



Viri učinkovin

doc.dr. Marko Anderluh

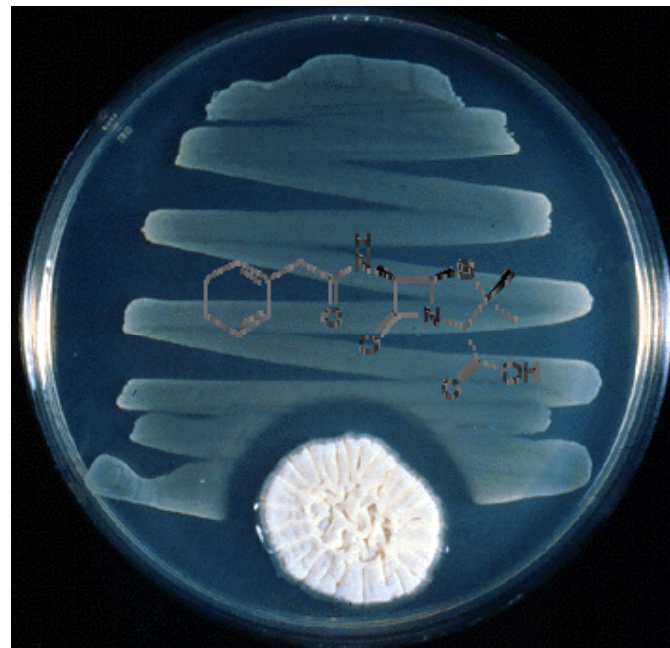
4. oktober 2012



Nekaj zgodovine

Odkritje penicilina

- Odkritje Alexandra Fleminga I. 1928: glivice rodu *Penicillium* izločajo snovi, ki zavirajo rast stafilokokov – ime penicilin
- Konec 30-ih let 20. stoletja Florey, Chain izolirajo penicilin: prvi odkrit beta-laktamski antibiotik
- Prvi uspešen poskus na človeku leta 1941



“Penicillin happened, it came out of the blue.”

A. Fleming,
1930.



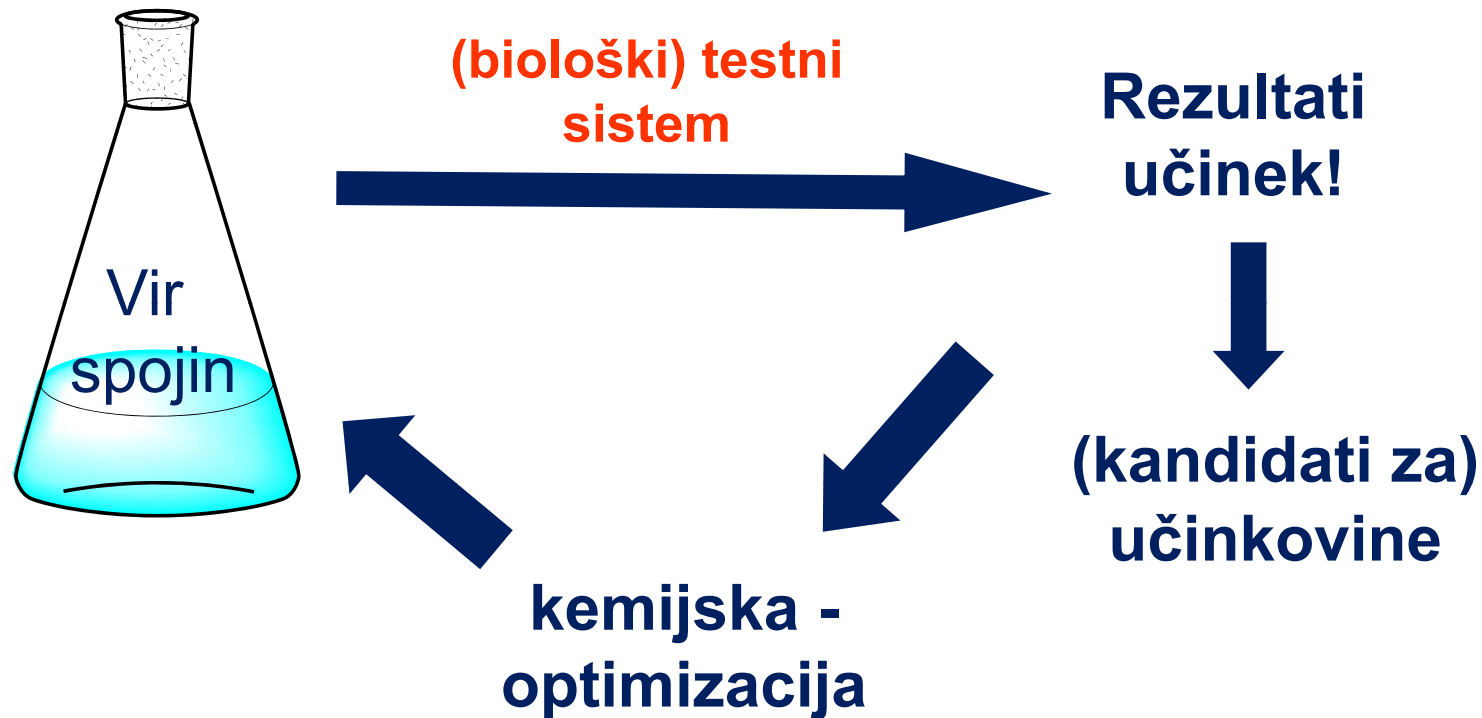
Nekaj zgodovine

Sulfonamidi – začetek ere kemoterapevtikov

- Gerhardt Domagk, 1932, azo-barvila delujejo protibakterijsko
- Azo-barvila se kovalentno vežejo na proteine blaga ali usnja → kovalentna vezava na bakterijske proteine → bakteriostatsko/cidno delovanje
- Mehanizem delovanja odkrijejo Ernest Fourneau in sodelavci na Pasteur Institute/Paris



Tradicionalni način otkrivanja zdravilnih učinkovin



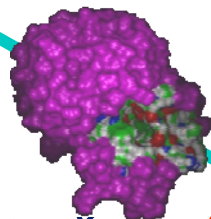
- Večinoma princip poskus-napaka (trial-and-error)
- "serendipity"
- Takojšnje otkrivanje učinkovin



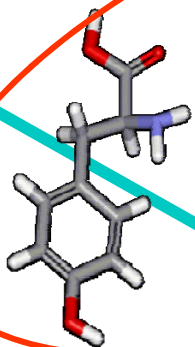
Odkrivanje/izumljanje zdravila danes



Izbira bolezni

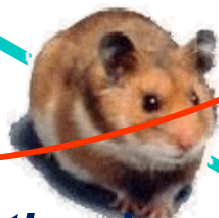


**Izolacija tarče,
ki je vpletena v
obolenje (2-5 let)**



**Odkritje učinkovine
proti dejavniku bolezni
(2-5 let)**

Pilotna sinteza



**Predklinična testiranja
(1-3 let)**

File IND



Formulacija



**Klinično
preizkušanje
(2-10 let)**

File NDA

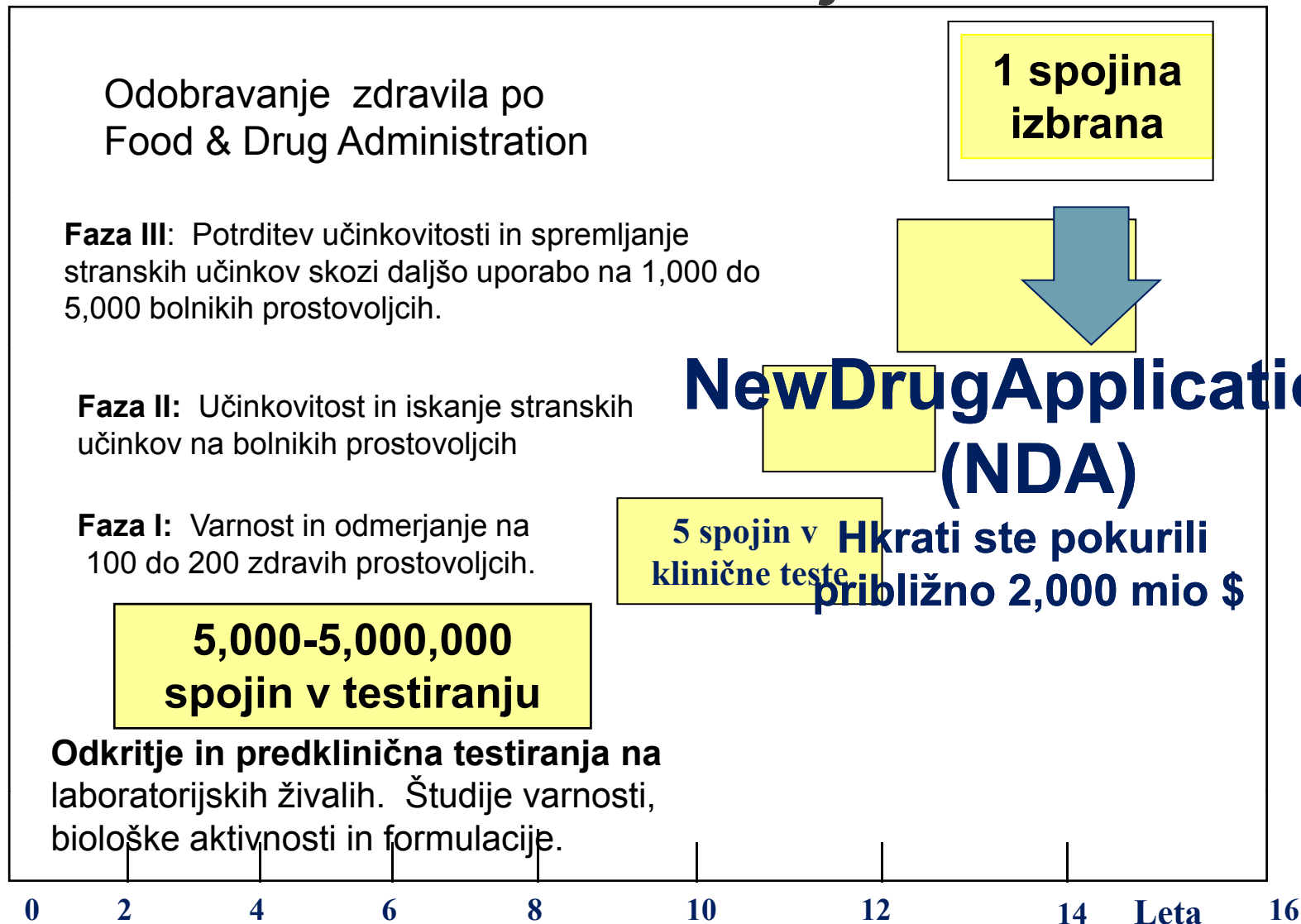
**Marketing Authorization
Application (EMA)**

**FDA odobritev
(2-3 leti)**





Klinične študije





Izbira bolezni

Ključno vprašanje – kaj je prioriteta farm. industrije:

- Ali lahko profit od prodaje zdravila opraviči stroške razvoja?
- Cilj “Big pharma” predvsem kronične bolezni razvitega sveta – hipertenzija, ulkus, hiperlipidemija...
- Konkurenca?
- “Orphan drugs”

Strateško področje, znanost pride na vrsto kasneje



Rank 2006	Brand Name(s)	Generic Name	Sales 2006 (USD millions)	Change from 2005	Company(ies)	Disease/Medical Use	First Approval Date
1	Lipitor	Atorvastatin	14,385	7%	Pfizer, Astellas Pharma	Cholesterol	Dec-1996
2	Advair, Seretide	Fluticasone + Salmeterol	6,129	12%	GlaxoSmithKline	Asthma	Aug-2000
3	Plavix, Iscover	Clopidogrel	6,057	-5%	Bristol-Myers Squibb, Sanofi-Aventis	Thrombotic events	Nov-1997
4	Nexium	Esomeprazole	5,182	12%	AstraZeneca	Gastrointestinal disorders	Mar-2000
5	Norvasc	Amlodipine	4,866	3%	Pfizer	Hypertension	Jul-1992
6	Remicade	Infliximab	4,428	23%	Johnson & Johnson, Schering-Plough, Tanabe	Rheumatoid arthritis	Aug-1998
7	Enbrel	Etanercept	4,379	20%	Amgen, Wyeth	Rheumatoid arthritis	Nov-1998
8	Zyprexa	Olanzapine	4,364	4%	Eli Lilly	Schizophrenia	Sep-1996
9	Diovan	Valsartan	4,223	15%	Novartis	Hypertension	Dec-1996
10	Risperdal	Risperidone	4,183	18%	Johnson & Johnson	Schizophrenia	Dec-1993

<http://www.drugs.com/top200.html>



NCE (NKE)

Po odobritvi NDA/MAA dobi učinkovina status

NCE = “new chemical entity” ali

NME = “new molecular entity”

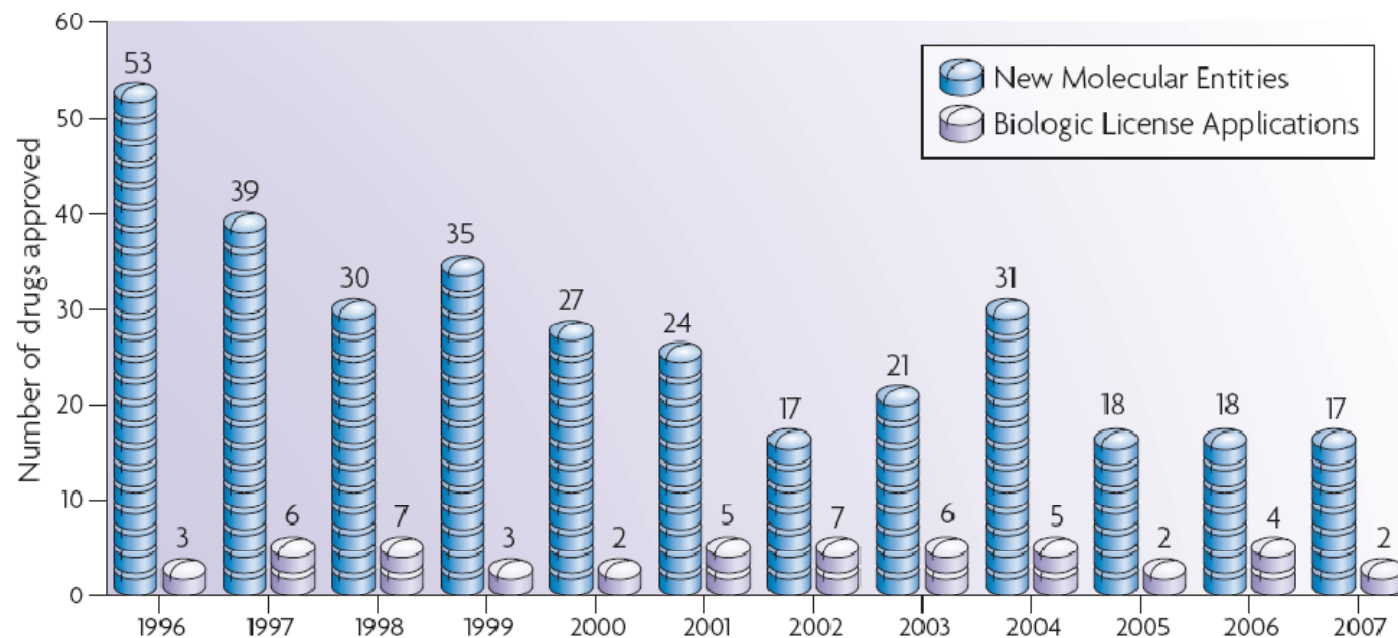


Figure 1 | **FDA drug approvals.** New molecular entities and biologic license applications approved by the US FDA by year.



Nekaj dejstev

- Več kot 90% zdravil prinašajo manj kot 180 mio\$/leto
- ~70% ne povrne stroškov R&D
- ↑Stroški marketinga – dosegajo R&D
- ↑Stroški kliničnih preizkušanj (20,000 – 30,000 subjektov v III fazi)
- ↑kompetitivnost generične industrije
- Ali se je “Big pharma” ujela v svojo igro?



Iskanje/validacija tarče

Validacija tarče:

“Drugability”

- Celična lokacija
- Razvoj rezistence/tolerance
- Stranski učinki

Selektivnost, specifičnost

- Bakterijske, virusne tarče niso prisotne v sesalskih org. – selektivna toksičnost!,
- Endogene tarče – selektivnost med podtipi receptorjev, selektivnost med izoencimi



Izbor testnega sistema

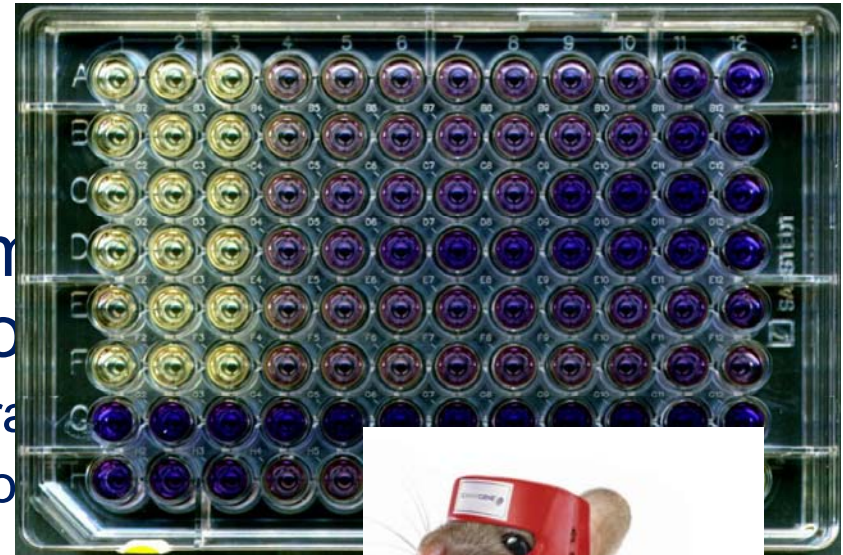
Testni sistem

In vitro: na izoliranih makromolekulah, celicah, tkivih, ali mikroorganizmih, (tkivih, celicah, tkivih, ali mikroorganizmih)

- Za rutinska testiranja, merjenje interakcij
- HTS – avtomatizirano testiranje množice vzorcev hkrati
- Primer – afiniteta do receptorja
- Ne merijo kliničnega učinka, stranskih učinkov, preciznosti

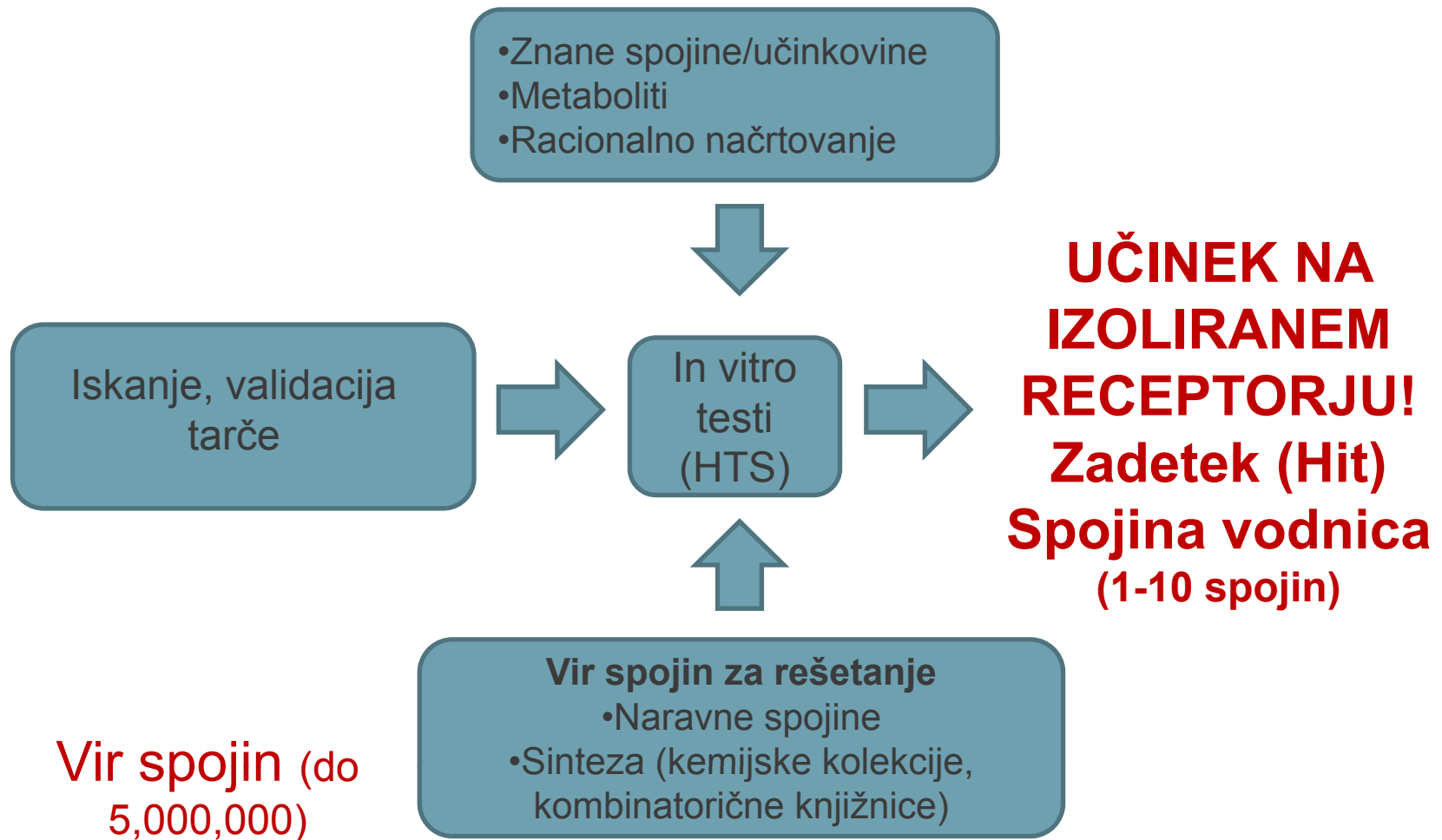
In vivo: na testnih živalih

- Fiziološki učinek, stranski učinki
- Metabolizem





Odkrivanje/izumljanje učinkovine





Spojina vodnica?

- Kaj je “zadetek”
- Kaj je spojina vodnica?
- Kako do spojine vodnice?



Spojina vodnica/učinkovina

Spojina zadetek (<i>hit</i>)	Spojina vodnica (<i>lead compound</i>)	Učinkovina – kandidat za klinična testiranja
Zmerna afiniteta do tarče (in vitro): v μM območju	Visoka afiniteta (in vitro): v nM območju	Izjemna afiniteta (in vitro): v nM območju
	Biološki učinek (in vivo)	Biološki učinek (in vivo)
	Selektivnost	Selektivnost
	Patentibilnost	Patentibilnost
	Nizka toksičnost (<i>in vitro</i>), hERG	Nizka toksičnost (<i>in vivo</i>), teratogenost, Minimalne interakcije z drugimi učinkovinami
	Jasen odnos struktura-učinek	Visoka biološka uporabnost
		Predvidljiv metabolizem
		Minimalna rezistenca/toleranca
		Kemična stabilnost
		Topnost



Iskanje spojine zadetka/vodnice

Osnovni principi

Neracionalni pristopi

- Sistematično testiranje: naravnih spojin, sinteznih spojin, znanih učinkovin
- Klinična opažanja: nove indikacije na osnovi stranskih učinkov, metaboliti znanih učinkovin
- Čisto naključje

- Terapevtske kopije (Ne)racionalni pristopi
- Rešetanje visoke zmogljivosti (HTS = *high-throughput screening*)
- Racionalno načrtovanje



Testiranje naravnih spojin

Biološka raznolikost na planetu

- 61% malih molekul (NKE), ki so bile uvedene kot učinkovine med 1981-2002 izhaja iz vodnic naravnega izvora

/NKE = nove kemične entitete/

- Odstopanja navzgor pri:

Protitumornih učinkovinah **74%**

Protibakterijskih učinkovinah **78%**

J. Nat. Prod. **2003**, 66, 1022.



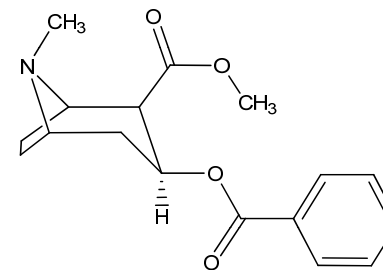
Testiranje naravnih spojin

Rastline

- Do 500,000 vrst; izjemna raznovrstnost
- Mnogo sekundarnih metabolitov: alkaloidi, terpeni, glikozidi, flavoni

Kokain (*Erythroxylon coca*)

- Ekstrakt listov koke široko uporabljan
- Izoliran 1855
- 1884 Karl Koller – uporaba v oftalmologiji
- Lokalni anestetik



kokain



Testiranje naravnih spojin

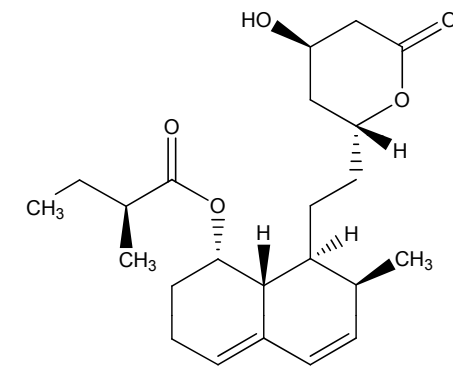
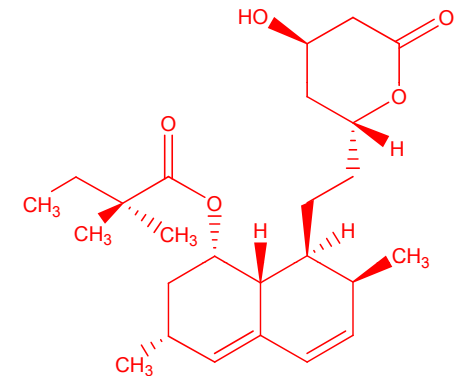
Mikroorganizmi

- Hitro razmnoževanje – velika produkcija
- Metaboliti, kompleksne biomolekule, toksini
- Morski organizmi, organizmi iz ekstremnih pogojev

Mevastatin (*Penicilium citrinum*)

- inhibitor hidrosimetilglutaril-koencim A reduktaze (HMG-CoA reduktaza)
- Akira Endo (1971); iskanje inhibitorjev HMG-CoA kot potencialnih antimikotikov
- Michael Brown, Joseph Goldstein; inhibicija endogene HMG-CoA → inhibicija biosinteze holesterola

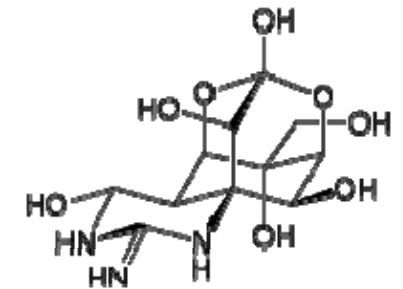
Simvastatin $IC_{50} = 23 \text{ nM}$



Mevastatin $IC_{50} = 23 \text{ nM}$



Testiranje naravnih spojin

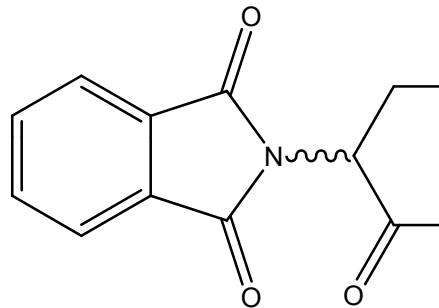


tetrodotoksin



Testiranje že znanih učinkovin

Talidomid



- Erythema nodosum leprosum – inhibitor TNF- α
- Chronova bolezen (CB) - inhibicija biosinteze TNF- α , odzivi na CB v dveh pilotnih kliničnih testiranjih
- Inhibitor angiogeneze – protitumorna učinkovina



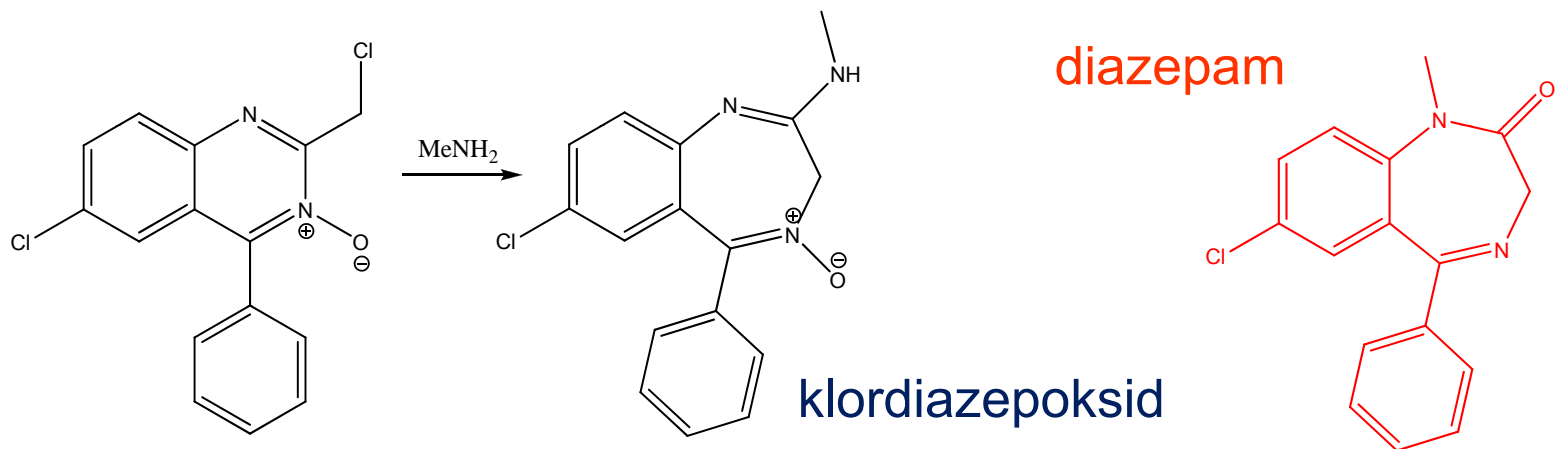
Rešetanje sinteznih spojin

Vertikalno rešetanje

- Testiranje le ene serije sorodnih spojin na številne tarče

Benzodiazepini

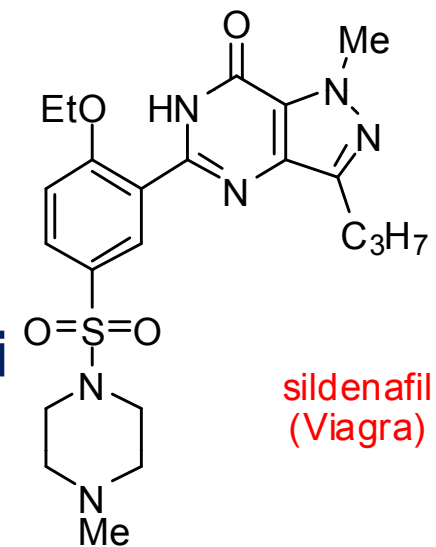
- Odkriti 1954, Leo Sternbach
- Nov tip spojin – množica testov, odkrit anksiolitični učinek





Klinična opažanja

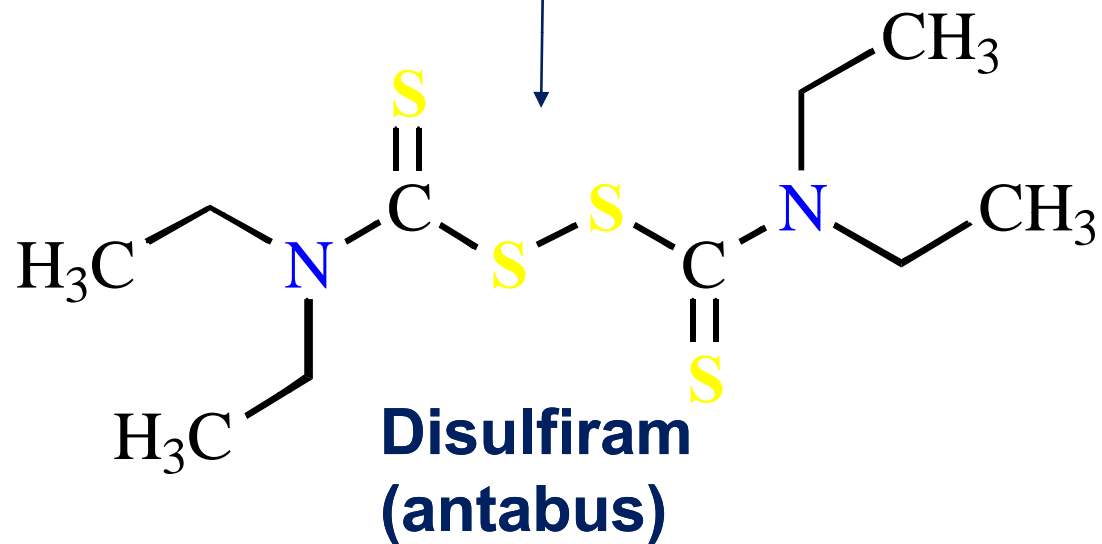
- **Sildenafil (Viagra)** je bil razvit za zdravljenje angine pectoris in hipertenzije
- Nizka aktivnost v Fazi II: učinkovino vrnili nazaj v Fazo I
- Prostovoljci poročali o **povečani erektilni funkciji**
- **Inhibicija fosfodiesteraze tipa 5**
- **Prva učinkovina v terapiji erektilne disfunkcije**





Čisto naključje

Gumarska industrija





Kopije (“me too” princip)

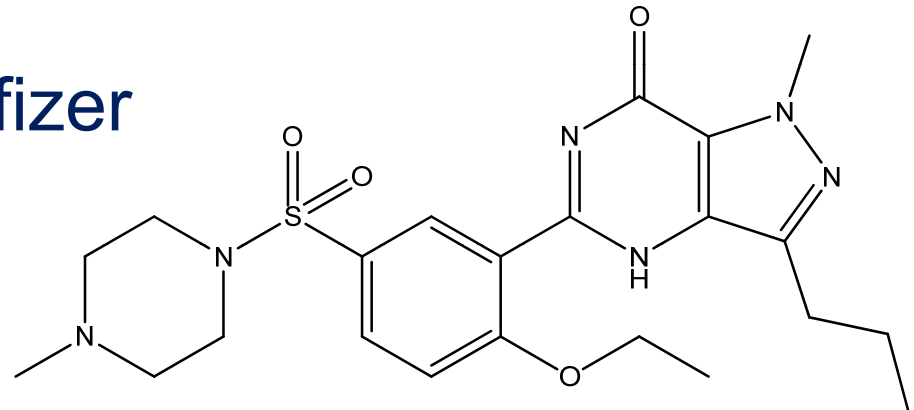




Terapevtske kopije (“me too”)

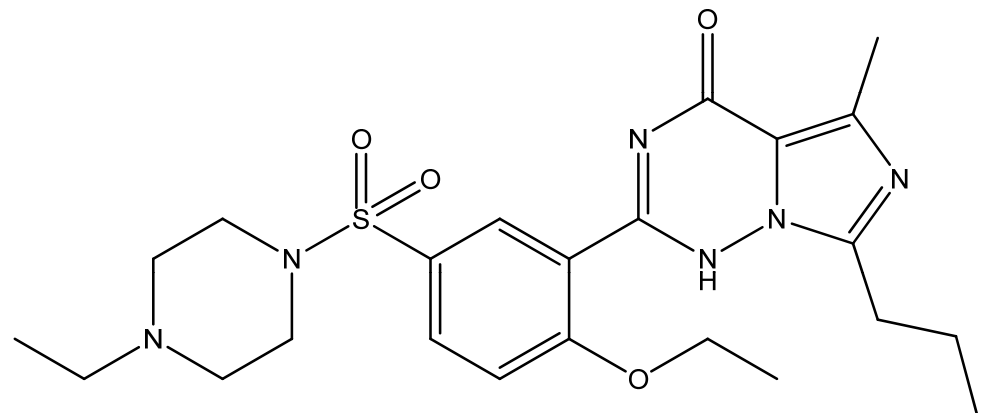
Sildenafil (Viagra®)

- prvi inhibitor PDE-5; Pfizer
- Registriran 1998



Vardenafil (Levitra®)

- Bayer, GSK
- Registriran 2003





Rešetanje visoke zmogljivosti (HTS)

- Rešetanje = *screening* = (naključno) biokemijsko, genetsko in/ ali farmakološko testiranje
- Kako povečati “output”? Testni sistem za testiranje velikega nabora raznovrstnih spojin!

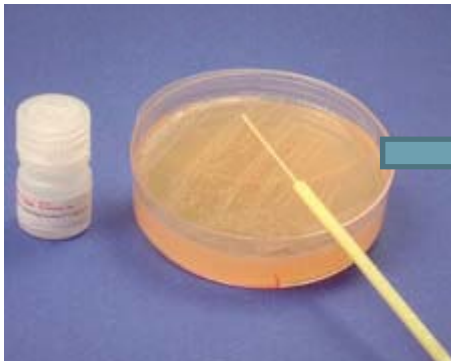


- Glavna ideja: ↑ število testiranih spojin - ↑ statistična verjetnost za zadetke
- zadostna količina proteina (tarče) za testiranje
- V začetku 90': razvoj molekularne in celične biologije – dostopnost številnih rekombinantnih proteinov – tarče za rešetanje!



Rešetanje visoke zmogljivosti (HTS)

- HTS= High-throughput screening (rešetanje visoke zmogljivosti) – robotizirano naključno rešetanje ogromnega števila spojin na *in vitro* testih





Rešetanje visoke zmogljivosti (HTS)

Glavne lastnosti HTS

- avtomatizirano testiranje
- mikrogramske ali sub-mikrogramske količine preiskovanih spojin
- **testiranje nekaj milijonov spojin/teden**
- prednosti – veliko število “zadetkov”
- slabosti – ↓raznolikost spojin
- VIR SPOJIN!?!



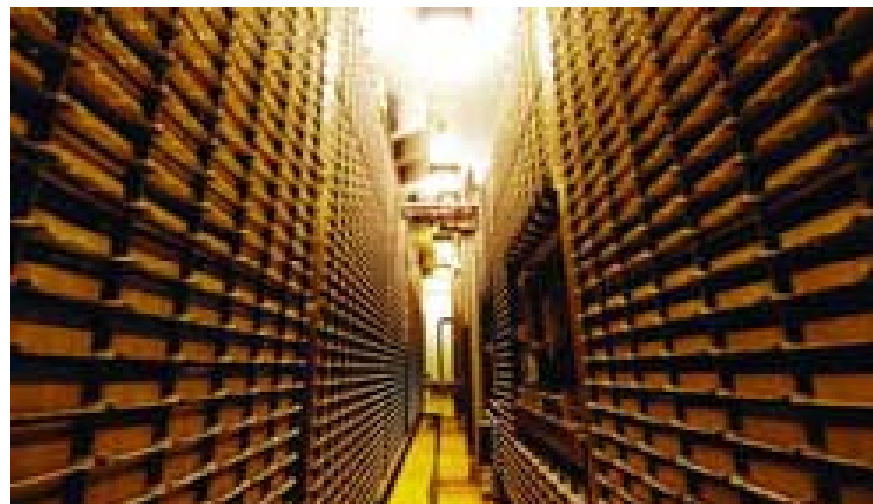
Kemijske knjižnice - definicija

Kemijska knjižnica - zbirka najmanj 2 do nekaj 100.000 različnih spojin, ki jo naredimo s ciljem ugotoviti, katera spojina ima željene lastnosti

Vir kemijskih knjižnic:

- s klasično sintezo (neekonomično)
- s kombinatorično sintezo

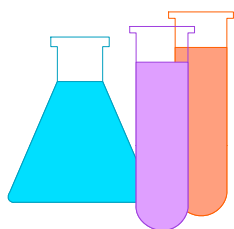
Kombinatorična kemijska
kombinatorično kemijo





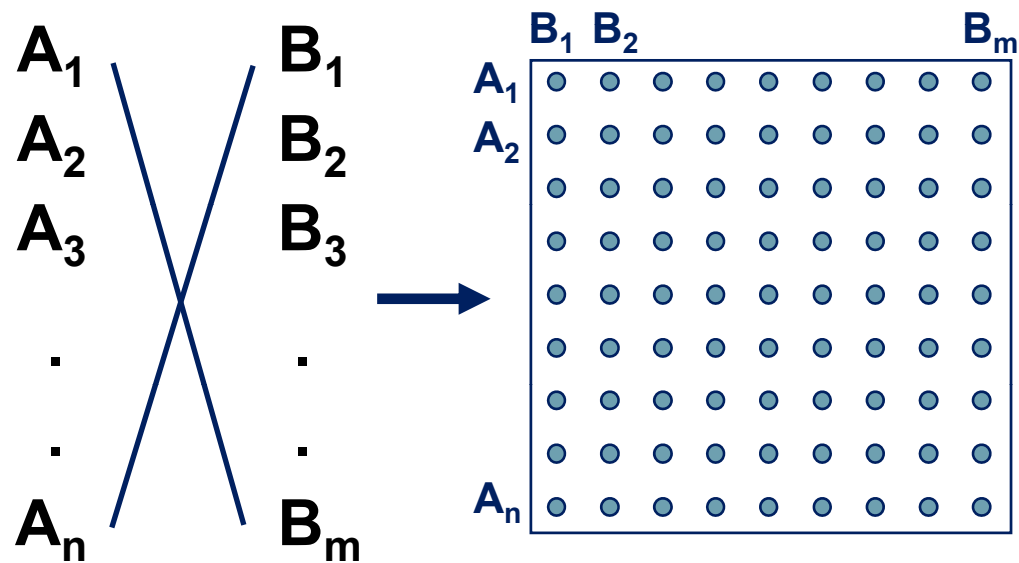
Kombinatorična kemija

- Tradicionalna sinteza



1 kemik =
50 spojin/leto

- **Kombinatorična sinteza**

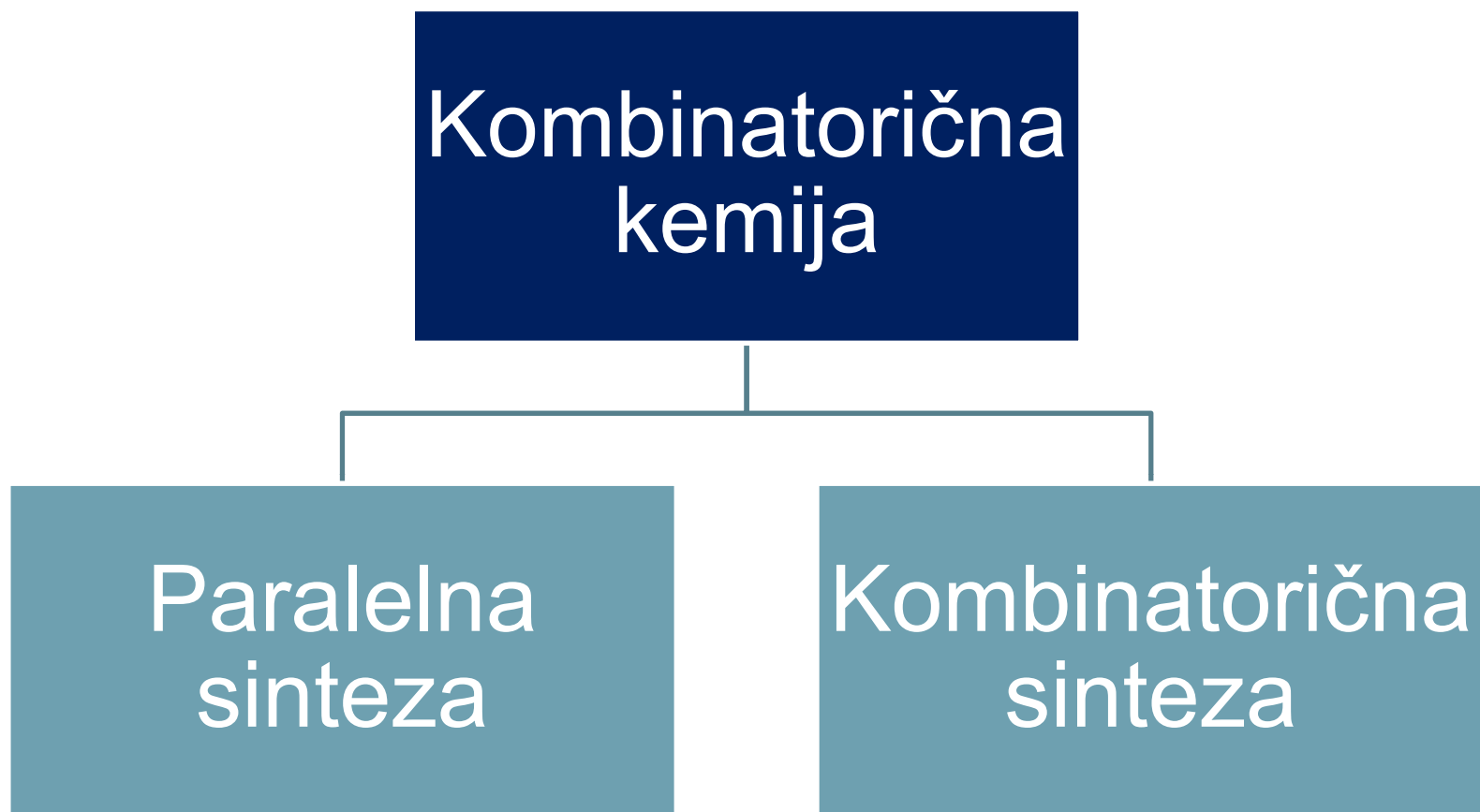


AB produkti

10^2 - 10^4 spojin/eksperiment



Delitev kombinatorične kemije

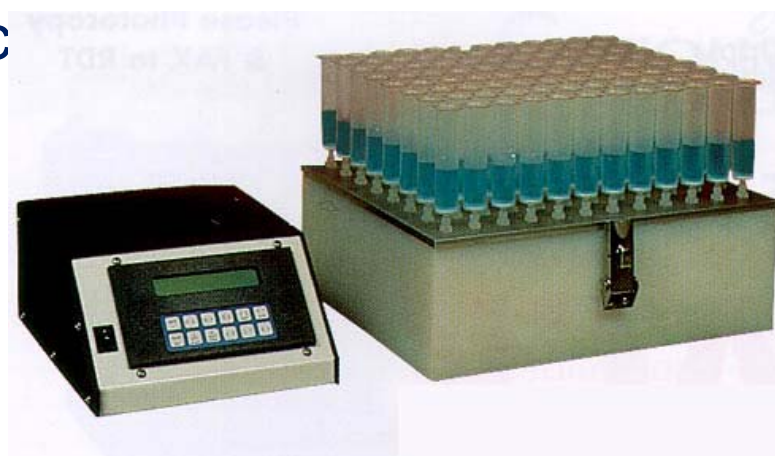




Kombinatorična kemija

Paralelna sinteza

- Avtomatizirana sinteza, na osnovi ene reakcijske sheme in različnih reagentov
- V vsaki reakcijski zmesi nastaja **EN PRODUKT**
- Sinteza v raztopinah, sinteza na trdnih nosilcih
- Sinteza manjših, usmerjenih kem. knjižnic
- Uporabnost: optimizacija vodnic

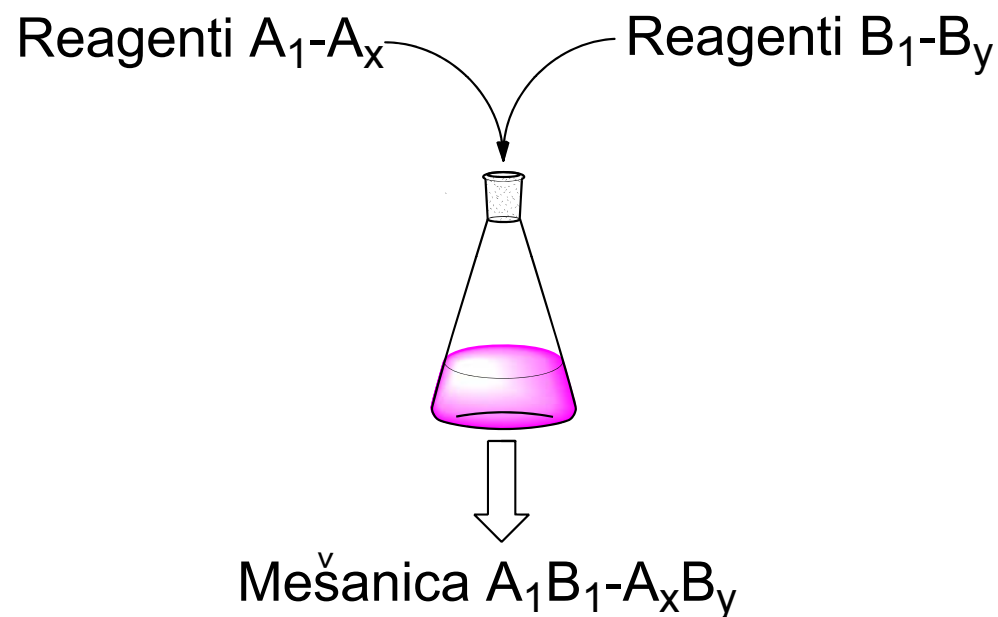




Kombinatorična kemija

Kombinatorična sinteza

- Osnovna ideja: posnemati naravo v številu in raznovrsnosti spojin!
- V vsaki reakcijski zmesi nastaja zmes produktov: **SINTEZA MEŠANIC!**
- Majhne količine
- Večinoma na trdnih nosilcih
- Uporabnost: odkrivanje spojine vodnice





Kombinatorična kemija – metoda “mix & split”

Primer – sinteza vseh tripeptidov iz 3 različnih aminokislin

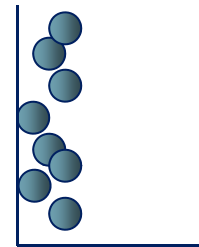
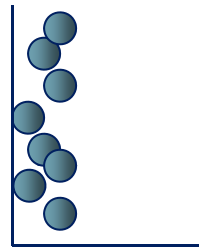
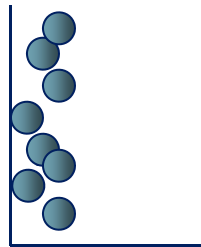
Metoda s klasično kemijo - 27 različnih eksperimentov

Metoda “mix and split” – 3 eksperimenti



Metoda "mix and split"

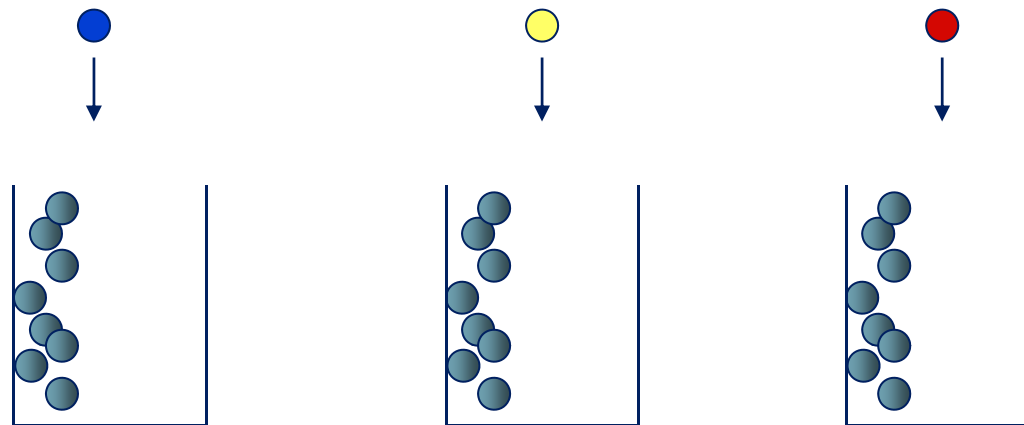
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

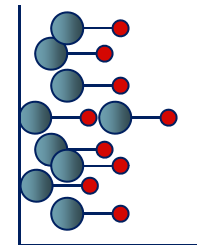
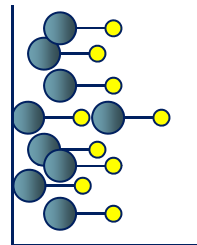
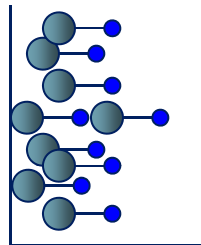
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

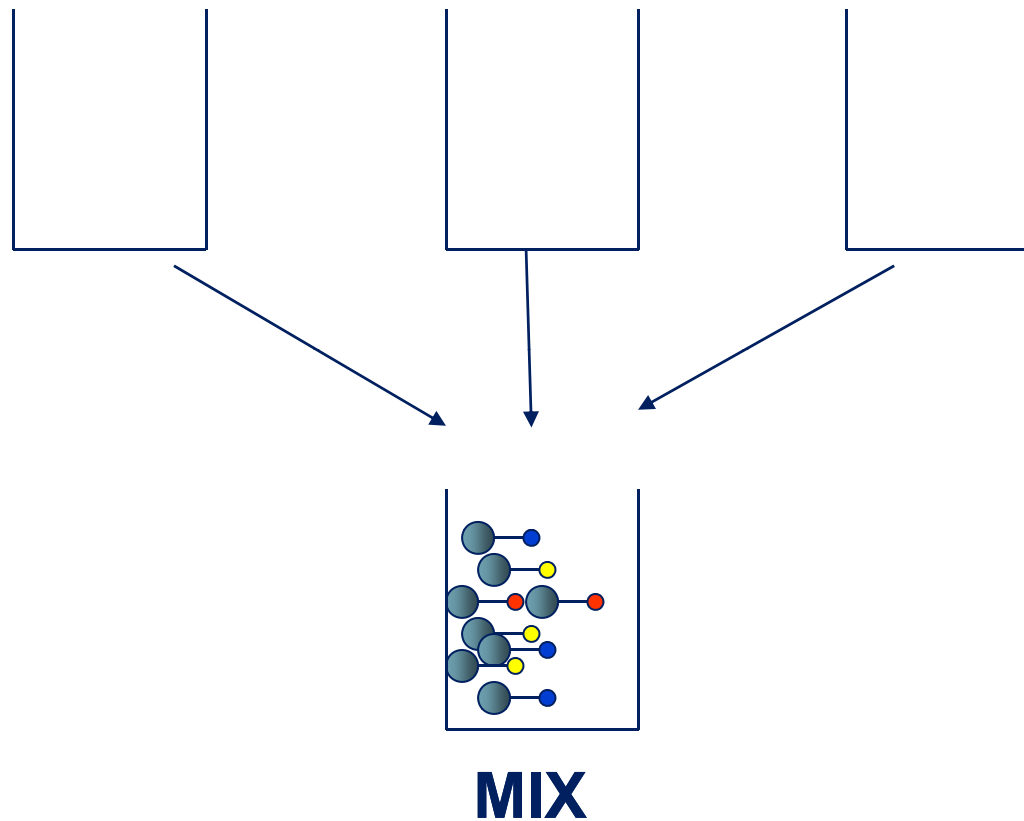
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda “mix and split”

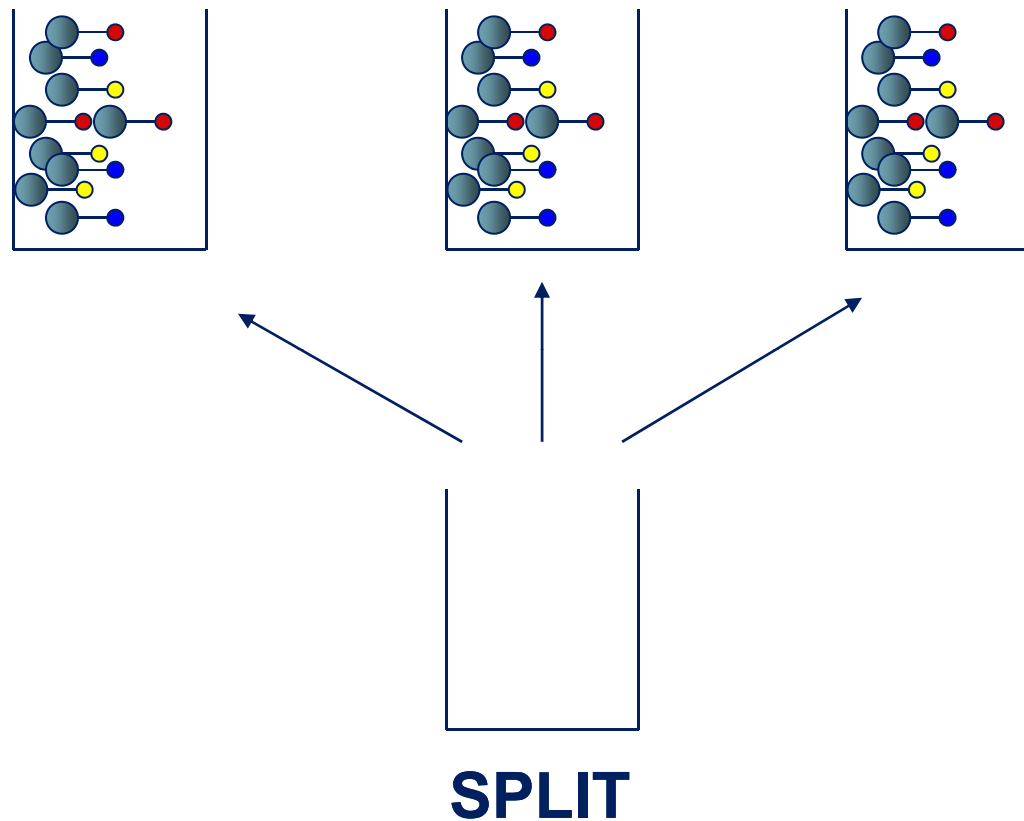
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

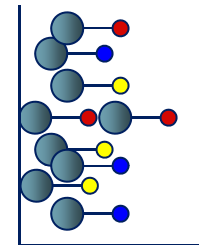
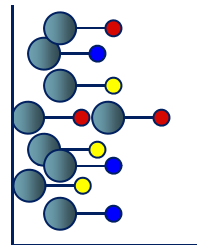
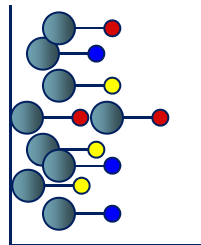
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

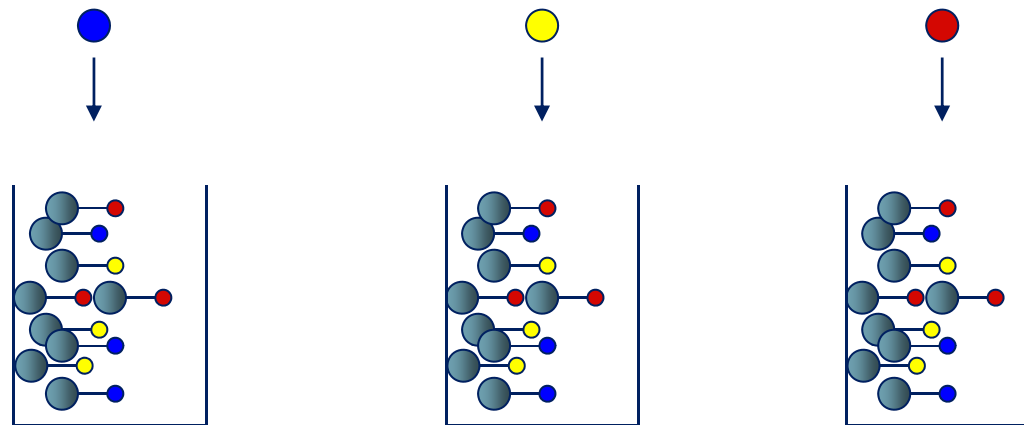
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

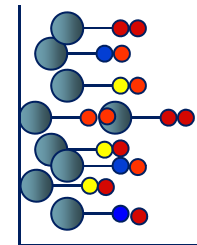
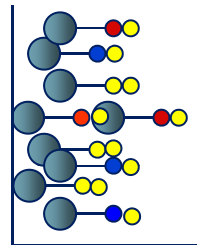
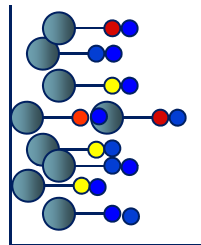
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

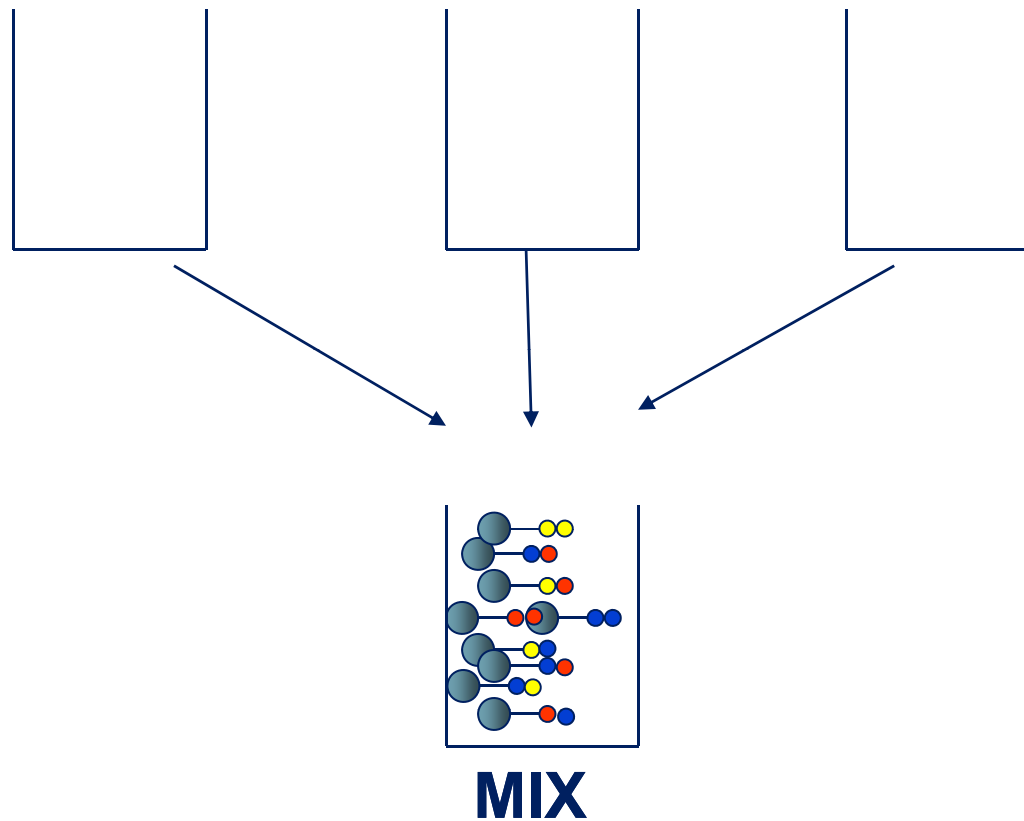
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

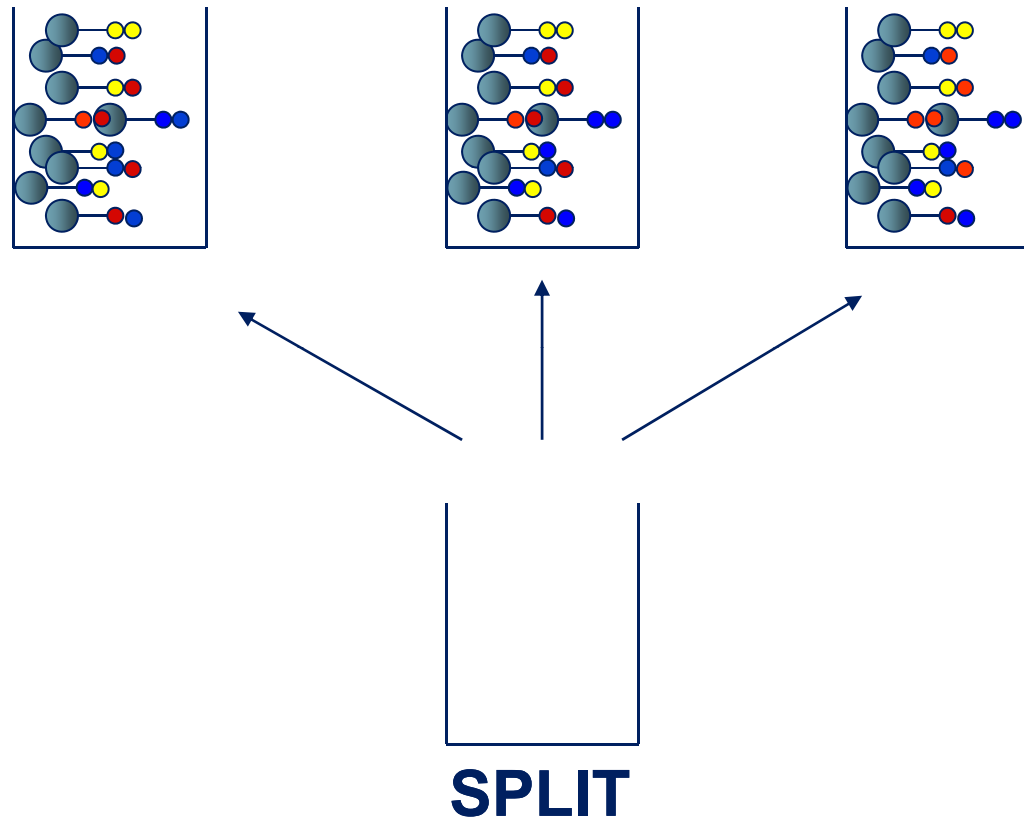
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

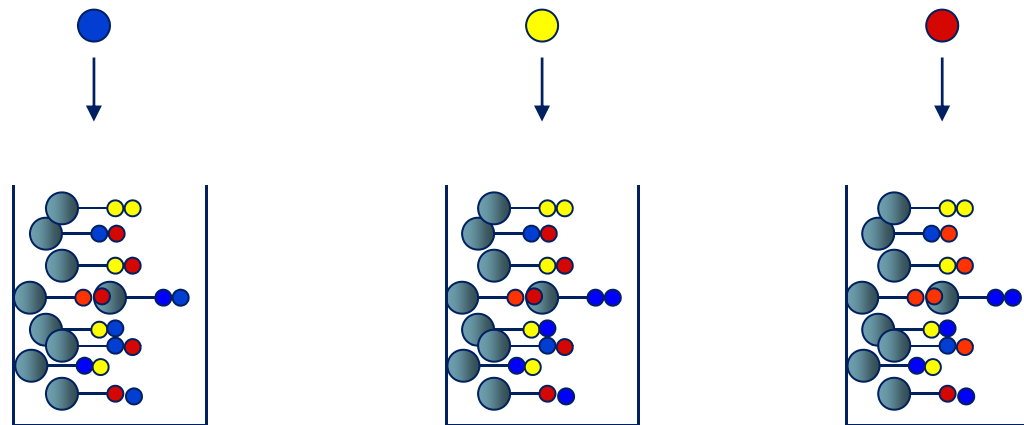
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

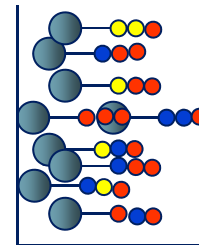
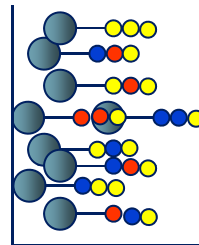
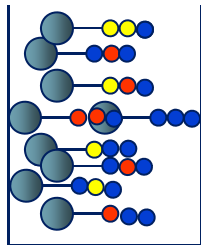
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

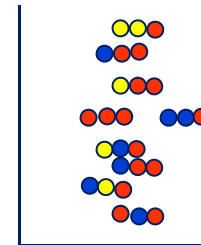
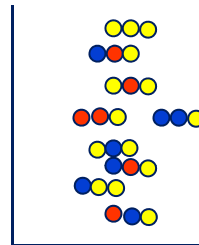
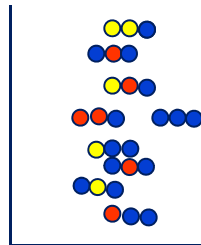
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin





Metoda "mix and split"

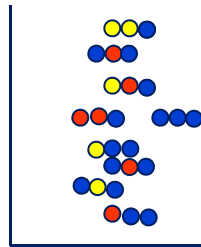
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin



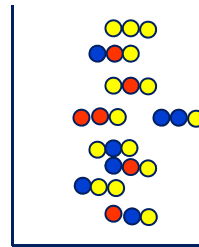


Metoda "mix and split"

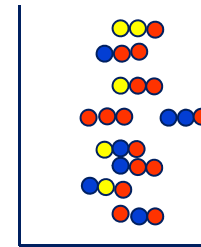
Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin



9



9



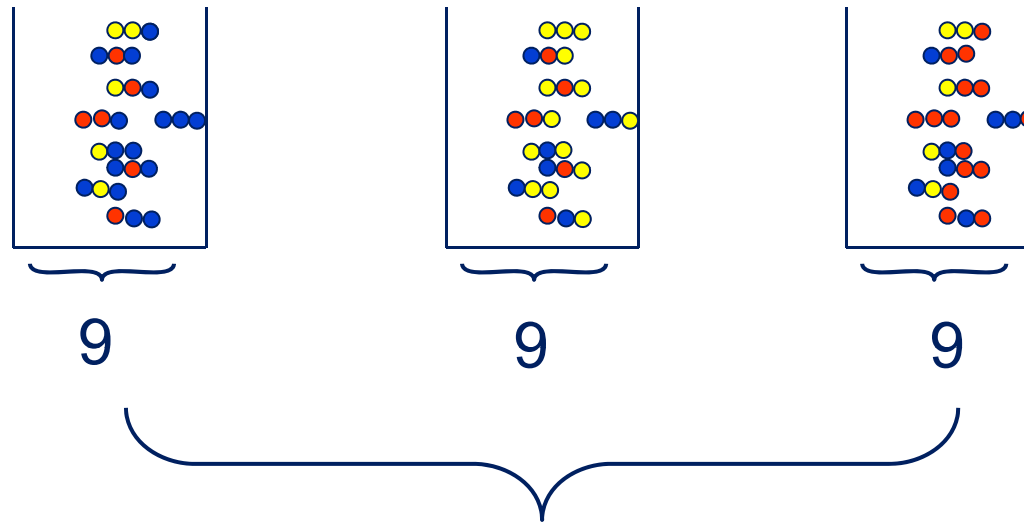
9

Št. vseh
tripeptidov



Metoda "mix and split"

Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin



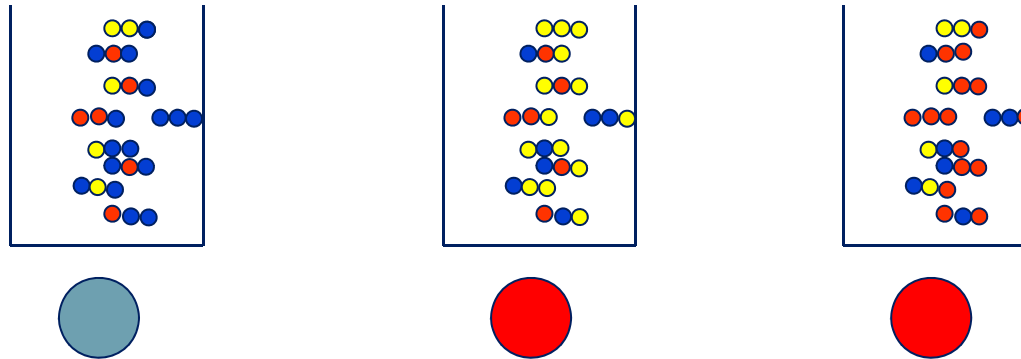
27 tripeptidov
3 viale

Št. vseh
tripeptidov



Metoda "mix and split"

Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin

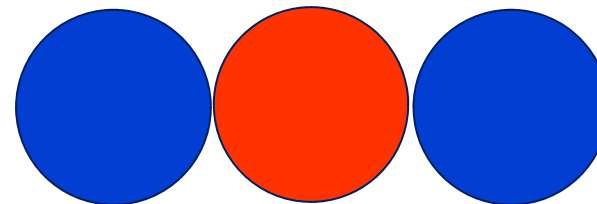
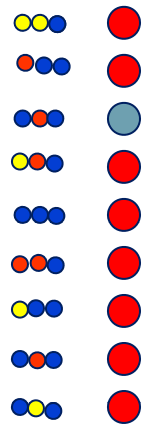
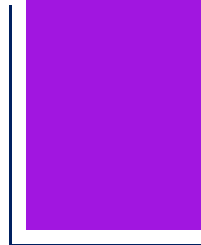


In vitro test afinitete/učinka



Metoda "mix and split"

Sinteza vseh tripeptidov iz 3 aminokislin



Sinteza vsakega tripeptida in ponovno
In vitro test



Kombinatorična kemija – metoda “mix & split”

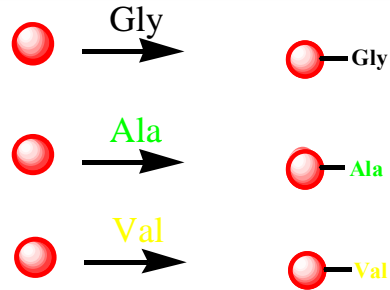
- Kako izolirati aktivno spojino pri \uparrow številu spojin?

Rekurzivna dekonvolucija

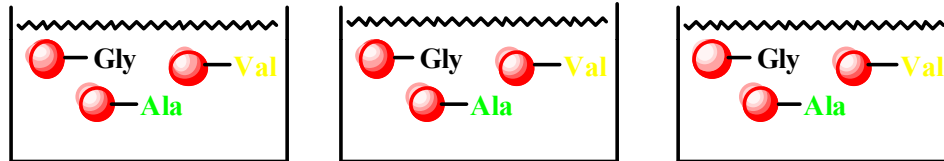
- Metoda identifikacije aktivne spojine iz mešanice
- Moramo ohraniti vzorce pred vsako stopnjo “mix and split”

Primer

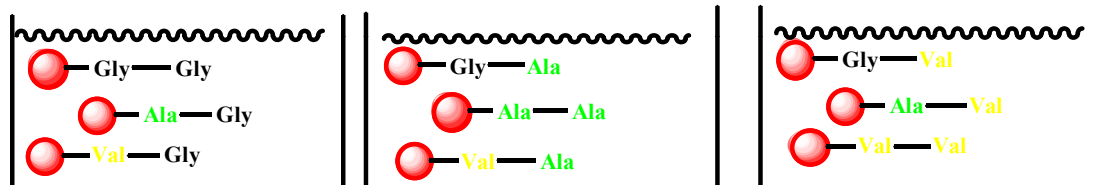
- 27 tripeptidov sintetiziranih z “mix and split” strategijo iz glicina, alanina in valina



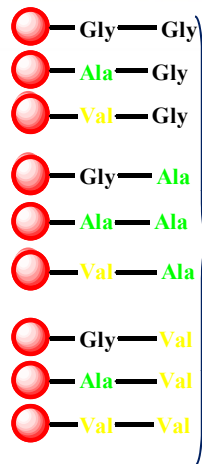
Mix and Split



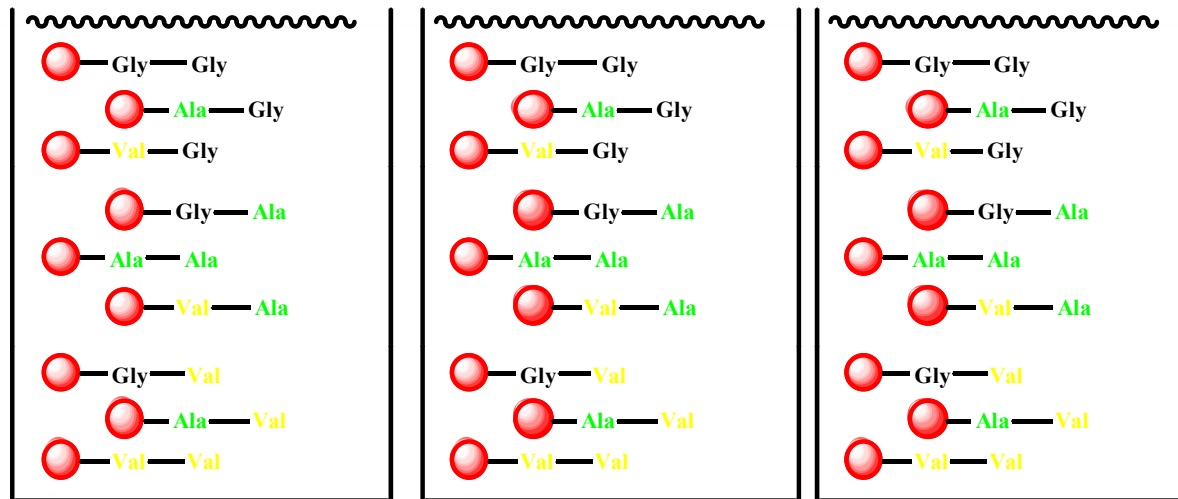
↓ Gly ↓ Ala ↓ Val



**Vsi možni dipeptidi v treh vialah
Ohranimo vzorec iz vsake viale**



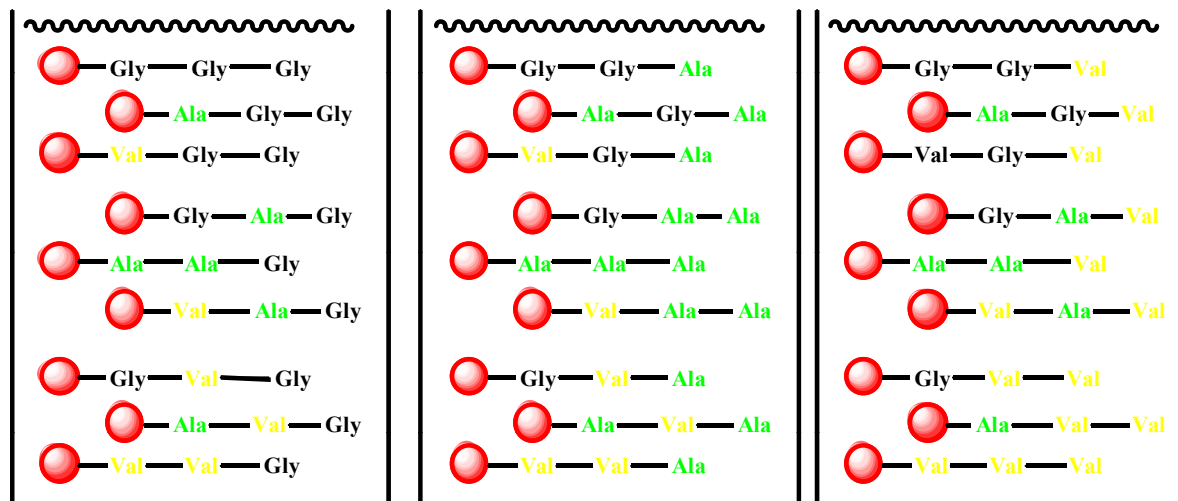
Mix and Split



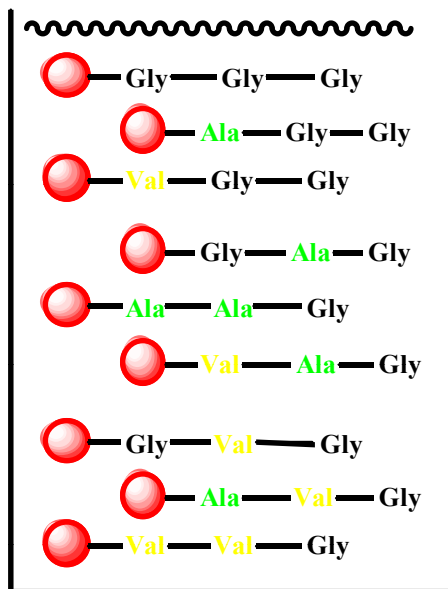
↓ Gly

↓ Ala

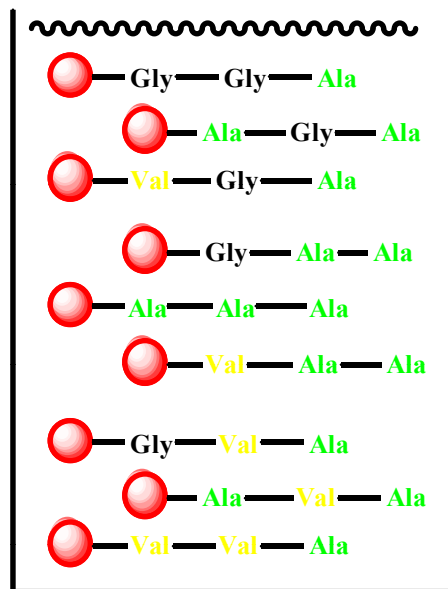
↓ Val



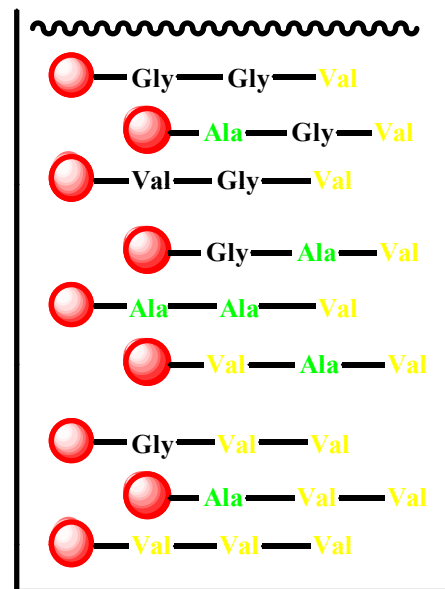
Vsi možni tripeptidi v treh vialah



**Neaktivna
mešanica**

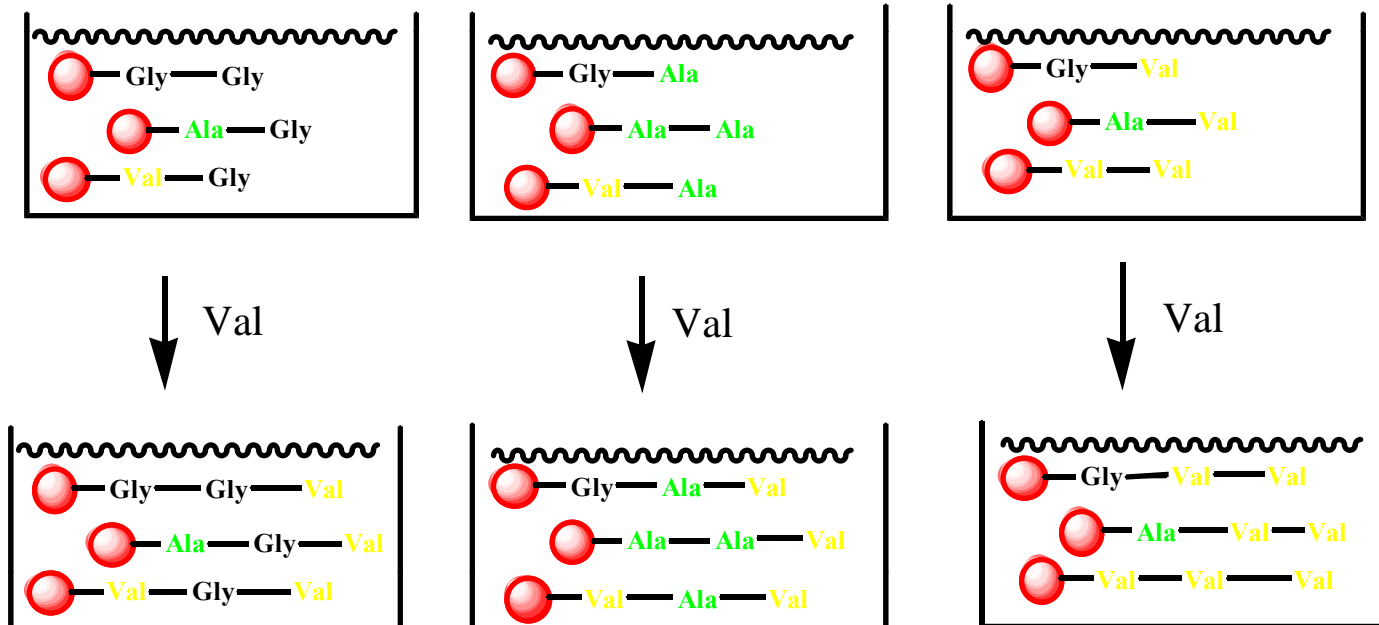


**Neaktivna
mešanica**



**Aktivna
mešanica**

- **9** možnih tripeptidov v aktivni mešanici
- **Vsi** imajo zadnjo AK valin
- **Dodamo** valin trem mešanicam dipeptidov



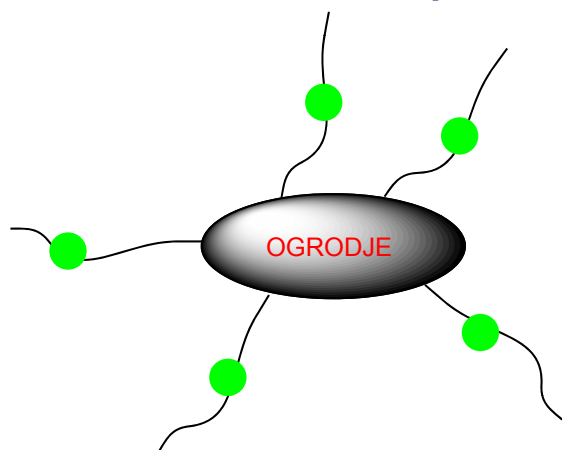
Aktivna mešanica

- Aktivno spojino smo identificirali v mešanici z alaninom na drugem mestu
- Sintetiziramo vsak tripeptid X-Ala-Val in testiramo
- Celokupno 6 sintez namesto 9

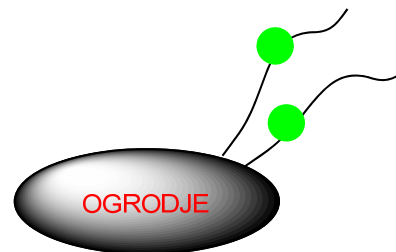


Načrtovanje kombinatorične knjižnice

- Pravilna izbira ogrodja za sintezo
- Lastnosti primernih ogrodij?
- Sintezna dostopnost na trdnih nosilcih



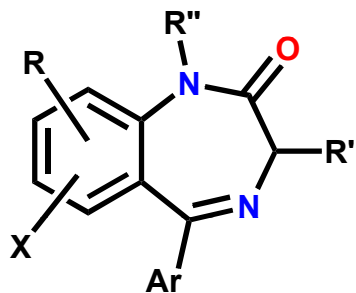
“pajku podobna”,
dispergirane funkc. skupine



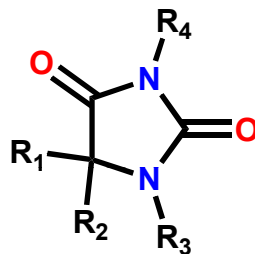
“paglavcu podobna”,
združene funkc. skupine



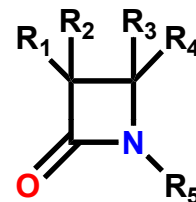
Načrtovanje kombinatorične knjižnice



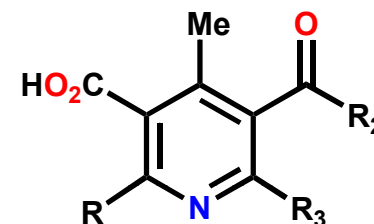
Benzodiazepini



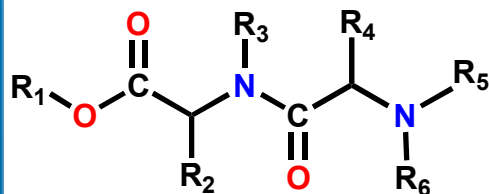
Hidantoini



β -Laktami



Piridini



Dipeptidi

- Primerna ogrodja
- Pajku podobna
- Nizka mol. masa
- Več sinteznih poti



Kombinatorična kemija: ZAKAJ?

Primerjava stroškov (1996) v \$

	Tradicionalna kemija	Kombinatorična kemija
Št. spojin na enega sintetika na mesec	4	3,300
Celotna cena	30,000 USD	40,000 USD
Cena za spojino	7,500 USD	12 USD



Rešetanje visoke zmogljivosti (HTS)

PROGRESS

GlaxoSmithKline's high-throughput-screening scorecard

	1996	1999	2003	2004
Compounds screened	100,000	430,000	615,000	1,050,000
Average lead potency	3,000 nM	400 nM	10 nM	10 nM
Screen success	20%	50%	58%	65%
Leads per target	1.0	1.7	1.9	2.0

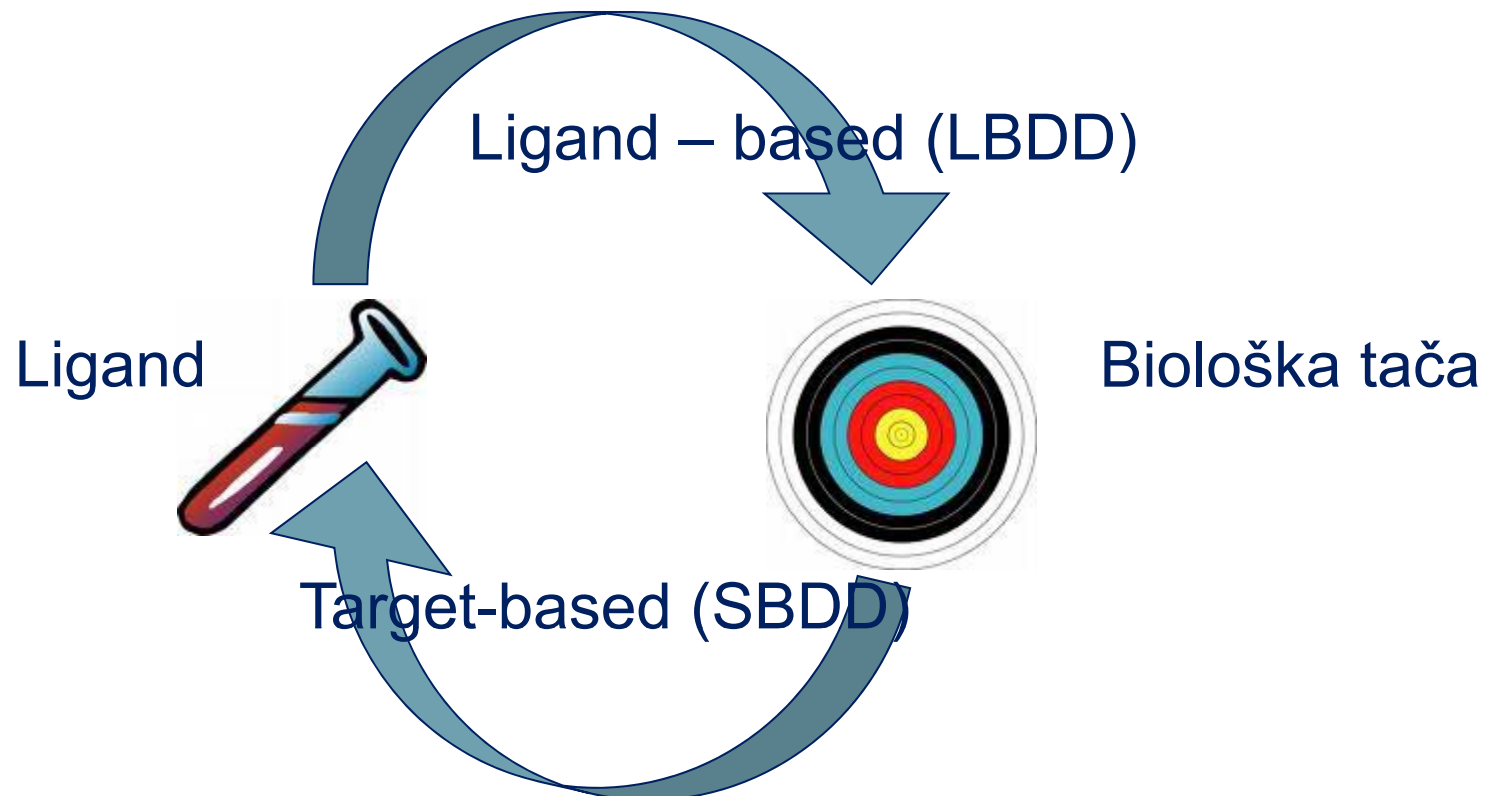
SOURCE: GlaxoSmithKline



Racionalno načrtovanje

Metode temeljijo na

- Na osnovi strukture (endogenega) liganda (LBDD)
- Na osnovi 3D strukture tarče (SBDD)





Racionalno načrtovanje

Smisel – predhodni filter spojin v virtualnem svetu

Priprava knjižnice virtualnih spojin
3D-konformacije, stereokemija,
protonacija, tautomerija

Virtualno rešetanje

Izbor spojin za biološko testiranje



Na osnovi liganda - LBDD

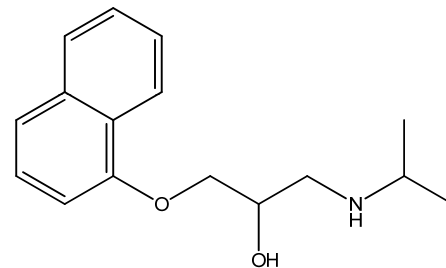
Na osnovi farmakofora

- **3D Farmakofor** je zbirka steričnih in elektronskih lastnosti, ki so potrebne za zagotovitev optimalnih medmolekulskih interakcij s specifično biološko tarčo in vodijo do indukcije ali inhibicije biološkega odziva

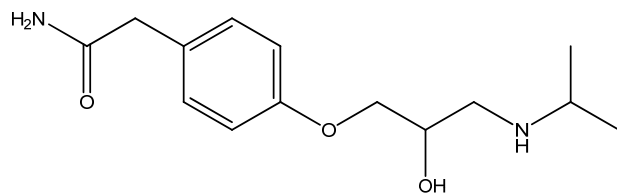


Na osnovi liganda - LBDD

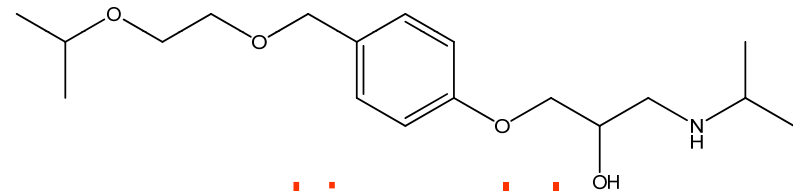
- Primer 2D farmakofora
- Antagonisti β_1 receptorjev



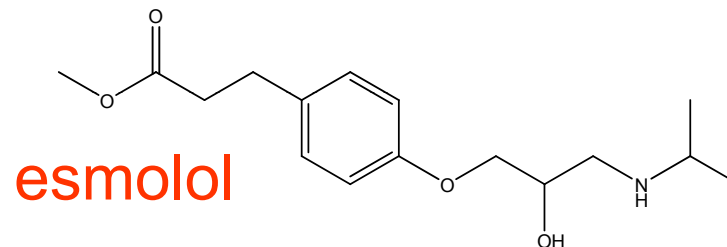
propranolol



atenolol

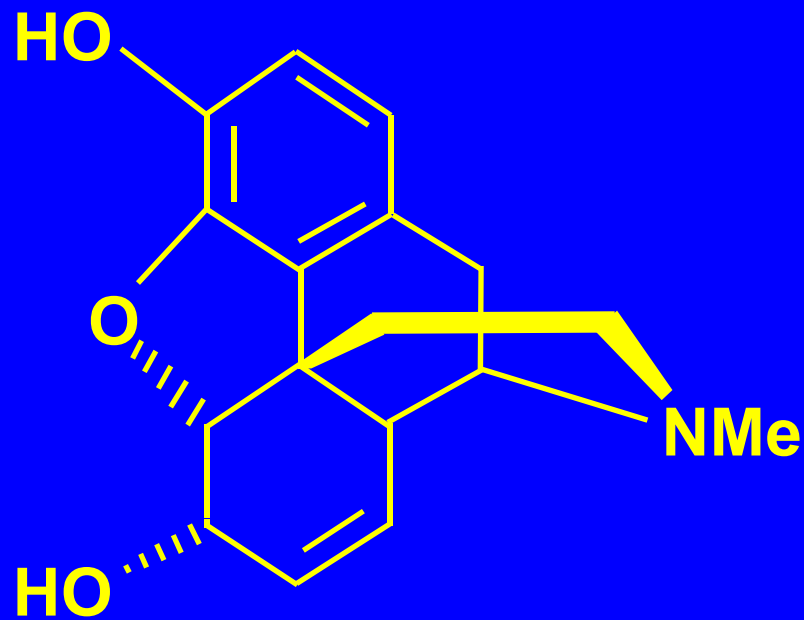


bisoprolol



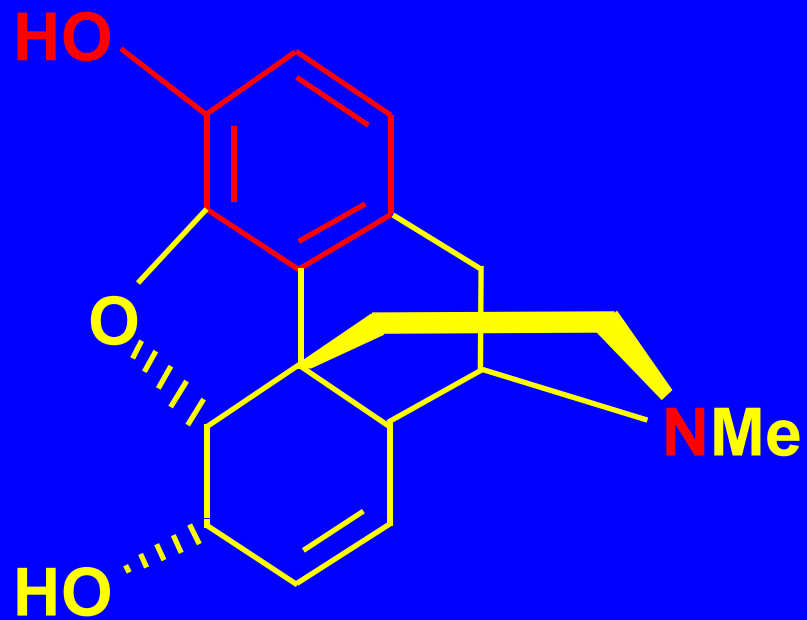
esmolol

Skupine pomembne za analgetični učinek



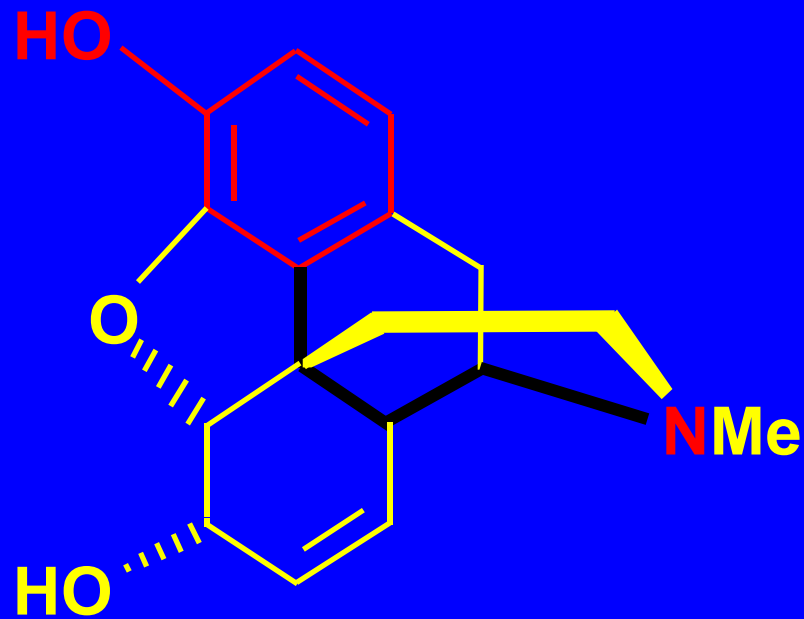
MORFIN

Skupine pomembne za analgetični učinek



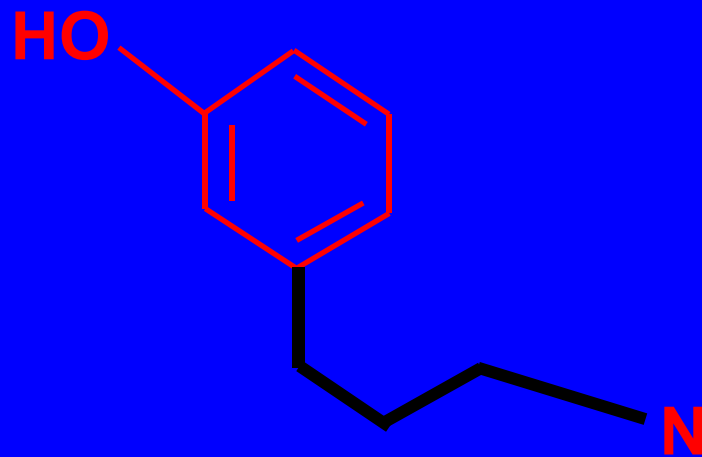
MORFIN

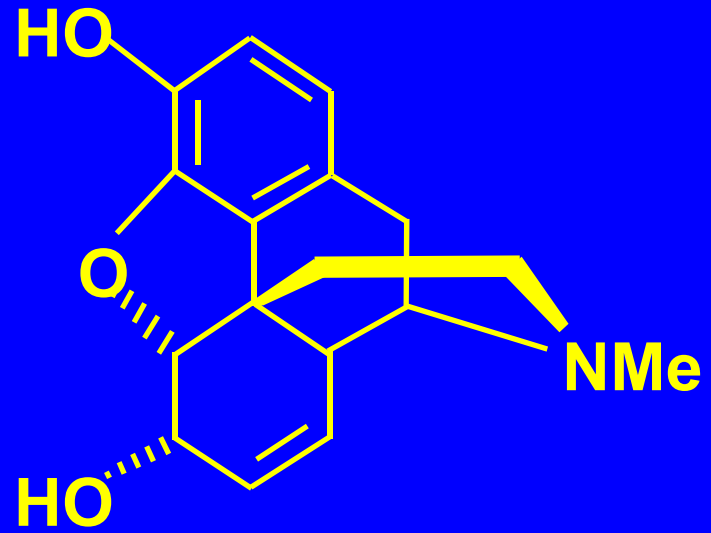
Skupine pomembne za analgetični učinek



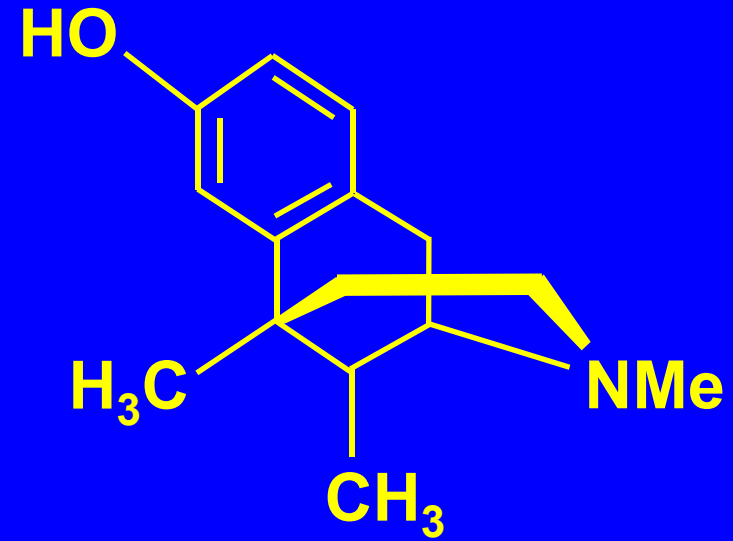
MORFIN

Skupine pomembne za analgetični učinek

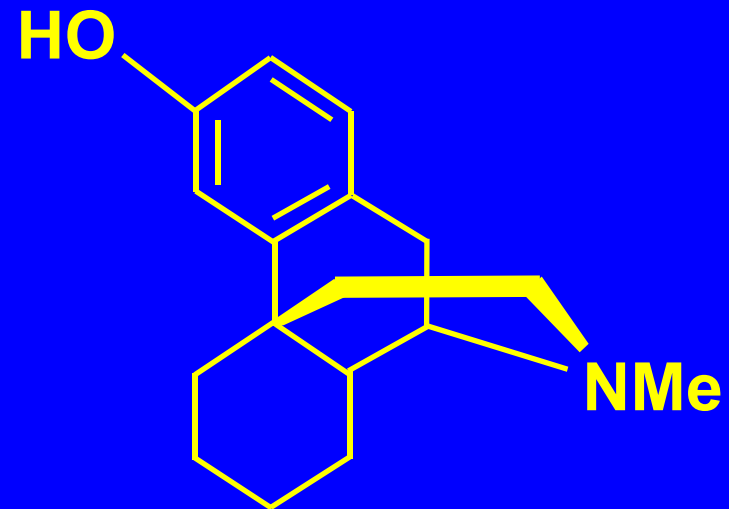




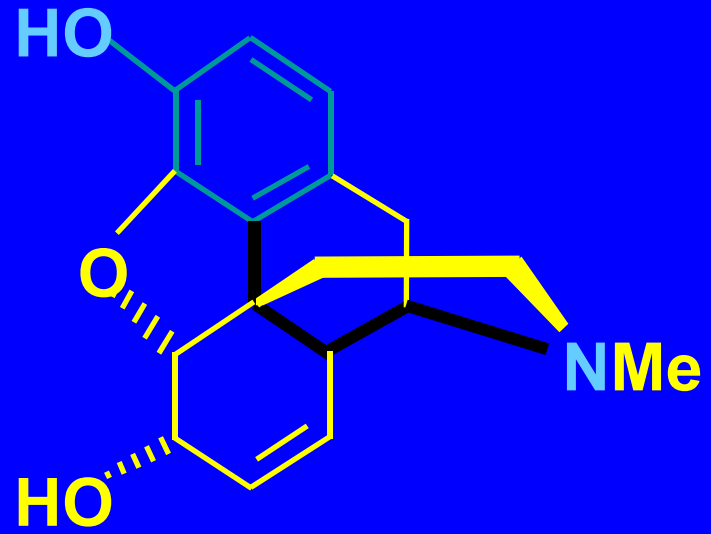
MORFIN



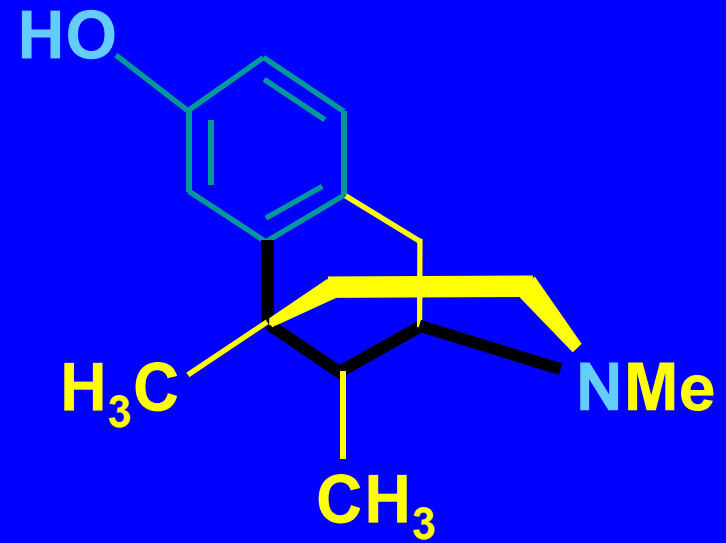
METAZOCIN



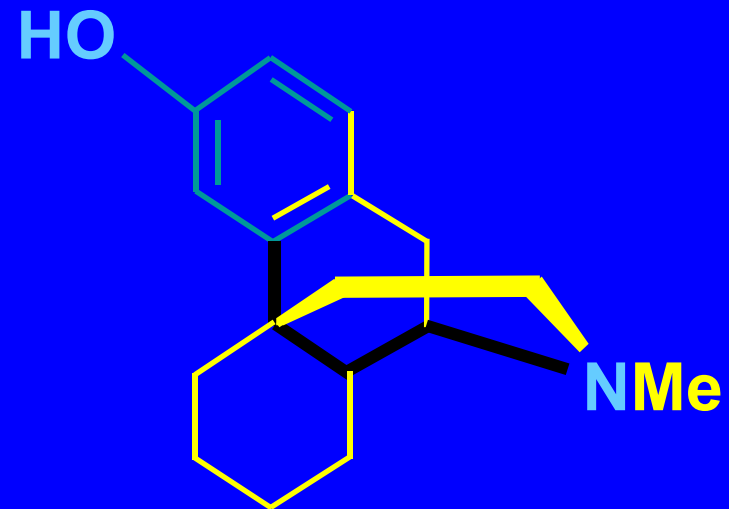
LEVORFANOL



MORFIN

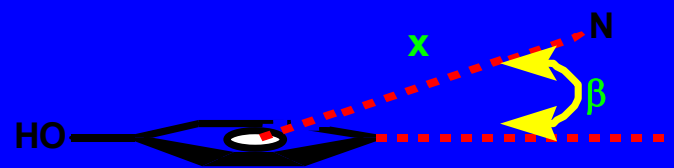
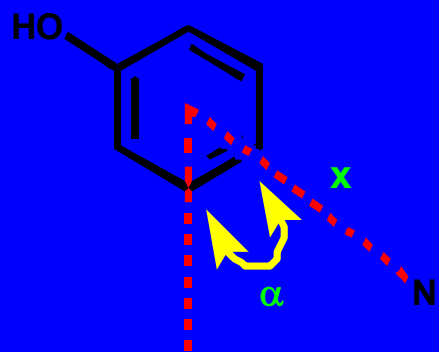


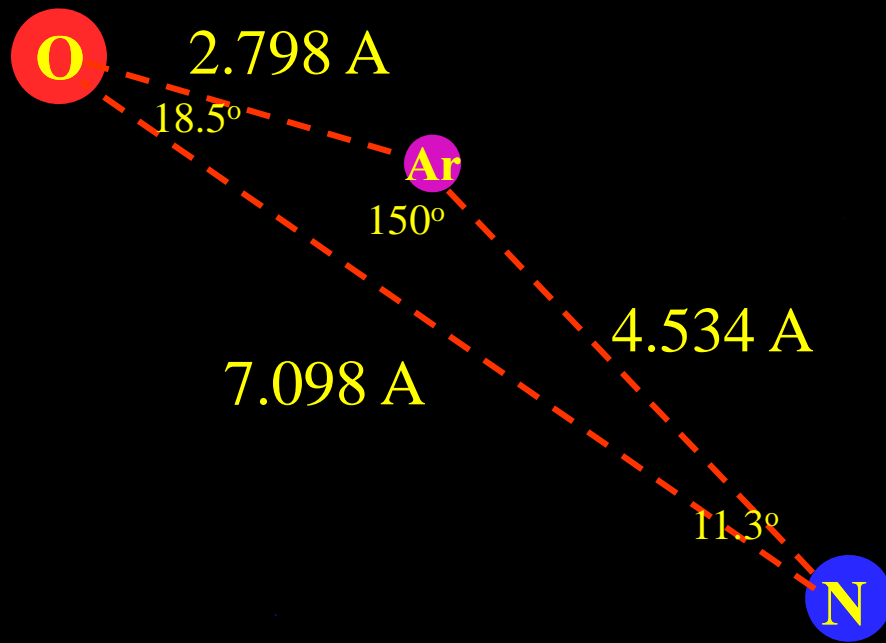
METAZOCIN



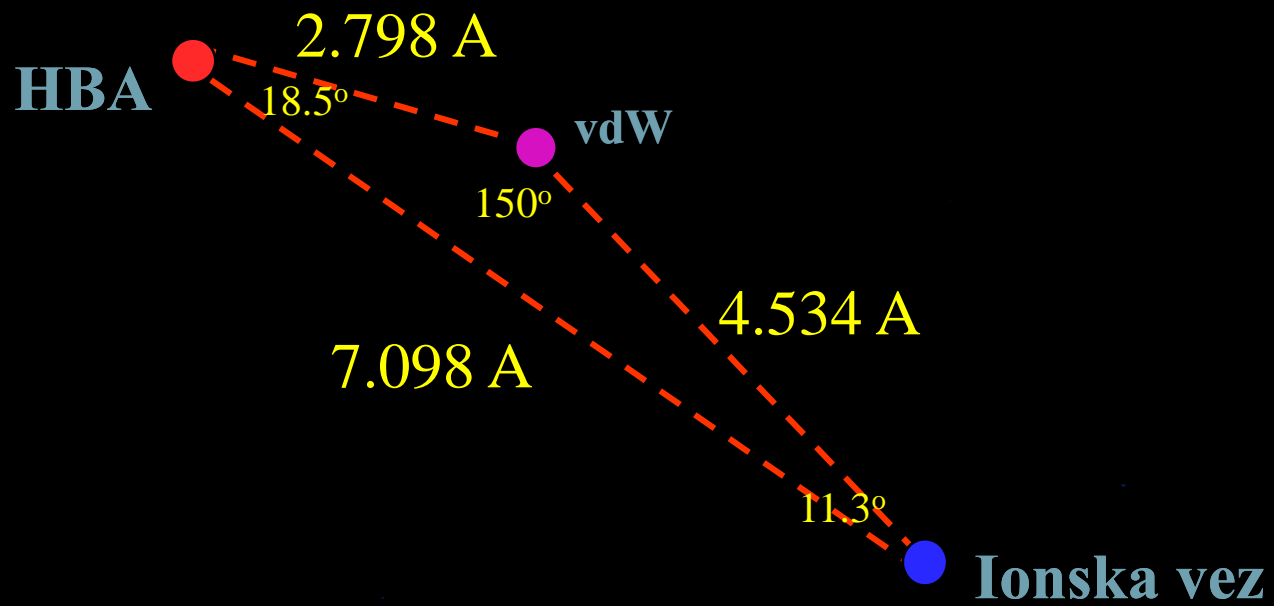
LEVOFANOL

3D farmakofor opioidnih analgetikov





Farmakofor po tipu vezi



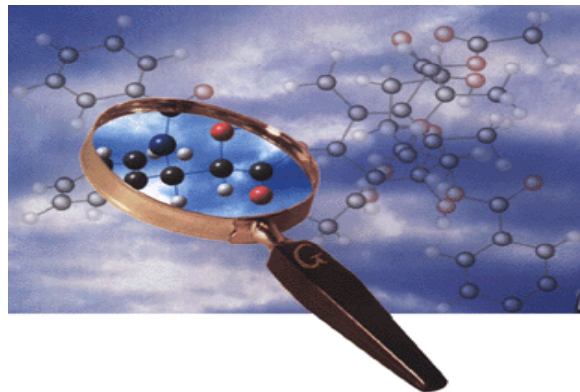


Na osnovi 3D strukture tarče - SBDD

- Potrebujemo 3D strukturo tarče/vezavnega mesta
- rentgenska kristalografija, NMR

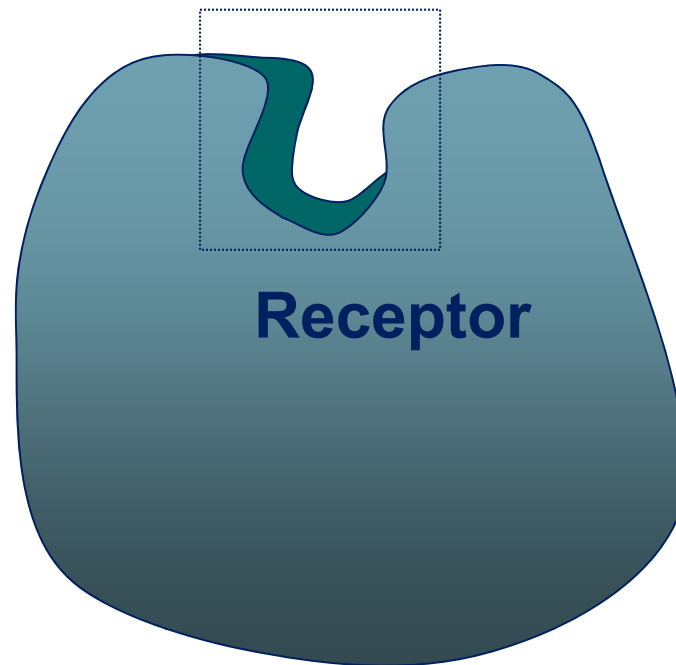
PROTEIN DATA BANK:

<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>



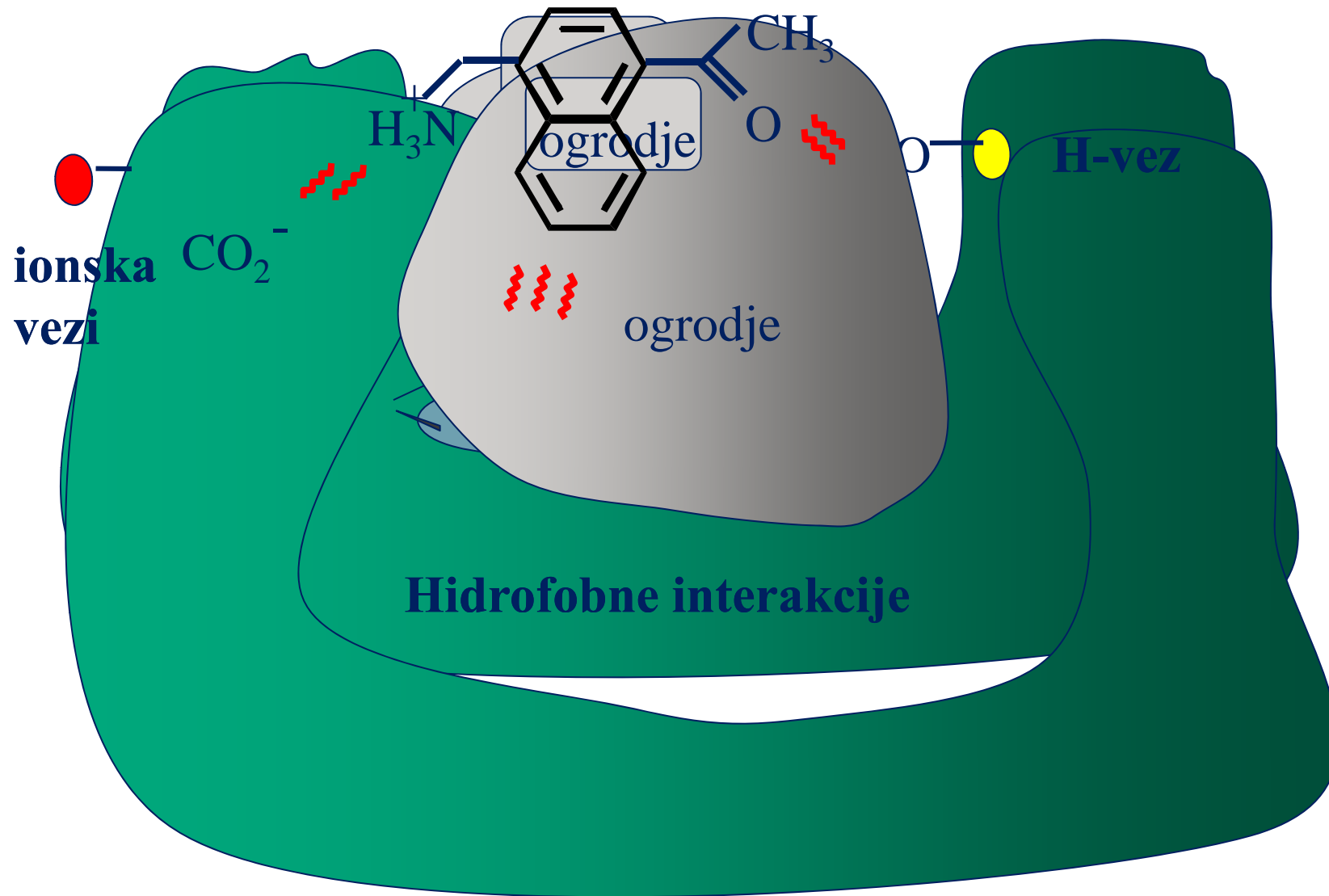


SBDD – *De novo*





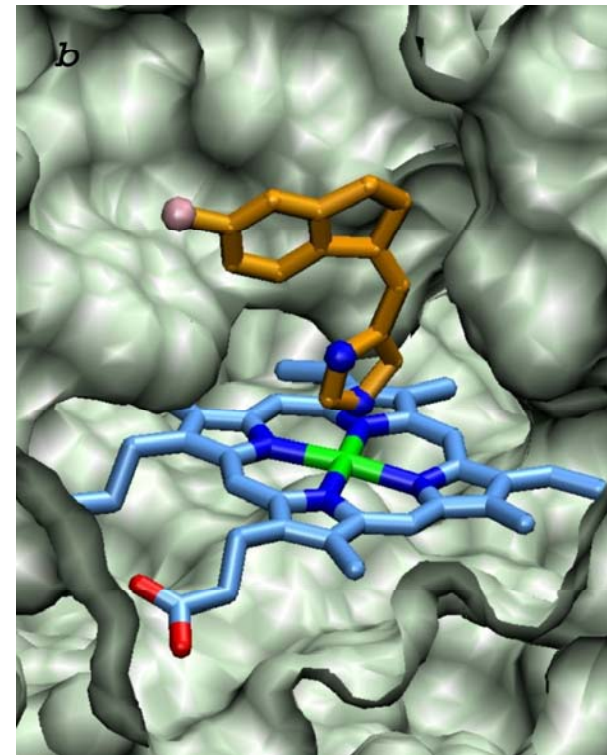
SBDD – *De novo*





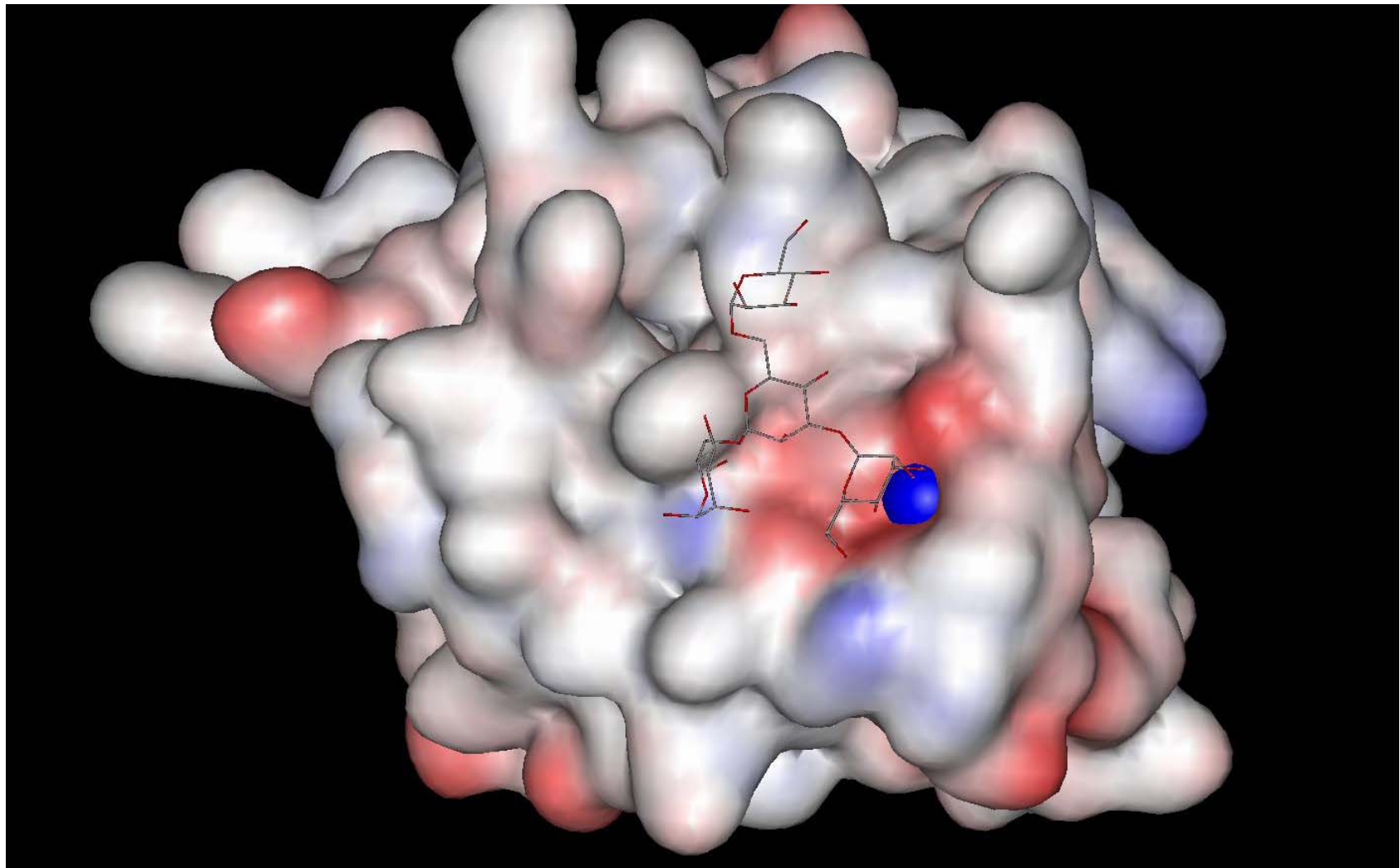
SBDD – sidranje

- Načrtovanje podprto z računalniki
- Uporabljamo 3D strukturo makromolekule – tarče
- “Docking” ali sidranje – 3D prileganje virtualne učinkovine virtualni makromolekuli
- Ocenimo jakost interakcije spojina – makromolekula
- REZULTAT – virtualna molekula, ki tvori najmočnejšo interakcijo (*in silico*)





SBDD – sidranje





Odkrivanje/izumljanje učinkovine

**Spojina
vodnica
(1-10 spojin)**



**Optimizacija
vodnice**



Predklinična testiranja



**Kandidati
za klinična
testiranja
(5 spojin)**



Odkrivanje/izumljanje učinkovine

- Časovno in denarno izjemno potraten proces, povrh tega največkrat ni rezultatov!
- Dolgotrajen proces, povdarek na varnosti
- Vloga Farmaceutske kemije – pripraviti varno in učinkovito zdravilno učinkovino!



Literatura predavanj

Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. Ed. :

- Overview
- 1. Natural products
- 2. Drug Design and....

G. L. Patrick: An introduction to medicinal chemistry, 4. Ed. :

- 12. poglavje
- 15. poglavje
- 16. poglavje

G.Thomas: Medicinal Chemistry

- Poglavje 2.6