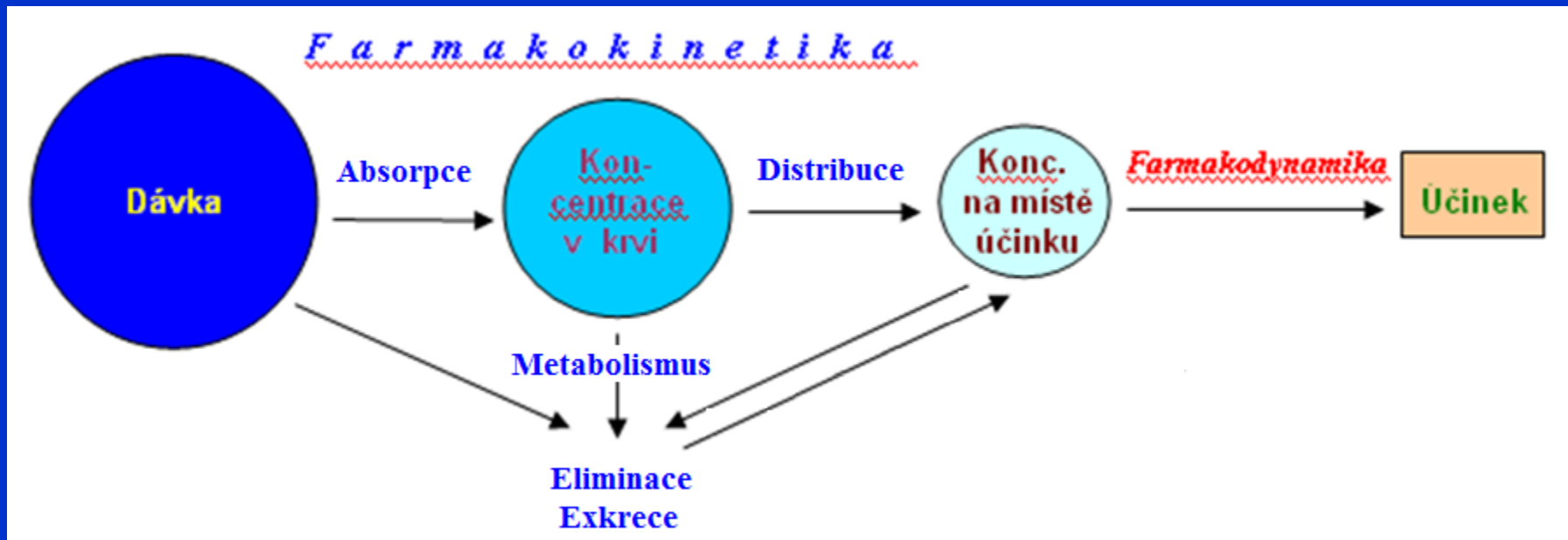


FARMAKOKINETIKA VÝZKUM A VÝVOJ LÉČIV

Předmět farmakologie

Vztah mezi podáním léčiva a účinkem



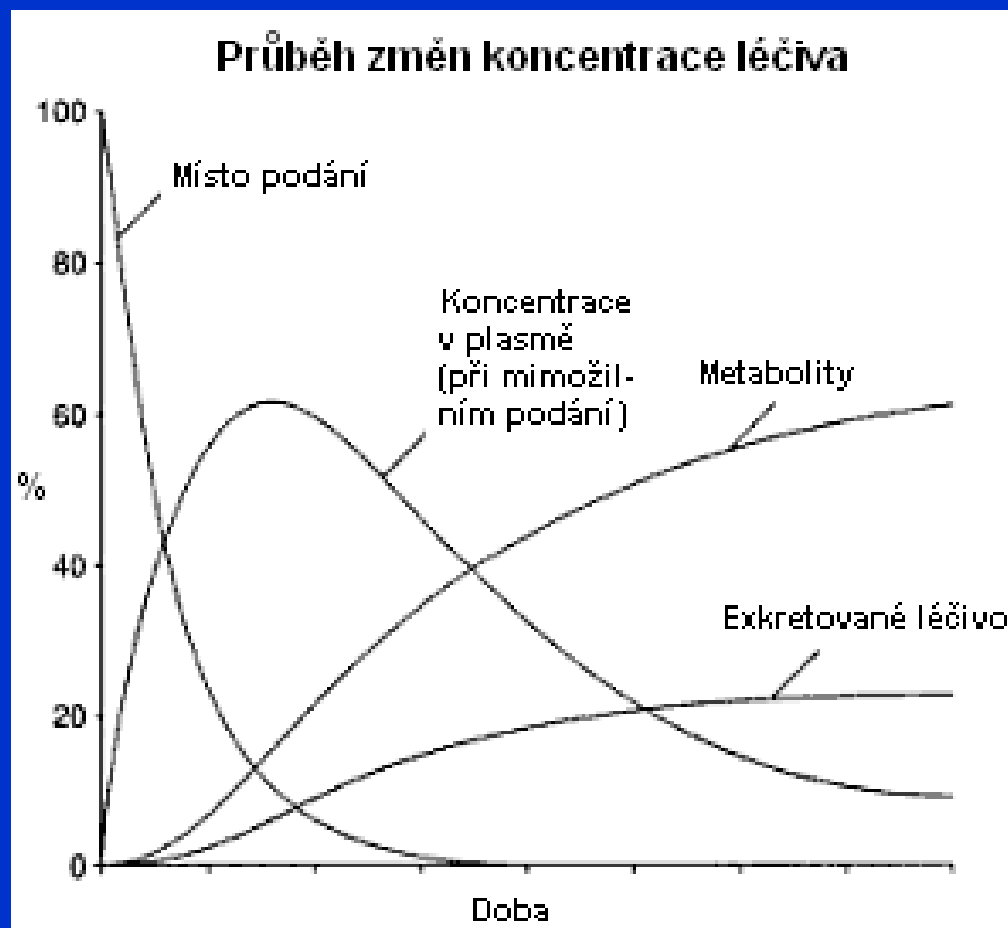
Farmakokinetika

Biologická odezva - žádoucí i nežádoucí (toxicita) závisí na koncentraci léčiva na místě účinku (u cílové struktury)

Koncentraci léčiva na místě účinku určují farmakokinetické parametry - ADME

- **Absorpce**
- **Distribuce**
- **Metabolismus**
- **Exkrece**

Změny koncentrace léčiva v organismu



Absorpce

Účinek léčiv závisí na jejich koncentraci v místě cílové struktury. Je-li cílová struktura uvnitř buňky musí molekuly léčiva proniknout přes buněčnou membránu

• **Podání léčiva přímo do krevního oběhu (injekce, infuze)**

• **Neinvazivní způsoby podání léčiva**

- perorální (absorpce v GI traktu) – opakující se průchod přes buněčné membrány, další problém: **první průchod játry** – možnost částečné inaktivace
- přes sliznice (sublingvální přípravky, čípky, nosní kapky a spreje, inhalační aerosoly)
- přes kůži (masti, krémy, tinktury, lotia, náplasti)

• **Průnik látek do buňky:**

- difuze přes lipidickou dvojvrstvu buněčné membrány
- difuze přes „vodní“ kanály buněčných stěn (neuplatňuje se: průměr vodního kanálu 0,4 nm; molekuly léčiv ≈ 1 nm)
- aktivní transport pomocí bílkovinných přenašečů (jen některá léčiva)
- pinocytóza (endocytóza – velké molekuly a nanočástice)

• **Příliš polární léčiva – omezená difuze lipidickou dvojvrstvou**

- řešení: převedení polárního léčiva na méně polární profarmaka, z nichž se účinná látka uvolní až v buňce

Pravidlo pěti

Předpoklady průniku látky přes buněčné membrány:

- molekulová hmotnost do 500
- ne více než 5 protondonorových a 10 protonakceptorových skupin
- log rozdělovacího koeficientu mezi n-oktanolem a vodou menší než 5 (ale ne záporný)

Užitečná pomůcka, ale idealizace: 80% používaných léčiv má logP v rozmezí 0,4-5,6; průměrná hodnota logP $\sim 2,5$

Výjimky: substráty transportních bílkovin
přípravky pronikající do buněk endocytózou
antibiotika, látky s protiplísňovým účinkem

Distribuce

Distribuci léčiva v organismu zajišťuje krevní oběh.

- adsorpce léčiva na plasmatické bílkoviny
- rovnovážná koncentrace volného léčiva

Z krevního oběhu se léčivo dostává do tkání

- distribuce v tkáních závisí na jejich zásobení krví
- pronikání léčiva z krevních kapilár k cílovým buňkám v tkáních
- průchod buněčnou stěnou (je-li cílová struktura uvnitř buňky)
 pravidlo pěti, profarmaka
- **hematoencefalická bariéra, placentální bariéra**
- **zdánlivý distribuční objem:**

$$V_D = D/C_P \quad (\text{odvozeno ze vztahu pro koncentraci léčiva v plasmě } C_P = D/V_D)$$

D celková koncentrace léčiva

vyšší hodnota V_D - léčivo se kumuluje v tkáňových buňkách

malá hodnota V_D - větší množství léčiva v krevním oběhu, méně v tkáních

Distribuce: voda v organismu

Dospělý jedinec (70 kg)

celkový obsah vody v těle: 42 kg (60%)

z toho:

voda v buňkách: 28 kg (40%)

voda v mimobuněčném prostoru: 14 kg (20%)

z toho:

krevní oběh: 3,5 kg (5%)

obsah vody v tkáních: 10,5 kg (15%)



Novorozenec

celkový obsah vody v těle: 77%

voda v buňkách: 27%

voda v mimobuněčném prostoru: 50%

Metabolismus

Metabolická inaktivace

- nežádoucí** – snížení koncentrace léčiva ještě před interakcí s cílovou strukturou,
- komplikace – odbourání léčiva enzymy v GI traktu nebo krevním oběhu,
 - částečná inaktivace léčiv po absorpci z GI traktu při prvním průchodu játry
- převážně potřebná** – důležitá pro odstranění léčiva z organismu

Metabolická aktivace (profarmaka)

Metabolické přeměny v játrech – oxidační enzymy cytochromy P 450

18 rodin cytochromů (40% shoda), 43 podrodin (55% shoda)

označení: CYP-číslo (rodina), písmeno (podrodina), číslo (jednotlivý enzym)

příklad: CYP3A4, CYP2D6

- **reakce fáze I – zvýšení polariry (hydrofility)**
 - oxidace, oxidativní odštěpování alkylskupin – cytochromy
 - redukce (nitro a azoskupiny, reduktivní dehalogenace) – cytochrom reduktasa, oxidoreduktasy
 - hydrolyza esterů a amidů – esterasy a další hydrolytické enzymy
- **reakce fáze 2 – další zvýšení polariry tvorbou konjugátů**
(glukuronidy – UDP-glukuronotransferasa, sulfáty - sulfotransferasa, konjugáty s glutathionem)
- **individuální rozdíly v koncentraci i aktivitě enzymů metabolizujících léčiva**
- **ovlivnění metabolismu**
 - lékové a potravinové interakce

Exkrece

Organismus vylučuje léčiva v nezměněné formě i metabolicky přeměněná

Exkrece:

- **močí (ledviny):**
 - ultrafiltrace krve v glomerulách
 - reabsorpce z nefronu (rozhoduje polarita: původní léčivo >> metabolity se zvýšenou polaritou)
- **stolicí:**
 - přechod z jater do žlučových cest a odtud do střev (+ neabsorbované léčivo)
- **potem:**
 - přes pokožku může být exkretováno až 10-15% léčiva
- **plicní exkrece:**
 - anestetika, těkavé metabolity
- **v mateřském mléce:**
 - možnost toxického působení léčiv na kojence

Eliminace - odstranění léčiva z krevního oběhu a tkání
(zahrnuje exkreci i metabolické přeměny léčiva na neúčinné deriváty)

Clearance a biologický poločas

Clearance = poměr rychlosti eliminace léčiva k jeho celkové koncentraci

Celková clearance CL_T - eliminace léčiva z krve (krevní plasmy)

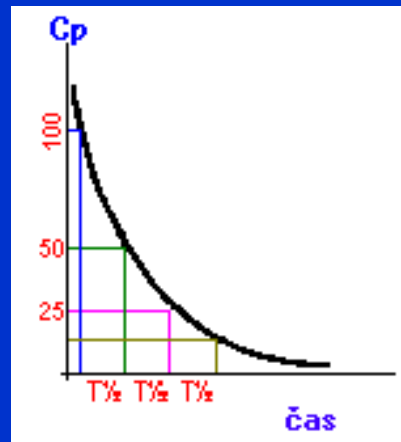
$CL_T =$ jaterní clearance CL_H (metabolická + žlučová)

+ ledvinová clearance CL_R

+ clearance ostatními orgány CL_O

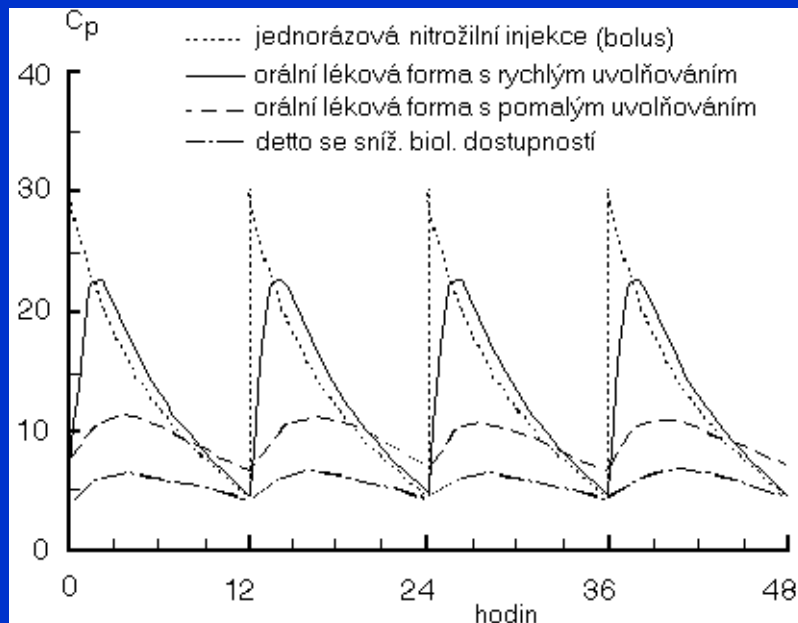
Čím vyšší je clearance, tím rychleji klesá koncentrace léčiva v krvi.

Biologický poločas - doba kdy koncentrace léčiva v krvi klesne na polovinu



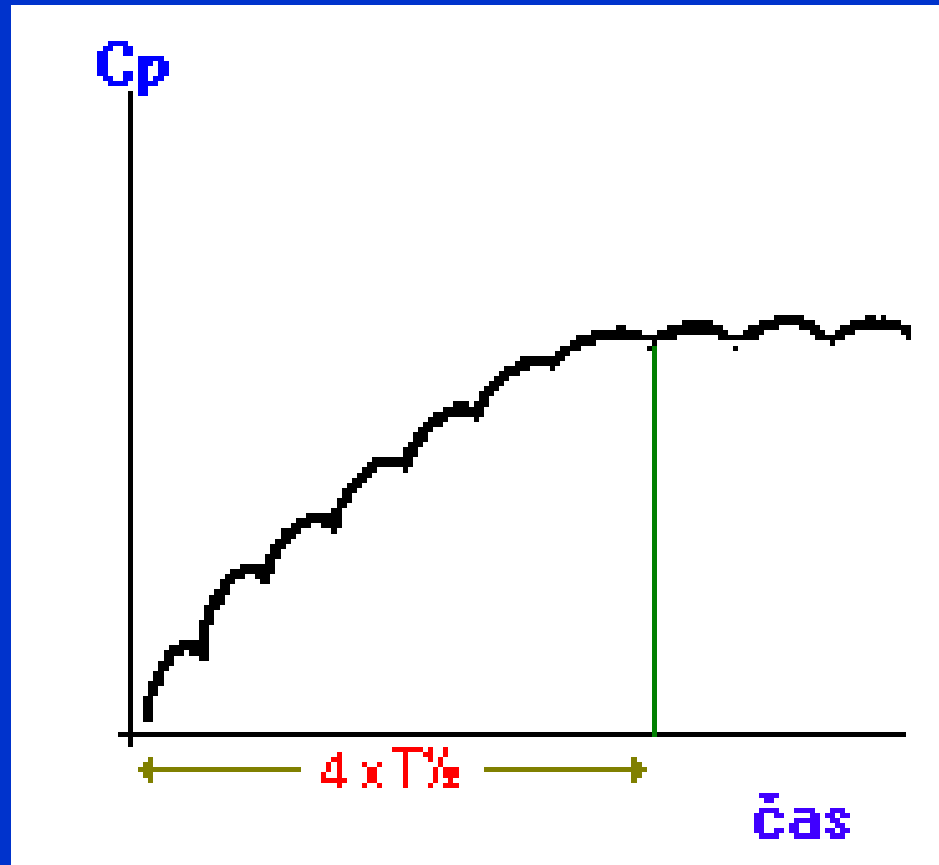
Význam clearance

Znalost clearance je důležitá pro určení režimu dávkování léčiva, aby byla potřebnou dobu udržována jeho koncentrace v terapeutickém rozmezí.



AUC – plocha pod křivkou – určuje celkové množství léčiva v krevní plasmě
přímo úměrná podanému množství léčiva
nepřímo úměrná celkové clearanci

Pro dosažení trvalé koncentrace léčiva v terapeutickém rozmezí je třeba podávání léčiva opakovat. Ustálený stav (s malými změnami koncentrace léčiva) se dosahuje v čase odpovídajícím čtyřnásobku biologického poločasu



Rezistence

Rezistence - snižování terapeutické odezvy na podanou dávku

Příčiny:

- **farmakodynamické faktory**
 - kvantitativní změny cílových struktur (nárůst nebo pokles počtu)
 - kvalitativní změny (mutacemi zapříčiněná změna prostorového uspořádání cílové struktury a její dostupnosti)
 - kvantitativní a/nebo kvalitativní změny bílkovin transportujících léčivo ven z buňky (ABC přenašeče)
- **farmakokinetické faktory**
 - zvýšení koncentrace a/nebo aktivity enzymů degradujících léčivo
- **selekční tlak (bakterie, nádorové buňky)**

Překonávání rezistence

- **režim léčby (chronoterapie)**
- **nová léčiva s nižší clearance**
- **inhibice degradujících enzymů**
- **potlačení tvorby nebo funkce transportních bílkovin**

Výzkum a vývoj léčiv

Základní rysy VaV léčiv

Fáze VaV léčiv

Objevování nových léčiv – metodiky

Na fragmentech založený objev léčiva

Kombinatoriální syntéza

Výzkum a vývoj nových léčiv je

- časově náročný (~15 let)
- nákladný (~1,4 -2 mld. \$)
- rizikový: velké množství látek selhává při preklinických i klinických zkouškách (úspěšnost < 0,01%)

⇒ kompletní VaV nového léčiva si mohou dovolit jen velké kapitálově silné farmaceutické firmy

VaV léčiv je službou pro tyto „zákazníky“:

- pacienti
- lékaře
- lékárníky a distributory léčiv
- poskytovatele a plátce zdravotnických služeb (pojišťovny)
- vedení a akcionáře farmaceutických firem, grantové agentury, vedení ústavů a vysokých škol

Trendy výzkumu, vývoje a výroby léčiv

☞ Roste náročnost výzkumu a vývoje léčiv

- Rostou požadavky na bezpečnost nových léčiv
- Ve výzkumu a vývoji je 35-40 tis. kandidátů na léčiva, ale počet povolo-
vaných nových léčiv („nových chemických entit“, NCE) je jen malý:
v r. 1997 bylo povoleno 49 nových léčiv, v dalších letech vždy méně (jen 21 v r. 2010); rok
r. 2018 rekordní: FDA: 59 , EMA: 81, z toho 42 s novými léčivými látkami
v r. 2019 pokles: FDA: 48 (35 dnů nucené dovolené 42% zaměstnanců, 4. března 2019
rezignace šéfa FDA Gottlieba); EMA: 66, z toho 30 NCE (přesun sídla EMA z Londýna
do Amsterdamu vyvolaný brexitem, asi 25% klíčových pracovníků zůstalo v UK)
- Stále větší měrou jsou předmětem VaV „cílená“ léčiva a „bioterapeutika“
spojování diagnostiky s terapií, protilátky, imunoterapie, genová a buněčná terapie

☞ Rostou náklady na výzkum a vývoj

- Náklady na VaV úspěšného nového léčiva dosahují až 2 mld. \$,
(při započtení nákladů na VaV neúspěšných léčiv by činily 3,7-11,8 mld. \$)
- Roste počet léčiv, která selhávají při klinickém zkoušení
(v poslední fázi klinického zkoušení selhávala na počátku 90. let minulého století
třetina, nyní ale až polovina nových léčiv)
- Jen u cca 20% léčiv přesáhne zisk z prodeje náklady na VaV
→ vysoké ceny nových léčiv
→ nutnost racionalizace VaV léčiv

Trendy výzkumu, vývoje a výroby léčiv

(pokračování)

☞ **Mění se orientace výzkumu a vývoje léčiv**

- Široké zapojení informačních technologií
- „Translační“ výzkum a vývoj
- Do popředí se dostávají léky pro dříve opomíjené indikace a poruchy
- Individualizovaná („precizní“ nebo „cílená“) terapie
- Prosazuje se „biologická“ léčba – biopolymerní léčiva dnes přinášejí 20 předním farmaceutickým firmám přes 40% jejich tržeb

☞ **Snahy o zbrzdění růstu nákladů na zdravotní péči vytvářejí tlak na ceny léčiv**

☞ **Končí patentová ochrana a ochrana farmaceutických dat úspěšných léčiv**

- Nástup generik a bionapodobenin - pokles tržeb za původní přípravky (tržby za atorvastatin činily až 12,9 mld. \$ ročně, po skončení patentové ochrany v r. 2011 klesaly a v r. 2018 činily jen 2,1 mld. \$; v roce 2018 dosahovaly tržby výrobců za 10 originálních léčiv, jejichž patentová ochrana končila v r. 2019, celkem 21,1 mld. \$)
- Snahy o prodlužování patentové ochrany (jiné polymorfy, enantiomery místo racemátů, nové lékové formy)

Inovativnost léčiv

Základní kategorie

- A. **Nová struktura, nové přínosy pro terapii (dosud neexistovala vhodná terapie, rozšíření možností léčby pro pacienty nereagující na dosavadní léčbu)**
- B. **Nová struktura (odlišná od dosud používaného léčiva), známé terapeutické přínosy -“me too” (vyšší účinnost, nižší vedlejší účinky, další účinky, lepší vlastnosti, výhody pro specifické skupiny pacientů, překonání/ rozšíření patentové ochrany, „bionapodobeniny“)**
- C. **Známá struktura, nové přínosy pro terapii (“profarmaka”, účinný enantiomer místo racemátu, nový typ soli, směřování účinku, nové indikace, nové lékové formy)**
- D. **Známá struktura, známé přínosy (generika, fixní kombinace)**

Fáze výzkumu a vývoje léčiv

(3 x DD)

❖ Fáze objevu (Drug Discovery)

hledání prvních látek s požadovanou účinností („hity“
→ vodítková látka/lead compound)

❖ Fáze návrhu (Drug Design)

modifikace vodítka – optimalizace vlastností, výběr
nejlepších kandidátů pro další vývoj

❖ Fáze vývoje (Drug Development)

vývoj technologie výroby, metod hodnocení,
preklinické a klinické zkoušení

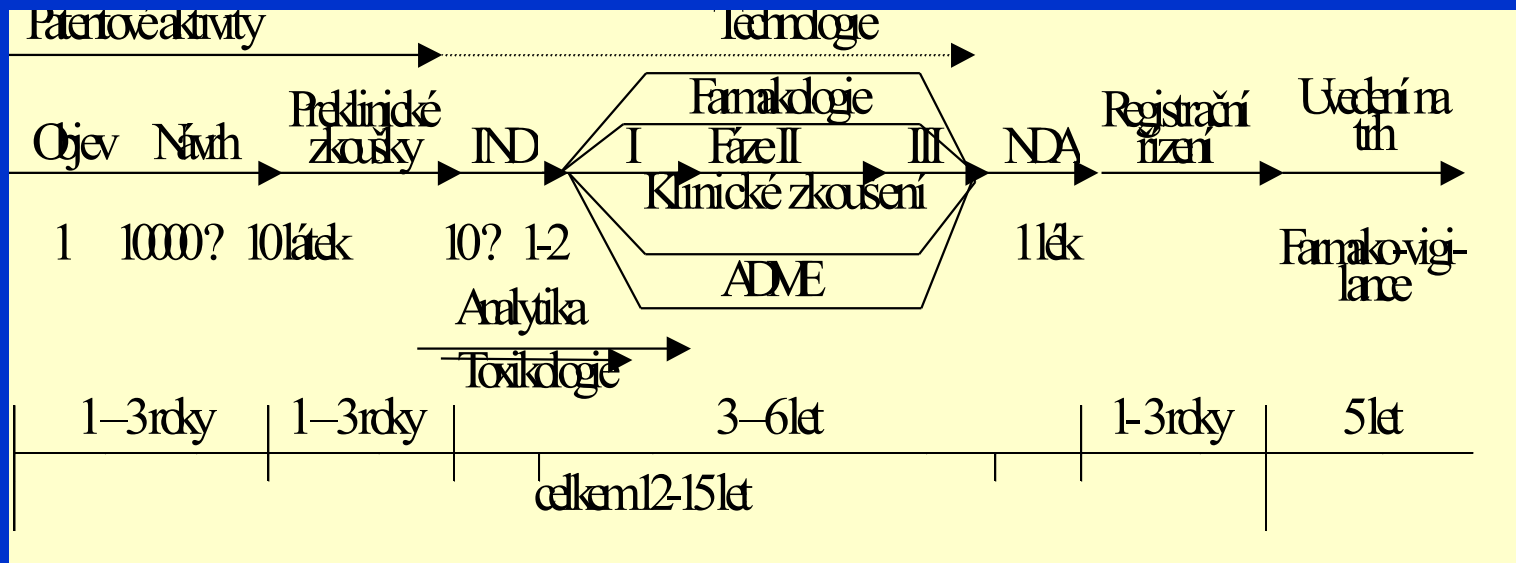
Kategorie inovativnosti 1 – všechny 3 fáze VaV

Kategorie inovativnosti 2 a 3 – 2. a 3. fáze VaV

Kategorie inovativnosti 4 – jen 3. fáze VaV

Časová náročnost VaV nového léčiva

Nové léčivo přichází na trh nejdříve za 8 let po objevu (průměr: 12-15 let)



Objevování nových léčiv - hledání vodítka (lead compound) pro další vývoj

- Šťastná náhoda – 5,8% léčiv
minulost?

- Racionální přístup

- Screening

Hledání účinných přírodních látek, příprava jejich derivátů

Nové syntetické látky

náhodný výběr - příklad NCI – otestováno na 100.000 látek

cílený výběr - na základě znalostí cílových struktur

vyhledávání celých molekul

na fragmentech založený objev léčiva

zkoušky účinnosti léčiv v nových indikacích (např. při terapii Covid-19)

– prvky náhodného i cíleného výběru

„translační“ výzkum

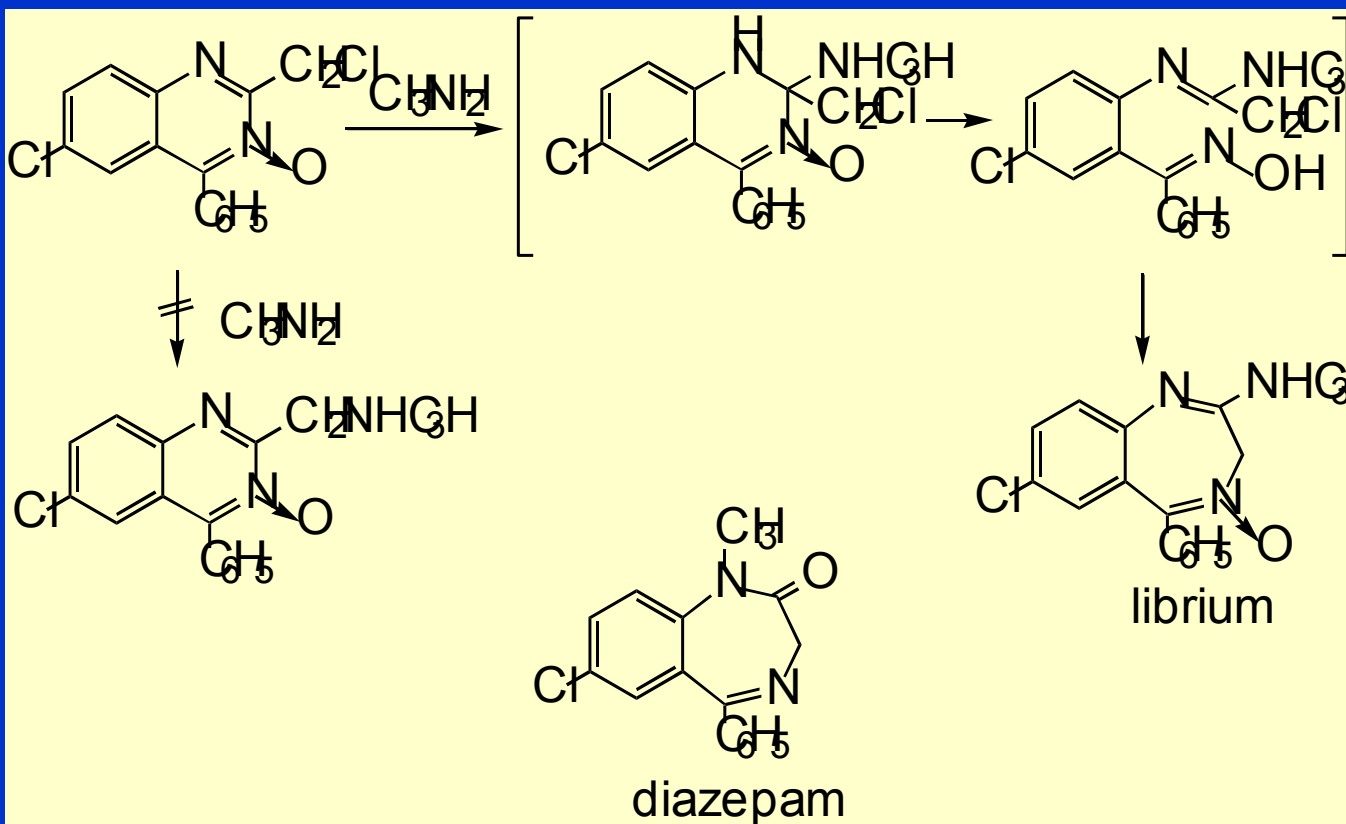
využití poznatků základního výzkumu v molekulární biologii, biochemii a lékařství ve farmakochemii a odtud přes preklinické a klinické hodnocení do praxe – „od laboratorního stolu k lůžku pacienta“ (“bench-to-bedside“)

Příklad objevu a vývoje léčiva

- šťastná náhoda:

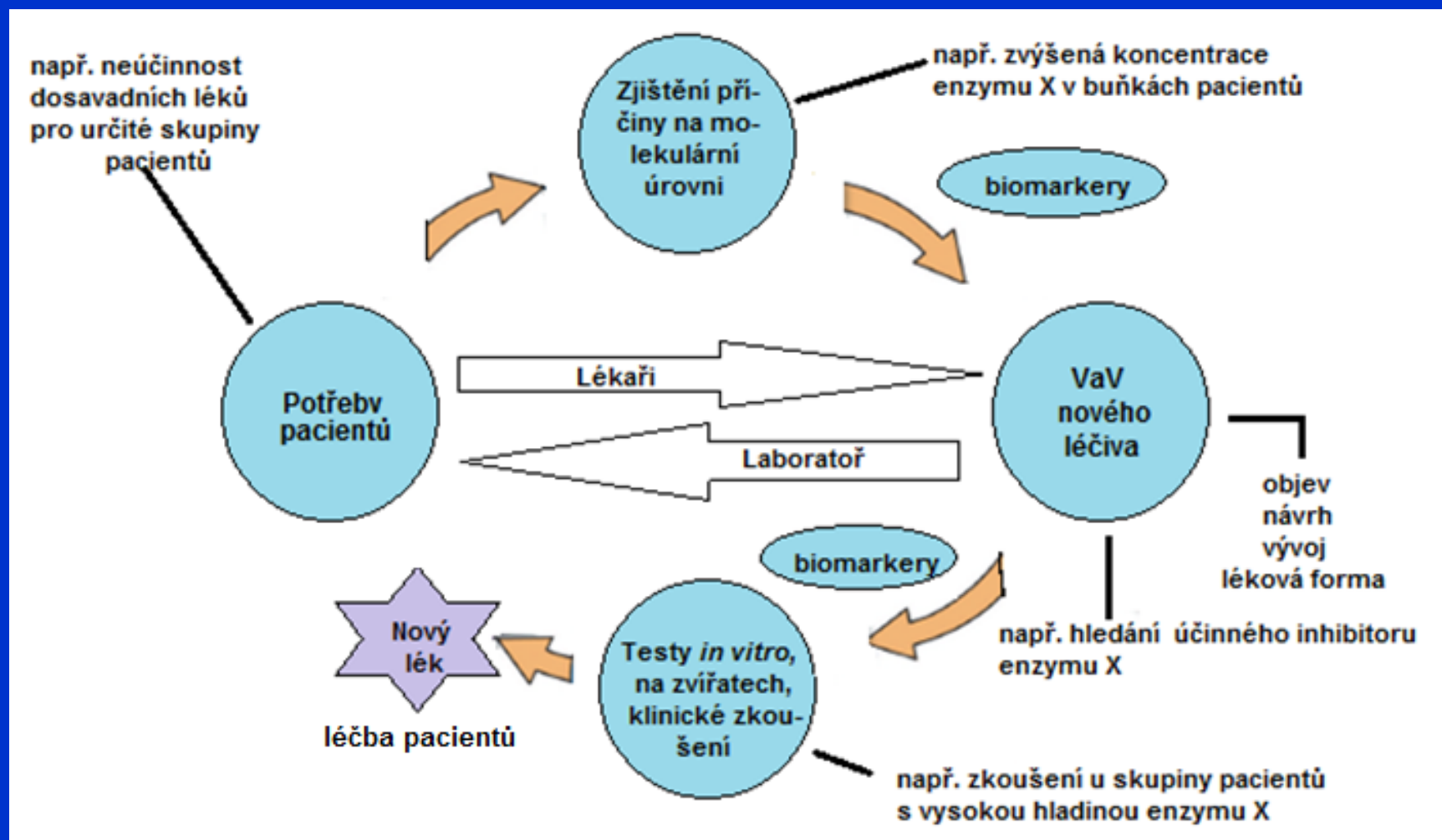
DIAZEPAM

viz text přednášky



Translační výzkum

od pacienta k farmakochemikovi a zpět (bench-to-bedside)



Objevování nových léčiv - metodický přístup

Identifikace a validace cílových struktur

poznání úlohy určitých cílových struktur v patogenezi onemocnění
předpoklady ovlivnění jejich funkce

Zpracování projektu VaV a vytvoření pracovní hypotézy

Vytvoření multidisciplinárního týmu

Výběr a validace biomarkerů – měřitelných indikátorů stavu organismu

biochemické, fyzikální, fenotypické biomarkery
doložení významu biomarkeru pro kontrolu účinku/vedlejších účinků
zkoušené látky

posouzení biomarkerů z hlediska jejich stanovení i citlivosti, specifčnosti,
přesnosti, robustnosti a reprodukovatelnosti při screeningu látek

Syntéza a screening látek s předpokládanou účinností

výběr látek vycházející z dosavadních poznatků a zkušeností

počítačové modelování (při znalosti prostorové stavby cílové struktury)

(kombinatoriální) syntéza

vypracování metodiky screeningu

screening látek (klasický, virtuální, vysokokapacitní, vysokoobsahový,
screening pro včasné zjištění nežádoucích vedlejších účinků)

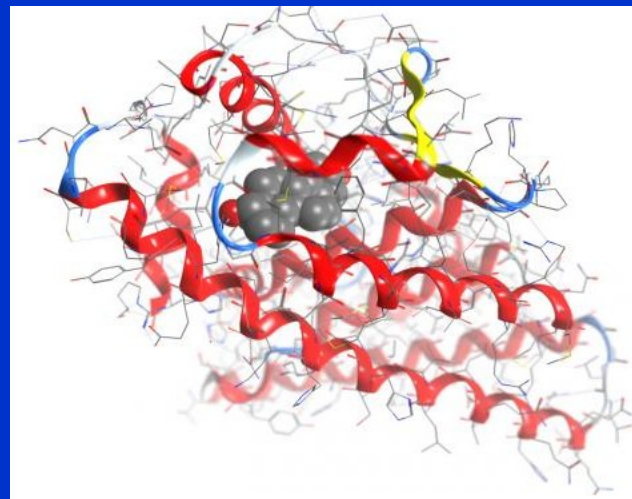
hity screeningu (jsou účinné, ale dosud nemusí mít charakter léčiva)

vodítková látka (vybraný hit) – základ pro optimalizaci struktury

Screening – zjišťování biologické účinnosti

Screening *in vitro*, *in vivo*, *in silico*

- **Klasický a vysokokapacitní (high throughput) screening**
 - biomarkery umožňující posouzení účinnosti látek
 - změny funkčnosti (inhibice, aktivace...), vazebné interakce (značené biomarkery)
 - rozdíly v metodice
- **Vysokoobsahový (high content) screening**
 - sledování vlivu látek na **celé buňky**
 - automatizovaná fluorescenční mikroskopie s analýzou obrazu, průtoková cytometrie
 - komplexnost, avšak méně podrobností (např. ovlivnění **celé** signalizační kaskády)
- **Virtuální screening („*in silico*“)**
 - počítačové modelování (docking & scoring)
 - vychází z rostoucích znalostí prostorové stavby enzymů, receptorů atd. (rtg. krystalografie a NMR bílkovin – dnes až 100 tis. prostorových struktur)
 - zjišťuje se, zda molekula může interagovat s aktivním/s alosterickým místem cílové struktury
 - návrh interagujících molekul *de novo* → syntéza a otestování
 - komplikace: flexibilita prostorové stavby cílové struktury i molekul potenciálních léčiv a dynamika jejich vzájemných interakcí za **reálných** podmínek



Klasický přístup

Syntéza a screening mnoha složitých molekul

„Hity“

- disociační konstanty komplexů látky s cílovou strukturou řádu 10^{-7} - 10^{-9} mol/l
- obrovský počet možných struktur (až 10^{60} molekul s 30 atomy)
- složité molekuly
- obvykle ještě nemají vlastnosti léčiva
např. problémy s rozpustností, biologickou dostupností, toxicitou apod.
- výběr vhodných hitů jako „vodítek“ („lead compounds“)
pro optimalizaci struktury a vlastností v další etapě

Na fragmentech založený objev léčiva (FBDD)

Fragmenty struktury budoucího léčiva

stavební kameny mnohem účinnějších látek

jednoduché látky s nižší molekulovou hmotností (do 300) interagující s cílovou strukturou

samy nemají dostatečnou účinnost (disociační konstanty komplexů s cílovou strukturou řádu 10^{-3} - 10^{-6} mol/l)

menší konečný počet fragmentů (řádově 10^2)

databáze fragmentů, privilegované struktury

- problémy s vyhledáváním fragmentů:

vazba fragmentu/inhibice, vazebné místo,

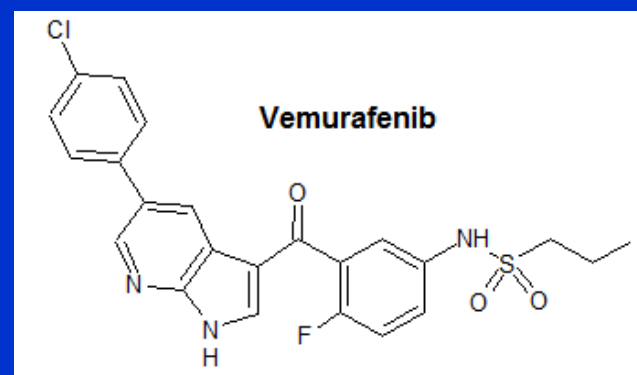
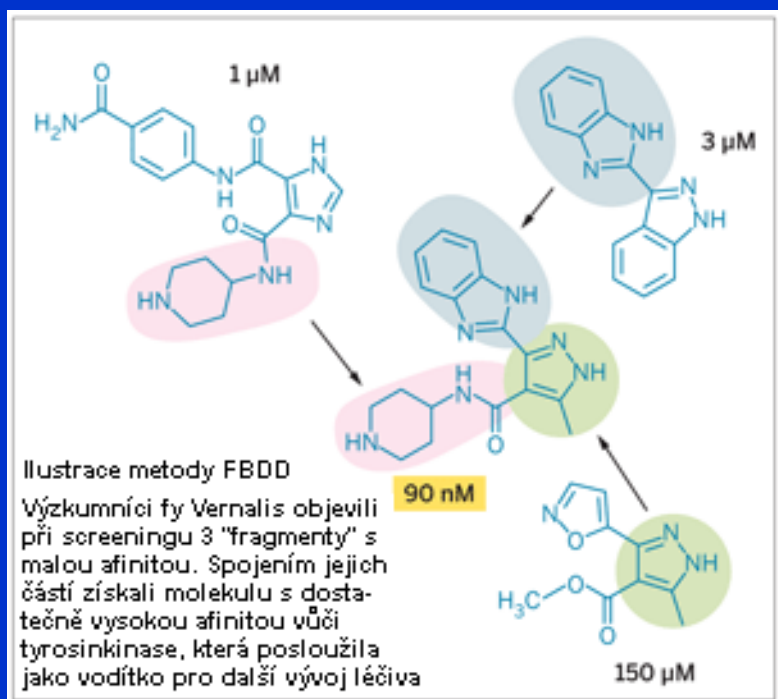
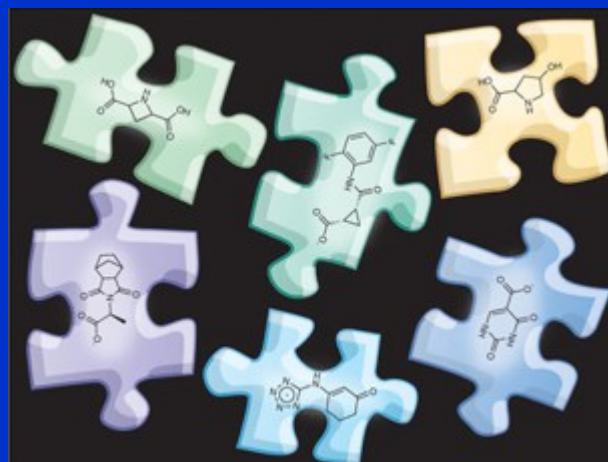
funkční screening – biochemické postupy (vysoké koncentrace)

fyzikální postupy (NMR, MS, rentgenografie)

Metodika FBDD

- vyhledávání „fragmentů“
- optimalizace fragmentů
- počítačové modelování fúzovaných molekul
- fúze a spojování fragmentů
- screening

Na fragmentech založený objev léčiva (FBDD)



Vemurafenib – první povolené léčivo, k jehož objevu byla využita metodika FBDD (povolen v letech 2011-2 pro léčbu metastázujícího melanomu)

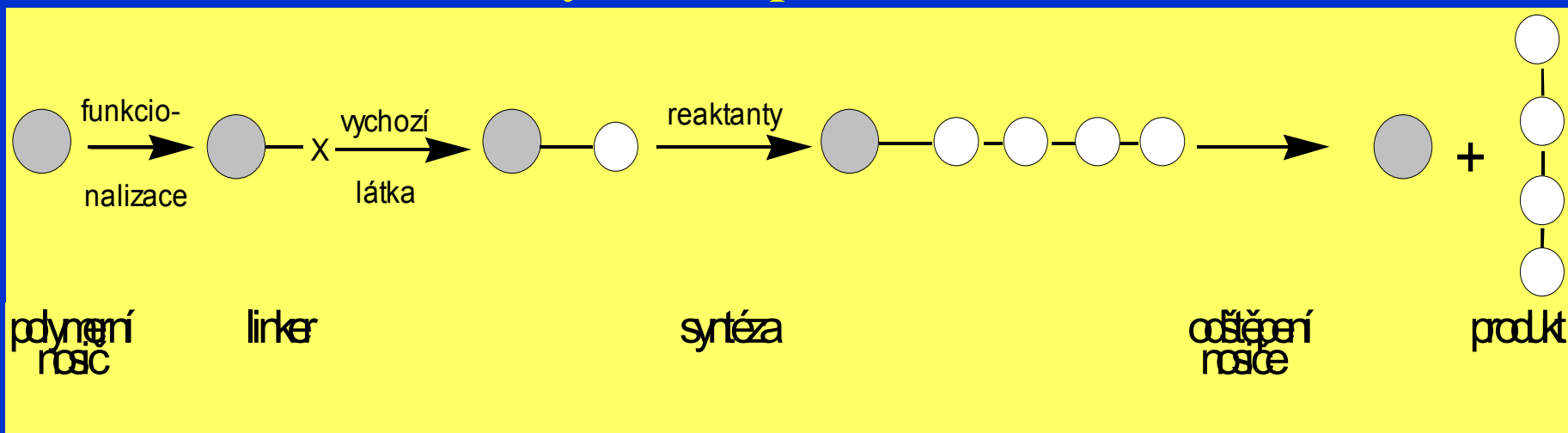
Kombinatoriální syntéza

Vývoj metodiky:

Syntéza v pevné fázi

Paralelní syntéza

Kombinatoriální syntéza v pevné fázi



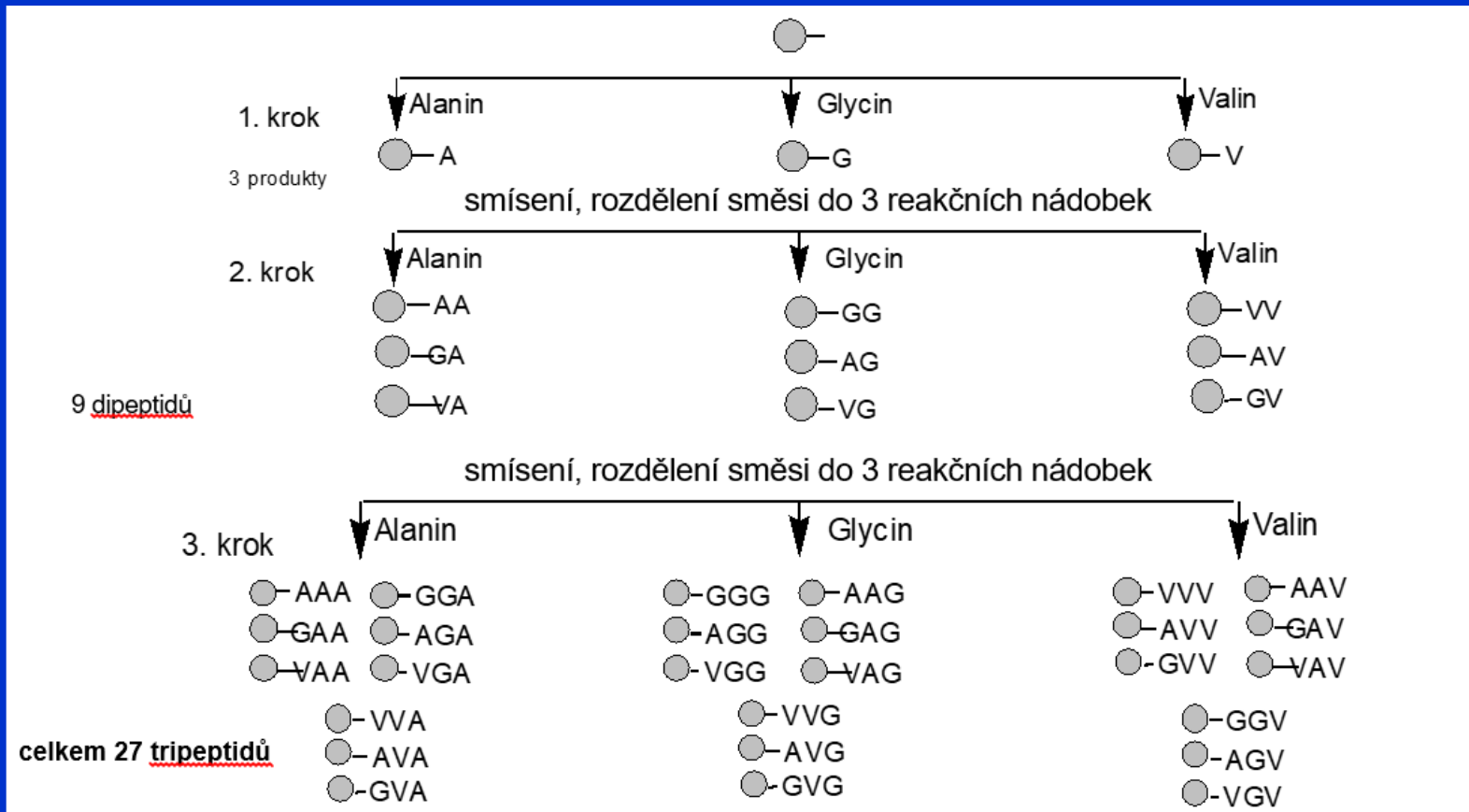
Kombinatoriální syntéza v kapalných fázích

rozpuštěný polymerní nosič, odstranění nespotřebovaných reaktantů ultrafiltrací

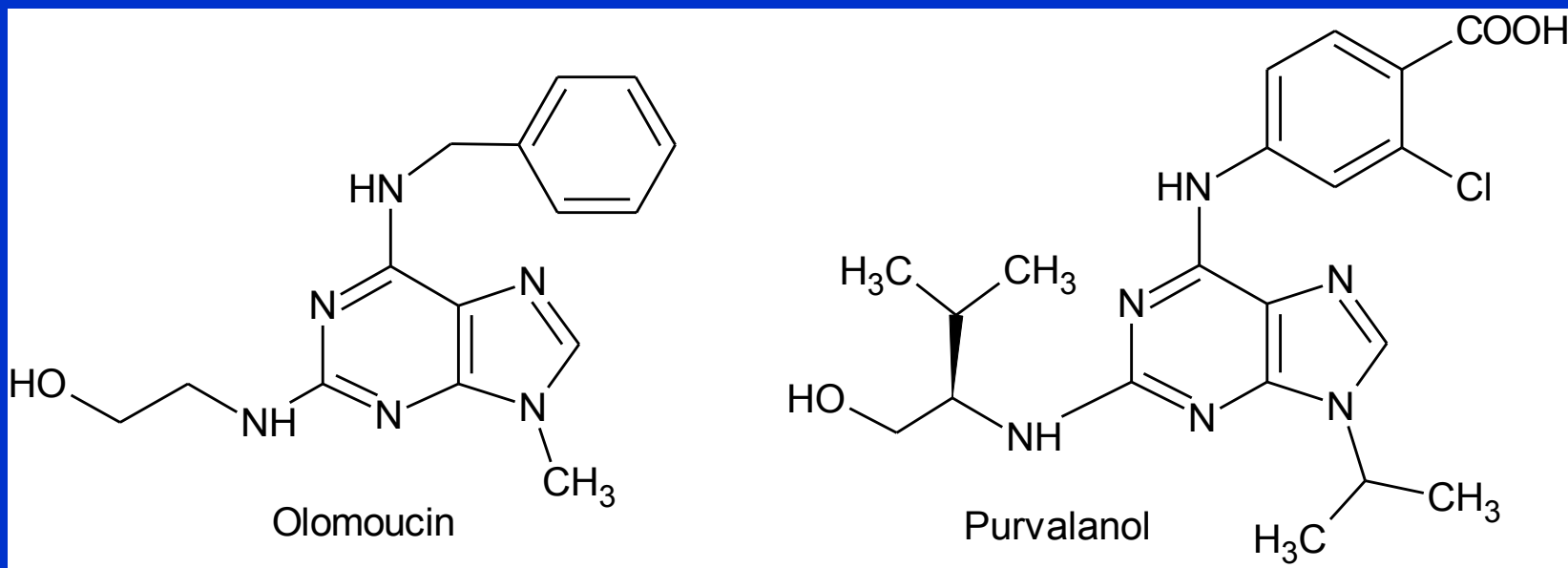
Paralelní syntéza

Kombinatoriální syntéza - knihovny sloučenin

velký počet látek → vysokokapacitní screening
identifikace účinných kombinací

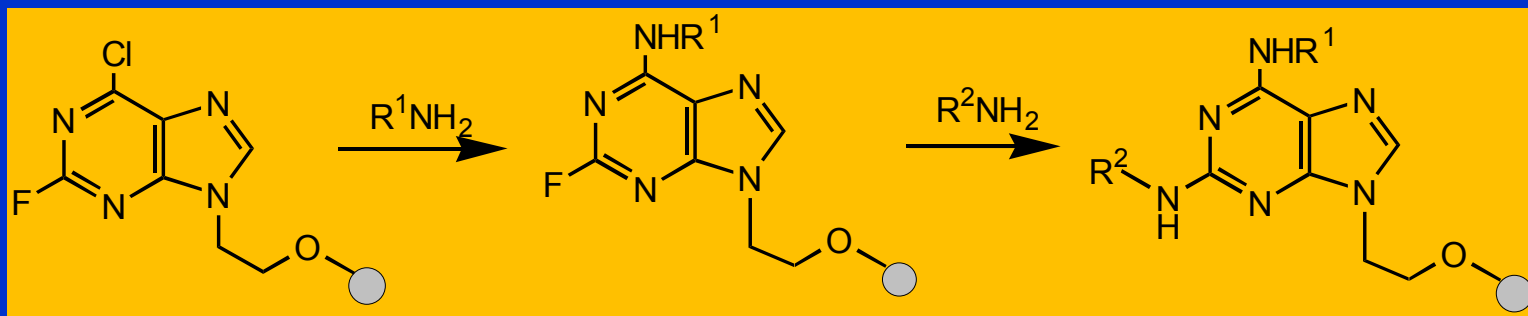
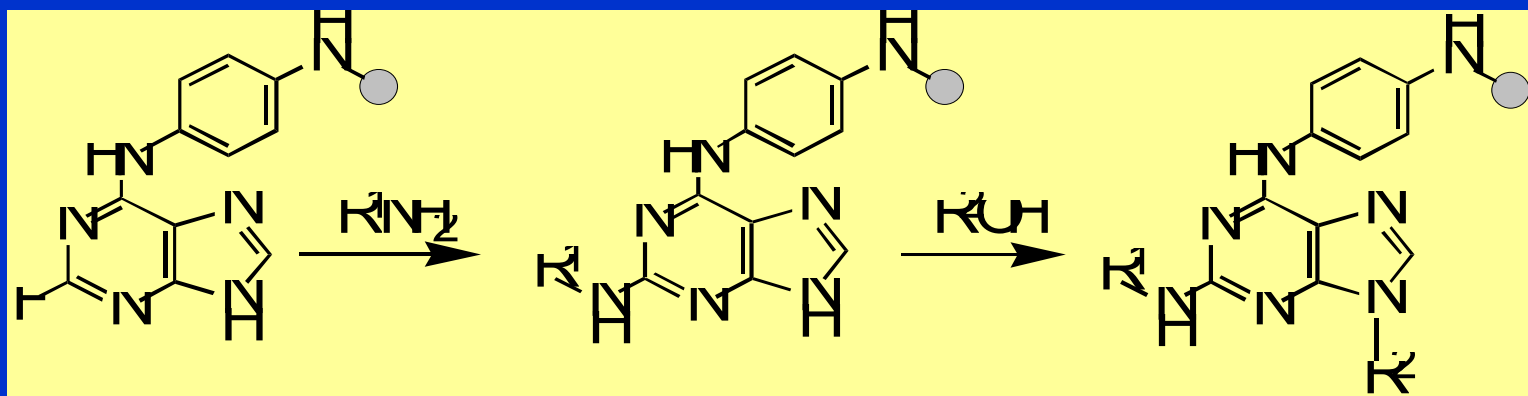
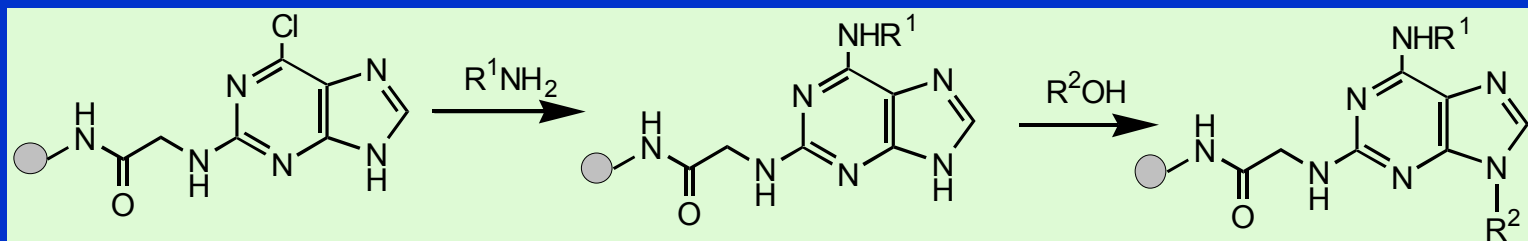


Purvalanol B - 1000 x účinnější než olomoucín



Využití při syntéze peptidů, ale i jiných látek

Příklad: inhibitory cdk2 (analoga olomoucínu)



Vysokokapacitní (high throughput) screening pro knihovny sloučenin

Využití vazebných interakcí s cílovou strukturou (enzym, receptor, strukturní bílkovina, DNA apod.) - binding assay

Zkoušení v pevné fázi – kuličky nosiče se rozdělí (mikrotitrační destičky)
cílové struktury se označí radioisotopem, chromogenní, fluorescenční nebo luminiscenční značkou

inkubace, posouzení intenzity vazby
výběr kuliček nosiče s účinnými látkami

Využití funkčních vlastností (inhibice apod.)

Zkoušení v roztoku po odštěpení látky od nosiče (mikrotitrační destičky)

Citlivost screeningu - 1 $\mu\text{mol/l}$

(kulička \varnothing 0,1 mm – 0,1 nmol látky – 0,1 ml činidla v jamce)

Zvýšení citlivosti - větší kuličky, destičky s 384 nebo 1536 jamkami

Automatizace vyhodnocování

až 10 mil. sloučenin za den - knihovna pentapeptidů z 20 aminokyselin

Identifikace

Analýza individuálních produktů, směsných vzorků

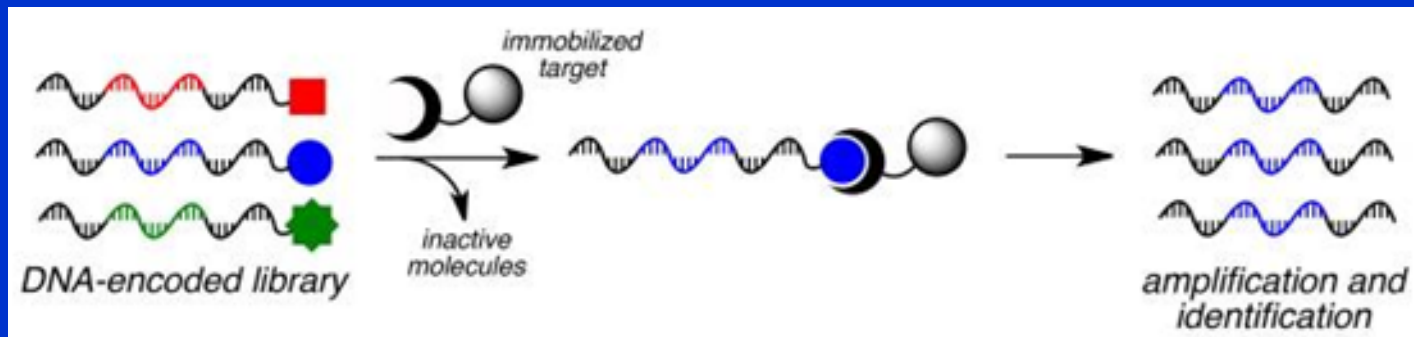
→ určení struktury látek v mikromolárním množství – **obtížný úkol**

DNA-kódování chemických knihoven

Kombinatoriální syntéza umožňuje rychlou přípravu rozsáhlých knihoven látek, identifikace hitů je však obtížná a zdlouhavá

Řešení problému: použití DNA jako nosiče i jako identifikační značky – „čárového kódu“ unikátního pro každou připravenou látku

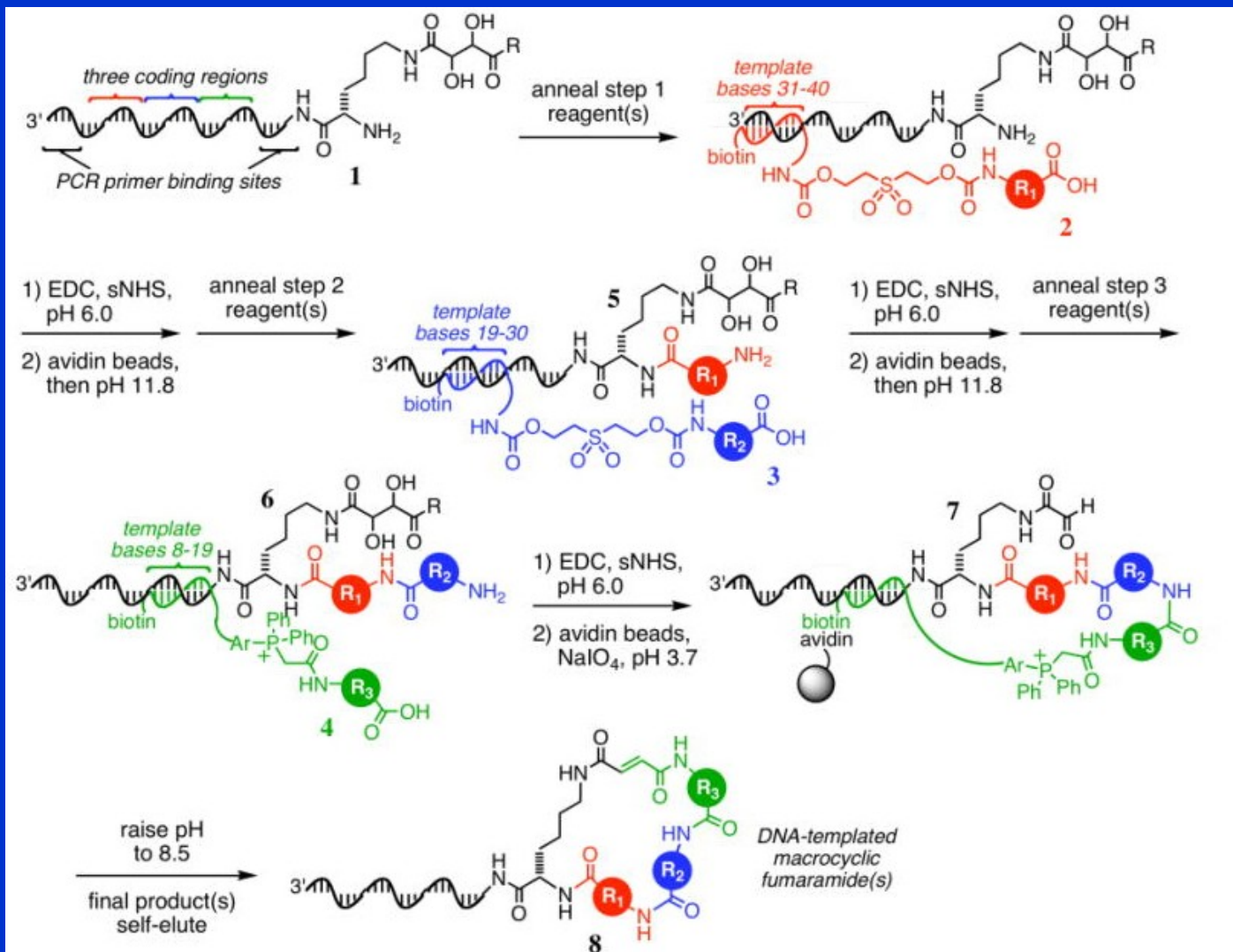
DNA-recorded combinatorial chemistry – DNA slouží jen k identifikaci:



Po přípravě knihovny látek a oddělení látek interagujících s cílovou strukturou se DNA značka odštěpí, pomnoží polynukleázovou řetězovou reakcí a identifikuje buď sekvenováním nebo hybridizací s komplementárními oligonukleotidy v mikročipech (DNA-microarray)

DNA-directed combinatorial chemistry (DCC) – DNA využita nejen k identifikaci, ale i ke specifickému připojení určité látky na původní sloučeninu – výběr látek na základě hybridizace oligonukleotidů – bylo vypracováno několik variant této techniky

DNA řízená kombinatoriální knihovna



B.N. Tse, T.M. Snyder, Y. Shen a D.R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130* (46): 15611-15626).

Dynamická kombinatoriální chemie

Metoda pro vytváření knihoven nových sloučenin termodynamicky kontrolovanými reverzibilními reakcemi a interakcemi určitých stavebních bloků.

Stavebními bloky mohou být slabě interagující fragmenty (návaznost na FBDD)

Rovnovážné zastoupení produktů dynamické kombinatoriální knihovny určuje jejich termodynamická stabilita.

Dynamická kombinatoriální knihovna může být generována v přítomnosti bílkovin nebo nukleových kyselin jako cílových struktur. Přitom se může zastoupení produktů dynamické kombinatoriální knihovny změnit ve prospěch látek, které s těmito cílovými strukturami nejsilněji interagují.

Dynamická kombinatoriální chemie

Reverzibilní vazby

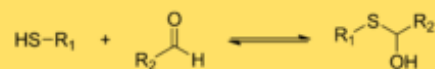
Boronate ester formation



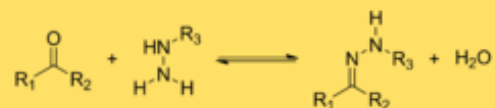
Disulphide formation



Hemithioacetal formation



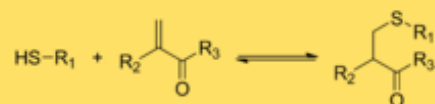
Hydrazone formation



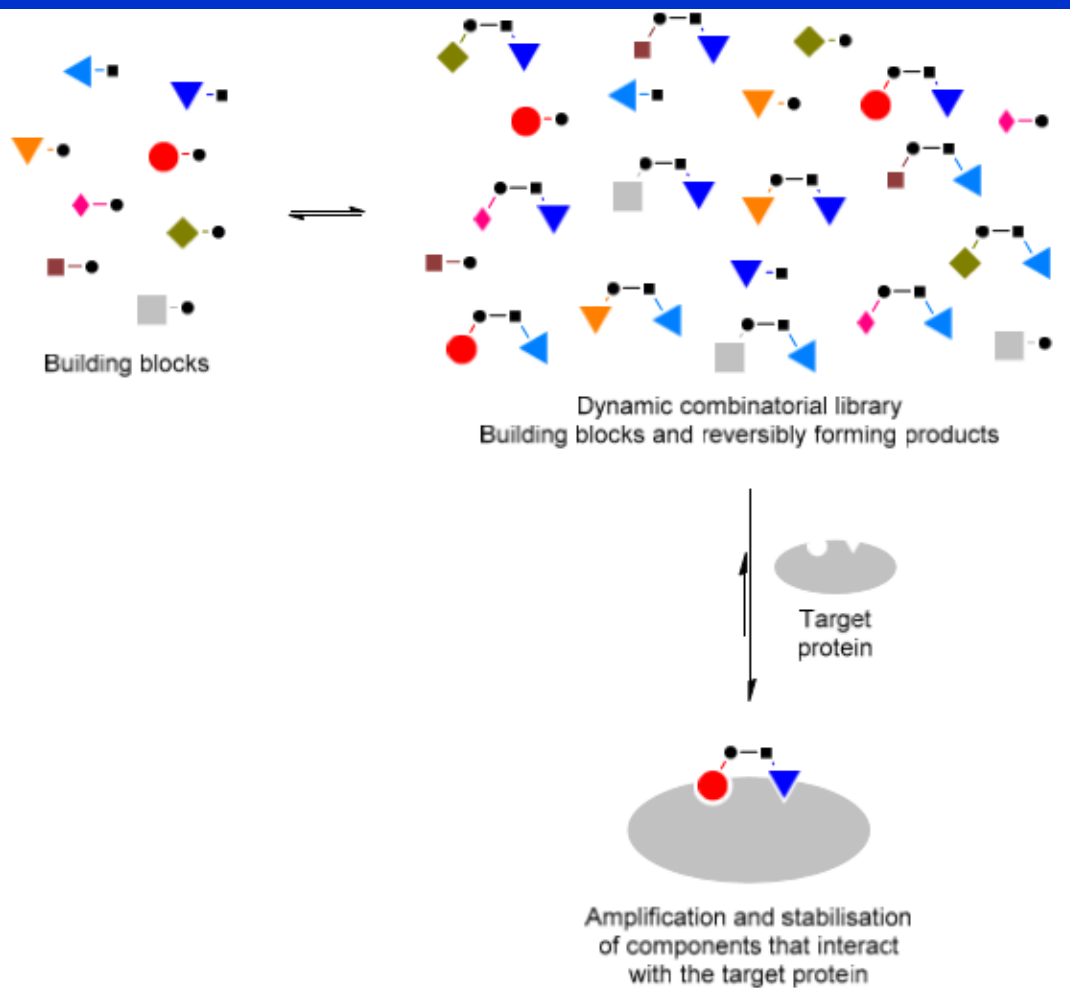
Imine formation



Thiol-enone exchange



Bílkovinou řízená dynamická kombinatoriální knihovna



Vodítková látka

Vodítková látka (lead compound, lead)

- výběr ze souboru „hitů“ nalezených při screeningu (látka s nejvyšší účinností a nejlepšími vlastnostmi)

„hit“ → vodítko

fáze návrhu ↓ (optimalizace struktury)

léčivo