

Výzkum a vývoj nových léčiv

Úvod

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

Průměrné náklady na výzkum a vývoj nového léčiva činily ještě v r. 1975 asi 150 mil. \$, kolem roku 2000 přesáhly 800 mil. \$ a nyní se mají pohybovat mezi 1,3-1,4 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 úspěšnými léčivy stál VaV jednoho z nich 3,7 mld. \$ a firmu AstraZeneca (5 schválených léčiv) dokonce 11,8 mld. \$. I když zisky farmaceutických firem činí 25-40% tržeb, jen asi 20% nových léčiv přináší více, než činily náklady na jejich VaV a musí proto zaplatit i VaV méně úspěšných. Vysoké náklady vyplývají zejména ze zvyšujících se požadavků na účinnost a bezpečnost. Důsledkem je, že mnoho léčiv selhává při klinických zkouškách. Zcela nových přípravků je proto povolováno každý rok jen velmi málo. V r. 2009 to bylo jen 25, zatímco v r. 1997 jich bylo 49 a v r. 2004 ještě 36. V r. 2011 jejich počet sice vzrostl na 35, to ale může být výjimka. Počet léků ve výzkumu a vývoji ale roste a nyní se pohybuje kolem 35.000. Spolu s tím rostou i částky vynakládané na VaV, ročně to bylo kolem 10%. V r. 2010 vydalo 50 nejdůležitějších firem na výzkum a vývoj 102,9 mld. \$. Nyní se i v této oblasti začíná šetřit (např. firma Pfizer snížila v r. 2011 plánované náklady na VaV o 1,5-2 mld. \$), ale přesto celkové náklady stále rostou. Roste i počet patentových přihlášek i publikací věnovaných novým potenciálním léčivům. Jejich autoři jsou často pracovníci akademických institucí nebo malých firem, kteří hodlají výsledky své práce výhodně prodat formou licence farmaceutickým gigantům, kde se vývoj léčiva dokončí. Šanci přitom mají, původ v akademických institucích a malých výzkumných firmách má nejméně čtvrtina nových léčiv. Pravděpodobnost, že uspějí je však jen malá – z deseti tisíců nových sloučenin se úspěšným léčivem stane jediná. Ilustruje to i příklad pražského Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii. Tam bylo do 90. let minulého století syntetizováno 18 tis. kandidátů na léčiva, jako nová originální léčiva bylo zaregistrováno jen 29 látek. Některé přitom byly úspěšné i v zahraničí – nejvíce antidepresivum desulepin s celkovým obrátem 19,5 mld. Kč. Licence na jeho výrobu byla prodána britské firmě Boots. Malá pravděpodobnost ale neznamená pravděpodobnost nulovou, ale nutnost racionálního přístupu k výzkumu. Zjistí-li se u nějaké nové látky mimořádně zajímavé biologické účinky, je třeba učinit vše proto, aby se z této látky nebo jejich derivátů léčivo stalo. Objev a návrh nového léčiva nemusí být finančně příliš náročný, potřebné zdroje se dají zajistit formou grantů nebo účelnou spoluprací s průmyslem. Je však třeba postupovat rychle a účelně a neopomenout nic, co rozhoduje o budoucím úspěchu, zejména pak patentovou ochranu. Finančně náročné jsou až závěrečné fáze vývoje, kdy se léčivo preklinicky a zejména pak klinicky zkouší. Tyto fáze už nelze bez spolupráce s kapitálově silným partnerem na potřebné úrovni zajistit. Provádění preklinického a klinického testování „na koleně“ na neakreditovaných pracovištích bez potřebného zázemí, což se u nás někdy děje, je pouze vyhazováním peněz. Výsledky takových zkoušek lékové autority povolující léčiva neuznávají a považují je pouze za orientační. Naproti tomu se u nás často podceňuje patentová ochrana nových látek před potenciálními konkurenty. Právě ta je však základním předpokladem pro nalezení a vzbuzení zájmu vhodného partnera, který finančně zajistí další vývoj léčiva až do jeho uvedení na trh, jako tomu bylo u antivirotik vyvinutých na ÚOChB AV ČR.

Výzkum a vývoj léčiv je **službou, která má své zákazníky.** Mají-li být pracovníci výzkumu a vývoje úspěšní a mají-li mít výsledky jejich práce šanci na to, aby se na trhu léčiv prosadily, musí reagovat na potřeby těchto zákazníků. To není jednoduché, protože každá skupina zákazníků přitom může mít různé (často dokonce 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 současně měla minimum 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, navíc požadují minimum kontraindikací (případů, kdy léčivo nelze předepisovat), protože případný omyl může mít nepříznivé následky nejen pro pacienta, ale i lékaře
- **Lékáři a distributoři léčiv** požadují od léčiv reprodukovatelnou kvalitu a co největší stabilitu, ale také chtějí, aby jim jejich prodeje 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 (u originálních léčiv), nízkou nákladovost a vysokou ziskovost výroby. V neposlední řadě jim jde i o to, aby léčivo vytvářelo u veřejnosti příznivý obraz firmy (to je důvodem, proč se některé farmaceutické firmy zabývají i méně lukrativními skupinami léčiv, jakými jsou např. léky proti AIDS nebo některá cytostatika).

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

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

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

Zda výzkum a vývoj nového léčiva zahrne všechny zmiňované fáze nebo jen některé, závisí na jeho **inovativnosti**.

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 odvozená od známých látek, známé přínosy** („me too“)
 - Léčivo je účinnější než dosud dostupné alternativy
 - Léčivo má méně vedlejších účinků
 - Léčivo přináší výhody pro určité skupiny pacientů (děti, senioři, pacienti s dalším onemocněním apod.)
 - Léčivo s dalším účinkem
- **Známa struktura, nové přínosy pro terapii**
 - „Profarmaka“, neúčinné látky, které přechází na účinnou látku po metabolické přeměně v organismu
 - Náhrada racemátu účinnějším enantiomerem
 - Nový typ soli
 - Zvýšení selektivity
 - Nová nebo rozšířená indikace
 - Nová léková forma
- **Známa struktura, známé přínosy**
 - **Generika**
 - „Fixní“ kombinace dvou nebo více 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 a farmaceutické koncerny si je pak kupují formou licence a rozvíjejí v dalších fázích VaV. Tím si snižují riziko, že se vydají na cesty, které nikam nevedou.

Výzkum a vývoj analog zavedených léčiv, tzv. „me too“, tj. patenty nechráněnými odvozeninami známých léčiv, začíná fází návrhu. Návrh nových „me too“ léčiv může vycházet ze zkušeností získaných s jejich předchůdci, takže tato léčiva obvykle bývají účinnější, bezpečnější a mnohdy 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.

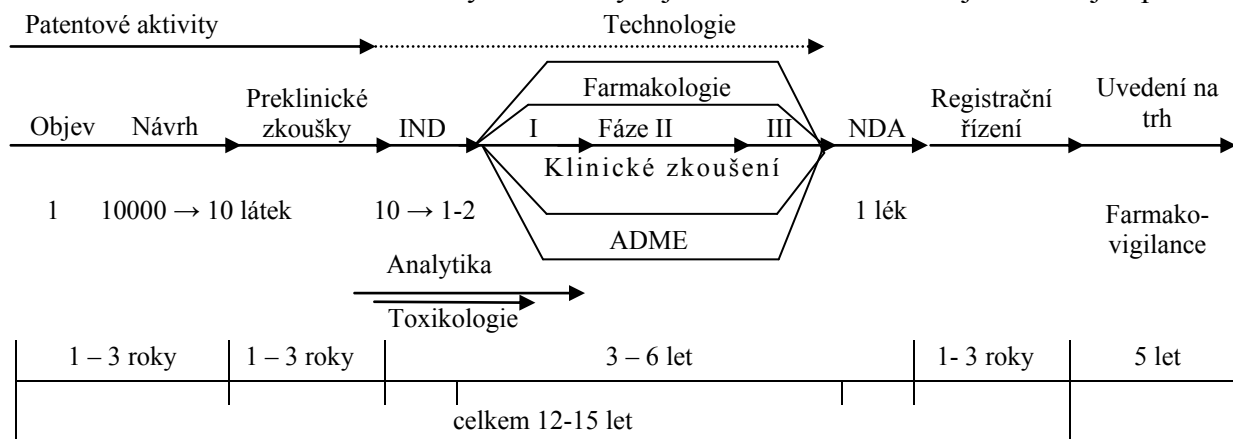
Někam mezi fází návrhu a vývoje patří hledání „profarmak“, derivátů, které se na účinnou látku přemění až v organismu, nových lékových forem známého léčiva, náhrady racemátu účinným enantiomerem, příprava a použití nových solí účinné látky apod. U většiny těchto látek musí proběhnout nové preklinické 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. Hledání a zkoušení nových indikací – možností léčby dalších onemocnění zavedeným léčivem – lze považovat za pokračování klinického vývoje přípravku.

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 originálními přípravky a jejich vývojem se 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 nákladném provedení všech předepsaných zkoušek. Výrobci generik proto 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. Složitější – a zatím ne zcela jednoznačná – je situace u tzv. biogenerik, napodobenin léčiv biomakromolekulárního charakteru (např. terapeutických monoklonálních protilátek), kde je téměř nemožné připravit přesně stejnou kopii originálního léčiva. Tam je určité klinické zkoušení požadováno.

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

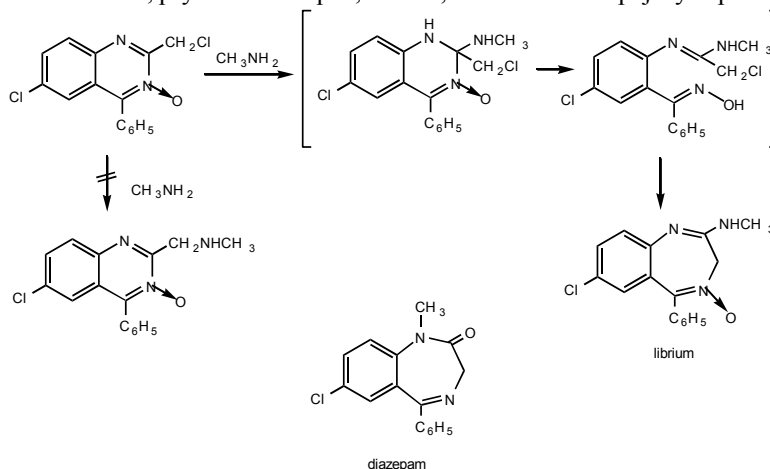


IND = žádost o povolení klinického zkoušení (Investigational New Drug application, NDA = žádost o registraci nového léčiva (New Drug Application), ADME = absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece (farmakokinetika)

Objevování nových léčiv

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

Využití šťastné náhody ilustruje případ zklidňujícího léku, diazepamu. V 50. letech 20. století se pracovníci firmy Roche snažili o syntézu benzoheptadiazolů jako nových léčiv, získávali však jen deriváty benzochinazolin-N-oxidu. Žádný z nich neměl požadovaný účinek a výzkum byl v r. 1955 ukončen. V r. 1957 byla při úklidu laboratoře objevena dosud neotestovaná látka. Výzkumníci ji dodatečně otestovali – a zjistili, že má překvapivou účinnost. Šlo o produkt reakce methylaminu s chlormethylderivátem substituovaného chinazolin-3-oxidu, nebyl to však 6-chlor-4-fenyl-2-methylaminomethylchinazolin-3-oxid, jak bylo předpokládáno. Ukázalo se, že při reakci došlo k otevření 6 členného kruhu a následné cyklizaci na 7 členný heterocyklický derivát, 2-methylamino-5-fenyl-4*H*-benzodiazepin-4-oxid. Ten byl nazván librium a stal se vodítkem pro návrhy dalších derivátů. Přitom se podařilo připravit diazepam a některé další deriváty benzodiazepinu, které byly při potlačování stavů strachu, psychického napětí, úzkosti, neklidu a s tím spojených poruch spánku o řád účinnější.



Podobných šťastných náhod bylo v minulosti mnohem více a vyloučit je nelze ani dnes. V současné době jsou objevy nových léčiv stále více výsledkem systematického **screeningu**, zkoumání účinků různých látek připravených synteticky nebo izolovaných z přírodních zdrojů.

Screening je rychlým vytříděním méně či více rozsáhlých souborů na látky účinné a neúčinné. Doslovným překladem slova screening je prosévání. 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. Dnes je základem „prosévání“ studium interakcí kandidátů na nové léčivo s izolovanými cílovými biomakromolekulami, buňkami nebo tkáněmi „ve skle“ (*in vitro*).

Moderní screeningové postupy vycházejí z poznání příčin nemocí na molekulární a buněčné úrovni. Možnost, že se podaří objevit nové úspěšné léčivo, proto závisí na tom, jaké informace o úloze určitých cílových struktur při vzniku a průběhu nemocí má výzkumný tým k dispozici.

Funkce řady cílových struktur je již dávno známa. U některých „multifaktoriálních“ onemocnění, jako je rakovina, srdeční nebo neurodegenerativní onemocnění jsou však stále ještě identifikovány různé nové nebo i již známé biomakromolekuly, především bílkoviny nebo geny, které je kódují, a jejichž anomální výskyt, množství nebo struktura mohou s nemocí nějak souviset. Zablokování, inhibice nebo naopak aktivace, popř. jiné interakce různých látek s takovými biomakromolekulami, pak mohou nemoc léčit nebo alespoň zmírnit její příznaky a průběh. Aby však výzkum a vývoj nového léčiva neskončil neúspěchem, je třeba však nově identifikované cílové struktury validovat, tj. co nejlépe poznat jejich roli v patogenezi určitého onemocnění nebo poruchy.

Validace cílových struktur (target validation) se proto stala důležitou součástí fáze objevu nového léčiva. To, že bude při screeningu nalezena látka s požadovanou interakcí 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 jiné, což by mohlo znamenat, že se u ní projeví závažné vedlejší účinky

Často se proto testuje nejen účinek na cílové molekuly a struktury mající vztah k onemocnění, které má být léčeno, ale i takové struktury, jejichž ovlivnění může způsobit poruchy důležitých životních funkcí. Nově proto byly do screeningu zavedeny metodiky vylučující látky s vysokou toxicitou nebo nevýhodnými farmakokinetickými vlastnostmi a hodnocení interakcí s více cílovými strukturami. Poté, co musela být některá léčiva stažena z trhu pro závažné poruchy v činnosti srdce, je např. u nových léčiv zkoušeno, zda nemohou inhibovat draslíkový kanál hERG, protože tato inhibice může být příčinou výskytu srdečních arytmií.

Při návrhu metod screeningu je kromě výběru relevantních cílových struktur také třeba určit způsob, jak jejich interakce se zkoušenými látkami detegovat a vyhodnotit. Detekovatelný způsob posouzení interakcí se tak stává **biomarkerem**, který nám řekne, zda látka je či není účinná. Stejně jako cílové struktury mají být biomarkery **validovány**, tj. má být doložen jejich vztah k průběhu onemocnění.

Při screeningu se nejčastěji využívají vazebné interakce látek s cílovou strukturou („binding assay“), které se mohou projevit např. inhibicí určitého enzymu nebo změnami optických nebo elektrických vlastností systému. Aby bylo možné účinky zkoumaných látek kvantitativně hodnotit, opatřují se biochemické markery vhodnou značkou. Značkou může být např. navázaný radioizotop nebo enzym (peroxidasa, alkalická fosfatasa) katalyzující přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt, vhodná fluoreskující sloučenina (v poslední době je populární zejména zelená fluoreskující bílkovina připojená k cílové bílkovině s využitím genové inženýrských postupů), luminiscenční látka apod. Kvantitativní údaj se pak získá měřením radioaktivity, absorbance, fluorescence nebo luminiscence. Screeningové systémy bývají navrženy tak, aby byly pokud možná eliminovány falešně pozitivní výsledky, protože další vývoj nevhodného kandidáta na léčivo by představoval zbytečně vynaloženou práci a finanční náklady.

Cílové biomakromolekuly mohou, být izolované a vyčištěné, mohou se ale vyskytovat i ve složitých směsích s jinými látkami ve svém prostředí v živých buňkách. Jako biomarkery, indikátory farmakologické odezvy na zkoumanou látku, mohou ale být využity i jiné charakteristiky normálních nebo patologických procesů v organismu, které mohou být objektivně měřeny. Biomarkerem může být specifický rys nemocné nebo i zdravé tkáně, jako je velikost a tvar buněk, jejich jádra, aktivita enzymů podílejících se na přenosu signálů v buňkách, změny genomu (mutace, počet kopií genu apod.) nebo i počet určitého typu buněk v krevním oběhu (např. cirkulujících nádorových buněk) apod. Využití tkáňových charakteristik při testech *in vivo* může být komplikované a proto se tam, kde je to možné, dává přednost biomarkerům, které se vyskytují v tělních tekutinách (krev nebo moč) a které lze hodnotit *in vitro*. Je to především hladina určitých enzymů nebo dalších bílkovin, zastoupení a struktura některých genů apod.

Metody zjišťování účinnosti léčiv podle jejich vlivu na chování živých buněk, který je většinou vyhodnocován mikroskopii 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. Jsou to např. potenciální protinádorová léčiva, které mohou blokovat buněčné dělení nebo spouštět procesy buněčné smrti, apoptosy.

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

Zavádění metod vysokokapacitního screeningu provázely zprvu přehnané naděje, pak následovala spíše skepse. V poslední době byly však metody HTS značně zdokonaleny.

Přes stále dokonalejší postupy nebývá výsledkem screeningu potenciálně účinných látek objev nového léčiva s dostatečně velkou a specifickou (tj. bez vedlejších účinků) biologickou odezvou a potřebnými farmakologickými vlastnostmi, ale jen objevy „**hitů**“, látek, které mají slibnou účinnost.

„Hity“ běžného i vysokokapacitního screeningu, jejichž cílem je vyhledání sloučenin s co možná nejvyšší účinností, většinou stále nesplňují požadavky na použitelné léčivo (drug-like character). Často mají příliš komplikovanou strukturu. Jejich molekuly obsahují nadbytečné funkční skupiny, které se mohou podílet na nežádoucích interakcích s jinými cílovými strukturami a tedy i toxicitě. Mohou být málo rozpustné v biologických tekutinách (aby špatná rozpustnost nekomplikovala screening, testují se rozpuštěné v dimethylsulfoxidu), mohou mít nedostatečnou biologickou dostupnost apod.

Z nejlepších hitů se proto vyberou látky, které stojí za to, aby jim byla věnována pozornost při další fázi 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 dalšího **vývoje léčiva**.

Při tomto vývoji se pak většími či menšími obměnami struktury optimalizují vlastnosti látky tak, aby byly získány produkty s požadovanými farmakodynamickými i farmakokinetickými vlastnostmi.

Jsou-li k dispozici kromě informací o úloze určité cílové struktury při vzniku 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 generování molekul komplementárních s aktivním nebo alosterickým místem enzymů nebo receptorů spolu s vyhodnocením jejich potenciálních interakcí nazývá „docking“, což je anglický výraz původně znamenající zajištění lodí do doků. Alternativou dockingu je počítačový návrh struktury léčiva *de novo*, který skýtá větší možnosti chemické rozmanitosti navrhovaných struktur, ale na druhé straně současně zvyšuje riziko neúspěchu. Virtuální screening látek založený na znalosti struktury cílové bílkoviny může nahradit podstatnou část jinak zdoluhavé a nákladné experimentální práce. Počítač může navrhnout i molekuly, jejichž přípravou by se experimentátoři patrně nezabývali, protože se nepodobají známým léčivům dané terapeutické kategorie, ale přitom mohou být účinné, protože zapadnou do cílové biomakromolekuly. Navržené látky se pak syntetizují a biologickým testováním se ověří, zda kandidát na nové léčivo má předpokládané vlastnosti. Počítačové metody virtuálního screeningu nebyly v minulosti dostatečně úspěšné. Dosavadní počítačové modely měly statický charakter a nepostihovaly ani flexibilitu cílové biomakromolekuly, která může zaujímat různé konformace, aniž by byla narušena její kompaktnost, ale ani flexibilitu molekul potenciálního léčiva. Tyto modely také nepočítaly s hydratací molekul a dynamikou jejich vzájemných interakcí za reálných podmínek. Nové počítačové postupy se však začínají vyrovnávat i s těmito problémy. Počítačové modelování interakcí potenciálních léčiv se tak stále více přibližuje skutečnosti. Zatím se využívá především ve fázi návrhu léčiva, kdy počítač navrhuje obměny vodítkové látky s využitím algoritmů popisujících vztahy mezi strukturou a účinností látek, začíná se však uplatňovat i v objevitelské fázi.

Techniky počítačového modelování interakcí léčiva s jeho cílovou strukturou spolu s moderními screeningovými postupy vedly v 90. letech minulého století ke zrodu nové metodiky objevování léčiv. Ta se zaměřila na identifikaci jednoduchých sloučenin, které interagují pouze s částí cílové struktury.

Disociační konstanty jejich komplexů s cílovou strukturou se pohybují mezi 10^{-5} – 10^{-3} mol/l. Malá afinita nestačí k tomu, aby tyto látky byly používány jako léčiva. Použitelná léčiva mají mít účinnost alespoň o 3 řády vyšší (nmol/l).

Nalezené látky lze však považovat za určité **fragменты budoucího léčiva**, které je možné kombinovat a spojovat s jinými fragmenty interagujícími s jinými místy cílové struktury.

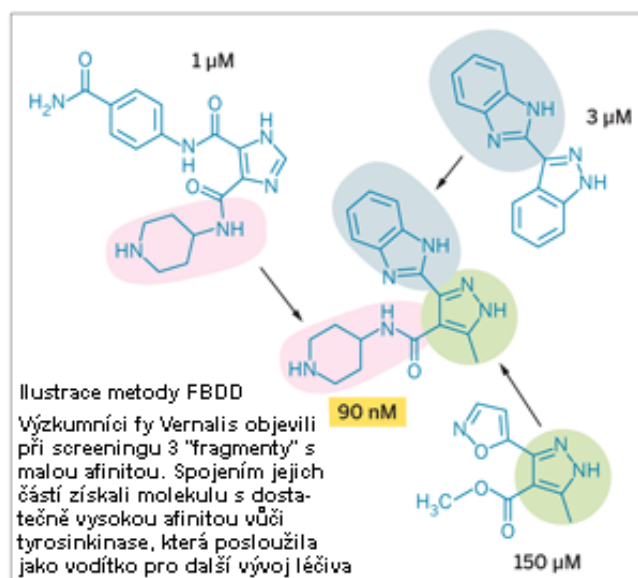
Kombinací fragmentů se pak získá látka, která je schopna komplexnějších a synergisticky zesílených interakcí a je tedy podstatně účinnější.

Metodika vyhledávání fragmentů a jejich spojování a kombinování byla nazvána **na fragmentech založený objev léčiva** (fragment-based drug discovery, zkratka FBDD).

Fragmenty, tj. stavební kameny mnohem větší a komplikovanější struktury budoucího léčiva, mají molekulovou hmotnost do 300 daltonů a omezený počet funkčních proton-donorových a akceptorových skupin. Ve srovnání s „hity“ standardního screeningu jsou méně lipofilní. Vyhledání fragmentů je snazší a rychlejší než hledání „hitů“, knihovny fragmentů jsou proto méně rozsáhlé. K vyhledávání fragmentů se využívají spíše biofyzikální (především NMR, ale i hmotová spektrometrie nebo krystalografie) než biochemické metody, které mohou být pro málo účinné fragmenty nedostatečně citlivé. Cílový protein musí ale být k dispozici izolovaný a případně i v krystalickém stavu.

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 bílkovinami (např. difenoly).

Spojením dvou nebo více fragmentů, z nichž každý má jen relativně malou afinitu vůči cílové struktuře (řádu mmol/l), lze získat molekuly s řádově zvýšenou afinitou ($\mu\text{mol/l}$, popř. dokonce nmol/l). 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 pak jsou syntetizovány, testovány, zhodnoceny a dopracovávány, až se dosáhne požadované účinnosti. Zahrnutí algoritmů pro farmakinetické 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 to, že se při spojení molekul 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. Použití FBDD je 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 struktura je známá a lze ji získat v čistém stavu. Osvědčuje se také, když existuje několik úspěšných léčiv příslušné terapeutické kategorie a jde o vyhledání nového léčiva charakteru „me too“, které by jim mohlo konkurovat. Pro uplatnění FBDD jsou nezbytné určité poměrně náročné technické předpoklady pro uplatnění metodik studia fragmentů (NMR, rentgenová krystalografie). Naopak uplatnění HTS je výhodné tam, kde cílová struktura je nová a zatím nedostatečně charakterizovaná a je třeba rychle získat hity pro její validaci jako místa terapeutického zásahu. Problémem všech FBDD metodik, screeningových postupů i počítačových návrhů léčiv však stále ještě zůstává identifikace vhodných vodítek pro další vývoj účinného a úspěšného léčiva. Žádný výstup FBDD zatím nebyl povolen jako léčivo, klinicky je však zkoušeno 10 takto navržených léčiv. Optimisté tvrdili, že první takto navržené léčivo se dostane na trh již v r. 2011, to se však zatím nestalo.

Kombinatoriální syntéza

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

Ještě na počátku v 90. let zajímala kombinatoriální syntéza jen pár chemiků. Je proto překvapivé, jak rychle se vyvinula v široce používanou rutinní metodu, kterou dnes žádná významná farmaceutická firma vyvíjející nová léčiva nemůže ignorovat. V r. 1992 byla kombinatoriální syntéza využita k přípravě pouhých 3 „knihoven“ nových látek, z čehož jen u 1 byla zjištěna terapeutická účinnost. V r. 1999 bylo takových knihoven látek připraveno již 292 a terapeutická účinnost byla zjištěna u 85 z nich. Na přelomu 20. a 21. století pronikla metodologie kombinatoriální syntézy i do dalších oblastí užité chemie a začala být využívána i při hledání agrochemikálií, konzervačních látek, různých aditiv, nových materiálů pro mikroelektroniku a dokonce i nových katalyzátorů.

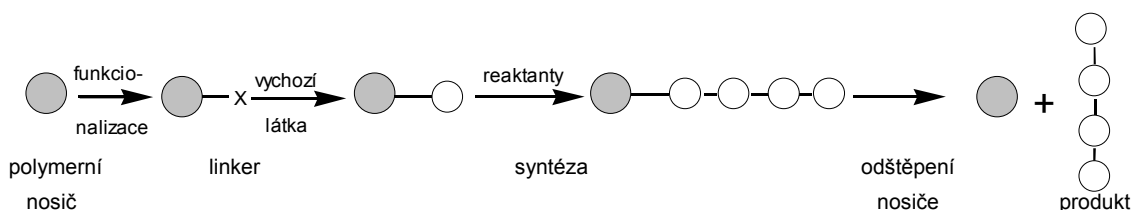
Kombinatoriální syntéza se vyvinula ze **syntézy v pevné fázi**. Tato technika usnadňuje izolaci produktů a umožňuje automatizovat pracovní postupy. Syntéza v pevné fázi je založena na navázání výchozí látky na inertní pevný nosič. Tím bývá vhodný polymerní materiál, často ve formě malých kuliček, nosičem však může být i 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 meziproducty a produkty. Nutnost použití membrán sice poněkud komplikuje používání rozpustných polymerních nosičů, výhodou však je hladší průběh reakcí v homogenním prostředí (eliminace difuzních jevů)

Některé typy nosičů obsahují samy 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.

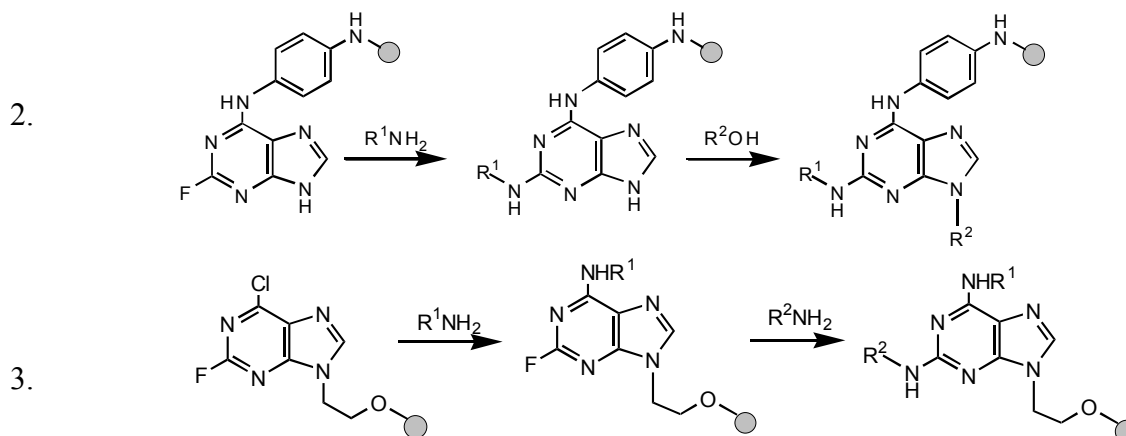
Na nosič s navázanou výchozí látkou se pak působí roztokem vhodně zvoleného činidla. To se obvykle použije ve velkém přebytku, aby reakce proběhla pokud možná kvantitativně. Vazba na nerozpustný nosič umožňuje, aby produkt byl snadno oddělen od přebytečného činidla pouhou filtrací a promytím. Produkt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



Syntéza v pevné fázi se využívá např. při přípravě peptidů. Nosičem je přitom řídko síťovaný styren-divinylbenzenový gel, někdy nazývaný Merrifieldova pryskyřice. Jsou to drobné kuličky kopolymeru styrenu s 1% divinylbenzenu, který slouží jako síťovadlo vytvářející trojrozměrnou gelovitou strukturu. Po aktivaci chlormethylací se na nosič naváže první aminokyselina. Reakce je „polymeranalogickou“ obdobou aralkylace aminokyseliny benzylchloridem. Karboxylová skupina navázané aminokyseliny se pak aktivuje pro reakci s aminoskupinou druhé aminokyseliny. Přitom vznikne navázaný dipeptid, který může být opakovaně aktivován a podroben reakci s další aminokyselinou. Aktivace a navázání aminokyseliny se pak opakují, až se získá žádaný oligopeptid, který se pak od nosiče hydrogenolyticky 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. současně 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. Také provádění paralelních syntéz mohou usnadnit různé laboratorní automaty a syntezátory



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.

Screeningové systémy bývají navrženy tak, aby byly pokud možná eliminovány falešně pozitivní výsledky. Při screeningu založeném na využití vazebných interakcí látek s cílovou strukturou zůstávají připravené látky navázané na nosič. Cílová struktura je opatřena „značkou“, navázanou barevnou nebo fluoreskující látkou, radioisotopem nebo enzymem (peroxidasa, alkalická fosfatasa), který reaguje s chromogenním substrátem za vzniku barevného produktu. Po inkubaci s označenou cílovou strukturou a promytí se pak kontroluje zbarvení (fluorescence, radioaktivita apod.) kuliček nosiče. Pozitivně reagující a tedy zbarvené kuličky se pak oddělí a zjišťuje se, jakou strukturu má produkt, který je na ně navázán. Jiné screeningové systémy využívají změn optických nebo elektrických vlastností látek při vzájemných interakcích. Vedle vazebných interakcí mohou být využity při screeningu knihoven látek i požadované funkční vlastnosti produktu, např. schopnost inhibovat určitý enzym. V takovém případě se detekce provádí po odštěpení produktů od nosiče, např. s použitím souboru 96 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 pikomolů 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.

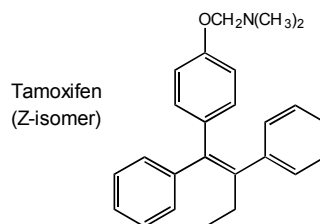
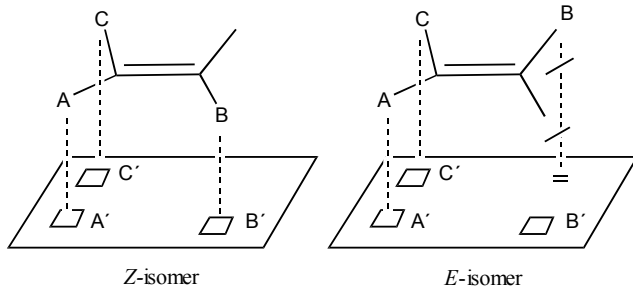
Po provedeném screeningu kombinatoriálních knihoven je třeba pozitivně reagující produkty identifikovat. Prvním možností identifikace představuje analýza individuálního produktu na jednotlivé kuličce nosiče, druhou možností je analýza směsného vzorku založená na statistickém hodnocení pravděpodobnosti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

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

Stereochemické aspekty výzkumu a vývoje léčiv

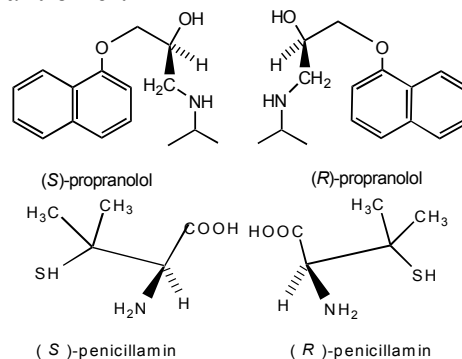
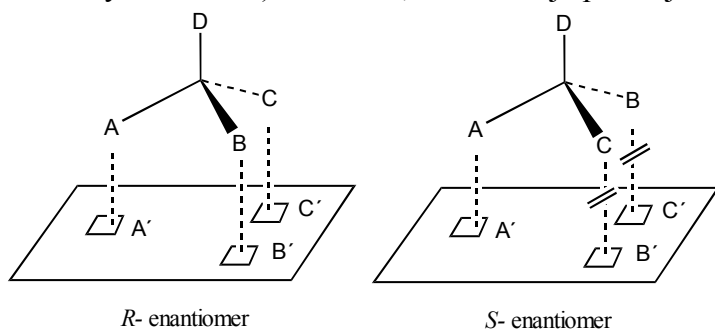
Účinek léčiva je podmíněn interakcemi jeho molekuly s trojrozměrnými cílovými strukturami s charakteristickou prostorovou stavbou. Při výzkumu a vývoji léčiva proto nelze opomíjet stereochemické aspekty, protože na **prostorové stavbě jeho molekuly**, tj. na **konfiguraci** jejích funkčních skupin, **chiralitě** 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 přítomnost malého množství *cis*-isomeru jako nečistoty příčinou vedlejších účinků tamoxifenu.

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



Interakce enantiomerů s cílovými strukturami se mohou projevit různě:

1. 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, častěji jsou účinné oba enantiomery, ale jeden je aktivnější než druhý.
2. 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
3. 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 může mít i (R)-enantiomer.
4. 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) přípravek proti kašli.
5. 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 vysokou hodnotu, pak je účelné se při syntéze léčiva zaměřit na možnosti získání pouze účinnějšího enantiomeru, eutomeru, aby organismus pacienta nebyl zbytečně zatěžován neúčinnou nebo méně účinnou látkou. Neplatí to však obecně. Např. u antidepresiva fluoxetinu je 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.

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 (*S*)-enantiomerem, esomeprazolem. K takové „chirální záměně“ (chiral switch) někdy dochází v době, kdy končí patentová ochrana racemátu. Důvodem přitom nebývají jen lepší terapeutické vlastnosti čistého enantiomeru, ale často jen snaha o prodloužení patentové ochrany léčiva a znevýhodnění generické konkurence.

Produktem 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. Moderní přístroje umožňující měření optické otáčivosti při různých vlnových délkách, popř. měření optické rotační disperze a cirkulárního dichroismu, sice dovolují zvýšit přesnost zjištění enantiomerní čistoty látky, přednost však dostaly spíše separační techniky, jako je plynová a vysoce účinná kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza a kapilární elektrochromatografie na chirálních chromatografických fázích. Těch je nyní na trhu kolem stovky. Jsou to sorbenty jako je silikagel nebo inertní organické polymery s navázanými „chirálními selektory“, kterými jsou aryl-deriváty 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 zdlouhavé úpravě vzorku, při níž může racemizace nebo kinetická rezoluce zhoršovat přesnost a správnost stanovení.

Chirální chromatografické separace lze využívat jak při analýzách, tak 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. Připravují se modifikací přirozených chirálních biopolymerů (triacylcelulosa, sesítěný albumin) nebo impregnací silikagelu vhodnou enantiomerní látkou, jakou je např. kyselina vinná, popř. navázáním aryl-derivátů aminokyselin amidickou vazbou na aminopropylovaný silikagel (Pirkleovy fáze).

Někdy je možné výsledky chirální separace převést z analytického do preparativního měřítka prostým použitím větších preparativních kolon a technik zvyšujících jejich výkonnost, jako jsou metody simulující pohyb náplně kolony (simulated moving bed).

Obecně jsou však chromatografické separační techniky vhodné spíše pro **analytickou kontrolu** jiných postupů rezoluce, které obvykle jsou pro výrobu chirálních léčiv ekonomicky výhodnější.

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 použijí některé chirální přirozené (např. alkaloidy) nebo (bio)syntetické aminy, z základních racemátů lze připravovat diastereomerní soli chirálních kyselin jako je kyselina vinná a její O-acyl-deriváty (nejčastěji kys. dibenzoylvinná), jablečná, mandlová, kafsulfonová, v poslední době se podobnému dělení používá kyselina 1,1'-dinaftyl-2,2'-fosforečná. Jestliže racemát neobsahuje kyselé ani bazické skupiny, pak musí být pro dělení modifikován, např. reakcí racemických alkoholů s chloridem kyseliny kafsulfonové lze připravit diastereomerní estery, které lze opět dělit krystalizací. Po rozdělení se navázaná skupina odštěpí.

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 ze směsi vylučuje rychleji než druhý, čehož lze využít k dělení racemátů tzv. **kinetickou rezolucí**.

Podá-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 až 100% výtěžek produktu s požadovanou konfigurací.

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

Např. D-fenylglycin, výchozí látka pro parciální syntézu ampicillinu, se připravuje působením aminopeptidasy na racemický fenylglycinamid. Enzym přitom katalyzuje pouze hydrolýzu L-enantiomeru, takže vznikne směs L-fenylglycinu a D-fenylglycinamidu, která se snadno rozdělí. Chemickou hydrolýzou 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.

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

Cyklodextriny a podobné látky mají v molekule dutiny, do nichž může být uzavřen pouze jeden enantiomer produktu. Vznikající inkluzní komplex pak může být oddělen od druhého enantiomeru, např. krystalizací. Je-li cyklodextrin navázán na nerozpustný nosič, může být druhý enantiomer oddělen chromatograficky nebo i pouhou filtrací při vsádkovém provedení.

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 resoluci 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 někdy být postupy **asymetrické** neboli **enantioselektivní syntézy**, při nichž přímo v reakční směsi vzniká určitý enantiomer chirálního produktu. K vnášení chirálního centra do achirálních molekul lze využít pestrou škálu chirálních činidel a pomocných chirálních látek.

Aby asymetrická syntéza úspěšně proběhla, musí být v reakčním systému přítomen určitý element přinášející chirální informaci – chirální musí být buď výchozí látka nebo reakční činidlo, popř. se použije chirální katalyzátor. To je zvláště výhodné, protože katalyzátoru se na rozdíl od chirálního činidla může použít jen relativně malé množství. Vzhledem k vysokým cenám chirálních katalyzátorů mohou 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 je někdy nazýván enantiomerní přebytek (v reakčních schématech označovaný jako e.e., enantiomeric excess). Je to poměr mezi naměřenou otáčivostí produktu reakce a hodnotou otáčivosti čistého enantiomeru. Hodnota optického výtěžku odráží poměr obou enantiomerů v produktu reakce. Např. e.e. 40% znamená, že ve směsi je 40% čistého enantiomeru, zbývajících 60% je racemát nevykazující žádnou optickou aktivitu, tj. směs 30% *S*- a 30% *R*- formy. V produktu reakce proto přitom je 70% jednoho enantiomeru a 30% druhého. V ideálním případě by e.e. měl být vyšší než 98%, což odpovídá obsahu čistého enantiomeru v produktu nad 99%. V praxi se však při asymetrické syntéze tak vysoké enantioselektivity obvykle nedosahuje a je nutná další purifikace produktu.

Řadu chirálních produktů lze připravit modifikacemi vhodných výchozích chirálních látek.

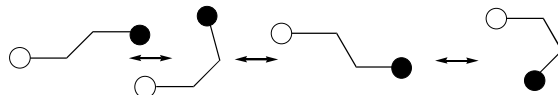
Takovými výchozími látkami mohou být přirozené aminokyseliny, cukry nebo jiné přírodní látky. Nevýhodou je, že se přitom někdy syntéza prodlouží o několik reakčních kroků a že musí být při syntéze vyloučeny faktory, které by mohly být příčinou racemizace (zahřívání na vyšší teploty, přítomnost silných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

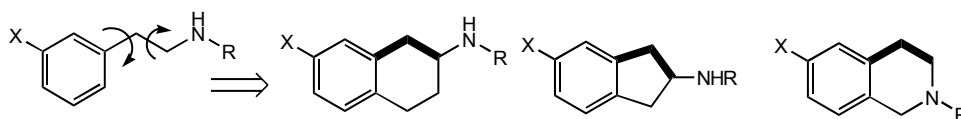
Je-li molekula látky příliš rigidní, pak její skupiny nemusí zaujmout přesně tu konformaci, která je pro interakci s cílovou strukturou nejvýhodnější. Nevýhodná však může být i příliš vysoká flexibilita molekuly, tj. přítomnost velkého počtu jednoduchých vazeb, kolem nichž mohou funkční skupiny volně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



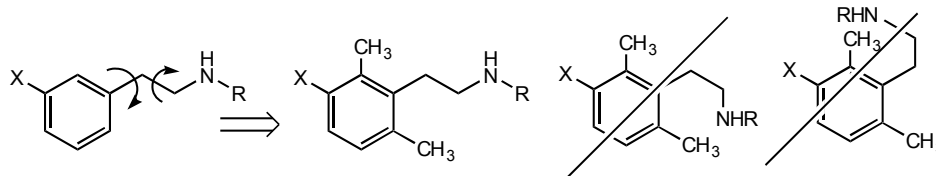
Fixováním aktivní konformace příliš flexibilní molekuly, tj. omezením volné rotace skupin, je proto možné zvýšit biologickou účinnost látky.

Aktivní konformaci lze fixovat:

- zavedením cyklických struktur do molekuly, např.:



- náhradou jednoduché vazby mezi ve flexibilním uhlíkatém řetězci molekuly rigidní skupinou, např. dvojnou nebo trojnou vazbou, aromatickým kruhem, amidovou skupinou apod.
- zavedením substituentů, které stericky brání molekule, aby zaujala určitou konformaci. Např. ve výše uvedeném příkladu lze fixovat požadovanou konformaci nejen vytvořením připojeného cyklu, ale i zavedením methylskupin do o-polohy, které pak omezují volnou rotaci flexibilního bočního řetězce:



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?