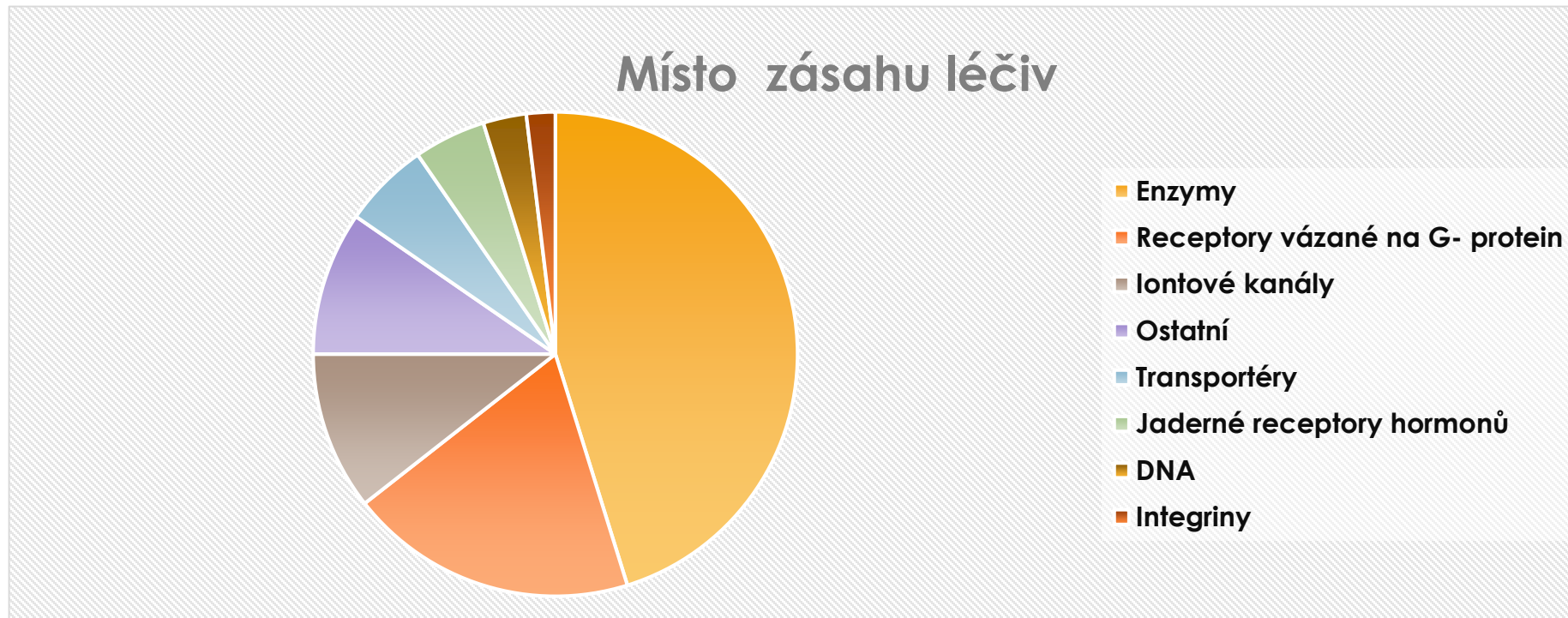


Enzymy jako místa zásahu léčiv

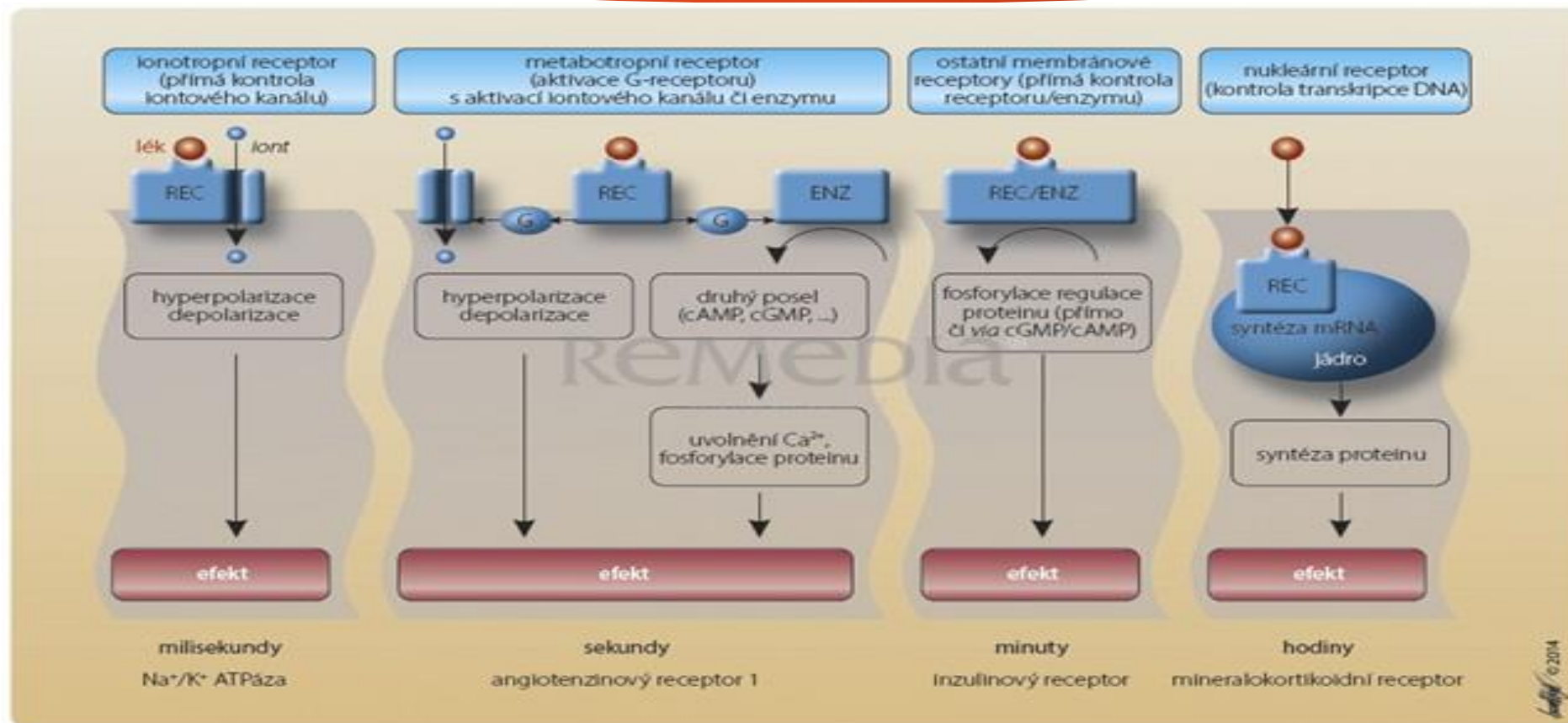
**Jaké je nejčastější místo
zásahu léčiv?**

Působení léčiv



A. L. Hopkins and C. R. Groom, Nature Rev. Drug Discov. 1, 727-730 (2002)

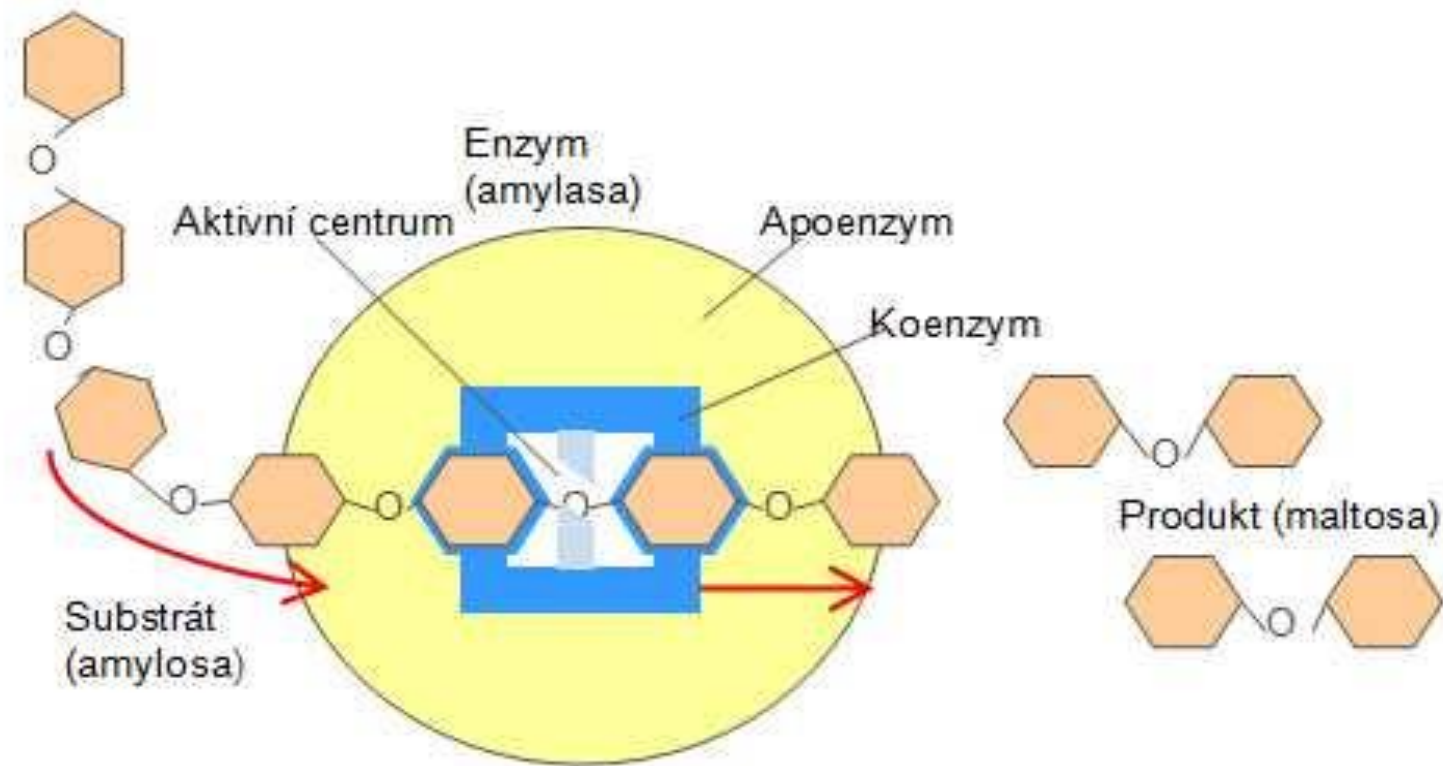
Místo zásahu léčiv





Co jsou to enzymy?

Schematické znázornění struktury a působení enzymu (amylasy)



Skupiny enzymů

- ▶ **Oxidoreduktázy – katalyzují oxidačně-redukční reakce**
- ▶ **Transferázy - přenášejí funkční skupiny (například methyl-, acetyl- nebo fosfátovou skupinu)**
- ▶ **Hydrolázy - katalyzují hydrolýzu chemických vazeb**
- ▶ **Lyázy - štěpí chemické vazby jiným způsobem než hydrolýzou**
- ▶ **Izomerázy - katalyzují izomerizační reakce**
- ▶ **Ligázy - spojují dvě molekuly kovalentní vazbou**

Charakter vztahu enzym a léčivo

▶ Inhibitor?

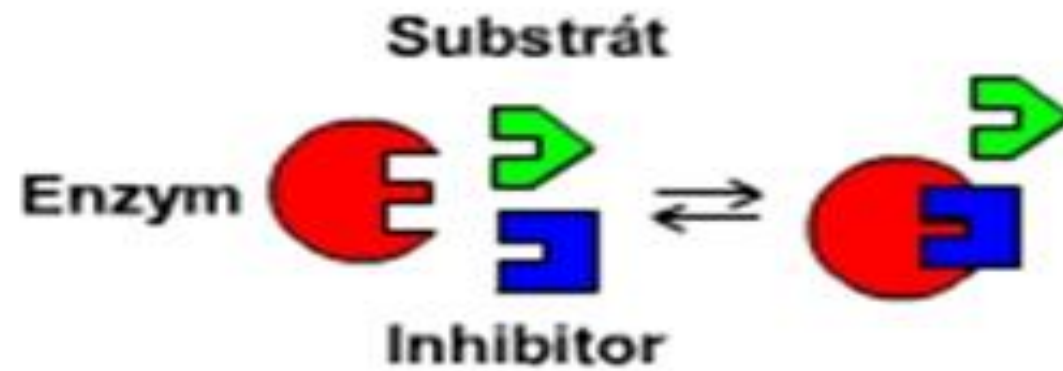
▶ Aktivátor?

Inhibice enzymu

- ▶ **Reverzibilní (Vratná) inhibice**
 - ▶ **Kompetitivní inhibice**
 - ▶ **Nekompetitivní**
 - ▶ **Akompetitivní**
- ▶ **Ireverzibilní (Nevratná) inhibice**

Inhibice enzymu

- ▶ Reverzibilní inhibice
 - ▶ Kompetitivní inhibice

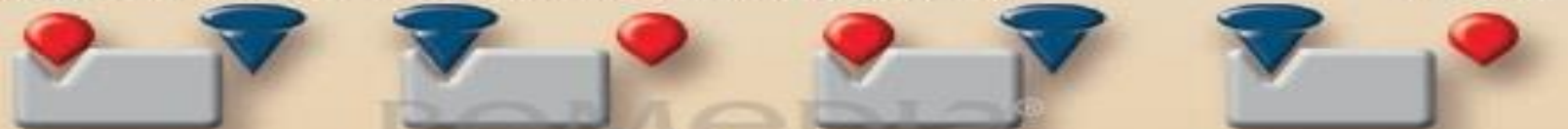


Kompetitivní inhibice enzymu – rychlost reakce závisí na poměru inhibitoru a substrátu.

fyziologický průběh reakce



vyrovnaný poměr inhibitoru a substrátu – zpomalení reakce



nadbytek inhibitoru – výrazné zpomalení reakce

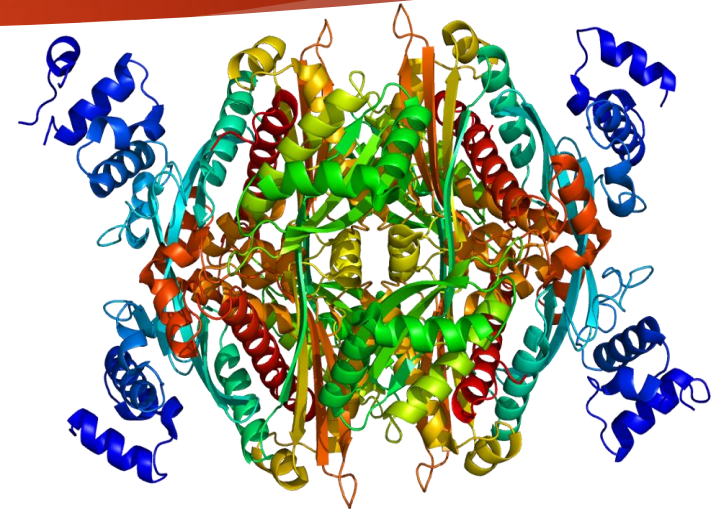


nadbytek substrátu – vytěsnění inhibitoru, rychlost reakce se obnoví



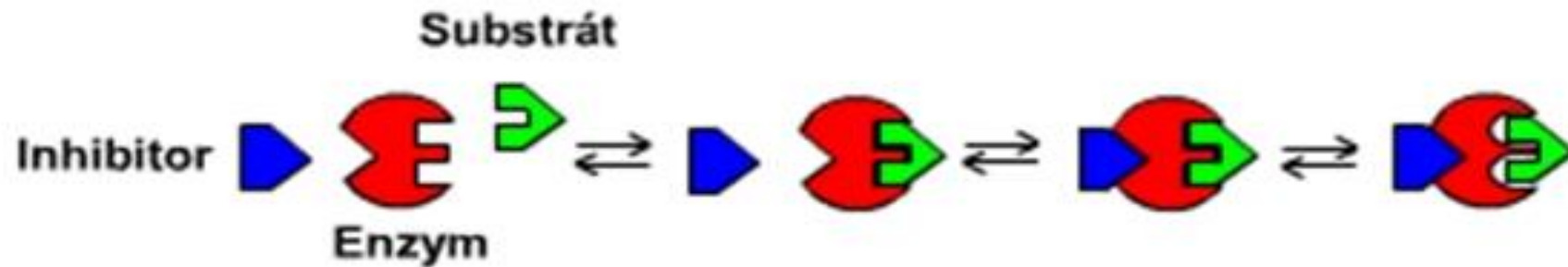
Inhibice enzymu

- ▶ Reverzibilní inhibice
 - ▶ Kompetitivní inhibice
 - ▶ Příklad: **HMG-CoA reductasa**



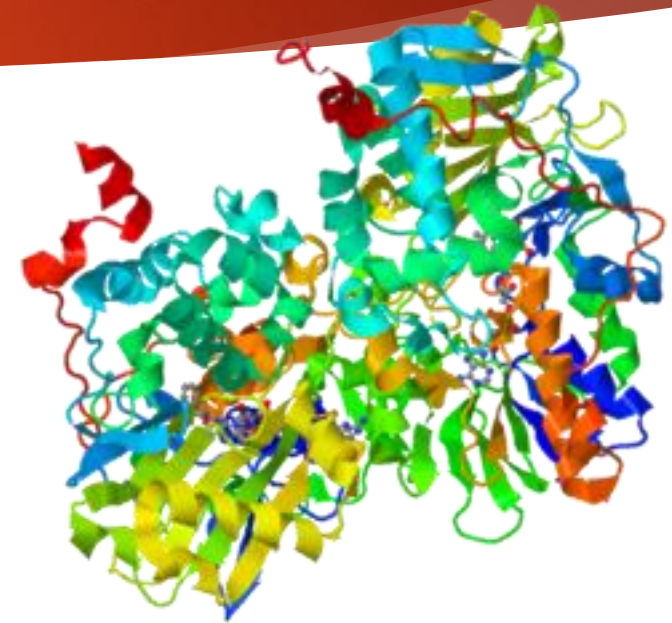
Inhibice enzymu

- ▶ Reverzibilní (Vratná) inhibice
 - ▶ Nekompetitivní inhibice



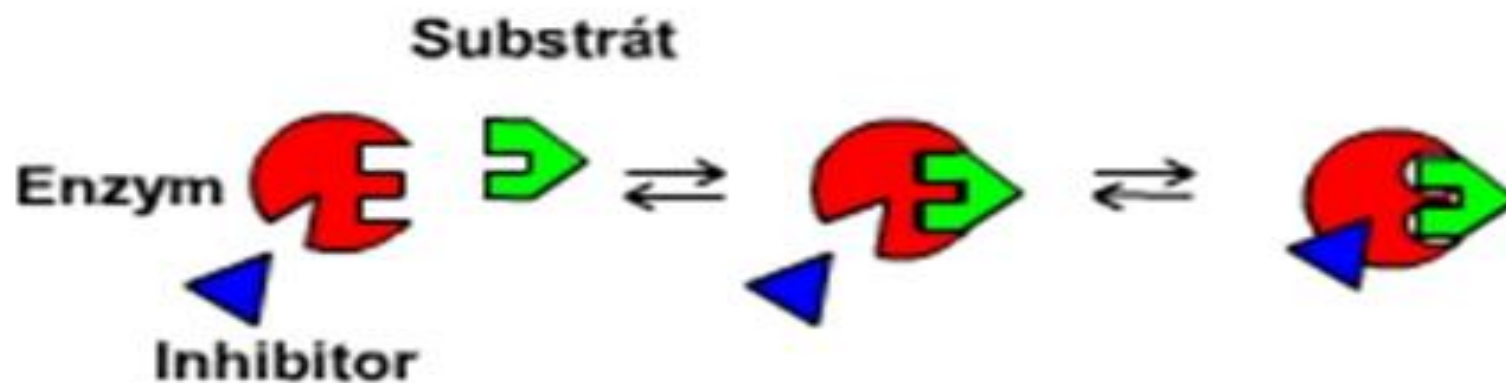
Inhibice enzymu

- ▶ Reverzibilní (Vratná) inhibice
 - ▶ Nekompetitivní inhibice
 - ▶ Příklad: Monoaminoxidasa (MAO)



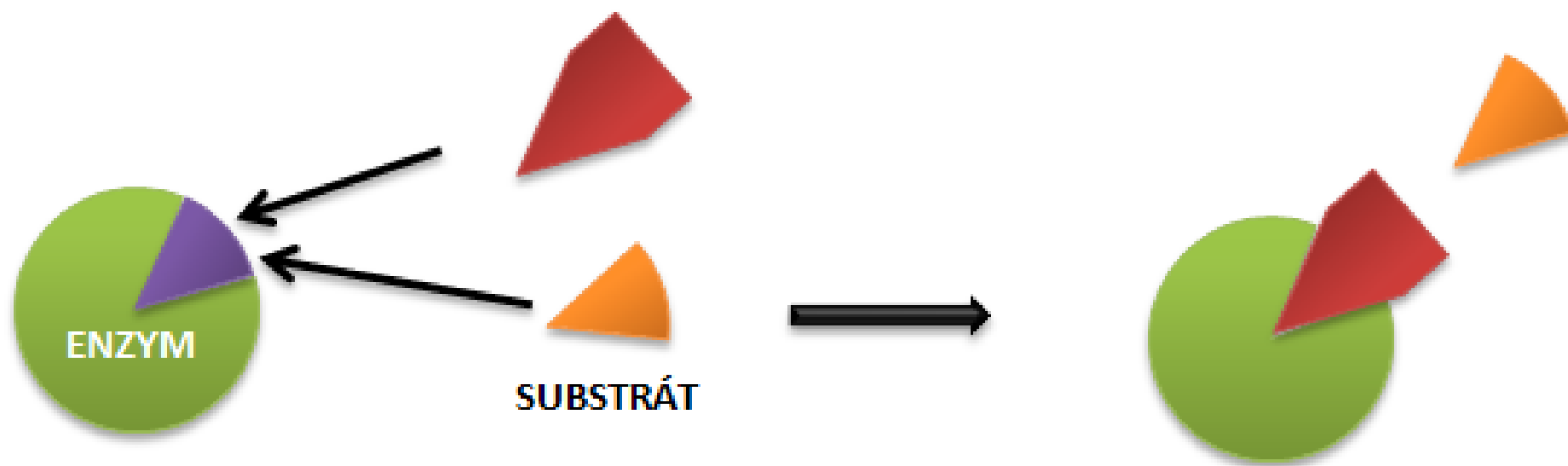
Inhibice enzymu

- ▶ Reverzibilní (Vratná) inhibice
 - ▶ Akompetitivní inhibice



Inhibice enzymu

Ireverzibilní (Nevratná) inhibice

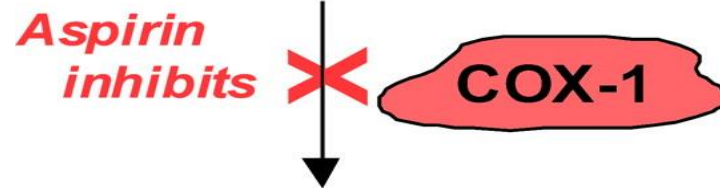


Inhibice enzymu

Ireverzibilní (Nevratná) inhibice

Stimulated Platelets

Arachidonic Acid



PG-G/H

Thromboxane synthase

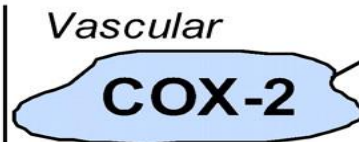
Thromboxane

*** Pro-thrombotic**

Vasculature
[Aspirin acetylation-dependent]

Arachidonic Acid

Aspirin acetylates



15R-HETE

Leukocytes
5-lipoxygenase

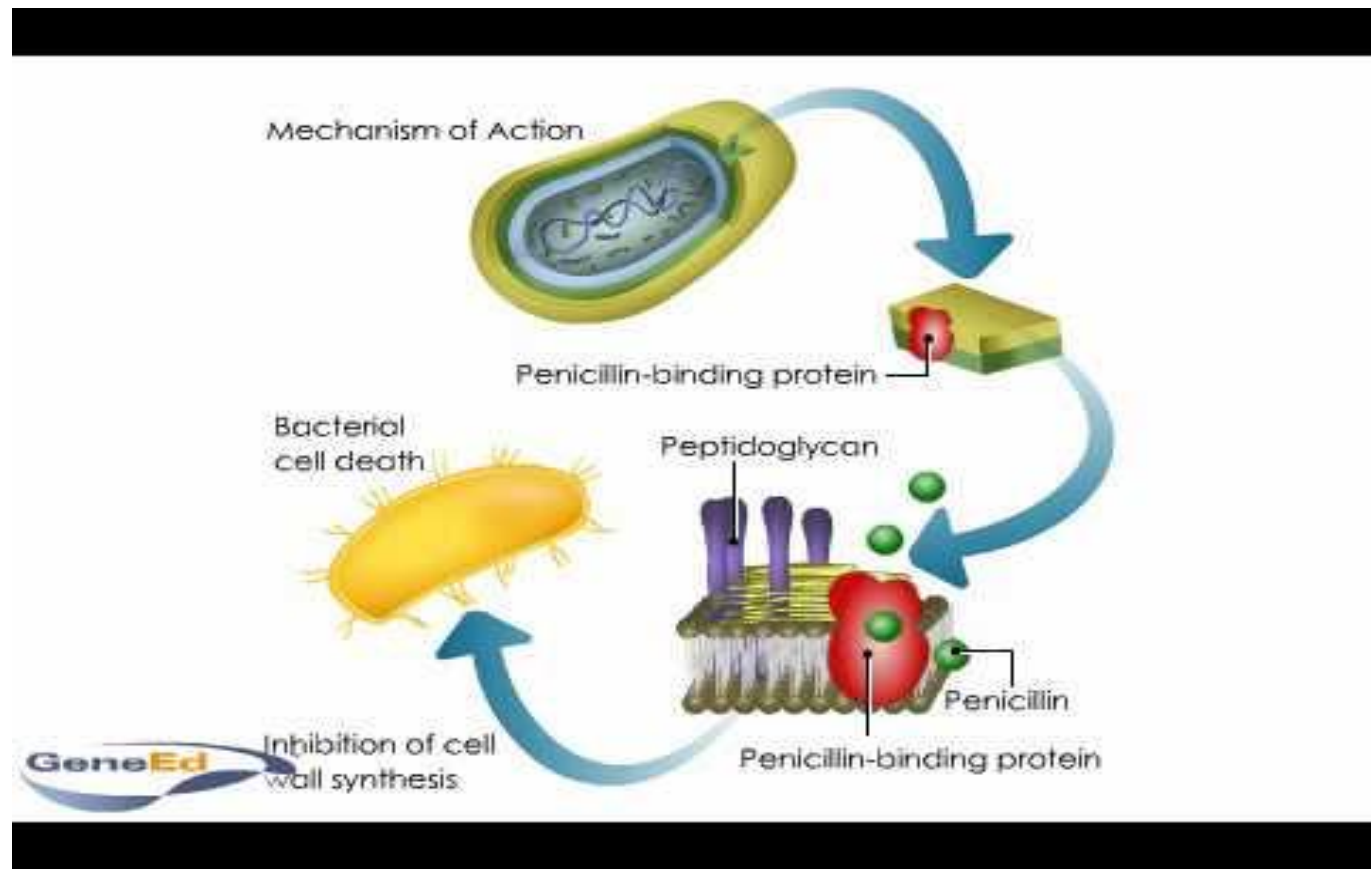
15-epi-Lipoxin A₄

**** Anti-inflammation
Pro-resolution**

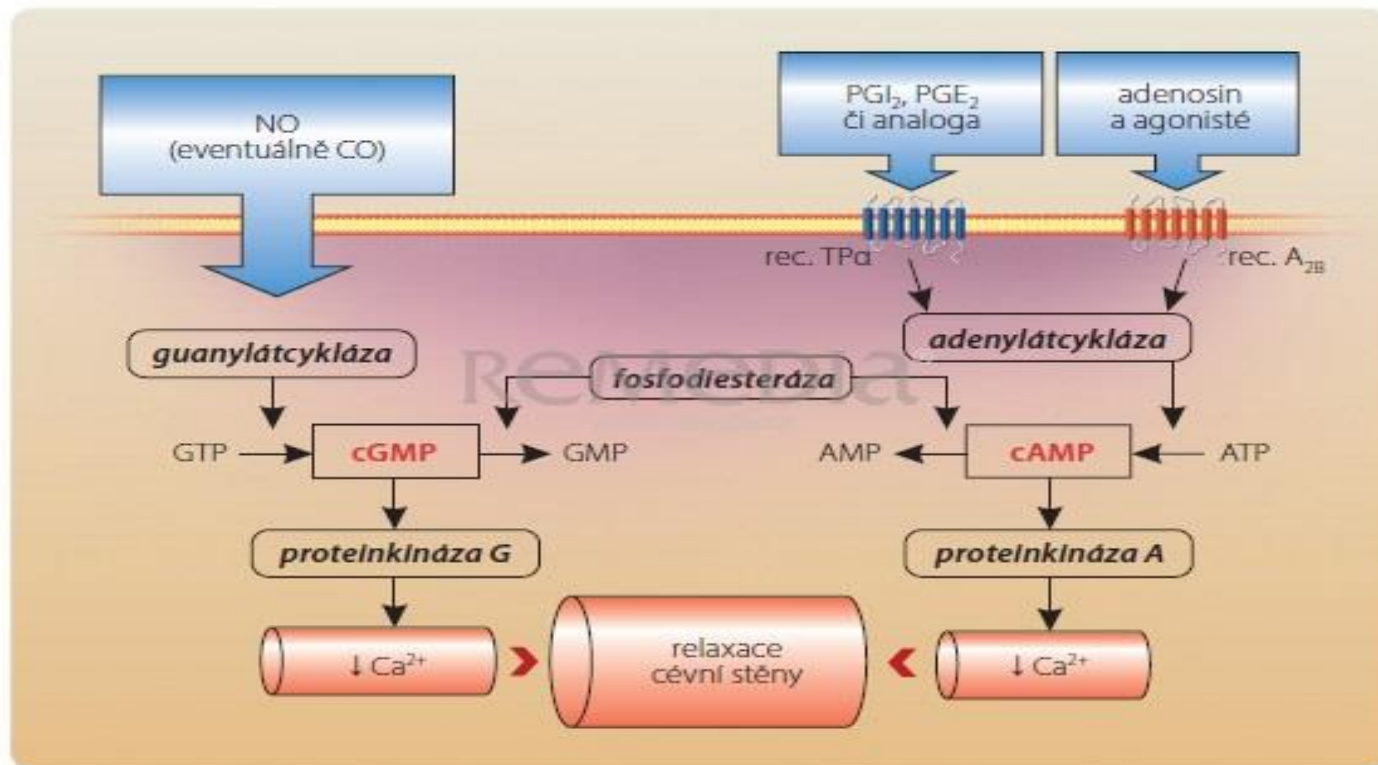


Inhibice enzymu

Ireverzibilní (Nevratná) inhibice



Aktivace enzymu

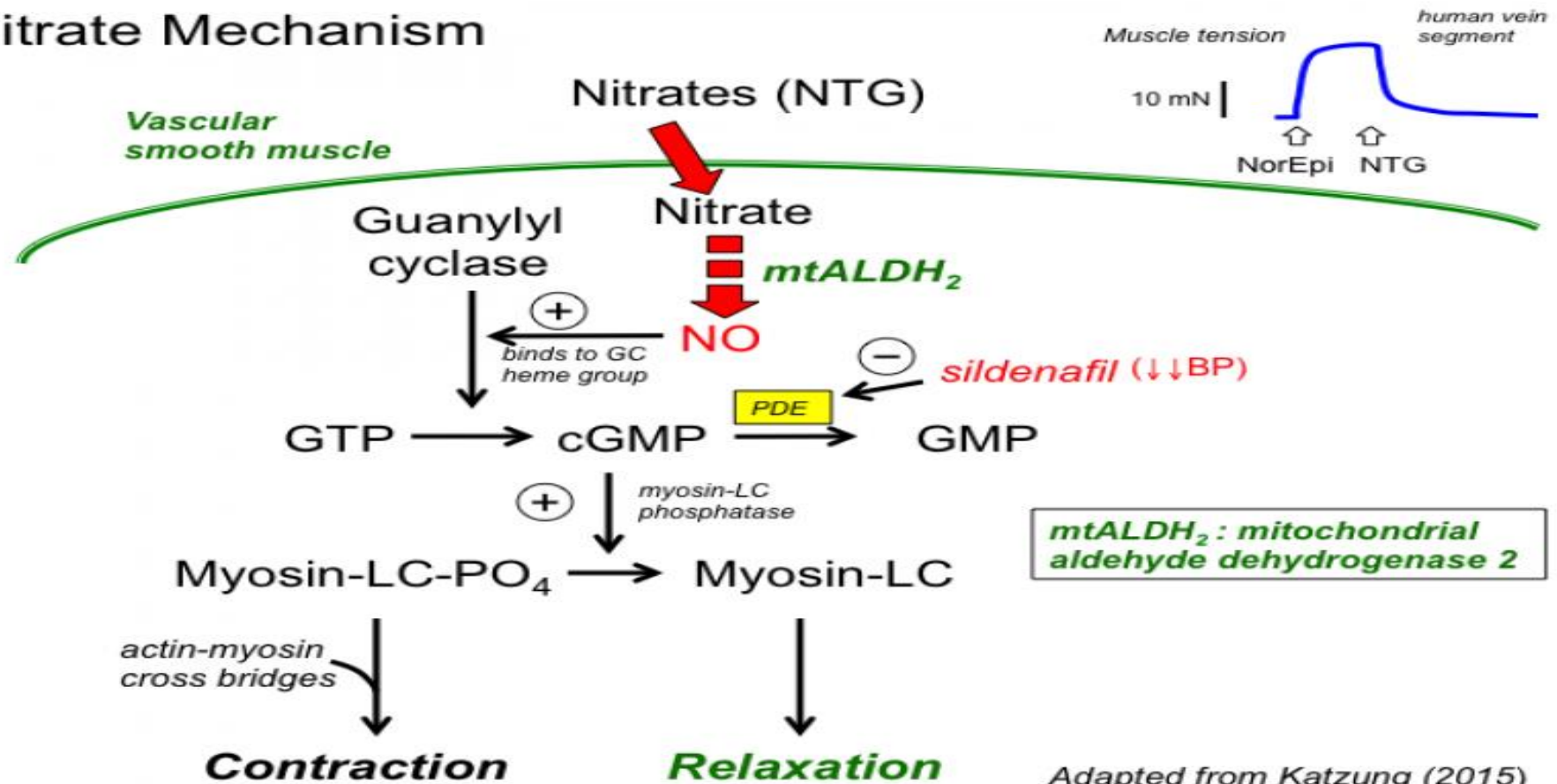


Obr. 6 Přímá aktivace guanylátcyklázy gasotransmitery (NO či CO) či nepřímá aktivace adenylátcyklázy zprostředkovaná receptory. NO – oxid dusnatý; CO – oxid uhelnatý; PGE₂, PGI₂ – prostaglandiny E₂, I₂; rec. TP α – tromboxanový/prostaglandinový receptor α ; rec. A_{2B} – adenosinový receptor A_{2B}; cGMP – cyklický guanosinmonofosfát; cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

Aktivace enzymu

► Příklad

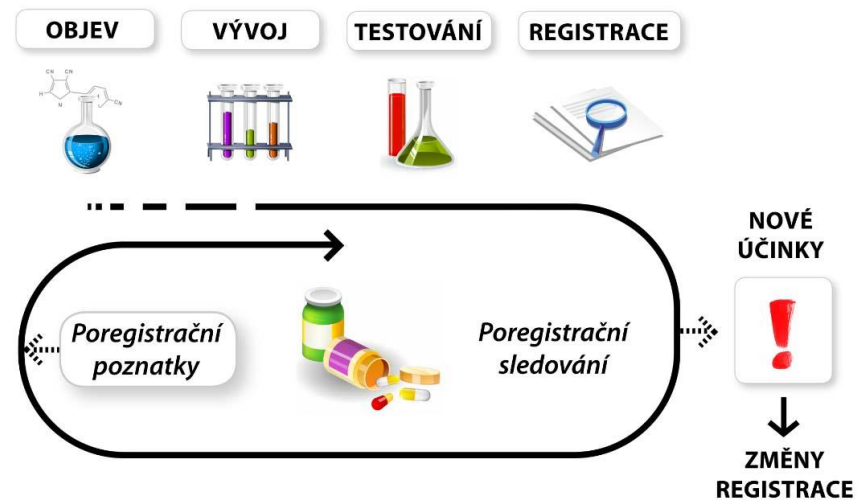
Nitrate Mechanism



Vývoj léčiv

Vývoj léčiv

ŽIVOTNÍ CYKLUS LÉČIVA



Vývoj léčiv

Knihovny
sloučenin
Miliony sloučenin



Lead
compounds
Slabé inhibitory
Stovky sloučenin



Drug
candidate
Desítky sloučenin



Drug
jedna látka

Vývoj léčiv (Miliony sloučenin)

- ▶ **Testování aktivity enzymů**
 - ▶ **Detekce enzymu – chceme zjistit, jestli je ve vzorku aktivní enzym**
 - ▶ **Stanovení katalytické aktivity – chceme zjistit kolik je ve vzorku aktivního enzymu**
 - ▶ **Měření katalytických schopností enzymů – chceme zjistit kolik substrátu by dokázal enzym transformovat za určitý čas**

Vývoj léčiv (Miliony sloučenin)

- ▶ **Jednotka aktivity**
 - ▶ reakční rychlost $\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$
 - ▶ katalytická aktivita katal (kat) mol.s^{-1}
 - ▶ jednotka (U) $\mu\text{mol.min}^{-1}$

Vývoj léčiv (Miliony sloučenin)

- ▶ **Nutno kontrolovat:**
 - ▶ - dobu reakce
 - ▶ - teplotu
 - ▶ - pH
 - ▶ - koncentrace substrátů
 - ▶ - koncentrace aktivního enzymu
 - ▶ - koncentrace solí, kofaktorů a podobně

Vývoj léčiv (Miliony sloučenin)

- ▶ Analytické metody používané při stanovování aktivity:

- ▶ Například:

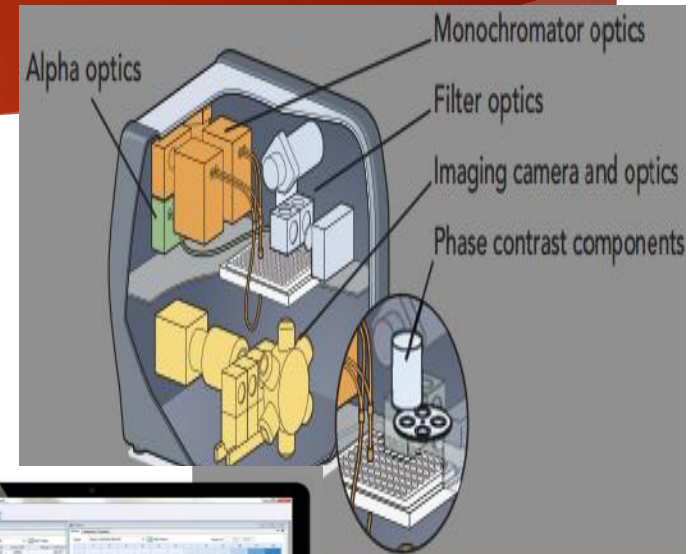
- ▶ - spektrofotometrie
 - ▶ - fluorimetrie
 - ▶ - luminimetrie
 - ▶ - radiometrické metody
 - ▶ - chromatografie
 - ▶ - elektroforesa
 - ▶ - potenciometrie, měření pH, pH-stat
 - ▶ - polarografie, voltametrie, amperometrie
 - ▶ - coulometrie

Vývoj léčiv

Testování potenciálních inhibitorů

Cytation 3

- hybridní zobrazovací multidetekční reader
- snímání vzorků v destičkách (1 – 384 jamek)
- měření absorbance, fluorescence, TRF (časově rozlišená fluorescence) fluorescence, fluorescenční polarizace a luminiscence



Vývoj léčiv Testování potenciálních inhibitorů APN)

► *Aminopeptidaza N*

řazen mezi exopeptidasy

Aminopeptidaza N se vyskytuje ve všech živých organismech (ledviny, tenké střevo, játra, placenta, CNS)

řízení funkce různých orgánů, tkání a typů buněk

Aminopeptidaza N také zasahuje do dějů související s nádorovým onemocněním, imunitní reakcí, bolestí, virovým onemocněním atd.

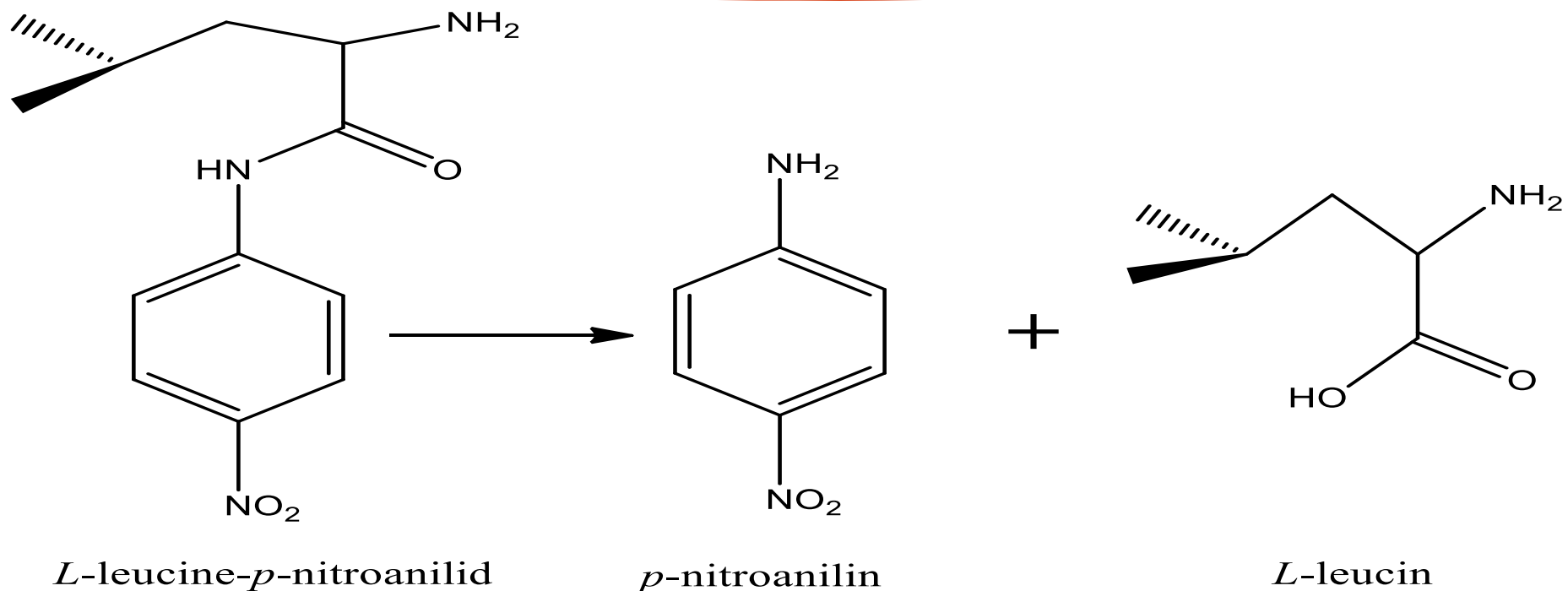
Vývoj léčiv

Testování potenciálních inhibitorů APN

- ▶ inhibitory tvoří s APN nekovalentní vazbu
- ▶ velikost inhibice IC_{50}
- ▶ inhibice funkce APN poskytují léčebné možnosti mnoha různým onemocněním, nádorová onemocnění, Alzheimerova choroba, vysoký krevní tlak

Vývoj léčiv

Testování potenciálních inhibitorů APN



***p*-nitroanilinu stanovujeme spektrofotometricky při 405nm**

Vývoj léčiv

Testování potenciálních inhibitorů APN

Bylo optimalizováno

10mM TBS

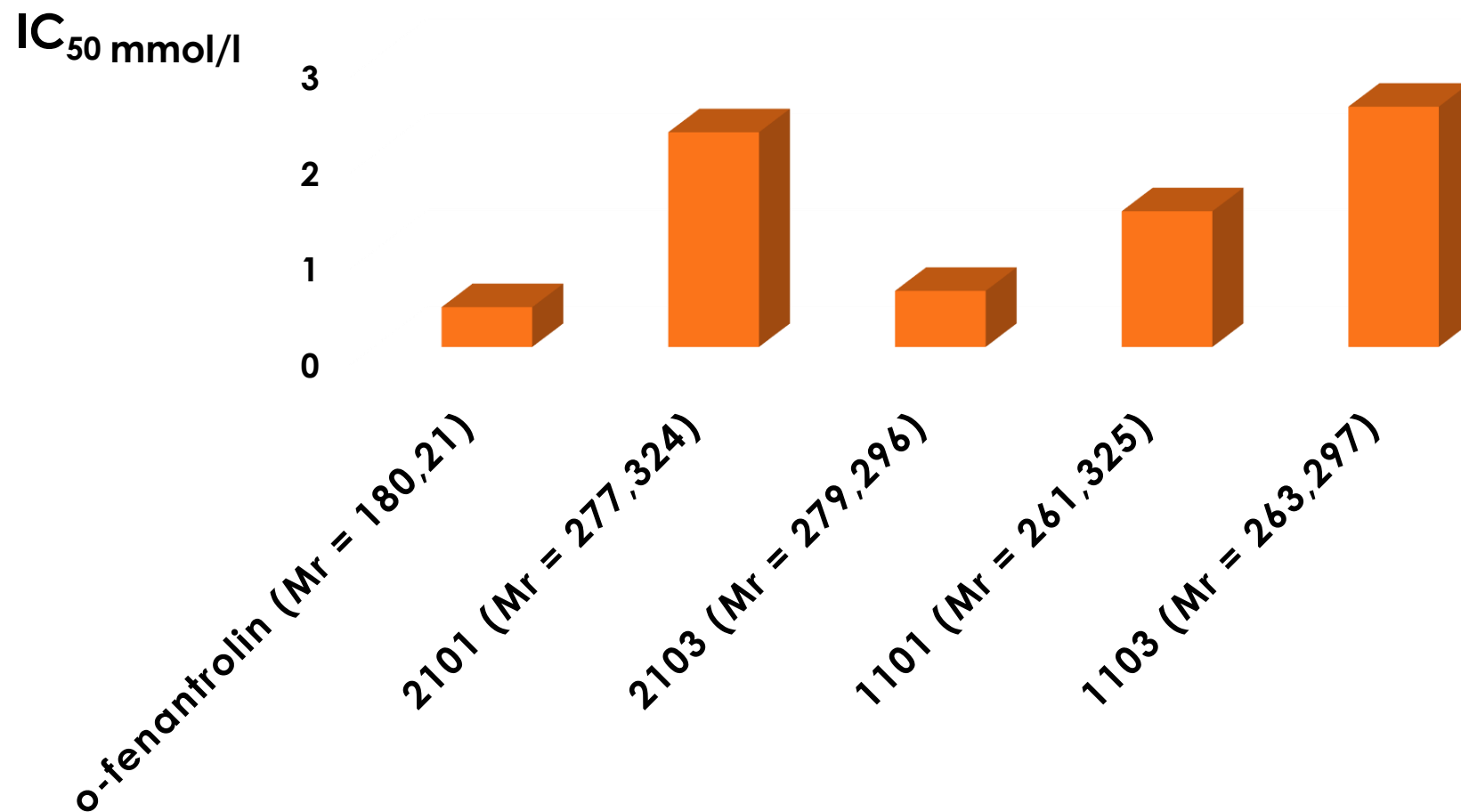
60 min inkubace

500 μ M roztok substrátu

Při 405 nm

Vývoj léčiv

Testování potenciálních inhibitorů APN



Použitá literatura

- ▶ <https://web.vscht.cz/~spiwokv/enzymologie/aktivty.pdf>
- ▶ <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakologie-pro-klinika/Pusobeni-leciva-na-urovni-ovlivneni-funkce-enzymu/6-1GB-1IN.magarticle.aspx>
- ▶ <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Farmakologie/Pusobeni-leciva-na-urovni-receptoru/8-10-1Gk.magarticle.aspx>
- ▶ <http://fblt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/6-enzymy/>
- ▶ http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_enzymy.html#11
- ▶ <http://www.olecich.cz/encyklopedie/jaky-je-zivotni-cyklus-leciva>
- ▶ <http://www.galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-biokatalyza-enzymova-kinetika>