

BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH
LIBRARIES OF CHEMICAL COMPOUNDS

Krzysztof M. Zwoliński, Zbigniew J. Leśnikowski

*Pracownia Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej,
Instytut Biologii Medycznej PAN
ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź
e-mail: kzwolinski@cbm.pan.pl, zlesnikowski@cbm.pan.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Eksploatacja zasobów przestrzeni chemicznej – biblioteki wirtualne
 2. Infrastruktura eksperymentalnych bibliotek związków
 3. Projektowanie struktury i właściwości bibliotek
 4. Normalizacja i profilowanie właściwości bibliotek metodami *in silico*
 5. Biblioteki generyczne
 6. Biblioteki fragmentów
 7. Biblioteki związków naturalnych
- Piśmiennictwo cytowane
-



Dr Krzysztof M. Zwoliński jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Po ukończeniu studiów i uzyskaniu stopnia doktorskiego w 2011 r. rozpoczął pracę w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Obecnie uczestniczy w realizacji Europejskiego projektu otwartych platform screeningowych w chemii biologicznej: EU-OPENSREEN.

Swoje zainteresowania naukowe związane z chemią medyczną i bionanotechnologią rozwija w Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej IBM PAN kierowanej przez profesora Zbigniewa J. Leśnikowskiego.



Prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski jest absolwentem Wydziału Chemii Politechniki Łódzkiej. W latach 1974–1994 związany był z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN gdzie uzyskał stopień doktora i doktora habilitowanego, w roku 2004 uzyskał tytuł profesora zwyczajnego. W latach 1992–1996 pracował w Uniwersytecie Emory i Veterans Affairs Medical Center w Atlancie, USA. Od roku 1996 pracuje w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi gdzie od roku 2009 pełni funkcję dyrektora. Przedmiotem zainteresowań prof. Leśnikowskiego jest chemia kwasów nukleinowych

i ich komponentów. Synteza, badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i DNA/RNA-oligonukleotydów zawierających klastery boru, modyfikowane kwasy nukleinowe jako materiały dla bionanotechnologii, bioterapeutyki i sondy molekularne w diagnostyce medycznej. Badania koniugatów nukleozydów i klastrów boru jako modulatorów aktywności receptorów purynergicznycy i nośniki boru dla BNCT, poszukiwania nowych związków o aktywnościach przeciw wirusowych.

ABSTRACT

Over the past decade one can observe a scientific revolution taking place resulting in an explosion of new biotechnologies. Moreover, with the end of the human genome project and following expansion of the extensive genetic research an unprecedented number of new biological targets useful in drug design have been identified. Simultaneously, new methods such as combinatorial synthesis have expanded the overall size of chemical libraries and high-throughput technologies have enabled to screen more than one million compounds a day [43]. However, an increasing size of chemical libraries in a random fashion may not necessarily increase a probability of success and the overall number of successfully identified leads. Thus, success of any drug discovery program depend heavily on the assumed selection criteria of appropriate molecules [58] which properties should maximize the chances of identifying ligands for any given target. Selection criteria used for compounds to generate diverse as well as focused chemical libraries are briefly discussed in the present overview. We describe the most important quality factors such as size, diversity and chemical tractability which should be always kept in mind during the design of chemical libraries.

Chemical space is enormous and limited only by a chemist's imagination. The number of possible drug-like molecules within chemical space has been estimated to be around 10^{60} [17]. In contrast the overall number of atoms in the observable Universe is approximately 10^{80} . It is obvious that it is impossible to synthesize every possible molecule so one need to explore only those regions of chemical space which are enriched with molecules of appropriate structure and function. Recent strategies for the design of high-quality collections of structurally diverse sets of small molecules are discussed in the context of probing the chemical space in order to find new biologically active structures.

Keywords: chemical libraries, virtual libraries, chemical space, drug, natural products

Słowa kluczowe: biblioteki chemiczne, biblioteki wirtualne, przestrzeń chemiczna, lek, związki naturalne

WPROWADZENIE

Biblioteką związków nazywa się uporządkowany zbiór cząsteczek chemicznych o poznanej strukturze oraz właściwościach fizykochemicznych, stworzony z zamiarem usprawnienia procesu identyfikacji substancji spełniających założone kryteria, a przy tym wykazujących spodziewaną aktywność. Wyjątkiem są tutaj biblioteki ekstraktów pozyskiwanych ze źródeł naturalnych, które zawierają wcześniej niezidentyfikowane metabolity wtórne (ang. *secondary metabolites*). Ze względu na szczególny charakter bibliotek ekstraktów, dokładną analizę jakościową zdeponowanych próbek przeprowadza się dopiero po stwierdzeniu w badaniach przesiewowych obecności substancji aktywnej (ang. *hit*).

Biblioteki związków chemicznych dzielą się na dwie zasadnicze grupy: biblioteki wirtualne oraz biblioteki eksperymentalne [1]. Biblioteki eksperymentalne składają się z próbek istniejących w rzeczywistości związków, których aktywność testuje się doświadczalnie przy wykorzystaniu wysokowydajnych metod eksperymentalnych (ang. „*wet screening*”) [2].

Z kolei biblioteki wirtualne zawierają jedynie zakodowane w odpowiednim formacie danych reprezentacje możliwych do wyprowadzenia z danego składu elementarnego struktur, których aktywność testuje się w środowisku wirtualnym z wykorzystaniem metod obliczeniowych, w tym popularnych obecnie metod modelowania molekularnego [3].

Biblioteki chemiczne wykorzystuje się powszechnie w wielu dyscyplinach nauki poszukując związków aktywnych biologicznie dla przemysłu farmaceutycznego, weterynarii, rolnictwa, biotechnologii, kosmetologii czy też dodatków do żywności. W niniejszym opracowaniu ograniczamy się do bibliotek dedykowanych poszukiwaniu nowych leków.

Wielkość bibliotek substancji o potencjalnej aktywności biologicznej może zmieniać się w bardzo szerokim zakresie począwszy od niewielkiego zbioru kilkuset wyselekcjonowanych związków a skończywszy na kolekcjach zawierających kilka milionów i więcej połączeń.

W zależności od przeznaczenia w skład bibliotek eksperymentalnych mogą wchodzić związki niskocząsteczkowe (ang. *small molecules*) [4], których masa cząsteczkowa nie przekracza umownej granicy 700 Da, jak również polimery [5], przeciwciała [6], peptydy [7], białka [8], oligonukleotydy [9] oraz kwasy nukleinowe [10]. Obecnie znanych jest także wiele przypadków kompleksów metali przejściowych o udowodnionej aktywności biologicznej [11], które znalazły zastosowanie, jako leki antynowotworowe [12], przeciwzapalne [13] czy też leki stosowane w stanach zaawansowanej cukrzycy [14].

1. EKSPLOKACJA ZASÓBOW PRZESTRZENI CHEMICZNEJ – BIBLIOTEKI WIRTUALNE

Na początku 2012 r. w największej na świecie naukowej bazie danych chemicznych Chemical Abstract Service (CAS) odnotowano rekordową liczbę ponad 63 milionów zarejestrowanych związków chemicznych [15]. Tymczasem liczbę wszystkich możliwych cząsteczek organicznych szacuje się w zależności od przyjętego algorytmu [16] na około 10^{18} – 10^{180} z czego przynajmniej 10^{60} cząsteczek może stanowić potencjalne modulatory celów biologicznych [17], a obecny stan zaawansowania technologii pozwala na syntezę blisko 10^{20} – 10^{24} cząsteczek [18]. Jeżeli odnieść te dane do liczby atomów w obserwowalnym wszechświecie, którą szacuje się na około 10^{80} atomów, wówczas stanie się zrozumiałym, iż nie jest możliwa nie tylko synteza, ale nawet wyczerpująca analiza zasobów całej przestrzeni chemicznej. Wkrótce może okazać się, iż wielkość dostępnych zasobów przestrzeni chemicznej ogranicza już tylko wyobraźnia ludzkiego umysłu, dlatego coraz większą uwagę przywiązuje się nie tyle do samej eksploracji zasobów, co do poszukiwań obszarów bogatych w związki aktywne w stosunku do danego celu biologicznego.

Przykładowa baza wirtualnych cząsteczek (ang. *generated database*) GDB-10 stworzona przez Reymonda i współpracowników [19] celem przeprowadzenia wirtualnych badań przesiewowych zawiera aż 26,4 milionów unikalnych reprezentacji struktur, z których udaje się wygenerować 110,9 miliona stereoizomerów. Wirtualną bazę GDB-10 tworzą reprezentacje cząsteczek o średniej masie cząsteczkowej 153,2 Da, z czego aż 87% to reprezentacje cząsteczek o masie poniżej 160 Da spełniające kryterium lekopodobności (ang. *druglikeness*) [20].

Przydatność bazy GDB-10 zademonstrowano w kampanii poszukiwania nowych kandydatów na substancje wiodące dla modulatorów wybranych klas receptorów i enzymów. Wykorzystując pakiet obliczeniowy oparty na statystyce Bayesowskiej [21] w bazie GDB-10 udało się znaleźć blisko 17,106 modulatorów receptorów sprzężonych z białkiem G, 2,071 inhibitorów kinaz oraz 7,527 ligandów regulujących aktywność kanałów jonowych.

Warto zwrócić uwagę na fakt, iż całkowita liczba cząsteczek zawartych w wirtualnych bazach GDB jest funkcją liczby atomów tworzących cząsteczkę. I tak wirtualne bazy GDB-13 [22] oraz GDB-15 [23] zawierają odpowiednio 980 milionów i 28,8 biliona reprezentacji trwałych w temperaturze pokojowej cząsteczek zawierających odpowiednio poniżej 13 oraz 15 atomów. W drodze ekstrapolacji łatwo oszacować, iż dla cząsteczek złożonych z 25 atomów powinno istnieć już ok. 10^{27} możliwych kombinacji. Ponieważ nie jest możliwa nawet zadowalająca eksploracja a co dopiero wyczerpująca synteza astronomicznych zasobów chemicznego wszechświata, dlatego pozostaje nam opracować skuteczne narzędzia do nawigacji w obszarach bogatych w cząsteczki o pożądanej aktywności.

Jak zauważa Lipiński i Hopkins przestrzeń chemiczna w wielu aspektach przypomina naturę kosmologicznego wszechświata, który podobnie zresztą jak wirtualny wszechświat cząsteczek „odznacza się podobną strukturą oraz bezmiarem”

[24]. Cząsteczki aktywne wobec określonej klasy celów biologicznych wykazują tendencję do grupowania się w specyficznych obszarach przestrzeni chemicznej przypominających galaktyki [25]. Co więcej przestrzeń chemiczną można również rozpatrywać w kontekście wielowymiarowej przestrzeni wszystkich deskryptorów [26], wyrażających w sposób liczbowy cechy strukturalne.

Przez pojęcie deskryptora należy rozumieć „wynik operacji logicznej lub matematycznej, która przekształca informację chemiczną kodowaną w symbolicznej reprezentacji cząsteczki w jej postać numeryczną” [27].

Skuteczna nawigacja w całym obszarze przestrzeni chemicznej wymaga, więc odwzorowania reprezentacji wszystkich znanych cząsteczek na współrzędnych wielowymiarowej przestrzeni deskryptorów [28]. Jednocześnie każdy wymiar powinien wyrażać unikalne cechy strukturalne wyrażone przez właściwości fizykochemiczne, molekularne odciski palca (ang. *molecular fingerprints*), cechy topologiczne, czy też podobieństwo do wybranego związku odniesienia [29].

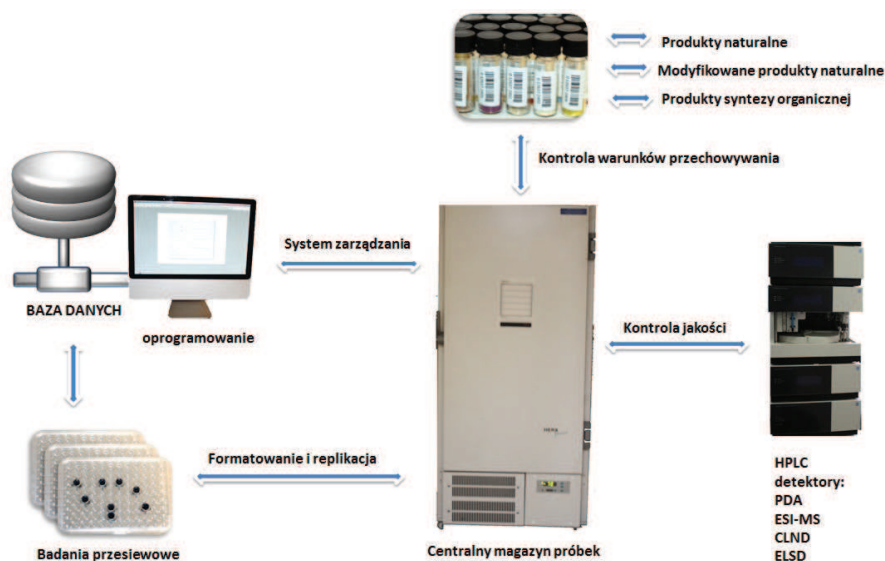
W tak zdefiniowanej przestrzeni chemicznej dwie sąsiadujące ze sobą cząsteczki odznaczają zbliżony zbiór wartości numerycznych dla przyjętych deskryptorów cech strukturalnych. Niestety dotychczas nie udało się skonstruować skutecznych algorytmów, które pozwalałyby przewidywać strukturę na podstawie wartości numerycznych samych tylko deskryptorów. Dlatego nawigacja przestrzeni chemicznej wymaga znajomości struktur wszystkich związków w niej zawartych.

Nowatorskie podejście do problemu eksploracji nieznanymi obszarów przestrzeni chemicznej, które pozwala na znalezienie unikalnych związków aktywnych biologicznie przedstawili Raymond i van Deursen [30]. Przestrzeń chemiczną udaje się przybliżyć w formie grafu, którego wierzchołki reprezentować będą cząsteczki, a krawędzie zmiany, jakie dokonują się w obrębie struktury. W opisanej w ten sposób przestrzeni chemicznej dwie sąsiadujące ze sobą cząsteczki odróżnia niewielka zmiana struktury, która może polegać na przegrupowaniu bądź zmianie charakteru atomów, jak również dodaniu lub usunięciu dodatkowego atomu lub wiązania. Na potrzeby nawigacji kierunków w obszarach przestrzeni chemicznej skonstruowano specjalny program o nazwie „Spaceship” [31]. Zastosowany w nim algorytm opiera się na cyklicznie powtarzanej operacji wprowadzania niewielkich modyfikacji strukturalnych oraz selekcji tylko tych, spośród otrzymanego w ten sposób zbioru cząsteczek, które wykazują największe podobieństwo do struktury docelowej mierzone wartością współczynnika Tanimoto (ang. *Tanimoto coefficient*) [32]. Warto w tym miejscu nadmienić, iż znanych jest obecnie kilka użytecznych programów dedykowanych tworzeniu bibliotek wirtualnych [33].

Większość z nich wykorzystuje znane bloki budulcowe oraz reakcje chemiczne, umożliwiając przygotowanie łatwych do syntezy cząsteczek, z których często korzysta się w kampaniach wirtualnych badań przesiewowych (ang. *virtual screening*) [34].

2. INFRASTRUKTURA EKSPERYMENTALNYCH BIBLIOTEK ZWIĄZKÓW

Biblioteki eksperymentalne zwykle składają się z czterech zasadniczych elementów: 1) centralnego magazynu próbek, 2) oprogramowania oraz bazy danych pozwalających analizować zgromadzone w testach przesiewowych dane doświadczalne, 3) zestawu analitycznego, który pozwala na bieżąco śledzić, jakość zdeponowanych związków oraz 4) zautomatyzowanych stacji pipetujących, służących przygotowaniu płytek macierzystych oraz ich dalszej replikacji [35].



Rysunek 1. Schemat przykładowej infrastruktury eksperymentalnej biblioteki związków chemicznych
 Figure 1. Schematic diagram of an example infrastructure of experimental chemical compounds library

W skład zaawansowanych systemów analitycznych pozwalających na bieżąco kontrolować, jakość zdeponowanych w bibliotece próbek wchodzi wysokosprawny chromatograf ciekowy (HPLC) wyposażony, w co najmniej trzy niezależne detektory wykorzystujące różne metody detekcji [36]. Spektrometr masowy służy głównie celom identyfikacji substancji, która w zarejestrowanym widmie mas powinna dawać spodziewany sygnał jonu molekularnego bądź pseudomolekularnego. Z kolei czystość próbki określa się metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej zwykle z użyciem detektora z matrycą fotodiodową DAD (ang. *Diode Array Detector*), a w przypadku cząsteczek słabo absorbujących bądź też nieabsorbujących promieniowania w zakresie Uv-Vis aerozolowego detektora promieniowania rozproszonego ELSD (ang. *Evaporative Light Scattering Detector*) [37]. Substancje przeznaczone do badań przesiewowych standardowo rozpuszcza się w dimetylosulfotlenku (DMSO) i przechowuje w zabezpieczonych płytkach wielodołkowych. Niestety wysoka higroskopijność DMSO sprawia, iż po upływie pewnego czasu zdarza się obserwować

wytrącanie części substancji rozpuszczonej, szczególnie w przypadku związków o podwyższonej lipofilowości [38]. Dlatego szczególną uwagę przywiązuje się do problemu zmian stężenia roztworów przechowywanych przez dłuższy okres czasu. Stężenia substancji zawierających atomy azotu oznacza się zwykle metodami chromatografii cieczowej z użyciem detektorów chemiluminescencji azotu CLND (ang. *Chemiluminescent Nitrogen Detector*) [39]. W przypadku roztworów substancji nie zawierających atomów azotu stosuje się głównie metody analizy ilościowej oparte na technice ^1H NMR, w tym szczególnie popularną metodę wzorca wewnętrznego [40].

Najważniejszy element biblioteki eksperymentalnej stanowi jednak baza danych zawierająca zbiór zakodowanych w odpowiednim formacie [41] informacji niezbędnych do zidentyfikowania zdeponowanych w jej infrastrukturze związków. Standardowo oprócz danych strukturalnych w bazie danych umieszcza się również informacje o dostępnej ilości, czystości oraz miejscu i warunkach przechowywania próbki. Ponadto baza danych często zawiera kluczowe z punktu widzenia opracowywania procedur testów przesiewowych wyniki badań fizykochemicznych. Przykładowo związki wykazujące silną wewnętrzną fluorescencję, w testach przesiewowych z detekcją fluorescencyjną będą dawać wyniki fałszywie dodatnie (ang. *false positives*) [42]. Z tego względu w bazie danych umieszcza się dodatkową adnotację o możliwej koincydencji ich właściwości z detektorem fluorymetrycznym.

3. PROJEKTOWANIE STRUKTURY I WŁAŚCIWOŚCI BIBLIOTEK

Podczas tworzenia bibliotek związków pierwszej generacji, jakie pojawiły się na początku lat dziewięćdziesiątych nie przywiązywano większej wagi do sposobu ich przygotowywania starając się przeszukiwać jak największe kolekcje w możliwie najkrótszym czasie.

Pomimo wdrożenia zaawansowanych technologii, a w szczególności wysoko-wydajnych metod przesiewania, które obecnie pozwalają testować dziennie zasoby dochodzące nawet do 1 miliona związków [43], nie zaobserwowano znaczącego zwiększenia częstotliwości odkrywania nowych substancji wiodących. Wynika z tego, iż powodzenie kampanii poszukiwania nowych substancji wiodących należy uzależnić nie tyle od ilości, co od właściwego wyboru cząsteczek reprezentujących niewielkie fragmenty przestrzeni chemicznej.

Podjęcie do zagadnień projektowania właściwości bibliotek zależy w pierwszej kolejności od aktualnego stanu wiedzy o celu biologicznym oraz rozpoznanych możliwości modulacji jego aktywności. Biblioteki generyczne (ang. *generic, unbiased, random*) odpowiadają potrzebie badań przesiewowych skierowanym na nowo odkryte cele biologiczne, których struktura nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Biblioteki generyczne można przygotowywać w drodze bezpośredniej selekcji cząsteczek spośród znanych kolekcji związków [44]. Znacznie częściej biblioteki generyczne przygotowuje się *de novo* funkcjonalizując szkielet znanych cząsteczek,

wykorzystując strategię syntezy zorientowanej na różnorodność (ang. *Diversity Oriented Synthesis, DOS*) [45].

Biblioteki generyczne przygotowywane metodą bezpośredniej selekcji zwykle zawierają cząsteczki przypominające budową motywy strukturalne znanych leków, a przez to zwane popularnie „uprzywilejowanymi” (ang. *privileged scaffolds*) [46], bądź też zawierające kluczowe z punktu widzenia oddziaływań wiążących farmakofory [47]. Najczęściej korzysta się jednak ze zbiorów cząsteczek, które nie zawierają, co prawda uprzywilejowanych motywów struktury, ale bogate są w łatwe do funkcjonalizacji grupy funkcyjne stanowiąc cenne substraty do syntezy zorientowanej na różnorodność.

Synteza zorientowana na różnorodność to umyślna, równoczesna i efektywna synteza więcej niż jednego strukturalnie zróżnicowanego związku docelowego o zaawansowanym stopniu skomplikowania szkieletu [48]. W syntezie zorientowanej na różnorodność dostępne bloki budulcowe służą wzbogaceniu szkieletu związku wiodącego w dodatkowe grupy funkcyjne oraz relacje stereochemiczne.

Ścieżki syntetyczne stosowane w syntezie zorientowanej na różnorodność powinny być nie tylko rozgałęzione, ale również rozbieżne (ang. *divergent*), pozwalając w ten sposób na szybkie i efektywne przekształcenie zbioru prostych i stosunkowo podobnych do siebie związków w reprezentatywny zbiór cząsteczek o większym stopniu skomplikowania struktury szkieletu i płynącej stąd różnorodności [49].

Skonstruowane w ten sposób biblioteki generyczne mogą obejmować swym zakresem bardzo odległe obszary przestrzeni chemicznej, a płynąca z nich różnorodność pozwala szczegółowo analizować funkcje enzymów zaangażowanych w kluczowe szlaki biochemiczne dostarczając niezbędnych informacji o kluczowych celach terapeutycznych.

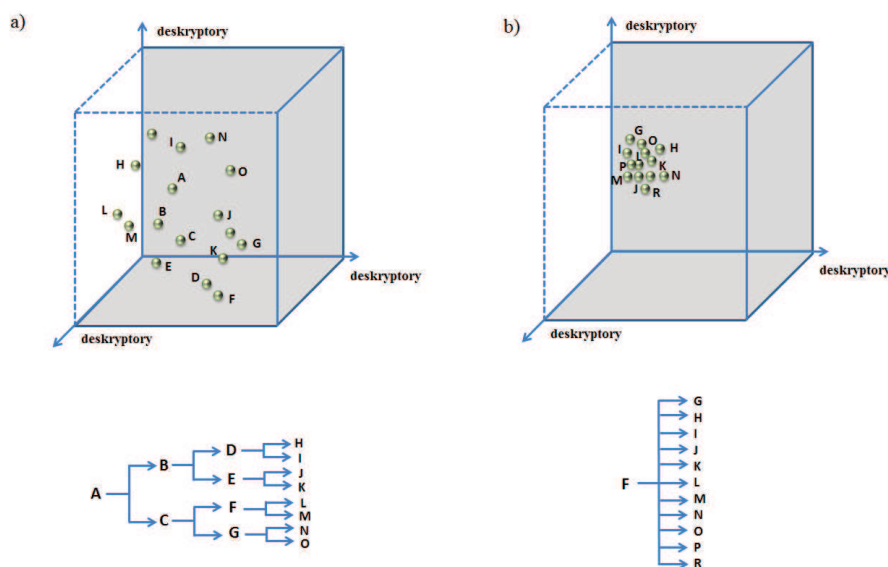
Biblioteki ukierunkowane (ang. *focused, biased, directed*) [50] zwykle przygotowuje się z myślą o badaniach przesiewowych wobec określonego przedstawiciela danej klasy enzymów.

Proces doboru cząsteczek spośród większych i bardziej zróżnicowanych kolekcji opiera się na szczegółowych informacjach o strukturze docelowego enzymu, a przynajmniej na znajomości kluczowych farmakoforów zaangażowanych w proces wiązania ligandów. Często biblioteki ukierunkowane wyprowadza się z większych kolekcji znanych związków w procesie selekcji *in silico* [51]. Zarówno na etapie wstępnego doboru kandydatów, jak i dalszej ewaluacji bibliotek ukierunkowanych korzysta się powszechnie z algorytmów genetycznych [52], które przeszukując duże przestrzenie możliwych rozwiązań pozwalają znaleźć najlepsze, chociaż wcale niekoniecznie optymalne rozwiązanie dla skomplikowanych i wielowymiarowych problemów optymalizacji.

Weber i współpracownicy [53] posłużyli się algorytmem genetycznym w procesie projektowania biblioteki kombinatorycznej celowanej na trombinę, znajdując silny inhibitor w cyklu syntezy zaledwie 400 ze 160,000 możliwych związków.

Biblioteki celowane (ang. *target-family-oriented libraries*) [54] skierowane są na poszczególne klasy enzymów takie jak metaloproteazy, kinazy czy fosfatazy. Tworząc biblioteki celowane dysponuje się zwykle niekompletnym zbiorem informacji, które dają pewne tylko wyobrażenie o możliwej strukturze docelowego miejsca wiążącego. Niemniej jednak poszukując nowej substancji aktywnej wobec przedstawiciela znanej klasy enzymów, wystarczy posłużyć się celowaną biblioteką bliskich analogów wcześniej rozpoznanej substancji wiodącej. Przykładowo Rice i współpracownicy [55] wychodząc ze struktury wiodącej jednego z rozpoznanych inhibitorów fosfatazy przygotowali bibliotekę celowaną, dzięki której udało się znaleźć nowe inhibitory dla czterech różnych fosfataz, o podwójnej specyficzności.

Strategia syntezy ukierunkowanej na cel (ang. *Target Oriented Synthesis, TOS*) służy przygotowaniu struktury wiodącej, z której w drodze dalszej funkcjonalizacji wyprowadza się ukierunkowaną bibliotekę strukturalnie spokrewnionych analogów. Obecnie w literaturze znanych jest wiele uprzywilejowanych chemotypów (ang. *privileged structures*) [56], których dalsza funkcjonalizacja prowadzi do wielu grup aktywnych modulatorów strategicznych celów biologicznych [57].



Rysunek 2. Porównanie struktury przestrzeni chemicznej oraz strategii syntezy dla: a) bibliotek generycznych oraz b) bibliotek ukierunkowanych

Figure 2. A comparison of chemical space structure and synthetic strategy for: a) generic libraries and b) directed libraries

Chociaż biblioteki ukierunkowane wokół jednego tylko, konkretnego chemotypu reprezentują niewielki fragment przestrzeni chemicznej, to pozwalają wyprowadzać kluczowe z punktu widzenia projektowania leków zależności, jakie zarysowują się między strukturą a wynikającą z niej aktywnością. Biblioteki ukierunkowane przygotowuje się najczęściej metodami TOS wykorzystując przy tym strategię analizy retrosyntetycznej.

4. NORMALIZACJA I PROFILOWANIE WŁAŚCIWOŚCI BIBLIOTEK METODAMI *IN SILICO*

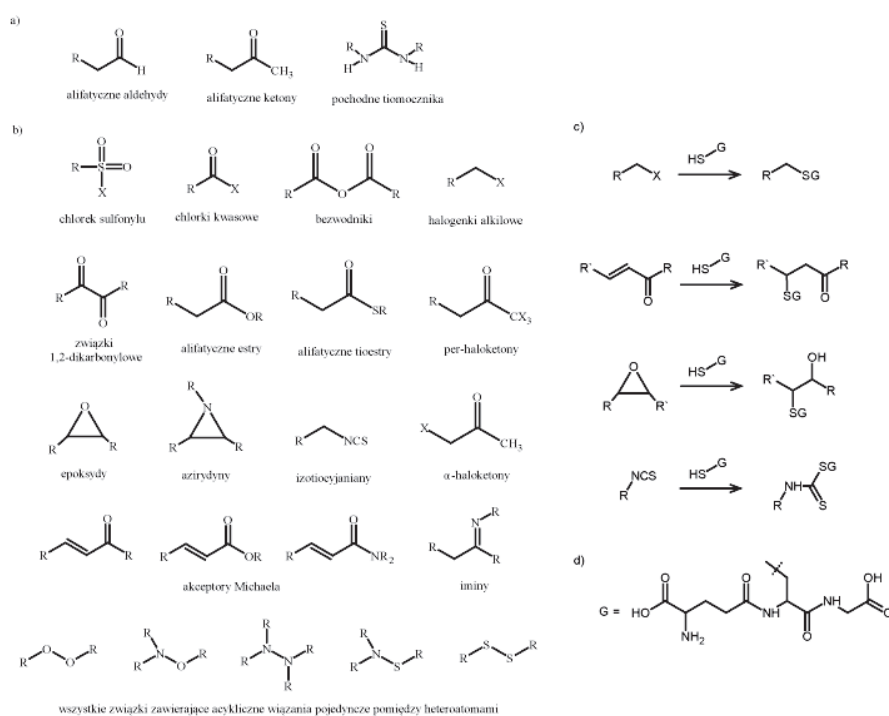
Wszystkie dostępne informacje o związkach zdeponowanych w bibliotece eksperymentalnej muszą zostać zgromadzone w centralnej bazie danych, gdzie poddaje się je kolejno zabiegom normalizacji. Stosując narzędzia chemoinformatyczne przeznaczone specjalnie do obsługi baz danych w pierwszej kolejności usuwa się symbole izotopów, cząsteczek wody hydratacyjnej i przeciwjonów, następnie przeprowadza się standaryzację ładunków formalnych, a na końcu potwierdza się zgodność otrzymanej w ten sposób dwuwymiarowej reprezentacji struktury z obowiązującymi zasadami wartościowości [58]. Na szczególną uwagę zwraca się również przy standaryzacji informacji o obecności centrów stereogenicznych, gdyż powszechnie stosowane wzory klinowe są niewłaściwie przetwarzane przez większość systemów komputerowych [59], co przy późniejszej konwersji reprezentacji dwuwymiarowych na strukturę przestrzenną może prowadzić do rażących błędów w analizie SAR (ang. *Structure-Activity Relationship*) [60].

Operacje porządkowania i standaryzacji baz danych prowadzi się zwykle na liniowych reprezentacjach struktury zapisanej w kanonicznym kodzie SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) [61]. Kod kanoniczny SMILES pozwala przetransponować dowolny wzór strukturalny do postaci zapisu liniowego, który można z kolei łatwo przeprowadzić w kod alfanumeryczny ASCII (ang. *American Standard Code for Information Interchange*), przez co nadaje się do indeksowania substancji zawartych w bazach danych. Kodowanie cech strukturalnych w postaci wektorów binarnych (przedstawianych w postaci ciągu jedynek i zer) ma tę dodatkową zaletę, iż pozwala na szybką i jednoznaczną identyfikację określonych cech struktury. Przed przystąpieniem do przesiewania zasobów oraz analizy stopnia zróżnicowania struktury bibliotek, wszystkie cechy strukturalne cząsteczek należy wyrazić w postaci liczbowej za pomocą odpowiednio wybranych deskryptorów.

Porządkowanie zasobów baz danych chemicznych bibliotek obejmuje między innymi analizę zawartości, gdzie poszukuje się podwielokrotności tej samej substancji. W przypadku stwierdzenia w bibliotece obecności kilku próbek tej samej substancji zwykle zachowuje się próbkę o największym stopniu czystości. Uporządkowaną w ten sposób bazę danych poddaje się następnie przesiewaniu właściwości, które zwykle ma na celu wybranie tylko tych spośród milionów zdeponowanych struktur, które spełniają założone kryteria. Należy przy tym jednak pamiętać, iż od doboru właściwych kryteriów przesiewania właściwości zależeć będzie, jakość otrzymanej w ten sposób biblioteki. W przypadku niewłaściwie dobranych kryteriów istnieje uzasadniona obawa nieumyślnego przeoczenia tych cząsteczek, które formalnie nie spełniają założonych kryteriów a mimo to wykazują pożądaną aktywność.

Rozpoznanych jest obecnie kilkanaście typów klas związków, które w testach przesiewowych zwykły dawać wyniki fałszywie dodatnie [62]. Z tego właśnie względu przyjęło się w pierwszej kolejności przesiewać bazy danych pod kątem nie-

požadanych właściwości fizykochemicznych [63] oraz toksycznych [64]. Stosując odpowiednio dobrane filtry [65] požadanych właściwości z baz danych usuwa się wszystkie związki zawierające w strukturze reaktywne, jak również hydrolytycznie niestabilne, ugrupowania. W szczególności należy tutaj wspomnieć o takich klasach związków jak chlorki kwasowe, bezwodniki, epoksydy, akceptory reakcji Michaëla, estry kwasów sulfonowych, iminy i inne [66]. Związki zawierające reaktywne grupy funkcyjne wchodzą w reakcje z glutationem oraz grupami tiolowymi peptydów i białek wykazując słabą stabilność w osoczu krwi ludzkiej. Należy odrzucić również wszystkie cząsteczki zawierające w swej strukturze fragmenty ugrupowań podejrzanych o działanie cytotoksyczne a w szczególności pochodne 4-piperydonu oraz tiomocznika [67].



Rysunek 3. Wybrane klasy: a) związków podejrzanych o działanie cytotoksyczne, b) związków niestabilnych w środowisku fizjologicznym, oraz c) produktów ich reakcji z nukleofilowymi fragmentami białek i peptydów takich jak d) glutation. Na rysunku przyjęto oznaczenia: X=F, Cl, Br, I, tosyl; R=alkil, aryl, heteroaryl; G=fragment białka, bądź peptydu (np. glutation)

Figure 3. Selected examples of : a) compounds with possible cytotoxic activity, b) compounds unstable under physiological conditions, and c) products of their reactions with the nucleophilic sites of proteins and peptides such as d) glutathione. The following abbreviations are used: X=F, Cl, Br, I, tosyl; R=alkyl, aryl, heteroaryl; G=part of protein or peptide (e.g. glutathione)

Wstępnej oceny kluczowych z punktu widzenia biodostępności właściwości ADME-Tox (ang. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) można dokonać stosując dostępne narzędzia chemoinformatyczne w tym popularną platformę ZINC wykorzystującą niekomercyjną wersję programu FILTER [68]. Warto przy tym również nadmienić, iż aktualna wersja algorytmu programu FILTER zawiera nieco ponad sto empirycznych reguł oceny stabilności struktury, co pozwala odrzucić znaczącą większość reaktywnych i hydrolitycznie niestabilnych cząsteczek.

W tym miejscu należy również stanowczo podkreślić fakt, iż każdego rodzaju profilowanie właściwości prowadzi się zawsze w kontekście przyjętych oczekiwań. A zatem w przypadku bibliotek związków ukierunkowanych na leki antynowotworowe należy stosować wyłącznie „miękkie” kryteria filtrowania właściwości, w przeciwnym wypadku odrzucilibyśmy środki alkilujące z grupy β -chloroetyloamin, etylenoimin czy epoksydów, a więc znaczącą większość stosowanych dzisiaj związków o udowodnionej aktywności przeciwnowotworowej [69].

Przed przystąpieniem do wirtualnego skringingu [70] zwykle dokonuje się jeszcze parametrycznej oceny, jakości skonstruowanej biblioteki. Wszystkie reprezentacje struktur wchodzących w skład bibliotek wyraża się przez deskryptory fizykochemiczne i topologiczne, które niosą ze sobą zakodowane informacje o właściwościach makroskopowych takich jak lipofilowość czy cechach topologicznych takich jak stopień rozgałęzienia struktury [71]. Szczegółowe omówienie wszystkich typów stosowanych deskryptorów wykracza poza ramy niniejszego opracowania. Czytelnik zainteresowany zagadnieniem opisu struktury cząsteczki za pomocą deskryptorów powinien prześledzić jedną z wcześniej wydanych monografii [72]. Należy przy tym podkreślić, że mimo ciągłego wprowadzania nowych typów deskryptorów jak dotychczas nie udało się wypracować uniwersalnej metody pomiaru stopnia zróżnicowania biblioteki związków [73].

Standardowo do parametrycznej oceny stopnia zróżnicowania kolekcji związków stosuje się współczynnik Tanimoto (ang. *Tanimoto coefficient*) [74], którego wartość zmienia się w wąskim przedziale między 0 a 1. Graniczne wartości pojawiają się w przypadku, gdy porównywane ze sobą struktury nie mają wspólnych deskryptorów ($S_T = 0$) bądź też wszystkie z analizowanych deskryptorów są identyczne ($S_T = 1$).

Nierozłącznie z terminem różnorodności wiąże się również pojęcie stopnia skomplikowania struktury [75]. Choć w literaturze wciąż toczy się debata o znaczeniu stopnia skomplikowania struktury to zwykle przyjmuje się, iż bardziej złożone w swej naturze cząsteczki oddziałują z biocząsteczkami w sposób bardziej selektywny a przy tym również specyficzny [24, 76].

5. BIBLIOTEKI GENERYCZNE

Na początku lat dziewięćdziesiątych zauważono, iż przeważająca część grupy początkowo dobrze rokujących substancji nie przeszła ostatecznie nawet I fazy badań klinicznych głównie ze względu na niekorzystną charakterystykę farmakokinetyczną (ang. *pharmacokinetics*, PK) [77]. Skuteczność działania leku zależy nie tylko od pożądanej aktywności biologicznej, ale również biodostępności, która określa zdolność danej substancji do przenikania przez błony biologiczne.

Pod koniec lat dziewięćdziesiątych Lipiński [78] przeprowadził statystyczną analizę właściwości fizykochemicznych znanych leków formując słynną już dziś „regułę pięciu” (ang. *Rule of Five*, RO5) [79]. W myśl „reguły pięciu” substancję można uznać za dobrze wchłaniającą po podaniu doustnym, jeżeli jej masa cząsteczkowa nie przekracza 500 Da, wartość logarytmu ze współczynnika podziału między oktanol i wodę ($\log P$) jest mniejsza od pięciu, liczba donorów wiązania wodorowego jest mniejsza od pięciu a liczba akceptorów wiązania wodorowego wyrażona przez sumę atomów tlenu i azotu nie przekracza dziesięciu. Późniejsze uściślenia zasady pięciu nakładają dodatkowe ograniczenia na obszar powierzchni polarnej (ang. *Polar Surface Area*, PSA) zdefiniowany poprzez sumę donorów i akceptorów wiązań wodorowych, która nie powinna przekraczać dwunastu [80], natomiast liczbę wiązań zdolnych do swobodnego obrotu zwykle zawęża się do dziesięciu [81].

Przy projektowaniu bibliotek związków nie należy zapominać, iż reguła pięciu określa tylko niezbędne warunki, jakie powinien spełniać każda dobrze przyswajana po podaniu doustnym substancja i z tego względu nie powinna przesądzać o ostatecznej kwalifikacji kandydatów na substancję wiodącą. Istnieje spora grupa znanych przypadków odstępstw od reguły pięciu, do której zalicza się makrocycliczne produkty naturalne wytwarzane przez grzyby, bakterie i rośliny [82]. Substancje o masie cząsteczkowej większej niż 500 Da mogą wykazywać pożądaną biodostępność, jeżeli włączyć w ich strukturę fragmenty odpowiedzialne za usztywnienie konformacji.

Szczegółowa analiza procesu optymalizacji struktury substancji wiodącej wykazała tendencję wprowadzania podstawników, które odpowiadają za wzrost lipofilowości cząsteczki [83]. Z tego względu często zdarza się, iż kryteria doboru kandydatów na substancje wiodące zawęża się do reguły czterech zdefiniowanej analogicznie do reguły pięciu Lipińskiego. Dalsza analiza właściwości fizykochemicznych leków [84], które zostały już dopuszczone do obrotu pozwoliła uściślić kryteria doboru odpowiednich kandydatów na substancje wiodące.

Kandydat na związek wiodący nie powinien zawierać więcej niż trzech skondensowanych ze sobą pierścieni aromatycznych, bowiem tego typu fragmenty struktury sprzyjają powstawaniu w warunkach fizjologicznych cytotoksycznych epoksydów oraz chinonów [85]. Pożądane jest również, aby kandydat na substancję wiodącą zawierał mniej niż cztery atomy halogenu, przy czym ze względu na szczególnie właściwości farmakoforów zawierających atomy fluoru [86], dopuszcza się współistnienie dwóch grup CF_3 . W końcu należy mieć również na uwadze fakt, iż zmniejszenie długości alifatycznego łańcucha oraz wielkości makrocyclicznego

pierścienia zawierającego do 22 atomów przyczynia się do ograniczenia labilności konformacyjnej, a tym samym ułatwia racjonalne projektowanie dalszych analogów substancji wiodącej.

6. BIBLIOTEKI FRAGMENTÓW

Biblioteki fragmentów (ang. *fragment-based libraries*) składają się z niewielkich cząsteczek o stosunkowo niskim powinowactwie do celów biologicznych, które zwyczajowo przyjęło się nazywać „fragmentami” [87]. Biblioteki fragmentów złożone z cząsteczek o niewielkim stopniu skomplikowania struktury odznacza szczególnie wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia komplementarnego układu oddziaływań wiążących.

Związki zaliczane do biblioteki fragmentów muszą spełniać ściśle określone kryteria zwane popularnie „regułą trzech” (ang. *rule of three*, RO3) [88], Zgodnie z regułą trzech związki wchodzące w skład biblioteki fragmentów powinny posiadać masę cząsteczkową nie większą niż 300 Da, wartość logarytmu ze współczynnika podziału między oktanol i wodę ($\log P$) mniejszą niż trzy, a przy tym zawierać nie więcej niż trzy H-donory (HBD) i trzy akceptory wiązania wodorowego (HBA).

Ponadto należy przy tym podkreślić, iż w przypadku bibliotek fragmentów znacznie większy nacisk kładzie się na wypadkową liczbę ciężkich atomów niż na masę cząsteczkową, bowiem atomy o wysokiej liczbie atomowej takie jak atomy bromu czy jodu wnoszą znaczący wkład w masę cząsteczkową. Z tego względu właściwości bibliotek fragmentów przyjęło się charakteryzować w oparciu o dodatkowy parametr zwany „efektywnością liganda” (ang. *Ligand Efficiency*, *LE*) zdefiniowany poprzez uśrednioną wartość energii wiązania, która przypada na pojedynczy atom bądź jednostkę masy [89]. Jeżeli jednak „efektywność liganda” musimy odnieść do jego masy cząsteczkowej wówczas należy posługiwać się procentowym indeksem efektywności (ang. *percentage efficiency index*) lub indeksem efektywności wiązania (ang. *binding efficiency index*) [90]. Dla typowej substancji o masie cząsteczkowej 333 Da hamującej w połowie aktywność enzymu przy stężeniu 10 μM procentowy indeks efektywności wynosi 1,5. Niskie wartości IC_{50} mieszczące się zazwyczaj między 0,1 a 1,0 mM, sprawiają, iż związki tworzące biblioteki fragmentów muszą być testowane przy stosunkowo wysokich stężeniach [91]. Naturalnym ograniczeniem stosowania biblioteki fragmentów w badaniach przesiewowych wydaje się być rozpuszczalność samego liganda, która powinna pozwalać na przygotowanie roztworów o odpowiednio wysokim stężeniu [92].

Niskie powinowactwo, słaba rozpuszczalność oraz konieczność stosowania wysokich stężeń sprawiają, iż w badaniach przesiewowych, w których korzysta się z bibliotek fragmentów częściej udaje się natrafić na substancję aktywną niż ma to zwykle miejsce w przypadku analogicznych bibliotek substancji lekoopodobnych.

Liczbę cząsteczek zawierających do 11 atomów, a których masa cząsteczkowa nie przekracza 300 Da szacuje się na około 13 milionów, co znacząco zawęża obszar

przestrzeni chemicznej, a jednocześnie również wielkość reprezentujących ją bibliotek fragmentów. Wielkość bibliotek fragmentów zmienia się w dosyć szerokim zakresie między 100 a 500 cząsteczek dla typowej wielkości bibliotek celowanych dochodząc nawet do 20,000 związków w przypadku bibliotek generycznych. Zwykle jednak typowe biblioteki fragmentów zawierają od 2 do 5 tysięcy związków [93] reprezentując przy tym porównywalnej wielkości fragment przestrzeni chemicznej, co liczące kilka milionów biblioteki związków lekopodobnych [94].

Przygotowując biblioteki fragmentów korzysta się zwykle z zasobów wirtualnych baz danych takich jak wcześniej już wspomniane bazy GDB-10 czy GDB-13. Alternatywne podejście do sposobu konstrukcji bibliotek fragmentów opiera się na wyprowadzeniu uprzywilejowanych fragmentów struktury ze znanych już cząsteczek leków. Analiza zasobów bazy CMC (ang. *Comprehensive Medicinal Chemistry*) dostarczyła 32 typy unikalnych szkieletów, które spotyka się w blisko połowie znanych leków [95]. Łącząc w drodze kombinatorycznej uprzywilejowane fragmenty szkieletów i łańcuchów bocznych [96] wyprowadzono bibliotekę SHAPES liczącą w pierwowzorze 132 fragmenty [97]. Wszystkie związki z biblioteki fragmentów SHAPES cechuje niewielka masa cząsteczkowa między 68-341 Da, dobra rozpuszczalność w wodzie, wysoka trwałość chemiczna oraz brak tendencji do agregacji przy stężeniu 1 mM.

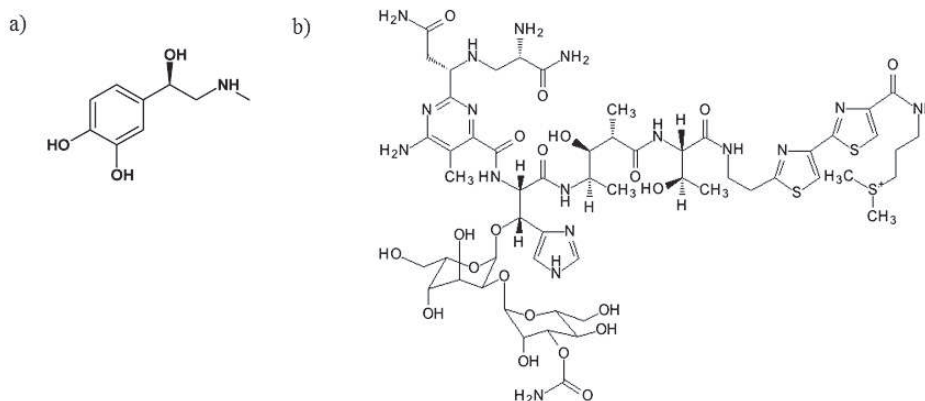
Z kolei procedura kombinatorycznej analizy retrosyntetycznej (ang. *Retrosynthetic Combinatorial Analysis Procedure*, RECAP) [98] stanowi oryginalne uzupełnienie opartej na samym tylko podobieństwie kształtów metodzie SHAPES.

Należy podkreślić, iż metody RECAP i SHAPES należy stosować ze szczególną ostrożnością, często, bowiem składowe fragmenty struktury, wiążą się w zupełnie innych miejscach niszy wiążącej, niż cząsteczka wyjściowego liganda, z której zostały wyprowadzone [99].

Projektując bibliotekę fragmentów należy brać pod uwagę również możliwości późniejszej funkcjonalizacji pierwotnie wyselekcjonowanej grupy fragmentów. Należy przy tym unikać wprowadzania reaktywnych fragmentów a w szczególności grup funkcyjnych, które mogłyby zakłócać przebieg testów enzymatycznych. Te dwa z pozoru przeciwstawne zadania udaje się rozwiązywać przez uwzględnienie strategii maskowania reaktywnych grup funkcyjnych [100].

7. BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW NATURALNYCH

Przyroda dysponując ograniczoną liczbą bloków budulcowych wypracowała niespotykaną w warunkach laboratoryjnych bioróżnorodność. Na Rysunku 4 przedstawiono dwa przykłady spotykanych w przyrodzie związków organicznych o granicznym zróżnicowaniu struktury.



Rysunek 4. Przykłady bioróżnorodności spotykanej w strukturze naturalnych związków organicznych: a) adrenalina, b) antybiotyk glikopeptydowy – bleomycyna

Figure 4. Examples of biodiversity encountered in natural organic compounds: a) adrenaline, b) antibiotic – bleomycin

Znanych jest dziś wiele mikroorganizmów, które przystosowały się do życia w ekstremalnych warunkach środowiska, jakie panują na lodowcach polarnych [101], głębinach morskich [102] i ciemnych jaskiniach [103]. Mikroorganizmy stanowią jedno z najbogatszych źródeł zróżnicowanych względem struktury i właściwości substancji biologicznie aktywnych, które wykorzystuje się obecnie, jako składniki aktywne leków z grupy antybiotyków, immunosupresantów czy też obniżających poziom cholesterolu we krwi statyn. Ocenia się, że na Ziemi spotkać można blisko 1,5 miliona możliwych gatunków grzybów oraz 1,5 milionów gatunków glonów i organizmów prokariotycznych [104]. Z 250,000 gatunków roślin, jakie mogą zamieszkiwać ziemię tylko 10% posłużyło dotychczas, jako źródło materiału do oceny aktywności biologicznej [105]. Inne źródła substancji aktywnych, a w tym morskie ślimaki oraz insekty [106], ze względu na trudności z izolacją wystarczającej ilości związku aktywnego mają obecnie jedynie drugorzędne znaczenie, i nie będą tu dyskutowane.

Standardową bibliotekę związków naturalnych przygotowuje się w oparciu o bioróżnorodność spotykaną w królestwie roślin oraz organizmów prokariotycznych.

W niniejszej pracy ograniczymy się jedynie do bibliotek substancji naturalnych pozyskanych z ekstraktów roślinnych. Wybrane metody selekcji gatunków roślin bogatych w różnorodne substancje aktywne omówiono szczegółowo w wielu pracach przeglądowych [107].

Wyselekcjonowany materiał roślinny [108] poddaje się zabiegom utrwalania, które mają na celu zapobiec enzymatycznej hydrolizie składników aktywnych. W tym celu surowy materiał roślinny poddaje się najczęściej suszeniu w umiarkowanej temperaturze chroniąc go przed dostępem światła [109]. W przypadku szczególnie nietrwałych substancji aktywnych materiał roślinny utrwalą się przez zamrażanie, liofilizację bądź działanie par alkoholu. Po utrwaleniu materiał roślinny

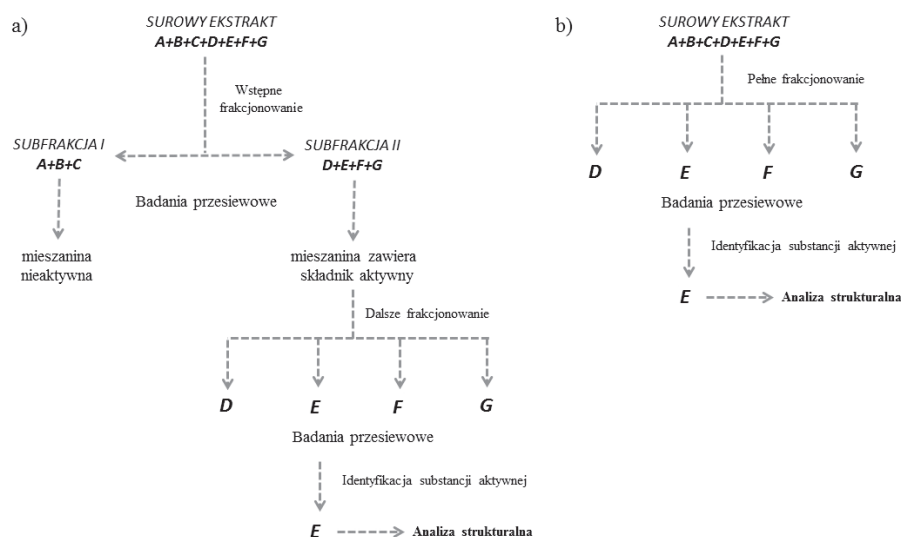
rozdrabnia się w odpowiednich moździerzach do konsystencji proszku, który poddaje się w dalszej kolejności procesowi ekstrakcji. Jeżeli nie jest znana natura chemiczna składników, wówczas procedura izolacji składników aktywnych obejmuje kilka następujących po sobie procesów ekstrakcji z użyciem coraz bardziej polarnych rozpuszczalników lub ich mieszanin. Surowy ekstrakt poddaje się często procesowi usuwania domieszek tanin znanych ze swoich zdolności do wytrącania białek [110], a przez to mogących wpływać niekorzystnie na przebieg testów enzymatycznych stosowanych w badaniach przesiewowych.

Surowy ekstrakt przyjęło włączać się do biblioteki związków naturalnych, jednak obecne w ekstrakcie domieszki substancji cytotoksycznych mogą skutecznie maskować aktywność pozostałych składników. Z tego względu surowy ekstrakt zwykle poddaje się procesowi subfrakcjonowania upraszczając w ten sposób identyfikację poszczególnych składników [111]. Chociaż w zależności od zastosowanej metody oczyszczania poszczególne subfrakcje mogą nawet w znacznym stopniu różnić się czystością, to zwykle jednak przeważają mieszaniny kilku tylko składników. W przypadku odnotowania aktywności w badaniach przesiewowych zebrane subfrakcje rozdziela się w preparatywnym systemie wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) na indywidualne składniki, które bada się ponownie pod kątem pożądanej aktywności.

Z kolei w popularnej strategii frakcjonowania nakierowanego na bioaktywność [112] (ang. *bioactivity-guided fractionation*), surowy ekstrakt rozdziela się bezpośrednio z pominięciem etapu subfrakcjonowania na frakcje indywidualnych składników, z których każda poddawana jest z osobna testom przesiewowym. Zdarza się jednak, iż w trakcie procesu frakcjonowania traci się bezpowrotnie te spośród składników aktywnych, które w ekstrakcie występowały w nieznacznych tylko ilościach.

Ponadto strategia frakcjonowania nakierowanego na bioaktywność pomija aspekt synergizmu farmakodynamicznego [113], w którym przyjmuje się, że za obserwowany efekt biologiczny odpowiada kombinacja składników aktywnych. Efekt synergizmu farmakodynamicznego [114] obserwowano już wcześniej min. w badaniach nad składnikami żeń-szenia właściwego (łac. *Panax ginseng*) [115], gdzie materiał roślinny wykazywał wyższą aktywność niż mogłoby to wynikać z prostego sumowania aktywności poszczególnych jej składników.

Stosowanie frakcji czystych składników w testach przesiewowych ma jednak tę dodatkową zaletę, iż pozwala nieznacznie ograniczyć koszty badań strukturalnych gdyż tylko frakcja składnika aktywnego poddawana jest szczegółowej analizie fizykochemicznej. Z drugiej jednak strony połączenie zaawansowania technik przepływowych i metod spektroskopowych, a w szczególności metod magnetycznego rezonansu jądrowego, pozwala dziś ustalać strukturę związków naturalnych wyizolowanych w ilości nie większej niż 1 mg [116].



Rysunek 5. Najpopularniejsze strategie przygotowywania i przesiewania bibliotek związków naturalnych: a) subfrakcjonowanie, b) frakcjonowanie nakierowane na bioaktywność

Figure 5. The most common strategies of preparation and activity screening of natural compounds libraries: a) subfractionation, b) subfractionation focused on bioactivity

Niestety biblioteki związków naturalnych nie są pozbawione szeregu wad, które znacznie ograniczają możliwości ich praktycznego wykorzystania. Po pierwsze, przygotowanie kolekcji związków naturalnych jest bardzo kosztowne obejmuje, bowiem konieczność sprowadzenia z odległych zakątków rzadkich a przez to drogich gatunków roślin, zwierząt i grzybów. W przypadku stwierdzenia obecności substancji aktywnej w badanym ekstrakcie należy wykonać żmudny a przy tym czasochłonny zabieg dekonwolucji mieszaniny, który pozwala zidentyfikować składnik aktywny. W przypadku, gdy uda się wyizolować nieopisany jak dotąd w literaturze związek należy przeprowadzić dodatkowe badania zmierzające do ustalenia struktury, które wymagają stosowania zaawansowanych metod spektroskopowych [117]. Nierzadko zdarza się jednak, iż z trudem wyizolowana substancja aktywna znana jest już od dłuższego czasu, a co gorsza już została opatentowana. Podobna sytuacja miała wcześniej miejsce np. w przypadku ginkgolidów wyizolowanych z ekstraktu z *Ginkgo biloba* [118]. Aby uniknąć kosztownej izolacji znanych już związków skład surowych ekstraktów ocenia się przy wykorzystaniu metod chromatograficznych i spektroskopowych [119]. Przykładowo niewielką próbkę surowego ekstraktu rozdziela się metodą chromatografii cienkowarstwowej, a wybarwione specjalną mieszaniną wywoływacza składniki ekstrahuje się z adsorbenta polarnym rozpuszczalnikiem. Zarejestrowane dla otrzymanego roztworu widmo spektrofotometryczne poddaje się analizie porównawczej z wcześniej przygotowaną biblioteką widm znanych związków.

Z kolei nowo zidentyfikowana substancja aktywna często występuje w ekstrakcie w ilości niewystarczającej do dalszej ewaluacji jej właściwości farmakologicz-

nych. O ile to możliwe proces izolacji substancji aktywnej należy wówczas powtórzyć w skali technicznej. Jak to już wcześniej oszacował McChesney [120] 50 kg surowego materiału wystarcza do pozyskania około 500 mg aktywnego składnika w postaci nadającej się do użycia w większości biotestów.

Natomiast badania przedkliniczne a później również testy kliniczne wymagają aż 2 kg czystej postaci związku aktywnego, którą można pozyskać wykorzystując do tego celu nawet 200 ton wyjściowego materiału. Przykładowo 12 tysięcy drzew cisa zachodniego (łac. *T. brevifolia*) dostarcza 27 tysięcy ton kory, co wystarcza do izolacji zaledwie 2,5 kg taksolu, związku o udowodnionej aktywności przeciwnowotworowej [121].

Z tego względu należy rozważyć również alternatywne źródła pozyskiwania większych ilości substancji aktywnych. Alternatywne metody pozyskiwania taksolu opierają się na zastosowaniu kultur komórkowych oraz kultur korzeni włośnikowatych [122]. Należy tutaj wspomnieć również o możliwościach wykorzystania metod inżynierii genetycznej, których pełniejsze wykorzystanie pozwoli otrzymywać zadowalające ilości związków aktywnych ze szczepów modyfikowanych genetycznie [123].

PODZIĘKOWANIA

Praca częściowo finansowana w ramach projektu EU-OPENSREEN, European Infrastructure of Open Screening Platforms for Chemical Biology, FP7-INFRASTRUCTURES-2010-1, numer Projektu 261861.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Casey, Designing Chemical Compound Libraries for Drug Discovery, December 1, 2005, [on-line], Business Intelligence Network, dostępny w Internecie: <http://www.b-eye-network.com/view/2039>.
- [2] E.A. Martis, R. Radhakrishnan, R.R. Badve, J. Appl. Pharm. Sci., 2011, **1**, 2.
- [3] H.D. Holtje, W. Sippl, D. Rognan, G. Folkers, *Molecular Modeling – Basic Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim, 2008, 3rd ed.
- [4] a) L.A. Thompson, J.A. Ellman, Chem. Rev., 1996, **96**, 555; b) E.E. Kim, C.T. Baker, M.D. Dwyer, M.A. Murcko, B.G. Rao, R.D. Tung, M.A. Navia, J. Am. Chem. Soc., 1995, **117**, 1181.
- [5] a) M. Paturej, M. El Fray, Polimery, 2009, **54**, 179; b) V. Kholodovych, A.V. Gubskaya, M. Bohrer, N. Harris, D. Knight, J. Kohn, W.J. Welsh, Polymer, 2008, **49**, 2435; c) S. Brocchini, K. James, V. Tangpasuthadol, J. Kohn, J. Biomed. Mater. Res., 1998, **42**, 66; d) C.H. Reynolds, J. Comb. Chem., 1999, **1**, 297.
- [6] a) A. Knappik, L.M. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellnhofer, A. Hoess, J. Wolle, A. Pluckthun, B. Virnekas, J. Mol. Biol., 2000, **296**, 57; b) M. Littre, M. Welschof, M. Braunagel, L. Hermes, C. Christ, A. Keller, P. Rohrbach, T. Kurschner, S. Schmidt, C. Kleist, P. Terness, J. Immunol. Methods, 1999, **231**, 3; c) K. Charlton, W.J. Harris, A.J. Porter, Biosens. Bioelectron.,

- 2001, **16**, 639; d) C.W. Cobaugh, J.C. Almagro, M. Pogson, B. Iverson, G. Georgiou, *J. Mol. Biol.*, 2008, **378**, 622.
- [7] a) V.J. Hruby, J.-M. Ahn, S. Liao, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, **1**, 114; b) P.J. Schatz, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, **5**, 487.
- [8] M. Denault, J.N. Pelletier, *Methods Mol. Biol.*, 2007, **352**, 127.
- [9] a) M. Famulok, A. Jenne, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, **2**, 320; b) E.M. LeProust, B.J. Peck, K. Spirin, H.B. McCuen, B. Moore, E. Namsaraev, M.H. Caruthers, *Nucl. Acids Res.*, 2010, **38**, 2522.
- [10] a) H.S. Zaher, P.J. Unrau, *Methods in Molecular Biology*, v. 288: *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, P. Herdewijn (ed.), Humana Press Inc., b) M.A. Cleary, K. Kilian, Y. Wang, J. Bradshaw, G. Cavet, W. Ge, A. Kulkarni, K. Chang, N. Sheth, E. Leproust, E.M. Coffey, J. Burcharth, W.R. McCombie, P. Linsley, G.J. Hannon, *Nat. Methods*, 2004, **1**, 241.
- [11] S. Rafique, M. Idrees, A. Nasim, H. Akbar, A. Athar, *Biotech. Mol. Biol. Rev.*, 2010, **5**, 38.
- [12] D. Chen, V. Milacic, M. Frezza, Q.P. Dou, *Curr. Pharm. Des.*, 2009, **15**, 777.
- [13] M.S. Arayne, N. Sultana, U. Haroon, M.A. Mesaik, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2009, Article ID 914105.
- [14] V. Badmaev, S. Prakash, M. Majeed, *J. Altern. Complement. Med.*, 1999, **5**, 273.
- [15] a) <http://www.cas.org/cgi-bin/cas/regreport.pl>, b) 63,461,917 związków na dzień 15.01.2012.
- [16] A.D. Gorse, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2006, **6**, 3.
- [17] R.S. Bohacek, C. McMartin, W.C. Guida, *Med. Res. Rev.*, 1996, **16**, 3.
- [18] P. Ertl, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2003, **43**, 374.
- [19] a) T. Fink, H. Bruggesser, J.-L. Reymond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 1504; b) T. Fink, J.-L. Reymond, *J. Chem. Inf. Model.*, 2007, **47**, 342.
- [20] M. Feher, J. M. Schmidt, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2003, **43**, 218.
- [21] Molinspiration Cheminformatics virtual Screening Toolkit, ver. 2005.03, Molinspiration Cheminformatics: Slovensky Grob, Slovak Republic, 2005.
- [22] L.C. Blum, J.-L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 8732.
- [23] J.-L. Reymond, R. van Deursen, L.C. Blum, L. Ruddigkeit, *Med. Chem. Commun.*, 2010, **1**, 30.
- [24] C.A. Lipiński, A. Hopkins, *Nature*, 2004, **432**, 855.
- [25] G.V. Paolini, R.H. Shapland, W.P. van Hoorn, J.S. Mason, A.L. Hopkins, *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**, 805.
- [26] C.M. Dobson, *Nature*, 2004, **432**, 824.
- [27] R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [28] J.L. Medina-Franco, K. Martinez-Mayorga, M.A. Giulianotti, R.A. Houghten, C. Pinilla, *Curr. Comput.-Aided Drug Des.*, 2008, **4**, 322.
- [29] T.I. Oprea, J. Gottfries, *J. Comb. Chem.*, 2001, **3**, 157.
- [30] J.-L. Reymond, R. van Deursen, *Chem. Med. Chem.*, 2007, **2**, 636.
- [31] J.-L. Reymond, R. van Deursen, L.C. Blum, L. Ruddigkeit, *Med. Chem. Commun.*, 2010, **1**, 30.
- [32] N. Nikolova, J. Jaworska, *QSAR Comb. Sci.*, 2003, **22**, 1006.
- [33] H. Patel, M.J. Bodkin, B. Chen, V.J. Gillet, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, **49**, 1163.
- [34] a) R. Kurczab, *Przemysł Farmaceutyczny*, 2011, **5**, 88; b) S. Polak, B. Wiśniowska, *Farmacja Polska*, 2009, **65**, 214; c) P. Setny, [on-line] dostępny na stronie www, http://www.icm.edu.pl/kdm/Projektowanie_leków.
- [35] U. Schopfer, F. Hohn, M. Hueber, M. Girod, C. Engeloch, M. Popov, I. Muckenschnabel, *J. Biomol. Screen.*, 2007, **12**, 724.
- [36] S. Lane, B. Boughtflower, I. Mutton, C. Paterson, D. Farrant, N. Taylor, Z. Blaxill, C. Carmody, P. Borman, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 4354.
- [37] R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 1663.

- [38] K. Oldenburg, D. Pooler, K. Scudder, C. Lipinski, M. Kelly, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2005, **8**, 499.
- [39] F. Li, C. Zhang, X. Guo, W. Feng, *Biomed. Chromatogr.*, 2003, **17**, 96.
- [40] V. Pinciroli, R. Biancardi, N. Colombo, et al. *J. Comb. Chem.*, 2001, **3**, 434.
- [41] A. Dalby, J.G. Nourse, W.D. Hounshell, A.K.I. Gushurst, D.L. Grier, B.A. Leland, J. Laufer, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1992, **32**, 244.
- [42] G.M. Rishton, *Drug Discov. Today*, 1997, **2**, 382.
- [43] L.M. Mayr, P. Fuerst, *J. Biomol. Screen.*, 2008, **13**, 443.
- [44] D.J. Huggins, A.R. Venkitaraman, D.R. Spring, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 208.
- [45] M.D. Burke, S.L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 46.
- [46] a) R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell, J.W. Darrow, D.A. Pippin, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2004, **7**, 473; b) C.D. Duarte, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 1108.
- [47] P.L. Myers, J.W. Greene, J. Saunders, S.L. Teig, *Today's Chemist at work*, 1997, **6**, 47.
- [48] D.R. Spring, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 3867.
- [49] E.J. Corey, X.-M. Cheng, *The logic of Chemical Synthesis*, Wiley, New York, 1995.
- [50] D.H. Drewry, S.S. Young, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1999, **48**, 1.
- [51] a) L. Tan, E. Loukine, J. Bajorath, *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, **48**, 2308; b) Z. Deng, C. Chuaqui, J. Singh, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 490.
- [52] a) D.E. Goldberg, *Algorytmy genetyczne i ich zastosowania*, Warszawa, WNT, 1998; b) A.L. Parrill, *Drug Discov. Today*, 1996, **1**, 514.
- [53] L. Weber, S. Wallbaum, C. Broger, K. Gubernator, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1995, **34**, 2280.
- [54] a) O. Prien, *ChemBioChem.*, 2005, **6**, 500; b) G. Muller, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 681.
- [55] R.L. Rice, J.M. Rusnak, F. Yokokawa, S. Yokokawa, D.J. Messner, A.L. Boynton, P. Wipf, J.S. Lazo, *Biochemistry*, 1997, **36**, 15965.
- [56] B.E. Evans, K.E. Rittle, M.G. Bock, R.M. DiPardo, R.M. Freidinger, W.L. Whitter, G.F. Lundell, D.F. Veber, P.S. Anderson, *J. Med. Chem.*, 1988, **31**, 2235.
- [57] a) M.E. Welsch, S.A. Synder, B.R. Stockwell, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 347; b) R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell, J.W. Darrow, D.A. Pippin, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2004, **7**, 473.
- [58] M.M. Olah, C.G. Bologa, T.I. Oprea, *Curr. Drug. Discov. Technol.*, 2004, **1**, 211.
- [59] M. Olah, M. Mracec, L. Ostopovivi, R. Rad, A. Bora, N. Hadaruga, L. Olah, M. Banda, Z. Simon, M. Mracec, T.I. Oprea, *Chemoinformatics in Drug Discovery*, T.L. Oprea, Ed.; Wiley-VCH: New York, 2004, 223.
- [60] E.A. Coats, *3D QSAR in Drug Design*, Vol. 3, H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin, Eds., Kluwer/ ESCOM, Dordrecht, 1998, str. 199.
- [61] a) D. Weininger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1988, **28**, 31; b) D. Weininger, A. Weininger, J.L. Weininger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1989, **29**, 97.
- [62] a) O. Roche, P. Schneider, J. Zuegge, W. Guba, M. Kansy, A. Alanine, K. Bleicher, F. Danel, E.M. Gutknecht, M. Rogers-Evans, W. Neidhart, H. Stalder, M. Dillon, E. Sjogren, N. Fotouhi, P. Gillespie, R. Goodnow, W. Harris, P. Jones, M. Taniguchi, S. Tsujii, W. von der Saal, G. Zimmermann, G. Schneider, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 137; b) S.L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, B.K. Shoichet, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1712; c) R.P. Sheridan, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2003, **43**, 1037.
- [63] a) H. van De Waterbeemd, D.A. Smith, K. Beaumont, D.K. Walter, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 1313; b) D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2615.

- [64] a) J. Ashby, D. Paton, *Mutation Res.*, 1993, **286**, 3; b) N. Green, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, **54**, 417.
- [65] a) P.S. Charifson, W.P. Walters, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2002, **16**, 311; b) M. Hann, B. Hudson, X. Lewell, R. Lively, L. Miller, N. Ramsden, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1999, **39**, 897.
- [66] a) T.I. Oprea, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2000, **14**, 251; b) S. Sirois, G. Hatzakis, D. Wei, Q. Du, K.-Ch. Chou, *Comput. Biol. Chem.*, 2005, **29**, 55; c) G.M. Rishton, *Drug. Disc. Today*, 1997, **2**, 382.
- [67] a) R.C. Onderwater, J.N. Commandeur, E.J. Groot, A. Sitters, W.M. Menge, N.P. Vermeulen, *Toxicology*, 1998, **125**, 117; b) G.F. Smith., *Prog. Med. Chem.*, 2011, **50**, 1.
- [68] FILTER OpenEye Scientific Software, <http://zinc.docking.org>
- [69] *Chemia leków*, Ewaryst Pawełczyk (ed.), Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1978, str. 557.
- [70] H. Xu, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, **2**, 1305.
- [71] a) E. Estrada, E. Uriarte, *Curr. Med. Chem.*, 2001, **8**, 1573; b) S. Fergus, A. Bender, D.R. Spring, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, 304.
- [72] a) R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, WILEY-VCH, 2000; b) R. Todeschini, V. Consonni, *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* (2 volumes), Wiley-VCH, 2009; c) C. Bologa, T. K. Allu, M. Olah, M. A. Kappler, T. I. Oprea, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2005, **19**, 625; d) V.J. Sykora, D.E. Leahy, *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, **48**, 1931.
- [73] E.J. Martin, J.M. Blaney, M.A. Siani, D.C. Spellmeyer, A.K. Wong, W.H. Moos, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 1431.
- [74] a) M. Hahn, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1997, **37**, 80; b) S. Renner, G. Schneider, *Chem. Med. Chem.*, 2006, **1**, 181.
- [75] a) S. Nikolić, N. Trinajstić, I.M. Tolić, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2000, **40**, 920; b) R.J. Spandl, A. Bender, D.R. Spring, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1149.
- [76] A.L. Hopkins, J.S. Mason, J.P. Overington, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2006, **16**, 127.
- [77] I. Kola, J. Landis, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2004, **3**, 711.
- [78] a) C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997, **23**, 3; b) C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **46**, 3.
- [79] C.A. Lipiński, *Drug Discov. Today: Technologies*, 2004, **1**, 337.
- [80] D.E. Clark, S.D. Pickett., *Drug Discov. Today*, 2000, **5**, 49.
- [81] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2615.
- [82] J. Clardy, C. Walsh., *Nature*, 2004, **432**, 829.
- [83] T.I. Oprea, *Mol. Divers.*, 2002, **5**, 199.
- [84] a) T.H. Keller, A. Pichota, Z. Yin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 357; b) T. Fichert, M. Yazdani, J.R. Proudfoot, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 719; c) I. Muegge, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 302; d) M.C. Wenlock, R.P. Austin, P. Barton, A.M. Davis, P.D. Leeson, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1250.
- [85] A. Luch, *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, 2005, Imperial College Press.
- [86] K. Muller, Ch. Faeh, F. Diederich, *Science*, 2007, **317**, 1881.
- [87] a) D.C. Rees, M.S. Congreve, C.W. Murray, R. Carr., *Nat Rev. Drug Discov.*, 2004, **3**, 660; b) D.A. Erlanson, R.S. McDowell, T. O'Brien, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3463.
- [88] a) M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. A. Jhoti, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 876; b) M. Cherry, T. Mitchell, *Introduction to Fragment-Based Drug Discovery*, [w:] *Fragment-Based Drug Discovery: A Practical Approach*, 2008, John Wiley&Sons, Ltd., rozdział 1.
- [89] A.L. Hopkins, C.R. Groom, A. Alex, *Drug Discov. Today*, 2004, **9**, 430.

- [90] C. Abad-Zapatero, J.T. Metz, *Drug Discov. Today*, 2005, **10**, 464.
- [91] J. Baker, T. Hesterkamp, D. Whittaker, *Drug Discov. World.*, 2008, **3**, 67.
- [92] a) L. Di, E.H. Kerns, *Drug Discov. Today*, 2006, **11**, 446; b) A. Schuffenhauer, S. Ruedisser, A.L. Marzinzik, W. Jahnke, M.J. Blommers, P. Selzer, E. Jacoby, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005, **5**, 751.
- [93] M. Hohwy, L. Spadola, B. Lundquist, P. Hawtin, J. Dahmen, I. Groth-Clausen, E. Nilsson, S. Persdotter, K. von Wachenfeldt, R.H.A. Folmer, K. Edman, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 2178.
- [94] P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik, *Science*, 1997, **278**, 497.
- [95] G.W. Bemis, M.A. Murcko, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 2887.
- [96] G.W. Bemis, M.A. Murcko, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 5095.
- [97] a) J. Fejzo, C.A. Lepre, J.W. Peng, G.W. Bemis, Ajay, M.A. Murcko, J.M. Moore, *Chem. Biol.*, 1999, **6**, 755; b) C.A. Lepre, J. Peng, J. Fejzo, N. Abdul-Manan, J. Pocas, M. Jacobs, X. Xie, J.M. Moore, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2002, **5**, 583.
- [98] X. Q. Lewell, D.B. Judd, S.P. Watson, M.M. Hann, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1998, **38**, 511.
- [99] K. Babaoglu, B.K. Shoichet, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 720.
- [100] A. Schuffenhauer, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005, **5**, 751.
- [101] a) J.C. Priscu, C.H. Fritsen, E.E. Adams, S.J. Giovannoni, H.W. Paerl, C.P. McKay, P.T. Doran, D.A. Gordon, B.D. Lanoil, J.L. Pinckney, *Science*, 1998, **280**, 2095; b) J.T. Staley, J.J. Gosink, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, **53**, 189.
- [102] a) E. Blochl, R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H.W. Jannasch, K.O. Stetter, *Extremophiles*, 1997, **1**, 14; b) H. Takami, K. Kobata, T. Nagahama, H. Kobayashi, A. Inoue, K. Horikoshi, *Extremophiles*, 1999, **3**, 97.
- [103] L. Groth, P. Schumann, B. Schuetze, K. Augsten, I. Kramer, E. Stackebrandt, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 1733.
- [104] S.L. Pimm, G.J. Russell, J.L. Gittleman, T.M. Brooks, *Science*, 1995, **269**, 347.
- [105] R. Vapoorte., *Drug Discov. Today*, 1998, **3**, 232.
- [106] a) A. Sittenfeld, R. Villers, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1993, **4**, 280; b) B. M. Olivera, C. Walker, G.E. Cartier, D. Hooper, A.D. Santos, R. Schoenfeld, R. Shetty, M. Watkins, P. Bandyopadhyay, D.R. Hillyard, *Ann. New York Acad. Sci.*, 1999, **870**, 223.
- [107] a) R. Verpoorte, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2000, **52**, 253; b) J. D. Phillipson, L.A. Anderson, *J. Ethnopharmacol.*, 1989, **25**, 61; c) A.D. Kinghorn, *Biotechnology*, 1994, **26**, 81.
- [108] E. Williamson, D.T. Okpako, F.J. Evans, *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*, 1996, Wiley, Chichester.
- [109] S.M. Rates, *Toxicon*, 2001, **39**, 603.
- [110] M. Zhu, J.D. Phillipson, P.M. Greengrass, N.E. Bowery, Y. Cai, *Phytochemistry*, 1999, **44**, 441.
- [111] M.S. Butler, *J. Nat. Prod.*, 2004, **67**, 2141.
- [112] R. Verpoorte, *J. Ethnopharmacol.*, 1989, **25**, 43.
- [113] E.M. Williamson, *Phytomedicine*, 2001, **8**, 401.
- [114] B. Gilbert, L.F. Alves, *Curr. Med. Chem.*, 2003, **10**, 13.
- [115] M. Hamburger, K. Hostettmann, *Phytochem.*, 1991, **30**, 12, 3864.
- [116] P.A. Keifer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, **7**, 388.
- [117] a) N. Bross-Walch, T. Kuhn, D. Moskau, O. Zerbe, *Chem. Biodiversity*, 2005, **2**, 147; b) G.E. Martin, R.C. Crouch, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists*, R.M.K. Carlton, W.R. Croasmun (eds.), 1994, Wiley-VCH, Weinheim.
- [118] a) *Ginkgo Biloba*, T.A. van Beek (ed.), 2000, Amsterdam, Harwood Academic Publ.; b) S. Furu-kawa, *Scientific Papers of the Institute of Physical and Chemical Research, Tokio*, 1932, **19**, 27.
- [119] a) K. Ingkaninan, A. Hazekamp, A.C. Hoek, S. Balconi, R. Verpoorte, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 2000, **23**, 2195; b) G.A. Cordell, Y.G. Shin, *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71** 1089;

-
- [120] J.D. McChesney, *Chemistry of the Amazon, Biodiversity, Nature Products and Environmental Issues*, ACS Symposium Series No. 88 American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- [121] M. Wani, H. Taylor, M. Wall, P. Coggon, A. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 2325.
- [122] Ł. Szoka, *Gazeta Farmaceutyczna*, 2009, **9**, 34.
- [123] a) C.T. Walsh, *Science*, 2004, **303**, 1805; b) J. Lau, S. Frykman, R. Regentin, S. Ou, H. Tsuruta, P. Licari, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **78**, 280.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 czerwca 2012