

Demeter Ádám

Az NMR spektroszkópia alkalmazási lehetőségei a gyógyszertervezésben

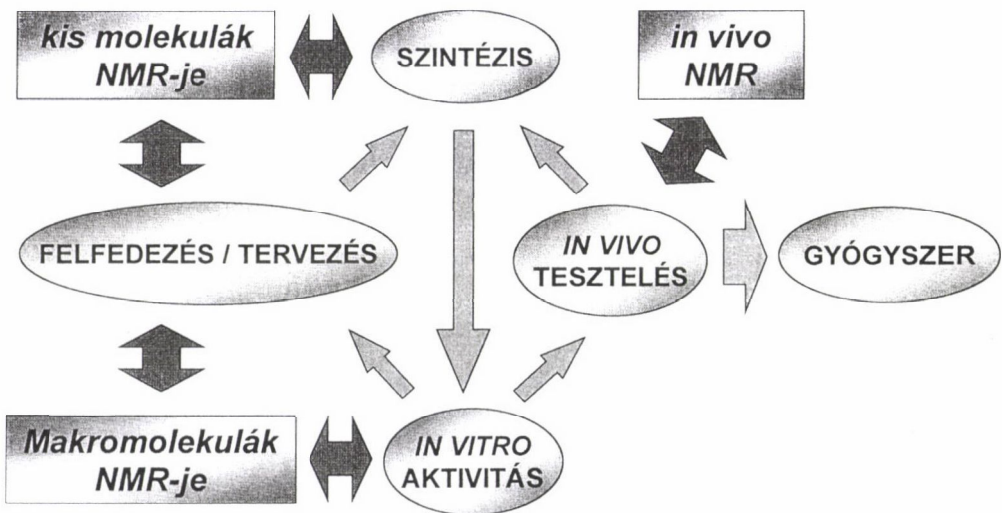
Edward M. Purcell¹ és Felix Bloch² vezette azokat a történelmi jelentőségű kísérleteket 1946-ban, amelyek a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia megszületéséhez vezettek. Az NMR spektroszkópia alig több mint ötvenéves múltja alatt bekövetkezett bámulatos fejlődés egyetlen spektroszkópai technikával sem állítható párhuzamba. Az elmúlt ötven év bebizonyította, hogy az NMR spektroszkópia a molekulák szerkezetének és a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatának rendkívül hatékony és sokoldalúan alkalmazható kutatási eszköze. Folyamatosan bővülő fizikai, kémiai, biológiai és orvosi alkalmazásaival az NMR technika napjainkra önálló, multidiszciplináris tudománnyá vált: számtalan szakkönyv és tudományos folyóirat foglalkozik az NMR elméletével és gyakorlati alkalmazásával; legalább nyolc fizikai és két kémiai Nobel-díjat adományoztak olyan kutatóknak, akik munkája különböző mértékben kapcsolódik a mágneses magrezonancia jelenségéhez.³

Az NMR spektroszkópia már hosszú ideje a gyógyszeripari kutatások egyik kiemelten fontos eszköze. Történelmi okokból fakadóan elsődleges szerepe a kémiailag szintetizált kis szerves vegyületek, vagy különféle természetes forrásokból izolált molekulák, metabolitok azonosítása és szerkezetének jellemzése. Az NMR hagyományos gyógyszeripari alkalmazása elsősorban a szintetikus kémiai kutatómunkát, valamint a szennyezésprofil vizsgálatokat és a metabolitkutatást támogatja. Az elmúlt néhány évtizedben végbement forradalmi, technológiai és módszertani fejlődésnek köszönhetően az NMR spektroszkópia gyógyszeripari alkalmazási köre jelentősen kibővült. Egyre több olyan külföldi gyógyszeripari példáról olvashatunk, ahol az NMR spektroszkópiát más gyógyszertervezési eszközökkel karöltve sikeresen alkalmazzák egy racionálisabb gyógyszerfejlesztés folyamatában. Az NMR spektroszkópiával meghatározható szerkezeti, dinamikai és egyéb kémiai-biológiai szempontból hasznos információk, a szerkezet-hatás összefüggés megértését elősegítve, jelentős hatást gyakorolhatnak a gyógyszerkutatás-fejlesztés irányára. A jelen összefoglaló tanulmány kitékintést kívánt nyújtani azokra az NMR spektroszkópiában rejlő potenciális lehetőségekre és módszerekre, melyek elsősorban gyógyszertervezési szempontból a hazai gyógyszerkutatásban meghonosításra érdemesek. A jelen közlemény alapjául külföldi összefoglaló tanulmányok szolgáltak.⁴

NMR a gyógyszerkutatásban

A 20. század végét jellemző, egyre gyorsuló tudományos és technikai fejlődésnek köszönhetően a gyógyszeripari kutatás és fejlesztés (K+F) alapvető stratégiai változások ment keresztül. A multinacionális gyógyszervállalatok átalakult K+F stratégiája egyértelműen kijelöli a 21. század gyógyszerkutatásának irányát. Ezt az utat olyan technológiák kifejlődése és térhódítása fémjelzi, mint például a kombinatorikus kémia, a nagy áteresztőképességű *in vitro* biológiai tesztelés (HTS, High-Throughput Screening), és a racionális gyógyszertervezés. Az új technológiák és kutatási stratégiák meghonosítására, anyagi kereteik között, a hazai gyógyszergyárak is törekednek, melynek sikeres példáját mutatja a Chinoin prolin endopeptidáz enzim inhibitorok fejlesztése a racionális gyógyszertervezés eszköztárának felhasználásával.⁵

Ahhoz, hogy az NMR nyújtotta lehetőségeket el tudjuk helyezni az új típusú gyógyszerkutatási stratégiákban, vázlatosan át kell tekintenünk a gyógyszerfejlesztési folyamatot. Az 1. ábra a korszerű gyógyszerfejlesztés-tervezés ciklikus folyamatának egy nagyon leegyszerűsített sémáját, valamint azokat a kapcsolódási pontokat mutatja, ahol az NMR potenciálisan hasznos információkat képes szolgáltatni.



1. ábra Az NMR spektroszkópia kapcsolódása a gyógyszerfejlesztés folyamatához

A korszerű gyógyszerkutatás felfedező szakaszában a „minél többet, minél gyorsabban” elvét alkalmazzuk: Lehetőleg kombinatorikus kémiai szintézisekkel létrehozott vegyülettárból *in vitro* HTS teszteken kiválasztjuk azokat a célzott biológiai hatású vezérmolekulákat, amelyek a gyógyszerfejlesztés kiindulópontjául szolgálnak. A gyógyszerkutatás következő tervezési fázisában a „minél jobbat, minél okosabban” elve érvényesül: A szerkezet-hatás összefüggés felderítésén keresztül, számítógépes molekulatervezés segítségével, a vezérvegyületek szerkezeti, fizikai-kémiai paramétereinek finom változtatásával, optimalizálásával jutunk el egy olyan ígéretes gyógyszerjelöltig, amely már részletes *in vivo* tesztre kerülhet, és gyógyszerre fejleszhető. A kombinatorikus kémia és a HTS lehetővé teszik a gyógyszerfejlesztés kezdeti szakaszának felgyorsítását, míg a számítógépes molekulatervezés eszközei a szerkezet-hatás összefüggés megértését mozdítják elő. Az 1. ábra azt illusztrálja, hogy az NMR a gyógyszerfejlesztés kezdeti felfedezési, és azt követő terve-

zési stádiumában, valamint az *in vivo* tesztelés fázisában is képes integráltan részt venni, és hasznos információkkal szolgálni.

A gyógyszerfejlesztési folyamat szempontjából alapvetően az NMR kísérletek három csoportját lehet megkülönböztetni:

- A kis molekulák NMR-je általában a gyógyszeriparban tipikusan előforduló kisebb molekulatömegű (molekulatömeg ≤ 1 kDa) szerves vegyületek szerkezetvizsgálatát jelenti. Ez tehát az NMR hagyományos gyógyszeripari alkalmazási területe, mely elsősorban a szintetikus kémiai munkát támogatja a K+F különböző stádiumaiban, de egyre nagyobb szerepet kap a minőségbiztosításban is.
- A makromolekuláris NMR lehetővé teszi biopolimerek elsősorban fehérjék és nukleinsavak, illetve ezek egymással és kisebb szerves és szervetlen vegyületekkel alkotott komplexek vizsgálatát. A makromolekuláris NMR-vel meghatározható információk a felfedezési stádiumban az *in vitro* tesztelést, míg a tervezési fázisban a szerkezet-hatás összefüggés megértését mozdítják elő.
- Az *in vivo* NMR lehetőséget teremt a gyógyszerjelölt hatásának *in vivo* vizsgálatára szöveteken, célszerveken, élő állatokon és emberen, ami a metabolitkutatásban, illetve a gyógyszerfejlesztés végső klinikai stádiumaiban szolgál hasznos információkkal.

Az összefoglaló tanulmány fókuszpontjában a gyógyszertervezési szempontból legfontosabb makromolekuláris NMR módszerei állnak. Ez a terület a hazai NMR műszerparkkal és műszertехnikai háttérrel elérhető, illetve a jövőben egyre inkább elérhetővé válik. Az NMR hagyományos, analitikai jellegű gyógyszeripari alkalmazásait (kis molekulák szerkezetvizsgálata) nem tárgyaljuk. A rendkívül dinamikus fejlődő *in vivo* NMR gyógyszerfejlesztési vonatkozásait csak röviden érintjük.

Receptor alapú gyógyszertervezés

A makromolekuláris NMR-vel meghatározható információk hatékonyan alkalmazhatók a gyógyszerkutatási stratégiákban egyre fontosabb szerephez jutó ún. szerkezet-, vagy receptor alapú gyógyszertervezésben, aminek elvét a 2. ábra mutatja.

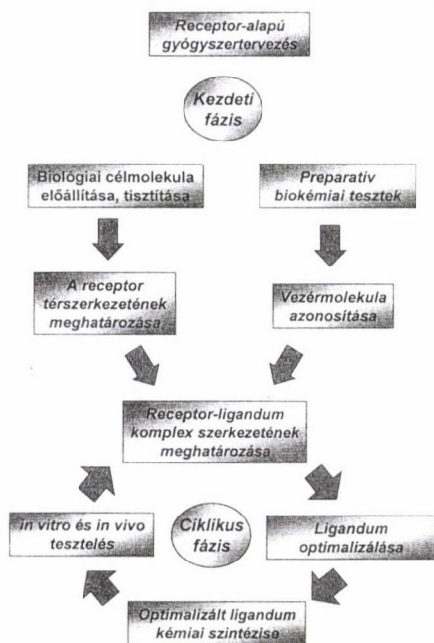
A receptor alapú gyógyszertervezés kiindulópontja a biológiai célmolekula (fehérje, nukleinsav) azonosítása, előállítása és tisztítása szerkezetkutatási célokra. Amennyiben a biológiai célmolekulát sikerül NMR spektroszkópiai vagy röntgenkristallográfiai vizsgálatokra alkalmas formában előállítani, és térszerkezetét meghatározni, úgy lehetővé válik a vezérmolekulák szerkezet-, vagy receptor alapú optimalizálása. Ennek során meghatározzuk a preparatív biokémiai tesztek alapján kiválasztott vezérmolekula receptorral alkotott komplexének térszerkezetét. A receptor és a ligandum bioaktív konformációjának ismeretében, a molekuláris felismerésért felelős kölcsönhatások megértésével lehetőség nyílik a ligandum szerkezet alapú optimalizálására, olyan analógok tervezésére, amelyek várhatóan nagyobb affinitásúak. Az optimalizált ligandumot szintetikusan előállítjuk, majd biológiai tesztek után a ciklust addig folytatjuk, míg további affinitásnövekedést már nem tudunk elérni.

A makromolekuláris NMR a receptor alapú gyógyszertervezés folyamatába három ponton képes aktívan bekapcsolódni:

- egyik kapcsolódási pont a szabad biológiai célmolekula térszerkezetének meghatározása,
- a második pont a receptor-ligandum komplex szerkezeti és egyéb vizsgálata,
- a harmadik kapcsolódási pont a vezérmolekulák azonosítása.

A továbbiakban a biológiai szempontból talán legfontosabb célmolekulák, a fehérjék, illetve fehérje-ligandum komplexek vizsgálatára fogunk szorítkozni.

Makromolekuláris NMR



2. ábra Receptor alapú gyógyszertervezési ciklus

illetve ezeket felhasználva, a makromolekula, illetve a makromolekula-ligandum komplex térszerkezetének atomi szintű leírását, számítását (szerkezetszámítás).

A három technológia együttesen képes arra, hogy oldatfázisban a fehérjék háromdimenziós térszerkezetét meghatározza kb. 10 kDa molekulatömegig izotópjelzés nélkül, 10–15 kDa között minimum ^{15}N izotópjelzést alkalmazva, 15 kDa fölött ^{13}C és ^{15}N izotópjelzéssel (25–30 kDa környékén már deutérium jelzés is szükséges). Az elmúlt egy-két évben kezdenek kifejlődni azok a technikák, amelyek a proteinek szerkezetmeghatározásának felső határát kb. 100 kDa molekulatömegig képesek felvinni.⁶ Napjainkra az NMR spektroszkópia a röntgenkristallográfiával összemérhető felbontással képes a biopolimerek térszerkezetének atomi szintű leírására. (A makromolekulák szilárd fázisban történő vizsgálatának metodikai fejlesztése jelentős erővel folyik, és nagy fejlődés előtt áll különösképpen a membrán proteinek tekintetében.)

A makromolekuláris NMR-vel kapcsolatban meg kell említeni gyógyszeripari szempontból alapvetően fontos két tényezőt: a vizsgálatok költség és idő vonzatát. A fehérjék géntechnológia úton történő előállítása fejlett biotechnológiai háttérrel igényel. A szerkezetkutatásra alkalmas fehérje előállítása, a megfelelő expressziós rendszer kifejlesztése és az izotópjelzés költséges művelet. Egy NMR mérésre alkalmas, izotópjelzéssel ellátott minta előállítási költségét 1000 USD-ben mérjük. Ezt a mintát egy dedikált kutatócsoport ki-mondottan erre a célra fenntartott készüléken, melynek értéke felszereltségtől függően több 100 mFt, több hónapig méri folyamatosan. A szerkezetvizsgálat NMR-es alapfeltétele a korszerű NMR-es műszertechnika és mérés technika. Ez minimum 500 MHz-es többszatomnás készülék, a megfelelő izotópok (^1H , ^2H , ^{13}C , ^{15}N) mérésre alkalmas mérőfejek,

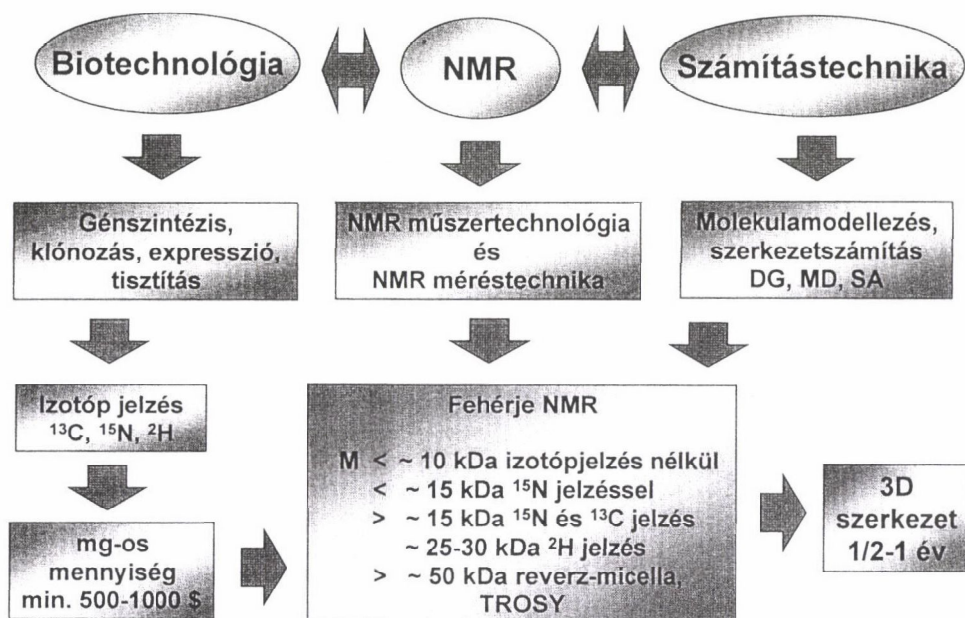
Mindenekelőtt tekintsük át azokat az erőforrásokat, amelyek megléte a makromolekuláris NMR művelésének alapfeltétele (3. ábra).

A makromolekuláris (fehérje) NMR alapvetően három terület szimbiózisán alapszik:

a) Az egyik terület a *biotechnológia*, ami lehetővé teszi fehérjék nagy mennyiségű előállítását (génszintézis, mutáció, klónozás, expresszió), tisztítását, szelektív, vagy teljes izotópjelzését (^{13}C , ^{15}N , ^2H) NMR szerkezetkutatási célokra.

b) Az *NMR spektroszkópia*, amely képes makromolekulák szerkezeti és dinamikai paramétereinek meghatározására. (A fehérjék térszerkezetének NMR-vel történő meghatározása nagyszámú, atomok közötti távolságok és torziós szögek meghatározásán alapszik. Ezeket az atomi távolság és torziós szög adatokat a fehérjeszerkezet számításakor, mint a fehérje szerkezetét definiáló ún. kényszerfeltételeket használjuk.)

c) Harmadrészt a *számítástechnika*, ezen belül olyan spektrális adatfeldolgozási és molekulamodellelési módszerek, amelyek lehetővé teszik az NMR-vel kísérletileg meghatározott spektrumokból molekulászerkezeti információk meghatározását,



3. ábra Fehérjék NMR-rel történő meghatározásának feltételei

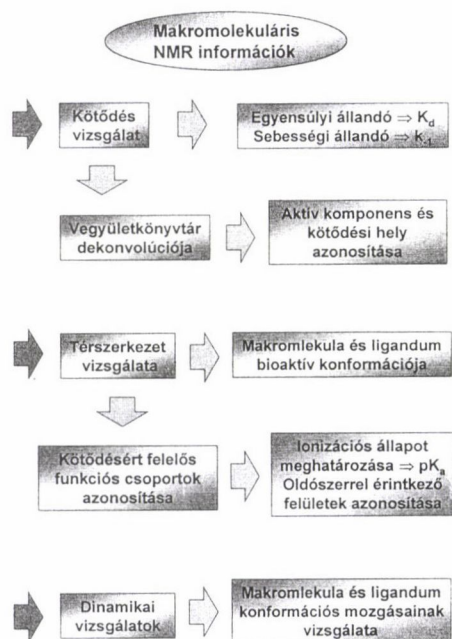
gradiens egység, hullámforma generátor stb. meglétét, másrészt naprakész, az adott egyedi készülékre adaptált méréstechnikát, speciális pulzusszekvenciák implementálását jelenti. Ezen erőforrások megléte esetén ideális esetben a vizsgált fehérje térszerkezetét, a fehérje méretétől, tulajdonságaitól függően szerencsés esetben fél, de inkább minimum egy év alatt lehet meghatározni. A szerkezetszámításhoz szintén több tízmillió Ft nagyságrendű szakértői szoftverre és hardverre (adatfeldolgozás + molekulamodellezés, munkaállomás) van szükség. Ezek az adatok és tények látszólag nehezen egyeztethetőek össze a gyógyszeripari kutatást meghatározó időbeli és finansziális határokkal. Mégis a jelentősebb külföldi gyógyszeripari vállalatok saját makromolekuláris NMR apparátust működtetnek. A makromolekuláris NMR ugyanis nem csak néhány akadémiai intézetben művelt alapkutatói tevékenység, hanem napjainkra már bevett protokollok alapján működő, „rutin” eljárásá vált, amely, mint technológia know-how, a jelentősebb külföldi gyógyszeripari K+F tevékenységének szerves részét képezi.

Egyre inkább érvényesül az a tendencia, hogy a gyógyszeripari kutatások ismert szerkezetű biológia célmolekulákhoz köthető hatásmechanizmusokat céloznak meg. Nyilvánvalóan egy új, addig ismeretlen biológiai célmolekula izolálása és szerkezetmeghatározása, a szerkezet-hatás összefüggés és hatásmechanizmus megállapítása jeleto elnyökkel jár az originális gyógyszerkutatásban. A makromolekuláris NMR laboratóriumok azonban csak részben foglalkoznak új biológiai célmolekulák szerkezetmeghatározásával. Gyógyszerkutatási szempontból legalább ennyire, vagy még inkább fontos a már akadémiai kutatásból, vagy más egyéb forrásból ismert térszerkezetű biopolimerekhez történő ligandumkötődés vizsgálata. Protein és NMR adatbankokban számos receptor szerkezeti és NMR paraméterei hozzáférhetőek, mely a ligandumkötődés vizsgálatok kiindulási pontjául szolgálhatnak.

Hazai viszonylatban ezeknek az erőforrásoknak egy része rendelkezésre áll. Például a Richter Gedeon Rt.-ben üzemelő Varian gyártmányú, 500 MHz-es NMR műszer már jelenlegi felszereltsége mellett is képes izotóp által jelzett fehérjék mérésére, továbbá az NMR mérések kiértékelését, és a szerkezetszámítást lehetővé tevő mindkét vezető molekulamodellő és NMR spektrumértékelő szoftvercsomag (MSI, TRIPOS) megtalálható. Az irodalomból ismert fehérjék expressziójára kifejlesztett törzsek megvásárolhatóak, új törzsek kifejlesztése pedig célszerűen külső kutatás keretében finanszírozható lehet. Így gyakorlatilag csak fermentációra és fehérje tisztítására van szükség, ami már gyógyszergyári apparátussal is megoldható.

Makromolekuláris NMR információk

A 4. ábra azokat a gyógyszertervezési szempontból legfontosabb információkat és alkalmazási lehetőségeket foglalja össze, melyeket a makromolekuláris NMR módszerei nyújtanak.



4. ábra A makromolekuláris NMR-rel meghatározható főbb információk

és a disszociáció sebességének meghatározását, amiből a kötődés erősségére, a makromolekula-ligandum komplex stabilitására következtethetünk. Ezek a kvantitatív információk felhasználhatóak pl. QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) számításoknál. A disszociációs állandó meghatározására protokollok léteznek, amelyek szerint a ligandum koncentrációjának függvényében felvett titrálási görbék analizálásával határozzák meg a K_d értéket, legáltalánosabban a kémiai eltolódás és jelszélesség változását figyelve.⁷

A kombinatorikus kémia és HTS technológiájával kapcsolatban felmerülő nagyon izgalmas és rendkívül aktuális kérdés a vegyülettárak, keverékek „dekonvolúciója”. A gyógy-

A kötődés tényének igazolására bármilyen NMR-vel mérhető molekuláris paraméter, pl. kémiai eltolódás, jelszélesség, T_1 és T_2 relaxációs idő, nukleáris Overhauser-effektus (NOE), diffúziós állandó stb. megváltozása szolgálhat. Amikor a kis molekulatömegű ligandum hozzákötődik a nagy molsúlyú makromolekulához, akkor azok a fizikai paraméterek fogják jellemezni, mint a makromolekulát, ezért a jelszélesség megnő, a T_2 relaxációs idő lecsökken, a NOE effektus előjelet vált ($+ \rightarrow -$), a diffúziós állandó lecsökken. Attól függően, hogy a ligandum kis affinitással ($K_d > 10^{-5}$), vagy nagy affinitással ($K_d < 10^{-8}$) kötődik a fehérjéhez, eltérő képet kapunk az NMR spektrumban, ezért eltérő stratégiát kell alkalmazni a kötődés vizsgálatánál. Kis affinitású ligandumok esetében a szabad és kötött forma (az NMR mérés ideje alatt) gyorsan egymásba alakul, így az NMR spektrumban a két állapot átlagát mutató jelet detektálunk, míg nagy affinitás esetében a két forma jelei elkülönülnek.

Kötődésvizsgálatok lehetővé teszik a makromolekula-ligandum komplex disszociációs egyensúlyi állandójának

szerkutatás felfedező szakaszában a „minél többet, minél gyorsabban” elve szerint a vezérmolekulák kiválasztására egy HTS teszten egyszerre több komponens keverékét is vizsgálhatjuk (pl. kombinatorikus kémiai keverék szintézissel létrehozott vegyülettárat). Amennyiben a HTS teszt pozitív választ ad, alapvető kérdést jelent hogyan határozzuk meg, hogy a vizsgált keverék melyik komponense felelős a hatásért. Előfordulhat, hogy a HTS-en kapott pozitív válasz, tulajdonképpen fals pozitív, ami a komponenskeverék egészétől származik. A keveréket alkotó komponenseket külön-külön vizsgálva az aktivitás elvész.

Több NMR-es technika is létezik, amely lehetővé teszi keverékekből az aktív komponens kiszűrését, szerkezetének azonosítását anélkül, hogy a keveréket fizikailag komponenseire kellene szétválasztanunk, ami jelentős időmegtakarítást jelent. Ezek a módszerek kis affinitású ligandumok esetében alkalmazhatóak, tehát kimondottan a vezérvagyületek azonosítására alkalmasak. Az affinitás alapján történő szűrésre a relaxációs idők és a diffúziós állandó, és a NOE előjelének megváltozását használják.⁸ Az Abott cég például eljárás-szabadalommal védi az általuk kifejlesztett NMR-es technikát.⁹ Ezek a módszerek a feleslegben lévő ligandumok jeleit, illetve azok változását mérik, tehát nem igényelnek költséges izotóp jelzett fehérjét.

Alapvetően fontos kérdés a kötődés helyének meghatározása, hiszen erre a HTS általában nem ad választ. Az NMR viszonylag gyors és hatékony módszert nyújt ennek a kérdésnek a megválaszolására. A fehérjék amid jeleinek kémiai eltolódása nagyon érzékeny indikátora a kötődésnek. A ligandumkötődés hatására a kötődés lokális környezetében lévő amid jelek kémiai eltolódása megváltozik, ami a fehérje szerkezetének és a spektrum asszignációjának ismeretében közvetlen információt ad a kötődés helyéről. Ennek az effektusnak a mérésére szolgál egy igen érzékeny és gyors mérés az ún. kétdimenziós ¹H-¹⁵N HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) kísérlet, amely, ¹⁵N jelzett fehérjék amid jeleinek vizsgálatát teszi lehetővé. A receptor kötőhelyének feltérképezésére ugyancsak felhasználható az amid hidrogén-deutérium kicserélődés sebességének megváltozása.

A másik izgalmas témakör a térszerkezet vizsgálata, ami egyrészt a makromolekula és ligandum bioaktív konformációjának meghatározását, a kötődésért felelős funkciók csoportok azonosítását, az egyes csoportok ionizációs állapotának vizsgálatát, valamint a vegyület oldószerrel érintkező felületének meghatározását jelenti. A szerkezet-hatás összefüggés analízise során ezek az információk rendkívüli értéket képviselnek, és nagymértékben elősegíthetik a molekuláris hasonlóságon alapuló analógok megtervezését.

A ligandum bioaktív konformációját, kis affinitású ligandumnál ún. NOE transzfer vizsgálatokkal állapíthatjuk meg,¹⁰ míg nagy affinitású ligandumok esetében ún. izotóp szerkesztett és izotóp szűrt méréseket¹¹ használhatunk a ligandum és receptor jeleinek megkülönböztetésére és a konformáció vizsgálatára.

A fehérje és ligandum egyes funkciók csoportjainak ionizációs állapota fontos információ lehet az enzim mechanizmus és a molekuláris felismerés megértésében. A pKa érték, a tautomer formák meghatározása jó példája annak, hogyan egészítheti ki és bővítheti az NMR a pusztán geometriai információkat.

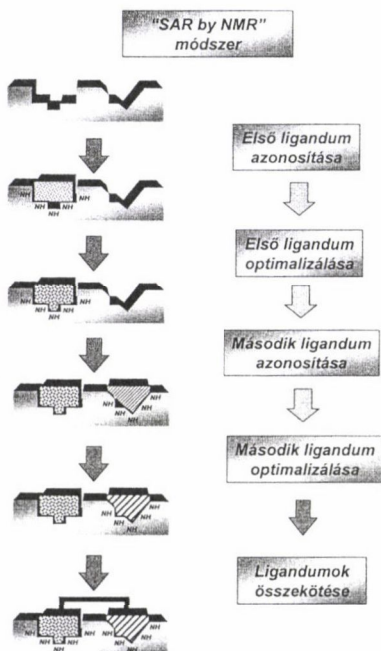
Gyógyszertervezési szempontból hasznos megkülönböztetni a vezérmolekula oldószerrel érintkező felületét, mely vélhetően kevésbé fontos szerepet játszik a receptor felismerésben, és azokat a régiókat, amelyek a receptor affinitásért és specifitásért felelősek. Az oldószerrel érintkező felületeken olyan kémiai módosításokat hajthatunk végre, amelyek a gyógyszerjelölt oldhatóságát, biológiai hasznosíthatóságát, farmakokinetikáját és toxicitási tulajdonságait javíthatják. Az oldószerrel érintkező, illetve kötésben részt vevő felületek megállapítására relaxációs reagenseket (pl. HyTEMPO) használhatunk.

A harmadik témakör a dinamikai vizsgálatok. Ez az a pont, ahol az NMR a röntgenkristallográfia pusztán szerkezeti információján alapvetően túlmutat. Az oldatfázisban megvalósuló különböző szintű molekuláris mozgások felderítése fontos szerepet játszhat a molekuláris felismerésért felelős folyamatok megértésében. Ilyen mozgások például a proteinek gerinckonformációjának vagy oldalláncok konformációjának dinamikája. Ligandumok esetében többszörös kötődési módok meghatározása, annak dinamikája válik

vizsgálhatóvá. Ezeknek a molekuláris mozgásoknak a megváltozása a kötődés hatására fontos szerkezet-hatás információval bír. Ugyancsak vizsgálható a fehérjék hidratálódása, a fehérje harmadlagos szerkezetét stabilizáló ún. szerkezeti víz dinamikai sajátságai.¹²

SAR by NMR módszer

Végezetül külön említését érdemel egy rendkívül ígéretes gyógyszertervezési stratégia, amelyet az Abbott cég fejlesztett ki és szabadalmaztatott.¹³ A módszer elvét sematikusán az 5. ábra mutatja.



5. ábra NMR alapú szerkezet-hatás összefüggés (SAR by NMR)

plantációk során az immunválasz elnyomásában fontos szerepet játszó FKBP (FK506 kötő protein) protein esetében egy $K_d = 2 \mu\text{M}$ és egy $K_d = 0,1 \text{ mM}$ affinitású fragmens összekötésével $K_d = 19 \text{ nM}$ affinitást tudtak elérni.¹⁴ Hasonlóképpen, Stromelysin esetében egy $K_d = 17 \text{ mM}$ és egy $K_d = 0,02 \text{ mM}$ affinitású fragmensből egy $K_d = 15 \text{ nM}$ affinitású vegyületet terveztek kevesebb, mint hat hónap alatt.¹⁵

In vivo NMR

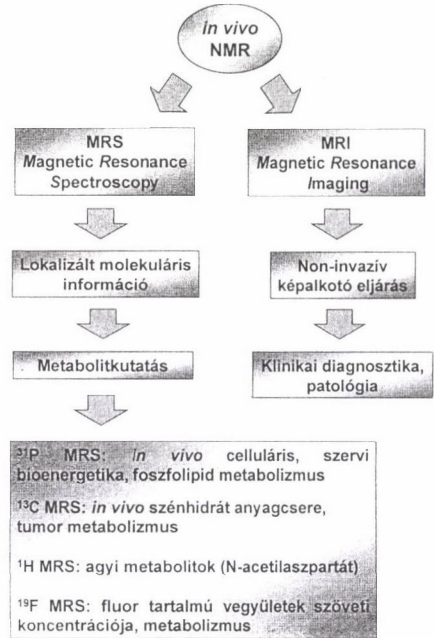
Az *in vivo* NMR-nek két fő irányvonala rajzolódik ki (6. ábra).

Az egyik irányvonal rövidítése MRI (Magnetic Resonance Imaging). Az MRI olyan non-invazív képalkotó eljárás, ami forradalmasította a klinikai diagnosztikát és a patológiát. Az MRI alkalmas élő szervezetek tetszőleges irányú metszetéről rétegfelvételt készíteni, mely a legkülönbözőbb morfológiai jellegű elváltozások (infarktus, daganat, fejlődési rendellenes-

A szerkezet-hatás összefüggés NMR-re alapozott vizsgálata elegáns módon ötvözi a racionális tervezés és a kombinatorikus kémia elemeit. A már említett ^1H - ^{15}N HSQC kísérlet segítségével, az amid jelek kötődés hatására történő megváltozását figyelve vizsgálnak egyszerre 10–20 kis molekulából álló keveréket. Ezzel a módszerrel, mérésidőt tekintve, egy nap kb. 1000 molekula tesztelhető. Miután azonosították, hogy a keverék melyik komponense kötődik a fehérjéhez, meghatározzák K_d értékét. Majd, hogy affinitásnövekedést érjenek el, a vezérmolekulához hasonló szerkezetű analógokat vizsgálnak. Ezután az optimalizált első ligandum jelenlétében további ligandumokat keresnek NMR-vel, amelyek az első ligandum kötődési helye közelében kötődnek. A második ligandumot is optimalizálják, majd a két ún. vezérfragmens kiválasztása után, röntgenkristallográfia vagy NMR spektroszkópia segítségével meghatározzák a vezérfragmens helyét és orientációját a fehérje-ligandum harmadlagos komplexben. A két vezérfragmens egymáshoz és a fehérjéhez viszonyított orientációjának ismeretében olyan molekulát terveznek, amelyben a két vezérfragmenst megfelelő kémiai lánc köti össze. Az így kapott molekula kötődést tekintve bifunkcióssá válik, ami jelentős affinitásnövekedést eredményez. Például a szervtransz-

ség stb.) kimutatására használható. Gyógyszerkutatósi szempontból az MRI különféle betegségek vizsgálatában, diagnosztikájában alkalmazható állatmodelleken vagy emberen, elősegítve új gyógyszervegyületek hatékonyságának klinikai jellemzését.

A másik irányvonal neve MRS (Magnetic Resonance Spectroscopy), ami egy adott szövet vagy szerv lokalizált térfogatelemében képes molekuláris információt, vagyis spektromot nyújtani (természetesen kisebb felbontással, mint a folyadékfázisú, nagyfelbontású NMR készülékek). Az MRS gyógyszerkutatósi alkalmazása leginkább a metabolitkutatóban (metabolitok alatt tágabb értelemben a szervezet endogén anyagait értve, pl. ATP, ADP, kreatin-foszfát, N-acetilszpartát stb.), azon keresztül a betegségek patomechanizmusának molekuláris szintű felderítésében nyilvánul meg. A 6. ábra alsó része néhány elterjedt alkalmazást mutat.



6. ábra **Az NMR *in vivo* alkalmazásai**

Összefoglalás

A szakirodalomban fellelhető adatok tanúbizonysága szerint az NMR spektroszkópia folyamatosan bővülő eszköztárával a modern gyógyszerkutatósi stratégiák egyik fontos pillérét képezi. Az NMR alkalmazási köre kiterjed a gyógyszerfejlesztés korai (vezérmolekulák azonosítása és optimalizálása) és késői (metabolizmus, klinikai jellemzés) szakaszára is. A molekuláris felismerésért felelős receptor-ligandum kölcsönhatások atomi szintű vizsgálatán keresztül kiemelkedően fontos információkat nyújt a szerkezet-hatás összefüggés felderítéséhez és az új terápiás készítmények kifejlesztésében egyre sikeresebben alkalmazott szerkezet-, vagy receptor alapú gyógyszertervezéshez. A hazai gyógyszerkutatósi tekintetében a makromolekuláris NMR spektroszkópia meghonosítása és integrálása a kombinatorikus kémia, a HTS és a racionális gyógyszertervezés eszközeivel, a külföldi példák szerint célszerűnek látszik. A rendelkezésre álló hazai erőforrások alapján a makromolekuláris NMR meghonosítása leginkább (legkisebb költséggel, leggyorsabban) kötődésvizsgálatokban (pl. vezérmolekulák azonosítása) kezdődhet el.

Köszönetnyilvánítás. Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak: *ifj. Szántay Csabának, Balogh Gábornak, Tárkányi Gábornak, Fűrjes Attilának* a tanulmány megírásában nyújtott közreműködésükért, hasznos észrevételeikért és támogatásukért.

HIVATKOZÁSOK:

1. E. M. Purcell, H. G. Torrey, R. V. Pound, Phys. Rev., 69, 37 (1946).
2. a) F. Bloch, W. Hansen, M. E. Packard, Phys. Rev., 69, 127 (1946); b) F. Bloch, Phys. Rev., 70, 460 (1946).
3. I. I. Rabi (1944, fizika), E. M. Purcell (1952, fizika), F. Bloch (1952, fizika), A. Kastler (1966, fizika), J. H. Van Vleck (1977, fizika), N. Bloembergen (1981, fizika), K. A. Müller

(1987, fizika), *N. F. Ramsey* (1989, fizika), *H. G. Dehmelt* (1989, fizika), *R. R. Ernst* (1991, kémia), *J. Pople* (1998, kémia).

4. a) NMR in drug design, Ed. *D. J. Craik*, CRC Press, New York (1996); b) NMR methods for elucidating macromolecule-ligand interactions: an approach to drug design, Eds. *R. E. Handschumacher*, *I. M. Armitage*, Proceedings of the fourth biochemical pharmacology symposium, New Haven, CT, July (1989); c) *B. J. Stockman*: NMR spectroscopy as a tool for structure-based drug design, *Prog. NMR Spectr.*, 33, 109–151 (1998); d) *M. Billeter*: NMR for structural studies in drug discovery, 3, 151–167 (1995); e) *S. W. Fesik*: NMR structure-based drug design, *J. Biomol. NMR*, 3, 261–269 (1993); f) *S. W. Fesik*: NMR studies of molecular complexes as a tool in drug design, *J. Med. Chem.*, 34, 2937–2945 (1991).

5. *Hermecz István, Kánai Károly, Arányi Péter*: Gyógyszerkutatók a Chinoinban, Magyar Tudomány, 1998. 9. sz.

6. a) *K. Pervushin, R. Ruek, G. Wider, K. Wütrich*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12366–12371 (1997); b) *K. Pervushin, R. Ruek, G. Wider, K. Wütrich*, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 6394–6400 (1998).

7. NMR of Macromolecules, Chapter 6, The Practical Approach Series, ed. *G. C. K. Roberts*, Oxford University Press (1993).

8. a) *H. Ponstingl, G. Otting, J. Biomol. NMR*, 9, 441–444 (1997); b) *P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, J. Am. Chem. Soc.*, 119, 12257–12261 (1997); c) *M. Lin, J. Shapiro, J. R. Wareing, J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5249–5250 (1997); d) *B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, Eur. J. Biochem*, 246, 705–709 (1997); e) *N. Gonnella, M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, X. Zhang, J. Magn. Reson.*, 131, 336–338 (1998).

9. *S. W. Fesik, P. J. Hajduk, E. Olejniczak*, WO 98/48264.

10. a) *G. M. Clore, A. M. Gronenborn, J. Magn. Reson.*, 48, 402–417 (1982); b) *A. M. Gronenborn, G. M. Clore, Biochem. Pharmacol.*, 40(1), 115–119, (1990).

11. a) *G. Otting, H. Senn, G. Wagner, K. Wüthrich, J. Magn. Reson.*, 70, 500–515 (1986); b) *S. W. Fesik, E. R. P. Zuiderweg, E. T. Olejniczak, R. T. Gampe, Biochem. Pharmacol.*, 40(1), 161–168, (1990).

12. *G. Wider, Progress in NMR Spectroscopy*, 32, 193–275 (1998).

13. a) *S. W. Fesik, P. J. Hajduk, E. Olejniczak*, WO 97/18469; b) *P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, Science*, 278, 497–499 (1997 October); c) *S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, Science*, 274, 1531–1534 (1996 November)

14. *S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, Science*, 274, 1531–1534 (1996 November).

15. a) *P. J. Hajduk et. al, J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5818–5827 (1997); b) *E. T. Olejniczak et. al., J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5828–5832 (1997).