

Návrh léčiva

Fáze **návrhu léčiva** zahrnuje systematickou práci při přípravě analog vodítka a jejich testování. Přitom se hledají takové modifikace „vodítka“, které poskytují produkty se zvýšeným požadovaným účinkem a potlačenými vedlejšími účinky (toxicitou) a zlepšenými farmakokinetickými, fyzikálními a chemickými parametry.

Vedle nejlepších hitů screeningu, může být vodítkem pro návrh nového léčiva již používané léčivo, k němuž má být připraven analog s vyšší účinností, nižšími vedlejšími účinky, s jinými výhodnými vlastnostmi nebo jen látka se stejnou účinností, která zatím není patentově chráněná. Vodítkem mohou být i léčiva se zajímavými vedlejšími účinky. Ty se pak dalšími modifikacemi posilují a naopak se potlačuje původní hlavní účinek. Někdy také může být "vodítkem" látka s opačným účinkem, než má mít vyvíjené léčivo, např. při vývoji antagonistů určitého receptoru nebo inhibitorů enzymů může být vodítkem struktura příslušného přirozeného agonisty nebo substrátu.

Látky vybrané screenigem *in vitro* často nemívají charakter léčiva (druggability, drug-like character) a nemohou proto být používány v terapii.

Nežádoucími charakteristikami látek je např. nerozpustnost ve vodném prostředí biologických tekutin, nedostatečná biologická dostupnost vyplývající ze špatného průniku přes buněčné membrány, nestálost v kyselém prostředí žaludku, příliš rychlé nebo naopak příliš pomalé odbourání jaterními enzymy apod. Nevhodné vlastnosti lze někdy překonat způsobem podání léčiva (např. injekčním podáním lze řešit problém špatného vstřebávání léčiva a/nebo jeho rozklad v žaludku a střevech) nebo vhodnou úpravou formy léčiva („enterosolventní“ potah tablet a kapslí, který odolává kyselému prostředí v žaludku, ale v mírně alkalickém prostředí ve střevech se rozpouští). Způsobem podání léčiva a úpravami lékové formy nelze však vyřešit všechny problémy.

Základní způsob, jak zlepšit charakteristiky a připravit použitelné léčivo, představují **chemické modifikace vodítkové látky**. V minulosti přitom museli chemici pracně syntetizovat stovky sloučenin s různě obměňovanou strukturou, u nichž pak byla zjišťována biologická účinnost. Mnoho látek přitom bylo připraveno zbytečně, protože jejich terapeutické vlastnosti se zhoršily. Dnes lze k modifikacím vodítkové struktury s cílem připravit budoucí léčivo s optimálními vlastnostmi přistupovat racionálně s využitím stále se prohlubujících znalostí **kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou účinností látek** (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR).

QSAR spolu s využitím možností výpočetní techniky umožňuje snížit počet látek, které je třeba syntetizovat a ověřovat jejich účinnost a tím i snížit časovou i finanční náročnost výzkumu a vývoje léčiva. Počítač s vloženými údaji navrhne pomocí software pro CADD – tj. počítači podporovaný návrh léčiva (Computer Aided Drug Design) – navrhne pomocí algoritmů založených na znalosti kvantitativních vztahů mezi strukturou látek a jejich biologickou aktivitou (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationship) strukturu několika látek, které pak syntetik připraví. Při biologickém testování se pak prověří správnost počítačového modelu. Ten se pak doladuje, aby další návrh vyprodukovaný počítačem poskytl látky s ještě lepšími vlastnostmi.

Kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou účinností

Schopnost molekuly léčiva účastnit se interakcí s biomakromolekulárními strukturami organismu je určena její strukturou. To jinak vyjádřeno znamená, že bezpečnost a účinnost léčiva je funkcí jeho chemické struktury. Studium kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou účinností látek (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) umožňuje zjistit, jak a jaké fyzikálně chemické vlastnosti molekul ovlivňují biologickou účinnost látek. Cílem tohoto studia je vypracovat algoritmy, které by byly použitelné pro předpověď biologické účinnosti různých sloučenin a využít je k návrhu látek s optimálními terapeutickými vlastnostmi. Terapeutické účinky látek nejsou ale určovány jen schopností látky interagovat s určitými cílovými strukturami v organismu, ale i schopností k této cílové struktuře proniknout a po potřebnou dobu na ni působit v dostatečné koncentraci, tedy nejen farmakodynamickými, ale i farmakokinetickými parametry.

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

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

Již v r. 1863 zjistil A.F.A. Crois, že toxicita vyšších alkoholů roste s tím, jak se snižuje jejich rozpustnost ve vodě, v r. 1869 podobně zjistil Richardson, že hypnotické účinky alkoholů rostou s velikostí molekuly, ale jen do určité míry a že maxima dosahují pro C₆-C₈. Závislost toxicity organických látek na jejich hydrofobním charakteru byla obecněji potvrzena v 90. letech 19. století Meyerem a Overtonem. Význam hydrofobity pro biologickou účinnost byl později dokumentován výsledky řady dalších studií.

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

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

Vztah mezi biologickou účinností a hydrofobitou látky je dán rovnicí:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Např. $\log P_H$ benzenu má hodnotu 2,13 a π konstanty pro fluor +0,14, chlor +0,71, brom +0,86, hydroxyl -0,67, methoxyl -0,02, -CONH₂ -1,49, methyl 0,52, t-butyl 1,68. Pomocí těchto hodnot pak lze snadno vypočítat logaritmus rozdělovací konstanty pro různé deriváty, např. 2,97 pro p-bromanisol nebo 1,35 pro m-chlorbenzamid.

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

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

Rozdělovací koeficient P je hodnotou jednoznačně charakterizující rozdělení **neionizované** látky mezi vodnou a organickou fází.

Pro získání správné hodnoty P je proto třeba nastavit při měření rozdělovacího koeficientu pH vodné fáze pufrem na hodnotu, při níž v roztoku převažuje neionizovaná forma.

U látek s **charakterem kyselin nebo bází**, které mohou disociovat, **závisí rozdělení na stupni disociace**, tedy na hodnotě pH prostředí. U kyselin a bází se proto používá k charakterizaci hydrofobity **distribuční koeficient** (distribution coefficient) D , který vyjadřuje při rozdělení ve dvoufázovém systému poměr koncentrací všech forem látky v obou fázích, tedy ionizovaných i neionizovaných molekul.

Závislost D resp. $\log D$ na pH vyjadřují tyto vztahy:

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

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

Pro kyseliny nebo báze, které jsou v daném prostředí převážně disociované ($pH - pK_a$ u kyselin, resp. $pK_a - pH$ u bází >1)

pak přibližně platí

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

resp.

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

a pro látky převážně nedisociované

$$\log D \approx \log P$$

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

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

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

Schopnost molekul léčiva pronikat do buněk je sice důležitým parametrem, ale biologická účinnost léčiv nezávisí jen na ní, ale zejména na interakcích léčiva s cílovou strukturou. Sílu těchto interakcí určují mimo jiné i **elektronické vlivy substituentů** v molekule léčiva.

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

Jestliže molekula léčiva obsahuje skupiny, které také mohou disociovat, pak stupeň disociace (= obsah ionizovaných skupin) ovlivňuje jeho interakce s aktivním centrem cílové struktury. Síla iontových interakcí při daném pH prostředí závisí na hodnotě pK_a . Tu ovlivňují svými elektronickými efekty další substituenty v molekule.

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

Elektronické efekty substituentů mají však vliv i na proton-donorový nebo proton-akceptorový charakter substituentů, na němž závisí síla vodíkových vazeb. Mírou elektronických vlivů substituentů na vlastnosti látky s aromatickým charakterem jsou **Hammettovy konstanty σ** .

Hammettovy konstanty byly odvozeny na základě porovnání disociačních konstant nesubstituované kyseliny benzoové a jejich substituovaných derivátů. Substituenty přitahující elektrony (např. nitroskupina nebo atom halogenu) disociaci zvyšují, jejich konstanty σ mají proto kladnou hodnotu. Substituenty, které naopak mají elektrondonorový charakter (např. alkylskupiny) disociaci potlačují a mají hodnoty σ záporné. Hodnoty Hammettových konstant neodráží jen indukční charakter substituentů, ale i rezonanční efekty, závisí proto i na poloze substituentu – jiné jsou pro substituenty v poloze *para*, jiné pro polohu *meta*.

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

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

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

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

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

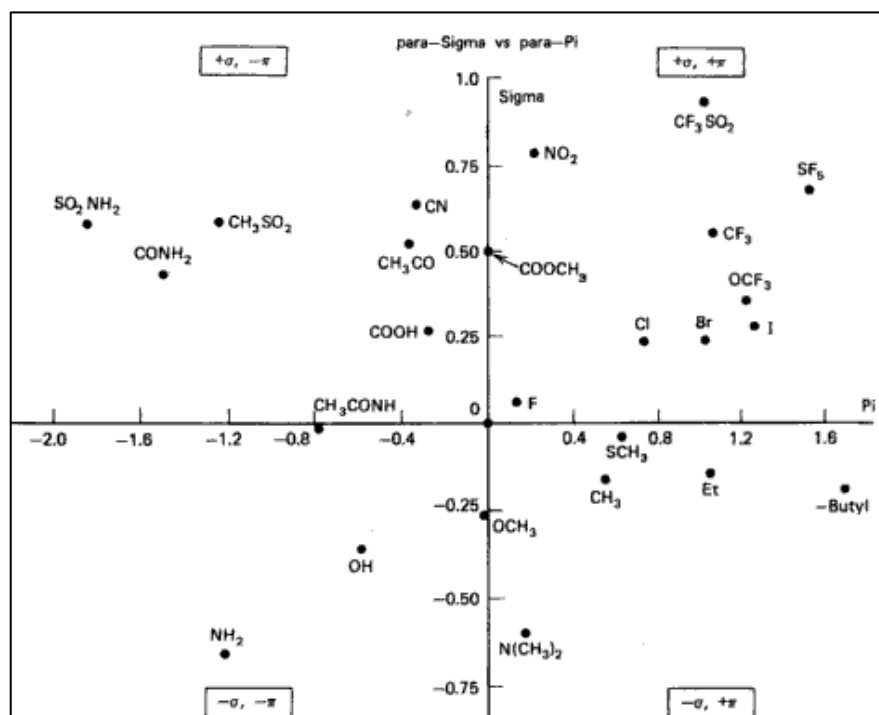
Objemné substituenty mohou snižovat biologickou účinnost tím, že brání molekule léčiva, aby správně „zapadla“ do vazebného místa své cílové struktury. V jiných případech však substituenty mohou stericky fixovat právě tu konformaci, která je pro interakci s cílovou strukturou nezbytná. K vyjádření sterických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

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

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

Z Hanschovy rovnice vyplývá, že vyšší biologickou účinnost mají ty látky, které se mohou lépe pronikat do buněk a tam se účinně vázat na cílovou strukturu díky svému sterickému uspořádání a přítomnosti funkčních skupin schopných interakcí s funkčními skupinami cílové struktury. Uplatnění korelačních vztahů mezi strukturou a účinností usnadňuje vyhledávání, navrhování a dopracování struktury „hitů“ screeningu na léčivo s dobrými farmakodynamickými a farmakokinetickými vlastnostmi, tedy s vyšší účinností *in vivo*.

Konstanty $k_1 - k_6$ se odvozují z údajů o aktivitě známých látek. Na výběru těchto látek pak závisí správnost předpovědi. Výběr usnadňuje pomůcka sestavená Craigem. Ten vynesl do grafu hodnoty σ a π pro různé substituenty. Osy x a y dělí substituenty podle hodnot σ a π do 4 kvadrantů ($+\sigma+\pi$, $+\sigma-\pi$, $-\sigma+\pi$, $-\sigma-\pi$). Připravili-li se látky se substituenty z jediného kvadrantu (např. Cl, Br, I, CF_3 a NO_2 , všechny s hodnotami $+\sigma+\pi$), bude pravděpodobně předpověď dosti špatná. Ke zjištění konstant Hanschovy rovnice by proto měly být použity látky pokud možná se substituenty, jejichž hodnoty patří do každého ze čtyř kvadrantů, např. CF_3 ($+\sigma+\pi$), Et ($-\sigma+\pi$), CN ($-\sigma+\pi$) a OH ($-\sigma-\pi$).



Rozdělení substituentů do kvadrantů podle Craiga

Korelace mezi strukturou a aktivitou byly dále zlepšovány rozšířením Hanschovy rovnice o další fyzikálně chemické parametry. Další zlepšení předpovědí přineslo modelování metabolismu léčiva i jeho interakcí léčiva s plasmatickými bílkovinami, na čemž závisí koncentrace volného léčiva v krevním oběhu a cílových tkáních. Největším přínosem ale bylo trojrozměrné počítačové modelování interakcí léčiva s cílovou strukturou umožněné jednak výkonnějšími počítači a sofistikovanějším software, jednak prohlubujícími se znalostmi o prostorové struktuře různých cílových biomakromolekul.

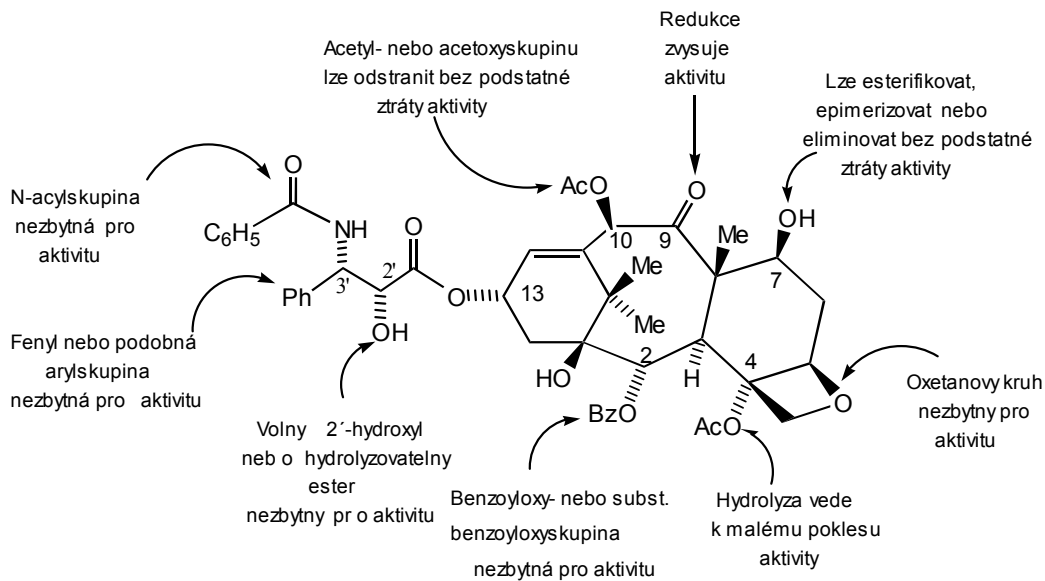
Do r. 2000 byly známy detailní prostorové struktury 460 enzymů, na konci roku 2003 to bylo už 1.900 struktur a tento počet dále roste. Z rentgenostrukturních nebo NMR měření jsou k dispozici nejen informace o struktuře samotných cílových biomakromolekul, ale stále častěji i o jejich komplexech s určitými léčivy. Problémem ale zůstává, že dosavadní výsledky popisují hlavně interakce za stacionárního stavu, zatímco reálné systémy se vyznačují velkou dynamičností. Rychle se zvyšující výkonnost počítačů dovoluje, aby do výpočtů bylo zahrnuto podstatně více parametrů než doposud. Postupně lze dokonce provádět výpočty interakcí protein-ligand *ab initio*. Navržena byla řada nových metod modelování vztahů mezi strukturou a účinností, které využívají k popisu vlastností látek různé další funkce a deskriptory, např. srovnávací analýza molekulových polí (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA), srovnávací analýza indexů podobnosti molekul (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis, CoMSIA), analýza vlastních hodnot (Eigenvalue Analysis, EVA) aj.

Ani ty nejlepší modely však zatím neposkytují zcela spolehlivé výsledky. V literatuře lze nalézt řadu příkladů léčiv, kdy predikce účinnosti pomocí výpočtů byla velmi úspěšná, ale i případy, kdy se naopak ukázalo, že léčivo má vlastnosti zcela odlišné.

Nepřesné jsou zejména predikce vlastností látek, jejichž struktura se dosti liší od souboru použitého k návrhu počítačového modelu. I když se výsledky neustále zlepšují, zatím stále ještě nemohou počítači podporované návrhy nových léčiv (CADD – Computer-Aided Drug Design) plně nahradit experimenty a experimentátory. Navzdory všem problémům, nepřesnostem výpočtů a nespolehlivosti predikcí se však počítačové modelování vztahů mezi strukturou a aktivitou stalo nezbytnou pomůckou pro zlepšení efektivnosti výzkumu a vývoje léčiv. Podle některých odhadů poradenských firem může v současné době uspořít počítačové modelování v krátkodobé perspektivě asi 10% nákladů na výzkum a vývoj léčiv.

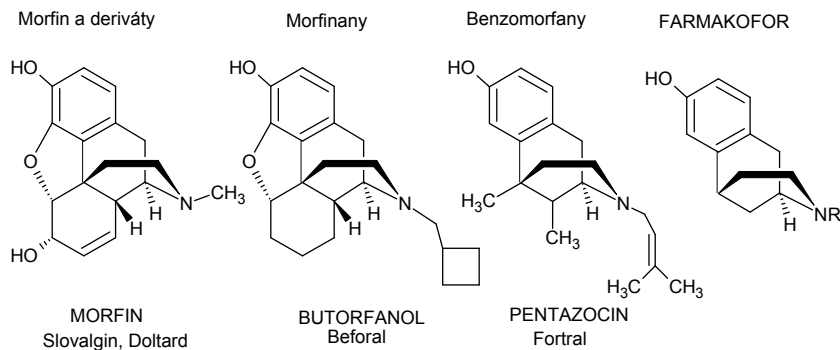
Studium vztahů mezi strukturou a aktivitou při vývoji léčiva začíná modifikacemi nebo záměnou funkčních skupin molekuly vodítkové látky a sledováním, jak se tyto změny projeví na účinku. Tím se zjistí, které funkční skupiny ovlivňují účinnost (tj. interakci s cílovou strukturou), jakým způsobem, zda pozitivně nebo negativně a v jaké míře.

Tento přístup je velmi starý, v podstatě již byl využit při přípravě aspirinu z kyseliny salicylové. Jeho nevýhodou je, že počet vhodných funkčních skupin látky je omezený a že u přírodních produktů mohou být mnohá analoga jen velmi obtížně dostupná. Přesto se však daří potřebné informace o vztahu mezi strukturou a aktivitou získávat. Tak např. studiem vlastností analog protinádorového léčiva paklitaxelu bylo zjištěno, které skupiny a struktury jsou nezbytné, mají-li být zachovány léčebné účinky (podle Kingston D.G.I., *Trends in Biotechnol.*, **1994**, 12, 222-227):



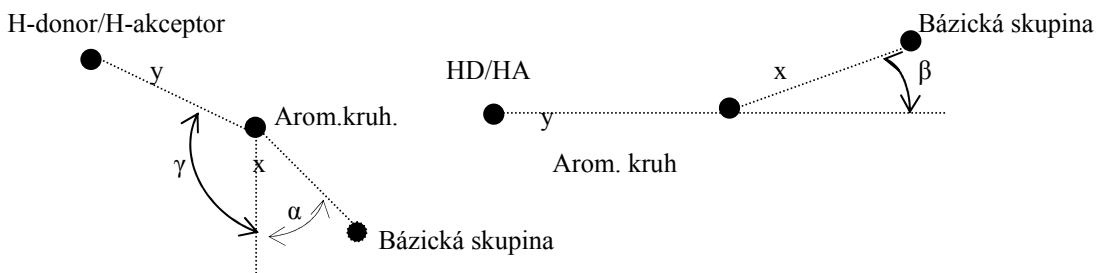
Souhrn požadovaných strukturních charakteristik molekuly léčiva nezbytných pro účinnost se nazývá **farmakofor**, strukturním rysem, které účinnost neovlivňují, se říká **auxofor**.

Farmakofor lze odvodit kromě zmíněného studia účinnosti různých speciálně připravovaných analog i porovnáním struktur známých léčiv se stejným mechanismem účinku. Tak např. struktura farmakoforu opiátových analgetik vyplynula z porovnání struktur morfinu, morfinanů a benzomorfonů:



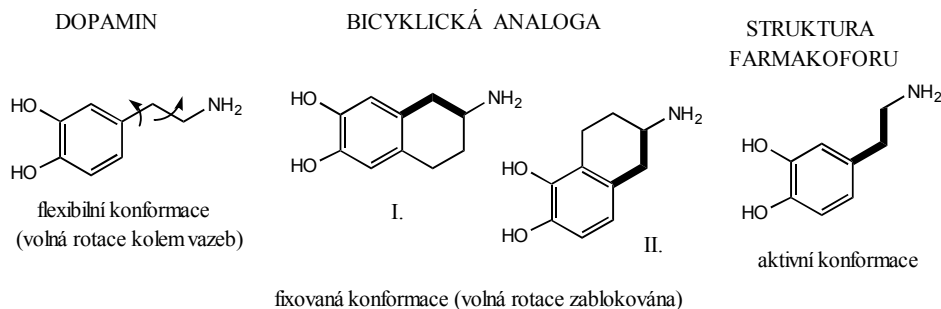
Pro farmakofor je důležitý především **charakter jeho funkčních skupin** - zda jsou schopné ionizace (aminodusík, karboxylová skupina apod.), zda při vytváření vodíkových můstků mají donorový nebo akceptorový charakter (některé skupiny, např. -OH, přitom mohou být jak donorem, tak i akceptorem vodíku, kyslík -CO- pouze akceptorem) nebo jsou hydrofobní. Neméně důležité je i **prostorové rozmístění funkčních skupin**.

Např. u opiátových analgetik určuje strukturu farmakoforu také vzdálenost aminodusíku od středu aromatického kruhu a úhly, které svírá spojnice atomu a středu kruhu s osou nebo rovinou aromatického cyklu.



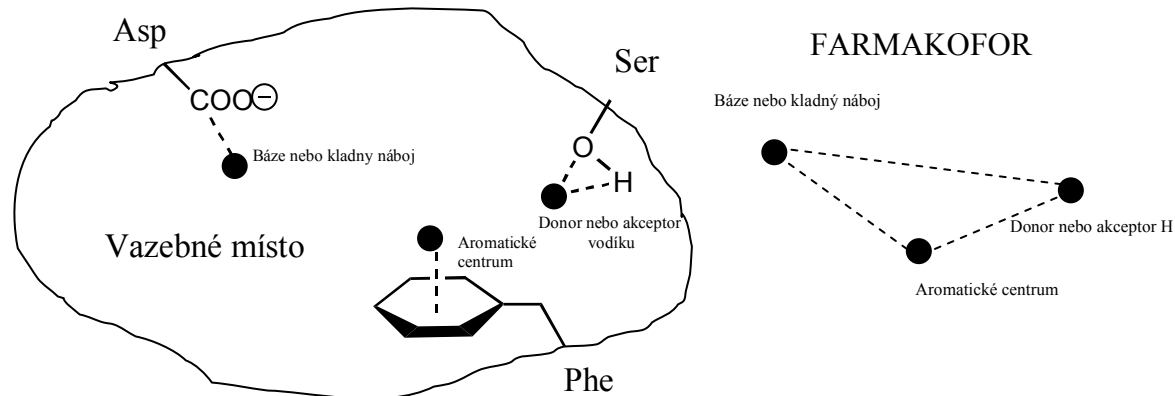
Kromě sterického uspořádání určuje biologickou účinnost i **konformační flexibilita molekuly**.

Konformace látky, která nejlépe odpovídá vazebnému místu cílové struktury, nemusí být nejstabilnější konformací. V takovém případě je třeba dodat látce určitou energii, aby místo stabilní konformace zaujala konformaci nejučinnější, kdy molekula látky nejlépe zapadne do aktivního místa cílové struktury. To se pak projeví jistým snížením afinity léčiva a tím i jeho účinnosti. Někdy proto může být účelné fixovat aktivní konformaci molekuly, např. přípravou některých cyklických derivátů, zavedením substituentů bránících volné rotaci vazeb apod. Příkladem může být účinnost látek I a II odvozených od dopaminu. Při biologickém testování se ukázalo se, že látka II je účinná, látka I nikoliv. Aktivní konformace farmakoforu je proto odvozena od struktury II.:



K definování farmakoforu lze dospět nejen na základě znalosti vztahů mezi strukturou a účinností. Je-li známo prostorové uspořádání vazebného místa cílové struktury, pak farmakofor lze definovat jako jeho "negativ". Správnost navrženého farmakoforu se pak může ověřit porovnáním struktury a účinnosti látek, které se mohou vázat na aktivní místo cílové struktury.

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



Před několika lety se zdálo, že koncept farmakoforu již zastaral. V poslední době však prožívá svoji renesanci, protože počítačové modelování umožňuje snáze definovat struktury farmakoforu v trojrozměrném prostoru a jejich znalost pak využít při návrhu nových léčiv. Přitom se využívají dva základní přístupy.

První je přístup, kdy se farmakofor odvodí z výsledků výše zmíněného studia interakcí cílové struktury s různými ligandy, kterými mohou být nově syntetizované látky nebo i již známá léčiva. Přístup se nazývá **na ligandech založený návrh léčiva** (ligand-based drug design). Prudce se rozvíjející disciplíny molekulární biologie, genomika a proteomika, umožnily i druhý přístup. Ten se opírá o identifikaci nových cílových biomakromolekul, které biochemici dovedou izolovat a fyzikální chemici pak umí z jejich krystalografických dat nebo NMR spekter odvodit prostorové charakteristiky jejich aktivního místa. Ty se pak využijí k definování komplementární prostorové stavby farmakoforu. Přirozené nebo syntetické ligandy s charakterem agonistů nebo antagonistů receptorů a inhibitorů nebo aktivátorů enzymů přitom nemusí ani být známy. Tento druhý přístup je nazýván **na struktuře založený návrh léčiva** (structure-based drug design).

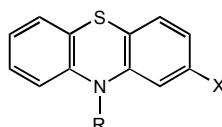
Po definování farmakoforu pak lze navrhovat, připravovat a testovat látky, které nesou s ním shodné strukturální rysy.

Takové látky lze nalézt i při prohledávání databází známých sloučenin. Využití farmakoforu obecně definovaného s pomocí počítačových modelů může na rozdíl od starších přístupů založených na obměňování funkčních skupin vést k tomu, že se najdou látky, které jsou sice chemicky značně odlišné, ale přesto mohou s určitou cílovou strukturou interagovat podobným způsobem. Potvrdí-li pak experiment účinnost těchto látek, mohou se stát vodítkem pro vývoj nových léčiv. Strukturální charakteristiky farmakoforu lze využívat i při objevech léčiv založených na již zmíněném kombinování fragmentů nebo při odhalování nových léčebných účinků známých léčiv.

Optimalizace farmakodynamických a farmakokinetických parametrů léčiva – zásady praktického přístupu

Po nalezení vodítka a zjištění, jaké strukturální charakteristiky musí látka mít, aby měla požadované účinky, je dalším úkolem farmakochemiků navrhnout nebo provést takové modifikace molekuly, aby byla zvýšena účinnost látky a současně eliminovány nebo alespoň zmírněny nežádoucí vlastnosti.

Strukturální modifikace molekuly je třeba provádět opatrně, protože někdy i při zdánlivě malých změnách struktury se může zcela výrazně změnit účinnost, protože různě obměněná molekula může odlišně interagovat s různými cílovými strukturami. Příkladem mohou být různě substituované 10-aminoalkylfenothiaziny:



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

Při obměnách vodítka bývají nejprve optimalizovány farmakodynamické charakteristiky látky. Při návrhu **analog vodítkové molekuly** musí být zachovány strukturální charakteristiky potřebné pro účinnost. Pokud není znám farmakofor, pak se při studiu vztahů mezi strukturou a účinností u prvních sérií připravených látek zjišťuje, které skupiny nebo místa molekuly nelze nebo naopak lze pozměnit bez ztráty základního účinku, tj. zda jsou součástí farmakoforu nebo auxoforu.

K modifikaci struktury vodítka se využívají běžné reakce, jako je esterifikace alifatických alkoholů a fenolů, vznik etherů, alkylace a acylace aminů, esterifikace karboxylových kyselin nebo naopak zmydelnění esterů, redukce dvojných a trojných vazeb, ketonů, esterů, substituce funkčních skupin apod. Někdy je třeba před modifikací molekuly určité funkční skupiny chránit a po provedení modifikační reakce chránicí skupiny odštěpit.

Totální syntéza přirozených látek a jejich analog bývá obtížná, protože tyto látky mohou mít několik center chiralit a na jejich konfiguraci závisí účinnost. Je-li vodítkem přirozená látka, bývá proto optimálním způsobem přípravy analog parciální syntéza, tj. modifikace základní struktury izolovaného produktu chemickými reakcemi. Takto byly např. připraveny prakticky použitelné deriváty protinádorového alkaloidu kamptothecinu, který sám má nepříjemnou toxicitu.

Kromě syntézy se při přípravě analog mohou využívat i biotransformace - přeměna látek pomocí mikroorganismů nebo enzymů. Např. penicilin G se připravuje tak, že se při výrobě do fermentačního média přidává kyselina fenyloctová, pokud se ta nahradí kyselinou fenoxoctovou, je produkován penicilin V. Ampicillin se připravuje z přirozených penicilinů odštěpením acylskupiny působením enzymu penicilinaacylasy a acylací volné aminoskupiny v poloze 6 β -laktamového kruhu D-fenylglycinem, podobně se mohou připravovat další polosyntetické peniciliny. Na rozdíl od chemické hydrolyzy není při hydrolyze katalyzované enzymy stěpen β -laktamový kruh antibiotika, jehož přítomnost v molekule je nezbytná pro antimikrobiální účinnost.

V minulosti představovaly modifikace vodítkové struktury provádění obrovského množství rutinních syntéz stovek příbuzných derivátů. Nyní lze část laboratorní práce při optimalizaci struktury léčiva nahradit počítačovým modelováním s využitím znalostí vztahů mezi strukturou a účinností. Syntetizují se pak jen nejslibnější deriváty.

Při chemických modifikacích látek záměnou jejich funkčních skupin je třeba brát v úvahu:

- **Místo v molekule**, kde modifikace může být provedena.

Měnit nelze ty funkční skupiny, které jsou nezbytnou součástí farmakoforu. Zavedení nových nebo záměna dosavadních funkčních skupin v určitých místech molekuly může negativně ovlivnit interakce léčiva s cílovou strukturou.

• Polohu funkčních skupin

Požadovanou nebo i nežádoucí účinnost může ovlivnit změna polohy funkčních skupin podílejících se na interakci s cílovou strukturou. Přitom se mohou zkracovat nebo prodlužovat alifatické řetězce, na nichž jsou skupiny navázány. Jsou-li skupiny vázány na cyklický systém, dochází ke změnám jejich polohy při kontrakci nebo naopak rozšíření kruhu, jindy je možné dosáhnout lepšího přizpůsobení molekuly léčiva prostorové stavbě cílové struktury změnou pozice funkčních skupin. Skelet molekuly se přitom nemění, interagující skupiny se jen buď vzájemně přiblíží, nebo naopak oddálí. Polohu funkčních skupin lze ovlivnit i již zmíněnou fixací aktivní konformace.

• Typ zaváděné skupiny nebo modifikace.

Zavedením polárních skupin jako je hydroxylová, aminová, amidová nebo karboxylová skupina do molekuly lze zvýšit rozpustnost látky ve vodě. Velmi silně polární skupiny, jako je sulfonová, fosfátová nebo fosfonátová skupina, sice zvyšují rozpustnost ve vodě nejvíce, avšak jejich přítomnost může bránit průniku molekuly léčiva přes buněčné membrány. Málo polární skupiny (halogen, etherová, esterová, aldehydická a ketonická skupina) rozpustnost ve vodě významněji neovlivňují, mohou však zlepšit penetraci molekuly přes lipidickou dvojvrstvu buněčných membrán. Rozpustnost ve vodě lze zvýšit také narušením planarity molekuly (zamezení π - π interakcí) a zvýšením její flexibility. Při těchto všech modifikacích je třeba mít na paměti, že změny polarit, planarity apod. sice zlepšují parametry rozpustnosti, ale přitom současně mohou více či méně narušit interakce molekuly léčiva s cílovou strukturou. Záměna nebo zavedení nových funkčních skupin mění rozložení elektronů v molekule, což se může projevit zesílením nebo zeslabením iontových a dipólových interakcí látky s cílovou strukturou, zesílením nebo zeslabením vodíkových vazeb a tím i změnami účinnosti. V případě hydrofobních interakcí lze modulovat aktivitu změnou velikosti hydrofobních skupin léčiva. Je-li hydrofobní vazebné místo cílové struktury velké, může záměna methylové skupiny za ethylovou, isopropylovou nebo *tert.*-butylovou vést ke zvýšení aktivity, protože objemnější substituent vyplní aktivní místo lépe než methylskupina. Podobně mohou být posíleny vazebné interakce aromatického systému přípravou analog obsahujících kondenzované aromatické kruhy. Na druhé straně účinnost se často snižuje při rozvětvení alifatického řetězce nebo záměně primární aminoskupiny za sekundární nebo terciární, protože se přitom většinou zhoršují sterické podmínky pro interakci.

• Isosterii a bioisosterii skupin

V původním pojetí mají chemicky isosterní skupiny stejný počet atomů a na svém povrchu stejný počet elektronů, např. isosterní je CO a N₂. Ve farmakochemickém pojetí mají stejně elektronů, ale nemusí mít stejný počet atomů – např. isosterní jsou atomy chloru nebo fluoru, hydroxyl, primární aminoskupina a methylskupina nebo methylenová skupina sousedící s kyslíkovým můstkem v etherech nebo s –NH– skupinou v sekundárních aminech. Vzhledem k odlišnému chemickému charakteru nemívají takové isostery stejnou biologickou účinnost. Thymidin je substrátem thymidinkinasy, kterou je fosforylován. Analogický derivát, který má deoxyribofuranosu nahrazenou isosterním derivátem cyklopentantanu, není kinasou fosforylován, není však ani inhibítorem enzymu. Důvodem však není interakce kyslíku furanosového kruhu s aktivním místem enzymu, ale odlišná konformace cyklopentanonového kruhu. Bioisostery sice nemají stejný počet atomů ani povrchových elektronů jako původní skupina, mohou dokonce mít alifatický řetězec nahrazený kruhem apod., ale mají podobnou biologickou účinnost. Příklady bioisosterických skupin je velká řada: např. s karbonylovou skupinou je bioisosterní skupina sulfinylová a sulfoxylová, s karboxylem skupina amidofosfonová, 3-hydroxy-5-thiazolyl-, 5-tetrazolyl- nebo 3,5-difluor-4-hydroxy-fenylskupina, s hydroxylem hydroxymethyl- nebo ureidoskupina atd.

• Pořadí a způsob chemické modifikace

Obměnu funkčních skupin lze v zásadě provést v jakémkoliv kroku syntézy, pokud se však modifikace, při nichž může vznikat velké množství vedlejších látek a nečistot, provádí až v závěrečných stupních, nemusí být snadné připravit léčivo v dostatečné čistotě. Rovněž je třeba přihlížet k podmínkám modifikace a přítomnosti dalších reaktivních skupin v molekule, které je třeba blokovat zavedením vhodných chránících skupin.

• Stabilitu zaváděných skupin a vazeb.

Léčiva nesmí obsahovat skupiny s vysokou reaktivitou vůči vodě, např. anhydridy, které by v biologických tekutinách rychle hydrolyzovaly. Jiné vysoce reaktivní skupiny a atomy, jako jsou alkylhalogenidy, oxirany, thirany nebo aldehydy sice mohou hydrolyze odolávat, mohou však reagovat s nukleofiními skupinami bílkovin, sacharidů nebo nukleových kyselin a tím pozměnit jejich vlastnosti. Léčiva s takovými reaktivními skupinami se v terapii uplatňují jen v omezené míře, protože se vyznačují vysokou systémovou toxicitou. Obecně přitom platí, že čím jsou chemicky reaktivnější, tím méně selektivní je jejich účinek. Používají se proto hlavně při léčbě život ohrožujících onemocnění, jako je rakovina (alkylační cytostatika). Většina běžných léčiv vysoce reaktivní skupiny neobsahuje, takže se u nich dostává do popředí metabolická stabilita. Skupiny navázané esterovou, amidovou, glykosidickou, sulfo- a fosfoesterovou vazbou mohou být snadno rozštěpeny enzymy. Takto modifikovaná léčiva v organismu přecházejí na původní látku, jsou tedy jejich profarmaky. Skupiny vázané přímo na uhlíkový skelet léčiva vazbami C-C, C-O a C-N jsou naopak metabolicky stálé.

Účinnost navržených a připravených analog vodítka se testuje, nejprve *in vitro* na vhodných modelech. U vybraných látek se provádějí zkoušky *in vivo*, u pokusných zvířat. Přitom se může ukázat, že látky s nejvyšší účinností *in vitro* nemají vlastnosti, které by umožňovaly jejich použití v terapii.

I když se podaří připravit látky, které mohou optimálním způsobem interagovat s cílovou strukturou, nemusí to znamenat, že bylo nalezeno skutečně účinné léčivo. Sebelépe interagující látka nemůže být účinná, jestliže se ke své cílové struktuře nedostane v potřebné koncentraci.

Dalším úkolem chemiků vyvíjejících léčivo proto je provést takové změny struktury, aby látka měla při **optimálních farmakodynamických vlastnostech** také **dobré fyzikálně-chemické i farmakokinetické parametry**.

Interakcím látek s cílovou strukturou *in vivo* může bránit nedostatečná rozpustnost v biologických tekutinách. U špatně rozpustných látek nelze dosáhnout potřebnou plasmatickou koncentraci látky. Stejně nevhodný je i příliš polární, tedy nedostatečně lipofilní (hydrofobní), charakter látky, která neumožňuje průnik molekul potenciálního léčiva buněčnými membránami. Látky mohou být chemicky nestálé nebo mohou být příliš rychle eliminovány. Jejich koncentrace v tělních tekutinách i cílových tkáních pak může být i při vyvážené polaritě molekuly příliš nízká. Jiné látky mohou být metabolickými procesy odbourávány příliš pomalu, v tkáních se hromadit a přitom vykazovat příliš vysokou orgánovou toxicitu.

Optimalizace fyzikálně-chemických a farmakokinetických parametrů často zahrnuje **zvýšení rozpustnosti a chemické stability látky, úpravu metabolické stálosti a zlepšení biologické dostupnosti**. Ke zlepšení biologické dostupnosti může přispět přiměřené zvýšení hydrofobity molekul. Rozpustnost a biologickou dostupnost látek lze zlepšovat úpravami jejich polaritě a/nebo jejich acidobazického charakteru. Některé problémy špatné biologické dostupnosti lze také řešit přípravou **profarmak** (viz dále). Příprava profarmak může být využívána i při řešení problémů chemické a metabolické stability.

Nejdůležitějším rozpouštědlem pro léčiva jsou vodné systémy biologických tekutin. Rozpustnost léčiv v těchto systémech lze do jisté míry předpovědět s využitím počítačových modelů. Předpovědi ale zatím nejsou dostatečně přesné a obecně použitelné, takže experimentální měření je zatím nezbytné. Rozpustnost se obvykle vyjadřuje jako hmotnost (gramy) látky rozpouštěné buď ve 100 g (w/w) nebo 100 ml (w/v) rozpouštědla, ve druhém případě je však třeba počítat se změnami objemu rozpouštědla s teplotou. S teplotou se mění i rozpustnost. Ta se proto u léčiv obvykle měří jednak při teplotě místnosti (25°C), jednak při teplotě těla (37°C). Se vzrůstající teplotou rozpustnost roste, jsou však i výjimky. U omezeně rozpustných solí se rozpustnost snižuje v přítomnosti stejných iontů, jaké jsou obsaženy v soli. S tím je třeba počítat u perorálně podávaných chloridů bazických léčiv, protože v žaludku je vysoká koncentrace chloridových iontů z kyseliny chlorovodíkové.

U látek bazického nebo kyselého charakteru závisí rozpustnost na stupni ionizace. Ionizované formy jsou polárnější a tedy ve vodě rozpustnější než neionizovaná látka.

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

Stupeň ionizace určuje pH prostředí. Není-li možné zvýšit rozpustnost léčiva převedením na vhodnou sůl, která je při fyziologickém pH v dostatečné míře ionizována, přichází v úvahu navázání nových nebo obměna stávajících funkčních skupin molekuly léčiva chemickou modifikací.

Fyziologické hodnoty pH krve se pohybují kolem 7,4, v některých orgánech nebo při některých patologických stavech však mohou být odlišné – výrazně kyselé je např. prostředí žaludku (pH < 2).

Chemicky i metabolicky stabilní musí být zejména léčiva, která jsou podávána perorálně.

Perorálně podávaná léčiva musí nejprve odolat agresivnímu prostředí zažívacího traktu (silně kyselé prostředí žaludku, mírně alkalické prostředí ve střevech, přítomnost hydrolytických enzymů). Ze zažívacího traktu se pak léčivo dostává nejprve do jater, kde je vystaveno účinku metabolizujících enzymů a teprve pak přejde do krevního oběhu.

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

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

Metabolické přeměny probíhají na specifických místech molekuly léčiva. Navázání metabolicky stálé skupiny nebo atomu na takové místo metabolické transformace zastaví nebo alespoň zpomalí. V takovém případě hovoříme o **metabolické blokádě**.

K metabolické blokádě může dojít, když se např. v aromatickém, alicyklickém nebo alifatickém zbytku, který podléhá metabolické oxidaci na hydroxyderivát, nahradí vodík atomem fluoru nebo chloru. Zvláště výhodná je substituce fluorem, kdy se prakticky nemění velikost molekuly a tedy ani její schopnost interagovat s cílovou strukturou. Na rozdíl od dalších halogenů, fluor většinou nemůže být snadno substituován. Metabolickou oxidaci methylové skupiny na karboxyl může zablokovat její náhrada za fluor, chlor nebo i vodík.

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

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

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

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

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

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

Profarmaka

Jak bylo zmíněno, některé problémy způsobené špatnou biologickou dostupností a případně i jinými nevhodnými vlastnostmi lze řešit přípravou **profarmak** („proléčiv“, prodrug). Profarmaka jsou biologicky neúčinné nebo jen málo účinné látky, které jsou v organismu působením enzymů metabolicky aktivovány, tj. převedeny na účinnou látku.

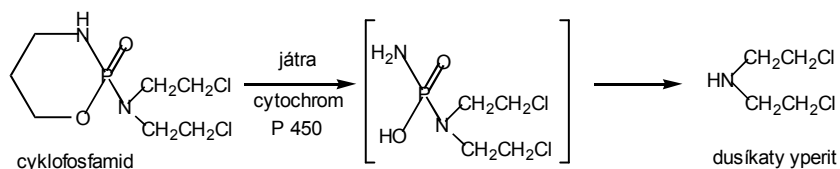
Profarmaka pomáhají překonávat problémy nevyhovující absorpce a distribuce, vysoké toxicity a jiných nežádoucích vedlejších účinků, příliš rychlé eliminace účinné látky, ale i nedostatečné rozpustnosti nebo stability, obtíží přípravy lékových forem a v neposlední řadě i malého komfortu pacienta (injekční podání, vysoká četnost podávání, apod.).

Profarmaka by měla splňovat tyto předpoklady.

- měla by mít vyšší biologickou dostupnost než samotná účinná látka
- účinná látka by z profarmaka měla vznikat požadovanou rychlostí
- odštěpené neaktivní složky molekuly by neměly být pro organismus toxické
- pokud možná by měla mít zvýšenou afinitu vůči cílovým tkáním nebo buňkám

Podle charakteru rozlišujeme **bioprekurzorová** a **transportní profarmaka** (carrier prodrugs), oba typy ale nejsou nijak ostře odlišené. **Bioprekurzorová profarmaka** jsou sloučeniny, které vznikají při modifikaci účinné látky jako takové. V organismu jsou převáděny na účinnou látku nejčastěji enzymatickou oxidací nebo redukcí.

Příkladem bioprekurzoru je např. první sulfonamid prontosil zmíněný v historickém úvodu, jehož účinným metabolitem je sulfanilamid. Jiným takovým profarmakem je protinádorové léčivo cyklofosfamid, které je oxidativním enzymatickým štěpením přeměněno na cytostaticky účinný dusíkatý yperit (který sám je velmi toxický).



Transportní profarmaka jsou připravována navázáním skupin, které usnadní účinné látky cestu z místa podání přes buněčné membrány k cílové struktuře.

Většinou jde o deriváty silně polárních léčiv se sníženou polaritou (estery, amidy apod.), které jsou na účinnou látku převáděny hydrolytickými procesy.

Speciálními typy profarmak jsou „**polymerní léčiva**“, konjugáty léčiv a syntetických nebo přírodních polymerů, jako jsou např. již zmíněná „**pegylovaná**“ léčiva. Mezi profarmaka lze řadit i „**směrovaná léčiva**“ (targeted drugs) připravovaná navázáním léčiva na protilátky. Někteří autoři řadí mezi profarmaka i konjugáty dvou léčiv a nazývají je **vzájemná profarmaka** (mutual prodrugs).

Při přípravě profarmak lze využít běžné chemické reakce probíhající na hydroxylových, aminových, karbonylových, karboxylových, popř. i fosfo- nebo sulfoskupinách.

Způsob a typ modifikace při přípravě profarmak je určen přítomností funkčních skupin v molekule výchozí účinné látky a specificitou hydrolytických enzymů cílové tkáně. Amidy se obecně štěpí pomaleji než estery, ale např. u amidů aminokyseliny může být rychlost enzymatického štěpení vyšší než u esterů. Příklady modifikací původních funkčních skupin léčiv jsou v tabulce:

Výchozí skupina	Modifikovaná skupina	Účinek	Výchozí skupina	Modifikovaná skupina	Účinek
-OH	-OCOAlkyl	acetylace, pivaloylace atd., zvýšení lipofility a stability vůči enzymům	-NH ₂	-NHCOAlkyl	zvýšení lipofility a stability vůči enzymům
	-OCOCH ₂ NR ₂ , estery lysinu	zvýšení rozpustnosti ve vodě, pK _a ~ 8		-NHCONH ₂ , -NHCOOR	lze snadno rozštěpit enzymy plasmu
	-OCH ₂ CH ₂ COO ⁻	zvýšení rozpustnosti ve vodě, pK _a ~ 5		Schiffovy báze	lipofilní, překonávají hematencefalickou bariéru
	-OPO ₃ ²⁻	zvýšení rozpustnosti ve vodě, pK _a ~ 2 a 6	-SO ₂ NH ₂	-SO ₂ NH-acyl	zvýšení rozpustnosti ve vodě tvorbou sodných solí
	-OCOCH ₂ SO ₃ ⁻	zvýšení rozpustnosti ve vodě, pK _a ~ 1	-COOH	-COOR	methyl-, ethylester, zvýšení lipofility
diol	diester, acetal, ketal	zvýšení lipofility	-CO-	imin, oxim, acetal (ketal), enolester, oxa- a thiazolidin	

Transportní profarmaka mohou být **dvoudílná** (bipartate) a **trojdílná** (tripartate). Dvoudílná profarmaka jsou tvořena účinnou látkou a na ní přímo navázanou transportní skupinou. Trojdílná profarmaka obsahují mezi těmito částmi navíc spojovací řetězec (linker, spacer).

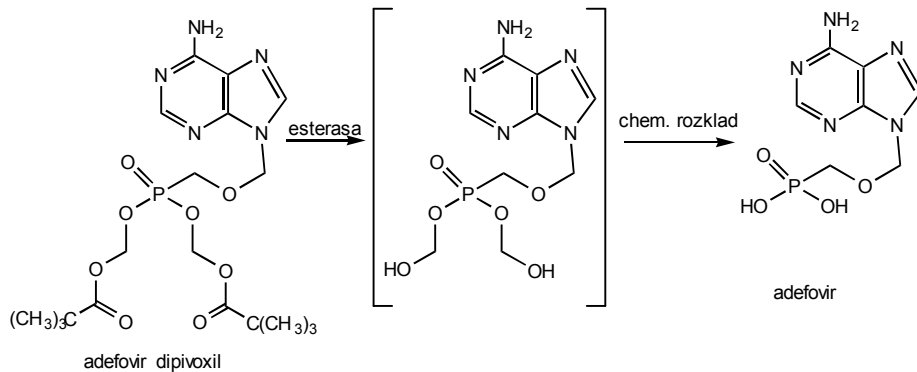
Dvoudílná profarmaka se obvykle připravují s cílem upravit rozpustnost léčiva v biologických tekutinách nebo naopak v lipidické dvojvrstvě buněčných membrán. Např. steroidní kortikoidní hormon prednisolon se jen velmi špatně rozpouští ve vodě. Jeho vysoká lipofilita je vhodná pro použití v dermatologii, pro použití v očním lékařství je však třeba rozpustnost ve vodě zvýšit. K tomuto účelu bylo připraveno několik profarmak, jako jsou sodné soli prednisolon-21-fosfátu (Solucort), -21-hemisukcinátu (Solu-Decortin H) nebo -21-m-sulfobenzoátu (Solupred), nebo soli (acetát) 21-dimethylaminoprednisolonu. U některých protinádorových léčiv (etoposid, fludarabin, nově zkoušený kombretastatin A-4) se zlepšuje rozpustnost účinné látky fosforylací. Pokud by taková léčiva nebyla fosforylována, musela by být podávána v pro pacienta nepřijatelně velkých objemech infuzních roztoků. Syntetický kortikoid, fluocinolon, má v molekule 4 polární hydroxylové skupiny, což znesnadňuje průnik pokožkou. Pro použití v dermatologii (k potlačení ekzémů a dalších kožních zánětlivých nebo alergických projevů) byla připravena proto byla profarmaka, u nichž byl transport přes pokožku usnadněn převedením na ketal, acetonid fluocinolonu (Gelargin), popř. acetylovaný acetonid (fluocinodid, Lidex).

Spojovacím řetězcem trojdílných profarmak je nejčastěji alkylenoxyskupina. V takovém případě po enzymatickém odštěpení acylskupiny navázané esterovou vazbou vznikne poloacetal nebo podobný derivát, který se pak snadno ve vodním prostředí biologických tekutin rozštěpí spontánní chemickou hydrolýzou na účinnou složku a aldehyd nebo keton.

Příkladem takového trojdílného profarmaka může být adefovir dipivoxil (Hepsera), antivirotikum používané pro léčení žloutenky typu B. Adefovir objevil dr. Holý z ÚOChB AV ČR. Pro svoji malou biologickou dostupnost není ale samotný adefovir s vysoce polární fosfonátovou skupinou použitelný jako účinný lék. Pracovníci americké firmy Gilead

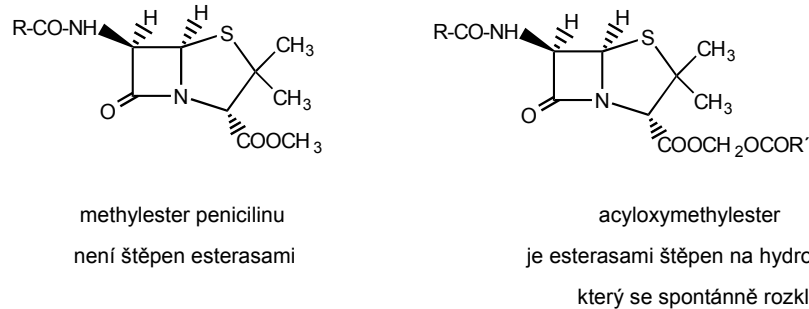
proto připravili jako profarmaka adefoviru některé estery. Z nich se osvědčil především pivaloxyloxymethylester adefoviru, který začala firma Gilead prodávat pod názvem Hepsera.

Hepsera se podává perorálně ve formě tablet. Biologická dostupnost adefoviru podaného ve formě profarmaka přitom dosahuje až 59%. Po absorpci profarmaka odštěpí esterasy krevní plasmy zbytek kyseliny pivalové. Vznikne hydroxymethylester, který se pak spontánně ve vodném prostředí rozloží na adefovir. Rozklad na účinnou látku je rychlý, maximum koncentrace adefoviru v krevní plasmě je dosaženo během 0,6-4 h po podání.



Biologickou dostupnost i další vlastnosti připravovaného profarmaka lze podle potřeby doladit volbou spojovacího řetězce i navázané transportní skupiny.

Např. methylester připravený esterifikací karboxylové skupiny penicillinu není ze sterických důvodů štěpen esterasy. Jako profarmakum proto není použitelný. Acyloxymethylestery enzymaticky hydrolyzovány jsou, protože mají esterovou skupinu, která je spojovací skupinou dostatečně oddálena od zbytku molekuly a je tedy pro esterasy přístupná. Příkladem může být profarmakum ampicillinu (polosyntetický analog penicilinu) pivampicillin ($R = \alpha$ -aminobenzyl, $R' = \textit{tert}$ -butyl):



„Polymerní“ léčiva jsou tvořena konjugáty léčiv s přirozenými makromolekulárními látkami (dextran, kyselina hyaluronová, albumin) nebo i syntetickými biokompatibilními polymery, jako je polyglutamová kyselina, polyethylenglykol (PEG), poly(N-hydroxypropylmethakrylamid) apod. Jejich farmakokinetické vlastnosti závisí spíše na charakteru polymerního nosiče než na léčivu. Polymer musí být ve vodě dobře rozpustný. Nemá-li požadovanou rozpustnost, mohou být na polymer navázány vhodné hydrofilní nebo lipofilní skupiny. Vedle toho lze na polymer navázat i specifické protilátky, které léčivo nasměrují k cílovým buňkám

Nejvýznamnější skupinu polymerních léčiv tvoří konjugáty polyethylenglykolu, již zmíněná „pegylovaná“ léčiva. Připravují se z některých nízkomolekulárních léčiv s cílem zvýšit jejich rozpustnost v biologických tekutinách a/nebo prodloužit dobu účinku, praktické uplatnění v terapii ale našly zejména již zmíněné pegylované terapeutické bílkoviny a oligopeptidy, jako je např. pegylovaný interferon α (Pegintron A, Pegasys) používaný při léčbě hepatitidy C a některých nádorových onemocnění. Navázáním polyethylenglykolu se zvyšuje biologická stabilita bílkovinného léčiva a současně snižuje jeho imunogenita, schopnost vyvolávat nežádoucí imunitní reakci organismu – anafylaktický šok. Zvýšenou stabilitu, malou systémovou toxicitu a zlepšenou rozpustnost mají i konjugáty některých léčiv s přirozenými biopolymery, jako je např. lidský albumin, který se často využívá k navázání protinádorových léčiv (např. Abraxane – konjugát albuminu s paklitaxelem) a virostatik.

Polymerní léčiva nemohou difundovat přes lipidickou dvojrstvu buněčné membrány. Nemohou proto být podávána perorálně, ale jen injekčně. Do buněk cílových tkání se krve dostávají **endocytózou** (pinocytózou), vchlípením části buněčné membrány obklopené léčivem do buňky.

Vchlípená část se může uzavřít, čímž se vytvoří v buňce jakési váčky s roztokem léčiva. Ty mohou splynout s lysosomy, buněčnými útvary obsahujícími hydrolytické enzymy, které pak v buňce odštěpí od nosiče účinnou látku.

To, že léčivo je uvolněno až v buňce, může být výhodné zejména u vysoce toxických nebo nestálých léčiv. Hydrolytické odštěpení léčiva může být v případě některých polymerních nosičů, např. u polymerních esterů nebo amidů kyseliny methakrylové, znesnadněno sterickou zábranou (polymethakryláty a polyakrylamidy mají v sousedství esterové nebo amidové funkce kvarterní uhlík). Aby léčivo mohlo být v takovém případě uvolněno, vkládá se proto mezi polymerní skelet a léčivo štěpitelný spojovací řetězec.

Zajímavými selektivními protinádorovými polymerními léčivy jsou konjugáty poly(N-hydroxypropylmethakrylamidu) a cytostatických antibiotik (daunomycin, doxorubicin), které byly řadu let studovány na Ústavu makromolekulární chemie a Mikrobiologickém ústavu AV ČR a pak klinicky testovány firmou Zentiva. Polymerní nosič je ve vodě rozpustný, netoxický a biokompatibilní. Léčivo je na polymer navázáno přes postranní řetězce tvořené krátkým peptidickým řetězcem ze 4-5 aminokyselin. Do buněk se vzniklý konjugát dostává endocytózou. Nádorové buňky nebo buňky infikované DNA viry jsou přitom více náchylné k takovému přijímání polymerních léčiv než buňky normální, čímž je dána vyšší selektivita účinku. Jakmile léčivo pronikne do buňky, rozštěpí lysosomální proteolytické enzymy peptidickou spojku, léčivo se uvolní a buňku usmrtí. Nerozštěpený konjugát je neúčinný a nemůže proto poškozovat buňky, do nichž se nepronikl. Polymer se hromadí v játrech, takže konjugát může být využit k léčení jaterních nádorů, jeho specifita je však poměrně malá, navíc nádorové onemocnění jater není časté. Jestliže se však kromě léčiva připojí na polymer ještě protilátka proti některému z tzv. nádorových antigenů – specifických glykoproteinů vyskytujících se na povrchu nádorových buněk, pak se konjugát hromadí i v jiných nádorech, pronikne do jejich buněk a začne je likvidovat. Výhodou je vysoká specifita účinku takto směřovaného polymerního léčiva, nevýhodou složitá struktura i příprava, takže jeho cena bude extrémně vysoká.

Podobně směřovaný účinek jako polymery s navázaným léčivem a protilátkou mají **imunotoxiny**, vysoce toxické účinné látky, které jsou na vhodnou protilátku navázané přímo nebo přes spojovací řetězce.

Jako protinádorové léčivo byl např. zkoušen imunotoxin tvořený jednou z nejedovatějších látek, ricinem, navázaným na protilátku proti nádorovým antigenům. Do terapeutické praxe se však nedostal, na rozdíl od imunokonjugátu s poněkud složitým generickým názvem gemtuzumab ozogamicin (Myotarg, Wyeth). Ten je tvořen derivátem protinádorového antibiotika kalicheamycinu navázaným přes spojku tvořenou ω -hydroxymáseelnou kyselinou na protilátku proti nádorovému antigenu CD33, který se vyskytuje na povrchu některých leukemických buněk. Konjugát slouží k léčbě leukemie. Samotný kalicheamycin je natolik toxický, že bez nasměrování na nádorové buňky navázáním na protilátku je jako léčivo nepoužitelný.

Kontrolní otázky pro zopakování

1. Co to je Hanschova rovnice a s jakými parametry počítá?
2. K čemu mohou být využity výsledky studia kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou účinností?
3. Co je farmakofor?
4. Jak se odlišuje vývoj léčiva závislý na ligandech a na struktuře?
5. Vodítková látka obsahuje ve své molekule karboxylovou skupinu, která však není součástí farmakoforu. Jak se mohou změnit farmakokinetické parametry, když tato karboxylová skupina bude nahrazena (a) za methylovou, (b) za sulfonovou?
6. Podařilo se nalézt látku se zajímavým účinkem, která je velmi špatně rozpustná ve vodě. Jak lze zvýšit její rozpustnost, aby se z ní stalo použitelné léčivo?
7. Jak je možné zpomalit eliminaci léčiva z organismu?
8. Proč mnoho léčiv obsahuje ve své molekule atomy fluoru?
9. Co je třeba brát v úvahu při chemických modifikacích molekuly léčiva?
10. Co znamená pojem bioisosterie?
11. Jaký je význam metabolické blokády a jak se jí dosáhne?
12. Co jsou profarmaka?
13. Jak je možné dělit profarmaka podle charakteru?
14. Kdy je třeba nahradit účinnou látku profarmakem?
15. Co jsou polymerní léčiva a jak mohou pronikat do buněk