

Metody pozyskiwania substancji leczniczych

Nowoczesne metody projektowania leków
- chemia kombinatoryczna

Lek naturalny

Izolacja z surowców naturalnych
–jak np. rośliny, tkanki zwierzęce

Lek
biotechnologiczny

Biosynteza z wykorzystaniem mikroorganizmów, hodowli komórkowych, hybryd

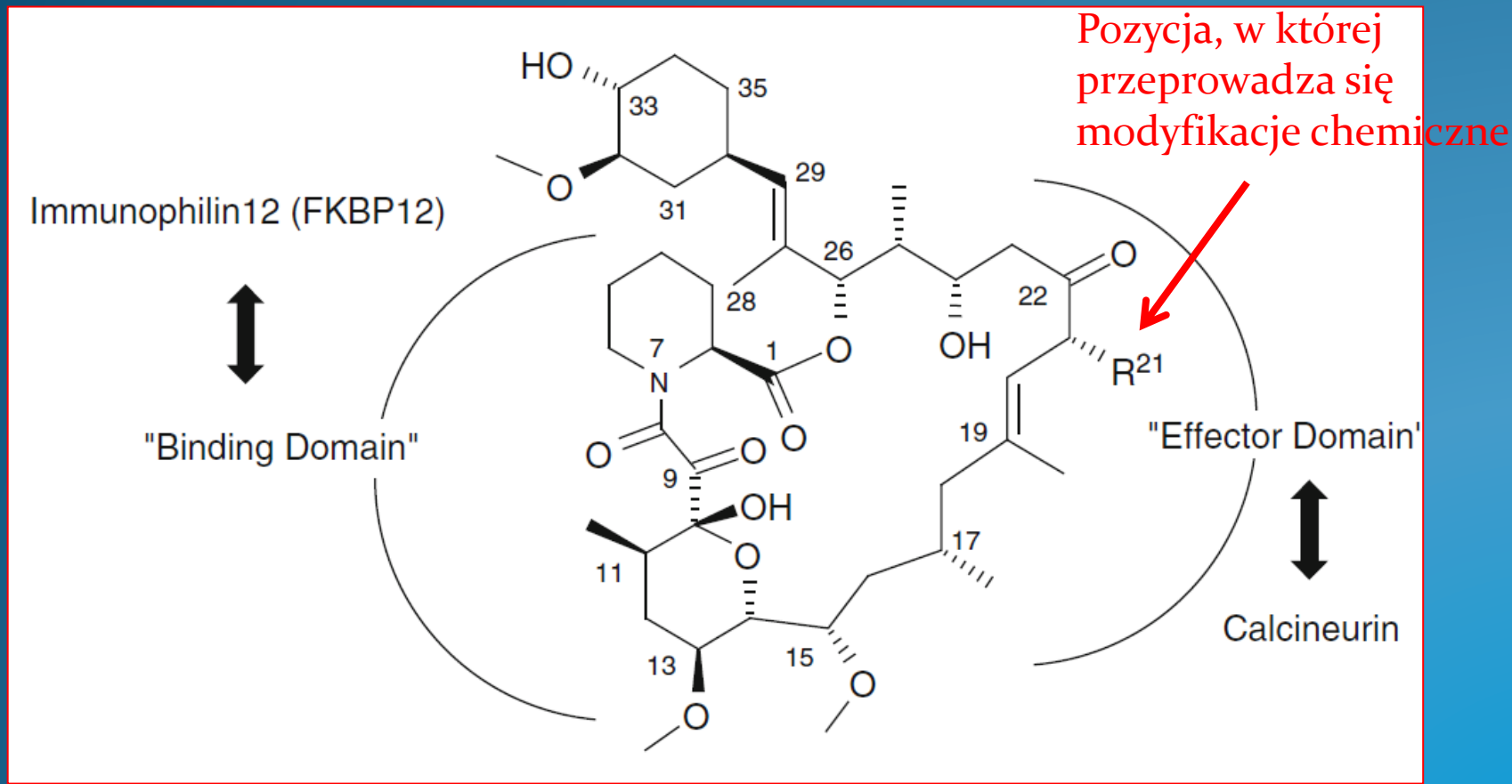
Lek syntetyczny

Biotransformacja - enzymatyczna transformacja **ksenobiotyku** do farmakologicznie czynnego produktu

Modyfikacja chemiczna substancji uzyskanej na drodze biosyntezy

Synteza totalna

Przykład związku otrzymywanego na drodze biosyntezy, poddawanego modyfikacji chemicznej: Tacrolimus, immunosupresant, inhibitor kalcyneuryny



- 23-członowy makrolakton o bardzo złożonej izomerii optycznej
- 14 węgli asymetrycznych, izomeriacis-trans (Z-E), tautomeria

Lek syntetyczny

–od pomysłu do wdrożenia

- Wybór jednostki chorobowej
- Określenie miejsca działania leku
- Określenie testu biologicznego

- Znalezienie struktury wiodącej
- Określenie zależności między budową a działaniem biologicznym (SAR)
- Identyfikacja grupy farmakoforowej
- Poprawienie oddziaływania między strukturą a miejscem działania
- Poprawienie własności farmakokinetycznych

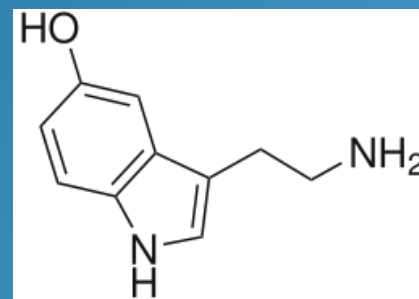
- Patentowanie
- Badanie metabolizmu
- Badanie toksyczności
- Opracowanie procesu technologicznego
- Badania kliniczne
- Wprowadzenie do obrotu

Zadania dla
syntetyka



Jak to wygląda w praktyce (przykład)?

- ❑ Decyzja – cel badawczy: chcemy znaleźć **innowacyjny lek przeciwdepresyjny**, lepszy niż obecnie stosowane
- ❑ Zakładamy na podstawie danych literaturowych, że powinien wiązać się z receptorami **5HT_{1A}**
- ❑ Zakładamy screeningowe badania **wiązalności z receptorem 5HT_{1A}**
- ❑ Zakładamy, że będzie to struktura podobna do naturalnego liganda receptora serotoninowego (to będzie **struktura wiodąca**)



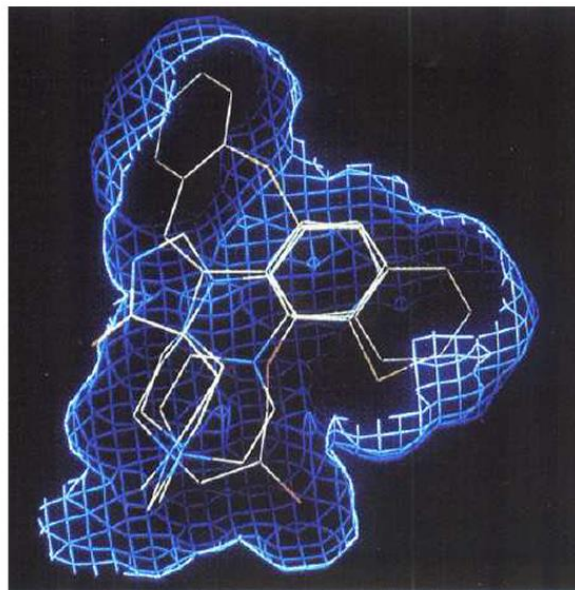
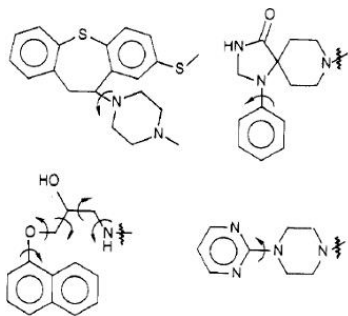
- ❑ Określenie zależności między budową a działaniem biologicznym (SAR):
Synteżujemy lub projektujemy *in silico* setki struktur i testujemy ich wiązalność z receptorem a następnie poszukujemy elementów cząsteczki **poprawiających** lub pogarszających oddziaływanie z receptorem

□ Identyfikacja grupy farmakoforowej:

Farmakofor – zbiór cech sterycznych i elektronowych, które są niezbędne dla optymalnego oddziaływania z celem molekularnym.

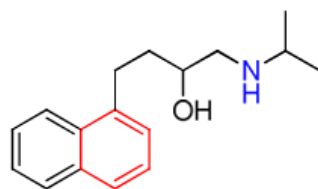
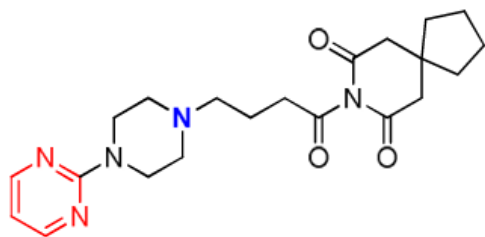
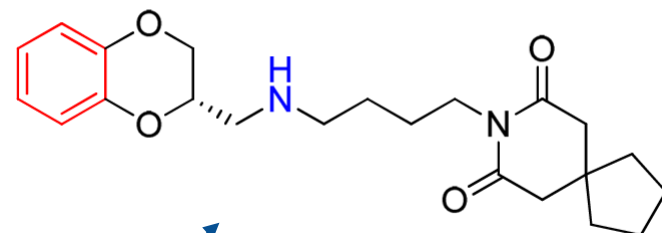
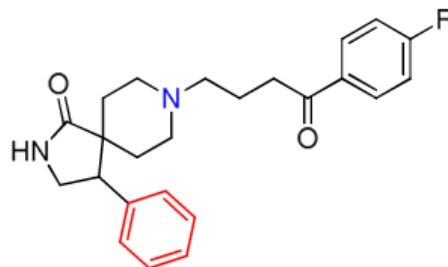
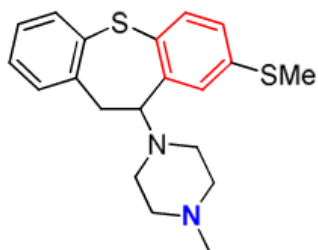
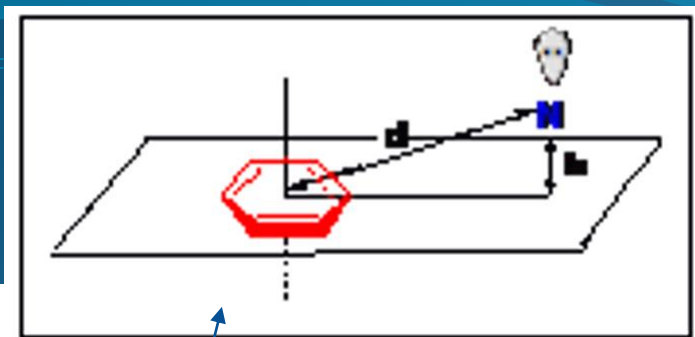
Farmakofor nie jest rzeczywistą cząsteczką a czysto abstrakcyjnym tworem.

Nakładanie związków z uwzględnieniem swobody konformacyjnej



[Podstawy projektowania leków wykład 11 - Bioorganic](http://bioorganic.ch.pwr.wroc.pl)
<http://bioorganic.ch.pwr.wroc.pl>

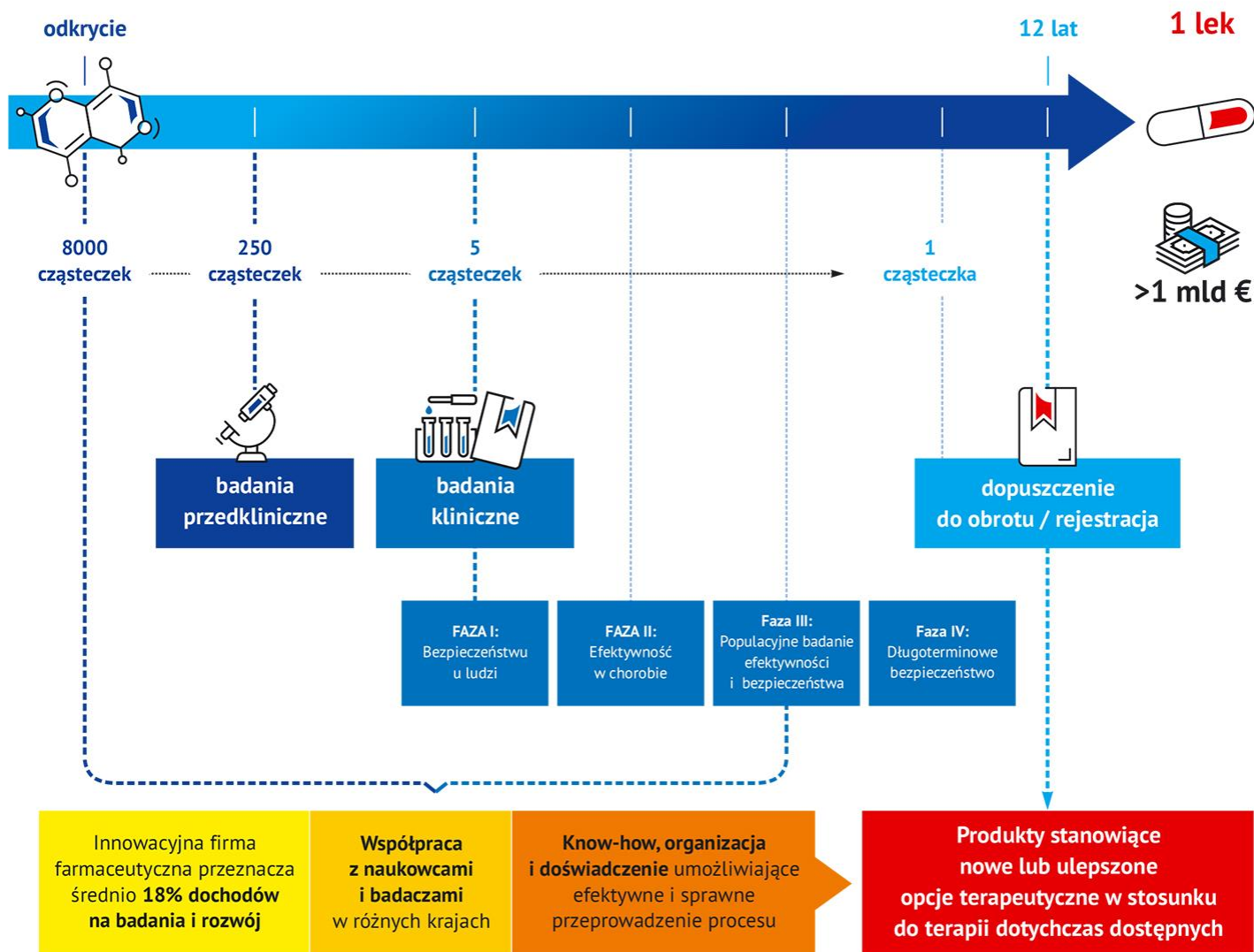
- Poprawienie oddziaływania między strukturą a miejscem działania
- Poprawienie własności farmakokinetycznych



Zaprojektowanie nowych związków. Otrzymany związek jest ponad 25 razy bardziej aktywny. Może „hit”?

Co dalej? Badania przedkliniczne *in vitro*, *in vivo* (ADME Tox), opracowanie postaci leku, opracowanie technologii otrzymywania, badania kliniczne Może sukces?

PROCES OPRACOWYWANIA NOWEGO INNOWACYJNEGO LEKU



Struktura wiodąca i jej poszukiwanie

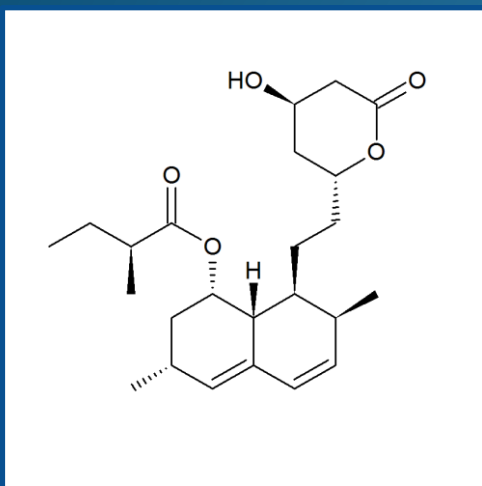
Struktura wiodąca- związek chemiczny który wykazuje pożądane właściwości biologiczne, czyli określony kierunek działania.

Stanowi punkt wyjścia do poszukiwania nowego leku, nie musi działać silnie, może wykazywać działania niepożądane.

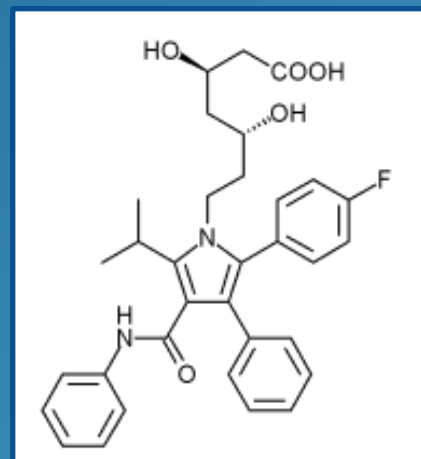
Źródła struktury wiodącej

1. Surowce naturalne:

rośliny, zwierzęta, organizmy morskie, mikroorganizmy

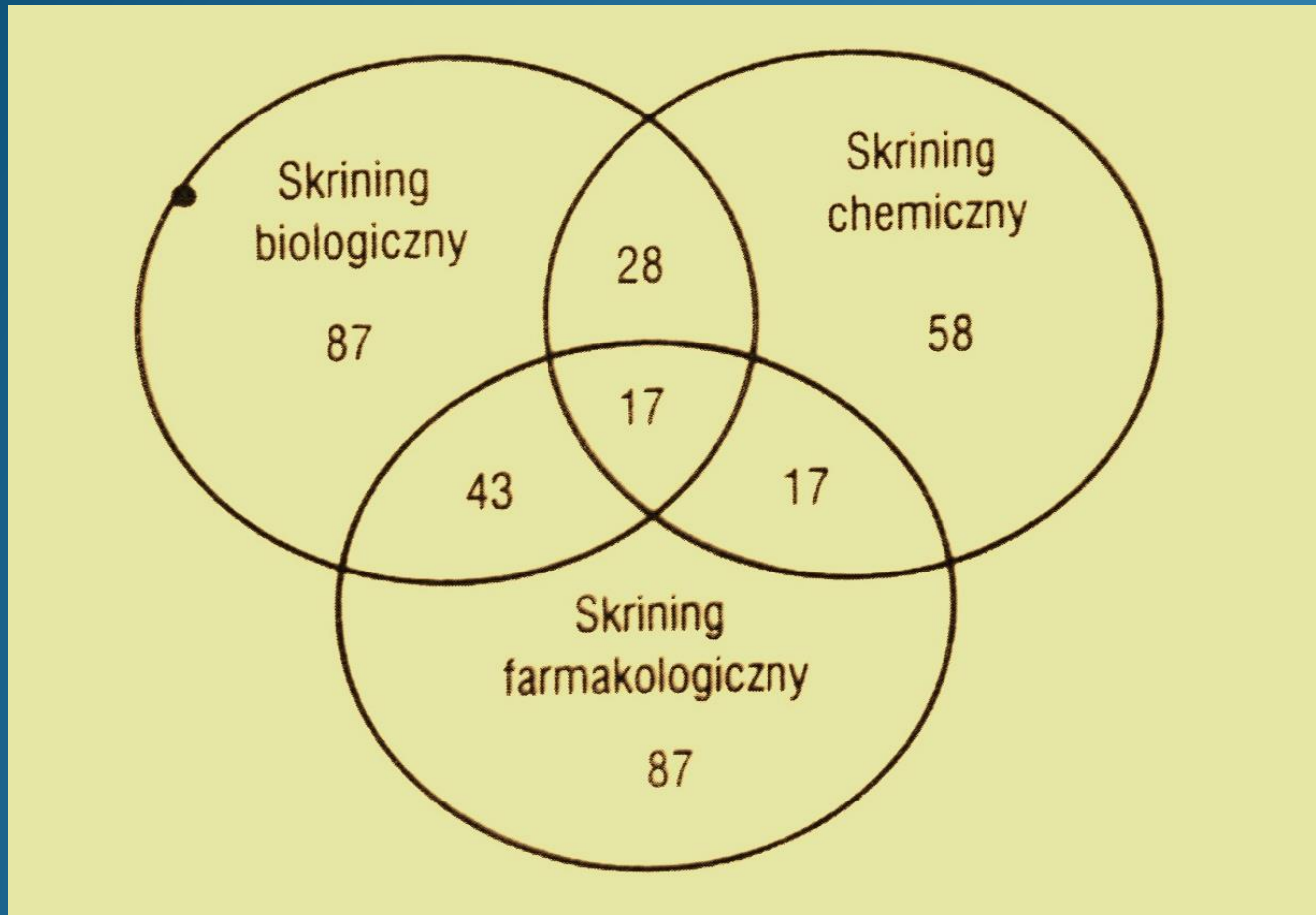


Lowastatyna,
metabolit grzybów



statyny typu II (analogi syntetyczne)
atorwastatyna, fluwastatyna,
rosuwastatyna, pitawastatyna

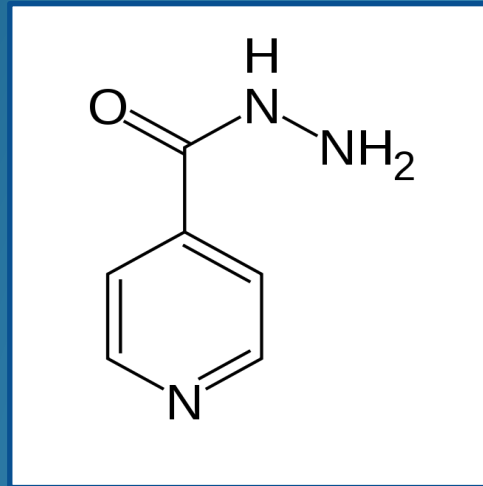
Poszukiwanie nowych struktur wiodących w środowisku naturalnym - przykład



Procentowy rozkład aktywności ($n = 268$) w przypadku ekstraktów z morskich promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. (wg O Kayser)

2. Związki syntetyczne:

Związki otrzymane w zespołach naukowych, zakupione przez firmy farmaceutyczne lub przez nie syntezowane, często otrzymywane jako produkty pośrednie, lub w zamyśle przeznaczone do dalszych badań chemicznych

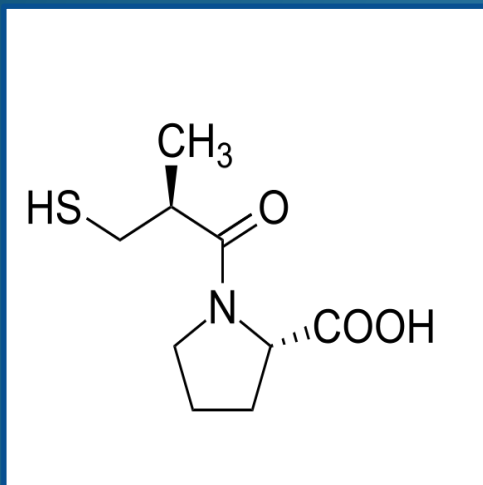


Isoniazyd – lek
przeciwgruźliczy

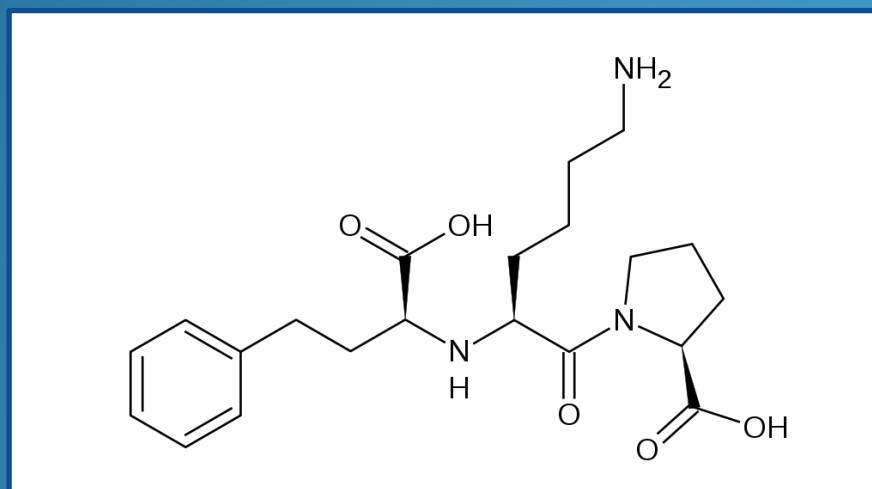
4. Istniejące już leki:

-Leki firm konkurencyjnych są wykorzystywane jako struktury wiodące do otrzymania związków o tym samym kierunku działania.

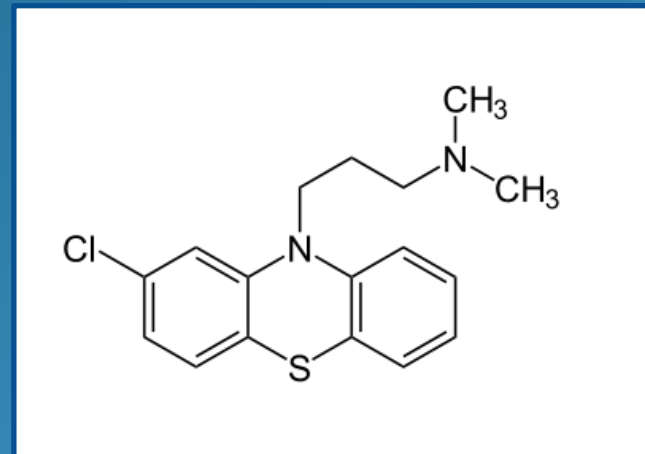
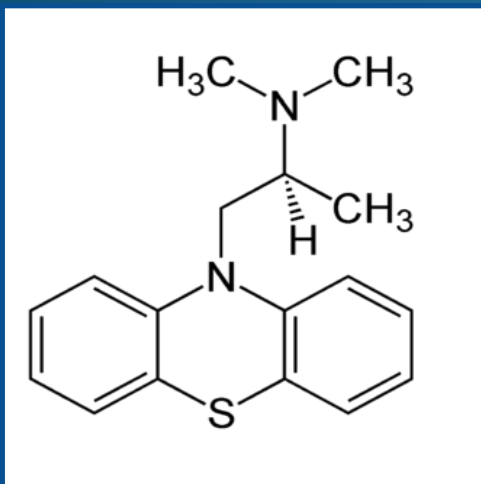
-Leki o znanych i „interesujących” działaniach niepożądanych mogą być wykorzystywane do poszukiwania leków o innym kierunku działania



Kaptopril – lek
obniżający ciśnienie
org Sqiubb



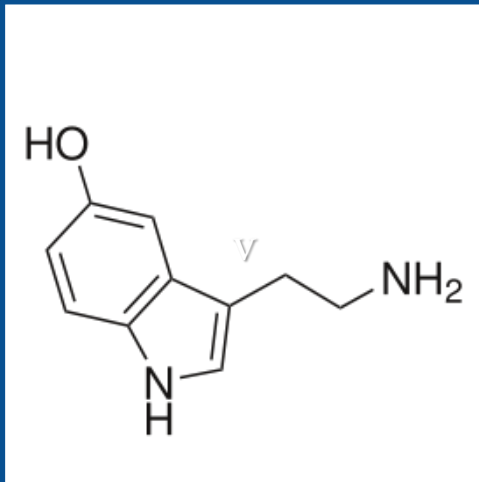
Lizinopril (Merck), Enalapril (Merck),
Cilazapril (Hoffman LaRoche)



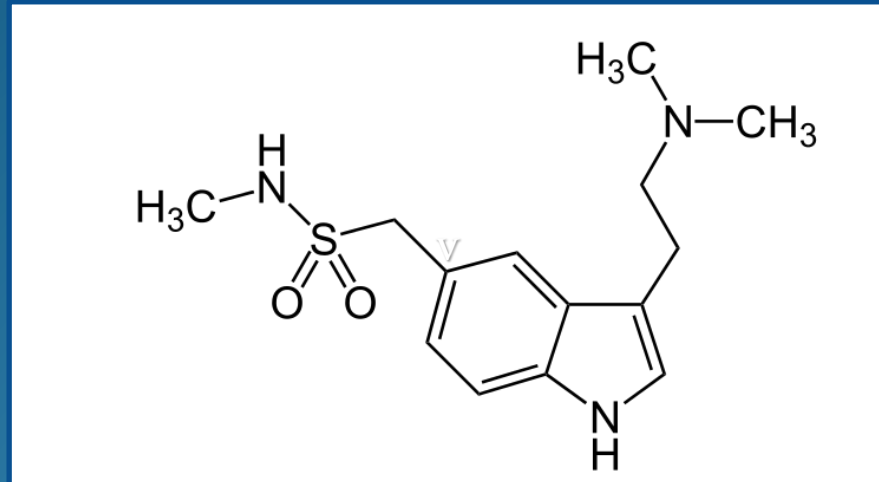
Prometazyna lek przeciwhistaminowy o stwierdzonym działaniu uspokajającym

Chloropromazyna, związek o podwyższonej aktywności uspokajającej, neuroleptyk

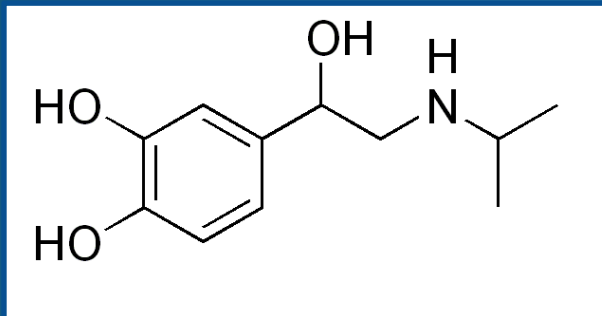
4. Naturalne ligandy i modulatory



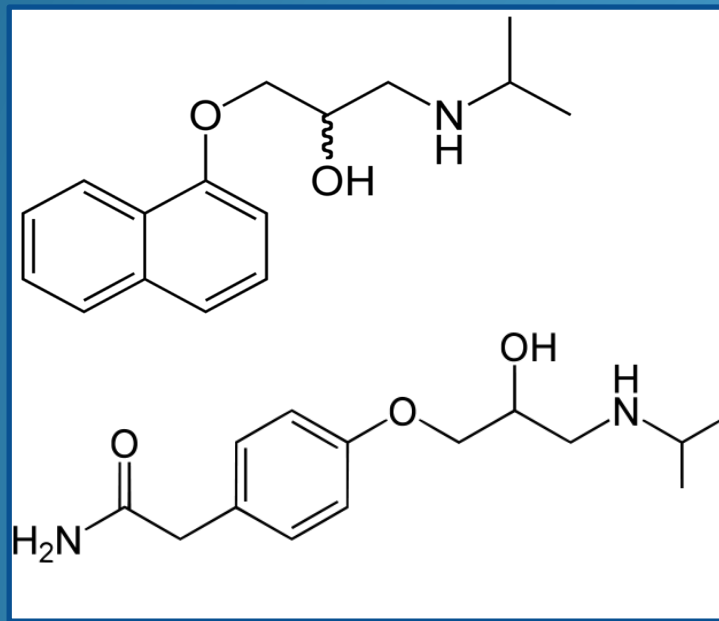
5-hydroksytryptamina
(5-HT)



Sumatriptan - agonista receptora 5-HT₁



Izoprenalina -
neurotransmitter



Propranolol -
nieselektywny
antagonista
receptorów β-
adrenergicznych,

Acebutolol -
kardioselektywny
β₁-bloker

5. Synteza kombinatoryczna

6. Projektowanie *in silico*

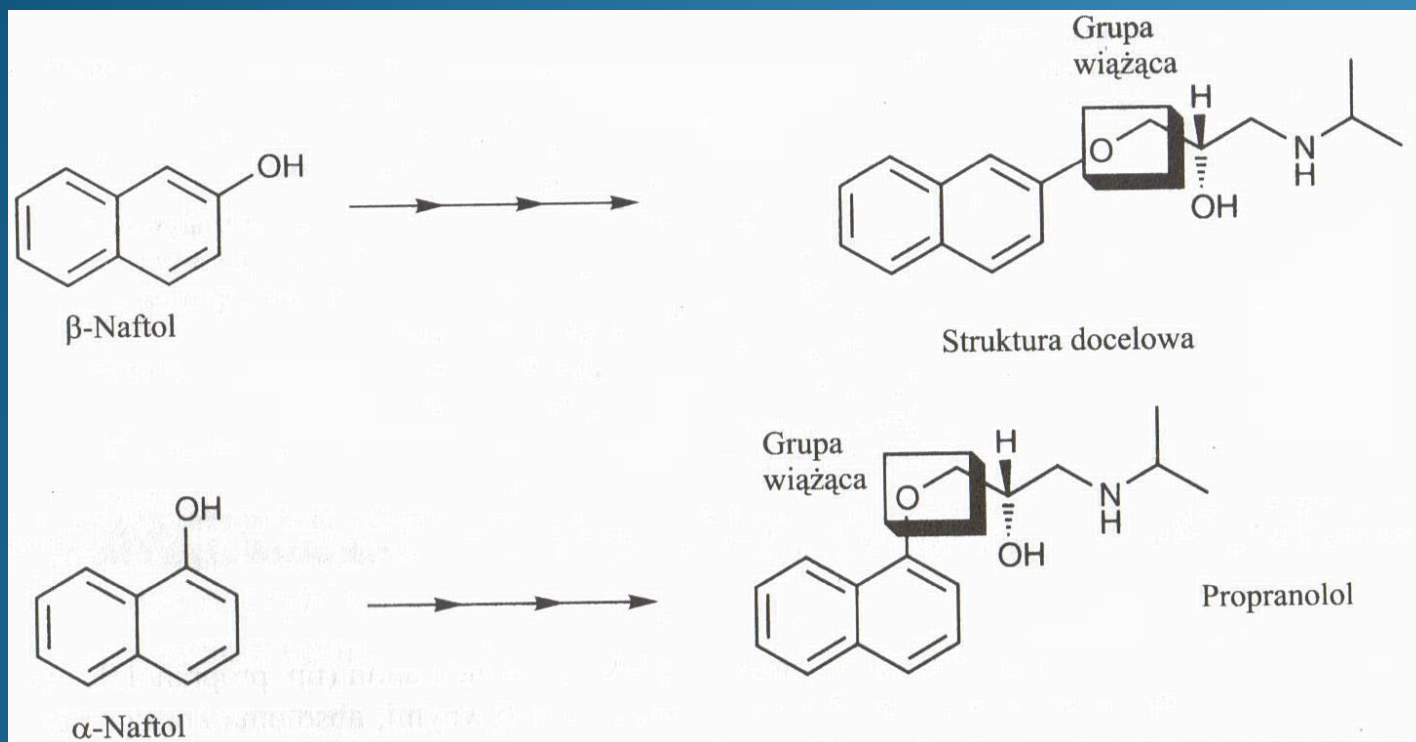
7. Przypadek (!)

Iproniazyd – stosowany początkowo w gruźlicy, powodował niespodziewanie pogodny nastrój pacjentów . Badania doprowadziły do otrzymania nowych leków antydepresyjnych – inhibitorów monoaminooksydazy.

Imipramina –analog chloropromazyny, otrzymano jako potencjalny lek antypsychotyczny. Zapoczątkował wprowadzenie do terapii tricyklicznych leków przeciwdepresyjnych.

W trakcie poszukiwań czystych antagonistów receptorów β -adrenergicznych zaplanowano ciąg syntez w których substratem był β -naftol.

Ze względu na brak w magazynie β -naftolu do syntezy wykorzystano α -naftol uzyskując propranolol, (czysty antagonist, 20 razy bardziej aktywny od znanego wówczas pronetalolu)



Otrzymana później analogiczna do propranololu pochodna β -naftolu okazała się znacznie mniej aktywna

Zależność między budową leku a jego działaniem (SAR)

Sposoby projektowania leków:

1. Zmiana „kształtu” potencjalnego leku, aby mógł się lepiej „dopasować” do receptora
2. Zmiana własności fizycznych leku, wpływających na dystrybucję, metabolizm i oddziaływanie z receptorem
3. Wymaga to syntezy szeregu analogów danego związku

Projektowanie leków

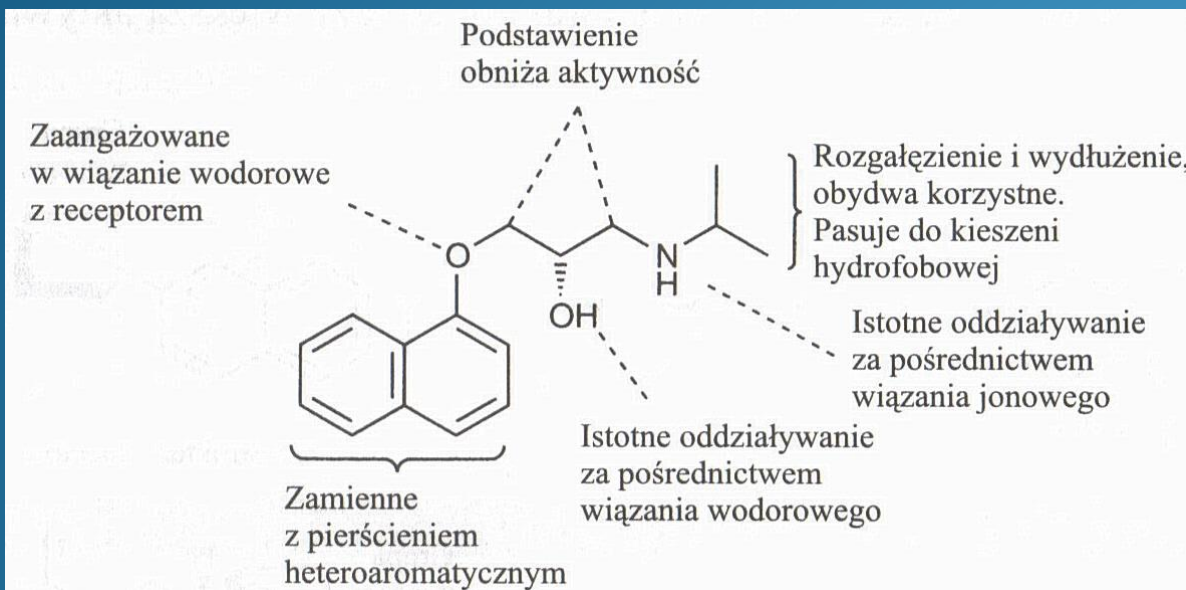
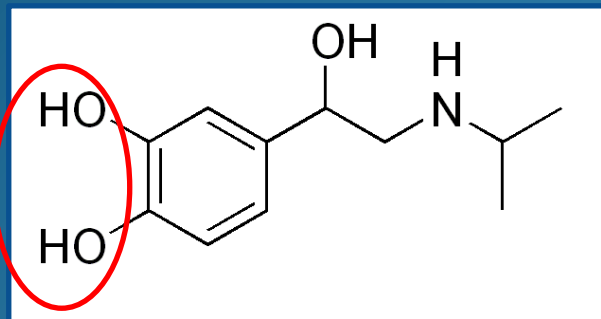
Strategie poprawiające oddziaływania między lekiem a miejscem jego działania:

- Wymiana podstawników
- Powiększenie cząsteczki
- Wydłużanie lub skracanie łańcucha
- Powiększanie lub zmniejszanie pierścienia
- Wymiana pierścieni
- Kondensacja pierścieni
- Wprowadzanie grup izosterycznych
- Upraszczenie struktury cząsteczki
- Usztywnianie cząsteczki

Przykładowe wyniki analizy zależności struktura-aktywność dla β -blokerów - aryloksypropanolamin

Struktura wiodąca -
izoprenalina

Odpowiadają za
aktywność
wewnętrzną



Propranolol - zależności struktura /aktywność w grupie arylopropanolamin

Metoda QSAR (*quantitative structure-activity relationship*)

Metoda zakłada możliwość określenia przewidywanej aktywności biologicznej cząsteczki na podstawie odpowiednich parametrów fizykochemicznych wynikających z jej struktury.

Zależności te określane są ilościowo.

Najczęściej brane są pod uwagę : hydrofobowość, właściwości elektronowe i steryczne – te parametry można stosunkowo łatwo zmierzyć.

Sprawdza się dla niektórych klas związków.

Synteza kombinatoryczna

Synteza kombinatoryczna pozwala na wytwarzanie w krótkim czasie bardzo dużej liczby związków w ilościach submikro.

Celem jest poddanie ich badaniu działania na określone receptory komórkowe (agonistycznego bądź antagonistycznego).

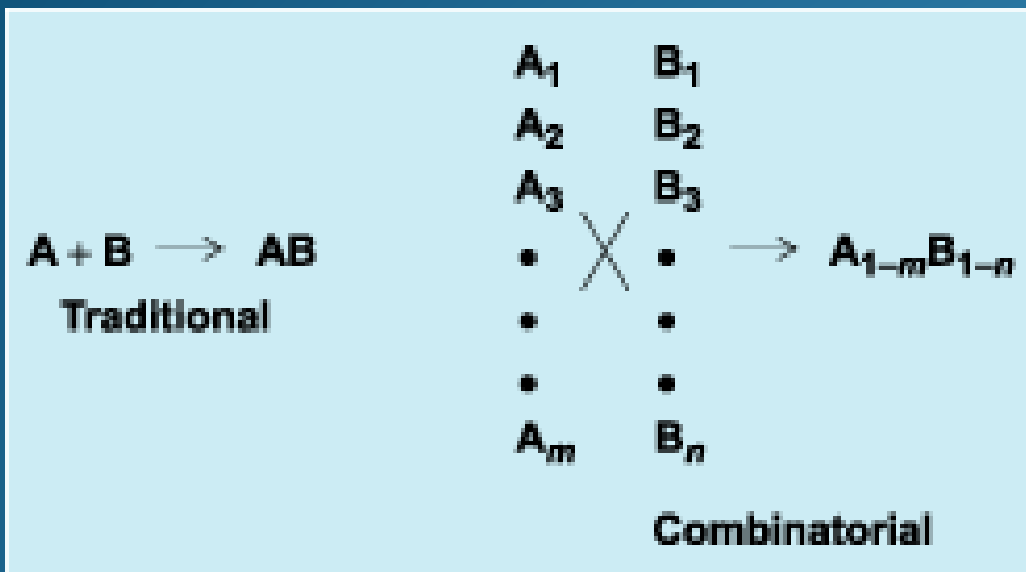
Stosowane metody badań aktywności (immunofluorescencyjne czy radioimmunologiczne) pozwalają na użycie pikomolowych ilości substancji.

Zarówno proces syntezy jak i badania aktywności farmakologicznej są zautomatyzowane .

Wysoko wydajny skrining to technika określana jako HTS (ang. *High Throughput Screening*), która prowadzi do miniaturyzacji i automatyzacji oraz umożliwia testowanie znacznej liczby próbek.

Dzięki opracowanym zminiaturyzowanym testom płytkowym można przebadać kilka tysięcy próbek w mikrostudzienkach, zawierających po ok. 1 μ l reagentów

Synteza tradycyjna a synteza kombinatoryczna



Metodą tradycyjną w ciągu miesiąca jeden chemik może otrzymać około 4 struktur, metodą kombinatoryczną można otrzymać około 3300 związków .

Jest to synteza tzw. bibliotek związków.

STRATEGIES

Conventional

- One molecule at a time
- Make → Purity → Test
- hundreds of molecules a month
- Slower lead generation
- High risk of failure

Combinatorial

- Many molecules at a time
- Make → Test → Purity
- Thousands of molecules a month
- Faster leads generation
- Low risk of failure

Synergy

LEAD IDENTIFICATION

Stosowane metodyki

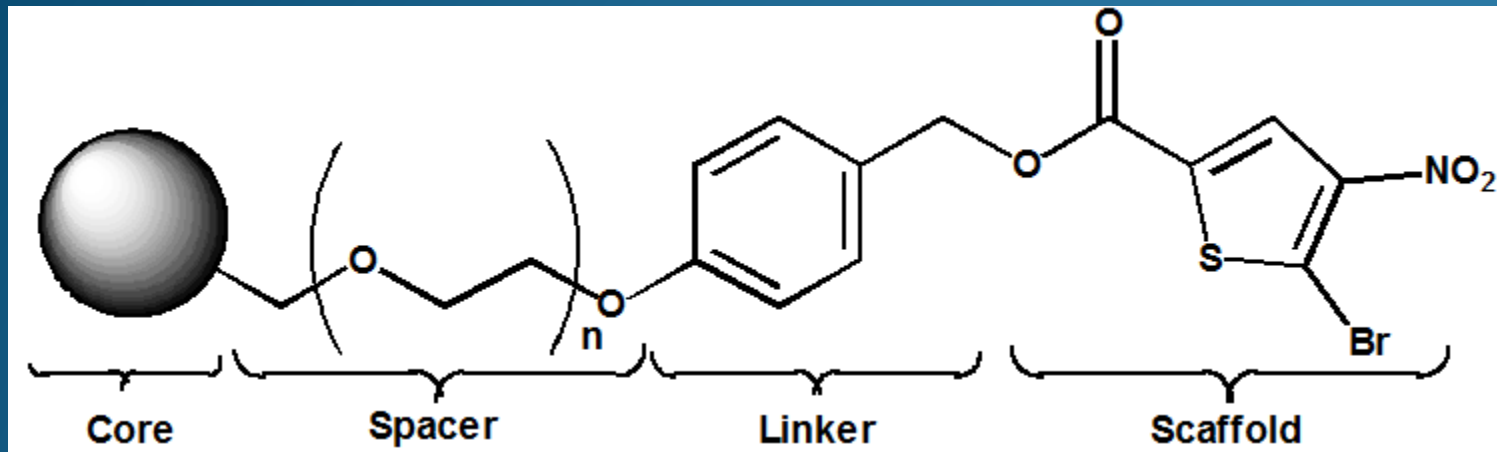
□ Synteza w roztworach

□ Synteza na nośnikach (kulki żywicy)

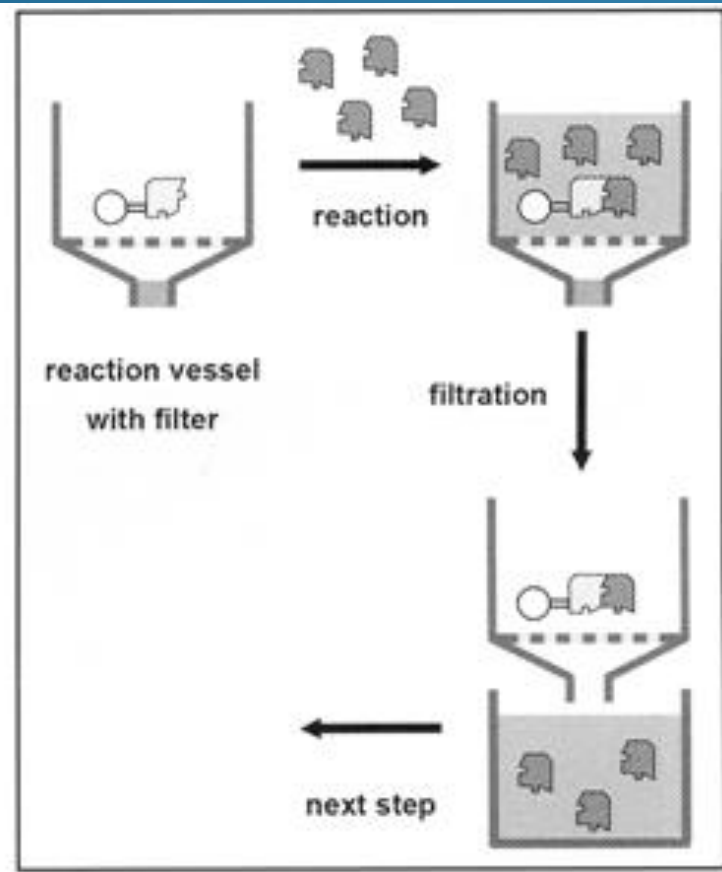
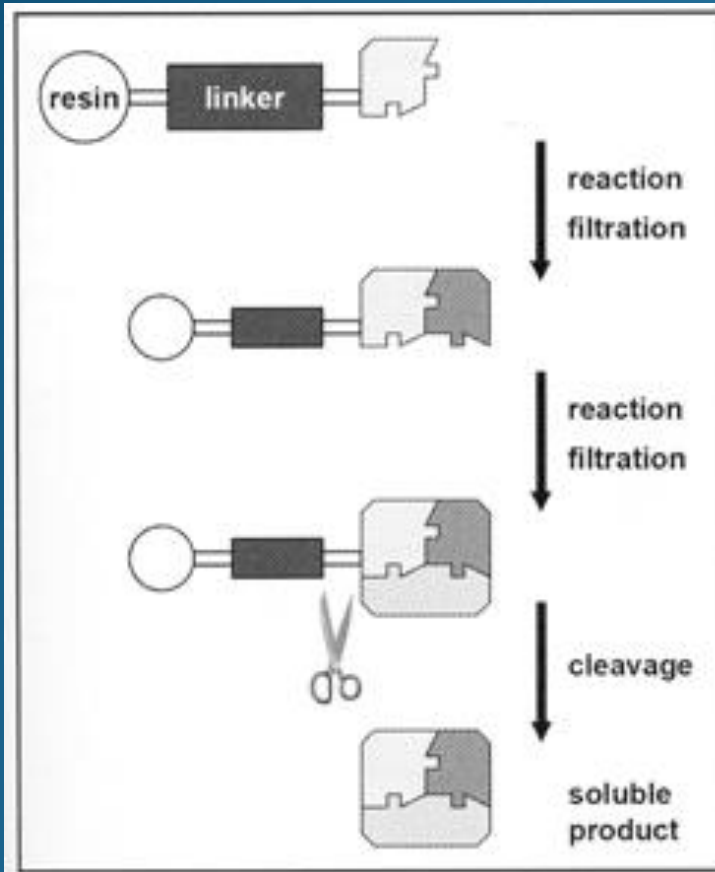
Wprowadził *Bruce Merrifield* laureat Nagrody Nobla z dziedziny chemii w 1984 for

Idea syntezy na nośniku stałym:

- Substrat jest przyłączany do chemicznie obojętnych, mikroskopijnych kulek nośnika stałego – żywicy.
- Po każdym etapie syntezy nie przereagowane reagenty są odmywane, produkty pozostają zakotwiczone do nośnika.
- Po zakończeniu syntezy produkt jest uwalniany od nośnika.



- ❑ Core – rdzeń – kulka polistyrenowa
- ❑ Spacer – odstępnik – nie zawsze obecny; np. glikol polietylenowy
- ❑ Linker – łącznik – nie zawsze obecny; ułatwia uwolnienie zsyntetyzowanej substancji
- ❑ Scaffold – szkielet – syntetyzowana substancja, uwalniana po syntezie



Zalety syntezy na nośniku stałym:

- skrócony całkowity czas syntezy
- łatwość izolacji produktu (filtracja)
- możliwość automatyzacji
- wysoka efektywność syntezy

Wady:

Trudności związane z koniecznością osadzania związków na podłożu i późniejszego ich uwalniania.

W syntezie kombinatorycznej stosowane są dwie podstawowe metodyki:

-Synteza równoległa

dająca bibliotekę pojedynczych związków,
*opracowana w połowie lat osiemdziesiątych przez Mario Geysena
związanego obecnie z Glaxo Wellcome.*

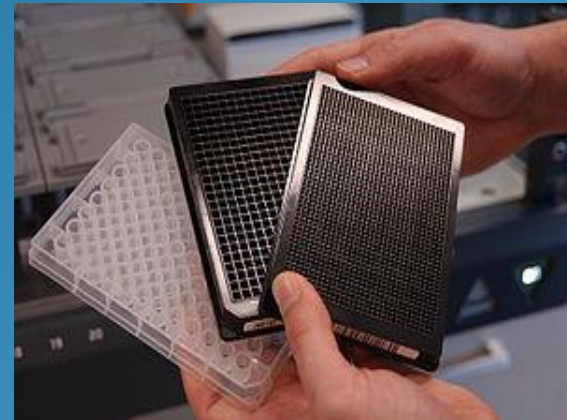
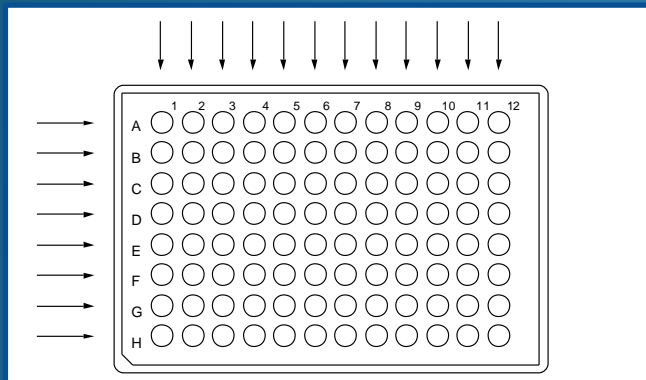
-Metoda split-and-mix (dziel i mieszaj)

w wyniku której powstaje mieszanina wielu
związków

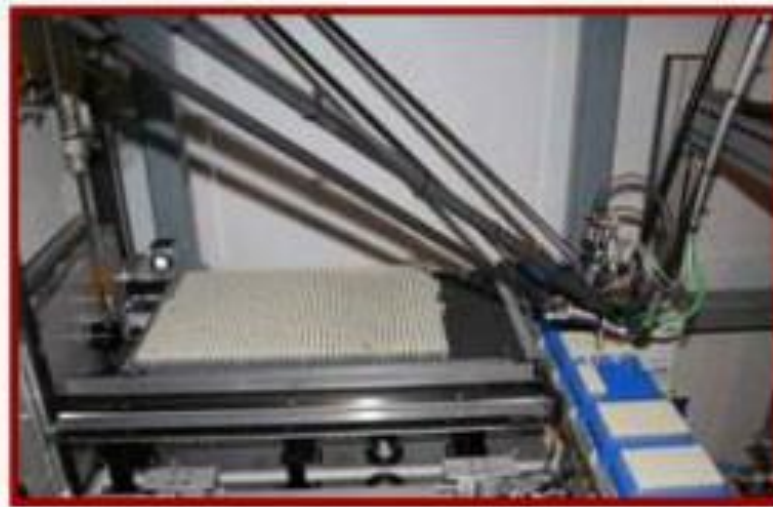
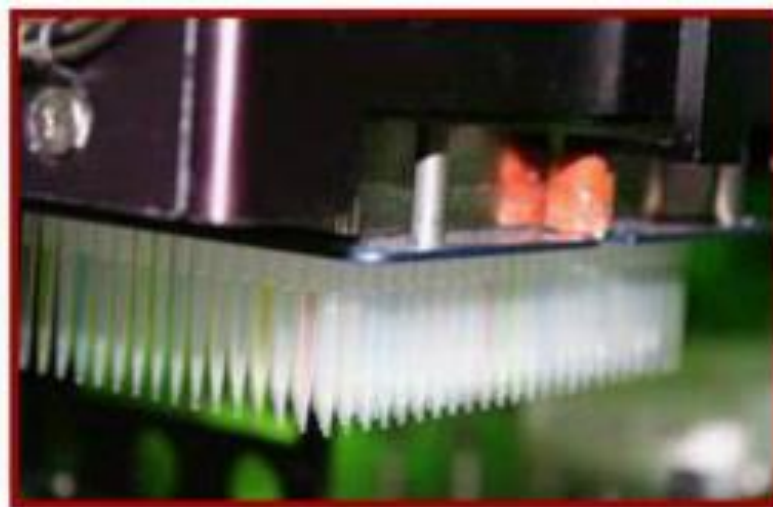
*opracowana w końcu lat osiemdziesiątych przez Arpada Furka, obecnie
związanego z firmą Advanced Chem-Tech w Louisville (Kentucky).*

Synteza równoległa

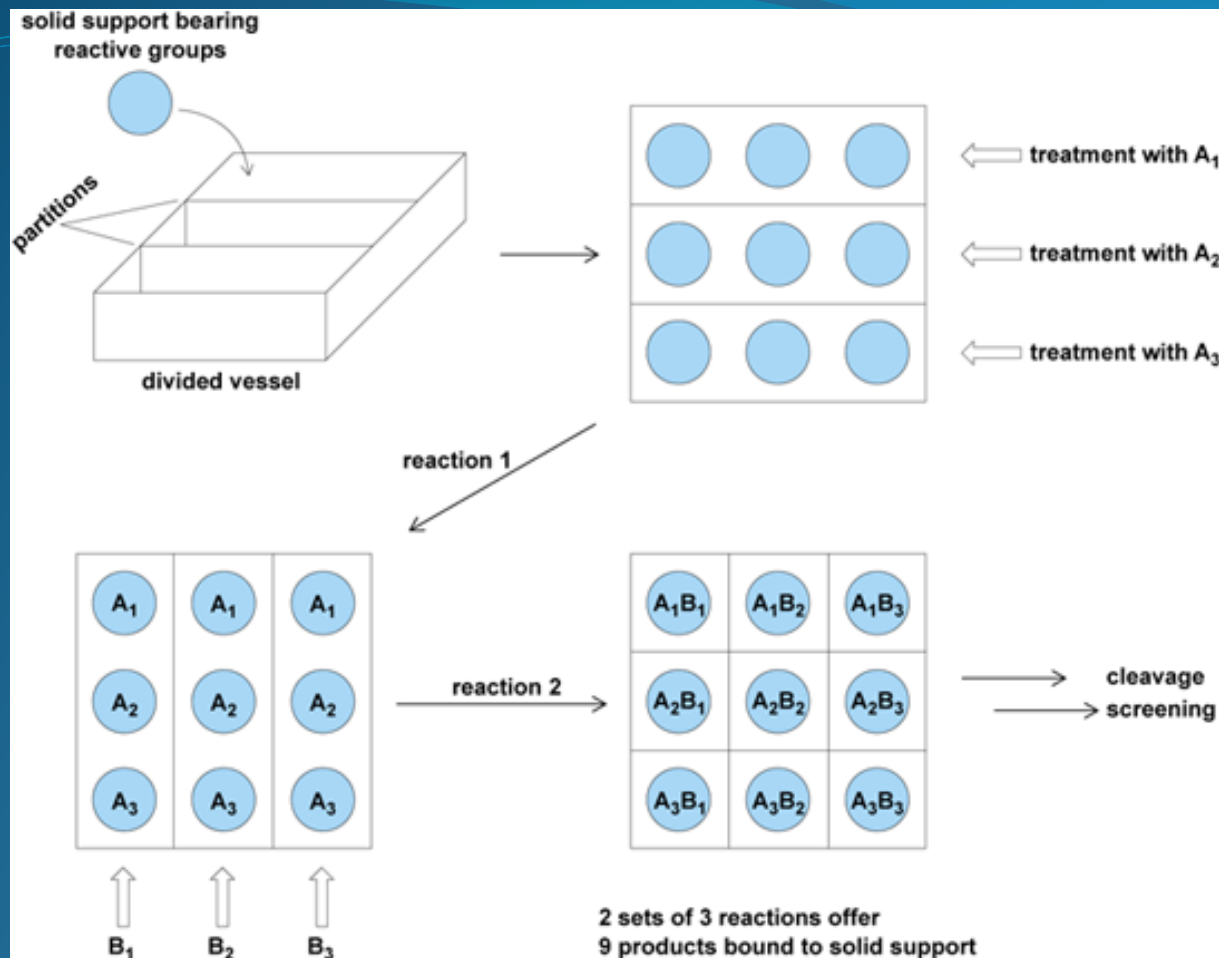
Produkty syntezy powstają w oddzielnych naczyniach reakcyjnych – często w zagłębieniach tzw. płytki mikromiareczkowej, w innej metodyce – w pojemnikach przypominających torebki z herbatą (*Tea-bags method*).



Techniki syntezy kombinatorycznej są w pełni zautomatyzowane



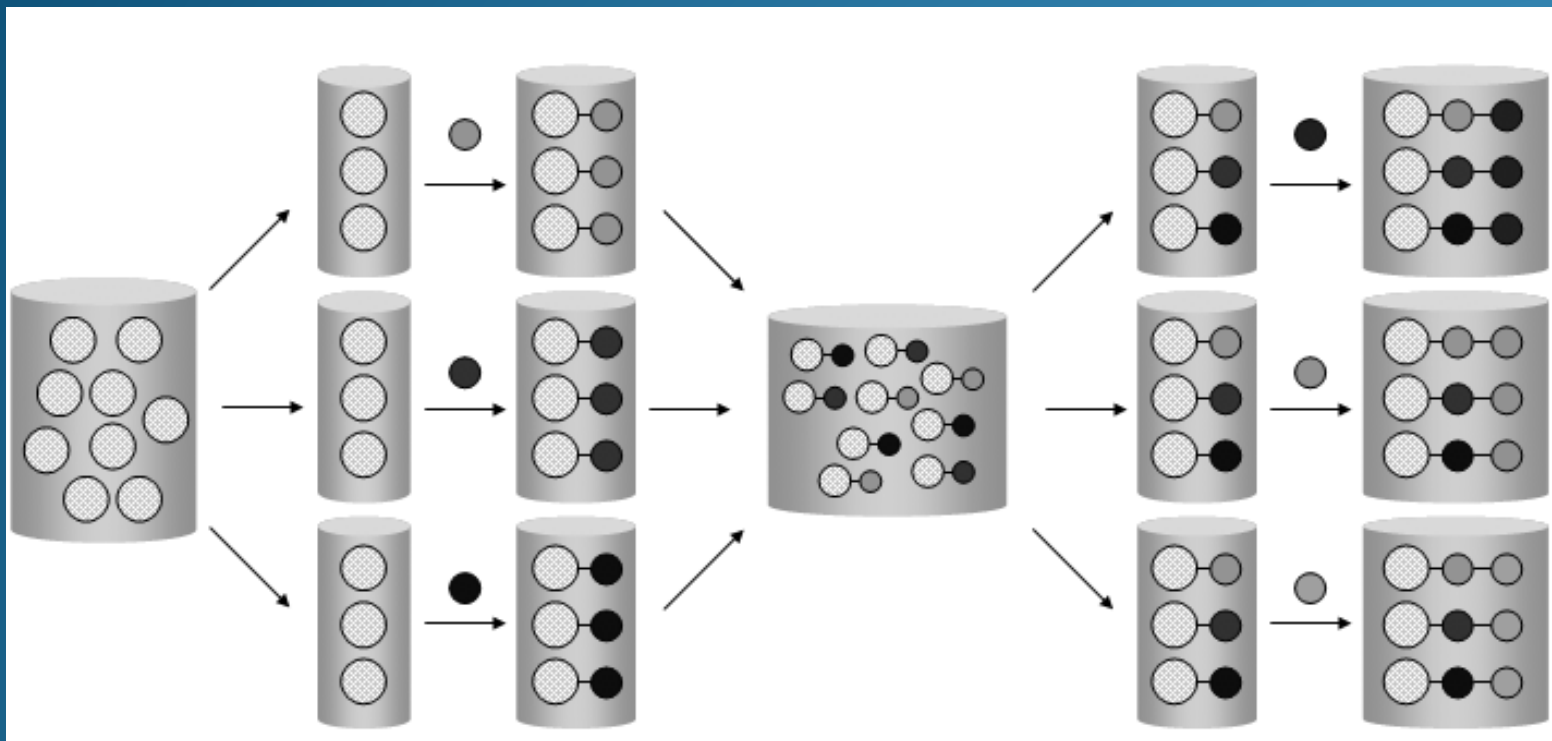
<http://drugdiscovery.weebly.com/combinatorial-approach.html>



Na każdym etapie produkty syntezy są rozdzielane i osobno poddawane kolejnej reakcji.

Bibliotekę 9-elementową otrzymuje się po przeprowadzeniu 12 reakcji

Metoda split-and-mix (dziel i mieszaj)



Po pierwszym etapie produkty syntezy są mieszane, ponownie rozdzielane i poddawane kolejnej reakcji.

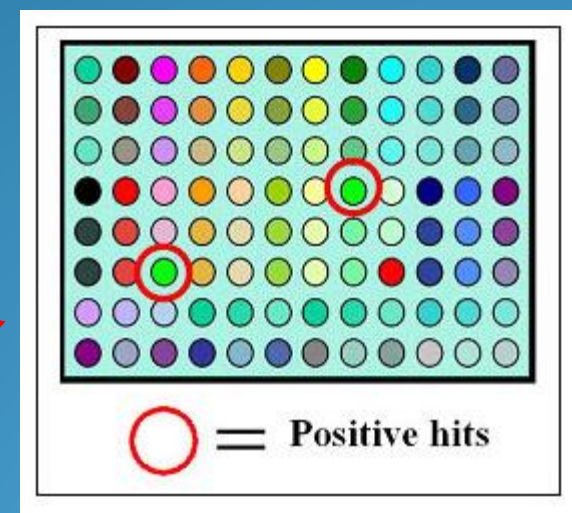
Bibliotekę 9-elementową otrzymuje się po przeprowadzeniu 6 reakcji.

- Poszukiwanie związków aktywnych w tej metodzie syntezy jest prowadzone przez metody pośrednie: prowadzi się badanie aktywności całych bibliotek (mieszanin)
- Wydaje się to szybsze, niż badanie pojedynczych związków, ale obarczone jest poważnymi wadami:
 - aktywność może pochodzić od jednego jak również od całej grupy związków
 - poszczególne związki w bibliotece mogą wzajemnie wygaszać swoją aktywność
- Występują również kłopoty z identyfikacją związków – tak poważne, że większość firm stosuje raczej metody syntezy równoległej

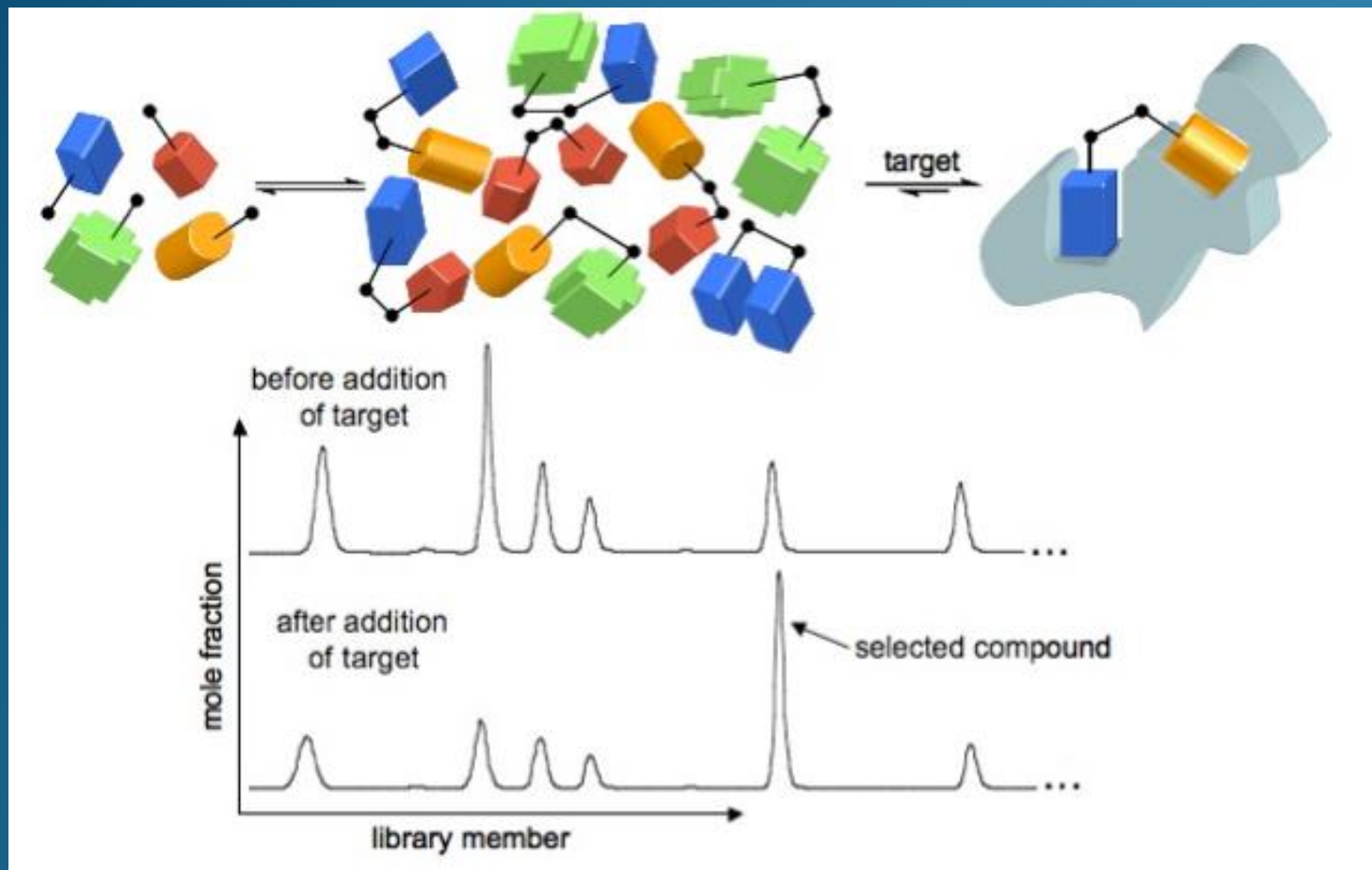
Biblioteki związków – efekt syntezy kombinatorycznej

Etapy prac

- ❑ przygotowanie biblioteki związków
- ❑ badanie aktywności biblioteki
- ❑ identyfikacja aktywnego składnika
- ❑ określenie struktury aktywnego składnika



Identyfikacja aktywnego związku



http://www.urmc.rochester.edu/labs/Miller-Lab/projects/dynamic_combinatorial_chemistry

Synteza kombinatoryczna w projektowaniu i optymalizacji struktury leku

Etapy prac

Określenie miejsca działania leku



Poszukiwanie struktury wiodącej



Izolacja i identyfikacja związku aktywnego



Określenie zależności między budową a działaniem biologicznym (SAR)



Optymalizacja struktury wiodącej
(poprawienie oddziaływania między strukturą a miejscem działania, poprawienie własności farmakokinetycznych)

Możliwość zastosowania syntezy kombinatorycznej

Synteza kombinatoryczna (synteza równoległa, powstają pojedyncze związki, metoda split and mix, powstaje mieszanina związków)

Synteza kombinatoryczna (synteza równoległa, powstają pojedyncze związki)