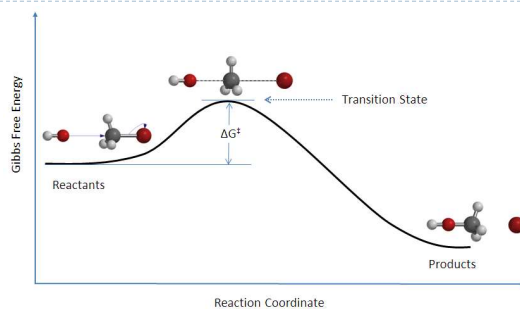


Podstawy projektowania leków wykład 8

Łukasz Berlicki

Teoria stanu przejściowego

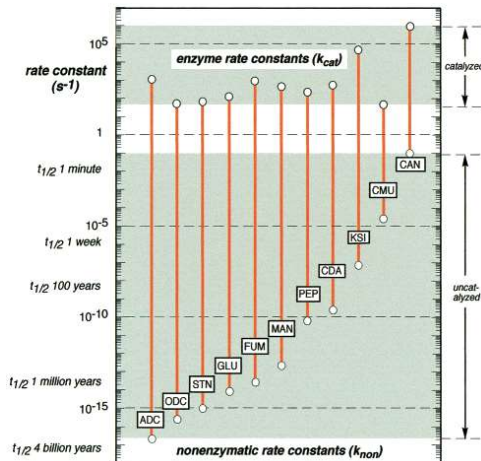
- ▶ **Stan przejściowy** – stan o najwyższej energii potencjalnej znajdujący się na ścieżce reakcji.
- ▶ **Energia aktywacji** – różnica energii pomiędzy substratami a stanem przejściowym. Wpływa na szybkość reakcji (k) – równanie Arrheniusa.



$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Enzymy

- ▶ Zwiększenie szybkości reakcji (k_{cat}/k_{non}) uzyskiwane przez enzymy jest w zakresie: $10^7 - 10^{19}$.



ADC = arginine decarboxylase;
 ODC = orotidine 5 γ -phosphate decarboxylase;
 STN = staphylococcal nuclease;
 GLU = sweet potato α -amylase;
 FUM = fumarase;
 MAN = mandelate racemase;
 PEP = carboxypeptidase B;
 CDA = E. coli cytidine deaminase;
 KSI = ketosteroid isomerase;
 CMU = chorismate mutase;
 CAN = carbonic anhydrase.



Kataliza enzymatyczna

- ▶ Linus Pauling zaproponował, że efektywność działania enzymów wynika z wiązania stanu przejściowego.



***** Biological Science *****

Molecular Architecture and Biological Reactions

LINUS PAULING
 Chairman, Division of Chemistry and Chemical Engineering,
 California Institute of Technology, Pasadena, Calif.

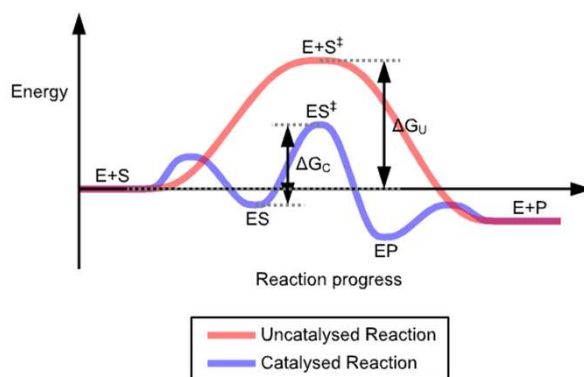
Answers to many basic problems of biology—nature of growth, mechanism of duplication of viruses and genes, action of enzymes, mechanism of physiological activity of drugs, hormones, and vitamins, structure and action of nerve and brain tissue—may lie in knowledge of molecular structure and intermolecular reactions

from the standpoint of molecular structure and the quantum mechanical theory of chemical reaction, the only reasonable picture of the catalytic activity of enzymes is that which involves an active site on the surface of the enzyme which is complementary in structure not to the substrate molecule itself, in its normal configuration, but rather to the substrate molecule in a strained configuration corresponding to the "activated complex" for the reaction catalyzed by the enzyme: the substrate molecule is attracted to the enzyme, and caused by forces of attraction to assume the strained state which favors the chemical reaction—that is, the activation energy of the reaction is decreased by the enzyme to an extent as to cause the reaction to



Kataliza enzymatyczna

- ▶ Zmniejszenie energii stanu przejściowego wynika z jego efektywnego wiązania przez enzym.
- ▶ Substraty i produkty są wiązane z znacząco mniejszą energią.



Analogi stanu przejściowego

- ▶ **Analogi stanu przejściowego** (*transition state analogues*) – związki wykazujące cechy strukturalne i elektronowe podobne do stanu przejściowego.
- ▶ Analogi stanu przejściowego są wiązane ze znacznie wyższą energią w porównaniu do substratów/produktów i ich analogów.

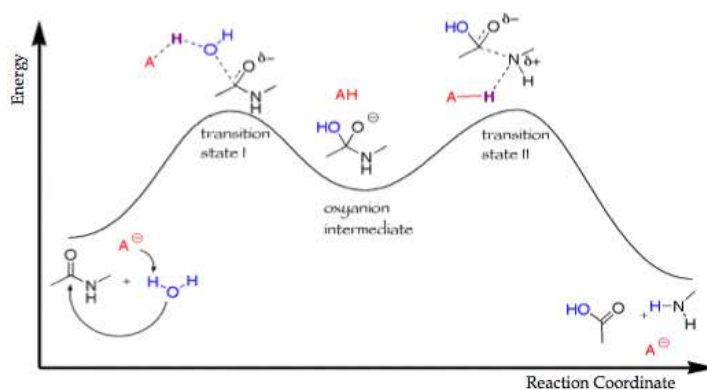
Enzymy wiążą „stan przejściowy”,
NIE substraty lub produkty



Analogi stanu przejściowego
są dobrymi inhibitorami.

Stan przejściowy vs produkt przejściowy

- ▶ Mechanizm reakcji hydrolizy wiązania amidowego najczęściej zakłada dwa stany przejściowe.

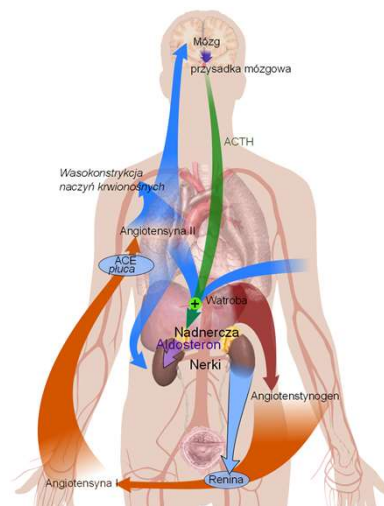


Analogi stanu przejściowego

- ▶ **Zalety:**
 - ▶ wysoka energia wiązania – wysoka aktywność inhibitorowa;
 - ▶ wysoka specyficzność;
 - ▶ proste projektowanie przy znanej strukturze stanu przejściowego.
- ▶ **Wady:**
 - ▶ mechanizm reakcji enzymatycznej nie zawsze jest znany;
 - ▶ często bardzo trudno określić strukturę stanu przejściowego;
 - ▶ analogi stanu przejściowego nie zawsze mają charakterystykę niezbędną dla leku (farmakokinetyka, farmokodynamika, etc.).

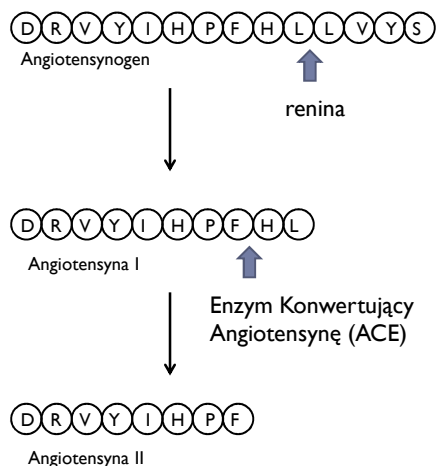
Regulacja ciśnienia krwi

- ▶ Ciśnienie krwi jest precyzyjnie regulowane poprzez współdziałanie wielu organów oraz działanie kilku hormonów.
- ▶ **Angiotensyna II** zwiększa ciśnienie krwi i powoduje wydzielanie aldosteronu.
- ▶ **Bradykinina** zmniejsza ciśnienie krwi.



Układ renina-angiotensyna-aldosteron

- ▶ Renina jest wydzielana w naczyniach krwionośnych w nerkach i hydrolizuje angiotensynogen.
- ▶ Angiotensyna I jest przekształcana w angiotensynę II przez ACE.
- ▶ Angiotensyna II jest hormonem o silnym działaniu zwiększającym ciśnienie krwi.
- ▶ Renina i ACE są celami molekularnymi dla leków na nadciśnienie tętnicze.





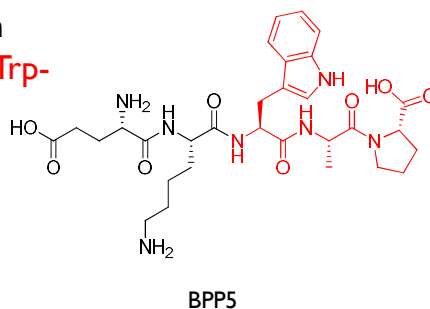
Bothrops jararaca

- ▶ Żararaka jest jednym z najbardziej jadowitych węży na świecie.
- ▶ Żyje w Ameryce Południowej.
- ▶ Znacząca część leczonych ukąszeń w Ameryce Południowej związana jest z żararaką.
- ▶ **Jad żararaki powoduje bardzo szybki spadek ciśnienia krwi.**



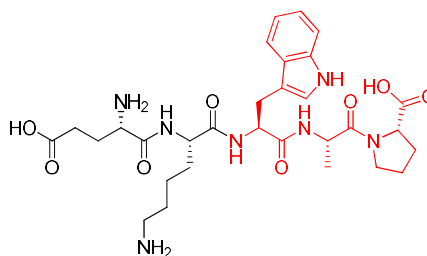
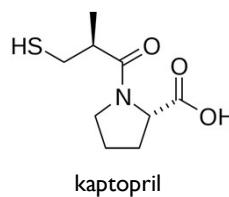
Peptydy z jadu żararaki

- ▶ W jadzie żararaki znajduje się mieszanina peptydów, które hamują aktywność enzymu konwertującego angiotensynę (ACE).
- ▶ Aktywnym motywem tych peptydów jest sekwencja **Trp-Ala-Pro**.



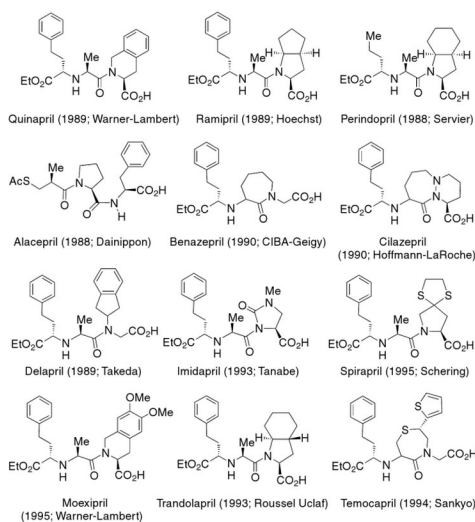
Inhibitory ACE

- ▶ Peptydy nie są dobrymi kandydatami na leki, ponieważ nie mogą być podawane doustnie.
- ▶ Pierwszym inhibitorem ACE zatwierdzonym jako lek był kaptopril.



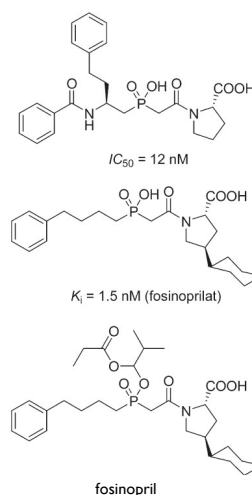
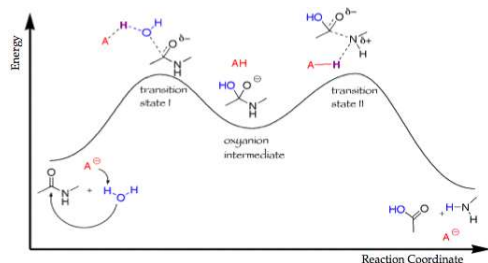
Inhibitory ACE

- ▶ Opracowano dużą liczbę inhibitorów ACE, z których kilkanaście było przedmiotem badań klinicznych.
- ▶ Większość ma dwa charakterystyczne elementy strukturalne: analog proliny i homofenyloalaniny.



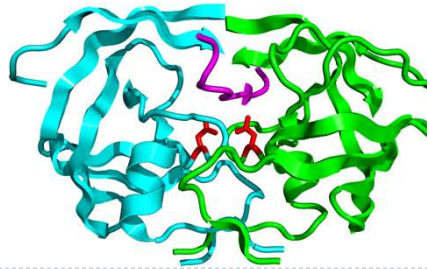
Inhibitory ACE

- ▶ Fosinoprilat jest analogiem produktu przejściowego reakcji enzymatycznej.
- ▶ Fosinopril jest prolekiem. Grupa blokująca funkcję fosfinową jest hydrolizowana *in vivo*.

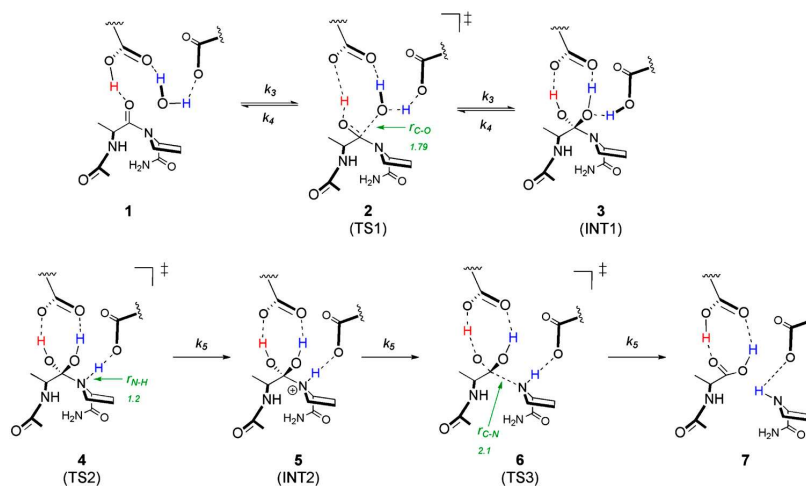


Proteaza HIV

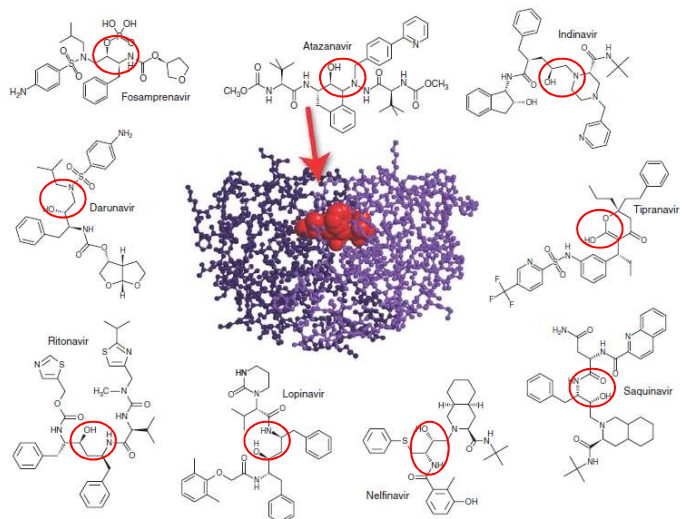
- ▶ Proteaza aspartylowa
- ▶ Przecina łańcuch polipeptydowy aby otrzymać białka niezbędne do stworzenia dojrzałego wirusa.
- ▶ Dimer, dwa łańcuchy 99 reszt aminokwasowych
- ▶ Symetria C_2
- ▶ Dwie triady katalityczne Asp25-Thr26-Gly27
- ▶ Najefektywniej przecina wiązanie peptydowe Phe-Pro lub Tyr-Pro



Proteaza HIV

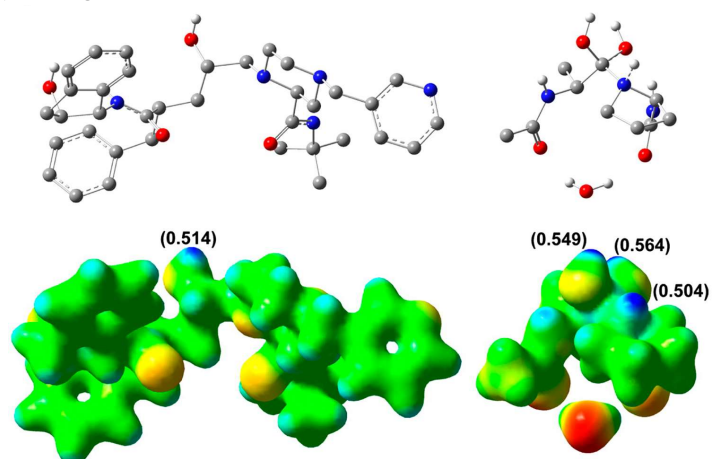


Inhibitory proteazy HIV na rynku



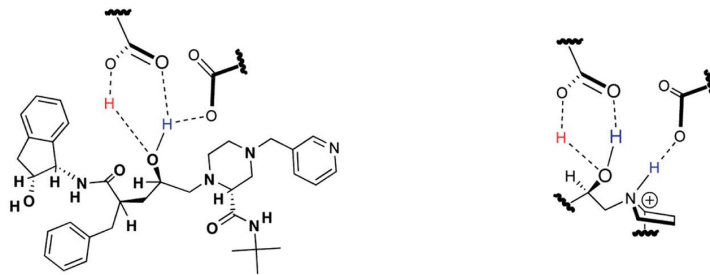
Inhibitory proteazy HIV

- Konformacja i potencjał elektrostatyczny inhibitora proteazy HIV i stanu przejściowego TS3.

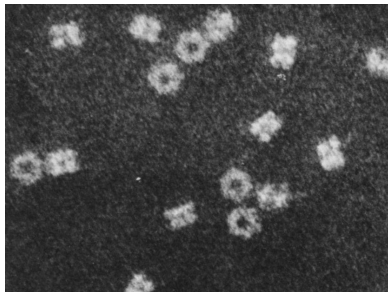
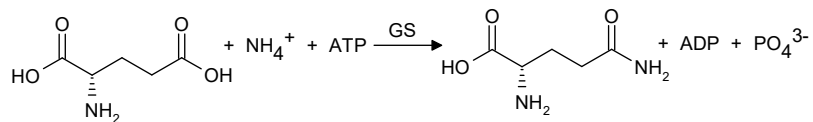


Inhibitory proteazy HIV

- ▶ Dokładna analiza ścieżki reakcji pokazała, że sposób wiązania inhibitorów HIV jest inny niż stanu przejściowego.



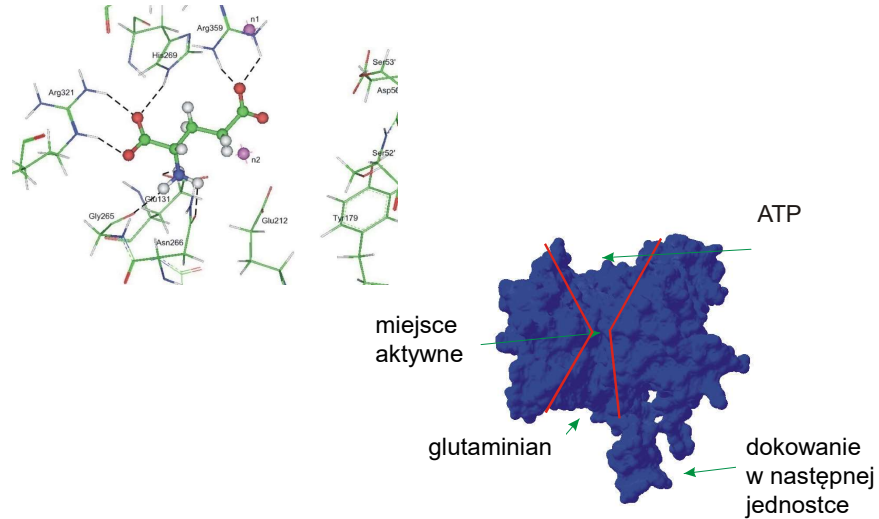
Syntetaza glutaminy



Syntetaza glutaminy(GS, EC 6.3.1.2) jest kluczowym enzymem metabolizmu azotu.

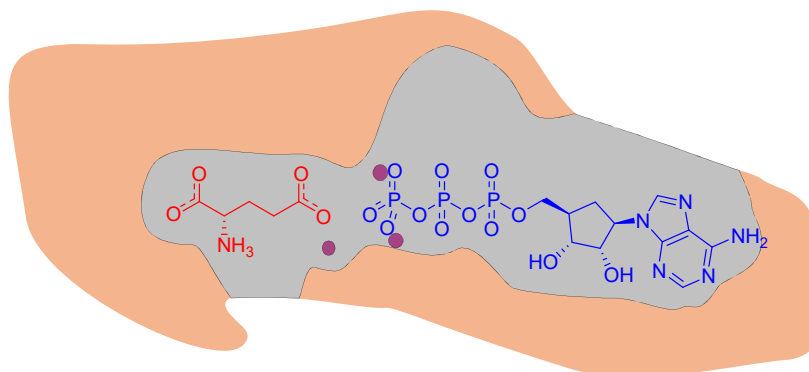


miejsce aktywne



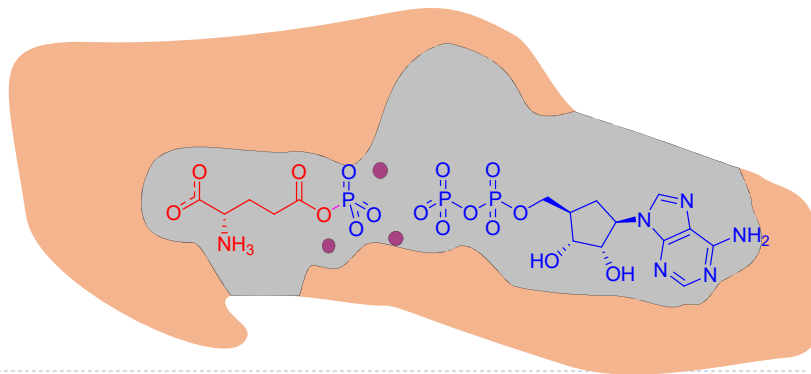
mechanizm reakcji

- ▶ Mechanizm reakcji syntezy glutaminianowej jest wieloetapowy.



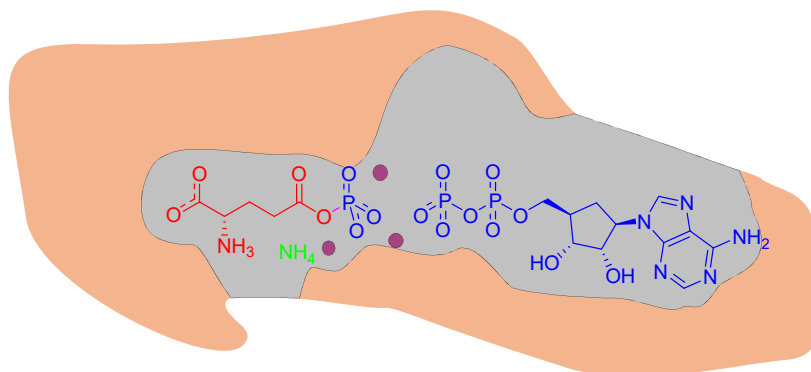
mechanizm reakcji

- ▶ Mechanizm reakcji syntezy glutaminianowej jest wieloetapowy.



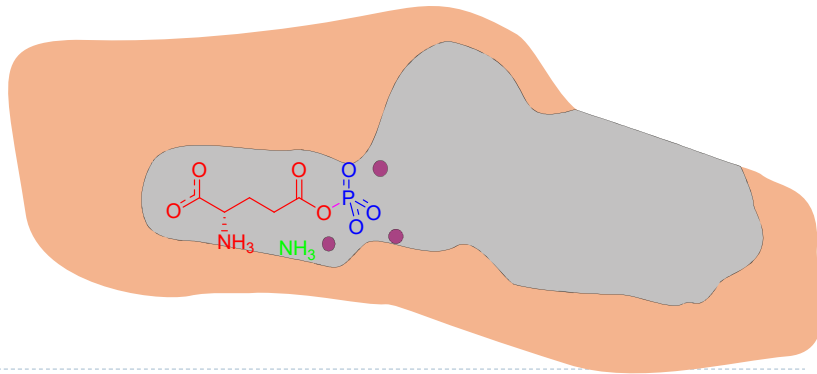
mechanizm reakcji

- ▶ Mechanizm reakcji syntezy glutaminianowej jest wieloetapowy.



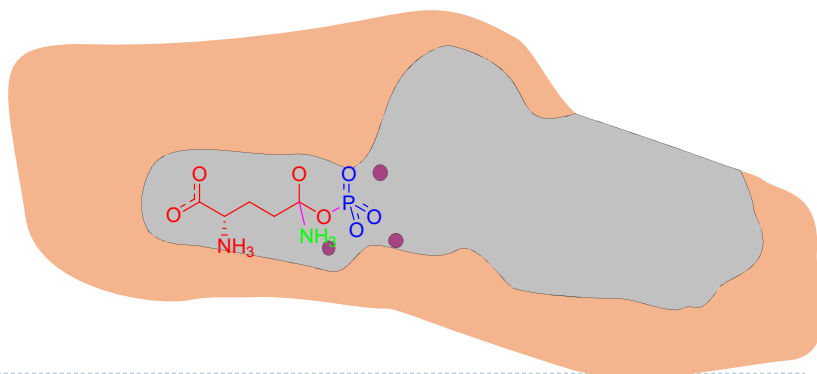
mechanizm reakcji

- ▶ Mechanizm reakcji syntezy glutaminianowej jest wieloetapowy.



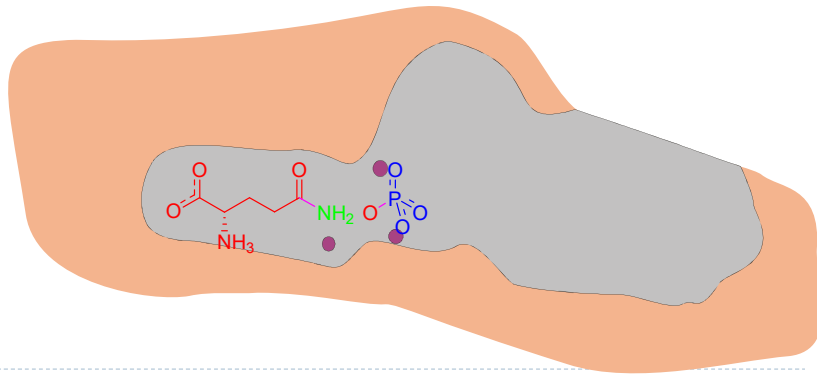
mechanizm reakcji

- ▶ Mechanizm reakcji syntezy glutaminianowej jest wieloetapowy.



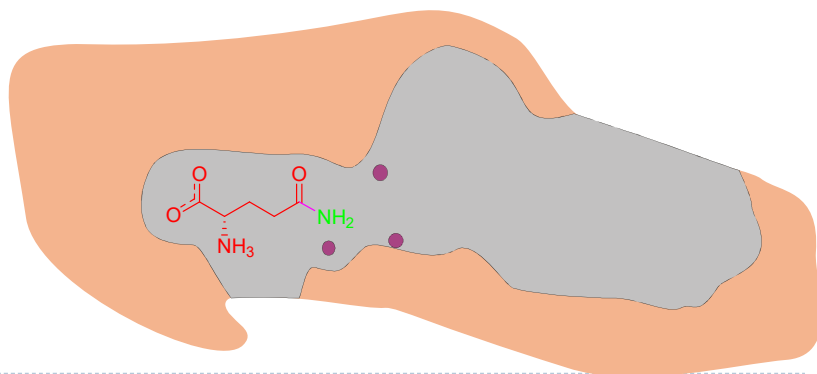
mechanizm reakcji

- ▶ Mechanizm reakcji syntezy glutaminianowej jest wieloetapowy.



mechanizm reakcji

- ▶ Mechanizm reakcji syntezy glutaminianowej jest wieloetapowy.



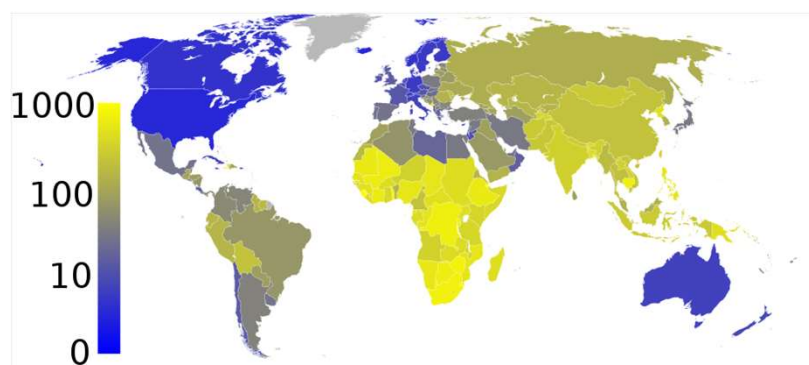
zastosowanie inhibitorów GS

- ▶ potencjalne leki przeciw gruźlicy,

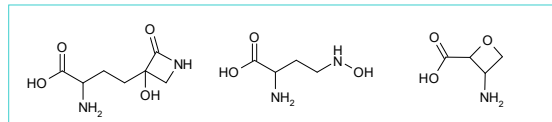
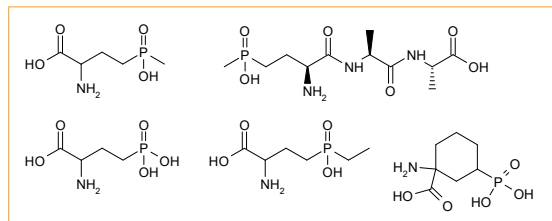
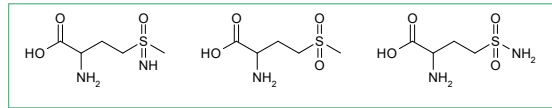


zastosowanie inhibitorów GS

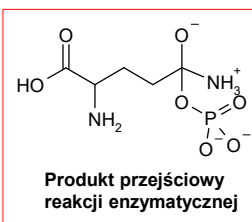
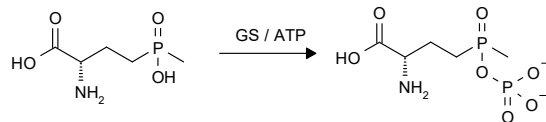
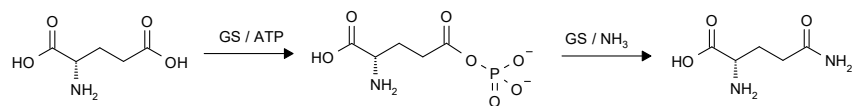
- ▶ Gruźlica



znane inhibitory

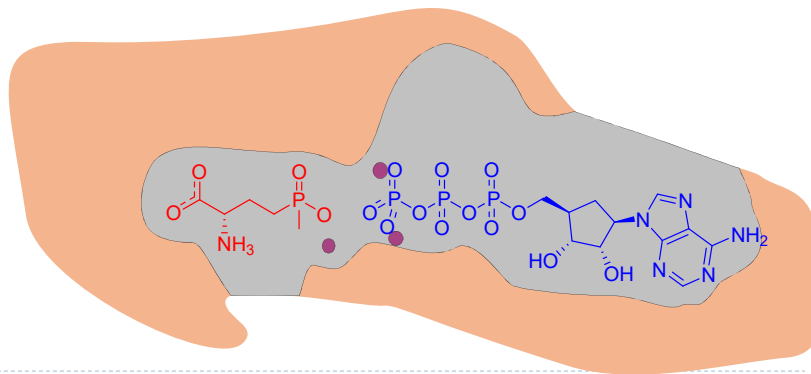


mechanizm inhibicji



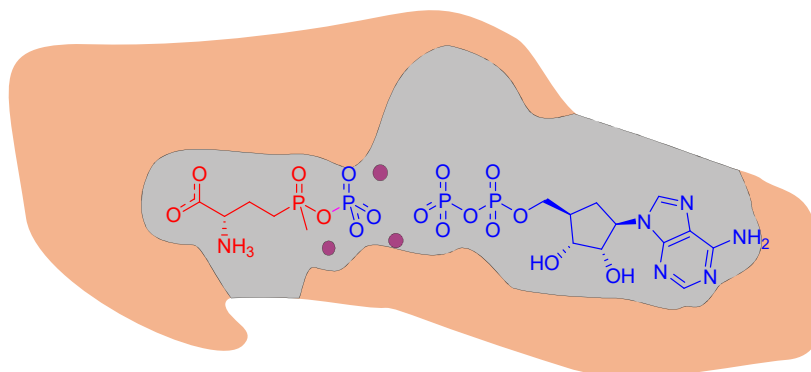
mechanizm inhibicji

- ▶ Mechanizm inhibicji syntetazy glutaminianowej przez fosfinotricynę opiera się na fosforylacji inhibitora w miejscu aktywnym.



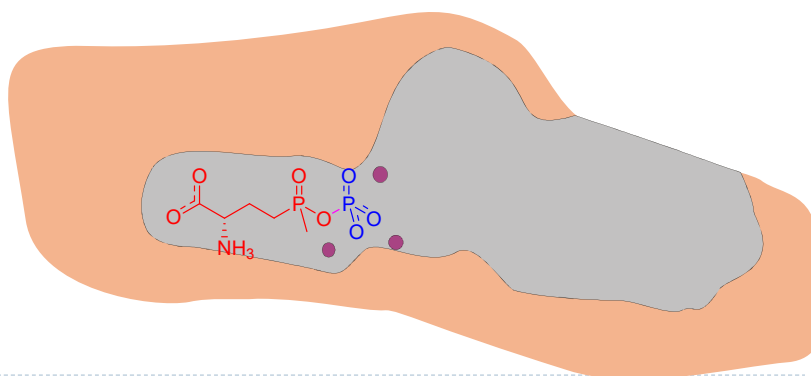
mechanizm inhibicji

- ▶ Mechanizm inhibicji syntetazy glutaminianowej przez fosfinotricynę opiera się na fosforylacji inhibitora w miejscu aktywnym.

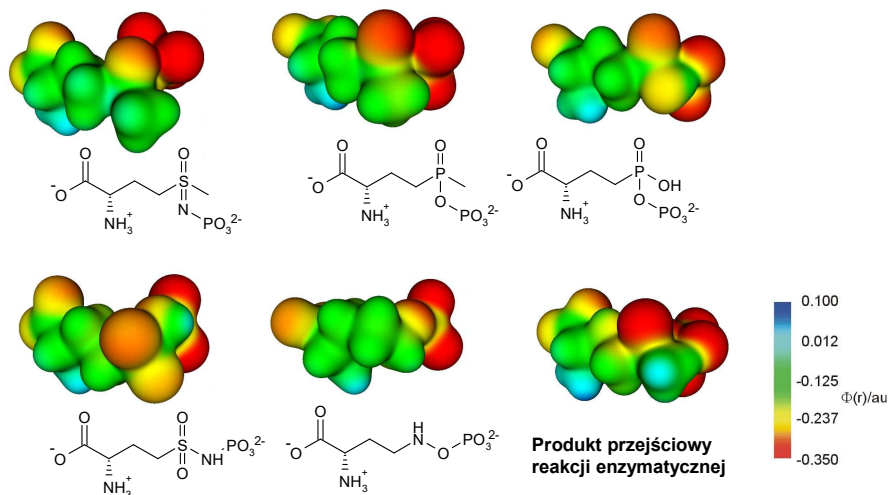


mechanizm inhibicji

- ▶ Mechanizm inhibicji syntetazy glutaminianowej przez fosfotricynę opiera się na fosforylacji inhibitora w miejscu aktywnym.

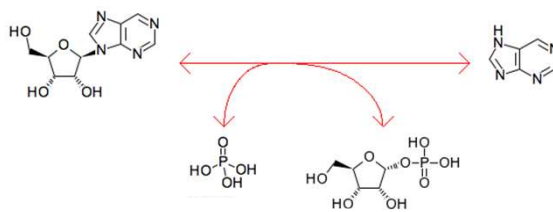


struktury inhibitorów



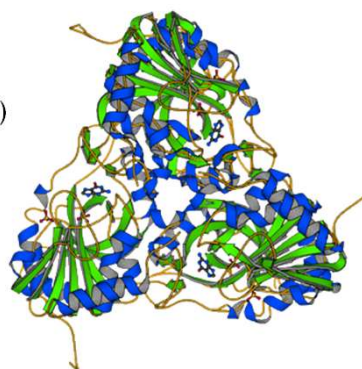
Fosforylaza nukleozydów purynowych

- ▶ **Fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP)** katalizuje reakcję rozpadu nukleozydów od odpowiednich zasad i l-fosforybozy.
- ▶ Wrodzone uszkodzenie tego enzymu powoduje brak odporności spowodowany apoptozą limfocytów T.
- ▶ PNP jest celem molekularnym dla leków na choroby, których rozwój związany jest z limfocytami T.



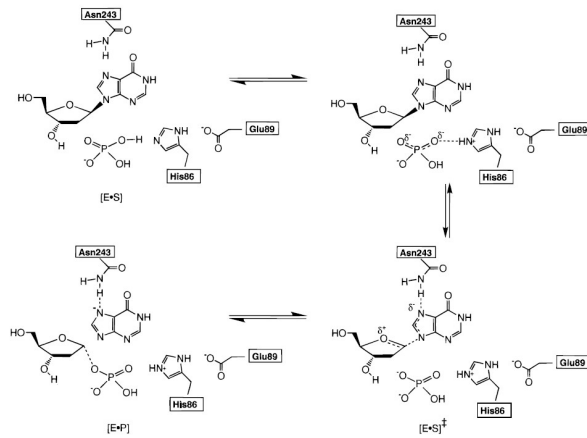
Fosforylaza nukleozydów purynowych

- ▶ **Inhibitory PNP** są potencjalnymi lekami na:
 - ▶ ostrą białaczkę szpikową (T-komórkową),
 - ▶ chłoniaka skórny (T-komórkowy)
 - ▶ łuszczycę,
 - ▶ reumatoidalne zapalenie stawów,
 - ▶ toczeń układowy rumieniowaty,
 - ▶ chorobę Crohna,
 - ▶ cukrzycę typu I,
 - ▶ dna moczanowa.



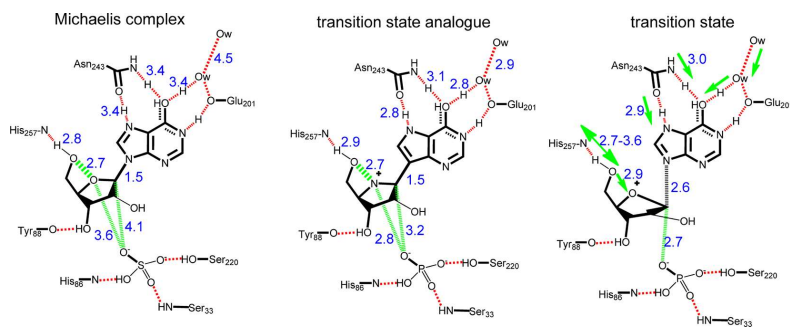
Fosforylaza nukleozydów purynowych

► Mechanizm reakcji enzymatycznej PNP



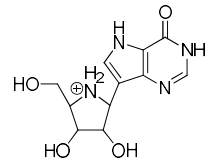
Analog stanu przejściowego

► Wysokoaktywny analog stanu przejściowego skonstruowany na podstawie analizy stanu przejściowego.



Analog stanu przejściowego

- ▶ Inhibitor PNP (immucylina) jest w trakcie badań klinicznych jako lek na białaczkę.
- ▶ Ponieważ aktywność inhibitorowa była wyższa dla enzymu wołowego, przeprowadzono także analizę stanu przejściowego dla enzymu ludzkiego (bardzo podobnego strukturalnie).



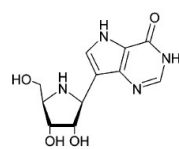
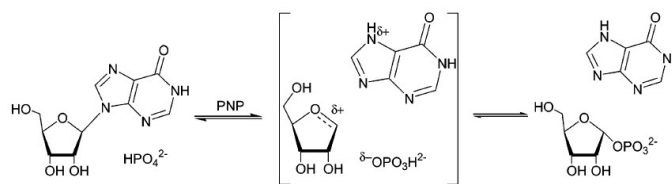
$K_i = 56 \text{ pM}$ (enzym ludzki)
 $K_i = 23 \text{ pM}$ (enzym wołowy)

Immucylina

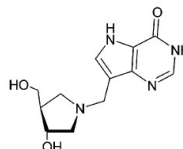


Mechanizm reakcji PNP ludzkiego

- ▶ Wykazano, że stan przejściowy dla enzymu ludzkiego jest inny niż wcześniej zbadany dla enzymu wołowego.



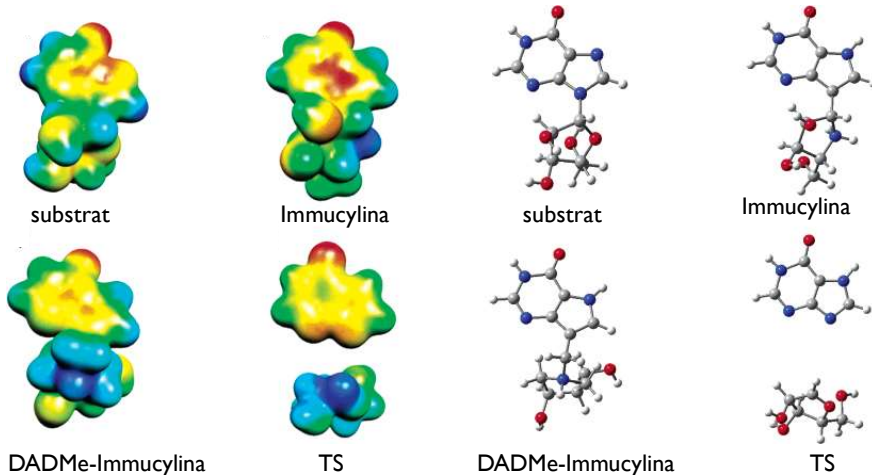
Immucylina



DADMe-Immucylina

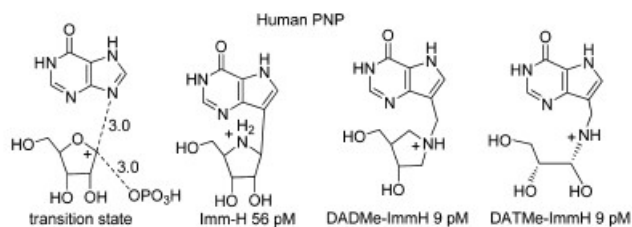


Substrat, stan przejściowy i analogi



Fosforylaza nukleozydów purynowych

- ▶ DADMe-Immucylina jest analogiem stanu przejściowego reakcji katalizowanej przez ludzki enzym. Wykazuje niezwykle wysoką aktywność inhibitorową (9 pM).
- ▶ DADMe-Immucylina jest przedmiotem badań klinicznych jako lek na dnę moczanową.



Podsumowanie

- ▶ Analogi stanu przejściowego są bardzo efektywnymi inhibitorami enzymów.
- ▶ Nie zawsze łatwo znaleźć prawdziwe analogi stanu przejściowego.

