

# **Optimiziranje lastnosti biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo pristopov računske kemije**

Raziskovalno področje: Medicina

Raziskovalna naloga

Avtor: Tevž Rus, 3. g

Šolska mentorica: Lara Vertačnik

Zunanji mentor: Sebastjan Kralj

Zunanji somentor: doc. dr. Marko Jukič

Ljubljana, 2024

GIMNAZIJA JOŽETA PLEČNIKA LJUBLJANA

## Kazalo vsebine

1 UVOD.....	6
1.1 Hipoteze .....	6
2 PREGLED LITERATURE IN TEORETSKO OZADJE .....	7
2.1 Virus Ebola in virus Marburg.....	7
2.1.1 Struktura virusa Ebola in virusa Marburg .....	9
2.1.2 Protitelesa in njihova uporaba v farmaciji.....	12
2.2 Računska kemija in racionalno načrtovanje.....	14
2.2.1 PDB format.....	15
2.2.2 PyMol .....	16
2.2.3 SMEHeC .....	17
2.2.4 CHARMM .....	18
3 METODE.....	19
Pregled literature in identifikacija tarče .....	19
Pridobitev struktur PDB.....	19
Primerjava sekvenc proteinov .....	19
Analiza in priprava sistemov v programu PyMol .....	19
Priprava vhodne datoteke za program SMEHeC .....	20
4 REZULTATI .....	21
Analiza rezultatov BLAST .....	21
Analiza rezultatov SMEHeC.....	22
5. RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK.....	24
6. VIRI IN LITERATURA .....	25

## Kazalo slik

Slika 1: A): Slika virus Marburg pod elektronskim mikroskopom [6]), B:	
Slika virusa Ebola po elektronskim mikroskopom [7].....	8
Slika 2: Strukturne enote filovirusa z njihovo prostorsko ureditvijo [13].....	11
Slika 3: Glikoprotein virusa Ebola iz različnih kotov v virusni kapsidi, stranski pogled in pogled od zgoraj [18].....	12
Slika 4: Shematska predstava strukture protitelesa [21] .....	13
Slika 5: Shematski prikaz delovnega toka v računski kemiji [25] .....	15
Slika 6: Izsek PDB datoteke [26] .....	16
Slika 7: Pogled strukture v programu PyMol [28] .....	17
Slika 8: Enačba za izračun statične vezavne energije [29].....	17
Slika 9: Tipični prikaz matematičnega opisa sil na molekule v program za molekularno dinamiko .....	18

Raziskovalna naloga: **Optimitziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije**

Slika 10: Pripravljena sistema glikoproteinov vezanih na protitelo Ansuvimab vizualizirana v programu PyMol.....	20
Slika 11: SMEHeC vhodna datoteka za avtomatsko mutacijo.....	21
Slika 12: Poravnava sekvenc Marbur GP in Ebola GP s programom BLAST.....	22
Slika 13: Rezultati toplotne karte za glikoproteina Ebola (A) in Marbug (B), z rdečimi kvadratki so označene ključne vrednosti in mutacije.....	23
Slika 14: Pogled v vezavno mesto Ansuvimaba in ključne aminokisline.....	23

## POVZETEK

Virusa Ebola in Marburg, ki spadata v družino filovirusov sta že od svojega odkritja v drugi polovici 20. stoletja endemična, predvsem na območju Afrike. Virusna hemoragična mrzlica, ki jo povzročata, je hudo nalezljiva in pogosto smrtna bolezen, za katero je umrlo večje število ljudi.

Tekom raziskovalne naloge sem se želel podrobnejše seznaniti z virusoma in preko raziskovalne naloge prispevati k razvoju učinkovitega zdravila. Raziskovalna naloga se je pričela s pregledom literature, ki je poglobila razumevanje o biokemijskem ozadju obeh virusov in o potencialnih možnostih za zaviranje delovanja virusov. Po osvojitvi potrebnega znanja o virusih, natančeneje filovirusih, protitelesih in proteinih ter proteinskih interakcijah, smo začeli z empiričnim delom naloge s pomočjo računalnika.

Osnovni namen naloge je bil poglobljeno razumevanje delovanja filovirusov, kot tudi vpliva mutacij na njihovo vezavo na protitelesa. S pomočjo literature in računalniških programov smo proučili delovanje in strukturo filovirusov ter protiteles ki zavirajo njihovo delovanje, opredelili ustrezne tarče za razvoj zdravila ter vizualizirali ustrezne proteinske komplekse glikoproteinov in protiteles. Na podlagi le-teh smo odkrili ustrezna skupna vezavna mesta obeh virusnih glikoproteinov ter ustrezne mutacije protiteles za močnejšo vezavo, ki smo jih kvantitativno ovrednotili.

**KLJUČNE BESEDE:** molekularno modeliranje, računska kemija, protitelesa, virus Ebola, virus Marburg, vezavna energija.

## ABSTRACT

Ebola and Marburg viruses, which belong to the filovirus family, have been endemic since their discovery in the second half of the 20th century, especially in Africa. The viral hemorrhagic fever they cause is a highly contagious and often fatal disease that has killed a large number of people.

During the research assignment, I wanted to learn more about viruses and through the research assignment contribute to the development of an effective medicine. The research task began with a review of the literature, which deepened the understanding of the biochemical background of the two viruses and the potential possibilities for inhibiting the activity of the viruses. After gaining the necessary knowledge about viruses, more specifically filoviruses, antibodies, proteins and protein interactions, we started with the empirical part of the task with the help of a computer.

The basic purpose of the task was to gain a deeper understanding of the functioning of filoviruses, as well as the effect of mutations on their binding to antibodies. With the help of literature and computer programs, we studied the function and structure of filoviruses and antibodies that inhibit their function, defined suitable targets for drug development, and visualized the corresponding protein complexes of glycoproteins and antibodies. Based on these, we discovered the corresponding common binding sites of both viral glycoproteins and the corresponding antibody mutations for stronger binding, which were quantitatively evaluated.

**KEYWORDS:** molecular modeling, computational chemistry, antibodies, Ebola virus, Marburg virus, binding energy.

## 1 UVOD

V raziskovalni nalogi sem primerjal podobnost glikoproteinov sorodnih virusov Ebole in Marburga ter iskal ustrezne mutacije protitelesa Ansuvimab, ki bi služile kot osnova za razvoj skupnega zdravila. Predmet zanimanja so bili predvsem proteini, ki sestavljajo virusa in protitelo ter njihove medsebojne interakcije in vpliv mutacij na vezavo in tvorbo omenjenih interakcij.

Namen naloge je bil uporaba pristopov računske kemije za vizualizacijo in pripravo struktur protitelesa Ansuvimab v kompleksu z glikoproteinom virusa Marburg in z glikoproteinom virusa Ebole ter nadaljni izračun vezavne afinitete pri mutaciji za optimizacijo vezave in delovanja protitelesa. Z optimizacijo protitelesa smo ciljali na ustvarjanje temelja za razvoj zdravila, ki bi preprečil, da bi virusa povzročila še več škode, kot sta jo v preteklosti.

V ta namen je bilo potrebno temeljito preučiti in poznati osnove biokemijskega ozadja proteinov, proteinskih interakcij, zgradbe in delovanja virusov, zgradbe filovirusov in se seznaniti z ustreznimi računalniškimi programi, ki omogočajo računalniški razvoj zdravil.

### 1.1 Hipoteze

Za dosego ciljev raziskovalnega dela smo si po pregledu literature postavili sledeče hipoteze:

- Glikoproteina virusa Ebole in virusa Marburg sta si strukturno podobna, saj sta virusa sorodna.
- Podobnost glikoproteinov lahko izkoristimo za namen iskanja skupnega mesta s protitelesom Ansuvimab.
- Izračun vezavnih afinitet mutacij terapvetskega protitelesa Ansuvimab ob vezavi z glikoproteinoma lahko razkrije potencialna mesta za optimiziranje protitelesa Ansuvimab za vezavo z glikoproteinom virusa Marburg in glikoproteinom virusa Ebola.

## 2 PREGLED LITERATURE IN TEORETSKO OZADJE

### 2.1 Virus Ebola in virus Marburg

Virusi so izjemno majhni in preprosti patogeni, sestavljeni iz nukleinske kisline, obdane z zaščitno beljakovinsko ovojnico, imenovano kapsida. Zaradi pomanjkanja lastnih celičnih mehanizmov se lahko razmnožujejo le znotraj živih gostiteljskih celic. Njihova reprodukcija je zapleten proces, ki se močno razlikuje od razmnoževanja drugih organizmov. Velikost virusov se giblje med 20 in 300 nanometri, kar je približno 100.000-krat manjše od premora človeškega lasu. [1]

Struktura virusa je preprosta, vendar ključna za njegovo delovanje. Nukleinska kislina, ki je lahko DNA ali RNA, vsebuje genetske informacije virusa. Kapsida ščiti nukleinsko kislino pred poškodbami in omogoča virusu pritrditev na gostiteljsko celico. Nekateri virusi imajo dodatno ovojnico, ki je sestavljena iz beljakovin in lipidov. Ovojnica pomaga virusu pri vstopu v gostiteljsko celico in ga ščiti pred imunskim sistemom gostitelja. [1, 2]

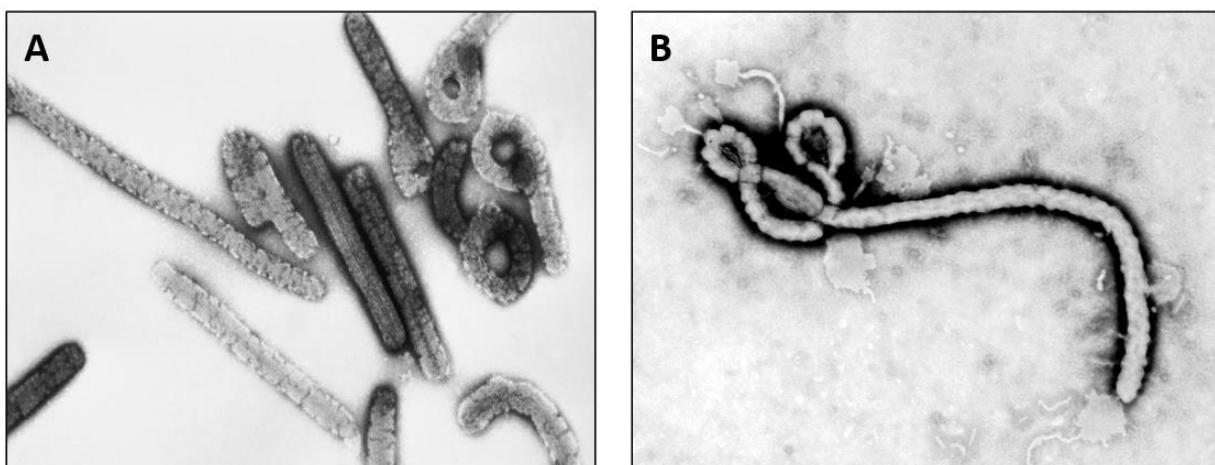
Razmnoževanje virusov je zapleten proces, ki poteka v večih fazah. Virus se najprej pritrdi na specifične receptorje na površini gostiteljske celice in nato vstopi v celico z različnimi mehanizmi, odvisno od tipa virusa. V celici se virusna nukleinska kislina prepiše v mRNA, ki se nato prevaja v virusne beljakovine. Te beljakovine se uporabijo za sestavljanje novih virusnih delcev, ki se nato sprostijo iz celice in okužijo nove celice. [1, 2]

Vplivi virusov na gostitelja se močno razlikujejo. Nekateri virusi so neškodljivi in ne povzročajo nobenih simptomov. Drugi virusi povzročajo blage bolezni, kot so prehlad ali gripa. Spet tretji virusi pa so izjemno patogeni in lahko povzročijo smrtne bolezni, kot so AIDS, Ebola ali Marburg. Zanje je značilna enoverižna RNK in pogosto nitasta ovojnica, ki pa se od vrste do vrste razlikuje. [1, 3]

Virusa Ebola in Marburg povzročata virusno hemoragično mrzlico, ki je redka, a pogostno smrtna bolezen. Začetni znaki okužbe so vročina, utrujenost, bolečine v mišicah, kosteh, sklepih za prsnico in v žrelu, vrtoglavica ter splošna oslabelost. V kasnejših fazah bolezni se lahko pojavijo krvavitve v podkožju, notranjih organih in iz telesnih odprtin, huda oblika bolezni pa vključuje šok, odpoved ledvic, krče, komo in delirij. [4]

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

Razširjena sta predvsem v Afriki, kjer nerazvitost in slaba higiena še dodatno prispevata k širjenju bolezni, ki nato vodijo do epidemij. Ebola se je prvič pojavila leta 1976 v dolini istoimenske reke, Marburg pa nosi ime po nemškem mestu, v katerem je bil leta 1967 prvič dokumentiran. V preteklosti sta povzročila številne smrti. Najbolj znana izmed njih je zahodnoafriška epidemija Ebole 2014, med katero je bilo okuženih 24701 ljudi, umrlo pa jih je 10194. Takrat je bil virus razširjen predvsem v Liberiji, Sierri Leone in Gvineji, a so bili redki primeri okužb zasledeni tudi v Nigeriji, Maliju, ZDA, Združenem kraljestvu, Senegalu in Španiji. Marburg tako množičnih izbruhov še ni povzročil, a je od svojega odkritja do danes že zahteval veliko žrtev, največ med leti 2004 in 2005 v Angoli, in sicer 329. Zaradi velikega števila žrtev in visoke smrtnosti (Ebola ~50 % in Marburg ~23-90 %) je razvijanje učinkovitih in dostopnih zdravil zelo pomembno, med drugim tudi za preprečitev pandemij podobnih SARS-CoV-2. [5, 6]



Slika 1: A): Slika virus Marburg pod elektronskim mikroskopom [6]), B: Slika virusa Ebola po elektronskim mikroskopom [7]

Zaradi visoke nalezljivosti obeh bolezni, je edina do sedaj poznana rešitev proti širjenju izogibanje vsem stikom z okuženimi osebami, njihovimi telesnimi tekočinami in predmeti, ki so lahko prišli v stik z njihovimi telesnimi tekočinami. Proti virusu Marburg trenutno ni odobrenih zdravljenj ali cepiv, Ebola pa ima tri različna odobrena zdravila, a zgolj za sev Ebola Zaire. Ta zdravila so cepivo Ervebo in zdravili z monoklonskimi protitelesi trženimi pod imeni Inmazeb in Ebanga. Slednji temelji na protitelesu ansuvimab in je temelj raziskovalne naloge, Inmazeb pa je kombinacija treh monoklonskih protiteles, in sicer altotivimab, maftivimab ter odesivimab. Ervebo je cepivo, ki temelji na rekombinatornem virusu vezikularnega stomatitisa. Ta vsebuje gen za EBOV glikoprotein namesto gena za lastni VSV glikoprotein. Telo ga nato zazna in nanj reagira. Ob morebitnem stiku s pravim virusom ga lahko nemudoma prepozna in ga prepreči.

## Raziskovalna naloga: **Optimitziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije**

Cepivo je bilo decembra 2020 s strani ameriškega FDA odobreno, s strani WHO pa predkvalificirano za uporabo na posameznikih starejših od 18 let (z izjemo nosečih in doječih žensk) za zaščito pred vrsto virusa Ebola Zaire. [8, 9, 10, 11]

### **2.1.1 Struktura virusa Ebola in virusa Marburg**

Filovirusi so virusi nitaste oblike iz družine Filoviridae, prepoznavni po njihovi dolgi, nitki podobni strukturi. Gre za zelo patogene viruse, ki pri ljudeh in opicah povzročajo hude hemoragične bolezni. Čeprav so relativno redki, so filovirusne okužbe lahko smrtne, zato so te viruse uvrščene med najnevarnejše patogene. Ker predstavljajo resno grožnjo javnemu zdravju, so raziskave na tem področju izjemno pomembne. Z razumevanjem strukture in delovanja teh virusov lahko razvijamo učinkovitejše metode za preprečevanje, diagnosticiranje in zdravljenje filovirusnih okužb. [2, 3]

Vsi filovirusi vsebujejo sedem različnih genov, ki kodirajo različne proteine. To so geni NP, VP30, VP35, VP24, VP40, L in GP. Vsi geni virusa Marburg kodirajo en protein z enakim imenom kot gen, virus Ebola pa ima več kot sedem proteinov, saj njegov gen GP kodira štiri različne proteine, in sicer GP, sGP, ssGP in D-peptid. [12]

Filovirsuni nukleoproteini (NP) igrajo ključno vlogo pri transkripciji in podvajaju, saj virusna polimeraza (L) služi kot model zanju. Tvorijo dolge oligomere, ki obdajajo virusno RNK. Nukleoprotein sicer ne interagira neposredno z virusno polimerazo, temveč interakcije mediirata ko-faktorja VP30 in VP35, ki sta nujna za izvršitev sinteze RNK. Poleg tega interagira z VP40 za vključitev nukleokapsida v virusne delce. [12]

Vloga virusnega proteina 30 (VP30) v življenskem krogu filovirusov je ključna, vendar ni popolnoma raziskana. Protein je edinstven filovirusom in je nujen za razmnoževanje nalezljivih virusnih delcev Marburga in Ebole. Vloge in funkcije VP30 se pri Eboli in Marburgu razlikujejo. Pri eboli deluje kot transkripcijski aktivator, Marburg pa ga za to funkcijo ne potrebuje. VP30 naj bi prav tako spodbujal ponovno iniciacijo transkripcije polimeraze. [12]

VP35 je filovirusna različica virusnih fosfoproteinov (P), ki jih najdemo pri drugih virusih. VP35 igra sorodno vlogo pri transkripciji in replikaciji virusa. Deluje kot ko-faktor polimeraze, ki interagira tako s polimerazo kot z virusnim nukleoproteinom. Poleg tega VP35 zavira naravni imunski odziv gostitelja z motenjem zaznavanja dsRNA in z interferenco z RNA. [12]

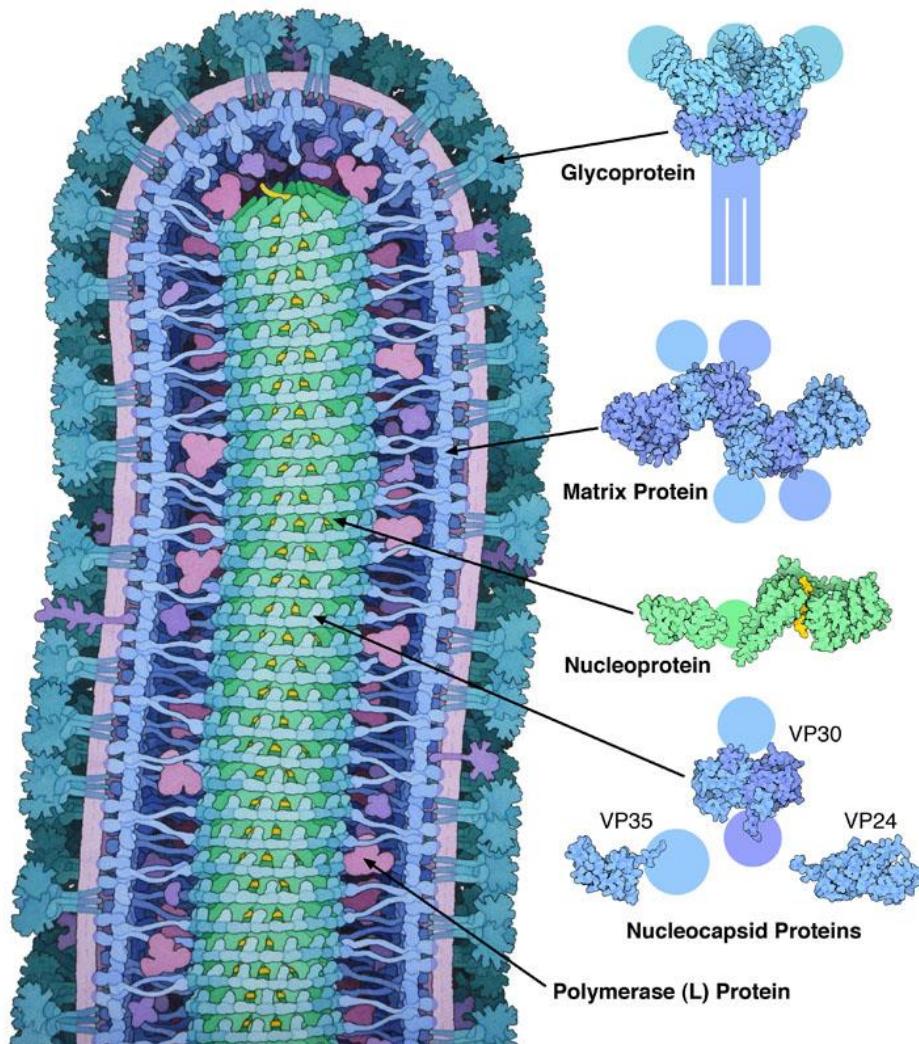
## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

Virusni protein 24 (VP24) je pomemben predvsem za sestavo in delovanje virusnega ribonukleoproteinskega kompleksa. VP24 kaže različne interakcije s faktorji gostitelja med virusom Ebola in virusom Marburg. Zanj je prav tako značilno izražanje v večih oligomerskih oblikah, namenjenih opravljanju številnih različnih funkcij skozi življenski krog virusa. [12]

Virusni protein 40 (VP40) je glavna struktturna sestavina filovirusne matrice in filovirusna različica proteinskih matrik. VP40 s polimerizacijo tvori proteinske filamenta, iz katerih je sestavljena virusna matrika, in iz katerih je dosežena značilna filamentozna oblika viriona. Matrika VP40 prav tako opravlja ključne interakcije z glikoproteinom in celično membrano ob sproščanju virusa. VP40 je prav tako pomemben za kontrolo transkripcije, za virus Marburg pa deluje imunosupresivno. Širok nabor funkcij in vlog proteina naj bi bil posledica sposobnosti tvorbe številnih različnih struktur polipeptida VP40. [12]

Čeprav je filovirusna polimeraza (L) ključni protein za razmnoževanje virusa, njena struktura zaradi težav pri pridobivanju zadostnih količin za in vitro preučevanje še ni v celoti razjasnjena. Ta gen in protein sta največja v virusu in se izražata kot en sam polipeptid. Polimeraza je odgovorna za vso encimsko aktivnost pri sintezi RNK, vendar je naše razumevanje te kompleksne molekule omejeno. Trenutno znanje o filovirusni polimerazi izhaja predvsem iz homologije z drugimi polimerazami virusov. To pomeni, da znanstveniki sklepajo o strukturi in delovanju filovirusne polimeraze na podlagi podobnosti z drugimi, bolje raziskanimi polimerazami. Vendar pa te analogije niso vedno popolnoma zanesljive in ključni vidiki delovanja filovirusne polimeraze ostajajo neznani. [12]

Raziskovalna naloga: **Optimitziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije**



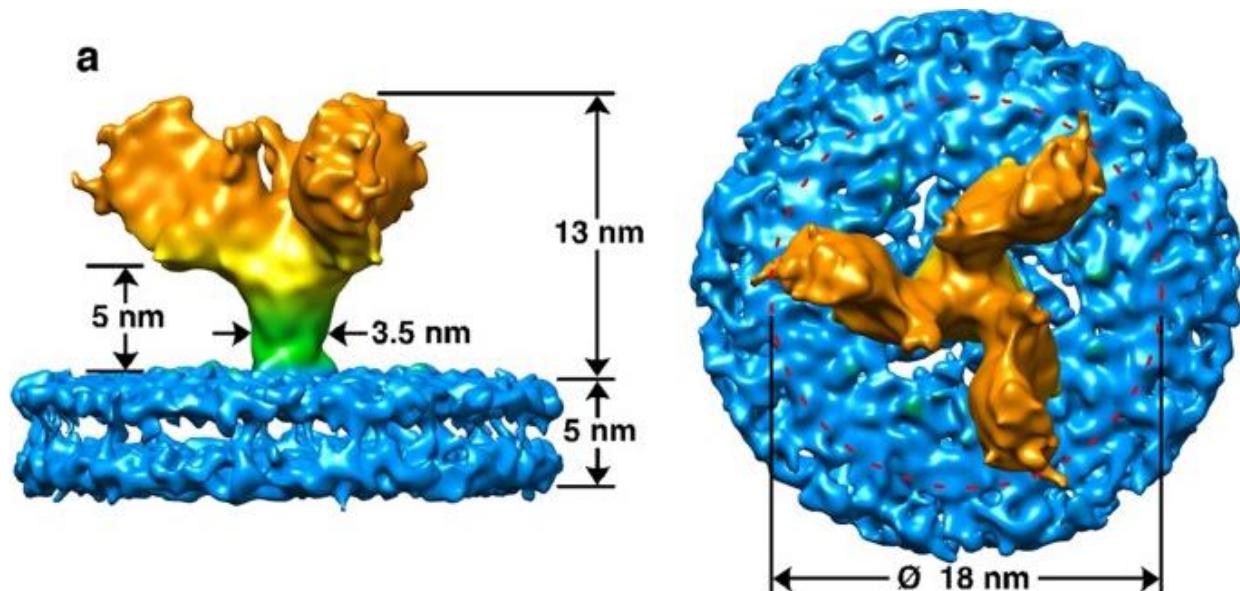
Slika 2: Strukturne enote filovirusa z njihovo prostorsko ureditvijo [13]

Glikoproteini so sestavljeni beljakovine, ki so kovalentno povezane z oligosaharidom. Sem uvrščamo številne membranske beljakovine, večino beljakovinskih encimov, nekatere encime in vsa protitelesa. [14]

Glikoprotein je edina struktura, ki se nahaja neposredno na virusni ovojnici, zato igra ključno vlogo pri vdoru in pritrjevanju virusa na gostiteljsko celico ter katalizi zlitja membran. Brez teh Ebola in Marburg ne bi mogla vstopiti in posledično škodovati gostiteljski celici, zato lahko z onesposabljanjem zgolj glikoproteina v celoti onemogočimo delovanje virusa. Posebne strukture namenjene vstopanju v gostiteljsko celico niso značilne zgolj za filoviruse, saj se tega mehanizma poslužujejo tudi virus influence, retrovirusi in najbolj značilno koronavirusi. Spike protein na površini virusov, med drugimi tudi SARS-CoV-2, opravlja enako nalogo in je za virusovo delovanje nepogrešljiv. [15, 16, 17]

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

GP tvori trimere na površini virionov in okuženih celic, sGP pa tvori dimere, ki se iz okuženih celic izločajo. GP še dodatno delimo na GP1 in GP2, glede na različne funkcije, ki jih opravlja. GP1 je zaslužen za vezavo receptrojev, glavna naloga GP2 pa so konformacijske spremembe, potrebne za združevanje virusnih celic z gostiteljskimi. Kljub temu sta med seboj povezana z disulfidno vezjo. Sekvenci aminokislin glikoproteinov Ebole in Marburga sta si zgolj 28 % podobni (na receptorskih vezavnih mestih pa 85 %), kar vodi tudi do mnogih razlik in nekaterih podobnosti v njihovih strukturah. [12]



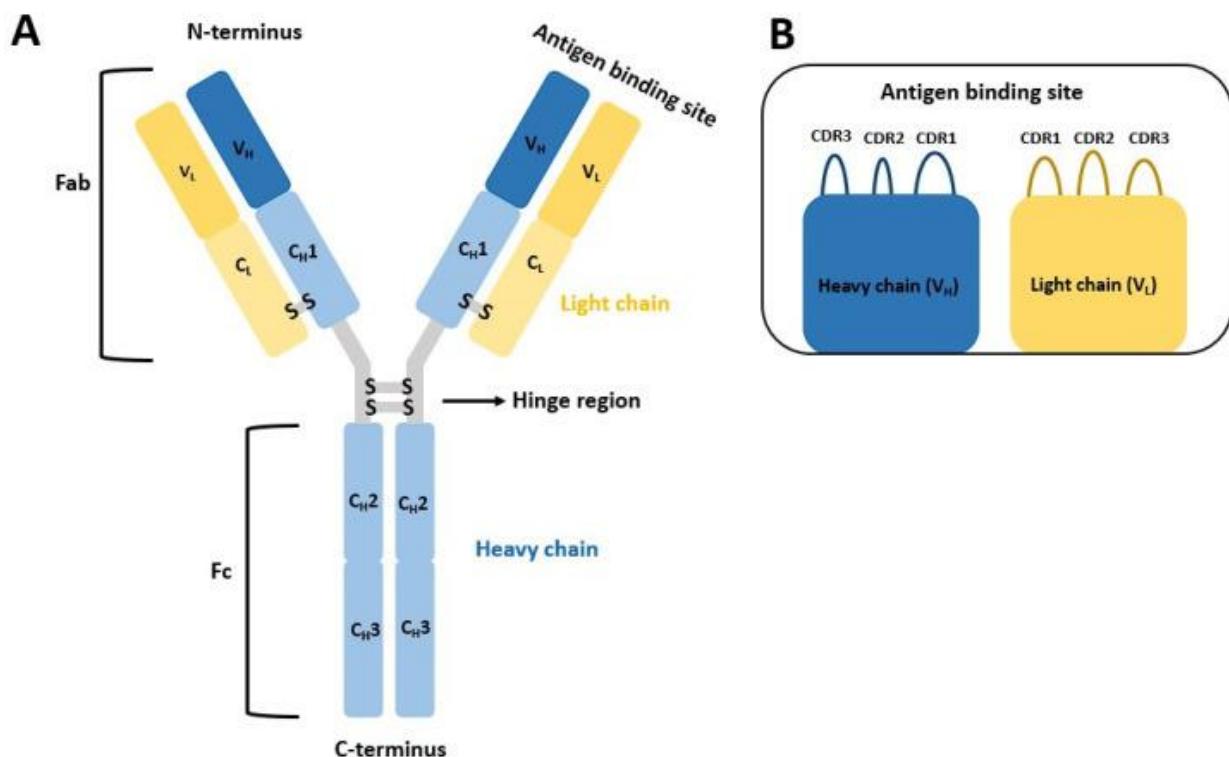
Slika 3: Glikoprotein virusa Ebola iz različnih kotov v virusni kapsidi, stranski pogled in pogled od zgoraj [18]

### 2.1.2 Protitelesa in njihova uporaba v farmaciji

Naše telo se na tujke, ki predstavljajo nevarnost za naše zdravje, med drugim odzove tudi s protitelesi. Protitelesa so topne glikoproteinske molekule iz skupine imunoglobulinov. Njihova naloga je preprečevanje škodovanja antigenov organizmu. Delujejo na podlagi specifičnega prepoznavanja in vezave na antigen, ter z vezavo na efektorske celice. Naše telo protitelesa ustvarja s pomočjo specializiranih belih krvničk, ki se ob stiku z antigeni delijo in klonirajo, nato pa klonirane celice v krvožilni in limfni sistem izločijo milijone protiteles. Tujke prepoznavajo in prestrežejo s tem, da prepozna specifične proteine, ki se nahajajo na površini tujkov, saj se ti močno razlikujejo od notranjosti telesa, ki jih obdaja. Zaradi te visoke specifike se naše telo na bolezni, ki jih je že prebolelo, odzove hitro in učinkovito, saj s protitelesi nemudoma prepozna antigen. Sestavljena so iz dveh težkih in dveh lahkih polipeptidnih verig, ki so razporejene v

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

obliko črke Y. Tujke nase vežejo z vrhovoma obeh krakov. Vrhovi krakov so prav tako del protitelesa po katerem se medsebojno razlikujejo. Različni aminokislinski ostanki na vrhovih krakov omogočajo različnim protitelesom vezavo različnih antigenov. Ker protitelesa zgolj prestrežejo tujke in so del organizmove naravne obrambe proti virusu prav tako v večji meri ne povzročajo neželenih stranskih učinkov. [19, 20]



Slika 4: Shematska predstava strukture protitelesa [21]

Sodobna medicina se za številne funkcije poslužuje predvsem monoklonskih protiteles. Gre za protitelesa, ki so monospecifična in monoafinitetna, ta specifičnost pa vodi do predvidljivih in ponovljivih učinkov na telo. Metoda pridobivanja monoklonskih protiteles s hibridizacijo celic, ki jo odkrijeta Köhler in Milstein leta 1975, nam omogoča ustvarjanje neomejenih količin protiteles, ki imajo odvisno od svoje afinitete točno dololčene funkcije v zdravstvu. So odlični diagnostični in terapevtski reagenti, dandanes pa je njihova uporaba razširjena za določanje krvnih skupin, ugotavljanje nosečnosti, merjenje serumske koncentracije zdravil, odkrivanje številnih patogenih mikrobov in odkrivanje nekaterih tumorskih antigenov. [19]

Njihova vloga v zdravljenju številnih bolezni je prav tako nepogrešljiva. Z njimi zdravimo številne avtoimune bolezni, raka, SARS-CoV-2 in tudi ebolo. Zaradi specifike njihovega delovanja, lahko izoliramo in namnožimo monoklonska protitelesa, ki zavirajo proteine, ključne

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

za delovanje nekega virusa, in ga s tem onemogočimo. Ansuvimab, katerega delovanje v nalogi optimiziramo, na isti princip zavira zunanji glikoprotein virusov Ebole in Marburga ter ju tako onesposablja. Optimizacija njihove specifične vezave na virus je ključna zato, da lahko ustvarimo učinkovito zdravilo. [19]

Z mutacijami proteinov lahko optimiziramo moč vezave monoklonskih protiteles nanje. Spremembu v zaporedju nukleotidov razen v primeru "silent" mutacij vodi do spremembe v kodiranju aminokislin, od zaporedja aminokislin pa so odvisne vse lastnosti proteina, tudi njegova struktura in prepoznavanje antigenov. Namreč višja struktura proteinov ima velik vpliv na moč vezave z interakcijskimi partnerji. Z mutacijami lahko strukture proteinov spremenimo tako, da se ujemata kot ključ in ključavnica (lock-and-key model). Večja komplementarnost oblik proteinov pomeni močnejšo vezavo med njima, močnejša kot je vezava, bolj učinkovito je delovanje protitelesa proti virusu. Ujemanja struktur je predvsem posledica steričnega neoviranja, pri vezavi pa so pomembne tudi vrste interakcij, ki sodelujejo pri tvorbi proteinskih kompleksov. Vodikove in van der Waalsove vezi ter hidrofobne in ionske interakcije vse vplivajo na moč vezave. Mutiranje aminokislin lahko spremeni vrsto in število vezi, ki se tvorijo v kompleksu. Te vezi so lahko močnejše ali šibkejše kot pred mutacijo, kar neposredno vpliva na moč vezave. [22]

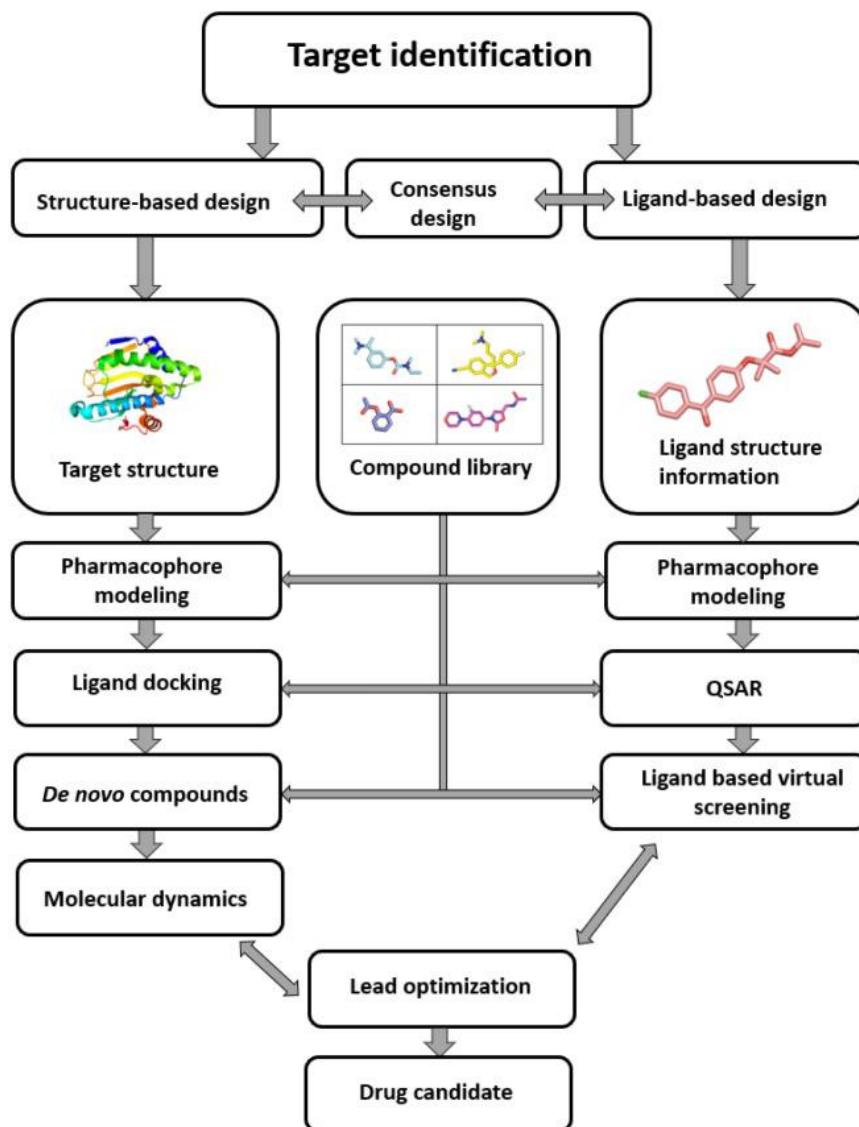
Sekvenci aminokislin glikoproteinov obeh virusov sta si zaradi sorodnosti podobni, zato predvidevamo, da je mogoče ustvariti zgolj eno optimizirano zdravilo, ki bi učinkovalo proti obema hkrati. Z razvojem enega zdravila namesto dveh je postopek hitrejši in prav tako ekonomsko ugodnejši, saj stroške, ki znašajo več kot milijardo dolarjev, s tem prepeljemo. Za končno obliko zdravila bi tako potrebovali zgolj dodatno indikacijo, prav tako bi bilo zaradi tega zdravilo bolj dostopno, kar je ključna lastnost v krajih kjer sta endemična Ebola in Marburg. Cenovna ugodnost zdravila je za revne afriške države, ki se borijo z virusoma, zelo pomembna. [23]

## 2.2 Računska kemija in racionalno načrtovanje

Računska kemija je veja kemije, ki uporablja računalniške metode za reševanje kemijskih problemov na podlagi znanj pridobljenih iz teoretične kemije. Uporablja se kot poglobljena raziskava eksperimentalno že pridobljenih podatkov ali za simulacijo kemijskih pojavov pred njihovo izvedbo v laboratorijih. Njena uporaba je najbolj razširjena na področjih izdelave novih materialov in zdravil. Razvoj le-teh je pogosto drag in dolgotrajen, zato so simulacije ekonomsko in časovno ugodne, saj lahko z njihovo pomočjo v laboratorij prenesemo zgolj tiste pojave, ki so

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

že v simulacijah kazali željene rezultate. Tako je privarčevan ves čas in denar, ki bi ga potrošili za izvedbo reakcij, ki smo jih s pomočjo simulacij že predhodno izločili. [24]



Slika 5: Shematski prikaz delovnega toka v računski kemiji [25]

### 2.2.1 PDB format

Podatkovna zbirka PDB (Protein Data Bank) je baza podatkov informacij o strukturah večjih molekul kot so proteini, nukleinske kisline in njihovi medsebojni kompleksi. Iz nje izhaja .pdb format, ki vsebuje vse potrebne podatke za uporabo v računski kemiji in za izdelavo 3D grafik molekul. Tak format mora poleg koordinat atomov v molekuli vsebovati tudi podatke o tem, kje v aminokislini se nahaja atom. V formatu so opredeljeni vsi ključni podatki kot so ime spojine, avtor in objava, eksperimentalni podatki, zaporedje aminokislin ter x, y in z koordinate vseh

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

atomov v zaporedju aminokislin proteina. PDB datoteka pogosto predstavlja vhodni podatek za namen racionalnega načrtovnega zdravil z računsko kemijo, saj omogoča tako vpogled v 3D strukturo s pomočjo programov za vizualizacijo kot pripravo računalniških simulacij ali izvedbo molekularnega sidranja na izbrani strukturi. [26]

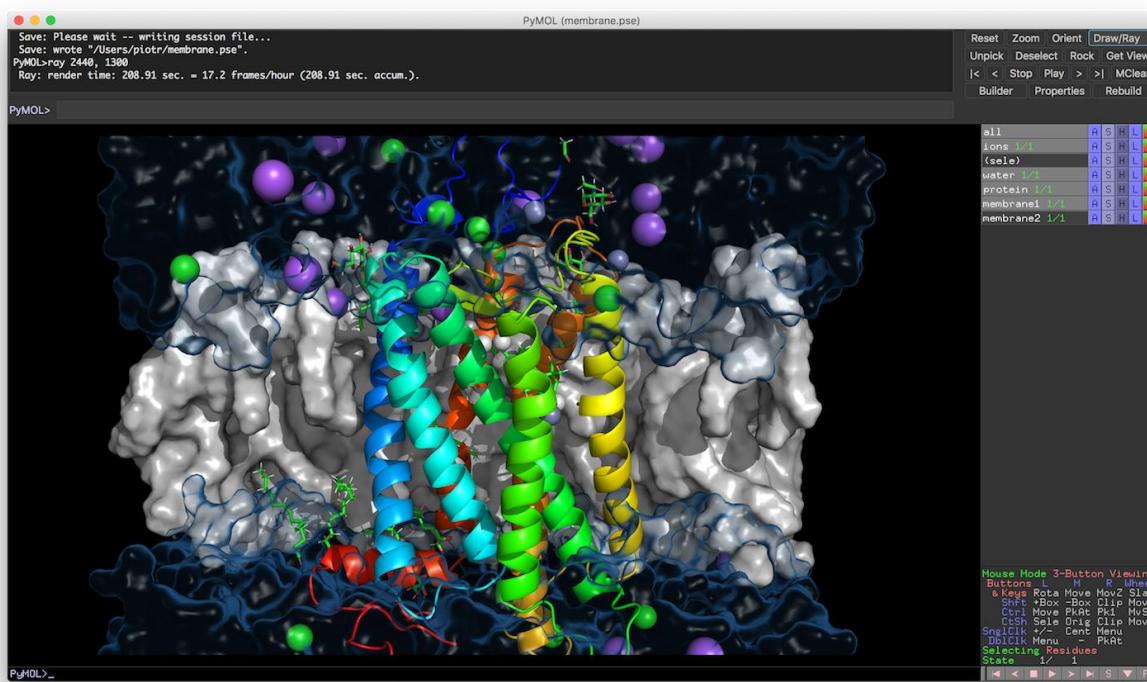
Tip molekule	Zaporedna številka atoma	Ime elementa	Ime aminokisline	Koordinate						
				X	Y	Z				
ATOM	1	N	GLN H	1	105.752	140.041	202.239	1.00	74.70	N
ATOM	2	CA	GLN H	1	105.374	139.270	201.033	1.00	74.70	C
ATOM	3	C	GLN H	1	106.336	138.159	200.795	1.00	74.70	C
ATOM	4	O	GLN H	1	107.370	138.337	200.150	1.00	74.70	O
ATOM	5	CB	GLN H	1	105.353	140.176	199.791	1.00	74.70	C
ATOM	6	CG	GLN H	1	104.966	139.438	198.507	1.00	74.70	C
ATOM	7	CD	GLN H	1	103.511	139.009	198.628	1.00	74.70	C
ATOM	8	NE2	GLN H	1	102.982	138.353	197.560	1.00	74.70	N
ATOM	9	OE1	GLN H	1	102.861	139.249	199.644	1.00	74.70	O
ATOM	10	N	VAL H	2	106.021	136.966	201.331	1.00	119.03	N
ATOM	11	CA	VAL H	2	106.912	135.867	201.121	1.00	119.03	C
ATOM	12	C	VAL H	2	106.488	135.156	199.878	1.00	119.03	C
ATOM	13	O	VAL H	2	105.299	134.939	199.652	1.00	119.03	O
ATOM	14	CB	VAL H	2	106.926	134.873	202.247	1.00	119.03	C
ATOM	15	CG1	VAL H	2	105.517	134.296	202.418	1.00	119.03	C
ATOM	16	CG2	VAL H	2	107.980	133.800	201.934	1.00	119.03	C
ATOM	17	N	GLN H	3	107.462	134.794	199.018	1.00	68.30	N
ATOM	18	CA	GLN H	3	107.103	134.109	197.811	1.00	68.30	C
ATOM	19	C	GLN H	3	108.179	133.117	197.479	1.00	68.30	C
ATOM	20	O	GLN H	3	109.359	133.352	197.737	1.00	68.30	O

Slika 6: Izsek PDB datoteke [26]

### 2.2.2 PyMol

Pymol je program molekularne vizualizacije, ki ga je razvil Warren Lyford DeLano leta 2000. Gre za odprtakodno, a lastniško orodje, ki omogoča podrobnejši ogled in ustvarjanje 3D slik majhnih molekul, kot so proteini. Program ustvari visokokakovostne slike molekul, ki jih lahko prosto vrtimo, obarvamo, povečujemo in si s številnimi funkcijami pomagamo pri preučevanju reakcij med proteini in ustvarjanju pregledne in unčikovite grafike. V seminarski nalogi je program uporabljen za generiranje slik glikoproteinov, preučevanje vezave glikoproteinov Ebola in Marburga na protitelo Ansuvimab in proučevanje vpliva ustreznih mutacij, ki bi pripomogle k ustvarjanju močnejše vezave. [27]

## Raziskovalna naloga: Optimitziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije



Slika 7: Pogled strukture v programu PyMol [28]

### 2.2.3 SMEHeC

SMEHeC je protokol, ki uporablja ukaz INTE ali GBMV programa CHARMM za napovedovanje učinkov mutacij na proteinske interakcije. Avtomatizira mutiranje PDB strukture in analizo mutacij in oceno energije interakcije. Uporablja se za različne vrste ligandov (beljakovine, DNK, RNK, ione, majhne molekule) in ponuja tudi različne druge funkcije za upravljanje PDB datotek. Energijske vrednosti dajejo absolutne in normalizirane toplotne karte, kar omogočajo hitro identifikacijo mutacij, ki stabilizirajo ali destabilizirajo kompleks protein-ligand. Protokol olajša študije mutacij, ki vplivajo na vezavo, in je posebaj uporaben za proučevanje interakcij gostitelj-patogen in zdravilo-proteinska tarča. [29]

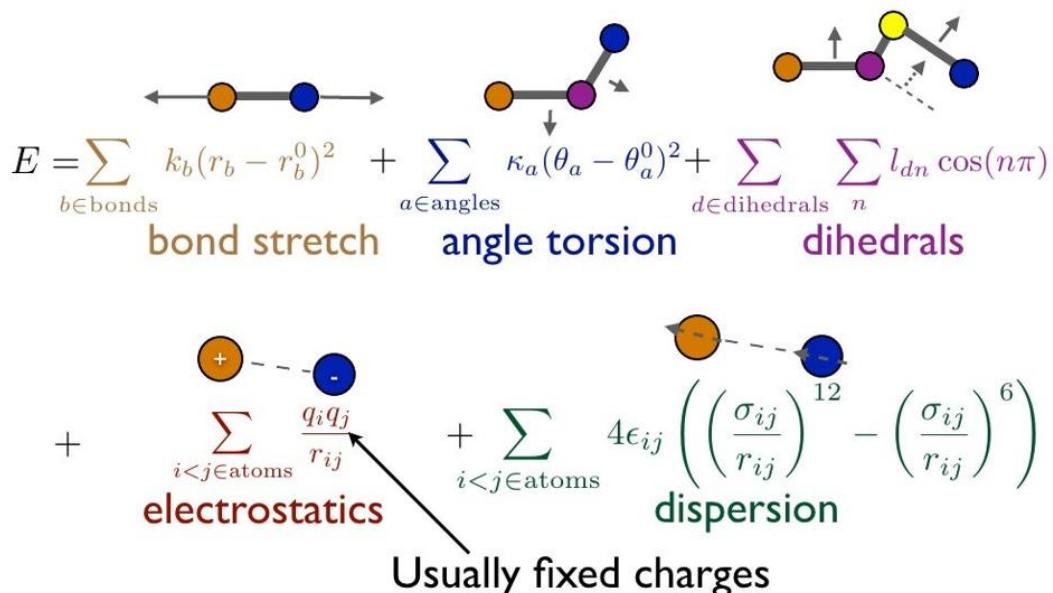
$$E(r) = \sum_{\text{vdw}} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{electrostatic}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

Slika 8: Enačba za izračun statične vezavne energije [29]

## 2.2.4 CHARMM

Simulacije molekularne dinamike (MD) so računalniška tehnika, ki nam omogoča posnemanje gibanja molekul v realnem času. S tem lahko podrobneje razumemo razmerje med strukturo molekule in njeno funkcijo. Razvoj te tehnike sega v pozna sedemdeseta leta prejšnjega stoletja, od takrat pa je močno napredovala, saj omogoča simulacije kompleksnih bioloških sistemov. CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) je eden izmed pionirskeih programov za simulacije MD. Zaradi nenehnega razvoja ponuja široko paleto funkcij. Vključuje različne opise polj sil, npr. CHARMM22 za proteine, CHARMM27 za lipide, DNA in RNA ter CGenFF za manjše molekule. Uporabnik lahko glede na molekule, ki jih želi simulirati, izbere ustrezeno polje sil. Polje sil predstavlja matematični opis sil ki delujejo na molekule. [30]

Program CHARMM omogoča izvajanje različnih operacij, od osnovnih simulacij dinamike in minimizacij do kompleksnih QM/MM simulacij in izračunov proste energije. Uporabnik lahko s programskim jezikom napiše ukazno datoteko za izvedbo želenega eksperimenta in analiz. V našem primeru smo uporabljali zgolj CHARMMovo funkcijo za pridobitev energij in manipulacijo struktur, vse funkcije pa so bile vgrajene znotraj programa SMEHeC, ki je deloval kot krovni program. [30]



Slika 9: Tipični prikaz matematičnega opisa sil na molekule v program za molekularno dinamiko [30]

## 3 METODE

### Pregled literature in identifikacija tarče

Prvi korak vsake znanstvene raziskave je seznanjene z osnovami izbrane tematike. Pred začetkom pisanja je bilo potrebno osvojiti vso predznanje, ki ga naloga zahteva. Za razumevanje aplikativnega dela je bilo potrebno znanje iz področje biokemije, kot je razumevanje mutacij, DNK, aminokislin, medsebojne povezanosti DNK in aminokislin, protiteles, strukture proteinov, njihovih medsebojnih interakcij in vezi, ki vplivajo nanje ter zgradbe in delovanja virusov. V nadaljevanju naloge, se pravi v aplikativnem delu pa je bilo potrebno tudi poznavanje osnov računske kemije, PDB formata, programa za vizualizacijo PyMOL, protokola SMEHeC in programa CHARMM, saj so bili ključni za izvedbo raziskave.

Literaturo sem pridobil s pomočjo spleta z iskanjem ključnih besed ‐antibody‐, ‐Ebola‐, ‐Marburg‐, ‐computational chemistry‐ v znanstvenih bazah podatkov kot je google scholar, ter s pomočjo literature, ki jo je priskrbel delovni mentor. Slednja je bila v obliki spletnih strani, znanstvenih člankov ter strokovnih učbenikov.

### Pridobitev struktur PDB

Prvi korak po pregledu literature in identifikaciji tarč je bil pridobitev tarčnih struktur. Iskali smo strukturo glikoproteina Ebole vezanega na protitelesu ansuvimab in strukturo glikoproteina virusa Marburg. Na podatkovni bazi PDB ([RCSB PDB: Homepage](#), dostopano dne 11. 12. 2023) smo pridobili strukturi s PDB oznako 5UQY in 5FHC.

### Primerjava sekvenc proteinov

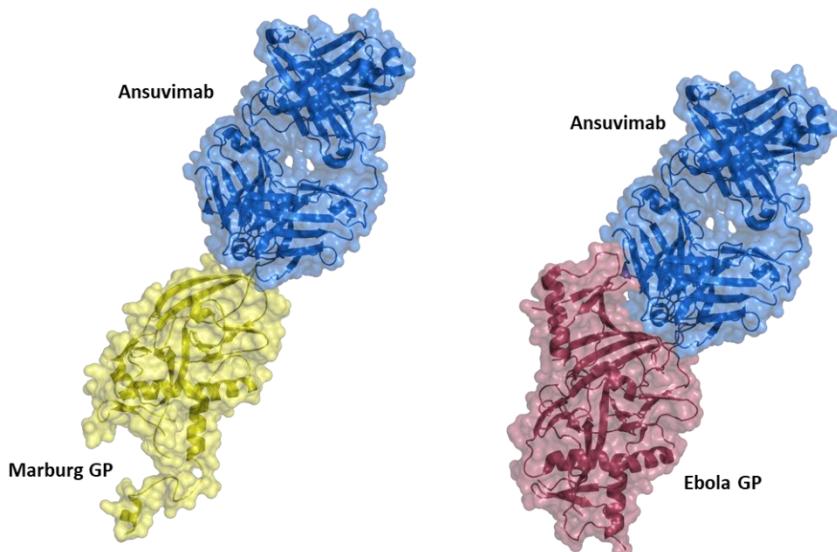
Za pridobljene strukture smo prenesli tudi aminokislinsko sekvenco, ki smo jo vnesli v strežnik BLAST za namen ocene sorodnosti strukture ([Protein BLAST: Align two or more sequences using BLAST \(nih.gov\)](#), dostopano dne 15.12.2023). BLAST namreč poravna proteinske sekvence in oceni podobnost med njima. Podobnost je pomemben faktor kadar želimo razviti zdravilo za več tarč hkrati.

### Analiza in priprava sistemov v programu PyMol

Sistem molekularne vizualizacije PyMOL smo uporabili na nadaljni poti do priprave sistemov. Služil je večim namenom in sicer za generiranje slik glikoproteinov za namen seminarske naloge,

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

proučevanje vezave glikoproteinov Ebole in Marburga na protitelo Ansuvimab in proučevanje vpliva ustreznih mutacij, ki bi pripomogle k ustvarjanju močnejše vezave. Vizualizacija struktur je poglobila razumevanje kompleksnih interakcij med proteini in skupaj s programom BLAST omogočila analizo ustreznih mutacij na ustreznih odsekih proteina. Obe pridobljeni strukturi 5UQY in 5FHC smo vnesli v PyMol in jih s pomočjo ukazov modificirali. Na koncu smo imeli dva sistema in sicer glikoprotein virusa marburg vezan na ansuvimab in glikoprotein virusa Ebola vezan na ansuvimab. Oba pripravljena sistema smo izvozili iz programa kot datoteka PDB za nadaljno obdelavo.



Slika 10: Pripravljena sistema glikoproteinov vezanih na protitelo Ansuvimab vizualizirana v programu PyMol.

### Priprava vhodne datoteke za program SMEHeC

S pomočjo uporabe Ubuntu terminala za operacijski sistem Windows smo dostopali do zmogljivega računalnika, ki je imel nameščec program SMEHeC in CHARMM. Oba sta namreč potrebna za generacijo topotne karte mutacij. Terminal nam je omogočal tudi prenos datotek na oddaljeni računalnik. Sledila je priprava vhodne datoteke v kateri smo nastavili avtomatsko detekcijo aminokislin med proteinoma. To v praksi pomeni da smo poiskali in mutirali zgolj aminokisline protitelesa Ansuvimab, ki so v neposredni bližini glikoproteina. Iskali smo potencialne mutacije, ki izboljšajo vezavo z interakcijskim glikoproteinom. Torej na modrem

## Raziskovalna naloga: Optimitziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

proteinu smo stične aminokisline mutirali in gledali spremembo energije ob vezavi z rdečim ali z rumenim. Če se ista aminokislina na modrem proteinu (Ansuvimab) pojavi tako ob vezavi z rumenim (Marburg) kot z rdečim (Ebola) proteinom to pomeni, da se protitelo s to aminokislino interagira tako z rumenim kot z rdečim proteinom, kar pomeni da ena mutacija lahko izboljša vezavo tako z glikoproteinom virusa Ebola kot marburg. Po opravljenih izračunih smo prenesli rezultate v obliki slike in jih analizirali. Prenesli smo tudi mutirane strukture in jih vizualizirali v programu PyMol.

```
# PDB input file and optional cgenff parameters(for small molecules)

PDB_NAME ebola_ab.pdb
CGENFF_NAME

# List of mutations in the form residue name, chain name and residue number
# Leave empty for automatic detection

MUTATION_LIST ALAE56 ASNE92 ASPF33 TYRF58 GLYF101

#Automatic detection of mutation cutoff (optimal cutoff is 5A, Papaleo et. al 2017)

CUTOFF 3

# Number of minimization steps

MINI_ABNR 50

# Interaction definition (define between which chains the energy is calculated)

MUTATING_PROTEIN E F
INTERACTING_PARTNER A B

# Charmm directory to execute generated input

CHARMM_DIRECTORY /usr/local/bin/charmm
```

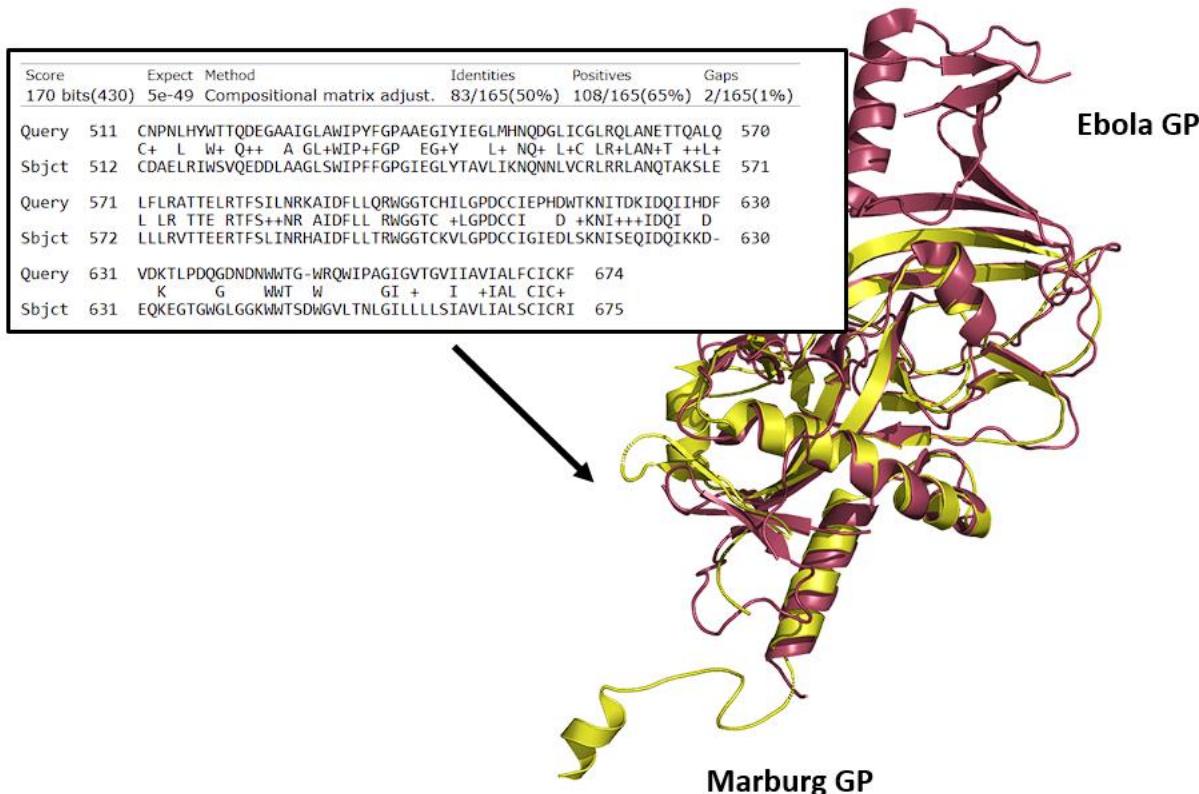
Slika 11: SMEHeC vhodna datoteka za avtomatsko mutacijo

## 4 REZULTATI

### Analiza rezultatov BLAST

Po pripravi sistemov v programu PyMOL smo z vnosom aminokislinskih sekvenc v program BLAST ugotovili, da se sekvenci 50,30 % ujemata. Visoka podobnost je za razvoj zdravila, ki učinkuje proti obema virusoma izredno pomembna. Rezultat je torej za nadaljevanje raziskave ugoden.

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije

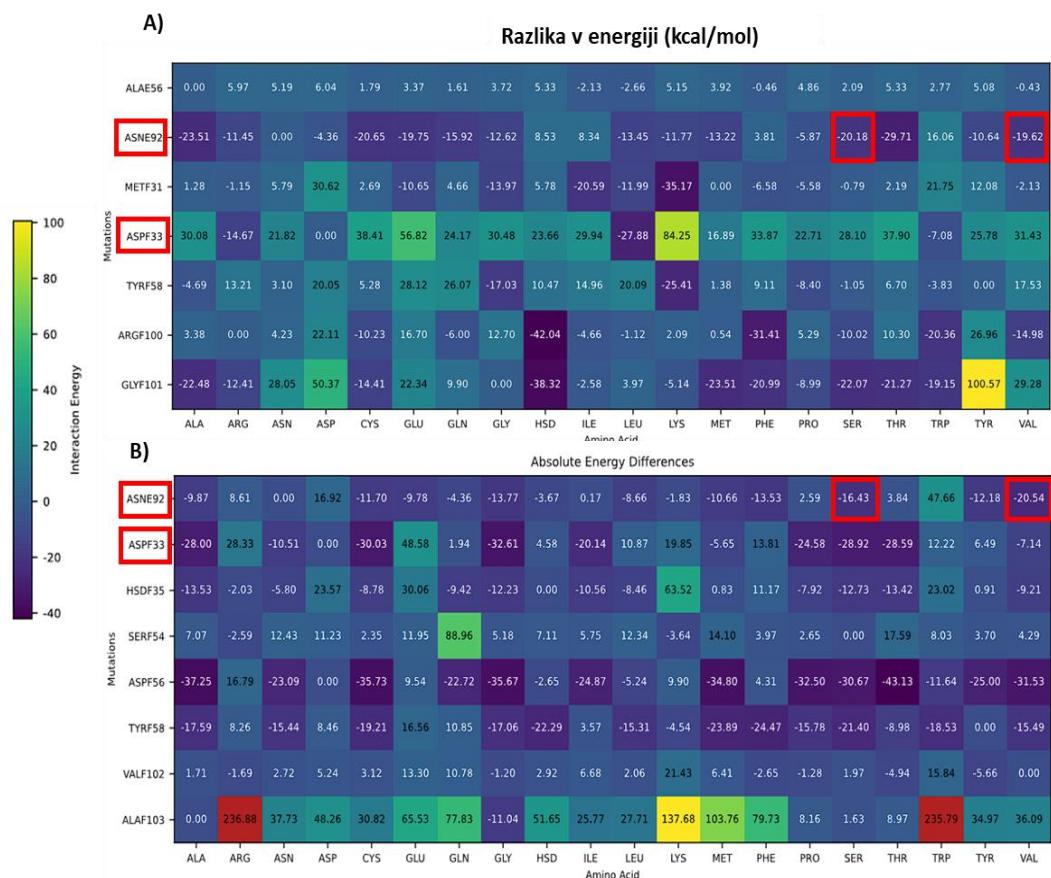


Slika 12: Poravnava sekvenč Marbur GP in Ebola GP s programom BLAST.

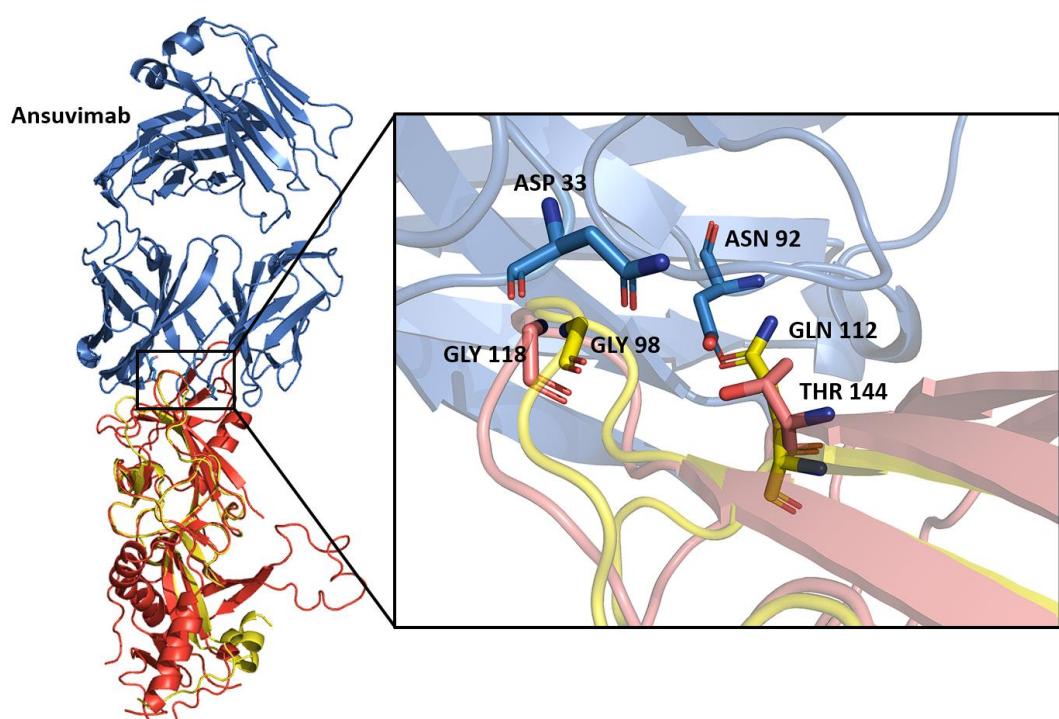
### Analiza rezultatov SMEHeC

Protokol SMEHeC nam omogoča celovito mutiranje posamičnih položajev aminokislin in oceno interakcijskih energij mutacij. Z njegovo pomočjo smo izračunali spremembo v interacijski energiji, program pa prav tako izdela toplotno karto ocen interakcijskih energij. Iz toplotne karte je razvidno, da se ob vezavi Ansuvimaba na glikoprote Marburg in Ebola ponavljata ASN92 in ASP33. Na mestu ASN92 ob mutaciji v Serin ali v Valin se pri obeh glikoproteinah zmanjša vezavna energija pri Eboli na -20,18 kcal/mol pri Marburg na -16,43 kcal/mol za ASN92 v SER92. Pri mutaciji ASN92 v VAL pa se zmanjša na -19,62 kcal/mol za virus Ebola in na -20,52 kcal/mol (slika 13). Slednji mutaciji protitelesa sta tisti, ki podajata osnovo za razvoj ustreznegata zdravila.

## Raziskovalna naloga: Optimiziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije



Slika 13: Rezultati toplotne karte za glikoproteina Ebola (A) in Marbug (B), z rdečimi kvadratki so označene ključne vrednosti in mutacije.



Slika 14: Pogled v vezavno mesto Ansuvimaba in ključne aminokisline

## 5. RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK

Tekom raziskovalne naloge sem se spoznal z osnovami biokemije proteinov in z osnovami razmonževanja in delovanja virusov. Poleg tega sem osvojil nekaj računalniškega znanja in znanje o računski kemiji. S pomočjo pridobljene ga znanja sem optimiziral vezavo protitelesa Ansuvimab na glikoprotein virusov Marburg in Ebola.

Podajam ugotovitve glede hipotez.

**Hipoteza 1:** Predvimevamo da, sta glikoproteina virusa Ebola in virusa Marburg strukturno podobna, saj sta virusa sorodna.

Hipoteza je potrjena. Primerjava aminokislinskih sekvenč je dokazala 50.30 % podobnost, kar je služilo kot temelj za nadaljevanje raziskovanja.

**Hipoteza 2:** Predvimevamo da, lahko podobnost glikoproteinov izkoristimo za namen iskanja skupnega vezavnega mesta s protitelesom Ansuvimab.

Hipoteza je potrjena. Podrobnejša analiza je dokazala dve skupni vezavni mesti aminokislini, in sicer ASP 33 (asparaginska kislina 33) in ASN 92 (asparagin 92).

**Hipoteza 3:** Predvimevamo da, izračun vezavnih afinitet mutacij protitelesa Ansuvimab ob vezavi z glikoproteinoma lahko razkrije potencialna mesta za optimiziranje protitela za vezavo z glikoproteinom virusa Marburg in glikoproteinom virusa Ebola.

Hipoteza je potrjena. Dokazali smo, da mutaciji ASN 92 v serin (SER) in tirozin (TYR) za oba glikoproteina povečata vezavni afiniteti.

Z opravljenou raziskovalno nalogou sem pokazal, da računska kemija lahko pripomore k hitrejšemu razvoju zdravil za različne bolezni. Nadaljevanje raziskovalne naloge bi vključevalo še bolj zahtevne računalniške metode in pa laboratorijsko delo, kar predstavlja izziv za naslednje leto.

## 6. VIRI IN LITERATURA

1. Virusi. *Wikipedija*. [Elektronski] 4. februar 2024. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://sl.wikipedia.org/wiki/Virusi>.
2. Koren, Srečko, in drugi. *Splošna medicinska virologija*. Ljubljana : Medicinski razgledi, 2011. str. 24-25. ISBN 961-6260-02-2.
3. Filovirusi. *Wikipedija*. [Elektronski] 1. oktober 2022. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://sl.wikipedia.org/wiki/Filovirusi>.
4. Virusna hemoragična mrzlica. *Wikipedija*. [Elektronski] 1. januar 2020. [Navedeno: 9. februar 2024.] [https://sl.wikipedia.org/wiki/Virusna\\_hemoragi%C4%8Dna\\_mrzlica](https://sl.wikipedia.org/wiki/Virusna_hemoragi%C4%8Dna_mrzlica).
5. Zahodnoafriška epidemija ebole 2014. *Wikipedija*. [Elektronski] 7. april 2023. [Navedeno: 21. februar 2024.] [https://sl.wikipedia.org/wiki/Zahodnoafri%C5%A1ka\\_epidemija\\_ebole\\_2014](https://sl.wikipedia.org/wiki/Zahodnoafri%C5%A1ka_epidemija_ebole_2014).
6. Marburg virus disease. *Wikipedija*. [Elektronski] 4. februar 2024. [Navedeno: 22. februar 2024.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Marburg\\_virus\\_disease](https://en.wikipedia.org/wiki/Marburg_virus_disease).
7. Ebola Virus. *utmb Health*. [Elektronski] [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://www.utmb.edu/virusimages/VI/ebola>.
8. Ebola disease. *Centers for Disease Control and Prevention*. [Elektronski] 21. september 2023. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html>.
9. Marburg (Marburg Virus Disease). *Centers for Disease Control and Prevention*. [Elektronski] 9. junij 2023. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/index.html>.
10. Ebola Vaccine: Information about ERVEBO. *Centers for Disease Control and Prevention*. [Elektronski] 15. september 2023. [Navedeno: 21. februar 2024.] <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/clinicians/vaccine/index.html>.
11. Ebola Virus Disease. *Cleveland Clinic*. [Elektronski] 22. november 2023. [Navedeno: 21. februar 2024.] <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15606-ebola-virus-disease#management-and-treatment>.
12. Kirchdoerfer, Robert N, in drugi. Filovirus Structural Biology: The Molecules in the Machine. *National Library of Medicine*. [Elektronski] [Navedeno: 22. februar 2024.] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28795188/>.
13. Molecule of the Month: Ebola Virus Proteins. *PDB-101*. [Elektronski] oktober 2014. [Navedeno: 21. februar 2024.] <https://pdb101.rcsb.org/motm/178>

Raziskovalna naloga: **Optimitziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije**

14. Glikoprotein. *Wikipedija*. [Elektronski] 11. julij 2023. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://sl.wikipedia.org/wiki/Glikoprotein>.
15. Aryal, Sagar. Structure of Ebola Virus. *Microbiology Info*. [Elektronski] 10. avgust 2022. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://microbiologyinfo.com/structure-of-ebola-virus/>.
16. Spike protein. *Wikipedija*. [Elektronski] 23. december 2023. [Navedeno: 21. februar 2024.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Spike\\_protein](https://en.wikipedia.org/wiki/Spike_protein).
17. de La Vega, Marc-Antoine, in drugi. The Multiple Roles of sGP in Ebola Pathogenesis. *National Library of Medicine*. [Elektronski] 1. februar 2015. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287119/>.
18. Beniac, Daniel R. in Booth, Timothy F. Structure of the Ebola virus glycoprotein spike within the virion envelope at 11 Å resolution. *scientific reports*. [Elektronski] 11. april 2017. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://www.nature.com/articles/srep46374>.
19. Antibodies. *Cleveland Clinic*. [Elektronski] 6. maj 2022. [Navedeno: 18. februar 2024.] <https://my.clevelandclinic.org/health/body/22971-antibodies>.
20. Protitelo. *Wikipedija*. [Elektronski] 27. julij 2018. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://sl.wikipedia.org/wiki/Protitelo>.
21. Jukič, Marko, in drugi. Design of Tetra-Peptide Ligands of Antibody Fc Regions Using In Silico Combinatorial Library Screening. *Pharmaceuticals*. [Elektronski] 17. avgust 2023. [Navedeno: 25. februar 2024.] <https://doi.org/10.3390/ph16081170>.
22. Xiong, Dapeng, in drugi. Implications of disease-related mutations in protein-protein interfaces. *National Library of Medicine*. [Elektronski] 24. december 2021. [Navedeno: 9. februar 2024.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8863207/>.
23. Morgan, Steve, in drugi. The cost of drug development: a systematic review. *National Library of Medicine*. [Elektronski] 21. januar 2021. [Navedeno: 2. februar 2024.] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21256615/>.
24. Computational Chemistry. *ScienceDirect*. [Elektronski] 2024. [Navedeno: 18. februar 2024.] <https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/computational-chemistry>.
25. Kralj, Sebastjan, Jukič, Marko in Bren, Urban. Commercial SARS-CoV-2 Targeted, Protease Inhibitor Focused and Protein–Protein Interaction Inhibitor Focused Molecular Libraries for Virtual Screening and Drug Design. *MDPI*. [Elektronski] 30. december 2021. [Navedeno: 1. marec 2024.] <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/1/393>.
26. Kralj, Sebastjan. *Optimizacija lastnosti biološkega zdravila Ipilimumab z uporabo pristopov molekularnega modeliranja*. Ljubljana : s.n., 2020.

Raziskovalna naloga: **Optimitziranje biološkega zdravila Ansuvimab z uporabo metod računske kemije**

27. PyMOL. *Wikipedija*. [Elektronski] 6. december 2023. [Navedeno: 22. februar 2024.]  
<https://en.wikipedia.org/wiki/PyMOL>.
28. PyMOL by Schrödinger. PyMOL. *PyMOL*. [Elektronski] 2024. [Navedeno: 22. februar 2024.]  
<https://pymol.org/2/#page-top>.
29. Kralj, Sebastjan, in drugi. *A Comprehensive In Silico Protocol for Fast Automated Mutagenesis and Binding Affinity Scoring of Protein-Ligand Complexes*. 2023.
30. Brooks BR, Karplus M. in drugi. *CHARMM: the biomolecular simulation program*. J Comput Chem. 2009 Jul 30;30(10):1545-614. doi: 10.1002/jcc.21287. PMID: 19444816; PMCID: PMC2810661.