

Fáze vývoje

U inovativních léčiv zahajuje fáze vývoje poté, co jsou vybrány látky, u nichž bylo předběžnými testy zjištěno, že mají farmakodynamické a farmakokinetické parametry odpovídající požadavkům. Vývoj se ale provádí i u generik, ekvivalentů vytipovaných léčiv, jejichž patentová ochrana i ochrana farmaceutických dat skončila nebo končí. **Hlavním cílem vývoje je reprodukovatelná, řádně zdokumentovaná a schválená výroba účinného, bezpečného a povoleného léčiva.**

Nové léčivo musí být povoleno příslušnými lékovými agenturami (FDA, EMA, lékové úřady jednotlivých států), tyto instituce schvalují i jeho způsob výroby. U originálních léčiv je vývojová fáze nejdelsí (8 i více let), nejnákladnější (nejméně 60% celkových nákladů) a nejrizikovější. Vývoj generických ekvivalentů zavedených léčiv není tak zdlouhavý a nákladný, stále však zůstává velmi náročný. Vzhledem k nutnosti předkládat k žádosti o povolení generického léčiva výsledky zkoušek dlouhodobé stability trvá vývoj generického léčivého přípravku ze substance od jiného výrobce v průměru 1-3 roky, v případě, že je vyvíjena i technologie výroby léčivé látky, je to průměrně 2-5 let. Od pracovníků vývoje se požaduje zkrácení této doby, dosažení co nejnižších výrobních nákladů, a to při vysoké kvalitě produktů

Fáze vývoje zahrnuje:

- U originálních léčiv finální optimalizaci farmakodynamických a farmakokinetických parametrů léčiva podle výsledků preklinických a klinických zkoušek
Vývojová fáze se v tomto případě prolíná s fází návrhu. Může zahrnovat přípravu profarmak, zejména pokud se při zkouškách *in vivo* ukáže, že je třeba řešit otázky biologické dostupnosti. Dále se v rámci fáze vývoje může řešit výběr polymorfů – krystalových modifikací léčivé látky, které mohou ovlivňovat vlastnosti léčivých přípravků.
- Vývoj lékové formy
- Vývoj technologie výroby léčivé látky i léčivého přípravku
- Optimalizaci a validaci výrobních postupů
- Návrh specifikace, vývoj a validace metod analytického hodnocení
- Preklinické a klinické zkoušky
U originálních léčiv je preklinické i klinické zkoušení značně náročné a rozsáhlé, u generik se omezuje na zkoušky stability a na průkaz bioekvivalence s originálním nebo i jiným dříve povoleným přípravkem. Složitější je situace u napodobenin originálních léčiv na bázi biopolymerů, u nichž je shoda chemického složení málo pravděpodobná a proto je požadován větší rozsah klinického zkoušení než u nízkomolekulárních generik
- Zpracování předepsané dokumentace a žádosti o registraci

Polymorfie

Má-li léčivá látka optimálně vyhovovat pro zamýšlené terapeutické použití, je třeba věnovat pozornost i její krystalové formě. Schopnost látky vytvářet více než jednu krystalovou formu, tj. schopnost molekul s určitou strukturou zaujímat různá prostorová uspořádání a přitom vytvářet různé krystalové mřížky, se nazývá **polymorfie**. Za polymorfni modifikaci bývá kromě různých krystalových forem považována i amorfní forma látky.

Poznámka: V chemii léčiv se dva blízké názvy používají pro zcela odlišné pojmy. Kromě polymorfie jako fyzikální charakterizace pevných forem látek, která je diskutována v této přednášce, to je polymorfismus genů, výskyt mutovaných genů se zaměněnými nukleotidy, který může být příčinou některých onemocnění, zejména rakoviny.

Různé krystalové formy mohou mít některé rozdílné fyzikálně chemické a další vlastnosti, které mohou ovlivnit způsob přípravy léčivých látek, jejich zpracování do léčivých přípravků a biologickou dostupnost. Polymorfie může významně ovlivnit i patentovou ochranu léčiv.

Situace je přitom poměrně složitá: Např. u acetylsalicylové kyseliny, aspirinu, byly popsány 4 krystalové modifikace. Vápenatá sůl atorvastatinu, léčiva ovlivňujícího hladinu cholesterolu v krvi, může tvořit 26 typů krystalů, k patentové ochraně bylo přitom přihlášeno dokonce 63 krystalových forem včetně různých hydrátů, někdy ovšem duplicitně. U sulfathiazolu bylo dokonce popsáno 120 různých krystalových forem bezvodé látky nebo jejich solvátů. U léčiv s charakterem kyselin a bází situaci dále komplikuje existence různých solí, z nichž každá může tvořit různé formy krystalů s různým množstvím krystalové vody nebo jiného rozpouštědla v krystalové mřížce. Odhaduje se, že asi třetina až polovina léčiv s molekulovou hmotností do 600 g/mol může vytvářet více než jeden typ krystalů a pokud se berou v úvahu různé soli a solváty, pak se odhady zvyšují na 56-87%. Rozdílné krystalové formy netvoří jen léčivé látky, ale i řada pomocných látek používaných při výrobě léčivých přípravků: např. hlavní složka kakaového másla používaného v čípcích může mít 4 formy, které se liší bodem tání; mannitol, složka řady tablet, krystaluje ve 5 formách lišících se stlačitelností.

Pseudopolymorfie (solvatomorfie) je schopnost látek tvořit různé **krystalické solváty**, z nichž jsou nejdůležitější **hydráty** se zabudovanou molekulou vody. Solváty resp. hydráty resp. mohou mít **stechiometrické** nebo **nestechiometrické složení**, nestechiometrickým solvátům se říká **klathráty**.

U stechiometrických solvátů jsou molekuly rozpouštědla integrální součástí krystalové mřížky a při jejich odstranění sušením dochází ke změně krystalové formy. Molekuly vody pevně zabudované do krystalové mřížky hydrátů nemohou interagovat s funkčními skupinami podléhajícími hydrolyze. Stechiometrické hydráty se snadno hydrolyzovatelnými skupinami proto bývají v pevném stavu docela stálé. U nestechiometrických solvátů jsou molekuly rozpouštědla vázány v krystalové mřížce volněji, takže při jejich odstranění sušením se mřížka nezhroutí, ale místa po molekulách rozpouštědla zůstanou volná.

Spolu s polymorfií ovlivňuje vlastnosti léčiv v pevném stavu i tvorba **solí**. Krystalová mřížka solí je tvořena ionty léčivé látky a příslušnými protioionty. Náboje disociovaných iontů a protioiontů se vzájemně kompenzují, takže soli mají stechiometrické složení. Slabé kyseliny a báze nemusí s léčivými látkami vytvářet soli iontového charakteru, ale určité adukty, které v pevném stavu mají rovněž stechiometrické složení. Místo silných iontových vazeb se přitom v jejich krystalové mřížce uplatňují slabší, ale stále dostatečně pevné vodíkové vazby a/nebo interakce dipól-dipól. Někteří autoři považují takové látky za další typ pseudopolymorfů, jiní je nazývají **kokrystaly**. Obecně jsou kokrystaly definovány jako krystalické materiály obsahující dvě nebo více různých neionizovaných molekul v jedné krystalové mřížce.

Kokrystaly odlišné od solí a solvátů může vytvářet až 60% látek. O tom, zda vznikne pravá sůl nebo forma kokrystalu, rozhoduje rozdíl v pK_a obou složek. Při větších rozdílech vzniká sůl, při menších kokrystal. Podle směrnice FDA vydané v r. 2018 (viz <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm281764.pdf>) je u solí tento rozdíl větší než 1, je-li menší, pak jde o kokrystaly, přechod mezi solemi a kokrystaly je však plynulý. Kokrystaly mohou vytvářet i látky, které nemají charakter kyselin a bází, ale jejichž molekuly mohou být mezi sebou propojeny vodíkovými můstky. Klasickým příkladem takového kokrystalu je chinhydron tvořený molekulami chinonu a hydrochinonu v poměru 1:1. Aby situace byla ještě o něco komplikovanější, mohou kokrystaly tvořit různé solváty a samy vykazovat polymorfii, tj. vytvářet různé krystalové mřížky. Podmínkou vzniku kokrystalu je, že pevnost nekovalentních vazeb mezi jeho komponentami je větší než pevnost vzájemných vazeb mezi molekulami léčiva v krystalové mřížce. Možnosti vzniku kokrystalů z různých složek lze do jisté míry predikovat s využitím výpočetní techniky. Podobně jako v případě predikce účinnosti v závislosti na struktuře je však třeba výsledek výpočtů potvrdit experimentálně.

Různé krystalové mřížky mohou vytvářet i **tautomery látky**.

Zatímco v roztoku existuje mezi tautomery rovnováha, krystaly obsahují vždy buď jeden nebo druhý tautomer. Krystaly různých tautomerů jsou tak vlastně tvořeny odlišnými molekulami, které pochopitelně vytvářejí různé krystalové mřížky. Někdy jsou rozdílné krystalové formy tautomerů označovány jako **parapolymorfy** (para = řecky téměř).

Vznik různých polymorfních forem může být zapříčiněn rozdílnou konformací látek. Různé konformery (rotamery) mají odlišný geometrický tvar molekul a bývají proto uspořádány do různých krystalových mřížek. Někdy ale mohou vytvářet polymorfy i molekuly s rigidní konformací, jejichž molekuly mají v krystalových mřížkách odlišnou vzájemnou orientaci nebo jsou různě těsně uspořádány.

Polymorfy s odlišnou konformací látky a polymorfy s odlišným uspořádáním molekul se stejnou konformací v krystalové mřížce jsou krajní případy polymorfie, kterých ale není mnoho. Většina známých polymorfů představuje jakési hybridy mezi oběma typy. Obecně ale platí, že rozdíly v geometrické stavbě molekul ovlivňují jejich uspořádání do krystalové mřížky a naopak způsob uspořádání molekul v krystalové mřížce může ovlivňovat jejich konformaci.

Různé konformery a tedy i polymorfy mají **odlišný obsah volné energie**. Obecnou tendencí látek je minimalizování jejich volné energie. Za daných podmínek je **termodynamicky stabilní** vždy jen jedna polymorfní forma s nejnižším obsahem volné energie. Ostatní formy jsou méně stálé, **metastabilní** a mohou proto přecházet na formu s nižší volnou energií.

Přeměna metastabilních polymorfů nemusí být kritická, pokud za daných podmínek probíhá pomalu. Metastabilní formou krystalického uhlíku je diamant. Jeho přeměna na termodynamicky stabilní grafit je však extrémně pomalá. Jindy ale může být přechod tak rychlý, že se některou metastabilní formu ani nepodaří za běžných podmínek izolovat. Snadnost a tedy i rychlost vzájemných přeměn určují rozdíly v obsahu volné energie polymorfů.

Z hlediska snadnosti přeměny se rozlišují **enantiotropní polymorfy**, které mohou přecházet na termodynamicky výhodnější formu i v pevném stavu a **polymorfy monotropní**, z nichž může být připravena odlišná forma jen krystalizací z roztoku nebo taveniny.

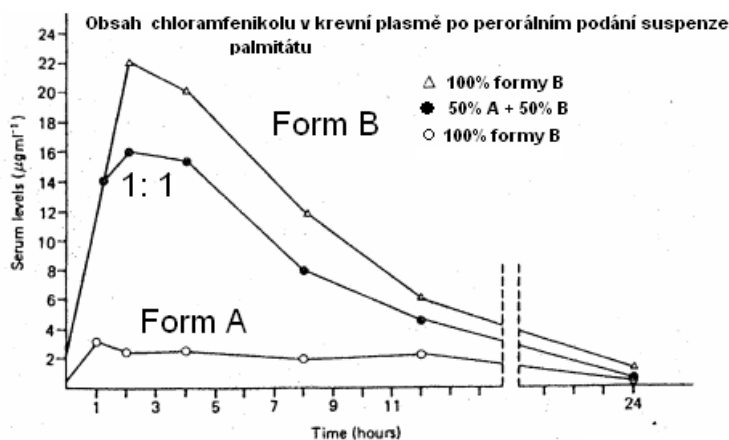
K přeměně jednoho polymorfu na druhý může docházet, až teplota systému překročí určitou hodnotu, tzv. bod (teplotu) přechodu (T_1). Při této teplotě mají oba polymorfy stejný obsah energie, při teplotách nižších má jedna forma nižší obsah volné energie a je tedy stabilnější, při teplotách nad T_1 je naopak stabilnější forma druhá. U enantiotropních polymorfů je T_1 nižší než bod tání. V monotropním systému je obsah volné energie jednoho polymorfu až do bodu tání trvale nižší nebo vyšší. Bod přechodu je nad bodem tání (jde o virtuální bod přechodu, protože v systému přítom nejsou dvě pevné fáze, ale pouze jedna kapalná fáze – tavenina).

Různé polymorfni formy mají odlišnou **hustotu a tvrdost, bod tání nebo sublimace, zbarvení a další optické charakteristiky, odlišnou tepelnou a elektrickou vodivost, různou rozpustnost a rychlost rozpouštění, fyzikální i chemickou stabilitu, hygroskopicitu, reaktivitu v pevné fázi a některé další vlastnosti**. Největší rozdíly jsou mezi **krystalickými a amorfními** formami látek. **Krystalické látky** mají atomy nebo molekuly uspořádány v definované krystalové mřížce, zatímco **amorfní forma** je nepravidelným seskupením molekul látky.

Pro své rozdílné vlastnosti mohou mít různé polymorfni formy pevných látek odlišné využití. Klasickým příkladem rozdílných vlastností i různého využití jsou dvě polymorfni formy uhlíku – diamant a grafit. První forma je transparentní a pro své optické vlastnosti se může používat k výrobě šperků, druhá neprůhledná, světlo absorbuje, takže může sloužit jako tuha při psaní písma. Diamant je nejtvrdější známý nerost a používá se proto jako brusivo, měkký grafit naopak slouží jako mazadlo. Diamant je nevodivý, naopak grafit dobře vede elektrický proud apod. U léčiv jsou sice rozdíly ve vlastnostech polymorfních forem podstatně méně výrazné, přesto však mohou mít značný dopad na farmakodynamické i farmakokinetické vlastnosti.

Pro farmakochemiky je důležitá hlavně **rozdílná rozpustnost** různých polymorfních forem a s ní související **biologická dostupnost**, která ovlivňuje účinnost nebo toxicitu léčiva. Obecně platí, že nejstabilnější forma se rozpouští nejméně.

Běžně jsou rozdíly v rozpustnosti polymorfních forem léčiv nanejvýš dvojnásobné, existují však výjimky. Známý je případ palmitátu chloramfenikolu, jehož metastabilní forma B má osminásobně vyšší biologickou dostupnost než stabilní forma A. Je-li metastabilní forma podána pacientovi, koncentrace chloramfenikolu v krevní plasmě může přesáhnout horní limit terapeutického rozmezí a nad příznivým účinkem převáží toxicita.



Podle A.J. Aigular, J.E. Zelmer, Dissolution behaviour of polymorphs of chloramphenicol palmitate and mefenamic acid, *J. Pharm. Sci.* 58, 983-7, (1969)

Rozdílná rozpustnost různých polymorfních forem může hrát důležitou roli i u některých kapalných lékových forem. Léčivo proti AIDS ritonavir (přípravek Norvir) bylo uvedeno na trh ve formě téměř nasyceného roztoku v ethanolu, jímž byly naplněny měkké želatinové tobolky. V době zahájení prodeje byla známa jen jedna polymorfni forma s dostatečnou rozpustností. Asi po dvou letech od uvedení na trh přestaly však mít některé tobolky potřebnou účinnost. Ukázalo se, že příčinou nebyl rozklad, ale že z roztoku vykristaloval předtím neznámý polymorf ritonaviru, který je asi 5 x méně rozpustný než běžný polymorf. Tím se zhoršila biologická dostupnost. Výrobce musel přípravek stáhnout z trhu a rychle vyvinout, otestovat a zaregistrovat novou lékovou formu, což mu přineslo značné finanční ztráty.

S určitým rizikem je spojeno použití enantiotropních polymorfních forem léčivých látek při výrobě pevných lékových forem. Screening pevné fáze se proto stal důležitou součástí vývoje léčivých přípravků

Méně stálý polymorf se při lisování do tablet nebo jiném zpracování, při němž dochází k tepelnému a tlakovému namáhání, ale někdy již dlouhodobém skladování, může přeměnit na stálejší. Tato přeměna může být příčinou nežádoucích změn vlastností léků, jako je rozpad tablet nebo snížení biologické dostupnosti. Je-li však zaručeno, že během výroby nebo skladování léčivého přípravku nebude k takovým změnám docházet (vysoký T_1) může být použití některých metastabilních polymorfů výhodné, protože jsou rozpustnější a také se někdy lépe zpracovávají.

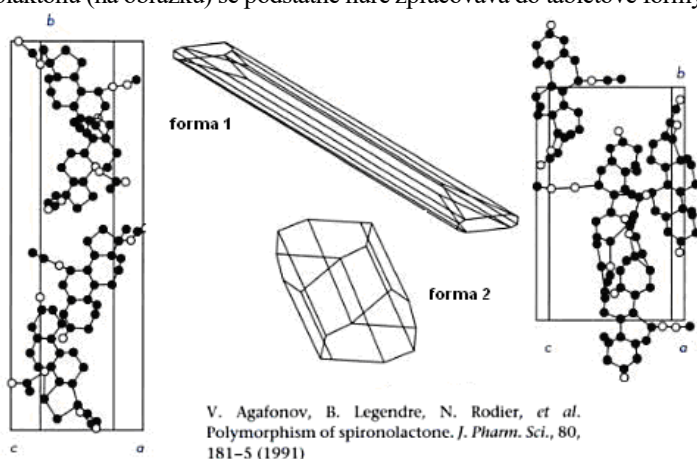
Podobný vliv na zpracovatelnost léčivé látky, fyzikální vlastnosti a biologickou dostupnost může mít i výběr kokryystalu. Při studiu přípravy kokryystalů s různými karboxylovými kyselinami se při použití kyseliny glutarové zvýšila rozpustnost jednoho léčiva 18x a biologická dostupnost 3x ve srovnání s kokrystaly získanými s monokarboxylovými kyselinami.

To, zda a jak se vliv polymorfie nebo typu kokryystalů na biologickou dostupnost projeví, závisí na polaritě léčiva, která určuje jeho rozpustnost ve vodě.

Je-li rozpustnost léčiva dostatečně vysoká (tj. když se nejvyšší podávaná dávka léčiva zcela rozpustí v méně než 250 ml vodného prostředí v rozmezí pH od 1,0 do 7,5), rozdíly v rozpustnosti různých polymorfů nebo kokryystalů biologickou dostupností neovlivňují. Léčivo je přitom prakticky po celou dobu setrvání v gastrointestinálním traktu ve formě roztoku. Jeho absorpce pak závisí jen na objemu vodného roztoku léčiva v tenkém střevu (ten v průměru činí zmíněných cca 250 ml) a schopnosti jeho molekul pronikat membránou buněk střevní sliznice, tj. na rozdělovacích a difuzních koeficientech. Odlišná situace ale nastává, je-li léčivo rozpustné ve vodném prostředí jen částečně. Rychlost rozpouštění pak ovlivňuje průběh absorpce a velikost maximální absorbovatelné dávky rychle klesá. Aby maximální absorbovatelná dávka dosahovala hodnoty, která je potřebná k vyvolání požadované terapeutické odezvy, musí mít léčivo určitou minimální rozpustnost a rovněž i rychlost rozpouštění musí mít určitou minimální hodnotu. Rychlost rozpouštění léčivého přípravku závisí nejen na velikosti krystalků účinné látky, ale i na polymorfii. Nejrychleji se rozpouštějí amorfní formy látky, které také mají i nejvyšší rozpustnost.

Kromě rozpustnosti jsou při výrobě pevných lékových forem důležité i rozdíly v **parametrech zpracovatelnosti** polymorfních a pseudopolymorfních forem léčivých látek do léčivých přípravků.

Zpracovatelnost ovlivňují rozdíly v bodech tání, hygroskopicitě, hustotě nebo sypané hmotnosti, filtrovatelnosti, stlačitelnosti směsí, mísitelnosti s pomocnými látkami, soudržnosti částic, smáčivosti, tokových vlastnostech pevných směsí apod. Obecně platí, že při výrobě pevných lékových forem jsou špatně zpracovatelné látky, které vykristalovaly ve formě jehliček. Např. polymorfní forma 1 spironolaktonu (na obrázku) se podstatně hůře zpracovává do tabletové formy než forma 2:



Pro reprodukovatelnou přípravu léčivých přípravků je proto třeba mít dostatečné informace o připravovaných a/nebo používaných polymorfních, pseudopolymorfních nebo kokryystalových formách léčivých i pomocných látek a podmínkách jejich přeměn. **Studium polymorfie se proto stalo důležitou součástí vývoje léčiv** a jeho výsledky jsou vyžadovány institucemi povolujícími uvedení léčiva na trh.

Ještě donedávna mělo hledání nalézání různých krystalových forem spíše náhodný charakter, systematický přístup se prosazuje až v posledních letech. Nalezení polymorfních forem, které jsou pro dané použití nejvhodnější, je předpokladem úspěchu léčiva. Studium polymorfie substance by mělo být zahájeno v časných stádiích práce na projektu vývoje léčiva, protože jeho výsledky jsou důležité jak pro vývoj léčivých přípravků, tak i pro optimalizaci procesu výroby účinné látky.

Polymorfie a tvorba kokryystalů je důležitá i z patentoprávního hlediska.

Dříve nepopsané krystalové formy léčiv jsou obecně považovány za nové a inovativní. Mohou proto být patentově chráněny. Patentování různých polymorfů nebo pseudopolymorfů léčivých látek forem, jakož i různých typů solí, kokryystalů a způsobů jejich přípravy, využívají farmaceutické firmy k prodloužení patentové ochrany původní molekuly a potlačení konkurence nebo naopak k překonání dosavadních patentových bariér. Jsou-li určité polymorfní a pseudopolymorfní léčivé látky patentově chráněné, je pro výrobce generik vstup na trh podmíněn vyhledáním a používáním jiné patentově volné krystalové formy. Nové formy přitom mohou mít lepší, ale často mívají horší vlastnosti. Většina patentů chrání účinné látky a „jejich farmaceuticky přijatelné soli, hydráty a solváty“, řada nových patentů obecně chrání i „různé polymorfy“, látky. Spory pak jsou často vedeny o to, zda určitá forma látky nebo její sůl je skutečně nová nebo zda její příprava představuje „vynálezickou činnost“, tj. zda nebyla připravena zřejmým a předvídatelným postupem. Lepší šance na patentovou ochranu přitom mohou mít kokrystaly, jejichž vznik, forma a vlastnosti (stabilita, rychlost rozpouštění apod.) vyžaduje větší míru vynálezkové činnosti.

Krystalové formy látek se získávají při chladnutí nasycených roztoků, tavenin, par sublimujících látek, při odpařování rozpouštědel z roztoků a při srážení. Hledání stabilních polymorfních forem látky bývá často zahajováno studiem stárnutí suspenzí.

Přítom se připraví suspenze (nesmí dojít k rozpuštění) látky v různých rozpouštědlech nebo jejich směsích (např. s vodou) a nechají se při určité teplotě, popř. za dalších vhodně zvolených podmínek po delší dobu stárnout (jeden měsíc, popř. i déle). Po dostatečně dlouhé době by přítom metastabilní forma látky měla přejít na formu termodynamicky stabilnější. Zjistí-li se, že přítom vznikla nová krystalová forma, studium stárnutí by se mělo opakovat se suspenzí této nové formy. Vznik stabilní formy lze urychlit aplikací ultrazvuku, střídáním zahřívání a ochlazování (za předpokladu, že nedojde k úplnému rozpuštění), popř. očkovaním podobnou látkou.

Jiný způsob hledání stabilních polymorfních forem nabízí studium **působení tepla** na látku.

Při zahřívání hydrátů nebo obecně solvátů může docházet k fázovému přechodu a vznikne nesolvatovaný resp. bezvodý polymorf, případně může být krystalová mřížka látky rozrušena za vzniku amorfního produktu. Zahřívát lze krystalické solváty v pevném stavu nebo i suspendované v rozpouštědle, v němž se rozpouštějí jen omezeně. U klatrátů molekuly rozpouštědla opouštějí při zahřívání krystalovou mřížku bez jejího narušení. Pokud se látka při zahřívání nerozkládá, ale taje, může se zahřát až vznikne tavenina a pak nechat chladnout rozdílnou rychlostí (rychle, střední rychlostí, pomalu). U vzniklých pevných produktů se změří jeho rentgenové spektrum a další charakteristiky, aby se zjistilo, zda vznikla krystalová forma odlišná od původního polymorfu. Při rychlém zchlazení vznikají spíše metastabilní formy, při dostatečně pomalém formy termodynamicky stálé. Při jiném metodickém postupu se látka zahřeje těsně pod bod tání, nechá určitou dobu při této teplotě a pak se zjišťuje, zda došlo ke změně její krystalové mřížky. Někdy se látka nechá vypařit a zchladí se její páry. U sublimátu se pak zjišťuje, zda jeho forma se liší od formy látky před sublimací.

Nejdůležitějším způsobem přípravy polymorfů při výrobě léčiv je **krystalizace látky z roztoku**.

Při krystalizaci hraje klíčovou roli výběr rozpouštědla, protože rozpouštědlo může favorizovat určitý polymorf před druhým. Zkouší se proto krystalizace z rozpouštědel s různou polaritou i z jejich směsí. Vedle krystalizace založené na rozdílné rozpustnosti látky při různých teplotách se studuje i snižování rozpustnosti (srážení) přídavky „špatných“ rozpouštědel (antisolventů) nebo přídavky rozpustných solí („vysolení“). Pozornost se přitom věnuje parametrům procesu krystalizace, jako je teplota, koncentrace roztoku, rychlost ochlazování nebo odpařování rozpouštědla, obsah vody, pH, přítomnost iontů, vliv míchání, rychlost přidávání antisolventu, doba stání roztoku, stupeň přesycení apod. Výsledek ovlivňuje i čistota látky nebo přítomnost dalších látek v roztoku. Nelze-li zpočátku použít čistý produkt, je v další fázi vývoje nutné ověřit vliv nečistot na krystalizaci, popř. ji opakovat s čistší látkou. Vznik určité formy může také být určen přítomností zárodečných krystalků. Při ochlazování nebo srážení vznikne přesycený roztok, v němž zárodečné krystalky někdy vznikají spontánně. Jindy se však látka po dlouhou dobu sama nevyučuje. Krystalizaci pak lze iniciovat naočkováním, tj. přidáním zárodečných krystalků. Krystalová forma „oček“ přitom většinou určuje krystalovou formu produktu. K přípravě stabilních forem se mohou použít např. krystalky získané stárnutím suspenzí nebo působením tepla. Pro reprodukovatelnou přípravu některých polymorfů je účelné uchovávat jejich krystalky, bez naočkování by mohla spontánně vykrystalovat forma jiná. Nejsou-li vhodné krystalky k dispozici, lze k naočkování použít náhradní „pseudoočka“, které jsou strukturálně kompatibilní s požadovanou krystalovou formou, ale nejsou totožné. Jak již bylo řečeno, krystalová forma, která má za daných podmínek vyšší obsah volné energie, je termodynamicky méně stálá a má snahu přecházet na formu s nižší energií. Proces krystalizace, který „jde proti termodynamice“, tj. poskytuje metastabilní polymorfy, se jen obtížně definuje, je méně robustní a jeho výsledek závisí na pečlivém dodržení kritických parametrů.

Kokrystaly lze připravovat podobným způsobem jako polymorfní formy látky.

Při vyhledávání vhodné formy lze využít stárnutí suspenzí směsí látek v rozpouštědle, v němž se ani jedna ze složek kokrystalu zcela nerozpouští, dále pak společné tavení nebo mletí suchých nebo zvlhčených složek kokrystalů, krystalizaci směsi z roztoku buď po zchlazení nebo odpaření rozpouštědla, popř. po vysrážení antisolventem. Ve výrobním měřítku lze k přípravě kokrystalů využít i nástřik roztoku směsi složek do rozprašovací sušárny, popř. extruzi zvlhčené směsi látek a vysušení extrudátu.

Hydráty se připravují buď krystalizací z vodných roztoků nebo roztoků obsahujících definované množství vody jako kosolventu, popř. i působením vlhkosti na bezvodé látky. Analogicky se připravují i jiné **solváty**.

Vliv vlhkosti se studuje pomocí mikrovah v temperované komůrce s definovanou vlhkostí prostředí. Přítom se zjišťuje, zda látka vodu absorbuje nebo naopak uvolňuje. Pokud je voda absorbována, je třeba zjistit, zda dochází ke stechiometrické nebo nestechiometrické hydrataci. Vzniká-li hydrát, je třeba vědět, zda vzniká přímo nebo přes meziproducty s nižším obsahem vody. Pokud může látka vytvářet hydrátů (nebo obecně solvátů) několik, může být systém velmi složitý a jeho studium značně náročné, protože k přeměnám některých solvátů může docházet i během krystalizace. Přeměny hydrátů při sušení nebo jiném tepelném zpracování se studují pomocí termogravimetrie.

Krystalizace neposkytuje jen určité polymorfy, ale je i jedním z nejúčinnějších způsobů čištění látek.

Krystalické produkty mívají vyšší čistotu než látky amorfnní, na jejichž nepravidelném povrchu se snáze zachytí cizí molekuly (např. zbytky rozpouštědel). Amorfnní formy proto mohou být i chemicky méně stálé.

K vytvoření termodynamicky stabilní polymorfnní formy krystalu nebo kokrystalu musí mít molekuly dostatek času.

Při rychlém ochlazení nasyceného roztoku nebo taveniny nebo rychlém srážení může vznikat kromě krystalků i amorfnní forma. Určitý podíl amorfnní formy může dokonce vznikat i při velmi jemném mletí (mikronizaci) krystalických produktů. Obvykle se však amorfnní produkty připravují buď rychlým odpařením rozpouštědla, k němuž dojde při nástřiku jemných kapiček roztoku do přehřátého prostoru v rozprašovacích sušárnách nebo zmražením vodných roztoků látek a odstraněním ledu mrazovou sublimací (lyofilizací). Existují však i lyofilizační techniky, které umožňují vznik produktů s krystalickým charakterem. Lyofilizace je hlavní způsob výroby tzv. suchých injekcí, které se převádí na roztok, „rekonstituují“, těsně před aplikací.

Aby bylo možné polymorfii řádně studovat, musí současně se screeningem polymorfů probíhat **vývoj metod zjišťování polymorfnních forem látek a metod hodnocení polymorfnní čistoty produktů**. V případech, kdy rozdíly v polymorfnní nebo pseudopolymorfnní formě mohou ovlivnit biologickou dostupnost a stabilitu léčivého přípravku, **předepisují kontrolu polymorfnní čistoty i lékopisy**.

Polymorfnní, pseudopolymorfnní nebo kokrystalické formy látky lze rozpoznávat pod optickým nebo elektronovým mikroskopem podle tvaru krystalků (jehlice, lístky, tyčinky, destičky apod.), v poli polarizačního mikroskopu vykazují krystalky látky charakteristický dvojlom. Mikroskop s programovatelně vyhřívaným a chlazeným stolem umožňuje vizualizovat fázové přechody a přeměny polymorfů. I když současná výpočetní technika umožňuje poměrně dokonalou analýzu obrazu, mají mikroskopická pozorování stále jen spíše kvalitativní charakter, kvantifikace výsledků je stále obtížná. Důležité výsledky poskytuje také měření bodů tání nebo stanovení rozpustnosti látky. Tyto techniky jsou užitečné zejména pro léčivé látky, ale nejsou použitelné u léčivých přípravků obsahujících různorodé směsi, často vzájemně slisované do tablet, nebo jinak upravené. V tomto případě je však důležité zjišťování rychlosti uvolňování a rozpouštění léčivé látky, tzv. disoluce.

Jednoznačnou charakteristikou polymorfnních forem jsou **rentgenová difrakční spektra**, která lze využívat jak ke kvalitativnímu, tak i kvantitativnímu posuzování krystalové struktury látek.

Na různých krystalových mřížkách dochází k různému ohybu rentgenových paprsků, takže jednotlivé polymorfnní formy mají rentgenové difrakční obrazce se zřetelně odlišenou strukturou. Připravovat monokrystaly různých polymorfů pro rentgenostrukturální měření by bylo obtížné. Pro studium polymorfie se proto využívají „práškové diagramy“. Ty vznikají při ohybu rentgenových paprsků na velkém souboru malých krystalků různě orientovaných vůči směru paprsků záření. Na práškových diagramech krystalických látek lze pozorovat oddělené pásy, jejichž vzdálenosti (odpovídající úhlu ohybu paprsků v daném systému) jsou pro každý polymorf charakteristické. Amorfnní látky poskytují diagramy, jejichž pásy mají neostrý difúzní charakter. Rentgenografické techniky a vyhodnocovací software byly v posledních letech propracovány natolik, že díky moderní přístrojové technice může být využití práškových diagramů ve farmaceutické analytice stejně běžné, jako např. HPLC.

Kromě rentgenografických metod mohou být k charakterizaci polymorfů a studiu jejich vzájemných přeměn použity i některé jiné fyzikálně chemické metody.

Polymorfnní, pseudopolymorfnní a kokrystalové formy látek mají kromě odlišných difraktogramů i rozdílná NMR, infračervená nebo Ramanova spektra v pevné fázi.

Ke studiu vzniku i případných přeměn jednotlivých polymorfů při krystalizaci nebo při zpracování substancí do léčivých přípravků a jejich skladování slouží zjišťování objemových a entalpických změn provázejících fázové přechody při změnách teploty pomocí termogravimetrie, diferenciální skenovací kalorimetrie nebo densitometrie.

Tyto metody poskytují průměrné výsledky pro celý systém. Pokud v systému mohou současně probíhat různé změny, je třeba kombinovat různé metody studia. Např. jestliže při krystalizaci vznikají současně různé typy krystalů, je nutné sledovat průběh krystalizace také pomocí mikroskopu, popř. pomocí jiných fyzikálních metod.

Pro návrh optimálních metod krystalizace nebo jiných způsobů výroby žádané polymorfnní, pseudopolymorfnní nebo kokrystalové formy substancí a jejich chování při výrobě nebo skladování léčivých přípravků je důležitá znalost **termodynamiky polymorfnního systému**. Stejně tak je důležitá i znalost rychlosti přeměn probíhajících v polymorfnním systému – tj. **kinetiky polymorfnních přeměn**.

Z technologického hlediska jsou důležité zejména přeměny probíhající při operacích provázených vzrůstem teploty, např. při mletí, sušení, apod., ale také při skladování. Dobu a podmínky konverze metastabilního polymorfu na stálější je přitom třeba zjišťovat experimentálně. I když se znalosti důležitých termodynamických údajů rozšiřují, předpovědi změn krystalové formy nejsou zatím zcela spolehlivé.

Vývoj procesů výroby léčivých látek

Poté, co byla vybrána, laboratorně připravena a otestována nová léčivá látka s dobrými farmakologickými vlastnostmi nebo bylo na základě marketingového rozboru zvoleno léčivo, jehož generický ekvivalent má být vyvíjen, stává se dalším úkolem vypracování optimálního postupu výroby látky v požadovaných objemech a kvalitě.

Vývoj procesu výroby je úkolem technologů. Je zahajován optimalizací postupu laboratorní syntézy, pak se vypracovaný laboratorní postup převádí do výrobního měřítka (scaling up). Přitom většinou nejde jen o pouhé zvětšení velikosti šarží. Výsledkem často bývá technologický proces, který se dosti výrazně odlišuje od původního laboratorního postupu. Při prvních syntézách v laboratoři jde hlavně o rychlou přípravu látky pro různé preklinické zkoušky, takže použití špatně dostupných a drahých surovin a reagentů nemusí být na závalu. Pro výrobu je však třeba nalézt levnější a snáze dostupné alternativy. Použití rozpouštědel s bodem varu vyšším než je teplota páry z běžných rozvodů (121°C, 200 kPa), např. dimethylformamidu, není v laboratoři problémem, výrobní technologii to však může značně komplikovat, vyžádat si nákladné úpravy inženýrských sítí a nákup dražšího vybavení. Totéž platí pro postupy vyžadující práci za teplot nižších než je teplota solanky. Vážnou komplikací výrobního procesu může být i práce s vysoce těkavými hořlavými látkami jako diethylether, alkalickými kovy, regulace silně exotermních reakcí apod. Různá úskalí postupu přípravy je třeba eliminovat již při optimalizaci laboratorního postupu. Současně je třeba již při optimalizaci laboratorního postupu studovat vliv různých faktorů na hlavní cílové parametry připravovaného produktu, tj. na výtěžek a kvalitu.

Vývojový pracovník si musí předem ujasnit strategii budoucí výroby. Musí dobře znát možnosti výrobního zařízení, které bude mít k dispozici a postup výroby jim pokud možná přizpůsobit. Musí zvažovat veškerá rizika budoucí výroby. Vedle technických problémů přitom musí při vypracování výrobní technologie řešit i otázky ekonomiky výroby, analytické kontroly surovin a meziproductů, kontroly a regulace výrobních procesů, bezpečnosti práce a ochrany životního prostředí. V průběhu vývoje je třeba předpokládané výrobní postupy předem řádně namodelovat.

Převádění laboratorních postupů do výroby bývá rozděleno do několika fází. Rozdělení přitom závisí na velikosti předpokládaného finálního objemu výroby. První fází je již zmíněná optimalizace laboratorního postupu. Pak se vypracovaný postup převede do „poloprovozního“ měřítka (někdy dokonce předtím ještě do měřítka „čtvrtprovozního“) a podle získaných zkušeností se pak doladuje tak, aby při výrobě v konečném měřítku nedocházelo k nepředvídaným problémům. Předpokládá-li se velký objem výroby látky, řeší se někdy i kontinualizace celého výrobního procesu nebo alespoň některých jeho stupňů. Po povolení prodeje léčiva (registraci) zahajuje pravidelná výroba, někdy až v tunových množstvích.

Mimořádnou pozornost je ve všech fázích vývoje třeba věnovat dosažení požadované **kvality produktů** při každé výrobní šarži.

Kdyby se to nepodařilo, bylo by třeba proces změnit. To je časově i finančně náročné. Změny postupu výroby léčiv je předem třeba oznamovat odběratelům i lékovým agenturám v jejich zemích a nechat si je od nich schvalovat. Bez schválení nemůže být léčivo vyráběné změněným postupem dodáváno. Povolení změny není u všech lékových agentur stejně pružné a rychlé, takže se může stát, že výrobce buď ztratí některé trhy, nebo bude muset stejné léčivo vyrábět dvěma různými postupy – starým a novým.

Výsledkem vývoje postupu výroby léčiva tedy musí být technologický proces, který je **účelný, účinný, levný, uskutečnitelný v reálných podmínkách, dobře reprodukovatelný a robustní, takže trvale poskytuje produkt požadované kvality**. Výrobní proces je třeba **validovat**, tj. zajistit, že všechny **specifikace surovin i používaných pomocných látek a kritické procesní parametry, které ovlivňují kvalitu finálního produktu, jsou trvale zajištěny**. Přitom musí být v první řadě zjištěno, na čem závisí kvalita finálního produktu. U jakostních kritérií pro suroviny, činidla a meziproducty, jakož i u procesních parametrů musí být dokumentovaně prokázáno, zda a jak je jejich dosažení kritické pro získání kvalitního produktu.

U procesních parametrů musí být určeno kritické rozmezí, v němž se mohou pohybovat, aniž by to mělo dopad na kvalitu produktu. Jestliže se ukáže, že např. kvalita produktu závisí na teplotě, při níž se reakce provádí, pak je třeba v první řadě určit, v jakém rozmezí se tato teplota může pohybovat, aby byla zajištěna požadovaná kvalita finálního výrobku. Podle požadovaného rozmezí teplot se pak musí volit zařízení a teplotní režim při výrobě.

Syntéza léčiva je obvykle vícestupňová.

Postup vedoucí ke konečnému produktu může být **lineární**, kdy se postupuje krok za krokem od výchozí látky přes jednotlivé meziprodukty ke konečnému produktu ($V \rightarrow M_1 \rightarrow M_2 \rightarrow \dots P$) nebo **konvergentní**, kdy se dva nebo více meziproduktů syntetizují odděleně a pak se jejich reakcí připraví cílový produkt nebo jeho poslední předstupně.

Přitom je třeba vždy usilovat o to, aby v každém stupni byly dosaženy co nejvyšší výtěžky, produkty byly snadno izolovatelné a vyčištěním zbaveny výchozích látek nebo vedlejších produktů, které by mohly negativně ovlivnit čistotu finálního produktu. Při syntéze chirálních látek je třeba usilovat o dosažení co nejvyšší stereospecificity a zamezení případné racemizace. U finálních produktů může být cílem i reprodukovaná příprava látky s požadovanou krystalovou strukturou.

Náročnost vývoje procesu výroby léčiva se v současné době podstatně zvýšila.

- Molekuly léčiv jsou stále složitější – mají vyšší molekulovou hmotnost, komplikovanější strukturu, vyšší obsah heteroatomů a chirálních center
- Současná farmaceutická legislativa klade vysoké nároky **na řádně zdokumentovaný průkaz kvality, bezpečnosti a účinnosti léčiva vyrobeného standardním a validovaným postupem.**
- Požadavky na kvalitu léčiv a postupy jejího stanovení jsou stále náročnější – dnes se většinou vyžaduje, aby léčiva měla čistotu vyšší než 99% a obsah jednotlivých nečistot se pohyboval pod 0,1%.
- Zvyšuje se počet sledovaných parametrů produktu (optická čistota, polymorfie atd.) i procesu
- Vypracování spolehlivých metod analytické kontroly kvality se stejně jako opatření vedoucí ke zajištění kvality produktu stává nedílnou součástí výroby procesu.

Přes zvyšující se nároky by měl být vývoj výrobních postupů a procesů (včetně požadovaných zkoušek) co nejrychlejší. Pro klinické zkoušky je zapotřebí připravovat léčiva v dostatečném množství v podstatě již řádně vyvinutým finálním procesem. Jakmile je produkt zaregistrován na základě klinických zkoušek s přípravkem získaným určitým procesem, další změny procesu, které by mohly ovlivnit kvalitu produktu (např. možnost vzniku jiných nečistot) vyžadují provedení nových finančně a hlavně časově náročných zkoušek **stability** a „**bioekvivalence**“ s produktem vyrobeným předchozím postupem. Bez nich nelze prokázat, že se nesnížila jakost, účinnost a bezpečnost produktu. Na výsledcích vývoje výrobních procesů závisí nákladovost výroby a včasnost uvedení léčiva na trh a tím i jeho obchodní úspěch. Odpovědný přístup k vývoji procesů proto zahrnuje pečlivé plánování a integraci různých aktivit, využívání výpočetní techniky při návrhu a hodnocení experimentů, automatizaci, řízení a monitoringu proměnných parametrů procesu, trvalé rozvíjení znalostí a dovedností včetně případného využívání všech možností výhodné spolupráce s externími pracovišti („outsourcing“).

Má-li být vypracován efektivní a dobře reprodukovatelný výrobní proces, je třeba znát, jak různé proměnné faktory ovlivňují čistotu a stabilitu produktu, výtěžky, jakož i jeho farmaceuticky významné fyzikální vlastnosti (polymorfie, velikost částic) a v neposlední řadě i jeho cenu.

Při vývoji technologie výroby léčiva je třeba vedle hledání optimálních procesních parametrů také připravit dostatečná množství látky pro vývoj analytických postupů, testování akutní toxicity, vývoj způsobu podání léčiva (perorálně, parenterálně), preformulační zkoušky léčivého přípravku a předběžné zkoušky stability.

Podle výsledků zkoušek se navrhuje **specifikace produktu**, tj. určí se, co se bude u produktu zkoušet a jak, jaké budou předepsané limity, identifikují se nečistoty a určí standardy látek, které budou zapotřebí pro analytickou kontrolu.

Specifikace je součástí žádosti o povolení klinických zkoušek. Specifikované limity musí splňovat všechny budoucí šarže léčiva. Mohou být bez dopadů na povolení výroby od lékových autorit zpřísněny, ovšem kdyby je bylo třeba změkčit nebo změnit, muselo by se prokázat, že produkt podle nové specifikace je **bioekvivalentní** s původními produkty. Určit hned zpočátku příliš měkké limity není ovšem možné, protože specifikace musí splňovat určité obecné a zpravidla poměrně značně náročné požadavky na jakost, např. obsah jednotlivé neznámé nečistoty nemá překročit 0,1%.

V další etapě vývoje je ale třeba léčivo připravit již v množství desítek kg pro pokračování toxikologických studií a vývoj lékové formy, někdy i pro fázi I klinického zkoušení.

Používaný postup se přitom může odlišovat od konečného postupu jen v některých parametrech. Vždy je však třeba dbát na kvalitu produktu udávanou obsahem účinné látky, druhem nečistot a jejich zastoupením.

K přípravě léčiva pro klinické zkoušky fáze II a III laboratorní výroba již nestačí, ale je třeba použít čtvrt- nebo poloprovozní zařízení. S vývojem konečného výrobního procesu na poloprovozním zařízení se současně vyrábí léčivá látka v množství až stovek kg (podle indikace léčiva) pro zkoušení na velkých souborech pacientů. Proces výroby by přitom už měl být finální, aby se již nemusel zásadně měnit.

Prioritou vývoje procesu je **poslední stupeň syntézy** a zejména pak postupy **čištění konečného produktu**, které zpravidla nejvíce ovlivňují kvalitu vyrobené léčivé látky.

Standardními postupy purifikace je krystalizace, precipitace a extrakce. Destilace se používá jen výjimečně, protože léčivy jsou většinou pevné látky, které se při vyšších teplotách rozkládají. Velmi účinnou purifikační technikou je preparativní kapalinová chromatografie, její provedení je však relativně pracné a nákladné. V závěrečných fázích vývoje výrobního procesu třeba sledovat nejen obsah účinné látky a nečistot, ale i parametry, které organičtí chemici někdy opomíjejí. Je to např. obsah anorganických příměsí, jako je obsah těžkých kovů (předepisován v tisícinách procenta) nebo některých aniontů, které mohou být při HPLC, fotometrii apod. „neviditelné“, ale mohou snadno překročit předepsané limity nebo jejich přítomnost může nežádoucím způsobem snižovat hodnotu obsahu účinné látky. Pozornost je třeba věnovat i krystalové formě (polymorfii) a velikosti částic, na nichž může záviset rozpustnost a časový průběh uvolňování a rozpouštění léčivé látky z léčivých přípravků (průběh disoluce), biologická dostupnost a stabilita léčiva.

První stupně procesu výroby léčiva se někdy optimalizují, až když už byl vyvinut optimalizovaný postup provedení finálního stupně. K jednotlivým krokům syntézy se však přitom musí přistupovat jako k integrální součásti celého procesu výroby s cílem dosáhnout co nejlepšího **celkového** výsledku.

Jde např. o to, aby suroviny neobsahovaly nečistoty, které by mohly přecházet do finálního produktu. Také je třeba zvážit, který meziprodukt je třeba izolovat a čistit a kdy to není třeba. Snižování počtu prováděných operací a manipulací s materiálem snižuje riziko záměn a kontaminací, někdy je dokonce možné několik stupňů syntézy provádět bez izolace meziproduktů v jednom zařízení („jednom hrnci“ – one-pot synthesis). Tím se mohou významně snížit výrobní náklady, nesmí však přitom být snížena kvalita konečného produktu. Nemalou pozornost je třeba věnovat organizaci práce a toku materiálu. Toky materiálu se ve výrobě nesmí křížit, aby byla eliminována možnost záměny surovin a činidel. Dále je třeba se zaměřit na odstranění „úzkých hrdel“, které nepříznivě ovlivňují efektivnost procesu, tj. objem výroby za časovou jednotku a tím i cenu. U některých procesů se zkouší možnost kontinuální výroby.

Spolu s procesem výroby jako takovým se vypracovávají i postupy čištění aparatur (včetně analytických postupů pro kontrolu čistoty výrobního zařízení), postupy mezioperační kontroly a také se specifikují kvalitativní parametry surovin, činidel a meziproduktů.

V neposlední řadě se řeší i otázky bezpečnosti práce, ochrany zdraví pracovníků a ochrany životního prostředí. Ověřují se možnosti recyklace odpadů, možnosti omezení množství odpadů určených na likvidaci a snižování emisí těkavých látek.

Jak bylo zmíněno, pro trvalé dosahování požadované kvality, je třeba, aby byly dodrženy tzv. **kritické atributy kvality** (CQA – Critical Quality Attributes), na nichž závisí jakost konečného produktu – léčivého přípravku ve vztahu k jeho léčebnému účinku. Kvalita léčivých přípravků samozřejmě závisí na attributech kvality účinné léčivé látky. Aby byly tyto atributy dosaženy, musí být definovány a kontrolovány atributy kvality surovin a meziproduktů a dodržovány **kritické parametry procesu** (CPP – Critical Process Parameters), např. rozmezí teplot při určité operaci. Zásady pro vývoj procesů výroby i pro konečnou výrobu léčivých látek s důrazem na jejich kvalitu jsou předmětem směrnice Q11 vydané v listopadu 2012 Mezinárodní radou pro harmonizaci ICH.

ICH (= International Council for Harmonization), Mezinárodní rada pro harmonizaci, starší (do října 2015) název Mezinárodní konference pro harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčiv, byla založena v r. 1990 s cílem dosáhnout celosvětový soulad požadavků lékových autorit, který by zjednodušil export léčiv. Jednání ICH se zprvu soustředovala hlavně na sladění lékopisných požadavků v USA, Evropě a Japonsku, v posledních letech má však ICH celosvětový charakter. Její agenda se nyní stále více zaměřuje na obecné problémy související s kvalitou léčiv. Svědčí o tom vedle zmíněné směrnice Q11 např. i směrnice Q8 věnovaná vývoji ve farmaceutickém průmyslu, Q9 zabývající se řízením jakostních rizik a Q10 implementací systému kvality ve farmaceutickém průmyslu. Tyto směrnice doplňují zásady tzv. Správné výrobní praxe. Mají usnadňovat inovace, zajišťovat trvalé zlepšování jakosti a posilovat propojení mezi vývojem a výrobou léčiv, a to jak léčivých látek, tak i léčivých přípravků.

Při vývoji procesů výroby bezpečných a kvalitních léčiv jsou využívány dva přístupy.

Tradiční přístup spočívá v nastavení určitých parametrů a jejich specifického rozmezí pro jednotlivé kroky procesu, při jejichž splnění se předpokládá opakované dosahování reprodukovatelné kvality produktů. Kontrola výroby spočívá v testování podle předem definovaných kritérií. Pokročilý přístup vychází z pochopení toho, jak jednotlivé vstupní a procesní parametry ovlivňují kvalitu finálních produktů a přináší do vývoje procesu strategii „řízení rizik“.

Součástí pokročilého přístupu je vymezení **“prostoru návrhu“** (Design Space).

Ten je směrnicemi ICH definován jako vícerozměrová kombinace a interakce vstupních proměnných (např. atributů surovin) a procesních parametrů, která **prokazatelně poskytuje záruku kvality finálního produktu**. Prostor návrhu je zpracován výrobcem a schvalován lékovými autoritami.

Pro posuzování výroby léčiva ze strany lékových autorit je důležité, že dokud se hodnoty vstupních a procesních parametrů pohybují uvnitř schváleného „prostoru“, pak nejde o změnu procesu, která by musela být posuzována a povolována.

Jak již bylo zmíněno, základem **koncepce zajištění kvality racionálním návrhem výrobního postupu** označované zkratkou **QbD** odvozenou od anglického výrazu Quality by Design, je identifikace **kritických atributů kvality látek vystupujících v procesu výroby** (suroviny, pomocné látky, meziprojektu i finální produkt) stejně jako **kritických parametrů procesu**, tj. pochopení vlivu různých faktorů na kvalitu finálních produktů založené na důkladném porozumění procesu výroby.

Kritické atributy kvality určují, jaké kvalitativní parametry musí léčivá látka nebo léčivý přípravek mít, aby byla použitelná v terapii. Kritické parametry procesu jsou ty faktory, na nichž záleží kvalita produktu. Jedním z důležitých prvků QbD je využívání **procesní analytické techniky (PAT)** pro kontinuální průběžné monitorování procesních parametrů, které ovlivňují atributy kvality produktů. Koncepce QbD zajišťuje, že budou splněny požadavky lékových agentur, aby výroba léčiva byla povolena, léčivo bylo zaregistrováno a mohlo být prodáváno (registrace léčiv – viz Farm07).

Chemik zabývající se optimalizací postupů výroby látky se proto musí v první řadě důkladně seznámit s problémem, který má řešit a definovat si **cíle** své práce. Přitom se zaměřuje spolu se samozřejmým zajištěním požadované **kvality produktu** na dosažení co nejvyššího **výtěžku** při co nejnižších **nákladech**, musí ovšem brát v úvahu i **bezpečnost práce a ochranu životního prostředí** a nesmí opomíjet ani problematiku **ochrany duševního vlastnictví**, tj. patentoprávní otázky.

Je např. zbytečné se zabývat postupy, při nichž se použijí suroviny, činidla a pomocné látky, jejichž souhrnná cena je jen o málo nižší nebo dokonce převyšuje cenu konkurenčního výrobku srovnatelné kvality. Stejně tak nemá cenu optimalizovat postup přinášející závažná bezpečnostní rizika, která za daných podmínek nelze eliminovat. Může jimi být např. práce s alkalickými kovy, pokud je k dispozici jen zařízení, kde není vyloučen styk kovu s vodou, nebo práce s vysoce hořlavými rozpouštědly, jestliže dostupné zařízení není chráněné proti jiskření. Z environmentálního hlediska jsou nevhodné procesy, při nichž dochází k velkému znečištění odpadních vod nebo nežádoucím emisím těkavých látek, zejména chlorovaných rozpouštědel, popř. ke vzniku toxických odpadů. Regenerace používaných rozpouštědel je účelná, může ale být riziková, pokud se při ní nepodaří vyčistit rozpouštědlo od nežádoucích kontaminantů, které by mohly znečišťovat finální produkt. Veřejnoprávní orgány nepovolují výroby, při nichž se používají zvláště nebezpečné látky nebo vznikají odpady se značným negativním vlivem na životní prostředí, ale i jinak běžné výroby, při nichž jsou překračovány emisní limity nebo povolené maximální hodnoty koncentrací látek v odpadních vodách. Riziková může být i samotná výroba léčivých látek, které v určitých koncentracích mají vždy nežádoucí účinek. Zvláštní pozornost je přitom třeba věnovat ochraně zdraví pracovníků při výrobě vysoce účinných léčivých látek (HPAPI – Highly Potent Active Pharmaceutical Ingredients). Pro používané i vyráběné látky jsou předepisovány hodnoty povolené denní expozice (PDE – Permitted Daily Exposure), které nesmí být překračovány. Využití některých publikovaných postupů může také být zabráněno jejich patentovou ochranou. Naopak je výhodné, když vývoj výrobního procesu přinese nový původní způsob výroby, který patentováním umožní získání konkurenční výhody.

Po stanovení cílů optimalizace je dalším krokem identifikace procesních **faktorů**, které mohou ovlivnit cíle vývoje procesu, především dosažení kritických atributů kvality. Pro tyto faktory je pak třeba určit hodnoty, které ovlivní výsledek, tj. **kritické parametry procesu** i jejich přípustné rozmezí.

Faktorů, které mohou mít přímý vliv na výsledek procesu, tj. především na kvalitu a výtěžek produktu, je celá řada. Patří mezi ně výběr surovin, teplota a tlak, reakční doba, druh rozpouštědla, koncentrace reaktantů, pořadí a rychlost přidávání reaktantů, rychlost ohřevu nebo chlazení, rychlost míchání, typ a množství katalyzátoru, pH, způsob purifikace apod.

Důležitým parametrem ovlivňujícím jakost finálních výrobků je **kvalita výchozích i pomocných látek**.

Aby nebyl finální produkt kontaminován nečistotami obsaženými ve výchozích surovinách, rozpouštědlech, reagentech a dalších pomocných látkách, je nezbytná analytická kontrola jakosti používaných látek a meziprojektů. Zvýšenou pozornost je přitom třeba věnovat případům, kdy se mění dodavatelé, protože látky různé proveniencí mohou být připravovány odlišnými postupy, takže mohou mít jinou kvalitu. Nečistoty ze surovin, rozpouštědel a dalších pomocných látek mohou „přežívat“ i několikastupňové postupy spojené s purifikací. Nečistoty mohou samy podléhat různým chemickým přeměnám. Konečný produkt tak může být kontaminován neočekávanou příměsí. Jako příklad zmiňuje literatura fluvastatin. Fluvastatin, jedno z léčiv snižujících hladinu cholesterolu, obsahuje v molekule N-isopropylskupinu. Analýzou finálního produktu bylo zjištěno, že je kontaminován nečistotou s N-ethylskupinou, kterou se běžnými způsoby čištění nedařilo odstranit. Při zjišťování příčin znečištění se ukázalo, že N-isopropylanilin, který byl použit již ve 2. stupni šestistupňové syntézy, obsahoval malé množství ethylanilinu. Ten pak v dalších stupních reagoval stejně jako isopropylanilin, takže i další meziprojektů byly kontaminovány. Čistý finální produkt bylo možné získat jen při použití suroviny, která ethylanilin neobsahovala.

Dalším úkolem vývojového pracovníka je potlačit **vznik nečistot v průběhu výroby**. Nečistoty přitom mohou vznikat jako produkt vedlejších nebo neúplně probíhajících reakcí, ale i rozkladem. Za ten se přitom nepovažuje pouze hydrolyza, fotolýza a podobné reakce, ale třeba i racemizace.

Čistota produktu a/nebo obsah nečistot může představovat důležitý parametr při optimalizaci postupu výroby. Pokud se nepodaří vznik nečistot eliminovat a finální produkt požadované kvality se nezíská ani při následné purifikaci, je třeba postup výroby změnit. Rizikové jsou zejména procesy, při nichž mohou vznikat kancerogenní nečistoty. V letech 2018 a 2019 byly z trhu řady zemí (včetně ČR) stahovány některé přípravky obsahující kardiiovaskulární lék valsartan, které byly vyráběné ze substancí dodávaných čínskými nebo indickými firmami, protože byly kontaminovány silně kancerogenním N-nitrosodimethylaminem (NDMA) vznikajícím v průběhu výrobního procesu. Valsartan obsahuje v molekule tetrazolovou skupinu. Původní postup přípravy zahrnující reakci s toxickým tributylcínazidem byl podle čínského patentu nahrazen reakcí s azidem sodným v přítomnosti chloridu zinečnatého v prostředí dimethylformamidu. Reakce byla ukončena přidávkou dusitanu sodného. Dimethylformamid se za podmínek reakce zřejmě rozložil na dimethylamin, který byl nitrosován. Koncentrace nitrosaminu navíc dále narůstala při použití postupu recyklace rozpouštědla. Podobná kontaminace N-nitrosodimethylaminem nebo i N-nitrosodiethylaminem byla zjištěna i u dalších blokátorů receptoru pro angiotensin s tetrazolovou skupinou: v indické substanci irbesartanu a čínském losartanu. V prosinci 2019 bylo z podobných důvodů z některých trhů staženo orální antidiabetikum metformin (v Evropě to podle EMA na základě výsledků zkoušek nebylo třeba).

Vznik nečistot lze ovlivnit změnou podmínek výroby, jako je teplota, pH, prostředí, přítomnost vody, přístup světla, ale třeba i rychlostí nebo pořadím přidávání reaktant, použitím nevhodného zařízení apod. Rada nečistot může vznikat **rozkladem účinné látky až po jejím vyrobení a vyčištění**.

K rozkladu léčivé látky často dochází při jejím sušení nebo při zpracování do léčivého přípravku. Ve druhém případě lze někdy rozklad potlačit změnou podmínek výroby přípravku, např. nahrazením mokré granulace za suchou, popř. změnou složení, snížením teploty při sušení granulátu, změnou osvětlení při práci se světlocitlivými látkami apod. Na vzniku nečistot se dále může podílet rozklad během doby skladování léčivé látky a zejména pak léčivého přípravku. Rozklad léčiva je přitom ovlivňován podmínkami skladování – především teplotou a relativní vlhkostí. Vliv těchto faktorů se zjišťuje při předepsaných zkouškách stability.

Určení optimální hodnoty **všech** faktorů ovlivňujících kvalitu i další požadované výsledky (výtěžek atd.) je obtížné a nákladné. Vývoj procesu, při němž by byly optimalizovány všechny možné faktory, by mohl stát více, než by činily přínosy optimalizace. Je proto třeba nejprve zjistit, které faktory mají na výsledek největší vliv a na ty se pak soustředit.

V ekonomice je znám Paretův princip, podle něhož jedna pětina výrobků přináší čtyři pětiny zisku. Tento princip lze aplikovat i na úvahy o významu jednotlivých faktorů: v prvním přiblížení lze tvrdit, že výsledky technologických procesů jsou ze 4/5 ovlivňovány pouze jednou pětinou variabilních faktorů.

Procesní faktory lze rozdělit na **kvalitativní** (suroviny, typ rozpouštědla, katalyzátoru, extrakčního činidla atd.), **kvantitativní**, které se mohou v určitém rozmezí libovolně měnit (např. teplota, pH, doba reakce apod.), **faktory „kategorické“ povahy**, které za daných podmínek lze buď aplikovat nebo vyloučit (např. míchání – ano/ne, světlo nebo tma apod.) a na **faktory, které na dosažení cílových parametrů mají nulový nebo jen nepatrný vliv** a které se pak při optimalizačních experimentech zanedbávají.

Kategorický faktor se při určitém uspořádání systému může změnit na kvantitativní, jehož hodnota může být optimalizována. Zatímco např. v jednom typu zařízení lze reakční směs jen nemíchat nebo míchat za stále stejných otáček, v jiném zařízení lze otáčky míchadla plynule měnit. Takové zařízení je ale dražší, takže je třeba pečlivě zvážit, zda je jeho pořízení účelné, tj. zda je zvýšení ceny zařízení vyváženo jeho přínosem pro daný proces.

Z kvalitativních faktorů stojí v popředí vedle atributů kvality výchozích látek především výběr **prostředí**, tj. volba rozpouštědel, v nichž se reakce provádí

Volba rozpouštědla ovlivňuje výtěžky i kvalitu produktu, průběh reakce, nákladovost výroby i environmentální dopady procesu. Při výběru rozpouštědla je třeba brát v úvahu především jeho kompatibilitu s příslušnou reakcí. Např. Friedel-Craftsovy reakce nebo práce s Grignardovými činidly lze provádět jen v určitých typech rozpouštědel. Polární rozpouštědla s vysokou dielektrickou konstantou dobře solvatují ionty. Dochází-li k nukleofilní substituci, pak na polaritě rozpouštědel závisí, zda substituční reakce proběhne S_N1 nebo S_N2 mechanismem. V polárních rozpouštědlech je preferována S_N1 reakce, v nepolárních S_N2 . Při S_N2 reakcích chirálních látek dochází k Waldenově zvratu, kdy z výchozí chirální látky vzniká chirální produkt s opačnou konfigurací, substituce probíhající S_N1 mechanismem je většinou provázena racemizací. Rozpouštědlo může ovlivňovat selektivitu reakce i jinak. Např. při redukci tosylátu ω -bromundecylaloholu $LiAlH_4$ v etheru dochází k odredukování tosyloxyskupiny, v diethylenglykoldimethyletheru je naopak redukčně odštěpován brom.

Důležitý je i bod varu rozpouštědla. Varem pod zpětným chladičem se nejspolehlivěji reguluje teplota reakční směsi. Rozdíly v bodu varu rozpouštědla a kapalného produktu ovlivňují způsob izolace a čistotu. Volba rozpouštědla závisí i na tom, jak se v něm rozpouští výchozí látky, hlavní i vedlejší produkty reakce. Výchozí látka nemusí být úplně rozpuštěná, stačí, když se rozpouští částečně, protože při vzniku produktu je rozpuštěná látka z reakční směsi odebrána a tím je porušována rovnováha mezi rozpuštěným a pevným podílem a další část látky může přejít do roztoku. Vylučování nerozpustného produktu z roztoku reakčních komponent může posouvat reakční rovnováhu žádoucím směrem ve prospěch produktu, jindy však může proces komplikovat, např. jestliže vylučovaný produkt obaluje částice heterogenního katalyzátoru a tím katalyzátor deaktivuje, nebo když se na vylučované sraženině produktu zachycují nečistoty. V úvahu je třeba brát i bezpečnostní aspekty, např. kancerogenitu a toxicitu rozpouštědel (benzen), body vzplanutí (diethylether), snadnost odstranění zbytků rozpouštědla z produktu s ohledem na povolené limity obsahu zbytkových rozpouštědel v léčivech a v neposlední řadě i ochranu životního prostředí (je např. třeba respektovat přísné předpisy týkající se exhalací chlorovaných rozpouštědel nebo přípustného množství látek kontaminujících odpadní vody).

U faktorů kvantitativní povahy („procesních proměnných“) je třeba zvážit, jaké může být rozmezí jejich hodnot a jaké jsou možnosti dosažení tohoto rozmezí a kontroly z hlediska vybavení, nákladů apod.

S růstem **teploty** roste rychlost chemických reakcí. To ale platí jak pro studovanou hlavní reakci, tak i pro případné nežádoucí vedlejší nebo rozkladné reakce a racemizaci, které zhoršují kvalitu produktu.

Tlak pozitivně ovlivňuje rychlost takových reakcí, při nichž při vzniku produktu klesá objem reakční směsi. Vedle reakcí s plynnými reaktanty (hydrogenace, oxidace) jde i o reakce v kapalné fázi, např. o esterifikace a zmýdelnění esterů, kvarternizace aminů, nukleofilní substituce, Diels-Alderovu reakci, Claisenův přesmyk apod. Při takových reakcích bez účasti plynných komponent se však účinek většinou projeví až při řádových změnách tlaku. Zvýšení tlaku samozřejmě také vede ke zvýšení bodu varu kapalných složek a tedy i teploty reakční směsi. Snížení tlaku může posouvat reakční rovnováhu vydestilováním těkavých produktů reakce.

Průběh reakcí samozřejmě ovlivňuje i **koncentrace reaktant**: Se vzrůstem koncentrace se zvyšuje reakční rychlost, ovšem nejen hlavních, ale i vedlejších reakcí. U exotermních reakcí musí být při vysokých koncentracích reaktant zajištěn dostatečný odvod tepla. Pokud to není možné, může mít reakce nekontrolovaný průběh. Aby se tomu předešlo, přidávají se reakční komponenty do směsi postupně. **Rychlostí přidávání reaktant** lze přitom řídit průběh exotermních reakcí a tím zajistit vyšší čistotu produktu. Výsledek reakce může také být ovlivněn **pořadím přidávání reakčních komponent**. Na **poměru množství reaktant** závisí poloha reakční rovnováhy a ekonomika procesu. Přebytek jedné komponenty (obvykle levnější) zajistí lepší výtěžek produktu a/nebo může pozitivně (někdy ale i negativně) ovlivnit jeho jakost. Posun reakční rovnováhy lze zajistit i odstraňováním žádaného nebo vedlejšího produktu reakce z reakční směsi – precipitací, oddestilováním nebo absorpcí (např. odstraňováním vznikající vody azotropním oddestilováním nebo přídavky sušidel) apod.

Reakční doba ovlivňuje efektivnost a cenu procesu. Z technologického hlediska je žádoucí, aby reakční doba činila nejvýše 20 hodin, jinak neúměrně rostou režijní náklady výroby, jedna z důležitých položek kalkulace celkových výrobních nákladů. Při optimalizaci procesu se proto obvykle zjišťuje minimální doba reakce potřebná k dosažení co nejvyššího výtěžku a požadované kvality produktu. To platí zejména pro rovnovážné reakce, protože prodlužovat reakční dobu po dosažení reakční rovnováhy nemá smysl. Vedle výtěžku je však třeba při prodlužování reakční doby brát v úvahu i možnost vzniku nečistot. Někdy je zapotřebí zastavit reakci i za cenu nižšího výtěžku ještě předtím, než dojde k výraznějšímu rozkladu produktu.

Vliv různých faktorů na výsledek reakce se zjišťuje při faktorových experimentech

Při **standardním faktorovém experimentu** se pro každý z kvantitativních faktorů, o nichž se předpokládá, že ovlivní výsledek, zvolí obvykle dvě hodnoty, dolní a horní. U kvalitativních kategorických faktorů se mohou volit různé alternativy. Pak se experimentálně ověří, jaký vliv na výsledek tyto faktory mají. Je-li vybraných faktorů 5 a méně, může se provést **úplný faktorový experiment**, který zahrnuje 2^n dílčích pokusů, při nichž se pro každý z faktorů použije zvolená horní a dolní hodnota. Při výběru 4 faktorů (např. teplota, reakční doba, polarita rozpouštědla, míchání – ano/ne) je těchto dílčích experimentů 16, u 5 faktorů 32. Se vzrůstem počtu vybraných faktorů počet dílčích experimentů však značně narůstá ($2^6 = 64$, $2^7 = 128$). Faktorový experiment se 2 hodnotami proměnných je sice využíván při screeningu vlivu faktorů na výsledek nejčastěji, neposkytuje však vždy relevantní výsledky. Nemusí postihnout situaci, kdy závislost výsledku na určitém faktoru prochází minimem nebo maximem. Vhodnější by proto bylo studium vlivu proměnného faktoru s použitím více hodnot proměnných (víceúrovňový faktorový experiment), přitom by však počet dílčích experimentů narůstal a činil např. 3^2 , 3^3 , 3^4 atd. Při ještě podrobnějším sledování by např. ke zjištění vlivu 5 faktorů na 4 úrovních bylo zapotřebí $4^5 = 1024$ dílčích experimentů. Aby se počet experimentů snížil, provádí se **částečný faktorový experiment** s menším počtem dílčích faktorů na dvou úrovních. Částečný faktorový experiment samozřejmě poskytne méně informací než úplný. K tomu, aby byla minimalizována ztráta informací, se využívají různé statisticky podložené chemometrické triky, optimalizační a vyhodnocovací počítačové programy. Přitom např. k základnímu sledování 2 úrovní 6 faktorů místo $2^6 = 64$ postačí 28 dílčích pokusů.

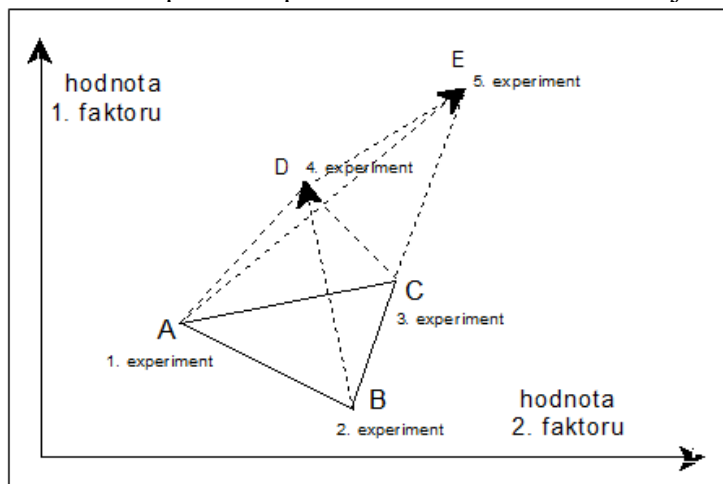
Pro faktory, které mají zásadní vliv na výsledek, se pak dále hledají optimální hodnoty. To lze provádět tak, že se **postupně sleduje vliv vždy jen jednoho faktoru na průběh dané reakce**.

Tento postup, který se v anglicky psané literatuře označuje příznačným akronymem COST (odvozeným z **C**hange **O**ne **S**eparate factor at a **T**ime, cost ale také znamená náklad, výdaj nebo cenu), je zdoluhavý, neefektivní a tedy i nákladný. Kromě toho ani nemusí přinášet správné výsledky, protože mezi jednotlivými faktory často existují vzájemné vztahy: Změna jednoho faktoru může působit proti změně faktoru druhého (např. s růstem teploty klesá doba reakce), jindy může naopak docházet k určité synergii.

Z tohoto důvodu je při hledání optimálního postupu účelné sledovat vliv kombinace různých faktorů na výsledek. Přitom se využívají různé optimalizační postupy, např. **sekvenční simplexová optimalizace**

Při optimalizaci dvou faktorů se provádí 3 dílčí experimenty s třemi různými hodnotami faktorů, 4 experimenty pro 3 faktory atd. Zjistí se výsledky experimentů. Pak se provede další experiment, při němž se proměnné volí tak, aby při grafickém znázornění byla jejich hodnota zrcadlovým obrazem hodnot proměnných při nejhorsím experimentu. To se pak opakuje několikrát, až se dosáhne nejlepší hodnoty procesní proměnné. Pokud by se hodnota proměnných měla „zrcadlením“ vrátit na hodnotu odpovídající horšímu výsledku, pak se vychází z předchozího výsledku. Při **modifikované simplexové metodě** se postupuje podobně, ale v případě, že by „zrcadlení“ poskytlo horší výsledek, se průmět zkrátí.

Provedení sekvenční simplexové optimalizace dvou faktorů ilustruje následující graf.



Hledání nejlepších podmínek různých procesů usnadňuje výpočetní technika s optimalizačním software.

Podrobnosti o metodách plánování a vyhodnocování experimentů lze nalézt v různých příručkách a učebnicích chemometrie, statistiky nebo chemického inženýrství, popř. na různých výukových internetových stránkách (např. v příručce inženýrské statistiky na stránkách amerického National Institute of Standards and Technology, Národního ústavu pro normy a techniku, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pmd/section1/pmd134.htm>)

Správná výrobní praxe

Správná výrobní praxe (SVP; Good Manufacturing Practice, GMP) představuje zásady, které musí dodržovat každý výrobce léčivých látek a zejména pak léčivých přípravků (viz Farm 05). Smyslem SVP je ochrana pacientů před riziky, které by pro ně představovala léčiva s nevyhovující kvalitou nebo nevhodná pro předpokládané použití. Jde o zásady, které se prakticky ve stejné podobě uplatňují v celé Evropě i ve vyspělých mimoevropských zemích. V ČR vychází zásady SVP ze zákona o léčivech. Jejich (zatím) aktuální verzi uvádí verze 3 pokynů SÚKL VYR-32, novelizovaná vyhláška Ministerstva zdravotnictví a Ministerstva zemědělství (protože nejde jen o humánní, ale i o veterinární léčiva) č. 411/2004 Sb., která je českou verzí pravidelně aktualizované Směrnice Evropské komise č. 2003/94/ES o správné výrobní praxi. Americkým předpisem je Kodex federálních předpisů CRF 21 (Code of Federal Regulation Title 21), část 820 Řízení systému jakosti.

Zásady SVP byly nejprve formulovány a uplatňovány ve Spojených státech jako reakce FDA na tragické případy zapříčiněné nekvalitou některých léčiv. Cílem zásad je zajistit, aby léčiva byla kvalitní a bezpečná, tj. že je lze reprodukovatelně vyrábět schváleným postupem za schválených podmínek ve schválených prostorách a aby veškeré činnosti při výrobě byly řádně dokumentovány. Zásady SVP se týkají zejména výroby léčivých přípravků, ve značné míře se však uplatňují i při výrobě léčivých látek, zejména finálních stupňů jejich výroby. V neposlední řadě specifikují náležitosti, které jsou součástí žádostí o povolení výroby léčiv a o povolení změn při výrobě nebo kontrole.

Někdy se hovoří o zásadách **soudobé SVP** (current GMP, c-GMP), čímž se zdůrazňuje nutnost pravidelně přezkoumávat podmínky výroby léčiv a aktualizovat je s ohledem na technický pokrok a zvyšující se požadavky na kvalitu a bezpečnost formulované v pravidelně novelizovaných směrnících a pokynech.

Kontroly dodržování zásad SVP provádí při pravidelných inspekcích u výrobců pověřené státní instituce. V ČR to je Státní úřad pro kontrolu léčiv, SÚKL. Pokud chce český výrobce dodávat léčiva na zahraniční trhy, musí počítat i s kontrolou cizích státních nebo nadnárodních lékových agentur, jako je FDA pro USA nebo EMA pro státy EU. Každý výrobce musí zajistit, že veškeré činnosti při výrobě léčiv jsou prováděny podle zásad SVP a v souladu s údaji ve schválené žádosti o registraci. Dojde-li při výrobě ke změnám proti údajům z registrační dokumentace, musí výrobce podat žádost o změnu registrace. Výrobu změněným postupem může provádět až poté, co změna je schválena.

Základním ustanovením zásad SVP je požadavek na vytvoření a udržování systému zabezpečení jakosti léčiv zahrnující aktivní účast řadových zaměstnanců i vedoucích pracovníků výrobce.

Zásady SVP proto velký důraz na personální i technické zajištění kvalitní výroby. Jednotliví pracovníci mají v systému SVP přesně vymezeny své povinnosti a pravomoci, výrobce jim musí zajistit řádné vyškolení i průběžné doškolování. Jak již bylo zdůrazněno v předchozí přednášce, mimořádně velký důraz je kladen na řádné dokumentování všech kroků a operací, které mohou ovlivnit jakost léčiva. Dokumentační systém musí být vytvořen tak, aby umožnil sledování historie výroby a změn zavedených během vývoje. Zejména je důležité, aby byly řádně zaznamenány všechny odchylky a zjištěné závady v procesu výroby, ty pak byly prošetřeny a výsledek šetření řádně zdokumentován. Důležitou součástí dokumentace je potvrzování všech kroků a opatření při výrobě i kontrole léčiv odrážející osobní odpovědnost všech zúčastněných.

Vedle toho stanoví SVP požadavky na hygienickou stránku výroby včetně technických opatření zajišťujících, že nedojde ke kontaminaci léčivých přípravků cizorodými látkami nebo mikroorganismy.

Výrobní prostory a zařízení musí být navrženy a konstruovány tak, aby bylo minimalizováno riziko křížové kontaminace a záměny resp. i jiných chyb, aby bylo umožněno jejich účinné čištění a údržba. Výrobní prostory a zařízení musí být kvalifikovány, tj. musí být dokumentovaně ověřeno, že jsou vhodné pro daný účel.

Na SVP navazuje **správná laboratorní praxe** (SLP), kterou pro oblast léčiv legislativně specifikuje vládní vyhláška 86/2008 Sb., která zapracovává příslušné předpisy EU a upravuje postupy pro zjišťování jakosti a neklinické zkoušení bezpečnosti léčiv při provádění laboratorních zkoušek. Přináší i předpisy týkající se laboratorních prostor a zařízení, personálu a dokumentace.

Validace výrobních postupů

Validace požadovaná farmaceutickou legislativou (pokyn SÚKL VYR-32, Doplněk 15) je poslední etapou vývoje procesu výroby léčivých látek i léčivých přípravků. Validace procesu výroby je dokumentovaným důkazem toho, že proces bude trvale poskytovat produkt vyhovující předem určené specifikaci.

Validace je v podstatě kontrolou reprodukovatelnosti a robustnosti vypracovaného výrobního postupu. Postup je validovatelný, jestliže běžné provozní kolísání hodnot různých faktorů nevybočuje z „prostoru návrhu“, design space, tj. nesnižuje jakost výrobku. Pro kritické faktory je určeno rozmezí, které nesmí být překročeno, má-li být dosažen požadovaný výsledek (např. $\pm 5^\circ\text{C}$ u teploty, časové rozmezí u doby reakce ± 30 min apod.).

Validace se provádí podle **řídícího plánu validace** (Validation Master Plan) a **validačního protokolu**. Výsledky validace jsou shrnuty ve **validační zprávě**.

Řídící plán validace je souhrnný dokument zpracováváný pro výrobu určitého léčiva. Vymezuje odpovědnosti jednotlivých pracovníků, předmět a cíl validace, způsob provedení a dokumentace výsledků.

Validační protokol definuje cíle a rozsah konkrétní validace, použité metodiky, typ a množství vzorků k hodnocení, hodnocené parametry a kritéria přijatelnosti pro každý z nich, způsob hodnocení a použité statistické metody pro vyhodnocení výsledků.

Validační zpráva obsahuje přehled a vyhodnocení dat získaných během validace. Musí obsahovat informace, zda byla splněna kritéria přijatelnosti, jaké byly zjištěny odchylky a přinést návrh na jejich odstranění.

Validační aktivity začínají **specifikací uživatelských požadavků** pro zařízení, prostory, média nebo systémy, **kvalifikací návrhu**, kde se posuzuje, jak tato specifikace odpovídá zásadám SVP a „kvalifikací“ výrobního zařízení.

U nového výrobního zařízení se nejprve provádí **instalační kvalifikace** (Installation Qualification, IQ), kdy se posuzuje, zda zařízení odpovídá specifikaci a je funkční.

Následuje **operační kvalifikace** (Operational Qualification, OQ), kdy se prokazuje, že při provozu zařízení lze dodržet předepsané parametry procesu, např. že aparatura těsní, míchadla se otáčejí specifikovanou rychlostí, měřicí zařízení je kalibrováno, teplota regulována v předepsaném rozmezí apod.

Finálním krokem je **procesní kvalifikace** (Performance Qualification, PQ), kdy se při reálném nebo simulovaném procesu ověřuje, jak zařízení vyhovuje pro příslušné specifické použití. Má přitom zahrnout zkoušky za podmínek zahrnujících horní a dolní limity kritických provozních parametrů.

Po kvalifikaci zařízení může začít **validace procesu**. Ta může být **prospektivní**, prováděná před zahájením výroby, **souběžná**, při níž současně probíhá výroba prvních šarží, popř. i **retrospektivní**, kdy se vychází z dokumentace o dosavadních vyrobených šaržích.

Velikost šarže má být při validaci pokud možná stejná jako u výrobních šarží. Vývoj procesu výroby léčiva by měl končit prospektivní validací. Ta může být u drahých léčiv poměrně nákladná, protože mají být vyrobeny alespoň tři validační šarže. Řešením pak je souběžná validace, kdy se validační šarže využijí např. k přípravě produktu pro stabilitní zkoušky nebo již dokonce k výrobě léčivého přípravku. Retrospektivní validace je přijatelná jen pro dobře definované procesy. Provádí se, jestliže se vzhledem k rozsahu výroby nevyrobí v jednom sledu statisticky významný počet šarží. Údaje pro retrospektivní validaci musí být řádně zdokumentovány a zdůvodněny, mají obsahovat hodnocení trendů v kvalitě i záznamy o výrobě nevyhovujících šarží. Retrospektivní validace je sice při menším objemu výroby výhodná, je však spojena s rizikem přerušování výroby a ekonomických ztrát v případě, kdy se ukáže, že proces nebyl dostatečně zvládnut, není tedy validní a musí být přepracován.

Výrobní proces lze validovat, jen když jsou stanovena kritéria přijatelnosti (specifikace) konečného výrobku i meziproductů a pro jejich kontrolu jsou k dispozici ověřené a rovněž **validované analytické postupy**. Na validaci výrobních procesů navazuje **validace postupů čištění** zařízení. Postup při provádění validací je vždy třeba přizpůsobit podmínkám konkrétního procesu. Výsledky nelze pouze sumarizovat, ale musí být správně statisticky vyhodnoceny. Při validacích se nelze spokojit s hodnocením typu vyhovuje/nehovuje specifikaci, ale je třeba zjišťovat **reálné hodnoty parametrů**. Ty se mají pohybovat uvnitř stanoveného rozmezí, nikoliv na jeho hranici.

Je-li např. stanoveno, že meziproduct může být použit v dalším stupni, jen když obsahuje maximálně 0,5% určité příměsi, pak by tento limit být nikdy překročen, průměrné výsledky by přitom ale měly být lepší. Na druhé straně by z výsledků mělo být zřejmé, že i meziproduct, který obsahuje právě 0,5% nečistoty, lze ještě bez problémů použít v dalším stupni. Robustnost procesu, tj. průkaz, že při dodržení předepsaných limitů pro kritické parametry se reprodukovatelně dosahuje požadovaný výsledek, se potvrzuje speciálními „zátěžovými“ zkouškami (challenge tests), při nichž se ověřuje výsledek v případech, kdy procesní parametry jsou právě na hranici předepsaných limitů. Podobně se má přistupovat k požadavkům na validace postupů čistoty zařízení. Kritériem přitom jsou povolené limitní hodnoty obsahu látky v oplachových vodách a stěrech z ploch zařízení. Zařízení používané univerzálně pro různé výroby musí být prokazatelně dokonale očištětelné od zbytků předchozího výrobku. Pokud se toho nedosahuje, smí se na určitém zařízení vyrábět jen jediný produkt.

Prostory, zařízení, systémy, procesy, kontrolní metody i postupy čištění musí být v pravidelných intervalech opakovaně hodnoceny – **revalidovány**, aby se prokázalo, že během času nedošlo k odchylkám od validovaného stavu. Revalidace se musí provádět i při změnách zařízení nebo procesů

Vývojová a výrobní dokumentace

Zásady „správné výrobní praxe (SVP)“, „správné laboratorní praxe“ i dalších „správných praxí, vymezují mimo jiné i požadavky na dokumentaci výsledků výzkumu, vývoje a výroby léčiv. Podobně věnují velkou pozornost dokumentaci všech kroků výzkumu, vývoje, výroby a kontroly i normy ČSN-ISO řady 9000 popisující systém řízení jakosti.

Systém dokumentace zahrnuje jednak obecné a společné instrukce, jako jsou specifikace surovin, meziproductů a produktů, výrobní předpisy, standardní operační postupy pro práci se specifickým zařízením nebo pro provádění určitých činností apod., jednak specifické dokumenty pro každou šarží, experiment nebo zařízení, jako jsou záznamy o výrobě šarže, laboratorní deníky, deníky o provozu zařízení a analytické atesty. Součástí výrobní dokumentace jsou dále doklady o validaci výrobních a kontrolních postupů, tj. ověření jejich správnosti a reprodukovatelnosti. Vývojovou dokumentací je Zpráva o vývoji výrobku, Zpráva o převedení technologie, souhrnným dokumentem je tzv. Drug Master File se základními údaji o léčivé látce.

Dokumenty musí mít předepsanou strukturu a být „v řízeném stavu“, tj. musí být předepsaným způsobem kontrolovány, posuzovány, schvalovány, revidovány, distribuovány a archivovány, popř. vyřazovány.

Nově jsou stanoveny zásady pro elektronické zpracování dokumentů a dat, včetně jejich elektronického podepisování a zabezpečení počítačových systémů proti ztrátě nebo neoprávněnému pozměňování elektronických dokumentů.

Základním prvkem specifické vývojové dokumentace je záznam v **laboratorním deníku**.

Laboratorní deník v písemné nebo elektronické formě je významným dokumentem nejen z hlediska SVP, ale i z hlediska právního, protože se může stát důležitým důkazem v případných patentoprávních i jiných sporech. **Laboratorní deník v písemné formě** musí mít očíslované stránky a být pevně svázaný. Záznamy musí být jasné, dobře čitelné, **nepřepisované** (opravy je třeba provádět přeškrtnutím původního údaje tak, aby bylo možné původní chybný záznam přečíst), datované a dostatečně podrobné. Volné místo na neúplně vyplněné stránce by mělo být přeškrtnuté. Záznamy mají být podepsány autorem i jeho nadřízeným jako svědkem správnosti záznamu. Zapisována mají být fakta, nikoliv domněnky. Výsledky analýz je třeba doplnit odkazem na analytické atesty výchozích látek, produktů a meziproductů, aby bylo případně možné atesty vyhledat a zkontrolovat.

Analytické atesty mají obsahovat odkazy na předepsané kontrolní postupy a parametry a na stránky laboratorních deníků pracovníků analytické kontroly s naměřenými výsledky a výpočty. Musí být podepsány.

Podobné zásady platí i pro **elektronickou formu laboratorních deníků**. I v tomto případě musí být zejména zaručeno dodatečné nepřepisování záznamů a možnost identifikace jejich autorů elektronickým podpisem nebo jiným nezaměnitelným způsobem.

Souhrnem informací o vývoji látky je **Zpráva o vývoji výrobku** (Product Development Report). Specifickým případem této zprávy je **Zpráva o převedení technologie** (Technology Transfer Report).

Na rozdíl od jiných dokumentů nemá zatím **Zpráva o vývoji výrobku** předepsanou jednotnou strukturu, měla by však shrnovat veškeré údaje důležité pro dokumentaci vývoje výrobku, jako je charakterizace produktu, surovin a meziproductů, popis jednotlivých stupňů syntézy a historie vývoje výrobního procesu, včetně informací o „slepých uličkách“ a zdůvodnění, proč byly opuštěny, o zvětšování objemu šarže v průběhu vývoje a o případných změnách parametrů proti laboratornímu měřítku. Analytické specifikace uvedené ve zprávě by měly být doplněny o údaje o validacích analytických metod. Na základě zkušeností získaných při vývoji by měly být definovány kritické kroky a přijatelná rozmezí hodnot procesních parametrů.

Zpráva o převedení technologie je dokumentem, v němž jsou uvedeny informace nutné pro zavedení do výroby, tj. o výrobním postupu a jeho kontrole. Slouží zejména pro zavádění licenčních výrob podle zakoupeného know-how, ale uplatňuje se i při převodu výrobků z vlastního vývoje do výroby. Má význam i jako podklad pro zpracování plánu validace výrobního procesu.

Základní dokument o léčivé látce (český oficiální termín pro Drug Master File, zkratka DMF, neboli Active Substance Master File, jak je tento dokument nazýván ve směrnicích ICH, FDA resp. EMA) poskytuje komplexní informaci o léčivé látce, postupu její výroby a kvalitě. Je jednou z nejdůležitějších součástí systému dokumentace v oblasti léčiv. DMF je neopomenutelnou součástí žádostí o registraci nebo o některé změny registrace léčiva.

Látky, k nimž výrobce nemůže dodat DMF v požadovaném rozsahu, nemohou být ve vyspělých zemích přímo použity k přípravě léčivého přípravku, ale nanejvýš jen jako suroviny k případnému přečištění. Totéž platí i v případě, že je výrobcem dodán neúplný DMF a odběratel si sám nedoplňuje některé údaje (např. o stabilitách nebo kontrolních metodách). Absence nebo neúplnost DMF se samozřejmě promítá do nižší ceny substance.

Obsah DMF je určen pokynem SÚKL REG-79, který je českým ekvivalentem Guideline on Active Substance Master File, pokynu Evropské agentury pro léčiva EMEA/CVMP/134/02.

DMF začíná obecnými údaji (název, struktura, základní vlastnosti) a pokračuje informacemi o výrobcu a výrobním postupu. Ty se liší podle toho, zda jde o tzv. **otevřenou část** DMF (Applicant's Part), která je veřejně přístupná všem zájemcům o zakoupení účinné látky, nebo **uzavřenou část** (Restricted Part), která je důvěrným materiálem určeným pro registrující lékový úřad. Otevřená část obsahuje pouze stručné schéma výrobního postupu, uzavřená podrobné informace: údaje o kontrole surovin, meziproductů, o kritických krocích výrobního procesu, o vývoji, validaci a zhodnocení výrobního procesu. DMF dále obsahuje charakterizaci výrobku (potvrzení struktury látky, informace o nečistotách, specifikaci produktu a její zdůvodnění) a popis kontroly (analytické postupy a jejich validace, analýza šarží, referenční standardy a materiály), údaje o balení a stabilitě látky (výsledky stabilitních zkoušek a z nich vyvozené závěry).

Výsledkem vývoje postupu výroby léčivé látky je **Výrobní předpis** (česky někdy nazývaný „Technologický reglement“, anglický název Master Formula nebo Master Recipe), formulář **Záznamu o výrobě šarže** (Batch Record) a rovněž i již zmíněná **Specifikace výrobku**. Postupy práce s určitým výrobním nebo kontrolním zařízením i nebo při některých jiných činnostech souvisejících s výrobou léčiva jsou předepsány v dokumentech nesoucích název **Standardní operační postup (SOP)**.

Výrobní předpis je komplexní dokument s předem určenou strukturou, který shrnuje charakteristiky vyráběného léčiva, požadavky na výrobní zařízení a kontrolní a měřicí přístroje, jakost surovin a meziproductů a způsoby jejich kontroly, přesný popis výrobního postupu, včetně údajů o postupu při případném přepracování nevyhovujících šarží, čištění zařízení při a po výrobě, balení a skladování meziproductů a konečného výrobku, kontrole výroby, zneškodňování nebo využití odpadů, uvádí normy spotřeby surovin a pracovních nebo technologických (=doba obsazení zařízení) hodin a v neposlední řadě přináší instrukce pro bezpečnou práci se surovinami, meziproducty i finálním produktem a zařízením.

Přílohou výrobního předpisu je formulář **Záznam o výrobě šarže**, do něhož pracovníci ve výrobě doplňují konkrétní údaje o násadách, reakčních dobách, výtěžcích, naměřených parametrech a případných neshodách skutečného průběhu výroby s předpisem. Záznamy musí být přesně datovány a podepsány pracovníky výroby i jejich nadřízenými, kteří je kontrolují.

Specifikace výrobku je jakousi vnitropodnikovou normou obsahující základní fyzikálně chemické charakteristiky látky, kvalitativní parametry, jejich předepsané hodnoty a postupy pro jejich stanovení.

Standardní operační postupy jsou dokumenty s detailním popisem postupu při obsluze určitého zařízení nebo při provádění určité činnosti (např. odběru vzorku apod.).

Všechny dokumenty musí být jasné, věcně úplné a bez chyb. Dokumenty obecného rázu musí být pravidelně aktualizovány, specifické dokumenty musí být udržovány a archivovány tak, aby bylo možné vysledovat historii výroby každé šarže nejméně do doby 1 roku po datu ukončení použitelnosti (expirace) výrobku.

Dokumentační povinnosti se staly neodmyslitelnou činností každého chemika zabývajícího se léčivy.

Ne všichni si to ale uvědomují. Povinnosti řádně dokumentovat činnosti při výzkumu, vývoji, zkoušení a zejména při výrobě léčiv a její kontrole bývají někdy chápány jako nepřijemná byrokratická zátěž. Někdy se stává, že dokumentace je zpracovávána dodatečně, až před blížícími se inspekcemi lékových agentur. Vyskytují se v ní chyby, přikrášená data, polopравdy a někdy i podvody. To ale je nebezpečné. Zkoušení auditori to většinou dovedou odhalit. Chyby a upravená data v dokumentaci bývají častou příčinou „varovných dopisů“ příslušných lékových autorit a uložených nápravných opatření.

Veškerá zpracovaná dokumentace je zevrubně posuzována při registračním řízení, tj. při povolování výroby a prodeje léčiva. Výrobní dokumentace je také pravidelně kontrolována při pravidelných auditech ve výrobních provozech farmaceutických firem inspektory lékových agentur.

Je jimi český Státní ústav kontroly léčiv, SÚKL, Evropská agentura pro léčiva, EMA (European Medicines Agency, dříve EMEA, European Medicines Evaluation Agency) nebo americký Úřad pro potraviny a léčiva, FDA (Food and Drug Administration). „Neshody“ v dokumentaci bývají častější příčinou vydávání „varovných dopisů“ ze strany národních a nadnárodních agentur, než zjištění o závadách na výrobním zařízení. Varovné dopisy FDA a EMA jsou veřejně dostupné, mnohdy mívají značnou mezinárodní publicitu a firmy, kde došlo k neshodám, pak ztrácejí své zákazníky. Agentury přitom určí termín, dokdy musí výrobce zjištěné menší závady odstranit. Zda se tak stalo, se zkontroluje při dalším auditu. Jsou-li závady zjištěné při auditu závažné nebo v případě, že méně závažné závady nebyly do dalšího auditu odstraněny, mohou lékové agentury výrobu zcela zakázat nebo zakázat dodávky léčiva od nespolehlivého zahraničního výrobce do své země.

Preklinické (neklinické) zkoušky nových léčiv

Preklinickými zkouškami se **prokazuje účinnost** a získávají se první informace o **bezpečnosti vyvíjeného léčiva**. Zahrnují jak testy *in vitro* „ve zkumavce“, tak i *in vivo*, tj. na pokusných zvířatech.

Zkouškám *in vitro* i *in vivo* může předcházet počítačové modelování interakcí zkoumaných látek s cílovou strukturou, testy „*in silico*“. Při nich se může na základě porovnání struktury látky a cílových biomakromolekul hodnotit předpokládaná účinnost, popř. i výskyt nežádoucích účinků. Počítačové modelování, ale ani zkoušky *in vitro*, nemohou nahradit biologické testování *in vivo*, mohou však přispět k včasnému vyloučení neperspektivních látek.

Výsledek zkoušek závisí na volbě vhodných parametrů, které umožní objektivní měření a vyhodnocení požadovaných vlastností nového léčiva. Nejčastěji se přitom sleduje koncentrace nebo intenzita projevů „**biomarkerů**“, které určitým způsobem souvisejí s výskytem a průběhem onemocnění.

Biomarkerem může být přímo cílová struktura, obvykle enzym. Přitom se stanovuje jeho aktivita. Jinými biomarkery může být výskyt a četnost antigenů, protilátek nebo některých jiných bílkovin, popř. i geny, u nichž se zjišťuje frekvence nežádoucích mutací nebo počet kopií. Biomarkerem mohou dále být i koncentrace některých nízkomolekulárních látek v tělních tekutinách, ale i určité projevy buněk v tkáňových kulturách (např. růst nebo buněčné dělení), funkčnost tkání nebo dokonce i projevy celého organismu (např. tělesná teplota). Vhodně zvolené biomarkery se sledují v prvních fázích vývoje léčiva a pak i při klinickém zkoušení. Mohou se uplatňovat i v diagnostice, při výběru pacientů pro nákladnou léčbu a kontrole terapie.

Zkoušení nových potenciálních léčiv na pokusných zvířatech je zdlouhavé, pracné i nákladné (i když méně nákladné než zkoušky na člověku) a může být spojeno s utrpením zvířete. Bylo by proto výhodné, kdyby mohly být zkoušky *in vivo* nahrazeny vhodnými testy *in vitro*.

Některé zkoušky *in vivo* lze nahradit zkoumáním účinku léčiv na izolované orgány, izolované buňky v tkáňových kulturách nebo studiem interakcí potenciálního léčiva s izolovanými cílovými buněčnými strukturami (enzymy, receptory, nukleové kyseliny apod.). Např. klasický způsob zkoušky na pyrogenitu spočíval ve vstříknutí dávky léčiva do ušního boltce pokusných králíků a následné zaznamenávání jejich tělesné teploty. Později byl u většiny léčiv nahrazen stanovením endotoxinů „chemickými“ LAL-testy (LAL = Limulus Amebocyte Lysate). Ty jsou založeny na koagulaci lyzátů amebocytů („krvinek“) pacifického kraba ostrorepa amerického (*Limulus polyphemus*), k níž dochází v přítomnosti bakteriálních endotoxinů. Nyní se objevují nové testy pyrogenity, pro něž není třeba odebírat „krev“ ani těmto krabům.

V r. 2005 vydala Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD) směrnici týkající se validace a mezinárodního uznávání nových a novelizovaných metod zkoušek pro hodnocení rizik, která navazuje na starší směrnice týkající se toxikologického testování látek (<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oced/oced-gd34.pdf>), a která byla následována a doplnována řadou dalších dokumentů ze série směrnic o testování a hodnocení látek, mezi něž patří mimo jiné v srpnu 2018 vydaná směrnice OECD č. 286 věnovaná správnému provádění různých *in vitro* metod ([http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)19&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)19&doclanguage=en)).

Preklinické zkoušky s izolovanými cílovými strukturami, ale i s tkáňovými kulturami tvořenými izolovanými buňkami určitého typu sice mohou přinést důležité poznatky o požadovaných i nežádoucích účincích zkoušených látek, jsou ale vždy jen **pouze určitým modelem, nikoliv plnohodnotnou náhradou živého organismu** se všemi jeho vnitřními vzájemnými vztahy a interakcemi. Naprostá náhrada práce se zvířaty proto testováním *in vitro* možná není. Řadu poznatků důležitých pro minimalizaci rizik při budoucím klinickém zkoušení lze získat jedině a pouze *in vivo*.

Testy na zvířatech začaly být více prosazovány po 2. světové válce v rámci tzv. Norimberských zákonů. Byla to reakce na praxi v nacistických koncentračních táborech, kde byly prováděny zkoušky na lidech. Od 90. let minulého století se začaly objevovat snahy o omezování zkoušek na zvířatech. V Evropě se v posledních letech provádělo při zkoušení bezpečnosti léčiv, kosmetiky, potravinářských aditiv, konzervačních látek, pesticidů, detergentů a dalších chemických výrobků asi 11 mil testů na zvířatech za rok. Jako cíl pro nejbližší léta vyhlásila Evropská komise snížení počtu o 2 miliony testů, aniž by přitom byly sníženy požadavky na bezpečnost látek. Tam, kde jsou testy *in vivo* nezbytné, mají být zkoušky navrženy tak, aby byl snížen počet a utrpení pokusných zvířat. Velké průmyslové svazy podepsaly deklaraci „3Rs“ (**R**eview, **R**educe or **R**eplace the use of animals), která shrnuje požadavky na náhradu (Replacement) pokusů na zvířatech všude tam, kde je to možné, např. využíváním testů s buněčnými kulturami, dále na omezení (Reduction) a zjemnění (Refinement) zkoušek *in vivo*, tedy jejich provádění v co nejmenším rozsahu a co možná nejšetněji. Aktuálním opatřením omezujícím testy *in vivo* byl např. zákaz zkoušení kosmetických výrobků na zvířatech. EU od března 2013 dokonce zakázala dovoz kosmetiky, která byla na zvířatech zkoušena. Evropské orgány v r. 2007 ale přijaly opatření známé pod zkratkou REACH (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemical substances – Registrace, hodnocení, autorizace a restrikce chemických látek), který rozšiřuje požadavky na biologické testování vyráběných chemikálií včetně testů na zvířatech, a to i přes snahy o jejich omezování a náhradu.

Vedle snahy o omezování testů na zvířatech byla pro nezbytné zkoušky *in vivo* vypracována pravidla, která poskytují záruky, že pokusná zvířata nebudou zbytečně vystavována utrpení.

Organizacím pro ochranu zvířat to někdy nestačí a dožadují se, aby bylo testování léčiv na zvířatech úplně zakázáno. Aktivisté se přitom někdy nespokojí s nenásilnými protesty, ale násilím pronikají do zvěřinců toxikologických ústavů, vypouštějí pokusná zvířata na svobodu (kde je ale čeká v pro ně neznámých podmínkách jen utrpení a smrt) a dokonce fyzicky napadají personál testovacích zařízení. V několika zemích (Argentina, Španělsko, Nový Zéland) byla dokonce přiznána určitá lidská práva lidoopům; v těchto, ale i některých dalších zemích se nesmí k žádnému testování léčiv opice používat. Na druhé straně ale existují pacientské organizace požadující zajištění větší bezpečnosti nových léků rozšířením zkoušek *in vivo*. Nově se požadavky na rozšíření a urychlení zkoušek objevily např. v souvislosti s obávanou infekcí viru ebola. Nákaza se nevyhýbá ani gorilám a šimpanzům a striktní zákaz testování léčiv na těchto zvířatech může znamenat, že nebude možné vyvinout vakcínu, která by účinně chránila lidi i lidoopy.

Avšak ani důkladné zkoušky *in vivo* nepřinášejí vždy výsledky, které lze bez rizika využít u člověka.

Ukázaly to např. výsledky klinických zkoušek monoklonální protilátky TGN1412 německé firmy TeGenero v r. 2006, které málem skončily tragicky. Humanizovaná protilátka TGN1412 se váže na receptory CD28 na T-buňkách imunitního systému a je jejich silným agonistou. Měla léčit reumatoidní artritidu a chronickou lymfocytickou leukemii, ale její podání vedlo k tomu, že imunitní systém začal napadat vlastní orgány. Všichni dobrovolníci, kterým byla protilátka podána, vážně onemocněli. U pěti přestaly řádně fungovat některé orgány, u šestého se projevil příznak rakoviny. Dávka (cca 0,1 mg/kg) přitom byla 500x nižší než nejvyšší tolerovaná dávka u pokusných zvířat, a to hlodavců i opic. Nakonec se sice všichni postižení dobrovolníci zotavili, rekonvalescence však byla zdoluhavá. Při zkoumání příčin se ukázalo, že aminokyselinové sekvence CD28 opic a člověka nejsou úplně stejné, ale je mezi nimi asi 4% rozdíl. I tento malý rozdíl stačil ke vzniku zdravotních problémů. Humanizované protilátky jsou původně zvířecí (zpravidla myší) protilátky upravené tak, aby se co nejméně lišily od protilátek lidských a nevyvolávaly proto u člověka nežádoucí odezvu. Tato „humanizace“ byla zřejmě příčinou neočekávaného nežádoucího účinku u člověka. Protilátka TGN1412 se při preklinických zkouškách jevila bezpečná, protože s receptory CD28 neinteragovala. Předtím proběhla úspěšně řada klinických zkoušek jiných humanizovaných protilátek proti jiným receptorům, při nichž podobná reakce organismu nikdy pozorována nebyla. Tyto protilátky byly po skončení bezproblémových klinických zkoušek schváleny jako nová účinná léčiva. Nikdo proto u TGN1412 nežádoucí reakce neočekával a její první podání člověku bylo povoleno.

Problémy s protilátkou TNG1412 vyvolaly diskuse o bezpečnosti klinických zkoušek. Evropská agentura pro léčiva EMA i FDA v USA následně zpřísnily předpisy pro hodnocení rizikových léčiv, za něž jsou nyní považovány i „humanizované“ protilátky.

Byla navržena opatření směřující k zajištění větší bezpečnosti klinických zkoušek. EMA předložila k diskusi návrh 28 opatření, např. změny schématu zvyšování dávek („mikrodávkování“), používání hlodavců, jejichž genom byl pozměněn vnese-ním lidských genů, rozšíření zkoušek na primátech, popř. nahrazení dobrovolníků nemocnými pacienty apod. Nakonec ale byla akceptována jen část původního návrhu. Nově začaly FDA a EMA také podporovat studium možností zhotovení „orgánů na čípech“ pro preklinické zkoušky. Jde o mikrofluidická zařízení s trojrozměrným tiskem pořízenými strukturami lidských buněk, které napodobují buněčnou strukturu a fyziologické funkce jedné nebo více vzájemně se ovlivňujících lidských tkání, např. průběh dýchání v plicích nebo metabolických přeměn léčiv v játrech.

Při preklinických testech *in vivo* se zjišťují **farmakodynamické i farmakokinetické vlastnosti** léčiv. Kromě **účinnosti** je to i jejich **toxická**. Testují se u látek, které byly vybrány na základě úspěšných zkoušek *in vitro*. Preklinické testování může začínat se skupinou několika kandidátů na finální léčivo, pro klinické testování se pak vyberou nejperspektivnější z nich.

Rozsah a provedení preklinických zkoušek léčiva jsou určeny předpokládaným použitím (např. pokud nelze vyloučit podávání léčiva těhotným ženám, musí se zjišťovat jeho teratogenita a embryotoxická) Předepsány jsou směrnicemi ICH (Guideline M3/R2/ on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals), které mají v ČR odraz ve vyhláškách ministerstva zdravotnictví a zemědělství a předpisech registračních orgánů).

Preklinické („neklinické“) zkoušky by měly být dostatečně rozsáhlé a zevrubné, aby bylo minimalizováno riziko, že při podstatně nákladnějším klinickém zkoušení kandidát na nové léčivo selže.

Ovšem ani náklady na preklinické zkoušky *in vivo*, tj. na zvířatech, nejsou nezanedbatelné. Ke zkouškám toxicity nelze používat pouze myši nebo laboratorní potkany (někdy se hovoří o pokusných krysách, to však není správné, protože jde o hlodavce rodu *Rattus norvegicus* = potkan, nikoliv *Rattus rattus* = krysa), ale mají se provádět na několika druzích savců, z čehož alespoň jeden nesmí být hlodavec. Zkoušky musí být prováděny s přesně specifikovanými chovy zvířat a za přesně definovaných podmínek týkajících se celého průběhu zkoušení od výběru zvířat pro zkoušky, šetrného zacházení, krmení, dávky a způsobu podání léčiva, odběru vzorků apod., až po hodnocení včetně statistického zpracování výsledků. Při jejich provádění musí být v ČR respektovány požadavky třetí části zákona o ochraně zvířat proti týrání „Ochrana pokusných zvířat“ (několikrát novelizovaný zákon č. 246/1992 Sb. v aktuálním znění), a rovněž i zásady **správné laboratorní praxe** (SLP, GLP) podle vyhlášky č. 86/2008 Sb. Jejich nedodržení nebo chyby při preklinickém zkoušení mohou vést k problémům při povolování klinických zkoušek. Aby se jim předešlo a zkoušky se nemusely opakovat nebo doplňovat, je účelné jejich rozsah a provedení předem konzultovat s registračními orgány.

Pro vývoj léčiva, které má požadovanou účinnost, jsou důležité především výsledky **toxikologických studií**. Mají prokázat, že látka nebude představovat přílišné riziko pro pacienta. Zjistí-li se toxické vedlejší účinky až při klinickém zkoušení nebo dokonce až po uvedení léčiva na trh, pak to znamená nejen velkou finanční ztrátu, ale také ohrožení dobrovolníků nebo pacientů přihlášených ke zkouškám. Toxické účinky látek závisí na podané dávce. Zkoušky toxicity proto slouží také k **navržení bezpečné dávky léčiva**, která může být pacientům bez většího rizika podávána.

Léčivo se při toxikologických studiích dává pokusným zvířatům v dostatečně vysokých dávkách, aby se projevil toxický účinek. Zkoušky se provádějí na několika druzích pokusných zvířat, z nichž alespoň v jednom případě nejde o hlodavce. Léčivo se podává pokud možná stejným způsobem, jakým má být podáváno klinicky, tj. např. intravenózně. Vedle toxicity účinné látky se musí prokazovat i toxicita pomocných látek, jsou-li použity poprvé. Podléhá-li léčivo významnému rozkladu během skladování, musí být hodnoceny i toxické účinky rozkladných produktů.

Toxikologické studie zahrnují v první řadě zjišťování **akutní toxicity**.

Při zkouškách akutní toxicity se zjišťuje účinek léčiva podávaného v jedné, popř. několika dávkách během 24 hodin. Zvířata se pozorují nejméně po dobu jednoho týdne, aby byl odhalen případný pozdní toxický účinek. Při klasických testech akutní toxicity byla zjišťována střední letální dávka, LD₅₀, nebo střední letální koncentrace LC₅₀, tj. dávka nebo koncentrace, která způsobí úhyn 50% pokusných zvířat. Zkoušená látka se přitom podávala ve zvyšujících se dávkách skupinám po 10 zvířecích samcích a 10 samicích a zjišťoval se úhyn zvířat, k němuž došlo do týdne. Tento způsob znamenal pro mnoho zvířat utrpení, hodnocena byla pouze mortalita a výsledky nebyly vždy předveditelné na člověka. Účelnost testů se proto stala předmětem diskusí mezi farmakologi, toxikologi i ochránci zvířat a legislativci. Ty vyústily v závěr, že při zjišťování systémové toxicity, tj. toxických vlivů látky na celý organismus, nelze zatím zkoušky *in vivo* nahradit. Klasický způsob zkoušek se ale dnes používá jen výjimečně tam, kde je to vědecky i eticky odůvodnitelné. Nahrazuje se alternativními zkouškami, zejména testem limitním, při němž se počet pokusných zvířat významně snižuje a místo úmrtnosti se hodnotí stav zvířete po podání léčiva.

Místo zvyšující dávky se přitom jednorázově podá jedné skupině samců a samic pokusných zvířat limitní dávka léčiva, obvykle 2 g/kg (látky s hodnotami LD₅₀ nad 2g/kg nejsou považovány za nebezpečné z toxikologického hlediska). Po skončení pozorování se výsledky vyhodnotí. Ukáže-li se, že dávka byla toxická, provedou se další zkoušky se sníženou dávkou. Pokusná zvířata, která přežila, se usmrtí a zjišťuje se, zda nedošlo k patologickým změnám na jejich orgánech.

Kromě akutní toxicity se zjišťuje **subakutní a chronická toxicita**.

Při subakutních toxikologických studiích se zjišťují nežádoucí účinky látky při několikanásobném podání v dávkách, o nichž se předpokládá, že sice vyvolají toxický efekt, nikoliv však smrt zvířete. Zkouška trvá 1-6 měsíců. U zvířat se pozorují známky toxického účinku (poruchy pozornosti, koordinace pohybů, podrážděnost a agresivita, únava apod.), kontroluje se jim moč a krev. Po skončení zkoušek se pokusná zvířata zabijí a hledají se známky poškození klíčových tkání a orgánů. Cílem studie je návrh bezpečné počáteční dávky pro klinické zkoušky. Zkoušky chronické toxicity se provádějí u léčiv, o nichž se předpokládá, že budou používána po delší dobu. Zkouška trvá 6 měsíců u hlodavců a 9 měsíců u jiných pokusných zvířat. Oba typy studií se musí provádět nejméně na dvou druzích zvířat, z nichž alespoň jedno nesmí být hlodavec.

Do kategorie toxikologických studií dále patří zkoušky **mutagenity a genotoxicity**, tj. schopnosti vyvolávat mutace DNA a trvale narušovat genetický materiál, **kancerogenity**, schopnosti vyvolávat nádorové bujení, **reprodukční toxicitu**, působení látky na reprodukční orgány, tvorbu vajíček a spermií, **teratogenity a embryotoxicity**, schopnosti vyvolávat poškození plodu. Dále se studují i **specifické toxické účinky látky na hlavní tělesné orgány**: vliv na kardiovaskulární systém, centrální nervový systém, gastrointestinální trakt, játra, ledviny, močové cesty apod.

Zkoušky **kancerogenity** se musí provádět u všech látek, které mají být dlouhodobě podávány a také u látek, u nichž lze na základě chemické struktury předpokládat poškozování DNA (obsahují alkylující skupiny, mohou vytvářet volné radikály apod.). Podle směrnice ICH S1 se mají zkoušky kancerogenity provádět se na dvou druzích zvířat, mohou to ale být hlodavci (obvykle potkan a myš).

Dlouhodobá zkouška na potkanech trvá nejméně 2 roky (ekvivalent průměrné doby života člověka). Dávky jsou pod hranici toxicity, aby zvířata při zkoušení neuhynula. Po skončení zkoušení se zvířata usmrtí a zkoumá se, zda se na jejich orgánech neobjevily nádory. Krátkodobé zkoušky se provádějí na transgenních myších s vysokou citlivostí na kancerogenní látky, nejlépe na kmenu TGM-p53 s vyřazeným tumorsupresorovým genem *p53* nebo kmenu rasH2 s nadměrnou expresí protoonkogenu *ras*. Pro srovnání se může podávat skupině zvířat některá z látek s prokázaným kancerogenním účinkem.

Mutagenita se většinou zjišťuje *in vitro* tzv. Amesovým testem. Při něm se používá mutovaný kmen bakterií *Salmonella typhimurium*, který nedokáže syntetizovat aminokyselinu histidin. Nemůže proto růst na bakteriologických půdách, které histidin neobsahují. Přidá-li se k bakteriím mutagenní látka, dochází často ke zpětné mutaci genu pro enzym podílející se na biosyntéze histidinu a bakterie začínají růst. Mutagenní potenciál se vyjadřuje jako počet „revertantů“ (počet kolonií bakterií, které narostou za 48 hodin při 37°C na Petriho misce s živným agarem neobsahujícím histidin) na 1 µg látky. Někdy se ke zkoušené látce ještě přidávají preparáty z jaterních buněk obsahující metabolizující enzymy. Přitom se zjistí, zda a jak jsou mutagenní hlavní metabolity látky. Alternativou je testování mutagenity na tkáňových kulturách savčích nebo i lidských buněk (buňky z vaječnicků čínské křečka, lymfocyty z periferní krve člověka nebo jiných savců). Projeví-li se látka jako mutagenní, zjišťuje se její mutagenita i při testech *in vivo*. Přitom se sleduje, zda u pokusných zvířat (nejčastěji myši) dochází k chromosomálním aberacím (poškození chromosomů, tvorba „mikrojader“ v lymfocytech, buňkách kostní dřene a zárodečných buňkách).

Genotoxicita se zjišťuje rovněž *in vitro* spolu s mutagenitou zkoumáním chromosomálních aberací, k nimž dochází v tkáňových kulturách vhodných buněk, nejčastěji z vaječnicků čínských křečků. Nově byl vyvinut test TG_x-DDI s panelem genů, pomocí něhož se zjišťuje poškození DNA

Zkoušky **reprodukční toxicity, embryotoxicity a teratogenity** se bez pokusných zvířat neobejdou. Nejprve se na samcích a samičkách laboratorních potkanů zkoumá, jestli látka negativně neovlivní vznik spermií a vajíček. Pak pokračují testy na březích samičkách dvou zvířecích druhů. Při nich se zjišťuje, zda látka nevyvolává deformace embrya nebo jinak embryo nepoškozuje, popř. nezpůsobí dokonce úhyn embrya. Nakonec se zkoumá, zda látka podávaná matce neovlivňuje průběh březosti, porod a růst narozených mláďat během doby kojení.

Při zkouškách **orgánové toxicity** se zjišťuje, zda látka nezpůsobí dočasné nebo trvalé poškození kardiovaskulárního systému, centrálního i vegetativního nervového systému, funkce ledvin, dýchání, krvetvorby a srážlivosti krve, gastrointestinálního traktu apod. Většina zkoušek orgánové toxicity se stále musí provádět na pokusných zvířatech, některé z nich se však daří, alespoň při screeningu, nahrazovat testy *in vitro*.

Např. zkouškami inhibice draslíkového kanálu hERG *in vitro* lze zjistit, zda léčivo může být příčinou vzniku srdeční arytmie. Přitom lze během 5-6 hodin otestovat 480 látek, zatímco předtím bylo v podstatě možné odhalit arytmii až při klinickém zkoušení. U vybraných kandidátů na léčivo je pak ale třeba zkoušky *in vitro* doplnit zkouškami *in vivo* a při následných klinických zkouškách se zaměřit i na zjišťování vlivu podaného léčiva na srdeční rytmus. K testům na jaterní toxicitu lze využít tkáňovou kulturu jaterních buněk získaných metodami buněčného inženýrství z přeprogramovaných lidských buněk vazivové tkáně.

Požadavky na veškeré testy specifické orgánové toxicity jsou v současné době mnohem náročnější než dříve. Rozsah zkoušení *in vivo* přitom roste i přes snahu maximálně šetřit laboratorní zvířata. Důvodem je minimalizace rizika tragicky končících projevů nežádoucích toxických vedlejších účinků některých léčiv po jejich uvedení na trh.

V minulosti byly zjištěny velmi nebezpečné vedlejší účinky pro určité skupiny pacientů u thalidomidu, terfenadinu, benoxaprofenu, flekainidu a enkainidu, nedávno u cerivastatinu a rofecoxibu.

Vedle toxikologických studií zaměřených na bezpečnost léčiva se při preklinických zkouškách *in vitro* i *in vivo* získávají modelová farmakologická data o vazbě léčiva na cílové struktury, účinnosti a specifčnosti účinku, absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci hodnoceného léčiva.

Z testů *in vitro* lze např. zmínit zkoušky absorpce v zažívacím traktu pomocí tzv. Caco 2 testu. Ten je založen na simulaci střevní sliznice buňkami nádoru střev speciálně kultivovanými tak, že vytvoří vrstvu podobající se střevnímu epitelu. Zkoumání permeace molekul léčiva přes tuto vrstvu pak přináší údaje, z nichž lze usuzovat, jak proběhne absorpce perorálních přípravků. K modelování metabolismu a lékových interakcí mohou být využity preparáty cytochromu P450, ale i „játra na čipu“, pro testování nefrotoxicity jsou vyvíjeny z kultur kmenových buněk „miniledviny“, zkoumána je i možnost vypěstování jiných miniaturních orgánů, „organoidů“, z tkáňových buněk atd. Testy *in vivo* ale stále ještě přinášejí komplexnější farmakologické údaje. Pro tyto testy je přitom vždy třeba vyvinout i **metodiky chemické analýzy** vhodné pro stanovení koncentrace léčiva a jeho metabolitů v krvi a dalších biologických tekutinách.

Z výsledků preklinického zkoušení by měl vyplynout **zpřesněný návrh indikace**, která bude klinicky ověřována, **návrh způsobu podání** (např. jednorázová injekce nebo infuze, tableta nebo tobolka apod.) a konečně i **návrh základní dávky**.

Kontrolní otázky pro zopakování

1. Co je cílem fáze vývoje léčiva? Co je obsahem fáze vývoje u původních a co u generických léčiv?
2. Co je polymorfie?
3. Proč může polymorfie ovlivnit vlastnosti léčivých přípravků?
4. Jak se liší polymorfni a pseudopolymorfni formy látky?
5. Co to jsou kokrystaly a čím se liší od běžných solí?
6. Jaké mohou být typy solvátů a čím jsou charakteristické?
7. Shrňte hlavní způsoby vyhledávání stabilních polymorfni forem látek.
8. Čím se liší enantiotropní a monotropní polymorfie?
9. Jak se polymorfni formy charakterizují?
10. Co má být výsledkem vývoje procesu výroby léčiva?
11. Co je prioritou vývoje procesu výroby léčiva a proč?
12. Jaké mohou být cíle optimalizace procesu?
13. Z čeho vychází koncepce zajištění kvality léčiv racionálním návrhem výrobního postupu (QbD)
14. Co si představujete pod pojmem „prostor návrhu“ (design space)?
15. Na jakých faktorech může záviset kvalita produktu?
16. Co je faktorový experiment?
17. Uveďte příklady kvalitativních, kvantitativních a „kategorických“ faktorů ovlivňujících výsledek procesu.
18. Proč nemusí vést sledování vlivu postupné změny jednotlivých faktorů k nalezení optimálního procesu?
19. Jaký je princip simplexové metody optimalizace?
20. Jakým způsobem mohou vznikat nečistoty obsažené v léčivu?
21. Jaké jsou základní dokumenty potřebné pro výrobu léčiva?
22. Dokumentace týkající se vývoje a výroby léčiv musí být v řízeném stavu. Co to znamená?
23. Co je obsahem validace výrobních procesů?
24. Jaké jsou typy validace?
25. Co všechno musí být při výrobě léčiv validované?
26. Co znamená pojem kvalifikace v souvislosti s procesem výroby léčiva a co se musí „kvalifikovat“?
27. Jak má být veden laboratorní deník a proč?
28. Co obsahuje Základní dokument o léčivé látce (Drug Master File) a jaké jsou jeho typy?