

INHIBÍTORY ENZÝMU KONVERTUJÚCEHO ANGIOTENZÍN

ŠRAMKO M., REMKO M.

Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej chémie, Slovenská republika

SÚHRN

Inhibítory enzýmu konvertujúceho angiotenzín

Enzým konvertujúci angiotenzín (ACE) je zinková metalopeptidáza, ktorá svojou proteolytickou aktivitou má dôležitú úlohu v regulácii niektorých významných vazoaktívnych peptidov. Účinné inhibítory ACE boli až doneďdávna projektované bez znalosti priestorovej (3D) štruktúry tohto enzýmu. V klinickej praxi je viac ako 15 dostupných účinných inhibítorov ACE, pričom všetky nešpecificky inhibujú obidve aktívne domény enzýmu. Vazopeptidázové inhibítory sú duálne inhibítory ACE a neutrálnej endopeptidázy (NEP). Súčasne inhibujú katalytickú funkciu dvoch enzýmov a v súčasnosti sú predmetom klinických skúšok, ktoré poukazujú na ich lepšiu účinnosť v liečbe hypertenzie a kardiovaskulárnych ochorení, ale zároveň vyššie riziko vedľajších nežiadúcich účinkov v porovnaní s inhibítormi ACE.

K l ú č o v é s l o v á: inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu – RAAS – neutrálna endopeptidáza – vazopeptidázové inhibítory

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 160–167

SUMMARY

Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors

Angiotensin converting enzyme (ACE) is a zinc metalloproteinase which plays a key role in the regulation of important vasoactive peptides through its proteolytic activity. Effective inhibitors of ACE were until recently designed in the absence of the solved 3D structure of this enzyme. About 15 ACE inhibitors are currently commercially available, all of which nonspecifically inhibit both active domains of ACE. Vasopeptidase inhibitors are mixed inhibitors of ACE and neutral endopeptidase (NEP). They contemporarily inhibit the catalytic function of two enzymes and currently are undergoing clinical trials exhibiting better efficacy in the treatment of hypertension and cardiovascular diseases, but in the same time higher risk of adverse side effects compared to ACE inhibitors.

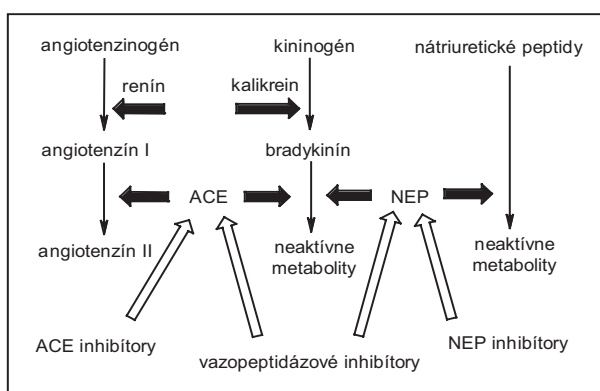
K e y w o r d s: angiotensin converting enzyme inhibitors – RAAS – neutral endopeptidase – vasopeptidase inhibitors

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 160–167

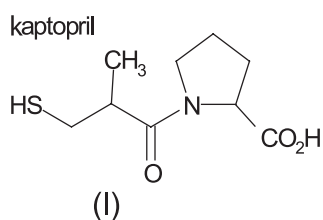
Má

Kardiovaskulárne ochorenia sú najčastejším dôvodom úmrtí vo vyspelých krajinách. Mnohé letálne kardiovaskulárne príhody sú dôsledkom práve neschopnosti znížiť krvný tlak u hypertenzných pacientov. Preto efektívna regulácia hypertenzie je stále dôležitou oblasťou výskumu. Renín-angiotenzín-aldosterónový systém (RAAS) spolu s určitými metalopeptidázami má významnú úlohu v metabolizme kľúčových peptidových hormónov pre moduláciu krvného tlaku. Enzým konvertujúci angiotenzín (ACE) a neutrálna endopeptidáza (NEP) sú zinkové metalopeptidázy. Obidve patria do skupiny enzýmov gluzincínov^{1,2)} a zdieľajú spoločné štruktúrne a funkčné vlastnosti (obr. 1). Obidve metabolizujú peptidy ako angiotenzín I a II (AI, AII)³⁾, bradykinín (BK) a atriálny

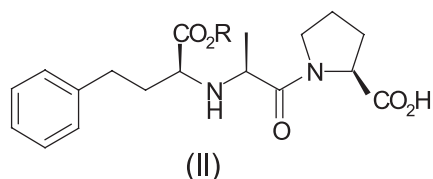
nátriuretický peptid (ANP)^{4,5)}, ktoré sú esenciálne pre arteriálny tlak a reguláciu vodno-elektrolytovej homeostázy. Vývoj inhibítorov týchto gluzincínových enzýmov bol až donedávna založený na štúdiu vzťahov medzi štruktúrou a aktivitou, ktoré vychádzali z modelov aktívnych miest získaných zo štruktúrnych údajov o termolýzine (TLN)^{6,7)}, prototypu gluzincínov, alebo z iných zinkových peptidáz, akou je napríklad karboxypeptidáza A (CPA)⁸⁾. Priestorová štruktúra ACE⁹⁾ a NEP¹⁰⁾ sa na atómovej úrovni určila len nedávno. Okrem natívnych enzýmov sa vyriešila aj priestorová štruktúra niektorých komplexov s vybranými inhibítormi^{9,11)}. Táto skutočnosť poskytuje nové možnosti pre projektovanie a vývoj nových ACE inhibítorov.



Obr. 1. Schéma renínového-angiotenzínového-aldosterónového systému (RAAS) a možnosti jeho farmakologického ovplyvnenia



R= -H enalaprilát
R= -C₂H₅ enalapril



Tab. 1. Nomenklatura vazoaktívnych peptidových substrátov zinkových metalopeptidáz zúčastňujúcich sa na regulácii krvného tlaku

AI	H ₂ N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH
AII	H ₂ N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH
A1-7	H ₂ N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-COOH
BK	H ₂ N-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH
ANP	H ₂ N-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-COOH

Súčasná koncepcia inhibície ACE a NEP spočíva buď na blokovaní funkcie každého enzýmu samostatne, alebo spoločnej inhibície týchto dvoch enzýmov jednou molekulou. Synchronná inhibícia týchto peptidov jednou zlúčeninou spôsobuje vazodilatáciu, ktorá je spojená s redukciou tlaku a zvýšenou nátriúrezou. Spoločný inhibítor je totiž schopný súčasne blokovať tvorbu AII a inaktiváciu BK a ANP. Podľa dlhodobých experimentálnych údajov by duálne ACE/NEP inhibítory mohli byť význam-

ným prínosom pri liečbe ťažkej hypertenzie a chronického srdcového zlyhávania.

Enzým konvertujúci angiotenzín

Enzým konvertujúci angiotenzín (ACE) je integrovaný membránový glykoproteín I typu (EC 3.4.15.1) a je dôležitým komponentom renínového-angiotenzínového-aldosterónového systému RAAS (obr. 1). ACE je metaloproteáza, ktorá vo svojom aktívnom mieste má dvojmocný kation Zn²⁺, ktorý stabilizuje substrát a prispieva k hladkému priebehu hydrolyzy peptidovej väzby.

Formy ACE

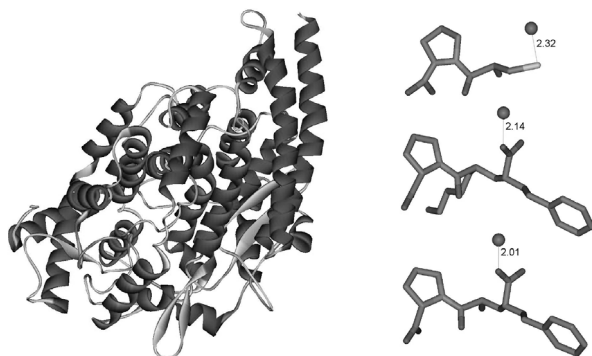
U ľudí rozoznávame dve rozdielne formy ACE: somatickú a testikulárnu. Somatická forma je zložená z 1306 aminokyselín a dvoch domén (N- a C-doména). Každá doména obsahuje aktívne miesto. Testikulárny ACE sa skladá zo 732 zvyškov a má jedno Zn²⁺ kation obsahujúce katalytické miesto, ktoré je homogénne s C-doménou somatickej formy^{12, 13}). Somatický ACE je ektoenzým, ktorý je lokalizovaný hlavne vo vaskulárnom endotele pľúc. V plazmatickej membráne je ukotvený svojím C-terminálnym koncom. Obidve Zn²⁺ obsahujúce aktívne miesta somatickej izoformy sa nachádzajú v extracelulárnom priestore bunky¹⁴).

Funkcia enzýmu

ACE metabolizuje viaceré peptidy, ktoré majú významnú úlohu v regulácii krvného tlaku včítane angiotenzínu I, angiotenzínu 1-7, BK (obr. 1) a hematopoetického regulačného faktoru – peptidu AcSDKP (N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro)^{3, 15-17}). ACE premieňa AI (tab. 1) odštiepením dipeptidu His-Leu z C-konca na oktapeptid AII. AII je jednou z najsilnejších známych vazokonstrikčných látok. Pôsobí hlavne na koronárne, renálne a cerebrálne cievy. Účinky AII sú rozsiahle: 1) Väzbou na AT-II receptory v cievnej stene priamo spôsobí vazokonstrikciu aktiváciou fosfatidyl-inozitolového systému bunky; 2) Väzbou na AT-II receptory na presynaptickej membráne terminálnych neurónov vyvolá zvýšené uvoľňovanie noradrenalínu, ktorý má hlavne vazokonstrikčný účinok; 3) Potencuje tvorbu endotelínu v endotelových bunkách koronárneho riečišťa; 4) Stimuluje proliferáciu hladkých svalových buniek ciev; 5) Zvyšuje influx Ca²⁺ iónov do buniek a 6). Spôsobuje zvýšené uvoľňovanie aldosterónu z kôry nadobličiek. Aldosterón ako posledný člen RAAS reguluje hospodárenie organizmu s minerálnymi látkami. Aj keď bol AI pôvodne považovaný za hlavný substrát ACE, výskum v tejto oblasti ukázal, že ACE má vyššiu afinitu k vazodilatačnému nonapeptidu BK, s K_m=18 M, zatiaľ čo relevantná afinita ACE k AI je približne K_m=16 M (K_m je Michaelisova-Mentenovej konštanta a je mierou enzýmovo-substrátovej afinity)¹⁸). Nedávno sa zistilo, že ACE v ľudskej plazme a na úrovni endotelu je metaloproteázou, ktorá je v rozhodujúcej miere zodpovedná za proteolytickú degradáciu a peptidovú inaktiváciu BK.

Štruktúra enzýmu

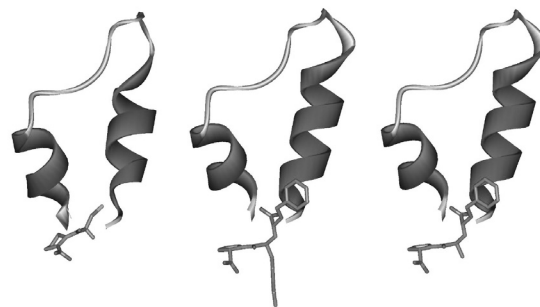
Racionálny vývoj ACE inhibítorov bol až donedávna komplikovaný vzhľadom na to, že nebola dostupná priestorová štruktúra cieľového enzýmu¹⁹⁻²¹⁾. V roku 2002 sa podarilo pripraviť a analyzovať röntgenovou difrakciou kryštály testikulárneho ACE (tACE) a jeho komplexu s inhibítorom lizinoprilom (III) (obr. 2, 3). Neskôr bola vyriešená aj priestorová štruktúra komplexu ACE s kaptoprilom a enalaprilátom²²⁾ (obr. 3). Táto skutočnosť bude mať zrejme podstatný vplyv na ďalší vývoj v skupine ACE inhibítorov, keď bude možné naplno využiť metódy počítačovo podporovaného projektovania nových liečiv (dokovanie, mapovanie receptora, koncept farmakofóru) pri dizajne selektívnejších a účinnejších ACE inhibítorov¹⁹⁾. Zistilo sa, že lizinopril a enalaprilát sa intenzívnejšie viažu na C-doménu somatického ACE, naproti tomu kaptopril má vyššiu afinitu voči N-doméne²²⁾. Yotakis et al. skríningom peptidových fosfinových knižníc identifikovali RXP 380, nový selektívny inhibítor N-domény somatického ACE²³⁾.



Obr. 2. A) Röntgenová štruktúra ACE (pdb 1O86); B) vzdialenosti funkčných skupín inhibítorov ACE (a-kaptopril, b-lizinopril, c-enalaprilát) a atómu zinku koordinačne naviazaného v ACE

ACE2

Nedávno sa zistilo, že aj homológ ACE, jednodoméno- vá zinková metalopeptidáza nazvaná ACE2, slúži ako ďalší regulátor renínového-angiotenzínového systému. ACE2 sa našla u hlodavcov aj u ľudí. V organizme sa nachádza hlavne v srdci a obličkách. Jedná sa o membránovo viazaný glykoproteín I typu s molekulovou hmotnosťou 120 KDa. Funguje ako karboxymono-peptidáza a uprednostňuje hydrofóbne alebo zásadité koncové karboxylové zvyšky²⁴⁾. Špecificita ACE2 sa líši od ACE, keďže jeho proteolytická aktivita nie je inhibovaná niektorými používanými ACE inhibítormi, ako sú kaptopril, fosinopril alebo enalaprilát^{25,26)}. V roku 2004 sa podarilo určiť jeho 3D štruktúru röntgenovou difrakciou v pevnom stave²⁷⁾. ACE2 má úlohu pri regulácii funkcie srdca a takisto ako funkčný receptor pre koronavírus, ktorý spôsobuje ťažký akútny respiračný syndróm (SARS). ACE2 obsahuje dve domény, amino- a karboxy-terminálnu doménu, ale iba jedno Zn^{2+} katalytické miesto. Katalytické miesto sa



Obr. 3. Aktívna časť enzýmu ACE s naviazaným príslušným inhibítorom (IUZF – kaptopril, IO86 – lizinopril, IUZE – enalapril)

nachádza na N-koncovej doméne, ktorá má približne 42% identitu sekvencií s N-katalytickou doménou ACE²⁸⁾. ACE2 inhibítory sú v súčasnosti predmetom intenzívneho výskumu v oblasti farmaceutickej chémie.

Neutrálna endopeptidáza

NEP je typ II integrálna membránová zinková endopeptidáza (EC 3.4.24.11). NEP sa skladá z krátkej cytoplazmatickej N-koncovej domény, ktorú nasleduje jedna transmembránová závitnica a veľká extracelulárna C-terminálna doména, ktorá obsahuje aktívne miesto^{29,30)}. Extracelulárna doména NEP obsahuje 12 zvyškov cysteínu, pričom všetky vytvárajú disulfidové mostíky¹⁰⁾. NEP má dôležitú úlohu pri degradácii nátriuretických peptidov a degradácii kinínov^{31,32)}. Z tohto dôvodu je veľký záujem o vývoj nových inhibítorov NEP a ich prípadné využitie v klinickej praxi⁴⁾. Rodina nátriuretických peptidov (NP) sa delí na tri skupiny peptidov: átriálny (ANP), mozgový (BNP) a C-typ (CNP). ANP sa produkuje v myokarde a je endogénnym inhibítorom RAAS (antagonista AII). Infúziou ANP sa znižuje tlak krvi a zároveň sa inhibuje renínovo-aldosterónová sekrécia³³⁾, zvyšuje sa objem moču, vylučovanie sodíka močom a hypotenzívny účinok BNP. Hladiny nátriuretických peptidov sú zvýšené u hypertenzných pacientov s ľavou komorovou hypertrofiou a skorým zlyhávaním srdca³⁴⁾. Tieto peptidy sú málo odolné voči proteolýze, vlastnosť, ktorá v spojení s ich vysokou cenou a problémami pri aplikácii, je hlavným nedostatkom pre ich využitie ako exogénnych terapeutík. Alternatívnou cestou zabránenia ich proteolýze by bola inhibícia zinkovej metalopeptidázy NEP.

V poslednom desaťročí sa pripravilo niekoľko vysoko účinných NEP inhibítorov. Tieto zlúčeniny sú schopné farmakologickej odozvy prostredníctvom zvýšenej hladiny opioidných alebo vazoaktívnych peptidov, čo sa môže využiť pri vývoji nových analgetík alebo antihypertenzív^{35,36)}. Vývoj nových liečiv z tejto oblasti bude v budúcnosti nepochybne profitovať aj z vyriešenej priestorovej štruktúry komplexu NEP s fosforamidonom³⁷⁾.

ACE inhibítory

Vývoj ACE inhibítorov (ACEI) začal pred vyše 30 rokmi bez znalosti priestorovej štruktúry ACE pionierskou prácou Ferreira a Ondettiho³⁸⁾. Komerčne sú ACEI dostupné už viac ako 20 rokov a projektovali sa na základe homológie ACE s metalopeptidázami (CPA, TLN), ktorých priestorová štruktúra je známa. V súčasnosti sa ACEI používajú v terapii esenciálnej hypertenzie, post-infarktových stavov, mestnavého zlyhania srdca a diabetickej nefropatie.

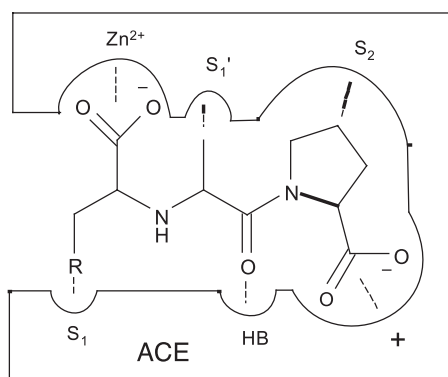
Mechanizmus účinku ACE inhibítorov

ACE inhibítory sú peptidomimetiká, ktoré účinkujú ako falošný nemetabolizovateľný substrát. Reverzibilnou kompetitívnou inhibíciou ACE sa zablokuje tvorba angiotenzínu II, a tým sa zabráni jeho silným vazokonstrikčným účinkom, čo má za následok pokles tlaku krvi. Následne sa zníži aj hladina aldosterónu. Navyše sa zabráni degradácii vazodilatačne pôsobiaceho BK, čo ešte viac zefektívni zníženie krvného tlaku. Približne u 5 % pacientov sa však, v dôsledku nahromadenia BK, vyskytuje najčastejší a najzávažnejší vedľajší účinok tejto skupiny liečiv – suchý kašeľ.

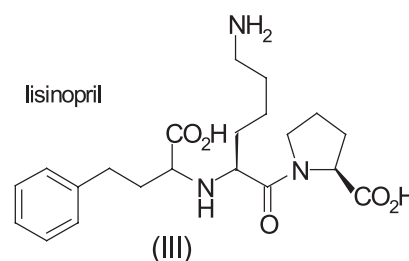
Prirodzeným substrátom pre ACE je angiotenzín I. Všetky ACE inhibítory kopírujú C-koncové zoskupenie aminokyselín angiotenzínu I Phe-His-Leu. Vo svojej molekule však neobsahujú ľahko hydrolyzovateľné peptidové väzby a namiesto karboxylovej skupiny sa koordinačná väzba s iónom Zn^{2+} vytvára prostredníctvom inej funkčnej skupiny (karboxyl, tiol, α -tiol, fosforylová skupina).

Väčšina ACEI sú typické *prodrug* liečivá. To znamená, že v liekovej forme je neúčinný alebo málo účinný prekursor (*prodrug* forma), ktorý má výhodnejšie farmakokinetické vlastnosti. Ten sa v organizme metabolizuje na účinnú látku. Biologická aktivita ACE inhibítorov je spojená hlavne s ich vysokou väzbovou kapacitou voči katiónu zinku v aktívnom mieste enzýmu. Aj napriek nedávnym pokrokom v oblasti výskumu AII antagonistov, je vývoj ACE inhibítorov stále aktuálny a môže priniesť nové selektívnejšie a vysoko účinné liečivá pre liečbu chorôb kardiovaskulárneho systému.

Kaptopril (I) je považovaný za prvý perorálne účinný ACEI, ktorý sa vyvinul metódami racionálneho projektovania liečiv²⁸⁾. Proces racionálneho vývoja kaptoprilu spočíval hlavne na: 1) štruktúrnych a funkčných rysoch karboxypeptidázy A, 2) inhibičnej účinnosti zmesi peptidov získanej z jedu brazílskeho hada *Bothrops jararaca*, známej ako potenciačný faktor bradykinínu a 3) skríningu rôznych chelátorov katiónov zinku Zn^{2+} , z ktorých jedným z najúčinnějších boli zlúčeniny obsahujúce tiolovú skupinu^{39, 40)}. Do klinickej praxe zavedený kaptopril obsahuje tiolovú skupinu, ale má aj niektoré vedľajšie nežiadúce účinky (suchý kašeľ, strata chuti, dermatózy), ktoré sa pripísali práve tiolovej skupine. Preto bol vývoj ACEI orientovaný na štruktúry, v ktorých tiolová skupina bola nahradená karboxylovou skupinou. Vývoj série peptidových N-karboxyalkylových analógov kaptoprilu (so všeobecnou sekvenciou $R-CHCO_2H-R_1-R_2$) s ďalšími skupinami, schopnými okupovať S_1 väzobný vaček ACE (obr. 4) viedol k identifikácii dvoch nových štruktúr s vhodnou inhi-



Obr. 4. Inhibítory ACE v aktívnom mieste enzýmu



bičnou účinnosťou. Enalaprilát (II) ($R_1-R_2 = \text{Ala-Pro}$) a lisinopril (III) ($R_1-R_2 = \text{Lys-Pro}$) sú tripeptidové analógy s karboxylovou skupinou schopnou koordinačnej väzby s katiónom zinku ACE. Molekula typického ACE inhibítora obsahuje nasledujúce funkčné skupiny (obr. 4):

- C-koncovú karboxylovú časť, ktorá interaguje s pozitívnymi zvyškami aminokyselín Lys a Tyr v aktívnej časti enzýmu;
- kruhový systém s karboxylovou skupinou (napríklad L-prolín), ktorý efektívne okupuje hydrofóbny vaček S_2 ;
- karboxylový kyslík, schopný vytvárať vodíkovú väzbu s väzbovým partnerom enzýmu (HB),
- štruktúrny motív, ktorý vyplní väzbové vrecko S_1 ;
- funkčnú skupinu, ktorá je schopná interakcie s iónom zinku v aktívnej časti enzýmu;
- hydrofóbnu časť, ktorá je schopná vyplniť hydrofóbne vrecko S_1 aktívnej časti enzýmu.

V nasledujúcich rokoch sa uskutočnil výskum a vývoj nových inhibítorov ACE vo viacerých farmaceutických spoločnostiach a do klinickej praxe boli postupne zavedené ďalšie účinné ACE inhibítory (IV–XIV). Nové ACE inhibítory vznikli štruktúrными obmenami klinicky využívaného liečiva (kaptopril) na základe analógie (prístup aktívneho analóga). Svetové farmaceutické spoločnosti do klinickej praxe zaviedli množstvo nových ACE inhibítorov (tzv. „me-too“ zlúčeniny)⁴¹⁾.

Napriek spomenutým nežiadúcim účinkom kaptoprilu sa dnes používajú aj ďalšie tiolové ACEI ako napr. zofenopril (XV), ktorý okrem štandardných účinkov kaptoprilu má navyše aj priaznivú aktivitu voči oxidatívne stresu. Klinické skúšky naznačujú, že oxidatívny stres u pacientov s esenciálnou hypertenziou sa znižuje chronickým užívaním tiolového ACEI zofenoprilu, ale nie karboxylovým ACEI enalaprilom⁴²⁾. Za predpokladu eliminácie ich nežiadúcich účinkov¹¹⁾ môžu byť nové tiolové ACEI považova-

né za nádejné potenciálne liečivá so širokým spektrom priaznivých účinkov pri hypertenzii a kardiovaskulárnych ochoreniach.

Rozdelenie ACE inhibítorov

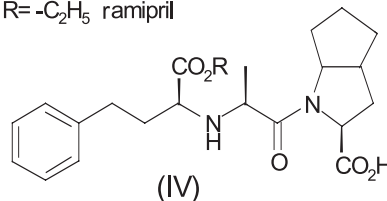
Existuje viacero triedení ACE inhibítorov. ACE inhibítory možno rozdeliť podľa:

- *historického vývoja*
 1. generácia ACE inhibítorov – kaptopril, enalapril,
 2. generácia ACE inhibítorov – ramipril, trandolapril,
 3. generácia ACE inhibítorov – fosinopril, ceranapril, duálne ACE/NEP inhibítory – omapatrilát, gemopatrilát, fasidotrilát.
- *chemickej podstaty*
 - peptidové ACE inhibítory – teprotid, saralazin,
 - nepeptidové ACE inhibítory – všetky ostatné.
- *potreby metabolizácie na aktívnu formu*
 - non-prodrug ACE inhibítory - kaptopril, lisinopril, ceranapril,
 - prodrug ACE inhibítory - enalapril, ramipril, cilazapril.
- *funkčnej skupiny interagujúcej so zinkovým kationom aktívneho centra*
 - ACE inhibítory obsahujúce tiolovú skupinu – kaptopril, zofenopril,
 - ACE inhibítory obsahujúce karboxylovú skupinu – enalapril, spirapril, perindopril,
 - ACEI obsahujúce fosforylovú skupinu – ceranapril, fosinopril, RXP 407,

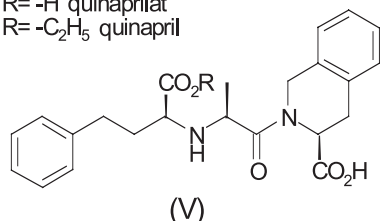
- ACE/NEP inhibítory obsahujúce α -tiolovú skupinu – omapatrilát, gemopatrilát.
- *cesty vylučovania z organizmu*
 - ACE inhibítory vylučované obličkami - enalapril, kaptopril,
 - ACE inhibítory vylučované pečeňou - spirapril, ceranapril, fosinopril.

Predpokladá sa, že premyslenou inhibičnou stratégiou, pri ktorej by sa zamedzilo produkcii AII, zatiaľ čo by sa znížila, ale nie úplne odstránila hladina BK v plazme, by bolo možné čiastočne obísť problém vyskytujúcich sa vedľajších účinkov ACE inhibítorov. To znamená, že inhibovaný ACE by stratil svoju schopnosť tvorby AII, ale stále by bol schopný degradovať BK, aj keď v nižšom rozsahu. Vieme, že ACE obsahuje dve katalytické miesta, u ktorých malé rozdiely v sekvencii a štruktúre zavádzajú

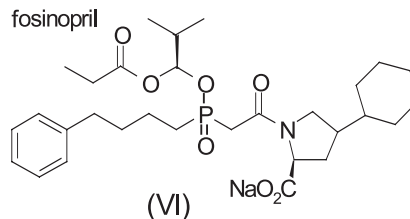
R= -H ramiprilát
R= -C₂H₅ ramipril



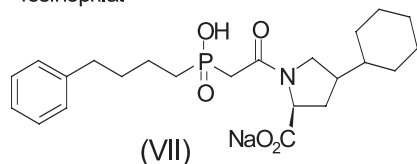
R= -H quinaprilát
R= -C₂H₅ quinapril



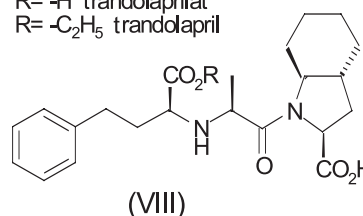
fosinopril



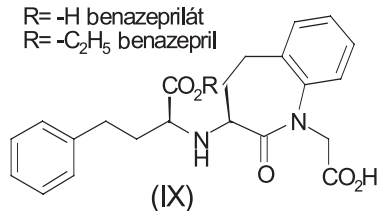
fosinoprilát



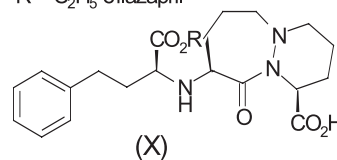
R= -H trandolaprilát
R= -C₂H₅ trandolapril

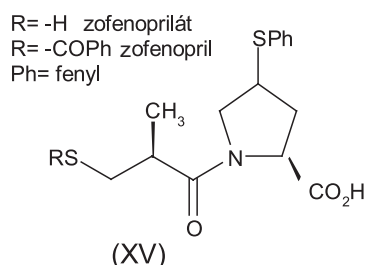
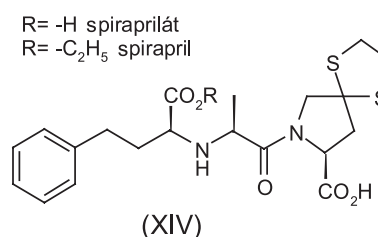
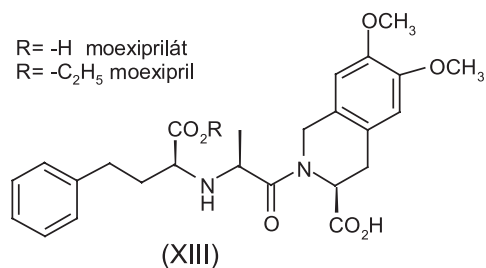
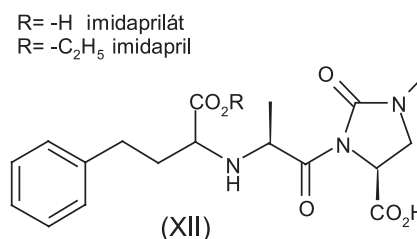
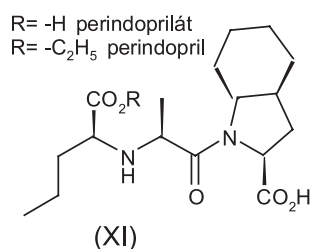


R= -H benazeprilát
R= -C₂H₅ benazepril



R= -H cilazaprilát
R= -C₂H₅ cilazapril





mierne odlišné funkcie. Zdá sa, že obe katalytické domény ACE rovnako katalyzujú degradáciu BK, naproti tomu C-doména je špecifickejšia pre tvorbu AII. V prípade, že by C-doména zastavila produkciu AII a N-doména by znížila hladinu BK, výsledkom by bol cirkulujúci BK v koncentrácii, ktorá by bola nedostatočná na stimuláciu vedľajších účinkov. Aj preto je selektívna inhibícia C- a N- domény hlavnou výzvou viacerých vedných odborov ako chémia, biológia, farmakológia a medicína, a predstavila by novú éru v procese dizajnu ACE inhibítorov. Nedávno určená röntgenová 3D štruktúra testikulárneho ACE a ACE2 objasnila atómovú úroveň interakcií medzi inhibítorom a aktívnym miestom enzýmu. Získané informácie budú využívané v štruktúrnej orientovanom dizajne nových účinných a selektívnych inhibítorov.

NEP inhibítory

NEP inhibítory zabraňujú nie len enzýmovej degradácii nátriuretických peptidov, zvyšujú tak ich biologickú aktivitu, ale tiež tvorbe vazokonstrične pôsobiaceho endotelínu ET-1. Tým NEP inhibícia moduluje rovnováhu medzi cirkulujúcimi vazodilatačnými a vazokonstrikčnými zložkami, aj keď určitú úlohu zohrávajú i ďalšie enzýmy a zložky (napr. ECE – endotelín konvertujúci enzým). U esenciálnej hypertenzie NEP inhibítory zvyšujú účinok ANP čím následne dochádza k zníženiu tlaku krvi. Napriek tomu NEP inhibítor kandexatril má výraznejší antihypertenzný

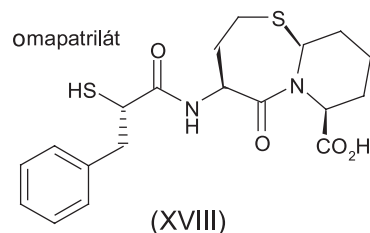
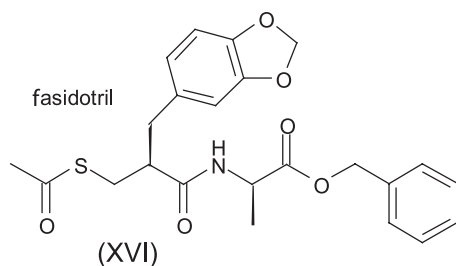
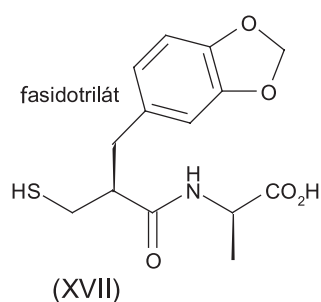
účinnosť skôr pri podávaní v kombinácii s ACE inhibítorom ako pri monoterapii⁴³⁾. Navyše žiadne výraznejšie priaznivé účinky neboli pozorované u pacientov s miernym chronickým srdčným zlyhávaním, keď boli liečení výlučne NEP inhibítormi⁴⁴⁾. Jedným z dôvodov môže byť široké spektrum substrátov, ktoré NEP hydrolyzuje. Takisto dôležité je spomenúť, že NEP sa stáva hlavnou cestou enzýmovej degradácie BK v prípade inhibície ACE. Hoci sú pokusy vyvinúť efektívny a nízkonákladový NEP inhibítor, hlavným trendom je príprava a použitie duálnych ACE/NEP inhibítorov. Predpokladá sa totiž, že duálne inhibítory by mohli poskytovať efektívnejší spôsob pri liečbe vysokého tlaku.

Vazopeptidázové inhibítory

Keďže nielen ACE, ale i ďalšie metalopeptidázy príbuzné ACE, ako napr. NEP, sú zainteresované v metabolizme peptidov zúčastňujúcich sa na regulácii tlaku krvi, je už od začiatku 90. rokov dvadsiateho storočia snaha o reguláciu ACE a NEP aktivity iba jedným spoločným inhibítorom⁴⁵⁾. Takéto kombinované ACE/NEP inhibítory sa nazývajú *vazopeptidázové inhibítory* (ang. vasopeptidase inhibitors – VPI) (obr. 1)²⁹⁾.

Pôvodná idea zasiahnuť dve metalopeptidázy, ACE a NEP, s čiastočne prekrývajúcimi sa, alebo synergickými funkciami bola aplikovaná použitím prvého VPI, fasidotrilátu (*prodrug* fasidotril), ktorý je pôvodne známy ako alatriopil (XVI, XVII). Fasidotrilát má podobnú inhibičnú aktivitu k ACE i NEP, a neskôr nasledoval vývoj ďalších VPI štruktúr, napr. sampatrilát⁴⁶⁾ a omapatrilát⁴⁷⁾ (XVIII). Doteraz je v rôznych štádiách vývoja približne 10 vazopeptidázových inhibítorov, napr. gemopatrilát, RB105/S21402 (mixanpril), RB106, BMS182657, MDL100173 (MDL100240), Z-13752A a CGS30008^{25, 48)}.

Počiatkové klinické štúdie troch najperspektívnejších VPI inhibítorov (omapatrilát, sampatrilát a fasidotrilát) u pacientov s miernou až strednou hypertenziou potvrdili,

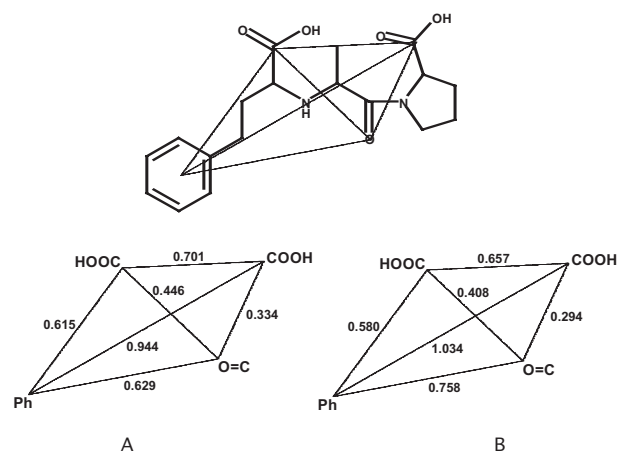


že nová skupina duálnych inhibítorov má výraznú a trvalú antihypertenznú aktivitu¹¹⁾. Najpokročilejším a najviac klinicky preskúšaným VPI je omapatrilát. V rámci klinického testovania sa vo viacerých štúdiách (HOPE, IMPRESS, OVERTURE, OCTAVE) potvrdili jeho výhodnejšie vlastnosti v porovnaní s používanými antihypertenzívami, hlavne ACEI a AII antagonistami. Práve v týchto štúdiách sa zistil aj pomerne vysoký výskyt jeho najzávažnejšieho vedľajšieho nežiadúceho účinku – angioedému, kvôli ktorému americká FDA v roku 2003 zamietla jeho schválenie. Angioedém sa ako nežiadúci účinok vzácnne vyskytuje (0,1–0,5%) aj pri aplikácii ACE inhibítorov. Jeho hlavným symptómom je opuchnutie, ktoré postihuje hlavne tvár, krk, pery, jazyk a hrtan. Jasné dôvody pre vznik angioedému nie sú známe, aj keď sa predpokladá, že niektoré druhy tohto nežiadúceho účinku sa môžu sprostredkovať aj zvýšenou akumuláciou koncentrácie BK. Je dôležité si uvedomiť, že BK je takisto degradovaný pôsobením NEP a synchronna inhibícia ACE a NEP môže značne znížiť proteolytickú inaktiváciu BK, čím dochádza k zvýšeniu hladiny BK v plazme a zároveň k vzrastu s BK súvisiacim rizikom výskytu angioedému. V prípade vazopeptidázových inhibítorov zostáva objasniť či vyšší výskyt angioedému, v prípade klinických štúdií omapatrilátu je špecifikum pre tento inhibítor, alebo je všeobecným vedľajším účinkom aj pre ďalšie, omapatrilátu štruktúrne podobné VPI. Nedávne klinické štúdie potvrdzujú^{49, 50)}, že VPI si zaslu-

hujú ďalšie skúmanie s cieľom získať rovnováhu medzi vazokonstrikčne a vazodilatačne pôsobiacimi cirkulujúcimi peptidovými hormónmi, s minimom vedľajších nežiadúcich účinkov.

ZÁVER

Vývoj nových ACE inhibítorov by sa mal orientovať na tvorbu nových doménovo- selektívnych inhibítorov s výhodnejšími farmakodynamickými a farmakokinetickými parametrami v porovnaní s už dostupnými inhibítormi. Eliminácia vedľajších nežiadúcich účinkov u duálnych ACE/NEP inhibítorov by mohla viesť k zavedeniu nových terapeuticky výhodných liečiv do klinickej praxe. Významnú úlohu pri projektovaní nových ACE inhibítorov budú mať aj metódy molekulového modelovania. Na základe molekulovo-modelovacích štúdií je možné odvodiť farmakofór⁵¹⁾ a jeho koncepciu využiť pri projektovaní nových liečiv. Farmakofór ACE inhibítorov⁵²⁾ sa odvodil na základe konformačného štúdia klinicky používaných aj experimentálnych ACE inhibítorov a ich aktívnych metabolitov^{52–54)}. Konformačné štúdium poskytlo najstabilnejšie konformácie, ktoré spolu s modelom aktívneho miesta ACE sa použili na generovanie farmakofóra. Priestorová orientácia hlavných farmakofórových skupín je pre všetky ACE inhibítory veľmi podobná, a preto sa mohol odvodiť štvorzložkový farmakofór⁵²⁾ (obr. 5A). Na obrázku 5B je zobrazený štvorzložkový farmakofór, ktorý sa odvodil z neskôr publikovanej 3D štruktúry komplexu lizinoprilu s ľudským ACE⁹⁾. Obidva farmakofóry sú v dobrej zhode. Teda metódami molekulového modelovania je možné, v prípade, ak presná 3D štruktúra receptora a jeho komplexov s ligandmi nie je známa, odvodiť farmakofór, ktorý spoľahlivo reprezentuje hlavné štruktúrne a priestorové prvky potrebné na definovanie požadovanej biologickej aktivity. Jackson et al. použili koncepciu farmakofóra a známu 3D štruk-



Obr. 5. Vzdialenosti medzi farmakofórovými funkčnými skupinami ACE inhibítorov
A model farmakofóra odvodený z molekulovomodelovacieho štúdia; B experimentálny model, ktorý sa získal z publikovanej röntgenovej štruktúry komplexu lizinoprilu s ľudským ACE

túru ľudského homológa ACE (ACE2) na virtuálny skrining približne 3,8 milióna chemických zlúčenín z komerčných databáz⁵⁵⁾. Použitím skórovacích funkcií sa im podarilo vyselektovať 17 nových štruktúr, ktoré otestovali na základnú farmakologickú aktivitu. Šesť najaktívnejších zlúčenín inhibovalo ACE2 aktivitu v oblasti mikromolových IC₅₀ hodnôt.

Racionálne projektovanie nových štruktúr a modifikácia už existujúcich inhibítorov bude profitovať z vyriešených 3D štruktúr ACE, NEP a ACE2, ktoré umožňujú odvodenie a naprojektovanie dokonalejších farmakofórov. Detailnejšie farmakofóry aktívnych miest jednotlivých enzýmov zároveň umožnia efektívnejšie prehľadávanie veľkých farmakofór-orientovaných databáz, čím sa značne zvýšia šance na získanie nových potenciálnych inhibítorov^{55, 56)}.

LITERATÚRA

1. Valle, B. L., Auld, D. S.: *Biochemistry*, 1990; 29, 5647 až 5659.
2. Spyroulias, G. A., Galanis, A. S., Pairas, G. et al.: *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004; 4, 403-429.
3. Eriksson, U., Danilczyk, U., Penniger, J. M.: *Current Biology*, 2002; 12, R745-R752.
4. Abassi, Z. A., Tate, J. E., Golombe, E., Keiser, H. R.: *Hypertension*, 1992; 20, 89-95.
5. Kenny, A. J., Stephanson, S. L.: *FEBS Lett.*, 1998; 232, 1-8.
6. Holland, D. R., Hausrath, A. C., Juers, D., Mathews, B. W.: *Protein Sci.*, 1995; 4, 1955-1965.
7. Colman, P. M., Jansonius, J. N., Matthews, B. W.: *J. Mol. Biol.*, 1972; 70, 701-724.
8. Steitz, T. A., Ludwig, M. L., Quioco, F. A., Lipscomb, W. N.: *J. Biol. Chem.*, 1967; 242, 4662-4668.
9. Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., Acharaya, K. R.: *Nature*, 2003; 421, 551-554.
10. Oefner, C., DeArcy, A., Hennig, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 2000; 296, 341-349.
11. Spyroulias, G. A., Cordopatis, P.: *Current Enzyme Inhibition*, 2005; 1, 29-42.
12. Hooper, N. M.: *FEBS Lett.*, 1994; 354, 1-6.
13. Hubert, C., Houot, A.-M., Corvol, P., Soubrier, F.: *J. Biol. Chem.*, 1991; 266, 15377-15383.
14. Corvol, P., Williams, T. A.: In: *Cell-surface Peptidases in Health and Disease*, Kenney, A. J., Boustead, C. M. (eds.): Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997, s. 99.
15. Erdos, E. G.: *Hypertension*, 1990; 16, 363-370.
16. Ferrario, C. M., Chappel, M. C., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B.: *Hypertension*, 1997; 30, 535-541.
17. Rousseau, A., Michaud, A., Chauvet, M. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1995; 270, 3656-3661.
18. Blais, C. Jr., Marceau, F., Rouleau, J. L., Adam, A.: *Peptides*, 2000; 21, 1903-1940.
19. Remko, M.: *Medicínska chémia*. Bratislava, SAP, 2002, s. 99.
20. Smieško, M.: *Molecular Modeling Study of ACE inhibitors*. Dizertačná práca (PhD.), 2002.
21. Smieško, M., Remko, M.: *Pharma Journal*, 2003; 13, 72-76.
22. Natesh, R., Schwager, S. L., Evans, H. R. et al.: *Biochemistry*, 2004; 43, 8718-8724.
23. Georgiadis, D., Cuniase, P., Cotton, J. et al.: *Biochemistry*, 2004; 43, 8048-8054.
24. Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, 2002; 277, 14838-14843.
25. Molinaro, G., Rouleau, J. L., Adam, A.: *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2002; 2, 131-141.
26. Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 2000; 275, 33238-33243.
27. Towler, P., Staker, B., Prasad, S. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 2004; 279, 17996-18007.
28. Turner, A. J., Hooper, N. M.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 2002; 23, 177-183.
29. The HYP Consortium 1995 *Nature Genet.*, 1995; 11, 130 až 136.
30. Emoto, N., Yanagisawa, M.: *J. Biol. Chem.*, 1995; 270, 15262-15268.
31. Roques, B. P., Noble, F., Daugé, V. et al.: *Pharmacol. Rev.*, 1993; 45, 87-146.
32. Pham, I., El Amrani, A. I. K., Fournié-Zaluski, M. C. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993; 265, 1339-1347.
33. Jansen, W. M., de Zeeuw, D., van der Hem, G. K., de Jong, P. E.: *Hypertension*, 1989; 13, 640-646.
34. Burnett, J. C. Jr, Kao, P. C., Hu, D. C. et al.: *Science*, 1986; 231, 1145-1147.
35. Burnett, J. C.: *J. Hypertens.*, 1999; 17, s37-s43.
36. Roques, B. P., Beaumont, A.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 1990; 11, 245-249.
37. Oefner, C., Roques, B. P., Fournié-Zaluski, M. C., Dale, G. E.: *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.*, 2004; 60, 392-396.
38. Cushman, D. W., Ondetti, M. A.: *Nat. Med.*, 1990; 5, 1110-1113.
39. Ondetti, M. A., Rubin, B., Cushman, D. W.: *Science*, 1977; 196, 441-444.
40. Napoli, C., Sica, V., de Nigris, F. et al.: *Am. Heart J.*, 2004; 148, e5.
41. Remko, M.: *Metódy výskumu a vývoja liečiv*. Bratislava, SAP, 1999, s. 52.
42. Leonetti, G., Cuspidi, C.: *Drugs*, 1995; 49, 516-535.
43. Richards, A. M., Wittert, G. A., Crozier, I. G. et al.: *J. Hypertens.*, 1993; 11, 407-416.
44. Northridge, D. B., Newby, D. E., Rooney, E. et al.: *Am. Heart J.*, 1999; 138, 1149-1157.
45. Trippodo, N. C., Robl, J. A., Asaad, M. M. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995; 275, 745-752.
46. Wallis, E. J., Ramsay, L. E., Hettiarachchi, J.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1998, 64, 439-449.
47. Weber, M.: *Am. J. Hypertens.*, 1999, 12, 139S-147S.
48. Sagnella, G. A.: *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 2002, 3, 90-95.
49. Kostis, J. B., Packer, M., Black, H. R. et al.: *Am. J. Hypertens.*, 2004, 17, 103-111.
50. Packer, M., Califf, R. M., Konstam, M. A. et al.: *Circulation*, 2002; 106, 920-926.
51. Smieško, M., Remko, M.: *Čes. slov. Farm.*, 1999; 48, 247-251.
52. Smieško, M., Remko, M.: *Chem. Papers*, 2002; 56, 138-143.
53. Smieško, M., Remko, M.: *Chem. Papers*, 2004; 58, 71-78.
54. Šramko, M., Remko, M., Garaj, V.: *Struct. Chem.*, 2005; 16, 391-399.
55. Rella, M., Rushworth, C. A., Guy, J. L., Turner, A. J., Langer, T., Jackson, R. M.: *J. Chem. Inf. Model* 10 (2006) v tlači.
56. Kuster, D. J., Marshall, G. R.: *J. Comput. Aided Mol. Des.* 19, 609-615 (2005).

Došlo 10. 2. 2006.

Prijato ke zverejnení 15. 3. 2006.

PharmDr. Martin Šramko
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR
e-mail: sramko@fpharm.uniba.sk, remko@fpharm.uniba.sk