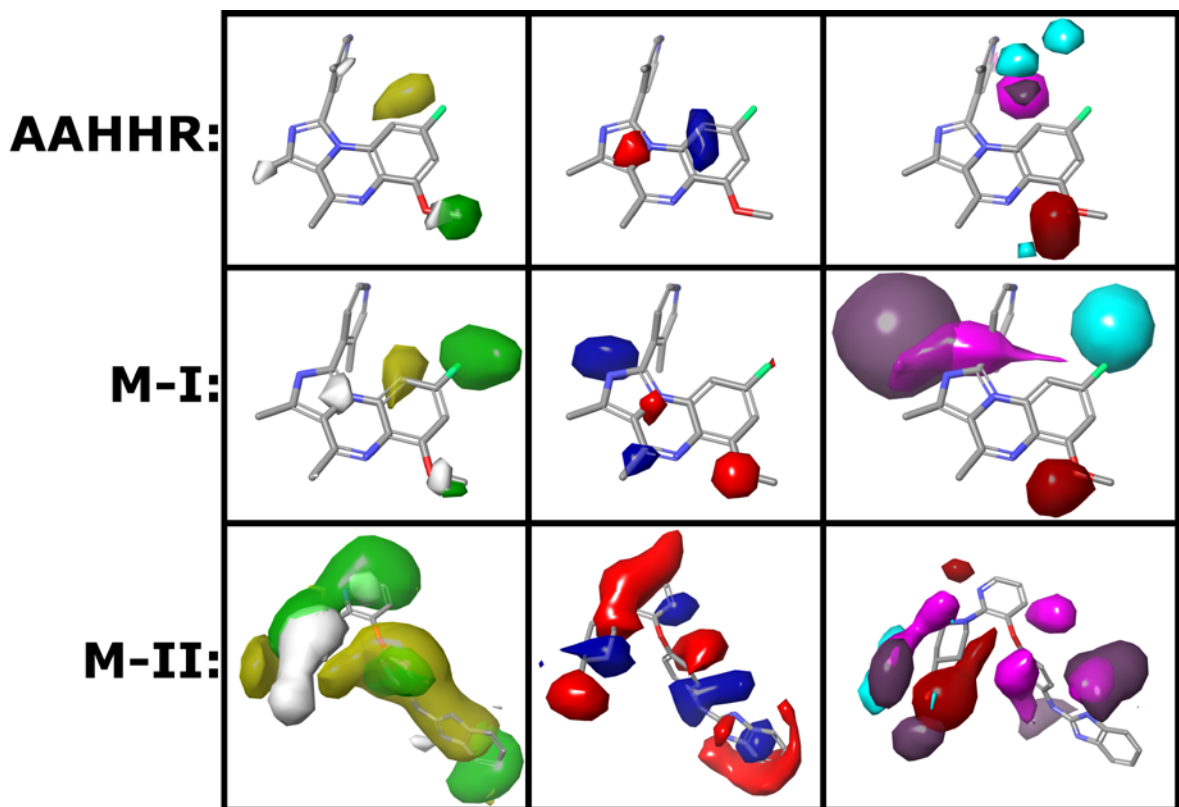
AAHHR-pohjaisista FQSAR-malleista paras käytti 3 PLS-tekijää ja kykeni selittämään 88 % koulutusjoukon ja 81 % testijoukon pIC_{50} -arvojen vaihtelusta (Taulukko 1). Yhteensä 75 farmakoforiseulonnan avulla löydetyn molekyylin pIC_{50} -arvoksi ennustettiin vähintään 10,0. M-I:n päälle tehdyn päällekkäinasettelun pohjalta tuotetuista FQSAR-malleista valittiin 3 PLS-tekijää käyttänyt malli, joka selitti 74 % koulutusjoukon ja 72 % testijoukon pIC_{50} -arvojen vaihtelusta (Taulukko 1). M-I:n seulontatuloksille tehdyn FQSAR-ennusteen mukaan 100 parhaan ennustettu pIC_{50} oli välillä 8,7 – 10,0. M-II-pohjaisista FQSAR-malleista lupaavin käytti 1 PLS-tekijää ja selitti 89 % koulutusjoukon ja 89 % testijoukon aktiivisuuksien vaihtelusta (Taulukko 1). Mallilla tuotetun ennusteen perusteella 47 molekyylin pIC_{50} oli välillä 7,5 – 9,3. Kaikkien kolmen mallin mukaan aktiivisuus perustui erityisesti molekyylien tilankäytöllisiin ja hydrofobisiin ominaisuuksiin. Lisäksi AAHHR- ja M-I-pohjaisissa malleissa vetysidosten vastaanottajat vaikuttivat merkittävästi aktiivisuuteen. M-II-pohjaisessa mallissa vetysidosten vastaanottajien lisäksi havaittavaa painoarvoa oli myös luovuttajilla, joskaan vastaanottajien painoarvo ei ollut yhtä suuri kuin AAHHR- ja M-I-pohjaisissa malleissa (Taulukko 2). Korrelaatiokenttien avaruudellinen sijoittuminen kunkin mallin osalta voidaan nähdä Kuva 6.

Taulukko 1. AAHHR:n, M-I:n ja M-II:n seulontatulosten uudelleenpisteytykseen käytettyjen FQSAR-mallien ennustavuudet. Taulukossa nähdään mallien käyttämien PLS-tekijöiden määrä ja mallien ennustavuutta kuvaavat tilastolliset arvot. Arvojen perusteella mallit kykenivät ennustamaan aktiivisten molekyylien koulutus- ja testijoukkojen aktiivisuudet hyvällä tarkkuudella (R^2 ja Q^2). R^2 -S-arvot (R^2 Scramble) jäivät alle 0,5:n, jonka perusteella mallit eivät olleet yliennustavia.

	PLS	R^2	R^2 -S	Q^2
AAHHR	3	0,87	0,41	0,81
M-I	3	0,74	0,46	0,72
M-II	1	0,89	0,38	0,89

Taulukko 2. AAHHR-, M-I- ja M-II-pohjaisten FQSAR-mallien korrelaatiokenttien painoarvot. Kentät kuvaavat ligandien fysikokemiallisten ominaisuuksien vaikutusta aktiivisuuteen. Suurempi arvo tarkoittaa suurempaa merkitystä aktiivisuuden kannalta.

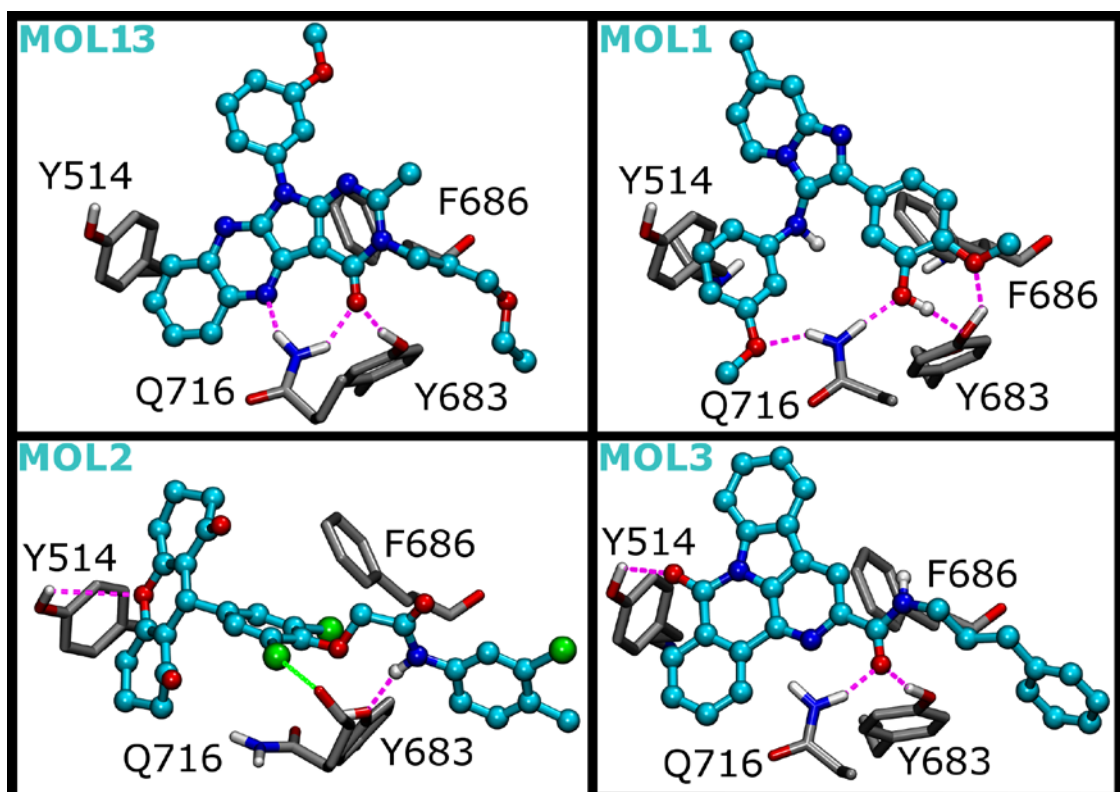
	Tilankäyttö	Elektrostaattinen	Hydrofobinen	H-sidos vastaanottaja	H-sidos luovuttaja
AAHHR	0,425	0,07	0,207	0,241	0,057
M-I	0,49	0,057	0,198	0,207	0,048
M-II	0,394	0,078	0,236	0,149	0,144



Kuva 6. PDE10A-estäjien virtuaaliseulonassa käytettyjen FQSAR-mallien korrelaatiokenttien sijoittuminen. Kuvassa nähdään eri fysikokemiallisten ominaisuuksien vaikutusta aktiivisuuteen kuvaavat kentät. Aktiivisuutta kasvattava tilankäyttö vihreällä, hydrofobisuus keltaisella, negatiivinen varaus punaisella, positiivinen varaus sinisellä, vetysidosten vastaanottajat tummanpunaisella ja luovuttajat tummanpurppuralla. Aktiivisuutta vähentävä hydrofobisuus valkoisella, vetysidosten vastaanottajat purppuralla ja luovuttajat turkoosilla. AAHHR- ja M-I-kuvissa nähtävillä myös PDB-rakenteen 3SN7 ja M-II-kuvassa rakenteen 4HEU PDE10A-estäjä aseteltuna päällekkäin mallin kanssa. Johtuen piirtoteknisistä syistä, kuvissa nähtävien kenttien intensiteetit eivät korreloi fysikokemiallisille ominaisuuksille määritettyjen painoarvojen kanssa.

3.1.2 Lupaavimmat PDE10A-estäjäkandidaatit

Uudelleen pisteytettyjen AAHHR-seulonnan tulosten telakoinnin ja energiaminimisaation perusteella yksi molekyyli (MOL13) valittiin kokeellisiin testeihin. Erityisen potentiaalisen PDE10A-estäjän MOL13:sta teki tämän sisältämä GLN-TYR-alueelle sijoittuva runko-osa, joka kykeni vastaanottamaan kaksi vetysidosta Q716:lta ja yhden Y683:lta (Kuva 7). Rungon aromaattiset renkaat mahdollistivat myös optimaalisen pakkautumisen F686:n ja F719:n väliin. Näiden sitoutumista edistävien ominaisuuksien vuoksi runko-osaa hyödynnettiin myös PANTHER-mallissa M-I. MOL13:n sitoutumisenergiaksi laskettiin -49,283 kcal/mol, joka ennakoiki molekyylistä 3SN7:n alkuperäisen ligandin (laskennallinen sitoutumisenergia: -46,883 kcal/mol, pIC₅₀ = 9,2) kanssa yhtä tehokasta PDE10A-estäjää.

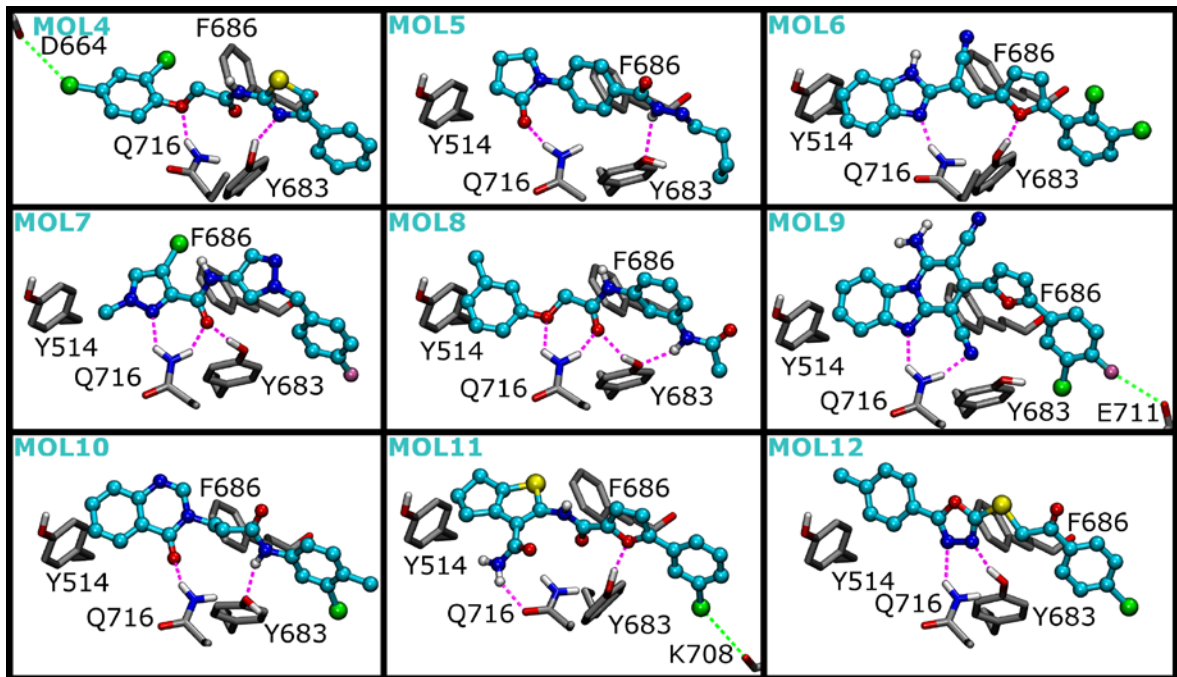


Kuva 7. Farmakoforimallilla AAHHR sekä PANTHER-malleilla M-I ja M-II tehdyillä PDE10A-estäjien virtuaalseulonnoilla löydettyjen molekyylien sitoutuminen. MOL13 löydettiin mallilla AAHHR, MOL1 mallilla M-I ja MOL2 sekä MOL3 mallilla M-II. PDE10A-estäjäkandidaattien hiili esitetty turkoosilla, happi punaisella, typpi sinisellä, vety valkoisella ja kloori vihreällä. Aminohappojen hiili on värjätty harmaalla, muuten väritykset ovat samat kuin edellä. Vetysidokset on merkitty purppuralla ja halogeenisidokset vihreällä katkoviivalla.

Myös M-I:n seulontatulosten sitoutumisennusteiden tarkastelu johti yhden molekyylin (MOL1) valintaan kokeellisiin testeihin. MOL1:n sitoutumisenergiaksi laskettiin $-62,948$ kcal/mol, jonka mukaan molekyyli sitoutuisi 3SN7:n alkuperäistä ligandia tehokkaammin. Energiaminimoitujen rakenteiden visuaalisen tarkastelun perusteella MOL1 muodosti M-I:n seulontatuloksista eniten vetysidoksia GLN-TYR-alueella, jonka takia se päätettiin testata kokeellisesti (Kuva 7).

M-II:n seulontatuloksista kaksi molekyyliä valittiin kokeellisiin testeihin (MOL2 ja MOL3). Molemmat muodostivat sitoutumista suosivia vuorovaikutuksia GLN-TYR-alueella, jonka lisäksi molekyylit täyttivät PDE10A:n selektiivisyystaskun ja THR-alueen (Kuva 7). MM/GBSA ennusti MOL2:lle sitoutumisenergiaksi $-72,828$ kcal/mol, joka ennakoi hieman rakenteen 4HEU alkuperäistä ligandia ($-87,518$ kcal/mol) heikompaa sitoutumista. MOL3:n laskennallinen sitoutumisenergia oli $-85,774$ kcal/mol, eli MOL3:n sitoutumisaffiniteetin ennustettiin olevan 4HEU:n alkuperäisen ligandin luokkaa.

M-III:lla tehdyn seulonnan parhaiden molekyylien sitoutumiskonformaatiot ennustettiin SHAEP:n ennustaman sitoutumisen lisäksi telakoimalla parhaat tulokset PLANTS:lla PDB-rakenteeseen 3SN7. Kaikkiaan 9 molekyyliä (MOL4-12) valittiin kokeellisiin testeihin sitoutumisennusteiden perusteella. Kaikki valitut molekyylit kykenivät muodostamaan vähintään kaksi vetysidosta GLN-TYR-alueella ja asettivat hydrofobiseen ympäristöön sopivan ryhmän selektiivisyystaskuun (Kuva 8). Valittujen molekyylien PLANTS-konformaatioiden ennustetut sitoutumisenergiat olivat välillä $-46,702$ - $-58,432$ kcal/mol, joka ennakoi tehokkaampaa tai vähintään saman luokan sitoutumista kuin 3SN7:n alkuperäisellä ligandilla.



Kuva 8. PANTHER-mallilla M-III tehdyllä virtuaaliselonnalla löydetty molekyylit. PDE10A-estäjäkandidaattien hiili esitetty turkoosilla, happi punaisella, typpi sinisellä, vety valkoisella, rikki keltaisella, fluori vaaleanpunaisella ja kloori vihreällä. Aminohappojen hiili värjätty harmaalla, muuten väritykset ovat samat kuin edellä. Vetysidokset on merkitty purppuralla ja halogeenisidokset vihreällä katkoviivalla.

3.2 Kolme uutta aktiivista PDE10A-estäjä-molekyyliä

Kokeellisesti testattiin yhteensä 13 molekyyliä (Taulukko 3, LIITE 1). Testatuista molekyyleistä kolme (MOL1, MOL2 ja MOL4) osoittautui aktiivisiksi PDE10A-estäjiksi. MOL1:n, MOL2:n ja MOL4:n IC_{50} -arvoiksi määritettiin 26,8 μ M, 48,8 μ M ja 67,0 μ M. Loput molekyylit määritettiin inaktiivisiksi liian vähäisen tai olemattoman PDE10A:n aktiivisuudessa havaitun muutoksen takia.

Taulukko 3. Kokeellisiin testeihin valitut PDE10A-estäjäkandidaatit. Taulukossa nähdään molekyylien nimet ja näiden SPECS-tietokannan tunnukset, kokeellisesti määritetyt IC₅₀-arvot, näistä lasketut pIC₅₀-arvot, laskennalliset sitoutumisenergiat, FQSAR-malleilla ennustetut pIC₅₀-arvot, sekä QIKPROP-ennusteet veriaivoesten läpäisevyydelle (QPlogBB) ja lääkeaineen kaltaisille ominaisuuksille (Ro5 = viiden sääntö, Lipinski ym. 1997; Ro3 = kolmen sääntö, Congreve ym. 2003). Ro5- ja Ro3-sarakkeissa on ilmoitettu molekyylin rikkeiden määrä näitä sääntöjä kohtaan (esim. MOL1 toteuttaa molemmat säännöt täysin, kun taas MOL2 rikkoo yhtä viiden säännön kohdista). Taulukosta nähdään myös malli, jolla kukin molekyyli on löydetty. Aktiivisiksi määritettiin molekyylit, joiden mitattu IC₅₀ oli alle 100 µM.

Molekyyli	Molekyyli (SPECS-tunnus)	IC ₅₀ (µM)	pIC ₅₀	MM/GBSA (Kcal/mol)	Ennustettu pIC ₅₀	QPlogBB	Ro5	Ro3	Malli
MOL1	AT-057-43485961	26,8	4,572	-62,948	9,219	0,527	0	0	M-I
MOL2	AM-879-42012742	48,8	4,312	-72,828	9,382	0,052	1	0	M-II
MOL3	AO-022-43453889	- ¹	- ¹	-85,774	7,583	0,333	0	0	M-II
MOL4	AG-690-09287047	67	4,174	-58,432	- ³	1,03	0	0	M-III
MOL5	AG-205-09068036	>100	<4	-47,282	- ³	-0,014	0	1	M-III
MOL6	AG-690-36108027	>100	<4	-52,288	- ³	0,559	0	0	M-III
MOL7	AK-968-15360495	>100	<4	-46,702	- ³	0,669	0	0	M-III
MOL8	AN-329-43449158	>100	<4	-50,464	- ³	0,139	0	0	M-III
MOL9	AN-465-14013021	>100	<4	-49,44	- ³	-0,064	1	2	M-III
MOL10	AP-853-42879195	>100	<4	-53,995	- ³	0,397	0	0	M-III
MOL11	AP-970-41728638	>100	<4	-48,305	- ³	0,197	0	1	M-III
MOL12	AP-853-42160322	- ²	- ²	-49,78	- ³	0,687	0	0	M-III
MOL13	AO-022-43390442	- ²	- ²	-49,283	10,112	0,478	0	0	AAHR

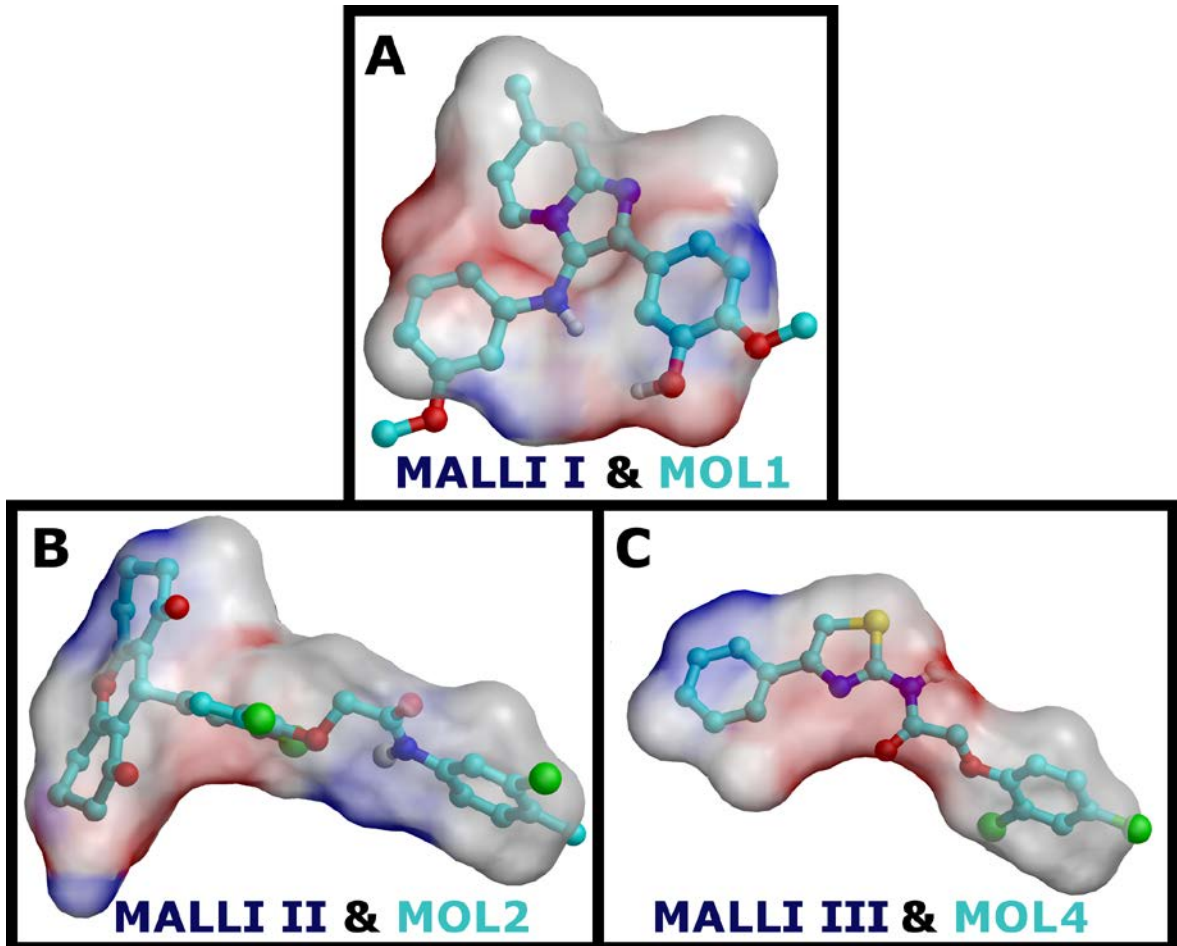
¹ Ei liuennut.

² Ei muutosta PDE10A:n aktiivisuudessa.

³ Ei FQSAR-käsittelyä.

MOL1 oli aktiivisin löydetyistä molekyyleistä. Sitoutumisennusteen mukaan MOL1:n aktiivisuus selittyi erityisesti neljällä GLN-TYR-alueella muodostuvalla vetysidoksella (Kuva 7). MOL1:n nähtiin vastaanottavan kaksi vetysidosta Q716:n sivuketjun aminoryhmältä sekä muodostavan kaksi vetysidosta Y683:n hydroksyyliiryhmän kanssa. Energiaminimisaatiolla saatiin optimoitua erityisesti

Q716:n ja Y683:n väliin sijoittuvan hydroksyyliiryhmän konformaatio (vrt. Kuva 9A ja Kuva 7). MOL1 myös sijoitti aromaattisen renkaan lähelle GLN-TYR-aluetta, pakkautuen F686:n ja F719:n väliin sitoutumista edistävällä tavalla.



Kuva 9. PDE10A-estäjien virtuaaliseulonassa löydettyjen aktiivisten molekyylien päällekkäinasettelut PANTHER-mallien kanssa. A. MOL1:n päällekkäinasettelu PANTHER-mallin M-I kanssa ja molekyylin SHAEP:n tuottama sitoutumiskonformaatio. B. MOL2:n päällekkäinasettelu PANTHER-mallin M-II kanssa ja molekyylin SHAEP-konformaatio. C. MOL4:n päällekkäinasettelu PANTHER-mallin M-III kanssa sekä molekyylin SHAEP-konformaatio. PANTHER-mallit on esitetty potentiaalipintoina (punainen kuvaa negatiivista, sininen positiivista ja vaalea neutraalia varausta). MOL1, MOL2 ja MOL4 on esitetty palloina ja tikkuina, hiili turkoosina, happi punaisena, typpi sinisenä ja vety valkoisena.

Löydetyistä PDE10A-estäjistä toiseksi aktiivisin, MOL2, muodosti sitoutumisennusteen mukaan GLN-TYR-alueella yhden vetysidoksen Y683:n kanssa sekä halogeenisidoksen Q716:n rungon karbonyyliiryhmän kanssa (Kuva 7). Lisäksi MOL2 vastaanotti vetysidoksen Y514:lta syvemmillä taskussa.

Energiaminimisaation voidaan nähdä edesauttaneen erityisesti GLN-TYR-alueella syntyvän vetysidoksen muodostumista (vrt. Kuva 7 ja Kuva 9B) Selektiivisyystaskun MOL2 täytti hydrofobiseen ympäristöön hyvin sopivalla 3-kloori-4-metyylifenyyliryhmällä.

MOL2:n MM/GBSA:lla tuotetussa sitoutumisennusteessa huomio kiinnittyi erityisesti Q716:n konformaatioon (Kuva 7). Q716:n aminoryhmä oli energiaminimisaation seurauksena kääntynyt kohti THR-aluetta, kun se tavallisesti osoittaa kohti taskun keskustaa (kuten esim. Kuva 7, MOL1). Sitoutumisennusteen konformaatio kuitenkin mahdollisti edellä mainitun halogeenisidoksen muodostumisen, jonka lisäksi aminoryhmän siirros jätti enemmän tilaa MOL2:lle optimaalisen sitoutumiskonformaation muodostamiseen. Vastaava Q716:n konformaatio on nähtävillä esimerkiksi PDB-rakenteissa 4LKQ ja 4DFF, jonka takia ennustetta voidaan pitää mahdollisena (Ho ym. 2012; Recht ym. 2014). Q716:n ennustetun konformaation aminoryhmän lähellä nähdään useissa kiderakenteissa myös vesimolekyyli, joka voisi mahdollistaa vesivälitteisen vetysidoksen muodostumisen aminoryhmän ja MOL2:n kyseiselle alueelle asettaman karbonyyliryhmän välille.

Kolmanneksi aktiivisimman uuden PDE10A-estäjän, MOL4:n, sitoutumisen täsmällinen ennustaminen osoittautui haastavaksi. PLANTS:lla ja SHAEP:lla tuotetut sitoutumisennusteet poikkesivat merkittävästi toisistaan (vrt. Kuva 8 ja Kuva 9C). PLANTS-telakoinnilla tuotetussa ennusteessa MOL4 vastaanotti yhden vetysidoksen sekä Q716:lta että Y683:lta, jonka lisäksi mahdollisuus halogeenisidokseen D664:n rungon karbonyyliryhmän kanssa nähtiin syvemmillä taskussa (Kuva 8). Selektiivisyystaskuun MOL4 asetti fenyyli-ryhmän. SHAEP:n ennustamassa sitoutumiskonformaatiossa MOL4 asettui taskuun toisin päin, asettaen dikloorifenyyli-ryhmän selektiivisyystaskuun ja fenyyli-ryhmän syvemmälle sitoutumistaskuun (Kuva 9C). Myös SHAEP-konformaatiossa MOL4 vastaanotti vetysidokset Q716:lta ja Y683:lta, jonka lisäksi mahdollinen halogeenisidos havaittiin dikloorifenyylin ja E711:n sivuketjun välillä. Pelkkien havaittavien vuorovaikutusten perusteella oli siis hyvin vaikea sanoa, kumpi

konformaatioista olisi todennäköisempi sitoutumiskonformaatio. Merkittävää eroa konformaatioiden suotuisuuden välille ei löydetty myöskään sitoutumisenergiälaskujen avulla. PLANTS-konformaation laskennallinen sitoutumisenergia oli -58,432 kcal/mol ja SHAEP-konformaation -59,044 kcal/mol.

Löydettyjen aktiivisten molekyylien QIKPROP-ennusteiden mukaan kaikki kolme kykenevät läpäisemään veriaivoesteen (Taulukko 3). Kaikki molekyylit myös toteuttivat johtolankamolekyylin kaltaisia ominaisuuksia kuvaavan kolmen säännön (Congreve ym. 2003). Lääkeaineen kaltaisia ominaisuuksia kuvaavan Lipinskin viiden säännön toteuttivat MOL1 ja MOL4 (Lipinski ym. 1997). MOL2 ylitti viiden säännön suosittelman molekyylipainon (MOL2: 560,86 g/mol, viiden säännön mukaan alle 500 g/mol).

4 TULOSTEN TARKASTELU

Kolme uutta aktiivista PDE10A-estäjää löydettiin testaamalla kokeellisesti ainoastaan 13 molekyyliä n. 140 000 yhdistettä sisältäneestä tietokannasta. Tulosta voidaan pitää erinomaisena osoituksena virtuaaliseulonnan kyvystä huomattavasti vähentää uusien potentiaalisten lääkeaineiden löytämiseen vaadittavia ajallisia ja taloudellisia resursseja kokeelliseen HTS:ään verrattuna. Kaikki aktiiviset molekyylit löydettiin PANTHER-mallinnuksen avulla, joka on jo aiemmin osoitettu erittäin nopeaksi menetelmäksi muihin rakenneperustaisiin virtuaaliseulontatekniikoihin, kuten esimerkiksi telakointiin, verrattuna (Niinivehmas ym. 2015). Näin ollen työn suorituksessa päästiin äärimmäisen hyvään tehokkuuteen myös laskennallisten resurssien käytön osalta.

Löydetyt aktiiviset molekyylit (MOL1, MOL2 ja MOL4) sopivat QIKPROP-ennusteiden mukaan hyvin tyypillisen lääkeaineen profiiliin. Molekyylit toteuttivat kolmen säännön sekä viiden säännön, poikkeuksena MOL2, jonka molekyylipaino ylitti viiden säännön suosittelman rajan (Lipinski ym. 1997; Congreve ym. 2003). Molekyylipainon merkitystä lääkeaineenkaltaisten ominaisuuksien kuvaamisessa on kuitenkin kyseenalaistettu, ja sen korvaamista polaarista pinta-alaa sekä pyörivien sidosten määrää kuvaavilla parametreilla on ehdotettu (Veber ym. 2002). Kaikki aktiiviset molekyylit ennustettiin myös veriaivoesteen läpäiseviksi, joka on PDE10A:han kohdistuvalle lääkeaineelle entsyymien ensisijaisesti aivoissa tapahtuvan ekspresion takia ensiarvoisen tärkeää (Lakics ym. 2010).

Uusien PDE10A-estäjien soveltuvuutta PDE10A:han kohdistuviksi lääkeaineiksi arvioitiin kuitenkin ensisijaisesti kokeellisesti määritettyjen IC_{50} -arvojen avulla. MOL1:lle, MOL2:lle ja MOL4:lle mitattujen mikromolaarisen kokoluokan IC_{50} -arvojen perusteella molekyylien sitoutumisen tehokkuus jäi melko kauas vahvimmistä tunnetuista PDE10A-estäjistä, joille on mitattu pikomolaarisen kokoluokan IC_{50} -arvoja (ks. katsausartikkeli Chappie ym. 2012). On kuitenkin syytä ottaa huomioon, että vahvimmat PDE10A-estäjät ovat mittavan,

huomattavia resursseja vaatineen rakenteellisen optimoinnin tuotoksia. Näin ollen MOL1:n, MOL2:n ja MOL4:n voidaan sanoa toimivan ennen kaikkea hyvänä lähtökohtana uusien, tehokkaampien PDE10A-estäjien kehitykselle.

MOL1, MOL2 ja MOL4 poikkeavat rakenteellisesti ja siten sitoutumisen yhteydessä muodostuvilta vuorovaikutuksilta merkittävästi toisistaan. MOL1:n rakenne ja sitoutuminen edustavat tyypillistä PDE10A:n ligandin sitoutumistaskun keskiosaan, GLN-TYR-alueen lähelle sijoittuvaa molekyyliä, jollaisista M-I:n pohjana käytetty MJ1 koostuu (mm. PDB-rakenne 3SN7, Malamas ym. 2011). Tällaisten PDE10A-estäjien mahdollisena ongelmana lääkeainekehityksen kannalta on PDE10A:n selektiivisyytaskun täyttämättä jättäminen. Vastaavan mallisten molekyylien tiedetään hyvistä sitoutumisaffiniteetista huolimatta usein sitoutuvan myös osaan muista PDE-tyypeistä, kuten esimerkiksi PDE2:een (Malamas ym. 2011). MOL2 ja MOL4 sen sijaan ilmentävät selektiivisyytaskun täyttävää sitoutumiskonformaatiota, joka tekee niistä tältä osin MOL1:a potentiaalisempia alkupisteitä uusien lääkeaineiden kehitykselle. Tässä työssä löydettyjen molekyylien PDE10A-selektiivisyys on kuitenkin syytä määrittää tarkemmin lisätutkimuksilla.

Tehokkaampien PDE10A-estäjien kehityksessä merkittävää hyötyä voitaisiin saada työssä luoduista aktiivisten molekyylien sitoutumisennusteista sekä FQSAR-malleista. PANTHER-malleilla tehtyihin päällekkäinasetteluihin perustuvat FQSAR-mallit sijoittavat molekyylin aktiivisuutta edistäviä ja vähentäviä ominaisuuksia kuvaavat kentät suoraan PDE10A:n sitoutumistaskun eri alueille. Tämä mahdollistaa paremmin ligandin ja proteiinin välille syntyvien vuorovaikutusten huomioon ottamisen uusien molekyylien suunnittelussa puhtaasti ligandipohjaiseen FQSAR-malliin verrattuna. Luotuja FQSAR-malleja ja sitoutumisennusteita voitaisiin käyttää esimerkiksi löydettyjen molekyylien kemiallisella synteesillä tehtävän sitoutumisominaisuuksien optimoinnin tukena (Lewis 2005).

Myös virtuaaliseulonta voisi edelleen tarjota mahdollisuuksia löytää tehokkaammin sitoutuvia molekyyliä. Kuten työssä saavutetut tulokset

osoittavat, PANTHER-mallinnus toimi PDE10A-estäjien virtuaaliseulonnassa erinomaisesti. Aktiivisia molekyyliä löydettiin sekä yhdistämällä PANTHER- ja FQSAR-mallinnus että käyttämällä SHAEP:n pisteytysfunktiota lupaavimpien PDE10A-estäjäkandidaattien valinnassa. PANTHER-mallit I-III kuitenkin kattoivat vain osan PDE10A:n melko suurikokoisesta sitoutumistaskusta. Tehokkaammin sitoutuvia PDE10A-estäjiä voitaisiinkin löytää ulottamalla malleja laajemmalle alueelle, jolloin useampien sitoutumista edistävien vuorovaikutusten muodostuminen tulisi mahdolliseksi. Käytettyjen mallien suoriutumista arvioidessa on syytä ottaa myös huomioon seulonnoissa käytetyn molekyyli-tietokannan suhteellisen pieni koko. Vain 140 000 molekyyliä käsittävässä tietokannassa ei välttämättä ole PDE10A:han tehokkaasti sitoutuvia molekyyliä. PANTHER-mallien I-III avulla voisi siis mahdollisesti löytää voimakkaammin sitoutuvia molekyyliä seulomalla suurempikokoisia ja kenties erilaisen osan kemiallisten yhdisteiden avaruudesta kattavia tietokantoja.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Useisiin vaikeasti lääkittäviin sairauksiin liitettyyn PDE10A:han kohdistuvien lääkeaineiden kehittäminen on osoittautunut vaikeaksi tehtäväksi, jonka takia uusien lääkeainekandidaattien löytäminen ja kehitys on edelleenkin tärkeää. Tässä tutkimuksessa löydetty kolme uutta PDE10A-estäjää sekä näiden aktiivisuuden selittävät mallit tarjoavat tämän haasteen selvittämiseksi uusia potentiaalisia lähtökohtia. Työn tuloksia voidaan pitää myös hyvänä osoituksena virtuaaliseulonnan tarjoamasta mahdollisuudesta lääkeaine-etsintään käytettävien ajallisten ja taloudellisten resurssien käytön tehostamisen kannalta. PANTHER-mallinnuksella saavutetut tulokset osoittivat menetelmän toimivuuden PDE10A-estäjien virtuaaliseulonnessa, jonka seurauksena myös uusien, tilankäytöllisesti kattavampien PANTHER-mallien kehitystä voidaan pitää jatkoa ajatellen lupaavana strategiana entistä tehokkaampien PDE10A-estäjien etsinnässä.

KIITOKSET

Kiitän työn ohjaajia, professori Olli Pentikäistä ja dosentti Pekka Postilaa, mielenkiintoisesta projektista ja ohjauksesta sekä kannustuksesta työn aikana. Kiitokset myös muille Laskennallisen biotieteen laboratorion jäsenille ohjauksesta erityisesti työn käytännön osuuden suorituksen yhteydessä. Lopuksi kiitän myös Tieteen tietotekniikan keskusta (www.csc.fi) avokätisestä laskentaresurssien tarjoamisesta ja siten tämän työn saumattoman suorituksen mahdollistamisesta.

KIRJALLISUUS

- Bajorath J. 2002. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature reviews. Drug discovery* 1: 882–894.
- Bas D.C., Rogers D.M. & Jensen J.H. 2008. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins* 73: 765–783.
- Beavo J.A. & Brunton L.L. 2002. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3: 710–718.
- Bento A.P., Gaulton A., Hersey A., Bellis L.J., Chambers J., Davies M., Krüger F.A., Light Y., Mak L., McGlinchey S., Nowotka M., Papadatos G., Santos R. & Overington J.P. 2014. The ChEMBL bioactivity database: An update. *Nucleic Acids Research* 42: 1083–1090.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N. & Bourne P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235–242.
- Boolell M., Allen M.J., Ballard S.A., Gepi-Attee S., Muirhead G.J., Naylor A.M., Osterloh I.H. & Gingell C. 1996. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *International journal of impotence research* 8: 47–52.
- Chappie T.A., Helal C.J. & Hou X. 2012. Current landscape of phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* 55: 7299–7331.
- Charifson P.S., Corkery J.J., Murcko M.A. & Walters W.P. 1999. Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *Journal of medicinal chemistry* 42: 5100–5109.
- Codutti L., Grimaldi M. & Carlomagno T. 2017. Structure-Based Design of Scaffolds Targeting PDE10A by INPHARMA-NMR. *Journal of Chemical Information and Modeling* 57: 1488–1498.
- Congreve M., Carr R., Murray C. & Jhoti H. 2003. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discovery Today* 8: 876–877.
- Dixon S.L., Smondirev A.M., Knoll E.H., Rao S.N., Shaw D.E. & Friesner R.A. 2006a. PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *Journal of computer-aided molecular design* 20: 647–671.
- Dixon S.L., Smondirev A.M. & Rao S.N. 2006b. PHASE: a novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching. *Chemical biology & drug design* 67: 370–372.
- Fabbri L.M., Calverley P.M.A., Izquierdo-Alonso J.L., Bundschuh D.S., Brose M., Martinez F.J. & Rabe K.F. 2009. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet (London, England)* 374: 695–703.

- Fan H.-T., Guo J.-F., Zhang Y.-X., Gu Y.-X., Ning Z.-Q., Qiao Y.-J. & Wang X. 2018. The rational search for PDE10A inhibitors from *Sophora flavescens* roots using pharmacophore and dockingbased virtual screening. *Molecular medicine reports* 17: 388–393.
- Francis S.H., Blount M.A. & Corbin J.D. 2011. Mammalian Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Physiological Reviews* 91: 651–690.
- Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T., Repasky M.P., Knoll E.H., Shelley M., Perry J.K., Shaw D.E., Francis P. & Shenkin P.S. 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry* 47: 1739–1749.
- Fujishige K., Kotera J., Michibata H., Yuasa K., Takebayashi S., Okumura K. & Omori K. 1999. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *The Journal of biological chemistry* 274: 18438–18445.
- Garcia A.M., Brea J., Gonzalez-Garcia A., Perez C., Cadavid M.I., Loza M.I., Martinez A. & Gil C. 2017. Targeting PDE10A GAF Domain with Small Molecules: A Way for Allosteric Modulation with Anti-Inflammatory Effects. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22.
- Giampa C., Laurenti D., Anzilotti S., Bernardi G., Menniti F.S. & Fusco F.R. 2010. Inhibition of the striatal specific phosphodiesterase PDE10A ameliorates striatal and cortical pathology in R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS one* 5: e13417.
- Grauer S.M., Pulito V.L., Navarra R.L., Kelly M.P., Kelley C., Graf R., Langen B., Logue S., Brennan J., Jiang L., Charych E., Egerland U., Liu F., Marquis K.L., Malamas M., Hage T., Comery T.A. & Brandon N.J. 2009. Phosphodiesterase 10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive, and negative symptoms of schizophrenia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 331: 574–590.
- Greenwood J.R., Calkins D., Sullivan A.P. & Shelley J.C. 2010. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. *Journal of computer-aided molecular design* 24: 591–604.
- Hankir M.K., Kranz M., Gnad T., Weiner J., Wagner S., Deuther-Conrad W., Bronisch F., Steinhoff K., Luthardt J., Kloting N., Hesse S., Seibyl J.P., Sabri O., Heiker J.T., Blüher M., Pfeifer A., Brust P. & Fenske W.K. 2016. A novel thermoregulatory role for PDE10A in mouse and human adipocytes. *EMBO molecular medicine* 8: 796–812.
- Harada A., Suzuki K. & Kimura H. 2017. TAK-063, a Novel Phosphodiesterase 10A Inhibitor, Protects from Striatal Neurodegeneration and Ameliorates Behavioral Deficits in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 360: 75–83.
- Harder E., Damm W., Maple J., Wu C., Reboul M., Xiang J.Y., Wang L., Lupyan D., Dahlgren M.K., Knight J.L., Kaus J.W., Cerutti D.S., Krilov G., Jorgensen W.L., Abel R. & Friesner R.A. 2016. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-

- like Small Molecules and Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation* 12: 281–296.
- Heckman P.R.A., Duinen M.A. van, Bollen E.P.P., Nishi A., Wennogle L.P., Blokland A. & Prickaerts J. 2016. Phosphodiesterase Inhibition and Regulation of Dopaminergic Frontal and Striatal Functioning: Clinical Implications. *The international journal of neuropsychopharmacology*.
- Ho G.D., Michael Seganish W., Bercovici A., Tulshian D., Greenlee W.J., Rijn R. Van, Hruza A., Xiao L., Rindgen D., Mullins D., Guzzi M., Zhang X., Bleickardt C. & Hodgson R. 2012. The SAR development of dihydroimidazoisoquinoline derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors for the treatment of schizophrenia. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 22: 2585–2589.
- Humphrey W., Dalke A. & Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* 14: 27–28,33–38.
- Jacobson M.P., Friesner R.A., Xiang Z. & Honig B. 2002. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *Journal of Molecular Biology* 320: 597–608.
- Jacobson M.P., Pincus D.L., Rapp C.S., Day T.J.F., Honig B., Shaw D.E. & Friesner R.A. 2004. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* 55: 351–367.
- Jenkins J.L., Kao R.Y.T. & Shapiro R. 2003. Virtual screening to enrich hit lists from high-throughput screening: a case study on small-molecule inhibitors of angiogenin. *Proteins* 50: 81–93.
- Jones G., Willett P., Glen R., Leach A. & Taylor R. 1997. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of molecular biology* 267: 727–748.
- Klebe G. & Abraham U. 1999. Comparative Molecular Similarity Index Analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 13: 1–10.
- Klebe G., Abraham U. & Mietzner T. 1994. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *Journal of medicinal chemistry* 37: 4130–4146.
- Korb O., Stütze T. & Exner T.E. 2009. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *Journal of chemical information and modeling* 49: 84–96.
- Kraulis P.J. 1991. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 24: 946–950.
- Kunitomo J., Yoshikawa M., Fushimi M., Kawada A., Quinn J.F., Oki H., Kokubo H., Kondo M., Nakashima K., Kamiguchi N., Suzuki K., Kimura H. & Taniguchi T. 2014. Discovery of 1-[2-Fluoro-4-(1H-pyrazol-1-yl)phenyl]-5-methoxy-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)pyridazin-4(1H)-one (TAK-063), a Highly Potent, Selective, and Orally Active Phosphodiesterase 10A (PDE10A) Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* 57: 9627–9643.

- Kurkinen S.T., Niinivehmas S., Ahinko M., Lätti S., Pentikäinen O.T. & Postila P.A. 2018. Improving Docking Performance Using Negative Image-Based Rescoring. *Frontiers in Pharmacology* 9.
- Lakics V., Karran E.H. & Boess F.G. 2010. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59: 367–374.
- Lehtonen J. V, Still D.-J., Rantanen V.-V., Ekholm J., Björklund D., Iftikhar Z., Huhtala M., Repo S., Jussila A., Jaakkola J., Pentikäinen O., Nyrönen T., Salminen T., Gyllenberg M. & Johnson M.S. 2004. BODIL: a molecular modeling environment for structure-function analysis and drug design. *Journal of computer-aided molecular design* 18: 401–419.
- Lewis R.A. 2005. A general method for exploiting QSAR models in lead optimization. *Journal of medicinal chemistry* 48: 1638–1648.
- Li J., Abel R., Zhu K., Cao Y., Zhao S. & Friesner R.A. 2011. The VSGB 2.0 Model: A Next Generation Energy Model for High Resolution Protein Structure Modeling. *Proteins* 79: 2794–2812.
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W. & Feeney P.J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23: 3–25.
- Loughney K., Snyder P.B., Uher L., Rosman G.J., Ferguson K. & Florio V.A. 1999. Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 234: 109–117.
- Malamas M., Ni Y. & Erdei J. 2011. Highly potent, selective, and orally active phosphodiesterase 10A inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 54: 7621–7638.
- Markt P., Feldmann C., Rollinger J.M., Raduner S., Schuster D., Kirchmair J., Distinto S., Spitzer G.M., Wolber G., Laggner C., Altmann K.-H., Langer T. & Gertsch J. 2009. Discovery of novel CB2 receptor ligands by a pharmacophore-based virtual screening workflow. *Journal of medicinal chemistry* 52: 369–378.
- Maurice D.H., Ke H., Ahmad F., Wang Y., Chung J. & Manganiello V.C. 2014. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nature reviews. Drug discovery* 13: 290–314.
- Merritt E.A. & Bacon D.J. 1997. Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods in enzymology* 277: 505–524.
- Niccolini F., Foltynie T., Reis Marques T., Muhlert N., Tziortzi A.C., Searle G.E., Natesan S., Kapur S., Rabiner E.A., Gunn R.N., Piccini P. & Politis M. 2015. Loss of phosphodiesterase 10A expression is associated with progression and severity in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 138: 3003–3015.
- Niinivehmas S.P., Manivannan E., Rauhamäki S., Huuskonen J. & Pentikäinen O.T. 2016. Identification of estrogen receptor a ligands with virtual screening techniques. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 64: 30–39.

- Niinivehmas S., Postila P.A., Rauhamaki S., Manivannan E., Kortet S., Ahinko M., Huuskonen P., Nyberg N., Koskimies P., Latti S., Multamaki E., Juvonen R.O., Raunio H., Pasanen M., Huuskonen J. & Pentikainen O.T. 2018. Blocking oestradiol synthesis pathways with potent and selective coumarin derivatives. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 33: 743–754.
- Niinivehmas S.P., Salokas K., Lätti S., Raunio H. & Pentikäinen O.T. 2015. Ultrafast protein structure-based virtual screening with Panther. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 29: 989–1006.
- Niinivehmas S.P., Virtanen S.I., Lehtonen J. V, Postila P.A. & Pentikäinen O.T. 2011. Comparison of virtual high-throughput screening methods for the identification of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51: 1353–1363.
- Parkes D.G., Mace K.F. & Trautmann M.E. 2013. Discovery and development of exenatide: the first antidiabetic agent to leverage the multiple benefits of the incretin hormone, GLP-1. *Expert opinion on drug discovery* 8: 219–244.
- Rauhamäki S., Postila P.A., Lätti S., Niinivehmas S., Multamäki E., Liedl K.R. & Pentikäinen O.T. 2018. Discovery of Retinoic Acid-Related Orphan Receptor γ Inverse Agonists via Docking and Negative Image-Based Screening. *ACS Omega* 3: 6259–6266.
- Rauhamaki S., Postila P.A., Niinivehmas S., Kortet S., Schildt E., Pasanen M., Manivannan E., Ahinko M., Koskimies P., Nyberg N., Huuskonen P., Multamaki E., Pasanen M., Juvonen R.O., Raunio H., Huuskonen J. & Pentikainen O.T. 2018. Structure-Activity Relationship Analysis of 3-Phenylcoumarin-Based Monoamine Oxidase B Inhibitors. *Frontiers in chemistry* 6: 41.
- Recht M.I., Sridhar V., Badger J., Bounaud P.-Y., Logan C., Chie-Leon B., Nienaber V. & Torres F.E. 2014. Identification and optimization of PDE10A inhibitors using fragment-based screening by nanocalorimetry and X-ray crystallography. *Journal of biomolecular screening* 19: 497–507.
- Rzasa R.M., Frohn M.J., Andrews K.L., Chmait S., Chen N., Clarine J.G., Davis C., Eastwood H.A., Horne D.B., Hu E., Jones A.D., Kaller M.R., Kunz R.K., Miller S., Monenschein H., Nguyen T., Pickrell A.J., Porter A., Reichelt A., Zhao X., Treanor J.J.S. & Allen J.R. 2014. Synthesis and preliminary biological evaluation of potent and selective 2-(3-alkoxy-1-azetidiny) quinolines as novel PDE10A inhibitors with improved solubility. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 22: 6570–6585.
- Rzasa R.M., Hu E., Rumfelt S., Chen N., Andrews K.L., Chmait S., Falsey J.R., Zhong W., Jones A.D., Porter A., Louie S.W., Zhao X., Treanor J.J.S. & Allen J.R. 2012. Discovery of selective biaryl ethers as PDE10A inhibitors: Improvement in potency and mitigation of Pgp-mediated efflux. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 22: 7371–7375.
- Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R. & Sherman W. 2013. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design* 27: 221–234.

- Schmidt C.J., Chapin D.S., Cianfrogna J., Corman M.L., Hajos M., Harms J.F., Hoffman W.E., Lebel L.A., McCarthy S.A., Nelson F.R., Proulx-LaFrance C., Majchrzak M.J., Ramirez A.D., Schmidt K., Seymour P.A., Siuciak J.A., Tingley F.D. 3rd, Williams R.D., Verhoest P.R. & Menniti F.S. 2008. Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 325: 681–690.
- Schuster D., Nashev L.G., Kirchmair J., Laggner C., Wolber G., Langer T. & Odermatt A. 2008. Discovery of nonsteroidal 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors by pharmacophore-based screening of virtual compound libraries. *Journal of medicinal chemistry* 51: 4188–4199.
- Shelley J.C., Cholleti A., Frye L.L., Greenwood J.R., Timlin M.R. & Uchimaya M. 2007. Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of computer-aided molecular design* 21: 681–691.
- Siuciak J.A., McCarthy S.A., Chapin D.S., Fujiwara R.A., James L.C., Williams R.D., Stock J.L., McNeish J.D., Strick C.A., Menniti F.S. & Schmidt C.J. 2006. Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology* 51: 374–385.
- Soderling S.H., Bayuga S.J. & Beavo J.A. 1999. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7071–7076.
- Stahl M. & Rarey M. 2001. Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. *Journal of medicinal chemistry* 44: 1035–1042.
- Tamm M., Richards D.H., Beghe B. & Fabbri L. 2012. Inhaled corticosteroid and long-acting beta2-agonist pharmacological profiles: effective asthma therapy in practice. *Respiratory medicine* 106 Suppl 1: S9-19.
- Thompson W.J. & Appleman M.M. 1971. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* 10: 311–316.
- Vainio M.J., Puranen J.S. & Johnson M.S. 2009. ShaEP: Molecular overlay based on shape and electrostatic potential. *Journal of Chemical Information and Modeling* 49: 492–502.
- Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.-Y., Smith B.R., Ward K.W. & Kopple K.D. 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry* 45: 2615–2623.
- Verhoest P.R., Chapin D.S., Corman M., Fonseca K., Harms J.F., Hou X., Marr E.S., Menniti F.S., Nelson F., O'Connor R., Pandit J., Proulx-LaFrance C., Schmidt A.W., Schmidt C.J., Siuciak J.A. & Liras S. 2009. Discovery of a novel class of phosphodiesterase 10A inhibitors and identification of clinical candidate 2-[4-(1-methyl-4-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-3-yl)-phenoxy-methyl]-quinoline (PF-2545920) for the treatment of schizophrenia. *Journal of medicinal chemistry* 52: 5188–5196.
- Wang H., Liu Y., Hou J., Zheng M., Robinson H. & Ke H. 2007. Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 5782–5787.

- Watts K.S., Dalal P., Murphy R.B., Sherman W., Friesner R.A. & Shelley J.C. 2010. ConfGen: A conformational search method for efficient generation of bioactive conformers. *Journal of Chemical Information and Modeling* 50: 534–546.
- Word J.M., Lovell S.C., Richardson J.S. & Richardson D.C. 1999. Asparagine and Glutamine: Using Hydrogen Atom Contacts in the Choice of Side-chain Amide Orientation. *J. Mol. Biol.* 285: 1735–1747.
- Yoshikawa M., Kamisaki H., Kunitomo J., Oki H., Kokubo H., Suzuki A., Ikemoto T., Nakashima K., Kamiguchi N., Harada A., Kimura H. & Taniguchi T. 2015. Design and synthesis of a novel 2-oxindole scaffold as a highly potent and brain-penetrant phosphodiesterase 10A inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry* 23: 7138–7149.
- Zoraghi R., Corbin J.D. & Francis S.H. 2004. Properties and Functions of GAF Domains in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Other Proteins. *Molecular Pharmacology* 65: 267–278.

LIITE 1. PDE10A-estäjäkandidaattien kokeellisten mittausten annosvastekäyrät

