

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

ИНТЕГРИСАНЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ ФАРМАЦИЈЕ

Б13 - Медицинска хемија 1

Развој нових молекула лекова из природних ресурса

Проф. др Слободан Новокмет

Једанаеста недеља наставе

Зимски семестар школске 2016 / 2017 године

Природни производи

- Методе за изоловање и пречишћавање активних принципа из природних производа развијене су средином 19. века. Од тада па до данас изолован је велики број различитих биолошки активних једињења и одређене су њихове структуре.
- Ови природни производи су постали полазна основа за велики број вештачких (синтетичких) аналога. Природни производ представља једињење чија основна биохемијска улога, у биолошкој врсти из које је изолован, није позната.
- Ова једињења су органски молекули мале релативне молекулске масе и представљају секундарне метаболите. Природни производи (у облику малих молекула) могу да утичу протеин-протеин интеракције и тиме на ћелијске процесе у стањима болести.

Природни производи

- У поређењу са вештачким једињењима, природни производи садрже већи број протонованих амина, слободних хидроксилних функционалних група, једногубих веза, кондензованих цикличних система (прстенова или циклуса) и хиралних центара.
- Природни производи се такође разликују од вештачких производа по броју присутних атома халогена, азота, кисеоника и сумпора као и по стерним особинама. Мање од 20% цикличних система заступљених у природним производима је заступљено у лековима који се тренутно користе.

Извори природних производа

- Основни приступи у одабиру биолошких врста (извора природних производа) за лабораторијско истраживање њихових биолошки активних компоненти су:
 - скрининг;
 - одабир појединих таксономских група (фамилије или род);
 - хемотакономски приступ - ограничен на класу секундарних метаболита (нпр., алкалоиди);
 - информационо-управљачки приступ, подразумева циљану групацију врста одабраних на основу доступних информација из бази података;
 - одабир на основу етномедицинског приступа.

Биолошки тестови

- Основне улоге биолошких тестова у изоловању активних једињења из природних извора су скрининг и праћење.
- Скрининг тестови се користе за детекцију присуства активних састојака у полазним екстрактима, док се тестови праћења користе ради праћења пута активних састојака кроз целокупан процес изоловања.

Скрининг природних производа

- Од открића пеницилина из гљивица, скрининг природних производа из биљних и микробиолошких извора се користе са циљем проналажења нових потенцијалних молекула лекова.
- У последње време, морски организми су означени као извор нових једињења са значајним биолошким активностима.
- Тест који се користи за скрининг мора да буде брз, тачан, поновљив, са великим капацитетом за узорке, повољан и једноставан за извођење. Тестови треба да буду употребљиви и за екстракте који се споро и слабо растварају у води.

Скрининг природних производа

- Скрининг тестови се класификују на опште и специфичне биолошке тестове. Општи скрининг тестови се користе за детекцију једињења са више различитих биолошких активности.
- Док се специфични биолошки тестови користе за идентификовање једињења која су активна само према специфичним болестима или организмима.

Изоловање и пречишћавање

- Изоловање и пречишћавање активних принципа зависи од структуре, стабилности и количине присутних једињења.
- Нпр., пеницилин је веома тешко изоловати и пречистити, због његове нестабилности у воденим растворима.
- Развојем новог поступка - лиофилизација, постигло се успешно изоловање пеницилина.
- Данас постоји низ хроматографских техника за изоловање и пречишћавање природних производа.

Дерепликација

- Дерепликација подразумева употребу хемијских техника у циљу елиминације екстракта који садрже активне састојке који су већ изоловани и окарактерисани.
- Представља хемијски скрининг екстракта користећи хемијске процедуре као што су хроматографија, *NMR*, *UV/VIS* спектроскопија и масена спектрометрија.
- Помоћу дерепликације се врши упоређивање резултата са базом података ради идентификације активних једињења која су већ испитивана.

Анализа структуре изоловане супстанце

- Одређивање структуре новог једињења у прошлости је била велика препрека, међутим данас је незамисливо одредити структуру новог једињења без употребе *NMR* и *IR* спектроскопије.
- Нова структура се може утврдити за пар недеља истраживачког рада, што је еквивалентно две или три деценије истог у прошлости.
- На пример, микроанализа за добијање молекулске формуле холестерола изведена је 1888. године, али његова хемијска структура није у потпуности одређена све до примене рендген-кристалографије, 1932. године.

Анализа структуре изоловане супстанце

- Структуре су разлагане до једноставнијих једињења, која су даље разграђивана до препознатљивих фрагмената. Из ових фрагмената, предложене су могуће структуре, али једини сигуран начин доказивања био је синтеза ових структура и поређење хемијских и физичких особина са природним једињењем или његовим производима деградације.
- Када не постоји довољна количина узорка за *NMR* или *IR* анализу, користи се масена спектроскопија.
- Фрагментација може дати корисне податке о структури, али не доказује структуру, још увек је као коначни доказ потребна синтеза.

Анализа структуре изоловане супстанце

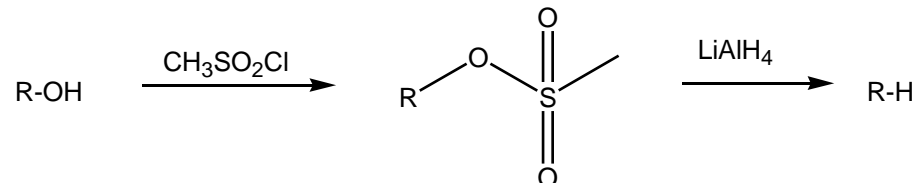
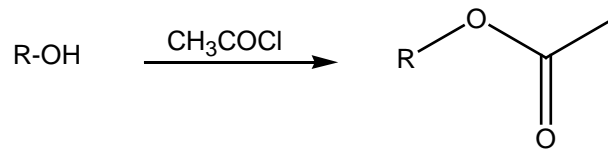
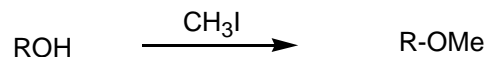
- Пре анализе структуре изолованих једињења, неопходно је проценити чистоћу. С обзиром да су количине изолованих једињења обично врло мале, тешко је добити чисте кристалне узорке поновљеном рекристализацијом. Једињење се сматра да је чисто уколико се добије један пик када се једињење подвргне низу квалитативних хроматографских техника попут гасне, течне и танкослојне хроматографије.
- Структура чистог једињења изолованог процесом фракционисања одређује се комбинацијом стандардних хемијских поступака попут масене спектрометрије, *NMR*, *IR*, *UV/VIS* спектроскопије и одговарајућих база података.
- Међутим, коначно изолована активна фракција се често састоји од смеше једињења. Структуре компоненти ових смеша се одређују употребом *GC-MS*, *LC-UV*, *LC-MS*, *LC-NMR* и *LC-PAD* (енгл. *Photodiode Array Detection*).

Улога везивања хидроксилних група за протеински ефектор

- Протон хидроксилне групе учествује у грађењу водоничне везе са рецептором и ако се уклони, нпр. превођењем хидроксилне групе у метил-етар или естар, грађење водоничне везе је онемогућено.
- Атом кисеоника у функционалним групама је такође погодан за грађење водоничне везе са бочним низовима аминокиселина. Етарски или естарски аналози могу да граде водоничну везу преко етарског или естарског кисеоника, мада је она доста слабија, нарочито у случају естра.
- Електронске особине естара и алкохола се значајно разликују. Карбоксилна група може “повући” електроне са суседног атома кисеоника и да ступи у резонанцију. С обзиром да слободни електронски пар учествује у резонанцији, онда не може ефикасно да учествује у грађењу водоничне везе. Стерни фактори такође ометају грађење водоничне везе.

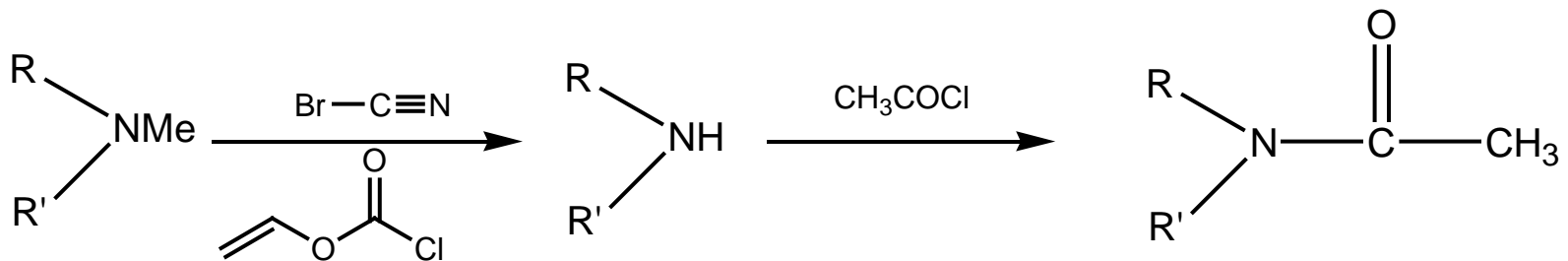
Улога везивања хидроксилних група за протеински ефектор

- Волуминозност супституената (нпр., ацил-група) омета приступ везивном месту у рецептору јер стерна сметња која потиче од метокси-групе отежава грађење водоничне везе.
 - Зато се у циљу потврде да ли хидроксилна група учествује у грађењу водоничне везе или не, врши изостерна супституција метил-групом.
 - Друга могућност је да хидроксилна група реагује са метансулфонил хлоридом у присуству литијум алуминијум хидрида, при чему долази до замене хидроксилне групе протоном.



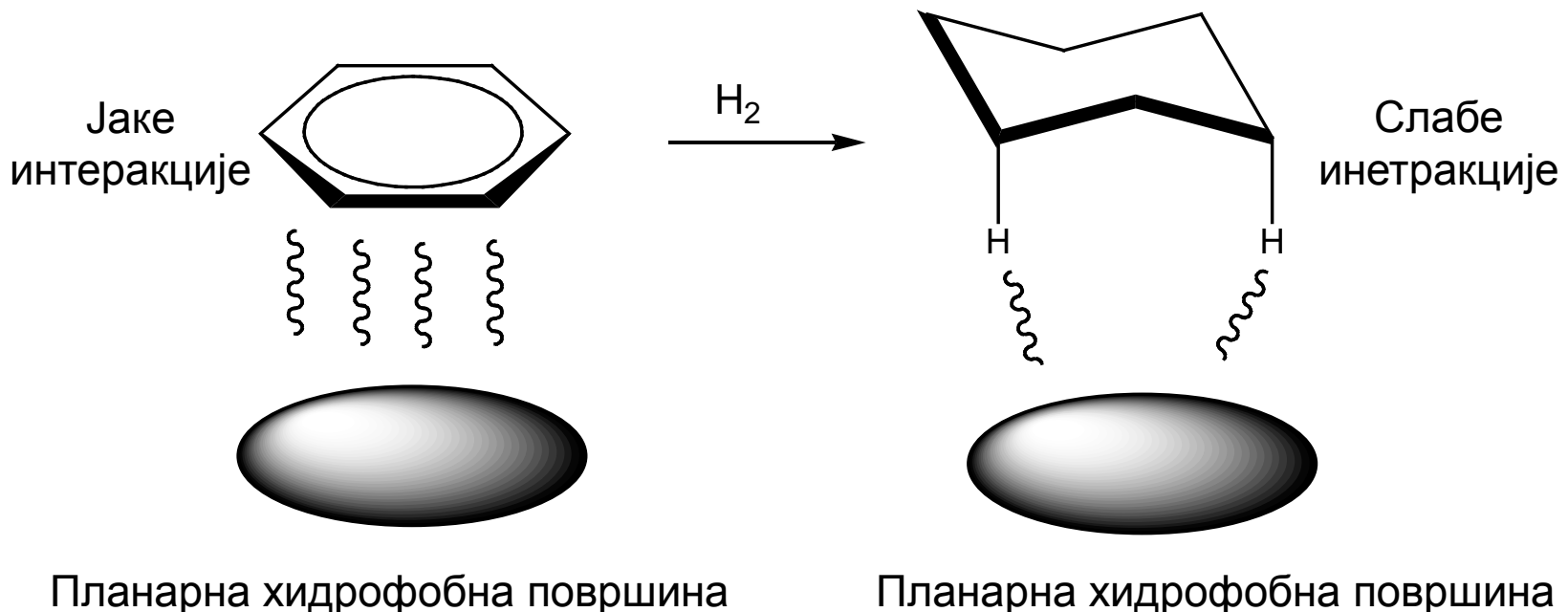
Улога везивања амино-група за протеински ефектор

- Амини могу да граде водоничне везе, међутим превођење амина у амид спречиће слободни електронски пар азота да учествује у грађењу водоничне везе. Терцијарни амини морају да се деалкилују до секундарних амина да би се превели у амид. Деалкиловање се врши помоћу цијанобромида или хлороформијата као што је винилоксикарбонил хлорид.



Улога везивања ароматичних прстенова за протеински ефектор

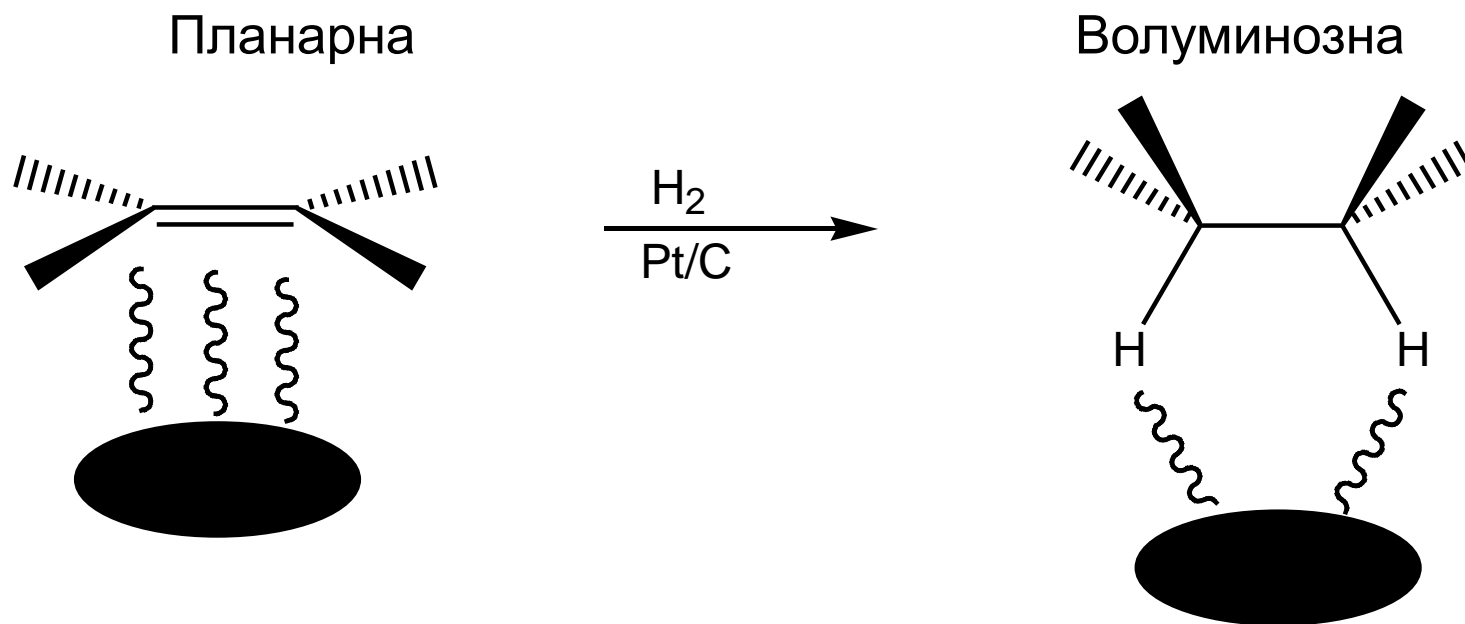
- Ароматични прстен ступа у ван дер Валсове интеракције са планарним хидрофобним површинама везивног места рецептора. Ако је прстен хидрогенизован до циклохексанског прстена, структура више није планарна и интеракције са везивним местом су мање ефикасне.



Улога двогубих веза у везивању за протеински ефектор

- Двогубе везе се лако редукују, што има значајан утицај на облик тог дела молекула. Редукцијом се планарна двогуба веза преводи у волуминозну алкил-групу.
- Уколико полазни алкен ступа у ван дер Валсове интеракције са планарним површинама рецептора, редукција алкена ће ослабити интеракције, јер настали волуминознији производ има ограничен приступ површини рецептора.
- Када се утврди које су групе важне за активност једне лековите супстанце, приступа се синтези аналога који садржи ове важне карактеристике.

Улога двогубих веза у везивању за протеински ефектор



Редукција двогубе везе хидрогенизацијом под водоником у присуству катализатора (Платина на активном угљу)

Кардиоваскуларни лекови изведени из природних производа

- Спрашени листови *Digitalis purpurea* се користе у западној медицини више од 200 година, чији је главни активни састојак срчани стероидни гликозид - дигитоксин, који се и данас користи за лечење конгестивне инсуфицијенције срца и атријалне фибрилације.
- "Статини" тј. *HMG*-инхибитори су лекови који се користе за снижавање ниво холестерола у крви, а засновани су на полазном једињењу мевастатину (компактин или цитринин), кога производи култура гљивица *Penicillium citrinum*. Откривени су коришћењем есеја са 5-хидрокси-3-метилглутарил-коензим А (*HMG*-CoA) редуктазом.

Кардиоваскуларни лекови изведени из природних производа

- Успешан пример изоловања кардиоваскуларних лекова из природних производа је инхибитор ангиотензин конвертујућег ензима тепротид (нонапептид), изолованог из отрова змије *Bothrops jararac*.
- Бивалирудин је вештачки пептид од 20 аминокиселина који је аналог хирудина, (супстанца присутна у пљувачки пијавица *Haementeria officinalis*). Бивалирудин је директни, специфични и реверзибилни инхибитор тромбина, примењује се инјекционо и користи за смањење инциденце згрушавања крви код пацијената који су подвргнути коронарној ангиопластици.

Лекови изведени из метаболита природних производа

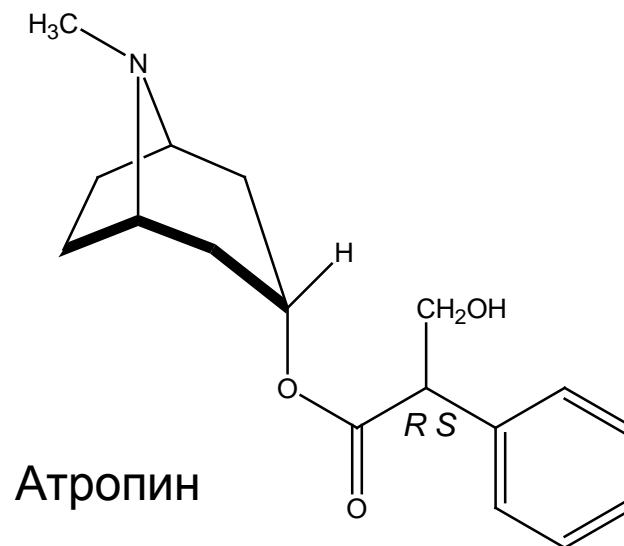
- Ексенатид је вештачки аналог пептида од 39 аминокиселина, кога производи гуштер *Gila monster*, *Heloderma suspectum*, и делује на исти начин као пептид сличан глюкагону-1 (енгл. *glucagon-like peptide-1* - GLP-1) који је природни хормон.
- Овај лек се примењује инјекционо и омогућава бољу контролу гликемије код пацијената са дијабетесом типом 2.

Лекови изведени из метаболита природних производа

- Средином 20. века откривени су кортизон и хидрокортизон (кортизол) који су високо ефикасни у лечењу реуматоидног артритиса. Оба лека, као и већина стероида, имају велики број хиралних центара који отежавају њихову синтезу.
- Кортизон је првобитно екстрахован из надбубрежних жлезда говечета, а касније се је вештачки добијен од полазног једињења дезоксихолнске киселине изоловане из жучи вола.
- Ове методе за производњу нису могле да задовоље потражњу, тако да су замењене ефикаснијом полувештачком методом, која подразумева производњу прогестерона из диоксгенина изолованог из *Mexican yams*. *Rhizopus arrhizus* врши ферментацију прогестерона до 11 α -хидроксипрогестерона у приносу већем од 85%.
- Низ реакција конвертује ово једињење у кортизон. Кортизон се метаболише у јетри до хидрокортизола, који је активни облик.

Лекови за централни и периферни нервни систем изведени из природних производа

- Морфин је значајан и најзаступљенији саставни део осушеног латекса (млечни ексудат) *Papaver somniferum* (опијум мака). Представља прототип за вештачке опиоидне аналгетике, селективне према μ -опиоидним рецепторима.
- Атропин изолован из биљке *Atropa belladonna* је послужио као прототипски молекул за синтезу антихолинергичних и антиспазмолитичких лекова.



Антибактеријски лекови изведени из природних производа

- Поред пеницилина и друге групе антибиотика су развијене из природних производа, аминогликозиди, цефалоспорини, гликопептиди, макролиди, рифамицини и тетрациклини. Антимикотици, попут гризеофулвина, полиена и авермектина, као и антипаразитски лек ивермектина, су такође микробиолошког порекла.
- Хинолински алкалоид хинин добијен из коре различитих врста *Cinchona*, користи се за лечење маларије и послужио је као полазни молекул за вештачке антималярике хлорокин, примакин и мефлокин.
- Меропенем је карбапенем, антибиотик широког спектра дејства (група β -лактамских антибиотика у којима је атом сумпора у тиазолидинском прстену замењен угљеником) и заснован је на структури тиенамицина, изолованог из *Streptomyces cattleya*.

Антитуморски лекови изведени из природних производа

- Већина данашњих терапијски значајних антитуморских лекова су микробиолошког или биљног порекла, као што су антрациклини (даунорубицин, доксорубицин, епирубицин, идарубицин и валрубицин), блеомицин, дактиномицин (актиномицин Д), митомицин Ц и митоксантрон.
- Антитуморски агенси биљног порекла су сврстани у четири главне класе: винка (*Catharanthus*) бисиндол алкалоиди (винбластин, винкрестин и винорелбин); полувештачки деривати епиподофилотоксина (етопозид, тенипозид и етопозид фосфат); таксани (паклитаксел и доцетаксел); и аналози камптотецина (иринотекан и топотекан).

Антитуморски лекови изведени из природних производа

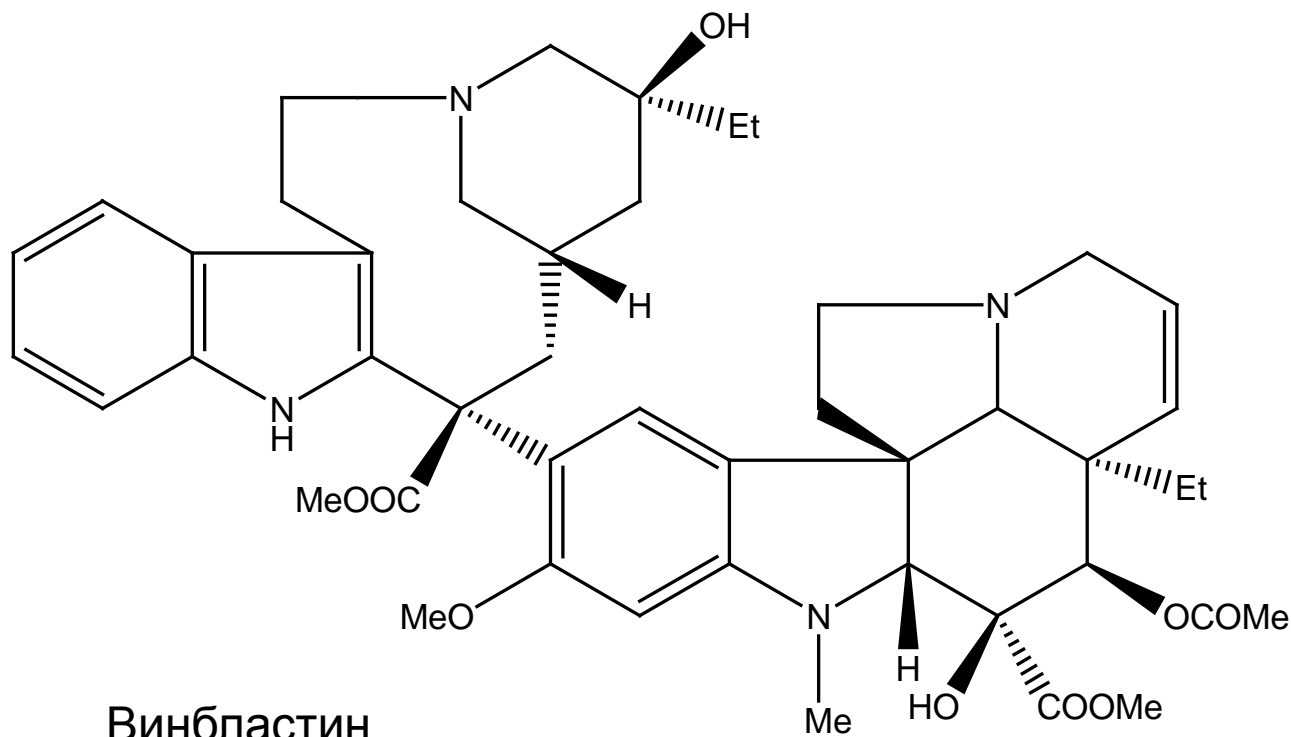
- Оригинално биљно порекло паклитаксела (таксола) је пацифичка тиса (*Taxus brevifolia*), дрво које sporo расте и његово изоловање из овог биолошког, природног извора захтевало би велике количине ове биљне врсте, што би довело до њеног постепеног уништавања.
- Међутим, паклитаксел и његов полувештачки аналог доцетаксел могу да се произведу парцијалном синтезом из дитерпеноида 10-деацетилбакатина III, који се може изоловати из игли украсне тисе, *Taxus baccata*, а која је обновљиви ботанички извор и може да се узгаја у стакленицима.
- Иксабепилон, полувештачки дериват епотилона Б, користи се за третман локално узнатредовалог и метастатског тумора дојке. Епотилони су изоловани из микобактерије *Sorangium cellulosum* и делују слично као паклитаксел.

Антитуморски лекови изведени из природних производа

- Трабектедин је изохинолински алкалоид пореклом из мора, првобитно добијен из љуске *Ecteinascidia turbinata*, али данас се производи парцијалном синтезом из микробиолошког метаболита, цианосафрацина Б из *Pseudomonas fluorescens*. Ромидепсин је депсипептид изолован из бактерије, *Chromobacterium violaceum*, 1994. године.
- Темсиролимус је полувештачки естарски дериват сиролимуса (рапамицина), изолованог из *Streptococcus hygroscopicus*.

Антитуморски лекови изведени из природних производа

- Винбластин, је алкалоид који се користи за лечење тератома и лимфома, представља пример сложености структуре активних принципа из природних производа.



Имуномодулатори изведени из природних производа

- Циклоспорин (циклоспорин А) је циклични пептид изолован из културе гљивице, користи се као имуносупресивни агенс приликом трансплантације органа и ткива.
- Макролид такролимус из *Streptomyces tsukubaensis* има исту врсту употребе као циклоспорин А.
- Два имуносупресива пореклом из природних производа су микофенолат-натријум и еверолимус.
- Активни принцип микофенолат-натријума је микофенолна киселина, добијена из више врста *Penicillium*-а.