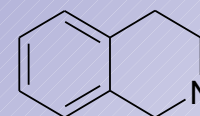
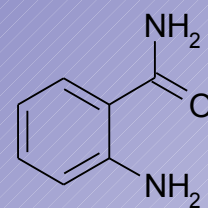
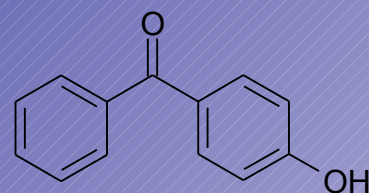
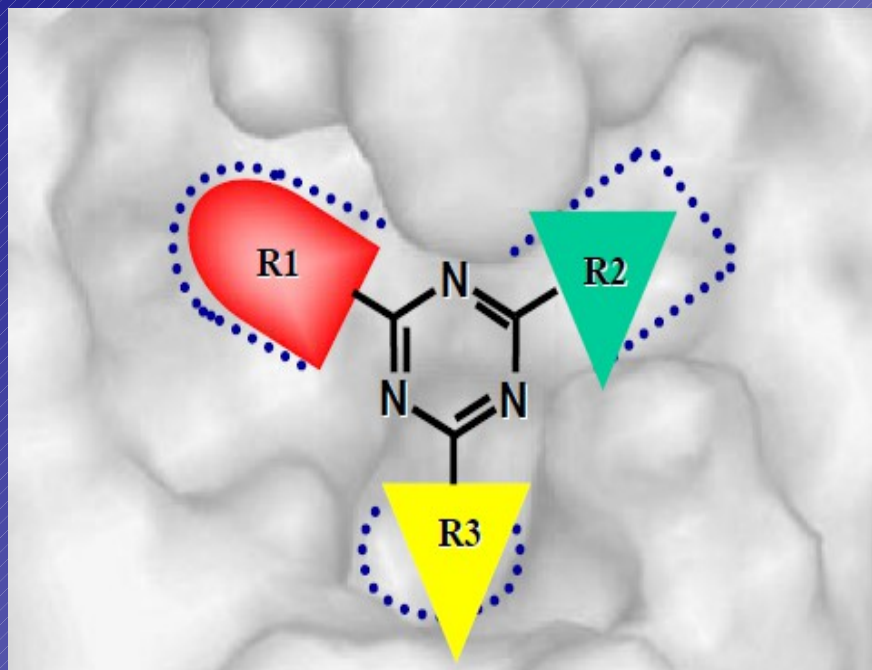


Design léčiv založený na molekulových fragmentech



Design léčiv založený na molekulových fragmentech

- Nový směr zaváděný v posledních 13 letech v předních farmaceutických společnostech nebo specializovaných high-tech. Firmách
- Využívá nejnovějších vědeckých poznatků a technologií z oblastí genetiky, molekulární biologie, proteinové krystalografie a/nebo NMR spektroskopie, bio-informatiky a počítačové chemie (modelování, docking)

Tradiční design léčiv

- Trtadiční recepty a náhodné objevy
- Kombinatorní chemie, přírodní sloučeniny
- Screening (ultra high-throuput screening, HTS), "hit" → "lead compound"
- Knihovny sloučenin - řádově milion sloučenin ve farmaceutických společnostech

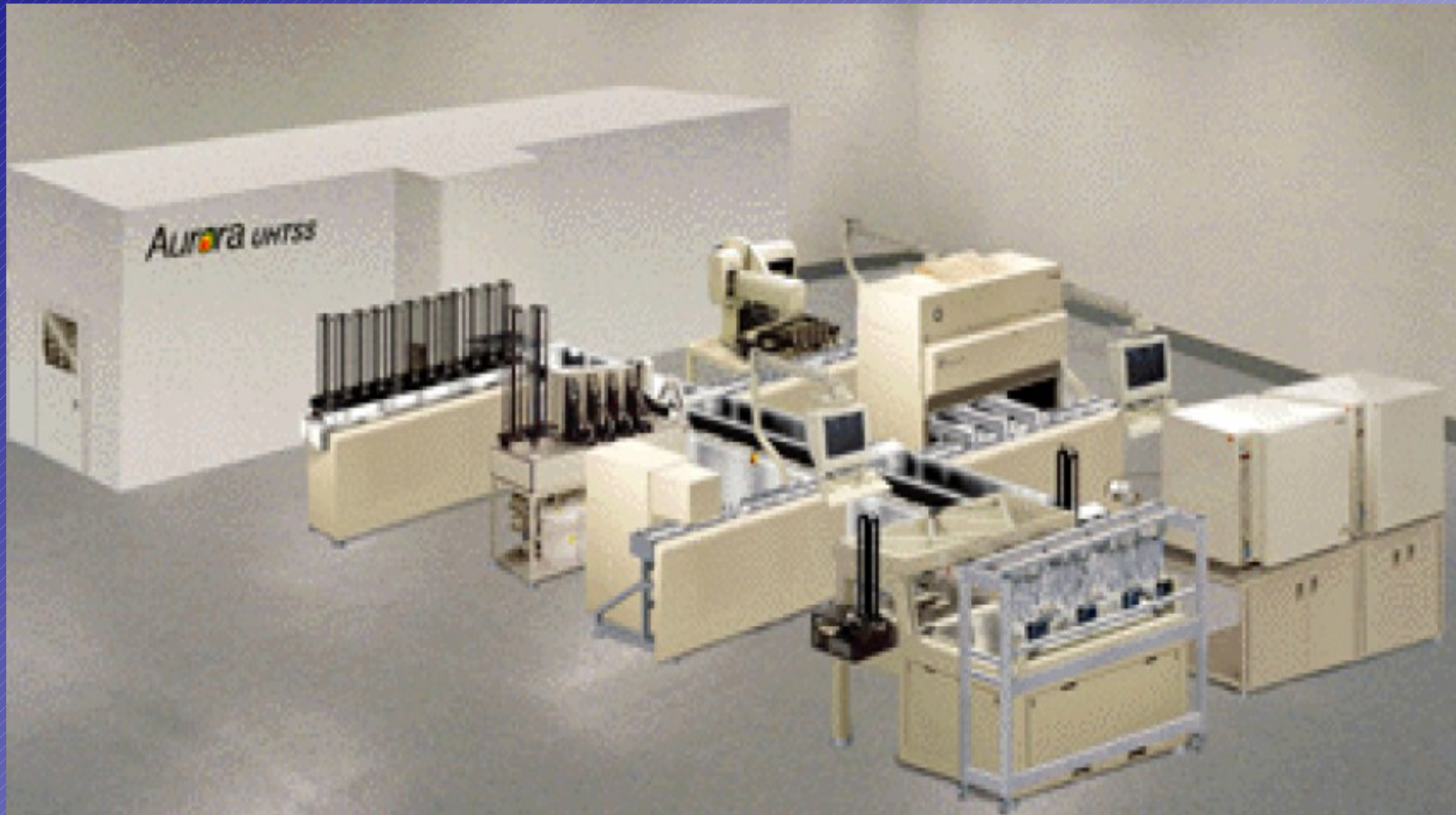
Typické vlastnosti orálních léčiv

- Typická molekulová hmotnost 350-450
- Afinity k proteinu, inhibice IC₅₀ 50 nM
- Pravidlo 5-ti
- Definovaný počet rotačních vazeb
- Optimalizace léčiva je provázena obvykle zvyšováním mol. hmotnosti

Pravidlo 5

- Ch.A.Lipinski, 1997. Orální léčiva.
- Ne více než 5 vodíkových donorů (OH, NH)
- Ne více než 10 (2x5) HB akceptorů (N a O atomy)
- Molekulová hmotnost pod 500
- ClogP pod 5

High-Throughput Screening, HTS

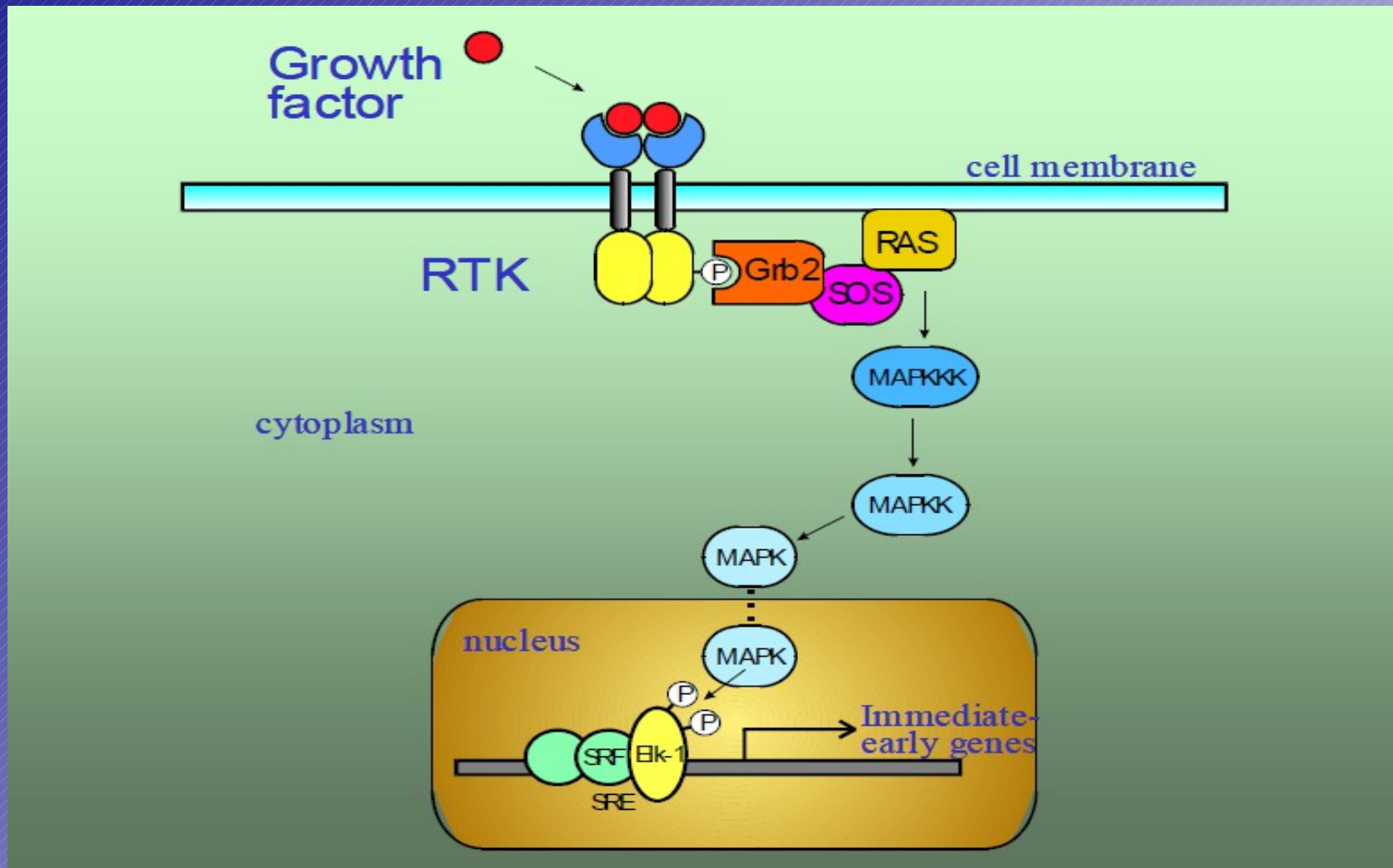


Je potřebný screening až milionu sloučenin aby se pozorovala nějaká aktivita vůči proteinu vázaného na nějakou nemoc

Limity HTS

- Automaty. Složitá a nákladná metoda
- Málo produktivní - vysoká "úmrtnost" hitů
- Knihovna sloučenin - zlomek chemického prostoru (drug-like space). 30 nevodíkových atomů - 1060 sloučenin
- Nepřinesla snížení nákladů NCE/(milión \$)
- Na 5000 sloučenin, pouze 5 - klinické pokusy
- Z těch pouze 5-20% jde na trh.
- Náklady \$800 mil.

Cíle – objekty (targets)



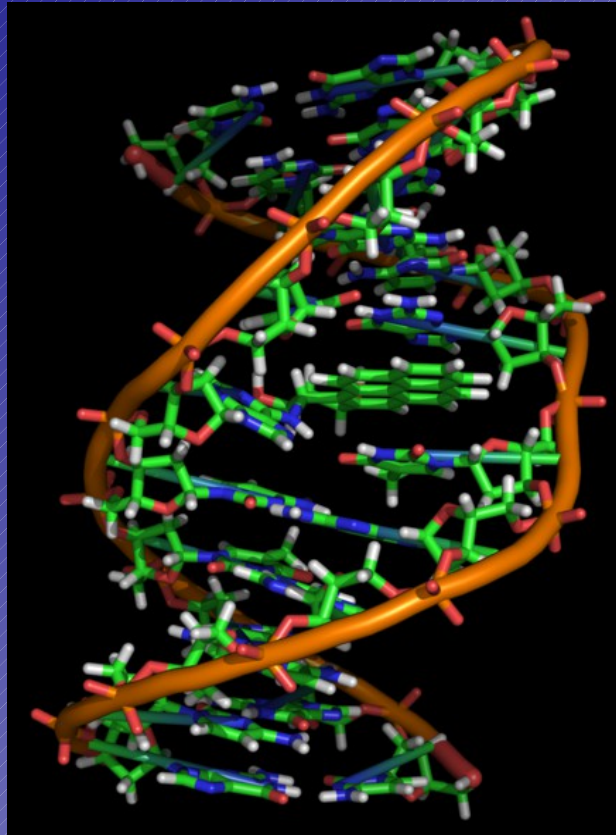
Cíle – objekty (targets)

- Často slabé binární komplexy vedou k stabilním multiproteinovým komplexům.
- Mnoho objektů je možné nalézt mezi multiproteinovými komplexy buňkové signalizace a regulace

Genomika

- „Human genome project“ mapuje geny lidské DNA.
- Ve všeobecnosti věříme, že toto poznání bude poskytovat daleko více potenciálních proteinových cílů.
- Strukturní genomika – funkce genu, určená ze struktury

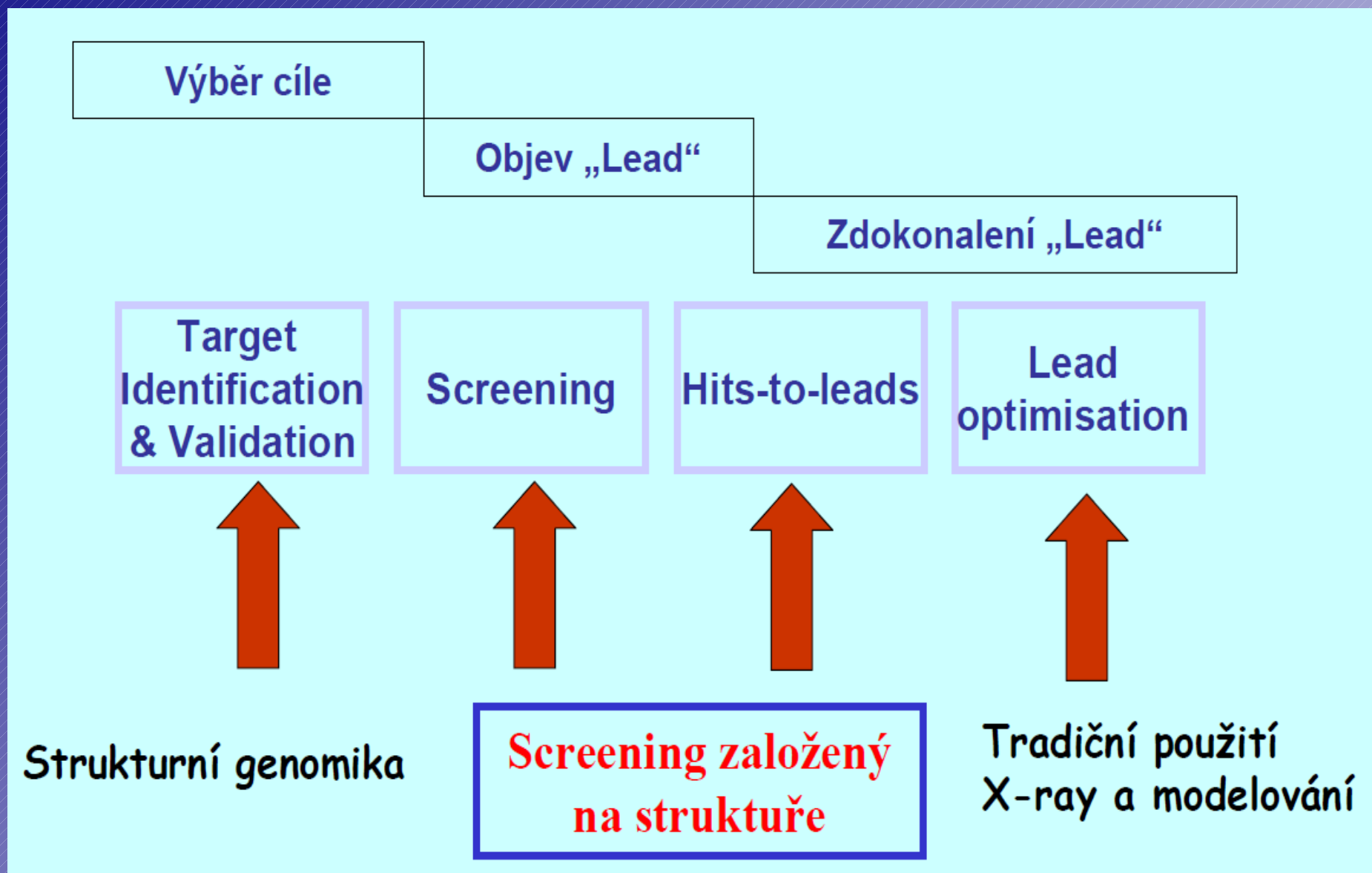
Genomika



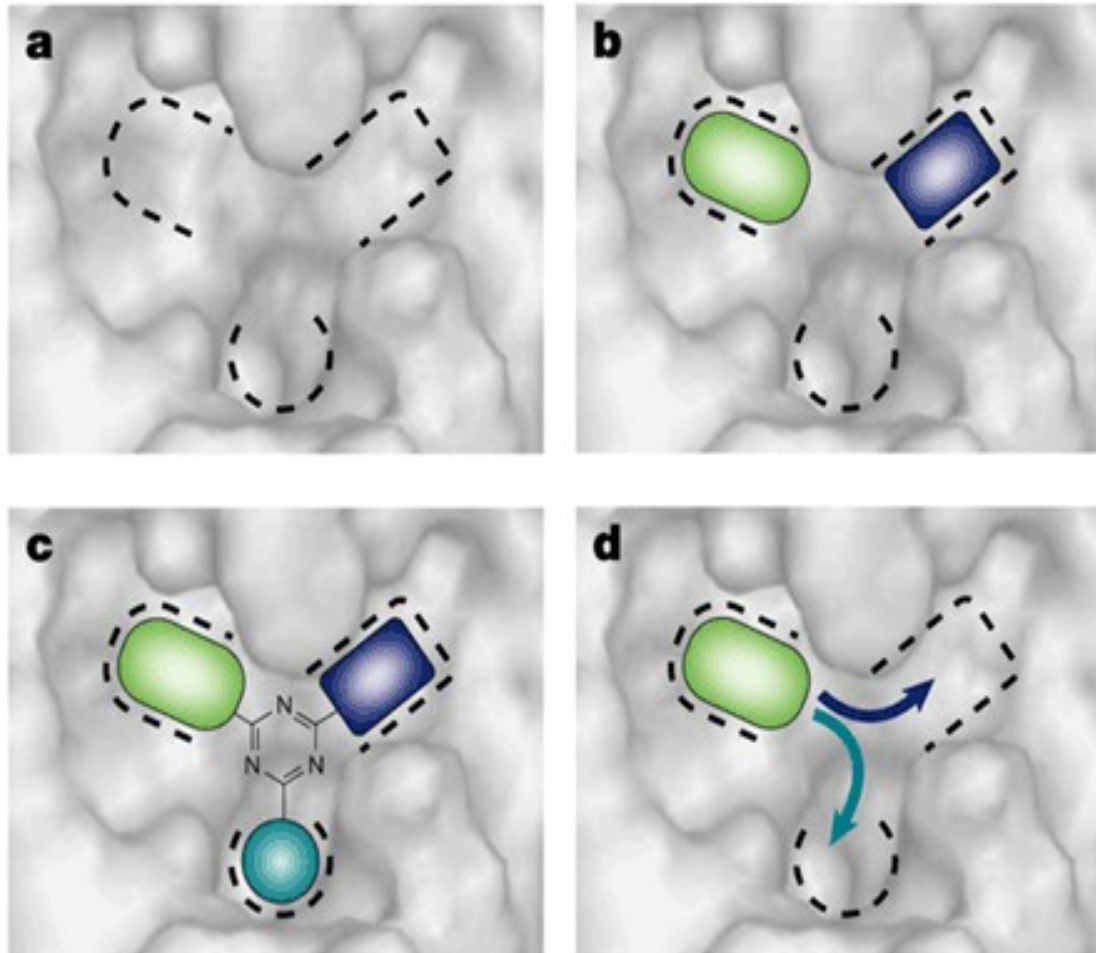
Identifikace cílů

- Funkční genomika - identifikace potenciálních terapeutických proteinových cílů - obrovské množství cílů
- Strukturní genomika - hledá vztahy mezi sekvencí a strukturou a vztah mezi strukturou a biologickou funkcí
- Konstantní růst PDB.

Strukturní biologie a objevy léčiv



Metoda fragmentů



Definice fragmentu

- Men.islou.enina (Pravidlo 3. Men. ne. 300 Da. Typicky 150-250. ClogP 3, ne vice ne. 3 HB donory a akceptory.
- St.edni urove. afinity ($100\mu\text{M}$ -1mM)
- HTS. Men.i knihovna slou.enin, men.i afinita. (Graffinity knihovna - 20 000 fragment., 40nmol/slou.enina).
- Biofyzikalni screening: NMR, X-ray, MS
- Ligand-protein vazebna mista

Výhody metody fragmentů

- Menší knihovna pokryje větší část chemického prostoru.
- 100 fragmentů (při třech fragmentech na sloučeninu) pokryje 1 milion kombinací
- Fragment je možné identifikovat pomocí proteinové krystalografie i když biologický screening nedává hit kvůli nedostatečné funkčnosti
- Fragmenty je možné hledat "in silico" např. pomocí programu GOLD (virtual screening) v aktivním místě

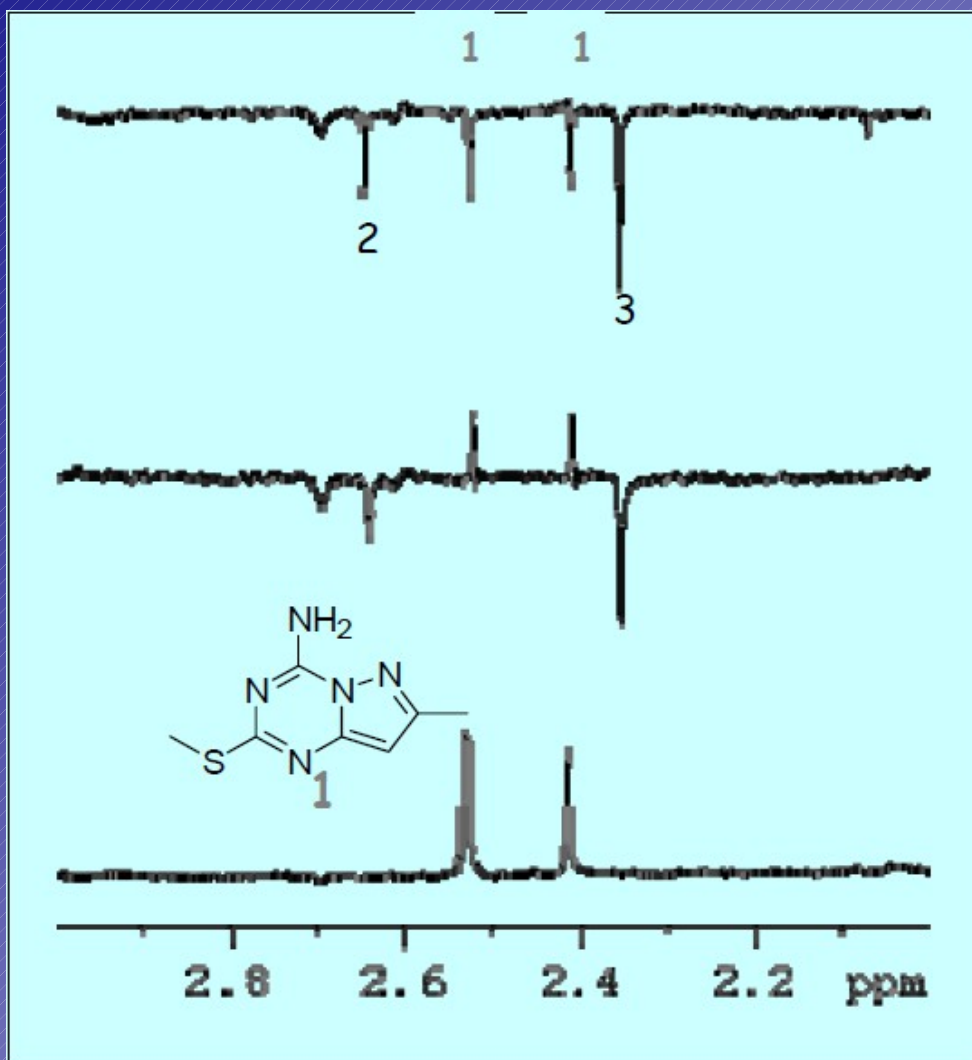
Screening

- Screening fragmentů proti proteinovým objektům (targets)
 - Používají se následující techniky:
 - rtg. krystalografie (proteinová krystalografie)
 - NMR spektroskopie (Water LOGSY)
 - Isotermální titrační kalorimetrie
 - Surface plasmon resonance
 - Nekovalentní hmotnostní spektroskopie (MS)
- Screening

NMR Screening

- NMR je nejproduktivnější metoda
- SAR pomocí NMR, (SAR = structure activity relationship)
- Interpretace je někdy subjektivní
- Není dostatečně automatická
- Abbott laboratories, Novartis, Vertex Pharmaceuticals, Hoffmann-La Roche, Triad Therapeutics

NMR screening



koktejl tří fragmentů 0.5 mM

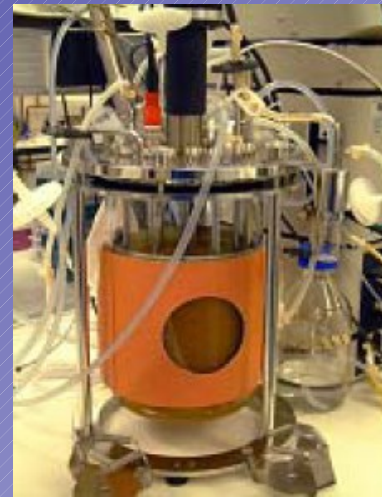
+ enzyme 20 mM

Pouze fragment 1 + enzyme (diference)

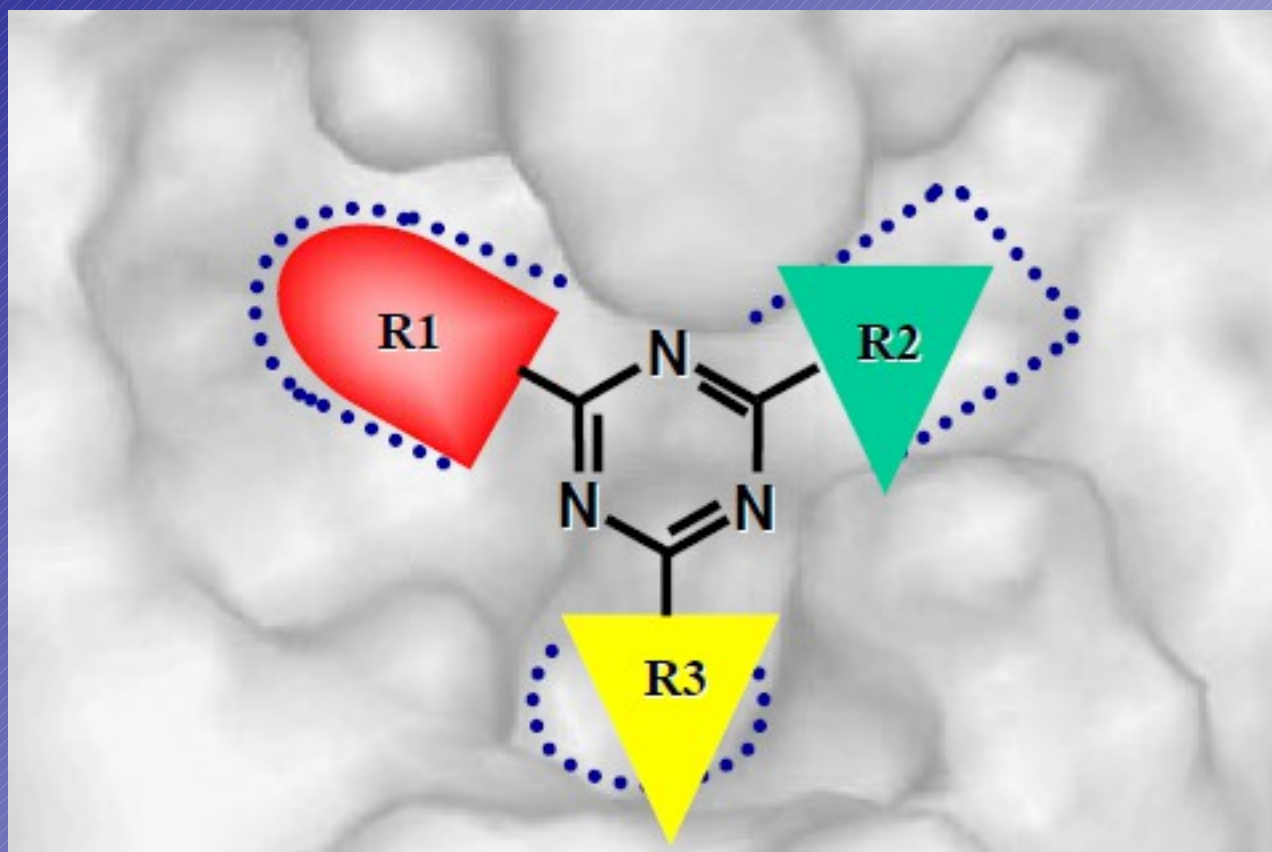
X-ray screening

- Nejlepší na studium interakcí protein-ligand
- Vysoký stupeň automatizace
- Vizualizace interakcí fragmentu s objektem, možnost počítačového do-modelování
- Vyloučí se nespecifická afinita. V krystale se vazba uskutečňuje na každou molekulu
- Potřeba synchrotronu
- Astex Therapeutics (Technology), Abbott Laboratories, Structural GenomiX (SD CA)

Astex facilities



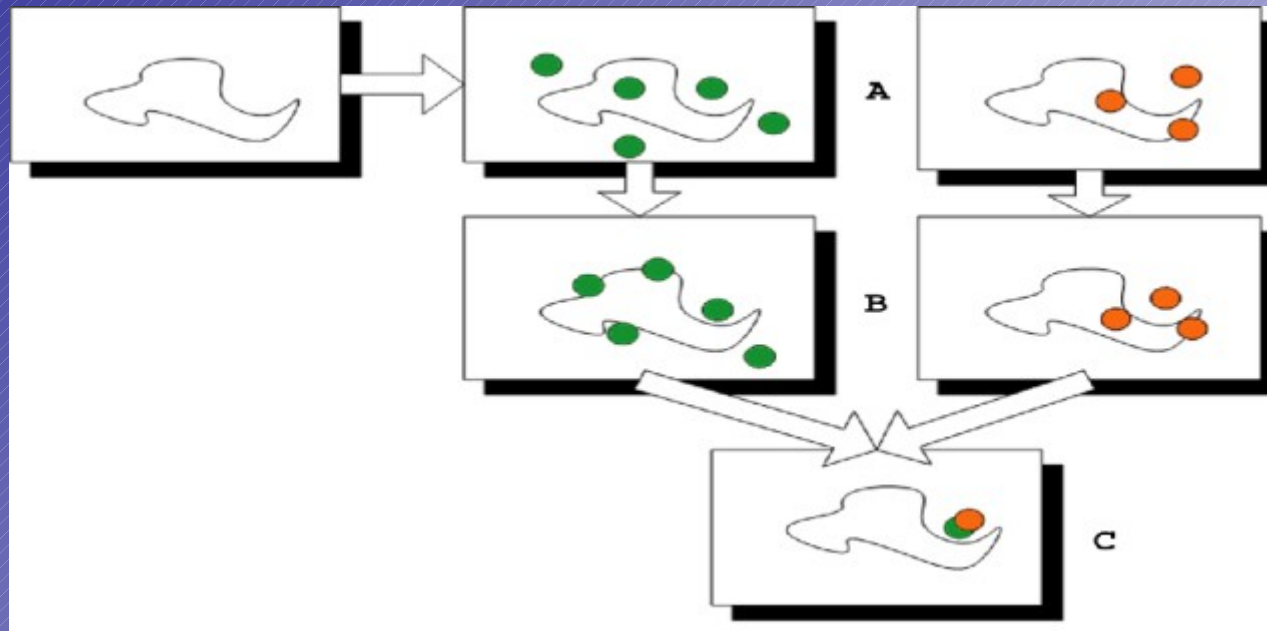
Strukturní screening fragmentů



Strukturní screening fragmentů

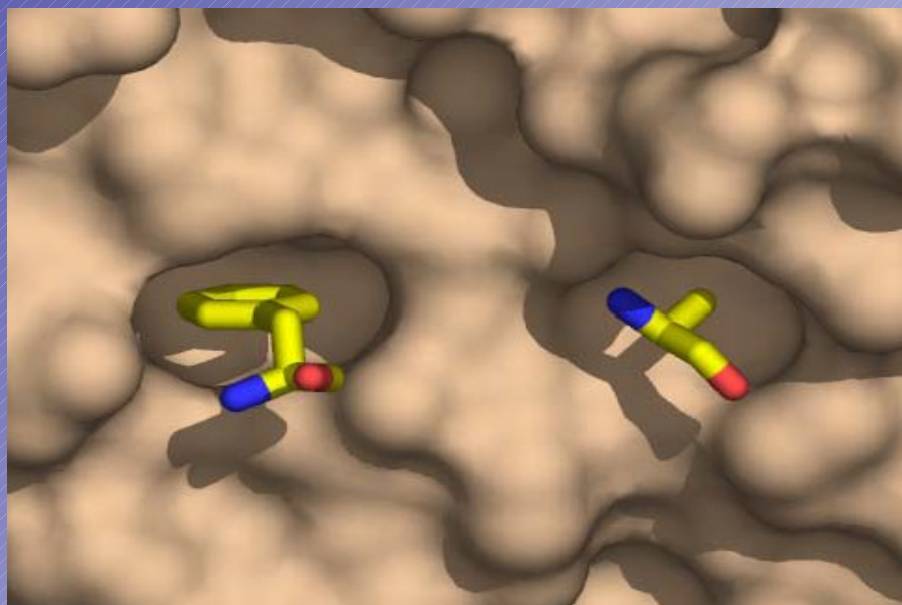
- $100R1 \times 100R2 \times 100R3 = 1,000,000$ cmpds
- Vyšší pravděpodobnost úspěchu
- Nalezení nových struktur (mM)
- Kvalitní data o zkoumané struktuře (validate/prioritise the hits)
- Rychlá optimalizace struktury
- Velký prostor k optimalizaci

X-ray screening



X-ray screening

- 4-10 sloučenin na koktejl Koncentrace 25-50mM na sloučeninu Krystal se pomůže do koktejlu Krystal si vybere sám aktivní sloučeninu



Identifikace v elektronové hustotě

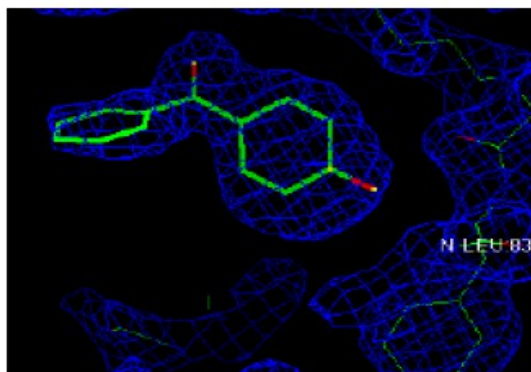
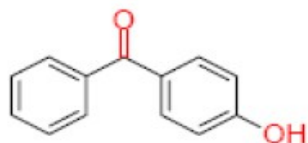
Cdk2 Hit Generation

Drug Fragment Set + targeted library (~600 cmpds)

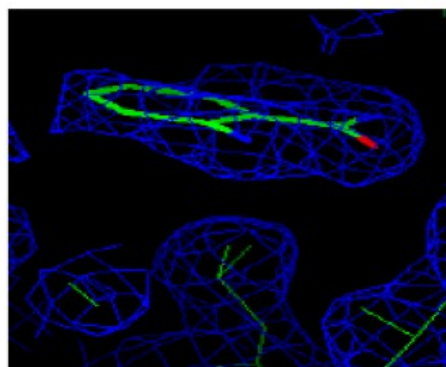
>25 confirmed hits

Structurally diverse - would not detect with HTS

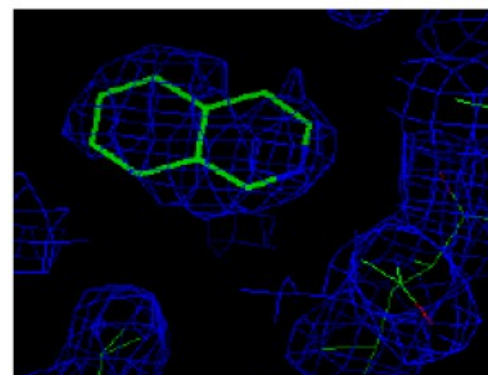
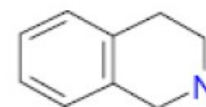
AT2202 29%



AT2282 28%



AT402 88%



(% inhibitions at 1mM)

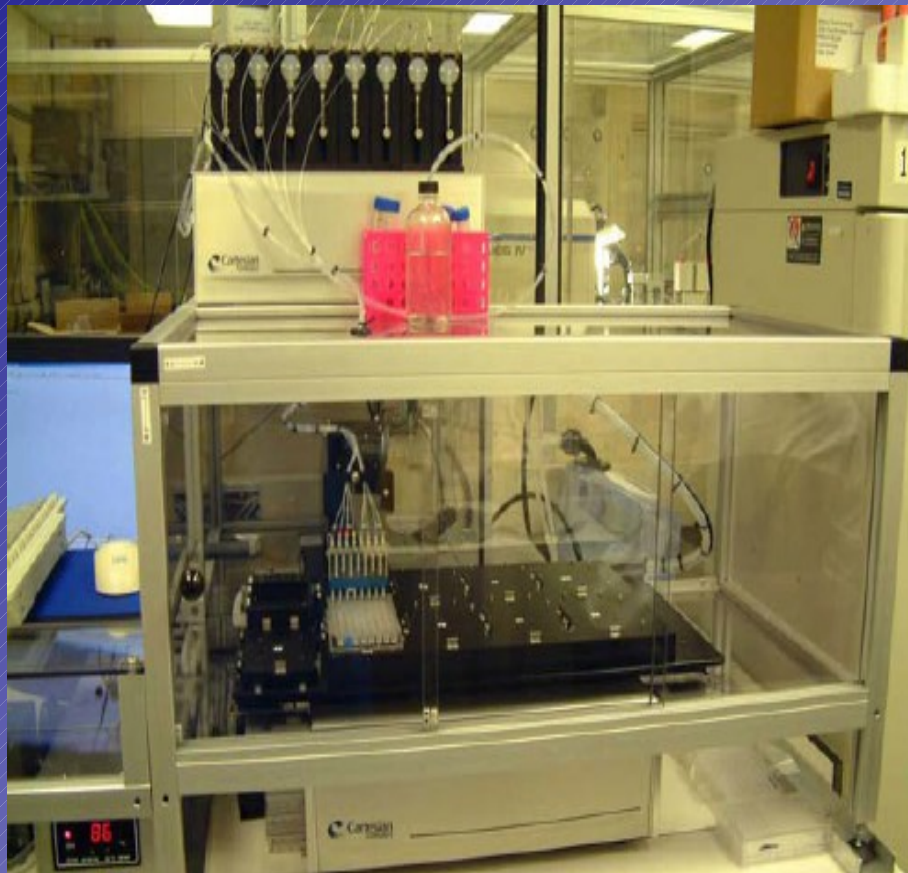
Definice X-ray procesu

- Potřeba 10-100 mg purifikovaného proteinu.
Počet proteinových krystalů 100.
- Každý krystal se nasákne (soaking) koktejlem z 5-10 fragmentů.
- Krystal se namontuje, rychle zmrazí (flash cooling, cryo-crystallography)

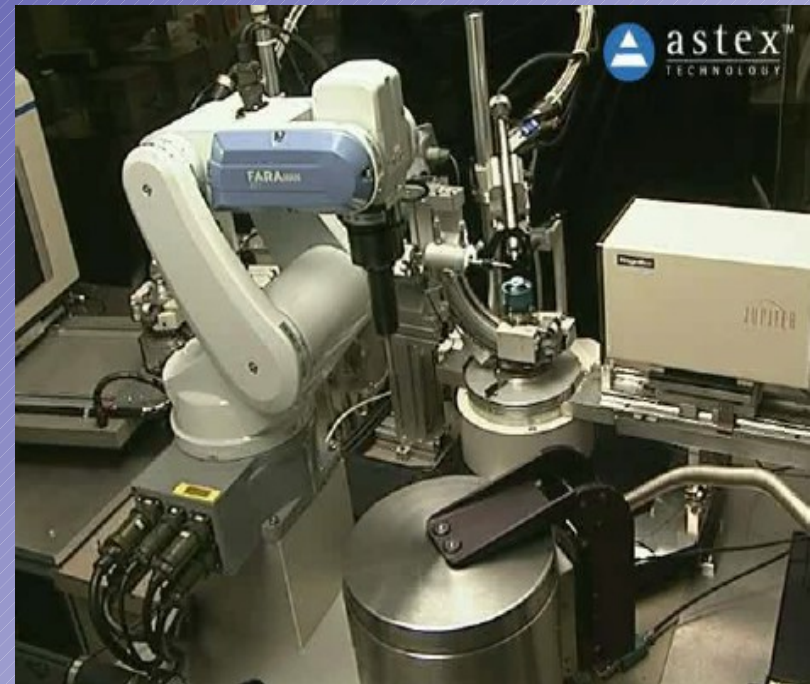
Definice X-ray procesu (pokračování)

- provede se automatické, vysokorychlostní difrakční měření a zpracování dat na synchrotronu (v Argonne National Lab. je možné provést X-ray screen 1000 sloučenin v průběhu 24-48 hodin)
- Rozumné rychlosti je možné dosáhnout i pomocí nových generátorů s optickou fokusací (54 krystalů/80h na Rigaku FR-E Superbright).
- Navázání fragmentu se projeví změnou difrakčního obrazce. Diferenční mapa ukáže navázaný ligand

Krystalizační protokol (PixSys)



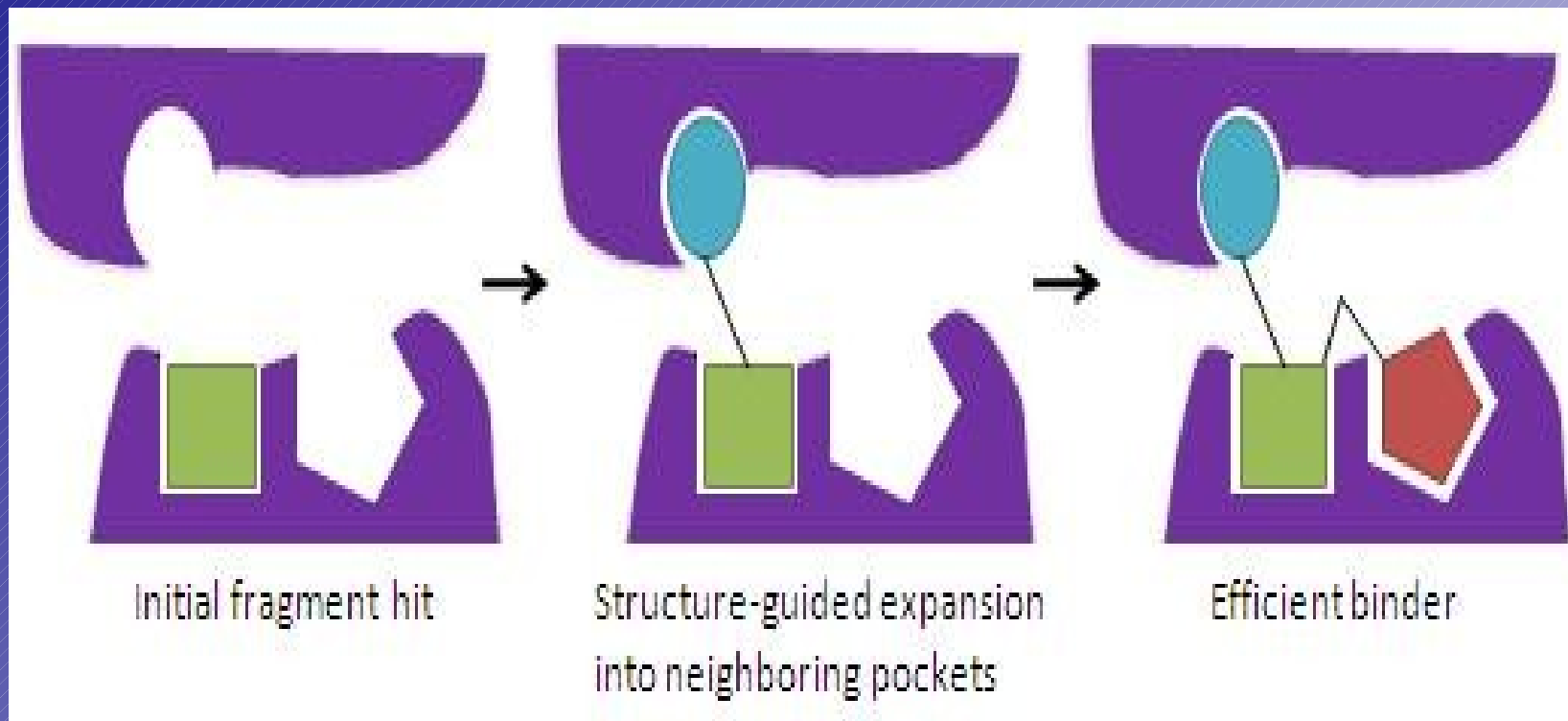
Astex facilities – X-ray analysis



Spojování a optimalizace fragmentů

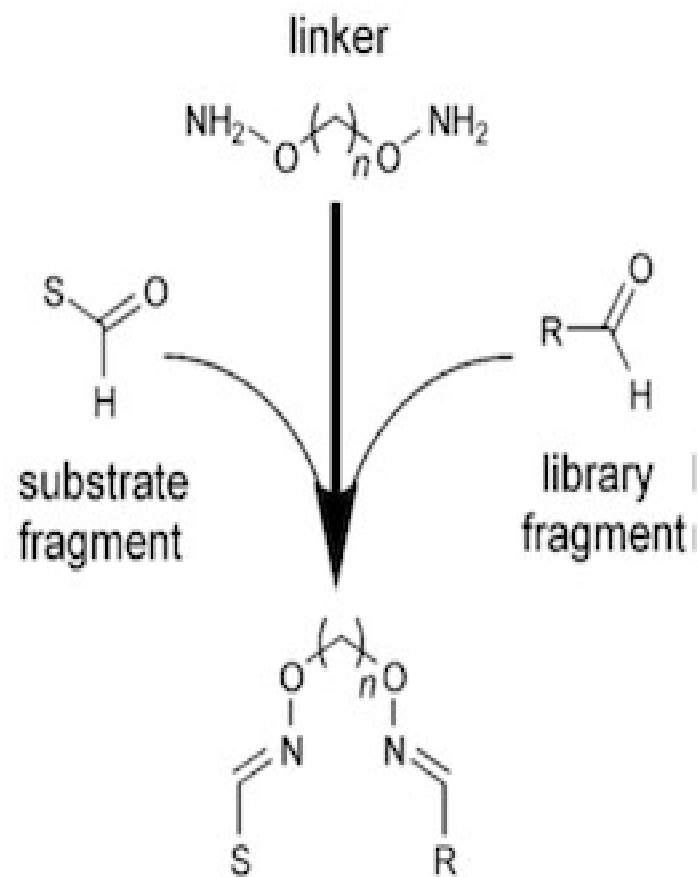
- Dva různé fragmenty v dvou různých polohách aktivního místa. Spojovací molekula (spacer)
- Self-assembly - samospojování v aktivním místě (templátová metoda). Protein katalyzuje syntézu vlastního inhibitoru, případně si sám vyselektuje fragmenty, které se dají spojit.
- Mapování vazebných míst receptoru pomocí specializovaných malých fragmentů pro SAR (analogie prób v GOLD).
- Spojením fragmentů se získá na entropii.
- Potence se zvýší o 3-5 řádů. Fragment → lead.

Spojování a optimalizace fragmentů

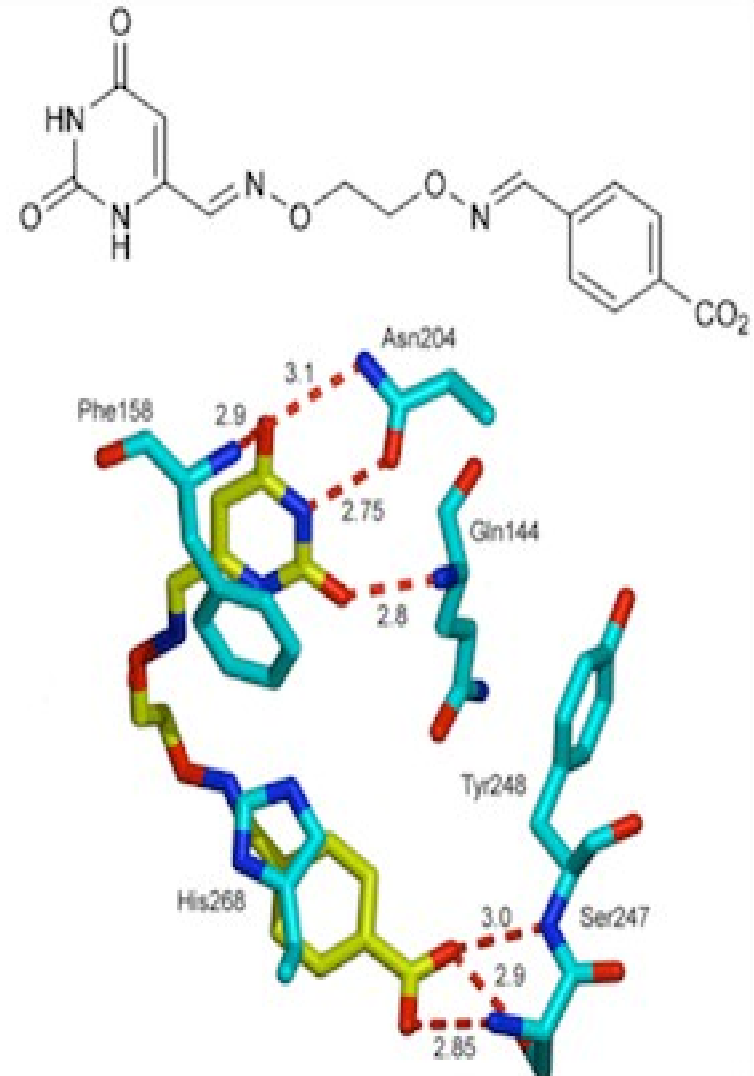


Spojování a optimalizace fragmentů

a



b



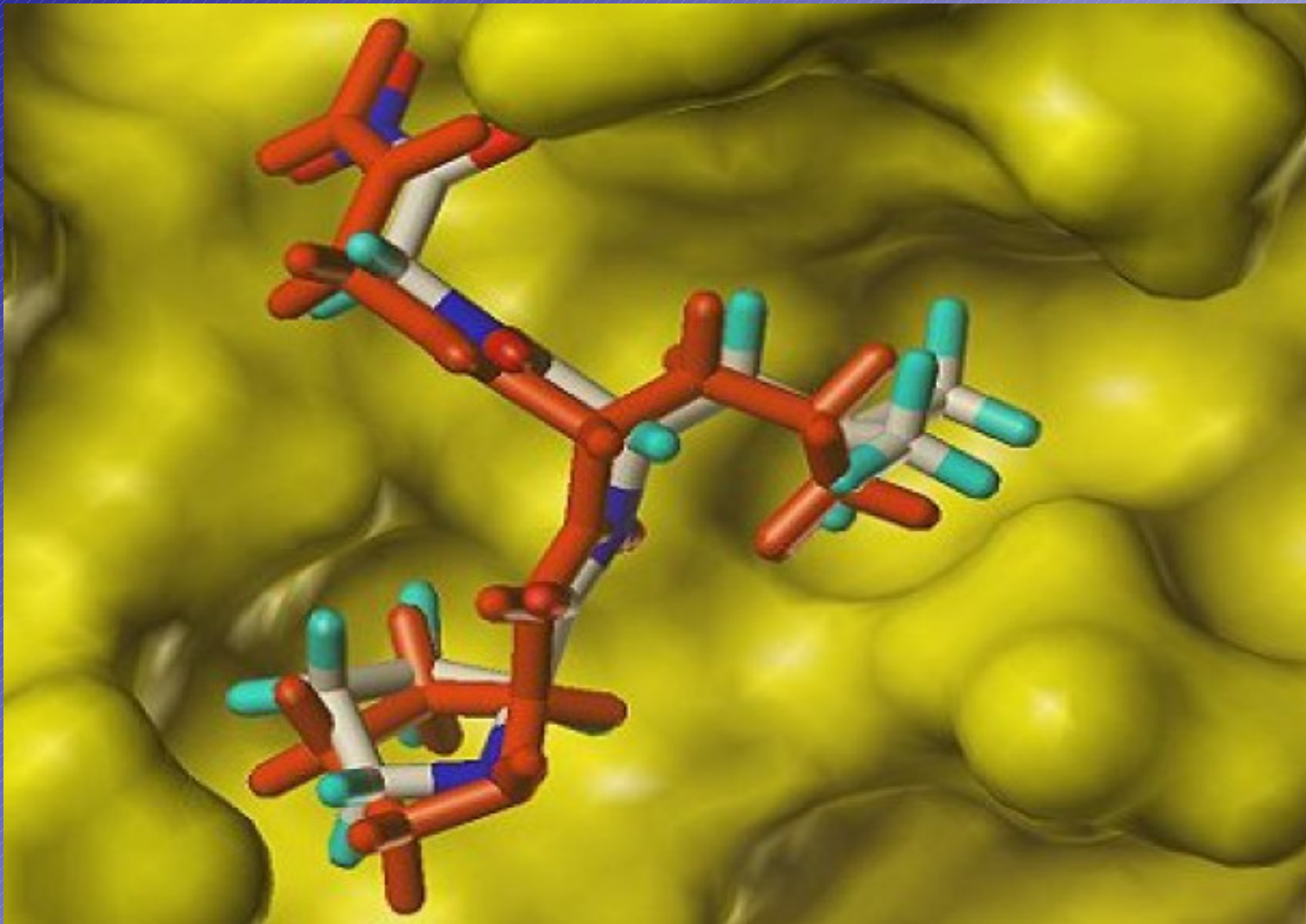
Optimalizace

- Znalost způsobu, jak se fragment váže na proteinový cíl umožňuje fragment zvětšovat.
- Používají se počítačové metody
- Docking
- „Experimentální“ metody Isostar, Superstar, Gold suite

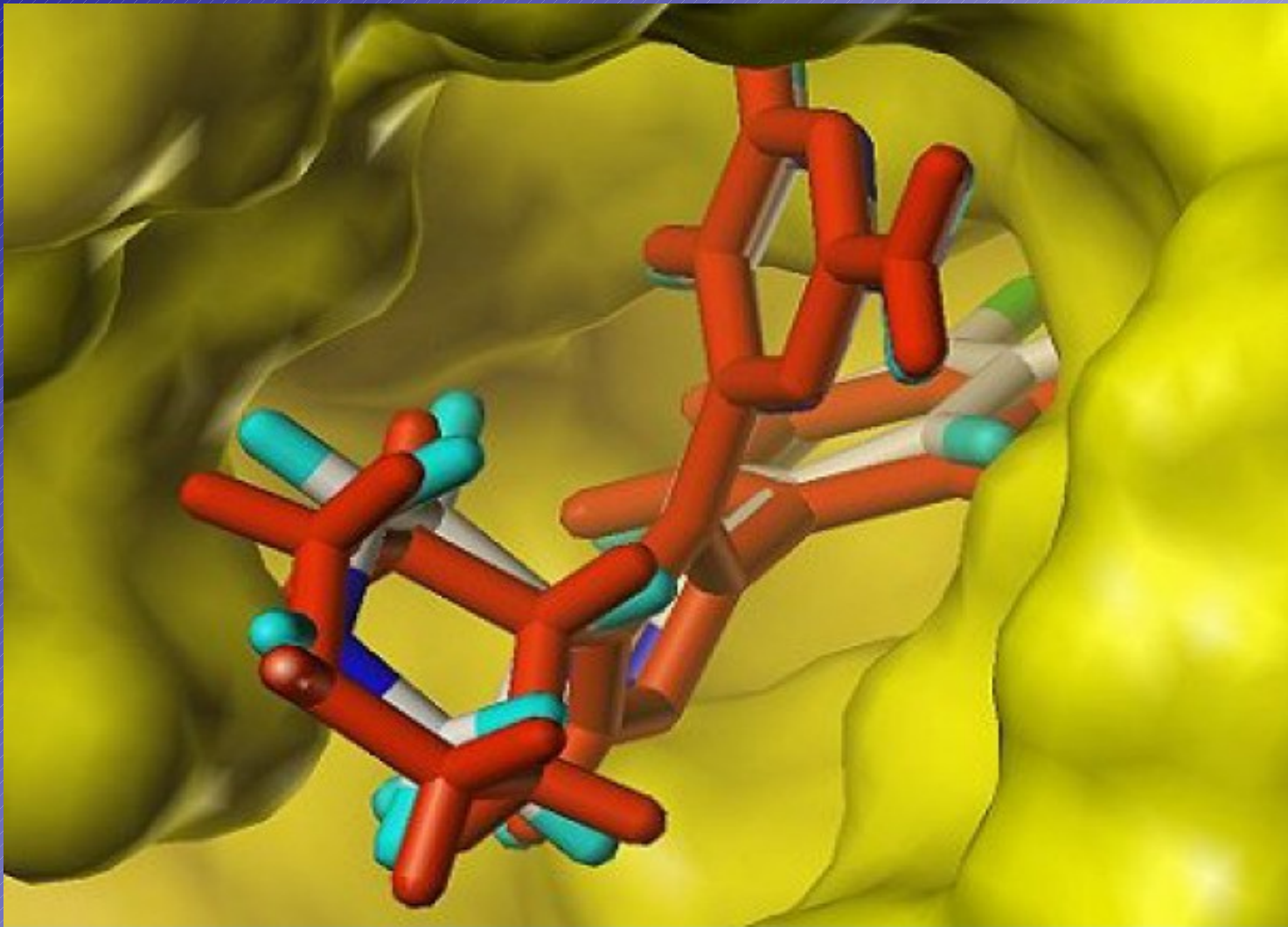
Gold - docking

- Protein-ligand docking
- GlaxoSmithKline, U.Sheffield, CCDC
- Úplná flexibilita ligandu, parciální proteinu
- Energetické funkce založené na IsoStar
- Diskriminace mezi aktivními a neaktivními sloučeninami
- Goldmine – decriptors (obsazený objem...)

Gold - docking



Gold - docking



Výhody a nevýhody

- Malý fragment má větší šanci, že se lépe zabuduje do vazebného místa cílového proteinu, než hotová molekula.
- Fragmenty mají vyšší vazebnou energii na jednotku hmotnosti.
- Screening malých fragmentů vede k většímu počtu "hitů". Počet fragmentů je na úrovni 100 - 1000 (v porovnání s milionem u HTS).

Výhody a nevýhody

- "Leads" z fragmentů mají nižší úmrtnost. 70% hitů z HTS selže, 80% FSDD hitů je úspěšných.
- Umožňuje objevit "lead", kde HTS selhal
- Je možné získat lead mimo oblast standardní databáze a tím získat sloučeninu, která je patentovatelná.