

Výzkum a vývoj nových léčiv

Úvod

Výzkum a vývoj nových originálních léčiv je zdoluhavý, nákladný a přitom značně rizikový. Je ale také nesmírně zajímavý a záslužný. Pravděpodobnost úspěchu je však při něm jen malá – z desettisíců nově zkoumaných látek se jen jedna až dvě stanou léčivem.

Ilustruje to třeba příklad pražského Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii. Tam bylo do 90. let minulého století syntetizováno 18 tis. látek, ale jen 29 z nich bylo zaregistrováno jako léčiva a i z těch uspělo v silném konkurenčním prostředí v zahraničí jen několik. Nejúspěšnější bylo antidepresivum dosulepin s celkovým obratem 19,5 mld. Kč. Licence na jeho výrobu byla prodána britské firmě Boots.

Výzkum a vývoj jednoho nového léčiva trvá v průměru 12-15 let. Průměrné náklady činily ještě v r. 1975 asi 150 mil. \$, kolem roku 2000 přesáhly 800 mil. \$ a nyní se mají pohybovat mezi 1,4-1,75 mld. \$.

Pokud se do nákladů zahrnou i částky vynaložené na zbytečný výzkum (tj. na léčiva, která při klinickém zkoušení selhala) a na marketing, pak z porovnání nákladů na VaV vykazovaných velkými firmami a počtu jejich povolených léčiv za období 1997-2011 vyplývá, že firmu Amgen s 9 povolenými léčivy stál VaV jednoho úspěšného léčiva 3,7 mld. \$ a firmu AstraZeneca (5 schválených léčiv) dokonce 11,8 mld. \$. Spolu s růstem nákladů na VaV léčiv klesá jejich „životnost“ na trhu – často se po několika málo letech objevují nové konkurenční přípravky. Kompletní výzkum a vývoj zcela nových léčiv, „nových chemických entit (NCE)“, si proto mohou dovolit pouze velké farmaceutické koncerny. Menší firmy se proto orientují hlavně na vývoj a výrobu generik, kopií léčiv, u nichž vypršela patentová ochrana, případně na hledání analog zavedených úspěšných léčiv.

Příčinou velké časové a finanční náročnosti výzkumu a vývoje a přitom i poměrně malé pravděpodobnosti úspěchu jsou mimořádně vysoké požadavky na účinnost, bezpečnost a kvalitu nových léčiv.

Při základním preklinickém zkoušení účinnosti a bezpečnosti uspěje jen asi 0,1% kandidátů na nové léčivo. I z těch pak první fázi klinického zkoušení na lidech projde jen asi jedna desetina a mnoho léčiv selhává i v dalších fázích klinických zkoušek. Přestože zisky farmaceutických firem činí 25-40% tržeb, jen asi 20% nových léčiv přináší více, než činily náklady na jejich výzkum a vývoj. Zisk z jejich prodeje pak musí zaplatit i VaV neúspěšných kandidátů. To se pak projevuje na cenách nových léčiv. Zcela nových léčiv, „nových chemických entit“, je ale povolováno každý rok jen velmi málo. Uváděny jsou hlavně léky povolované FDA. Ještě v r. 1997 jich bylo 49, ale v r. 2009 jen 25. V r. 2011 jejich počet vzrostl na 35 a v r. 2015 na 45, ale v r. 2016 jich bylo jen 22. Evropská EMA sice v r. 2016 schválila 81 léčiv, ale jen 27 bylo nových. Přes malý počet nově schválovaných léčiv přesto stále roste počet kandidátů na nová léčiva ve výzkumu a vývoji. Nyní je odhadován na asi 35-40 tisíc, z toho přes 5 tis. léků je klinicky zkoušeno. Spolu s tím rostou i částky vynakládané na VaV. V r. 2010 vydalo 50 nejvýznamnějších firem na výzkum a vývoj 102,9 mld. \$, průměrný roční nárůst měl být 7,4%. Nyní se i v této oblasti začalo šetřit (např. firma Pfizer měla od r. 2011 plánované náklady na VaV osekát z 9,4 na 6,5-7 mld. \$; Merck ohlásil snížení stavu pracovníků ve VaV a obchodu o 8.500-9.500. V rámci restrukturalizace farmaceutického průmyslu dochází k řadě akvizic a fúzí spojených s redukcí VaV a rozpadem některých výzkumných týmů. Firmy proto hledají možnosti úspor nákladů na VaV bez omezení inovací, např. získáváním licencí na slibné látky z různých pracovišť, jejichž vývoj pak dokončují. Nejméně čtvrtina nových úspěšných léčiv má původ v laboratořích vysokých škol, státních výzkumných institucích nebo malých výzkumných firmách.

Velké riziko neúspěchu neznamená nulovou pravděpodobnost, že se ze připravených tisíců nových látek stane úspěšné léčivo, ale poukazuje na nutnost racionálního přístupu k výzkumu a vývoji léčiv.

Zjistí-li se u nějaké látky zajímavé biologické účinky, je třeba ještě velmi mnoho práce, aby se z ní nebo odvozených derivátů stalo povolené léčivo. Objev biologicky účinné látky v první fázi výzkumu a vývoje nového léčiva není finančně příliš náročný, potřebné zdroje se dají zajistit formou grantů nebo účelnou spoluprací s průmyslem. Dále je však třeba postupovat rychle a účelně a neopomenout nic, co rozhoduje o budoucím úspěchu látky, zejména pak patentovou ochranu. Finančně náročné jsou zejména závěrečné fáze VaV, kdy se vyvíjí technologie výroby a metody analytické kontroly a léčivo se preklinicky a zejména pak klinicky zkouší. Tyto fáze už většinou nelze bez spolupráce s kapitálově silným partnerem na potřebné úrovni zajistit. Provádění preklinického a klinického testování „na koleně“ na pracovištích nespĺňujících požadavky „správné laboratorní nebo klinické praxe“, což se u nás většinou děje, je pouze vyhazováním peněz. Výsledky takových zkoušek bývají sice medializovány jako velké úspěchy našich vědců, lékové autority povolující léčiva je ale neuznávají a považují je pouze za orientační. Naproti tomu se u nás někdy podceňuje patentová ochrana nových látek před potenciálními konkurenty. Právě ta je však základním předpokladem pro nalezení vhodného partnera, který finančně zajistí další vývoj léčiva až do jeho uvedení na trh.

Chceme-li se zabývat výzkumem a vývoj léčiv, je třeba si uvědomit, že jde **službu, která má své zákazníky**. Předpokladem úspěšného uplatnění výsledků VaV, tedy úspěšného marketingu této služby, je uspokojení potřeb zákazníků. To není jednoduché, protože každá skupina zákazníků přitom má různé (někdy až protichůdné) zájmy.

- **Pacienti** požadují, aby jim léčiva pomáhala zlepšit kvalitu života, tj. vyléčila onemocnění nebo alespoň odstranila nebo zmírnila jeho symptomy, prodloužila dobu života nebo alespoň prodloužila dobu do recidivy onemocnění, zmírnila bolesti, zkrátila dobu neschopnosti, byla účinná a aby současně měla minimum nežádoucích vedlejších účinků, byla bezpečná a kvalitní, ale také levná a/nebo hrazená pojišťovny a aby jejich podání bylo snadné a komfortní.
- **Lékaři** mají podobné požadavky na léčivo jako pacienti, ale požadují i minimum kontraindikací (kdy léčivo nelze předepisovat) a lékových interakcí, protože omyl v preskripci může mít nepříznivé následky pro pacienta i lékaře.
- **Lékárníci a distributoři léčiv** požadují od léčiv reprodukovatelnou kvalitu a co největší stabilitu, ale také chtějí, aby jim jejich prodej přinášel zisk.
- **Poskytovatelé a plátcí zdravotní péče (pojišťovny)** chtějí, aby jejich finanční zátěž spojená s podáním léčiva byla co nejnižší (nízká cena a úhrada, farmakoekonomická výhodnost)
- **Vedení a akcionáři farmaceutické firmy** mají zájem o široké uplatnění léčiva (rozsáhlé indikace, využitelnost u nejčtenějších onemocnění, minimální konkurence), o co nejdelší patentovou ochranu nových léčiv, nízkou nákladovost a vysokou ziskovost výroby. V neposlední řadě chtějí, aby léčivo vytvářelo u veřejnosti příznivý obraz firmy (některé farmaceutické firmy se proto zabývají i méně lukrativními léčivy, např. léky proti AIDS).

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

- * **Fáze objevu** (Drug Discovery), kdy se zjišťuje, která látka nebo látky jsou účinné („hity“)
- * **Fáze návrhu** (Drug Design), kdy se modifikuje struktura nejlepších účinných látek 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, zajišťuje jejich trvalá kvalita a provádí klinické zkoušky

Toto rozdělení je do značné míry formální. To, co jedni nazývají fází návrhu, druzí považují za optimalizační část fáze objevu a další přitom hovoří už o vývoji. 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. Různí autoři také odlišně chápou pojmy výzkum a vývoj. V ČR se někdy vývoj nepovažuje za tvůrčí činnost a – zřejmě ve snaze získat granty – se o vývoji mluví jako o výzkumu. To pak vede k odlišování „vědy“ a „výzkumu“ resp. „badatelského“ a „aplikovaného“ výzkumu. V těchto přednáškách se budeme držet výše naznačeného rozdělení do tří fází.

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

- **Nová struktura, nové přínosy** („first in the class“):
 - Léčivo může léčit nemoci a symptomy, pro něž dosud neexistovala vhodná terapie
 - Léčivo rozšiřuje možnosti léčení, je alternativou pro pacienty, kteří na dosavadní terapii nereagují
- **Nová, patenty nechráněná struktura navazující na léčivo se známými přínosy** („me too“):
 - Léčivo je účinnější než dosud dostupné alternativy
 - Léčivo má méně nežádoucích vedlejších účinků
 - Léčivo přináší výhody pro pacienty (tablety místo injekcí a infuzí, prodloužení účinku apod.) nebo jejich specifické skupiny (děti, senioři, těhotné ženy, pacienti s dalším onemocněním atd.)
 - Léčivo s dalším účinkem,,
 - Profarmaka“, neúčinné látky, které přechází na účinnou látku po metabolické přeměně v organismu
- **Známá struktura, nové přínosy pro terapii**
 - Náhrada racemátu účinnějším enantiomerem
 - Nový typ soli
 - Zvýšení selektivity
 - Nová nebo rozšířená indikace
 - Nová léková forma
- **Známá struktura, známé přínosy**
 - **Generika**
 - „Fixní“ kombinace dříve odděleně podávaných léčiv s doplňujícím se účinkem

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. Farmaceutické koncerny si je pak kupují formou licence a rozvíjejí v dalších fázích VaV až po jejich předběžném posouzení. 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 získaných s jejich předchůdci, takže tato léčiva obvykle bývají účinnější, bezpečnější, pro pacienta komfortnější a proto často i komerčně úspěšnější.

Někdy také mohou být hledána analoga zavedených léčiv, u nichž byl zjištěn další terapeuticky využitelný účinek. Ten může být obměnami základní molekuly zesilován, zatímco původní biologická aktivita může naopak být potlačována, takže nakonec vlastně vznikne nové léčivo.

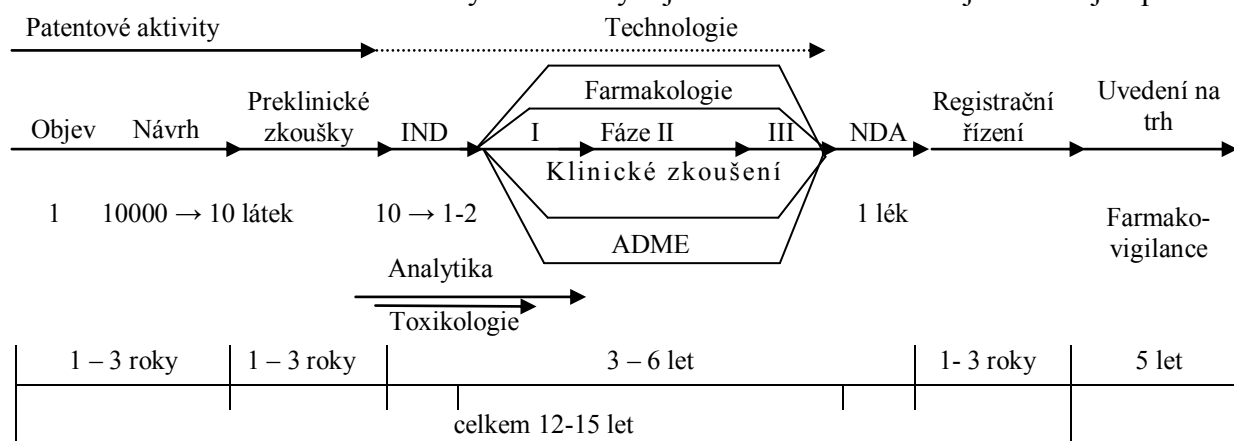
Někdy mezi fází návrhu a vývoje lze zařadit hledání „profarmak“, derivátů, které se na účinnou látku přemění až v organismu, nových lékových forem známého léčiva, náhrady racemátu účinným enantiomerem, příprava a použití nových solí účinné látky apod. U většiny těchto látek musí proběhnout nové preklinické a klinické zkoušky, jejich rozsah však může být do určité míry zredukován. U některých nových solí, které vykazují „zásadní podobnost“ se solemi použitými v původním přípravku, jsou nutné pouze zkoušky bioekvivalence (shodné účinnosti). Hledání a zkoušení nových indikací – možností léčby dalších onemocnění zavedeným léčivem – lze považovat za pokračování klinického vývoje přípravku. V tomto případě jsou nezbytné další klinické zkoušky, odpadá ale většina preklinických testů.

U generik – kopií zavedených nízkomolekulárních léčiv – se provádějí pouze vývojové práce (třetí fáze). Vývoj generika přitom končí prokázáním jeho bioekvivalence s původním přípravkem. Tím, že nemusí být nákladně klinicky zkoušeny, jsou podstatně levnější než originální přípravky a jejich vývojem se proto mohou zabývat i malé firmy.

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 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, zaregistrováno však může být až po skončení této ochrany nebo po provedení všech předepsaných zkoušek. To je nákladné a tak výrobci generik raději čekají, až ochrana dat skončí (v EU nyní po 10 - 11 letech, dříve to v ČR bylo za 6 let). Pak je možné se odvolat 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 může k prokázání bioekvivalence stačit jen porovnání složení a stability se zavedeným přípravkem. U tzv. biogenerik, napodobenin léčiv charakteru biomakromolekul (např. terapeutických protilátek), je určité klinické zkoušení požadováno, protože je téměř nemožné připravit kopie s přesně stejnou strukturou.

Průměrnou časovou náročnost výzkumu a vývoje nového léčiva ilustruje následující přehled:



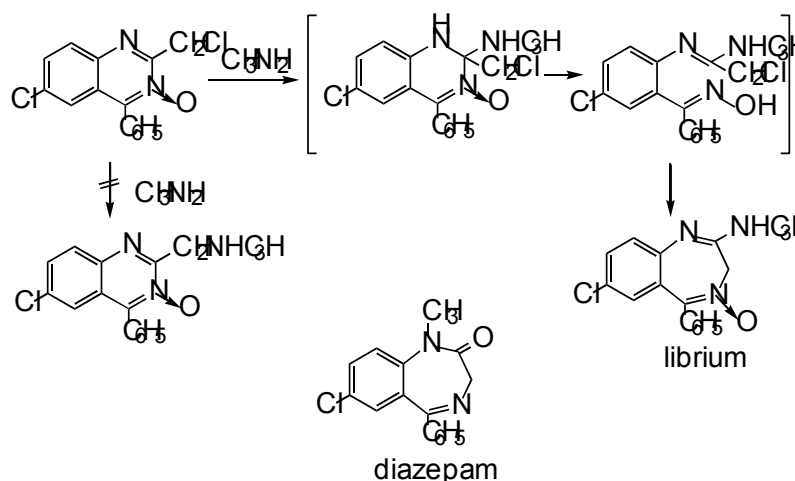
IND = žádost o povolení klinického zkoušení (Investigational New Drug application, NDA = žádost o registraci nového léčiva (New Drug Application), ADME = absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece (farmakokinetika)

Objevování nových léčiv

V minulosti byly účinné látky hledány mezi složkami tradičních léčivých prostředků nebo byl jejich objev výsledkem šťastné náhody (serendipity).

Šťastná náhoda přinesla objevy 5,8% všech používaných léčiv, některé z nich, jako např. penicilin, přitom znamenaly průlom do terapie. Historie léčiv, o jejichž objev se zasloužily šťastné náhody, je nepochybně zajímavá, někdy má dokonce i anekdotický charakter – např. to, že fenolftalein je účinným projímadlem, se zjistilo, když bylo zkoušeno jeho použití k přibarvování vín. Historie sildenafilu známého pod firemním názvem Viagra je popsána v jednom doprovodném textu.

Jiný případ využití šťastné náhody ilustruje např. příklad zklidňujícího léku, diazepamu. V 50. letech 20. století se pracovníci firmy Roche snažili o syntézu benzoheptoxidiazinů (tehdejší název, podle současného názvosloví benzodiazepin-N-oxidů) jako nových léčiv, připravili však jen asi 40 nových derivátů chinazolin-N-oxidu. Ty neměly požadovaný účinek a výzkum byl v r. 1955 ukončen. V r. 1957 byla při úklidu laboratoře objevena zapomenutá látka. Při dodatečném otestování se zjistilo, že má překvapivou účinnost. Šlo o produkt reakce methylaminu s chlormethylderivátem substituovaného chinazolin-3-oxidu, ale nebyl to 6-chlor-4-fenyl-2-methylaminomethylchinazolin-3-oxid, jak bylo předpokládáno. Při reakci totiž došlo k otevření 6 členného kruhu a následné cyklizaci na 2-methylamino-5-fenyl-4H-benzodiazepin-4-oxid. Ten byl nazván librium a stal se vodítkem pro vývoj diazepamu a dalších benzodiazepinů, které byly při potlačování stavů strachu, psychického napětí, úzkosti, neklidu a s tím spojených poruch spánku o řád účinnější než librium:



Podobné šťastné náhody nelze zcela vyloučit ani dnes. V současné době jsou ale objevy nových léčiv především výsledkem systematického a racionálního přístupu. Aktuálním přístupem je tzv. **translační výzkum léčiv** (translational medicines research, TMR).

Tento přístup „překládá“ resp. přenáší výsledky základního výzkumu v medicíně, molekulární biologii a biochemii do činnosti farmakochemiků, farmaceutických technologií a do zaměření klinického zkoušení. Podmínkou úspěchu přitom je vytvoření komplexního multidisciplinárního pracovního týmu se zkušenými odborníky různých oborů. Do translačního výzkumu se zapojuje stále více firemních i akademických pracovišť. O jeho významu a aktuálnosti svědčí mj. i to, že v posledních letech vzniklo nejméně 6 časopisů zaměřených na translační výzkum nebo medicínu, mimo jiné i specializovaná sekce časopisu *Science*.

Projekt translačního výzkumu vychází z **pochopení biologické podstaty určitého onemocnění**. Na tu navazuje **identifikace cílové struktury**¹, jejíž funkce má příčinný vztah k onemocnění.

V minulosti byly znalosti konkrétních cílových struktur v organismu jen mizivé. Při hledání nových léčiv se až do 90. let minulého století uplatňoval **fenotypický přístup**, kdy se sledoval vliv vybraných látek na biologické funkce modelových organismů nebo později na buňky pěstované v laboratorních kulturách. Až pak byly určovány cílové struktury, s nimiž syntetizované látky interagovaly. Pak byly hledány způsoby, jak modifikaci molekuly potenciálního léčiva interakce podle potřeby modulovat. Od 90. let minulého století se začal prosazovat **cílený přístup** k objevům nových léčiv (target-based drug discovery) umožněný úspěchy genomiky a proteomiky. Ty přinesly informace o úloze určitých genů a bílkovin, jejichž anomální výskyt, množství nebo struktura mohou nějak souviset se vznikem, průběhem a projevy určitých onemocnění. Byly tak identifikovány cílové struktury léčiv. Následně byly hledány různé látky, které díky svému složení a prostorovému uspořádání funkčních skupin mohou s cílovými strukturami interagovat a tím přispět k vyléčení nebo alespoň zmírnění příznaků nemoci. Aby vyhledávání potenciálních léčiv bylo úspěšné, bylo třeba vytipované cílové struktury validovat.

Validace cílových struktur (target validation) je objektivní posouzení úlohy určité biomakromolekuly v patogenezi určitého onemocnění nebo poruchy a možností ovlivnění průběhu a dopadů onemocnění **modulováním funkčnosti této biomakromolekuly vhodnými látkami**.

Cílený přístup se v mnohém osvědčil. Uplatnil se především při hledání léčiv charakteru „me too“ a léčiv pro nemoci způsobené jedním nebo jen malým počtem faktorů (např. mutací genů kódujících určité proteiny). Proti očekávání ale nepřinesl výraznější zvýšení počtu nově povolovaných léčiv. Tam, kde cílové struktury nemají aktivní místa vhodná pro interakce malých molekul (jde např. o receptory na povrchu buněk interagující s biopolymerními ligandy) nebo při hledání léčiv na multifaktoriální onemocnění, se znovu uplatňuje fenotypický přístup.

Dalším krokem při výzkumu nových léčiv je vypracování **metod screeningu**, jimiž budou hodnoceny testované látky.

Screening, v doslovném překladu „prosévání“, je vyřazením méně či více rozsáhlých souborů sloučenin na látky účinné a neúčinné. Problémem screeningu je nalezení vhodného „síta“, aby jím „propadly“ jen molekuly s požadovanými vlastnostmi. V minulosti to bývaly testy *in vivo*, prováděné na živých pokusných zvířatech, ty však byly zdlouhavé a finančně náročné. Moderní screeningové postupy vycházejí z poznání příčin nemocí na molekulární a buněčné úrovni. Často spočívají ve zjišťování interakcí kandidátů na nové léčivo „ve skle“ (*in vitro*), tj. s izolovanými cílovými biomakromolekulami, buněčnými kulturami nebo izolovanými tkáněmi.

¹ Podrobnější údaje např. ve výukovém videu E. Murrayové: <https://www.youtube.com/watch?v=R3XXCk3aS0>

Při návrhu metod screeningu je kromě výběru relevantních cílových struktur také třeba určit způsob, jak jejich interakce se zkoušenými látkami detegovat a vyhodnotit. Interagující systém se tak stává **biomarkerem**, který nám řekne, zda zkoušená látka je či není účinná. Stejně jako cílové struktury mají být biomarkery **validovány**, tj. má být doložen jejich vztah k průběhu nemoci. Screeningové systémy mají být navrženy tak, aby byly pokud možná eliminovány falešně pozitivní výsledky, protože další vývoj neúčinné látky by znamenal zbytečně vynaloženou práci a finanční náklady. Současně by měl být i minimalizován počet falešně negativních výsledků, při nich by testem neprošly slibné účinné látky.

Kde je to možné, dává se při screeningu přednost biomarkerům, které lze hodnotit *in vitro*. K jejich výběru významně přispěla genomika a proteomika. Hodnotí se aktivita nebo hladina určitých enzymů, popř. i jiných bílkovin, zastoupení a struktura některých genů apod., a to většinou pomocí vazebných interakcí („binding assay“). Ty se detegují na základě změny charakteristik detekčního systému při vazbě inhibitoru na enzym, antagonisty na receptor apod. Aby bylo možné kvantifikovat účinnost látek, opatřují se biomarkery vhodnou značkou, kterou může být např. navázaný radioizotop, barvivo, fluoreskující nebo luminiscentní látka, popř. enzym (peroxidasa, alkalická fosfatasa) katalyzující přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt apod. Kvantitativní údaj se pak získá po vazebné interakci měřením radioaktivity, absorbance, fluorescence nebo luminiscence systému.

Moderní screeningové metody *in vitro* umožňují rychlé otestování velkých souborů látek – „knihoven“ – sloučenin většinou získávaných metodami kombinatoriální chemie (viz dále). Jsou často označovány anglickým termínem „high throughput screening“ (zkratka HTS), který lze přeložit jako **vysokokapacitní screening** (někdy je v češtině používán termín vysokovýkonný screening).

Zavádění automatizovaných metod vysokokapacitního screeningu provázely zprvu přehnané naděje, pak následovala spíše skepse vyvolaná nesouladem výsledků HTS s poznatky z dalšího hodnocení vybraných látek. V poslední době ale byly metody HTS značně zdokonaleny, např. využíváním nových vysoce citlivých detekčních metod i dalšími technickými opatřeními, takže se znovu staly důležitým pomocníkem farmakochemiků.

Ani moderní zdokonalené screeningové postupy *in vitro* založené na automatizované kvantifikaci vazebných interakcí molekul kandidátů na léčivo s cílovými biomakromolekulami, stále nemusí poskytovat jednoznačné výsledky. Proteiny i další biomakromolekuly se v buňkách vyskytují ve složitých systémech, jejichž složky se vzájemně ovlivňují. Např. při přenosu signálů k dělení buněk může být zablokováno jedné signalizační dráhy inhibicí určitého enzymu vykompenzováno indukci tvorby enzymů alternativní dráhy.

Důležitá je i přesnost a správnost výsledků použitých metod a uspořádání testů minimalizující počet falešně pozitivních i falešně negativních výsledků. Správné statistické vyhodnocení výsledků automatizovaného vysokokapacitního screeningu, kdy se např. zjišťují vazebné interakce velkých souborů kandidátů na léčivo při řadě různých koncentrací s označenou cílovou strukturou imobilizovanou v jamkách titračních mikrodestiček, je stále velkou výzvou.

Fenotypickými biomarkery použitelnými jako indikátory farmakologické odezvy na zkoumanou látku jsou charakteristické rysy normálních nebo nemocných buněk a tkání, popř. i celých organismů, které mohou být objektivně měřeny.

Biomarkerem tak může např. být velikost a tvar buněk nebo jejich jádra, dělení a další buněčné projevy a procesy, počet určitého typu buněk v tkáni (např. cirkulujících nádorových buněk v krevním oběhu) apod. Využití buněčných a tkáňových charakteristik jako biomarkerů sice může být s ohledem na histologické vyhodnocení komplikovanější, ale na druhé straně může poskytnout komplexnější pohled na účinky látek.

Metody zjišťování účinnosti léčiv podle jejich vlivu na charakteristické rysy živých buněk hodnocené např. mikroskopií histochemických preparátů spojenou s analýzou obrazu nebo průtokovou cytometrií se označují jako „high-content screening“ (HCS), **vysokoobsahový screening**.

HCS poskytuje obrovské množství dat, jejich správná interpretace je však zatím složitá. Je výhodný při hledání léčiv určených k terapii nemocí, které mohou být způsobeny kombinací více příčin, např. potenciálních protinádorových léčiv, která blokují buněčné dělení nebo spouští procesy buněčné smrti, apoptózy.

To, že bude při screeningu nalezen „**hit**“, látka interagující s vybranou a validovanou cílovou strukturou, nemusí ještě znamenat, že se podařilo nalézt nejvhodnějšího kandidáta na nové léčivo. Důležitá je i specifická účinku, tj. zda látka působí selektivně jen na vybrané cílové struktury, ale neovlivňuje nežádoucím způsobem jiné.

Nově proto bylo do screeningu zavedeno hodnocení interakcí s více cílovými strukturami. Zjišťuje se přitom nejen pozitivní účinek látek na cílové struktury mající vztah k některým onemocněním, které mají být léčeny, ale i ovlivnění cílových struktur vyvolávající poruchy důležitých životních funkcí. K predikci nežádoucích účinků se používají metodiky vylučující látky s vysokou toxicitou nebo nevýhodnými farmakologickými vlastnostmi. Poté, co musely být „superaspiriny“ rofecoxib a valdecoxib inhibující cyklooxygenasu 2 staženy z trhu pro závažné toxické vedlejší účinky, je např. u kandidátů na nová léčiva zkoušeno, zda neovlivní draslíkový kanál hERG, jehož inhibice může být příčinou srdečních arytmií. Jinou „anti-cílovou strukturou“ je serotoninový receptor 5-HT_{2B}, kdy nežádoucím dopadem jeho interakcí jsou abnormální změny na srdečních chlopních, plicní hypertenze a selhání jater. Pro tyto účinky musely být staženy z trhu některé léky pro hubnutí, jako byly např. svého času velmi populární fenfluramin, dexfenfluramin a podobné látky. Mezi látky interagující s receptorem 5-HT_{2B} patří i tzv. „rekreační drogy“, jako je extáze a další amfetaminy. Nebezpečné mohou být i interakce některých dalších cílových struktur, např. inhibice cytochromů P450 může být příčinou nežádoucích lékových interakcí, protože se zpomalí eliminace druhých léčiv.

Jsou-li k dispozici kromě informací o úloze určité cílové struktury při nemoci i údaje o její prostorové stavbě, lze experimentální screening nahradit **screeningem virtuálním**, „*in silico*“, spočívajícím ve využití počítačů k vyhledávání molekul, které mají takový tvar a funkční skupiny, aby mohly „zajet“ do aktivního nebo alosterického místa cílové biomakromolekuly a tam interagovat.

V odborné literatuře se počítačové posuzování možností interakcí určitých molekul s cílovou strukturou o známé prostorové stavbě nazývá „docking“, což je anglický výraz pro zajištění lodí do doků. Virtuální screening může nahradit část zdoluhavé a nákladné experimentální práce. Alternativou virtuálního screeningu je počítačový návrh léčiva, generování struktur molekul komplementárních s aktivním nebo alosterickým místem enzymů nebo receptorů. Ten sice skýtá větší možnosti chemické rozmanitosti navrhovaných struktur, ale na druhé straně současně zvyšuje riziko neúspěchu. Počítač může navrhovat i molekuly, jejichž přípravou by se experimentátoři patrně nezabývali, protože se nepodobají známým léčivům dané terapeutické kategorie, ale přitom mohou být účinné, protože mají prostorovou stavbu umožňující interakce se strukturou aktivního místa cílové biomakromolekuly. Virtuální screening nebo počítačový návrh léčiva ale zatím stále nemohou nahradit experimentální screeningové postupy. Navržené látky musí být syntetizovány a pak zkoušeny, aby se zjistilo, zda kandidát na nové léčivo skutečně má předpokládané vlastnosti.

Význam a úspěšnost virtuálního screeningu nebo počítačového návrhu léčiv vzrostly s rozšiřujícím se poznáním prostorové struktury cílových biomakromolekul, které přinesla rentgenová krystalografie, elektronová difrakce nebo NMR spektroskopie.

Údaje z databanky bílkovin (PDB, Protein Data Bank) ale stále mají jen statický charakter a nepostihují v potřebné míře hydrataci a konformaci biomakromolekul, která se může za reálných podmínek panujících v organismu dynamicky měnit. Počítačové modely zatím ani v dostatečné míře neřeší konformační flexibilitu molekul potenciálního léčiva. Získávání nových dat včetně údajů o struktuře komplexů protein léčiva a neustále vylepšované počítačové modelování se však začínají vyrovnávat i s těmito problémy, takže se výsledky virtuálního screeningu a počítačových návrhů léčiva stále více přibližují skutečnosti. Zatím slouží především k návrhu obměn účinné látky s využitím algoritmů popisujících vztahy mezi strukturou a účinností látek s cílem zlepšit její farmakologické parametry.

Techniky počítačového modelování interakcí léčiv spolu s moderními postupy screeningu vedly v 90. letech minulého století ke zrodu nové metodiky objevování léčiv. Ta vychází z identifikace jednoduchých sloučenin, z nichž interagují s cílovou strukturou pouze části – fragmenty – molekuly.

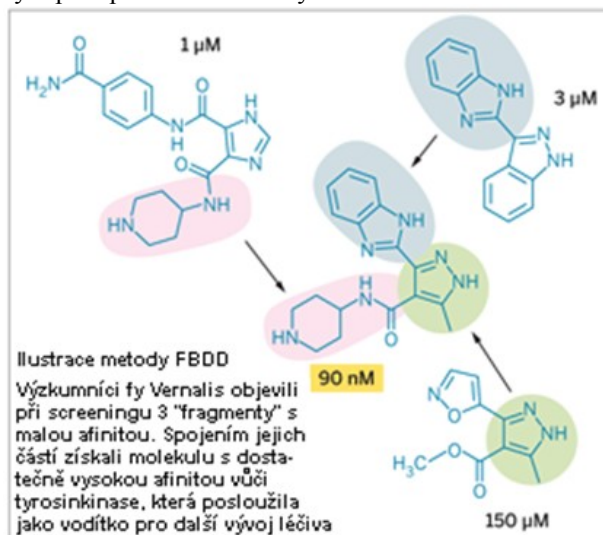
Disociační konstanty jejich komplexů s cílovou strukturou se pohybují mezi 10^{-5} – 10^{-3} mol/l. To nestačí k tomu, aby tyto látky mohly být používány jako léčiva, u nichž je požadována účinnost alespoň o 3 řády vyšší (v mikro-až nanomolárních koncentracích, tj. 10^{-6} – 10^{-9} mol/l). Výhodou ale je, že fragmenty mají mnohem jednodušší strukturu než molekuly účinně interagujících léčiv. Zatímco molekuly klasických léčiv s průměrně 30 atomy těžšími než je vodík mohou teoreticky vytvářet až 10^{63} různých struktur, fragmenty molekul s 12 těžšími atomy jen 10^7 .

Slabě interagující části molekuly lze považovat za **fragmenty budoucího léčiva**, které je možné kombinovat a spojovat s jinými fragmenty interagujícími s jinými skupinami cílové struktury. Kombinací fragmentů se pak získá látka, která je schopna komplexnějších a synergisticky zesílených interakcí a je tedy mnohonásobně účinnější. Metodika vyhledávání fragmentů a jejich spojování a kombinování byla nazvána **na fragmentech založený objev léčiva** (Fragment-Based Drug Discovery, FBDD).

Fragmenty se přitom stávají stavebními kameny komplikovanější struktury budoucího léčiva. Vzhledem k menšímu počtu atomů mají molekulovou hmotnost do 300 daltonů i omezený počet proton-donorových a akceptorových skupin. Knihovny fragmentů jsou méně rozsáhlé než knihovny potenciálních „hitů“. Vyhledání fragmentů je proto snazší a rychlejší. Využívají se přitom spíše fyzikálně chemické (především NMR, ale i hmotová spektrometrie nebo krystalografie) než biochemické nebo biologické metody, které mohou být pro málo účinné fragmenty nedostatečně citlivé. Cílová biomakromolekula musí ale být pro tyto metody k dispozici izolovaná a její trojrozměrná struktura dostatečně známá.

Kromě experimentálního screeningu lze knihovny fragmentů získat i vyhledáváním opakujících se strukturních rysů v molekulách známých léčiv. Knihovny fragmentů mohou přitom být obohacovány i o „privilegované molekuly“, o nichž je známo, že silně interagují s bílkoviny (např. difenyly).

Spojováním fragmentů, z nichž každý má jen malou afinitu vůči cílové struktuře (řádů mmol/l), lze získat molekuly s mnohonásobně zvýšenou afinitou ($\mu\text{mol/l}$, popř. dokonce nmol/l). Při studiu vazeb různých látek na cílové struktury se ukázalo, že kombinací účinných ligandů lze získat léčiva s lepšími vlastnostmi (nižší molekulová hmotnost, nižší toxicita, lepší farmakokinetika apod.) než při jiných postupech hledání účinných léčiv.



Kombinace fragmentů, obměny způsobu jejich spojení a případné další modifikace lze samozřejmě studovat experimentálně, část experimentální práce však lze nahradit využitím počítačového modelování. Počítač přitom navrhne kombinace a další úpravy fragmentů. Molekuly s navrženou strukturou jsou připravovány a testovány, až se dosáhne požadované účinnosti. Zahnutí algoritmů pro farmakokinetické parametry a toxikologické údaje do počítačových modelů experimentální práci dále zjednodušuje, protože umožňuje předem vyloučit látky s nedostatečnou rozpustností, nežádoucí toxicitou nebo jinými nevhodnými vlastnostmi. Situaci přitom komplikuje ale to, že při spojení fragmentů se mohou jejich funkční skupiny vzájemně ovlivňovat, přičemž se mění i jejich interakční energie. Přesto se metodikou FBDD získává poměrně efektivně nové léčivo nebo alespoň vodítko pro jeho další vývoj.

Standardní metody vyhledávání hitů i metodiky FBDD se navzájem nevylučují, ale spíše doplňují.

Ve výzkumných laboratořích velkých farmaceutických firem se často využívají různé metodiky vedle sebe. Uplatnění HTS je výhodné tam, kde cílová struktura je nová a zatím nedostatečně charakterizovaná a je třeba rychle nalézt hity pro její validaci jako místa terapeutického zásahu. Použití FBDD je naopak účelné zejména tam, kde metodika HTS selhává (např. jsou-li cílovými strukturami některé proteasy nebo anhydrasy kyseliny uhličitě) nebo neposkytuje dobré výsledky. Metodika FBDD může vést rychleji k cíli v případech, kdy cílová biomakromolekula je známá a lze ji získat v čistém stavu. Osvědčuje se také při hledání nového léčiva charakteru „me too“, které má mít vyšší účinnost než dosavadní známá léčiva pro danou indikaci. Pro možnost využití FBDD jsou ale nezbytné určité poměrně náročné technické předpoklady pro studium interakcí fragmentů (NMR, rentgenová krystalografie, měření rezonance povrchových plasmonů). Prvním povoleným léčivem vyvinutým metodikou FBDD byl v r. 2011 (USA) resp. 2012 (Evropa) vemurafenib určený k léčbě pokročilých stadií melanomu, nejméně desítkou dalších takto navržených léčiv je klinicky zkoušena.

„Hity“ nalezené pomocí standardních screeningových postupů nebo FBDD metodik, popř. dokonce navržené počítačem sice mohou mít slibnou účinnost, ale většinou ještě nemají charakter léčiva (drug-like character), tj. nesplňují požadavky na použití v terapii.

Hity často mívají příliš komplikovanou strukturu. Jejich molekuly obsahují nadbytečné funkční skupiny, které se mohou podílet na nežádoucích interakcích s různými dalšími cílovými strukturami a tedy i toxicitě. Mohou být málo rozpustné v biologických tekutinách (aby screening nekomplikovala špatná rozpustnost ve vodě, testují se v některých případech látky rozpuštěné např. v dimethylsulfoxidu), mohou mít nedostatečnou biologickou dostupnost, jsou rychle eliminovány apod.

Z nejlepších hitů se proto vyberou látky, na které se zaměří další fáze výzkumu a vývoje. Tyto látky se pak stanou určitými **vodítky** (anglicky lead compound nebo jen lead, což někdy nevhodně překládáno jako „vůdčí látka“ nebo „vůdčí struktura“) stojícími na startovní čáře **fáze návrhu léčiva**. V této fázi se pak většími či menšími obměnami struktury optimalizují vlastnosti látky tak, aby byly získány produkty s požadovanými farmakodynamickými i farmakokinetickými vlastnostmi.

U těch se pak prověří jejich bezpečnost při preklinických zkouškách. Pro vybrané látky s optimalizovanou strukturou se pak ve **fázi vývoje** vypracuje technologie výroby, metody mezioperační i finální analytické kontroly, navrhne způsob podání, vhodná forma léčivého přípravku a technologie jeho výroby a finální přípravek se pak klinicky zkouší.

Kombinatoriální syntéza

Jako moderní metodické nástroje, které umožňují racionalizovat a urychlovat fáze objevu a návrhu nových léčiv byly vyvinuty techniky **kombinatoriální syntézy a vysokokapacitního screeningu**. Úspěšnost jejich využití je podmíněna pečlivým naplánováním experimentů. K tomu jsou zapotřebí znalosti organické chemie, biochemie, biologie, analytiky, matematické statistiky a bioinformatiky.

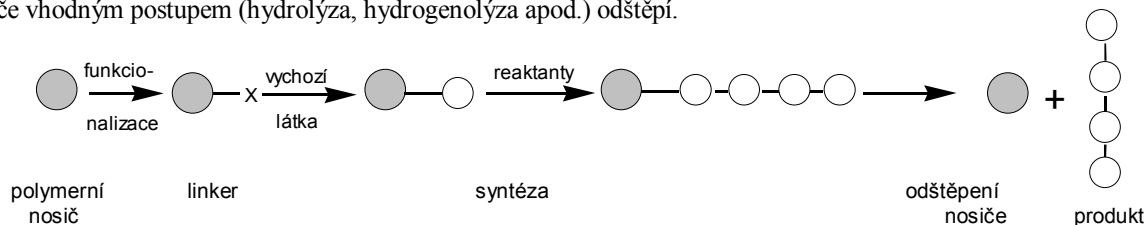
Ještě na počátku v 90. let se o kombinatoriální syntézu zajímalo jen pár chemiků. Je proto překvapivé, jak rychle se vyvinula v široce používanou metodu, kterou dnes žádná významná farmaceutická firma vyvíjející nová léčiva nemůže ignorovat. V r. 1992 byla kombinatoriální syntéza využita k přípravě pouhých 3 „knihoven“ nových látek, z čehož jen u 1 byla zjištěna terapeutická účinnost. V r. 1999 bylo ale takových knihoven látek připraveno již 292 a terapeutická účinnost byla zjištěna u 85 z nich. Na přelomu 20. a 21. století pronikla metodologie kombinatoriální syntézy i do dalších oblastí užité chemie a začala být využívána i při hledání účinných léčiv, ale i agrochemikálií, konzervačních látek, různých aditiv, nových materiálů pro mikroelektroniku a dokonce i nových katalyzátorů. V posledních letech pak byla kombinatoriální syntéza ještě dále vylepšena kódováním knihoven pomocí DNA (DNA-encoded chemical libraries, zkratka DEL). Jde o využití oligodeoxynukleotidů jednak jako nosiče pro vytváření nových kandidátů na léčivo a současně i jako značky, která umožňuje jednoznačnou identifikaci připravených látek hybridizací s vhodným DNA templátem na základě vytváření vodíkových vazeb mezi komplementárními páry bází.

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 navázání výchozí látky na inertní pevný nosič. Tím bývá vhodný polymerní gel, často ve formě malých kuliček, nosičem však může být i anorganický materiál, jako je silikagel, porézní sklo apod.

Nosič 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 meziprodukty a produkty. Nutnost použití membrán sice poněkud komplikuje používání rozpustných polymerních nosičů, výhodou však je hladší průběh reakcí v homogenním prostředí (eliminace difuze do pórů polymerního gelu).

Některé typy nosičů samy obsahují funkční skupiny vhodné pro navázání výchozí látky, např. hydroxyly, karboxyly nebo aminoskupiny, 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 (hydrolýza, hydrogenolýza apod.) odštěpí.



Syntéza v pevné fázi se využívá např. při přípravě peptidů. Nosičem je přitom řídkce síťovaný styren-divinylbenzenový gel, někdy nazývaný Merrifieldova pryskyřice. Jsou to drobné kuličky kopolymeru styrenu s 1% divinylbenzenem, který slouží jako síťovadlo vytvářející trojrozměrnou gelovitou strukturu. Po aktivaci chlormethylací se na nosič naváže první aminokyselina. Reakce je „polymeranalogickou“ obdobou aralkylace aminokyseliny benzylochlorem. Karboxylová skupina navázané aminokyseliny se pak aktivuje pro reakci s aminoskupinou druhé aminokyseliny. Při té 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 hydrolyticky odštěpí.

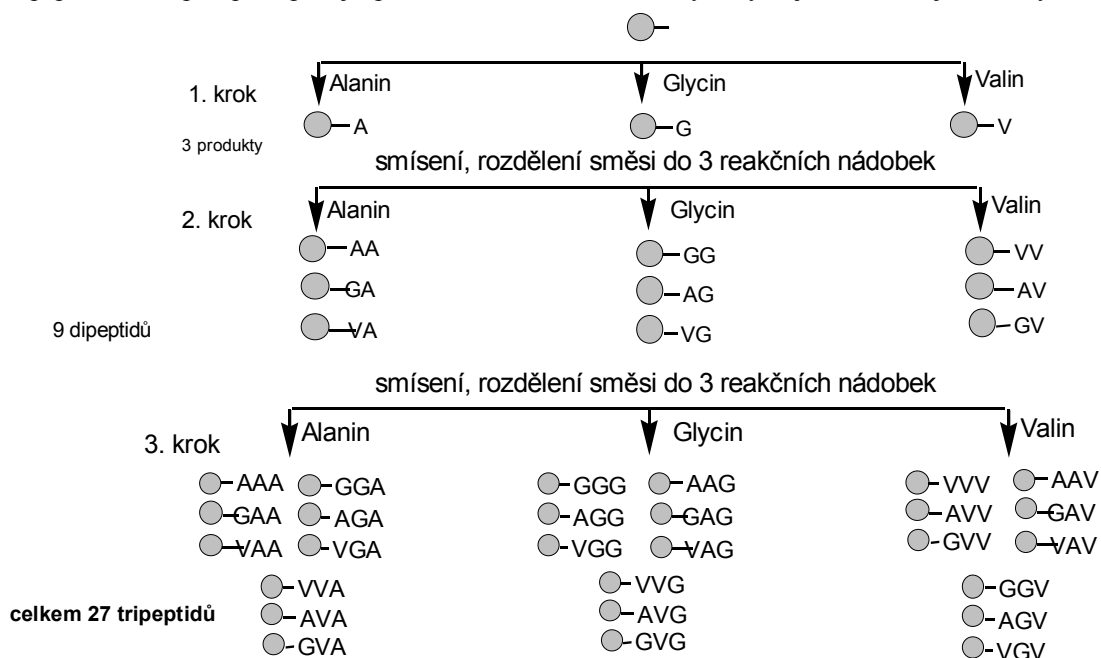
Postup, popř. jeho varianty, je možné automatizovat. Automatické syntezátory peptidů se využívají jak ve výzkumu, tak i při výrobě. Podobné automaty slouží i k přípravě oligonukleotidů používaných pro genové manipulace.

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 niž se může působit stejnými nebo různými činidly za jinak stejných podmínek. Nakonec se získá v každé reakční nádobce různá sloučenina.

Paralelní syntéza urychluje přípravu sérií analogů účinné látky s rozdílnými substituenty, např. různých esterů, aminů, amidů apod. Provádění paralelních syntéz mohou také usnadnit různé laboratorní automaty a syntezátory.

Od paralelní syntézy vede přímá cesta ke **kombinatoriální syntéze**. V tomto případě se nezískávají individuální látky, ale směsi různých produktů, tzv. **knihovny sloučenin**.

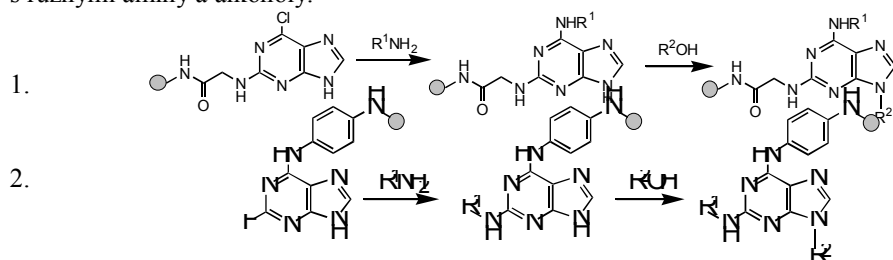
Množství látek tvořících „knihovnu“ může být značné, zcela běžné jsou knihovny s desítkami látkami. V extrémním případě může každá z kuliček nosiče obsahovat jednu navázanou individuální sloučeninu („one-bead-one-compound“). Při přípravě takových kombinatoriálních knihoven se využívá metoda „smíchej a rozděl“ („mix and split method“), kterou lze ilustrovat např. na přípravě knihovny tripeptidů tvořených třemi aminokyselinami. Nejprve se na nosič s linkerem naváže ve třech nádobkách tři různé aminokyseliny. Získané produkty se smísí a směs se rozdělí do tří nádobek. Do každé nádobky se pak přidá jiná aminokyselina, která se naváže na nosič s první aminokyselinou. takže v každé nádobce vznikne směs tří dipeptidů se stejnou koncovou skupinou, celkem tedy 3^2 , tj. 9 dipeptidů. Postup se pak opakuje, po 3. kroku kombinatoriální syntézy se již získá 3^3 , tj. 27 různých tripeptidů:



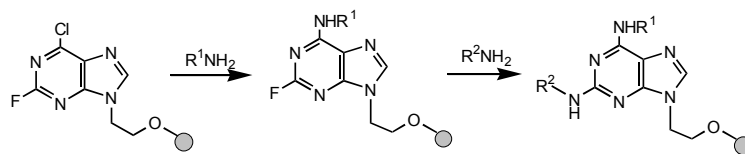
Kdyby se přitom místo 3 různých aminokyselin použilo všech 20 přirozených aminokyselin, pak by počet připravených tripeptidů činil po třetím syntetickém kroku již 20^3 , tj. 8.000.

Postupy kombinatoriální syntézy se zrodily pro potřeby chemie peptidů, podobným způsobem však byly připraveny rozsáhlé knihovny jiných látek, např. N-alkyl-N-acylamino-kyselin, substituované s-triaziny, různé β -laktamy, deriváty isochinolinu, benzimidazolu apod.

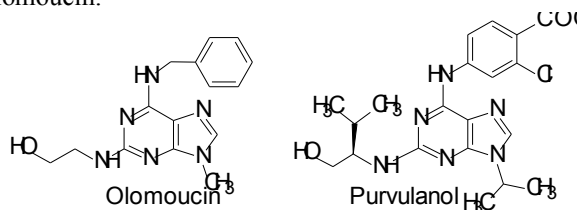
Kombinatoriální syntéza byla např. využita v USA při hledání analogů protinádorově účinného derivátu purinu, který objevili čeští vědci z olomouckého pracoviště Ústavu experimentální botaniky AV ČR a nazvali jej podle svého města olomoucín. Olomoucín inhibuje cyklindependentní proteinkinasy, enzymy, které mají důležitou roli při řízení buněčného dělení. Jejich inhibice proto může brzdit růst nádorů. Knihovna analogů olomoucínu byla připravena kombinatoriální syntézou ze tří výchozích purinových halogen-derivátů ukotvených na polymerním nosiči reakcemi s různými aminy a alkoholy.



3.



Mezi látkami z takto připravené knihovny byla látka nazvaná purvulanol B, která byla při screeningových testech *in vitro* asi 1000 x účinnější než olomoucín.



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.

Při screeningu založeném na využití vazebných interakcí látek s cílovou strukturou, v tomto případě enzymem, zůstávají připravené látky navázané na nosič. Enzym je opatřen „značkou“, navázanou barevnou nebo fluoreskující látkou, radioisotopem nebo enzymem (peroxidasa, alkalická fosfatasa), který reaguje s chromogenním substrátem za vzniku barevného produktu. Po inkubaci 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 navázan. Jiné screeningové systémy využívají změn optických vlastností látek při vzájemných interakcích. Vedle vazebných interakcí mohou být využity při screeningu knihoven látek i požadované funkční vlastnosti produktu. V takovém případě se detekce provádí po odštěpení produktů od nosiče, např. s použitím souboru 96 mikrofiltrů. Do každého mikrofiltru se vloží 100-500 kuliček nosiče, produkt se odštěpí a jeho roztok odfiltruje od nosiče do mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Provede se inkubace a otestuje se biologická aktivita roztoků v jamkách. Kuličky s produktem, který poskytl pozitivní reakci, se pak rozdělí a testují 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 nebo i 1536 jamkami) nebo zvýšením množství navázaného produktu (zvětšením kuličky nosiče a/nebo jeho vazebné kapacity je lze zvýšit až o dva řády). 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. Avšak v případě heptapeptidů s 20 aminokyselinami (s 20^7 , tj. $1,28 \cdot 10^9$ permutacemi) ani tak rychlý automatizovaný screening neposkytne požadovaný výsledek v přiměřené době.

Po provedeném screeningu je třeba pozitivně reagující produkty identifikovat.

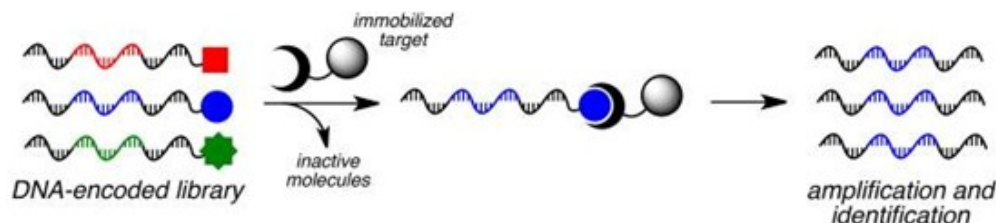
První možnost identifikace představuje analýza individuálního produktu na jednotlivé kuličky nosiče, druhou možností je analýza směsného vzorku založená na statistickém hodnocení pravděpodobnosti výskytu produktu s pozitivními výsledky testování. Používané analytické techniky musí být dostatečně citlivé 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).

I když klasické postupy kombinatoriální syntézy umožňují rychlou přípravu rozsáhlých knihoven sloučenin, identifikace „hitů“ je nesnadná a časově náročná.

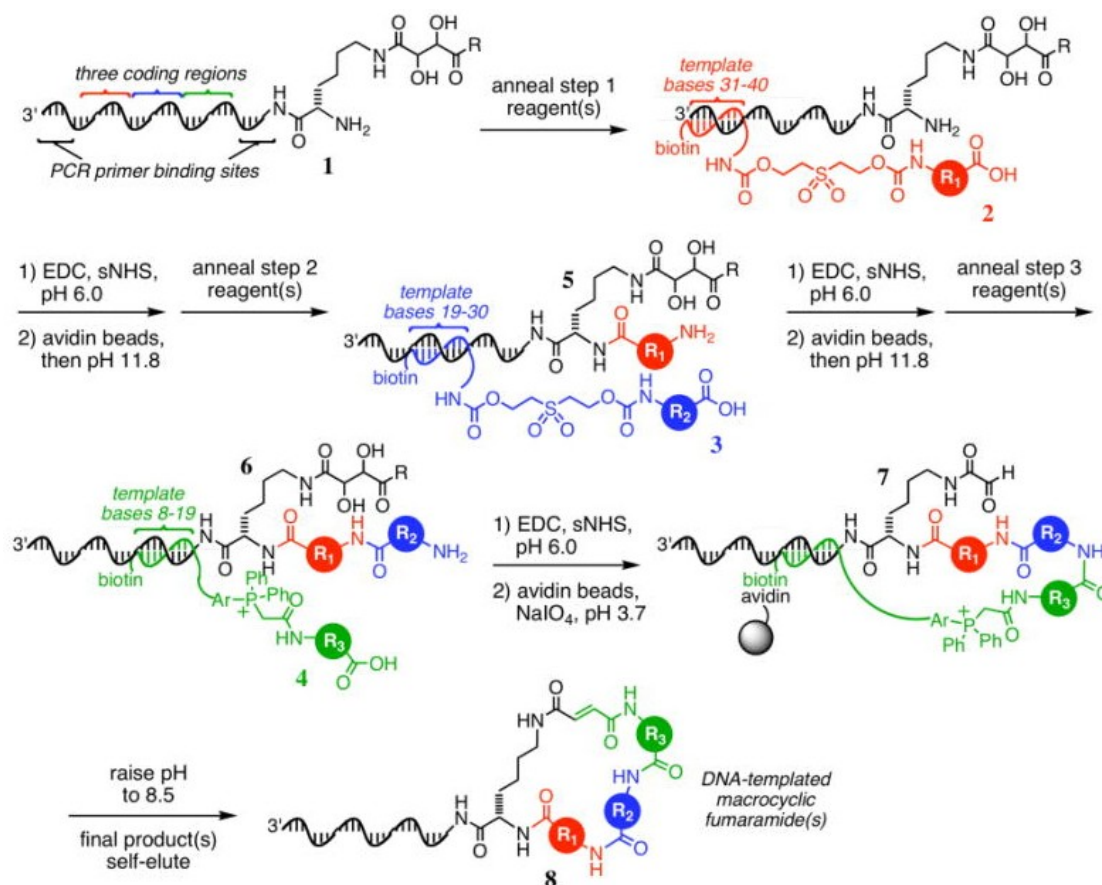
Zatímco techniky kombinatoriální syntézy umožňují přípravu knihoven s biliony látek, možnosti identifikace hitů jsou podstatně skromnější, přes automatizaci zdlouhavé a proto se omezují na miliony sloučenin, často jen řádově na tisíce.

V 90. letech minulého století se proto objevily návrhy na takové označování připravovaných látek, které by umožnilo rychlou jednoznačnou identifikaci produktů interagujících s vybranou cílovou strukturou. Rozvoj použití DNA čipů k identifikaci genetických odchylek na základě párování bází v řetězcích polynukleotidů podnítl vznik koncepce **DNA-kódování chemických knihoven** (DNA-encoded chemical libraries, zkratka DEL). DNA přitom slouží jednak jako nosič, jednak jako „čárový kód“, který je přitom pro každou z připravených látek unikátní.

Koncepce DNA-kódování chemických knihoven je založena na kombinaci molekulární biologie s organickou chemií a moderní bioanalytikou. DNA přitom může sloužit buď jen jako identifikační značka pro produkty připravované napojováním stavebních kamenů za vzniku stále složitějších molekul (přístup označovaný v některých přehledech jako „DNA-recorded chemistry“) nebo může kromě identifikace ještě také usměrňovat průběh kombinatoriální syntézy („DNA-directed chemistry“). V první případě se po přípravě kombinatoriální knihovny a oddělení konjugátů interagujících s cílovou strukturou odštěpí unikátní DNA značka, namnoží se polynukleázovou řetězovou reakcí a pak identifikuje.



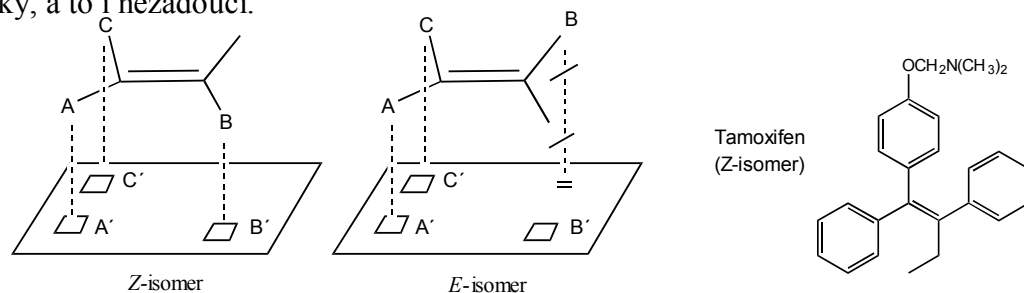
Ve druhém případě se uplatňují různé strategie, jaké představuje syntéza s DNA šablonou (DNA-templated synthesis, DTS), systémy Yocto Reactor nebo kódované samosestavovací kombinatoriální knihovny (ESAC libraries – an encoded self-assembling combinatorial libraries). Následující reakční schéma je ilustrací jednoho z takových přístupů – postupu syntézy s DNA šablonou (B.N. Tse, T.M. Snyder, Y. Shen a D.R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(46):15611-15626).



Při kombinatoriální syntéze je zde jako značka využit oligodeoxyribonukleotid se třemi kódujícími úseky, na něž je napojen první stavební blok připravované látky s volnou aminoskupinou. Ten selektivně hybridizuje s biotinylovaným oligodeoxyribonukleotidem, na nějž je přes štěpitelnou spojku navázán aminoskupinou druhý stavební blok s volnou karboxylovou funkcí. Následuje reakce s 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem (EDC) a sulfovaným N-hydroxysukcinmimidem, kdy dojde ke vzniku amidu. Oligonukleotidový hybrid se oddělí na afinitním sorbentu s avidinem, který silně váže biotin. V alkalickém prostředí se komplementární oligonukleotid odštěpí. Na nyní volnou aminoskupinu navázaného meziproductu se nyní váží podobným způsobem další stavební bloky. Různé stavební bloky, ale i vhodné DNA značky jsou komerčně dostupné, ceny se pohybují mezi 20-100 \$ za značku. Organizace zabývající se smluvním výzkumem nabízejí i provedení kompletní bioanalytické vyhodnocení produktů, v tomto případě ale za značně vysoké ceny – řádově ve statisících dolarů.

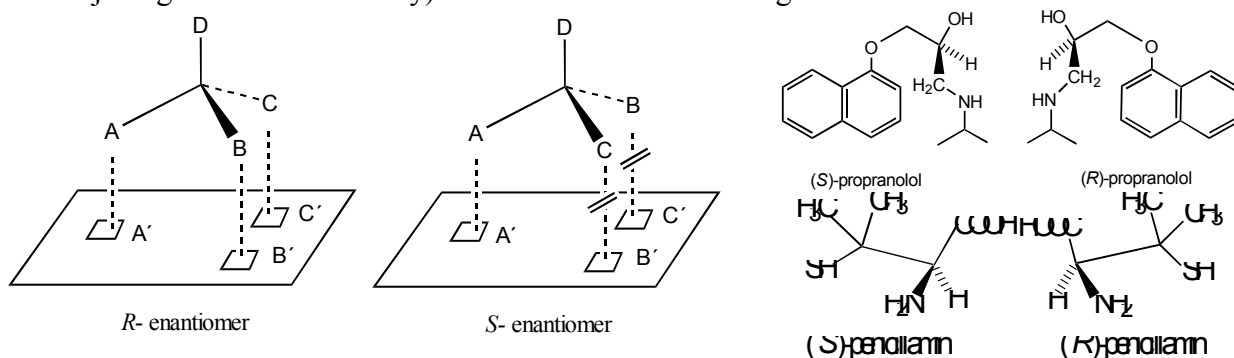
Stereochemické aspekty výzkumu a vývoje léčiv

Účinek léčiva je podmíněn interakcemi jeho molekuly s trojrozměrnými cílovými strukturami s charakteristickou prostorovou stavbou. Při výzkumu a vývoji léčiva proto nelze opomíjet stereochemické aspekty, protože na **prostorové stavbě jeho molekuly**, tj. na **konfiguraci** jejích funkčních skupin, **chiralitě** a v neposlední řadě i na **konformaci** molekuly závisí, jak léčivo bude schopné s cílovou strukturou interagovat, tedy jaká bude jeho účinnost. Je-li prostorová stavba cílové struktury taková, že interakce se může účastnit jen jediný geometrický isomer léčiva, 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. Druhý geometrický isomer – *cis* – není účinný a podle některých prací může dokonce být jeho přítomnost jako nečistoty příčinou vedlejších účinků tamoxifenu.

Cílové struktury v živých organismech jsou **chirální**. Je-li chirální i molekula léčiva a skupiny interagující s cílovou skupinou jsou součástí chirálního centra, pak jednotlivé enantiomery (podobně jako geometrické isomery) mohou mít odlišnou biologickou aktivitu.



Interakce enantiomerů s cílovými strukturami se mohou projevit různě:

- Jeden enantiomer je účinnější než druhý. Např. u propranololu, léčiva poruch kardiovaskulárního systému, je účinný pouze (S)-enantiomer. Podání racemátu pak znamená, že pacient dostává 50% látky zbytečně. Naprostá neúčinnost jednoho enantiomeru je však výjimkou, účinné mohou být oba enantiomery, ale jeden je aktivnější než druhý.
- Oba enantiomery mají stejnou nebo podobnou účinnost i toxicitu. Je to v případě, kdy se skupiny chirálního centra nepodílejí na interakcích s cílovou strukturou nebo když jsou enantiomery v organismu převáděny na achirální účinnou komponentu
- Jeden nebo i oba enantiomery mají požadovanou účinnost, ale jeden enantiomer má nežádoucí účinek. Např. (S)-penicillamin může být použit jako chelatující látka k léčbě Wilsonovy nemoci, při níž tělo nedokáže metabolizovat měď. (R)-enantiomer je toxický a údajně může dokonce způsobit oslepnutí. U thalidomidu, léku proti nevolnosti, který při podání těhotným ženám způsobil, že se jim rodily deformované děti, se na základě pokusů na myších zdálo, že poškození embrya způsobil (S)-enantiomer. Pokusy s jinými zvířaty ale ukázaly, že nežádoucí účinek na rostoucí tkáň embrya může mít i (R)-enantiomer.
- Enantiomery jsou metabolizovány odlišnou rychlostí nebo jeden enantiomer ovlivňuje rychlost metabolických přeměn druhého. To je většinou nežádoucí, ale někdy i výhodné (prodloužení doby účinku).
- Každý enantiomer reaguje s jinou cílovou strukturou. U dobutaminu, který zvyšuje sílu srdečního stahu, působí každý enantiomer na jiný receptor a jejich účinek se doplňuje. Používá se proto racemát. Někdy se každý enantiomer může dokonce použít v jiné indikaci – dextropropoxyfen (Darvon) je analgetikum, levopropoxyfen (Novrad) lék proti kašli.
- Enantiomery mají opačné účinky – např. (R)-sopromidin je agonista H₂ receptoru, (S)-enantiomer je antagonist

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 vyšší hodnotu (nad 2), pak je účelné se zaměřit na možnosti získání a podávání účinnějšího enantiomeru, aby organismus pacienta nebyl zbytečně metabolicky zatěžován neúčinnou nebo méně účinnou látkou. Neplatí to však obecně. Např. u antidepresiva fluoxetinu je o něco účinnější (*S*)-enantiomer. Současně je však tento enantiomer rychleji eliminován, takže pro zajištění dlouhodobého účinku je výhodnější podávat pacientům racemát. V případě antihypertensiva labetalolu, látky s dvěma asymetrickými uhlíky, musel být účinnější (*R,R*)-diastereomer, 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 racemického labetalolu. Ten je přitom nadále používán jako přípravek Trandate, je-li třeba rychle snížit krevní tlak.

Chirální léčiva tvoří asi 25 % všech používaných léčiv. Mnohá léčiva přitom mají v molekule více chirálních center, takže pak nevytvářejí jen dva enantiomery, ale **2ⁿ diastereomerů**, kde *n* je počet chirálních center v molekule. Zatímco enantiomery mají až na otáčivost stejné fyzikálně chemické vlastnosti, vlastnosti diastereomerů se vzájemně odlišují.

V případě přírodních léčiv je používání účinného enantiomeru nebo diastereomeru samozřejmé. V případě syntetických léčiv může být uveden na trh nejprve racemát a teprve pak se přejde k použití čistého účinnějšího enantiomeru. Příkladem může být léčivo proti žaludečním vředům, racemický omeprazol, který je v posledních letech nahrazován účinným (*S*)-enantiomerem, esomeprazolem. K takové „chirální záměně“ (chiral switch) někdy dochází v době, kdy končí patentová ochrana racemátu. Důvodem přitom bývají lepší terapeutické vlastnosti účinného enantiomeru, někdy ale i snaha výrobce o prodloužení patentové ochrany léčiva a znevýhodnění generické konkurence.

Produktům běžných syntéz bývá **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. Otáčivost závisí na vlnové délce světla, při němž se měření provádí, protože se při průchodu polarizovaného světla látkou uplatňuje i absorpce světla. Moderní přístrojová technika umožňuje měření optické otáčivosti při různých vlnových délkách, popř. i měření optické rotační disperze a cirkulárního dichroismu, kdy se sleduje otáčivost v závislosti na vlnové délce. To sice umožňuje zvýšit přesnost stanovení enantiomerní čistoty látek, přednost při hodnocení chirálních léčiv ale dostaly spíše separační techniky, jako je plynová a vysoce účinná kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza a kapilární elektrochromatografie na chirálních fázích. Těchto fází je nyní na trhu kolem stovky. Patří mezi ně silikagel nebo inertní organické polymery s navázanými „chirálními selektory“, kterými jsou arylderiváty nebo kovové cheláty aminokyselin, cyklohextriny, chemicky modifikované polysacharidy, glykoproteiny, peptidy a bílkoviny a případně i další biopolymery. K dělení enantiomerů lze používat i běžné stacionární fáze, ale mobilní fáze musí přitom obsahovat chirální aditiva nebo musí být dělené látky převedeny reakcí s chirálními činidly na diastereomerní produkty, které se pak rozdělí. Přímé separace na chirálních fázích však mají přednost, protože umožňují vyhnout se zdoluhavé úpravě vzorku, při níž může docházet k racemizaci, která pak zhoršuje přesnost a správnost stanovení.

Chirální chromatografické separace lze využívat nejen při analýze, ale i v preparativním měřítku.

Při preparativní chromatografii je však problémem omezená stabilita a také vysoká cena řady chirálních sorbentů. Existuje však několik relativně levných a poměrně stabilních sorbentů, které jsou vhodné i pro preparativní účely. Přípravují se modifikací přirozených chirálních biopolymerů (triacetyl- a jiné triacylcelulosity, deriváty amylosy, zesítený hovězí sérový albumin) nebo impregnací silikagelu vhodnou enantiomerní látkou, jakou je např. kyselina vinná, navázaním arylderivátů aminokyselin amidickou vazbou na aminopropylovaný silikagel (Pirkleovy fáze) a podobnými modifikacemi.

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 čistoty chirálních látek** získávaných jinými postupy rezoluce, které obvykle jsou pro výrobu ekonomicky výhodnější.

Nejčastěji se proto 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 k tomu používají některé chirální přirozené (např. alkaloidy, jako je např. brucin – což je však vzhledem k jejich toxicitě u léčiv problematické) nebo (bio)syntetické aminy (např. (*S*)- α -methyl-benzylamin), z bázičkých racemátů lze připravovat diastereomerní soli chirálních kyselin jako je kyselina vinná a její O-acyderiváty (nejčastěji kys. dibenzoylvinná), nebo kafrsulfonová, v poslední době se podobnému dělení často používá kyselina 1,1'-dinaftyl-2,2'-fosforečná. Jestliže racemát neobsahuje kyselé ani bázičké skupiny, pak musí být pro dělení modifikován, např. reakcí racemických alkoholů s chloridem kyseliny kafrsulfonové lze připravit diastereomerní estery, které lze opět dělit krystalizací. Po rozdělení se navázaná skupina odštěpí.

Při reakci racemátu s enantiomerním činidlem je k vzniku dvou různých diastereomerních přechodových stavů zapotřebí různá aktivační energie. Jeden diastereoisomerní produkt se pak tvoří a/nebo ze směsi vylučuje rychleji než druhý, čehož lze využít k dělení racemátů tzv. **kinetickou rezolucí**.

Podari-li se v systému současně s kinetickou rezolucí provádět racemizaci, pak je přednostně racemizován ten enantiomer z původního racemátu, z něhož vzniká diastereomerní produkt pomaleji. V takovém případě **dynamické kinetické rezoluce** je někdy možné získat téměř kvantitativní výtěžek požadovaného enantiomeru.

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, která se snadno rozdělí. Chemickou hydrolyzou amidu se pak získá žádaný produkt. Podobně lze rozdělit racemické estery pomocí acylas. Ty selektivně rozštěpí pouze jednu enantiomerní formu esteru na alkohol a kyselinu. Enzymy přitom nemusí jen enantioselektivně štěpit vhodné deriváty, ale také mohou katalyzovat jejich vznik. Např. některé lipasy ve vodném prostředí selektivně rozštěpí z racemické směsi esterů jen jeden, v nevodném prostředí ale mohou naopak katalyzovat vznik jen jednoho enantiomerního esteru z racemického alkoholu nebo kyseliny. Získaná směs se pak snadno rozdělí.

Jiné možnosti dělení racemátů představuje **tvorba inkluzních komplexů** s látkami, které mají ve své molekule chirální dutiny, jako jsou cyklohextriny.

V dutinách molekul cyklohextrinů a podobných látek může být uzavřen pouze jeden enantiomer produktu. Přitom vznikne inkluzní komplex, který může být např. krystalizací oddělen od druhého enantiomeru, který komplex netvoří. Je-li cyklohextrin navázan na nerozpustný nosič, může být druhý enantiomer oddělen chromatograficky nebo při vsádkovém provedení i pouhou filtrací.

Obecnou nevýhodou přípravy enantiomerů rozdělením racemátů je, že se (s výjimkou dynamické kinetické rezoluce) získává pouze **poloviční výtěžek** účinné enantiomerní formy léčiva.

Ztráta poloviny produktu tvořeného nežádoucím enantiomerem rezoluci racemátů prodražuje. Hledají se proto cesty, jak ztráty eliminovat. Někdy lze odpadní enantiomer převést na žádaný produkt nukleofilní substitucí probíhající s Waldenovým zvratem, např. odpadající *R*-alkohol se tosyluje a *R*-tosylát podrobí hydrolyze S_N2 mechanismem na *S*-alkohol. Jindy lze odpadající enantiomer racemizovat a rezoluci opakovat. Výše zmíněný L-fenylglycin odpadající po enzymatické rezoluci se racemizuje působením kyseliny sírové. Racemát se pak převede na amid, který se znovu dělí pomocí aminopeptidasy. Jindy může být racemizace prováděna přes achirální meziproduct, např. oxidací enantiomerního alkoholu na keton a jeho zpětnou redukcí na racemický alkohol. K racemizaci také dochází, když jako meziproduct vzniká planární karbokation.

Ekonomicky výhodnější mohou být postupy **asymetrické** neboli **enantioselektivní syntézy**, při nichž přímo v reakční směsi přednostně vzniká určitý enantiomer chirálního produktu. Aby asymetrická syntéza úspěšně proběhla, musí být v reakčním systému přítomna určitá složka 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 obvykle použije jen relativně malé množství. Vzhledem k vysokým cenám chirálních katalyzátorů mohou ale být i takové asymetrické syntézy značně nákladné.

Relativně levnými a přitom vysoce účinnými chirálními katalyzátory jsou enzymy. Ty se při průmyslové výrobě enantiomerně čistých látek nevyužívají pouze k rezoluci racemátů, ale i k syntéze.

Příkladem může být výroba L-asparagové kyseliny, složky umělého sladidla aspartamu, z kyseliny fumarové pomocí enzymu aspartasy. Enzym se přitom nemusí ani izolovat, stačí místo něho používat imobilizované mikrobiální buňky vyšlechtěné tak, aby obsahovaly aspartasu ve velké koncentraci.

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

Optický výtěžek nazývaný také enantiomerní přebytek (v reakčních schemech označovaný jako e.e., enantiomeric excess) je poměrem 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, tedy směs 30% *S*- a 30% *R*- formy. V produktu reakce tedy 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 většinou nedosahuje a je nutná další purifikace produktu.

Řadu chirálních produktů lze připravit modifikacemi vhodných výchozích chirálních látek.

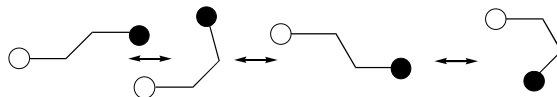
Takovými výchozími látkami mohou být přirozené aminokyseliny, cukry nebo jiné přírodní látky. Nevýhodou je, že se přitom někdy syntéza prodlouží o několik reakčních kroků a že musí být při syntéze vyloučeny faktory, které by mohly být příčinou racemizace (zahřívání na vyšší teploty, přítomnost silných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

V případě, že v molekule výchozí látky je již přítomno jedno nebo více chirálních center, pak při reakci, při níž se vytváří další chirální centrum, bývá u vznikajícího diastereomerního produktu preferována určitá konfigurace.

Dochází k tomu např. při parciálních syntézách léčiv modifikací přírodních látek (alkaloidů, steroidů, cukrů apod.). Přítomnost chirálního centra ale nemusí vždy vést ke vzniku jen jednoho diastereomeru. Je-li nově vznikající chirální seskupení vzdálené, pak může být vliv původního centra chiralit na stereochemický průběh reakce a konfiguraci produktu 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.

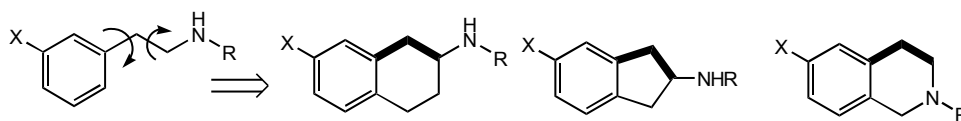
Je-li molekula látky příliš rigidní, pak její skupiny nemusí zaujmout přesně tu konformaci, která je pro interakci s cílovou strukturou nejvýhodnější. Nevýhodná však může být i příliš vysoká flexibilita molekuly, tj. přítomnost velkého počtu jednoduchých vazeb, kolem nichž mohou funkční skupiny volně rotovat. V takovém případě 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 pak může projevit sníženou biologickou účinností.



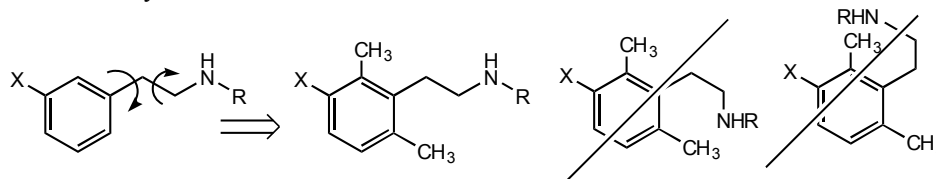
Fixováním aktivní konformace flexibilní molekuly, tj. omezením volné rotace skupin, je proto možné zvýšit biologickou účinnost látky.

Aktivní konformaci lze fixovat:

- zavedením cyklických struktur do molekuly, např.:



- náhradou flexibilní jednoduché vazby rigidnější 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 nejen vytvořením připojeného cyklu, ale i zavedením methylskupin do *o*-poloh. Sousedící methylskupiny pak omezují volnou rotaci flexibilního bočního řetězce, čímž je upřednostněna aktivní konformace látky:



Kontrolní otázky pro zopakování

1. Jak lze léčiva rozdělit podle inovativnosti?
2. Jaký je rozdíl mezi původním a generickým léčivem?
3. Jaké jsou fáze výzkumu a vývoje nového léčiva?

4. Jaké jsou hlavní úkoly chemika v jednotlivých fázích výzkumu a vývoje?
5. Jak je dlouhá průměrná doba od objevu léčiva po jeho registraci a proč?
6. Jaké jsou metody screeningu?
7. Co si představujete pod pojmem validace cílových struktur?
8. Co a čím je vodítko (vodítková látka, lead compound) při výzkumu a vývoji nového léčiva?
9. Čím je charakteristická metodika objevování léčiv založená na fragmentech?
10. Co to je knihovna sloučenin?
11. Na čem je založena kombinatoriální syntéza?
12. Proč může účinek léčiva záviset na prostorové struktuře jeho molekuly?
13. Jaké mohou být rozdíly v biologické účinnosti enantiomerů?
14. Kdy má význam podávat čistý enantiomer léčiva místo racemátu?
15. Jaké má chemik možnosti přípravy chirálních léčiv?
16. Jak můžete rozdělit racemickou látku na enantiomery?
17. Co to je a jak se zjišťuje optický výtěžek?
18. Proč může konformace léčiva ovlivnit jeho účinnost?