

# TWORZENIE NOWYCH LEKÓW: MIEJSCA DOCELOWE I RECEPTORY

*dr farm. Paweł BODERA*

## New drug design: target sites and receptors

**Streszczenie.** Tradycyjne metody odkrywania nowych leków polegają na przetestowaniu tysięcy potencjalnych substancji czynnych pochodzenia naturalnego i znalezieniu tej substancji, która zadziała na miejsce docelowe. Taka procedura przypomina poszukiwanie igły w stogu siana. Postęp w tworzeniu nowych preparatów leczniczych doprowadził do bardziej racjonalnego podejścia. Polega ono na dokładnym określeniu struktury miejsca docelowego po to, aby móc stworzyć lek działający w pożądanym miejscu i prowadzący do modyfikacji funkcji.

**Słowa kluczowe:** *miejsca wiążące, projektowanie leków, receptory, struktura.*

**Summary.** Typically a drug target is a key molecule involved in a particular metabolic or signalling pathway that is specific to a disease condition or pathology. An important criterion to determine the medical value of a drug is specificity: the physiological effect of the drug should be as clearly defined as possible. It has to specifically bind to the target protein in order to minimise undesired side-effects ago, Fischer and Ehrlich already used a „lock-and-key” analogy. Some approaches attempt to stop the functioning of the pathway in the diseased state by causing a key molecule to stop functioning.

**Keywords:** *target site, drug design, structure, receptors.*

Aby lek był skuteczny, musi dotrzeć i zadziałać w miejscu docelowym, objętym procesem chorobowym. Sytuację tę dobrze obrazuje porównanie choroby do zamka i klucza, gdzie zamek reprezentuje miejsce objęte chorobą, a klucz to lek. Aby móc otworzyć zamek i drzwi w celu wyleczenia choroby, należy znaleźć odpowiedni, pasujący do zamka klucz.

Tradycyjne metody odkrywania nowych leków polegają na przetestowaniu tysięcy potencjalnych substancji czynnych pochodzenia naturalnego i znalezieniu tej substancji, która zadziała na miejsce docelowe. Taka procedura przypomina poszukiwanie igły w stogu siana. Ryzyko niepowodzenia jest więc bardzo wysokie. Warto wiedzieć, że większość leków obecnych na rynku powstało właśnie w taki sposób.

Postęp w tworzeniu nowych preparatów leczniczych doprowadził do bardziej racjonalnego podejścia. Polega ono na dokładnym określeniu struktury miejsca docelowego po to, aby móc stworzyć lek działający

w pożądanym miejscu i prowadzący do modyfikacji funkcji. Odnosząc tę sytuację do zamka i klucza, należy najpierw poznać mechanizm wewnętrzny zamka, a następnie wykonać klucz o kształcie pozwalającym na otworzenie zamka.

Szczególny nacisk jest położony najpierw na identyfikację miejsca docelowego. Takie podejście do zagadnienia traktuje znalezienie miejsca docelowego objętego chorobą jako pierwszy stopień w tworzeniu nowego leku. To jak dokładna identyfikacja zepsutego zamka i stworzenie klucza (leku) pozwalającego na otworzenie właściwych drzwi.

Firma farmaceutyczna zainteresowana wprowadzeniem na rynek nowego leku musi określić zapotrzebowanie na nowe, skuteczne metody farmakoterapii. Zanim ogłosi potrzebę stworzenia nowego preparatu leczniczego, musi ocenić swoje możliwości, kompetencje i zaawansowanie techniczne oraz zidentyfikować ewentualne trudności i źródła finansowania badań. Przeciętny nakład finansowy

*Firma farmaceutyczna zainteresowana wprowadzeniem na rynek nowego leku musi określić zapotrzebowanie na nowe, skuteczne metody farmakoterapii.*



Tabela 1. Wiodące terapeutyczne grupy leków (1)

Grupy leków (mld USD)	Sprzedaż	Całkowita sprzedaż
Leki stosowane w chorobie wrzodowej żołądka	19,5	6%
Leki obniżające poziom cholesterolu i trójglicerydów	18,9	5%
Leki przeciwdepresyjne	16,2	5%
Leki stosowane w chorobach reumatycznych (niesterydowe)	10,9	3%
Inhibitory kanału wapniowego	9,9	3%
Leki przeciwpsychotyczne	7,7	2%
Doustne leki przeciwcukrzycowe	7,6	2%
Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE)	7,5	2%
Cefalosporyny i ich połączenia	6,7	2%
Leki przeciwhistaminowe (ogólne)	6,7	2%

- ▶ potrzebny do stworzenia nowego leku waha się pomiędzy 500 a 800 milionów USD.

Tabela 1 przedstawia niektóre grupy leków i ich sprzedaż w roku 2006. Do trzech najlepiej sprzedających się grup leków należą: leki stosowane w chorobie wrzodowej żołądka, leki obniżające poziom cholesterolu i trójglicerydów oraz leki przeciwdepresyjne. Sprzedaż leków z wzmiankowanych 10 grup terapeutycznych wynosi 49% całej sprzedaży leków.

### OKREŚLENIE MIEJSCA DOCELOWEGO

Większość chorób, z wyjątkiem tych, których przyczyną są urazy lub infekcje, ma podłoże genetyczne. Tzw. mapa zmienności genetycznych determinuje indywidualną dla każdego człowieka skłonność do zapadania na różne choroby, podatność na działanie różnych patogenów oraz – co bardzo istotne – odpowiedź na leki.

Współczesna strategia tworzenia nowych leków zaczyna się od badań nad funkcjonowaniem ludzkiego organizmu w stanach zdrowia i choroby. Celem jest zatrzymanie procesu chorobowego na poziomie komórkowym. Zrozumienie roli genów i związanych z nimi białek pozwoli na określenie i wyeliminowanie przyczyn wielu chorób. Leki mogą zostać tak precyzyjnie zaprojektowane, aby dokładnie oddziaływały na źródło

procy procesu chorobowego. Można zatem wynaleźć i wyprodukować lek działający wysoce specyficznie (mniej działań niepożądanych) oraz skutecznie (szerszy indeks terapeutyczny), który przywróci równowagę zachwianą przez chorobę.

Dzięki Human Genome Project (HGP, Projekt Ludzkiego Genomu) (2) wiemy, że istnieje około 3 miliardów nukleotydów tworzących cząsteczkę DNA. Tylko niektóre z tych segmentów DNA kodują strukturę białek. Segmenty te są zwane genami. Szacuje się, że około 30 000-40 000 genów koduje białka. Dzięki 30-40 tysiącom genów produkowane jest wiele milionów rodzajów różnych białek. Miejsca docelowe dla leków są zwykle białkami lub glikoproteinami, ponieważ białka są składnikami enzymów i receptorów, z którymi leki wchodzi w reakcję. Do chwili obecnej tylko ok. 500 białek zostało określonych jako miejsca docelowe dla ogromnej ilości leków obecnych na rynku. Możliwości, jakie dają badania nad genomem człowieka, otworzyły drogę do identyfikacji wielu miejsc docelowych dla nowo tworzonych leków.

### MIEJSCA DOCELOWE LEKÓW

Istnieje wiele technik stosowanych do identyfikacji miejsca docelowego działających leków. Dotychczas najczęściej stosowaną metodą było zastosowanie radioligandów (3). Obecnie częściej stosowanymi metodami są sekwencje podlegające ekspresji (ESTs), płytki genowe oraz metody komputerowe (*in silico*) – realizowane na pojedynczych maszynach i systemach kłajstrowych, działających w sieciach.

**Radioligandy.** Klasyczna metoda identyfikacji miejsca docelowego leku lub receptorów polega na przyłączeniu do potencjalnych receptorów tzw. radioligandów w celu ich uwidocznienia wśród ogromnej ilości innych receptorów. Wyselekcjonowane tą metodą receptory są następnie odłączane od ligandów, klonowane, a ich sekwencja nukleotydowa zostaje odkodowana. Badane cząsteczki są następnie poddawane testom z wyselekcjonowanymi receptorami pod kątem ich właściwości biochemicznych i sposobu działania.

**Tzw. mapa zmienności genetycznych determinuje indywidualną dla każdego człowieka skłonność do zapadania na różne choroby, podatność na działanie różnych patogenów oraz odpowiedź na leki.**

**Płytki genowa**, znana również pod nazwą chipa genowego, to nowa technologia służąca do analizy zestawu tysięcy genów, określania ich interakcji oraz sposobu kontroli funkcji biologicznych w organizmie człowieka. (4) Mechanizm ekspresji genów jest dynamiczny, gdyż reagują one na zewnętrzne bodźce bardzo szybko. Poprzez ocenę profilu ekspresji genów naukowcy potrafią oszacować mechanizmy regulacyjne, ścieżki przemian biochemicznych oraz funkcje komórek. Dzięki płytkom genowym możliwe jest szybkie znalezienie właściwego genu dla miejsca docelowego – powodującego chorobę.

Płytki genowe (*DNA microarrays*) to szklane płytki wielkości karty kredytowej, których najważniejszym elementem jest błona złożona z kilku tysięcy pól. Na każdym z pól znajduje się niewielka ilość DNA, które można uwidocznic dzięki barwnikom fluorescencyjnym lub substancjom radioaktywnym. Do powierzchni takich płytek przyczepiają się fragmenty kwasów nukleinowych komplementarne do badanych genów. Dzięki temu można przestudiować ekspresję bardzo wielu genów odpowiedzialnych za występowanie licznych schorzeń w krótkim czasie.

**Sekwencje podlegające ekspresji (ESTs) oraz metody *in silico* (5)**. EST to krótkie, zbudowane z 200-500 par sekwencje nukleotydów. Są one częścią DNA kodującego strukturę poszczególnych białek. EST jest szybką metodą odszukania właściwych genów kodujących poszukiwane białko. Skanowanie sekwencji nukleotydów możliwe jest dzięki komputerowym metodom *in silico*. Wszystkie białka, nawet te, których struktury znacznie się różnią między sobą, mogą należeć do rodzin białek o podobnej budowie i funkcjach.

Naukowcy prowadzą takie badania z zastosowaniem bardzo obszernych baz danych. Każda sekwencja nukleotydowa może być porównana z sekwencją aminokwasów białka. Dzięki temu możliwe jest określenie stopnia komplementarności. Technika ta znana jest pod nazwą: *threading* (6). Polega ona na określeniu struktury odcinka DNA na podstawie znajomości fizykochemicznych właściwości aminokwasów.

## POTWIERDZENIE MIEJSCA DOCELOWEGO

Z chwilą określenia miejsca docelowego powodującego chorobę rozpoczyna się tzw. proces potwierdzania. Proces ten ma na celu potwierdzenie funkcji i wpływu miejsca docelowego. Ostateczne zatwierdzenie miejsca docelowego stanowi seria badań klinicznych z udziałem ludzi. Badanie te służą do oceny spektrum działania leku. Takie działanie zapewnia optymalne wykorzystanie czasu, środków i funduszy na tworzenie nowych leków.

Pytania, na które należy znać odpowiedź, brzmią:

1. Jaka jest funkcja miejsca docelowego?
2. Na jaką ścieżkę przemian wpływa miejsce docelowe?
3. Jaki będzie działał dany lek na inne funkcje organizmu w wyniku oddziaływania na miejsce docelowe?

Etapy potwierdzania miejsc docelowych można podzielić na dwie grupy: laboratoryjne testy *in vitro* oraz badania *in vivo* na zwierzętach. Typowymi testami *in vitro* są badania z zastosowaniem komórek i tkanek. Celem tych badań jest ocena funkcji biochemicznych miejsca docelowego po przyłączeniu do niego ligandu w postaci potencjalnej substancji czynnej. Podczas tych badań ocenia się stężenie jonów, aktywność enzymów oraz profil ekspresji genów.

W badaniach *in vivo* na zwierzętach analizuje się związek miejsca docelowego z chorobą. Jednym z takich modeli testowych jest model myszy pozbawionych określonego genu (*knockout mouse*). Oczywiście jest istnienie różnic pomiędzy ekspresją genów i reakcjami biochemicznymi u ludzi i zwierząt. Niemniej jednak modele zwierzęce są ważnym etapem badań nad wpływem nowych leków.

Ostatnio często wykorzystuje się metody komputerowe (*in silico*) w badaniach nad nowymi substancjami leczniczymi. Jest to metoda podobna do opisanej powyżej ESTs. Sekwencje DNA domniemanego miejsca docelowego są porównywane ze znanymi sekwencjami receptorów połączonych z ligandami. Homologia, czyli podobieństwo sekwencji i budowy, może dać wskazówki, jaki ligand najlepiej zareaguje z miejscem docelowym. ►

*Dzięki płytkom genowym możliwe jest szybkie znalezienie właściwego genu dla miejsca docelowego – powodującego chorobę.*

*Wszystkie białka, nawet te, których struktury znacznie się różnią między sobą, mogą należeć do rodzin białek o podobnej budowie i funkcjach.*

*Miejsca docelowe, które identyfikuje się dzięki płytkom genowym, to najczęściej geny, które regulują przebieg choroby lub ją wywołują.*

*Aby mogło rozpocząć się działanie terapeutyczne leku, aktywna cząsteczka musi mieć właściwy kształt i rozmiar, by móc wpasować się w miejsce wiążące (kieszonkę), znajdujące się na receptorze lub enzymie.*

## ► INTERAKCJE LEKÓW Z MIEJSCAMI DOCELOWYMI I RECEPTORAMI

Należy podkreślić, że miejsca docelowe, które identyfikuje się dzięki płytkom genowym, to najczęściej geny, które regulują przebieg choroby lub ją wywołują. Docelowe geny dają nam informację o białkach biorących udział w przebiegu choroby.

Miejsca docelowe substancji terapeutycznych można zaklasyfikować w trzech kategoriach:

1. *Enzymy.* Istnieje ogromna ilość enzymów biorących udział w różnych przemianach biochemicznych w ludzkim organizmie. Leki, oddziałując na enzymy, mogą zmieniać ich aktywność.
2. *Receptory wewnątrzkomórkowe* znajdują się w cytoplazmie lub jądrze komórki. Leki lub endogenne ligandy muszą mieć charakter hydrofobowy lub połączyć się z hydrofobowym nośnikiem tak, by przedostać się przez błonę komórkową (podwójna warstwa lipidów) i połączyć się z receptorami wewnątrzkomórkowymi.
3. *Receptory powierzchniowe.* Tego typu receptory znajdują się na powierzchni komórki i mają wysokie powinowactwo z cząsteczkami hydrofilowymi. Sygnały pochodzące z zewnątrz są przesyłane do cytoplazmy właśnie za pośrednictwem tych receptorów. Istnieją trzy duże grupy receptorów powierzchniowych: receptory białkowe-G (GPCR), kanały jonowe oraz katalityczne receptory zależne od aktywności enzymatycznej.

Leki hydrofilowe lub rozpuszczalne w wodzie nie przechodzą przez błony komórkowe. Znajdują się one w krwioobiegu przez krótki okres, trwający często kilka sekund, i pośredniczą w reakcjach o krótkim czasie trwania. W przeciwieństwie do tego cząsteczki hydrofobowe wymagają nośnika w celu przetransportowania do wnętrza komórki. Okres półtrwania tych leków wynosi godziny lub dni, co skutkuje dłuższym efektem ich działania.

Lek aktywujący lub wywołujący reakcję biochemiczną nazywany jest *agonistą*, natomiast lek przerywający, hamujący lub bloku-

jący połączenie innego agonisty do receptora to *antagonista*. Jeśli dochodzi do interakcji z enzymem, lek nosi nazwę *induktora* – jeśli aktywuje go, lub *inhibitora* – jeśli dany enzym zostaje zdezaktywowany.

Zarówno lek jak i błona komórkowa to w rzeczywistości skomplikowane, trójwymiarowe struktury. Tylko właściwe klucze mogą zostać włożone do zamka i spowodować jego zamknięcie bądź otwarcie. Oto fakty na temat oddziaływań pomiędzy lekami i miejscami docelowymi, o których należy pamiętać:

1. Połączenia ligandów z receptorami są specyficzne.
2. Połączenie możliwe jest tylko w określonym punkcie miejsca docelowego.
3. Połączenie powinno być odwracalne.

Wiązania allosteryczne mają miejsce wtedy, gdy dochodzi do przyłączenia dwóch cząsteczek w dwóch różnych punktach miejsca docelowego. Jeśli obie molekuly są identyczne, mówimy o oddziaływaniu homotropowym, jeśli zaś cząsteczki różnią się od siebie, reakcja ta nazywana jest heterotropową. Kompetetywne połączenie to takie, gdzie dwa różne ligandy współzawodniczą o to samo miejsce.

## TYPY ODDZIAŁYWAŃ

Rodzaje połączeń pomiędzy cząsteczkami, które mogą mieć znaczenie terapeutyczne, a receptorami lub enzymami bardzo zależą od kształtu i rozmiaru molekuł. Aby mogło rozpocząć się działanie terapeutyczne leku, aktywna cząsteczka musi mieć właściwy kształt i rozmiar, by móc wpasować się w miejsce wiążące (kieszonkę), znajdujące się na receptorze lub enzymie. Kolejnym ważnym czynnikiem jest charakter wiązania. Siły przyciągania muszą być wystarczająco silne, aby przyciągnąć i umiejscowić cząsteczkę we właściwym miejscu. Typy wiązań pomiędzy cząsteczkami można podzielić na: wiązania kowalencyjne, oddziaływanie elektrostatyczne obecne dzięki wiązaniom wodorowym lub siłom van der Waalsa. Im silniejsze wiązanie pomiędzy aktywną cząsteczką a miejscem wiązania, tym bardziej długotrwałe oddziaływanie.

Wiązania kowalencyjne należą do silnych oddziaływań. Tworzenie tych wiązań jest możliwe dzięki uwspólnianiu elektronów krążących po zewnętrznych orbitalach atomów. Choć ten typ oddziaływań jest długotrwały, to niewiele połączeń lek–receptor ma charakter wiązań kowalencyjnych.

Oddziaływania elektrostatyczne to wzajemne przyciąganie się lub odpychanie cząsteczek o trwałym rozkładzie ładunku elektrycznego. W strukturach makrocząsteczkowych receptorów i enzymów istnieją ładunki jonowe, które przyciągają przeciwnie naładowane cząsteczki. Oddziaływanie elektrostatyczne ma mniejszą siłę niż wiązania kowalencyjne. Ten typ oddziaływań jest bardziej powszechny w połączeniach lek–receptor. Oddziaływania elektrostatyczne można podzielić na dwa typy: wiązania wodorowe i siły van der Waalsa.

Wiązanie wodorowe to słabe oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy elektroujemnym atomem a atomem wodoru, który jest kowalencyjnie połączony z innym atomem elektroujemnym, np. z tlenem lub azotem. W wiązaniu tym wodór pełni rolę mostka łączącego dwa elektroujemne atomy. Wiązania wodorowe są o wiele słabsze niż wiązania kowalencyjne, ale są one odpowiedzialne za utrzymywanie trójwymiarowej struktury związku oraz za wzajemne oddziaływania złożonych molekuł. Siły van der Waalsa są bardzo słabymi oddziaływaniami zachodzącymi pomiędzy wszystkimi typami neutralnych atomów.

Trzeci typ stanowią oddziaływania hydrofobowe. Nie są to wiązania w ścisłym tego słowa znaczeniu, gdyż łączenie się fragmentów hydrofobowych jest zjawiskiem wtórnym, wywołanym „niechęcią” do cząsteczek wody. Ten typ oddziaływania występuje w lekach rozpuszczalnych w tłuszczach o wysokim powinowactwie do lipidów obecnych w cytoplazmie komórki.

## ENZYMY

Enzymy to cząsteczki czynne biologicznie, które katalizują reakcje biochemiczne. Wszystkie enzymy to białka. Stanowią one

matryce, dzięki którym możliwe jest łączenie się substratów, ich reakcje, przemiany i powstawanie nowych produktów. Miejsca, do których przyłączają się substraty, zwane są „miejscami aktywnymi”. Dzięki trójwymiarowej strukturze miejsc aktywnych enzymy posiadają specyficzne funkcje, co oznacza, że każdy rodzaj enzymu katalizuje odpowiednią reakcję biochemiczną.

Enzymy przyspieszają reakcje, ale same nie zużywają się, nie stają się częścią produktów końcowych. International Union of Biochemists (7) dzieli enzymy na sześć klas zależnie od pełnionej przez nie funkcji (tabela 2).

W niektórych przypadkach, aby mogło dojść do reakcji, enzymy wymagają obecności koenzymów (kofaktorów). Kofaktory to witaminy, jony metali, kwasy i zasady. Ich rola polega na transportowaniu lub przyjmowaniu elektronów bądź też na wchodzeniu w reakcje utleniania – redukcji. Po zakończeniu reakcji kofaktory zostają uwolnione. Nie są one włączane w struktury produktów końcowych. Energię potrzebną do przemian biochemicznych dostarcza ATP (kwas adenozynotrójfosforowy).

Reakcje enzymatyczne można zahamować, dodając egzogenne cząsteczki. Leki są najczęściej stosowane w tym właśnie celu. Ich zadaniem jest nie dopuścić do przebiegu reakcji biochemicznej.

*Reakcje enzymatyczne można zahamować, dodając egzogenne cząsteczki. Leki są najczęściej stosowane w tym właśnie celu. Ich zadaniem jest nie dopuścić do przebiegu reakcji biochemicznej.*

Tabela 2. Klasyfikacja enzymów

Liczba	Klasyfikacja	Właściwości biochemiczne
1	Oksydoreduktazy	Usuwną lub dodają atom wodoru podczas reakcji utlenienia lub redukcji.
2	Transferazy	Przenoszą grupy funkcyjne z jednej cząsteczki do drugiej. Kinazy to wysoko wyspecjalizowane transferazy, które przenoszą fosforan z ATP na inną cząsteczkę.
3	Hydrolazy	Hydrolizują różne grupy funkcyjne.
4	Liazy	Enzymy katalizujące usunięcie lub przyłączenie cząsteczki wody, amoniaku lub dwutlenku węgla skutkujące powstaniem podwójnego wiązania.
5	Izomerazy	Enzymy konwertujące substraty do ich form izomerycznych.
6	Ligazy	Enzymy tworzące wiązania pomiędzy cząsteczkami.

► *Istnieją następujące klasy receptorów: superrodzina receptorów białkowych-G (GPCRs), receptory kanałów jonowych, kinazy tyrozyny oraz receptory wewnątrzkomórkowe.*

Leki dzieli się na inhibitory kompetytywne i niekompetytywne. Inhibitory kompetytywne rywalizują z innymi substratami o dostęp do miejsca aktywnego, podczas gdy niekompetytywne przyłączają się do miejsca allosterycznego, jednocześnie wpływając na miejsce aktywne a w konsekwencji również na przemiany biochemiczne substratów.

Leki stosuje się również w celu zahamowania reakcji enzymatycznych przebiegających w organizmie pod wpływem chorobotwórczych patogenów. Przykładem jest inhibitor odwrotnej transkryptazy oraz inhibitor proteazy – leki stosowane w zakażeniu wirusem HIV.

### RECEPTORY I PRZEKAZYWANIE SYGNAŁÓW

Komórki komunikują się między sobą, aby koordynować funkcje biochemiczne organizmu. Jeśli system komunikacji zostanie przerwany bądź też przekazana wiadomość nie będzie kompletna, funkcje naszego organizmu również zostaną zaburzone. Jako przykład może posłużyć mutacja białka p53, prowadząca do niekontrolowanego rozrostu komórek i rozwoju choroby nowotworowej.

Na powierzchni komórki obecne są setki receptorów. Działają one jak anteny wychytujące sygnały pochodzące ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Sygnały te mogą pochodzić ze źródeł endogennych, takich jak neurotransmitery, cytokiny i hormony, lub ze źródeł egzogennych, np.: wirusów i leków. Po otrzymaniu sygnałów receptory przekazują je do wnętrza komórki. Wewnątrz komórki sygnał powoduje kaskadę reakcji biochemicznych.

Sygnały mogą działać bezpośrednio, tak jak w przypadku kanałów jonowych, gdzie odpowiedni sygnał powoduje otwarcie lub zamknięcie kanału, pozwalając na migrację jonów. Niektóre sygnały mają o wiele bardziej złożony charakter i biorą udział w przyłączeniu ligandu do receptora. Skutkiem tego przyłączenia są zmiany konformacyjne (zmiany kształtu) receptora, które prowadzą do dalszych przemian.

Istnieją następujące klasy receptorów: superrodzina receptorów białkowych-G (GPCRs), receptory kanałów jonowych, kinazy tyrozyny oraz receptory wewnątrzkomórkowe.

### SUPERRODZINA RECEPTORÓW BIAŁKOWYCH-G (GPCRS)

GPCRs reprezentują prawdopodobnie najważniejszą klasę białkowych miejsc docelowych. Są to receptory, które zawsze są włączone w szlaki przekazywania sygnałów z zewnątrz do środka komórki. Istnieje ogromna liczba chorób spowodowanych nieprawidłową funkcją receptorów GPCR. Większość powszechnie przepisywanych leków działa właśnie za pośrednictwem receptorów GPCR. Szacuje się, że więcej niż 30% leków wpływa na tę grupę receptorów.

Charakterystyczną cechą tej superrodziny receptorów (istnieje duża różnorodność rodzin i podtypów receptorów z tej grupy) jest siedem domen, które przechodzą przez błonę komórkową.

Wewnątrz komórki receptory serpentynowe łączą się w białka-G (białka regulacyjne nukleotydu guaniny). Podjednostki  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  to trzy części składowe białek-G. Z chwilą przyłączenia się ligandu, np.: leku lub neurotransmitera do receptora na powierzchni komórki, receptor zmienia swój kształt. Zmiana kształtu receptora indukuje przemiany w trzyczęściowym skupisku podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  w obrębie komórki. Pojawia się reakcja fosforylacji (polegająca na dodaniu grupy fosforowej, do danego związku chemicznego), dzięki której GDP (difosforan guanozyny) ulega przemianie do GTP (trifosforanu guanozyny):



Reakcja ta uaktywnia cząsteczkę efektorową i sygnał jest przekazywany dalej wzdłuż szlaku. Po zadziałaniu enzymu GTP-azy, który hydrolizuje GTP do GDP, usuwając grupę fosforanową. Trzyczęściowa podjednostka powraca do stanu nieaktywnego. Taki receptor jest ponownie gotowy to przekazywania kolejnych sygnałów.

*Większość powszechnie przepisywanych leków działa za pośrednictwem receptorów GPCR. Szacuje się, że więcej niż 30% leków wpływa na tę grupę receptorów.*

Tabela 3. Wybrane leki oraz ich docelowe receptory

Lek	Kategoria terapeutyczna	Miejsce docelowe lek
Omeprazol (Losec <sup>®</sup> , AstraZeneca)	Przewód pokarmowy/metabolizm	Kanał jonowy
Simwastatyna (Zocor <sup>®</sup> , Pfizer)	Układ sercowo-naczyniowy	Inhibitor enzymu
Atorwastatyna (Lipitor <sup>®</sup> , Pfizer)	Układ sercowo-naczyniowy	Inhibitor enzymu
Amlodypina (Norvasc <sup>®</sup> , Pfizer)	Układ sercowo-naczyniowy	Kanał jonowy
Lanzoprazol (Takepron <sup>®</sup> , Takeda)	Przewód pokarmowy/metabolizm	Kanał jonowy
Loratadyna (Claritin <sup>®</sup> , Schering)	Układ oddechowy	Kanał jonowy
Fluoksetyna (Prozac <sup>®</sup> , Eli Lilly)	Centralny układ nerwowy	GPCR
Olanzapina (Zyprexa <sup>®</sup> , Eli Lilly)	Centralny układ nerwowy	GPCR
Paroksetyna (Seroksat <sup>®</sup> , GlaxoSmithKline)	Centralny układ nerwowy	GPCR
Sertralina (Zoloft <sup>®</sup> , Pfizer)	Centralny układ nerwowy	GPCR

Zaburzenia receptorów GPCR prowadzą do wielu chorób, m.in. astmy, nadciśnienia tętniczego, stanów zapalnych, chorób sercowo-naczyniowych, chorób nowotworowych, schorzeń przewodu pokarmowego oraz centralnego układu nerwowego. Dzięki Human Genome Projekt wiemy, że szacunkowa liczba receptorów GPCR wynosi ok. 1000. Obecne na rynku farmaceutycznym występują leki działające jedynie na 50 receptorów GPCR. Istnieją zatem olbrzymie możliwości rozwoju rynku nowych leków, których miejscami docelowymi byłyby właśnie receptory GPCR.

## RECEPTORY KANAŁÓW JONOWYCH

Istnieją dwa główne typy receptorów kanałów jonowych: kanały zależne od ligandu i kanały zależne od napięcia. Dodatkowo aktywność niektórych kanałów jonowych jest regulowana dzięki receptorom GPCR lub poprzez aminokwasy.

Do rodziny kanałów zależnych od ligandu należy tzw. rodzina *cys-loop*, czyli: receptor nikotynowy, receptory kwasu gammaaminomasłowego [GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>C</sub>], receptory glicynowe, receptory 5-HT<sub>3</sub> oraz niektóre kanały anionowe aktywowane glutaminianem). Charakterystyczną cechą tej rodziny receptorów jest ich budowa złożona z pięciu podjednostek (dwie oznaczone jako  $\alpha$ , jedna jako  $\beta$ , jedna –  $\gamma$  oraz  $\delta$ ). Do naturalnych ligandów łączących się z tą rodziną kanałów

jonowych należy: acetylocholina, GABA, glicyna i kwas asparaginowy. Są to w większości transmittery synaptyczne.

W stanie spoczynku kanały są nieprzepuszczalne dla jonów. Po przyłączeniu się ligandu do receptora i tym samym jego aktywacji kanał jonowy otwiera się do średnicy ok. 6.5 Å (6,5 x 10<sup>-10</sup>). Pozwala to na migrację zewnątrzkomórkowych jonów sodu do wnętrza komórki. Kaskada kolejnych przemian prowadzi do wzmocnienia sygnału.

Otwieranie i zamykanie kanałów zależnych od napięcia regulowane jest przez potencjał błonowy. Charakterystyczną cechą tych receptorów jest obecność czterech domen, z których każda składa się z sześciu regionów rozpiętych na błonie komórkowej.

Spośród kanałów jonowych zależnych od napięcia można wyróżnić kanały sodowe, wapniowe oraz potasowe, których funkcją jest regulacja napływu odpowiednich jonów do wnętrza komórki, czego wynikiem jest dalsze przekazywanie sygnału. Do chorób spowodowanych zaburzeniami kanałów jonowych należą choroby sercowo-naczyniowe, nadciśnienie tętnicze i choroby centralnego układu nerwowego.

## KINAZY TYROZYNOWE

Ta klasa receptorów przesyła sygnały przekazywane przez hormony i czynniki wzrostu. Receptory te są zbudowane z domeny zewnątrzkomórkowej wiążącej się z ligandem

*Zaburzenia receptorów GPCR prowadzą do wielu chorób, m.in. astmy, nadciśnienia tętniczego, stanów zapalnych, chorób sercowo-naczyniowych, chorób nowotworowych, schorzeń przewodu pokarmowego oraz centralnego układu nerwowego.*

*Do chorób spowodowanych zaburzeniami kanałów jonowych należą choroby sercowo-naczyniowe, nadciśnienie tętnicze i choroby centralnego układu nerwowego.*

- ▶ oraz z cytoplazmatycznej części enzymatycznej. Zadaniem kinaz jest umożliwienie przebiegu procesu fosforylacji. Fosforylacja reguluje niemal wszystkie aspekty życia komórki.

Ligand przyłącza się do receptorów, a następnie receptory łączą się ze sobą i ulegają dimeryzacji. Takie działanie aktywuje enzymy znajdujące się wewnątrzkomórkowo. W wyniku tych przemian białka ulegają fosforylacji.

Spośród innych receptorów kinaz można wymienić kinazy seryny/treoniny, kinazy białkowe oraz kinazy białkowe aktywowane mitogenami (kinazy MAP). Do naturalnych ligandów łączących się z receptorami kinaz należą: insulina, transformujący czynnik wzrostu-beta (TGF- $\beta$ ) oraz płytkowy czynnik wzrostu (PDGF).

### RECEPTORY WEWNĄTRZKOMÓRKOWE

Receptory wewnątrzkomórkowe (jądrowe) znajdują się w cytoplazmie lub w jądrze komórki. Ligandy endogenne, takie jak hormony i leki, łącząc się z tymi receptorami, aktywują lub hamują procesy transkrypcji genów. Istnieje ogromna superrodzina receptorów wewnątrzkomórkowych. Ich cechą charakterystyczną jest łańcuch polipeptydowy zbudowany z oddzielnych domen.

### PERSPEKTYWY BADAWCZE

Badania obejmujące oddziaływanie lek – receptor/enzym, nie zawsze są możliwe do przeprowadzenia na żywych organizmach posiadających docelowy receptor. Zamiast tego jednak, badania biochemiczne można wykonywać z użyciem związku imitującego miejsce docelowe. Bardzo często w analizach tych wykorzystuje się luminescencję lub fluorescencję. Dzięki temu możliwe jest prześledzenie szlaku przemian w czasie i przestrzeni umożliwiające oszacowanie ilościowe reakcji.

Możliwe jest monitorowanie wielu parametrów, np. stężenia wolnych jonów, potencjałów błonowych, aktywności poszczególnych enzymów, wskaźnika powstawania protonów,

transportu cząsteczek przenoszących sygnały oraz ekspresji genów.

Wstępne analizy są tworzone w celu włączenia fizjologicznych lub enzymatycznych miejsc docelowych do *screeningu* aktywności biologicznej potencjalnych związków terapeutycznych. Analizy biologiczne są następnie potwierdzane podczas przeprowadzania specyficznych testów biochemicznych i analiz obejmujących całą komórkę po to, by dobrze ocenić i scharakteryzować oddziaływania pomiędzy związkami docelowymi. Kolejnym etapem badań są szeroko zakrojone i wielośrodkowe, randomizowane badania kliniczne.

Dr farm. Paweł Bodera jest autorem pracy doktorskiej: „Działanie przeciwutleniające, radioprotekcyjne a struktura izoflawonów i ich pochodnych glikozydowych”, napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Wawer (Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Warszawie, 2004). Od 5 lat zajmuje się zawodowo nadzorowaniem bezpieczeństwa farmakoterapii.

#### Piśmiennictwo:

1. <http://www.marketresearch.com/>
2. [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/home.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml)
3. Bylund D.B., Toews M.L.: *Radioligand binding methods: practical guide and tips*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 265: 421, 1993.
4. Fedrigo O., Naylor G.: *A gene-specific DNA sequencing chip for exploring molecular evolutionary change*, Nucleic Acids Res., 32: 1208-1213, 2004.
5. Gurd S., Tiffany Gaudin T., Dore C., Pierre et al.: *Survey of allelic expression using EST mining* Genome Res., 15: 1584-1591, 2005.
6. Akutsu T., Hayashida M., Bahadur D. et al.: *Dynamic Programming and Clique Based Approaches for Protein Threading with Profiles and Constraints*, IEICE Trans A: Fundamentals, E89-A: 1215-1222, 2006.
7. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>