

УНВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

АКАДЕМСКЕ ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ - МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ

ИП14: ИСТРАЖИВАЊА У ФАРМАЦИЈИ

Синтеза и биолошка активност потенцијално нових
фармацеутика који се могу применити у
кардиоваскуларној патологији. Методе истраживања *in vitro* и *in vivo*.

Проф. др Слободан Новокмет

Школска 2019 / 2020. година

Крагујевац

Дизајн лекова

Приступи у дизајну лекова

- ⇒ Концепцијски
- ⇒ Практични
- ⇒ Хуманитарни

Концепцијски приступ

- Састоји се из две фазе.
- **Прва фаза** представља проучавање основних концепта о молекулима лекова, рецепторима и инетракцијама "лек-рецептор", и представља "камен-темељац" у дизајну лекова
- **Друга фаза** представља основни концепт о примени интеракција "лек-рецептор" на хумане болести.

Концепцијски приступ у дизајну лекова

Кораци у првој фази

- Познавање које особине преводе молекул у лек.
- Познавање које особине макромолекул преводе у рецептор за лек.
- Познавање како дизајнирати и синтетисати лек који се уклапа у рецептор.

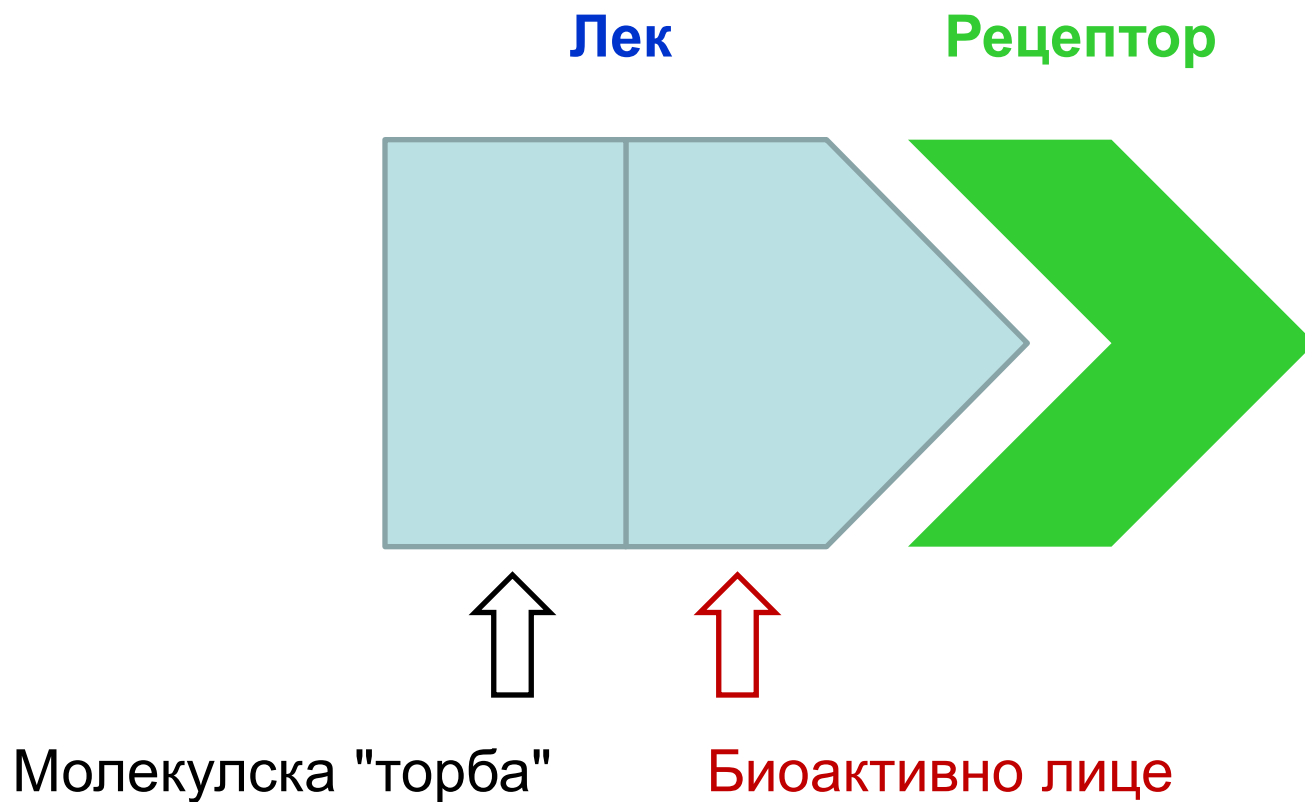
Кораци у другој фази

- Познавања како управљати телесним ендогеним системом.
- Познавање како управљати телесним ендогеним макоромолекулима.
- Познавање како инаktivирати штетне егзогене супстанце.

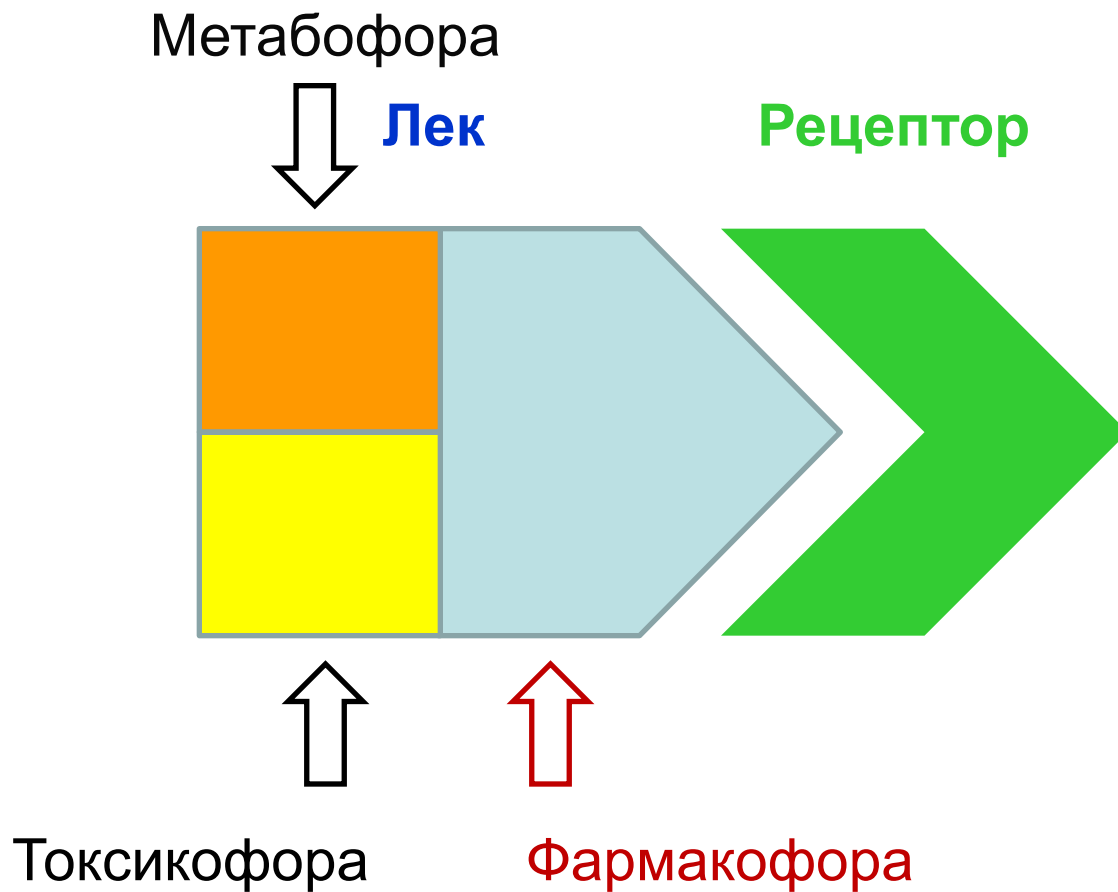
Молекул лека као садржај молекулских фрагмената

- Молекул лека као целина - **мултифора**.
- Биолошки активни делови молекула - **биофора**.
- Део молекула лека који је одговоран за метаболизам - **метабофора**.
- Део молекула лека који је одговоран за токсичност - **токсикофора**.
- Делови молекула лека који су биолошки еквиваленти и (не морају да буду) хемијски еквиваленти, служе ради обезбеђивања оптималних биолошких особина лекова - **биоизостери**.

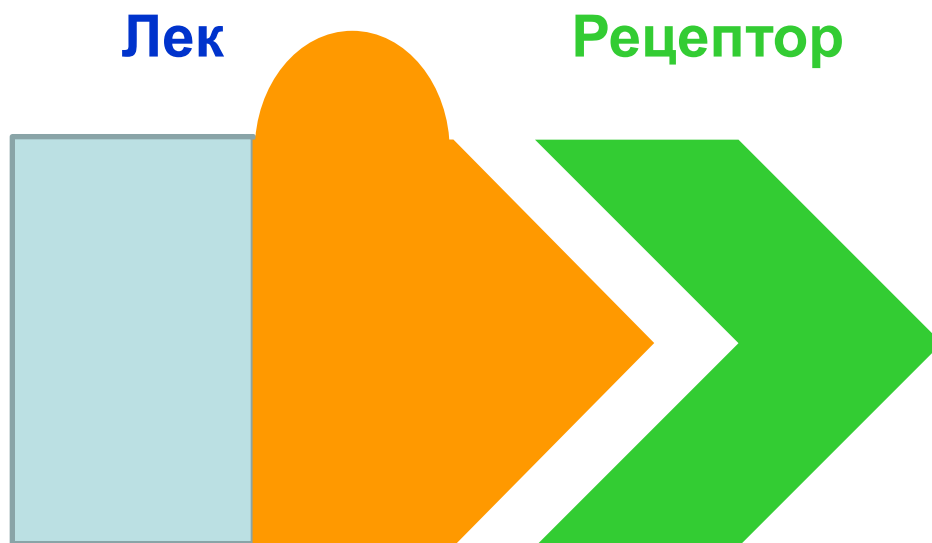
Молекул лека као садржај молекулских фрагмената



Молекул лека као садржајна целина делова молекула



Молекул лека као садржајна целина делова молекула



Биоизостерно супституисана фармакофора

Практични приступ у дизајну лекова

- Познавање и разумевање хумане биохемије и патологије на молекулском нивоу у циљу дизајна молекула сличних лековима који су конструисани да се прецизно уклопе у мете дејства лека ("лековите мете").

Хуманитарни приступ у дизајну лекова

- Фармацеут може, захваљујући пажљивом дизајну новог лека, помоћи хиљадама и милионима људи.
- ☑ *Пракса у науци представља људску активност а фармацеут је хуманитарни научник.*

Дефиниција лека у дизајну лекова

► Молекул лека

- садржи једну или више функционалних група које се налазе у тродимензионалном простору у структурном оквиру који одржава функционалне групе у дефинисаној геометријској позицији која омогућава молекулу да се веже специфично за циљане биолошке макромолекуле (рецепторе).

Дефиниција лека у дизајну лекова

- ▶ Молекул сличан леку
 - поседује хемијске и физичке особине које ће омогућити да као такав постане молекул-лек и који ће се везати за одговарајући рецептор.

Рационални дизајн лекова

- Процес који се користи у фармацеутској технологији и биотехнологији за развој нових лекова.
- Користи различите рачунарске методе у циљу
 - ☑ Идентификације нових једињења.
 - ☑ Дизајнирању селективности, ефикасности, безбедности и клиничке користи.

Категорије рационалног дизајна лекова

- Дизајн заснован на структури
- Дизајн заснован на структури лиганда
- Дизајн "*de novo*"
- Хомолого моделовање - које зависи од расположивих информација у вези циљева лека и једињења као потенцијалних лекова.
- Дизајн заснован на приступу активног аналога.

Дизајн заснован на структури

- Циљ је лек као кључни молекул који је укључен у специфичне метаболичке или ћелијске сигналне путеве повезаних са развојем болести.
- Најчешће протеини и ензими.
- Једињења се дизајнирају тако да **инхибишу**, **поврате** и **мењају** структуру и понашање протеина и ензима који су одговорни за развој болести.

Ресурси за откриће нових лекова

- I. Постојећи лекови.
 - II. Проучавања физиолошких циљева (мета) према којима лекови показују деловање.
 - III. Дизајнирање лекова засновано на структури.
- ⇒ Почетна основа за откриће нових лекова представља познати ("стари") лек.

Дизајнирање нових лекова засновано на структури

► Разлози (фармаколошки захтеви)

- ⇒ Развој бољих дозних облика.
- ⇒ Побољшање апсорпције.
- ⇒ Повећање дужине деловања.
- ⇒ Повећање јачине деловања.
- ⇒ Смањен број дневних доза у терапији.
- ⇒ Избегавање појаве нежељених дејстава.

Подела лекова према пореклу

- ▶ Лекови могу да буду:
 - ПРИРОДНИ и
 - ВЕШТАЧКИ (СИНТЕТИЧКИ).

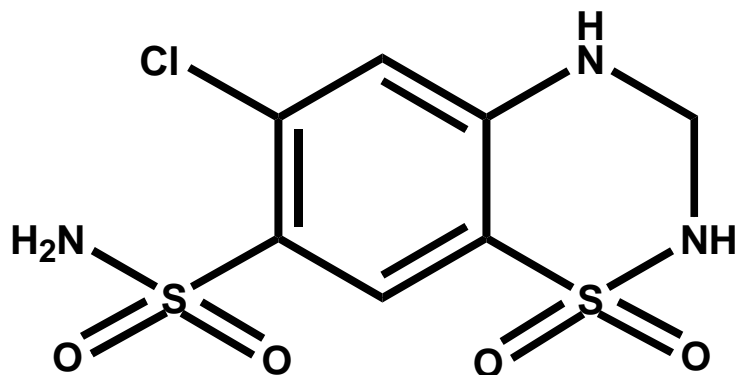
Природни лекови

- Најстарија група лекова (база података).
- Служе као полазна основа за дизајнирање нових лекова (аналога).
- Служе као водичи за синтезу и развој нових аналога са бољим особинама у односу на полазну супстанцу.

Вештачки (синтетички) лекови

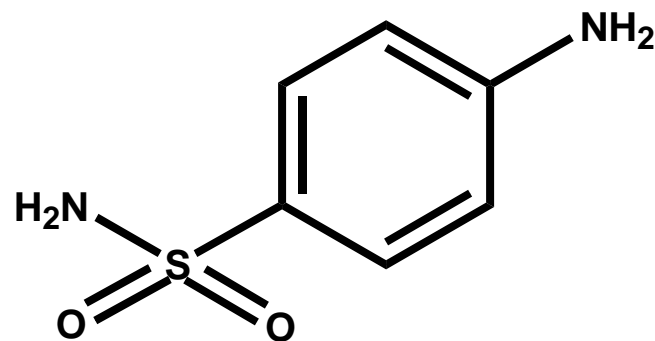
- ▶ "Пионирски" лек или "први из групе" лекова представља најважнији тип синтетичког лека.
 - ▶ Користи се за дизајнирање синтезе аналога постојећег лека.
 - ▶ Његов значај се огледа у поређењу његових нежељених дејстава са нежељеним дејствима постојећег лека који је у употреби.
- ⇒ Пример је откриће сулфонамидних диуретика, педесетих година двадесетог века, које је проистекло на основу уоченог ефекта да бактерицид, сулфанил-амид, повећава алкалност урина јер инхибира ензим - карбоанхидразу.

Вештачки (синтетички) лекови



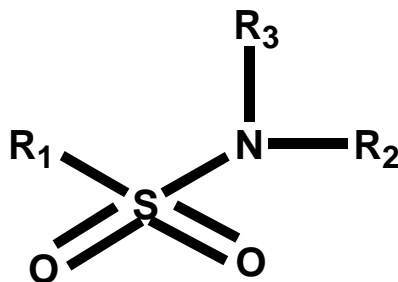
Хидрохлортиазид

Диуретик



Сулфаниламид

Бактерицид



Фармакофора тиазидних диуретика

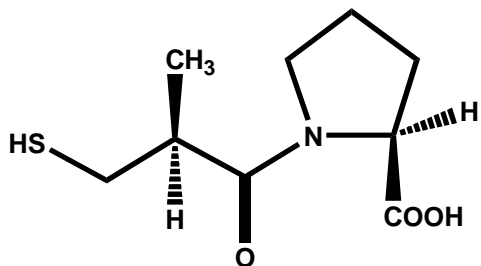
Вештачки (синтетички) лекови

- ⇒ Ово, као и друга открића нису била последица дизајнирања са циљем постизања њихове нове индикације већ су била случајна.
- ⇒ Захваљајући овим пионирским открићима започет је нов приступ у дизајнирању аналога лекова и побољшању њихових фармаколошких особина.

Физиолошки циљеви (мете)

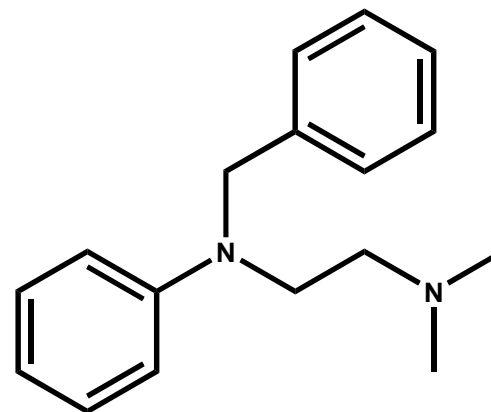
- ▶ Синтеза пионирског лека може да буде резултат дизајнирања заснованог на структури лиганда (нпр. са циљем инхибиције неког ензима или рецептора за биогени амин).
- ▶ Примери таквог приступа су синтеза првог:
 - ACE-инхибитора - каптоприла.
 - Антагонисте хистаминских H_1 -рецептора - фенбензамина.
 - Бета-блокатора - пронеталола.
 - Антагонисте хистаминских H_2 -рецептора - циметидина.

Пионирски лекови



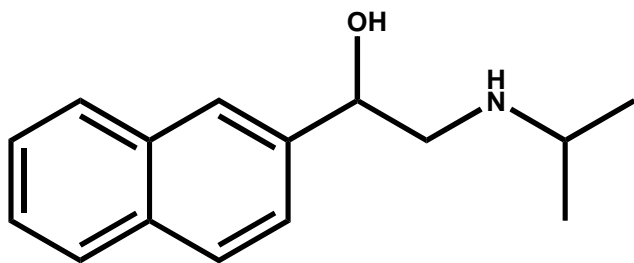
Каптоприл

ACE-инхибитор



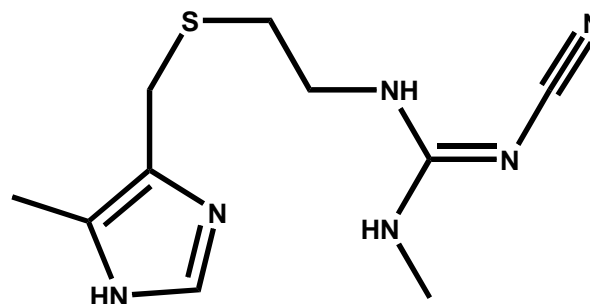
Фенбензамин

Хистамински H_1 -антагониста



Пронеталол

Неселективни бета-блокатор



Циметидин

Хистамински H_2 -антагониста

Физиолошки циљеви (мете)

- ▷ Бројни физиолошки циљеви (мете) се користе за одређивање и дефинисање дејства нових потенцијалних молекула лекова - **молекул сличан леку**.
- ▷ То се постиже захваљујући великом броју доступних података из области биохемије и биологије ћелија и могућности њиховог коришћења.

Физиолошки циљеви (мете)

▼ Недостаци

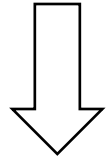
- Усклађивање дефинисаног физиолошког циља према целокупној физиологији организма (код експерименталних животиња).
 - Немогућност да ће се на основу циља одредити исход лечења болести.
 - Многи физиолошки циљеви немају специфичан секундарни гласник.
- Због наведених разлога приступа се Ха-Те-Ес-методи (*HTS* од енгл. - *High Throughput Screening*) и бази података која садржи хемијске информације о познатим лековима.

Дизајнирање лекова засновано на структури

- ⇒ Када су познате неопходне информације о молекулској структури физиолошког циља (мете) као што је кристална структура ензима која садржи прецизну геометрију активних места, онда се дизајнирање лека заснива на синтези молекула који се "уклапа" у тим активним местима.
- ⇒ То је идеалан случај и није чест.
- ⇒ У реалности говоримо о "дизајнирању лека заснованом на асистенцији познате структуре" нпр. откриће новог инхибитора ренина - алискирен.

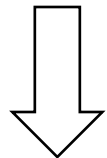
Алискирен

Ангиотензиноген



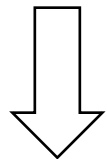
⊗ Инхибитори ренина

Ангиотензин I



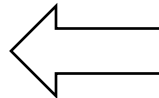
⊗ ACE-инхибитори

Ангиотензин II

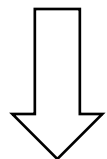


⊗ Антагонисти AT_1 -рецептора за ангиотензин II

Алдостерон

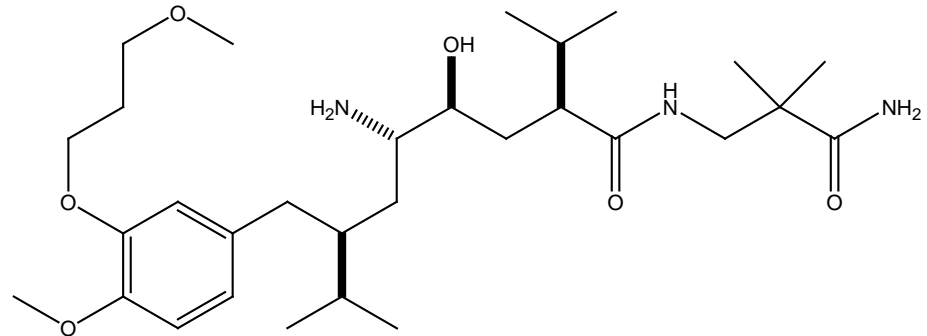


Остали стимулуси



⊗ Антагонисти алдостеронских рецептора

Вазоконстрикција и васкуларно
ремоделовање



(2S,4S,5S,7S)-N-(2-karbamoil-2-metilpropil)-5-amino-4-hidroksi-2,7-diizopropil-8-[4-metoksi-3-(3-metoksipropoksi)fenil]-oktanamid

Дизајнирање лекова засновано на структури

- !! Нова открића лекова представљају ризичан процес.
- !! Временски период је 10-20 година при чему не постоје гаранције да ће нов лек адекватно утицати на процес болести, бити безбедан и да неће изазивати нежељена дејства.

Дизајнирање лека засновано на структури аналога

- ⇒ Предност синтезе аналога неког познатог, постојећег, лека заснива се на чињеници да је предвиђен терапијски ефекат аналога **ПОЗНАТ**.
- ⇒ Због ове чињенице на тржишту се појављује велики број аналога у врло кратком временском периоду (2-3 године).
- ⇒ Сви аналози морају да прођу кроз фазе претклиничког испитивања у циљу дефинисања безбедности и клиничких студија у циљу доказивања њихове предности у терапији.

Дизајнирање лека засновано на аналогу

- ⇒ Синтеза аналога се усмерава у циљу њихове безбедне примене код широке популације пацијената без изазивања нежељених дејстава.
- ⇒ Свака примена новог аналога има историјски значај јер предтсваља подешавање одређене терапије.

Дефиниција аналога

"Лек чија је структура слична у односу на други лек али чије хемјске и биолошке особине могу бити потпуно различите"

IUPAC-ово тумачење за медицинску хемију

Структурни и фармаколошки аналози

- Под појмом аналог често се подразумева аналог лека који има сличне хемијске и/или фармаколошке особине са другим леком.
- Када аналози имају идентичну структуру онда се они називају директни аналози.
- Већина аналога има врло малу сличност у погледу структуре фармакофоре.
- У случајевима када је тешко препознати праву хемијску сличност за дизајнирање аналога примењује се метода односа структуре и деловања (*SAR* од енгл.- *Structure-Activity Relationship*).

Структурни аналози

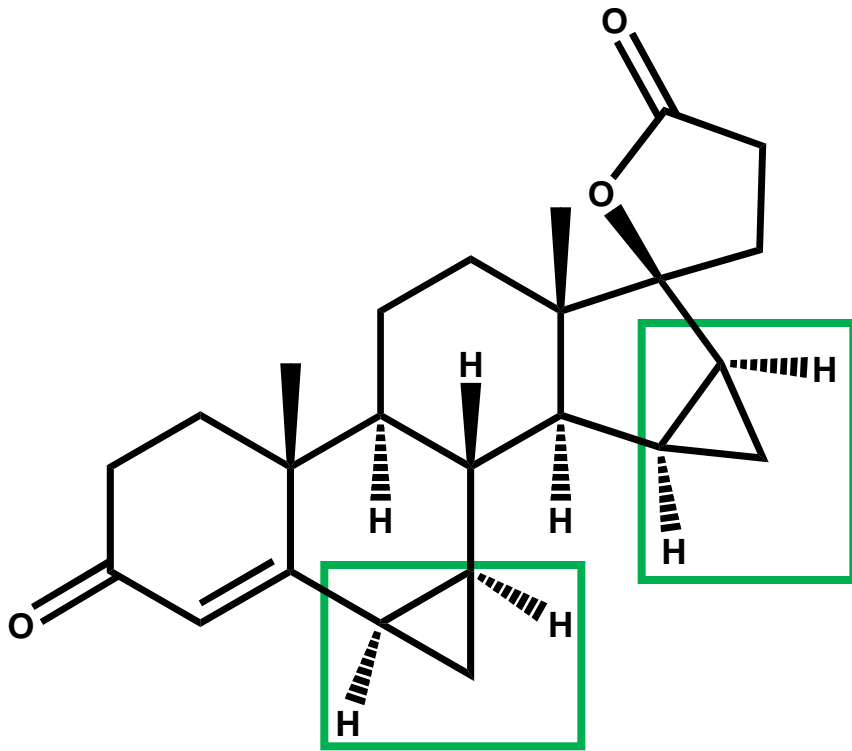
- ▷ Структурни аналози су молекули лекова који имају сличну хемијску структуру али различите фармаколошке особине.
- ▷ Они су најчешће добијени са намером да буду структурни и фармаколошки аналози али су неочекивано показали другачије фармаколошко дејство (активност).

Структурни аналози

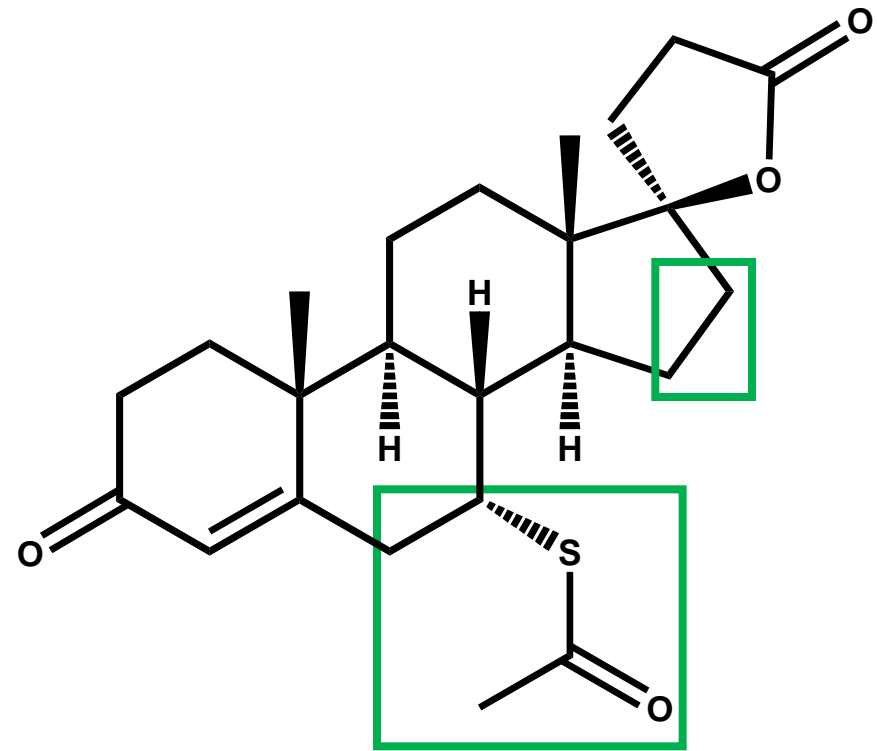
- !! Једноставна модификација (промена) структуре лека може да "из корена" промени његову биолошку активност уз истовремено очување дела првобитне активности.

Структурни аналози

- Пример: добијање дроспиренона (оралног контрацептивног средства) почевши од спиронолактона (диуретика).



Дроспиренон



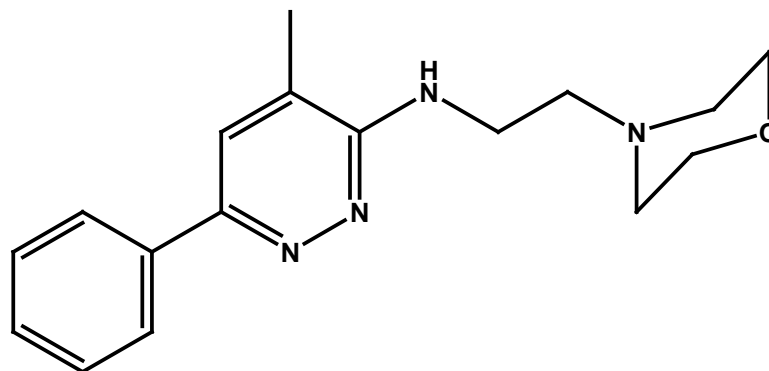
Спиронолактон

Фармаколошки аналози

- ▶ Лекови који имају слична фармаколошка деловања без одређених, јасних, хемијских или структурних сличности.
- ▶ То значи да различите фармакофоре објашњавају исто фармаколошко деловање лекова који се разлукују по структури.
- ☑ Дизајнирање оваквих аналога се одвија помоћу скрининг метода или рачунара.
- ⇒ Дефиниција модела за фармакофору: *"Тродимензионални распоред атома (или група атома) одговорних за биолошку активност молекула лека."*

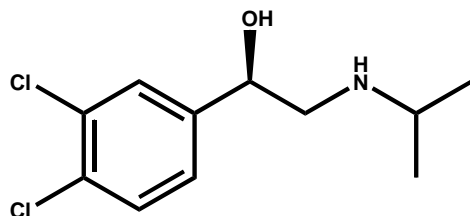
Лекови произашли на основу нежељених дејстава

- **Селективно подешавње нежељених дејстава**
представља нов приступ тј. стратегију и подразумева да нежељена дејства активне супстанце служе као полазна основа за промене у њеној структури и добијања аналога чија је главна активност оно што је у почетку било нежељено дејство.
- ⇒ Нпр.: Структура инхибитора ацетихолинестеразе, мускаринских M_1 -рецептора, серотонинских 5-HT₃-рецептора изводи се из структуре минаприна (антидепресива).



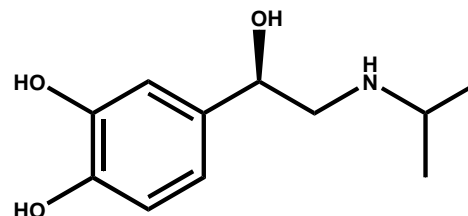
Антагонисти и агонисти

- Антагонисти и агонисти неуротрансмитера и *GPCR* рецептора често су врло слични у хемијском (структурном) погледу.
 - Мале промене у структури и хемијских особина (повећање липофилности) може да преведе агонисту у антагонисту.
- ⇒ Нпр.: први (неселективни) бета-блокатор, дихлороизопреналин, изведен је из структуре изопреналина.



Дихлороизопреналин

Антагониста

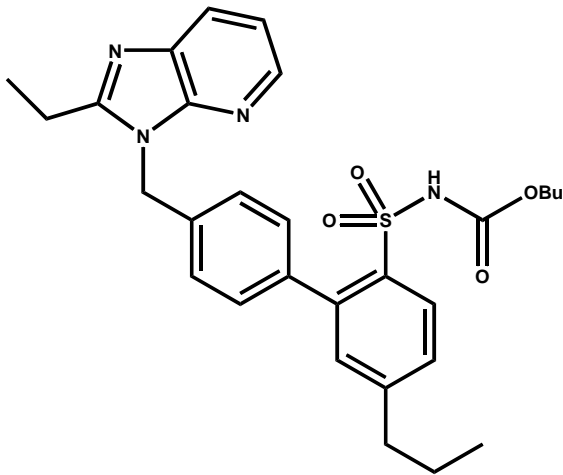


Изопреналин

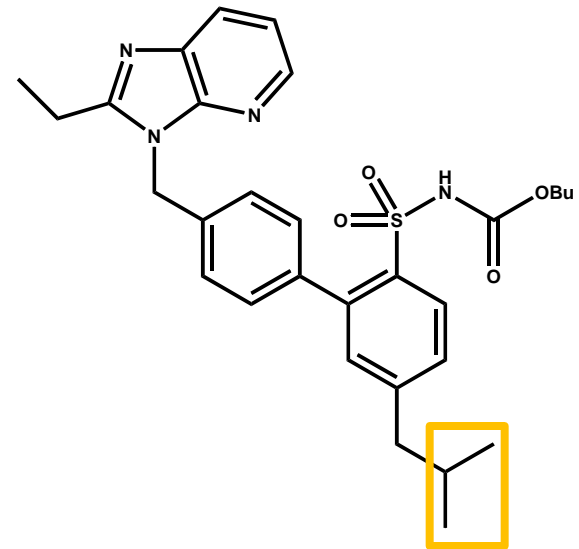
Агониста

Антагонисти и агонисти

- **Реверзни ефекат** или превођење антагонисте у агонисту, одвија се благим повећањем липофилности молекула.
- ⇒ Нпр.: антагониста AT_1 -рецептора за ангиотензин II се преводи у агонисту увођењем метил-групе.



Антагониста



Агониста

Основни принципи у дизајну новог терапеутика

- I. Дизајн молекула који садржи особине молекула лека.
 - II. Одабир одговарајућег рецептора као понетцијалну мету за молекул лека
 - III. Употреба метода за идентификацију и оптимизацију прототипског лека.
- Такође, неопходно је повезати све наведене принципе са хуманом патологијом болести која треба да се лечи, односно, пронаћи однос између болести и протеинске мете за молекул лека.
 - У случају кардиоваскуларног система када се ради о ангини пекторис, инфаркту миокарда, аритмијама, артеријској хипертензији или валвуларним болестима срца, учествују различити рецептори (нпр.: адренергички, холинергички) и различити патолошки процеси (нпр.: атеросклероза, инфламација).

Синтеза и биолошка активност потенцијално нових
фармацеутика који се могу применити у кардиоваскуларној
патологији. Методе истраживања *in vitro* и *in vivo*.

АСЕ-ИНХИБИТОРИ

Механизам деловања ACE-инхибитора

- ▶ Антихипетензивно деловање инхибицијом елиминације (разградње или деградације) декапептида **ангиотензина-I** (*Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu*) у октапептид **ангиотензин-II** (*Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe*).
- ▶ Компетитивна инхибиција ензима конвертазе ангиотензина I - ACE (од енгл.-*Angiotenzin Converting Enzyme*).
- ▶ Инхибицијом ензима ACE (*пептидил-дипептидазе*; *ЕС 3.4.15.1*) смањује се концентрација ангиотензина-II (вазоконстриктор) у тковима што доводи до снижења крвног притиска.

Порекло и деловање ангиотензина II



AT_1 - и AT_2 -рецептори за ангиотензин II (Фибропласти)

AT_1 - и AT_2 -рецептори за ангиотензин II (Миоцити)

AT_1 -рецептори за ангиотензин II (Нервни завршеци)

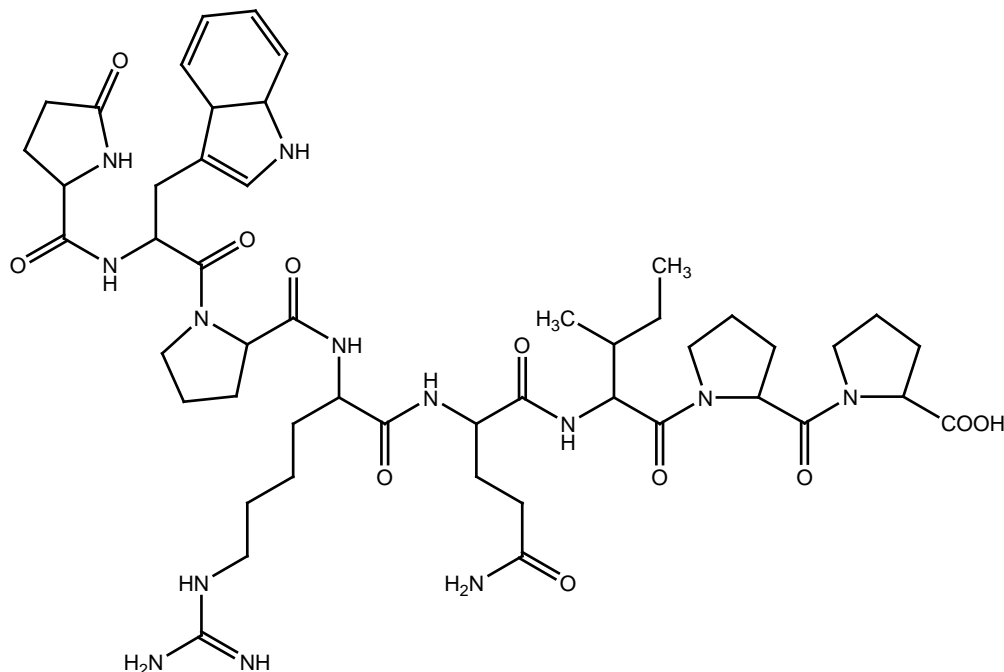
Дизајн АСЕ-инхибитора

- **Полазна хипотеза** - АСЕ-инхибиција тј. блокирање деградације ангиотензина-I (брадикинина, супстанце *P* и енкефалина).
- **Почетак истраживања** - изоловање, карактеризација и вештачка синтеза већег броја пептида из отрова змије лат.- *Bothrops jararaca*.
- **Синтеза** активног антихипертензива тепротида (нонапептид; SQ 20881).

Пептидни АСЕ-инхибитор

- Секвенција: *Glu-Trp-Pro-Arg-Gln-Ile-Pro-Pro* или *Pyr-Trp-Pro-Arg-Gln-Ile-Pro-Pro*

- ▶ Интравенска примена код пацијената са есенцијалном хипертензијом.
- ▶ Губитак биорасположивости након оралне примене.
- ▶ Изведени фармаколошки, хемијски и ензимски подаци о особинама конвертазе ангиотензина.



Тепротид (SQ 20881)

Дизајн непептидних АСЕ-инхибитора

⇒ Заснован на следећим
чињеницама:

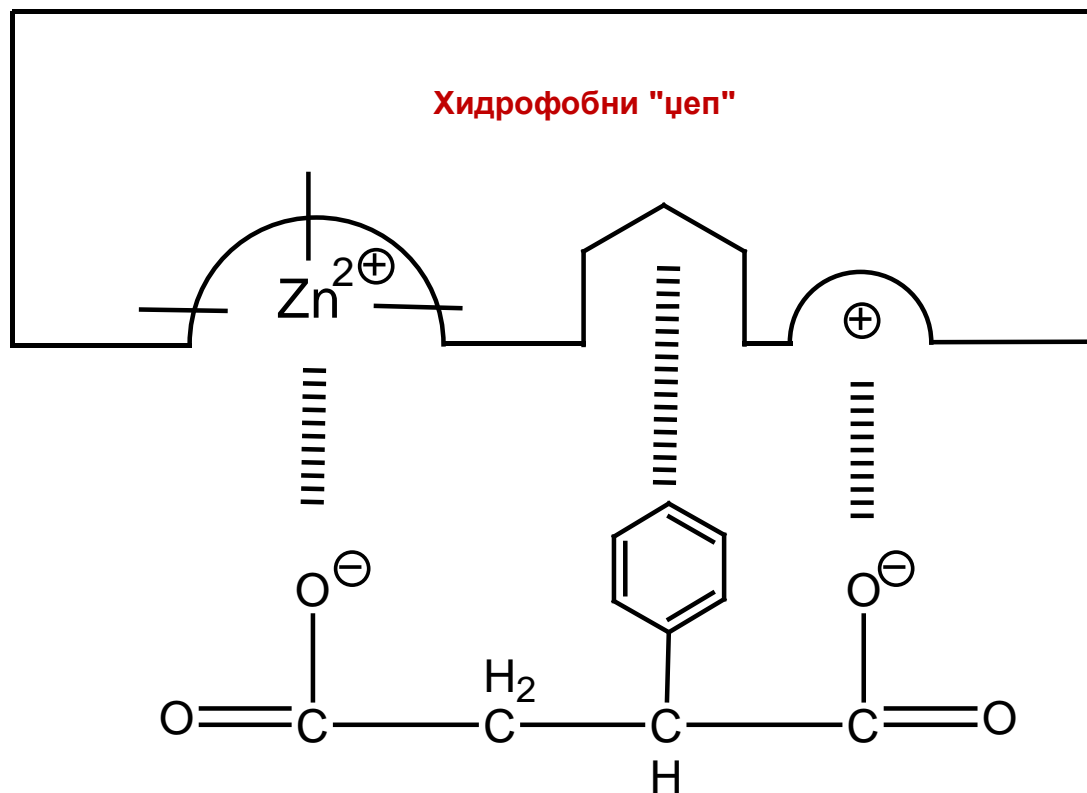
Конвертаза ангиотензина спада у
групу ензима карбоксипептидаза
(структура слична
карбоксипептидази А у
панкреасу).

D-Бензил-сукцинска (ћилибарна)
киселина је јак инхибитор
карбоксипептидазе А.



David W. Cushman и Miguel A. Ondetti

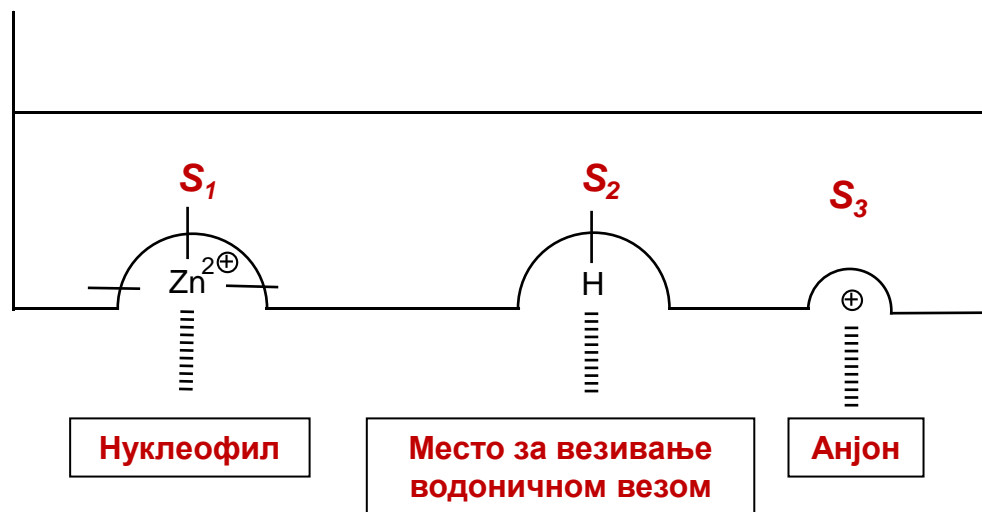
Схема везивних места у ензиму карбоксипептидаза А



Карбоксипептидаза А

D-2-Бензил-фенилаланин

Схема везивних места у ензиму ACE



⇒ Поседује три везивна места за супстрат (**S** од енгл.- *binding sites*):

- Централни метални јон (Zn^{2+}).
- Позиција на којој је могуће грађење водоничне везе.
- Позитивно наелектрисан јон (катјон) аргинина (гванидинијум или аргининијум катјон).

⇒ Не садржи хидрофобни "џеп" - место за селективно везивање супстрата.

Дизајнирање синтезе непептидних АСЕ-инхибитора

- ⇒ Претпоставка: раздаљина између Zn^{2+} јона и аргининијум катјона у АСЕ је дужа него у карбоксипептидази-А.
- ⇒ Полазна основа за синтезу снажног АСЕ-инхибитора: деривати *D*-2-бензил-ћилибарне (сукцинске) киселине продужене за једну аминокиселинску јединицу (*N*-сукцинил-*L*-пролин).
 - Синтетисана је серија сукцинил-пролинских деривата, при чему је **SQ 14.225** показао високу ефикасност АСЕ-инхибиције.
 - Ова супстанца је названа **каптоприл** и представља прототип АСЕ-инхибитора тј. **пионирски лек**.

Дизајнирање синтезе непептидних *АСЕ*-инхибитора

- Каптоприл је *АСЕ*-инхибитор прве генерације антихипертензивних агенаса, и у неким случајевима се користи у првој линији терапије.
- Повећање концентрације брадикинина у плазми изазвано присуством *АСЕ*-инхибитора представља један од главних фактора антихипертензивног деловања *АСЕ*-инхибитора.

Дизајнирање синтезе непептидних АСЕ-инхибитора

- Замена тиолне (-SH) групе са биостерно еквивалентом карбоксилном (-COOH) групом која може да се везује за Zn^{2+} .
- Дизајн **дикарбоксилних** АСЕ-инхибитора који у својој структури садржи две карбоксилне групе.
- Полазна основа за синтезу био је модел трипептида код кога је *N*-терминус изостерно замењен *N*-карбоксиметил-групом.
- Први аналог, из групе аналога на основу изведене фармакофоре био је еналаприлат.

Дизајнирање синтезе непептидних *АСЕ*-инхибитора

- Еналаприлат има одличну активност код интравенске примене, недостатак је био губитак биорасположивости након оралне примене.
- Естерификацијом еналаприлата добијен је еналаприл који је показао изузетну биорасположивост након оралне примене.
- Обзиром да је за биоактивацију еналаприла неопходна естарска хидролиза, он функционише као прекурзор.
- Синтеза еналаприла отоврила је пут ка синтези различитих дикарбоксилних *АСЕ*-инхибитора.

Дизајнирање синтезе непептидних *АСЕ*-инхибитора

- Лизиноприл и каптоприл су једина два *АСЕ*-инхибитора у клиничкој употреби који нису прекурзори.
- Молекулски низ код ових *АСЕ*-инхибитора је развијен модификацијом прстена на С-терминусу аминокиселине.
- Заменом пиролидинског прстена код каптоприла, еналаприла и лизиноприла већим бицикличним или спиро-прстеном добијени су беназеприл, цилазаприл, квиналаприл, моексиприл, периндоприл, рамиприл, спираприл и трандолаприл.

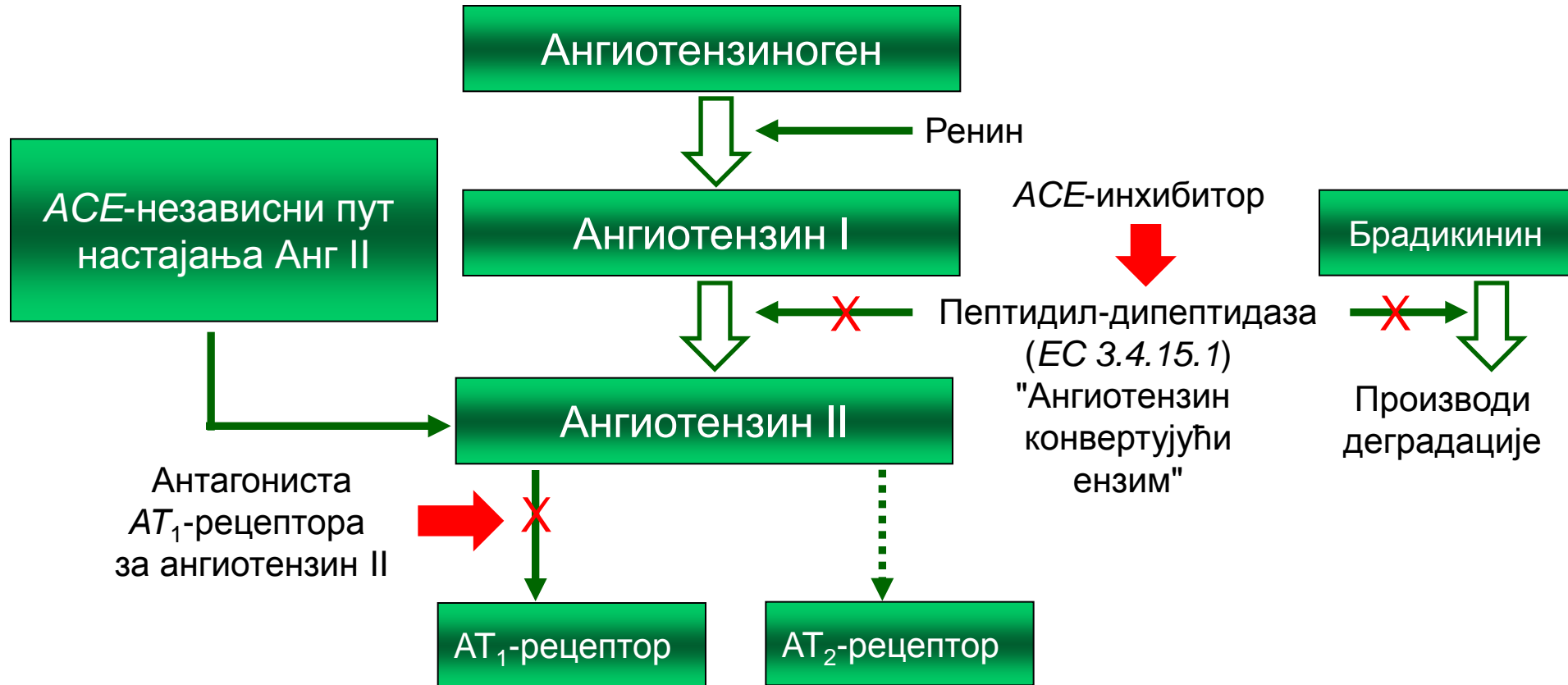
Дизајнирање синтезе непептидних *АСЕ*-инхибитора

- За синтезу *АСЕ*-инхибитора који не садрже тиолну групу пошло се и од синтезе једињења која садрже фосфор у својој структури у облику фосфоната (фосиноприл и церонаприл).
- Фосфинска киселина је биостерно еквивалентна тиолној и карбоксилној групи у погледу афинитета према Zn^{2+} јону у *АСЕ* ензиму.
- Фосиноприл је прекурсор који се хидролизује деловањем ензима у јетри до биоактивног фосиноприлата.

Синтеза и биолошка активност потенцијално нових
фармацеутика који се могу применити у кардиоваскуларној
патологији. Методе истраживања *in vitro* и *in vivo*.

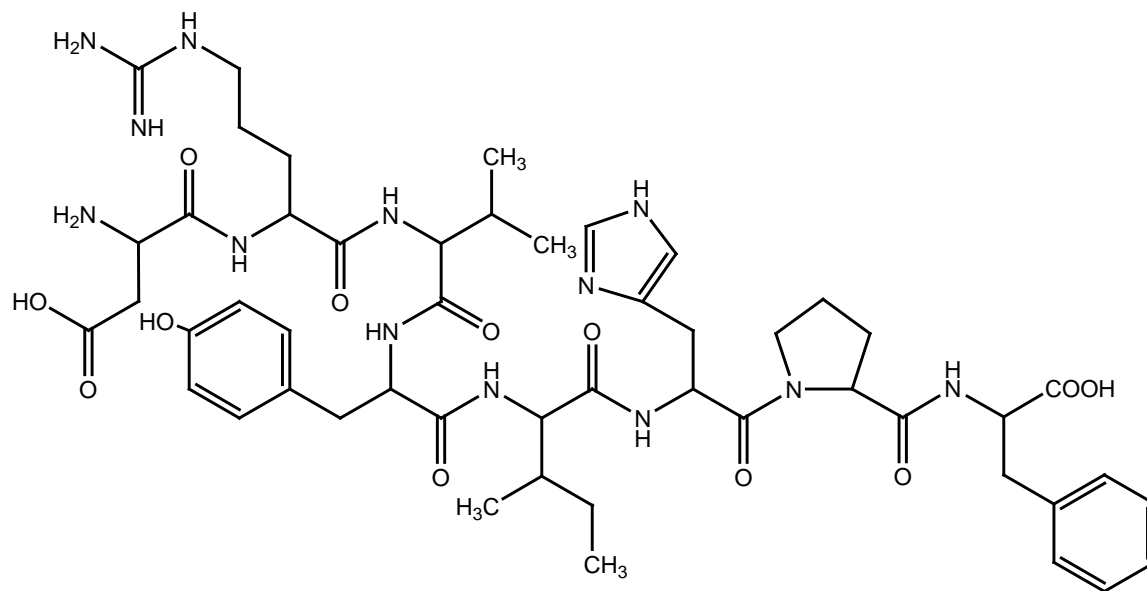
АНТАГОНИСТИ АНГИОТЕНЗИНА

Механизам деловања ангиотензина II



Дизајн пептидних антагониста ангиотензина

- Пептидни антагонисти рецептора за ангиотензин II дизајнирани су модификацијом структуре молекула ангиотензина II.

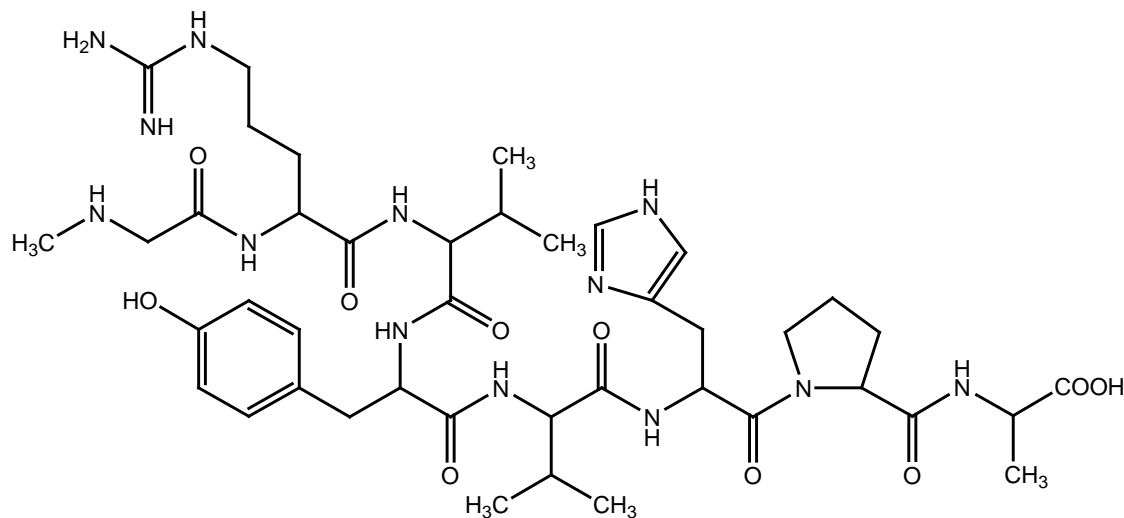


Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

Ангиотензин II

Дизајн пептидних антагониста ангиотензина

- Сараласин, најефектинији пептидни антагониста рецептора за ангиотезин II, који је активан само када се примењује интравенски.
- Сараласин или [*Sar*¹, *Val*⁵, *Ala*⁸] ангиотензин II (*Sar* скраћеница за аминокиселину саркозин или *N*-метил-глицин).

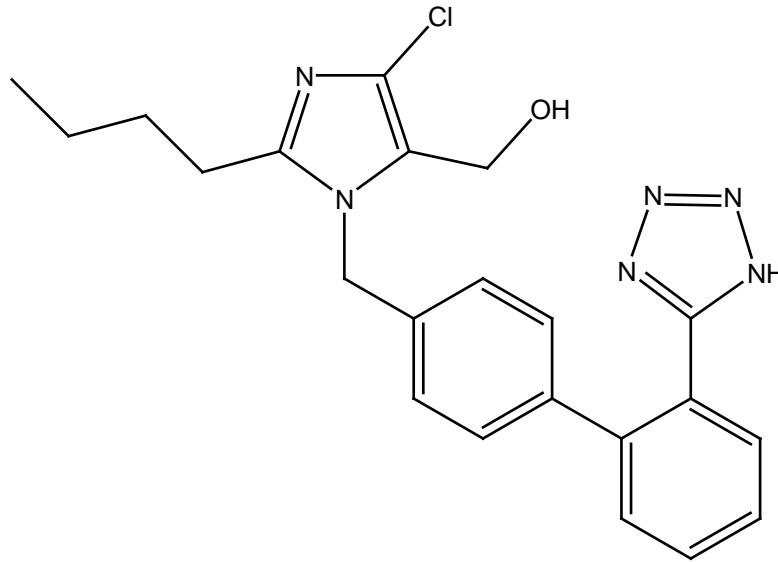


Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala

Сараласин

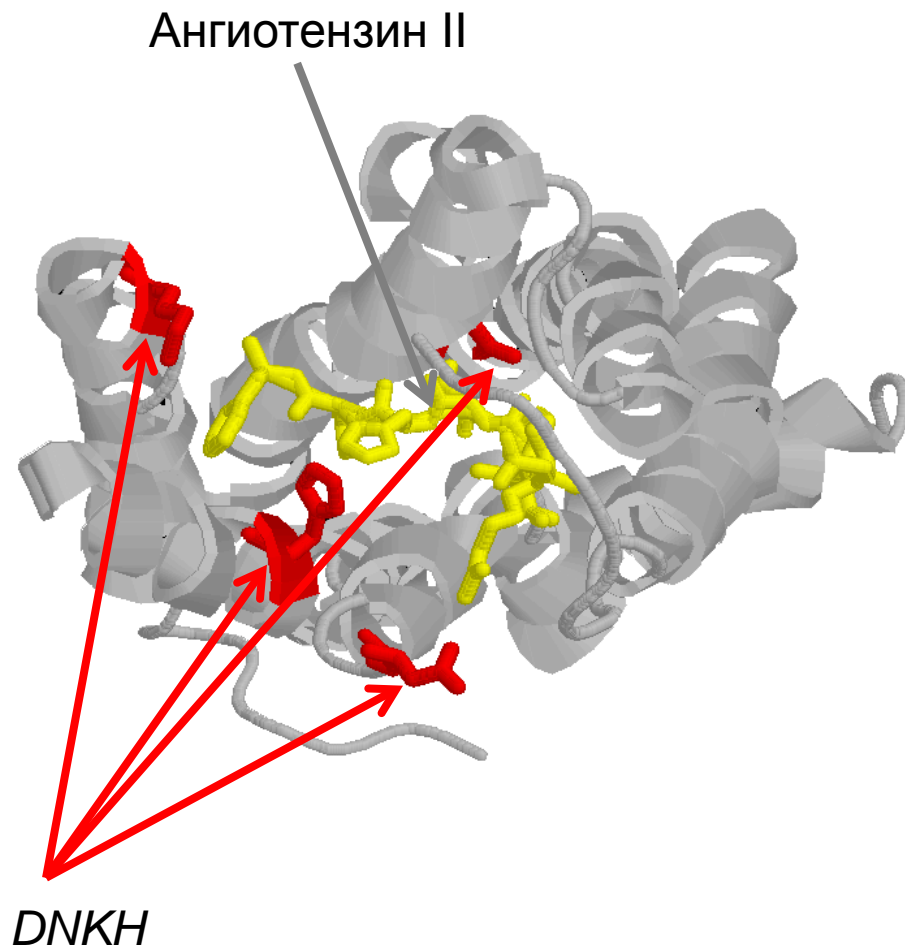
Дизајн непептидних антагониста ангиотензина

- Лосартан је дизајниран уз помоћ рачунарске технологије и софтверског инжењеринга где је коришћена структура ангиотензина II и "overlap" програм за серију антихипертензивних молекула, аналога имидазол-5-сирћетне киселине.



лосартан

AT₁-рецептор



- AT₁-рецептор је протеин који се састоји од 359 аминокиселина.
- Везује ангиотензин II и сличне пептиде.
- Ангиотензин II (као и слични лиганди или пептиди) се везује за специфичну **DNKH** аминокиселинску секвенцу AT₁-рецептора.

D (Аспарагинска киселина 281)

N (Аспарагин 111)

K (Лизин 199)

H (Хистидин 256)

Антагонисти рецептора за ангиотензин II

- Непептидни антагонисти рецептора за ангиотензин II су јаки, орално активни, специфични и компетитивни антагонисти (или блокатори) AT_1 -рецептора за ангиотензин II.
- Њихово дејство се огледа у смањењу крвног притиска које је аналогно **еналаприлу**.

Подела непептидних антагониста AT_1 -рецептора за ангиотензин II према функционалности

- Јаки, орално активни, специфични и компетитивни антагонисти AT_1 -рецептора за ангиотензин II.
- Снижење крвног притиска аналогно **еналаприлу**.
- Према фармаколошком дејству непептидне антагонисте ангиотензинских рецептора теоријски можемо поделити у три групе:
 - Селективни антагонисти AT_1 -рецептора за ангиотензин II.
 - Селективни антагонисти AT_2 -рецептора за ангиотензин II.
 - Неселективни антагонисти AT_1 - и AT_2 -рецептора за ангиотензин II.

Селективни антагонисти AT_1 -рецептора за ангиотензин II

- Блокирају следећа биолошка дејства ангиотезина II:
 - ▶ Контракција васкуларних мишића
 - ▶ Брз и спори хипертензивни ефекат
 - ▶ Жеђ
 - ▶ Ослобађање вазопресина
 - ▶ Секреција алдостерона
 - ▶ Ослобађање катехоламина из бубрега
 - ▶ Хипертрофија и хиперплазија ћелија

Заједничке фармаколошке особине селективних антагониста AT_1 -рецептора за ангиотензин II

- Ниска биорасположивост (<50 %, осим ирбесатрана).
- Високи степен везивања за протеине плазме (>90 %).
- Излучују се углавном путем јетре.
- Полувреме елиминације је око 9 сати.

Синтеза и биолошка активност потенцијално нових
фармацеутика који се могу применити у кардиоваскуларној
патологији. Методе истраживања *in vitro* и *in vivo*.

НАТРИУРЕЗНИ ПЕПТИДИ

Натриурезни пептиди

- ▶ Пептиди сличних структура.
- ▶ Остварују велики број корисних физиолошких ефеката.
- ▶ Приступни су у разним ткивима.
 - ▶ Регулаторне супстанце одговорне за одржавање хомеостазе воде и натријума (диуретици и натриуретици).
 - ▶ Регулаторни хормони одговорни за снижење крвног притиска.

Натриурезни пептиди

► Основна физиолошка функција

- Регулација хомеостазе воде и електролита различитим механизмима.
- Заштита кардиоваскуларног и других система од ефеката које изазива оптерећење волуменом.

► Главна физиолошка функција

- Ефекти на кардиоваскуларном систему, бубрезима и мозгу.

► Биосинтеза

- У срцу и крвним судовима.

Натриурезни пептиди

- У физиолошким околностима, у дугорочној регулацији хомеостазе воде и електролита доминира РАС, док су натриурезни пептиди мање важни.
- У стањима великог и трајног повишења притиска у преткоморама, долази до трајне активације натриурезних пептида која се испољава натриурезом и супресијом деловања пресорних супстанци и катехоламина.

Натриурезни пептиди

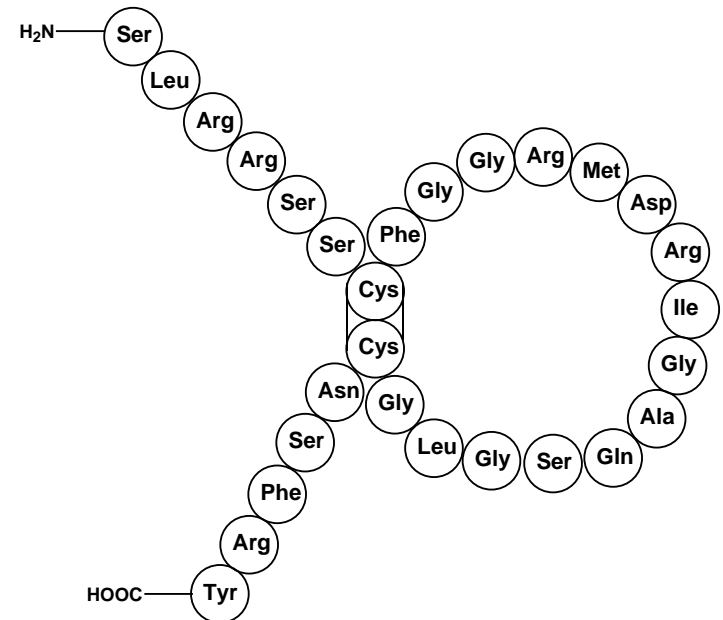
- У ЦНС-у натриурезни пептиди регулишу хомеостазу воде и електролита централним механизмима:
 - ⇒ смањују тонус симпатикуса.
 - ⇒ смањују секрецију вазопресина.
 - ⇒ смањују потребу за сољу.
 - ⇒ утичу на центар за жеђ.
- Срце испољава своју ендокрину функцију тако што лучи *ANP* и *BNP* чиме се укључује у сложен систем регулације запремине течности у организму.

Натриурезни пептиди

- ▶ Заједничке особине:
 - ☑ Прстенаста структура.
 - ☑ Различита локализација.
 - ☑ Испољавање различитих физиолошких ефеката.
- ▶ Значај прстенасте структуре натриурезних пептида огледа се у њиховом везивању за рецепторе.

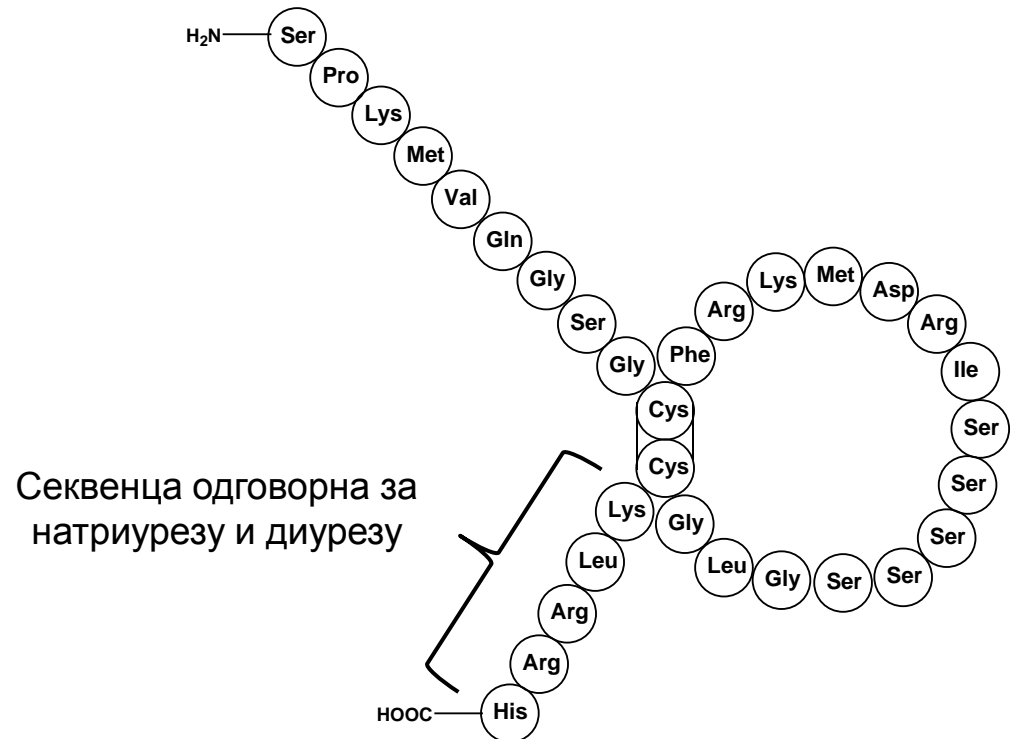
Атријални натриурезни пептид - *ANP*

- 28 аминокиселина.
- Диуретик и натриуретик.
- Инхибитор РААС и СНС.
- Васкуларна релаксација.
- Антагонизује вазоконстрикторне ефекте ангиотензина II.
- Атрија (преткомора).



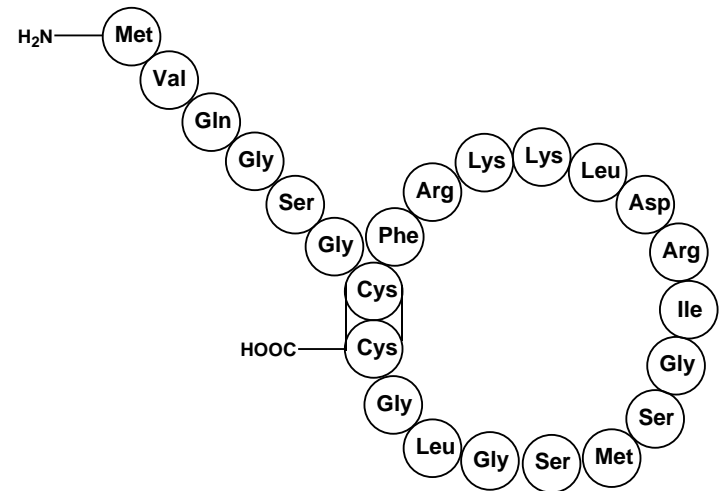
Натриурезни пептид тип *B* (од енгл.-*Brain*) - *BNP*

- 32 аминокиселине.
- Диуретик и натриуретик.
- Инхибитор РААС и СНС.
- Дужи полу-живот.
- Биохемијски маркер.
- Користи се у терапији декомпензоване срчане инсуфицијенције.
- Преткомора и комора.



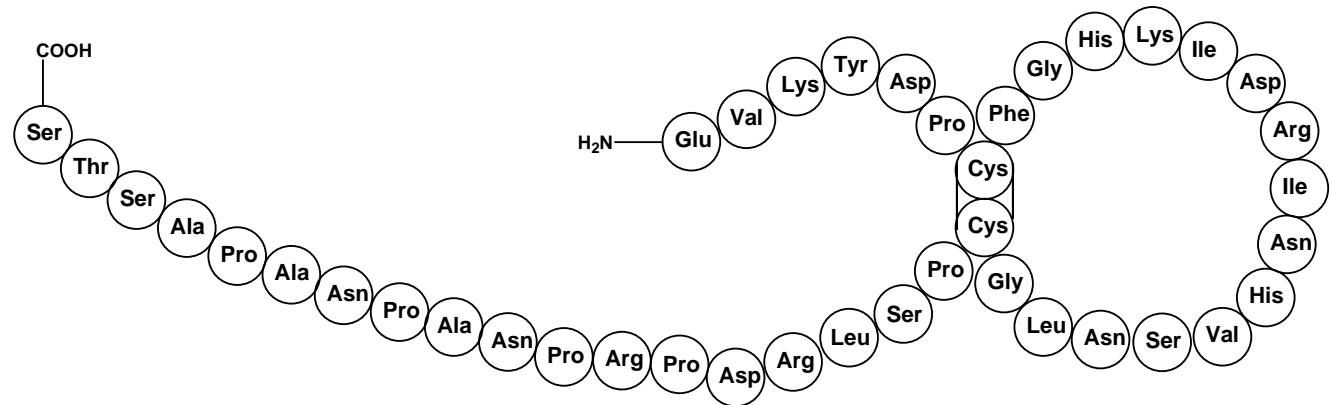
Натриурезни пептид тип C - *CNP*

- 22 аминокиселине.
- Важна улога у паракриној регулацији васкуларног тонуса на локалном нивоу и раста ћелија.
- Није диуретик ни натриуретик.
- Потентан вазодилататор.
- Инхибира ослобађање ендотелина стимулирано ангиотензином II.
- Биосинтеза у крвним судовима.



Натриурезни пептид тип *D* - *DNP* (од лат. - *Dendroaspis*)

- 38 аминокиселина.
- Првенствено изолован из отрова змије Зелена Мамба (лат. - *Dendroaspis angusticeps*) а касније из хуманог ткива и плазме.
- Диуретик и натриуретик.
- Релаксира гастроинтестиналне глатке мишиће.



Фармаколошке особине натриурезних пептида

	<i>ANP</i>	<i>BNP</i>
Дужина полипептидног низа	28 АК	32 АК
Одговарајући рецептор	<i>NPR-A; NPR-C</i>	<i>NPR-C</i>
Прекурзор	Препро <i>ANP</i> (151 АК)	Препро <i>BNP</i> (134 АК)
Прохормон (прекурзор без сигналне секвенце)	Про <i>ANP</i> (126 АК)	Про <i>BNP</i> (108 АК)
Складиште прохормона	Атријалне грануле	Без складиштења
Главни пептидни фрагменти у крвотоку	<i>NT-проANP</i> _(1-30; 31-67; 79-98) <i>ANP</i> ₍₉₉₋₁₂₆₎	<i>NT-проBNP</i> ₍₁₋₇₆₎ <i>BNP</i> ₍₇₇₋₁₀₈₎
Биолошки активни хормони (са дисулфидним мостом)	<i>ANP</i> ₍₉₉₋₁₂₆₎	<i>BNP</i> ₍₇₇₋₁₀₈₎
Полуживот у плазми	3 минута	21 минут
Стимулус за ослобађање	Атријална трансмурална тензија	Коморска тензија зида
Место за синтезу	Срчана атрија	Срчана вентрикула

Рецептори за натриурезне пептиде

- Натриурезни пептиди остварују своје физиолошко дејство посредовањем преко својих рецептора.
- Локализација
 - ендотелне ћелије.
 - ћелије глатких мишића крвних судова.
 - друге циљне ћелије.
- Типови рецептора за натриурезне пептиде (*NPR*)
 - *NPR-A* (*GC-A*; *NPR1*)
 - *NPR-B* (*GC-B*; *NPR2*)
 - *NPR-C* (рецептори за елиминацију; *NPR3*)

Рецептори за натриурезне пептиде

- *NPR-A* и *NPR-B* имају сличну структуру.
- Садрже ванћелијски домен (домен за везивање лиганда) директно повезан са унутарћелијским доменом (каталитичким доменом) који поседује активност гуанилат-циклазе.
- Везивањем за *NPR-A* и *NPR-B* долази до:
 - ☑ Повећања активности гуанилат-циклазе.
 - ☑ Повећања концентрације унутарћелијског *cGMP*.
 - ☑ Сигнализације и постизања биолошког одговора.

Рецептори за натриурезне пептиде

- *NPR-C* не поседује никакву познату својствену ензимску активност.
- Претпоставља се да остварује унутарћелијски ефекат преко интеракције са аденилат-циклазом и *cAMP*.
- Разграђује натриурезне пептиде на специфичним местима што доводи до њихове инактивације механизмом преузимања и унутарћелијске деградације.

Јачина афинитета натриурезних пептида према рецепторима

	Афинитет (K_i)		
	<i>NPR-A</i>	<i>NPR-B</i>	<i>NPR-C</i>
ANP	1,9 pM	1,6 pM - 5,4 nM	2,6 - 120 pM
BNP	7,3 pM	14,7 - 30 nM	13 pM - 3,7nM
CNP	>500 nM	7-30 pM	10,8 -140 pM

- ANP и CNP имају висок афинитет везивања за рецепторе.
- За BNP није до сада откривен одговарајући рецептор према коме има висок афинитет за везивање.
- Натриурезни пептиди се елинишу путем крвотока ензимском деградацијом.

⇒ NPR-A: ANP \geq BNP \gg CNP

⇒ NPR-B: CNP > ANP \geq BNP

⇒ NPR-C: ANP > CNP > BNP

*Фузија растворног ванћелијског домена рецептора за натриурезни пептид са Ig. *J Biol Chem* 1991; 266: 23060-67.

#Ћелијска мерења. *Circulation* 1992; 86: 1081-88.

‡Ћелијска мерења. *Endocrinology* 1992; 130: 229-39.

Терапијски значајни натриурезни пептиди

- **карперитид** (рекомбиновани хумани атријални натриурезни пептид; *rhANP*) одобрен за клиничку употребу у Јапану 1995. године.
- **несиритид** (рекомбиновани хумани натриурезни пептид - тип *B*; *rhBNP*) *FDA* одобрила клиничку употребу у Сједињеним Америчким Државама, августа 2001. године.
- **уларитид** (синтетски хумани бубрежни натриурезни пептид - уродилатин) тренутно у фази клиничког развоја у Европи и Сједињеним Америчким Државама.

Клинички значајни натриурезни пептиди

- карперитид
 - вазодилататор, натриуретик и инхибитор РААС-а, користи се за лечење декомпензоване акутне срчане инсуфицијенције.
- несиритид
 - користи се за краткотрајну терапију пацијената са акутном декомпензованом конгестивном срчаном инсуфицијенцијом, само код пацијената са отежаним дисањем при малом напору или без напора.
- уларитид
 - смањује капиларни плућни притисак код пацијената са конгестивном срчаном инсуфицијенцијом, али не поседује натриурезне особине.

Уларитид

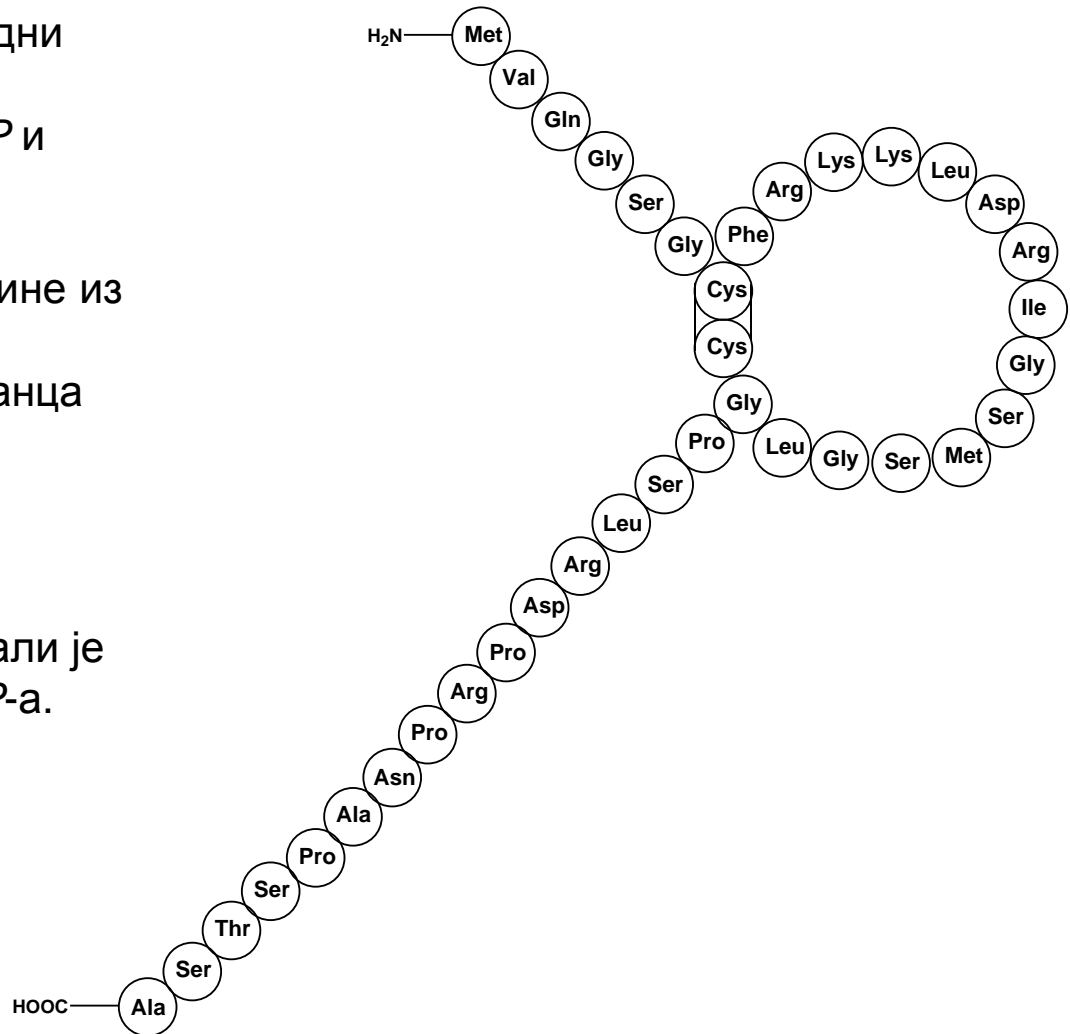
- Синтетички аналог уродилатина.
- Уродилатин припада групи атријалних натриурезних пептида (*ANP*).
- Уродилатин настаје у ћелијама бубрежних тубула и важан је за излучивање натријума и воде.
- Остварује повољне хемодинамске ефекте и побољшану диурезу и натриурезу код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом.

Уларитид

- У *SIRIUS I* ($n=24$) и *SIRIUS II* ($n=221$) студији, проучаване су три различите дозе уларитида у односу на плацебо, примењене код хоспитализованих пацијената са акутном срчаном инсуфицијенцијом.
- Уларитид остварује користан симптоматски, хемодинамски и неурохормонски ефекат.
- ↓ Најчешћа нежељена реакција била је хипотензија (до 5 одсто у третираним групама).

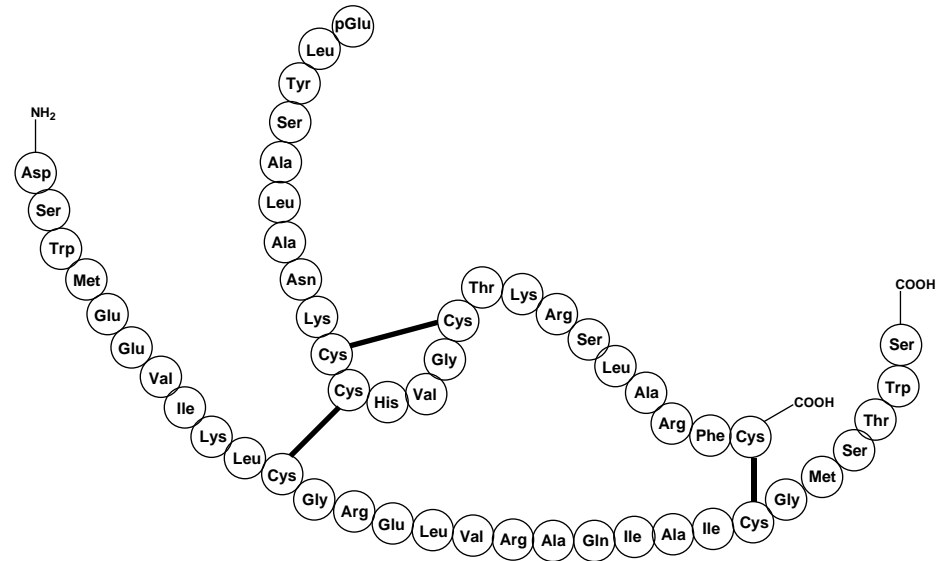
CD-NP

- Химерни, фузиони или хибридни натриурезни пептид који представља комбинацију *CNP* и *DNP*.
- Састоји се од 22 аминокиселине из структуре *CNP*-а и 15 аминокиселина са *C*-терминусног ланца *DNP*-а.
- Врши натриурезу и диурезу, побољшава гломеруларну филтрацију, инхибира ренин али је мање је хипотензиван од *BNP*-а.



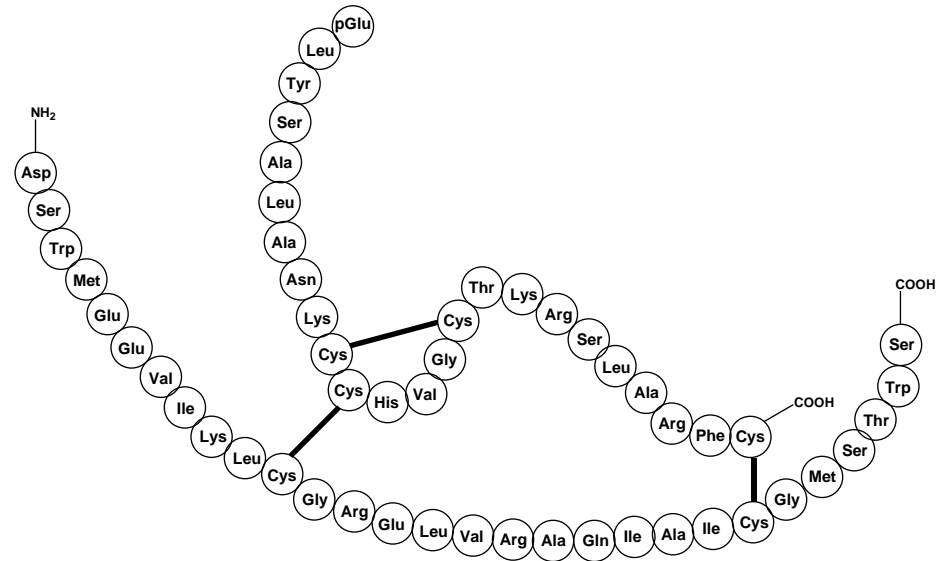
Релаксин

- 53 аминокиселине.
- Сличан инсулину по структури и биосинтези али не и по функцији.
- Настаје као прохормон који подлеже протеолизи и уклањању C-пептида при чему настаје пептид са два ланца и очуваном дисулфидном везом.
- Своју активност остварује посредовањем преко сродног рецептора *LGR7* локализован у бубрежној и системској васкулатури.



Релаксин

- Поседује сложен механизам дејства који се огледа у:
 - Дејству на азот-моноксид (NO).
 - Посредовању преко рецептора за ендотелин тип B .
 - Дејству на атријални натриурезни пептид.
 - Дејству на фактор раста васкуларног ендотела у ендометријуму.
 - Активирању матрикс металопротеиназа, што доводи до повећања артеријске комплијансе.

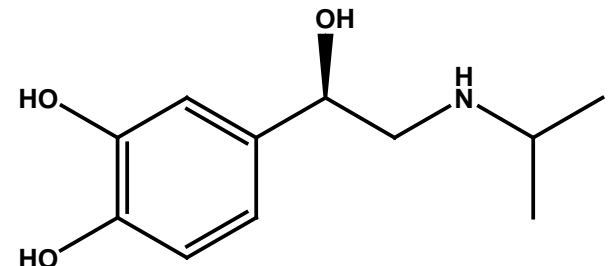


Синтеза и биолошка активност потенцијално нових
фармацеутика који се могу применити у кардиоваскуларној
патологији. Методе истраживања *in vitro* и *in vivo*.

АНТАГОНИСТИ АДРЕНЕРГИЧКИХ БЕТА- РЕЦЕПТОРА

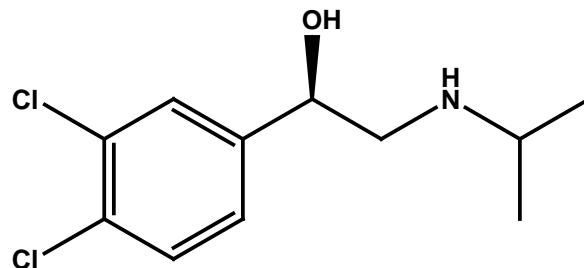
Дизајн неселективних антагониста бета(β)-адренергичких рецептора

- (*R*)-изопротеренол или (*R*)- изопреналин
 - Синтетички дериват катехоламина
 - Јак агониста бета(β)-адренергичких рецептора
 - Слаб агониста алфа(α)-адренергичких рецептора
 - Бронходилататор.
 - Садржи катехоламински део молекула који је подложен оксидацији кисеоником из ваздуха.



Дизајн неселективних антагониста бета(β)-адренергичких рецептора

- ▶ Биоизостерна супституција у прстену обе хидроксилне групе са атомима хлора извршена је због:
 - Побољшања његових агонистичких особина, према β -адренергичким рецепторима.
 - Стабилизације катехоламинског дела молекула.
- ▶ Дихлоро дериват изопреналина (дихлоро-изопреналин) није агониста него антагониста β -адренергичких рецептора.



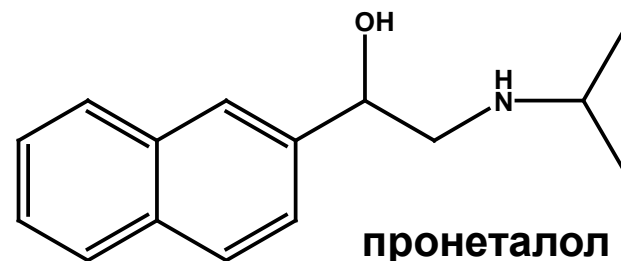
Дизајн неселективних антагониста бета(β)-адренергичких рецептора

⇒ Фармаколошка претпоставка

⇒ антагонисти β -адренергичких рецептора могу да заштите миокард у исхемији од симпатичких промена у току ангине пекторис.

Дизајн неселективних антагониста бета(β)-адренергичких рецептора

- ▶ Биоизостерном супституцијом у прстену дихлоро-изопrenalина оба атома хлора са арил-супституентом добијен је пронеталол:
 - ▲ Побољшане β -блокаторске особине.
 - ▲ Први (пионирски) неселективни β -блокатор.
 - ▲ Делотворан у лечењу ангине пекторис.
 - ▼ Повучен је из клиничке употребе у току прве године његове употребе због канцерогености.

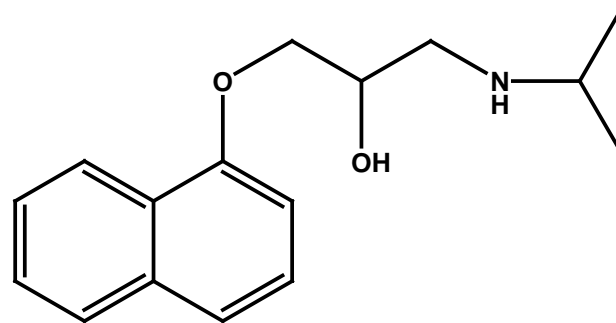


Дизајн неселективних антагониста бета(β)-адренергичких рецептора

- ▶ Промена структуре пронеталола је извршена да би се добио β -блокатор без канцерогених особина.
- ▶ Увођењем оксиметиленског (-O-CH₂-) моста у позицији C2-етаноламинског бочног низа (ланца) пронеталола, добијен је оксипропаноламински бочни низ (ланац), за који је утврђено да задржава бета-блокаторске особине самог молекула.
- ▶ Позиција оксипропаноламинског бочног низа у прстену је промењена са позиције C2- на позицију C1-нафталенског прстена.
- ▶ Тако је дизајниран арилоксипропаноламински дериват пронеталола - пропранолол.

Дизајн неселективних антагониста бета(β)-адренергичких рецептора - пропранолол

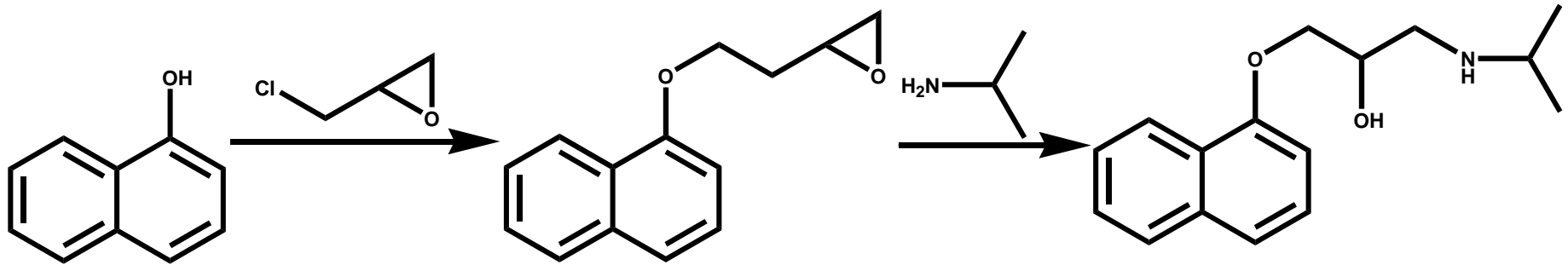
- ⇒ Неселективни β -блокатор без канцерогених особина.
- ⇒ Први, стабилни β -блокатор у клиничкој пракси и *прави пионирски* лек из групе.
- ⇒ Поред особина β -блокатора има и антиаритмијско и антихипертензивно дејство.



пропранолол

Дизајн неселективних антагониста бета(β)-адренергичких рецептора - пропранолол

- ↑ Синтеза пропранолола је послужила за дефинисање опште схеме за синтезу арилоксипропаноламинских деривата.



Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора

➔ Разлози:

- Пропранолол изазива срчану депресију мембранском стабилизацијом, независно од дејства према бета-(β)-адренергичким рецепторима.
- Лечење ангине пректорис код пацијената са опструктивном болети плућа.
- Спречавање блокаде бета-2(β_2)-адренергичких рецептора у бронхијама - бронхоконстрикција.

Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - практолол

- *пара*-Фенил супституисани арилоксипропаноламински дериват.
- Први селективни антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора.
- При вишим дозама блокира бета-1(β_1) и бета-2(β_2)-адренергичке рецепторе док у нижим дозама селективно блокира бета-1(β_1)-адренергичке рецепторе.



Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - практолол

- ➔ Први прави антиангинални лек кога су добро подносили пацијенти са хроничном опструктивном болести плућа.
- ▼ Повучен је из употребе у клиничкој пракси због појаве окуломукокутаног синдрома.
- Даље је било потребно дизајнирати нови аналог чије су *фармаколошке особине* биле засноване на познатим особинама практолола.



Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - атенолол

► Жељени фармаколошки профил новог аналога:

- ➔ иста јачина дејства према бета-1(β_1)-адренергичким рецепторима (у срчаном ткиву) као пропранолол;
- ➔ већи афинитет према бета-1(β_1)-адренергичким рецепторима у односу на бета-2(β_2)-адренергичке рецепторе у бронхијалном стаблу, периферним крвним судовима и коронарној циркулацији;
- ➔ већи афинитет према рецепторима који су укључени у метболизам шећера (за које у то време није постојала одговарајућа поткласификација);
- ➔ без мембранске депресионе или стабилизационе активности;
- ➔ без делимичног агонистичког својства или својствене симпатомиметичке активности;

Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)- адренергичких рецептора - атенолол

- ▶ Структурне особине новог аналога заснивале су се на арилоксипропаноламинском деривату пропранолола - практолол.
- ▶ Фармаколошке особине новог аналога заснивале су се на познатој селективности практолола према бета-1(β_1)-адренергичким рецепторима.
- ▶ Познате особине ацетиламино-групе у *пара*-положају фенокси прстена практолола коришћене су у даљем дизајну новог аналога.

Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - атенолол

- Промене у структури ацетиламино-групе у *пара*-положају фенокси прстена практолола вршене су из два разлога:
 - Електрон-привлачећи (акцепторски) ефекат карбонилне групе који условава киселост (ацидитет) водоника (протона) -NH-CO- групе може да се мимикује (опонаша) -CH₂-CO- групом.
 - Капацитет грађења водоничне везе може да се задржи увођењем -CH₂-CO-NHR-групе у *пара*-положај прстена.



Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - атенолол (предност за дизајнирање синтезе)

- Око 5000 једињења је синтетисано и испитивано *in vitro*:

Анестезирани пацови (бета-блокаторска активност)



Анестезиране мачке (селективност бета-блокаде: срце vs. крвни судови)



Заморчићи (селективност бета-блокаде: срце vs. плућа)



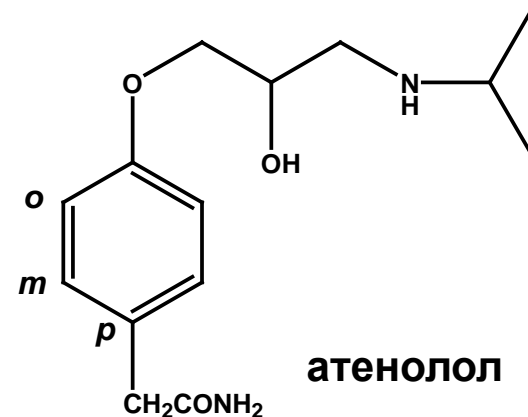
Анестезирани пацови (симпатомиметичка активност)



Жабљи сцијатни нерв (активност мембранске стабилизације)

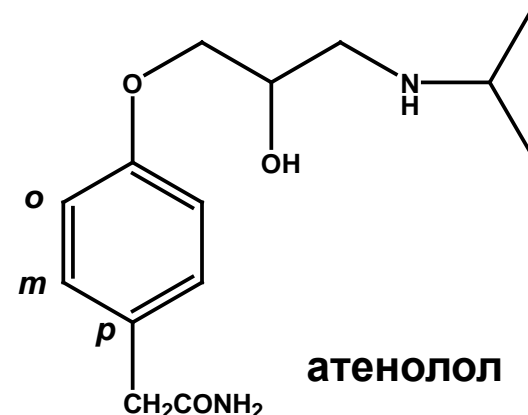
Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - атенолол (однос структуре и дејства)

- Ацетамидо супституент у *пара*-положају повећава бета-1-селективност преко амидне -NH- групе.
- Супституцијом амидне -NH- групе смањује се бета-1-селективност при чему терцијерна амидна група условљава најмању активност.
- Метиленска група нема јак утицај на активност и селективност али утиче на симпатомиметичку активност тако што је смањује.



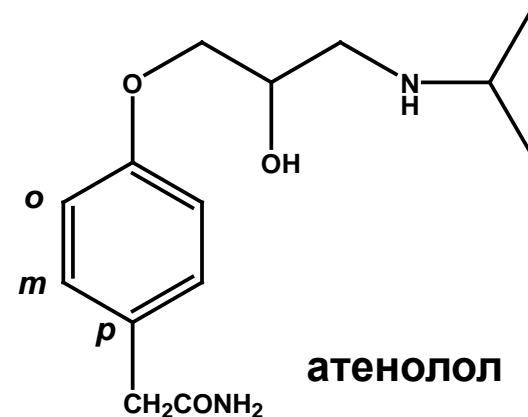
Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - атенолол (однос структуре и дејства)

- Амидна група у пара-положају ароматског прстена, било да је везана са стране карбонилог угљениковог или амидног азотовог атома, различито утичу на степен симпатомиметичке активности.
- Увођењем метиленске групе између ароматског прстена и амидног супституента значајно се смањује симпатомиметичка активност и са даљим продужењем низа метиленским групама долази до инактивације.



Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - атенолол (однос структуре и дејства)

- Увођење додатних супституената у фенилни прстен у *орто*-положају има повољан утицај на активност док у *мета*-положају неповољно утиче на активност.
- *мета*-положај није повољан због стерног утицаја на грађење водоничне веза са амидом.



Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - бетаксолол

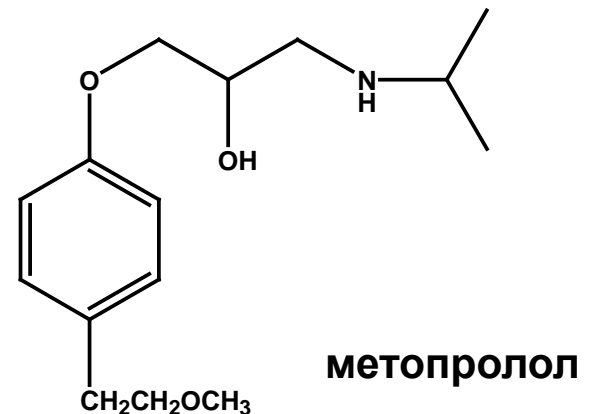
- ➔ Програм за дизајнирање бетаксолола заснованом на аналогу састојао се из следећих захтева:
 - ☑ Висок степен кардиоселективности.
 - ☑ Дуготрајно деловање које се постиже једнократним дозирањем (једном дневно).
 - ☑ Висока биорасположивост када се примењује орално.

Дизајн селективних антагониста бета-1 (β_1)- адренергичких рецептора - бетаксолол

- На основу постојећих података о односу структуре и дејства (активности) изведене су следеће структурне претпоставке за сигуран пут у дизајну кардиоселективних бета-блокатора:
 - Обавезно присуство супституента у *пара*-положају ароматског прстена аналогно ацебутололу, атенололу и метопрололу.
 - Или замена *N*-изо-пропил-групе са арилалкилским ситемом.

Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - бетаксолол

- Метопролол је служио као полазна основа за синтезу аналога код којих је вршено увођење волуминозних стабилних супституената на крају бочног низа (ланца) ради успоравања метаболизма (постизање дуготрајнијег деловања-модификација метабофоре) и постизања кардиоселективности.
- Проучавањем метаболизма метопролола потврђена је оправданост увођења волуминозних супституената.

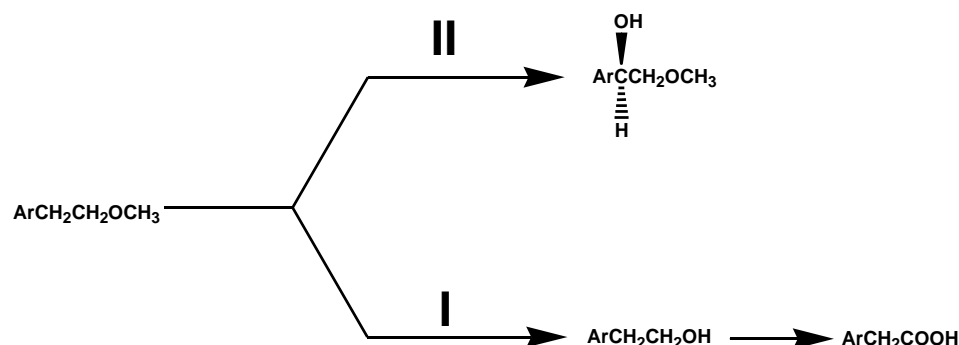


Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - метаболизам метопролола

- Метаболизам метопролола одвија се посредовањем цитохрома *P450* - [*P450(CYP)2D6*] и одвија се у два правца:

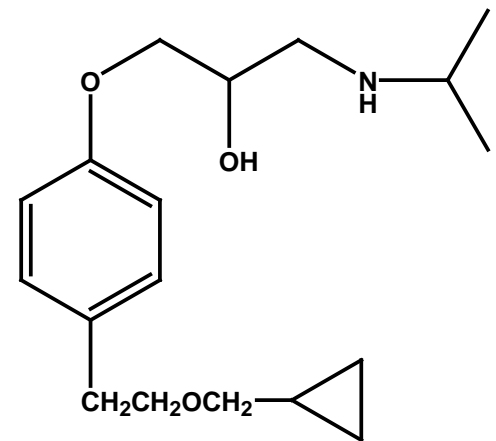
I. Брза елиминација метоскиетил-групе и настајање деривата 2-фенилетанола који се даље постепено оксидује до деривата фенил-сирћетне киселине.

II. Стереоселективна оксидација бензилног угљениковог атома и добијање (*R*)-алкохола.



Дизајн селективних антагониста бета-1(β_1)-адренергичких рецептора - бетаксолол

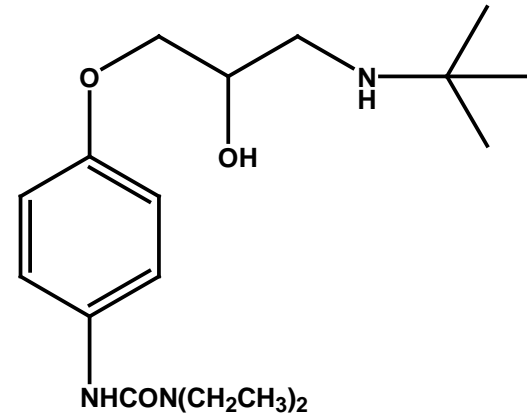
- Бетаксолол је означен као јачи, кардиоселеткивији, биорасположивији и дуже делујући од атенолола, ацебутолола и метопролола.
- Већа бета-1(β_1)-блокаторска активност бетаксолола у односу на метопролол објашњава се тиме што је седам пута липофилнији од метопролола.



бетаксолол

Дизајн селективних антагониста бета-1 (β_1)-адренергичких рецептора - целипролол

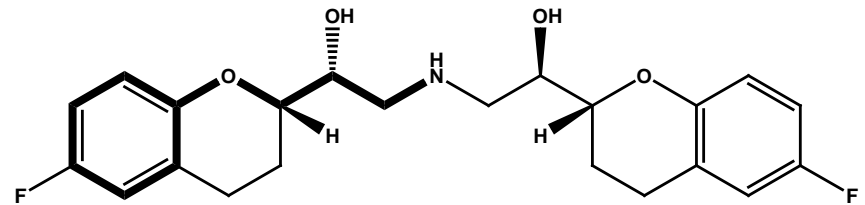
- Програм за дизајнирање целипролола био је сличан програму за бетаксолोल.
- Његова синтеза је извршена са циљем да се добије једињење које поседује:
- ☑ Значајно смањен метаболизам "првог пролаза" у јетри.
- ☑ Полу-живот у плазми већи од ацетбутолола (3^h).



целипролол

Дизајн селективних антагониста бета-1 (β_1)-адренергичких рецептора - небиволол

- Његов дизајн проистекао је на основу свих SAR података о претходно изведеним бета-блокаторима.
- У структури садржи два оскипропанол-аминска система у бис-позицији према аминогрупи.
- У терапији се користи у облику рацемске (модификације) смеше (*S, R, R, R*) и (*R, R, R, S*) енантиомера.
- (*S, R, R, R*)-небиволол поседује 200 пута јаче дејство него његов (*R, R, R, S*) енантиомер.



(*S, R, R, R*)-небиволол