

Úvod do farmakologie - Farmakokinetika

Farmakokinetika se zabývá působením organismu na léčivo, tj. osudem léčiva v organismu od podání až po jeho vyloučení. Farmakokinetika vychází z předpokladu, že biologická odezva, a to jak žádoucí terapeutická odezva, tak i vedlejší účinky, závisí na koncentraci léčiva v místě jeho cílové struktury.

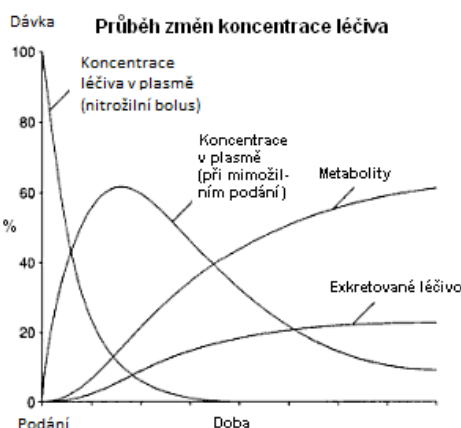
Mnoho látek se slibnými biologickými účinky se nikdy nestane léčivem. Je to proto, že jim chybí určité farmakologické vlastnosti, které musí léčiva splňovat (v angličtině: *drug-like properties* nebo také *druggability*, druhý termín se ale používá i pro označení charakteru cílových struktur – jejich schopnosti interagovat s léčivy). Vedle dobrých farmakodynamických vlastností musí mít také takové farmakokinetické parametry, které zaručí, že se po podání dostane v dostatečné koncentraci do cílové tkáně, tam pronikne do buněk a poté, co se projeví jeho účinek, bude organismem eliminováno.

Studium farmakokinetiky má velký význam především pro správné dávkování léčiva. Koncentrace léčiva na cílovém místě není určena samotnou dávkou, ale závisí na **absorpci** léčiva organismem po podání, jeho **distribuci** v organismu krevním oběhem, **metabolismu** a vylučování z organismu, **exkreci**. Někdy se tyto farmakokinetické faktory souhrnně označují zkratkou **ADME**.

Většina léčiv se dostává k místu působení **krevním oběhem**.

Přímé podání léčiva do krevního oběhu, ať již okamžitě formou **jednorázové nitrožilní injekce** (tzv. bolus), nebo postupně formou **infuze**, může být pro pacienty nepohodlné a nepříjemné. Často vyžaduje asistenci zdravotníka a v případě infuzí mnohdy i pobyt pacienta na lůžku.

Pro pacienta výhodnější jsou **neinvasivní způsoby podání**, především ústy (perorální podání – tablety, kapsle, sirupy a suspenze), popř. podání přes sliznice (čípky, nosní kapky, spreje a inhalační roztoky) nebo přes kůži (masti, krémy, tinktury, léčivé náplasti). Přitom se ale do krevního oběhu většinou nedostane celá podaná dávka léčiva. S cílovými strukturami pak může interagovat jen její určitý podíl. Jak velký tento podíl je, závisí na farmakokinetických vlastnostech léčiva.



Parametrem, na němž závisí koncentrace léčiva v krvi při neinvasivním podání (popř. i při některých způsobech injekčního podání, jako jsou podkožní nebo nitrosvalové injekce), je **absorpce** léčiva.

Většina perorálně (ústí) podaných léčiv je absorbována v zažívacím traktu. Aby se léčivo dostalo do krevního oběhu, musí nejprve projít střevní sliznicí. Látky s malou molekulovou hmotností (≤ 200) se přitom mohou „protlačit“ mezi buňkami střevních stěn. Větší molekuly, jaké ovšem má většina léčiv, musí nejprve proniknout do buněk lemujících střevní stěnu a odtud do krevních kapilár. Léčivo přitom musí opakovaně procházet buněčnými membránami, které jsou tvořené fosfolipidickou dvouvrstvou bránící průchodu polárních látek.

Molekuly různých látek mohou pronikat do buňky čtyřmi různými způsoby: aktivním transportem pomocí bílkovinných přenašečů, průstupem přes „vodní kanálky“ v buněčných stěnách, difuzí přes lipidickou dvojvrstvu buněčné membrány a konečně endocytózou.

Aktivní transport molekul léčiva do buňky pomocí transportních bílkovin byl zmíněn v souvislosti s výčtem cílových struktur léčiv. **Průstup léčiv vodními kanálky do buněk** se významněji neuplatňuje, protože tyto kanálky (póry) mají menší průměr (0,4 nm), než je průměr molekul většiny léčiv (kolem 1 nm). **Endocytóza** (pinocytóza) spočívá ve vchlípení části buněčné membrány s okolní extracelulární tekutinou obsahující roztok léčiva do buňky. Vchlípený útvar se může uzavřít buněčnou membránou, takže se v buňce vytvoří jakýsi váček naplněný tekutinou. Obal váčku tvořený zbytkem buněčné membrány se pak v buňce rozpadne a tekutina s léčivem se uvolní. Takto pronikají do buněk vysokomolekulární léčiva.

Hlavním mechanismem průniku léčiva je **difuze přes lipidickou dvojvrstvu buněčné membrány**.

Jde o pasivní transport, jehož hnací silou je gradient koncentrace léčiva vně a uvnitř buňky. Aby léčivo mohlo membránou do buněk pronikat, musí mít dobře vyváženou polaritu – musí být natolik polární, aby bylo dostatečně rozpustné ve vodném prostředí tělních tekutin, současně však natolik lipofilní (hydrofobní), aby se ve vnitřní lipidické části dvojvrstvy buněčné membrány „rozpuštělo“. Lipofilita léčiva se obvykle charakterizuje jeho rozdělovacím koeficientem mezi n-oktanolem a vodou (P), n-oktanol přitom slouží jako modelová látka simulující lipidy buněčné stěny, které mají podobnou polaritu.

Požadavky na vlastnosti léčiva z hlediska absorpce udává empirické „**pravidlo pěti**“.

Pravidlo formuloval Christopher Lipinski z výzkumných laboratoří firmy Pfizer. I když bylo publikováno poměrně nedávno (1997), rychle se mezi farmakochemiky rozšířilo a stalo užitečným kritériem pro posuzování pravděpodobnosti uplatnění různých látek jako perorálních léčiv. Pro získání lepších předpovědí použitelnosti léčiv bylo také různě modifikováno.

Pravidlo pěti říká, že by léčivo nemělo mít molekulovou hmotnost přes 500, nemělo mít více než 5 skupin, které jsou při tvorbě vodíkových můstků donory a ne více než 10 skupin, které jsou akceptory a logaritmus jeho rozdělovacího koeficientu mezi n-oktanolem a vodou ($\log P$) by měl být menší než 5.

Léčiva s $\log P > 5$ jsou špatně rozpustná ve vodném prostředí biologických tekutin. Přestože mohou v důsledku své vysoké lipofility snadno a rychle pronikat přes buněčné membrány, jejich špatná rozpustnost může negativně ovlivnit časový průběh absorpce. Jejich aktuální koncentrace v krevní plasmě pak nemusí postačovat k vyvolání požadovaného účinku. Přes buňky sliznice zažívacího traktu mohou procházet jen látky, které jsou rozpuštěné ve vodném prostředí tekutin zažívacího traktu (objem asi 250 ml, pH 1-7,5). Rozpuštění je rovnovážným procesem. Je-li část látky nerozpuštěná, pak snížení její koncentrace v roztoku po jejím průchodu vyvolá přechod dalších molekul do roztoku, proces absorpce se tím ale může zpomalit.

Vysoce polární léčiva, jejichž rozdělovací koeficient je příliš malý (někdy dokonce záporný), difundují přes membrány buněk sliznice zažívacího traktu jen neochotně, takže jejich absorpce je velmi pomalá. Aby se taková léčiva dostala k cílovým tkáním v potřebné koncentraci, bývají podávána injekčně přímo do krevního oběhu. I když je „pravidlu pěti“ věnována značná pozornost v moderních učebnicích farmakochemie v kapitolách o vztazích mezi strukturou a účinností léčiv (viz Farm04), je třeba si uvědomit, že je jen určitou idealizací: Analýza provedená u používaných léčiv zahrnutých do CMC databáze např. ukázala, že v 80% případů se $\log P$ se pohyboval mezi 0,4 do 5,6, průměr činil 2,5.

Výjimkou z pravidla pěti jsou léčiva, která mohou do cílových buněk pronikat **aktivním transportem**, jehož se účastní bílkoviny procházející buněčnou membránou. Transportní bílkoviny jsou substrátově specifické. Podílejí se např. na transportu polárních antibiotik, fungicidů, srdečních glykosidů apod. Jak již bylo ukázáno, po interakci se substrátem rozpuštěným v extracelulární tekutině změní transportní bílkovina konformaci, na vnější straně se uzavře, uvnitř buňky otevře a léčivo uvolní.

Některá léčiva s velkými molekulami nebo léčiva navázaná na polymery nebo na nanočástice mohou do buněk pronikat i tak, že dojde k vchlípení (invaginaci) buněčné membrány s roztokem léčiva (pinocytóza) nebo s pevnou částicí (fagocytóza). Vchlípená část stěny se v buňce uzavře za vzniku váčku (vezikulu), buněčné enzymy zbytky membrány rozloží a léčivo z váčku uvolní.

Léčiva se mohou do krevního oběhu dostávat nejen injekčně nebo **absorpceí přes sliznice zaživacích orgánů**, ale i **přes další sliznice** (nosní, ústní, plicní a poševní) a také **přes kůži**.

Přitom se léčivo po absorpci vyhne tzv. prvnímu průchodu játry (viz dále) a není proto ještě před vstupem do krevního oběhu zčásti inaktivováno jaterními enzymy. V případě absorpce v plicích je výhodou i to, že plicní tkáň je propustná i pro větší molekuly (zkoušeno je např. inhalační podání insulinu nebo dokonce mRNA). K absorpci přes pokožku dochází při aplikaci dermatologických přípravků – mastí, krémů atd. nebo léčivých náplastí. Taková aplikace je výhodná, má-li léčivo působit místně, může však být využita i k podání léčiv působících na celý organismus. Absorpce přes pokožku je však pomalá a málo účinná (na rozdíl od sliznic se v průběhu evoluce kůže vytvořila jako ochrana před průnikem látek z vnějšího prostředí do organismu).

Jakmile léčivo pronikne do krevního oběhu, dochází k jeho **distribuci** v organismu.

Léčivo, které je rozpuštěné v krevní plasmě, se přitom dostává do kapilár zásobujících tkáň krví. V některých orgánech je síť kapilár hustší, takže jsou krví více zásobeny než jiné. Distribuce léčiva v tkáních proto není rovnoměrná. Póry ve stěnách kapilár v tkáních pak pronikají molekuly léčiva spolu s živinami a kyslíkem do mimobuněčné tekutiny a odtud se dostávají do buněk tkáň. Kromě krve mohou léčivo k orgánům distribuovat i jiné tělesné tekutiny, jako je mozkomíšni mok, plodová voda nebo nitrooční tekutina.

Při distribuci léčiva krevním oběhem hraje významnou roli skutečnost, že některá léčiva se mohou **adsorbovat na plasmatické bílkoviny** (albumin, α_1 - kyselý glykoprotein, lipoproteiny a globuliny) i další složky krve. V krvi se pak ustaví rovnováha mezi adsorbovaným a volným léčivem.

Ve většině případů může pouze volné léčivo vyvolat farmaceutickou odezvu a být eliminováno. Adsorbované léčivo přitom slouží jako určitý zásobník, z něhož se volné léčivo postupně uvolňuje, když jeho koncentrace v krvi po průniku do cílových buněk nebo metabolických přeměnách klesne. Adsorpce tak může prodloužit biologický poločas léčiva (viz dále) a potlačit jeho eliminaci z organismu, může ale také zpomalit jeho průnik do cílových tkání a tím snižovat jeho koncentraci v buňkách.

Od krevních kapilár v běžných tkáních se liší cévy a kapiláry zásobující krví mozek. Ty tvoří tzv. **hematoencefalickou bariéru**. Jejím úkolem je chránit citlivou mozkovou tkáň před nežádoucími účinky některých škodlivých látek a přitom nebránit přísunu živin a kyslíku.

Buňky cévních stěn jsou v ní uspořádány velmi těsně, takže mezi nimi prakticky nejsou žádné póry vhodné pro průchod molekul léčiva. Navíc jsou kapiláry v mozku lemovány buňkami, jejichž stěny mají zvýšenou lipofilitu. Překonat hematoencefalickou bariéru proto mohou jen léčiva s vysoce lipofilním charakterem nebo léčiva, která mohou být „propašována“ do mozkové tkáně pomocí transportních proteinů. Mají-li být použita jiná léčiva, pak musí být aplikována do mozkomíšního moku, podle nových poznatků by mohl být k překonání hematoencefalické bariéry využit fokusovaný ultrazvuk.

Jiná přirozená tkáňová bariéra organismu, **placentální bariéra**, která odděluje krev matky od krve plodu, je naopak vysoce propustná.

Mohou proto přes ni snadno procházet živiny potřebné pro růst embrya a také případně být odváděny jejich rozkladné produkty. Placentální bariérou pronikají však stejně snadno i léčiva. Embryo tak může být vystaveno účinku léků, které těhotná žena užívá. Snadno proniká placentální bariérou také alkohol, nikotin nebo drogy. Ty pak mohou značně poškodit embryo, které nemá vyvinuté žádné detoxifikační mechanismy.

Pokud cílové struktury léčiva nejsou na povrchu buněk (receptory apod.), ale až uvnitř buňky, pak musí být molekuly léčiva dostatečně lipofilní (hydrofobní), aby mohly z mimobuněčné tekutiny proniknout přes buněčné membrány do tkáňových buněk. Přitom se uplatňují již zmíněné mechanismy absorpce. U některých silně polárních léčiv se k průniku do buněk může využít určitý trik: Na polární skupiny léčiva se naváží lipofilní substituenty. Navázáním vzniknou **profarmaka** ("**pro**léčiva", **pro**drug), prekurzory léčiv, které jsou natolik lipofilní, že přes buněčné membrány již mohou pronikat. Sama o sobě mohou být profarmaka neúčinná nebo jen málo účinná, účinné polární léčivo z nich vznikne až uvnitř buňky po odštěpení lipofilních substituentů působením buněčných enzymů.

Příkladem mohou být fosfonátová analoga nukleotidů adefovir a tenofovir, léčiva proti hepatitidě B a AIDS vyvinutá prof. Holým na ÚOChB AV ČR. Ta jsou vysoce polární, takže nemohou v dostatečné koncentraci pronikat buněčnými membránami. Aplikují se proto jako estery pivaloxyloxy-methanolu (adefovir dipivoxil) nebo isopropyloxy-methanolu (tenofovir disoproxil), resp. nověji jako fenylester amid isopropylesteru α -alaninu (tenofovir alafenamid) které se po proniknutí do buněk hydrolyticky rozštěpí na účinné látky. Charakter profarmak má asi 16% všech povolených léčiv.

Léčivo je v organismu distribuováno v tělních tekutinách, jejichž základem je voda. Celkový obsah vody v organismu dosahuje 60-70% tělesné hmotnosti.

Voda je přitom obsažena v různých prostorách, kompartmentech. Největší množství vody je obsaženo uvnitř buněk, pak v extracelulární tekutině. V důležitém kompartmentu, krevní plasmě, je množství vody odpovídající asi 4,4% tělesné hmotnosti.

Koncentrace léčiva v plasmě (C_p) je úměrná celkovému množství léčiva v organismu (D):

$$C_p = D/V_d$$

kde V_d označuje **zdánlivý distribuční objem**, obvykle vyjadřovaný v litrech na kg hmotnosti.

Je to fiktivní objem tekutiny, v němž by se léčivo vyskytovalo, kdyby jeho koncentrace byla ve všech částech těla stejná jako v plasmě. Hodnota V_d může přesáhnout nejen objem krve, ale i celkový objem vody v těle. Vysoká hodnota znamená, že se léčivo kumuluje v tkáních (např. svalech nebo tukové tkáni), ale v krvi se téměř nevyskytuje. Malá hodnota naopak nasvědčuje tomu, že největší podíl léčiva je vázán v krevní plasmě. Léčivo bývá v takovém případě ve značné míře absorbováno na plasmatické bílkoviny. Hodnotu V_d lze vypočítat tak, že se celkové množství léčiva v organismu nahradí podanou dávkou (D_0), změří se koncentrace léčiva v plasmě v několika časových intervalech a pak se extrapolací zjistí C_{p0} , tj. hodnota koncentrace v čase t_0 .

V organismu podléhají léčiva různým **metabolickým přeměnám** katalyzovaných enzymy. Nejčastěji jde o **metabolickou inaktivaci**, která ovlivňuje koncentraci léčiva a jeho vylučování z organismu.

Část léčiv se může z organismu vylučovat v nezměněné formě, většina je však vylučována až po metabolické přeměně. Některá léčiva mohou být degradována již enzymy obsaženými v krevní plasmě nebo tkáních, na metabolických přeměnách léčiv se může podílet i mikrobiom, komplex bakterií ve střevěch.

Klíčovou roli v metabolismu léčiv mají však jaterní enzymy. Ty katalyzují reakce, jimiž se zvyšuje polarita molekul. Zvýšení polaritity usnadňuje eliminaci léčiva, protože polárnější látky jsou z těla vylučovány snáze než látky méně polární.

Jaterní enzymy mohou část perorálně podaných léčiv inaktivovat, ještě dříve než proniknou do krve. Léčiva absorbovaná ze zažívacího traktu se nejprve dostanou do vrátnicové (portální) žíly, která odvádí krev ze střev do jater. Ta se v játrech rozdělí do systému kapilár, jimiž léčivo rozpuštěné v krevní plasmě prostupuje do jaterní tkáně. Až odtud se pak dostane do rozvětveného systému kapilár jaterní žíly, který je součástí krevního oběhu. Při tomto prvním průchodu játry může být předčasně metabolizováno určité množství léčiva. Léčiva podávaná injekčně, přes sliznice, kůži apod. se „efektu prvního průchodu“ játry vyhnou.

Metabolické přeměny léčiva v játrech zvyšují polaritu látky. Při **reakcích fáze I** dochází k různým oxidativním reakcím, hydrolyze amidů a esterů, redukci nitro a azosloučenin a reduktivní dehalogenaci.

Oxidativní reakce jsou katalyzovány skupinou jaterních enzymů nazývaných **cytochromy P 450**. Jsou to červené hemoproteiny obsahující porfyrinový kruh s centrálním atomem železa. Číselné označení odpovídá vlnové délce jejich absorpčního pásu. Je známo nejméně 18 rodin těchto enzymů. Cytochromy jsou např. schopné oxidovat methylové skupiny na primární alkoholy, demethylovat methylderiváty aminů, oxidovat aromatické uhlovodíky na fenoly a aromáty nebo látky s dvojnými vazbami na epoxidy. Primární úlohou cytochromů je odstraňování škodlivých látek z organismu. Substrátem mohou být vedle léčiv i látky obsažené v potravě nebo i chemikálie z životního prostředí. Jejich role přitom není jen pozitivní, cytochromy např. oxidují polycyklické aromatické uhlovodíky na deriváty s epoxidovými skupinami, které mohou vyvolávat nádorové bujení.

Reakce fáze II zahrnují enzymově katalyzovaný vznik konjugátů léčiva s vysoce polárními látkami.

Konjugace dále zvyšuje polaritu metabolitů vznikajících při reakcích fáze I. Přitom jde např. o navázání kyseliny glukuronové O- nebo N-glykosidickou vazbou na hydroxylové nebo aminové skupiny léčiv nebo jejich metabolitů. Reakci katalyzuje enzym **UDP-glukuronotransferasa** přenášející zbytek kyseliny glukuronové z uridindifosfoglukuronátu. Hydroxylové skupiny některých steroidů mohou být ve fázi II sulfatovány reakcí s 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátem (PAPS) katalyzovanou **sulfotransferasami**. Epoxidy vznikající při reakcích fáze I působením cytochromů P450 na aromáty reagují s -SH skupinou cysteinového zbytku tripeptidu glutathionu za vzniku polárních aduktů. Glutathion se může vázat i na chinony vznikající metabolickou oxidací některých substituovaných aromatických látek.

Zastoupení jednotlivých cytochromů P450 i dalších enzymů podílejících se na metabolických přeměnách léčiv v organismu i jejich aktivita jsou značně variabilní a vysoce individuální. Důsledkem pak je, že metabolismus léčiv se u jednotlivých pacientů může odlišovat, někdy zcela výrazně.

U někoho je léčivo metabolizováno velmi rychle, takže jeho hladina v organismu je pak nízká a k dosažení potřebného účinku je třeba podat vyšší dávku nebo dokonce jiný lék. U jiného pacienta může být naopak odbourávání zpomaleno. Hladina léčiva je pak u něho dlouho vysoká, což může u léků s úzkým terapeutickým intervalem (jako je např. warfarin) vést k předávkování a zvýšení rizika nežádoucích vedlejších účinků. Aktivita cytochromů P 450 nezávisí jen na individuálních rozdílech mezi uživateli léků, ale může ji ovlivnit i přítomnost látek, které cytochromy aktivují nebo naopak inhibují. Těmi mohou být i jiná léčiva, které pacienti užívají při léčbě různých onemocnění a syndromů, kterými jsou současně postiženi. Tak např. barbituráty aktivitu cytochromů zvyšují, zatímco např. léčiva proti žaludečním vředům ji snižují.

Při současném podání více léčiv může proto být rychlost metabolického odbourání a tedy i hladina každého z nich v krvi jiná, než když se lék podá samostatně. Dochází k **lékovým interakcím**, které někdy mohou být pro pacienty i nebezpečné. Vedle syntetických léčiv mohou aktivitu cytochromů ovlivňovat i **látky obsažené v léčivých bylinách** (v tomto směru je např. riziková třezalka, žen-šen nebo ginkgo) **nebo i v potravinách** (např. v růžičkové kapustě, šťávě grapefruitu nebo i čokoládě).

Počet současně používaných léků roste a s tím i riziko nežádoucích lékových interakcí. Různé léky mohou předepisovat různí lékaři, kteří nemusí vědět, co pacientovi předepsali jejich kolegové. Toto riziko by mohlo odstranit sdílení elektronických záznamů o zdravotním stavu pacienta a předepisovaných lécích. Přesto se farmakochemici musí snažit, aby jimi vyvíjená nová léčiva aktivitu cytochromů P 450 významně neovlivňovala a nežádoucí lékové interakce nevyvolávala.

Exkrece je proces vylučování léčiva z organismu. Vylučována mohou být jak léčiva v nezměněné formě, tak i produkty jejich metabolických přeměn. Na exkreci se podílejí především ledviny, léčiva a jejich metabolity mohou však být z organismu vylučovány i přes pokožku nebo přes různé sliznice (potem, slinami, slzami), plícemi (dechem), žlučové cesty (stolicí), ale i přes mléčné žlázy.

V **ledvinách** se krev obsahující léčiva a jejich metabolity dostává z přírodní tepny do uzlíků kapilár nazývaných glomeruly, které zapadají do kanálků nazývaných nefrony. Krev je v glomerulách pod tlakem, který působí tak, že dochází k její ultrafiltraci. Přitom nejen krvinky, ale ani vysokomolekulární složky krve krevními kapilárami neprocházejí, zatímco nízkomolekulární látky, tedy i běžná léčiva a jejich metabolity nebo rozkladné produkty, ano. Dostávají se tak do moči, s níž pak z organismu odcházejí. Průstup látek stěnou kapilár při glomerulární ultrafiltraci nezávisí na jejich polárním nebo nepolárním charakteru. Nefron je však obklopen hustou sítí vlásečnic, přes jejichž stěny mohou být exkretované látky reabsorbovány a dostávat se tak se žilní krví zpět do krevního oběhu. Zde již polarita látek hraje důležitou roli. Je-li při metabolické přeměně polarita zvýšena, je reabsorpce metabolitu potlačena nebo k ní vůbec nedochází. Nezměněné léčivo se naopak reabsorbuje snadněji.

Přes **pokožku** může být potem exkretováno až 10-15% některých léčiv. **Plicní exkrece** je důležitá pro eliminaci plynů podávaných při anestezii, přes plíce jsou exkretovány i některé těžké metabolity léčiv. Řada metabolitů vznikajících v játrech, především některé konjugáty s kyselinou glukuronovou, přechází do **žlučových cest**, odkud se dostávají do zažívacího traktu. Část může být v tenkém střevě rozštěpena a pak reabsorbována, většina však přechází do stolice. **Stolicí** jsou exkretovány i ty podíly léčiva, které zůstaly při orálním podání neabsorbovány. Možnost exkrece léčiv v **mateřském mléce** má význam především z hlediska ochrany zdraví kojenců, protože vylučovaná léčiva a jejich metabolity mohou na nezralý organismus působit toxicky. Na to je třeba brát zřetel při předepisování léků kojícím matkám. Přes mléčné žlázy může být vylučován i alkohol, nikotin a návykové drogy.

Eliminace je nevratný proces odstranění léčiva z organismu. Eliminace zahrnuje jak metabolické přeměny léčiva na neúčinné metabolity, tak i exkreci.

Rychlost eliminace je důležitou charakteristikou ovlivňující způsob podání léčiva. Je-li příliš vysoká, je třeba léčivo podávat v krátkých intervalech nebo dokonce kontinuálně infuzí, aby jeho koncentrace v krvi neklesala pod prahovou hodnotu terapeutické dávky. Naopak, příliš pomalá eliminace může vést k tomu, že po dalším podání koncentrace léčiva překročí terapeutický interval a ve zvýšené míře se projeví nežádoucí vedlejší účinky.

Poměr rychlosti eliminace léčiva k jeho celkové koncentraci se označuje jako **clearance (CL)**:

$$CL = \frac{\text{Rychlost eliminace}}{C}$$

Pro termín *clearance* se nepoužívá žádný český ekvivalent. Celková clearance (CL_T) se týká eliminace léčiva z krve nebo krevní plasmy. Clearance má aditivní charakter a je tvořena příspěvky jednotlivých orgánů. Nejdůležitější místa eliminace léčiv jsou játra a ledviny. Celková clearance je proto součtem jaterní (hepatické) clearance (CL_H), ledvinové (renální) clearance (CL_R) a clearance ostatními orgány (CL_O).

$$CL_T = CL_H + CL_R + CL_O.$$

Každý člen přitom představuje součet clearance všech eliminačních procesů – hepatická clearance je např. součet metabolické clearance (CL_M) a žlučové (biliární) clearance (CL_B): $CL_H = CL_M + CL_B$. Clearance je také ovlivněna sorpční vazbou léčiva na plasmatické bílkoviny, protože vázané léčivo není k dispozici pro eliminační procesy.

Hodnotu clearance si lze představit jako takový objem krve v těle, který je během jednotky času zcela zbaven léčiva. Protože clearance závisí na tělesné hmotnosti, vyjadřuje se v cm^3 za minutu na kg. Vedle významu pro lékaře, kteří clearance musí brát v úvahu při určení režimu dávkování léčiva, je znalost jejich hodnot užitečná i pro farmakochemiky. Porovnání clearance různě substituovaných látek umožňuje posoudit vliv strukturních změn na chování léčiva v organismu.

Celkovou clearance lze určit z měření časového průběhu změn koncentrace léčiva v krevní plasmě (C_p) po jednorázové dávce léčiva podané injekčně do žíly (intravenózní bolus):

$$CL_T = D / C_p \cdot t$$

Vynesením koncentrace proti času od podání se získá křivka, která graficky znázorňuje průběh eliminace léčiva. Plocha pod křivkou (AUC, area under curve) odpovídá celkovému množství léčiva, které se za čas t dostane do krevního oběhu. Toto množství je přímo úměrné podané dávce (D) a nepřímo úměrné celkové clearance:

$$AUC = D / CL_T$$

Rychlost eliminace vyjádřená jako časová změna (úbytek) celkového podaného množství D je přímo úměrná koncentraci léčiva v plasmě a celkové clearance:

$$dD/dt = CL_T \cdot C_p$$

Odtud:

$$dD = CL_T \cdot C_p \cdot dt$$

a po integraci:

$$D = CL_T \cdot C_p \cdot t,$$

přičemž

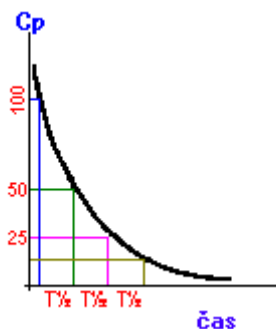
$$C_p \cdot t = AUC$$

Časovou závislost rychlosti eliminace léčiva na počáteční koncentraci lze ve většině případů popsat vztahem pro kinetiku prvního řádu:

$$C_p = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$$

kde k_{el} je rychlostní konstantou eliminace léčiva.

Z tohoto vztahu lze odvodit další důležitý farmakokinetický parametr, kterým je **biologický poločas léčiva** ($t_{1/2}$).



Biologický poločas je dobou, za níž poklesne koncentrace léčiva v plasmě na polovinu původní hodnoty. Čím vyšší je clearance, tím je pochopitelně biologický poločas kratší.

Naopak, mezi biologickým poločasem a distribučním objemem je přímá úměra:

$$t_{1/2} = 0,693 \cdot V_d / CL$$

Podobný vztah platí nejen pro injekce, ale i pro léčiva podaná jiným způsobem, pouze se místo podané dávky počítá s dávkou léčiva, která se absorbuje. Tato dávka je určena **biologickou dostupností** definovanou jako podíl množství léčiva, které se po podání uvolní z lékové formy, vstřebá a v nezměněné formě dostane do krevního oběhu (F), k celkové podané dávce (D).

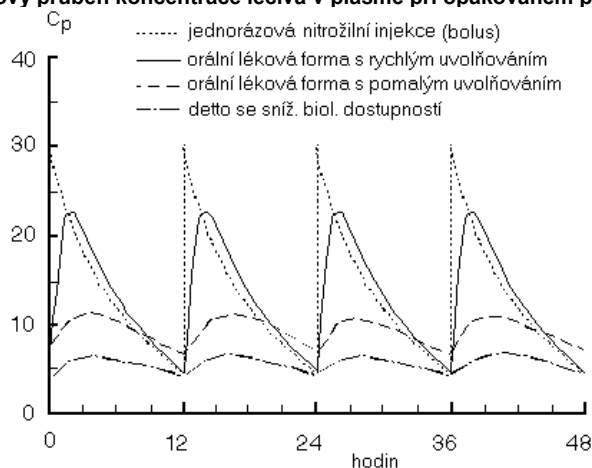
Jak bylo řečeno výše, celkové množství léčiva, které pronikne do krevního oběhu, je určeno velikostí plochy pod křivkou vyjadřující závislost plasmatické koncentrace na čase (AUC). Proto platí:

$$F = AUC/D$$

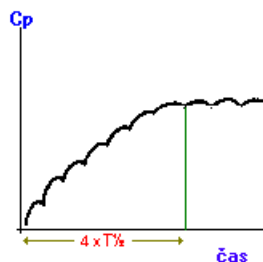
U léčiva podaného injekčně do žíly je biologická dostupnost rovna jedné. U léčiv podaných jinou cestou je biologická dostupnost nižší, protože léčivo nemusí být úplně vstřebáno nebo může být ještě předtím, než pronikne do krevního oběhu, zčásti eliminováno metabolickými procesy v žaludku, střevním traktu a také v játrech.

Znalost farmakodynamických a farmakokinetických parametrů má velký význam nejen pro určení správné dávky léčiva, ale i rychlosti a/nebo četnosti jeho podání. Optimální účinek lze dosáhnout, jestliže plasmatická koncentrace léčiva se po dobu léčení pokud možná trvale pohybuje ve vymezeném terapeutickém intervalu. Tato koncentrace se označuje jako C_{ss} (ss podle steady state = setrvalý stav). Rychlost dávkování přitom musí být shodná s rychlostí clearance. Onemocnění ledvin nebo jater, které může clearance ovlivnit, si proto může vyvolat změnu dávkování léčiva.

Časový průběh koncentrace léčiva v plasmě při opakovaném podání



Vyrovnat rychlost dávkování a clearance lze pouze v případě infuzí. Při jednorázovém injekčním podání je třeba počítat s tím, že od doby podání plasmatická koncentrace léčiva klesá, při jiném podání (např. orální lékové formy – tablety, kapsle) koncentrace nejprve roste podle toho, jak se léčivo rychle absorbuje, pak v důsledku eliminace klesá. Podání léčiva je v takovém případě zapotřebí opakovat ve vhodných časových intervalech tak, aby bylo dosaženo alespoň částečně setrvalého stavu plasmatické koncentrace. Hodnota C_{ss} se v takovém případě vypočte jako průměr mezi vrcholem a minimem koncentračního píku. Ustálený stav plasmatické koncentrace se přitom obvykle dosahuje v čase odpovídajícím čtyřnásobku biologického poločasu.



Je-li biologický poločas příliš dlouhý, může se dosáhnout zkrácení doby ustavení setrvalého stavu tím, že se na počátku terapie nasadí větší počáteční dávky léčiva a pak se dávkování sníží.

Rezistence

Účinnost určitého léčiva může ovlivňovat vedle farmakodynamických a farmakokinetických faktorů i vznik **rezistence**, k němuž dochází při opakovaném nebo dlouhodobém podávání léčiva.

Rezistence se projevuje tím, že k vyvolání terapeutické odezvy jsou zapotřebí stále se zvyšující dávky léčiva, popř. může docházet k tomu, že k žádoucí odezvě vůbec nedojde. Vznik rezistence je jedním z velkých problémů farmakoterapie.

Na vzniku rezistence se mohou podílet jak farmakodynamické faktory (nárůst nebo pokles množství cílových struktur, mutace ovlivňující jejich afinitu k léčivu nebo jejich aktivitu), tak i změny farmakokinetických parametrů (zvýšení aktivity degradujících enzymů nebo transportních proteinů).

Známa je rezistence některých patogenních mikroorganismů na určitá antibiotika. Pro účinnost penicilinů a cefalosporinů je nezbytná přítomnost β -laktamového kruhu v molekule. Rezistence na tato antibiotika pak závisí na tom, zda buňky patogenů jsou schopné produkovat enzym β -laktamazu, která β -laktamový kruh štěpí. Při častém podávání antibiotik produkce tohoto enzymu narůstá, takže účinek antibiotika klesá. Ke vzniku rezistence však dochází i u vyšších organismů. Např. při častém používání barbiturátů se zvyšuje tvorba jaterních enzymů, které barbituráty oxidují. Tím jsou barbituráty rychleji eliminovány a jejich koncentrace v krevní plasmě klesá, takže podaná dávka pak již nestačí k vyvolání požadovaného účinku. Podobně je u drogově závislých k vyvolání halucinogenního účinku zapotřebí stále větší dávka drogy.

Rezistenci nemusí vyvolávat jen zvýšená tvorba enzymů, které léčivo odbourávají. Při podávání protinádorových léčiv působících na vnitrobuněčné cílové struktury dochází ke vzniku rezistence nárůstem tvorby transportních bílkovinných systémů, které léčivo účinně „pumpují“ z buňky do okolního prostředí, a to i proti koncentračnímu gradientu.

Vznik a nárůst rezistence lze vysvětlit **selektivním tlakem**, které léčivo vyvolává.

V důsledku rozdílné exprese nebo i mutací genů může kolísat množství nebo aktivita enzymů nebo jiných funkčních bílkovin produkovaných jednotlivými buňkami buněčné populace. Mikrobiální buňky produkující větší množství β -laktamasy nebo s mutacemi zvyšujícími aktivitu tohoto enzymu mohou degradovat β -laktamová antibiotika účinněji. K jejich usmrcení je pak zapotřebí vyšší koncentrace antibiotika než u původních „divokých“ buněk. Není-li potřebná koncentrace dosažena, buňky přežívají. Když se pak pomnoží, jsou jejich potomci vůči antibiotiku o něco odolnější, než byla původní populace s buňkami produkujícími β -laktamasy méně. Po dalších cyklech dělení buněk v prostředí se zvyšující se koncentrací antibiotika se degradační schopnost mikrobů dále zvyšuje, až nakonec převáží rezistentní varianty, na něž antibiotikum už vůbec nepůsobí. Podobným způsobem mohou zvyšovat i nádorové buňky svoji odolnost vůči cytostatikům. Nedávno bylo např. zjištěno, že určitá bodová mutace jednoho genu mnohonásobně zvyšuje účinnost transportního proteinu ABCG2 čerpající cytostatika ven z buněk. Buňky s takovou „superpumpou“ jsou pak až 6000x rezistentnější než původní nádorové buňky. Zatímco citlivé buňky s původní variantou genu jsou cytostatikem usmrceny, ve zbytkovém nádoru zůstávají a dále se množí buňky s mutovaným genem, které jsou proti účinkům léčiva odolné. Když pak nádor znovu naroste, je tvořen rezistentními buňkami, na něž už cytostatikum nepůsobí.

Určitou pomocí v boji s rezistencí je **správný režim léčby**: tj. podávání léčiv v dostatečných dávkách a v intervalech určených na základě farmakokinetických studií, aby bylo zaručeno, že po celou dobu léčby bude koncentrace léčiva v organismu ve výši, která je potřebná pro požadovanou odezvu.

V 50. letech minulého století byl v některých vyspělých zemích penicilin preventivně přidáván i do zubních past, žvýkaček apod. Dávky penicilinu v těchto přípravcích byly nízké, takže většinou nestačily k usmrcení patogenních mikroorganismů. Vyvolávaly však selektivní tlak, který vedl k tomu, že začaly převládat rezistentní kmeny, vůči nimž penicilin už účinný nebyl. Jiná antibiotika byla v 60. a 70. letech přidávána do krmiv hospodářských zvířat. Tím byly potlačeny infekce, které snižovaly výnosy. Rezidua antibiotik se přitom ale dostávala s masem nebo dalšími živočišnými produkty v malých dávkách do lidského organismu. To mělo za následek, že se postupně vyvíjela rezistence i u některých lidských patogenních mikroorganismů a antibiotika přestávala být účinná. V současné době je rizikem pro vznik rezistence zbytečné užívání antibiotik u virových onemocnění, na něž antibiotika nepůsobí (např. při chřipce) a také nedodržování předepsaného léčebného režimu (nedodržování předepsaných intervalů podání, předčasné ukončení léčby po vymizení prvních příznaků onemocnění).

Výjimečně může být vznik rezistence využit terapeuticky, většinou je však nežádoucí. Snaha o překonání rezistence vede jednak k hledání nových léčiv působících i na rezistentní patogenní organismy nebo na nemocné buňky, jednak ke studiu kombinací léku s látkami blokujícími mechanismy rezistence.

Příkladem účinné kombinace léčiva s inhibítorem degradujícího enzymu může být přípravek amoxiclav obsahující kombinaci polosyntetického penicilinu amoxicillinu s kyselinou klavulanovou, která je účinným inhibítorem β -laktamasy. Studovány jsou i kombinace účinných léčiv s látkami blokujícími proteiny, které se účastní transportu léčiv ven z buněk.

Výzkum a vývoj nových léčiv

Výzkum a vývoj nových originálních léčiv je zdlouhavý, nákladný a přitom značně rizikový. Z desetitisíců nově zkoumaných látek se jen jedna až dvě stanou užitečným léčivem. Přesto je nesmírně zajímavý a záslužný. Bez nových účinných léčiv by byl pokrok moderní medicíny nepředstavitelný.

Ilustruje to třeba příklad pražského Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii. Tam bylo do 90. let minulého století syntetizováno 18 tis. látek, ale jen 29 z nich bylo zaregistrováno jako léčiva a i z těch uspělo v silném konkurenčním prostředí v zahraničí jen několik. Nejúspěšnější bylo antidepressivum dosulepin s celkovým obratem 19,5 mld. tehdejších Kč, u něhož se podařilo prodat licenci tehdejší britské firmě Boots. Světově úspěšná antivirotika vyvinutá dr. Holým z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR byla výsledkem dlouholeté usilovné a vytrvalé práce, ale také notné dávky štěstí při nalezení vhodných partnerů pro testování účinnosti a farmaceutický vývoj na belgické univerzitě v Leuven ve virologovi profesoru De Clercovi a v americké firmě Gilead, která získala licenci na jeho nová virostatika cidofovir, adefovir a tenofovir a kde byla vyvinuta vhodná profarmaka dvou posledních látek.

Výzkum a vývoj jednoho nového léčiva trvá v průměru 12-15 let. Průměrné náklady činily ještě v r. 1975 asi 150 mil. \$, kolem roku 2000 přesáhly 800 mil. \$ a nyní se mají pohybovat mezi 1,4-2,15 mld. \$.

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

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

Při preklinických zkouškách účinnosti a bezpečnosti uspěje jen asi 0,1% kandidátů na nové léčivo. I z těch pak první fázi klinických zkoušek na lidech projde jen asi jedna desetina a řada léčiv selhává i v dalších fázích klinických zkoušek. Přestože zisky farmaceutických firem činí 25-40% tržeb, jen asi 20% nových léčiv přináší více, než činily náklady na jejich výzkum a vývoj. Zisk z jejich prodeje proto musí zaplatit i VaV neúspěšných kandidátů. To se pak projevuje na cenách nových léčiv. Zcela nových léčiv, „nových chemických entit“, je povolováno každý rok poměrně málo. Americký Úřad pro potraviny a léčiva FDA povolil v r. 2009 jen 25 NCE. V r. 2011 jejich počet vzrostl na 35 a v r. 2015 na 45, ale v r. 2016 jich bylo jen 22. Pak se situace zlepšila: v r. 2017 jich bylo již 46, v r. 2018 dokonce 59 a v r. 2019 bylo povoleno nových léčiv Evropská Agentura pro léčiva EMA v r. 2017 „autorizovala“ celkem 92 léčiv, z toho 35 nových, v r. 2018 to bylo 84 léčiv, z toho 42 s novými účinnými látkami a v r. 2019, kdy se její sídlo stěhovalo v souvislosti s Brexitem z Londýna do Amsterdamu 60, z toho 30 NCE. Přesto stále roste počet kandidátů na nová léčiva ve výzkumu a vývoji. Nyní je odhadován na asi 35-40 tisíc, z toho přes 5 tis. léků je klinicky zkoušeno. Spolu s tím rostou i částky vynakládané na VaV. V r. 2010 vydalo 50 nejvýznamnějších firem na výzkum a vývoj 103 mld. \$, v r. 2017 to už bylo 165 mld. \$, přestože i v této oblasti začaly přední farmaceutické firmy šetřit. V rámci restrukturalizace farmaceutického průmyslu dochází k řadě akvizic a fúzí spojených s redukcí VaV a rozpadem některých výzkumných týmů. Přední firmy proto hledají možnosti úspor nákladů na VaV bez omezení inovací, např. získáváním licencí na slibné látky z různých pracovišť, jejichž vývoj pak dokončují. Nejméně čtvrtina nových úspěšných léčiv má původ v laboratořích vysokých škol, státních výzkumných institucích nebo malých výzkumných firmách.

Velké riziko neúspěchu neznamená, že se ze připravených tisíců nových látek nemůže stát úspěšné léčivo, ale poukazuje na nutnost racionálního přístupu k výzkumu a vývoji léčiv. Nové techniky, jaké přináší mimo jiné nové syntetické postupy, biokatalýza, informatika a miniaturizace mohou podle nedávno publikovaného referátu o syntetické chemii léčiv z prestižního časopisu *Science* výzkum a vývoj urychlit a zlepšit.

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

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

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

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

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

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

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

- **Nová struktura, nové přínosy („first in the class“):**
 - Léčivo může léčit nemoci a symptomy, pro něž dosud neexistovala vhodná terapie
 - Léčivo rozšiřuje možnosti léčení, je alternativou pro pacienty, kteří na dosavadní terapii nereagují
- **Nová, patenty nechráněná struktura navazující na léčivo se známými přínosy („me too“)**
 - Léčivo je účinnější než dosud dostupné alternativy
 - Léčivo má méně nežádoucích vedlejších účinků
 - Léčivo přináší výhody pro pacienty (tablety místo injekcí a infuzí, prodloužení účinku apod.) nebo jejich specifické skupiny (děti, senioři, těhotné ženy, pacienti s dalším onemocněním atd.)
 - Léčivo s dalším účinkem,,
 - Profarmaka“, neúčinné látky, které přechází na účinnou látku po metabolické přeměně v organismu
- **Známa struktura, nové přínosy pro terapii**

- Náhrada racemátu účinnějším enantiomerem
- Nový typ soli
- Zvýšení selektivity
- Nová nebo rozšířená indikace
- Nová léková forma

➤ **Známá struktura, známé přínosy**

• **Generika**

- „Fixní“ kombinace dříve odděleně podávaných léčiv s doplňujícím se účinkem

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

Výzkum a vývoj analog zavedených léčiv, tzv. „me too“, tj. patenty nechráněnými odvozeninami známých léčiv, začíná fází návrhu. Návrh nových „me too“ léčiv může vycházet ze zkušeností získaných s jejich předchůdci, takže tato léčiva obvykle bývají účinnější, bezpečnější, pro pacienta komfortnější a proto často i komerčně úspěšnější. Někdy také mohou být hledána analoga zavedených léčiv, u nichž byl zjištěn další terapeuticky využitelný účinek. Ten může být obměnami základní molekuly zesilován, zatímco původní biologická aktivita může naopak být potlačována, takže nakonec vlastně vznikne nové léčivo.

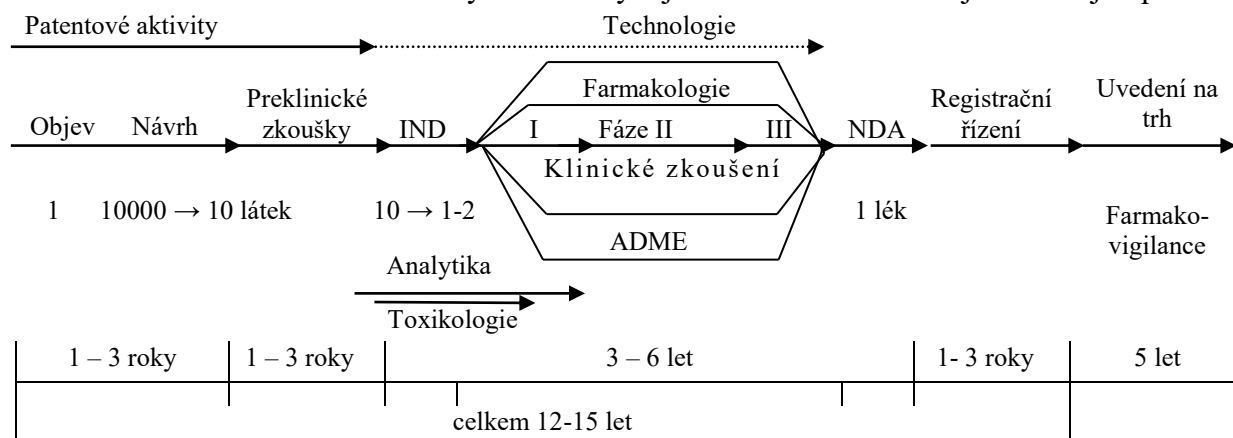
Někam mezi fází návrhu a vývoje lze zařadit hledání „profarmak“, derivátů, které se na účinnou látku přemění až v organismu, nových lékových forem známého léčiva, náhrady racemátu účinným enantiomerem, příprava a použití nových solí účinné látky apod. U většiny těchto látek musí proběhnout nové preklinické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

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

Generika lze vyrábět a uvést na trh až po vypršení patentové ochrany originálního přípravku, podle nové legislativy EU mohou však být vyvíjena již před skončením platnosti patentu. Vedle patentové ochrany je třeba brát v úvahu i tzv. **ochranu farmaceutických dat**, tj. dat z preklinických a klinických zkoušek.

Trvá-li ochrana farmaceutických dat i po vypršení platnosti patentu, je sice možné léčivo vyrábět, zaregistrováno však může být až po skončení této ochrany nebo po provedení klinických zkoušek. To je však nákladné a tak výrobci generik raději čekají, až ochrana dat skončí (v EU nyní po 10 - 11 letech, dříve to v ČR bylo za 6 let). Pak je možné se odvolat na výsledky zkoušek originálního přípravku a provést pouze průkaz bioekvivalence generika – srovnání účinnosti a bezpečnosti s originálním přípravkem u malého souboru pacientů, u injekcí přitom může k prokázání bioekvivalence stačit jen porovnání složení a stability se zavedeným přípravkem. U napodobenin léčiv charakteru biomakromolekul (např. terapeutických protilátek), je určité klinické zkoušení požadováno, protože je téměř nemožné připravit kopie původního přípravku s přesně stejnou strukturou.

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



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

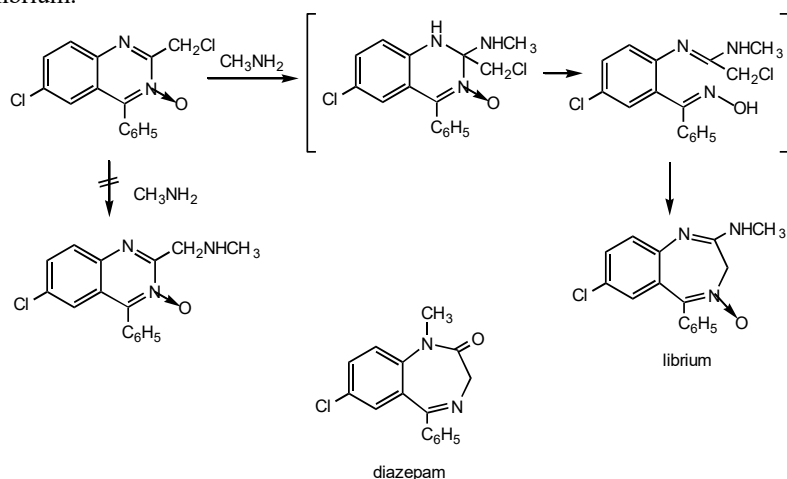
Objevování nových léčiv

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

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

Jiný případ využití šťastné náhody ilustruje příklad VaV zklidňujícího léku, diazepamu. V 50. letech 20. století se pracovníci firmy Roche snažili o syntézu benzoheptodiazinů (tehdejší název, podle současného názvosloví benzodiazepin-N-oxidů) jako nových léčiv, připravili však jen asi 40 nových derivátů chinazolin-N-oxidu.

Ty neměly požadovaný účinek a výzkum byl v r. 1955 ukončen. V r. 1957 byla při úklidu laboratoře objevena zapomenutá látka. Při dodatečném otestování se zjistilo, že má překvapivou účinnost. Šlo o produkt reakce methylaminu s chlor-methylderivátem substituovaného chinazolin-3-oxidu, ale nebyl to 6-chlor-4-fenyl-2-methylaminomethylchinazolin-3-oxid, jak bylo předpokládáno. Při reakci totiž došlo k otevření 6 členného kruhu a následné cyklizaci na 2-methylamino-5-fenyl-4H-benzodiazepin-4-oxid. Ten byl nazván librium a stal se vodítkem pro vývoj diazepam a dalších benzodiazepinů, které byly při potlačování stavů strachu, psychického napětí, úzkosti, neklidu a s tím spojených poruch spánku o řád účinnější než librium:



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

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

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

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

¹ Podrobnější údaje např. ve výukovém videu E. Murrayové: <https://www.youtube.com/watch?v=R3XXCk3aSO>

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

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

Dalším krokem při objevování nových léčiv je vypracování **metod screeningu**, postupů hodnocení biologické účinnosti testovaných látek.

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

Při návrhu metod screeningu je kromě výběru relevantních cílových struktur třeba určit i způsob zjišťování a hodnocení jejich interakce se zkoušenými látkami. Interagující systém se tak stává **biomarkerem**, který nám řekne, zda zkoušená látka je či není účinná. Stejně jako cílové struktury mají být biomarkery **validovány**, tj. má být doložen jejich vztah k průběhu nemoci.

Screeningové systémy mají být navrženy tak, aby byly pokud možná eliminovány falešně pozitivní výsledky, protože další vývoj neúčinné látky by znamenal zbytečně vynaloženou práci a finanční náklady. Současně by měl být i minimalizován počet falešně negativních výsledků, při nich by testem neprošly slibné účinné látky. Kde je to možné, dává se při screeningu přednost biomarkerům, které lze hodnotit *in vitro*. K jejich výběru významně přispěla genomika a proteomika. Hodnotí se aktivita určitých enzymů, popř. i jiných biopolymerů nebo zastoupení a struktura některých genů a bílkovin s využitím vazebných interakcí („binding assay“). Ty se detegují na základě změny charakteristik detekčního systému při vazbě inhibitoru na enzym, antagonisty na receptor apod. Aby přitom bylo možné kvantifikovat účinnost látek, opatřují se biomarkery vhodnou značkou, kterou může být např. navázaný radioizotop, barvivo, fluoreskující nebo luminiscenční látka, popř. enzym (peroxidasa, alkalická fosfatasa) katalyzující přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt apod. Kvantitativní údaj se pak získá po vazebné interakci měřením radioaktivity, absorbance, fluorescence nebo luminiscence systému. Určitou nevýhodou tohoto přístupu je, že měří intenzitu vazebné interakce látky s určitou cílovou strukturou, ale neříká nic o možnosti současného ovlivnění dalších cílových struktur v organismu. Interakce zkoušené látky s nimi může pak mít za následek závažné vedlejší účinky, které se zjistí až při nákladném klinickém testování. Z tohoto hlediska mohou být výhodnější fenotypické biomarkery, které mohou poskytovat komplexnější informace o účincích látky.

Moderní screeningové metody *in vitro* umožňují rychlé otestování velkých souborů látek – „knihoven“ – sloučenin získávaných zpravidla metodami kombinatoriální chemie (viz dále). Jsou často označovány anglickým termínem „high throughput screening“ (zkratka HTS), který lze přeložit jako **vysokokapacitní screening²**.

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

Moderní zdokonalené screeningové postupy *in vitro* založené na automatizované kvantifikaci vazebných interakcí molekul kandidátů na léčivo s cílovými biomakromolekulami nemusí poskytnout vždy zcela spolehlivé a jednoznačné informace o účincích látky. Proteiny i další biomakromolekuly se v buňkách vyskytují ve složitých systémech, jejichž složky se vzájemně ovlivňují. Např. při přenosu signálů k dělení buněk může být zablokováno jedné signalizační dráhy inhibicí určitého enzymu vykompenzováno indukcí tvorby enzymů alternativní dráhy.

² V sérii stručných přehledů věnovaných různým aspektům objevování a návrhu nových léčiv v 11. čísle Chemických listů z roku 2017 je pro HTS používán spíše doslovný, ale méně srozumitelný překlad „testování biologické aktivity s vysokou propustností“. Mimo jiné to je i v přehledech zabývajících se technickými aspekty HTS – viz např. *Chem. Listy*, **111**, 11: 766-771 a 772-776 (2017). V jiných českých podkladech byl použit termín „vysokovýkonný screening“.

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

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

Takovým biomarkerem může např. být velikost a tvar buněk nebo jejich jádra, průběh dělení buněk a dalších buněčných projevů a procesů, počet určitého typu buněk v tkáni (např. cirkulujících nádorových buněk v krevním oběhu) apod. Využití buněčných a tkáňových charakteristik jako biomarkerů sice může být vzhledem k vyhodnocování komplikovanější, ale na druhé straně může poskytnout komplexnější pohled na účinky látek, a to jak požadované, tak i nežádoucí.

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

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

To, že bude při screeningu nalezen „hit“, látka interagující s vybranou a validovanou cílovou strukturou, nemusí ještě znamenat, že se podařilo nalézt nejvhodnějšího kandidáta na nové léčivo.

Důležitá je i specifická účinku, tj. zda látka působí selektivně jen na vybrané cílové struktury, ale neovlivňuje nežádoucím způsobem jiné. Do screeningu proto bylo zavedeno hodnocení interakcí s více cílovými strukturami, kdy se zjišťuje nejen pozitivní účinek látek na cílové struktury mající vztah k určitému onemocnění, ale i ovlivnění jiných cílových struktur vyvolávající poruchy důležitých životních funkcí. K predikci nežádoucích účinků se používají metodiky vylučující látky s vysokou toxicitou nebo nevýhodnými farmakologickými vlastnostmi. Poté, co musely být tzv. „superaspiriny“ rofecoxib a valdecoxib inhibující cyklooxygenasu 2 staženy z trhu pro závažné toxické vedlejší účinky, je např. u kandidátů na nová léčiva zjišťován jejich vliv na draslíkový kanál hERG, jehož inhibice může být příčinou srdečních arytmií. Jinou „anti-cílovou strukturou“ je serotoninový receptor 5-HT_{2B}, jehož interakce s některými látkami vede k abnormálním změnám na srdečních chlopních, plicní hypertenzi a selhání jater. Pro tyto účinky musely být staženy z trhu léky pro hubnutí, jako byly např. svého času populární fenfluramin, dexfenfluramin apod. Mezi látky interagující s receptorem 5-HT_{2B} patří i tzv. „rekreační drogy“, jako je extáze a další amfetaminy. Nebezpečné mohou být i interakce léčiv s některými dalšími cílovými strukturami, např. s cytochromy P450, která může být příčinou nežádoucích lékových interakcí, protože ovlivní koncentraci a tím i účinek dalších léčiv, které pacient užívá.

Jsou-li k dispozici kromě informací o úloze určité cílové struktury při nemoci i údaje o její prostorové stavbě, lze experimentální screening nahradit **screeningem virtuálním, „in silico“**, spočívajícím ve využití počítačů k vyhledávání molekul, které mají takový tvar a funkční skupiny, aby mohly „zajet“ do aktivního nebo alosterického místa cílové biomakromolekuly a tam interagovat³.

V odborné literatuře se počítačové posuzování možností interakcí určitých molekul s cílovou strukturou o známé prostorové stavbě nazývá „docking“, což je anglický výraz pro zajištění lodí do doků. Virtuální screening může nahradit část zdlouhavé a nákladné experimentální práce. Alternativou virtuálního screeningu je počítačový návrh léčiva, generování struktur molekul komplementárních s aktivním nebo alosterickým místem enzymů nebo receptorů. Ten sice skýtá větší možnosti chemické rozmanitosti navrhovaných struktur, ale na druhé straně současně zvyšuje riziko neúspěchu. Počítač může navrhovat i molekuly, jejichž přípravou by se experimentátoři patrně nezabývali, protože se nepodobají známým léčivům dané terapeutické kategorie, ale přitom mohou být účinné, protože mají prostorovou stavbu umožňující interakce se strukturou aktivního místa cílové biomakromolekuly. Vedle hledání účinných látek může být virtuální screening využit i k predikci nežádoucího působení látky. Přitom se zjišťuje, které ze známých cílových struktur v buňkách mohou interagovat s vytípanou sloučeninou (inverzní docking).

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

³ Virtuálnímu screeningu léčiv, a to jak při objevování nových léčiv, tak i při jejich návrhu – optimalizaci farmakologických vlastností – je věnován jiný přehledný článek z již zmíněného čísla Chemických listů – viz *Chem. Listy*, **111**, 11: 738-744 (2017)

V červnu 2016 obsahovala Databanka bílkovin (PDB, Protein Data Bank, www.pdb.org) přes 100 tisíc experimentálně (rentgenograficky, NMR) zjištěných struktur bílkovin, z nichž může vycházet počítačový na struktuře závislý návrh léčiv (SBDD – Structure-Based Drug Design). Údaje z databanky ale stále mají spíše jen statický charakter a nepostihují v potřebné míře hydrataci a konformaci bílkovin, která se může za reálných podmínek dynamicky měnit. Stejně tak se může v závislosti na podmínkách měnit i prostorová struktura konformačně flexibilních molekul potenciálního léčiva. Takové změny pak mohou ovlivnit účinnost léčiva. Starší počítačové modely tyto problémy v dostatečné míře neřešily. Získávání nových dat včetně údajů o struktuře komplexů biopolymerů s léčivem a neustále vylepšované počítačové modelování, které nyní umí do určité míry postihovat i dynamické změny molekul (postupy MDDDD – Molecular Dynamics-Driven Drug Discovery)⁴, se však začínají vyrovnávat i s těmito problémy. Výsledky virtuálního screeningu a počítačových návrhů léčiva se tak stále více přibližují skutečnosti. Přesto zatím stále slouží počítačové modelování s využitím algoritmů popisujících vztahy mezi strukturou a účinností látek spíše než k návrhu nových léčiv k navrhování obměn účinné látky s cílem zlepšit její farmakologické parametry.

Ani nové postupy virtuálního screeningu a/nebo počítačového návrhu léčiva ale zatím stále nemohou nahradit experimentální postupy. Počítačem navržené látky musí být syntetizovány a pak důkladně biologicky testovány, aby se zjistilo, zda kandidát na nové léčivo má skutečně předpokládané vlastnosti.

Moderní postupy virtuálního i experimentálního screeningu vedly v 90. letech minulého století ke zrodu nové metodiky objevování léčiv. Ta vychází z identifikace jednoduchých sloučenin, z nichž interagují s cílovou strukturou pouze části – fragmenty – molekuly.

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

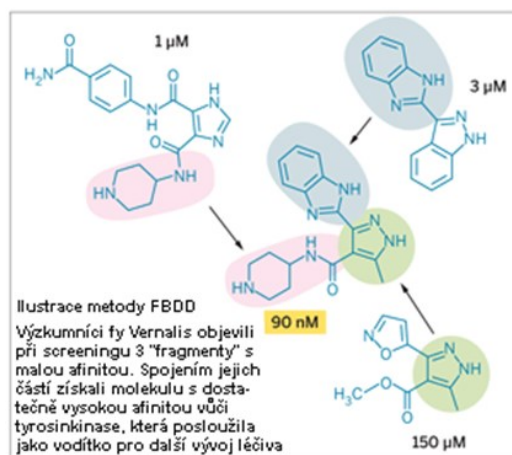
Slabě interagující části molekuly lze považovat za **fragmenty budoucího léčiva**, které je možné kombinovat a spojovat s jinými fragmenty interagujícími s jinými skupinami cílové struktury. Tím se pak získá látka, která je schopna komplexnějších a synergisticky zesílených interakcí a je tedy mnohonásobně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

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

Kromě experimentálního screeningu lze knihovny fragmentů získat i vyhledáváním opakujících se strukturních rysů v molekulách známých léčiv. Knihovny fragmentů mohou přitom být obohacovány i o „privilegované molekuly“, o nichž je známo, že silně interagují s bílkoviny (např. difenyl). Spojováním fragmentů, z nichž každý má jen malou afinitu vůči cílové struktuře (řádu mmol/l), lze získat molekuly s mnohonásobně zvýšenou afinitou (μ mol/l, popř. dokonce nmol/l). Při studiu vazeb různých látek na cílové struktury se ukázalo, že kombinací účinných ligandů lze dospět k léčivům s lepšími vlastnostmi (nižší molekulová hmotnost, nižší toxicita, lepší farmakokinetika apod.) než při jiných postupech hledání účinných léčiv. Kombinace fragmentů, obměny způsobu jejich spojení a případné další modifikace lze samozřejmě studovat experimentálně, část experimentální práce však lze nahradit využitím počítačového modelování.

Počítač přitom může z komerčních knihoven vybrat vhodné fragmenty, navrhnout jejich úpravy a kombinace. Molekuly s navrženou strukturou pak jsou syntetizovány a testovány, až se dosáhne požadované účinnosti. Zahrnutí algoritmů pro farmakokinetické parametry a toxikologické údaje do počítačových modelů experimentální práci dále zjednodušuje, protože umožňuje předem vyloučit látky s nedostatečnou rozpustností, nežádoucí toxicitou nebo jinými nevhodnými vlastnostmi. Situaci přitom komplikuje ale to, že při spojení fragmentů se mohou jejich funkční skupiny vzájemně ovlivňovat, přičemž se mění i jejich interakční energie. Přesto se metodikou FBDD získává poměrně rychle a efektivně nové léčivo nebo alespoň vodítko pro jeho další vývoj.

⁴ Jedním z takových nástrojů je i software CAVER vyvinuté na MU ve spolupráci přírodovědců a informatiků.



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

Ve výzkumných laboratořích velkých farmaceutických firem se často využívají různé metodiky vedle sebe. Uplatnění HTS je výhodné tam, kde cílová struktura je nová a zatím nedostatečně charakterizovaná a je třeba rychle nalézt hity pro její validaci jako místa terapeutického zásahu. Použití FBDD je naopak účelné zejména tam, kde metodika HTS selhává (např. jsou-li cílovými strukturami některé proteasy nebo anhydrasa kyseliny uhličitě) nebo neposkytuje dobré výsledky.

Metodika FBDD může vést rychleji k cíli v případech, kdy cílová biomakromolekula je známá a lze ji získat v čistém stavu. Osvědčuje se také při hledání nového léčiva charakteru „me too“, které má mít vyšší účinnost než dosavadní známá léčiva pro danou indikaci. Pro možnost využití FBDD jsou ale nezbytné určité poměrně náročné technické předpoklady pro studium interakcí fragmentů (NMR, rentgenová krystalografie, měření rezonance povrchových plasmonů). Prvním povoleným léčivem vyvinutým metodikou FBDD byl v r. 2011 (USA) resp. 2012 (Evropa) vemurafenib určený k léčbě pokročilých stadií melanomu, nejméně desítkou dalších takto navržených léčiv je klinicky zkoušena.

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

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

Z nejlepších hitů se proto vyberou látky, na které se zaměří další fáze výzkumu a vývoje. Tyto látky se pak stanou určitými **vodítky** (anglicky lead compound nebo jen lead, což někdy nevhodně překládáno jako „vůdčí látka“ nebo „vůdčí struktura“) stojícími na startovní čáře **fáze návrhu léčiva** (viz Farm03). V této fázi se pak většími či menšími obměnami struktury optimalizují vlastnosti látky tak, aby byly získány produkty s požadovanými farmakodynamickými i farmakokinetickými vlastnostmi.

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

Kombinatoriální syntéza

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

Ještě na počátku v 90. let se o kombinatoriální syntézu zajímalo jen pár chemiků. Je proto překvapivé, jak rychle se vyvinula v široce používanou metodu, která je nepostradatelná při výzkumu nových léčiv. V r. 1992 byla kombinatoriální syntéza využita k přípravě pouhých 3 „knihoven“ nových látek, z čehož jen u 1 byla zjištěna terapeutická účinnost. V r. 1999 bylo ale takových knihoven látek připraveno již 292 a terapeutická účinnost byla zjištěna u 85 z nich. Na přelomu 20. a 21. století pronikla metodologie kombinatoriální syntézy i do dalších oblastí užité chemie a začala být využívána při hledání účinných léčiv, ale i agrochemikálií, konzervačních látek, různých aditiv, nových materiálů pro mikroelektroniku a dokonce i nových katalyzátorů.

V posledních letech pak byla kombinatoriální syntéza ještě dále vylepšena kódováním knihoven pomocí DNA (DNA-encoded chemical libraries, zkratka DEL). Jde o využití oligodeoxynukleotidů jednak jako nosiče pro vytváření nových kandidátů na léčivo a současně i jako značky, která umožňuje jednoznačnou identifikaci připravených látek hybridizací s vhodným DNA templátem na základě vytváření vodíkových vazeb mezi komplementárními páry bází.

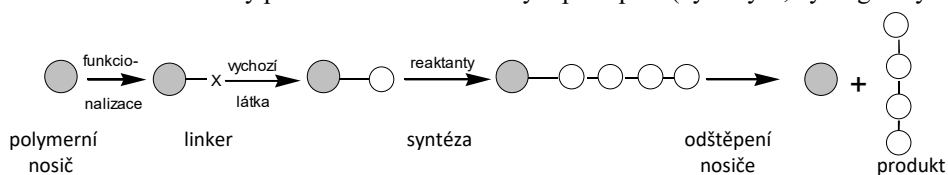
Kombinatoriální syntéza se vyvinula ze **syntézy v pevné fázi**. Tato technika usnadňuje izolaci produktů a umožňuje automatizovat pracovní postupy. Syntéza v pevné fázi je založena na navázání výchozí látky na inertní pevný nosič. Tím bývá vhodný polymerní gel, často ve formě malých kuliček, nosičem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

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

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

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

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



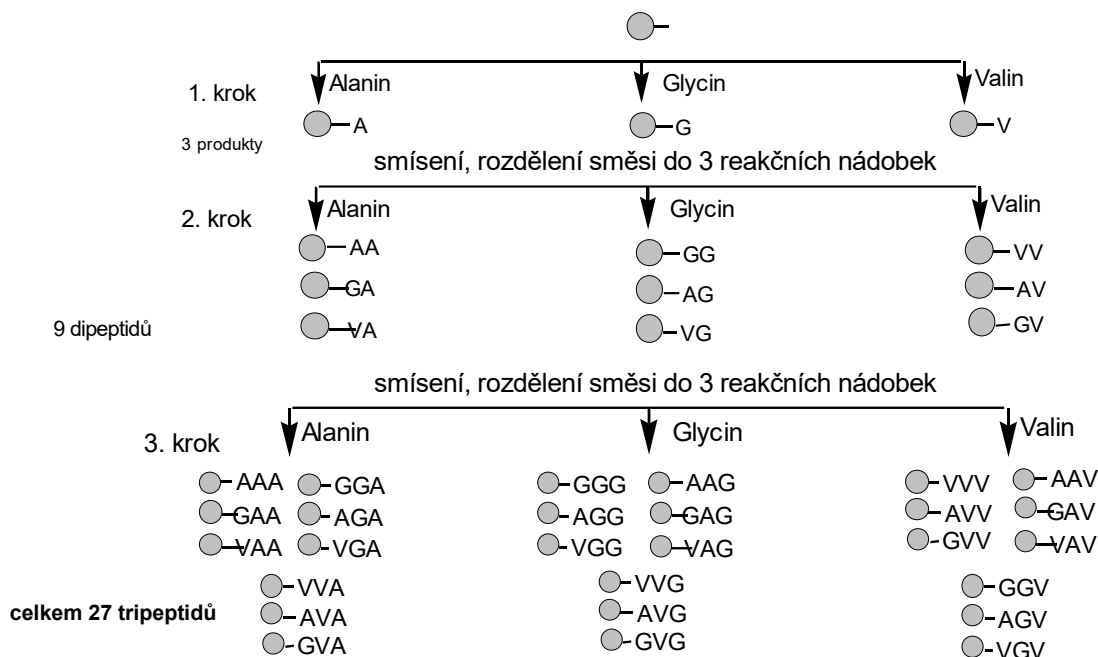
Syntéza v pevné fázi se využívá např. při přípravě peptidů. Nosičem je přitom nejčastěji řídicí síťovaný styren-divinylbenzenový gel, někdy nazývaný Merrifieldova pryskyřice. Jsou to drobné kuličky kopolymerního styrenu s 1% divinylbenzenu, který slouží jako síťovadlo vytvářející trojrozměrnou gelovitou strukturu nosiče. 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. Při této reakci 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 dnes využívají jak ve výzkumu, tak i při výrobě. Podobné automaty slouží i k přípravě oligonukleotidů používaných pro genové manipulace.

Využití pevných nosičů usnadňuje **paralelní syntézu**, tj. současné provádění reakcí stejného typu v různých reakčních nádobkách s použitím různých reaktantů. 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 analog účinné látky s rozdílnými substituenty, např. různých esterů, aminů, amidů apod. Provádění paralelních syntéz mohou také usnadnit různé laboratorní automaty a syntezátory.

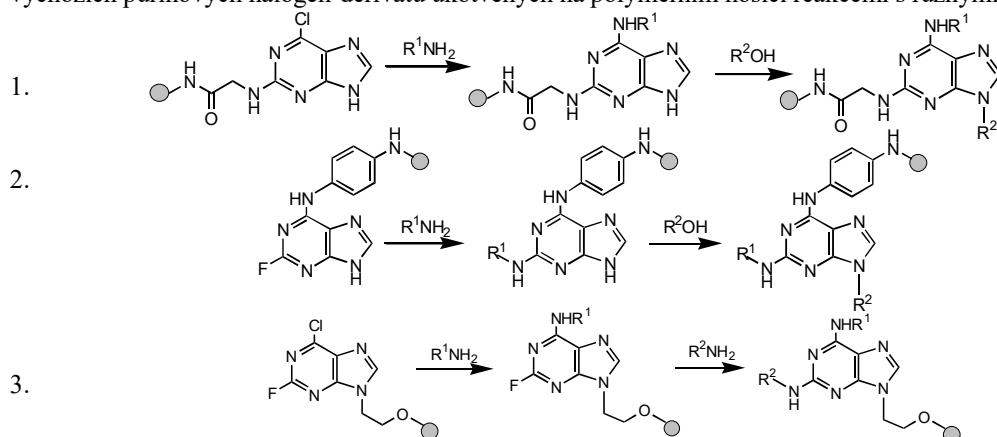
Od paralelní syntézy vede přímá cesta ke **kombinatoriální syntéze**. V tomto případě se nezískávají individuální látky, ale směsi různých produktů, tzv. **knihovny sloučenin**.

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

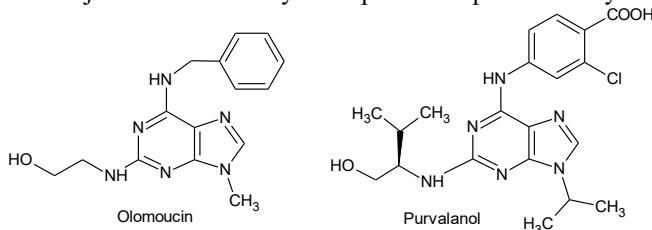


Kdyby se přitom místo 3 různých aminokyselin použilo všech 20 přirozených aminokyselin, pak by počet připravených tripeptidů činil po třetím syntetickém kroku již 20^3 , tj. 8.000. Jedním z průkopníků kombinatoriální syntézy je absolvent MU V. Krchňák, autor řady referátů i původních prací věnovaných této metodice. Postupy kombinatoriální syntézy se zrodily pro potřeby chemie peptidů, podobným způsobem však byly připraveny rozsáhlé knihovny jiných látek, např. N-alkyl-N-acylaminokyseliny, substituované s-triaziny, různé β -laktamy, deriváty isochinolinu, benzimidazolu apod. Tak např. byla kombinatoriální syntéza využita na americkém pracovišti při hledání vylepšených analog protinádorově účinného derivátu purinu, který objevili čeští vědci z olomouckého pracoviště Ústavu experimentální botaniky AV ČR a nazvali jej podle svého města olomoucín.

Olomoucín inhibuje cyklinependentní proteinkinasu, enzym, který má důležitou roli při řízení buněčného dělení. Inhibice cdk proto může brzdit růst nádorů. Knihovna analog olomoucínu byla připravena kombinatoriální syntézou ze tří výchozích purinových halogen-derivátů ukotvených na polymerním nosiči reakcemi s různými aminy a alkoholy.



Mezi látkami z takto připravené knihovny byla látka nazvaná purvalanol B, která byla podle výsledků screeningových testů *in vitro* asi 1000 x účinnějším inhibítorem cyklinependentní proteinkinasy 2 než olomoucín.



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

Při screeningu založeném na využití vazebných interakcí látek s cílovou strukturou, v tomto případě enzymem, zůstávají připravené látky navázané na nosič. Enzym je opatřen „značkou“, navázanou barevnou nebo fluoreskující látkou, radioisotopem nebo enzymem (peroxidasa, alkalická fosfatasa), který reaguje s chromogenním substrátem za vzniku barevného produktu. Po inkubaci a promytí se pak kontroluje zbarvení (fluorescence, radioaktivita apod.) kuliček nosiče. Pozitivně reagující a tedy zbarvené kuličky se pak oddělí a zjišťuje se, jakou strukturu má produkt, který je na ně navázán. Jiné screeningové systémy využívají změn optických vlastností látek při vzájemných interakcích. Vedle vazebných interakcí mohou být využity při screeningu knihoven látek i požadované funkční vlastnosti produktu. V takovém případě se detekce provádí po odštěpení produktů od nosiče, např. s použitím souboru 96 mikrofiltrů. Do každého mikrofiltru se vloží 100-500 kuliček nosiče, produkt se odštěpí a jeho roztok odfiltruje od nosiče do mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Proveďte se inkubace a otestuje se biologická aktivita roztoků v jamkách. Kuličky s produktem, který poskytl pozitivní reakci, se pak rozdělí a testují v podstatě individuálně (1 kulička na 1 jamku). Nakonec se produkty identifikují. V některých případech se screening v pevné fázi a v roztoku kombinuje. Základním předpokladem úspěchu screeningu je, aby detekce byla dostatečně citlivá. Na jedné standardní kuličce o průměru 0,1 mm mohou být navázané řádově stovky pikomol produktu. Objem roztoku v jamce je asi 0,1 ml, takže výsledná koncentrace látky je pak řádově mikromolární, což stačí k průkazu aktivity vhodnými analytickými postupy. Je-li třeba, lze koncentraci produktu zvýšit snížením objemu roztoku v jamce (např. použitím mikrotitračních destiček s 384 nebo i 1536 jamkami) nebo zvýšením množství navázaného produktu (zvětšením kuličky nosiče a/nebo jeho vazebné kapacity je lze zvýšit až o dva řády). Zjišťování účinnosti je automatizováno. Moderní vybavení umožňuje, aby jeden pracovník během jednoho dne otestoval 10⁷ 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 20⁷, tj. 1,28 · 10⁹ permutacemi) ani tak rychlý automatizovaný screening neposkytne požadovaný výsledek v přiměřené době.

Po provedeném screeningu je třeba pozitivně reagující produkty identifikovat.

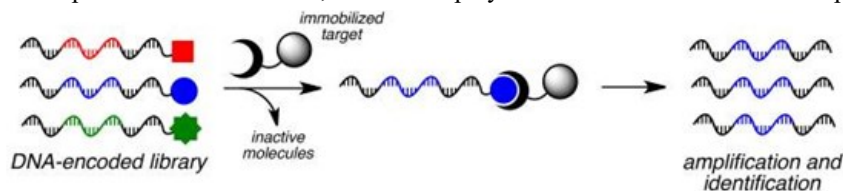
První možnost identifikace představuje analýza individuálního produktu na jednotlivé kuličky nosiče, druhou možností je analýza směšného vzorku založená na statistickém hodnocení pravděpodobnosti výskytu produktu s pozitivními výsledky testování. Používané analytické techniky musí být dostatečně citlivé a přitom specifické, aby umožnily určovat látky vyskytující se v mikromolárních koncentracích. K analýze a identifikaci se využívá zejména hmotová spektrometrie, infračervená spektrometrie, kapilární elektroforéza nebo HPLC (často kombinovaná s hmotovou spektrometrií).

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

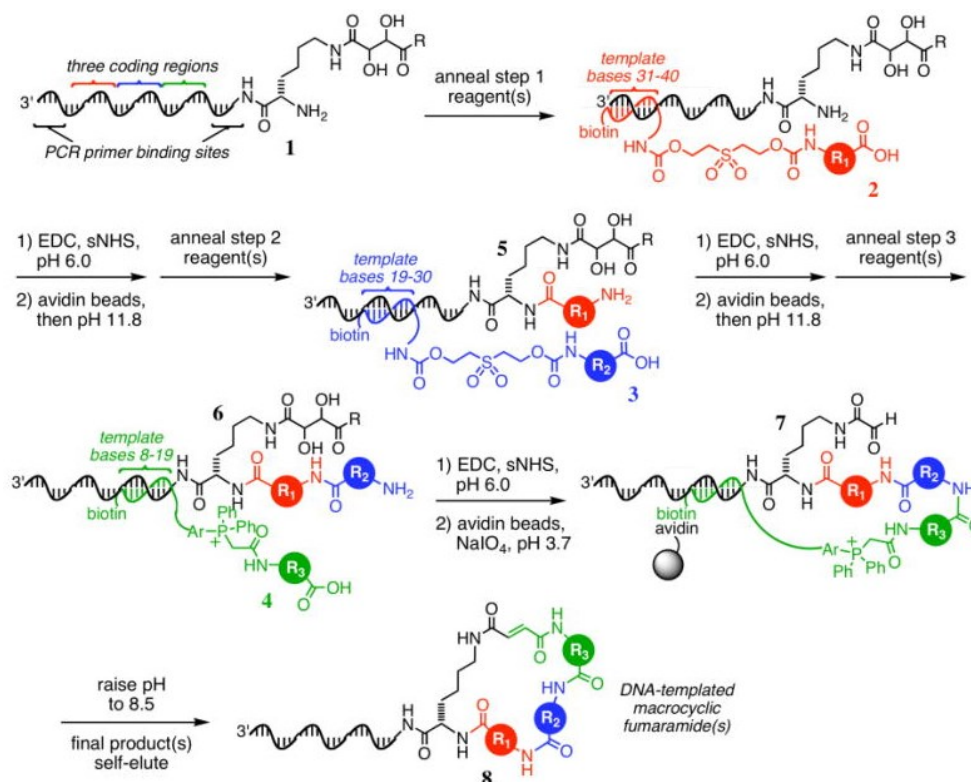
Zatímco techniky kombinatoriální syntézy umožňují přípravu knihoven s biliony látek, možnosti vyhledávání hitů jsou podstatně skromnější, i při automatizaci je provedení zdoluhavé. To představuje značnou komplikaci.

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

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



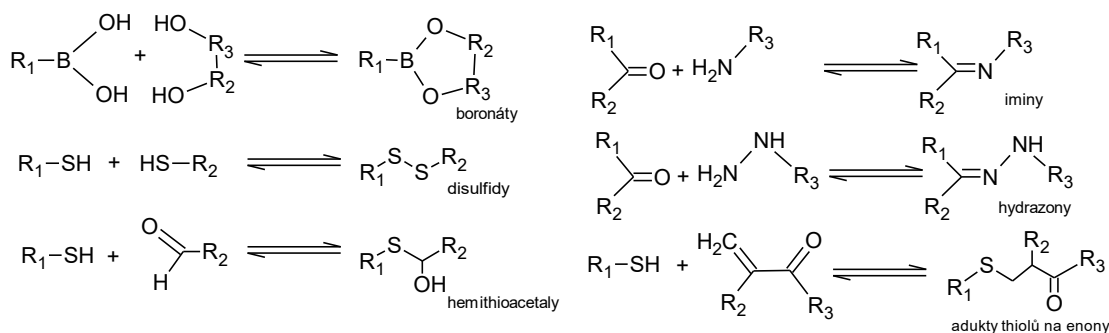
Ve druhém případě se uplatňují různé strategie, jaké představuje syntéza s DNA šablonou (DNA-templated synthesis, DTS), systémy Yocto Reactor nebo kódované samosestavovací kombinatoriální knihovny (ESAC libraries – a encoded self-assembling combinatorial libraries). Následující reakční schéma je ilustrací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

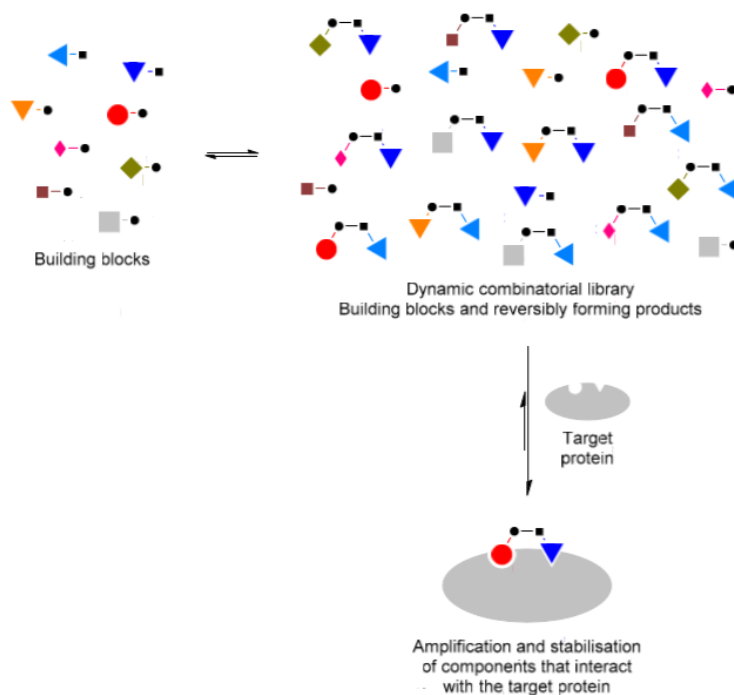


Při kombinatoriální syntéze je zde jako značka využit oligodeoxyribonukleotid se třemi kódujícími úseky, na něž je napojen první stavební blok připravované látky s volnou aminoskupinou. Ten může selektivně hybridizovat s biotinylovaným oligodeoxyribonukleotidem, na něž je přes štěpitelnou spojku navázán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

Jinou technikou usnadňující získávání výsledků při hledání účinných látek je **dynamická kombinatoriální chemie** (DCC – Dynamic Combinatorial Chemistry). Přitom se určité stavební kameny molekul spojují vazbami, které jsou reversibilní. Všechny složky takto vznikajících knihoven sloučenin jsou přitom v rovnováze a jejich zastoupení v systému je určeno jejich termodynamickou stabilitou za daných podmínek. Je-li přitom do systému přidána látka interagující s určitou složkou, např. příslušná cílová struktura, pak se rovnováha systému posouvá. Interagující složka je přitom ze směsi odstraňována, je interakcí stabilizována a její tvorba se zvyšuje.

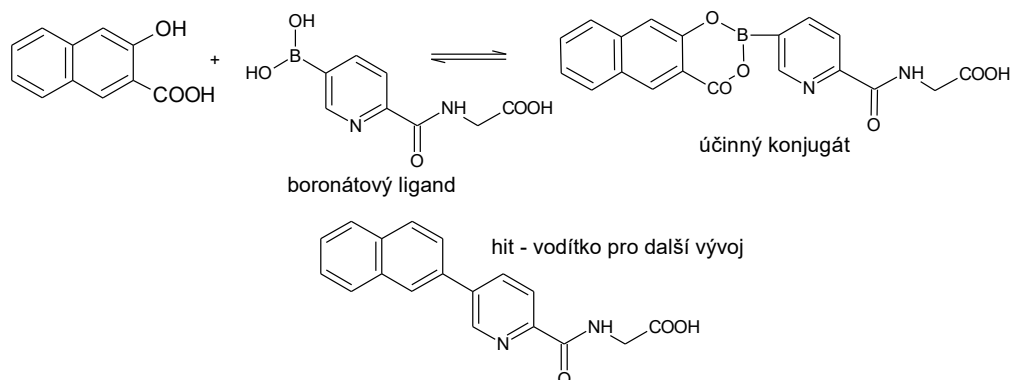
Reversibilní vazby vhodné pro připojování ligandů při DCC vznikají při reakcích boronových kyselin s dioly, tvorbě disulfidů z thiolů, reakcích thiolů s aldehydy, aminů nebo hydrazinů s ketony a adicích thiolů na eny:





Princip dynamické kombinatoriální chemie – podle přehledu Protein-Directed Dynamic Combinatorial Chemistry: A Guide to Protein Ligand and Inhibitor Discovery, Renjie Huang and Ivanhoe K. H. Leung, *Molecules* **2016**, *21*(7), 910; doi:[10.3390/molecules21070910](https://doi.org/10.3390/molecules21070910), <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/7/910/htm>

Po nalezení účinných derivátů s vhodnými funkčními skupinami – vhodnými fragmenty molekuly léčiva – se pak musí reverzibilní vazby nahradit stabilními vazbami. K tomu někdy stačí redukce (např. u iminů), často je však nutná náhrada spojená s celkovou záměnou – např. náhrada boronátové vazby za C-C vazbu:



Podle Demetriades, M.; Leung, I.K.H.; Chowdhury, R.; Chan, M.C.; McDonough, M.A.; Yeoh, K.K.; Tian, Y.-M.; Claridge, T.D.W.; Ratcliffe, P.J.; Woon, E.C.Y.; et al. Dynamic combinatorial chemistry employing boronic acids/boronate esters leads to potent oxygenase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, *51*, 6672–6675.

Jedním z posledních referátů o kombinatoriální syntéze je práce Ruiwu Liu, Xiaocen Li a Kit S. Lam, *Combinatorial Chemistry in Drug Discovery, Curr. Opin. Chem. Biol.*, June 2017, **38**: 117-126, doi:[10.1016/j.cbpa.2017.03.017](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.017). (volně dostupný preprint je na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5645069/pdf/nihms870040.pdf>)

Kontrolní otázky pro zopakování

1. Co studuje farmakokinetika?
2. Na čem závisí absorpce léčiva?
3. Co je biologická dostupnost?
4. Co je pravidlo pěti?
5. Čím je ovlivňována distribuce léčiva v organismu?
6. Co je zdánlivý distribuční objem a co charakterizuje?
7. Jak jsou léčiva metabolizována v játrech?
8. Jaké jsou výhody a nevýhody různých způsobů podání léčiva?
9. Jak mohou být léčiva z organismu eliminována?
10. Co to je clearance?

11. Co to je biologický poločas a jaký má význam pro dávkování léčiva?
12. Co může být příčinou rezistence.
13. Jak je možné překonávat rezistenci?
14. Jak lze léčiva rozdělit podle inovativnosti?
15. Jaký je rozdíl mezi původním a generickým léčivem?
16. Jaké jsou fáze výzkumu a vývoje nového léčiva?
17. Jaké jsou hlavní úkoly chemika v jednotlivých fázích výzkumu a vývoje?
18. Jak je dlouhá průměrná doba od objevu léčiva po jeho registraci a proč?
19. Jaké jsou metody screeningu?
20. Co si představujete pod pojmem validace cílových struktur?
21. Co a čím je vodítko (vodítková látka, lead compound) při výzkumu a vývoji nového léčiva?
22. Čím je charakteristická metodika objevování léčiv založená na fragmentech?
23. Co to je knihovna sloučenin?
24. Na čem je založena kombinatoriální syntéza?