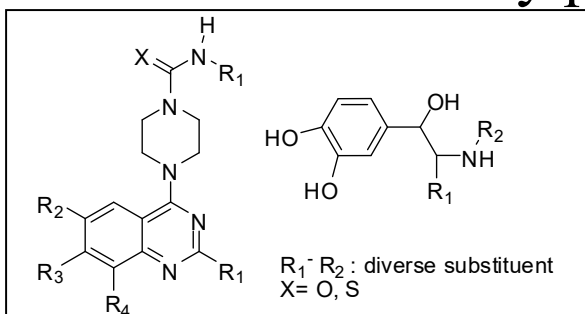


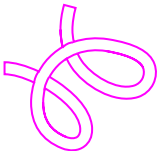
## Kombinator(iál)ní chemie jako prostředek vývoje léčiv



# Soudobý proces vývoje léčiv



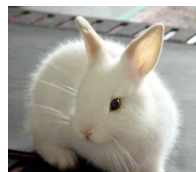
Kombinatorní chemie  
Přírodní produkty

  
Cílové molekuly  
(enzymy, receptory...)

Vysokokapacitní  
screening (~vysoce  
propustný; vysoce  
výkonný -High-  
throughput  
Screening - HTS)

Vzorová  
sloučenina (Lead  
Compound) &  
optimalizace  
léčiva

*in vitro* testy



Klinické zkoušení



# Kombinatorní chemie

- Možná definice: syntéza chemických sloučenin jako souborů (knihoven) a screening těchto knihoven na sloučeniny s požadovanými vlastnostmi
- Potenciálně rychlá cesta k novým katalyzátorům, materiálům a zejména **léčivům**
- Technika vyvinutá na přelomu 80. a 90. let, aby umožnila pracovat s mnoha sloučeninami současně

# Techniky kombinatorní chemie

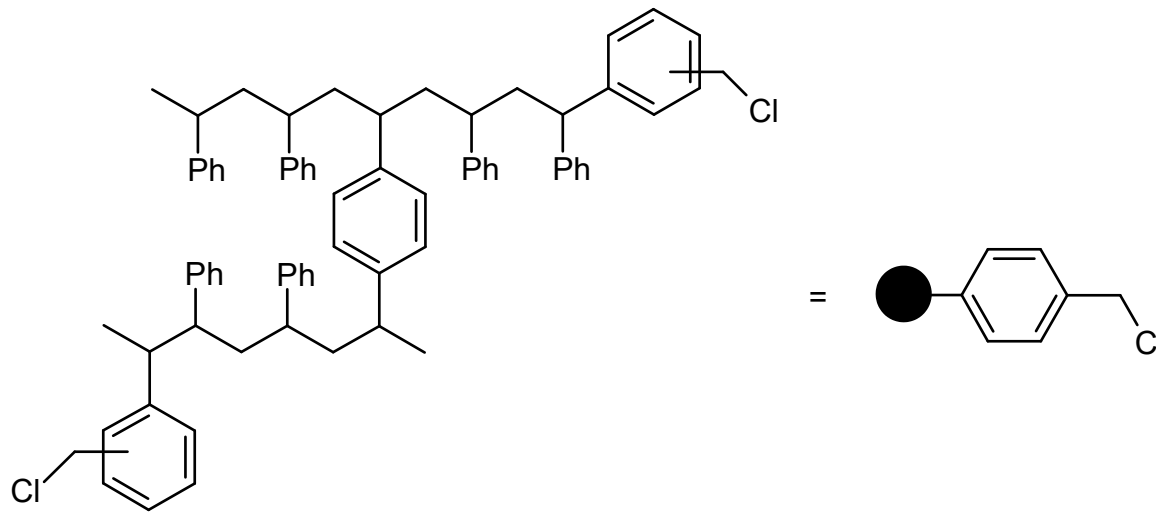
- Nástroje
  - Syntéza na pevné fázi – některé reaktanty zakotvené na částicích vhodného polymeru, po reakci lze odštěpit
  - Sady reaktantů, popř. monomerů
  - Použití linkerů – fragmentů navázaných na kuličky polymerní pryskyřice vhodných pro připojení reaktantu kovalentní vazbou
  - Screeningové metody, především HTS (high-throughput screening; vysokokapacitní screening)

# Metody kombinatorní chemie

- Pevným polymerním nosičům se zakotvenými reaktanty, vyvinutým původně k peptidové syntéze, se dostalo mnohem širšího použití
- Produkty z jedné reakce jsou rozděleny a podrobeny reakci s dalšími reaktanty v posloupnosti
  - Spojovací – směšovací schéma: rozsah knihovny roste exponenciálně

# Syntéza na pevné fázi

Zakotvení na polymerní pryskyřici (polystyrenové kuličky) = *beads*



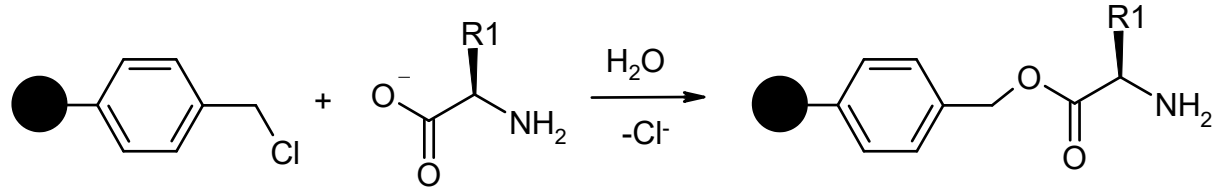
Prostorově zesíťovaný polystyren (1-1.5% divinylbenzenu)

# Syntéza na pevné fázi

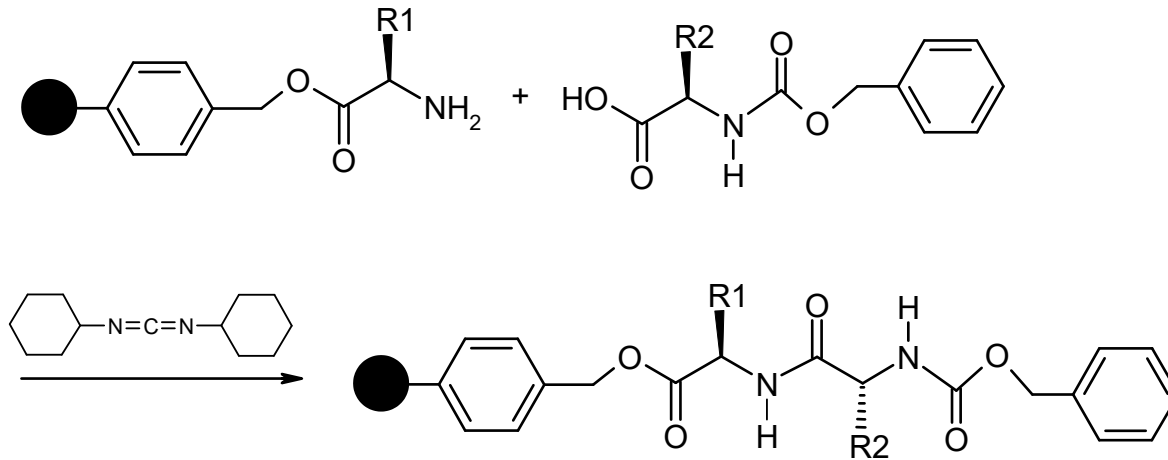
Původně vyvinuta k přípravě polypeptidů s dlouhým řetězcem.  
Fixace peptidu na polystyrenových kuličkách.

Příklad Merrifielda:

1. C-terminální aminokyselina

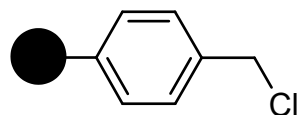


2. aminokyselina na dusíku chráněná Boc - skupinou (benzyloxykarbonylem)

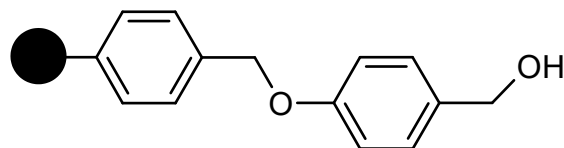


Lit. R. B. Merrifield *J.Am.Chem.Soc.* **85** (1963) 2149.

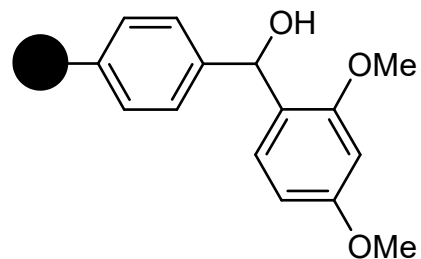
# Linkery pro syntézu na pevné fázi



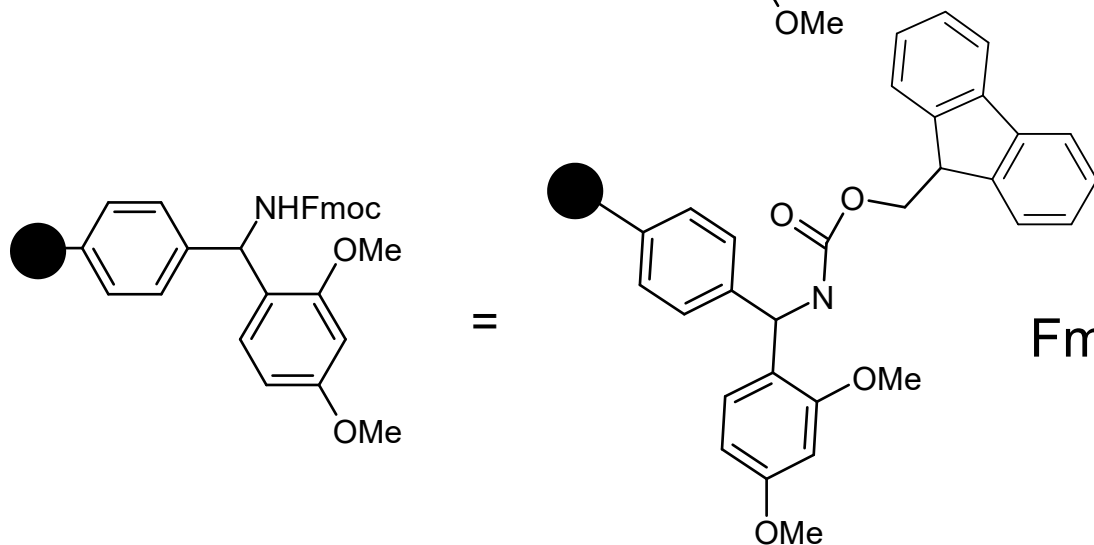
Merrifieldova pryskyřice



Wangova pryskyřice



Rinkův kyselý linker

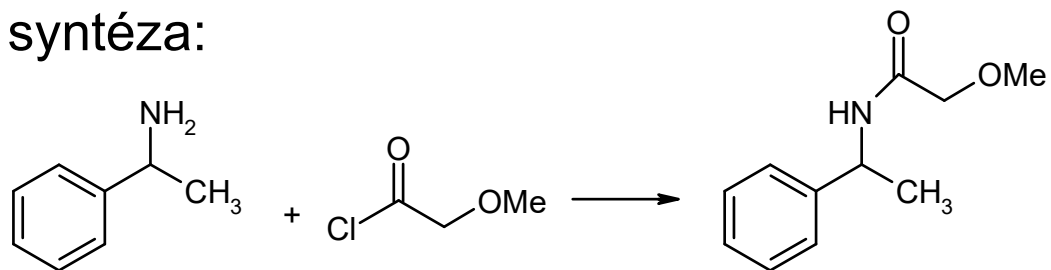


Fmoc-ochráněný Rinkův aminový linker



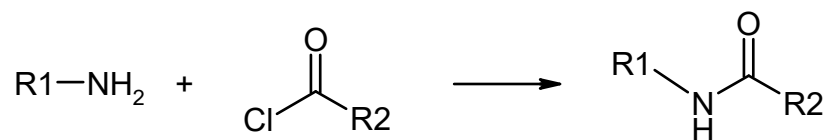
# Klasická a kombinatorní syntéza

Klasická syntéza:



1 reaktant \* 1 reaktant = 1 produkt

Kombinatorní syntéza:

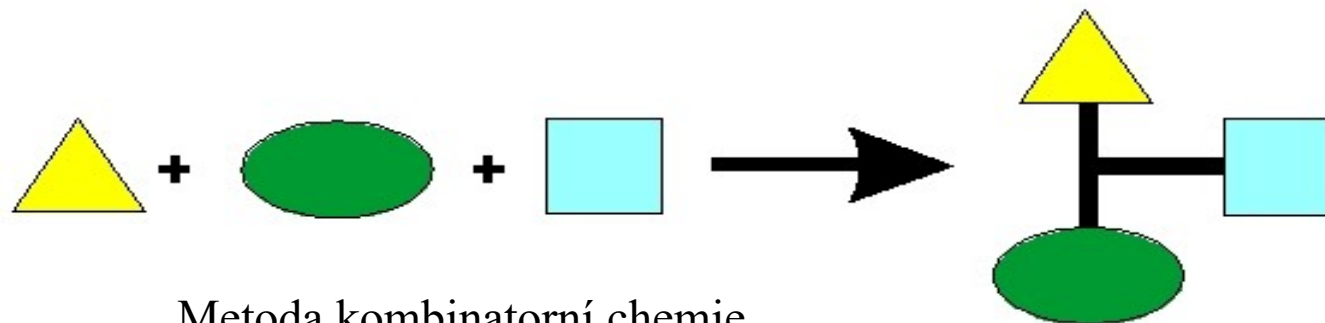


Např.: 50 reaktantů \* 20 reaktantů = 1000 produktů

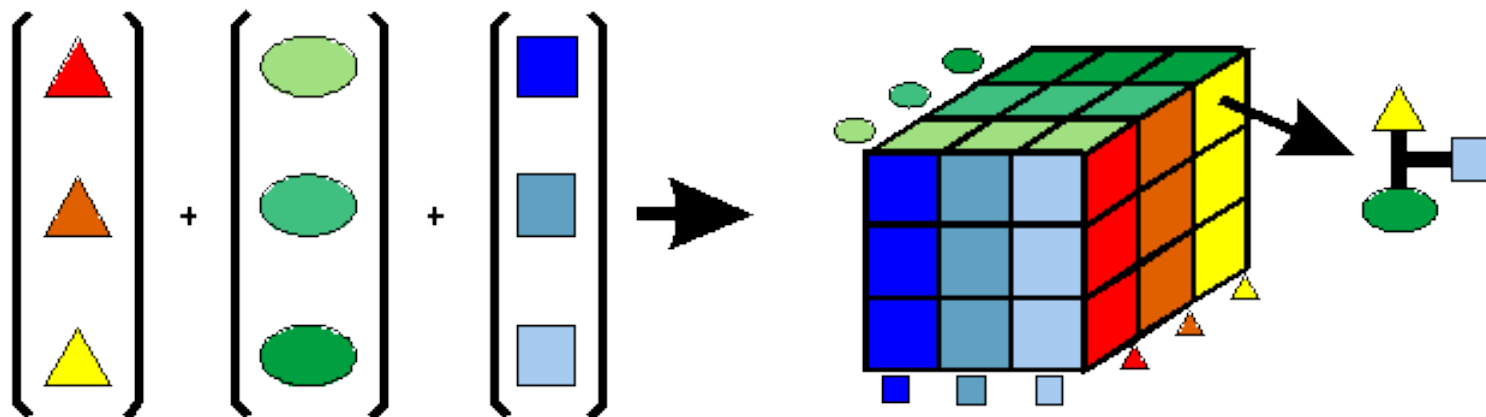
Při více stupních např.: 50 \* 20 \* 20 = 20 000 produktů

# Ilustrace rozdílu mezi klasickou organickou syntézou a kombinatorní chemií

Klasická syntéza

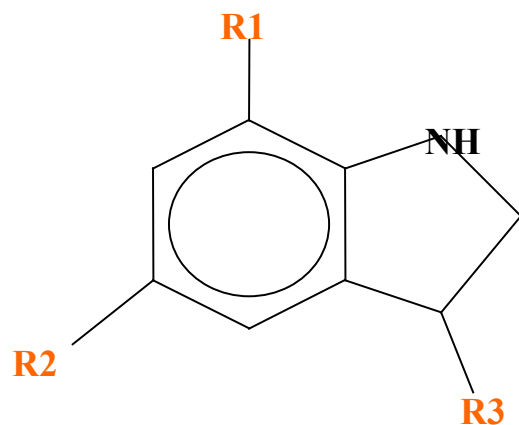


Metoda kombinatorní chemie



# Příklad miniaturní kombinatorní knihovny

*Skelet*



*Pro tuto malou knihovnu je počet  
možných látek*

$$5 \times 6 \times 5 = \underline{150}$$

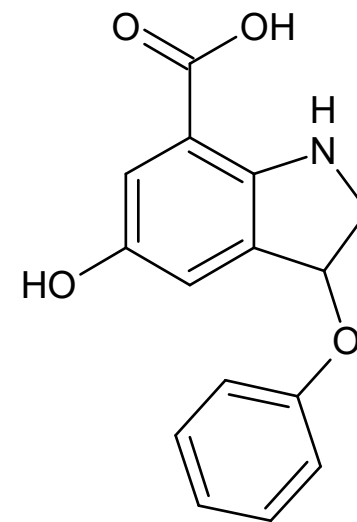
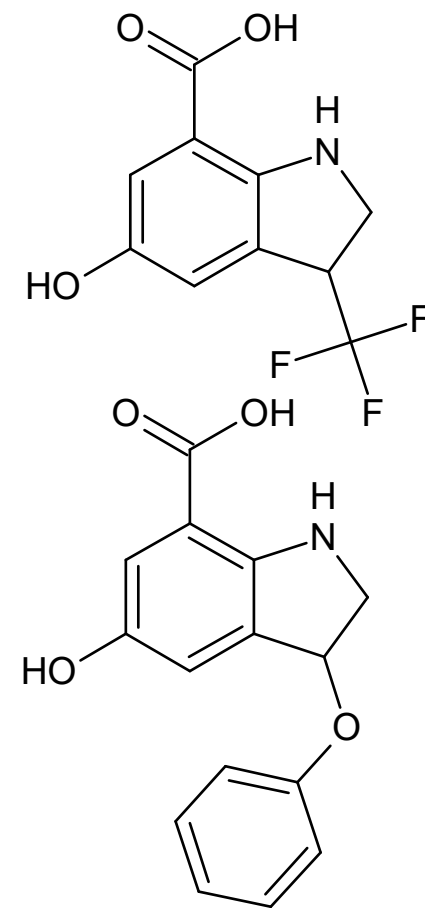
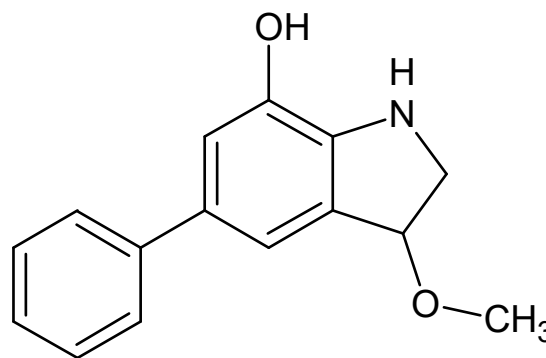
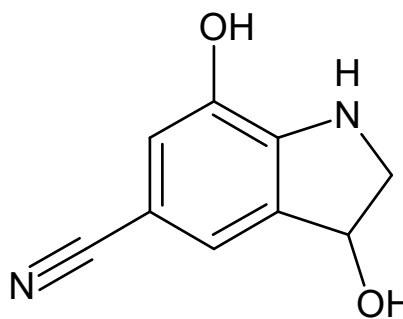
*“R”-  
substituenty*

R1 = OH  
OCH<sub>3</sub>  
NH<sub>2</sub>  
Cl  
COOH

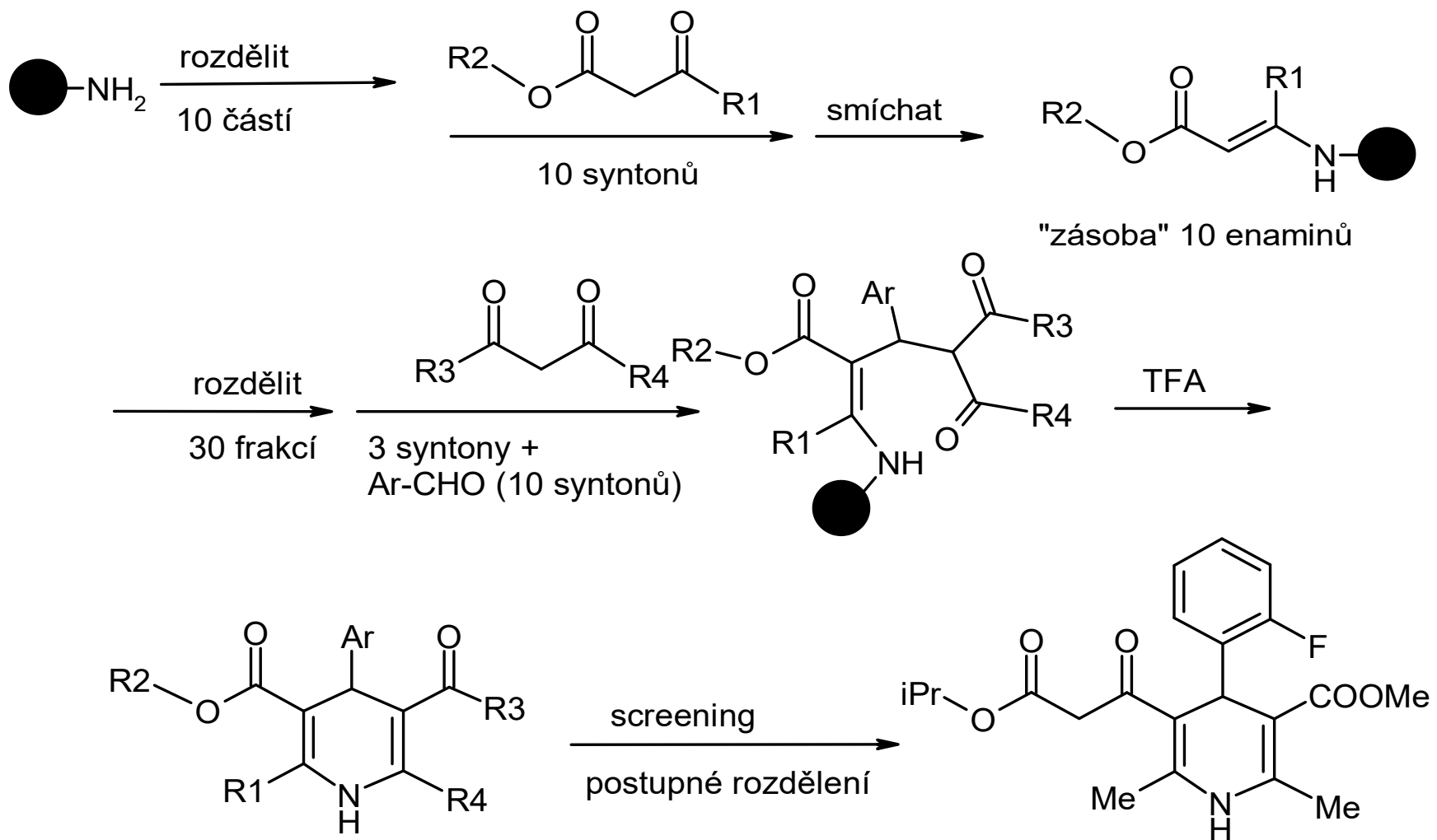
R2 = fenyl  
OH  
NH<sub>2</sub>  
Br  
F  
CN

R3 = CF<sub>3</sub>  
NO<sub>2</sub>  
OCH<sub>3</sub>  
OH  
fenoxy

*Příklady*



# Kominační knihovna dihydropyridinů

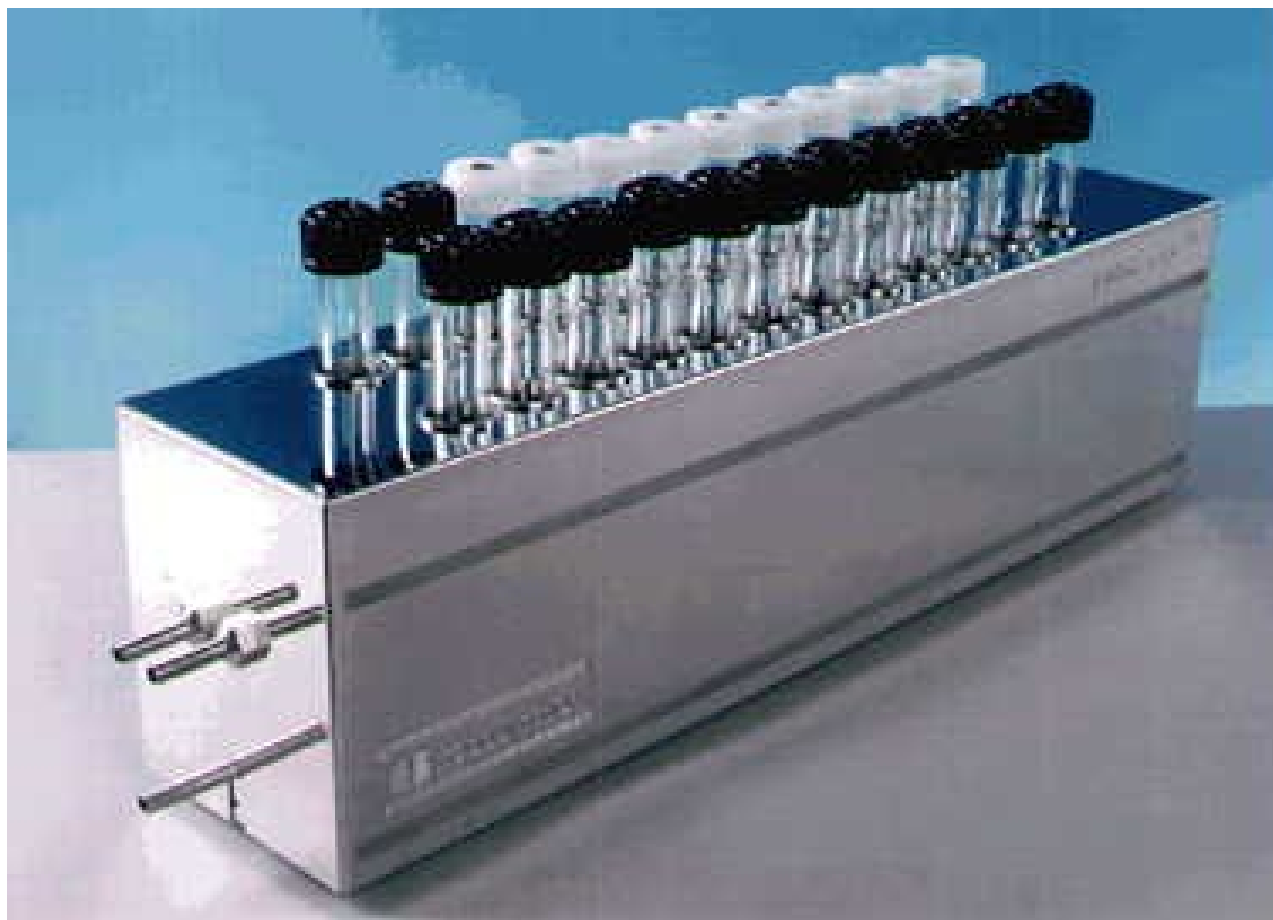


100 produktů

IC<sub>50</sub> (Ca<sup>2+</sup> kanál) = 14 nM

Lit: K.C. Nicolaou et al. in *Handbook of Combinatorial Chemistry*, VCH Wiley (2000) pp. 659-660

# Multireaktorové nádoby



# Nástroje pro mikrovlnnou syntézu v kombinatorní chemii



# Problémy raných knihoven kombinatorní chemie

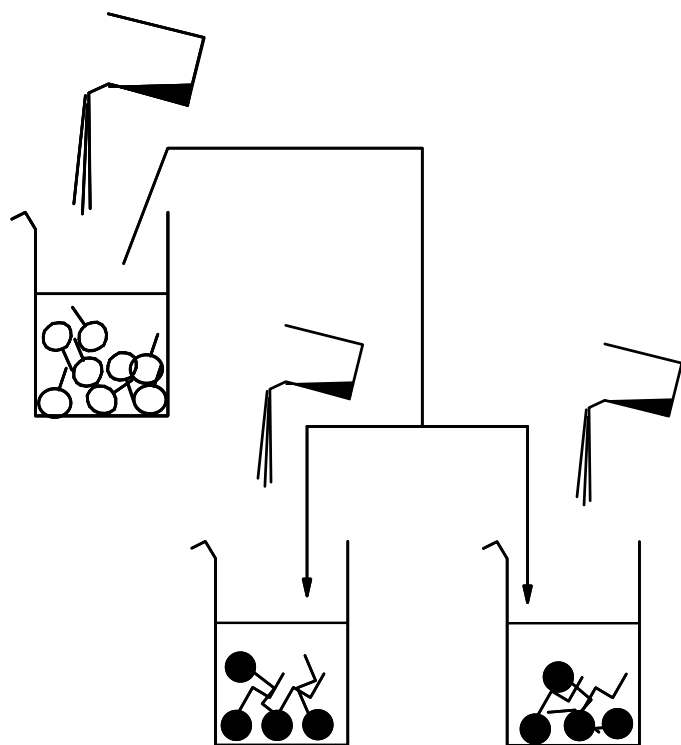
- Mnoho látek mělo nežádoucí vlastnosti:
  - Velikost, resp. příliš velkou  $M_r$
  - Špatnou rozpustnost ve vodě a jiných rozpouštědlech, použitelných pro testování
  - Nevhodné funkční skupiny (reaktivní, způsobující toxicitu - „toxikofory“)

# Problémy související s technikou kombinatorní chemie

- Rané knihovny byly často založeny na jediném základním skeletu (scaffold)
- K dispozici byl jen omezený počet skeletů
- Jednotlivé sloučeniny v knihovně byly strukturně podobné
- Látky měly sklon k achiralitě či racemizaci
- Počáteční důraz na tvorbu směsí velkého počtu sloučenin už dnes není aktuální



## „Split-and-pool strategy“

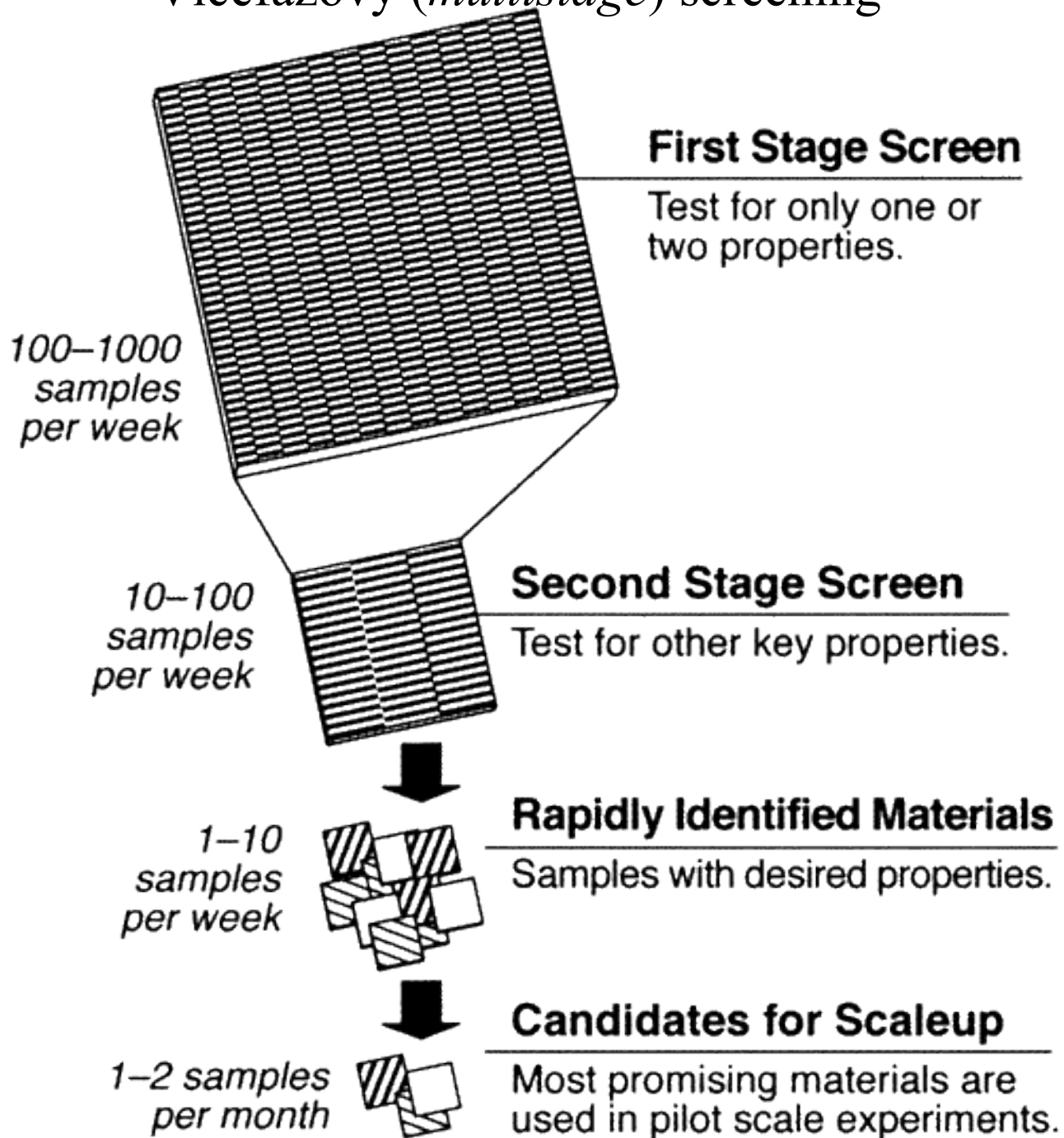


Vyjdeme-li z jednoho základního skeletu, pomocí rozdělení reakční směsi (*splitting*) můžeme v každém novém *poolu* obměňovat substituční předlohu

Možné technické řešení oddělení: magnetické kuličky

# Metody screeningu na aktivní sloučeniny

## Vícefázový (*multistage*) screening



# Vysokoučinný screening (*High-throughput Screening* - HTS)

- Proces stanovení aktivity velkého počtu látek vůči různým biologickým cílům.
- Za den může být analyzováno až 100 000 látek.
- Robotická zařízení obvykle připravují a analyzují mnoho destiček se sadami vzorků současně.



# Před HTS je vhodné provést předvýběr, popř. látky zařadit do „fyzické knihovny“ - repositoria (příklad z Ústavu výzkumu genomu Univerzity v Cincinnati)

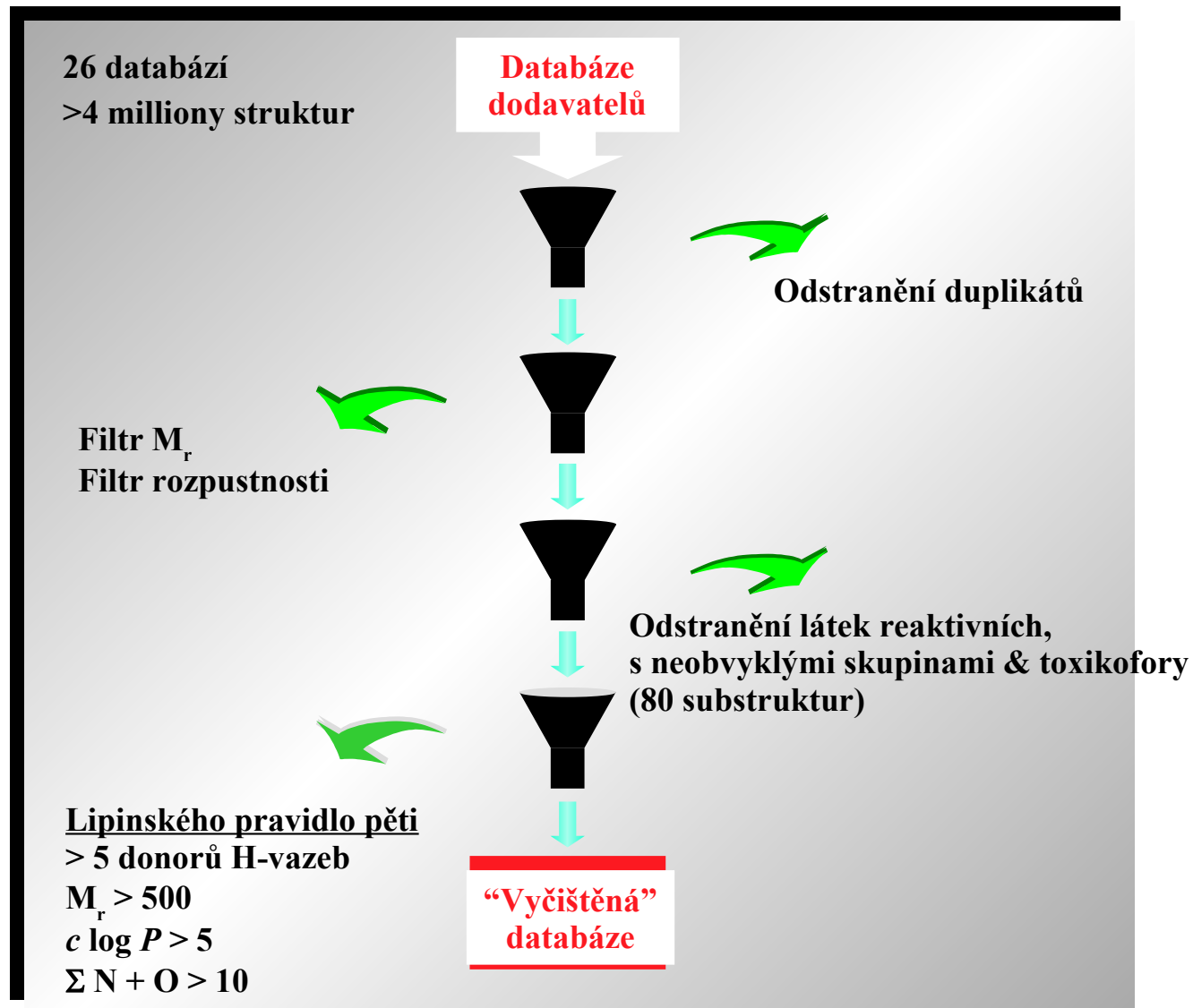
Nejde o pouhou hru s čísly –  
předvýběr podstatně zvyšuje účinnost  
HTS

Výběr je založen na „lékovitých“  
(*drug-like*) vlastnostech a má  
maximalizovat strukturní rozrůzněnost  
(různorodost, diverzitu sloučenin v 6-  
rozměrném „lékovém prostoru“

Jako zdroje je užívána nabídka  
externích dodavatelů stejně jako  
vlastní kombinatorní syntéza

~250 000 látek na výstupu

Software podstatně zvýšil účinnost  
identifikace vzorových struktur.



# Lipinského “pravidlo pěti” <sup>(1)</sup>

- ◆  $M_r \leq 500$
  - ◆ # Akceptorů H-vazeb  $\leq 10$
  - ◆ # Donorů H-vazeb  $\leq 5$
  - ◆  $-2 < \text{CLog P} < 5$  (nebo  $\text{MLOGP} < 4,15$ ).
  - ◆ # Rotace schopných vazeb  $< 5$  - **molekulární flexibilita**
- } farmakoforové vlastnosti

**„LÉKOVITÉ“ (DRUG-LIKE) CHOVÁNÍ**

1: C. Lipinski et al, Adv. Drug. Del. Rev, 23, 3-25 (1997)

**Clog P:** log P odhadnutý výpočtem dle Hansche a Lea

$$\log P = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j f_j,$$

$f_i$  je fragmentová konstanta,  $f_j$  je korekční faktor a  $a_i$  a  $b_j$  je odpovídající počet výskytů daného parametru.

Hansch C., Leo A.: Substituent constants for chemistry and biology. Wiley, New York, 1979

**Mlog P:** log P odhadnutý rovnicí dle Moriguchiho a spol., odvozenou na základě analýzy vlivu řady ze struktury odvozených parametrů na log P sady 1230 organických sloučenin  
•analýzou za užití multilineární regrese byl sestaven model zahrnující „pouhých“ 13 parametrů (deskriptorů):

$$\log P = 1,244(\text{CX})^{0,6} - 1,017(\text{NO})^{0,9} + 0,406\text{PRX} - 0,145(\text{UB})^{0,8} + 0,511\text{HB} + 0,268\text{POL} - 2,215\text{AMP} + 0,912\text{ALK} - 0,392\text{RNG} - 3,684\text{QN} + 0,474\text{NO}_2 + 1,582\text{NCS} + 0,773\text{BLM} - 1,041$$

$n = 1230$ ,  $r = 0,952$ ,  $s = 0,411$ ,  $F = 900,4$ ,

kde

CX ... vážený součet počtů atomů uhlíku a halogenů s váhami: C: 1,0; F: 0,5; Cl: 1,0; Br: 1,5; I: 2,0

NO... celkový počet atomů dusíku a kyslíku

PRX... efekt proximity N/O: X-Y: 2,0; X-A-Y: 1,0 (X,Y: N/O, A: C,S nebo P) s korekcí (-1) pro karboxamid/sulfonamid

UB... celkový počet násobných vazeb kromě NO<sub>2</sub>

HB... „nepravá“ (indikátorová) proměnná pro přítomnost intramolekulární vodíkové vazby jako např. mezi *ortho*-OH a -CO-R, -OH a -NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub> a -COOH, nebo 8-OH/-NH<sub>2</sub> na chinolinech, 5 nebo 8-OH/-NH<sub>2</sub> na chinoxalinech aj.

POL... počet aromatických polárních substituentů (aromatické substituenty kromě Ar-CX<sub>2</sub>- a Ar-C=C<; X: C nebo H)

AMP... amfotericita: α-aminokyselina: 1,0; aminobenzoová kys.: 0,5; pyridinkarboxylová kys.: 0,5

ALK... „nepravá“ (indikátorová) proměnná pro alkan, alken, cykloalkan nebo cykloalken (uhlovodíky s 0 nebo 1 dvojnou vazbou)

RNG... „nepravá“ (indikátorová) proměnná pro přítomnost cyklické struktury jiné než benzenové jádro a s ním kondenzované kruhy (aromatické, heteroaromatické a jakékoliv uhlovodíkové cykly)

QN... kvarterní dusík: >N<sup>+</sup>< 1,0; N-oxid 0,5

NO<sub>2</sub>... počet nitroskupin

NCS... isothiokyanátová skupina (-N=C=S) 1,0; thiokyanátová (-S-C≡N) 0,5

BLM... „nepravá“ (indikátorová) proměnná pro přítomnost β-laktamu

Moriguchi et. al.: Simple method for calculating octanol/water partition coefficient. Chem. Pharm. Bull. 40, 127-130 (1992)

Další možnosti „čištění“ databáze látek: „halogenový filtr“

### ‡ Ribapharm Concern

- **Cl, Br, I považovány za tzv. těžké halogeny**
- **Ponechat látky obsahující nejvýše 2 atomy těžkých halogenů a žádný fluor**
- **Ponechat látky obsahující 1 těžký halogen a nejvýše 3 atomy fluoru**
- **3F atomy = 1 těžký halogen (-CF<sub>3</sub> skupiny)**



# Fyzické skladování knihoven kombinatorní chemie

## Příklad z Ústavu výzkumu genomu Univerzity v Cincinnati

„Stohovací“ sklad nativních sloučenin

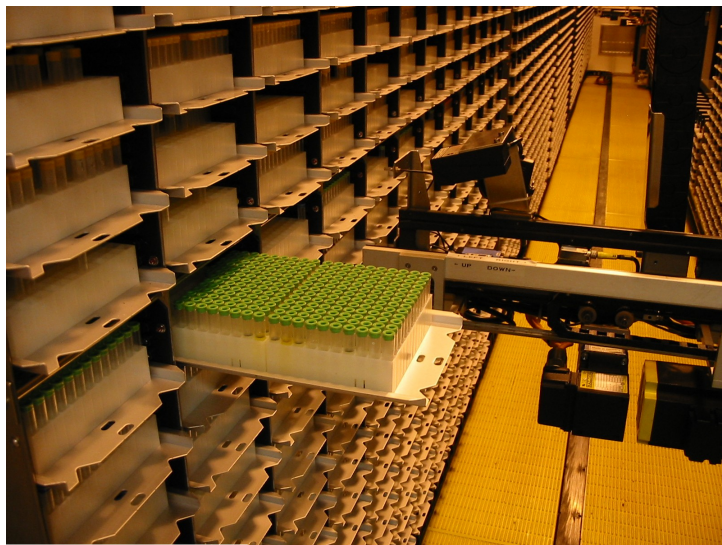
- Kapacita = 200 000 lahviček
- Momentálně = 207 000 lahviček
- Je-li třeba, skladovány v mrazících boxech

Solar (*Solution Archive*) – archív roztoků – roztoky v DMSO

- Kapacita = 1,8 milionu zkumavek, 10 000 plat po 96 jamkách, 13 600 plat po 384 jamkách
- Momentálně = 338 000 sloučenin v 383 400 zkumavkách a 1862 jamkách

mělkých jamkách

Celková skladovací plocha ~3500 sq. ft. ≈ 325 m<sup>2</sup>



## Vysokokapacitní screening (HTS)

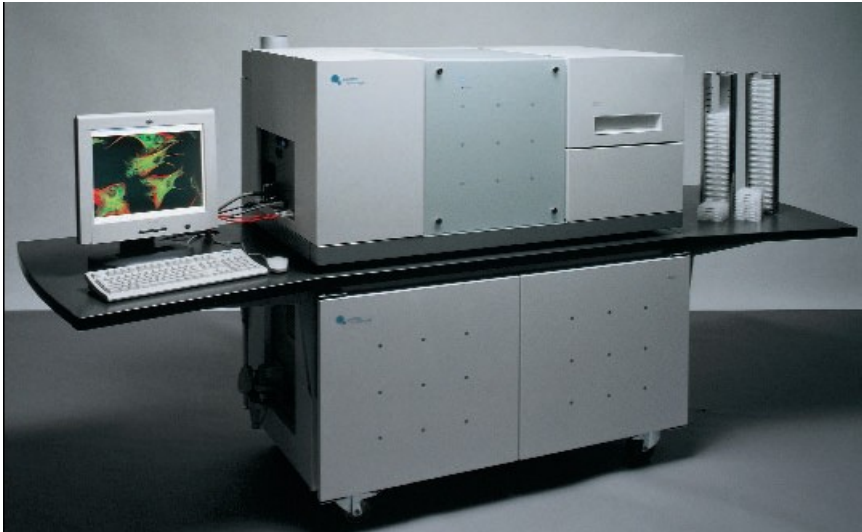
Analyzátor plat + zobrazovací systém Opera + ultraHTS systém  
Evotec-Technologies/Perkin-Elmer



Až 100 000 vzorků/24 hodin

## HTS: co se vlastně vyhodnocuje?

### Opera Imaging Reader



>50 000 mnohobarevných datových bodů/24 hodin

Fluorescenční měření na celých buňkách  
Životaschopnost buňky, diferenciace  
buňky, proliferace buňky, cytotoxicita,  
apoptóza, přenašečové systémy

Stanovení přenosu signálu v buňce  
Tok  $Ca^{2+}$ , *second messengers*, iontové kanály,  
membránový potenciál

Stanovení exprese genů  
Analýzy membránových receptorů  
Vazba ligandů, aktivace, desenzibilizace,  
translokace a endocytosa receptorů, nábor  
signálních molekul

Stanovení translokace  
Změny distribuce cílové molekuly

Morfologická stanovení  
Růst neuritů, diferenciace buněk, adheze a  
šíření buněk

# Možná strategie pro použití HTS screeningu

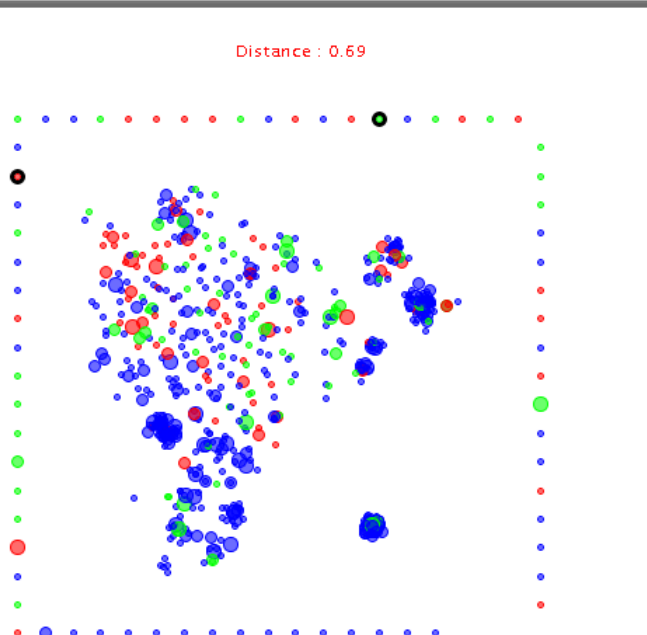
- Provést HTS
- Rozhodnout, které látky jsou „aktivní“ a které „neaktivní“.
- Rozčlenit aktivní látky a zařadit je do sérií (řad).
- Zobrazit zóny aktivních sloučenin, tyto látky zobrazit jako strukturní vzorce, a označit zajímavé série.
- Identifikovat společný základní skelet každé série.
- Použít hledisko podobnosti (similarity) nebo substrukturní vyhledávání k nalezení „neaktivních“ látek, které souvisejí s těmito sériemi (jsou jejich součástí).
- Použít SAR (popř. QSAR) techniky k objevení rozdílů mezi aktivními a neaktivními sloučeninami v sérii. (Oproti původnímu rozdělení na „aktivní“ a „neaktivní“ může nastat posun.)

# Nástroj pro HTS – Tripos SAR Navigator

SARNavigator

File Edit Insert View Graph Structures Tools Help

Distance: 0.69



Compound A-73020 has 3 members  
666 out of 666 compounds visible, 2 selected

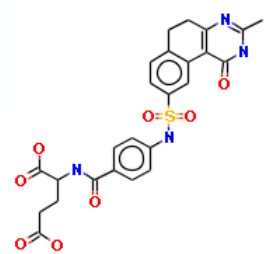
	IC50	PCT_INHIB	CNT	CLOGP	ROTBONDS	NUM
583C80	34	120	2	8.186	1	
6108-A1	100	194	1	0.989	4	
6315-S	100	156	12	4.954	7	
6366-DM	36	198	1	-3.709	6	
661U88	100	10	3	4.127	3	
690C88	10	204	1	6.355	17	
70026	100	30	1	6.545	6	
711389-S	40	128	1	2.54	7	
72-70	100	10	3	4.584	4	
7351	14	220	1	6.463	6	
7432-S	40	106	1	4.531	6	
799	100	68	6	6.316	4	
8363-S	100	30	5	10.825	11	
84-246	100	-2	3	4.504	7	
86-247	100	0	2	4.185	6	
86-448	100	20	2	5.817	6	
86-941	100	12	5	5.763	4	
882C	100	10	3	4.564	5	
932	100	40	13	0.951	5	
A-007	100	10	4	5.872	6	
A-10255	100	4	6	5.451	7	
A-134U	42	128	2	6.002	8	
A-145	100	4	1	5.722	6	
A-16	100	10	15	5.587	9	

Range Color Size

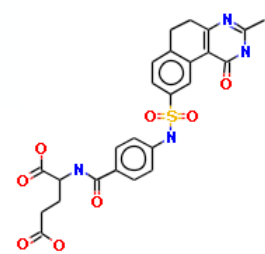
Reset Sliders Customize

4.0	IC50 (04.00, 100.00)	100.0
-16.0	PCT_INHIB (-16.00, 240.00)	240.0
0	CNT (0, 30)	30
-12.434	CLOGP (-12.43, 11.54)	11.543
0.0	ROTBONDS (00.00, 48.00)	48.0
1.0	NUM N O (01.00, 25.00)	25.0

ACAMGLUTE



583C80



# Nástroj pro HTS - BioReason ClassPharmer

- Rozčleňuje („klastruje“) aktivní látky do skupin představujících série.
- Pokouší se najít společný základní skelet za použití MCS algoritmu.
- Vrací „inaktivní“ sloučeniny zpět do sérií.
- Ukazuje série jako řádky v „tabulkové“ podobě
- Poskytuje další statistické údaje týkající se sérií, např. distribuci aktivity.
- <http://www.bioreason.com>

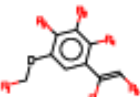
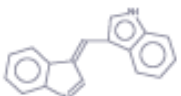
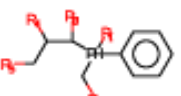
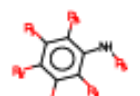
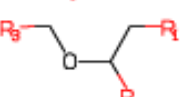
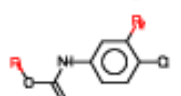
# BioReason Classpharmer

DrugPharmer -- HIV500\_EC50\_14Dec00

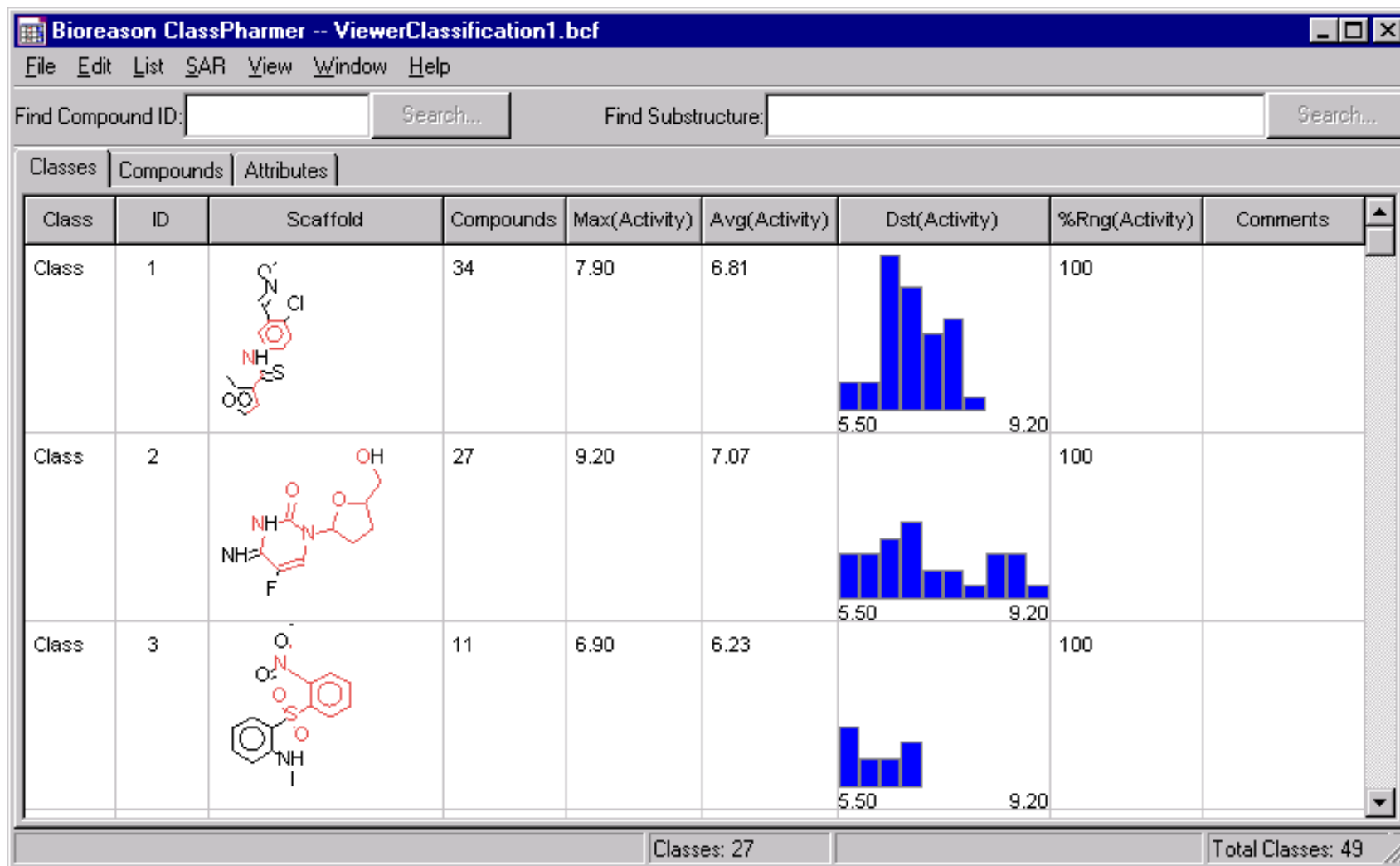
File Edit Classes Compounds Help

Class View R-Table Compound View

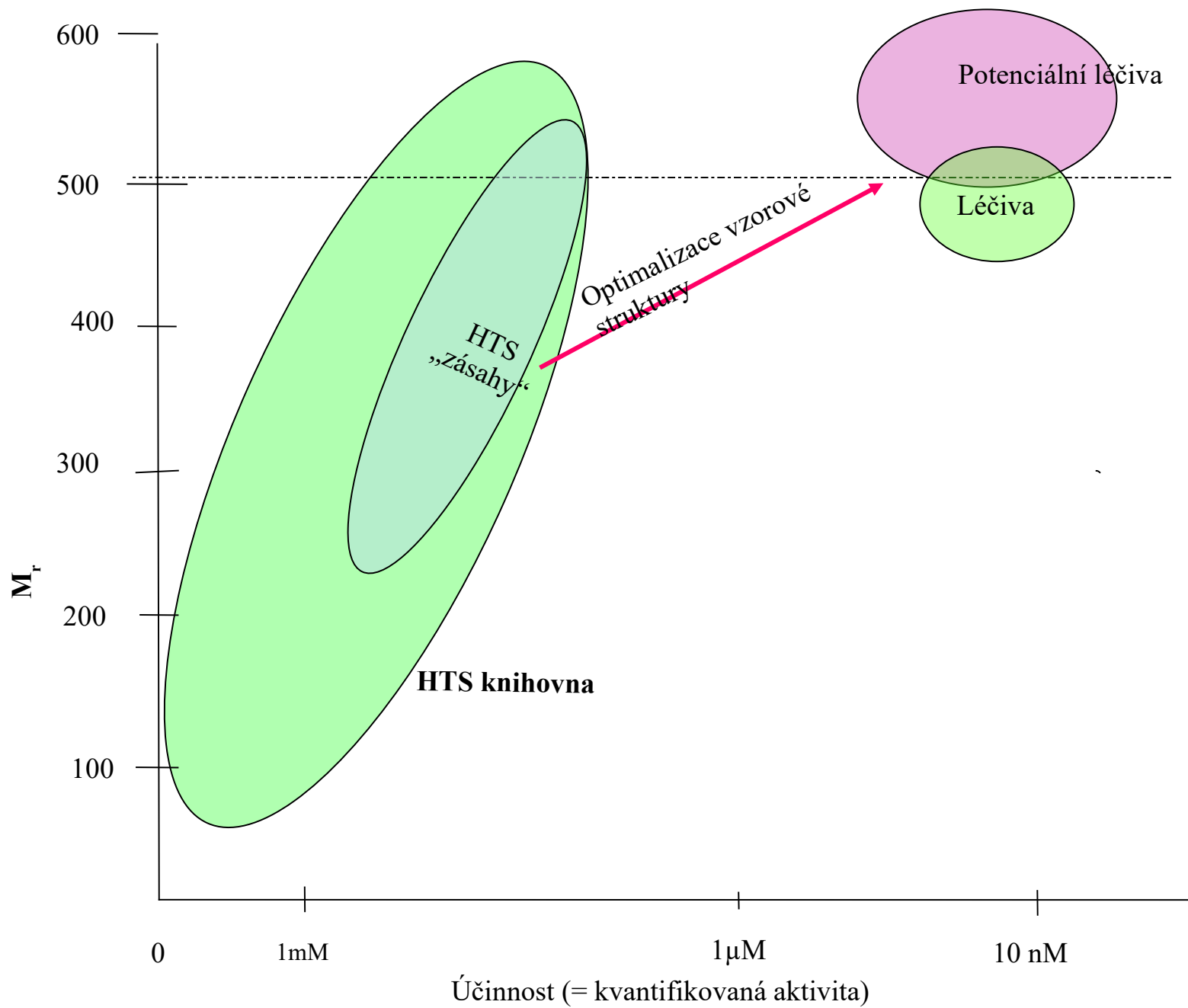
*Prioritized Lead Classes*

Class ID	Class Name	Scaffold	Actives	Median Activity	Actives SD	Max Activity	Filtered
66	Class 66		7	7.20	0.76	7.20	100
5	Class 5		17	7.20	0.32	7.20	95
25	Class 25		5	7.20	0.00	7.20	20
2	Class 2		33	6.80	0.71	7.90	120
1	Class 1		37	6.70	0.97	9.20	507
19	Class 19		6	6.50	0.73	7.20	0

# BioReason Classpharmer







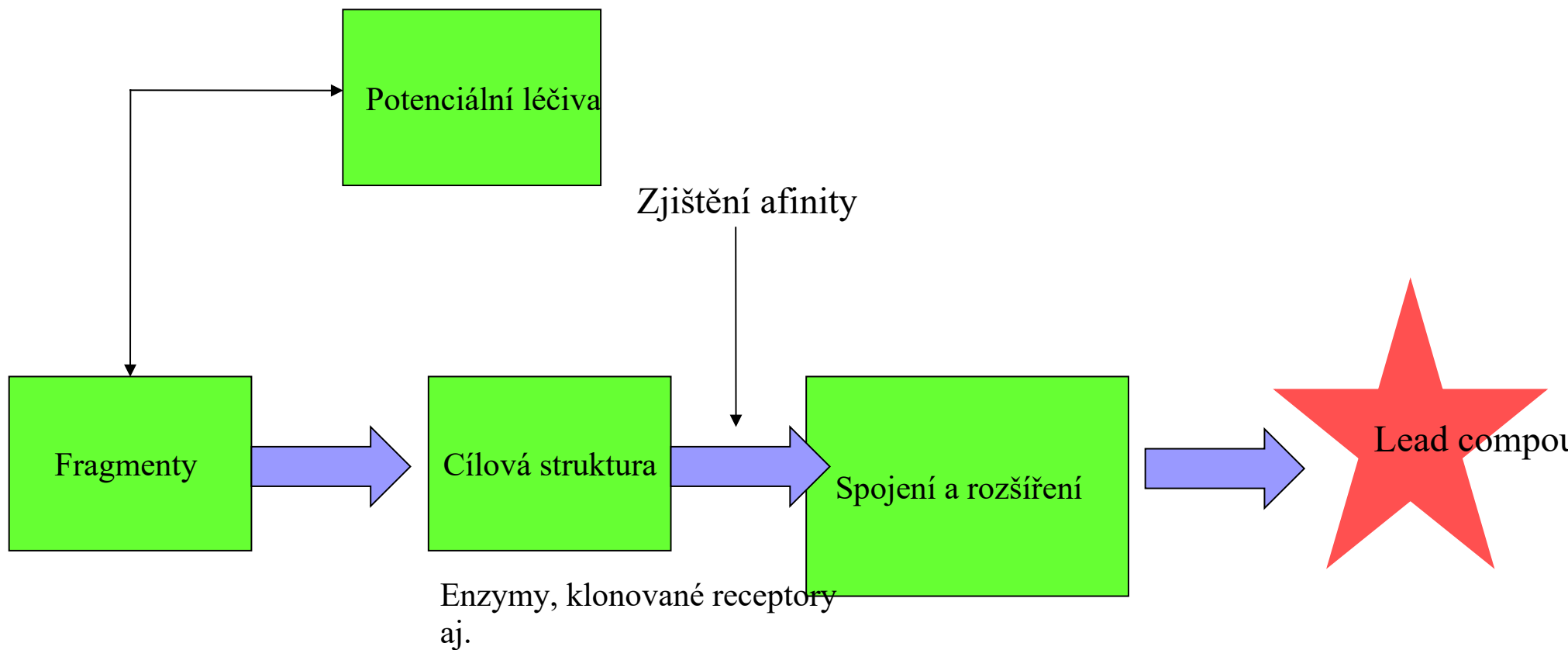
## *Traditional Discovery v. Combi-Chem*

- Expensive, slow
- Sequential learning
- Goal: Reduce cost
- Emphasizes scientific knowledge
- Sequential search
- Requires years of training
- Art, hand-crafting
- Values experience
- Bottle-neck is analoguing
- Flexible across compounds
- Near 100% purity
- Cheap (?), fast
- Trial & error
- Goal: Reduce time
- Emphasizes process knowledge & skill
- Parallel search
- Threatens stakeholders
- Brute force
- Complements traditional
- Bottle-neck is data processing
- Applies to some compound families
- Partial purity

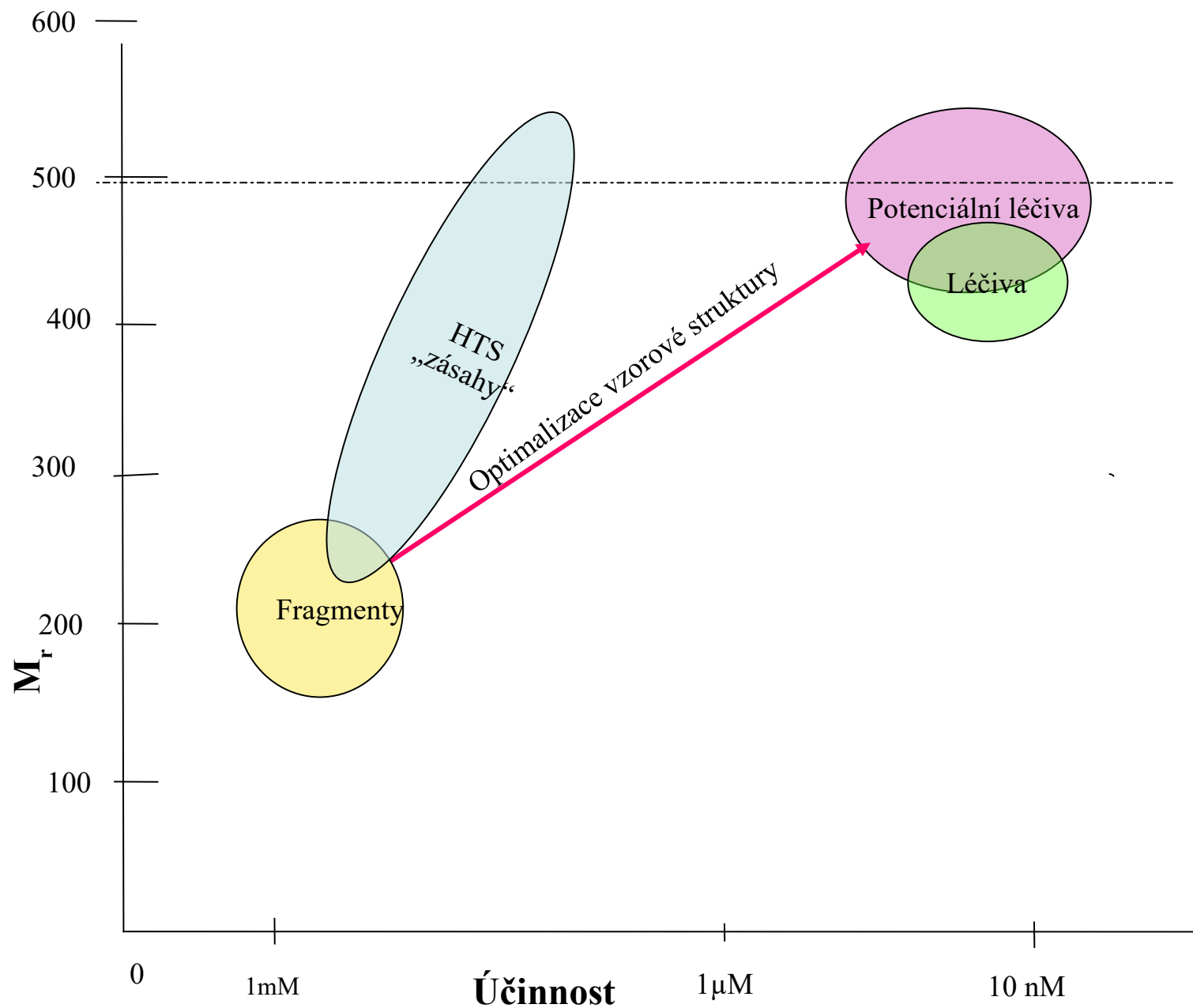
Fragmentová metoda ve vývoji léčiv  
(někdy též „fragnomika“)

Cíl: najít „diskrétní komponenty“ - fragmenty relativně jednoduché struktury o nízké molekulové hmotnosti, které se vážou na danou cílovou strukturu

- fragmenty dále poslouží jako „stavební bloky“, jež se mají dále spojovat, kombinovat a optimalizovat za vzniku nových „lead compounds“ (vzorových sloučenin), jež splňují nebo překračují kritéria kladená na „HTS (high-throughput screening) hits“ - látky zachycené při screeningu aktivit „strukturních knihoven“ vytvořených kombinatorní chemií
- racionální odůvodnění: mnoho cílových struktur obsahuje diskrétní „podmísta“ pro vazbu ligandů, substrátů a/nebo kofaktorů

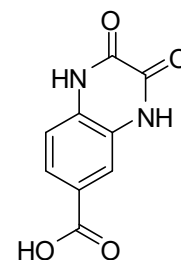
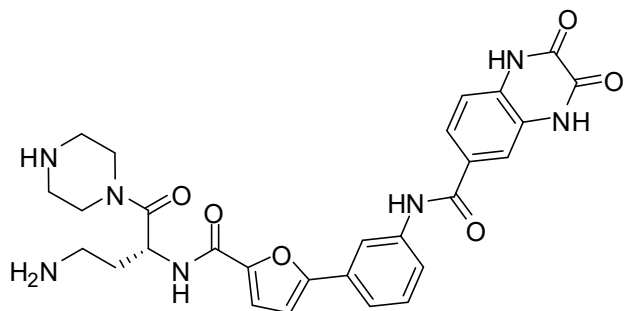
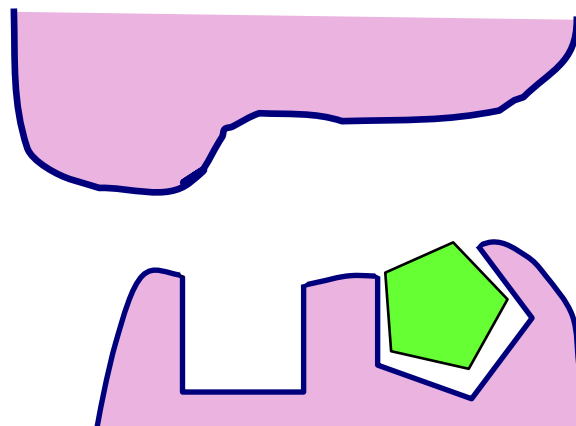
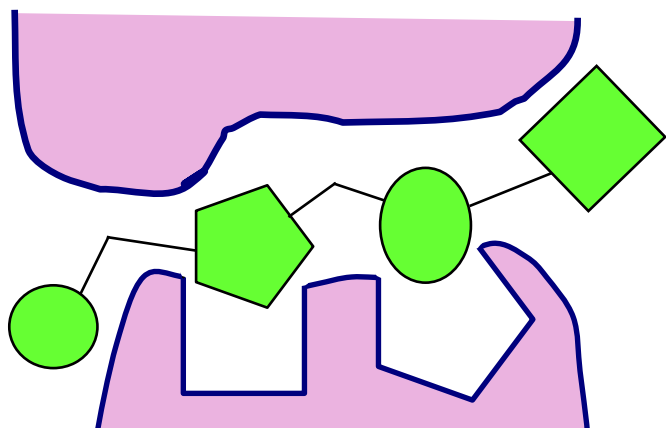


# Průměrná molekulová hmotnost fragmentů zachycených při HTS screeningu a fragmentů



Jaké požadavky má splňovat molekula, aby mohla být považována za fragment vhodný pro vývoj „lead compound“?  
(Aplikace Lipinského „pravidla pěti“)

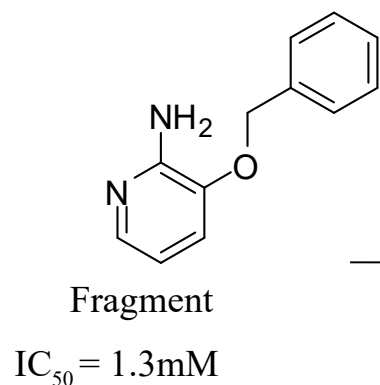
1. Mr ~300
2. Počet donorů vodíkových vazeb (HBD)  $\leq 3$
3. Počet akceptorů vodíkových vazeb (HBA)  $\leq 3$



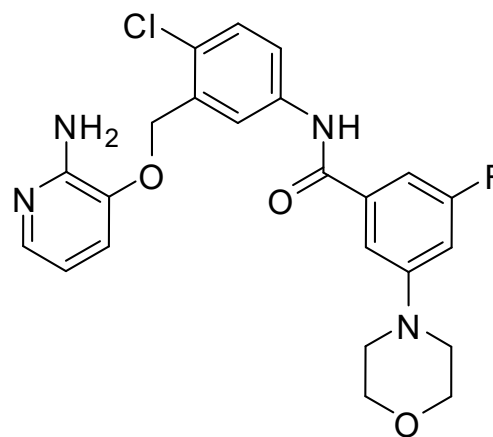
# Jaké požadavky má splňovat molekula, aby mohla být považována za fragment vhodný pro vývoj „lead compound“?

- $M_r \sim 300$
- Počet donorů vodíkových vazeb (HBD)  $\leq 3$
- Počet akceptorů vodíkových vazeb (HBA)  $\leq 3$

Příklad fragmentu k vývoji lead compound pro inhibitory proteinkinasy



$M_r = 200$   
HBD = 2  
HBA = 3

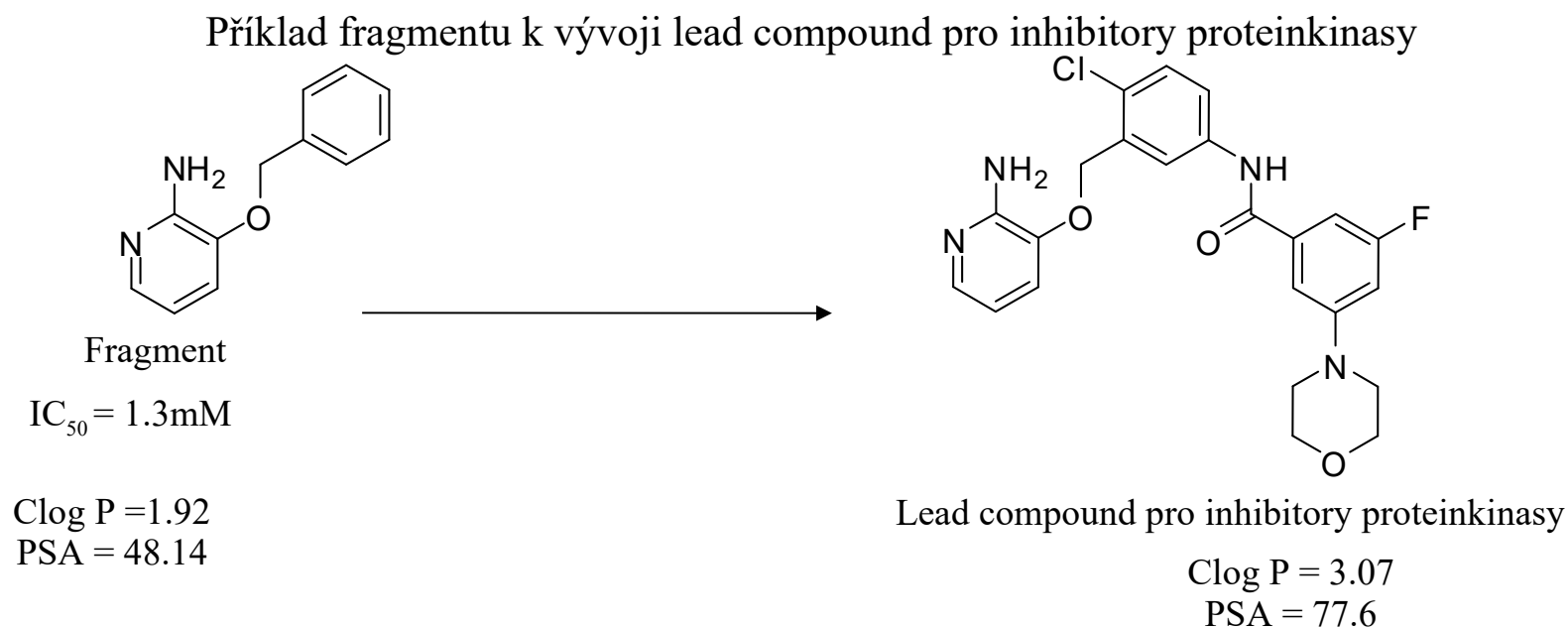


$IC_{50} = 65\text{ nM}$   
 $M_r = 456$

Jaké požadavky má splňovat molekula, aby mohla být považována za fragment vhodný pro vývoj „lead compound“?  
(Aplikace Lipinského „pravidla pěti“)

4.  $Clog P < 3$  - míra lipofility látky

5. Plocha polárního povrchu (PSA)  $< 60 \text{ \AA}^2$  - povrch patřící polárním atomům; míra schopnosti pronikat buněčnými membránami

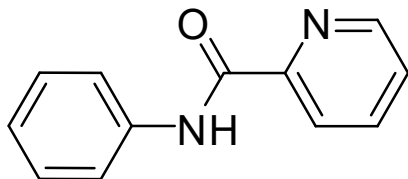
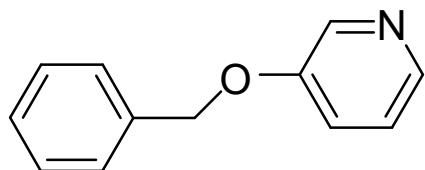
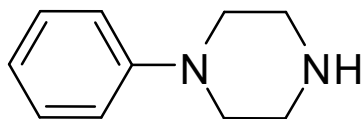
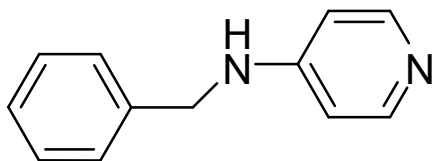


Congreve, M. et al. *Drug Discov. Today* **2003**,8, 876-877  
Ertl, P. et al. *J. Med. Chem.* **2000**, 43,3714-3717

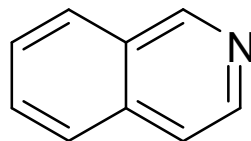
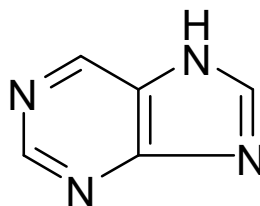
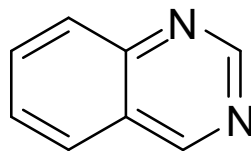
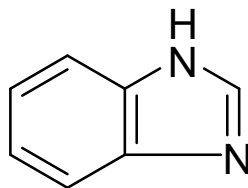


## Některé běžnější fragmenty převzaté z léčiv

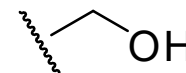
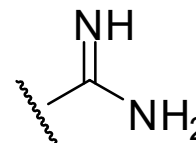
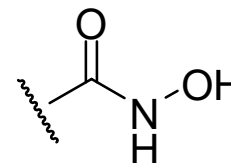
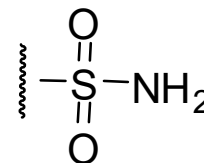
Syté kruhy převzaté z léčiv



Heterocyklické systémy



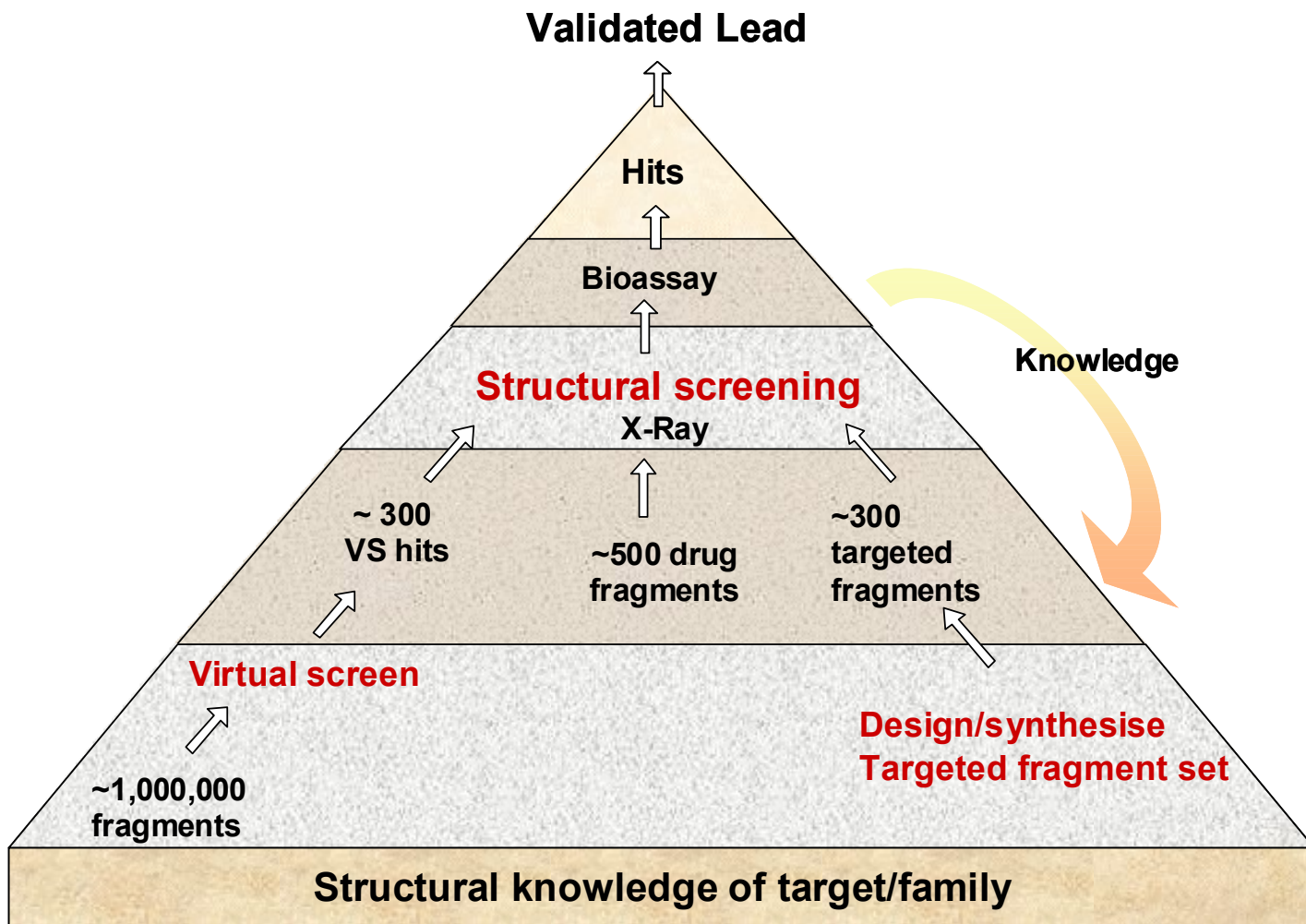
Postranní řetězce



Jak provést „rychle a jednoduše“ zjištění afinity ligandu k cílové struktuře?

a) Ko-krytalizace fragmentu jako ligandu s receptorem/enzymem a určení struktury komplexu rtg. difrakcí

Příklad konkrétního vývojového procesu s využitím fragmentové metody

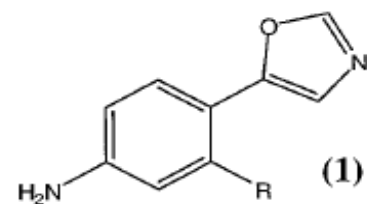


Jak provést „rychle a jednoduše“ zjištění afinity ligandu k cílové struktuře?

## b) Metody využívající NMR

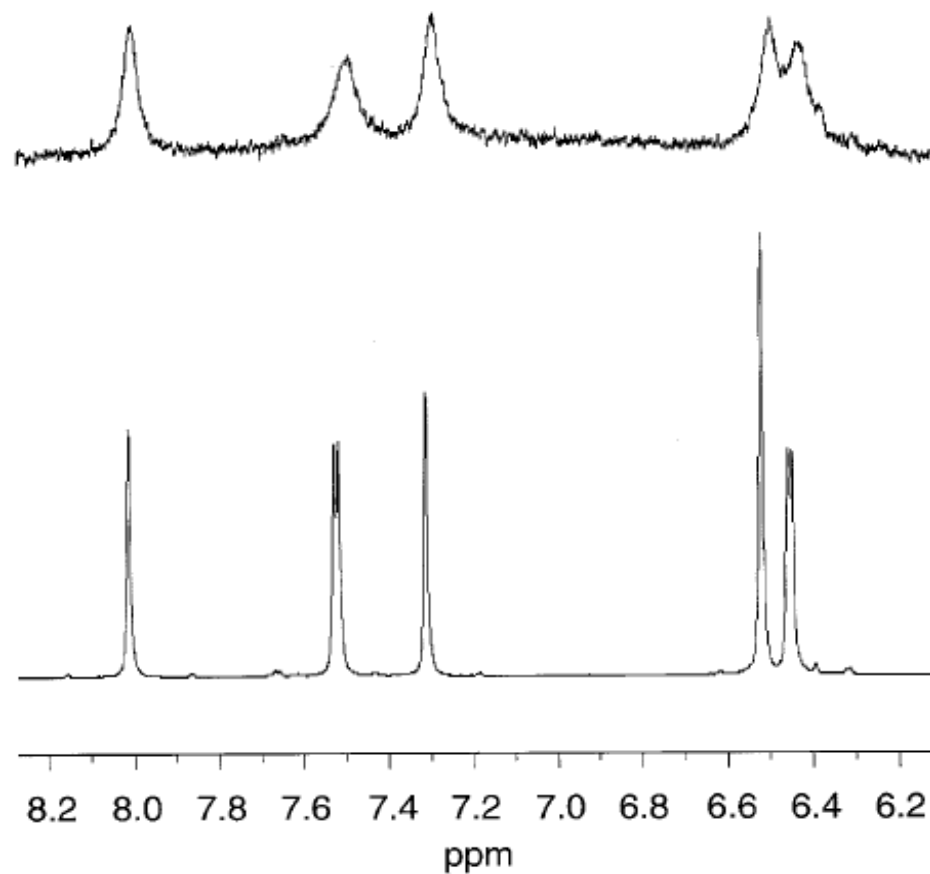
Metoda SHAPES fy Vertex využívá rozšíření linií standardního 1D spektra a přeneseného 2D nukleárního Overhauserova efektu (tNOE) k výběru rozpustných sloučenin nízké  $M_r$  (fragmentů), jež interagují s potenciální cílovou strukturou

- nutná méně početná „knihovna“ (~200) dostatečně rozdílných struktur
- cílová struktura musí být rovněž rozpustná, má-li se použít klasická NMR spektroskopie

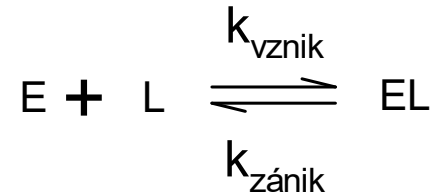


$^1\text{H-NMR}$  spektrum volného ligandu (1) – dole a spektrum stejné látky v přítomnosti inosin-5'-monofosfátdehydrogenasy (protein o  $M_r$  cca 224 000; klíčový enzym pro syntézu guaninového nukleotidu *de novo*)

- významné rozšíření linie spektra indikuje vazbu malé molekuly na protein (šířka signálu v polovině výšky u signálu nejvíce vlevo vzrostla z 3 na 30 Hz)



## Popis rovnováhy protein (enzym) – ligand v NMR – disociačních experimentech



E ... protein (enzym)

L ... ligand

EL ... komplex

$k_{\text{vznik}}$  ... rychlostní konstanta vzniku komplexu

$k_{\text{zánik}}$  ... rychlostní konstanta zániku komplexu

$K_D = k_{\text{vznik}} / k_{\text{zánik}}$  ... disociační konstanta komplexu

•  $k_{\text{vznik}}$  limitována rychlostí difuze, odhadována na  $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$

• ligandy, vážící se „pevně“ ( $K_D \sim 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ ;  $k_{\text{zánik}} \sim 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) podléhají „pomalé výměně“ v horizontu relaxačních časů v NMR; ligandy, vážící se „velmi slabě“ ( $k_{\text{zánik}} > 10^3 \text{ s}^{-1}$ ) podléhají „rychlé výměně“

P ... parametr, jehož změny jsou pozorovány NMR (např. pološířka signálu  $LW_{1/2}$ )

$P_{\text{obs}}$  ... aktuální velikost pozorovaného parametru

$P_{\text{free}}$  ... velikost parametru patřící volné formě

$P_{\text{bound}}$  ... velikost parametru patřící vázané formě

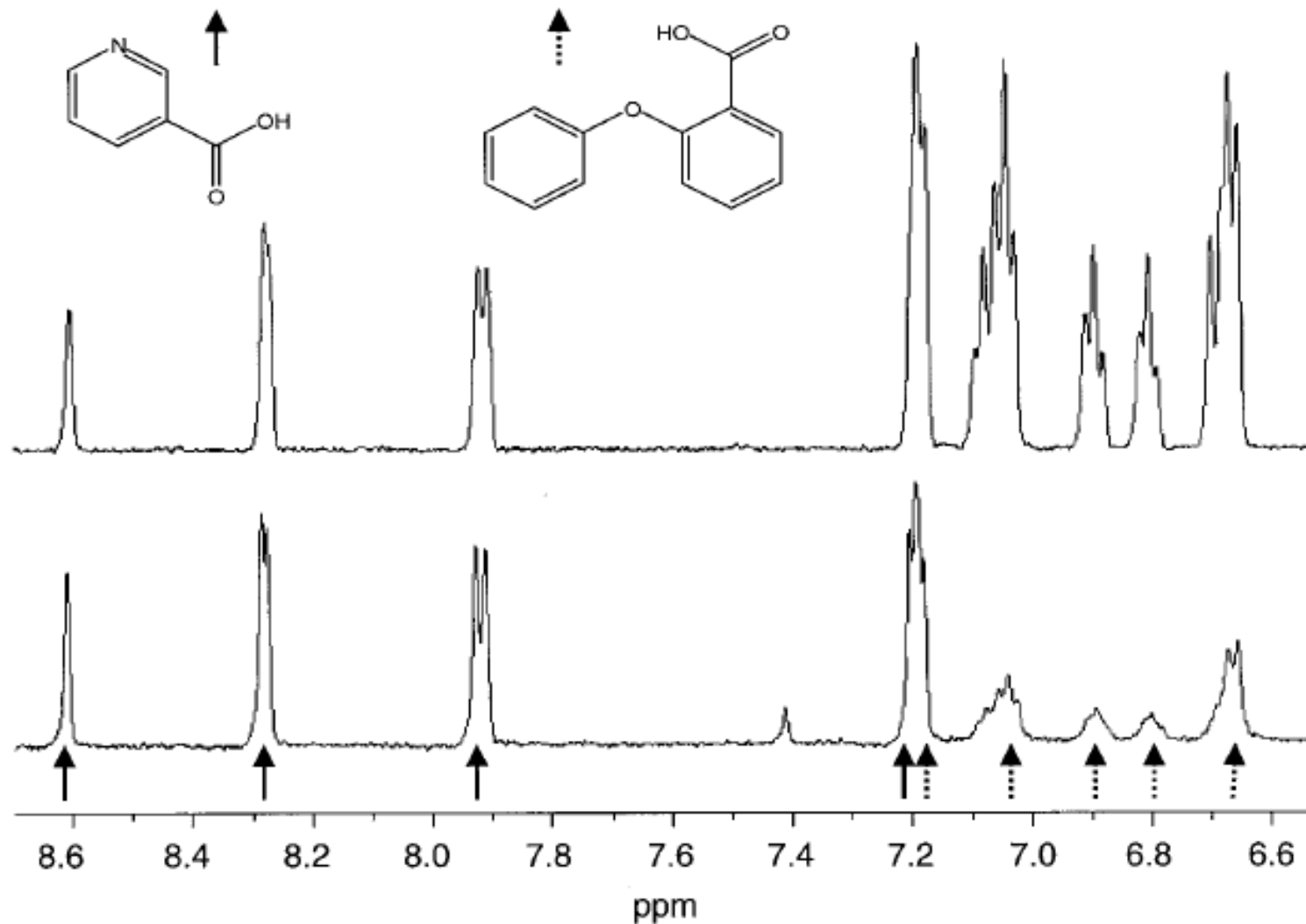
•  $P_{\text{bound}}$  je funkcí koncentrací [E] proteinu a [L] ligandu, poměru těchto koncentrací a disociační konstanty komplexu  $K_D$

Lze napsat

$$P_{\text{obs}} = (1 - p_b)P_{\text{free}} + p_b(P_{\text{bound}}),$$

kde  $p_b$  je frakce (podíl) ligandu ve vázaném stavu

- ligandy podléhající velmi pomalé výměně zůstávají navázané v průběhu celého procesu excitace a relaxace magnetického spinu  $\Rightarrow p_b \sim 1 \Rightarrow P_{\text{obs}} \sim P_{\text{bound}} \Rightarrow$  malá molekula nese NMR charakteristiky celého komplexu ligand – protein
- ligandy podléhající velmi rychlé výměně stačí protein opustit do uplynutí relaxačního času až několiktisíckrát  $\Rightarrow p_b \sim 0 \Rightarrow P_{\text{obs}} \sim P_{\text{free}} \Rightarrow$  signály mají parametry blízké volnému ligandu



<sup>1</sup>H-NMR spektrum dvojice ligandů – nikotinová a 2-fenoxybenzoová kys.

- nahore – spektra směsi samotných kyselin

- dole – stejná směs v přítomnosti p38 kinasy, proteinu o Mr cca 40 000.

(Signály nikotinové kys. plnými šipkami, signály benzoové kys. přerušovanými, signál kolem 7,2 ppm je složen z překrývajících se signálů obou)

•v případě, kdy je obtížné spolehlivě poznat rozšíření linie  $^1\text{H-NMR}$  spektra, lze použít např .

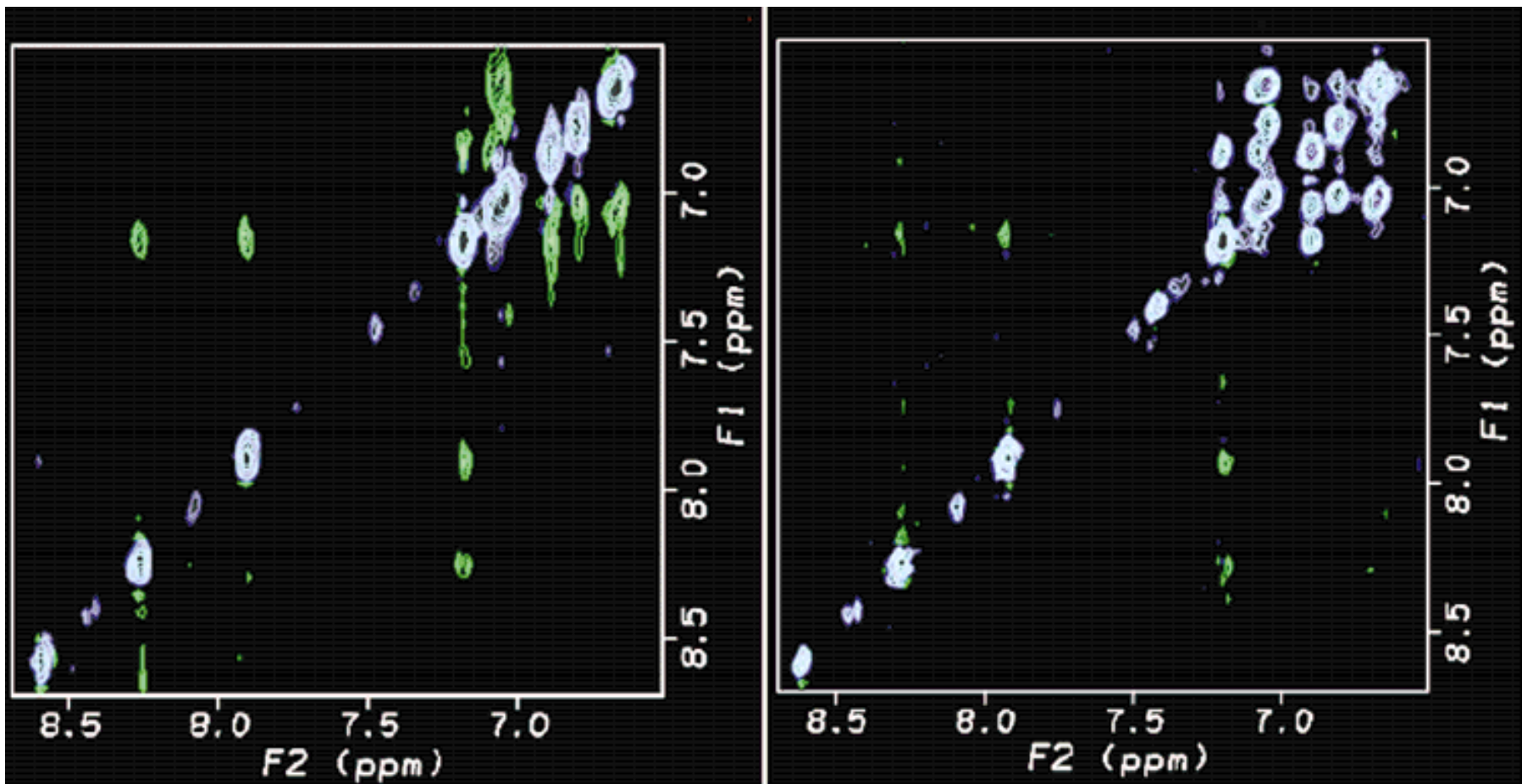
**tNOE (2D přenesený NOE experiment)**

•**NOE** = nukleární Overhauserův efekt, jev, kdy spolu interagují magnetické momenty prostorově blízkých jader jedné sloučeniny nebo i různých sloučenin (tNOE) za následného poklesu intenzity

NMR signálů obou jader

•dvojrozměrné tNOE spektrum = tNOESY

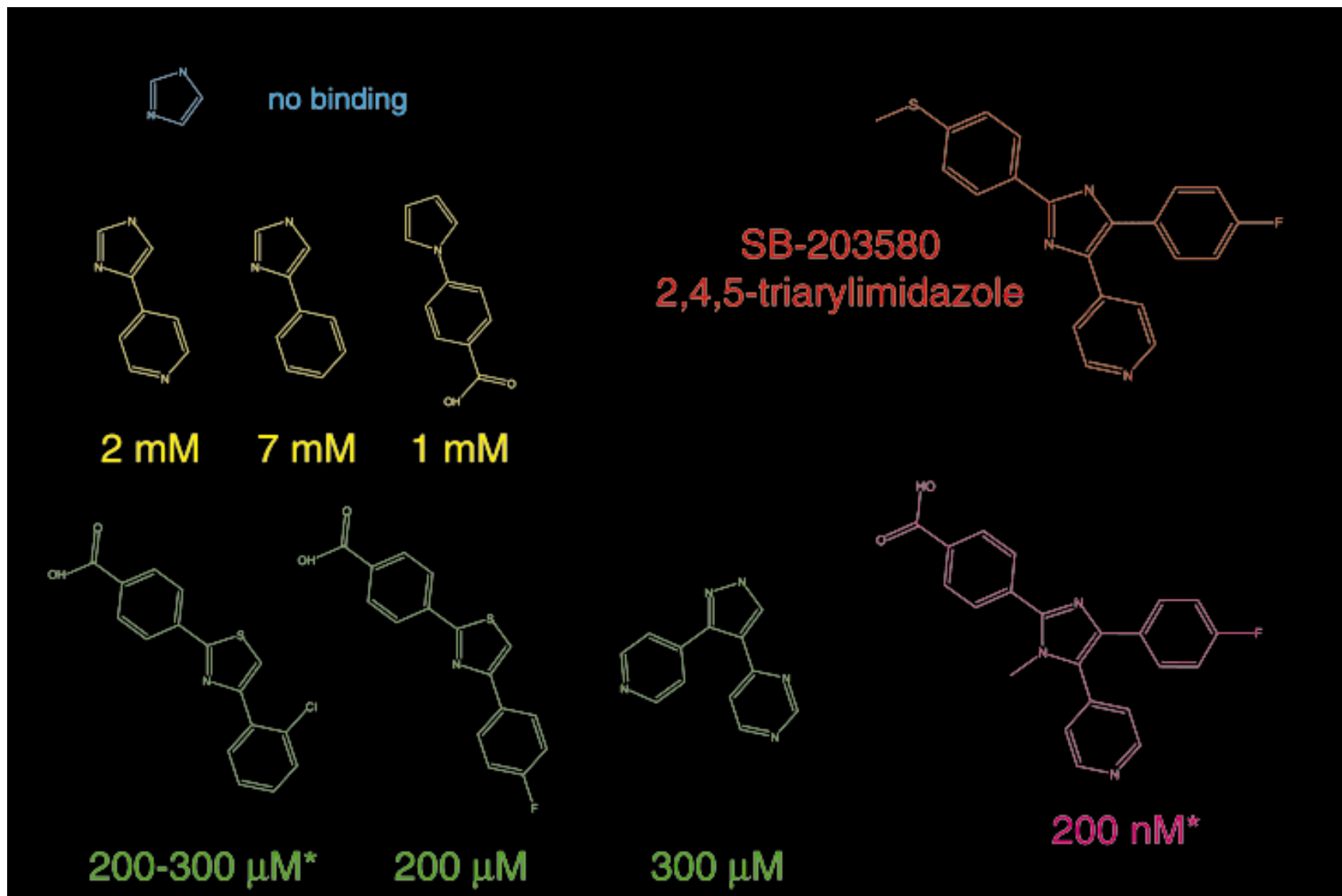




2D-NOESY spektrum stejné směsi jako na předchozím obr.; obrysy pozitivních krosníků jsou zeleně, negativních světle modře.

- vlevo: směs bez proteinu: oba ligandy mají negativní krosníky a pozitivní diagonální pík
- vpravo: směs s proteinem: pro signály při nízkém poli (vlevo) patřící kys. nikotinové zůstávají krosníky v opačné fázi k diagonálním píkům (tj. s opačným znaménkem)  $\Rightarrow$  kys. nikotinová se na protein neváže; pro signály při vysokém poli (vpravo) mají krosníky stejné znaménko jako diagonální píky  $\Rightarrow$  2-fenoxybenzoová kys. se na protein váže
- pík při 7,2 ppm obsahuje překrývající se signály obou kyselin, proto lze při této frekvenci najít pozitivní i negativní pík

Spojování fragmentů se společným skeletem může vést ke vzniku molekul s vysokou afinitou



•disociační konstanty pro p38 byly získány NMR difuzním měřením pomocí rozšiřování spektrální linie a tNOE, s výjimkou slouč. označené\*, zde enzymologicky (mM = mmol.l<sup>-1</sup> apod.)

## Souhrn

Použití designu léčiv založeného na fragmentech doprovázeného různými způsoby detekce může zvýšit šanci na nalezení nových léčiv.

- Výzkum ligandů zacílených na místo účinku a hledání vzorové struktury na základě fragmentů jsou stále v podstatě na začátku, ale jejich šance na úspěch je značná.
- Je zřejmé, že žádná technika není sama o sobě dostačující, a v kombinaci s HTS bude pravděpodobně význam fragmentové metody stále stoupat.