

Eredeti gyógyszerkutatás

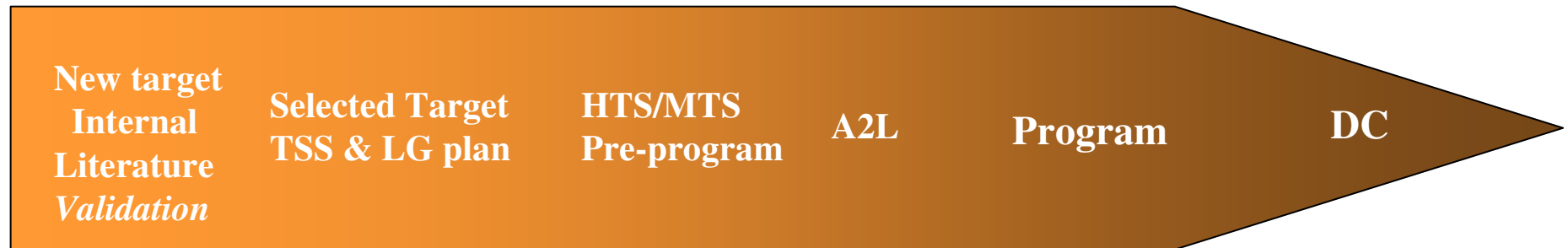
ELTE TTK vegyészhallgatók számára

Dr Arányi Péter

2009 március, 4.ea.

Szerkezet optimalizálás (I.)

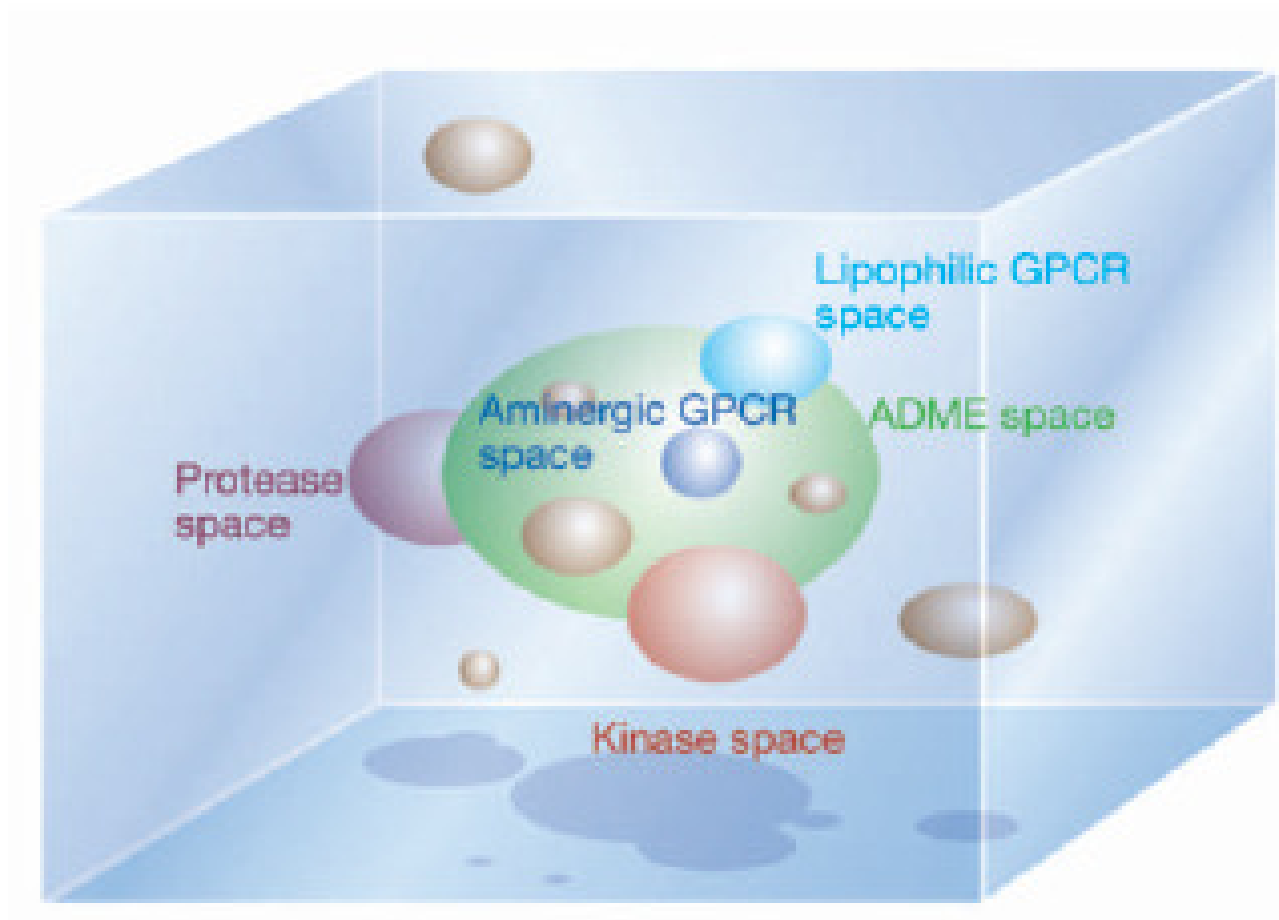
How do we proceed?



Virtual screen

Use rational approaches and structural information to enhance
and facilitate Drug discovery and optimisation

Chemical space



(Lipinski, Hopkins, 2004)

Gyógyszervegyészeti meghatározások

- Drug-likeness
- Druggability
- Kutatási segédvegyületek (Tools)
- Gyógyszerkutatás vagy alapkutatás

Drug likeness (1/2)

- **Various definitions of, and methods to predict, drug-likeness have been proposed.**
- **Consensus is that drug-likeness is defined by a range of molecular properties and descriptors that can discriminate between drugs and non-drugs for such characteristics as oral absorption, aqueous solubility and permeability. Computational property filters can be used to rapidly assess the drug-likeness of chemical libraries *in silico* before purchase or synthesis.**

Drug likeness (2/2)

- **Orally administered drugs are likely to reside in areas of chemical space defined by a limited range of molecular properties.**
- **Lipinski's 'rule of five'. Historically, 90% of orally absorbed drugs had**
 - fewer than five hydrogen-bond donors,
 - less than ten hydrogen-bond acceptors,
 - molecular masses of less than 500 daltons
 - log P values (a measure of lipophilicity) of less than five.

Druggability

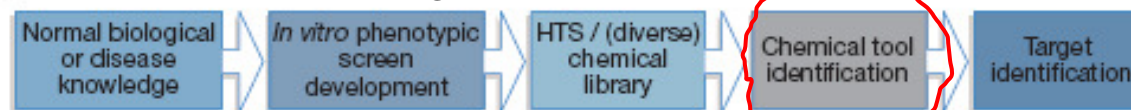
- Postulate: since the binding sites on biological molecules are complementary to their ligands in terms of volume, topology and physicochemical properties, then only certain binding sites on putative drug targets will be compatible with high-affinity binding to compounds with drug-like properties.
- Extension of this concept to a whole genome analysis leads to the druggable genome. ***This is the expressed proteome predicted to be amenable to modulation by compounds with drug-like properties.***

Gyógyszer vagy segédvegyület

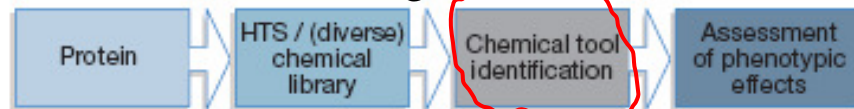
a Standard model



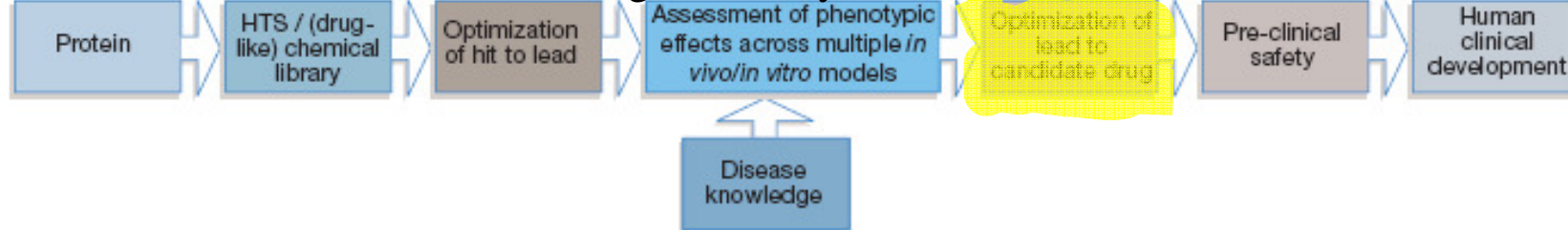
b Forward chemical genetics



c Reverse chemical genetics



d Combine chemical tool and drug discovery

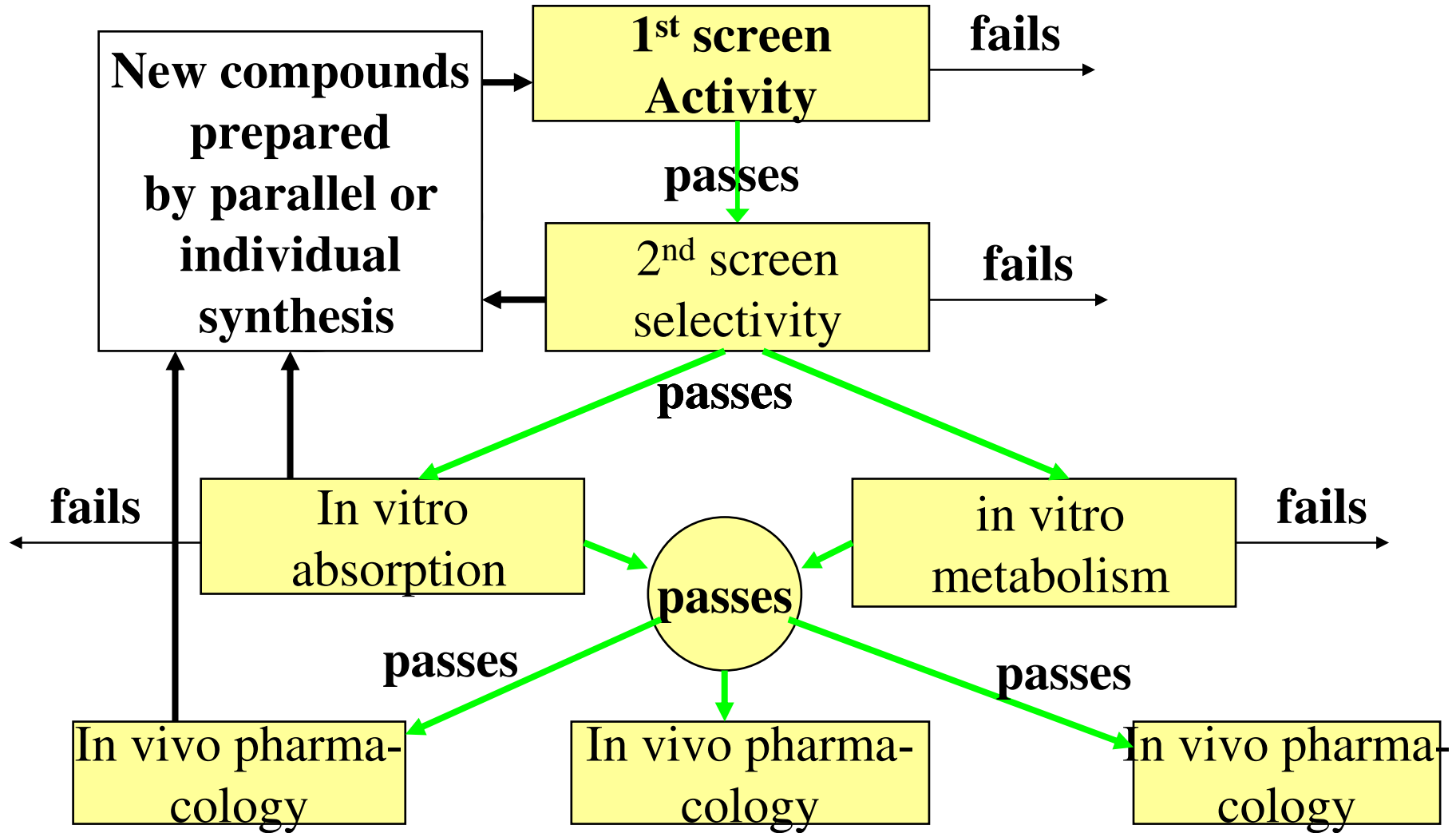


(Lipinski, Hopkins, 2004)

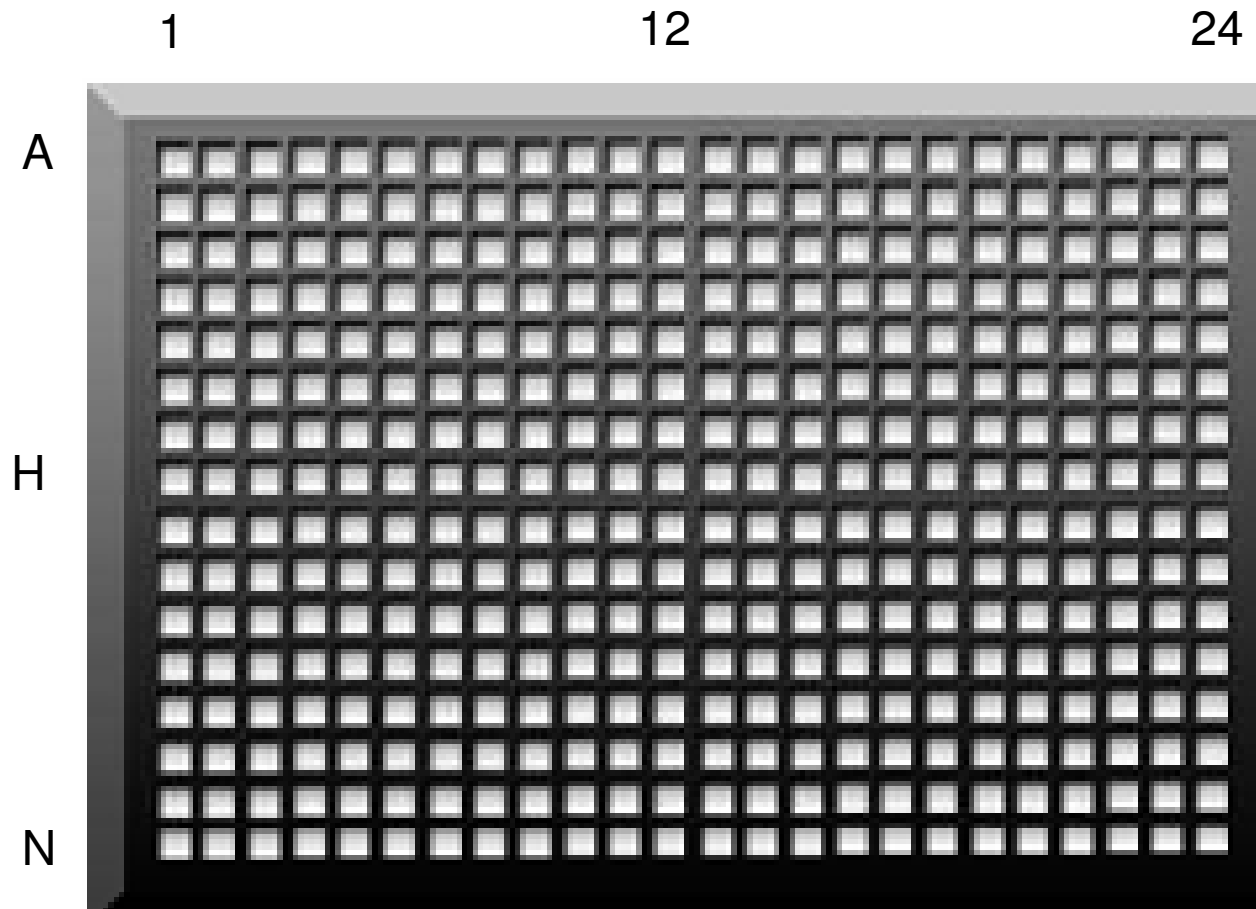
Biological tools (in vivo)

- Protein-specific antibodies Immunoglobulins secreted from a single clone of antibody producing cells
- Engineered recombinant proteins Subtle modification of endogenous proteins to produce agonists/antagonists
- Gene knockouts Inactivate a gene to create null phenotype
- Gene knockins Insert a gene in a selected position
- RNA interference Introduce double stranded complementary RNA in order to inhibit temporarily the expression of a gene

Screening flowchart



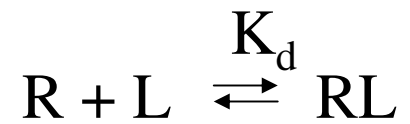
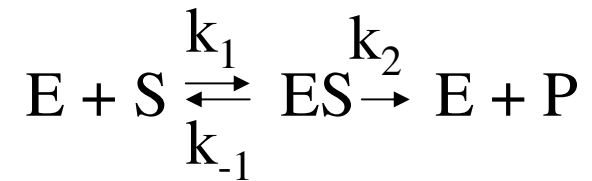
Multiwell dish = microtiter plate



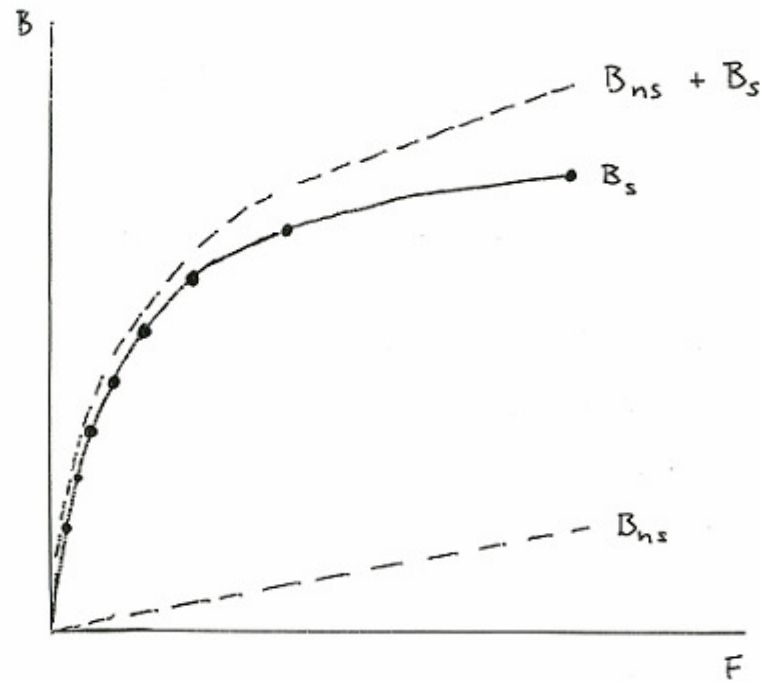
Receptorok tanulmányozásának módszerei

1. Kötődés - leszorítás (specifitász vizsgálatak)
2. Funkcionális vizsgálatak (enzim-aktiválás, mikro elektrofiziológia)
3. Izolálás - tisztítás (szolubilizálás - affinitás kromatográfia)
4. Kémiai módosítás - affinitás jelzés - keresztkötések
5. Immunológiai jellemzés (monoklonális antitestek)
6. Klónozás - expressziós rendszerek
site directed mutagenesis

Enzim- és receptorkinetika (egyensúly)



Telítési görbe

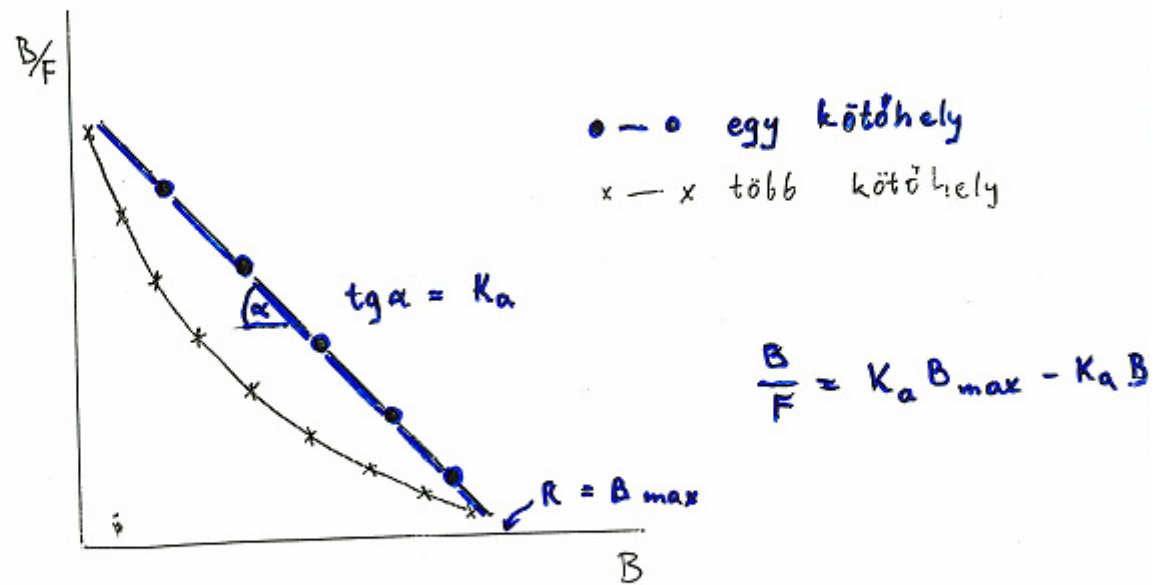


$$B_s = \frac{B_{\max} F}{K_D + F}$$

$$B_{ns} = \alpha F$$

(Enzimreakció sebessége : $v_o = \frac{V_{\max} S}{K_M + S}$)

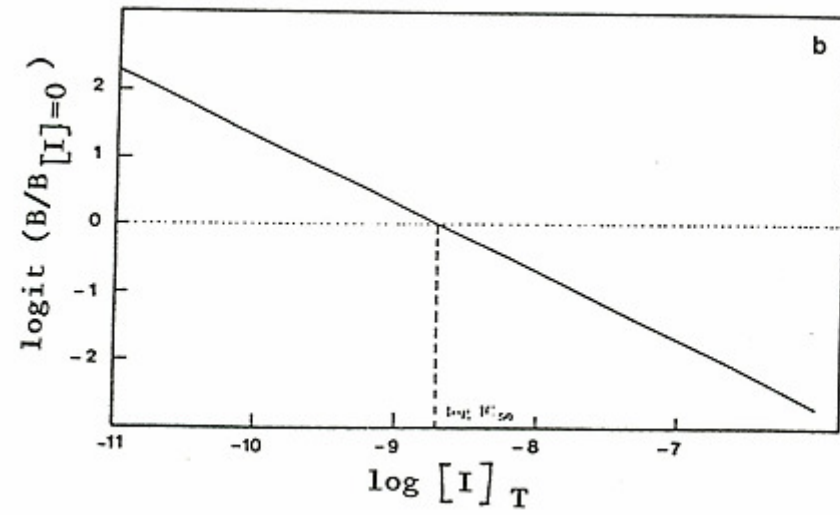
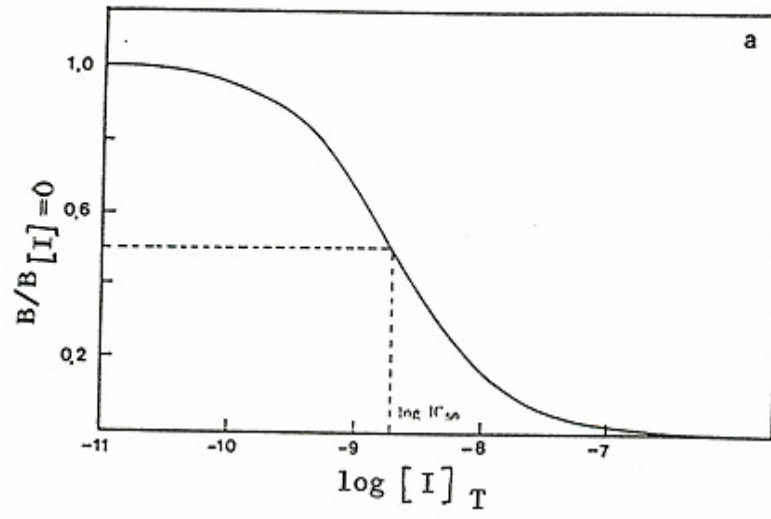
Scatchard ábrázolás



Alulról konvex
 több független kötőhely
 negatív kooperativitás
 szisztematikus hibák

Felülről konvex
 pozitív kooperativitás
 szisztematikus hibák

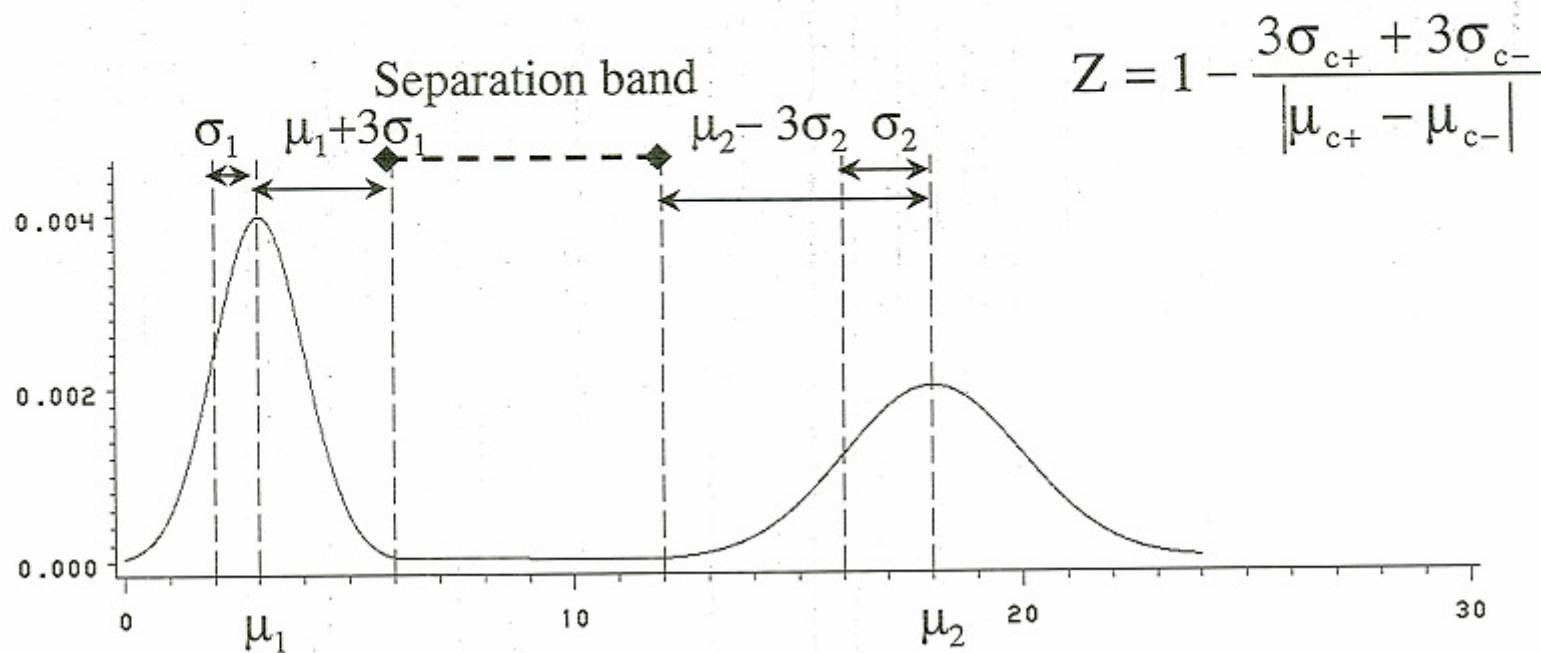
Leszorítási analízis



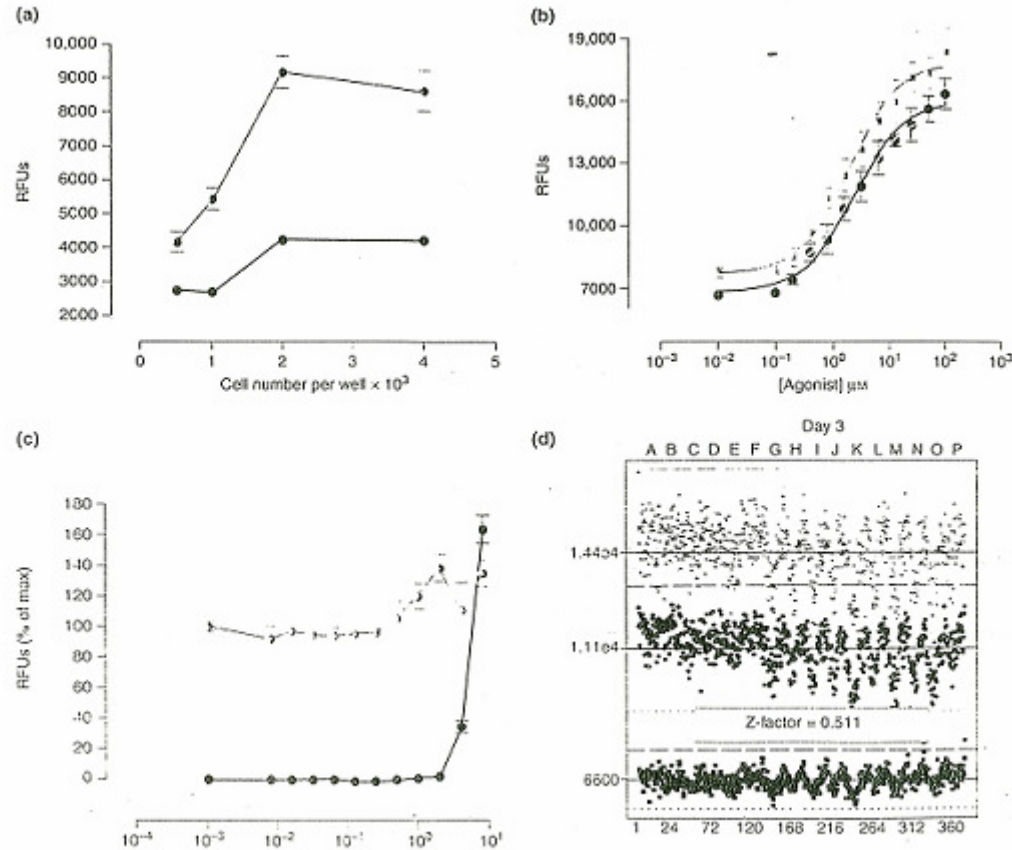
Szűrővizsgálatok „jósága” (1/2)

The length of the separation band: $|\mu_2 - \mu_1| - (3\sigma_1 + 3\sigma_2)$

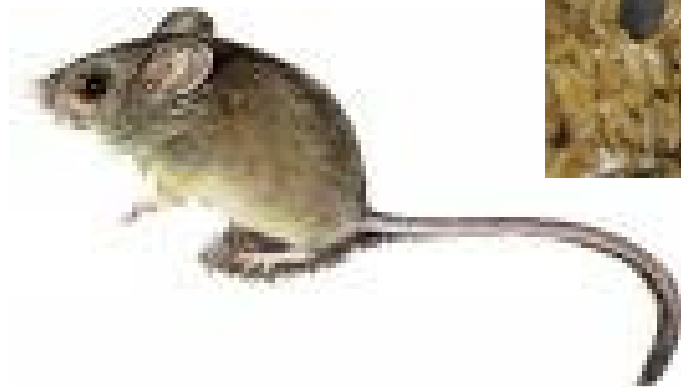
The Z-factor is the relative length of the separation band (compared to the dynamic range of the assay)



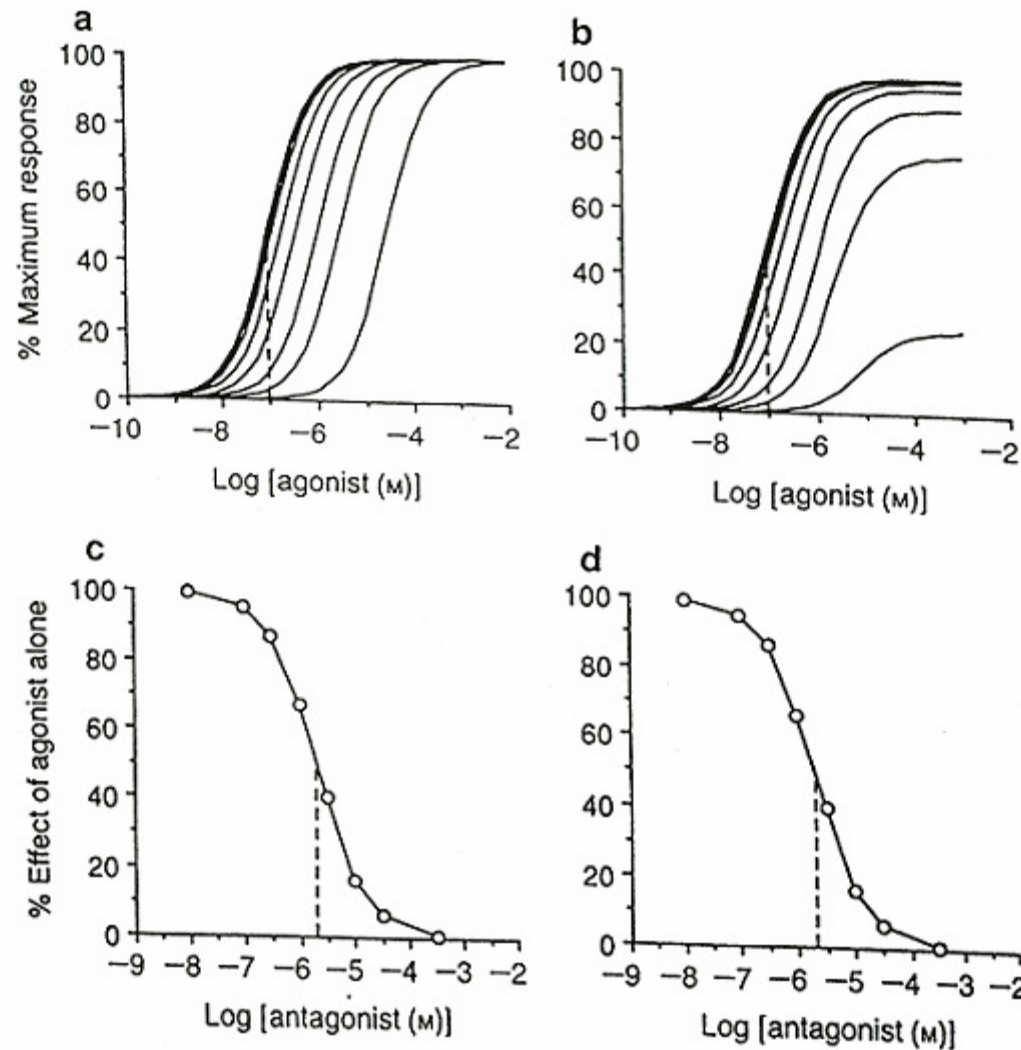
Szűrővizsgálatok „jósa” (2/2)



In vitro – in vivo



In vitro farmakológia: Agonisták - antagonisták



Farmakológiai hatás - receptor telítettség kapcsolata

(Furchgott, 1972)

$$\frac{E_A}{E_m} = f(S) = f(\varepsilon [RA]) = f\left(\frac{e [RA]}{R_t}\right) = f\left(\frac{e [A]}{K_A + [A]}\right)$$

E_A = hatás A agonista jelenlétében, E_m = maximális hatás

S = stimulus

ε = intrinsic efficacy

e = efficacy

K_A = disszociációs állandó

$$\frac{E'_A}{E_m} = f(S') = f \left(\frac{e [RA']}{[R_t]} \right) = f \left(\frac{e [A']}{K_A(1+B/K_B) + [A']} \right)$$

E'_A = hatás A agonista és B kompetitív antagonistá együttes jelenlétében

$$\frac{[A']}{[A]} - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

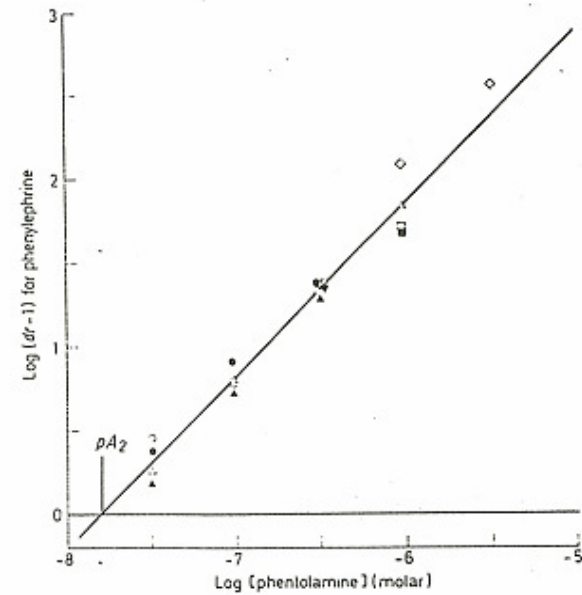
$$\lg(dr-1) = \lg[B] - \lg K_B \quad (\text{Schild, 1949})$$

SCHILD ábrázolás

$$\frac{[A']}{[A]} - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

$$\lg (dr-1) = \lg [B] - \lg K_B$$

(Schild, 1949)



Aorta csikok összehuzódása *L*-agonista és antagonistá jelenlétében izolált rendszerben

$$K_d = \frac{F(B_{max} - B)}{B}$$

$$B = \frac{B_{max} F}{K_d + F}$$

$$\lg(B/(B_{max}-B)) = \lg F - \lg K_d$$

$$\lg(B/(B_{max}-B)) = n_H \lg F - n_H \lg K_d$$

Cheng - Prusoff egyenlet:

$$K_i = \frac{I_{50}}{1 + (F/K_d)}$$

Kötési kísérletekre:

$$K_i = \frac{I_{50}}{1 + F/EC_{50}}$$

Funkcionális vizsgálatokra:

$$K_b = \frac{I_{50}}{1 + A/EC_{50}}$$

Változó koncentrációk mellett analizálva a dr függvényt K_B meghatározható n_H ismerete nélkül, a Schild függvény szerint.

$$K_B = \frac{B}{dr - 1}$$

$$K_B = \frac{IC'_{50}}{A/EC'_{50} - 1}$$

Farmakológiai hatás - receptor telítettség kapcsolata
(Furchgott, 1972)

$$\frac{E_A}{E_m} = f(S) = f(\varepsilon [RA]) = f \left(\frac{e [RA]}{R_t} \right) = f \left(\frac{e [A]}{K_A + [A]} \right)$$

E_A = hatás A agonista jelenlétében, E_m = maximális hatás

S = stimulus

ε = intrinsic efficacy

e = efficacy

K_A = disszociációs állandó

$$\frac{E'_A}{E_m} = f(S') = f \left(\frac{e [RA']}{[R_t]} \right) = f \left(\frac{e [A']}{K_A(1+B/K_B) + [A']} \right)$$

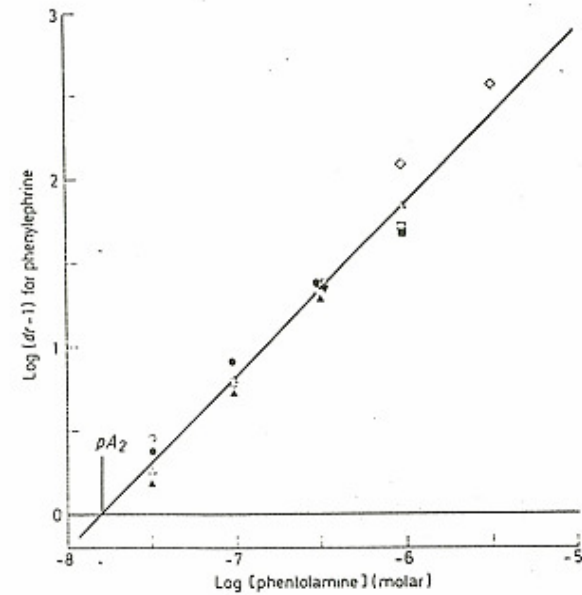
E'_A = hatás A agonista és B kompetitív antagonistá együttes jelenlétében

SCHILD ábrázolás

$$\frac{[A']}{[A]} - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

$$\lg (dr-1) = \lg [B] - \lg K_B$$

(Schild, 1949)



Aorta csikok összehuzódása *L*-agonista és antagonistá jelenlétében izolált rendszerben

In vivo speciális farmakológiai vizsgálatok (1/2)

- Célok
 - In vitro hatások visszaigazolása állatmodellen
 - Proof of mechanism, proof of concept
 - Dózis – hatás összefüggés
 - Hatás időtartam
 - Preventív vs kuratív hatékonyság
 - Terápiás index meghatározása
 - Ismételt adagolás

In vivo speciális farmakológiai vizsgálatok (2/2)

- Jellemzők
 - Több állatfaj (rágcsáló, kutya stb)
 - Validálás referens anyagokkal
 - Akut és krónikus
 - Többféle adagolási mód – biohasznosíthatóság
- Problémák
 - Prediktivitás (modell, speciesz különbségek)
 - reprodukálhatóság