

Poszukiwanie nowych leków pochodzenia naturalnego

Searching for novel, bioactive compounds derived from nature

Streszczenie:

Związki pochodzenia naturalnego stanowią ważne źródło pożądanych aktywności biologicznych. Charakteryzują się dużym zróżnicowaniem budowy chemicznej. Jedną z metod szybkiego i wydajnego poszukiwania nowych leków przez firmy farmaceutyczne jest nowoczesna technika HTS (*high-throughput screening*).

Słowa kluczowe: związki naturalne, metabolity, HTS, biblioteki

Summary:

Natural products represent a rich source of bioactive compounds and possess a molecular diversity. The major research focus of the pharmaceutical industry is the fast and efficient detection of active compounds ("leads"). Modern technologies, e.g. high-throughput screening (HTS) enable generating high-profile candidates.

Key words: natural compounds, metabolites, HTS, libraries

Zatwierdzono do publikacji: grudzień 2011 r.

Związki pochodzenia naturalnego były przez długi czas jedynymi lekami dostępnymi dla człowieka i nadal odgrywają dużą rolę, głównie w procesie samoleczenia. Z czasem bioaktywne metabolity zaczęły być wypierane przez ich syntetyczne pochodne, analogi lub cząsteczki otrzymane metodą syntezy chemicznej. W latach 1970-2006 odkryto i wprowadzono do leczenia 24 leki wywodzące się ze związków naturalnych. Dziewiętnaście z nich było metabolitami promieniowców pochodzących z gleby, a pozostałe 5 związków metabolitami roślinnymi. Większość cząsteczek została odkryta i zbadana przez koncerny farmaceutyczne, korzystające z metod HTS, pozostałe wyodrębniono w instytucjach naukowych. Prawie połowa metabolitów pochodziła z Japonii. Spośród wszystkich 24 związków, 10 wykazywało działanie przeciwbakteryjne (3 związki działały wewnątrz komórki, 7 na ścianę lub błonę komórkową). Związki te strukturalnie należały do poliketydów, peptydów lub terpenoidów. Spośród 24 związków naturalnych, 17 zostało dopuszczonych do obrotu bez żadnych modyfikacji, 6 poddano semisyntezie, natomiast je-

den β -laktam SQ26180 został zastąpiony syntetycznym analogiem. Wprowadzenie na rynek większości leków (17 z 24) zajęło ponad 10 lat.

Obecnie trwają poszukiwania leków o nieznanym do tej pory mechanizmie działania i interesującej budowie chemicznej. Jest to spowodowane w wielu przypadkach wyczerpywaniem się aktualnych możliwości leczenia wielu poważnych schorzeń, np. zakażeń bakteryjnych, w wyniku wielolekooporności szczepów klinicznych. Ze względu na czas trwania badań, zwłaszcza klinicznych, wprowadzanie do obrotu nowych leków jest procesem długotrwałym.

Na całkowity czas kompleksowego badania potencjalnego leku wpływa optymalizacja struktury cząsteczki pod kątem jej działania w warunkach biologicznych (wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu, wydalania i toksykologii), powiększanie skali biosyntezy metabolitów do celów przemysłowych, a także długość badań klinicznych. Istotną cechą nowych leków jest innowacyjność, która dotyczy zarówno struktury chemicznej cząsteczki, zachowania w warunkach biologicznych jak i mechanizmów działania potencjalnego leku.



Jolanta Solecka

Joanna Zajko

Aleksandra Rajnisz

Magdalena A. Postek

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
Państwowy Zakład Higieny

Ważne jest również aktualne zapotrzebowanie rynku farmaceutycznego.

Naturalne źródła

W dziedzinach onkologii i chorób zakaźnych, odpowiednio 60 proc. i 75 proc. nowych leków wprowadzonych do leczenia w latach 1981-2002 było pochodzenia naturalnego. W latach 2001-2005 wprowadzono na rynek w Europie, Japonii i USA 23 kolejne leki, m.in. do zwalczania zakażeń o podłożu bakteryjnym i grzybiczym, cukrzycy, nowotworów i dyslipidemii.

Związki pochodzenia naturalnego stanowią źródło różnorodnych struktur chemicznych i często wykazujących aktywność biologiczną. Tworzą grupę strukturalnie uprzywilejowaną w procesie łączenia się z określonymi enzymami, receptorami, lub innymi miejscami wiążącymi, wykazując wysokie powinowactwo do struktur znajdujących się w różnych organizmach żywych. Bioaktywne metabolity wytwarzane są w stosunkowo niewielkich ilościach, a proces ich oczyszczania i izolacji, a także powiększania skali biosyntezy dla celów przemysłowych, jest częstokroć żmudny, czasochłonny i kosztowny.

Unowocześnianie technik skryningowych HTS (*high-throughput screening*) i zastoso-

wanie chemii kombinatorycznej ponownie ukierunkowuje koncerty farmaceutyczne na poszukiwanie leków wśród związków naturalnych. Wprowadzane są innowacje w procesach fermentacji, oczyszczania i izolacji oraz określania struktury związków naturalnych przy zastosowaniu połączonych metod HPLC i SPE z NMR i MS (UV).

Potencjalnym źródłem bioaktywnych metabolitów są rośliny, zwierzęta, grzyby, mikroorganizmy (głównie promieniowce i szczepy z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*). Wśród mikroorganizmów – promieniowce, a szczególnie rodzaj *Streptomyces*, są profilowymi producentami związków o działaniu antybiotycznym, przeciwrzybicznym, przeciwwirusowym, przeciwnowotworowym, przeciwutleniającym itp.

Mikroorganizmy, w porównaniu do roślin i zwierząt, stanowią odnawialne i odtwarzalne źródło metabolitów. Ponad 130 leków dostępnych na rynku jest pochodzenia mikrobiologicznego. Następne 67 znajduje się w różnych fazach badań klinicznych. Uważa się, że pomimo izolowania tak dużej liczby drobnoustrojów, 99 proc. mikroorganizmów pozostaje nadal nieodkryta.

Zwiększa się również obszar poszukiwania metabolitów drobnoustrojów. Do tej pory ich głównym źródłem pochodzenia była ziemia. Obecnie rozszerza się strefę odkrywania mikroorganizmów do akwenów wodnych (mórz, oceanów), a także izoluje się je z gąbek. W związku z tym obserwuje się oryginalność zarówno nowych gatunków drobnoustrojów, jak i ich metabolitów. Ponadto, metodami półsyntezy, uzyskuje się analogi związków pochodzenia naturalnego, które stanowią dodatkowe źródło nowych struktur.

Modyfikacje chemiczne umożliwiają przekształcenie grup funkcyjnych w cząsteczkach związków naturalnych, co sprawia, że związki te mogą wykazywać wyższą aktywność biologiczną niż metabolity wyjściowe. Dla przykładu, tigeceyklina, półsyntetyczny analog tetracykliny (dopuszczony do obrotu przez FDA do zwalczania infekcji bakteryjnych), w odróżnieniu od tetracykliny, nie stymuluje ważnych mechanizmów oporności u bakterii, które powoduje tetracyklina (m. in. tworzenie pompy eflux). Oprócz modyfikacji chemicznych cząsteczkę związku pochodzenia naturalnego można zmieniać metodami enzymatycznymi.

Związki pochodzenia naturalnego są w dalszym ciągu cennym materiałem wyjściowym przy poszukiwaniu nowych leków. Posiadają one ciekawe, unikatowe struktury, z wyważoną proporcją pierścieni. Ponadto charakteryzują się dużą masą cząsteczkową, mają wiele polarnych grup funkcyjnych, a także dużą ilość akceptorów wiązania wodorowego. Zsyntezowanie w laboratorium chemicznym związków o takich strukturach może być poważnym wyzwaniem.

Metabolity mogą posłużyć jako wzorce, cząsteczki wyjściowe (*templates*) przy tworzeniu nowych struktur związków chemicznych. Tworzenie analogów, tj. cząsteczek wykazujących podobieństwo strukturalne i analogiczną aktywność biologiczną do oryginalnego związku, może zwiększyć ich możliwości terapii. Analogi można podzielić na trzy kategorie: ● wykazujące podobieństwo chemiczne (strukturalne) i farmakologiczne ● tylko podobieństwo chemiczne ● wykazujące podobieństwo właściwości farmakologicznych, lecz mające zupełnie odmienną budowę chemiczną (tzw. analogi funkcjonalne). Dla przykładu metylacja łańcucha bocznego cząsteczki lowastatyny (która jest znanym lekiem obniżającym poziom cholesterolu) prowadzi do powstania jej pochodnej, simwastatyny, także powszechnie stosowanego leku w leczeniu hipercholesterolemii.

Biblioteki związków pochodzenia naturalnego

Obecnie firmy farmaceutyczne tworzą zarówno biblioteki związków bioaktywnych jak i ich syntetycznych analogów. Zawierają one wiele cząsteczek o różnorodnych strukturach i właściwościach. Tworzone są również biblioteki nieaktywnych biologicznie naturalnych ekstraktów, w których dokonuje się modyfikacji chemicznych grup często występujących w związkach pochodzenia naturalnego w grupy rzadko produkowane podczas wtórnego metabolizmu. Uzyskuje się w ten sposób udoskonalenie naturalnego systemu produkcji przez syntetyczne modyfikacje. Pozwala to na analizę SAR (*structural-activity relationship*).

Biblioteki związków pochodzenia naturalnego mogą zawierać nieoczyszczone ekstrakty, wstępnie oczyszczone ekstrakty oraz metabolity oczyszczone. Pomimo iż w HTS stosuje się całkowicie oczyszczone mieszaniny, nieoczyszczone ekstrakty są

również ważnym źródłem potencjalnych struktur, ponieważ są tańsze i łatwiejsze do pozyskania. Biblioteki związków syntetycznych charakteryzują się zdefiniowaną strukturą chemiczną swoich zbiorów. Natomiast w bibliotekach związków naturalnych zawarte są zazwyczaj nieoczyszczone lub wstępnie oczyszczone ekstrakty.

Firma bioLeads tworzy również biblioteki zawierające wstępnie oczyszczone mieszaniny związków naturalnych o nieznannej strukturze (tzw. subfrakcje). Pozyskuje się je z hodowli mikroorganizmów lub grzybów. Supernatanty są oddzielone od grzybni za pomocą filtracji. Następnie filtry są absorbowane na kolumnach i frakcjonowane w zależności od ich masy. Po wykazaniu aktywności w subfrakcjach, określone mieszaniny poddawane są procesowi HPLC i analizie metodami LC-MS i ewentualnie NMR. Stworzenie takiej biblioteki obniża koszt, ponieważ tylko aktywne frakcje są oczyszczane i analizowane.

Inną techniką tworzenia bibliotek jest DYMONS (*diversity-modified natural scaffolds*). Technika ta polega na wybieraniu szkieletów cząsteczek związków pochodzenia naturalnego z dostępnej bazy do tej pory odkrytych związków (*Dictionary of Natural Products, Chapman i Hall*) pod kątem posiadania przez nie właściwości charakterystycznych dla cząsteczki leku (odpowiedniej masy cząsteczkowej, ilości pierścieni, ilości rotujących wiązań, rodzaju grup funkcyjnych, log P, a także ich aktywności biologicznej).

Koszty zbudowania bibliotek związków chemicznych oscylują na poziomie około 6,5 proc. całkowitego kosztu wprowadzenia na rynek nowego leku. W bibliotekach związków chemicznych istotna jest różnorodność zbiorów. Tę cechę można uzyskać poprzez kolekcjonowanie związków chemicznych pochodzących z możliwie jak największej liczby źródeł. Jakość biblioteki określana jest w odniesieniu do właściwości farmakokinetycznych związków, które są punktem krytycznym w procesie badania nowego leku.

Biblioteki muszą dysponować substancjami o odpowiedniej czystości w ilości 10-100 mg. Wymaganiem standardowym jest co najmniej 80 proc. czystość związku. Im bardziej oczyszczony, tym wyższa jest, z reguły, jego cena. Do sprawdzania jakości związków w bibliotece stosuje się połączone

nia technik ^1H NMR i LC-MS, a ich rozpuszczalność i stabilność określa się często w DMSO.

Typowe biblioteki związków chemicznych w większych koncernach farmaceutycznych zawierają miliony związków chemicznych. Zbiory te podlegają ciągłym uaktualnianiom. W zależności od korelacji biologicznych związków z określonym celem poszukiwań dodaje się je, lub usuwa, z biblioteki.

HTS

Obecnie poszukiwanie nowych leków w przemyśle farmaceutycznym wykorzystuje technikę HTS, w której przeszukuje się zazwyczaj dziesiątki tysięcy substancji tygodniowo. Prawidłowy sposób przygotowania związków do HTS polega na rozdzieleniu naturalnych ekstraktów na frakcje i ich analizie spektroskopowej.

Ekstrakty związków naturalnych są zwykle mieszaniną różnych struktur np. tanin, które łatwo wiążą się z białkami i mogą dawać podczas HTS fałszywie pozytywne wyniki. Dlatego przed analizą HTS należy je usunąć (detanizacja). Naturalne ekstrakty często zawierają związki już poznane.

W przypadku roślin wyższych i mikroorganizmów morskich technika HTS może napotykać trudności. Ich przyczyną może być sezonowa lub środowiskowa zmiana składu, a także dostępności źródeł substancji bioaktywnych. Trudności mogą dotyczyć również detekcji związków aktywnych, powtarzalności wyników badań, czystości związków czy możliwości utraty źródła. Proces izolacji konkretnego metabolitu jest zazwyczaj czasochłonny (może trwać tygodnie lub miesiące), natomiast czas trwania jednej analizy HTS to kilka tygodni. Aby określić strukturę chemiczną nowego związku, produkt musi być wysokiej jakości. Głównymi narzędziami są: HPLC w połączeniu z MS, MS/MS, NMR oraz IR i UV.

HTS polega na przeszukiwaniu kolekcji związków dostępnych w bibliotece pod kątem ich aktywności wobec konkretnego czynnika, np. szczepu określonego gatunku bakterii, receptora, danego enzymu. Im większa ilość związków w bibliotece i im większa różnorodność ich struktur chemicznych, tym większe prawdopodobieństwo odkrycia nowego leku. Inną zbliżoną metodą polegającą na projektowaniu kon-

kretnych cząsteczek mających oddziaływać z biologicznym celem, czyli np. enzymem, receptorem, białkiem, jest RDD (*rational drug design*). Obie techniki wymagają określenia konkretnego punktu docelowego poszukiwań (*target*). Powinien on występować w określonej dużej grupie np. patogenów i musi być specyficzny np. dla komórki bakteryjnej, a niespotykany w organizmie człowieka.

Jeśli biblioteka zawiera dużą liczbę nowych struktur, które nie były wcześniej używane w programie skriningowym, jako cząsteczki docelowej (*target*) początkowo można użyć standardowego białka, receptorów, szczepów bakterii itd. Jednak jeśli biblioteka była już często przeszukiwana pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej w celu odkrycia nowych mechanizmów działania czy nowych klas związków, zaleca się zastosowanie niestandardowego enzymu lub innego białka, czy szczepów bakterii opornych na dostępne na rynku antybiotyki.

Obecnie reakcje HTS prowadzi się na płytach titracyjnych. Początkowe analizy HTS mają charakter jakościowy. Jeśli próbki dadzą wynik pozytywny, reakcję powtarza się ilościowo. Jako standardowe badania w HTS wykonuje się testy biochemiczne, w tym ELISA, badania cytotoksyczności (aktywności przeciwnowotworowych), analizy powinowactwa do określonych białek (*binding assay*).

Alternatywną techniką dla HTS jest SOSA (*selective optimization of side activities*). Metoda ta składa się z dwóch etapów, skriningu nowych punktów uchwytu (*targets*) przy zastosowaniu ograniczonej ilości (ok. 1000) dobrze znanych cząsteczek leków dla których znana jest bioaktywność, toksyczność i które są użyteczne w terapii dla ludzi. Po wyselekcjonowaniu optymalnej cząsteczki związku, kolejnym etapem jest otrzymanie analogów molekuly, których uboczny efekt działania stanie się głównym oraz zostanie zredukowana lub znacznie zmniejszona początkowa aktywność farmakologiczna związku wyjściowego. Biblioteka chemiczna dla celów SOSA (www.prestwickchemical.com) zawiera ok. 1120 związków biologicznie czynnych, wykazujących duże zróżnicowanie strukturalne i farmakologiczne oraz znaną biodostępność i bezpieczeństwo dla ludzi. Ponad 85 proc. związków to leki dobrze po-

znane, 15 proc. z nich to bioaktywne alkaloidy. Dla naukowców zajmujących się analizą strukturalną związków aktywnych farmakologicznie początkowe biblioteki te są niezwykle cennym źródłem cząsteczek wzorcowych.

Podsumowanie

Do tej pory odkryto i przebadano pod kątem aktywności biologicznej mniej niż 1 proc. mikroorganizmów i prawdopodobnie mniej niż 15 proc. roślin wyższych. Związki naturalne są izolowane i oczyszczane wieloetapowo; mają zróżnicowaną dostępność, a ich analizy są skomplikowane. Po uzyskaniu metabolitu z określonego źródła prowadzi się skrining jego właściwości bioaktywnych, analizę struktury chemicznej, syntezę analogów i wybiera optymalną cząsteczkę leku do dalszych badań. Nowoczesne techniki MS i NMR umożliwiają analizę struktury chemicznej związku, HPLC jego rozdział, a HTS identyfikację znanych związków i potencjalnych leków i odkrywanie każdego roku tysięcy związków pochodzenia naturalnego. Z tej liczby, w wyniku bardziej szczegółowych analiz, tylko kilka związków ma szansę na wprowadzenie do leczenia. Bioaktywne metabolity o unikalnej budowie przyciągają uwagę chemików zainteresowanych syntezą nowych cząsteczek. Stworzenie i utrzymanie zbiorów związków naturalnych (bibliotek) jest na razie opłacalne tylko dla dużych koncernów farmaceutycznych. Firmy farmaceutyczne, ze względu na dużą konkurencję chcą wyprodukować nowy lek szybko i jak najmniejszym kosztem. Dlatego ważna jest zarówno jakość związków znajdujących się w bibliotece chemicznej, jak i ich dostępność (gromadzenie wyłącznie związków aktywnych).

Praca jest współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013; projekt „Potencjalny antybiotyk oraz metoda otrzymywania nowych związków przeciwbakteryjnych” nr: UDA-POIG.01.03.01-14-136/09.

Adres do korespondencji:
e-mail: jsolicka@pzh.gov.pl

Wykaz piśmiennictwa u autorek