

Projektowanie związków biologicznie czynnych **wykład 4**

Łukasz Berlicki

Cel molekularny

- ▶ **Cel molekularny (TARGET)** – makrocząsteczka w żywym organizmie, która oddziałuje z lekiem i wynikiem tej interakcji jest pożądany efekt terapeutyczny.
- ▶ Typy:
 - ▶ Białka:
 - ▶ Enzymy,
 - ▶ Receptory,
 - ▶ Kanały jonowe,
 - ▶ Białka strukturalne,
 - ▶ Białka membranowe,
 - ▶ Kwasy nukleinowe



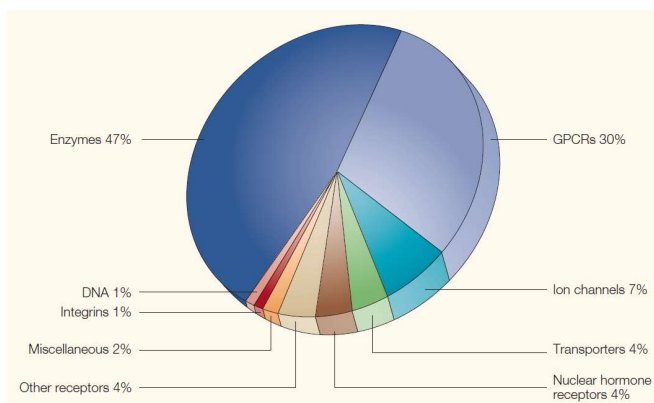
Cel molekularny

- ▶ **Oddziaływanie lek-cel może być:**
 - ▶ niekowalencyjne,
 - ▶ kowalencyjne odwracalne,
 - ▶ kowalencyjne nieodwracalne.
- ▶ **Ligand może spowodować:**
 - ▶ zahamowanie funkcji celu molekularnego bez zmiany jego konformacji (inhibicja enzymu, antagonizm receptora, blokada kanału jonowego)
 - ▶ zmianę funkcji celu molekularnego w wyniku zmiany konformacji (aktywacja enzymu, inhibicja niekompetycyjna enzymu, aktywacja receptora, etc.)



Klasy znanych celów molekularnych

- ▶ **Głównymi klasami są:**
 - ▶ receptory sprzężone z białkami G (GPCR),
 - ▶ kinazy
 - ▶ peptydazy



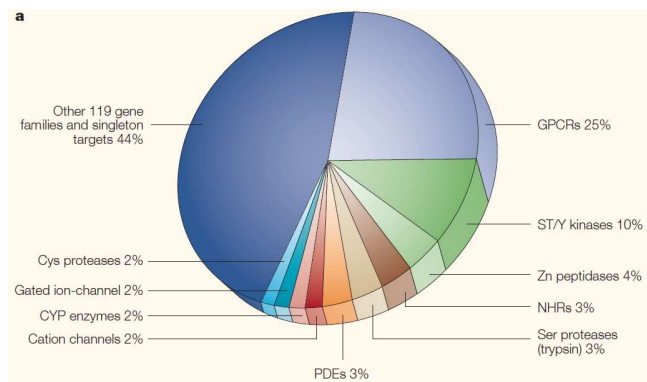
CYP – cytochrom P450, NHR – receptory jądrowe wiążące hormony, PDE - fosfodiesterazy



Klasy znanych celów molekularnych

▶ Głównymi klasami są:

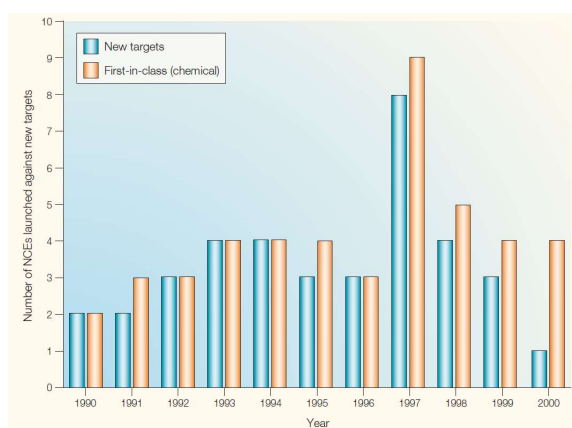
- ▶ receptory sprzężone z białkami G (GPCR),
- ▶ kinazy
- ▶ peptydazy



CYP – cytochrom P450, NHR – receptory jądrowe wiążące hormony, PDE - fosfodiesterazy

Nowe leki – nowe cele

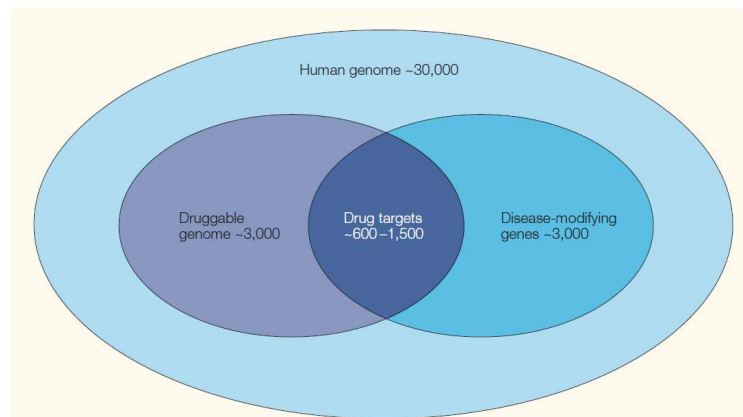
▶ Nowe cele molekularne są wciąż eksplorowane



NCE – nowy związek chemiczny

Druggable target

- ▶ **'Druggable target'** – cel molekularny, który może oddziaływać z lekiem.



Ocena celu molekularnego

- ▶ **Ekspresja** transkryptu mRNA stanach związanych z chorobą.
- ▶ Białko znalezione w **kontekście badań** nad chorobą.
- ▶ Białko **bezpośrednio związane** z chorobą.
- ▶ Związki chemiczne oddziałujące na cel w **badaniach klinicznych**.
- ▶ Związki chemiczne oddziałujące na cel jako **zarejestrowane leki**.

Ocena celu molekularnego – *proof of the concept*

- ▶ Musi zostać udowodnione, że **zmiana aktywności** celu molekularnego jest **ściśle powiązana z efektem** terapeutycznym.
- ▶ Cel molekularny powinien **być zbadany** na tylu różnych poziomach jak to tylko możliwe (badania *in vitro*, komórkowe, na kulturach tkankowych i *in vivo*).
- ▶ Bardzo cenne jest badanie transgenicznych modeli zwierzęcych (gene knockout).
- ▶ **Efektywność** potencjalnej **terapii** może być oceniona z użyciem modelowego związku, przeciwciał.



Ocena celu molekularnego

- ▶ Informacje o celu molekularnym ważne dla projektowania i badania leków:
 - ▶ **Funkcja** (ligandy, substraty, kofaktory, produkty, katalizowana reakcja, oddziaływanie z innymi makromolekułami)
 - ▶ **Otrzymywanie/izolacja/występowanie** (jak najefektywniej uzyskać odpowiednią ilość białka?)
 - ▶ **Właściwości fizykochemiczne** (rozpuszczalność, stabilność, masa cząsteczkowa etc.)
 - ▶ **Struktura!!!**



Wirus HIV

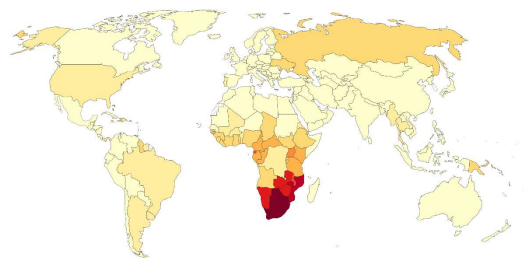
- ▶ Ludzki wirus niedoboru odporności;
- ▶ 1983, wyizolowany przez Luca Montagniera (nagroda Nobla 2008) i niezależnie Roberta Gallo
- ▶ Pierwsze leki specyficzne przeciw HIV w połowie lat 90-tych XX w.
- ▶ Ze względu na dużą zmienność ewolucyjną wirusa obecnie stosuje się koktajle trzech leków.



Wirus HIV

- ▶ Wirus HIV jest wciąż bardzo poważnym problemem wielu krajów.
- ▶ Dostępne są terapie hamujące rozwój infekcji.

Share of the population infected with HIV, 2019
The share of people aged 15 to 49 years old who are infected with HIV.



No data 0% 0.5% 1% 2.5% 5% 7.5% 10% 12.5% 15% 17.5%

Source: IHME, Global Burden of Disease (2019)

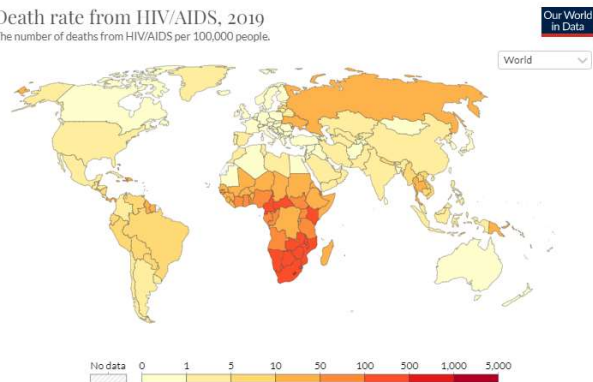
OurWorldInData.org/hiv-aids • CC BY



Wirus HIV

- ▶ Wirus HIV jest wciąż bardzo poważnym problemem wielu krajów.
- ▶ Dostępne są terapie hamujące rozwój infekcji.

Death rate from HIV/AIDS, 2019
The number of deaths from HIV/AIDS per 100,000 people.



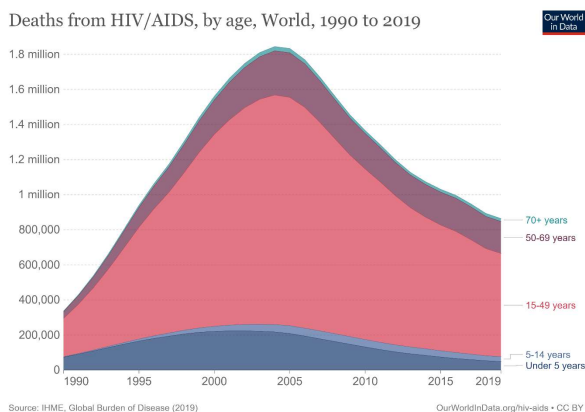
Source: IHME, Global Burden of Disease (2019)
Note: To allow comparisons between countries and over time this metric is age-standardized. OurWorldInData.org/hiv-aids • CC BY

▶ 1990 ◯ 2019

Wirus HIV

- ▶ Wirus HIV jest wciąż bardzo poważnym problemem wielu krajów.
- ▶ Dostępne są terapie hamujące rozwój infekcji.

Deaths from HIV/AIDS, by age, World, 1990 to 2019

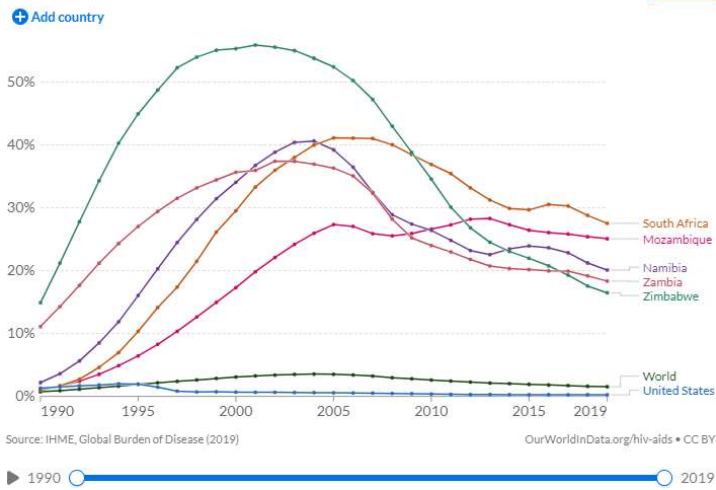


Source: IHME, Global Burden of Disease (2019) OurWorldInData.org/hiv-aids • CC BY

HIV/AIDS

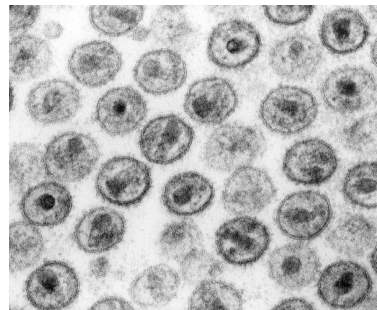
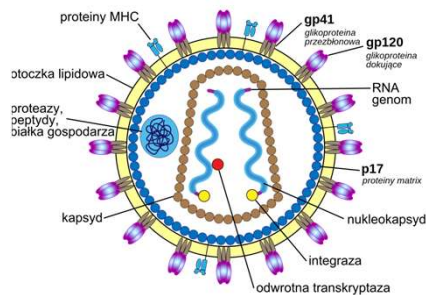
Share of deaths from HIV/AIDS, 1990 to 2019

Our World in Data

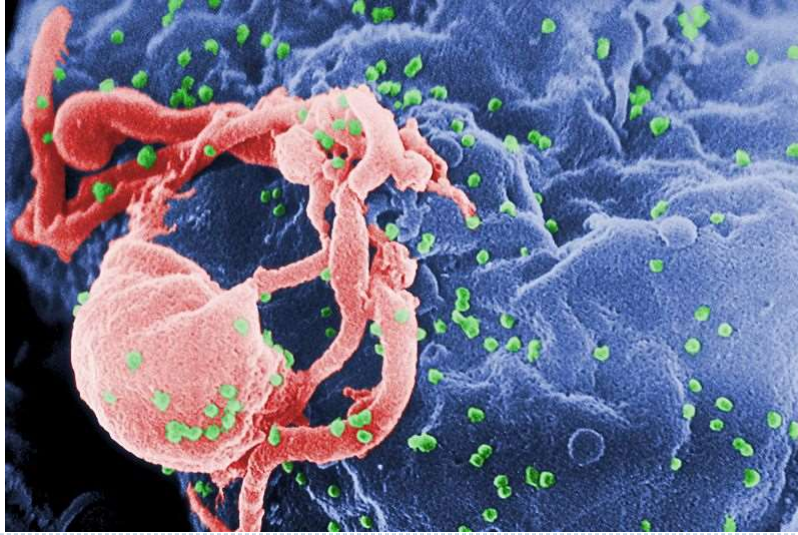


Wirus HIV - budowa

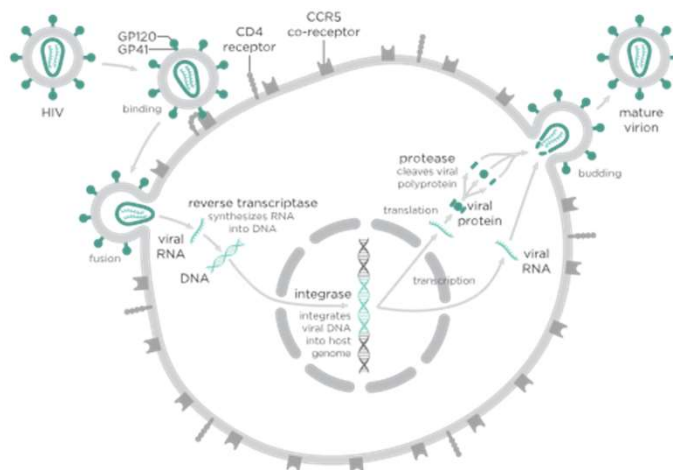
- ▶ retrowirus
- ▶ kulisty
- ▶ Średnica 120 nm



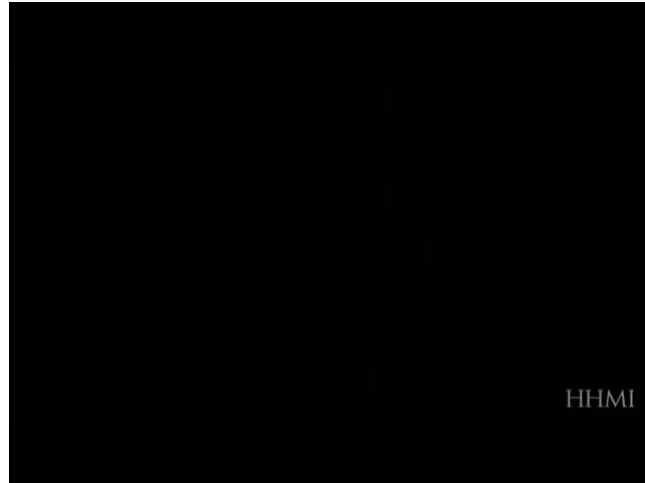
HIV – limfocyt T



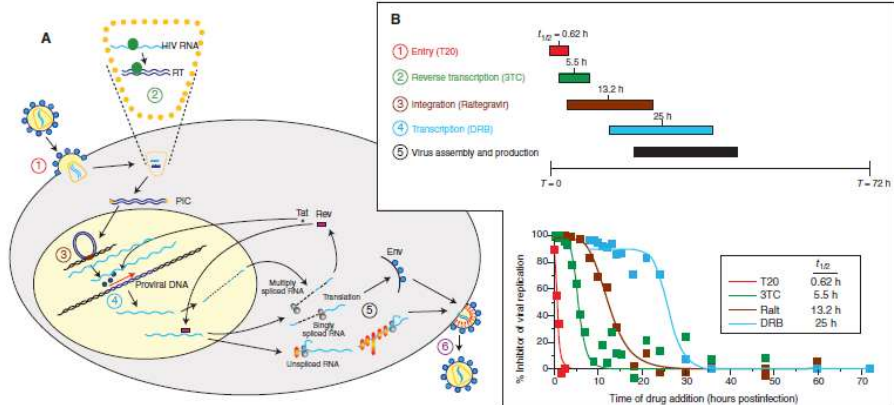
Cykl replikacji



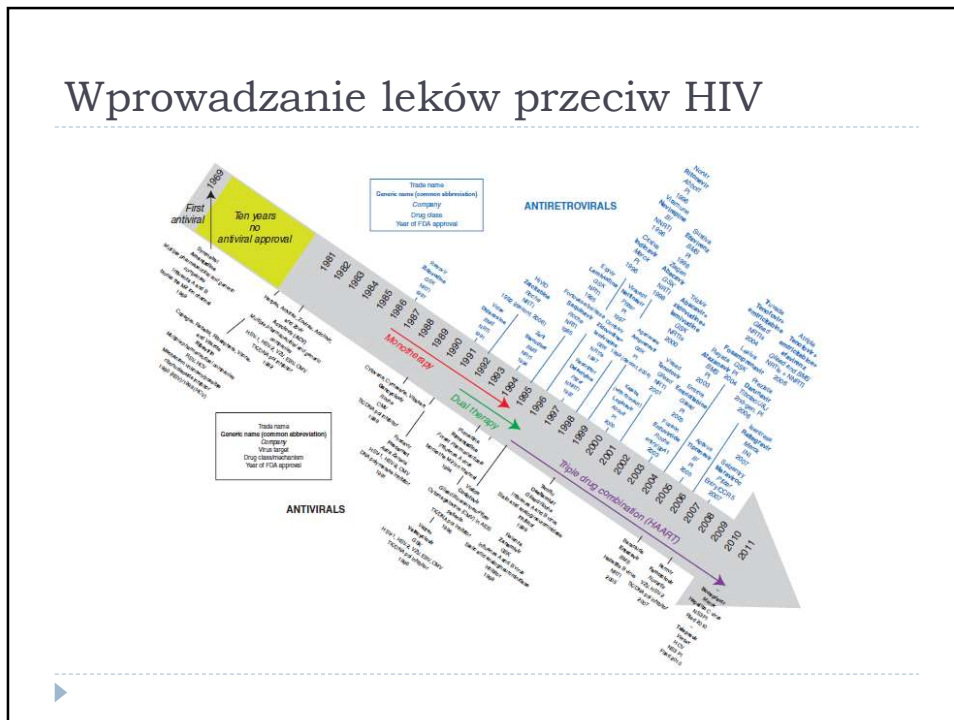
Cykl replikacji



Cykl replikacji a cele molekularne

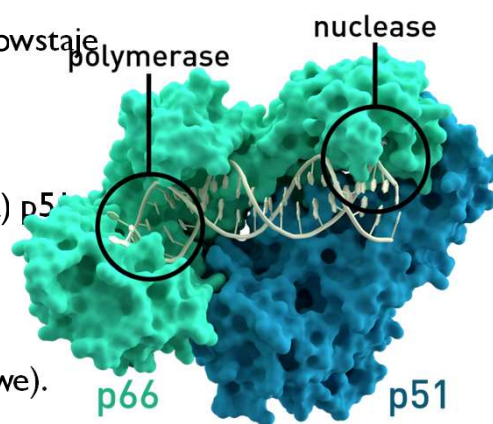


Wprowadzanie leków przeciw HIV



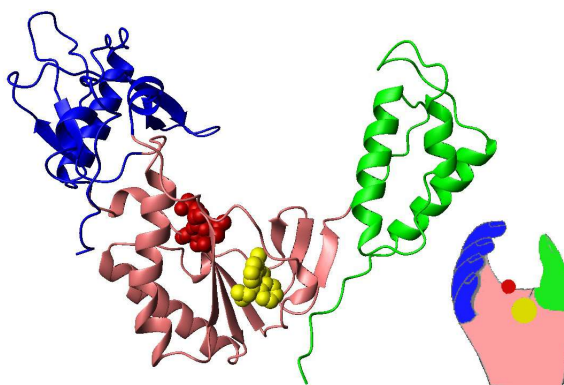
Odwrotna transkryptaza HIV

- ▶ Syntezuje komplementarną nić DNA na podstawie RNA (odwrotna transkrypcja)
- ▶ Z jednoniciowego RNA powstaje podwójna nić DNA
- ▶ RNA jest hydrolizowane
- ▶ Enzym składa się z dwóch podjednostek: p66 (560 aa) p51 (440 aa).
- ▶ Podjednostka p66 zawiera miejsca aktywne (polimرازowe i nukleazowe).



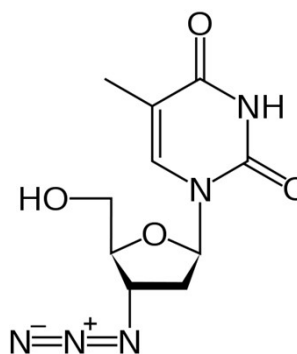
Odwrotna transkryptaza HIV

- ▶ Podjednostka p66 ma strukturę analogiczną do dłoni.
- ▶ Miejsce aktywne jest ulokowane w części centralnej (na czerwono)
- ▶ Nienukleotydowe inhibitory wiążą się w miejscu zaznaczonym na żółto.



Odwrotna transkryptaza HIV

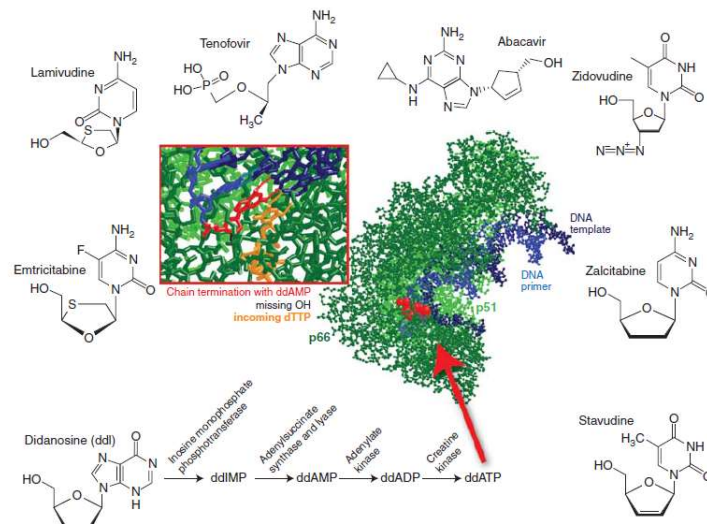
- ▶ Odwrotna transkryptaza była pierwszym celem molekularnym leków przeciw HIV.
- ▶ Inhibitory odwrotnej transkryptazy są ważnymi lekami przeciw HIV
- ▶ Pierwszym lekiem przeciw HIV był Retrovir (azydotymidyna, AZT). Wprowadzony w 1987 w wyniku przyspieszonej procedury (25 miesięcy).
- ▶ AZT jest przeprowadzane w trójfosforan, który jest używany przez odwrotną transkryptazę i hamuje reakcję polimerazową.



Witaj w klubie

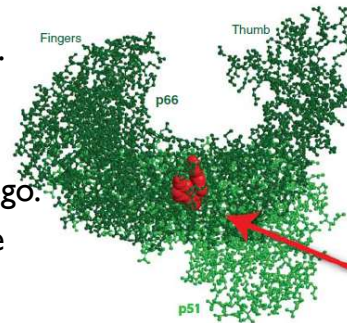


Nukleotydowe inhibitory odwrotnej transkryptyazy



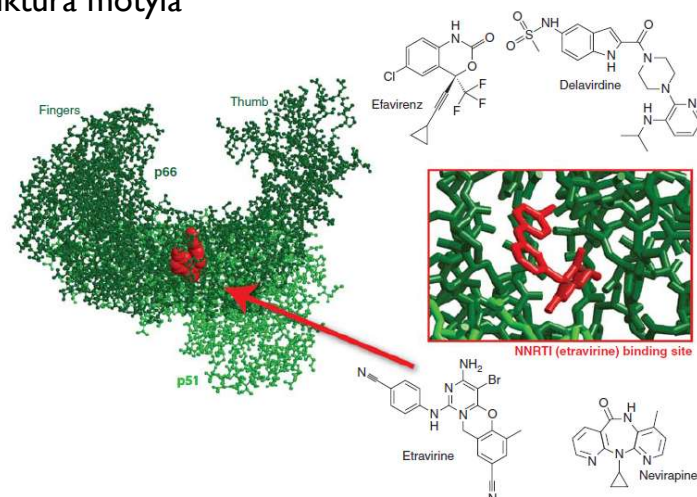
Inhibitory odwrotnej transkryptazy

- ▶ Pierwsze nienukleotydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTI) były wprowadzone na rynek w 1996.
- ▶ Wszystkie NNRTI wiążą się do tego samego miejsca – ok. 10 Å od miejsca katalitycznego.
- ▶ Wiązanie inhibitorów powoduje zmiany konformacyjne enzymu.



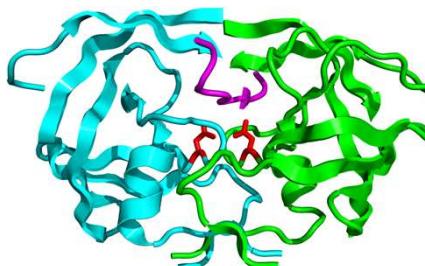
Inhibitory odwrotnej transkryptazy

- ▶ Struktura motyla

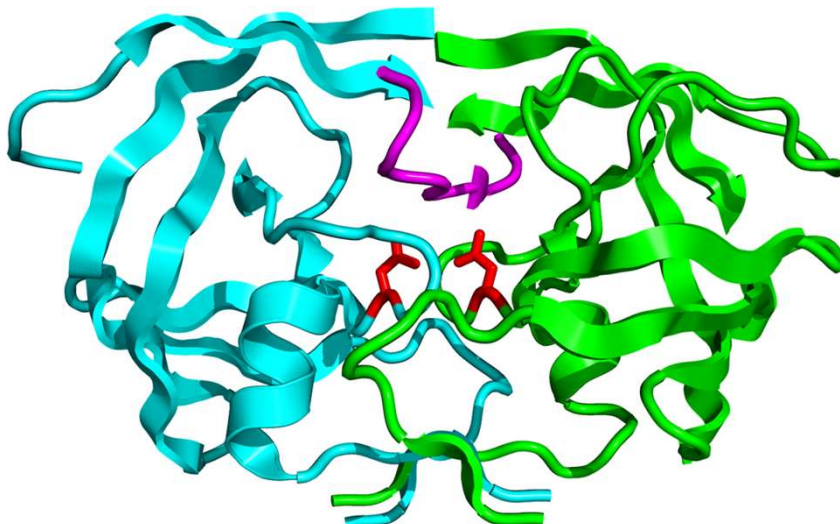


Proteaza HIV

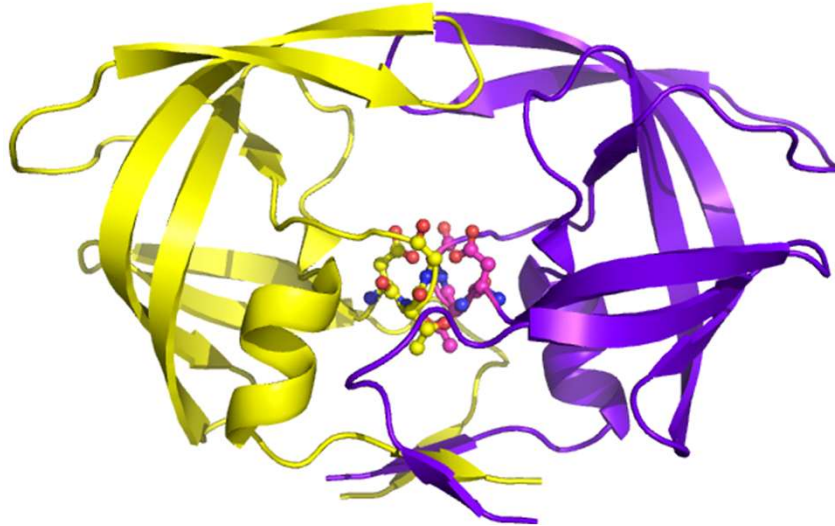
- ▶ Proteaza aspartylowa
- ▶ Przecina łańcuch polipeptydowy aby otrzymać białka niezbędne do stworzenia dojrzałego wirusa.
- ▶ Dimer, dwa łańcuchy 99 reszt aminokwasowych
- ▶ Symetria C_2
- ▶ Dwie triady katalityczne Asp25-Thr26-Gly27
- ▶ Najefektywniej przecina wiązanie peptydowe Phe-Pro lub Tyr-Pro



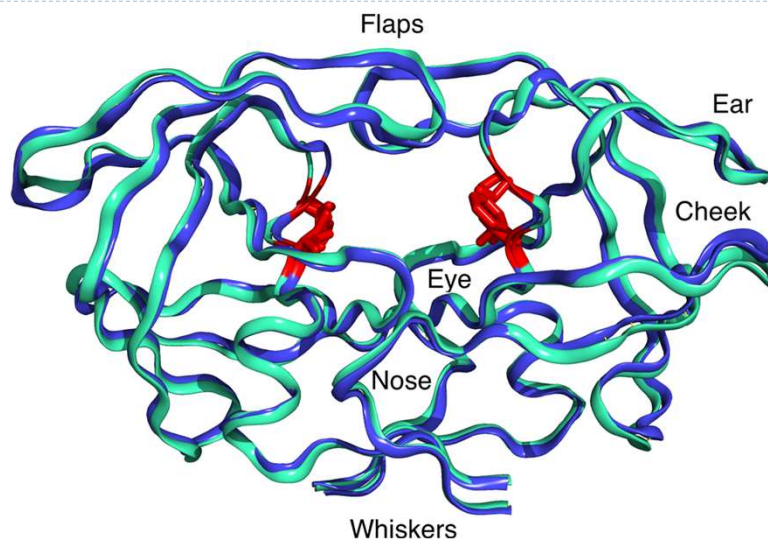
Proteaza HIV – miejsce aktywne



Proteaza HIV – miejsce aktywne

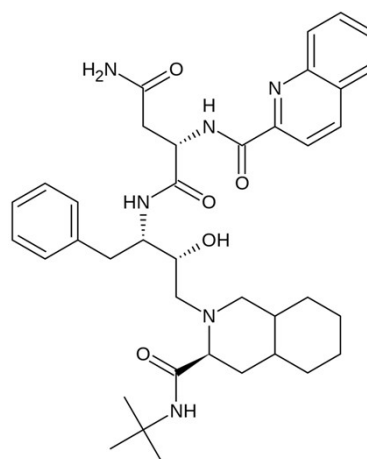


Proteaza HIV – twarz buldoga

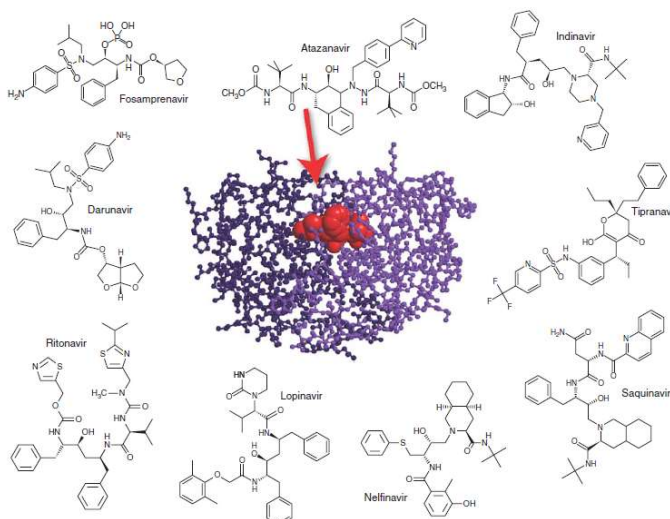


Proteaza HIV

- ▶ Proteaza HIV jest jednym z najbardziej eksplorowanych celów molekularnych leków.
- ▶ Baza PDB zawiera ok. 470 struktur z różnymi ligandami i mutantami a baza PubMed ok. 17 tys. artykułów dotyczących tego białka.
- ▶ Pierwszy inhibitor proteazy HIV - saquinawir był wprowadzony na rynek w 1995.
- ▶ Saquinawir znacząco polepszył możliwości terapii przeciw HIV.

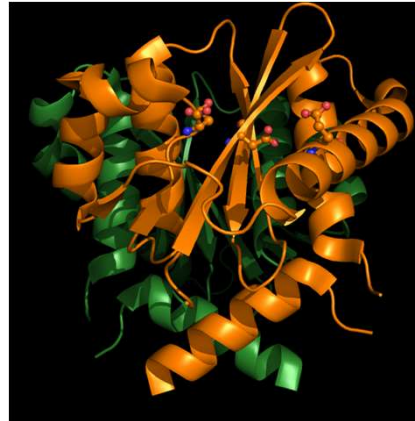


Inhibitory proteazy HIV na rynku



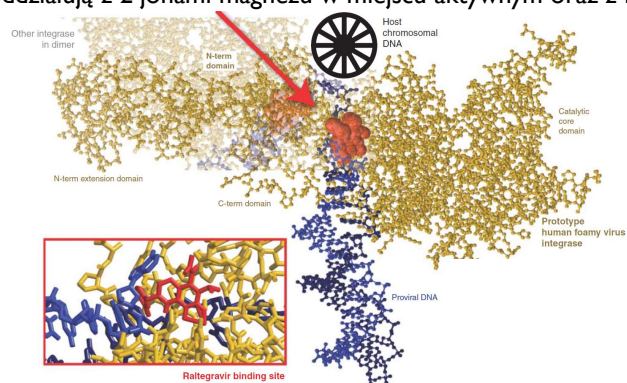
Integraza

- ▶ Enzym pozwalający na integrację materiału genetycznego wirusa z DNA gospodarza.
- ▶ Integraza także jest dobrym celem molekularnym dla leków przeciw HIV.
- ▶ Pierwszy inhibitor integrazy został wprowadzony na rynek w 2007 (Raltegravir).



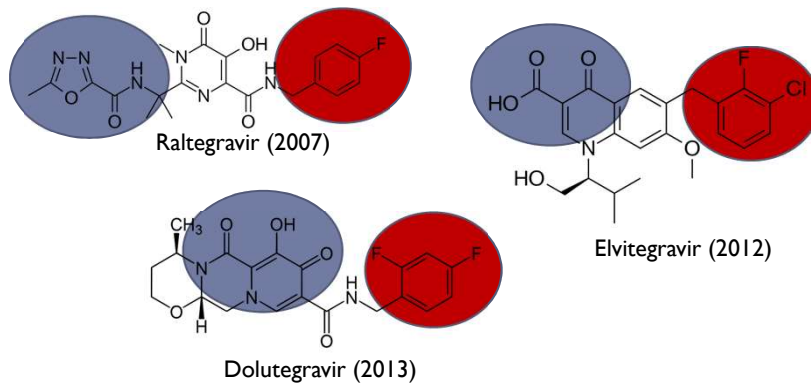
Integraza

- ▶ Znane inhibitory integrazy hamują przesuwanie łańcucha DNA (integrase *strand transfer inhibitors, InSTI*).
- ▶ Inhibitory wiążą się tylko do kompleksu integrazy z wirusowym DNA
- ▶ Inhibitory oddziałują z 2 jonami magnezu w miejscu aktywnym oraz z DNA.



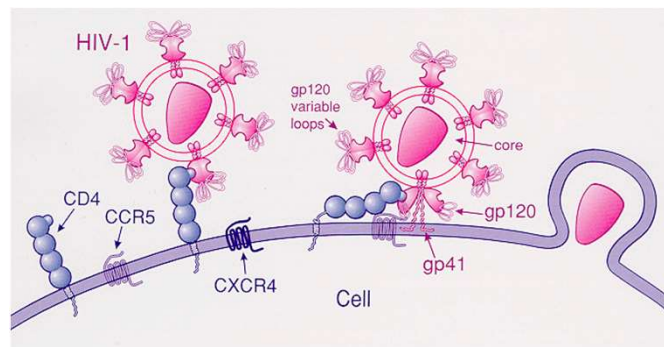
Inhibitory integrazy

- ▶ Inhibitory integrazy składają się z dwóch części:
 - ▶ Domeny wiążącej metal
 - ▶ Grupy aromatycznej (interkalującej DNA)



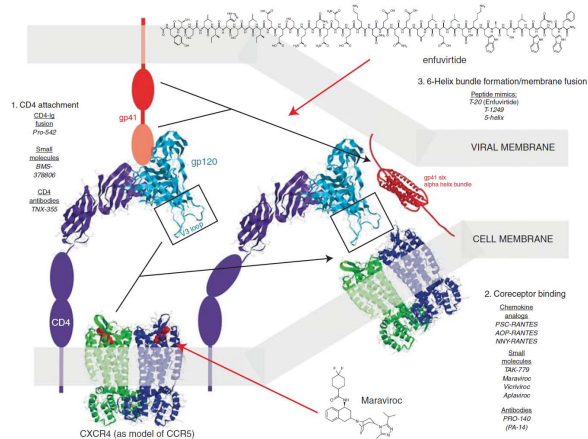
Inhibitory wejścia (*entry inhibitors*)

- ▶ Inhibitory blokujące oddziaływanie wirus-limfocyt T i hamujące wejście wirusa do komórki.
- ▶ Inhibitory mogą oddziaływać zarówno z białkami z powierzchni wirusa (gp41 i gp120) jak i tymi z powierzchni komórki eukariotycznej (CD4 i CCR5)



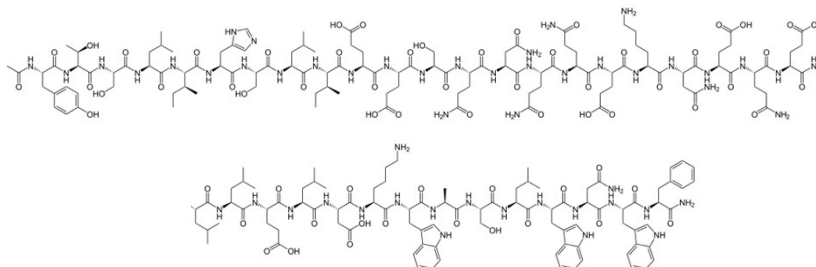
Inhibitory wejścia (*entry inhibitors*)

- ▶ Inhibitory blokujące oddziaływanie wirus-limfocyt T i hamujące wejście wirusa do komórki.



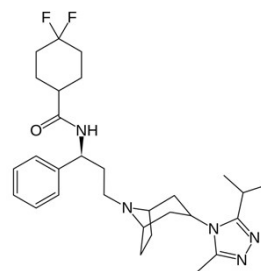
Inhibitory wejścia (*entry inhibitors*)

- ▶ **Fuzeon**, peptydowy inhibitor (36 aa) wejścia wiążący się do białka gp41.
- ▶ Używany w przypadku nieskuteczności innych terapii.
- ▶ Wysoki koszt rocznej terapii (ok. 25 000 USD).



Inhibitory wejścia

- ▶ **Malaviroc**, antagonist receptora CCR5. Blokuje oddziaływanie CCR5 z gp120.
- ▶ Wiąże się do hydrofobowej wnęki CCR5 i zmienia konformację zewnątrzkomórkowej pętli.
- ▶ Tropizm – część wirusów używa tylko receptorów CCR5 (wirusy R5), a część CXCR4 (wirusy X4), a inne obu (wirusy X4R5).



Malaviroc

Zmienność wirusa HIV

- ▶ Zarażony człowiek ma ok. 10 000 – 100 000 wirusów /mL
- ▶ 1 mutacja na 1 000 – 10 000 nukleotydów
- ▶ Genom HIV to 10 000 nukleotydów.
- ▶ Każdy cykl replikacji może spowodować 1-10 mutacji!!!
- ▶ Może być wiele mutantów wirusa (także u jednego pacjenta) o różnej odporności na leki.

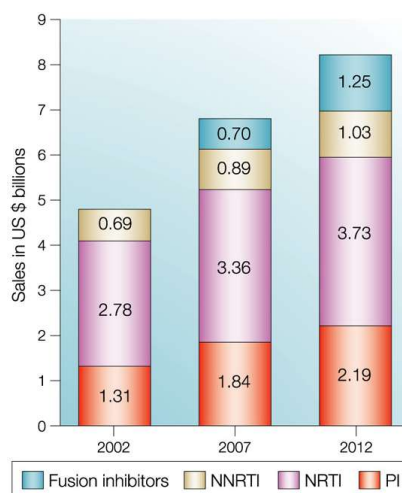
HAART

- ▶ Typowo stosuje się kombinację 3 leków, co umożliwia zwalczanie mutantów na podobnym poziomie.
- ▶ HAART - *highly active antiretroviral therapy*
- ▶ Typowo stosowana jest mieszanka dwóch nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy i nienukleozydowego RTI lub inhibitora proteazy .
- ▶ Monoterapia powoduje selekcję wirusów odpornych na zastosowany lek.
- ▶ HAART umożliwia zahamowanie replikacji do niewykrywalnego poziomu i odbudowanie limfocytów T.



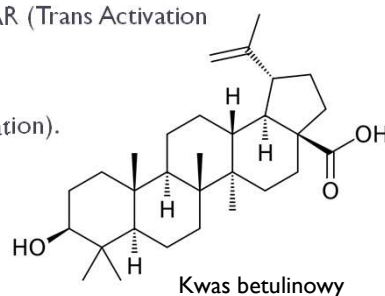
Przychody

- ▶ Przychody z leków przeciw HIV ciągle rosną.



Podsumowanie HIV

- ▶ Leki przeciw HIV są bezpośrednio związane z różnymi fazami replikacji wirusa:
 - ▶ inhibitory wejścia;
 - ▶ odwrotna transkryptaza;
 - ▶ integraza;
 - ▶ Oddziaływanie białka regulatorowego Tat (Trans-activator of transcription) z elementem RNA – TAR (Trans Activation Response);
 - ▶ proteaza;
 - ▶ inhibitory dojrzewania wirusa (maturation).



Podsumowanie

- ▶ Wybór celu molekularnego jest kluczowy dla sukcesu projektu farmaceutycznego
- ▶ Badania podstawowe dotyczące celu molekularnego znacząco zwiększają możliwości projektowania leków.
- ▶ Zastosowanie kombinacji kilku leków z różnymi celami molekularnymi daje możliwość terapii patogenów o dużej zmienności