

Projektowanie związków biologicznie czynnych **wykład 7**

Łukasz Berlicki

Inhibitory enzymów

- ▶ **Kowalencyjne** – reagują z resztami aminokwasowymi enzymu. Inhibitory kowalencyjne mogą być nieodwracalne lub odwracalne.
- ▶ **Niekowalencyjne** – oddziałują z enzymem.

- ▶ Inhibitory kowalencyjne mogą reagować z:
 - ▶ nukleofilami miejsca aktywnego (biorących udział w reakcji enzymatycznej) – *mechanism-based inhibitors*;
 - ▶ nukleofilami w pobliżu miejsca aktywnego – *targeted covalent inhibitors* (TCI).



Inhibitory kowalencyjne

Zalety

- ▶ silne oddziaływanie z enzymem, często nieodwracalne;
 - ▶ połączenie oddziaływań niekowalencyjnych (specyficzność) i kowalencyjnych (energia oddziaływania);
 - ▶ zwiększona efektywność biochemiczna:
 - ▶ Nierównowagowe wiązanie ogranicza kompetycję z naturalnymi substratami ligandami;
 - ▶ Wolne usuwanie z organizmu;
 - ▶ Wymagane niższe dawki leku;
 - ▶ Jeżeli cel jest dezaktywowany szybko, stężenie leku szybko zmniejsza się i toksyczność oraz interakcje lek-lek są ograniczone.
 - ▶ Potencjalnie dłuższy czas działania zależny od syntezy nowych porcji enzymu (rzadsze dawkowanie leku).
 - ▶ Najefektywniejsza strategia dla celów wymagających całkowitej dezaktywacji.
-



Inhibitory kowalencyjne

Wady

- ▶ Większe prawdopodobieństwo braku selektywności;
 - ▶ Potencjalna immunogeniczność adduktu białka z ligandem prowadząca do odpowiedzi alergicznej;
 - ▶ reakcja idiosynkratyczna (nadwrażliwość);
 - ▶ Możliwe problemy z reaktywnymi produktami metabolizmu;
 - ▶ Nieoptymalne dla celów molekularnych wymagających krótkiego działania lub częściowej inhibicji;
-



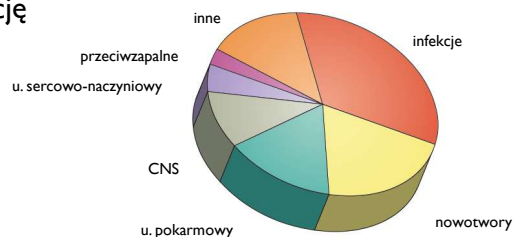
Inhibitory kowalencyjne

- ▶ **Idiosynkrazja** (gr. ἰδiosisynkrazia, idiosynkrasia, idios „jego własny” i syn-krasis „mieszanina”) - stan zwiększonej odczynowości organizmu na określony związek chemiczny.
- ▶ Reakcja na lek, związana z osobniczą wrażliwością, wynika z nieprawidłowości przemian biochemicznych leku w organizmie: nieprawidłowy metabolizm, kumulowanie lub zablokowanie metabolizmu innych substancji.
- ▶ Nie jest to reakcja uczuleniowa (nie dochodzi do oddziaływania antygen-przeciwciało).



Inhibitory kowalencyjne

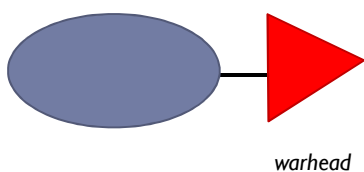
- ▶ Ze względu na trudne do przewidzenia efekty uboczne inhibitory kowalencyjne są niechętnie stosowane jako substancje wiodące w projektach farmaceutycznych.
- ▶ Większość stosowanych inhibitorów kowalencyjnych było wprowadzonych na rynek przed odkryciem ich kowalencyjnego mechanizmu działania.
- ▶ Ok. 30% stosowanych inhibitorów enzymów działa poprzez kowalencyjną modyfikację celu molekularnego.



Inhibitory kowalencyjne

▶ Najprostszy sposób projektowania:

- ▶ fragment analogiczny do substratu,
- ▶ grupa reagująca z resztami **Ser** lub **Cys** w miejscu aktywnym lub jego okolicy.



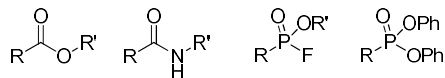
Inhibitory kowalencyjne

▶ Grupy nukleofilowe w enzymie:

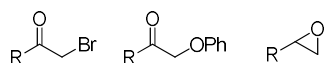
- ▶ Cys, -SH
- ▶ Ser, -OH

▶ Grupy elektrofilowe w inhibitorze:

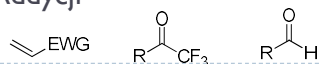
- ▶ Reakcje acylowania



- ▶ Reakcje alkilowania



- ▶ Addycji



Inhibitory kowalencyjne

▶ **Nukleofil** – grupa z nadmiarem elektronów, która w reakcji może być donorem pary elektronowej:

- ▶ -SH
- ▶ -OH

▶ **Elektrofil** – grupa z deficytem elektronów, która w reakcji jest akceptorem pary elektronowej:

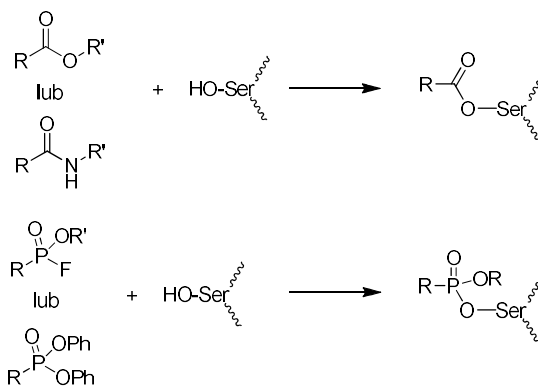


▶ Elektrofil nie może być zbyt reaktywny (nie może reagować z wodą).



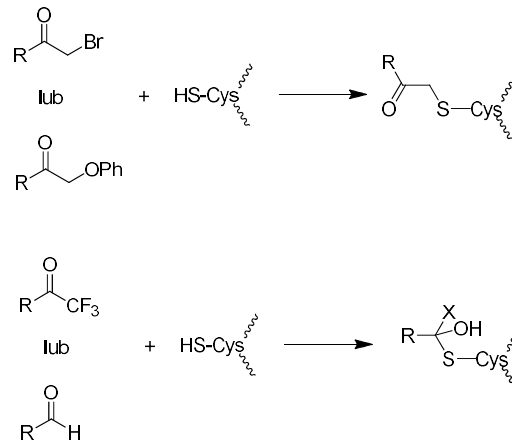
Inhibitory kowalencyjne

▶ **Acylowanie lub fosfonylowanie seryny**



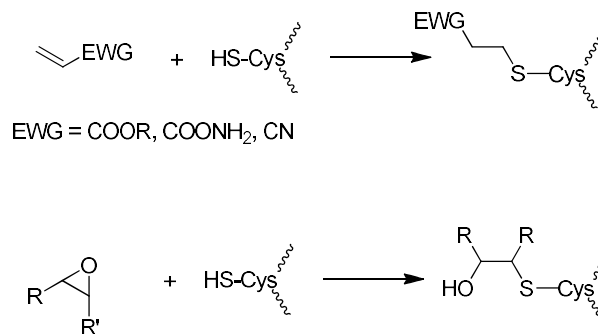
Inhibitory kowalencyjne

► Akilowanie lub addycja do cysteiny



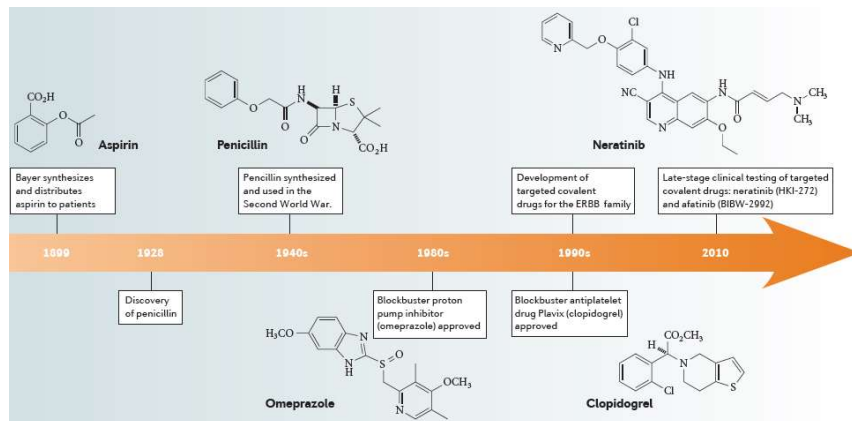
Inhibitory kowalencyjne

► Akilowanie lub addycja do cysteiny

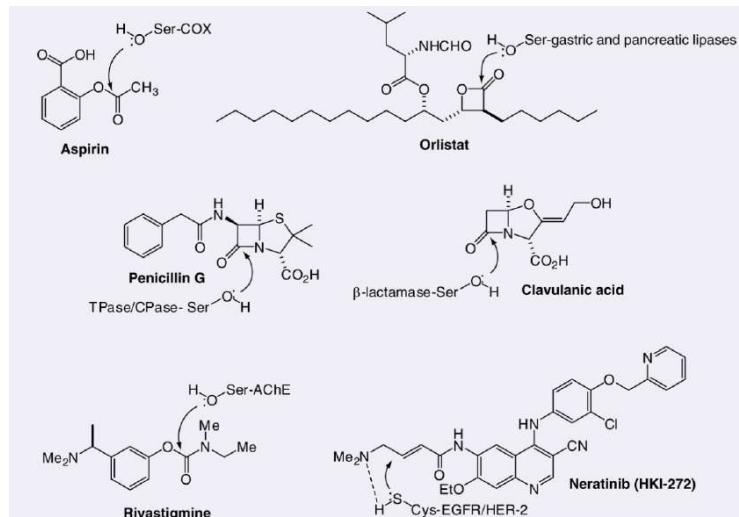


Inhibitory kowalencyjne

- Inhibitory kowalencyjne są stosowane do leczenia wielu chorób.

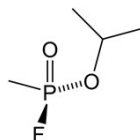


Przykłady

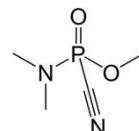


Inhibitory acetylocholinoesterazy

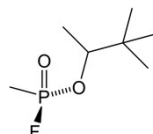
- ▶ Sarin był odkryty w Niemczech w roku 1938 (IG Farben) w badaniach mających na celu znalezienia pestycydów.
- ▶ Od 1939 Niemcy produkowali sarin i jego analogi jako broń chemiczną (nigdy przez nich nie użyta).
- ▶ Nazwa sarin pochodzi od nazwisk odkrywców: **S**chrader, **A**mbros, **R**üdiger i Van der **L**inde.



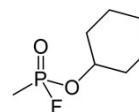
sarin



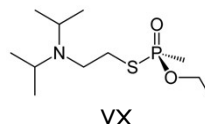
tabun



soman



cyklosarin



VX

Inhibitory acetylocholinoesterazy

- ▶ Sarin był użyty w 1988 przeciw Kurdom w Iraku (5 000 ofiar).
- ▶ W 1995 sarin był użyty w zamachu w metrze w Tokio przez sektę Najwyższa Prawda.



Inhibitory acetylocholinoesterazy

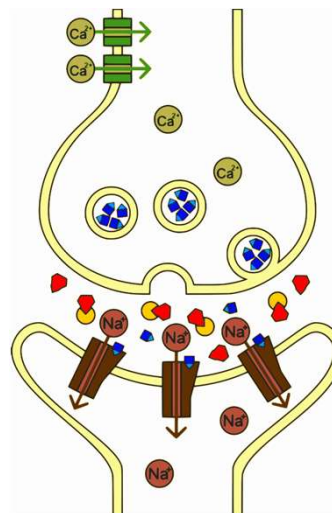
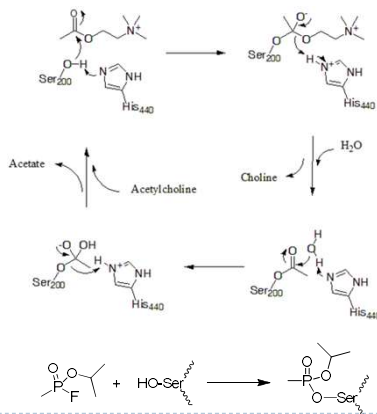
- ▶ Wysoka toksyczność paralityczno-drgawkowych gazów bojowych: sarin, soman, cyklosarin, tabun i VX wynika z ich nieodwracalnego hamowania acetylocholinoesterazy.

- ▶ $LD_{50} = 172 \mu\text{g/kg}$



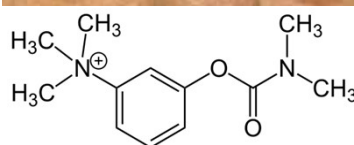
Inhibitory acetylocholinoesterazy

- ▶ Inhibitory reagują z resztą seryny w miejscu aktywnym enzymu.

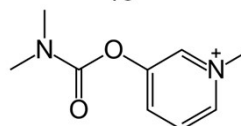


Inhibitory acetylocholinoesterazy

- ▶ **Miastenia** – Choroba autoimmunologiczna charakteryzująca się szybkim męczeniem mięśni szkieletowych. Jest związana z blokowaniem receptorów acetylocholinowych.
- ▶ Lekami są **odwracalne kowalencyjne** inhibitory acetylocholinoesterazy.

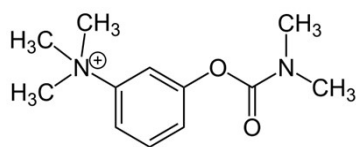
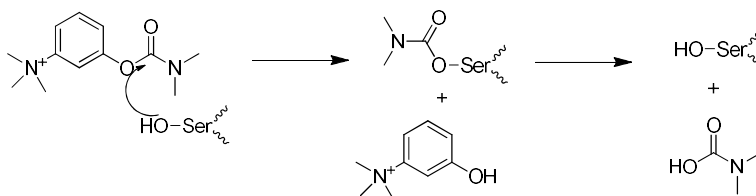


Neostygmina

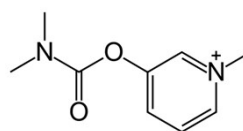


Pirydostygmina

Inhibitory acetylocholinoesterazy



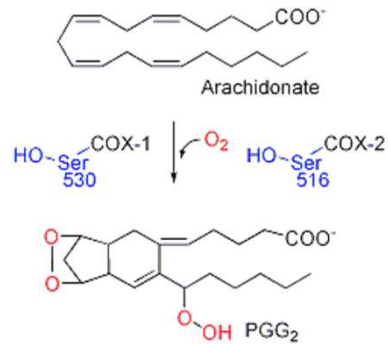
Neostygmina



Pirydostygmina

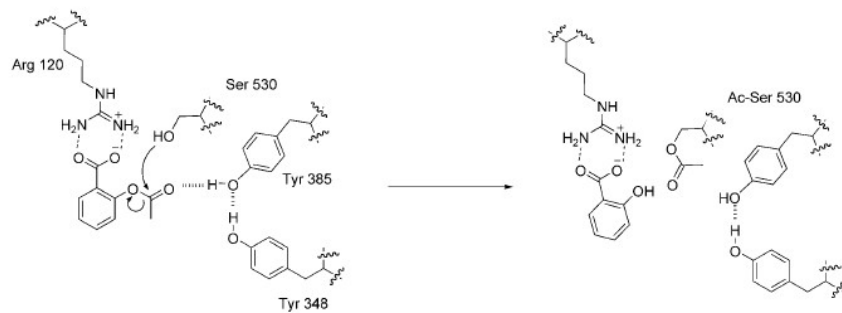
Aspiryna

- ▶ Aspiryna jest **nieodwracalnym** inhibitorem cyklooksygenaz COX-1 i COX-2.
- ▶ Cyklooksygenazy katalizują syntezę prostaglandyny z kwasu arachidonowego.



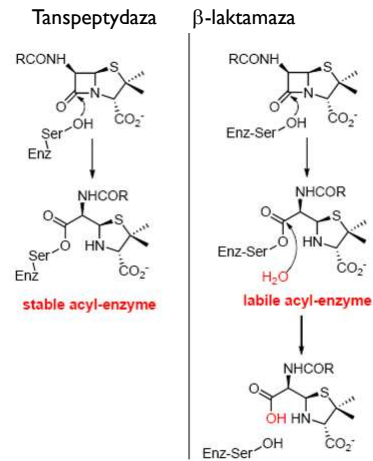
Aspiryna

- ▶ Aspiryna **acetyluje** resztę seryny w miejscu aktywnym enzymu.



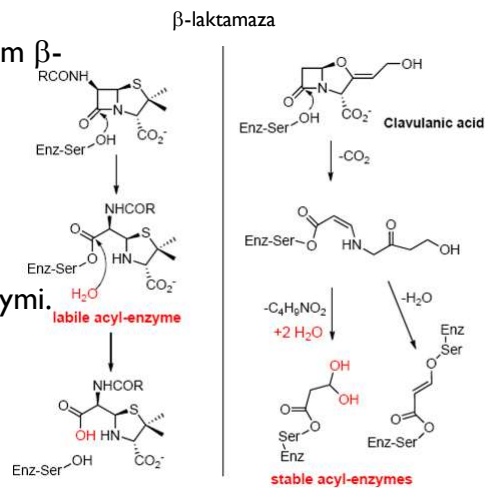
β-laktamy

- ▶ Antybiotyki β-laktamowe są nieodwracalnymi inhibitorami D-ala-D-Ala-transpeptydazy.
- ▶ Tworzą stabilny addukt do Ser w miejscu aktywnym transpeptydazy.
- ▶ Penicyliny są efektywnie hydrolizowane przez β-laktamazy



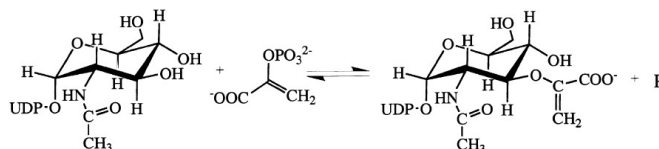
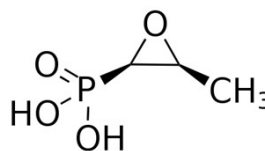
Kwas klawulanowy

- ▶ Kwas klawulanowy jest nieodwracalnym inhibitorem β-laktamaz.
- ▶ Kwas klawulanowy był wyizolowany z bakterii *Streptomyces clavuligerus*.
- ▶ Jest stosowany razem z antybiotykami β-laktamowymi.



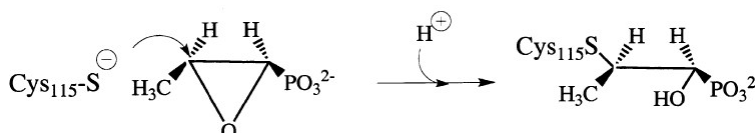
Fosfomicyna

- ▶ **Fosfomicyna** została wyizolowana z bakterii *Streptomyces*.
- ▶ Jest **kowalencyjnym** inhibitorem MurA – transferazy UDP-N-acetylglucozamina enoloprogronian.
- ▶ Enzym jest niezbędny do biosyntezy peptydoglikanu – składnika ściany komórkowej bakterii.

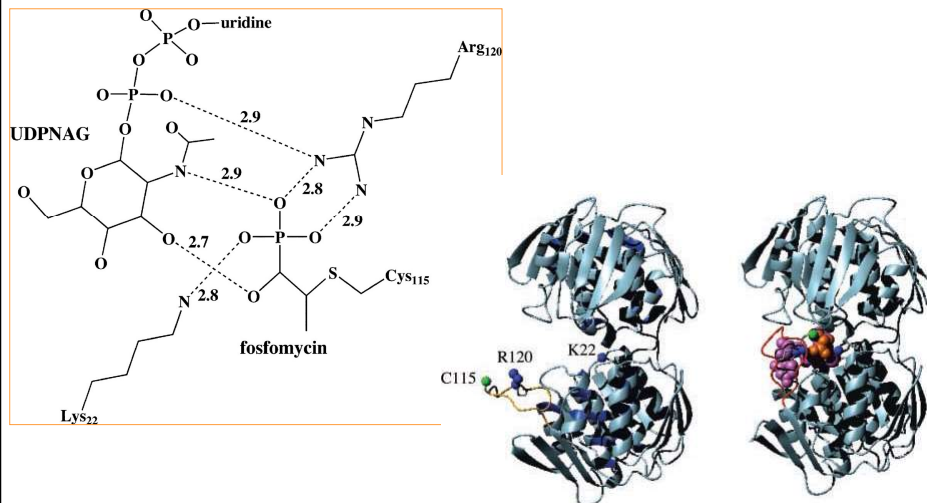


Fosfomicyna

- ▶ Fosfomicyna jest efektywnym antybiotykiem stosowanym w leczeniu infekcji układu moczowego.
- ▶ Typowo przyjmuje się 1 megadawkę (2-3 g leku).
- ▶ Fosfomicyna reaguje z Cys115 enzymu tworząc kowalencyjny addukt.

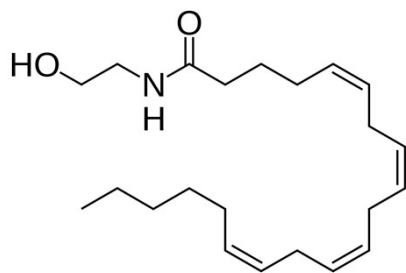


Fosfomycyna



hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych

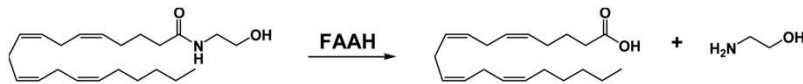
- ▶ Głównym substratem hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) jest anandamid.
- ▶ Anandamid jest endokannabinoidem.
- ▶ Anandamid aktywuje receptory kannabinoidowe CB₁ i CB₂.
- ▶ Anandamid ma aktywność podobną do THC.



Anandamid
(Sanskryt, *ananda* – radość, szczęście)

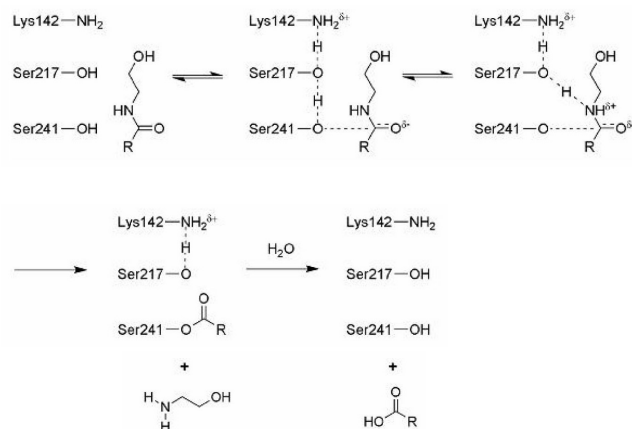
FAAH

- ▶ FAAH – jest celem molekularnym leków przeciwbólowych.
- ▶ Zahamowanie FAAH powoduje zwiększenie stężenia anadamidu i poprzez to efekt przeciwbólowy.
- ▶ Zahamowanie FAAH nie powoduje efektów ubocznych obserwowanych przy bezpośredniej aktywacji receptorów CB1 i CB2 (zaburzenie rozpoznawania i motoryki).



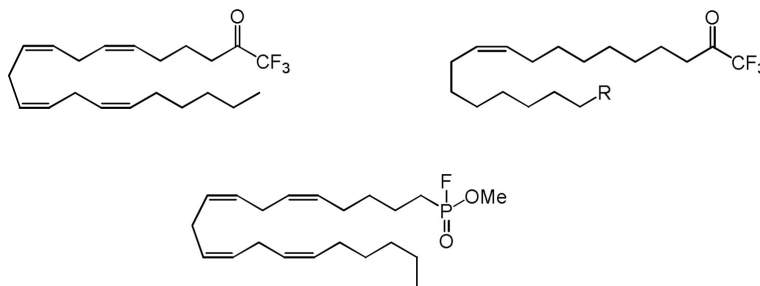
FAAH

- ▶ Mechanizm hydrolizy



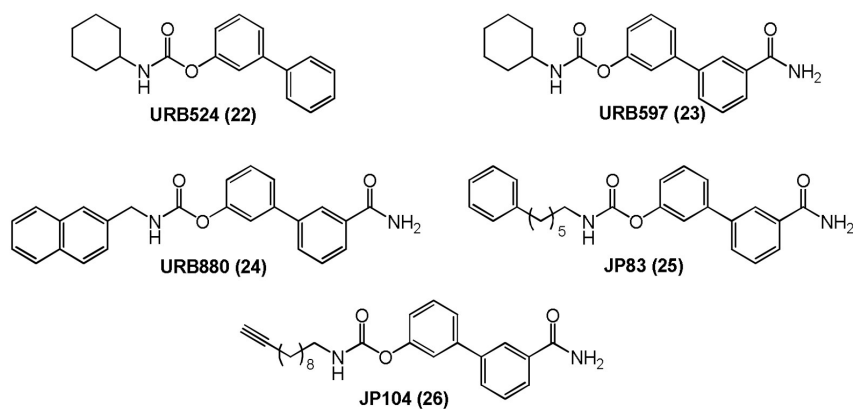
Inhibitory FAAH

- ▶ Inhibitory będące analogami substratu



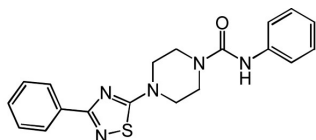
Inhibitory FAAH

- ▶ Inhibitory karbaminianowe acylują enzym.

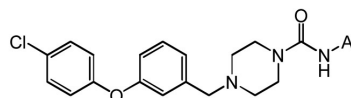


Inhibitory FAAH

► Inhibitory mocznikowe acylują enzym.



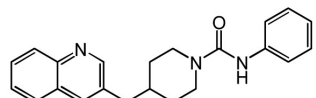
JNJ-1661010/Takeda-25 (32)



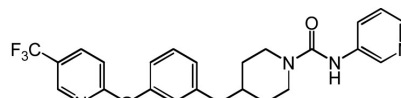
33, Ar = phenyl

34, Ar = pyridazin-3-yl

35, Ar = benzoisoxazol-3-yl



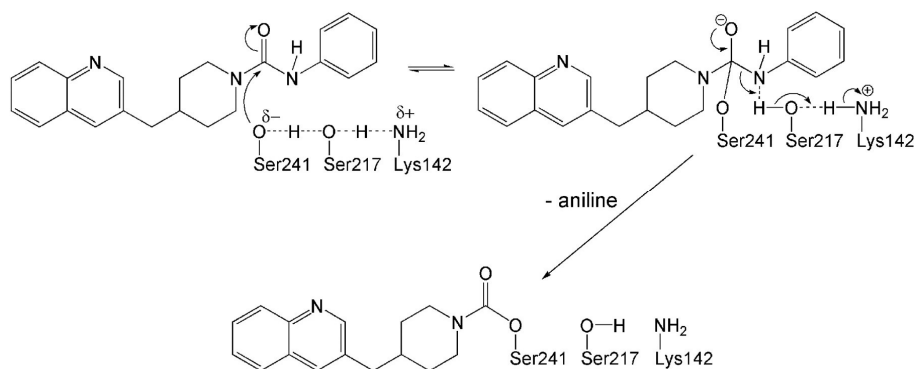
PF-750 (36)



PF-3845 (37)

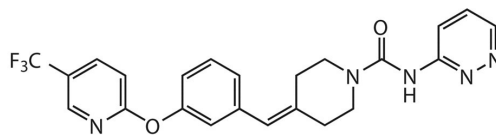
Inhibitory FAAH

► Mechanizm acylowania enzymu



Inhibitory FAAH

- ▶ Związek PF-04457845 jest w II fazie badań klinicznych jako lek przeciwbólowy

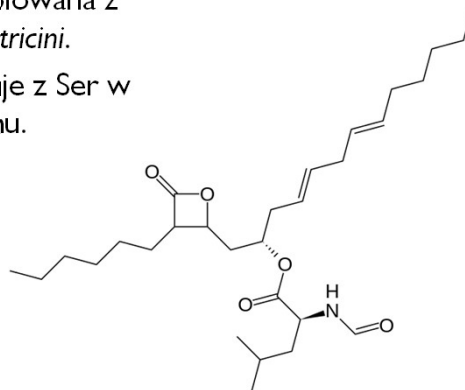


PF-04457845



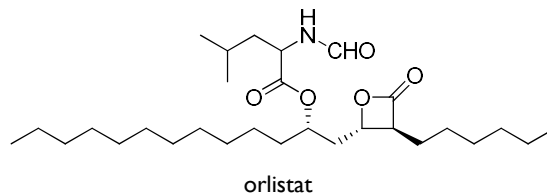
Lipostatyna

- ▶ Lipostatyna jest nieodwracalnym inhibitorem lipazy trzustkowej.
- ▶ Lipostatyna została wyizolowana z bakterii *Streptomyces toxytricini*.
- ▶ Układ β -laktonowy reaguje z Ser w miejscu aktywnym enzymu.

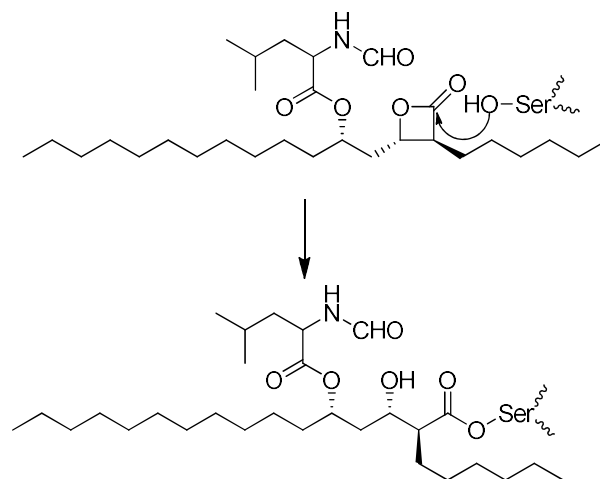


Lipostatyna

- ▶ Nasycony analog lipostatyny - **orlistat** jest komercyjnie dostępnym lekiem na otyłość.
- ▶ Zahamowanie aktywności enzymatycznej lipazy powoduje zmniejszenie przyswajania tłuszczu.
- ▶ Bez dodatkowych zabiegów (ćwiczenia i dieta) efekt działania leku jest **umiarkowany**: ok. 2-3kg rocznie.

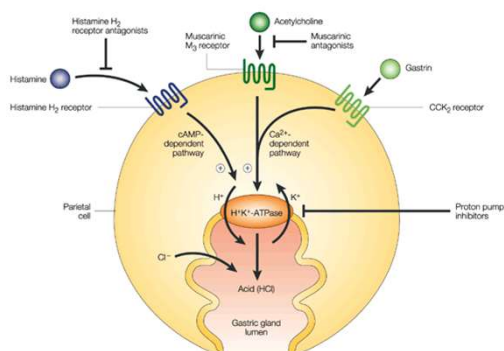


Lipostatyna - orlistat



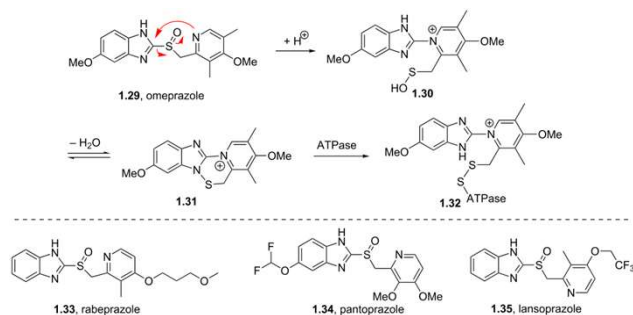
Inhibitory pompy protonowej

- ▶ W chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy oraz chorobie refluksowej korzystne jest zmniejszenie kwaśności soku żołądkowego.
- ▶ Zahamowanie H^+/K^+ ATP-azy (pompa protonowa) w komórkach okładzionowych żołądka powoduje zmniejszenie wydzielania jonów wodorowych.



Inhibitory pompy protonowej

- ▶ Omeprazol i jego analogi są kowalencyjnymi inhibitorami ATP-azy.

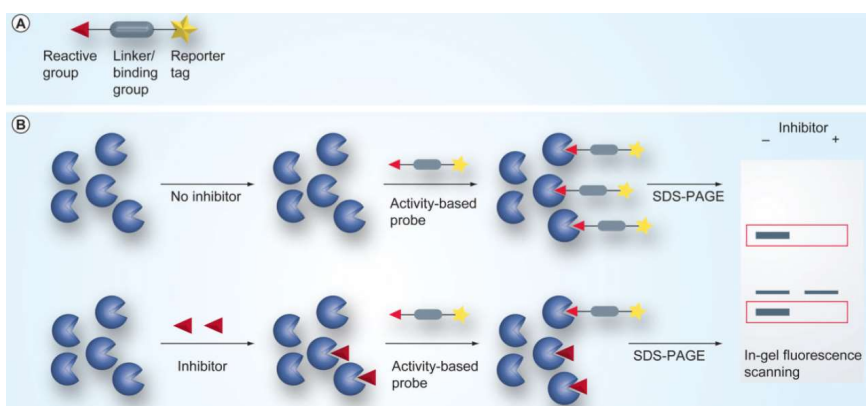


Sprawdzanie selektywności

- ▶ Ze względu na reaktywność inhibitorów kowalencyjnych niezbędne jest sprawdzenie ich selektywności względem wszystkich enzymów z danej klasy.
- ▶ Testy można wykonać używając substancji wykrywających badaną aktywność enzymatyczną (*activity-based probes*).



Sprawdzanie selektywności



Podsumowanie

- ▶ Nieodwracalne inhibitory enzymów są ważną klasą szeroko stosowanych leków.
- ▶ Inhibitory nieodwracalne mają wiele zalet wynikających z nierównowagowego zachowania względem enzymu.
- ▶ Mogą powodować trudne do przewidzenia efekty uboczne.

