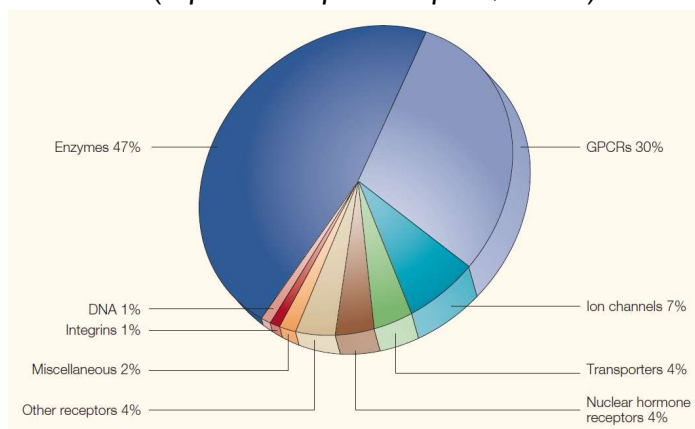


Projektowanie związków biologicznie czynnych **wykład 9**

Łukasz Berlicki

Cele molekularne leków

- ▶ Jedną z głównych klas celów molekularnych są receptory sprzężone z białkami G (*G protein-coupled receptors*, GPCR).



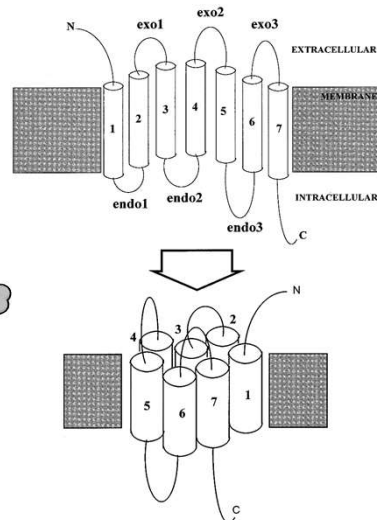
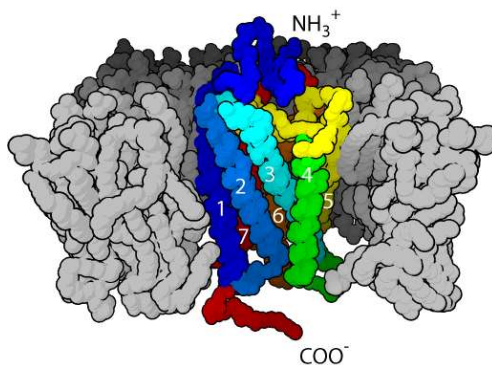
Leki

- ▶ Ok. 30 GPCR jest celami dla leków,
- ▶ Znanych jest ok. 240 GPCR z określonymi ligandami i 160 GPCR bez określonych ligandów (*orphan receptors*).
- ▶ Ok. 25% leków z 100 najlepiej zarabiających jest ligandami GPCR.
- ▶ Leki będące ligandami GPCR są stosowane w bardzo szerokim spektrum chorób, m. in.: alergie, choroby psychiczne, nadciśnienie, nowotwory, astma, ból.



Struktura GPCR

- ▶ Struktura wszystkich GPCR jest podobna: 7 transmembranowych helis, C-koniec wewnątrz, N-koniec na zewnątrz.

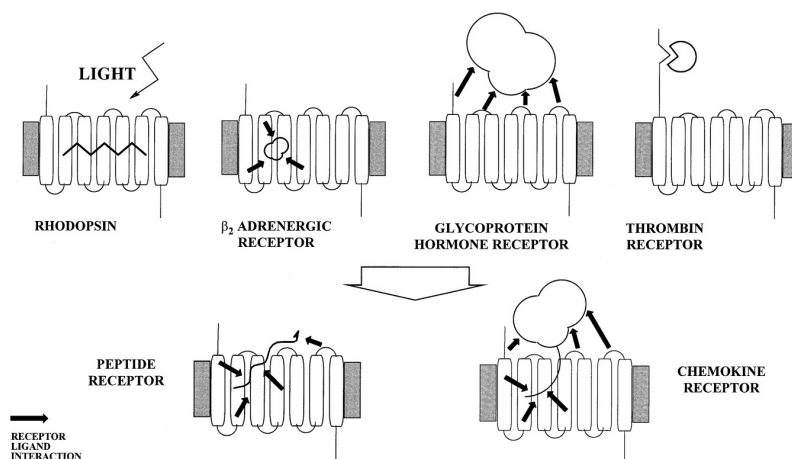


Ligandy endogenne

- ▶ **Biogenne aminy:** adrenalina, dopamina, histamina, acetylocholina, noradrenalina, serotonina, melatonina
- ▶ **Peptydy i białka:** angiotensyna, bradykinina, bombesyna, kalcytonina, chemokiny, hormon wzrostu, enkefaliny i endomorfiny, neuropeptyd Y, somatostatyna, wazopresyna i inne.
- ▶ **Związki lipidowe:** anandamid, leukotrieny, prostaglandyny, tromboksany,
- ▶ **Nukleotydy i puryny:** adenozyzna, cAMP, ATP, UTP, ADP, UDP
- ▶ **Aminokwasy i jony:** glutaminian, GABA, Ca^{2+} .

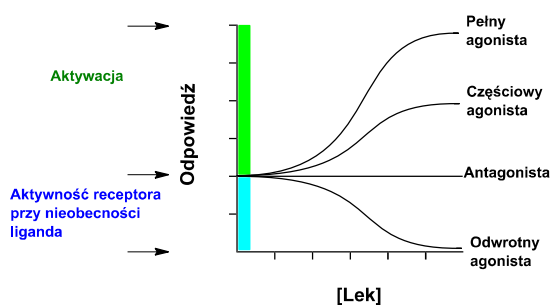


Sposób wiązania ligandów

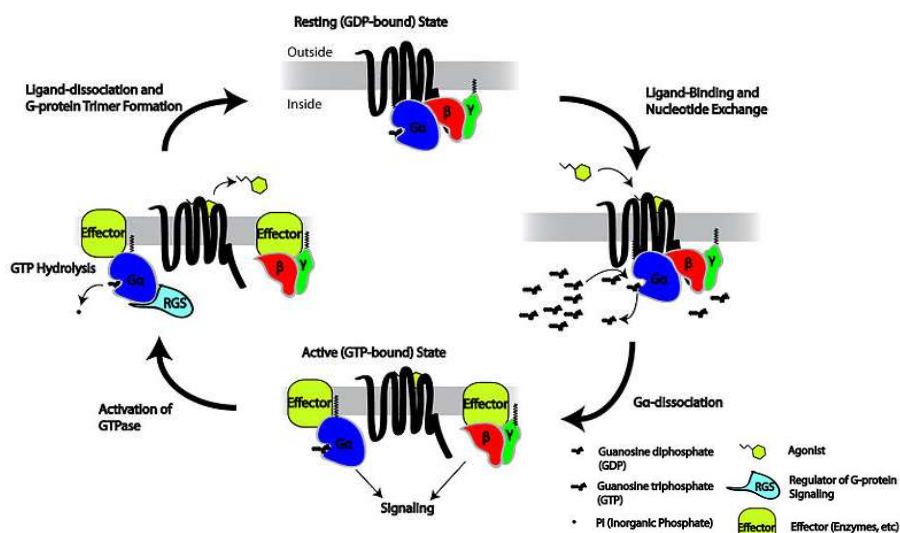


Działanie ligandów

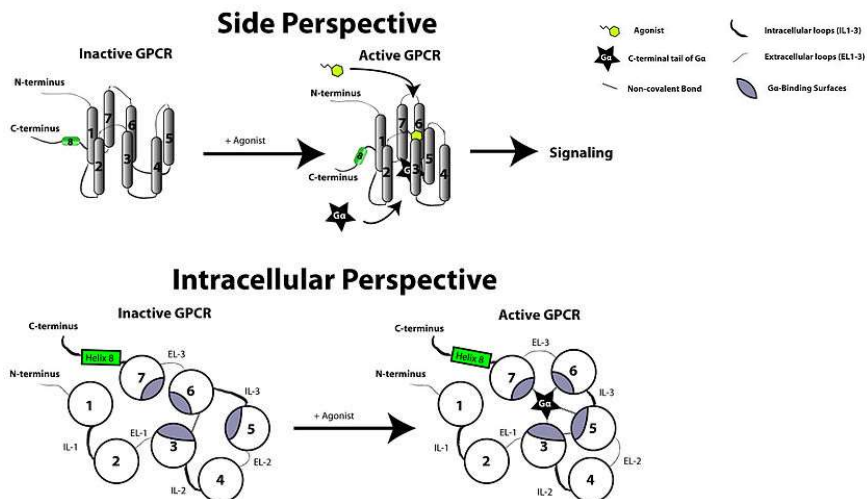
- ▶ **Agonista** – ligand wiążący się do receptora powodujący odpowiedź farmakologiczną (pełną lub częściową),
- ▶ **Odwrotny agonista** – ligand powodujący odpowiedź przeciwną do endogennego liganda,
- ▶ **Antagonista** – ligand konkurujący z endogennym ligandem i zmniejszający odpowiedź farmakologiczną.



Działanie GPCR



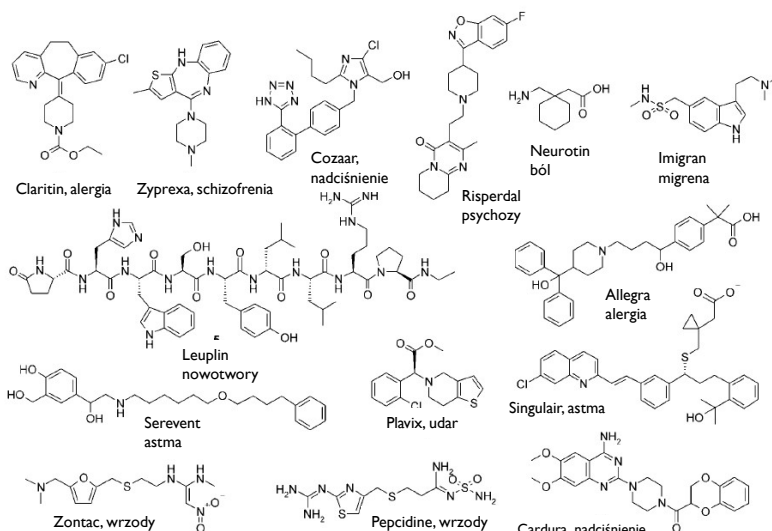
Działanie GPCR



Role GPCR

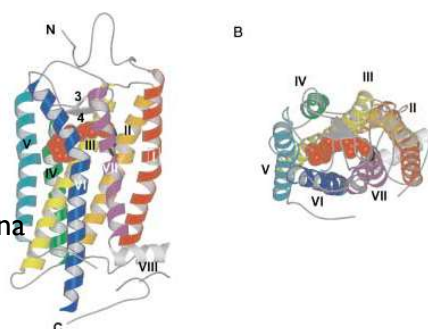
- ▶ GPCR są zaangażowane w wiele ważnych procesów fizjologicznych:
 - ▶ widzenie,
 - ▶ odczuwanie smaku i zapachu,
 - ▶ regulacja zachowania i nastroju,
 - ▶ regulacja aktywności układu odpornościowego i reakcji na zapalenie,
 - ▶ transmisja sygnałów w autonomicznym systemie nerwowym,
 - ▶ regulacja homeostazy (np. balans wody),
 - ▶ wzrost i przerzutowanie niektórych typów nowotworów.

Struktury leków – ligandów GPCR



Struktura GPCR

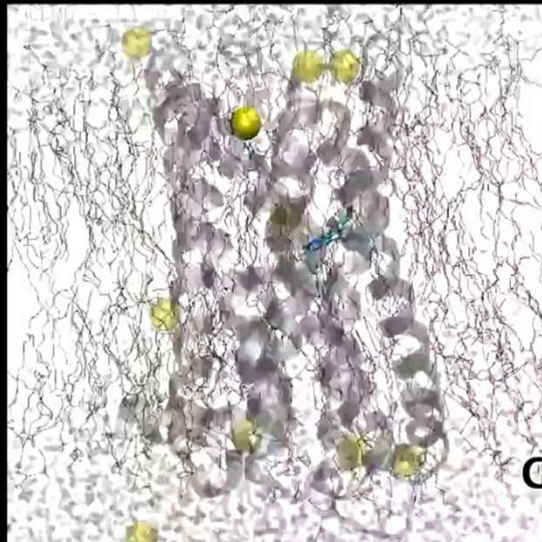
- ▶ Badania strukturalne GPCR są trudne ponieważ jest to białko transmembranowe.
- ▶ Pierwsza struktura GPCR – rodopsyny została opublikowana w roku 2000.
- ▶ Nagroda Nobla z chemii w 2012 została przyznana za badania nad GPCR: Robert Lefkowitz i Brian Kolibka.



K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, 289, 739

Ligand-based drug design

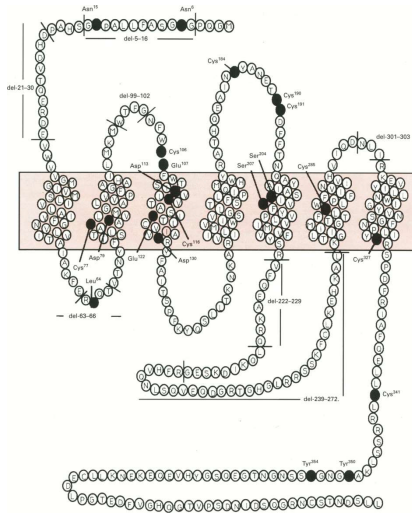
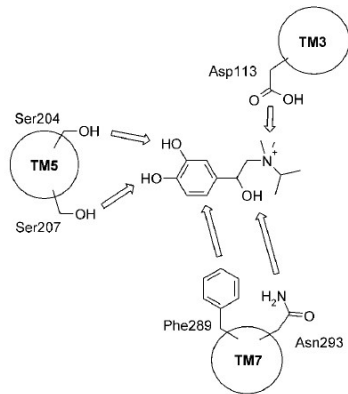
- ▶ Z powodu bardzo ograniczonej wiedzy na temat struktury GPCR projektowanie leków opiera się głównie na strukturach ligandów (*ligand-based drug design*).
- ▶ Dobrym punktem startowym są ligandy endogenne.
- ▶ Badanie zależności struktura aktywność jest kluczowe (*structure-activity relationships, SAR*).
- ▶ Model endogennego liganda lub jego analogu może być podstawą do poszukiwania innych struktur poprzez nakładania farmakoforów.



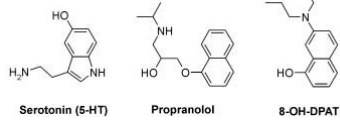
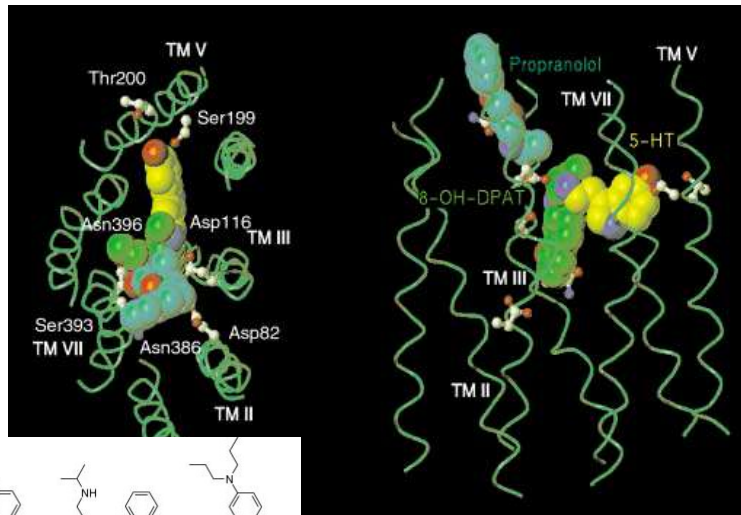
GPUGRID.net

Wiązanie ligandów

- ▶ Sposób wiązania ligandów może być badany za pomocą ukierunkowanej mutagenety.



Wiązanie ligandów

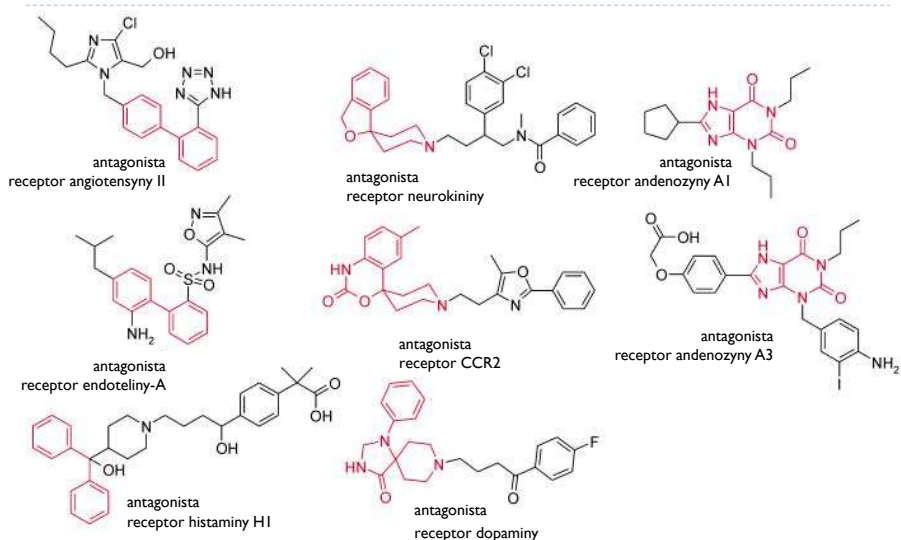


Struktury uprzywilejowane

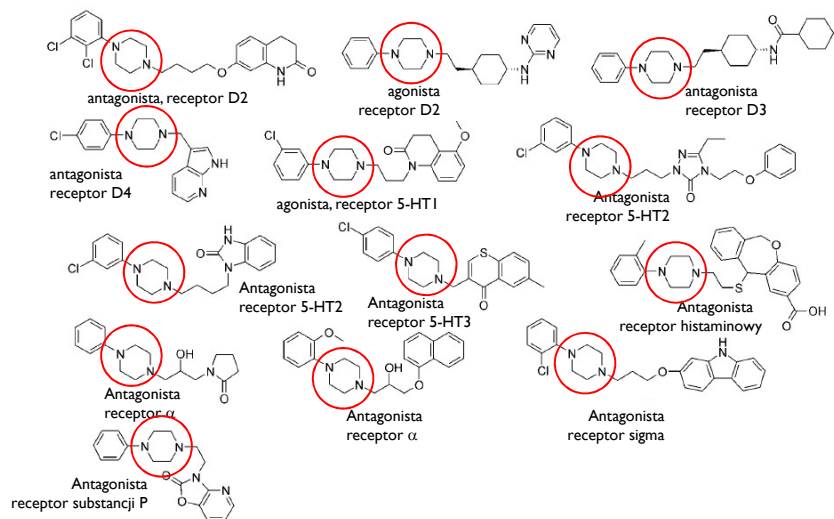
- ▶ **Struktury uprzywilejowane** (*privileged structures*) to takie fragmenty strukturalne, które mogą być podstawą do zaprojektowania i otrzymania ligandów dla różnych receptorów.
- ▶ Różnorodne modyfikacje takich struktur mogą być ważną metodą poszukiwania nowych ligandów receptorów (agonistów i antagonistów).
- ▶ Istnienie struktur uprzywilejowanych wynika z podobieństwa strukturalnego niektórych elementów GPCR.



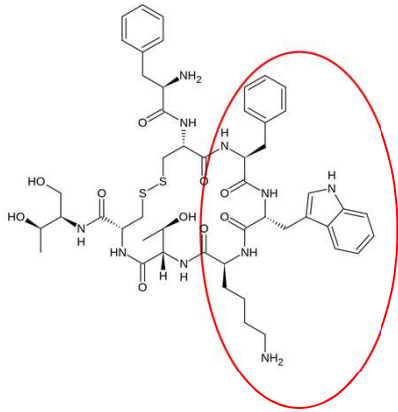
Struktury uprzywilejowane



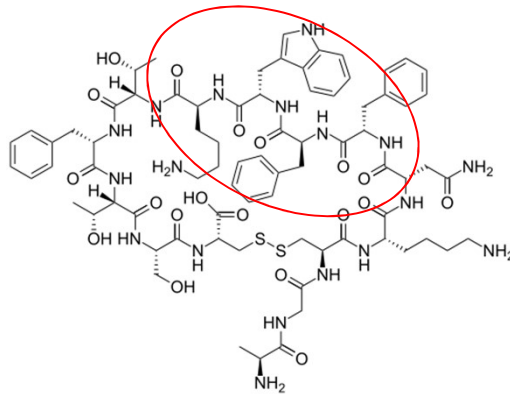
Struktury uprzywilejowane



Leki

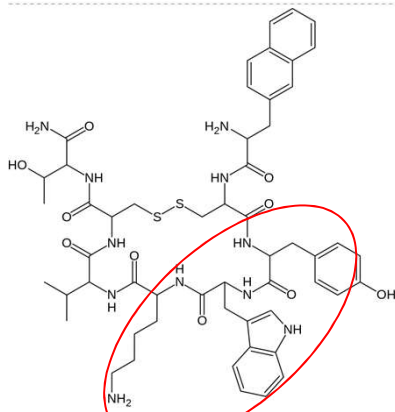


Oktreotyd
 $t_{1/2} = \text{ok. } 90 \text{ min}$

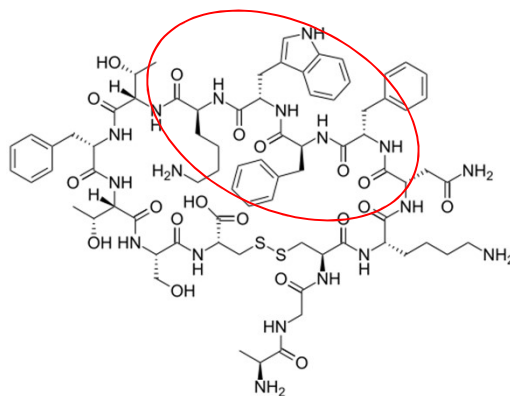


Somatostatyna
 $t_{1/2} = \text{ok. } 2-3 \text{ min}$

Leki

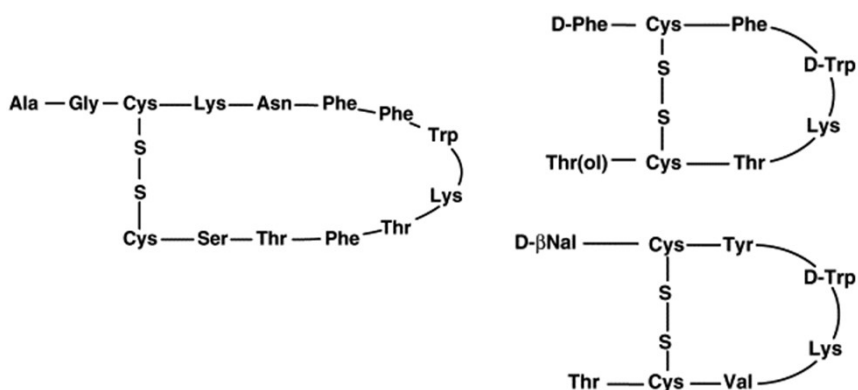


Lanreotyd
 $t_{1/2} = \text{ok. } 90 \text{ min}$



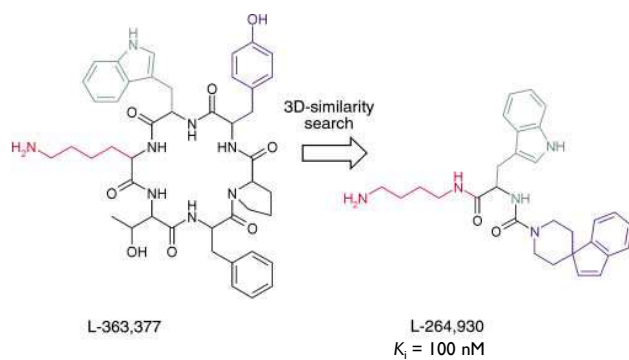
Somatostatyna
 $t_{1/2} = \text{ok. } 2-3 \text{ min}$

Somatostatyna i analogi



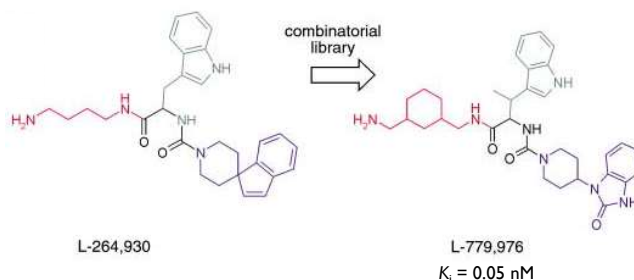
Somatostatyna

- ▶ Cykliczny heksapeptyd z motywem **Tyr-D-Trp-Lys** był użyty do przeszukania bazy związków aby znaleźć związek o podobnej strukturze



Somatostatyna

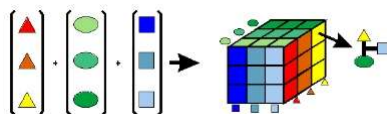
- ▶ Zastosowanie chemii kombinatorycznej do znalezienia selektywnych antagonistów receptorów somatostatyny



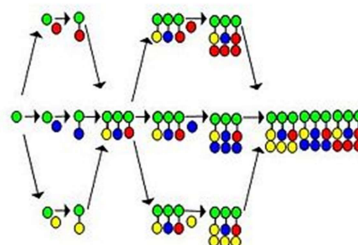
20 podstawników diaminowych
20 pochodnych Trp
79 pochodnych aromatycznych
=
130 000 związków

Chemia kombinatoryczna

- ▶ Dzięki testowaniu mieszanin wielu związków można szybko przebadać dużą liczbę analogów.

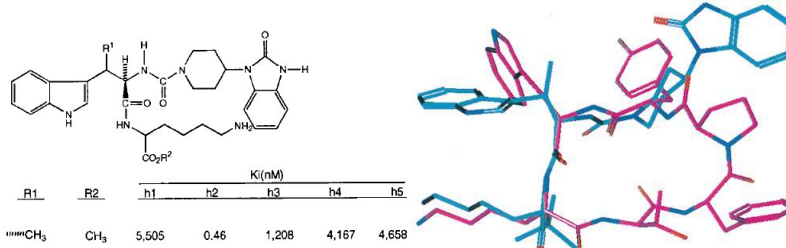


- ▶ Testowanie coraz mniejszych grup związków pozwala znaleźć ten najbardziej aktywny.



Somatostatyna

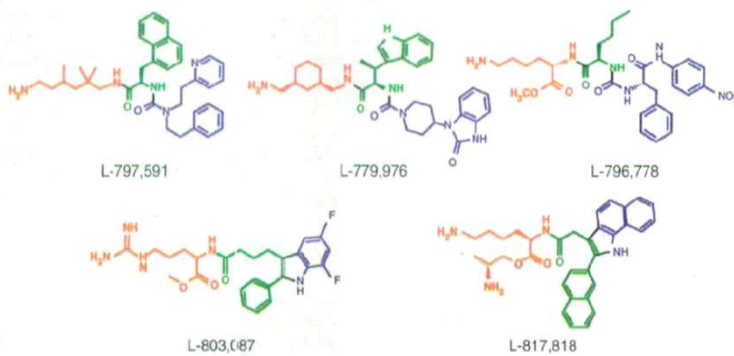
► Optymalizacja struktury liganda



Compound	R1	R2	K _i (nM)				
			h1	h2	h3	h4	h5
4	CH ₃	CH ₃	5,505	0.46	1,208	4,167	4,658
5	H	C(CH ₃) ₃	1,701	0.1	226.4	397	1,184
6	CH ₃	C(CH ₃) ₃	4,766	2.1	515.2	379	1,193
7 (L-054,522)	---CH ₃	C(CH ₃) ₃	2,392	0.01	31	81	163



Somatostatyna

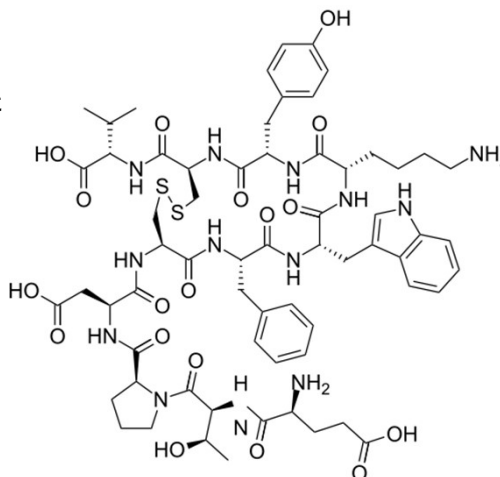


Compound	hsstr1	hsstr2	hsstr3	hsstr4	hsstr5
ss-14	0.4	0.04	0.7	1.7	2.3
L-363,377	5664	0.5	3072	>10,000	2009
L-797,591	1.4	1875	2240	170	3600
L-779,976	2760	0.05	729	310	4260
L-796,778	1255	>10,000	24	8650	1200
L-803,087	199	4720	1280	0.7	3880
L-817,818	3.3	52	64	82	0.4



Urotensyna II

- ▶ Urotensyna II reguluje pracę układu sercowo-naczyniowego.
- ▶ Receptor urotensyny II jest potencjalnym celem dla leków przeciw chorobom układu sercowo-naczyniowego.



Urotensyna II

- ▶ Skan alaninowy i badanie krótkich peptydów pozwala na znalezienie motywu odpowiedzialnego za aktywność.

- ▶ Kluczowym motywem jest

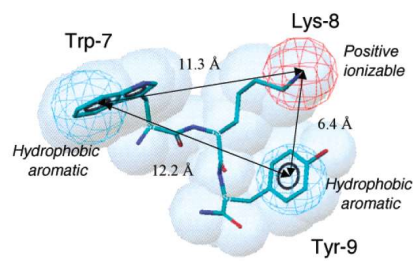
Trp-Lys-Tyr.

no.	peptide	sequence	EC ₅₀ (nM)	E _{max}
1	U-II (1-11)	ETPDCFWKYCV	2.5 ± 0.2	100
2	U-II (2-11)	TPDCFWKYCV	2.4 ± 0.1	103 ± 3.8
3	U-II (3-11)	PDCFWKYCV	3.6 ± 0.6	100 ± 5.5
4	U-II (4-11)	DCFWKYCV	3.0 ± 0.9	102 ± 4.5
5	U-II (5-11)	CFWKYCV	1.8 ± 0.3	106 ± 4.0
6	U-II (1-10)	ETPDCFWKYC	1.8 ± 0.1	99 ± 3.5
7	U-II (5-10)	CFWKYC	2.3 ± 1.1	95 ± 6.8

no.	sequence	EC ₅₀ (nM)	E _{max}
8	ATPDCFWKYCV	1.8 ± 0.3	101 ± 1.7
9	EAPDCFWKYCV	3.3 ± 0.8	101 ± 0.7
10	ETADCFWKYCV	1.9 ± 0.8	102 ± 3
11	ETPACFWKYCV	2.7 ± 0.5	101 ± 3
12	ETPDAFWKYCV (linear)	233 ± 16	96 ± 4
13	ETPDAWKYCV	5.7 ± 0.3	98 ± 1
14	ETPDCFAKYCV	1,303 ± 98	45 ± 2
15	ETPDCFWAYCV	14,800 ± 800	ND
16	ETPDCFWKACV	193 ± 9	75 ± 3
17	ETPDCFWKYCA	3.2 ± 0.3	99 ± 2

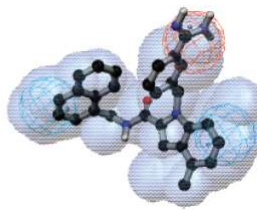
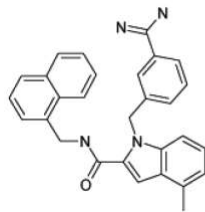
Urotensyna II

- ▶ Konformacja peptydu pozwala na określenie formakoforu.



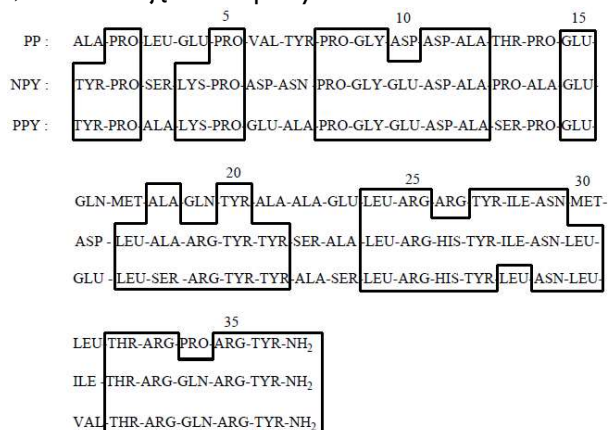
Urotensyna II

- ▶ Przeszukanie bazy danych związków i ustalenie podobieństwa 3D daje szansę na znalezienie aktywnego antagonisty



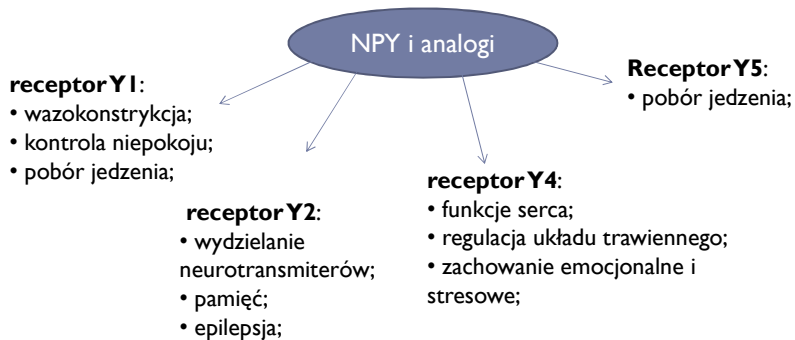
Neuropeptyd Y i analogi

- ▶ Neuropeptyd Y (NPY), polipeptyd trzustkowy (pp) i polipeptyd Y (PPY) są hormonami peptydowymi wydzielanymi z mózgu i autonomicznym układzie nerwowym, które działają na receptory Y.



Neuropeptyd Y i analogi

- ▶ Oddziaływanie z różnymi receptorami Y (Y1-Y5) kontroluje różne funkcje.



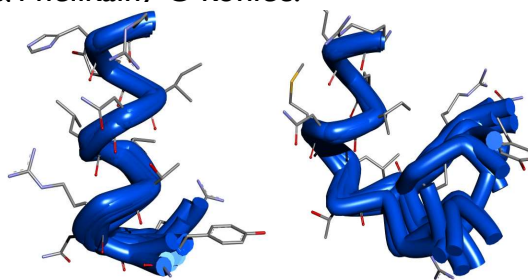
Ligandy receptorów Y jako leki

- ▶ Agoniści receptorów Y₁ i Y₅ powoduje **zwiększony** pobór jedzenia a agoniści receptorów Y₂ i Y₄ powodują **zmniejszenie** jedzenia.
- ▶ Antagoniści Y₁ i Y₅ lub agoniści Y₂ i Y₄ mogą być efektywnymi lekami na otyłość.
- ▶ Konieczne jest opracowanie selektywnych ligandów.



Neuropeptyd Y i analogi

- ▶ Struktura NPY i PP jest podobna – nieuporządkowany N-koniec, i helikalny C-koniec.



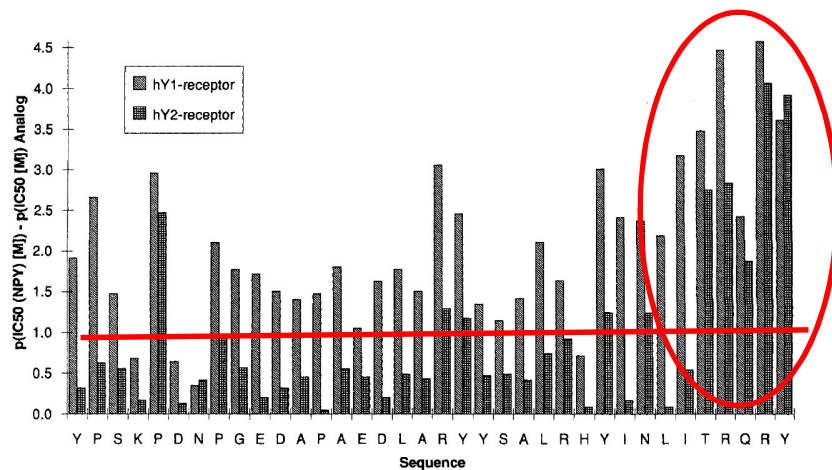
pNPY

bPP

Peptide	Y ₁ IC ₅₀ [nM]	Y ₂ IC ₅₀ [nM]	Y ₃ IC ₅₀ [nM]	Y ₅ IC ₅₀ [nM]
pNPY	0.2	0.04	5.5	0.6
hPP	> 100	> 1000	0.04	27 ^a



Neuropeptyd Y – skan alaninowy



Neuropeptyd Y

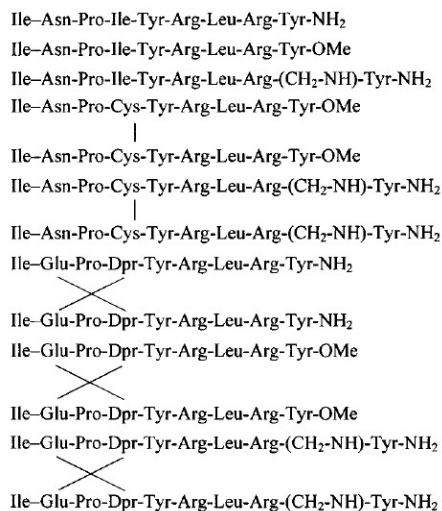
- C-końcowy fragment NPY zachowuje znaczącą aktywność biologiczną

compound	rat brain (Y ₂) IC ₅₀ (μM)
1, NPY	0.00045 ± 0.00005
2, NPY(13-36)	0.015 ± 0.002
3, PheMetArgPhe-NH ₂	40 ± 1.4
4, ThrArgGlnArgTyr-NH ₂	> 100
5, IleTyrArgLeuArgTyr-NH ₂	2.95 ± 1.7
6, LeulleTyrArgLeuArgTyr-NH ₂	0.4 ± 0.01
7, AsnLeulleTyrArgLeuArgTyr-NH ₂	0.31 ± 0.01
8, IleAsnLeulleTyrArgLeuArgTyr-NH ₂	0.037 ± 0.006
9, TyrIleAsnLeulleTyrArgLeuArgTyr-NH ₂	0.008 ± 0.003
10, HisTyrIleAsnLeulleTyrArgLeuArgTyr-NH ₂	0.012 ± 0.002
11, ArgHisTyrIleAsnLeulleTyrArgLeuArgTyr-NH ₂	0.012 ± 0.007

Neuropeptyd Y

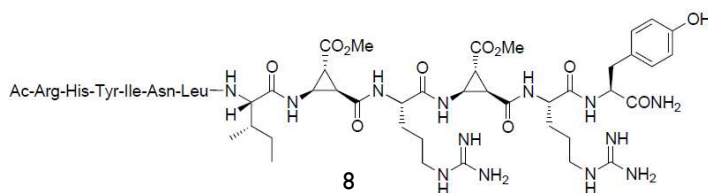
- Proste modyfikacje (dimeryzacja, podstawienie) krótkich peptydów mogą powodować zwiększenie selektywności.

peptide	Y1	Y2
NPY	0.52 ± 0.02	0.23 ± 0.02
1 ^c	5.0 ± 0.46	11.3 ± 3.8
2	25.7 ± 5.9	1420 ± 191
3	34.8 ± 5.8	1650 ± 114
4	4.8 ± 1.1	1120 ± 15
5	2.3 ± 0.5	822 ± 78
6 ^e	0.07 ± 0.01	55 ± 21
7	0.27 ± 0.01	1036 ± 116
8	0.46 ± 0.12	624 ± 69



Neuropeptyd Y

- Usztywnienie struktury peptydu wpływa na zwiększenie jego selektywności.

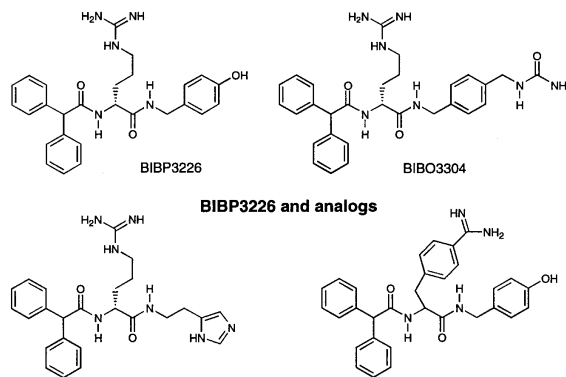


	Sequences ^[b]	Y ₁	Y ₂	Y ₅
	RHYINLITRQRY-NH ₂	> 1000	21 ^[d]	> 1000
4	RHYINLITR▲RY-NH ₂	37(± 20)	> 1000	724
5	RHYINLITR▼RY-NH ₂	> 1000	> 1000	> 1000
6	RHYINLI▲RQRY-NH ₂	> 1000	> 1000	> 1000
7	RHYINLI▼RQRY-NH ₂	> 1000	> 1000	> 1000
8	RHYINLI▲R▲RY-NH ₂	50(± 10)	> 1000	617

Neuropeptyd Y

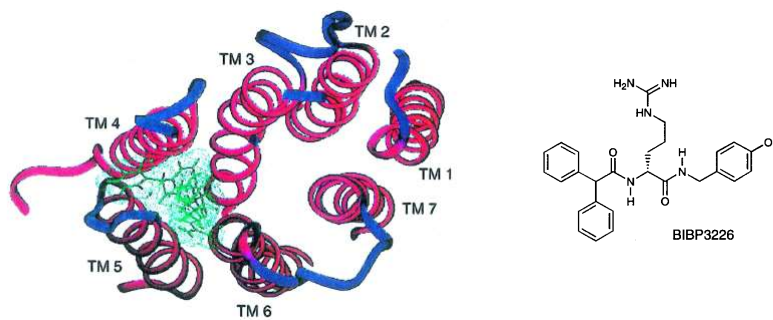
- ▶ Niepeptydowe ligandy bazujące na C-końcowym fragmencie NPY

Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-**Asn-Arg-Tyr-NH₂**



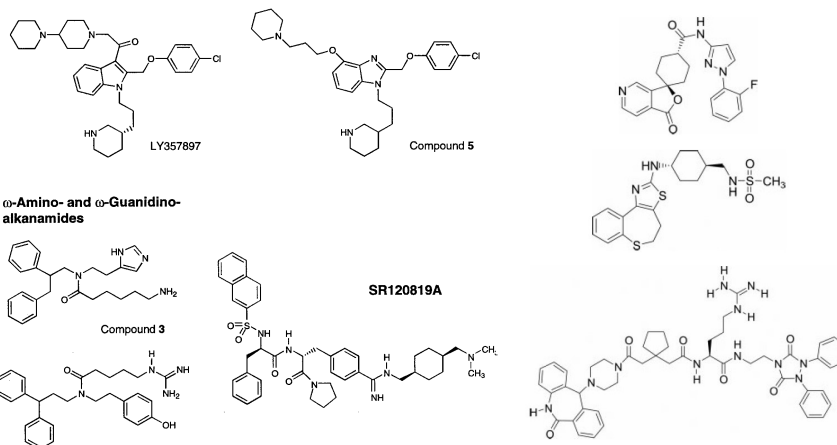
Neuropeptyd Y

- ▶ Sposób wiązania niepeptydowego antagonisty BIBP3226 do receptora



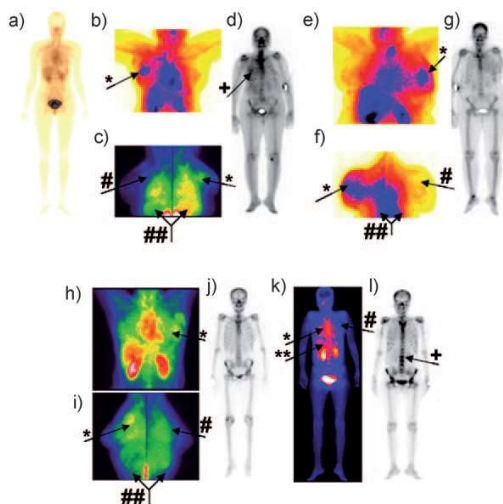
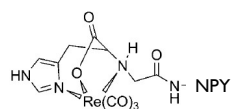
Neuropeptyd Y

► Inne niepeptydowe ligandy receptorów Y



Neuropeptyd Y

- Receptory Y1 są nadekspresjonowane w nowotworach piersi.
- Połączenie NPY z znacznikiem izotopowym pozwala na obrazowanie nowotworów.



Podsumowanie

- ▶ Ligandy receptorów sprzężonych z białkami G są ważną klasą leków, ponieważ te receptory kontrolują bardzo wiele ważnych procesów.
- ▶ Projektowanie agonistów i antagonistów GPCR opiera się głównie na strukturze ligandów.

