

C – OD KOFEINU K NÁVRHU LÉČIV

MIROSLAV BRUMOVSKÝ, STANISLAV GEIDL

Od vrbové kůry k přístrojům za miliony

Začneme malým výletem do historie. Uvidíme, že metody objevování léčiv se v průběhu dějin značně rozvíjely a měnily. Cesta k současnému postupu hledání léčiv bude dlouhá, ale nesmírně zajímavá.

V minulosti byla řada léčiv objevena náhodou, obvykle pozorováním účinků různých přírodních látek na organismus. Výtažky z rostlin byly často používány k výrobě lektvarů nebo obkladů. Takto byly například objeveny účinky morfinu, kyseliny salicylové nebo chininu.



Obrázek 1 Extrakt z vrbové kůry, která obsahuje kyselinu salicylovou, používali již dávní Egypťané k tlumení bolesti a horečky. Záznamy o použití tohoto extraktu jsou rovněž i ze starověkého Řecka.

Dávní mudrci byli při přípravě nových léčiv do značné míry ovlivněni náboženstvím nebo různými tajemnými naukami a k vědeckému přístupu to měli dosti daleko. Určitě jste již slyšeli o alchymistech a o roztodivných pokusech, které (bohužel neúspěšně) prováděli. Důležitou výjimkou v období alchymie byl Paracelsus, který hlásal, že posláním alchymie není transmutace různých látek ve zlato, nýbrž hledání nových léků proti nemocem. Svým učením položil základy iatrochemie (řecky *iatros* = lékař), předchůdkyně farmaceutické chemie. Základní ideou iatrochemie byla představa, že příčinou špatné funkce organismu jsou změny v jeho chemickém složení. Úkolem lékařů pak bylo uzdravit nemocného s využitím chemických prostředků. Iatrochemici zavedli do léčebné praxe používání anorganických látek (oxidů, sulfidů, solí).



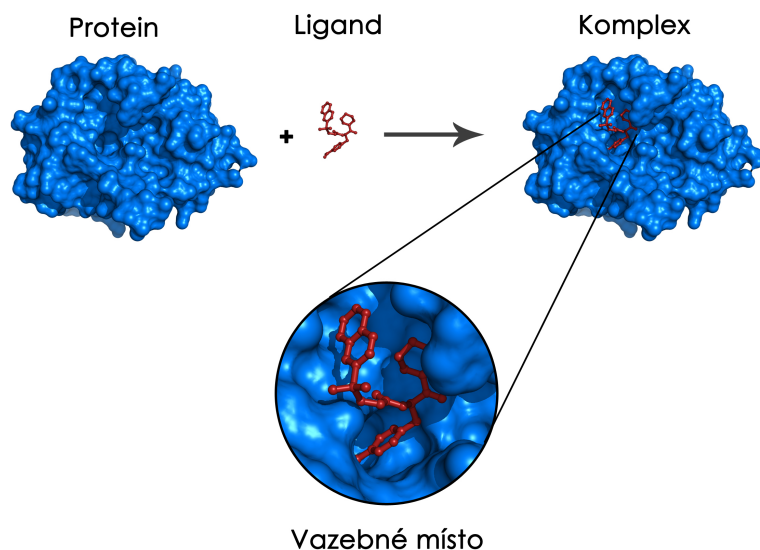
Obrázek 2 Alchymie, která doznala velkého rozkvětu v období renesance, neměla obvykle s vědou mnoho společného. Přesto umožnila rozvoj experimentálního zkoumání, objevila celou řadu nových látek a chemických postupů.

Vývoj separačních metod umožnil v 19. století izolaci účinných látek z přírodních extraktů a s využitím organické syntézy byly připraveny deriváty těchto látek za účelem dosažení vyšší účinnosti (například heroin).



Obrázek 3 Vlevo: lahvička synteticky vyrobené kyseliny acetylsalicylové (Bayer, 1899); vpravo: dobový leták firmy Bayer z přelomu 19. a 20. století propagující kromě Aspirinu i další acetylovanou látku přírodního původu – heroin. Heroin byl prodáván jako nenávykový analog morfinu pro léčbu kašle. Později se však ukázalo, že heroin se v těle rychle metabolizuje na morfin.

Vědecký pokrok ve 20. století vnesl do celé oblasti vývoje léčiv racionální pohled. Vědci přišli s myšlenkou, že molekuly léčiva se v buňkách váží na biologické receptory¹ a ovlivňují jejich funkci.² Pochopení mechanismu, jak léčivo v těle funguje, hraje zásadní roli při hledání nových léčiv. Tento princip, označovaný také jako mechanismus zámku a klíče, zůstal jakýmsi "centrálním dogmatem" farmakochemie celá desetiletí a posloužil při vývoji celé řady látek. Na začátek nám tento model sice postačí, ale později si povíme, že není úplně správný, protože jak receptor (nejčastěji protein), tak léčivo, jsou pohyblivé molekuly a mohou při interakci měnit svou konformaci, což může vést ke změně vazebných vlastností.

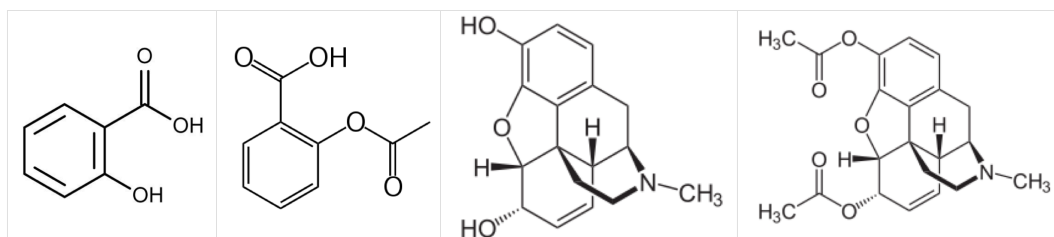


Obrázek 4 Působení léčiva v těle si můžeme představit následovně: v těle se nachází receptor (nejčastěji enzym), do jehož vazebného místa se léčivo váže, a tím ovlivní jeho funkci (například zabránění vstupu přirozených substrátů do enzymu, čímž zpomalí enzymatickou reakci).

¹Receptory v tomto kontextu myslíme všechny biomolekuly, na které se mohou vázat molekuly léčiva (proteinové receptory na povrchu buněk, enzymy, nukleové kyseliny, membrány).

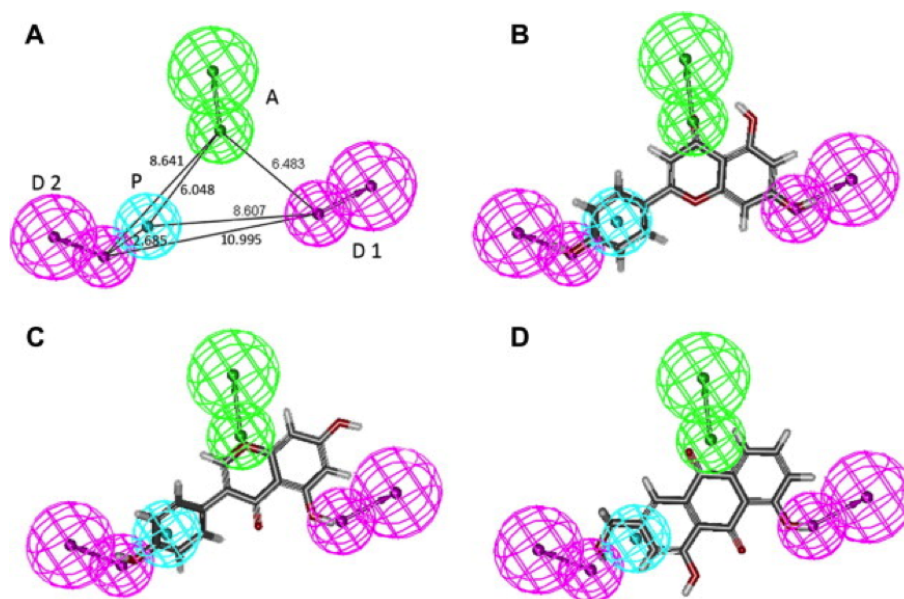
²Základy tohoto konceptu vytvořili E. Fischer, P. Ehrlich a J. N. Langley.

Rozvoj strukturních metod (hlavně rentgenové krystalografie) v první polovině 20. století umožnil určit molekulární strukturu látek. I když se struktury některých léčiv podařilo dříve odvodit, až v této době bylo možné je experimentálně získat.



Obrázek 5 Vzorce některých léčiv, zleva: kyselina salicylová, kyselina acetylsalicylová, morfin, heroin.

Znalost molekulární struktury látek je klíčová pro systematický přístup k objevování nových léčiv. Představme si první racionální metodu, kterou k tomuto účelu můžeme použít. Na základě struktury známé látky, která vykazuje biologický účinek, můžeme hledat látku s podobnou strukturou a zkoušet, zda bude účinnější. Anglicky se tomuto přístupu říká **ligand-based drug design**. Prvním využitím tohoto přístupu byla příprava derivátů účinných látek, která probíhala již v 19. století. Existují však i další (a lepší) možnosti. Když vyjdeme z představy, že léčivo (ligand) se váže na biologický receptor pomocí slabých interakcí (vodíkové můstky, van der Waalsovy síly), můžeme hledat takové látky, které mají v molekule podobně rozmístěné vodíkové donory, akceptory a náboje jako původní látka. Soubor těchto vlastností včetně vzájemné vzdálenosti jednotlivých atomů či jejich skupin se označuje jako tzv. farmakofo³.



Obrázek 6 Farmakofo³ viru hepatitidy C: A) Popis farmakoforu, modře – hydrofobní oblast, fialově – donor vodíkové vazby, zeleně – akceptor vodíkové vazby, čísla udávají vzdálenosti v angströmech. B) – D) různé látky, které se váží na receptor. Povšimněte si, že struktura ligandů se liší, ale všechny splňují uvedený farmakofo³.

Oříšek v celém nápadu představuje skutečnost, že je nejdříve nutné zjistit, které jsou ony atomy (či jejich skupiny), které hrají klíčovou roli při vazbě léčiva k receptoru. A tu nastupuje testování. Dostí brutální.

³Základ konceptu pochází již z počátku 20. století, kvantitativního zpracování a praktické použitelnosti dosáhl farmakofo³ až později zásluhou M. Kiera, P. Gunda a dalších).

Ve 20. století se v hojné míře začínají využívat zvířecí modely pro testování jak účinnosti, tak toxicity zkoumaných látek.⁴ Výsledky testů na zvířatech mohou prokázat, které látky jsou účinné proti danému onemocnění.⁵ Pokud strukturní vzorce těchto látek srovnáme vedle sebe a budeme si všímat jejich tvaru, velikosti, funkčních skupin a rozložení nábojů, můžeme odvodit farmakofor cílového receptoru. Na jeho základě můžeme navrhovat struktury dalších léčiv (ať už prostou úvahou, tak třeba procházením databází molekul). Je na místě přiznat, že tento teoretický přístup nemusí vždy fungovat, a proto výzkumníci často dávali přednost testování obrovské řady látek na zvířatech (metoda hrubé síly). Velký rozmach racionálního návrhu léčiv umožnil až rozvoj výpočetní techniky v 70. letech 20. století.

Následuje dobrá zpráva pro milovníky zvířat. Druhá polovina 20. století přinesla do vývoje léčiv několik revolučních změn, a to zejména v oblastech molekulární a strukturní biologie, rychlého testování obrovského množství látek (tzv. high-throughput screening) a již zmíněné výpočetní techniky.

Další pokroky v rentgenové krystalografii umožnily určování struktury biomolekul, a tím vědcům odhalily skutečnou podobu receptorů. Díky rozvoji genetiky a klonování bylo najednou možné vyrobit v laboratoři velké množství receptorového proteinu. Porozumění struktuře a funkci buňky a jejích jednotlivých částí dále umožnilo pochopení molekulární podstaty celé řady onemocnění. Dostupnost práce s receptorem jak teoreticky (modelování interakce), tak prakticky (testování v laboratoři), otevřela spoustu nových možností.

Jednou z nich je testování nových látek přímo na receptoru či buněčné kultuře (tzv. *in vitro* – ve skle). Dnes už jsou prakticky všechna nová léčiva testována nejdříve na roztoku receptoru a poté v živých buňkách. Pouze v případě, že tyto testy prokážou účinnost látky a nepotvrdí buněčnou toxicitu, jsou látky dále testovány na zvířatech a až nakonec na lidech.

A jdeme do finále. Pokroky druhé poloviny 20. století nabídl dvě hlavní metody, jak dnes léčiva hledáme.⁶ Obě dvě metody probereme v následujících odstavcích.

High-throughput screening (do češtiny možno přeložit jako „vysoce výkonný skrínig“, HTS), metoda hrubé síly, při které je obrovské množství látek testováno *in vitro*. Obvykle se počet látek pohybuje v deseti- až stotisících. Aby bylo tolik testů možné uskutečnit v reálné době, jsou HTS systémy většinou automatizovány do podoby různých robotů.

⁴Testování nových látek přímo na lidech bylo naštěstí už od počátku 20. století postupně zakazováno nebo aspoň regulováno. Pro mikrobiální onemocnění bylo navíc možné provádět testy přímo na daných mikroorganismech (např. při výzkumu antibiotik).

⁵Což bohužel v praxi nemusí být pravda kvůli odlišnostem v metabolismu člověka a modelového zvířete, proto je třeba vybrat vhodný model pro testování.

⁶Představené přístupy nejsou jediné, které se dnes používají k hledání nových léčiv, dále se využívá například hledání nových látek v přírodě (v sinicích, řasách, korálech apod.).



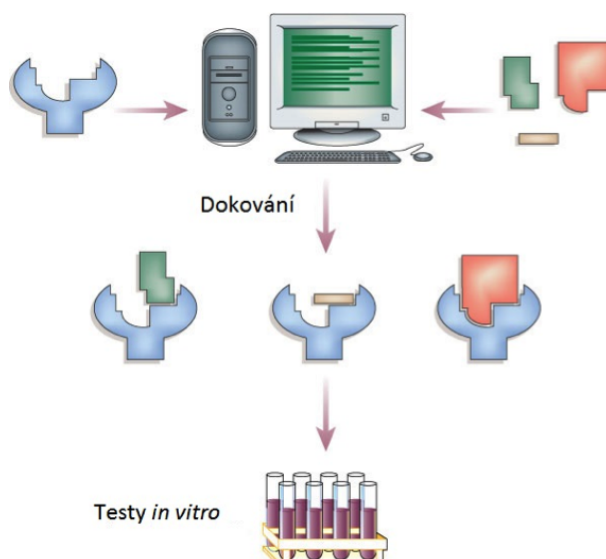
Obrázek 7 Při testování nových léčiv je důležité vybrat správný zvířecí model. Například pro výzkum lepry je nutné použít pásowce, protože běžná laboratorní zvířata toto onemocnění nepostihuje.



Obrázek 8 High-throughput screening dovoluje automaticky testovat obrovské množství látek. Zařízení připomíná výrobní linku a taky podle toho stojí.

Design léčiv využívající výpočetních metod (CADD – Computer assisted drug design), umožněný rozmachem výpočetní techniky a strukturní biologie. Výpočetní metody zahrnují zejména tzv. dokování (angl. docking), při kterém specializovaný program předpovídá vazebnou energii ligandu s receptorem. Dokování se používá při tzv. virtuálním skríningu, který funguje obdobně jako HTS, ovšem probíhá pouze na počítači (*in silico*). Program předpoví vazebné energie celé knihovny molekul s receptorem a ty, které se na receptor váží silně, vyhodnotí jako potenciální léčiva. Přístup pracující s receptorem se anglicky označuje jako **structure-based drug design**.

Další metody z oblasti CADD zahrnují například modelování metabolismu látek, předpověď jejich toxicity nebo již dříve zmíněný ligand-based drug design. Tento přístup je stále využíván tam, kde není znám dostatek informací o biologickém receptoru. Nejčastěji používané metody v rámci tohoto přístupu jsou farmakoforové modely a tzv. QSAR modely. S farmakofory jsme se setkali již dříve, nyní si ještě objasníme druhý pojem. QSAR (angl. Quantitative Structure-Activity relationship, česky "kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou") předpovídá aktivitu testovaných látek na základě matematického vztahu mezi různými parametry charakterizující dané látky (např. molekulová hmotnost, polarita, počet určitých funkčních skupin, aj.).



Obrázek 9 Schéma virtuálního skríningu. Simulace na počítači pomocí molekulového dokování umožňuje předpovědět, jak dobře se různé látky budou vázat do vazebného místa receptoru. Obvykle je pomocí této metody vybrána menší skupina látek, které jsou poté testovány *in vitro*.

Oba dva představené přístupy jsou v současné době běžně využívány při návrhu nových léčiv v akademické sféře i ve farmaceutických firmách. Vzhledem k tomu, že virtuální skrínig i HTS mají své klady i zápory, je výsledný postup při výzkumu obvykle kompromisem mezi oběma metodami. Často je pomocí virtuálního skrínigu vybrána podskupina látek (stovky, tisíce), které jsou poté testovány *in vitro* na HTS. Zvyšující se přesnost výpočtů spolu s rostoucími náklady na objevování nových léčiv činí výpočetní metody stále více atraktivní. Pro ilustraci se můžete podívat, kolik orientačně stojí různé experimenty při objevování léčiv (celková cena výzkumu jednoho léčiva je dnes v průměru 25 miliard Kč).

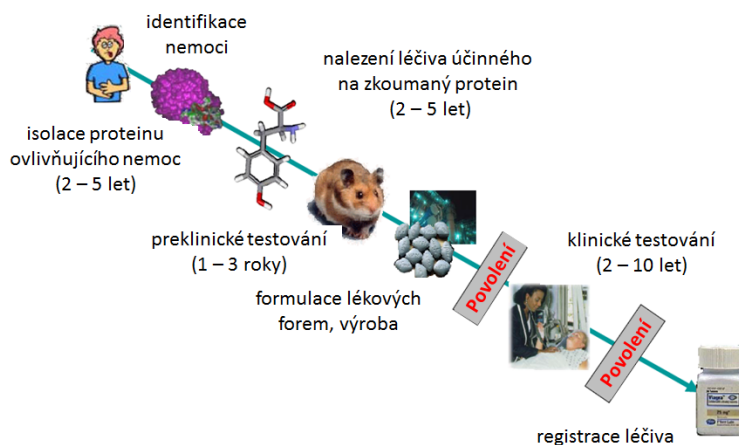
Tabulka 1 Orientační ceny různých experimentů

Experiment	Typická cena pro 1 látku
počítačové modelování	200 Kč
biochemická analýza	7 000 Kč
testování na buněčné kultuře	75 000 Kč
stanovení akutní toxicity na myších	250 000 Kč
stanovení struktury proteinu krystalizací	2 000 000 Kč
ověření účinnosti na zvířatech	5 500 000 Kč
stanovení chronické toxicity (potkan)	14 000 000 Kč
klinické zkoušky na lidech	10 000 000 000 Kč

Vývoj léčiv v současnosti

Cílem historické exkurze do objevování léčiv v předchozí kapitole bylo nastínit složitost celého procesu a představit základní pojmy a metody, které jsou důležité při současném výzkumu léčiv. Typický trend dnes představuje racionální pohled na problematiku, kdy je kladen důraz na pochopení mechanismu účinku a vztahů mezi látkami na molekulární úrovni. Tento postup, hlavně v kombinaci s velkou výpočetní kapacitou moderních počítačů, umožňuje minimalizovat časové i finanční náklady na hledání nových léčiv.

Schéma postupu při objevování léčiv je uvedeno na následujícím obrázku.⁷



Obrázek 10 Postup při objevování léčiv. Uvedení nového léku na trh trvá 10 až 15 let, takže výzkum léčiv, která jsou registrována v tomto roce, započal pravděpodobně na konci 90. let minulého století.

Jak to tedy celé probíhá? Výzkum léčiv začíná tím, že se objeví nové onemocnění. Dalším krokem, který zabere obvykle několik let, je výzkum nemoci na molekulární úrovni a hledání cílové biomolekuly (obvykle enzymu), kterou by bylo možné ovlivnit léčivem. Léčivo po navázání na enzym může ovlivňovat jeho funkci dvěma způsoby – buď ji zpomalí (naváže se do vazebného místa a blokuje jej, tzv. antagonist), nebo naopak zrychlí (funguje jako přirozený substrát, tzv. agonista).

Po identifikaci cílového enzymu začíná samotný proces hledání léčiva, při kterém se využívají dvě hlavní metody – high-throughput screening a virtuální skrining. V prvním případě je nutno připravit cílový enzym laboratorně a izolovat jej pro testy *in vitro*, ve druhém případě je (obvykle) nutno znát strukturu enzymu (nejčastěji z rentgenové krystalografie). Jak jsme se již zmínili dříve, často se v tomto kroku používá kombinace obou metod, kdy pomocí virtuálního skriningu je vybrán zlomek molekul, které jsou poté testovány pomocí HTS. Výsledkem je nalezení látek, které se váží na receptor, v hantýrce se jim říká „hits“.

Ne všechny látky, které se váží na receptor, ale mohou být dobrými léčivy. Látky mohou být toxické nebo se v buňkách mohou rozložit dříve, než se dostanou k místu účinku.⁸ Proto v další fázi vývoje léčiv probíhá testování na buněčných kulturách. Paralelně s tímto testováním probíhá také optimalizace léčiv pomocí výpočetních metod. Výsledkem této fáze je nalezení látek, které mají potenciál k léčbě nemoci, jsou označovány jako „leads“.

Dalším krokem je preklinické testování na zvířatech (*in vivo*). Cílem preklinických testů je ověřit účinnost látky k léčbě daného onemocnění a odhalení toxických účinků na systémové úrovni. Nejběžnějším zvířecím modelem pro testování je myš, protože je nejlevnější, ovšem vždy je potřeba dávat pozor na to, aby onemocnění mělo u modelového zvířete co nejpodobnější průběh jako u člověka (vzpomeňte na příklad pásovce k výzkumu lepry).

Z preklinických studií je také možné zjistit, jaký je farmakokinetický profil léčiva v těle (jak se vstřebává, distribuuje po těle, metabolizuje a vylučuje z těla ven). S využitím těchto znalostí je poté možné vytvořit vhodnou lékovou formu. Velkou snahou farmaceutických firem je vyrábět léčiva ve formě prášků a tabletek, které se dají polknout. I když se většinou nejedná o nejlepší způsob podání léčiva,

⁷Zaměříme se při tom na „klasická“ léčiva, tedy na malé organické molekuly.

⁸Celá řada látek se navíc do buňky z okolí vůbec nedostane.

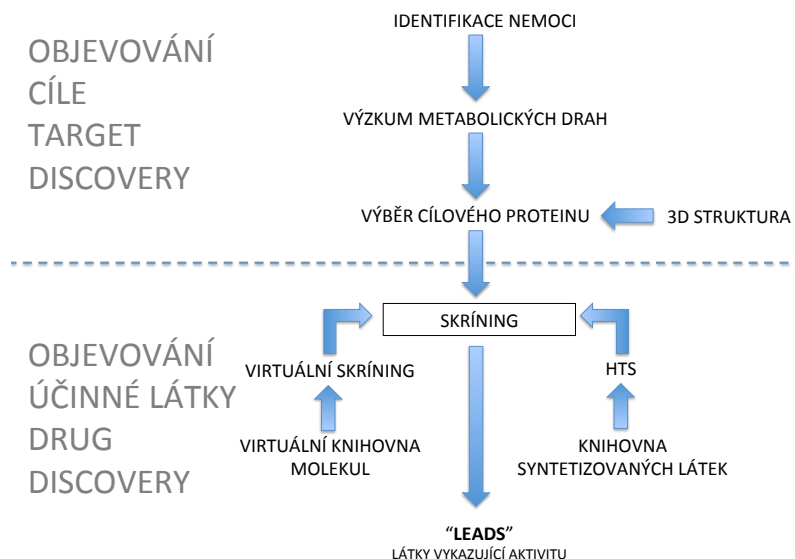
je mezi pacienty nejpobulárnější. Finální léková forma je ještě upravena během klinického testování na lidech, aby vykazovala co nejvyšší terapeutický účinek a zároveň minimální nežádoucí účinky.

Klinické testování probíhá ve třech fázích a k zahájení každé z nich musí vydat souhlas příslušný státní regulační orgán.⁹ Nejprve je nové léčivo podáváno zdravým lidem, aby se zjistily vážné nežádoucí účinky. Asi polovina látek postoupí do fáze II, ve které je již podáváno lidem trpícím onemocněním, na jehož léčbu je léčivo určeno. V této fázi se ověřuje účinnost léčiva ve srovnání s placebem (a staršími léčivy) a optimalizuje se léková forma a dávkování. Studie probíhá zaslepeně, pacient neví, kterou látku dostal. Asi třetina látek postoupí z fáze II do fáze III. Třetí fáze spočívá v testování léčiva na široké skupině pacientů (stovky až tisíce) a je dvojité zaslepená, tzn. pacient ani lékař neví, jakou látku podávají. Cílem třetí fáze testování je vyloučit efekt placebo a podchytit všechny nežádoucí účinky.

Fází III projde asi čtvrtina léčiv. Po úspěšném testování podá výrobce žádost o registraci léčiva příslušnému státnímu regulačnímu orgánu. Po udělení registrace může být léčivo uvedeno na trh. Nutnou podmínkou k udělení registrace je zajištění tzv. postmarketingového monitorování, které spočívá ve sledování účinků léčiva u pacientů (často označováno jako fáze IV klinického testování).

Virtuální skríníng

V první lekci jsme se věnovali historii vývoje léčiv a dospěli jsme až k postupům, které se používají v současné době. Zjistili jsme, že vymyslet nové léčivo není vůbec jednoduché ani levné. V druhém studijním textu se podrobněji zaměříme na jednu z metod hledání potenciálního léčiva, a to virtuální skríníng (česky můžeme přeložit třeba jako "virtuální prohledávání").



Obrázek 1 Úloha skríníngu při výzkumu léčiv. Cílem skríníngu je identifikovat soubor látek (v řádu stovek), které vykazují aktivitu na daném biologickém receptoru. Pro skríníng je použito několik set tisíc až milionů látek. Směr shora dolů na obrázku znázorňuje postup při hledání potenciálního léčiva, vodorovně jsou uvedeny různé metody skríníngu.

Finanční i časová náročnost je pro experimentální přístup, při kterém bychom otestovali všechny látky v laboratoři (např. pomocí HTS), velkou překážkou. Je totiž nutné izolovat požadovaný biologický receptor (target) v dostačujícím množství a koupit či syntetizovat všechny látky, které by měly být testovány. Z tohoto důvodu se ve farmaceutickém průmyslu rozvinulo používání počítačových simulací a výpočtů, které umožňují vybrat užší soubor látek, které budou s vyšší pravděpodobností vykazovat aktivitu. Další výhodou je, že nám počítače dovolují použití velké míry automatizace a zpracování ohromného množství molekul, jak malých molekul (potenciálních léků), tak velkých biomolekul. Vznikl tak celý vědní obor

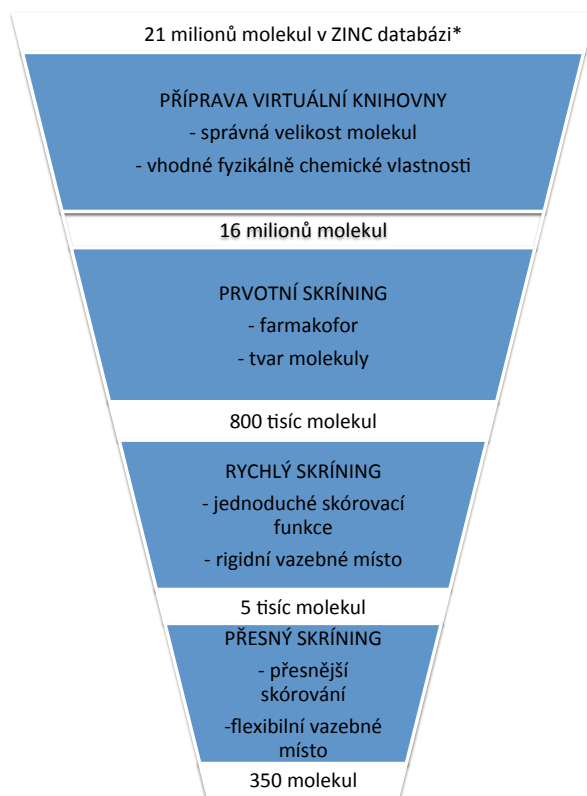
⁹U nás je to Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL), ve Spojených státech potom Food and Drug Administration (FDA).

chemoinformatika. V posledních letech se rozvinula do dynamické a lukrativní technologie pro získávání nových „hitů“, potenciálně nových účinných látek.

Připomeňme si, že výpočetní metody pro design léčiv můžeme dělit do dvou skupin. Ze znalosti bioaktivního konformeru molekuly získaného pomocí strukturních metod (rentgenová krystalografie – X-ray¹⁰ a nukleární magnetická rezonance – NMR¹¹) můžeme hledat potenciální nový ligand pomocí 3D podobnostního hledání¹², farmakoforového vzoru (obrázek 6A z minulé lekce) nebo QSAR modelu. Tento přístup pak nazýváme **ligand-based virtuální skrínig**, protože vychází ze struktury známého ligandu.

Pokud známe i strukturu cílového receptoru (target), můžeme využít molekulové dokování, které se pokusí dostupné látky umístit do vazebného místa receptoru a odhadne příslušné vazebné energie. Na základě srovnání vazebných energií poté program vyhodnotí látky s nejvyšší aktivitou. Tento přístup se nazývá **structure-based virtuální skrínig**. Dále v tomto textu budeme jako biomolekuly a makromolekuly uvažovat pouze enzymy, protože jsou v drtivé většině případů hlavním cílem léčiv.

Uvedené metody můžeme vhodně kombinovat tak, abychom nejdříve rychle vybrali menší množství látek, které dále upřesníme pomalejší, ale zato přesnější metodou. Můžeme si to představit například jako několik sít s klesající velikostí děr, v každém kroku se nám zmenšuje počet kamínků, které projdou skrz, resp. potenciálních ligandů. energii a prostředky, které musíme vynaložit v každém následujícím kroku, rostou, tzn. že ty nejnáročnější a nejpřesnější metody provádíme až na konec s nejmenším počtem molekul.



Obrázek 2 Hierarchický postup virtuálního skrínigu. Na počátku stojí rychlé a nepřesné metody, směrem dolů vzrůstá přesnost použitých metod, ale zároveň i náročnost výpočtů.

*Databáze ZINC je databáze komerčně dostupných molekul připravených pro dokování, můžete ji najít na adrese <http://zinc.docking.org>

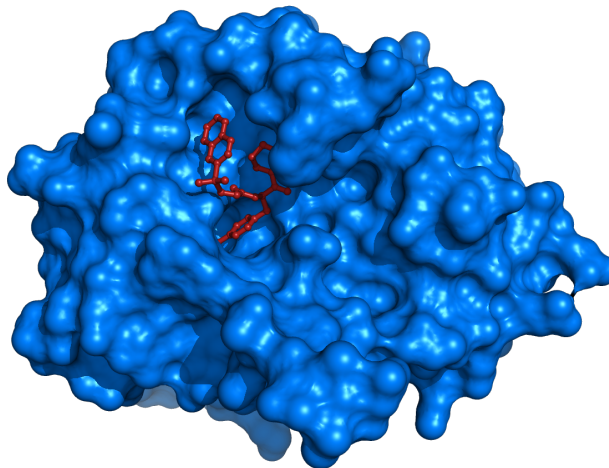
¹⁰Tato metoda měří rozložení atomů pomocí elektronové hustoty, kterou získáme rozptylem rentgenového záření na elektronech. Pro tuto metodu používáme krystaly látek, u kterých chceme znát strukturu.

¹¹Tato metoda je založena na měření frekvence spinu atomových jader. V silném magnetickém poli vyladíme přístroj na určitý typ jader a posíláme různé rádiové signály a jadra různě odpovídají na základě různého rozložení elektronů v jejich okolí.

¹²Jedná se o metodu, která se snaží najít molekuly, které mají na určitých místech v prostoru stejné atomy.

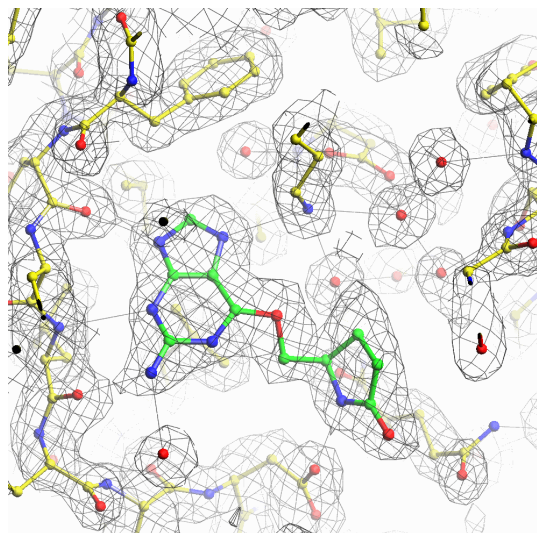
Structure-based virtuální skrínig

Tento přístup byl poprvé publikován v roce 1982 ve článku "A geometric approach to macromolecule-ligand interactions,"¹³ kde se skupina profesora Ferrina pokusila identifikovat potenciální místo, kam by se mohl vázat ligand. Toto vazebné místo může být lokalizováno v kapse nebo kavitě proteinu a obsahuje s různou pravděpodobností donory či akceptory vodíkové vazby, hydrofobní místa a další skupiny, která mohou vytvářet slabé interakce s ligandem. Příkladem vazebného místa může být aktivní místo enzymu.



Obrázek 3 Struktura trombinu s navázaným inhibitorem NAPAP (1-[N-(naftalen-2-ylsulfonyl)glycyl-4-karbamimidoyl-D-fenylalanyl]piperidin). Struktura byla získána experimentálně za pomoci rentgenové krystalografie.¹⁴

Structure-based virtuální skrínig využívá metody zvané dokování. Předpokladem této metody je znalost 3D struktury proteinu. Tu nejčastěji získáváme pomocí experimentálních metod rentgenové krystalografie nebo nukleární magnetické rezonance či za použití empirické metody homologního modelování¹⁵. Existují i experimentální struktury, které obsahují i konkrétní ligand. Příkladem může být předchozí obrázek, kde je ve struktuře trombinu navázána látka NAPAP.



Obrázek 4 Ukázka elektronové hustoty. Při určování struktury pomocí rentgenové krystalografie zjistíme nejprve mapu elektronové hustoty, do které poté umístíme jednotlivé části makromolekuly.

¹³[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90153-X](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(82)90153-X)

¹⁴Více informací na <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1dwd>

¹⁵Tato metoda predikuje 3D strukturu na základě známé struktury podobného proteinu.

Tuto vzájemnou interakci ligandu a receptoru můžeme vyjádřit dvěma způsoby: disociační konstantou komplexu enzym-inhibitor (K_i) a inhibiční konstantou (IC_{50}), což je koncentrace inhibitoru, při které se rychlost enzymatické reakce zpomalí na polovinu.

Molekulové dokování je metoda, která se snaží predikovat vzájemnou konformaci a interakční energii dvou molekul. Pokud si to jednoduše představíme na obrázku 3, kde je zachycena interakce trombinu s NAPAP, při dokování se snažíme dostat stejný "obrázek" a disociační konstantu $K_i = 4 \text{ nM}$ ¹⁶, která odpovídá experimentálnímu zjištění¹⁷.

Princip dokování si můžete představit jednoduše takto: představte si deset různých kousků puzzle, které se snažíte napasovat do posledního prázdného místa na obrázku. Některé puzzle vůbec nepasují (museli bychom je upravit) a některé pasují, ale do obrázku úplně nesedí. Poté, co zkusíte napasovat všechny kousky puzzle, zhodnotíte, jak dobře jeden po druhém zapadly na místo a seřadíte je od nejlepšího po nejhorší. A teď si to představte v trojrozměrném prostoru.

Dokování se skládá ze dvou základních kroků:

- Umístění kousku puzzle do obrázku, resp. prohledání konformačního prostoru ligandu vázaného na cílovou molekulu.
- Ohodnocení jak dobře tam pasuje, resp. ohodnocení neboli skórování vzniklé vazebné interakce. K tomuto účelu se používají tzv. skórovací funkce.

Tyto dva body do sebe velice pěkně zapadají. Abychom mohli najít správnou pozici ligandu, musíme dobře hodnotit jednotlivé uspořádání ligandu a proteinu. Určitým způsobem hledáme vzájemné polohy a každou z nich ohodnotíme a pokud je nová poloha horší než ta předchozí, zahodíme ji, v opačném případě s ní pracujeme. Tímto postupným hledáním najdeme nejlepší uspořádání ligandu a proteinu podle skórovací funkce.

Z chemického hlediska se ligand obvykle váže do vazebného místa slabými interakcemi, takže nedochází ke vzniku kovalentní vazby. Mluvíme o interakci ligandu s receptorem. Tato interakce je zprostředkována následujícími silami a efekty:

- vodíkové můstky
- elektrostatické (van der Waalsovy síly, rozdělujeme coulombické, indukční a disperzní)
- hydrofobní efekt
- solvatační efekt

To, jak dobře se ligand váže do vazebného místa receptoru, je při molekulovém dokování hodnoceno podle vazebné energie komplexu ligand-receptor. Vazebná energie je odhanuta pomocí skórovací funkce a zahrnuje příspěvky různých sil a efektů uvedených výše.

Tady naše povídání ukončíme. V rámci dvou studijních textů, které jsme pro vás připravili, jste měli možnost nahlédnout do minulosti i současnosti objevování léčiv. Doufáme, že vám tyto informace přišly zajímavé a studium vás bavilo.

¹⁶M = mol l⁻¹

¹⁷<http://dx.doi.org/10.1021/jm00049a008>