

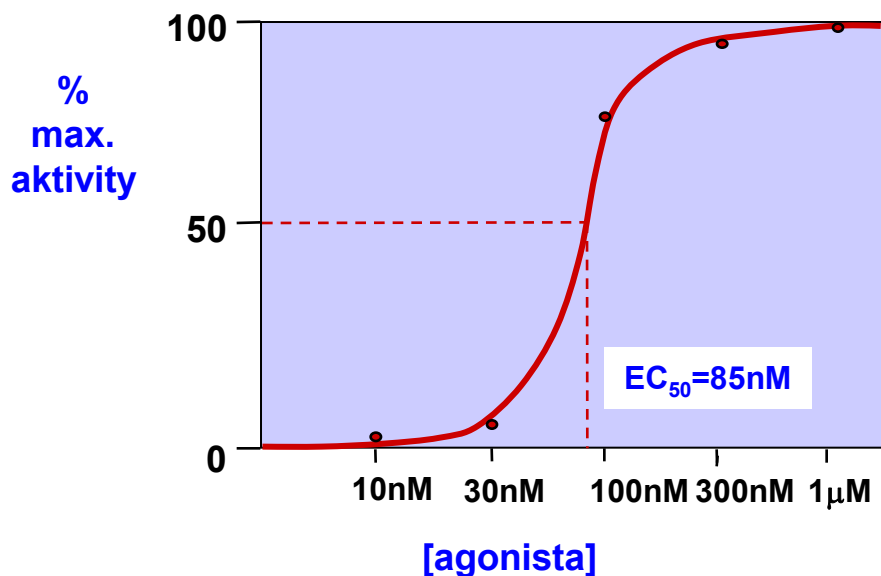
Interakce protein - léčivo

upravil a přeložil Tomáš Goněc podle:

Barrie Martin, AstraZeneca R&D Charnwood

Chemistry, Lecture 3: Molecular interactions and drug potency

Závislost účinku na dávce



(kompetitivní) inhibitory enzymu:

Měří se míra inhibice při různých koncentracích látky.

IC₅₀ - Koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% snížení vnitřní aktivity enzymu

$$pIC_{50} = -\log_{10}(IC_{50})$$

$$IC_{50} 1\mu M = pIC_{50} 6.0$$

$$IC_{50} 1nM = pIC_{50} 9.0$$

Agonisté: Měření % **odpovědi** při různých koncentracích agonisty

EC₅₀ – Koncentrace agonisty, která způsobí 50% maximální odpovědi. $pEC_{50} = -\log_{10}(EC_{50})$

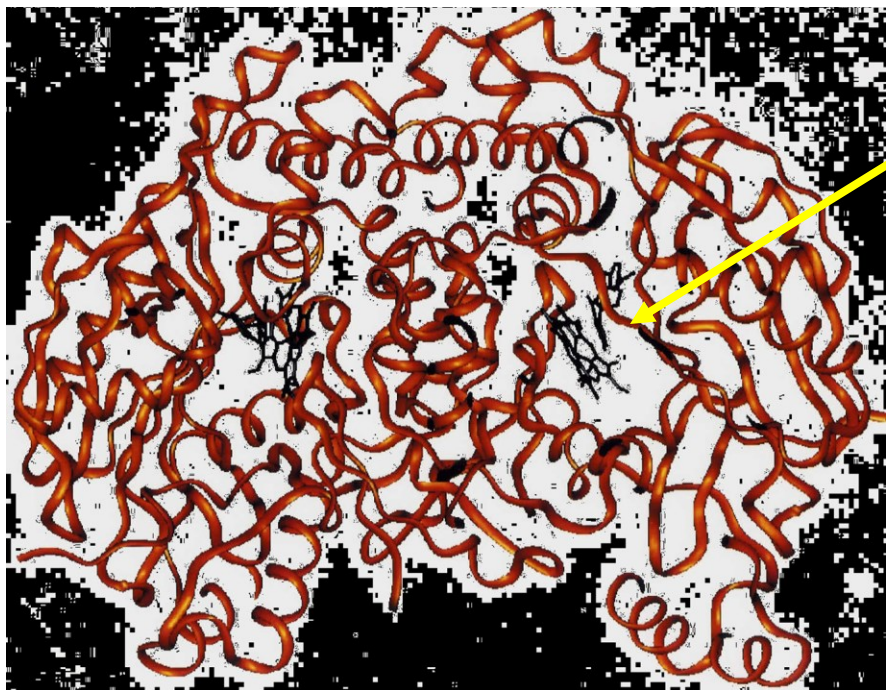
Antagonisté: Situace je daleko složitější. Antagonisté posouvají nějakým způsobem křivku závislosti odpovědi na koncentraci agonisty doprava – nejužitečnější je proto měření afinity (**pA₂**) – měří se množství navázaného agonisty při různých koncentracích antagonisty.

Problematické u ireverzibilních antagonistů a u parciálních agonistů (antagonistů s vnitřní aktivitou)

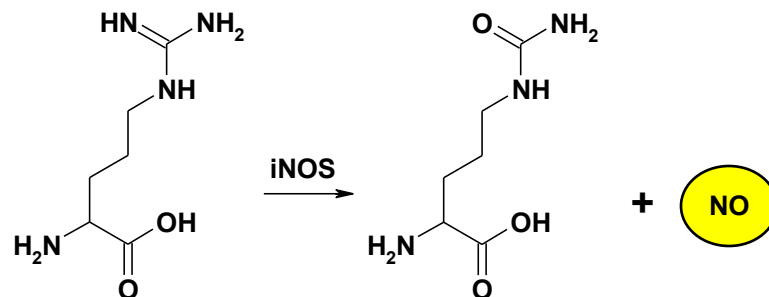
Pro léčivo je typická cílová aktivita $pIC_{50} \geq 8$

(odpovídá koncentraci <10 nM)

iNOS – Výzkumný projekt AZ Charnwood



Aktivní místo
Hem & inhibitor

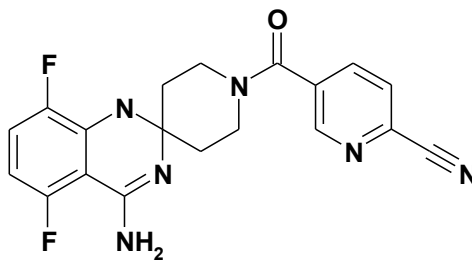


NO syntetasa – katalyzuje uvolňování oxidu dusnatého z argininu v tkáních – způsobuje vazodilataci a otoky při zánětlivých onemocněních, např. revmatoidní artritidě

AZ10896372

pIC_{50} 7,5

Účinný selektivní inhibitor iNOS
vyvinutý Astra Zeneca Charnwood



AstraZeneca 

Jak se léčiva váží na enzymy a receptory?

Léčiva se váží na konkrétní místa enzymů a receptorů. V případě enzymů je to nejčastěji **aktivní místo**. Receptory mají **vazebná místa** tvořená transmembránovými doménami, kam se většinou léčiva váží (ne vždy je totožné místo pro vazbu agonisty a antagonisty).

Tato místa jsou tvořena množstvím různých aminokyselin, které vytvářejí specifický 3-D tvar a fyzikální vlastnosti místa:

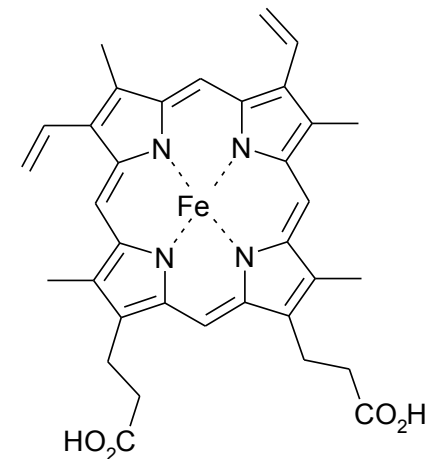
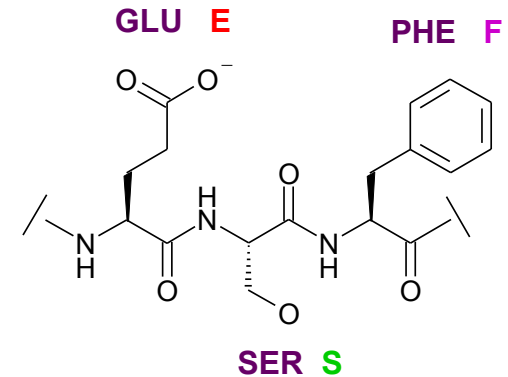
- Náboje: CO_2^- , NH_3^+ , $=\text{NH}^+$
- Polární skupiny: OH, C=O, CONH
- Hydrofobní skupiny: fenyl, alkyl, SMe

U enzymů jsou přítomna některá typická aktivní centra, např.:

- **Asp-His-Ser** v esterasách
- **SH** v některých proteasách
- kovové ionty (CYP-450, iNOS).

Malé molekuly vážící se na tato místa musí splňovat obě vlastnosti:

- komplementarita tvaru molekuly a vazebného místa
- energeticky výhodné vazebné interakce vyvolávající účinek

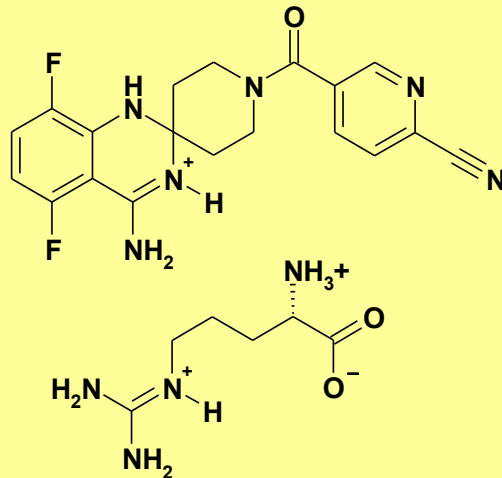


Haem group – iNOS, CYP-450

Komplementarita tvaru

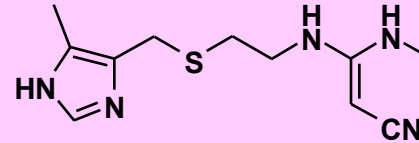
Inhibitor iNOS

AZ10896372

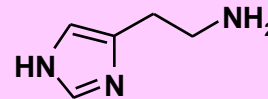


Arginin

Antagonisté H₂ receptorů



Cimetidin



Histamin

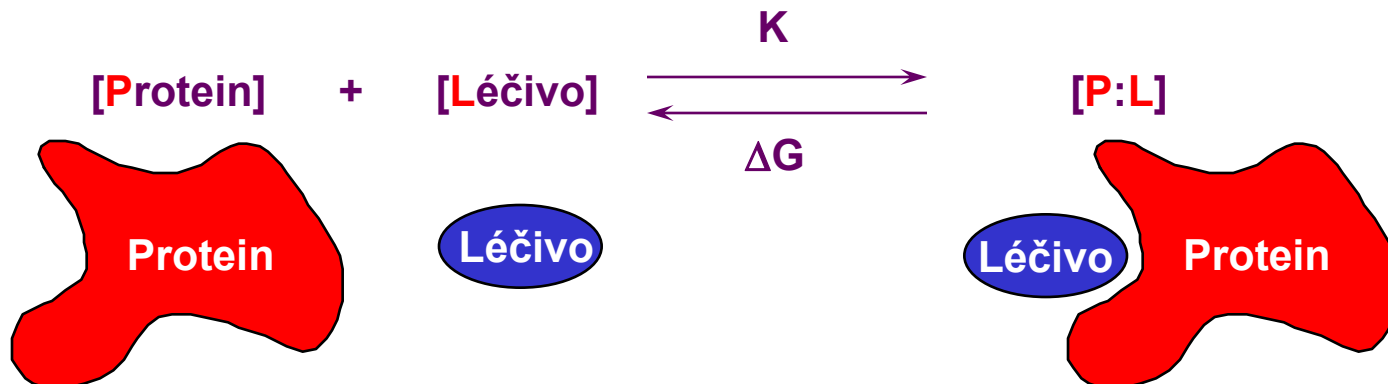
Molekula léčiva musí pasovat na **vazebné místo** a komplementarita tvaru je důležitou vlastností molekuly. Kompetitivní inhibitory často připomínají strukturu substrátu enzymu, protože se váží na stejné **aktivní centrum**. Toto platí i pro antagonisty vážící se na stejné místo jako agonista. Většina antagonistů se však **váže na jiné místo receptoru než agonista** a může mít proto **zcela odlišnou strukturu**.

Síla interakce závisí na komplementaritě fyzikálně chemických vlastností funkčních skupin, které jsou v těsné blízkosti, tj. povrchu proteinu a struktury ligandu.

Vazebná místa nejsou zcela rigidní. Postranní řetězce aminokyselin tvořící vazebné místo mají určitou mobilitu. Velké množství podobných struktur může stejně dobře pasovat do místa, což je dáno drobnými změnami tvaru aktivního místa. Tuto schopnost vysvětlujeme hypotézou „indukované komplementarity“.

Vazebné energie protein-léčivo

Pro vazebnou rovnováhu mezi **P**roteinem a **L**éčivem



$$K = \frac{[P:L]}{[P] \times [L]}$$

Změna Gibbsovy volné energie

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{and} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Změna **entalpie** (ΔH) tak i **entropie** (ΔS) ovlivňují sílu vazby

Interakce protein - léčivo

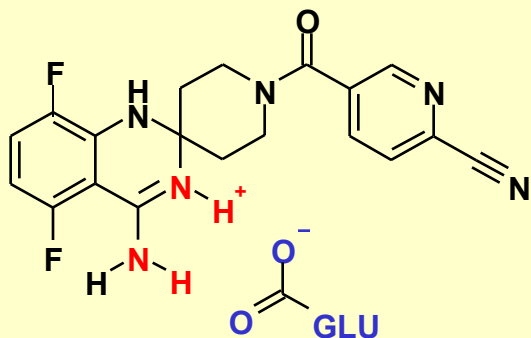
Vazba	Příklad	kJ/mol
Van der Waal	Xe...Xe, alkylové skupiny	2
Hydrofobní	Ph...Ph (π -interakce)	5
Dipól - Dipól	C=O...HN-R ($\delta+/\delta-$)...($\delta+/\delta-$)	5
Vodíková	H ₂ O...H ₂ O (X-H) ...(Y-R)	35
Ion - Dipól	F ⁻ ...H ₂ O (+/-ve)...($\delta+/\delta-$)	170
Ion - Ion	H ⁺ ...Cl ⁻ (+ve)...(-ve)	450
Kovalentní	C-O	350

Když se léčivo dostává z vodního prostředí do vazebného místa, musí zpřetrhat H-vazby s vodou, desolvatovat se atd. Tyto procesy vyžadují energii, proto může být **čistá vazebná energie** pouze zlomkem výše uvedených vazebných energií.

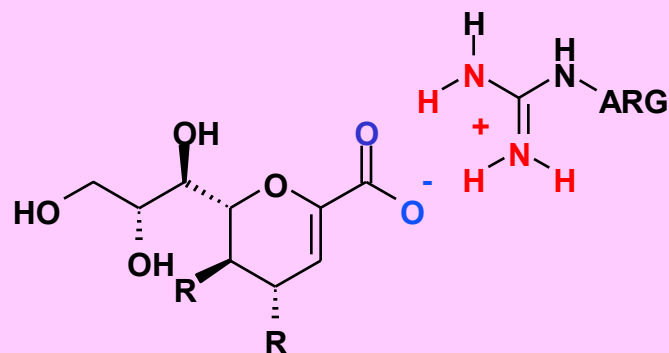
Electrostatické interakce

- Výsledkem přitažlivosti mezi dvěma molekulami s opačnými náboji.
- Silné iontové interakce mohou mít velký podíl na celkové síle vazby.
- Proteiny obsahují jak CO_2^- tak NH_3^+ zbytky, a ty mohou být přítomny v aktivních místech a interagovat s opačně nabitými skupinami léčiva.

AZ-10896372 inhibitor iNOS



Inhibitor neuraminidasy (Antivirotikum)



- Energie iontových vazeb může být v řádech **>30 kJ/mol**
- Můžou vést ke zvýšení afinity až o **>10⁶ násobek**

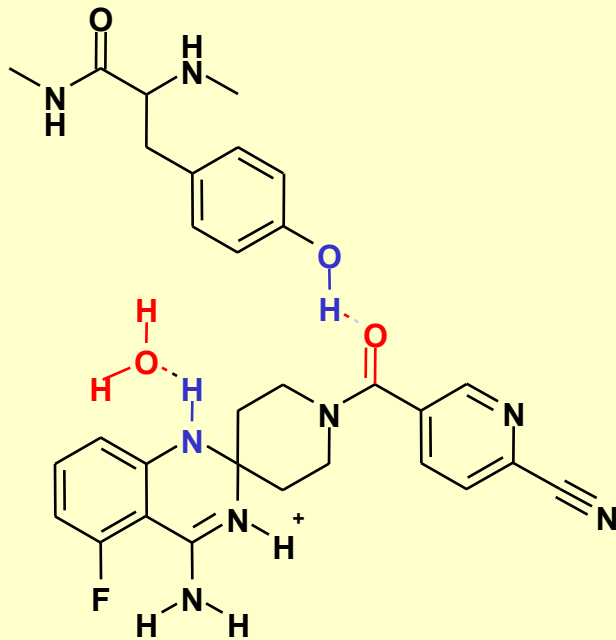
Vodíkové vazby

Vodíková vazba vzniká pokud je vodík mezi dvěma silně elektronegativními atomy:

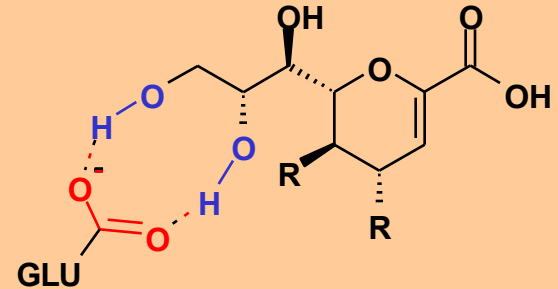
Donor má navázaný vodík, **Akceptor** má volný nevazebný elektronový pár

D-X-H....Y-A

např. **R-O-H.....O=C**



AZ10896372 - iNOS komplex
amid-tyrosin H-vazba



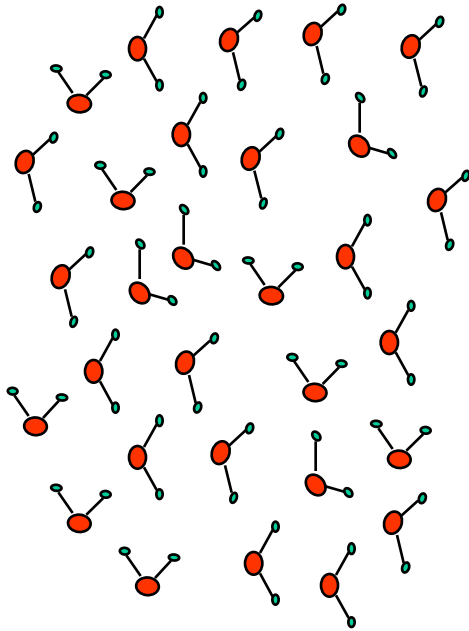
Inhibitor neuraminidasy
vodíková vazba zesílená nábojem

Hydrofobní interakce

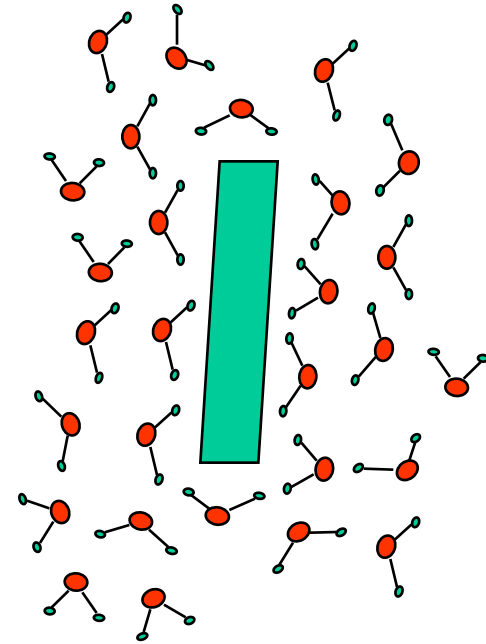
- Léčiva obecně jsou většinou hydrofobní molekuly
 - Vazebná místa mají v rámci proteinu také obecně hydrofobní charakter
 - Z toho plyne určitá přirozená přitažlivost mezi jakýmkoliv léčivem a jakýmkoliv vazebným místem
 - Co je důvodem této přitažlivosti?
-
- **Přírůstek entalpie může být tvořen van der Waalsovými vazbami:**
 - **mezi alkyly, aryly, halogeny**
 - **π - π interakce jsou velmi důležité (silnější než výše uvedené)**

 - **Přírůstek entropie je tvořen vytlačáním molekul vody z aktivního místa a jejich návratu do více náhodného stavu ve vnějším prostředí.**
-
- Každá $-(\text{CH}_2)-$ skupina může přispět >1 kJ/mol k celkové vazbě
 - Každý fenyl / heteroaryl / násobné vazby může přispět >2 kJ/mol k celkové vazbě
 - Tyto efekty se sčítají a proto mohou být **hydrofobní interakce** rozhodující složkou celkové vazebné energie

Hydrofobní interakce : Δ Entropie

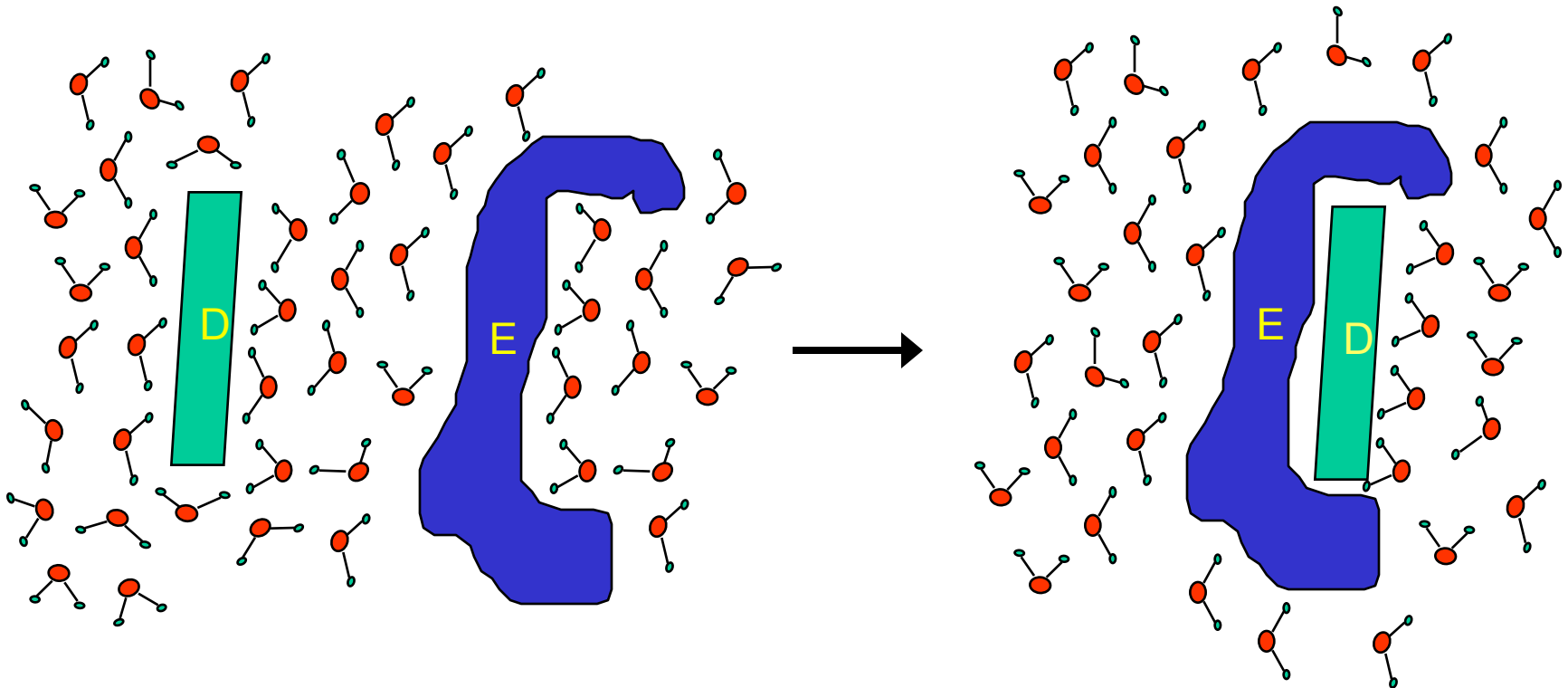


Molekuly vody jsou ve vysoce neuspořádaném stavu. Každá molekula maximalizuje počet H-vazeb k ostatním molekulám



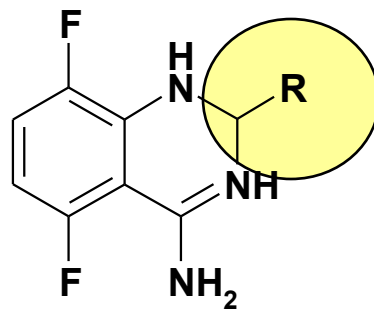
Pokud je hydrofobní léčivo umístěno do vody, struktura vody v jeho okolí se stane více uspořádanou. Vazby $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ sice zůstanou zachovány, ale v blízkosti látky se omezí pohyblivost molekul H_2O . To vede ke snížení **entropie** a je energeticky méně výhodné.

Hydrofobní interakce : Δ Entropie



- Hydrofobní interakce mezi proteinem a léčivem je energeticky preferována **přírůstkem entropie**:
 - Voda v okolí se vypuzením léčiva vrátí do méně uspořádaného stavu
 - Molekuly vody jsou vypuzeny z aktivního místa
- Navíc je tu nárůst **entalpie** vznikem nových vazeb (např van der Waalovy interakce)

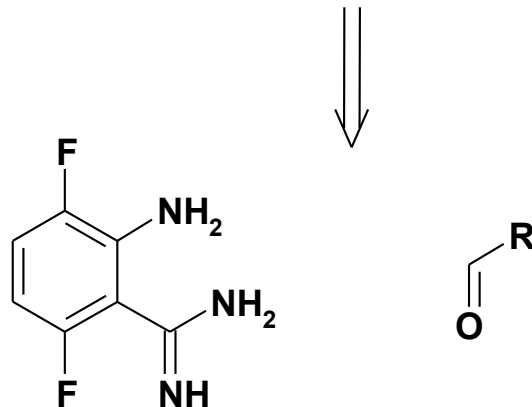
Optimalizace hydrofobicity ve vývoji léčiv



Nový iNOS inhibitor R = Me, malý lipofilní substituent iNOS pIC₅₀ 7.8

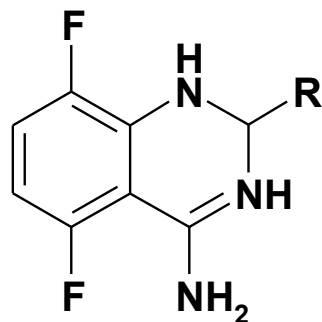
Cíl: vyzkoušet velikost lipofilní kapsy – co jiného se sem vejde?

Syntetizována série analogů:

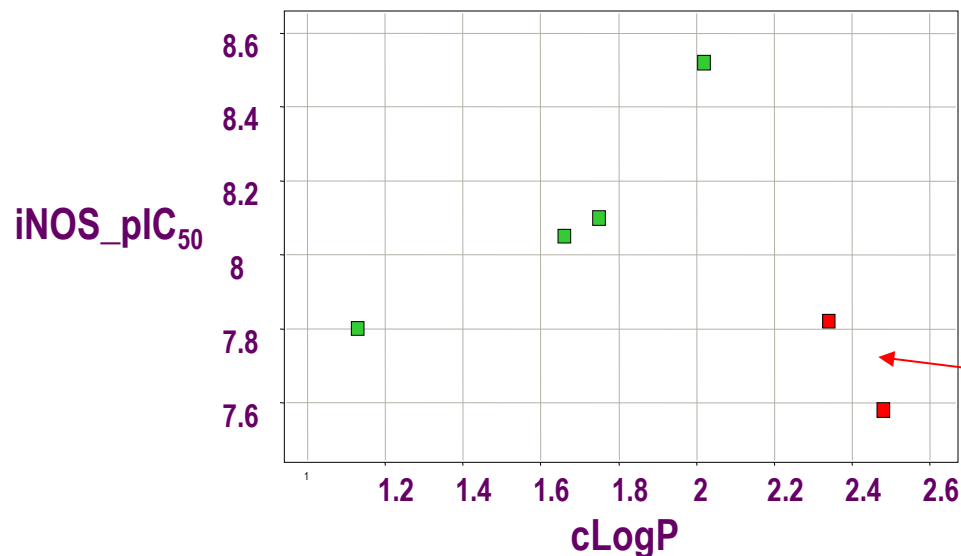


Vliv hydrofobicity na aktivitu

Vazba do lipofilní kapsy iNOS



R	cLogP	IC ₅₀ μM
Me	1.13	0.016
Et	1.66	0.009
CF ₃	1.75	0.008
Thiofen	2.02	0.003
Fenyl	2.34	0.015
2-Me-thiofen	2.48	0.026



Moc objemné, nevejdou se
(komplementarita tvaru)

Bioisostery

Isoster:

Podobnosti ve fyzikálně-chemických vlastnostech atomů / funkčních skupin / molekul s podobným elektronovým uspořádáním (počet a uspořádání elektronů valenčních vrstev). Často mezi prvky stejné skupiny (Cl → Br, C → Si).

Grimmovo pravidlo záměny hydridů (1925) -

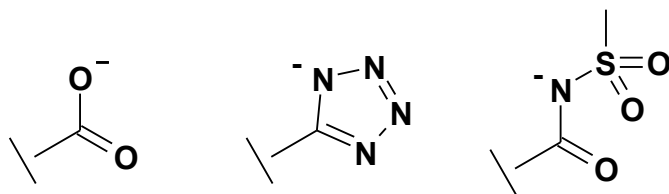
C	N	O	F	Ne	Na ⁺
CH	NH	OH	FH		
	CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂ ⁺	
		CH ₃	NH ₃	NH ₄ ⁺	

Bioisostery:

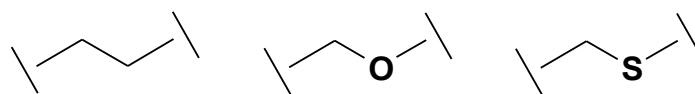
Nejjednodušší definice – jakákoliv skupina se stejným typem vazby na protein

Dvě zaměnitelné funkční skupiny zachovávající biologickou aktivitu.

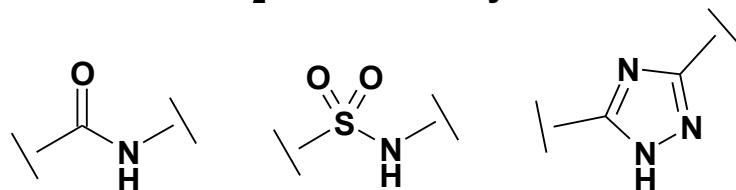
Bioisosterní záměna často vede ke zlepšení jak v účinku tak v jiných vlastnostech molekuly (např. metabolická stabilita, absorpce....)



karboxylová skupina a bioisostery

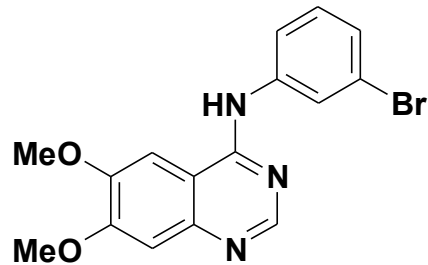


-CH₂ & bioisostery

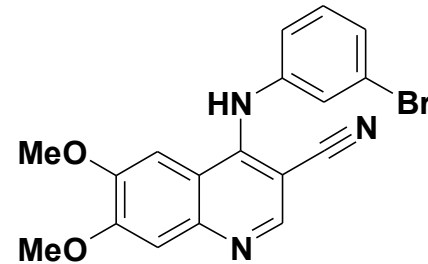


amid & bioisostery

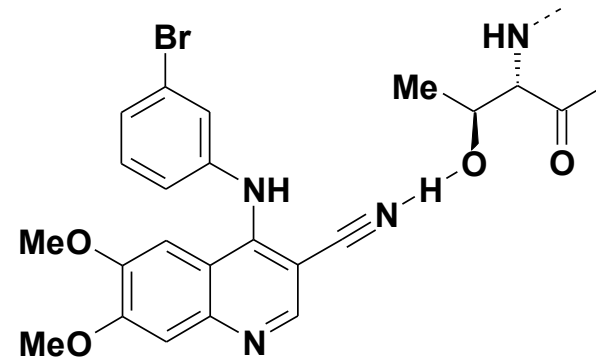
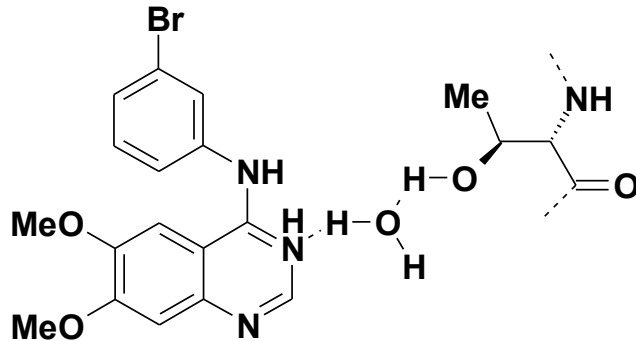
„neviditelné“ isostery



EGF-R 2.2 nM

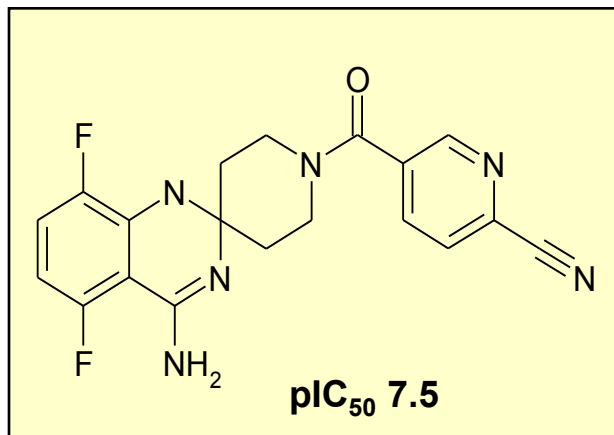


EGF-R 7.5 nM



Vodíkové vazby mohou vznikat prostřednictvím molekuly vody nebo přímo

Optimalizace účinku



Jak může být zvýšena účinnost této molekuly?

Potřeba poznat, které části molekuly jsou nezbytné pro účinek – postupné odstranění substituentů.

Prozkoumat, kam by se daly zavést další skupiny zvyšující účinek tvorbou hydrofobních interakcí nebo vodíkových vazeb.

Nahrazovat nezbytné funkční skupiny bioisostery.

Při plánování použít dostupné informace o struktuře vazebného místa – např. krystalovou strukturu aktivní látky navázané na protein.

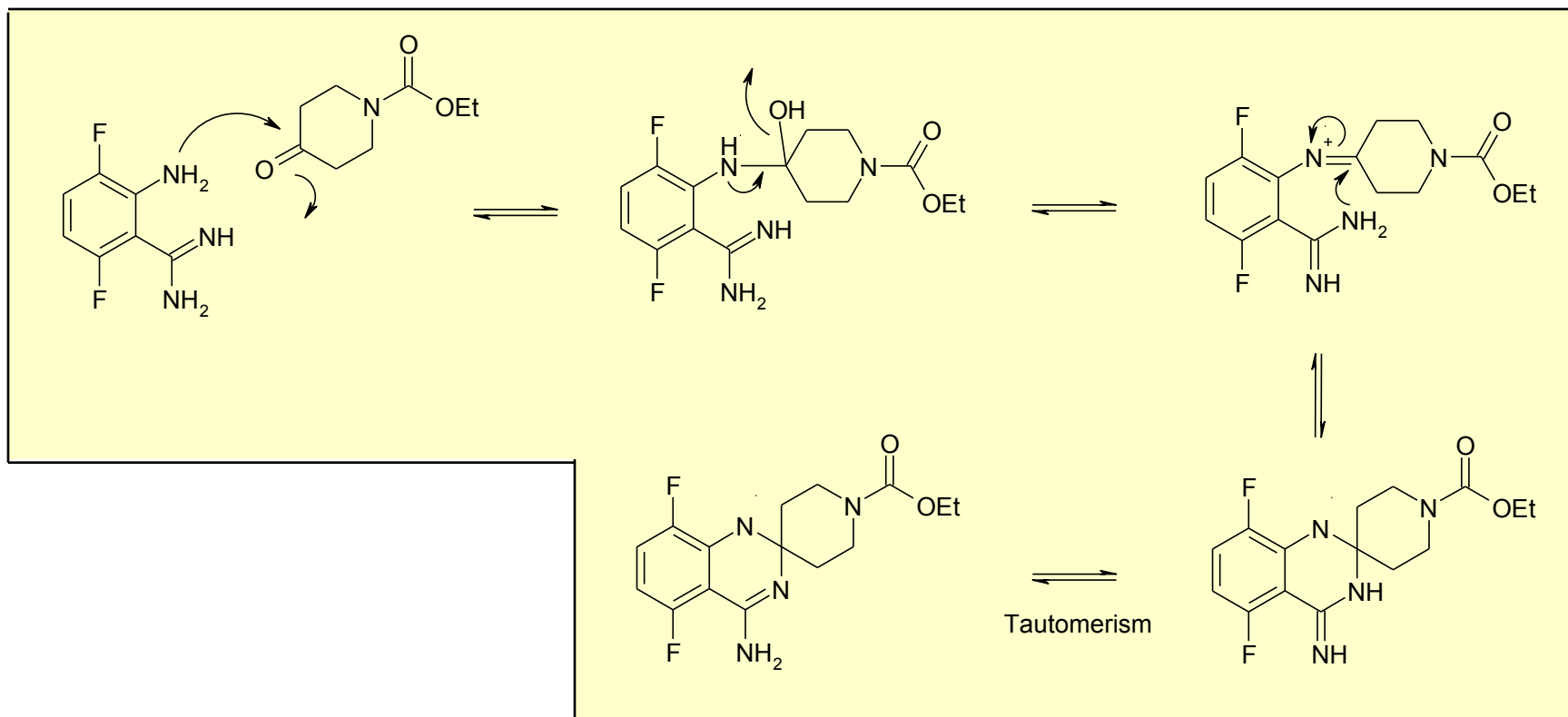
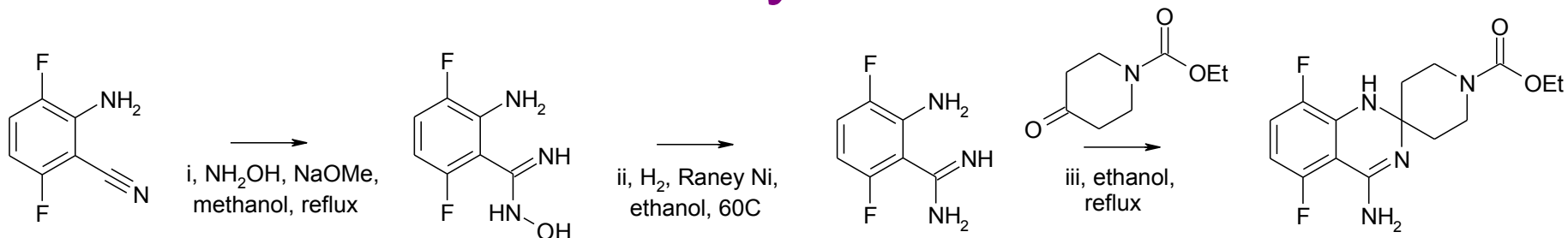
Použít modelování k vývoji a předběžnému potvrzení možných modifikací struktur.

Syntetizovat navržená analoga a experimentálně potvrdit hypotézy.

Vyvinout vhodný syntetický postup umožňující rychlou syntézu celé řady rozdílných analogů – vytvoření co největší série.

Nezapomenout vzít v potaz spoustu dalších vlastností, které ovlivní změna struktury – absorpci, metabolismus, toxicitu, rozpustnost atd.

Následná syntéza - 1



Následná syntéza - 2

