

# Výzkum a vývoj nových léčiv

## Úvod

**Výzkum a vývoj nových originálních léčiv je zdlouhavý, nákladný a přitom značně rizikový.** Kompletní výzkum a vývoj zcela nových léčiv, „nových chemických entit (NCE)“, si proto mohou dovolit pouze finančně velmi silné farmaceutické koncerny. Menší firmy se proto orientují nanejvýš na hledání analog zavedených léčiv, ale hlavně na vývoj a výrobu generik, kopií léčiv u nichž vypršela patentová ochrana.

Průměrné náklady na výzkum a vývoj nového léčiva činily v r. 1975 asi 150 mil. \$, nyní se vyšplhaly přes 800 mil. \$. Některé prameny přitom dokonce uvádějí částku 1,4 mld. \$, jiné však tyto údaje zpochybňují a tvrdí, že zahrnují i náklady na marketing. Vysoký růst nákladů je zapříčiněn zejména zvýšenými požadavky na bezpečnost léku. To pak vede k tomu, že stále více léků při klinických zkouškách selhává. Zcela nových léčiv je proto uváděno na světový trh každým rokem jen velmi málo. V letech 2005-2007 to bylo kolem 20 NCE za rok, v r. 2004 ještě bylo nových léčiv 36. Naopak, částky vynakládané na výzkum a vývoj léčiv přitom rostou. V r. 2005 činily náklady vynaložené na VaV léčiv asi 40 mld. \$, což bylo o asi 6% více než v r. 2004. Rychle také rostou počet patentových přihlášek i publikací věnovaných novým potenciálním léčivům. Jejich autoři jsou často pracovníci akademických institucí nebo malých firem, kteří se domnívají, že výsledky své práce výhodně prodají formou licence farmaceutickým gigantům, které vývoj léčiva dokončí. Určitou šanci mají, původ v akademických institucích má nejméně čtvrtina nových léčiv. Pravděpodobnost, že se podaří připravit nové léčivo je však jen malá – z deseti tisíců nových sloučenin se úspěšným léčivem stane jediná. Malá pravděpodobnost však neznamená pravděpodobnost nulovou, ale nutnost racionálního přístupu k výzkumu. Zjistí-li se u nějaké nové látky mimořádně zajímavé biologické účinky, je třeba učinit vše proto, aby se z této látky nebo jejich derivátů léčivo stalo. Objev a návrh nového léčiva nemusí být finančně příliš náročný, potřebné zdroje se dají zajistit formou grantů nebo účelnou spoluprací s průmyslem. Je však třeba postupovat rychle a účelně a neopomenout nic, co rozhoduje o budoucím úspěchu, zejména pak patentovou ochranu. Finančně náročné jsou až závěrečné fáze vývoje, kdy se léčivo preklinicky a zejména pak klinicky zkouší. Tyto fáze už nelze bez spolupráce s kapitálově silným partnerem na potřebné úrovni zajistit. Provádění preklinického a klinického testování „na koleně“ na neakreditovaných pracovištích bez potřebného zázemí, což se často děje, je pouze vyhadzováním peněz. Výsledky takových zkoušek orgány povolující léčiva neuznávají a považují je pouze za orientační. Naproti tomu se často podceňuje patentová ochrana nových látek před potenciálními konkurenty. Právě ta však je základním předpokladem pro nalezení a vzbuzení zájmu vhodného partnera, který finančně zajistí další vývoj léčiva až do jeho uvedení na trh.

Má-li být výzkum a vývoj léčiv úspěšný, je třeba si uvědomit, že jde o **službu, která má své zákazníky**, které je třeba uspokojit. Každá skupina zákazníků přitom může mít **různé zájmy**:

- **Pacienti** požadují, aby jim léčiva pomáhala zlepšit kvalitu života, tj. vyléčila onemocnění nebo alespoň odstranila jeho symptomy a prodloužila dobu do dalšího projevu symptomů, prodloužila dobu života, zmírnila bolesti, zkrátila dobu neschopnosti, byla účinná a současně měla minimum vedlejších účinků, byla bezpečná a kvalitní, hrazená pojišťovnou nebo alespoň byla levná a aby jejich podání bylo snadné a komfortní
- **Lékaři** mají podobné požadavky na léčivo jako pacienti, navíc požadují minimum kontraindikací (případů, kdy léčivo nelze předepisovat), protože omyl může mít nepříznivé následky nejen pro pacienta, ale i lékaře
- **Lékárníci a distributoři léčiv** požadují od léčiv reprodukovatelnou kvalitu a co největší stabilitu, ale také chtějí, aby z jejich prodeje jim plynul zisk.
- **Poskytovatele a plátce zdravotní péče (pojišťovny)** chtějí, aby jejich finanční zátěž spojená s podáním léčiva byla co nejnižší (nízká cena, farmakoekonomická výhodnost)
- **Vedení a akcionáři farmaceutické firmy** mají zájem o široké uplatnění léčiva (rozsáhlé indikace, využitelnost u nejčtetnějších onemocnění, minimální konkurence), o co nejdélní patentovou ochranu (u originálních léčiv), nízkou nákladovost a vysokou ziskovost výroby. V neposlední řadě jim jde i o to, aby léčivo vytvářelo u veřejnosti příznivý obraz firmy (to je důvodem, proč se některé farmaceutické firmy zabývají i málo lukrativními skupinami léčiv, jakými jsou např. léky proti AIDS nebo některá cytostatika).

**Výzkum a vývoj nových léčiv lze rozdělit do tří fází (etap):**

- \* **Fáze objevu** (Drug Discovery), kdy se zjišťuje, která látka nebo látky jsou účinné
- \* **Fáze návrhu** (Drug Design), kdy se modifikuje struktura objevené látky s cílem připravit deriváty s optimálními terapeutickými vlastnostmi jako kandidáty pro další vývoj.
- \* **Fáze vývoje** (Drug Development), kdy se u vybraného léčiva vyvíjí technologie výroby léčivé látky a léčivého přípravku, zjišťuje jejich a provádí klinické zkoušky

Toto rozdělení je do značné míry formální. Různí autoři chápou pojmy výzkum a vývoj odlišně (v ČR se – zřejmě ve snaze získat na vývoj různé granty – termín vývoj raději vůbec nepoužívá, což pak vede k odlišování „vědy“ a „výzkumu“ resp. „badatelského“ a „aplikovaného“ výzkumu). To, co jedni nazývají fází návrhu, druzí považují za fázi objevu apod. Činnosti v jednotlivých fázích výzkumu a vývoje se kromě toho prolínají a neexistuje mezi nimi ostrá hranice. Obsah a rozsah činností při výzkumu a vývoji každého individuálního léčiva závisí i na jeho charakteru a aplikaci.

Zda výzkum a vývoj nového léčiva zahrne všechny zmiňované fáze, závisí na jeho **inovativnosti**. Podle stupně inovativnosti lze léčiva rozdělit do několika kategorií:

- Nová struktura, nové přínosy pro terapii
- Nová struktura odvozená od známých látek, známé přínosy („me too“)
- Známa struktura, nové přínosy pro terapii („profarmaka“, účinnější enantiomer místo racemátu, nový typ soli, směřování účinku, nové indikace, nové lékové formy)
- Známa struktura, známé přínosy (generika)

Časově i finančně nejnáročnější je výzkum a vývoj léčiv s novým účinkem, který začíná od objevitelské fáze. Objevy nových účinných látek se často rodí v akademických institucích a farmaceutické koncerny si je pak kupují formou licence a rozvíjejí v dalších fázích VaV. Tím si snižují riziko, že se vydají na cesty, které nikam nevedou.

Výzkum a vývoj analog zavedených léčiv, tzv. „me too“, tj. patenty nechráněnými odvozeninami známých léčiv, začíná fází návrhu. Návrh nových „me too“ léčiv může vycházet ze zkušeností získanými s jejich předchůdci, takže tato léčiva obvykle bývají účinnější, bezpečnější a mnohdy i komerčně úspěšnější. Jejich výzkumem a vývojem se proto zabývá nejvíce firem, od středních až po farmaceutické giganty. Někdy mohou také být hledána analoga zavedených léčiv, u nichž byl zjištěn další terapeuticky využitelný účinek. Ten pak je obměnami základní molekuly zesilován, zatímco původní biologická aktivita může naopak být potlačována, takže nakonec vlastně vznikne nové léčivo.

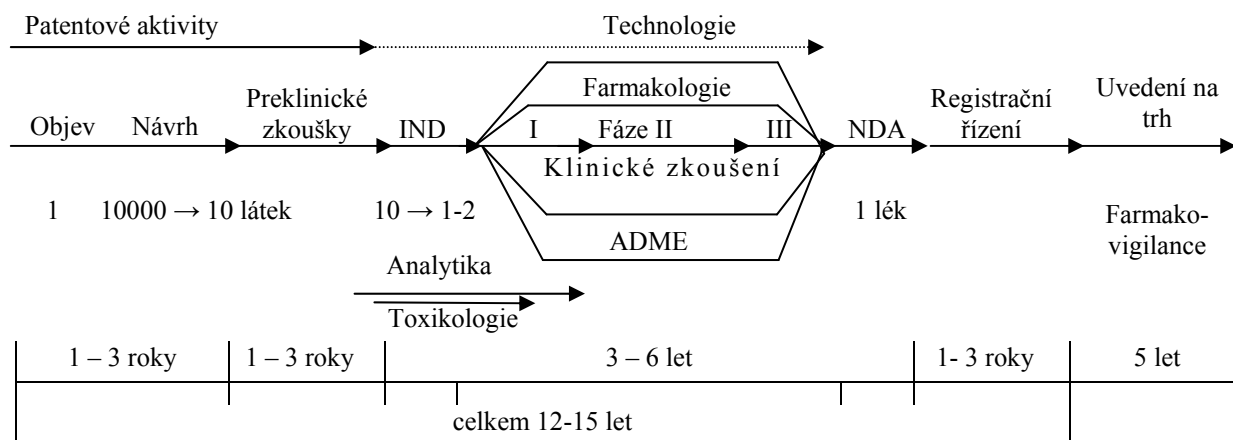
Někam mezi fází návrhu a vývoje patří hledání „profarmak“, derivátů, které se na účinnou látku přemění až v organismu, nových lékových forem známého léčiva, náhrady racemátů účinným enantiomerem, příprava a použití nových solí účinné látky apod. U těchto látek musí proběhnout preklinické a klinické zkoušky, které však mohou být zredukovány na získávání nových poznatků. Výjimkou v tomto směru jsou některé soli vykazující „zásadní podobnost“ se solemi použitými v původním přípravku, v tomto případě jsou nutné pouze zkoušky bioekvivalence. Hledání a zkoušení nových indikací – možností léčby dalších onemocnění zavedeným léčivem – lze považovat za pokračování klinického vývoje přípravku.

U generik – kopií zavedených léčiv se provádějí pouze vývojové práce (třetí fáze). Vývoj generika přitom končí prokázáním jeho bioekvivalence s původním přípravkem.

Generika lze vyrábět a uvést na trh až po vypršení patentové ochrany originálního přípravku, podle nové legislativy EU mohou však být vyvíjena již před skončením platnosti patentu.

Vedle patentové ochrany je však třeba brát v úvahu i tzv. ochranu farmaceutických dat, tj. dat z preklinických a klinických zkoušek. Trvá-li ochrana farmaceutických dat i po vypršení platnosti patentu, je sice možné léčivo vyrábět, pro povolení je však třeba provést všechny předepsané zkoušky. To je ovšem nákladné. Výrobci generik proto raději čekají až ochrana dat skončí (v EU to nyní je jednotně za 10 - 11 let, dříve to v ČR bylo 6 let). Pak je možné se odvolávat na výsledky zkoušek originálního přípravku a provést pouze průkaz bioekvivalence generika – srovnání účinnosti a bezpečnosti s originálním přípravkem u malého souboru pacientů, u injekcí přitom stačí jen porovnání složení a stability.

**Časovou náročnost** výzkumu a vývoje nového léčiva ilustruje následující přehled:



IND = žádost o povolení klinického zkoušení (Investigational New Drug application), NDA = žádost o registraci nového léčiva (New Drug Application), ADME = absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece (farmakokinetika)

## Objevování nových léčiv

V minulosti mnohdy napomohla nalezení účinných látek šťastná náhoda (serendipita) a její podíl na objevech nových léčiv nelze vyloučit ani nyní. Na šťastnou náhodu však nelze spoléhat. Při racionálním přístupu k hledání nového léčiva má klíčovou roli **screening**, vyhledávání účinných látek.

Screening je rychlým vyříděním velkého souboru různých látek, doslovným překladem slova screening je prosévání. Problémem je nalezení vhodného „síta“, aby jím „propadly“ jen ty molekuly, které mají požadované vlastnosti. V minulosti to bývaly testy na pokusných zvířatech, to však bylo zdoluhavé a finančně náročné. Dnes je základem pro hledání „síta“ znalost příčin nemoci nebo poruchy na molekulární a buněčné úrovni. Na základě této znalosti se vybere cílová struktura (enzym, receptor apod.), která hraje při onemocnění závažnou roli a jejíž interakcí s léčivem (např. inhibicí enzymu nebo obsazením vazebných míst receptoru) lze ovlivnit průběh onemocnění. Pak se určí způsob, jakým lze příslušnou interakci detegovat a vyhodnotit, tj. provést screening. Ten se pak využije k hledání účinných látek mezi různými látkami připravenými syntézou nebo izolovanými z různých přírodních zdrojů (rostliny, živočichové, mikroorganismy, v poslední době velmi často i mořská flora a fauna). Jsou-li k dispozici informace o prostorové stavbě cílové struktury, lze dokonce molekulu potenciálního léčiva nejprve navrhnout pomocí počítače, „*in silico*“, a teprve pak látku syntetizovat a ověřit, zda má předpokládané vlastnosti.

Fáze objevu zpravidla nevede k nalezení nového léčiva, ale spíše slouží k vyhledání prvních účinných látek – **vodítka** (anglicky lead compound, někdy překládáno jako „vůdčí látka“ nebo „vůdčí struktura“), jejichž molekuly jsou následně modifikovány s cílem zlepšit terapeutické i další vlastnosti.

Vodítková látka nemusí sama mít příliš velkou nebo specifickou (tj. bez vedlejších účinků) biologickou odezvu, protože se sama v terapii nakonec zpravidla nepoužije. Jde o pouze látku stojící na startovní čáře dalšího vývoje.

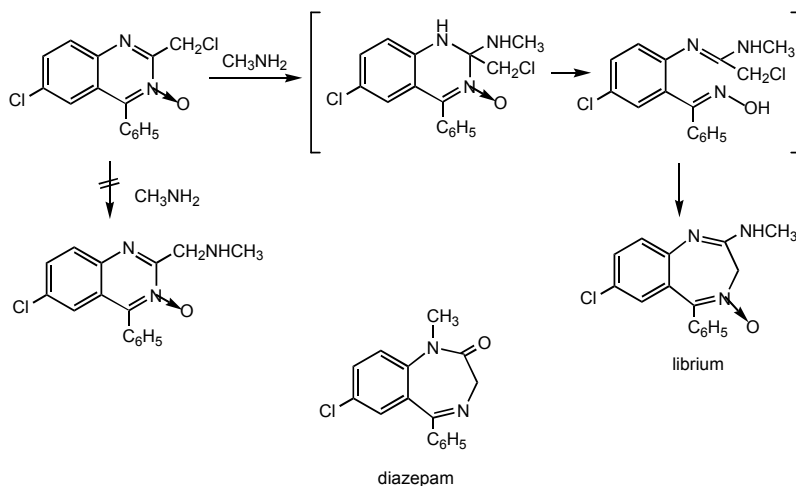
## Návrh léčiva

Ve **fázi návrhu** se vyhledávají nejvhodnější analoga „vodítka“, deriváty s vyššími žádoucími účinky a menšími vedlejšími účinky (toxicitou) a některými dalšími důležitými vlastnostmi.

Vedle látek objevených při screeningu, může být vodítkem pro návrh nového léčiva již používané léčivo, k němuž má být připraven analog s vyšší účinností, nižšími vedlejšími účinky, jinými výhodnými vlastnostmi nebo jen látka s stejnou účinností, ale zatím patentově nechráněná. Někdy dokonce může být "vodítko" vybráno mezi přirozenými látkami s přesně opačným účinkem, než má mít vyvíjené léčivo - např. při vývoji antagonistů určitého receptoru může být vodítkem struktura příslušného přirozeného agonisty.

Návrh léčiva zahrnuje spoustu systematické práce při přípravě analog vodítka a jejich testování.

Nalezení „vodítka“ a další postup při návrhu nového léčiva dobře ilustruje případ známého zklidňujícího léku diazepam. V 50. letech minulého století se pracovníci firmy Roche snažili o syntézu benzoheptadiazolů jako nových léčiv, získávali však jen deriváty benzochinazolin-N-oxidu. Žádný z nich neměl požadovaný účinek. Projekt byl v r. 1955 ukončen. V r. 1957 byla při úklidu laboratoře objevena neotestovaná látka. Ta nebyla vyhozena, ale pro jistotu otestována. Její účinnost přitom překvapila. Látka byla připravena reakcí methylaminu s chlormethylderivátem substituovaného chinazolin-3-oxidu, takže měla mít strukturu 6-chlor-4-fenyl-2-methylaminomethylchinazolin-3-oxidu. Ukázalo se však, že jde o 2-methylamino-5-fenyl-4H-benzodiazepin-4-oxid, který vznikl nepředpokládaným adičním mechanismem. Látka nazvaná librium se pak stala vodítkem pro návrhy dalších derivátů. Přitom se podařilo připravit diazepam, který byl při potlačování stavů strachu, psychického napětí, úzkosti, neklidu a s tím spojených poruch spánku o řád účinnější než librium. Diazepam i další deriváty benzodiazepinu se pak staly předmětem desítek různých patentů.



V minulosti museli chemici pracně syntetizovat stovky sloučenin s různě obměňovanou strukturou, u nichž pak byla zjišťována biologická účinnost, obvykle laboratorními testy „*in vitro*“ („ve skle“). Nejslibnější látky byly vybrány pro další vývoj. Nyní chemikům usnadňují návrh nových léčiv postupy „*in silico*“, využívající možnosti výpočetní techniky.

Počítači podporovaný návrh léčiva (CADD – Computer Aided Drug Design) umožňuje snížit počet látek, které je třeba syntetizovat a ověřovat jejich účinnost. Je založen na znalosti společných strukturálních rysů různých látek s požadovanou biologickou aktivitou, tzv. **farmakoforu**, a současně i znalosti **kvantitativních vztahů mezi strukturou látek a jejich biologickou aktivitou** (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationship). Počítač s vloženými údaji navrhne pomocí CADD software několik analog vodítka, která pak syntetik připraví. Při biologickém testování se pak prověří správnost počítačového modelu. Ten se pak doladí, aby další návrh vedl ke strukturám s ještě vyšší aktivitou. S růstem znalostí o vztazích mezi strukturou a aktivitou se výběr připravovaných látek zužuje. U vybraných látek s nejslibnějším farmakologickým profilem se testování *in vitro* doplňuje testy na pokusných zvířatech (*in vivo*). Přitom se už zjišťují základní farmakodynamické a farmakokinetické parametry (účinnost, toxicita, ADME – adsorpce, distribuce, metabolismus, exkrece).

U neúčinnějších látek vybraných na základě *in vitro* testů se někdy stává, že jejich účinek na živé organismy není takový, jak se předpokládalo. Příčinou přitom bývají nevýhodné fyzikálně chemické a farmakokinetické parametry, např. malá rozpustnost ve vodném prostředí biologických tekutin, nedostatečná permeabilita přes buněčné membrány, malá stabilita v kyselém prostředí žaludku, rychlé odbourání jaterními enzymy apod. Nevhodné vlastnosti lze někdy překonat způsobem podání léčiva (např. injekční podání eliminuje špatné vstřebávání a rozklad látky v žaludku a střevech) nebo vhodnou úpravou formy léčiva („enterosolventní“ potah, který odolává kyselému prostředí v žaludku a rozpouští se až ve střevech), jindy je třeba přistoupit k **chemickým modifikacím**, které přímo neovlivní aktivitu, ale rozpustnost a permeabilitu léčiva přes buněčné membrány. Problémy příliš rychlé enzymatické inaktivace, ale i nedostatečné rozpustnosti a biologické dostupnosti se přitom mnohdy řeší přípravou „**profarmak**“, neboli „proléčiv“ (prodrug), derivátů, který mohou v dostatečné koncentraci proniknout až do cílových buněk nebo tkání a teprve tam se působením enzymů přemění na účinnou látku.

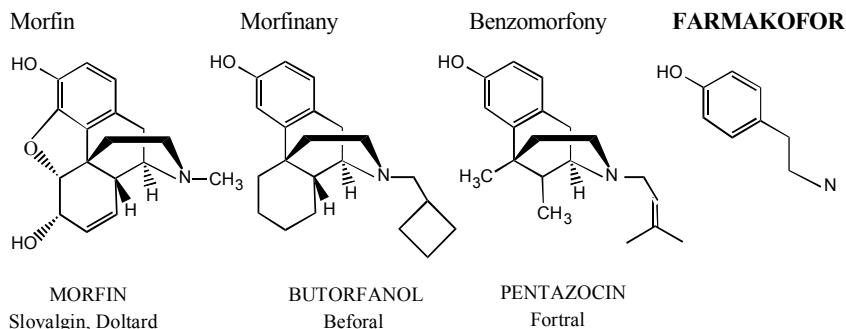
## Základní (vodítková) struktura léčiva a farmakofor

Po objevu vodítka se připravují první analoga. K tomu, aby měla vyšší účinnost nebo menší nežádoucí vedlejší účinky, se využívají známé nebo nově zjištěné vztahy mezi strukturou a biologickou účinností (Structure-Activity Relationship, SAR). Vyšší účinnost mají zpravidla ty látky, které se mohou lépe vázat na cílovou strukturu díky svému sterickému uspořádání a přítomnosti funkčních skupin schopných interakcí s funkčními skupinami cílové struktury. Studium SAR umožňuje zjistit, které skupiny jsou pro vazebné interakce léčiva s jeho cílovou strukturou nezbytné.

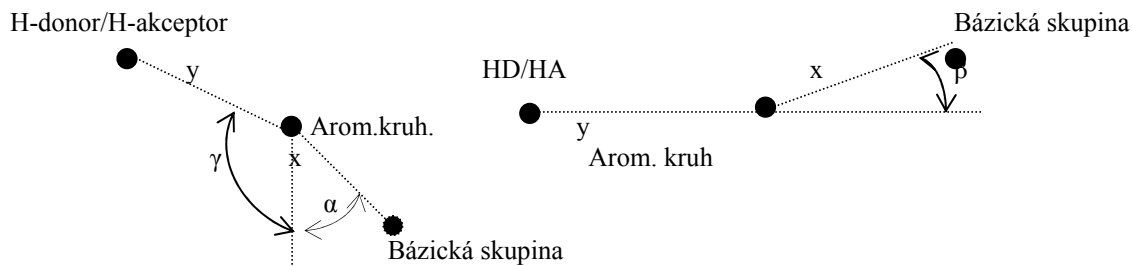
Studium vztahů mezi strukturou a aktivitou začíná modifikacemi nebo záměnou funkčních skupin molekuly látky a sledováním, jak se tyto změny projeví na účinku. Tím se zjistí, které funkční skupiny pozitivně nebo negativně ovlivňují účinnost (tj. interakci s cílovou strukturou). Tento přístup je velmi starý, byl využit již při přípravě aspirinu z kyseliny salicylové. Nevýhodou je, že počet funkčních skupin látky je omezený a že u přírodních produktů mohou být analoga jen velmi obtížně dostupná. Jako modifikační reakce se používají běžné reakce, jako je esterifikace alifatických alkoholů a fenolů, vznik etherů, alkylace a acylace aminů, esterifikace karboxylových kyselin nebo naopak zmýdelnění esterů, redukce dvojných a trojných vazeb, ketonů, esterů, substituce funkčních skupin apod. Někdy je třeba před modifikací molekuly určité funkční skupiny chránit a po provedení reakce chránící skupiny odštěpit. U některých přirozených látek je jedinou cestou k přípravě analog parciální syntéza, tj. modifikace základní struktury izolovaného produktu chemickými reakcemi, někdy je však možná totální syntéza. Kromě syntézy se při přípravě analog mohou využívat i biotransformace - přeměna látek pomocí mikroorganismů nebo enzymů. Např. penicilin G se připravuje tak, že se do fermentačního média přidává kyselina fenylacetová, po přidavku fenylacetové kyseliny je produkován penicilin V. Ampicillin a další polosyntetické peniciliny se mohou připravovat z přirozených penicilinů odštěpením karboxylové skupiny působením enzymu penicilinacylasy a acylací volné aminoskupiny. Enzymatická hydrolýza přitom nenaruší  $\beta$ -laktamový kruh antibiotika, jehož přítomnost v molekule je nezbytná pro antimikrobiální účinnost.

Studie SAR umožňují zjistit, které stereospecifické charakteristiky molekuly (vzájemná poloha a vzdálenosti funkčních skupin) jsou nezbytné pro vazbu látky na cílovou strukturu a tedy i účinnost léčiva a které nikoliv. Souhrn požadovaných charakteristik molekuly léčiva se nazývá **farmakofor**, složkám struktury, které nejsou pro účinnost relevantní, se říká **auxofor**.

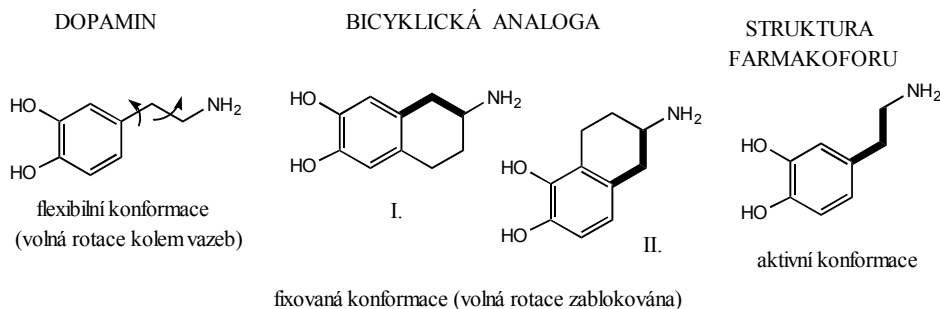
Farmakofor lze odvodit buď na základě studia účinnosti různých analog nebo porovnáním struktur různých skupin známých léčiv se stejným mechanismem účinku. Tak např. struktura farmakoforu opiátových analgetik vyplynula z porovnání struktur morfinu, morfinanů a benzomorfonů.



Pro farmakofor je důležitý především charakter jeho funkčních skupin - zda jsou schopné ionizace (aminodusík, karboxylová skupina apod.), tvorby vodíkových můstků (charakter donoru a/nebo akceptoru - např. hydroxylová skupina může být jak donorem, tak i akceptorem, kyslík karbonylové skupiny je pouze akceptorem vodíku), či hydrofobních skupin. Neméně důležité je však rozmístění těchto skupin v prostoru. U opiátových analgetik např. jde o vzdálenost aminodusíku od středu aromatického kruhu a úhly, které svírá spojnice atomu a středu kruhu s osou nebo rovinou aromatického cyklu.

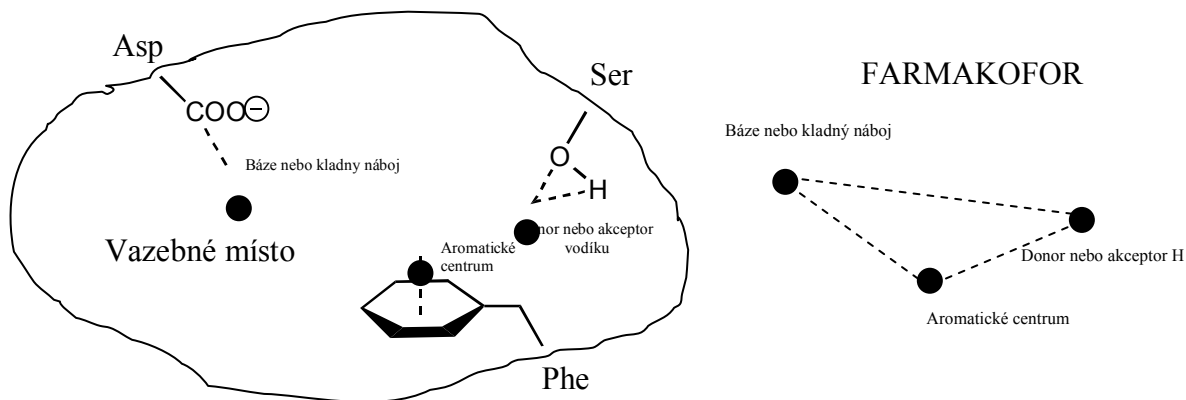


Prostorové rozmístění funkčních skupin důležitých pro biologickou účinnost závisí i na konformaci molekuly. U rigidních molekul není určení aktivní konformace složité. Horší je situace u flexibilních molekul. Údaje o prostorovém uspořádání pro jednotlivé konforméry lze vypočítat, stejně jako jejich energetický obsah. Problémem však je, že konformace látky, která nejlépe odpovídá vazebnému místu cílové struktury, nemusí být nejstabilnější konformací. V některých případech může při hledání aktivní konformace pomoci příprava derivátů, u nichž je konformace fixována a posouzení jejich biologické účinnosti. Příkladem může být studium účinnosti látek I a II odvozených od dopaminu. Ukázalo se, že látka II je účinná, látka I nikoliv:



K definování farmakoforu lze dospět nejen na základě znalosti struktury účinné látky a jejích analog, možný je i opačný způsob. Pokud je známa cílová struktura a prostorové uspořádání jejího vazebného místa lze definovat farmakofor jako "negativ" této struktury. Správnost navrženého farmakoforu se pak může ověřit přezkoumáním, zda jej obsahují látky, o nichž je známo, že se mohou vázat v aktivním místě cílové struktury.

Předpokládejme, že cílovou strukturou je bílkovina a vazebné místo vytváří karboxylová skupina asparagové kyseliny (karboxylátový anion), hydroxylová skupina serinu, a aromatický kruh fenylalaninu. Léčiva, která mají interagovat s tímto vazebným místem by měly obsahovat skupiny schopné vytvářet iontovou a vodíkovou vazbu a účastnit se van der Waalsových interakcí s aromatickým jádrem, tj. aminoskupinu, skupinu působící jako donor nebo akceptor vodíku a hydrofobní skupinu (podle G. Patrik, Medicinal Chemistry. Instant Notes. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, 2001)



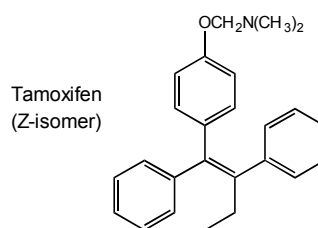
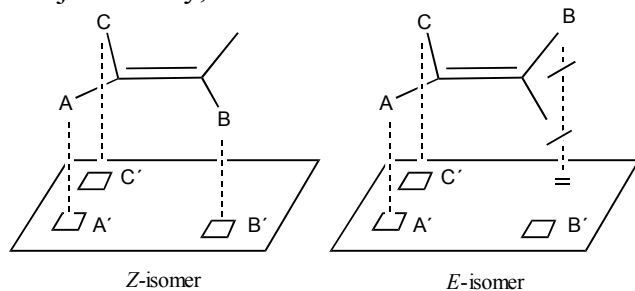
Před několika lety se zdálo, že koncept farmakoforu již zastaral, V poslední době však prožívá svoji renesanci, protože znalosti prostorové stavby cílových struktur nebo dokonce i jejich komplexů s léčivou a počítačové modelování umožňují získávat informace o prostorové struktuře farmakoforu a využívat je při navrhování nových léčiv.

Pruďce se rozvíjející disciplíny molekulární biologie, genomika a proteomika, umožňují identifikovat zcela nové cílové struktury, jejichž přirozené ligandy, agonisté nebo antagonisté nemusí být známy. Návrh farmakoforu, tj. strukturních charakteristik látek schopných interakce s nově identifikovanými cílovými strukturami, v takovém případě poskytne počítačové modelování. Prohledáváním databázi známých sloučenin se pak zjišťuje, které látky mají strukturní rysy shodné s navrženým farmakoforem. Využití obecně definovaného farmakoforu přitom může vést k tomu, že se zjistí podobný účinek mezi sloučeninami, které jsou chemicky značně odlišné. Potvrdí-li experiment účinnost těchto látek, mohou se stát vodítkem pro vývoj nových léčiv.

### Stereochemické aspekty výzkumu a vývoje léčiv

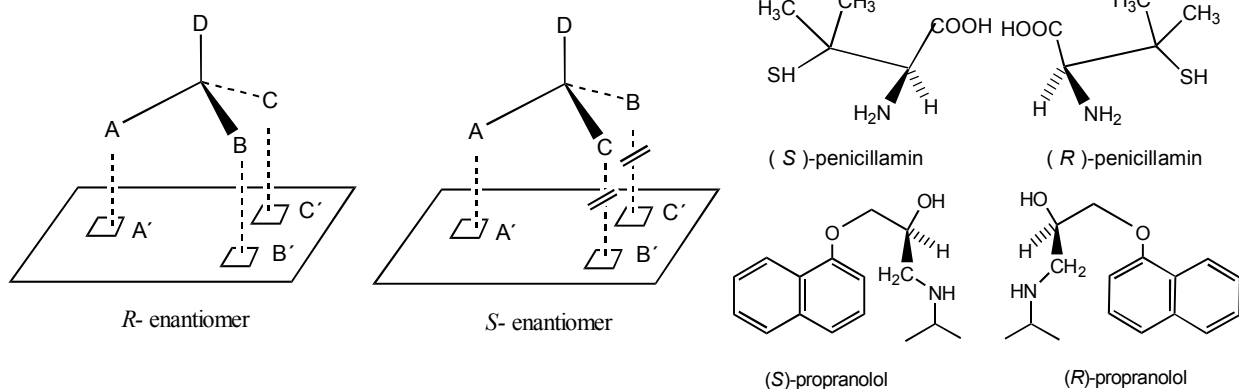
Je-li účinek léčiva podmíněn interakcemi léčiva s trojrozměrnými cílovými strukturami, pak je zřejmé že tento účinek léčiva, tj. jeho farmakodynamické vlastnosti, musí záviset nejen na jeho chemickém charakteru, ale i **prostorové stavbě molekuly**. Při racionálním návrhu léčiva na základě modelování vztahů mezi strukturou a aktivitou proto nelze opomíjet stereochemické aspekty, jako je **konfigurace** funkčních skupin, **chiralita** molekuly a v neposlední řadě ani její **konformace**.

Je-li prostorová stavba cílové struktury taková, že interakce se může účastnit jen jediný geometrický isomer, pak druhý geometrický isomer je méně účinný nebo zcela neúčinný, případně může mít zcela jiné účinky, a to i nežádoucí.



Účinnost tamoxifenu, léčiva používaného k léčbě nádorů prsu, závisí na jeho interakcích s estrogenními receptory. Z obou geometrických isomerů tamoxifenu se může na estrogenní receptor vázat (a tím jej zablokovat pro přirozené agonisty – estrogenní hormony) pouze *trans* (Z) isomer tamoxifenu. Podle některých prací je přítomnost malého množství *cis*-isomeru v léčivu příčinou, proč tamoxifen sice blokuje růst nádorů prsu, ale jeho dlouhodobé podávání může poněkud zvýšit výskyt nádorů děložní sliznice.

Cílové struktury v živých organismech jsou **chirální**. Je-li chirální i molekula léčiva, pak jednotlivé enantiomery mohou mít odlišnou biologickou aktivitu. Pokud jsou skupiny interagující s cílovou skupinou navázány na chirálním centru molekuly léčiva, pak se (podobně jako u geometrických isomerů) může stát, že aktivní je pouze jeden enantiomer:



„Špatný“ enantiomer přitom dokonce může interagovat s odlišnou cílovou strukturou, což pak má za následek nežádoucí vedlejší účinky. Např. penicillamin může být použit jako chelatující látka k léčbě Wilsonovy nemoci, při níž tělo nedokáže metabolizovat měď. Použitelný je však pouze (*S*)-enantiomer, protože podávání (*R*)-enantiomeru může způsobit oslepnutí. Takový případ je však spíše výjimkou. Častěji se stává, že druhý enantiomer je neaktivní. Např. u propranololu, léčiva poruch kardiovaskulárního systému je účinný pouze (*S*)-enantiomer. Podání racemátu pak znamená, že pacient dostává 50% léčivé látky zbytečně. V jiných případech mohou být účinné oba enantiomery, ale jeden je aktivnější než druhý. Někdy může být situace poměrně složitá. U thalidomidu, léku proti nevolnosti, který při podání těhotným ženám způsobil, že se jim rodily deformované děti, se nejprve na základě pokusů na myších zdálo, že poškození embrya způsobil (*S*)-enantiomer, pokusy s jinými zvířaty však ukázaly, že nežádoucí teratogenní účinky má i (*R*)-enantiomer.

Chirální léčiva tvoří asi 25 % všech používaných léčiv.

V případě přírodních léčiv je používání účinného enantiomeru nebo diastereomeru samozřejmé. V případě syntetických léčiv je často uveden na trh nejprve racemát a teprve pak se přechází k použití čistého enantiomeru s lepšími terapeutickými vlastnostmi. Příkladem může být léčivo proti žaludečním vředům, omeprazol, který je až v poslední době nahrazován (*S*)-enantiomerem, esomeprazolem. K takové „chirální záměně“ (chiral switch) často dochází až v době kdy končí patentová ochrana racemátu. Důvodem přitom nebývají pouze lepší vlastnosti enantiomeru, ale často i snaha o prodloužení patentové ochrany léčiva a znevýhodnění generické konkurence.

Enantiomer s vyšší biologickou účinností se nazývá **eutomer**, méně účinný enantiomer je **distomer**. Poměr mezi biologickou aktivitou eutomeru a distomeru je označován jako **eudismický poměr**.

Má-li eudismický poměr vysokou hodnotu, pak je účelné se při syntéze léčiva zaměřit na možnosti získání pouze účinnějšího enantiomeru, eutomeru, aby organismus pacienta nebyl zbytečně zatěžován neúčinnou nebo méně účinnou látkou. Neplatí to však obecně. Např. u antidepressiva fluoxetinu je účinnější (*S*)-enantiomer. Současně je však tento enantiomer rychleji metabolizován, takže je z hlediska účinku výhodnější podávat pacientům racemát. V případě antihypertensiva labetalolu, látky s dvěma asymetrickými uhlíky, musel být účinnější (*R,R*)-isomer, dilevalol, dokonce stažen z trhu (viz případovou studii Dilevalol). Důvodem bylo, že při podávání dilevalolu se v mnohem větší míře vyskytly závažné vedlejší účinky – narušení funkce jater, než v případě labetalolu. Racemický labetalol (Trandate) je naproti tomu nadále používán, je-li třeba rychle snížit krevní tlak.

Produktem syntézy je často **racemická směs enantiomerů**. Má-li být připraven jediný enantiomer, je třeba takovou směs rozdělit, provést její **rezoluci**. Příprava a používání jednoho enantiomeru resp. diastereomeru přitom sebou přináší problém **kontroly optické čistoty produktů**.

Měření optické otáčivosti k tomu většinou nepostačuje, v případě malých hodnot je zatíženo velkou chybou. Moderní přístroje umožňující měření optické otáčivosti při různých vlnových délkách, popř. měření optické rotační disperze a cirkulárního dichroismu, sice dovolují zvýšit přesnost zjištění enantiomerní čistoty látky, přednost však dostaly spíše separační techniky, jako je plynová a vysoce účinná kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza a kapilární elektrochromatografie.

Chirální chromatografické separace lze využívat jak při analýzách, tak i v preparativním měřítku

Při chromatografických separacích enantiomerů lze používat i běžné stacionární fáze, mobilními fáze však musí obsahovat chirální aditiva. Také lze látky převést reakcí s chirálními činidly na diastereomerní produkty, které se již od sebe dělí. Přímé separace na chirálních fázích však mají přednost, protože umožňují se vyhnout zdlouhavé úpravě vzorku, při níž může racemizace nebo kinetická rezoluce zhoršovat přesnost a správnost stanovení. Chirálních stacionárních fází je nyní na trhu kolem stovky. Jsou to sorbenty jako je silikagel nebo inertní organické polymery s navázanými „chirálními

selektroty“, jako jsou arylderiváty nebo kovové cheláty aminokyselin, cyklohextriny, chemicky modifikované polysacharidy (deriváty škrobu nebo celulosy), glykoproteiny, peptidy a bílkoviny a případně i další biopolymery.

Chirální selektory přitom většinou mají několik skupin schopných interakce se separovanými molekulami, přičemž nejméně v jednom případě musí být interakce stereospecifická. Problémem řady chirálních sorbentů bývá omezená stabilita a také vysoká cena. Existuje však několik relativně levných a poměrně stabilních sorbentů, které jsou vhodné i pro preparativní účely. Přípravují se modifikací přirozených chirálních biopolymerů (triacetylcelulosa, sesíťený albumin) nebo impregnací silikagelu vhodnou enantiomerní látkou, jakou je např. kyselina vinná, popř. navázáním arylderivátů aminokyselin amidickou vazbou na aminopropylovaný silikagel (Pirkleovy fáze).

Někdy je možné výsledky chirální separace převést z analytického do preparativního měřítka prostým použitím větších preparativních kolon a technik zvyšujících jejich výkonnost, jako jsou metody simulující pohyb náplně kolony (simulated moving bed). Obecně jsou však chromatografické separační techniky vhodné spíše pro **analytickou kontrolu** jiných postupů rezoluce, které obvykle jsou pro výrobu chirálních léčiv ekonomicky výhodnější.

Ideálním způsobem rezoluce by byla spontánní krystalizace eutomeru z roztoku racemické směsi. K vykrytalování jednoho enantiomeru sice může výjimečně docházet, není to však případ chirálních léčiv.

Nejčastěji se k rezoluci využívá **převedení racemátu na směs diastereomerních látek**. Ty na rozdíl od enantiomerů mají odlišné fyzikálně chemické vlastnosti, čehož lze využít k jejich rozdělení.

Výhodné je, když můžeme připravit z racemátu a vhodné enantiomerní látky směs **diastereomerních solí**, které mají odlišné krystalizační schopnosti. Má-li racemát kyselý charakter, pak se použijí některé chirální přirozené (např. alkaloidy) nebo (bio)syntetické aminy, z základních racemátů lze připravovat diastereomerní soli chirálních kyselin jako je kyselina vinná a její O-acylderiváty (nejčastěji kys. dibenzoylvinná), jablečná, mandlová, kafsulfonová, v poslední době se podobnému dělení používá kyselina 1,1'-dinaftyl-2,2'-fosforečná. Jestliže racemát neobsahuje kyselé ani bazické skupiny, pak musí být pro dělení modifikován, např. reakcí racemických alkoholů s chloridem kyseliny kafsulfonové lze připravit diastereomerní estery, které lze opět dělit krystalizací. Po rozdělení se navázaná skupina odštěpí.

V případě reakce racemátu s enantiomerně čistým činidlem lze k dělení využít i tzv. **kinetickou rezoluci**, při níž se využívá skutečnosti, že vzniku dvou různých diastereomerních přechodových stavů je zapotřebí různá aktivační energie. Výsledkem pak je, že jeden stereoisomerní produkt se tvoří rychleji než druhý.

Podari-li se v systému současně s kinetickou rezolucí provádět racemizaci, pak je přednostně racemizována výchozí látka, z níž vzniká produkt pomaleji. V takovém případě hovoříme o **dynamické kinetické rezoluci**. V optimálním případě se přitom získá 100% výtěžek produktu s požadovanou konfigurací.

K dělení racemátů lze využít i **enzymatickou rezoluci**, při níž se využívá stereospecificity enzymů.

Např. D-fenylglycin, výchozí látka pro parciální syntézu ampicillinu, se připravuje působením aminopeptidasy na racemický fenylglycinamid. Enzym přitom katalyzuje pouze hydrolyzu L-enantiomeru, takže vznikne směs L-fenylglycinu a D-fenylglycinamidu. Ta se snadno rozdělí a chemickou hydrolyzou amidu se získá žádaný produkt. Podobně lze rozdělit racemické estery pomocí acylas. Ty selektivně rozštěpí pouze jednu enantiomerní formu esteru na alkohol a kyselinu.

Jiné možnosti dělení racemátů představuje **tvorba inkluzních komplexů s cyklohextrinami**.

Cyklohextriny a podobné látky mají v molekule dutiny, do nichž může být uzavřen pouze jeden enantiomer produktu. Vznikající inkluzní komplex pak může být oddělen od druhého enantiomeru, např. krystalizací. Je-li cyklohextrin navázan na nerozpustný nosič, může být druhý enantiomer oddělen při vsádkovém provedení filtrací nebo elucí, tvoří-li imobilizovaný sorbent stacionární fázi chromatografické kolony.

Obecnou nevýhodou přípravy enantiomerů rozdělením racemátů je, že se získává pouze **poloviční výtěžek** účinné enantiomerní formy léčiva.

Ztráta poloviny produktu tvořeného nežádoucím enantiomerem přípravu chirálních léčiv rezolucí racemátů prodražuje. O něco levnější je rezoluce racemátů v případech, kdy lze odpadající enantiomer racemizovat a rezoluci opakovat nebo převést vhodným postupem na druhý, žádaný. Racemizace může být prováděna přes achirální meziproduct (např. oxidací enantiomerního alkoholu na keton a jeho následnou redukcí na racemický alkohol). Např. výše zmíněný L-fenylglycin lze racemizovat působením kyseliny sírové. Získaný racemát se pak převede na amid, který se znovu dělí pomocí aminopeptidasy. Příkladem převodu odpadního enantiomeru na žádaný produkt je nukleofilní substituce probíhající s Waldenovým zvrátením: Nežádoucí *R*-forma alkoholu se tosyluje a *R*-tosylát podrobí hydrolyze  $S_N2$  mechanismem na *S*-alkohol.



Ekonomicky výhodnější proto mohou být postupy **asymetrické** neboli **enantioselektivní syntézy**, při nichž přímo vzniká určitý enantiomer chirálního produktu. K vnášení chirálního centra do achirálních molekul lze využít pestrou škálu chirálních činidel a pomocných chirálních látek.

Aby asymetrická syntéza úspěšně proběhla, musí být v reakčním systému přítomen určitý element přinášející chirální informaci – chirální musí být buď výchozí látka nebo reakční činidlo, popř. se použije chirální katalyzátor. To je zvláště výhodné, protože katalyzátoru se na rozdíl od chirálního činidla může použít jen relativně malé množství. Vysoce účinnými chirálními katalyzátory jsou enzymy, které lze využít k přípravě enantiomerně čistých látek i v průmyslovém měřítku. Příkladem enantioselektivní enzymově katalyzované reakce může být příprava L-asparagové kyseliny, složky umělého sladidla aspartamu, z kyseliny fumarové pomocí aspartasy. Enzymy přitom není třeba izolovat, při asymetrické syntéze lze využít i imobilizované mikrobiální buňky obsahující příslušný enzym.

Dobrý postup asymetrické syntézy musí poskytovat žádaný produkt ve vysokém chemickém i **optickém výtěžku**. Optický výtěžek je mírou enantioselektivity reakce.

Optický výtěžek je někdy nazýván enantiomerní přebytkem (v reakčních schématech označovaný jako e.e., enantiomeric excess). Je to poměr mezi naměřenou otáčivostí produktu reakce a hodnotou otáčivosti čistého enantiomeru. Hodnota optického výtěžku odráží poměr obou enantiomerů v produktu reakce. Např. e.e. 40% znamená, že ve směsi je 40% čistého enantiomeru, zbývajících 60% je racemát nevykazující žádnou optickou aktivitu, tj. směs 30% S- a 30% R- formy. V produktu reakce proto přitom je 70% jednoho enantiomeru a 30% druhého. V ideálním případě by e.e. měl být vyšší než 98%, což odpovídá obsahu čistého enantiomeru v produktu nad 99%. V praxi se však při asymetrické syntéze tak vysoké enantioselektivity obvykle nedosahuje a je nutná další purifikace produktu.

Výhodnou může být příprava chirálních produktů z vhodných chirálních výchozích látek.

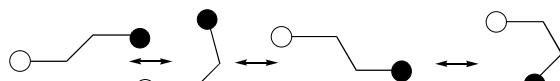
Takovou vhodnou výchozí látkou mohou být přirozené aminokyseliny, cukry nebo jiné přírodní látky. Nevýhodou je, že se přitom někdy syntéza prodlouží o několik reakčních kroků a že někdy musí být při syntéze vyloučeny faktory, které by mohly být příčinou racemizace (zahřívání na vyšší teploty, přítomnost silných kyselin nebo bází apod.).

V případě, že v molekule výchozí látky je již přítomno jedno nebo více chirálních center, pak při reakci, při níž vzniká další chirální centrum, může být preferována určitá konfigurace produktu.

Dochází k tomu např. při parciálních syntézách léčiv vycházejících z přirozených produktů (alkaloidů, steroidů, cukrů apod.). Přítomnost chirálního centra nemusí však vždy vést ke vzniku jen jednoho enantiomeru. Je-li nově vznikající chirální seskupení vzdálené, pak může být vliv původního centra chiralitity na stereochemický průběh reakce jen velmi malý.

Vedle správné geometrické a chirální struktury je předpokladem vysoké účinnosti, tj. silné interakce molekuly léčiva s jeho cílovou strukturou, i zaujetí správné „**aktivní**“ **konformace molekuly**.

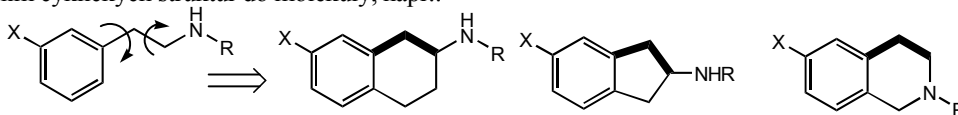
Je-li molekula látky příliš rigidní, pak její skupiny nemusí zaujmout přesně tu konformaci, která je pro interakci nejvýhodnější. Nevýhodná však může být i příliš vysoká flexibilita molekuly, tj. přítomnost velkého počtu jednoduchých vazeb, kolem nichž mohou funkční skupiny volně rotovat. V takovém případě se mohou molekuly látky zaujímat řadu různých konformací, mezi nimiž se ustaví rovnovážný stav. Pravděpodobnost, že v okamžiku „setkání“ s cílovou strukturou bude molekula zaujímat právě jen „aktivní“ konformaci se tím snižuje. Změna konformace probíhá určitou rychlostí a vyžaduje dodání energie, což se projeví sníženou biologickou účinností.



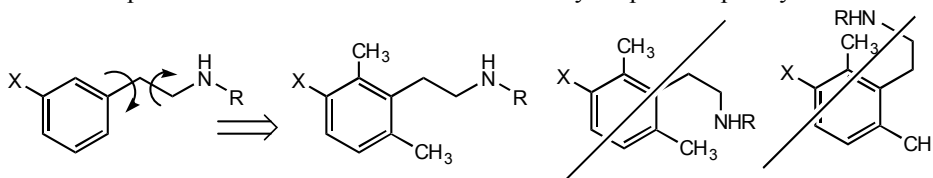
Fixováním aktivní konformace příliš flexibilní molekuly, tj. omezením volné rotace skupin, je proto možné zvýšit biologickou účinnost látky.

Aktivní konformaci lze fixovat:

- zavedením cyklických struktur do molekuly, např.:



- náhradou jednoduché vazby mezi ve flexibilním uhlíkatém řetězci molekuly rigidní skupinou, např. dvojnou nebo trojnou vazbou, aromatickým kruhem, amidovou skupinou apod.
- zavedením substituentů, které stericky brání molekule, aby zaujala určitou konformaci. Např. ve výše uvedeném příkladu lze fixovat požadovanou konformaci i zavedením methylskupin do o-polohy k flexibilnímu bočnímu řetězci:



## Kombinatoriální syntéza a vysokokapacitní screening

Techniky **kombinatoriální syntézy a vysokokapacitního screeningu** jsou moderními metodickými nástroji, které umožňují racionalizovat fázi objevu a zejména pak fázi návrhu nových léčiv. Úspěšnost jejich využití závisí na pečlivém naplánování experimentů. K tomu jsou zapotřebí znalosti organické chemie, biochemie, biologie, analytiky, matematické statistiky a bioinformatiky.

Ještě na počátku v 90. let zajímala kombinatoriální syntéza jen pár chemiků a je proto překvapivé, jak rychle se vyvinula v široce používanou rutinní metodu, kterou dnes žádná významná farmaceutická firma vyvíjející nová léčiva nemůže ignorovat. V r. 1992 byla kombinatoriální syntéza využita k přípravě pouhých 3 „knihoven“ nových látek, z čehož jen u 1 byla zjištěna terapeutická účinnost. V r. 1999 bylo takových knihoven látek připraveno již 292 a terapeutická účinnost byla zjištěna u 85 z nich. Na přelomu století kromě toho pronikla metodologie kombinatoriální syntézy i do dalších oblastí a začala být využívána i při hledání agrochemikálií, konzervačních látek, různých aditiv, nových materiálů pro mikroelektroniku a dokonce i nových katalyzátorů.

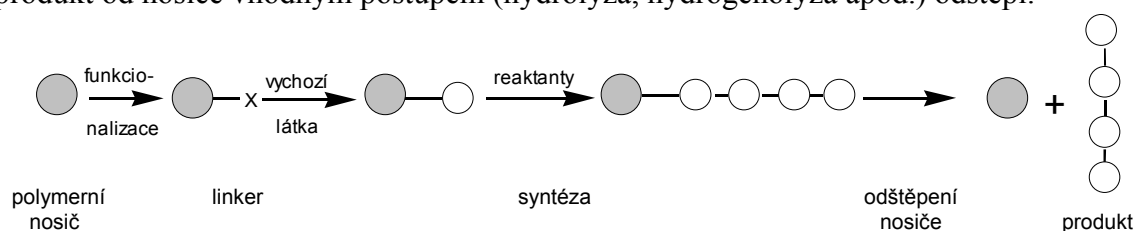
Kombinatoriální syntéza se vyvinula ze **syntézy v pevné fázi**. Tato technika usnadňuje izolaci produktů a umožňuje automatizovat pracovní postupy. Syntéza v pevné fázi je založena na tom, že se výchozí látka naváže na inertní pevný nosič. Tím je obvykle vhodný polymerní materiál, často ve formě malých kuliček, nosičem však může být i silikagel, porézní sklo apod.

Nosič však nemusí být jen pevný, podobně se mohou použít i rozpustné polymery uzavřené v komůrce se semipermeabilní membránou. Tou mohou procházet nízkomolekulární reagenty, ne však molekuly polymeru s navázanými meziproducty a produkty. Nutnost použití membrán sice poněkud komplikuje používání rozpustných polymerních nosičů, výhodou je však hladší průběh reakcí v homogenním prostředí (eliminace difuzních jevů)

Některé typy nosičů obsahují samy funkční skupiny vhodné pro navázání výchozí látky, např. hydroxyl, karboxyl nebo aminoskupinu, jiné nosiče je třeba pro vazbu výchozí látky upravit zavedením vhodných „linkerů“, tj. substituentů s koncovými reaktivními skupinami.

Linker musí umožnit snadné navázání výchozí látky i snadné odštěpení konečného produktu. Příkladem takového linkeru může být chlormethylskupina navázaná na kopolymerní styren-divinylbenzenový gel. Někdy je pro navázání výchozí látky i její další reakce výhodné, jestliže reaktivní funkční skupina je od polymerního skeletu oddálena delším řetězcem, „spacerem“, protože reakci navázané látky pak nebrzdí sterické vlivy.

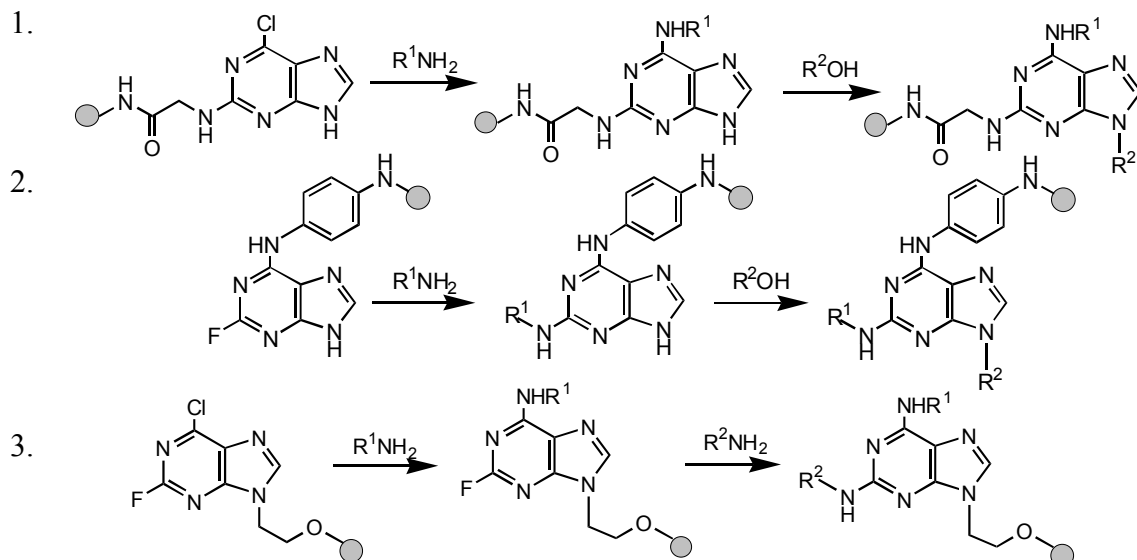
Na nosič s navázanou výchozí látkou se pak působí roztokem vhodně zvoleného činidla. To se obvykle použije ve velkém přebytku, aby reakce proběhla pokud možná kvantitativně. Vazba na nerozpustný nosič umožňuje, aby produkt byl snadno oddělen od přebytečného činidla pouhou filtrací a promytím. Produkt může být využit v dalším stupni k jiné reakci. Nakonec se konečný produkt od nosiče vhodným postupem (hydrolyza, hydrogenolýza apod.) odštěpí.



Syntéza v pevné fázi se využívá např. při přípravě peptidů. Nosičem je přitom řídko síťovaný styren-divinylbenzenový gel, někdy nazývaný Merrifieldova pryskyřice. Jsou to drobné kuličky kopolymeru styrenu s 1% divinylbenzenu, který slouží jako síťovadlo vytvářející trojrozměrnou gelovitou strukturu. Po aktivaci chlormethylací se na nosič naváže první aminokyselina. Reakce je „polymeranalogickou“ obdobou aralkylace aminokyseliny benzylchloridem. Karboxylová skupina navázané aminokyseliny se pak aktivuje pro reakci s aminoskupinou druhé aminokyseliny. Přitom vznikne navázaný dipeptid, který může být opakovaně aktivován a podroben reakci s další aminokyselinou. Aktivace a navázání aminokyseliny se pak opakují, až se získá žádaný oligopeptid, který se pak od nosiče odštěpí. Postup, popř. jeho varianty, je možné automatizovat. Automatické syntezátory peptidů se využívají jak ve výzkumu, tak i při výrobě. Podobné automaty slouží i k přípravě oligonukleotidů používaných pro genové manipulace.

Využití pevných nosičů umožňuje **paralelní syntézu**, tj. současné provádění stejné reakce v různých reakčních nádobkách s použitím různých reaktantů a činidel. Nosič v každé reakční nádobce přitom může obsahovat jinou navázanou látku, na níž se může působit stejnými nebo různými činidly za jinak stejných podmínek. Nakonec se získá v každé reakční nádobce různá sloučenina.





Připravovat rozsáhlé knihovny sloučenin kombinatoriální syntézou má význam, jen když je možné látky rychle otestovat a vybrat nejlepší kandidáty pro další vývoj. Na kombinatoriální syntézu proto musí navazovat vhodné postupy **vysokokapacitního screeningu** (high-throughput screening).

Screeningové systémy bývají navrženy tak, aby byly pokud možná eliminovány falešně pozitivní výsledky. Využit lze např. vazebné interakce látek s cílovou strukturou („binding assay“). Látky přitom zůstávají navázané na nosič. Cílová struktura je opatřena „značkou“, navázanou barevnou nebo fluoreskující látkou, radioisotopem nebo enzymem (peroxidasa, alkalická fosfatasa), který reaguje s chromogenním substrátem za vzniku barevného produktu. Po inkubaci s označenou cílovou strukturou a promytí se pak kontroluje zbarvení (fluorescence, radioaktivita apod.) kuliček nosiče. Pozitivně reagující a tedy zbarvené kuličky se pak oddělí a zjišťuje se, jakou strukturu má produkt, který je na ně navázán. Jiné systémy detekce vazby potenciálních léčiv na cílové struktury využívají změn optických nebo elektrických vlastností látek při vzájemných interakcích. Vedle vazebných interakcí mohou být využity při screeningu knihoven látek i požadované funkční vlastnosti produktu, např. schopnost inhibovat určitý enzym. V takovém případě se detekce provádí po odštěpení produktů od nosiče, např. s použitím souboru 96 mikrofíltrů. Do každého mikrofíltrového dílku se vloží 100-500 kuliček nosiče, produkt se odštěpí a jeho roztok odfiltruje od nosiče do mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Proveďte se inkubace a otestuje se biologická aktivita roztoků v jamkách. Kuličky s produktem, který poskytl pozitivní reakci, se pak rozdělí a zkouší se v podstatě individuálně (1 kulička na 1 jamku). Nakonec se produkty identifikují. V některých případech se screening v pevné fázi a v roztoku kombinuje. Základním předpokladem úspěchu screeningu je, aby detekce byla dostatečně citlivá. Na jedné standardní kuličce o průměru 0,1 mm mohou být navázané řádově stovky pikomol produktu. Objem roztoku v jamce je asi 0,1 ml, takže výsledná koncentrace látky je pak řádově mikromolární, což stačí k průkazu aktivity vhodnými analytickými postupy. Je-li třeba, lze koncentraci produktu zvýšit snížením objemu roztoku v jamce (např. použitím mikrotitračních destiček s 384 jamkami) nebo zvýšením množství navázaného produktu (zvětšením kuličky nosiče a/nebo jeho vazebné kapacity se může zvýšit množství produktu až 100násobně). Zjišťování účinnosti je automatizováno. Moderní vybavení umožňuje, aby jeden pracovník během jednoho dne otestoval  $10^7$  kuliček nosiče, což je kapacita plně postačující pro knihovnu s  $<3 \cdot 10^6$  permutacemi, tedy např. knihovnu pentapeptidů s 20 aminokyselinami. V případě heptapeptidů s 20 aminokyselinami (s  $20^7$ , tj.  $1,28 \cdot 10^9$  permutacemi) však ani tak rychlý automatizovaný screening neposkytuje požadovaný výsledek v přiměřené době. V poslední době byly metody vysokokapacitního screeningu dále zdokonaleny. Nově byla např. zavedena metodika screeningu látek na základě jejich vlivu na charakteristiky buňky, jako je velikost a tvar jádra, replikace DNA apod., zjišťované automatickou mikroskopií a analýzou obrazu, tzv. high-content screening (HCS). HCS poskytuje obrovské množství dat, jejichž správná interpretace je zatím složitá. Jeví se však jako velmi výhodný pro výběr látek, které mohou blokovat buněčné dělení, ovlivňovat procesy buněčné smrti, apoptosy apod., tj. potenciálních protinádorových léčiv.

Po provedeném screeningu kombinatoriálních knihoven je třeba pozitivně reagující produkty identifikovat. Prvním možností identifikace představuje analýza individuálního produktu na jednotlivé kuličce nosiče, druhou možností analýza směšného vzorku založená na statistickém hodnocení pravděpodobnosti výskytu produktu s pozitivními výsledky testování účinnosti.

Používané analytické techniky musí být dostatečně citlivé a přitom specifické, aby umožnily určovat látky vyskytující se v mikromolárních koncentracích. K analýze a identifikaci se využívá zejména hmotová spektrometrie, infračervená spektrometrie, kapilární elektroforéza nebo HPLC (často kombinovaná s hmotovou spektrometrií). K charakterizaci individuálních produktů z knihoven peptidů nebo oligonukleotidů lze využít techniky mikrosequenace.

## Kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou účinností

Struktura molekuly léčiva definuje její interakce s ostatními molekulárními strukturami organismu. To znamená, že bezpečnost a účinnost léčiva je funkcí jeho chemické struktury. Studium kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou účinností látek (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR,) umožňuje zjistit, jak fyzikálně chemické vlastnosti molekul ovlivňují biologickou účinnost látek. Cílem tohoto studia je vypracovat algoritmy, které by byly použitelné pro předpověď biologické účinnosti různých sloučenin a využít je k návrhu látek s optimálními terapeutickými vlastnostmi. Tyto terapeutické vlastnosti jsou určovány jak schopností látky interagovat s cílovou strukturou, tak i k této cílové struktuře proniknout.

Klasický přístup ke studiu QSAR vychází z přípravy řady látek se společným základním skeletem a rozdílnými substituenty a studia jejich účinnosti. Ze zjištěných vztahů se vyvodí, jaké fyzikálně chemické charakteristiky skupiny jsou významné z hlediska žádaného účinku. To pak umožňuje navrhnout nové, ještě účinnější látky.

Studium QSAR ukázalo, že pro účinnost látky má největší význam hydrofobita (= lipofilita), elektronový charakter a sterické parametry molekuly a/nebo jejích funkčních skupin. Moderní léčiva mají ovšem velmi složitou strukturu, což predikci vlastností pomocí QSAR znesnadňuje. Jednotlivé funkční skupiny molekuly se vzájemně ovlivňují, změna charakteru jedné skupiny má dopad na parametry jiných funkčních skupin. Situaci navíc komplikuje i to, že účinnost sama není jediným faktorem ovlivňujícím úspěch léčiva, mnoho velmi účinných látek selhalo při zkouškách *in vivo* pro omezenou rozpustnost nebo stabilitu, biologickou dostupnost, popř. vysokou nežádoucí toxicitu. Složitost příslušných korelačních algoritmů stále ještě limituje predikci vlastností a tedy i navrhování léčiv pomocí moderních počítačů, CADD (Computer-Assisted Drug Design).

Vztahy mezi strukturou látky a jejími vlastnostmi zajímají chemiky již od 19. století. Již v r. 1863 zjistil A.F.A. Crois, že toxicita vyšších alkoholů roste s tím, jak se snižuje jejich rozpustnost ve vodě, v r. 1869 podobně zjistil Richardson, že hypnotické účinky alkoholů rostou a maxima dosahují pro C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>. Závislost toxicity organických látek na jejich hydrofobním charakteru byla obecněji potvrzena v 90. letech 19. století Meyerem a Overtonem. Význam hydrofobity pro biologickou účinnost byl později dokumentován výsledky řady dalších studií.

Jako míra hydrofobity se při studiu kvantitativních vztahů mezi strukturou a účinností využívá logaritmus **rozdělovacího koeficientu** (partition coefficient) látky mezi n-oktanolem a vodou,  $\log P$ .

n-Oktanol má přibližně stejnou hydrofobitu jako lipidická dvojvrstva buněčné membrány a může proto sloužit jako její zjednodušený model. Pro většinu léčiv platí, že čím větší je koncentrace látky v n-oktanolové fázi, tj. čím větší je hodnota  $P$  resp.  $\log P$ , tím větší je aktivita. Vyšší hydrofobita znamená, že molekuly léčiva snáze pronikají přes buněčné membrány ke svým cílovým strukturám. Neplatí to však neomezeně. Z experimentů s přípravou a studiem aktivity řady analog určité výchozí struktury vyplývá, že po příliš velkém zvýšení hydrofobity (např. zavedením velkých objemných alifatických substituentů) se účinnost může naopak snížit.

Vztah mezi biologickou účinností a hydrofobitou látky je dán rovnicí:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = -k_1 \cdot (\log P)^2 + k_2 \cdot \log P + k_3,$$

kde  $k_1$ ,  $k_2$  a  $k_3$  jsou konstanty.  $C$  je koncentrace látky potřebná k tomu, aby se projevil definovaný účinek (např. byl z 50% inhibován určitý enzym). Čím je látka účinnější, tím je pro dosažení příslušného účinku zapotřebí menší koncentrace látky a hodnota logaritmu  $1/C$  je tedy vyšší.

Je-li celková hydrofobita molekuly relativně malá, pak účinnost určuje především  $\log P$ . U vysoce hydrofobních látek určuje naopak výslednou hodnotu spíše  $(\log P)^2$ , který je v rovnici vystupuje se záporným znaménkem. V takovém případě účinnost klesá. Protože hydrofobita odráží schopnost látky pronikat přes buněčné membrány, vztah mezi účinností a hydrofobitou molekuly se uplatňuje především *in vivo*, při sledování účinku látky na živé organismy. Při testech *in vitro* se látka může dostávat do interakce s cílovou strukturou přímo, takže vztah mezi hydrofobitou a účinkem se uplatit nemusí. Vliv hydrofobity molekuly na účinek je nevýraznější u léčiv působících na centrální nervový systém, která musí překonávat hematoencefalickou bariéru. Čím je léčivo hydrofobnější, tím snáze přes tuto bariéru proniká. Heroin, diacetylderivát morfinu, proniká do mozku asi 100 x snadněji než morfin s 2 volnými hydroxylovými skupinami a je proto mnohem více návykový. Léčiva CNS mívají  $\log P$  kolem 2; u léčiv určených pro jinou terapii může vyšší hydrofobita znamenat vyšší nežádoucí účinky na nervový systém.

Rozdělovací koeficient popisuje celkovou hydrofobitu molekuly. Tuto celkovou hydrofobitu molekuly je možné vyjádřit jako určitý součet příspěvků jednotlivých částí molekuly.

Měřitkem hydrofobity jednotlivých substituentů je konstanta  $\pi_x$ , kterou lze experimentálně stanovit porovnáním  $\log P$  standardní sloučeniny s derivátem, u něhož je vodík nahrazen příslušným substituentem (x):

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H,$$

kde  $P_H$  je rozdělovací koeficient standardní sloučeniny a  $P_x$  rozdělovací koeficient derivátu s příslušným substituentem. Je-li hodnota konstanty  $\pi_x$  kladná, pak substituent je hydrofobnější než vodík, je-li záporná, je tomu naopak.

Znalost konstant  $\pi_x$  pro různé substituenty umožňuje získat informaci o celkové hydrofobitě látky výpočtem. Pro zjednodušené výpočty celkové hydrofobity látky lze použít vzorec:

$$\log P = \log P_H + \sum \pi_x$$

Např.  $\log P_H$  benzenu má hodnotu 2,13 a  $\pi$  konstanty pro fluor +0,14, chlor +0,71, brom +0,86, hydroxyl -0,67, methoxyl -0,02, -CONH<sub>2</sub> -1,49, methyl 0,52, t-butyl 1,68. Pomocí těchto hodnot pak lze snadno vypočítat logaritmus rozdělovací konstanty pro různé deriváty, např. 2,97 pro p-bromanisol nebo 1,35 pro m-chlorbenzamid.

Situace je však složitější. V úvahu je třeba brát i sterické uspořádání substituentů a zejména pak kolísání hodnot  $\pi$  konstant pro různé systémy.

Např. výše uvedené hodnoty pro substituenty platí pro deriváty benzenu, ale již ne pro různé heteroaromatické látky. V ideálním případě by měly být používány  $\pi$  konstanty platné pro určitý systém. To však není v praxi vždy možné, takže je třeba počítat s určitými nepřesnostmi předpovědi.

Rozdělovací koeficient  $P$  je hodnotou jednoznačně charakterizující rozdělení neionizované látky mezi vodnou a organickou fází. U látek, které mohou disociovat, závisí rozdělení na stupni disociace, tedy na hodnotě pH prostředí.

Pro získání správné hodnoty  $P$  je třeba nastavit při měření pH vodné fáze pufrem na hodnotu, při níž v roztoku převažuje neionizovaná forma. U kyselin a bází se proto používá jako měřítko hydrofobity **distribuční koeficient** (distribution coefficient)  $D$ , který vyjadřuje poměr koncentrací všech forem látky v obou fázích, tedy ionizovaných i neionizovaných molekul. Závislost  $D$  resp.  $\log D$  na pH vyjadřují tyto vztahy:

Pro kyseliny: 
$$\log D_{kys} = \log P + \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

a pro látky charakteru bází: 
$$\log D_{báze} = \log P + \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

Pro kyseliny nebo báze, které jsou v daném prostředí převážně disociované (pH-pK<sub>a</sub> u kyselin, resp. pK<sub>a</sub>-pH u bází >1)

pak přibližně platí 
$$\log D_{kys} \approx \log P + pK_a - pH,$$

resp. 
$$\log D_{báze} \approx \log P + pH - pK_a$$

a pro látky převážně nedisociované  $\log D \approx \log P$

Při uvádění hodnoty  $D$  nebo  $\log D$  léčiva je třeba specifikovat hodnotu pH, při níž byl distribuční koeficient změřen. Pro léčiva je důležitá zejména hodnota pH krevního séra, která činí 7,4, v některých tkáních může být pH odlišné.

Látek, jejichž biologická účinnost závisí jen na hydrofobitě molekuly, je jen málo.

Jsou to např. systémová anestetika, která ovlivňují nervové funkce tím, že pronikají do buněčných membrán a tím mění jejich vlastnosti, neúčastní se však žádných specifických interakcí s receptory, enzymy nebo nukleovými kyselinami. Anestetická účinnost u nich dobře koreluje s hodnotou  $\log P$ . Ta je 0,98 pro ether, 1,97 pro chloroform a 2,3 pro halothan

Biologická účinnost léčiv závisí nejen na schopnosti pronikat do buněk, ale zejména na interakcích s cílovou strukturou. Ty ovlivňují i **elektronické vlivy substituentů** v molekule léčiva.

Elektronické vlivy substituentů na sílu interakcí léčiv vyplývají z charakteru cílových struktur. Těmi jsou v první řadě bílkoviny. Jejich biomakromolekuly obsahují skupiny, které při disociaci mohou vytvářet jak aniony, tak i kationy. Podobně tomu však je i u dalších cílových struktur, jako jsou nukleové kyseliny. Stupeň ionizace kyselých a bázeických skupin cílové struktury závisí na pH okolí. Fyziologickou hodnotou pH je 7,4, díky kooperativnímu efektu sousedních skupin může však být aktuální hodnota pH v aktivním místě cílové struktury odlišná. Při fyziologickém pH jsou disociovány fosfátové skupiny nukleových kyselin, téměř úplně jsou disociovány volné karboxylové skupiny bílkovin (-COOH skupiny kyseliny asparagové a glutamové s pK<sub>a</sub> 4-4,5), ale částečně disociovány mohou být i -SH skupiny cysteinu (pK<sub>a</sub> 8,5-9) a dokonce i fenolická skupina tyrosinu (pK<sub>a</sub> 9,5-10). Z bázeických skupin je prakticky úplně protonizován guanidinový zbytek argininu (pK<sub>a</sub> 12-13), ve značné míře koncové aminoskupiny lysinu (pK<sub>a</sub> 10-10,5) a částečně i imidazolový kruh histidinu (pK<sub>a</sub> 6-6,5).

Jestliže molekula léčiva obsahuje také skupiny, které mohou být ionizovány, pak stupeň ionizace ovlivňuje jeho interakce s aktivním centrem cílové struktury.

Fenylbutazon (butazolidin), s  $pK_a$  4,5 je účinný jen v ionizované formě, kdy blokuje reabsorpci kyseliny močové v ledvinách. Kyselina močová je pak ve zvýšené míře vylučována močí, což brání vzniku močových kamenů. Protože pH moči je 4,8 je však v močovém systému koncentrace účinné ionizované formy jen malá. Sulfinpyrazon, analog fenylbutazonu, který má v molekule butylový řetězec nahrazen fenylsulfinyethylskupinou, má hodnotu  $pK_a$  2,8. Koncentrace jeho aniontu v moči je proto podstatně vyšší a sulfinpyrazon je proto asi 20 x účinnější

Iontové interakce při daném pH závisí na hodnotě  $pK_a$ , kterou ovlivňují svými elektronickými efekty další substituenty v molekule. Elektronické efekty však ovlivňují i sílu vodíkových vazeb.

Mírou elektronických vlivů substituentů na vlastnosti látky s aromatickým charakterem jsou Hammettovy konstanty  $\sigma$ , které byly odvozené na základě porovnání disociačních konstant nesubstituované kyseliny benzoové a jejich substituovaných derivátů. Substituenty přitahující elektrony (např. nitroskupina nebo atom halogenu) disociaci zvyšují, jejich konstanty  $\sigma$  mají kladnou hodnotu. Substituenty, které naopak mají elektrondonorový charakter (např. alkylskupiny) disociaci potlačují a mají hodnoty  $\sigma$  záporné. Hodnoty Hammettových konstant neodráží jen induktivní charakter substituentů, ale i rezonanční efekty, závisí proto i na poloze substituentu – jiné jsou pro substituenty v poloze *para*, jiné pro polohu *meta*.

Hammettovy konstanty se běžně uplatňují v různých korelačních vztazích v organické chemii, ale z výše uvedených důvodů mají vztah i k biologické aktivitě látky.

Např. minimální inhibiční koncentrace  $C$  aromatických sloučenin vůči bakteriím *Escherichia coli* je určena vztahem:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = 1,05 \sigma - 1,28$$

Deriváty se substituenty s elektronovým deficitem inhibují růst bakterií inhibovat více než látky se substituenty s vlastnostmi elektron-donorů.

Vedle hydrofobity a elektronické struktury ovlivňují biologickou aktivitu i **sterické faktory**.

Objemné substituenty mohou snižovat biologickou účinnost tím, že brání molekule léčiva aby správně „zapadla“ do vazebného místa své cílové struktury. V jiných případech však substituenty mohou stericky fixovat právě tu konformaci, která je pro interakci s cílovou strukturou nezbytná. K vyjádření sterických vlivů substituentů na účinnost se používá několik různých parametrů. Nejčastěji jimi jsou Taftovy sterické faktory  $E_S$  odvozené ze vztahu mezi objemem substituentu v řadě příbuzných sloučenin a rychlostí určité základní reakce. Účinnost však může být korelována se sterickými efekty pomocí molekulové refraktivity, která se vypočte z indexu lomu, hustoty a molekulové hmotnosti látky nebo Verloopových sterických parametrů, které lze vypočítat z údajů o vazebných úhlech, délce vazeb, van der Waalsových poloměrech a předpokládané konformaci substituentu.

Přímá korelace účinnosti s Hammettovými konstantami a sterickými faktory se může uplatňovat zejména tam, kde účinnost nezávisí na tom, zda látka proniká přes buněčnou membránu, tj. zejména při sledování účinků *in vitro* v bezbuněčných systémech. V reálných systémech je samozřejmě třeba brát v úvahu jak transport látky přes buněčné membrány, tj. hydrofobitu látky, tak i pravděpodobnost jejich interakcí s cílovou strukturou, tj. elektronický charakter a prostorovou strukturu látky. Vztahem, který tak komplexně činí je **Hanschova rovnice**, základní rovnice QSAR a první rovnice, která umožnila předpovědi biologické účinnosti skupin derivátů určité základní látky.

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = -k_1 (\log P)^2 + k_2 \log P + k_3 \pi + k_4 \sigma + k_5 E_S + k_6$$

Konstanty  $k_1 - k_6$  se odvozují z údajů o aktivitě známých látek. Na výběru těchto látek pak závisí správnost předpovědi. Výběr usnadňuje pomůcka sestavená Craigem. Ten vynesl do grafu hodnoty  $\sigma$  a  $\pi$  pro různé substituenty. Osy x a y dělí substituenty podle hodnot  $\sigma$  a  $\pi$  do 4 kvadrantů (+ $\sigma$ + $\pi$ , + $\sigma$ - $\pi$ , - $\sigma$ + $\pi$ , - $\sigma$ - $\pi$ ). Připraví-li se látky se substituenty z jediného kvadrantu (např. Cl, Br, I, CF<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>, všechny s hodnotami + $\sigma$ + $\pi$ ), bude pravděpodobně předpověď dosti špatná. Ke zjištění konstant Hanschovy rovnice by proto měly být použity látky pokud možná se substituenty, jejichž hodnoty patří do každého ze čtyř kvadrantů, např. CF<sub>3</sub> (+ $\sigma$ + $\pi$ ), Et (- $\sigma$ + $\pi$ ), CN (- $\sigma$ + $\pi$ ) a OH (- $\sigma$ - $\pi$ ).

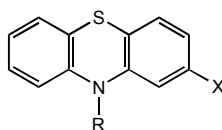
Korelace mezi strukturou a aktivitou byly dále zlepšovány rozšířením Hanschovy rovnice o další fyzikálně chemické parametry. Podstatné zlepšení korelací přineslo zahrnutí interakcí léčiva s plasmatickými bílkovinami (na nichž závisí koncentrace volného léčiva v krevním oběhu), s metabolizujícími enzymy apod. Největším přínosem pak bylo trojrozměrné počítačové modelování interakcí léčiva s cílovou strukturou umožněné jednak výkonnými počítači a sofistikovaným software, jednak prohlubující se znalosti o prostorové struktuře různých cílových biomakromolekul.

V posledních letech byla navržena řada nových metod modelování vztahů mezi strukturou a účinností, které využívají různé funkce a deskriptory k popisu vlastností látek, např. srovnávací analýza molekulových polí (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA), srovnávací analýza indexů podobnosti molekul (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis, CoMSIA), analýza vlastních hodnot (Eigenvalue Analysis, EVA) aj. Ani ty nejlepší modely však zatím neposkytují zcela spolehlivé výsledky. V literatuře lze nalézt řadu příkladů léčiv, kdy predikce účinnosti pomocí výpočtů byla velmi úspěšná, ale i případy, kdy se naopak ukázalo, že léčiva se chovají odlišně. Nepřesné jsou zejména predikce vlastností látek, jejichž struktura se dosti liší od souboru použitého k návrhu počítačového modelu. Důvodem je, že naše znalosti o vztazích různých strukturních parametrů k chování látky v systému jsou stále ještě příliš kusé a že dosavadní modely postihují spíše jen interakce za určitého stacionárního stavu, zatímco reálné systémy se vyznačují velkou dynamičností. Situace se však rychle zlepšuje. Podílí se na tom i rostoucí množství informací o detailním prostorovém uspořádání cílových biomakromolekul (enzymů, receptorů, nukleových kyselin apod.). Do r. 2000 byly známy detailní prostorové struktury 460 enzymů, na konci roku 2003 to bylo už 1.900 struktur. Z rentgenostrukturních nebo NMR měření jsou k dispozici nejen informace o detailní struktuře cílové biomakromolekuly, ale stále častěji i o jejich komplexech s určitými léčivy. Zvyšuje se výkonnost počítačů, takže do korelací lze zavést podstatně více parametrů než doposud a lze postupně provádět výpočty interakcí protein-ligand *ab initio*. Přes veškerá zlepšení zatím stále ještě nemohou návrhy nových léčiv „*in silico*“, tedy pomocí křemíkových čipů počítačů, plně nahradit experimenty a experimentátory. Počítačové modelování vztahů mezi strukturou a aktivitou se však stalo nezbytnou pomůckou pro zlepšení efektivnosti výzkumu a vývoje léčiv.

## Optimalizace farmakodynamických a farmakokinetických parametrů léčiva

Po nalezení vodítka a zjištění, jaké strukturní charakteristiky musí látka mít, aby měla požadované účinky, je dalším úkolem farmakochemiků navrhnout nebo provést takové modifikace molekuly, aby byla zachována nebo lépe zvýšena účinnost látky a přitom byly současně eliminovány nebo alespoň zmírněny její nežádoucí vlastnosti. Při řešení tohoto úkolu jsou navrhována, připravována a zkoušena **analoga** základní molekuly.

Některé možnosti přípravy analog vodítkové struktury vedoucí ke zvýšení účinnosti již byly zmíněny, např. v souvislosti s fixací aktivní konformace nebo ovlivněním  $pK_a$ . Mezi další možnosti zvýšení požadované účinnosti a/nebo potlačení nežádoucích účinků patří **změna polohy dvou nebo více funkčních skupin** potřebných pro interakci zkrácováním nebo prodloužováním alifatického řetězce, na němž jsou tyto skupiny navázány. Pokud jsou interagující skupiny součástí cyklického systému lze modulovat aktivitu kontrakcí nebo naopak rozšířením kruhu. Jsou-li tyto skupiny součástí většího komplexního skeletu, je možné dosáhnout lepšího přizpůsobení molekuly léčiva prostorové stavbě cílové struktury změnou pozice funkčních skupin. Skelet molekuly se přitom nemění, interagující skupiny se jen buď vzájemně přiblíží nebo naopak oddálí. V případě hydrofobních interakcí je někdy možné modulovat aktivitu **změnou velikosti hydrofobních skupin léčiva**. Je-li hydrofobní vazebné místo cílové struktury velké, může záměna methylové skupiny za ethylovou, isopropylovou nebo *tert.*-butylovou vést ke zvýšení aktivity, protože objemnější substituent je lépe vyplní než methylskupina. Podobně mohou být vazebné interakce aromatického systému zvýšeny přípravou analog obsahujících kondenzované aromatické kruhy. Rozvětvení alifatického řetězce nebo záměna primární aminoskupiny za sekundární nebo terciární účinnost obvykle snižuje, protože se zhoršují sterické podmínky pro interakci. Někdy mohou zdánlivě malé změny struktury výrazně změnit farmakodynamické charakteristiky látky. Příkladem mohou být 10-aminoalkylfenothiaziny:

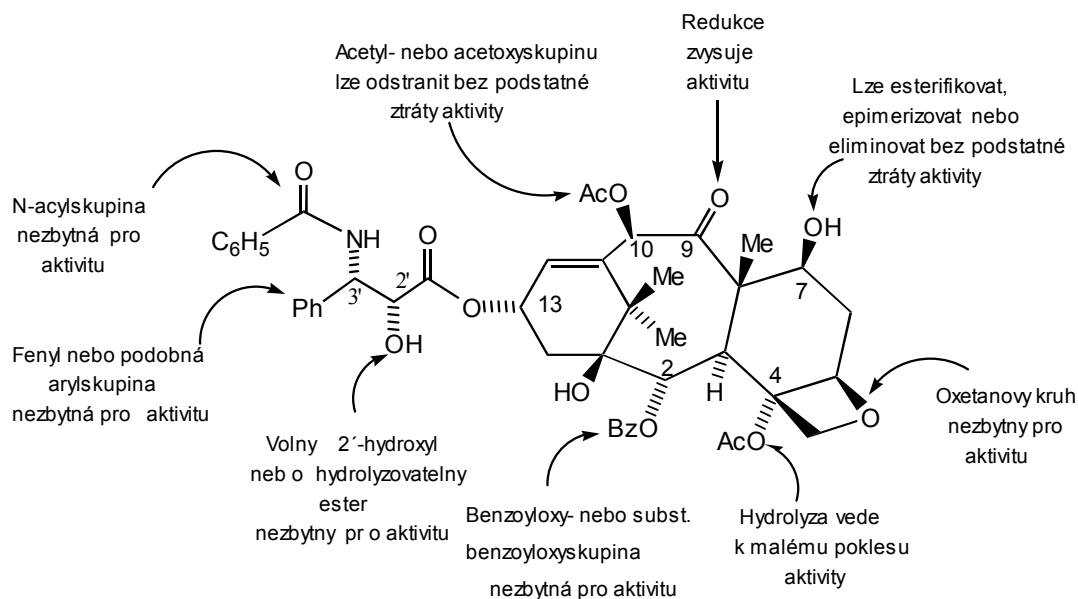


U hydrochloridu promethazinu, ( $X=H$ ,  $R=2$ -dimethylaminopropyl) převládají protikřečové a antihistaminové účinky. Promazin, ( $X=H$ ,  $R=3$ -dimethylaminopropyl) má výrazně zklidňující účinky, trimeprazin, ( $X=H$ ,  $R=3$ -dimethylamino-2-methylpropyl) má zvýšený protiprurický účinek (potlačuje svědění). Chlorpromazin, 2-chlorderivát promazinu, ( $X=Cl$ ,  $R=3$ -dimethylaminopropyl) má zklidňující účinek, zatímco prochloroperazin, derivát, který má dimethylaminoskupinu v postranním řetězci nahrazenou N-methylpiperazinem ( $X=Cl$ ,  $R=3$ -[4-methylpiperazin-1-yl]propyl) potlačuje zvracení a tlumí psychózy)

Při přípravě analog musí samozřejmě být zachovány strukturní charakteristiky potřebné pro účinnost. Při studiu vztahů mezi strukturou a účinností se na prvních sériích připravených látek zjišťuje, které skupiny nebo místa molekuly nelze nebo naopak lze pozměnit bez ztráty účinnosti, tj. zda jsou součástí farmakoforu nebo auxoforu.



Tak např. studiem biologických vlastností různých analog protinádorového léčiva paklitaxelu bylo zjištěno, které skupiny a struktury jsou nezbytné, mají-li být zachovány léčebné účinky (podle Kingston D.G.I., *Trends in Biotechnol.*, 1994, 12, 222-227):



Navržená a připravená analoga vodítkové struktury se obvykle testují nejprve *in vitro* a až u vybraných látek s nejvyšší účinností se provádějí zkoušky *in vivo*. Přitom se často stává, že tyto látky nemají vlastnosti, které by umožňovaly jejich použití v terapii.

Může to být nedostatečná rozpustnost v biologických tekutinách, takže není možné dosáhnout potřebnou plasmatickou koncentraci látky nebo naopak nedostatečná hydrofobita (lipofilita), která neumožňuje průnik molekul potenciálního léčiva buněčnými membránami. Vybrané látky mohou být chemicky nestálé nebo je organismus může příliš rychle nebo naopak příliš odbourávat. Mohou vykazovat příliš vysokou systémovou nebo orgánovou toxicitu, tj. být vysoce toxické nejen vůči nemocným, ale i zdravým buňkám a tkáním.

Dalším úkolem chemika proto je provést takové změny struktury látky, které by při zachovaných farmakodynamických charakteristikách měly zlepšené farmakokinetické parametry. Nejčastěji to bývá **zvýšení rozpustnosti látky**.

Rozpustnost látek závisí na struktuře jejich molekul i charakteru rozpouštědla, kterým jsou u léčiv biologické tekutiny tvořené vodními systémy. Do jisté míry lze rozpustnost léčiv v těchto systémech předpovědět s využitím výpočetní techniky. Výsledky předpovědí ale zatím nejsou dostatečně přesné a obecně použitelné, takže se bez měření rozpustnosti farmakochemici zatím neobejdou. Rozpustnost se vyjadřuje buď jako hmotnost (v gramech) látky rozpuštěné ve 100 g (w/w) nebo 100 ml (w/v) rozpouštědla, ve druhém případě je však třeba počítat se změnami objemu rozpouštědla s teplotou. S teplotou se mění i rozpustnost. U léčiv se proto obvykle měří rozpustnost jednak při teplotě místnosti (25°C), jednak při teplotě těla (37°C). U většiny látek se vzrůstající teplotou rozpustnost roste, jsou však i výjimky. U omezeně rozpustných solí se rozpustnost snižuje v přítomnosti stejných iontů, jaké tvoří sůl. U perorálně podávaných léčiv je třeba s tím počítat v případě chloridů, protože v žaludku je vysoká koncentrace chloridových iontů z kyseliny chlorovodíkové.

U látek bazického nebo kyselého charakteru závisí rozpustnost na stupni ionizace, který určuje pH. Ionizované formy jsou polárnější a proto ve vodě rozpustnější než neionizovaná látka.

Většina bazických léčiv se proto podává ve formě solí „s farmaceuticky akceptovatelnými kyselinami“, tj. kyselinami, které samy o sobě nejsou toxické ani nemají žádný jiný výrazný biologický účinek. Většinou to jsou soli s hydrofilními kyselinami (např. citráty, laktáty, maleáty, fumaráty, mesyláty, chloridy, bromidy a sulfáty), které jsou lépe rozpustné než soli kyselin s lipofilním charakterem. Podobně je tomu v případě solí léčiv s charakterem kyselin, kdy se jako báze používá „tromethamin“ (trihydroxymethylaminomethan), N-methylglukamin, diethanolamin nebo aminoethanol, popř. se připravují soli s anorganickými kationty (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>). Omezeně rozpustné soli jsou zpravidla méně účinné než soli dobře rozpustné, někdy však může být omezená rozpustnost využita k tomu, aby se léčivo uvolňovalo při pomalém rozpouštění v organismu postupně (např. depotní forma penicilinu G je tvořena intramuskulárními injekcemi suspenze jeho omezeně rozpustné soli s prokainem).

Není-li možné zvýšit rozpustnost převedením na sůl, přichází v úvahu navázání nebo obměna funkčních skupin molekuly léčiva chemickou modifikací. Přitom je třeba brát v úvahu:

- **Místo v molekule**, kde modifikace může být provedena. Zavedení dalších nebo záměna funkčních skupin v určitých místech molekuly může negativně ovlivnit interakce léčiva s cílovou strukturou
- **Typ zaváděné skupiny nebo modifikace**. Rozpustnost ve vodě zvyšují polární skupiny jako je hydroxylová, aminová, amidová nebo karboxylová skupina. Velmi silně polární skupiny, jako je sulfonová, fosfátová nebo fosfonátová skupina, zvyšují rozpustnost ve vodě nejvíce, avšak jejich přítomnost může bránit průniku molekuly léčiva přes buněčné membrány. Málo polární skupiny (halogen, etherová, esterová, aldehydická a ketonická skupina) rozpustnost ve vodě významněji neovlivňují, mohou však zlepšit penetraci molekuly přes lipidickou dvojvrstvu buněčných membrán. Rozpustnost ve vodě lze zvýšit také narušením planarity molekuly (zamezení  $\pi$ - $\pi$  interakcí) a zvýšením její flexibility. Při těchto všech modifikacích je třeba mít na paměti, že změny polaritu, planarity apod. mohou sice zlepšit parametry rozpustnosti, ale přitom současně zhoršit interakce molekuly léčiva s cílovou strukturou.
- **Bioisosterii**. Klasické isosterní skupiny mají na svém povrchu stejný počet elektronů, ale nemusí mít stejný počet atomů – např. isosterní jsou atom chloru nebo fluoru, hydroxyl, primární aminoskupina a methylskupina nebo methylenová skupina s kyslíkovým můstkem etherů a –NH– skupinou v ekvivalentních aminech. Vzhledem k odlišnému chemickému charakteru nemívají takové isostery stejnou biologickou účinnost. Např. thymidin je substrátem thymidinkinasy, kterou je fosforylován. Analogický derivát, který má deoxyribofuranosu nahrazenou 3-hydroxy-4-hydroxymethylcyklopentantanem fosforylován touto kinasou není, není však ani inhibitorem enzymu. Důvodem však v tomto případě není interakce kyslíku furanosového kruhu s aktivním místem enzymu, ale odlišná konformace cyklopentanového kruhu. Naproti tomu bioisostery sice nemají stejný počet atomů ani povrchových elektronů a dokonce mohou mít řetězec nahrazený kruhem, ale mají podobnou biologickou účinnost. Příkladů bioisosterických skupin je velká řada: s karbonylovou skupinou je bioisosterní např. sulfinylová, sulfoxylová skupina, s karboxylem skupina amidofosfonová, 3-hydroxy-5-thiazolyl-, 5-tetrazolyl- nebo 3,5-difluor-4-hydroxyfenylskupina, s hydroxylem hydroxymethyl- nebo ureidoskupina atd.
- **Stabilitu zaváděných skupin a vazeb**. Skupiny navázané esterovou, amidovou, glykosidickou, sulfo- a fosfoesterovou vazbou mohou být snadno rozštěpeny enzymy za vzniku původní účinné látky, léčiva modifikovaná pomocí takových vazeb jsou tedy vlastně profarmaky. Skupiny vázané přímo na uhlíkový skelet léčiva vazbami C-C, C-O a C-N jsou naopak metabolicky stálé.
- **Způsob chemické modifikace**. Chemickou modifikaci lze v zásadě provést v jakémkoliv kroku syntézy, pokud se však modifikace, při níž může vznikat velké množství vedlejších látek a nečistot provádí až v závěrečných stupních, nemusí být snadné připravit léčivo v dostatečné čistotě. Rovněž je třeba přihlížet k podmínkám modifikace a přítomnosti chemicky nestálých skupin v molekule, což může vést k nutnosti zavedení chránících skupin.

U léčiv je dále požadováno, aby byla dostatečně **chemicky i metabolicky stabilní**. Platí to zejména u léčiv, která jsou podávána perorálně a musí tedy odolávat agresivnímu prostředí zažívacího traktu (silně kyselé prostředí žaludku, bazické prostředí ve střevech, účinek hydrolytických enzymů). Ze zažívacího traktu se léčivo dostává nejprve do jater, kde je vystaveno účinku metabolizujících enzymů a teprve pak přejde do krevního oběhu. Podobně jako rozpustnost, tak i chemickou a metabolickou stabilitu léčiv lze ovlivnit modifikacemi jejich molekuly.

Při modifikacích molekuly léčiva se chemik musí vystříhat zavedení skupin s vysokou chemickou reaktivitou vůči vodě, jako jsou např. anhydridy, protože vzniklé deriváty v biologických tekutinách rychle hydrolyzují. Ostatní vysoce chemicky reaktivní skupiny a atomy, jako jsou halogeny, oxirany, thirany nebo aldehydy mohou sice hydrolyze odolávat, zato však mohou reagovat s funkčními skupinami bílkovin, sacharidů nebo nukleových kyselin a tím pozměnit jejich vlastnosti. Léčiva s takovými reaktivními skupinami se v terapii uplatňují jen v omezené míře, protože se vyznačují vysokou systémovou toxicitou. Obecně přitom platí, že čím jsou chemicky reaktivnější, tím méně selektivní je jejich účinek. Používají se proto převážně jen při léčbě život ohrožujících onemocnění, jako je rakovina (alkylační cytostatika). Většina běžných léčiv proto vysoce reaktivní skupiny neobsahuje, takže se u nich dostává do popředí metabolická stabilita.

Různé skupiny léčiv mohou podléhat metabolickým přeměnám ochotněji než druhé. **Znalost metabolických přeměn funkčních skupin je proto velmi důležitá pro návrh stabilních léčiv.**

Při metabolické inaktivaci bývají např. methylové skupiny oxidovány na skupiny karboxylové, esterové a amidové skupiny hydrolyzovány, aromatická jádra oxidována na fenoly apod. Přitom se zvyšuje polarita molekuly, což pak vede ke zrychlené eliminaci (viz kapitolu o farmakokinetice).

Metabolické přeměny probíhají na specifických místech molekuly léčiva. Navázáním metabolicky stálé skupiny nebo atomu na takové místo metabolickou inaktivací zastaví nebo alespoň zpomalí. V tomto případě hovoříme o **metabolické blokadě**.

K metabolické blokadě může např. dojít, když se v aromatickém, alicyklickém nebo alifatickém zbytku, který podléhá metabolické oxidaci na hydroxyderivát, nahradí vodík atomem fluoru nebo chloru. Zvláště výhodné jsou přitom fluorderiváty, protože zavedením fluoru se nemění velikost molekuly a tedy ani její schopnost interagovat s cílovou strukturou. Na rozdíl od dalších halogenů, fluor většinou nemůže být snadno substituován. Metabolickou oxidaci methylové skupiny na karboxyl se může zabránit její náhradou rovněž za fluor, chlor nebo i vodík.

Metabolickou hydrolýzu esterových nebo aminových skupin lze potlačit, jestliže se do jejich sousedství zavedou objemné skupiny, které vytvoří **sterický štít**.

Sterický štít znesnadňuje přiblížení labilní skupiny do aktivního místa enzymů. Příkladem může být zablokování hydrolýzy peptidasami a proteinasami tím, že se z léčiv peptidického charakteru připraví N-methylderiváty.

K ovlivnění rychlosti chemické i enzymatické hydrolýzy esterových a amidových skupin lze využít i různé **elektronické efekty**.

U esterů, které jsou enzymaticky štěpeny velmi rychle, lze snížit rychlost štěpení zavedením elektrondonorových skupin do zbytku alkoholové komponenty. Naopak zavedením elektronakceptorových skupin se rychlost hydrolýzy zvyšuje.

Některá léčiva mají charakter oligopeptidů nebo bílkovin. Tato léčiva jsou jednak metabolicky nestálá, jednak mohou vyvolávat nežádoucí imunitní reakce organismu. Navázáním vhodných polymerních řetězců lze tato léčiva stabilizovat a současně potlačit vznik protilátek proti léčivu a tak chránit organismus před anafylaktickým šokem.

Nejčastěji se v takových případech provádí „pegylace“, tj. navázání řetězců polyethylenglykolu (PEG). Molekuly vody vytváří kolem PEG hydratační obal, který chrání molekulu léčiva před atakem proteolytických enzymů a tím prodlužuje jejich plasmatický poločas. Současně snižuje hydratační obal imunogenicitu terapeutických bílkovin.