

Základní popis procesu vývoje originálních léčiv

Úvod

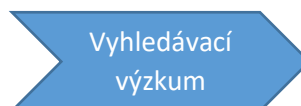
Vývoj originálních léčiv je velmi komplikovaný proces trvající řádově 10 - 15 let. Celkové náklady na vývoj jednoho originálního léčiva se dnes pohybují od několika set milionů EUR do několika miliard EUR. Běžně uváděný průměr je dnes 2-3 miliardy EUR na jedno úspěšně zavedené léčivo. Pro srovnání, stavba současné největší výletní lodi na světě, Harmony of the Seas, pro téměř 9.000 lidí, s tonáží 4x větší než proslulý Titanic, s 18 palubami, bazény, divadly, aquaparkem i ledovým kluzišťem a dalšími vymoženostmi, trvala pouze 3 roky a stála „pouhou“ 1 miliardu EUR.

Na procesu vývoje léčiv se podílí početné skupiny odborníků z celé řady vědeckých oborů, jako je organická syntéza, biochemie, molekulární biologie, chemická analytika a bio-analytika, farmakologie, fyziologie, medicína, regulatorní věda a farmako-ekonomika. Velice zjednodušeně lze tento proces znázornit následujícím schématem:



V tomto manuálu se zaměříme především na první fázi vývoje léčiv – vyhledávací výzkum. Ostatní fáze budou popsány pouze v obecných rysech, neboť konkrétní procesy v těchto fázích velmi záleží na zamýšlené indikaci léčiva a vlastnostech konkrétní molekuly jakožto účinné látky.

1. Vyhledávací výzkum a vývoj



Vyhledávací výzkum je sám o sobě složitým procesem, ve kterém se obecně hledá účinná látka, která by se mohla za určitých předpokladů stát léčivem pro nějakou konkrétní nemoc.

Většina v současnosti běžně používaných léčiv nebyla objevena na základě racionálního výzkumu, ale byla získána spíše náhodou, empirickým pozorováním a opakovanými pokusy na cílových proteinech, buňkách a zvířecích modelech. Notoricky známým a výmluvným příkladem je objev penicilínu Alexandrem Flemingem. Empirie a síla pozorování jsou proto velmi důležitou součástí objevování jak nových látek, tak jejich molekulárních cílů.

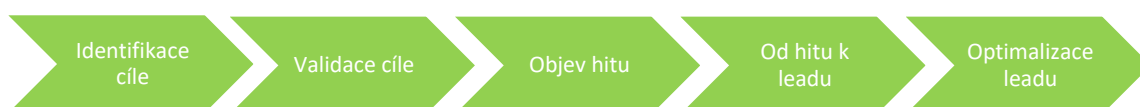
Snahu o racionální přístup k vývoji léčiv můžeme pozorovat zhruba od poloviny minulého století. Tato cesta k léčivům začíná identifikací nových molekulárních biologických cílů, které hrají významnou úlohu v patogenezi určitého onemocnění. Smysluplný výzkum by se měl zabývat pouze cíli, které mají nepopiratelnou relevanci k danému onemocnění, tedy takovými, jejichž interakce s léčivou vyvolá žádoucí změnu.

Přístup k výzkumu léčiv, při kterém nejdříve hledáme relevantní biologický cíl onemocnění a pro tento konkrétní cíl pak hledáme vhodné látky, které s ním interagují, je znám pod názvem „target-based drug discovery“, tedy výzkum léků založený na znalosti biologického cíle. Jeho rozvoj je spojen s obrovským pokrokem v biochemii a molekulární biologii.

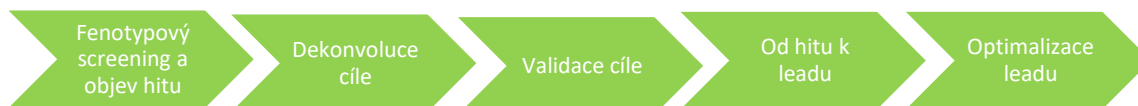
Přestože farmaceutický průmysl investoval nemalé úsilí a finanční prostředky do vývoje takovýchto racionálních metodik výzkumu, bilancování nad úspěšností tohoto principu ukázalo, že většina látek označovaných jako první ve své třídě (first-in-class) byla v období mezi lety 1999-2008 objevena na základě přístupu jiného, označovaného jako „phenotypic drug discovery“ neboli fenotypový výzkum léčiv. Jedná se o metodiku, při níž je látka aplikovaná na buňky nebo celé živé organismy a pozorována její odezva. Je-li dosaženo pomocí studované látky žádoucího efektu, může být dále vyvíjena.

Přestože jsou tyto dva přístupy koncepčně odlišné, mají řadu společných kroků a na oba tyto přístupy navazují preklinické a klinické zkoušky léčiv – vývoj léčiv:

Výzkum léčiv založený na cíli (Target based drug discovery) :



Fenotypový výzkum léčiv:



1.1. Biologické cíle léčiv (drug targets)

Léčivé látky interagují (obvykle prostřednictvím nevazebných interakcí) s jinými molekulami, v převážné většině s proteiny. Tato vazba většinou vyvolá signalizaci na úrovni buněk (např. sekreci, kontrakci nebo specifickou změnu metabolismu), která se projeví na orgánové úrovni

jako kýžená odezva (např. změna kardiovaskulární nebo trávicí funkce). Obecně je také možné říci, že léčivo nevytváří žádnou novou funkci, ale zvyšuje nebo snižuje funkci existující.

Projekt mapování lidského genomu započal v roce 1990 na U. S. Department of Energy (DOE) a National Institutes of Health (NIH) a podařilo se ho zvládnout již v roce 2003 tedy o 2 roky dříve, než bylo původně plánováno, a to díky rychlému pokroku v technologii sekvenování genů. Projekt stál 437 miliónů dolarů (~ 9 miliard korun). Tento výzkum mimo jiné predikuje existenci množství proteinů, u nichž neznáme jejich strukturu ani funkci, a které mohou sloužit jako potenciální biologické cíle pro terapii. Předpokládá se, že těchto potenciálních cílů využitelných v terapii je 2 až 3 tisíce (někdy je uváděno až 8 tisíc). Současná léčiva využívají cca 330 molekulárních cílů, z nichž 270 je kódováno lidským genomem a 60 patogenními organismy. Největší podíl léčiv náleží do kategorie malých molekul, tedy molekul, které nemají oligomerní nebo polymerní charakter (jako peptidy a nukleové kyseliny).

Hlavní biologické cíle můžeme rozdělit podle umístění a funkce na:

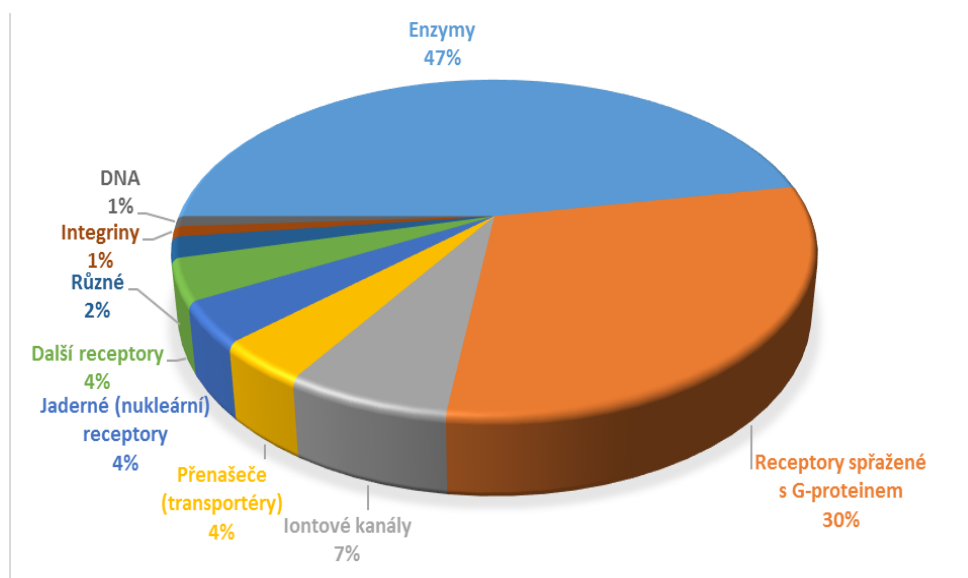
1) Cíle uvnitř buněk

- a. Enzymy
- b. Jaderné (nukleární) receptory
- c. Nukleové kyseliny

2) Cíle na povrchu buněk

- a. Přenašeče (transportéry)
- b. Iontové kanály
- c. Receptory

3) Další mechanismy účinků (např. antacida - neutralizují HCl v žaludku)



Obr. 1. Biologické cíle nízkomolekulárních látek v klinické praxi v roce 2002.

1.1.1. Enzymy jako biologické cíle léčiv

Enzymy jsou proteinové biokatalyzátory, které hrají centrální roli ve velké většině dějů, které se odehrávají v buňkách našeho těla. Přestože některé ribonukleové kyseliny, označované jako ribozymy, mají také katalytickou funkci, jejich role jako biologických cílů léčiv je zcela marginální. Enzymy jsou společně s receptory vůbec nejdůležitějšími biologickými cíli léčiv (Obr. 1). Tato exkluzivní role enzymů v medicíně je dána možností ovlivnění množství klíčových chemikálií v našich buňkách, inhibicí enzymů, které katalyzují syntézu těchto látek, nebo se podílí na jejich rozkladu. Inhibicí funkce enzymů nezbytných pro život bakteriálních a virových patogenů, můžeme znemožnit jejich replikaci v našem těle.

Transformace substrátů na produkty probíhá v katalytickém nebo aktivním místě enzymu, které má specifický tvar a obsahuje vhodné aminokyselinové zbytky pro vazbu substrátu. Při dané reakci dochází ke konformační změně enzymu (může být i poměrně výrazná), která umožňuje urychlení cílené reakce na základě specifických elektronových vlivů aminokyselinových zbytků (případně koenzymů nebo iontů kovů přítomných v aktivním místě enzymu). Přestože jsou známy také aktivátory některých enzymů, které zvyšují účinnost enzymatických reakcí, jejich farmaceutické využití je v porovnání s inhibitory enzymu, tedy látkami, které snižují aktivitu enzymů, zcela zanedbatelné. Podle vratnosti vazby inhibitoru a enzymu je dělíme na ireverzibilní a reverzibilní.

Reverzibilní inhibitory se váží na enzymy nekovalentě, zejména pomocí nevazebných interakcí. Naproti tomu ireverzibilní inhibitory, vytvářejí s cílovým enzymem velmi pevnou, nejčastěji kovalentní, vazbu.

1.1.2. Receptory jako biologické cíle léčiv

Receptory jsou proteiny integrované do plazmatické membrány buněk, které zprostředkovávají přenos signálu z vnějšího prostředí do buňky. Látky, které se váží na receptory, nazýváme ligandy a mohou jimi být neurotransmitery, hormony, růstové faktory, ale také léčiva. Vazba léčiva může stimulovat nebo potlačovat přirozenou funkci receptoru. Podle toho můžeme léčiva působící na receptory rozdělovat do několika skupin:

1. Agonista receptoru

Látky, které stimulují funkci receptoru a tím mimikují funkci přirozeného ligandu nazýváme agonisty receptoru. Tyto látky většinou připomínají svou strukturou přirozený ligand receptoru a vyvolávají obdobnou odpověď. Přirozené ligandy mohou sloužit jako vhodný výchozí bod pro design těchto látek. Pro kvantifikaci odpovědi receptoru na stimuly vyvolané ligandem používáme střední účinnou (efektivní) koncentraci EC₅₀, která je obdobou hodnoty IC₅₀ u enzymů a vyjadřuje koncentraci, při které je dosaženo 50% maximální odpovědi receptoru. Agonista receptoru může být:

a) Plný agonista, tedy látka vyvolávající plnou odpověď receptoru.

b) Parciální agonista, který i při plné saturaci receptoru vyvolává pouze částečnou odpověď.

Tento typ agonistů se chová do určité míry jako agonista i jako antagonist. Přestože může zabraňovat vazbě přirozeného ligandu na receptor, vyvolává částečnou aktivační odpověď.

2. Antagonista receptoru

Jako antagonisty receptorů označujeme látky, které inhibují efekt přirozeného ligandu nebo agonisty. V případě, že není přítomen přirozený ligand receptoru, se účinek antagonisty prakticky neprojeví. Antagonisty dělíme na:

a) Kompetitivní antagonisty.

Kompetitivní antagonisté se většinou váží na stejné místo jako přirozený ligand, ale nevyvolávají žádnou odpověď receptoru. Při zvyšování koncentrace přirozeného agonisty dochází k jejich kompetitivnímu vyvazování z vazby na receptor a dojde ke znovudosažení maximální odpovědi receptoru.

b) Nekompetitivní antagonisty.

Tyto látky se váží většinou v alosterickém místě receptoru a způsobují konformační změnu tohoto proteinu, která zabraňuje vazbě přirozeného ligandu nebo agonisty do aktivního místa receptoru. Díky tomu nedochází k obnovení funkce receptoru po zvýšení koncentrace agonisty.

3. Inverzní agonista

Inverzní agonisté jsou látky, které se váží do stejného místa jako agonisté, ale vyvolávají opačný efekt. Tento jev je způsoben takzvanou bazální aktivitou receptoru, která může být v důsledku vazby inverzního agonisty zcela potlačena.

1.1.3. Jaderné receptory

Specifickým typem receptorů jsou jaderné (nukleární) receptory, které se nenacházejí na povrchu buněk na membránách, ale jsou umístěny v cytosolu. Jedná se vlastně o ligandy řízené transkripční faktory, které ovlivňují průběh genové exprese a tím hrají centrální roli v procesu reprodukce, vývoje, metabolismu a homeostázy buněk. Lidské buňky obsahují 48 genů pro nukleární receptory. Po průniku přes buněčnou membránu se ligand váže na ligand-vážící doménu nukleárního receptoru v cytoplazmě. Tato vazba ligandu iniciuje konformační změnu receptoru, která může vést k přímému ovlivnění transkripce po translokaci komplexu do jádra, kde nukleární receptory interagují se specifickými úseky chromozomů pomocí domény vážící se na DNA (DNA-binding domain). Vazba ligandu na nukleární receptor může také vyvolat vazbu dalších regulačních molekul (kofaktorů), které umožňují stimulaci nebo útlum exprese patřičných genových produktů.

„Superrodina“ jaderných receptorů zahrnuje receptory pro:

- steroidní hormony
- hormony štítné žlázy
- retinoidy

- „seco-steroidy“ – vitamín D
- „orphan“ receptory – ligandy pro tyto receptory nejsou známé

Jaderné receptory patří mezi slibné biologické cíle pro řadu onemocnění včetně diabetu a několika druhů rakoviny, ale také různých metabolických onemocnění a Alzheimerovy choroby. Jedním z příkladů léčiv založených na interakci s jadernými receptory je chemoterapeutikum tamoxifen, které působí jako antagonist estrogenních receptorů a využívá se při léčbě estrogendependentních nádorů, zejména nádorů prsu.

1.1.4. Transportéry jako biologické cíle léčiv

Transportéry (nebo také membránové přenašeče) jsou proteiny, které jsou schopny přemísťovat ionty, živiny a metabolity přes biologické membrány. Tyto proteiny vykazují schopnost saturace a substrátovou specifitu. Přenašeče se nacházejí jak na povrchu buněk, tak na membránách mitochondrií a dalších organel.

Mezi farmakologicky důležité transportéry patří:

a) přenašeče iontů (pumpy)

Přenašeče iontů jsou transmembránové proteiny, které umožňují pohyb iontů proti koncentračnímu gradientu. Jedná se o aktivní transport a tyto proteiny jsou buď ATPasy anebo dochází ke kotransportu iontů přičemž jeden je hnaný gradientem. Například sodíkové kationty jsou aktivně vylučovány z buněk Na^+/K^+ ATPasou a je jim do buněk dovoleno se vrátit pomocí kotransportérů. Vzniklý koncentrační gradient Na^+ dodává energii pro konformační změnu těchto proteinů a umožňuje přenos (kotransport) dalších iontů např. draselných kationtů proti jejich koncentračnímu spádu. Tyto přenašeče jsou nezbytné pro zachování správné rovnováhy elektrolytů v buňkách a jejich funkce je klíčová pro přenos signálů po membránách i v dalších významných procesech.

Mezi pumpy, na které účinně cílí současná farmakoterapie, patří např.:

- Na^+ / K^+ pumpa také označovaná jako „sodíková pumpa“. Tato ATPasa je biologickým cílem srdečních glykosidů, jako jsou digitoxin a digoxin, které byly původně objeveny v náprstnicích (*Digitalis lanata* a *Digitalis purpurea*).
- H^+ / K^+ pumpa, která je označována jako „protonová pumpa“. Omeprazol, jedno z vůbec nejčastěji užívaných léčiv na světě, inhibuje funkci této pumpy v žaludeční sliznici a tím způsobuje snížení produkce kyseliny chlorovodíkové a používá se jako antiulcerózum, tedy látka proti žaludečním vředům.

b) Přenašeče neurotransmiterů

Tyto transportéry přenášejí neurotransmitery ze synaptické štěrbině zpět do neuronů (re-uptake neurotransmiteru). Jsou to velmi důležité biologické cíle psychofarmak. Existuje více než dvacet typů těchto přenašečů. Farmakologicky relevantní jsou především transportéry monoaminů – noradrenalinu (NET), serotoninu (SERT) a dopaminu (DAT). Látky inhibující

vychytávání neurotransmiterů ze synaptické štěrbině do presynaptického zakončení zvyšují množství neurotransmiterů v synaptické štěrbině. Tyto látky jsou využívány především jako antidepresiva, jejich 1. generace (tricyklická antidepresiva) a 2. generace byly neselektivní. Jako 3. generaci antidepresiv označujeme selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) např. sertralin nebo fluoxetin.

c) Přenašeče glukózy

Přenašejí glukózu a některé další hydrofilní látky do buněk. Buněčné membrány takřka všech nádorových buněk obsahují více těchto proteinů v porovnání se zdravými tkáněmi. Rychlý růst nádorů je závislý na dodávce energie v podobě glukózy a její nedostatek vede k inhibici proliferace a smrti buněk nádorů. Inhibitory některých těchto přenašečů mají proto potenciální využití v protinádorové terapii.

d) ABC Transportéry (ATP Binding Cassette Transporters)

ABC transportéry jsou jednou z největších rodin přenašečů a proteinů vůbec. V současné době se o nich nejčastěji mluví v souvislosti s mnohočetnou lékovou rezistencí u nádorových onemocnění (multidrug resistance).

1.1.5. Iontové kanály jako biologické cíle léčiv

Existuje celá řada iontových kanálů. Jedná se o proteiny, které umožňují průchod iontů přes plazmatickou membránu, díky vodou naplněným pórům které obsahují. Studie lidského genomu předpokládají, že naše buňky obsahují více než 400 různých iontových kanálů. Poruchy iontových kanálů jsou velmi často zodpovědné za onemocnění, a to jak daná poruchou genetického kódu jako je například cystická fibróza nebo epilepsie, tak průjmová onemocnění indukovaná účinkem toxinů na iontové kanály.

Iontové kanály většinou dělíme podle toho, na základě jakého stimulu dochází k jejich otevírání nebo podle iontů, které propouštějí.

Podle spouštěcího mechanismu můžeme rozdělit iontové kanály následovně:

a) Napětově řízené kanály

Tato skupina iontových kanálů je z farmakologického hlediska nejdůležitější. Jejich otevření je závislé na elektrickém potenciálu na membráně a patří sem:

- Na⁺ - sodíkové kanály Na_v, jejich blokátory se používají jako:
 - Lokální anestetika (lidokain)
 - Antiarytmika (chinidin, prokainamid)
 - Antiepileptika (fenytoin, lamotrigin)
- Ca²⁺- vápníkové kanály Ca_v jako terapeutika se používají blokátory:
 - Ca_v1 kanálů, které jsou lokalizované v srdečním a hladkém svalstvu. Jejich blokátory se používají jako antihypertenziva např. nifedipin, verapamil, diltiazem.
 - Ca_v2 kanálů, které umožňují kontrolu neurotransmiterů na presynaptickém stupni. Příkladem je léčivo ziconotid, které je indikováno na chronickou bolest.

- Ca_v3 kanálů, které v poslední době získaly určitou pozornost jako potenciální cíle pro kardiovaskulární onemocnění, epilepsii a spánkové poruchy.
- K^+ - draselné kanály jsou poměrně heterogenní skupinou iontových kanálů s velkým potenciálem pro vývoj nových terapeutik.
 - ATP-dependentní KATP je cílem pro sulfonylmočoviny (např. tolbutamid), které stimulují sekreci inzulínu blokací tohoto typu draselných kanálů v pankreatických β - buňkách.

b) Světlem řízené iontové kanály

c) Kanály řízené mechanicky

d) Kanály řízené cyklickými nukleotidy jsou typem iontových kanálů, který je potenciálně využitelný pro vývoj nových terapeutik. Některé cAMP řízené kanály mohou sloužit jako biologické cíle pro snížení srdečního rytmu u anginy pectoris.

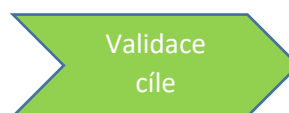
e) Kanály řízené ligandy (viz. Receptory s vnitřním iontovým kanálem)

1.2. Vlastnosti optimálního biologického cíle

1. Biologický cíl má významnou roli v patofyziologii onemocnění a musí významně ovlivňovat cílené onemocnění.
2. Vliv modulace daného biologického cíle je méně významný za fyziologických podmínek než za nemoci.
3. Výhodou může být známá krystalová struktura potenciálního cíle případně jiná strukturní informace (např. NMR struktura, homologní model atd.).
4. Zásadní je možnost připravit metodu pro testování malých molekul (biotest, bioassay), díky které budeme schopni identifikovat úvodní látky (hity) s požadovanou biologickou odezvou.
5. Klíčovou může být také selektivita cíle:
 - Mezidruhová selektivita hraje významnou roli v léčbě infekčních onemocnění. Naši primární snahou je najít biologický cíl mikrobiálních onemocnění, který je buď zcela odlišný od struktur lidských buněk např. lidských enzymů, nebo vykazuje významnou selektivitu vůči mikrobiálním funkčním prvkům např. významná selektivita antivirotik vůči virovým polymerasám v porovnání s polymerasami lidskými.
 - Neuniformní exprese biologického cíle v jednotlivých tkáních může být zásadní pro onemocnění, která postihují jen konkrétní orgány nebo tkáně. V současné době se například vyvíjí léky proti chronické lymfatické leukemii a některým druhům non-Hodgkinova lymfomu založené na inhibici PI3K δ , enzymu který výrazným způsobem zasahuje do PI3K-Akt signalizační kaskády, nejčastěji zmutované dráhy u nádorových onemocnění. Tato izoforma PI3K je exprimována především v leukocytech a umožňuje tak cílit pouze na tuto postiženou tkáň.

- Výhodou může být také selektivita k několika různým cílům, které vykazují synergický efekt proti danému onemocnění. Tuto vlastnost označujeme jako multitargeting. Jedním z významných úspěchů současné terapie nádorových onemocnění byl objev imatinibu. Tato látka byla původně vyvíjena jako inhibitor nereceptorové tyrosin kinasy ABL, mutované u chronické myeloidní leukemie. Až později se ukázalo, že tato unikátní látka cílí také na další proteinové kinasy a díky tomu může být požívaná v dalších indikacích, a dochází k potenciaci jejího účinku.
6. Je samozřejmě výhodou, pokud je naše znalost molekulární biologie cíle na takové úrovni, že jsme schopni predikovat potenciální vedlejší účinky a případně přímo diskvalifikovat nevhodný biologický cíl.
 7. Z hlediska potenciálního využití léčiva v klinické praxi je nutné brát v úvahu také otázku duševního vlastnictví (IP, intellectual property) a možnost patentovatelnosti malých molekul, které s vybraným biologickým cílem interagují.

1.3. Validace biologického cíle

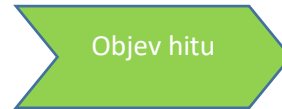


Nedostatečná validace biologického cíle je považována za primární příčinu selhání kandidátů v pozdních fázích klinického vývoje, které má za následek hlavní ekonomické ztráty. Validace cíle je proto jeden z klíčových okamžiků v rozhodovacím procesu ve farmaceutickém průmyslu. Validace biologického cíle obvykle zahrnuje tato prověření:

- Daný biologický cíl se vyskytuje v buňkách nebo tkáních, které mají relevanci k danému onemocnění.
- Může být ovlivněn molekulou, která má charakter léčiva.
- Může být připraven screeningový test pro tento cíl.
- Musí vykazovat požadovaný fenotyp na buněčných nebo zvířecích modelech.

Přestože plná validace cíle proběhne vlastně až při klinických zkouškách, vyloučení neperspektivních cílů na začátku procesu je jednou z hlavních výzev současného výzkumu a vývoje léčiv. Základem celého procesu je hluboká znalost funkce biologického cíle v buňce a organismu, která musí být založena jak na pozorováních *in vitro*, tak *in vivo*. Mezi postupy používané ve validačním procesu *in vitro*, patří metodiky sledující interakce mezi proteiny, které mohou identifikovat potenciální toxicitu účinku na biologický cíl. Při validaci biologických cílů se v tomto kontextu uplatňují zejména proteinové mikročipy a yeast two-hybrid system. Metody potlačování nebo naopak zvýšené exprese konkrétních proteinů v buňkách slouží k pochopení funkce biologických cílů jak v kontextu jednotlivých buněk, tak i na úrovni organismů. Použití knock-out genů, antisense oligonukleotidů a RNA interference patří mezi stěžejní postupy, které za tímto účelem využíváme.

1.4. Objev hitu



Mezi základní vlastnosti biologických cílů, které hledáme, patří možnost připravit biologický test (biotest, assay nebo také bioassay), pomocí kterého bude možné vyhledávat nové látky s definovanou aktivitou a určit její míru. Biotest sleduje, zda má látka danou biologickou aktivitu a determinuje rozsah této aktivity. Systematické vyhledávání látek, které vykazují nadprahovou odezvu v takovém biotestu označujeme jako screening.

Biologické testy můžeme rozdělit podle provedení na *in vitro* nebo *in vivo*.

Mezi *in vitro* metodiky řadíme:

1) Biochemické testy, které využívají purifikované proteiny získané rekombinantní technologií a následnou purifikaci. Jako expresní systémy se používají rychle rostoucí bakteriální, hmyzí nebo savčí buňky. Biochemické testy se využívají zejména u enzymů, ale také u receptorů. Jedná se o testy, u kterých je sledována afinita potenciálních ligandů k danému proteinu.

2) Buněčné testy, u kterých se využívají:

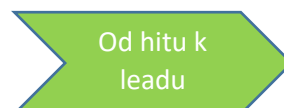
- a) nezměněné buňky,
- b) patologicky poškozené buňky např. nádorové (mohou sloužit jak pro cílený výzkum, tak pro fenotypový screening),
- c) savčí buňky (např. ovariální buňky křečička čínského CHO), ve kterých je uměle zvýšena exprese sledovaného proteinu. Tato technologie se obecně používá u membránových receptorů, iontových kanálů a nukleárních receptorů,
- d) mikrobiální buňky (bakteriální kultury, kvasinky) nebo buňky napadené buněčnýmiparazity (viry).

In vivo metodiky hledání hitů jsou v současné době zaměřené na fenotypový screening, kde se jako modelové organismy užívají zejména octomilky (*Drosophila melanogaster*), dánío pruhované (*Danio rerio*) nebo drápatky vodní (*Xenopus laevis*).

U některých onemocnění je poměrně obtížné používat relevantní biochemické testy nebo buněčné modely, a je nutné použít modely zvířecí. Trendem posledních deseti let v tomto oboru je nahrazování savčích modelů (myši) za jednodušší zvířecí modely jako dánía. Tento proces je označován jako replacement. U těchto organismů mohou být genetickou manipulací navozeny patologické stavy odpovídající stavům u člověka (např. zánět), případně jim může být transplantována část lidské tkáně (např. tkáň nádorová). Výhodou je hlavně jejich použitelnost v paralelních automatizovaných screeningových testech, ale také nižší náklady a nenáročnost chovu. U těchto modelů je výhodou přímé testování toxicity použitých látek.

Samozřejmou komplikací biotestů prováděných přímo na zvířatech je etický aspekt spojený se skutečností, že zvíře trpí. Všichni pracovníci proto musí podstoupit speciální kurz, a experimenty musí být schváleny etickou komisí. Dalším problémem je, že pozorované farmakokinetické i farmakodynamické parametry mohou být u pokusných zvířat jiné než u člověka a pozorovaná fenotypová odpověď může být způsobena nezávislými faktory.

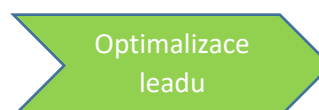
1.5. Od hitu k leadu



Objev hitu je pro výzkum nových léčiv velmi důležitý, přesto většina hitů nemá optimální farmakodynamické ani farmakokinetické vlastnosti. V tomto bodě přichází na řadu medicínální chemie, jejímž úkolem je optimalizace struktury hitu do podoby nové látky, která vychází ze struktury hitu, a které říkáme lead. Farmakodynamickými parametry v tomto případě rozumíme zejména, jakým mechanismem účinku látka působí a jaká je závislost tohoto efektu na jeho dávce. Optimalizací farmakodynamických parametrů je myšleno zvyšování (optimalizace) interakce látky s jejím molekulárním cílem, případně zvyšování selektivity k vybranému molekulárnímu cíli. Optimalizací farmakokinetických parametrů se pak rozumí úprava látky tak, aby byla schopna se ke svému molekulárnímu cíli dostat a působit na tento cíl po potřebnou dobu. Jedná se o optimalizaci vlastností látky týkající se základních farmakokinetických dějů v těle - absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace.

Z pohledu moderního přístupu k výzkumu léčiv je možné považovat farmakokinetický příspěvek za stejně důležitý jako příspěvek farmakodynamický, přestože v akademickém sektoru je většinou klade důraz na farmakodynamickou složku. Tento proces může být pro jednotlivé farmaceutické společnosti individuální a může se také podstatně lišit u jednotlivých projektů.

1.6. Optimalizace leadu



Prvním krokem k optimalizaci leadu bývá zvýšení jeho aktivity, selektivity účinku a případné potlačení toxicity. Pro tento účel jsou prostředky medicínální chemie nezastupitelné, a sehrávají v tomto procesu zásadní roli. Níže popsané postupy jsou využívány jak v úvodních fázích SAR (Structure-Activity Relationship) studií při výběru leadu, tak v průběhu jeho optimalizace. Příprava nových analogů nám dává nezbytné informace o možných modifikacích výchozí struktury a předpokládaném dalším postupu v jeho strategii. Můžeme rozlišit několik základních druhů analogie:

1.6.1. Homologie

Jako homologa označujeme deriváty, které se liší v dané homologní řadě o určitou konstantní jednotku (většinou - CH₂ -). Prodlužování uhlovodíkového řetězce může vést k několika různým fenoménům. Prodlužováním řetězce dochází k růstu hydrofobní části, který má vliv na základní fyzikálně-chemické parametry jako jsou log P (míra lipofilicity, viz níže), log S (míra rozpustnosti ve vodě), R_f a kritická micelární koncentrace.

1.6.2. Isosterie a bioisosterie

Koncept izosterie byl definován téměř před sto lety (v roce 1919) Irvingem Langmuirem a později rozvinut Grimmem a Erlenmeyerem. Izostery jsou definovány jako atomy, skupiny atomů nebo ionty, které mají stejné mocenství (valenční číslo, stejný počet elektronů ve valenční vrstvě). Takovéto atomy nebo skupiny atomu tak sdílejí obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Hans Erlenmeyer také poprvé vyslovil myšlenku, že strukturně odlišné molekuly mohou být obdobně rozeznávány biologickými systémy, i když pojem bioizoster byl zaveden až Harrisem Friedmanem v padesátých letech minulého století. Podle Burgera definujeme bioizostery jako látky nebo skupiny, které mají ekvivalentní tvar a objem, přibližně stejnou distribuci elektronů, a které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako např. hydrofobicitu. Bioizosterní sloučeniny ovlivňují stejné biochemické systémy, a vyúsťují v biologické vlastnosti, které jsou navzájem příbuzné. Dle Thornbera jsou bioizostery látky nebo jejich skupiny, které sdílejí fyzikální a chemické podobnosti, a poskytují značně podobné biologické efekty.

Bioizostery mohou ovlivňovat množství parametrů a při bioizosterní záměně bychom měli brát v úvahu:

- velikost
- konformaci
- indukční a mezomerní efekt
- polarizovatelnost
- formování vodíkových vazeb
- pK_a
- logS
- logP
- reaktivitu a stabilitu

Koncept bioizosterů si vydobyl nezastupitelnou pozici v moderní medicíně, stal se jednou ze základních taktik ve vývoji nových léčiv od hitu přes leady až po finální klinické kandidáty. Díky široké variabilitě výše zmíněných parametrů je tímto přístupem možné pozměnit řadu vlastností léčiv od vlastních farmakodynamických parametrů (aktivita, selektivita) přes parametry farmakokinetické (metabolismus, rychlost absorpce a exkrece, omezení toxikoforů) až po patentovatelnost nově připravených látek.

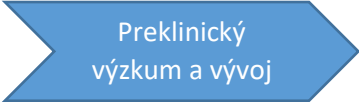
1.6.3. Záměna skeletu

Vedle užití bioizosterů pro cílenou optimalizaci aktivních struktur, se v procesu hit to lead a při optimalizaci leadu uplatňují další strategie umožňující racionální modifikaci výchozích

derivátů. S tématem bioizosterie kruhu úzce souvisí jedna z nich - záměna skeletu neboli „scaffold hopping“. Scaffold hopping se uplatňuje při hledání nového chemického prostoru, a to jak z důvodu optimalizace interakce s cílovou strukturou, tak z důvodů čistě pragmatických jako jsou patentovatelnost produktu a příprava me too derivátů.

Pojem scaffold hopping se užívá v několika situacích spojených s obměnou centrálního skeletu, od prosté změny jádra molekuly, až po komplexní transformaci struktury, při kterých zůstává zachována nebo roste sledovaná biologická aktivita. Tradičním příkladem scaffold hoppingu jsou ligandy GABAA receptoru, které přes svou značnou strukturní variabilitu vykazují obdobné sedativní účinky (Diazepam, Zolpidem, Zopiclon, Zaleplon).

2. Preklinický výzkum a vývoj



Preklinický
výzkum a vývoj

V rámci preklinického vývoje je optimalizována „lead structure“ s cílem vytvoření kandidáta pro vývoj, „development candidate“. Děje se tak v rámci celé řady *in vitro* a *in vivo* experimentů, které bývají souhrnně nazývány ADME-TOX (Absorpce Distribuce Metabolismus Exkrece – Toxicita).

Klíčovými kritérii jsou přijatelná farmakokinetika a toxicita *in vitro* i *in vivo* modelech, jednoduchá formulace, *in vivo* preklinická účinnost, příznivá toxikologie a možnost syntézy ve větším měřítku. V případě, že sloučenina neuspěje, testují se obvykle její blízká analoga a hledá se optimální struktura.

Chemická sloučenina, která má sloužit jako léčivo, musí mít také vysokou afinitu k cíli, léčivo by se k němu mělo významně vázat při nízkých mikro- až nanomolárních koncentracích. Cílem farmakologického výzkumu ve spolupráci s medicínskou chemií je tyto vlastnosti zlepšit tak, aby terapeutický účinek měla co nejnižší koncentrace léčiva. Za tím účelem se lead structure cíleně modifikuje, funkční skupiny jsou často nahrazovány jejich isostery.

2.1. ADME

Absorpce je schopnost látky překonat bariéry jako je střešní stěna, hematoencefalická bariéra, plíce, sliznice nebo kůže.

Distribuce je proces pohybu látky tělem a tendence kumulace v jednotlivých orgánech a tkáních.

Metabolismus je proces chemické přeměny látky v těle, především v játrech. Je nutné sledovat jednotlivé metabolity z hlediska jejich možné účinnosti včetně možné interakce s jinými léčivy.

Exkrece je proces, kterým látka z těla odchází.

Všechny výše uvedené procesy jsou samy o sobě složité a v souhře určují farmakokinetiku účinné látky. Kandidát vývoje v nich musí vykazovat dobré nebo alespoň přijatelné vlastnosti, jinak nemůže být jako léčivo použit, i přes pozitivní terapeutický efekt. Navíc, právě účinnost léku často na ADME vlastnostech látky kriticky závisí.

Jedním z faktorů ovlivňujících farmakokinetiku je i indukce genové exprese biotransformačních enzymů vyvolaná aktivací nukleárních receptorů xenobiotiky – fenomén autoindukce biotransformace. V rámci ADME je testováno, zda látky inhibují biotransformační enzymy cytochromu P450, zda se váží na nukleární receptory a zda interagují s transportními mechanismy. Na základě těchto testů pak můžeme předem odhadnout rizika lékových interakcí (drug-drug interactions).

Pro základní předpověď ADME vlastností existují sofistikované *in silico* metody, ale dosud se zároveň používají sady obvykle několika empirických pravidel, která souvisejí s fyzikálními vlastnostmi molekul, jako je rozpustnost, polarita, polarizovatelnost apod. Pro léčiva, u nichž se uvažuje o perorální aplikaci, se často používají Lipinského pravidla. Lipinského pravidla doporučují, aby molekulová hmotnost léčiva byla nižší než 500, index lipofility $\log P < 5$, dále má mít molekula určitý počet donorů nebo akceptorů vodíkových vazeb. Chemická sloučenina, která tato pravidla splňuje, je potenciální léčivo.

Experimentální metody ADME studií:

- Průchod přes Caco-2 buňky případně PAMPA membránu (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)
- Metabolická stabilita na hepatocytech /resp. mikrosomální stabilita
- Metabolomika – identifikace metabolitů *in vitro* a *in vivo*
- Vazba na plazmatické bílkoviny a volná frakce v plazmě
- Interakce s cytochromy P450, indukční studie
- Vazba na transportéry (např. MDR1-MDCK model pro vazbu na P-glykoprotein, eseje na interakci s ABC a SLC transportéry dle směrnic FDA a EMA)

Pro zlepšení ADME vlastností je obvyklá i příprava tzv. prodrugs, což znamená, že k lead struktuře je kovalentně navázána jiná molekula, která tyto ADME vlastnosti vhodně upraví. Tato molekula je pak odštěpena enzymy v místě působení za uvolnění samotného léčiva. Prodrugs jsou obvykle méně aktivní než vlastní chemical lead, to však není na závadu, neboť účinná část molekuly je z nich v místě působení uvolněna.

2.2. Toxicita

V **preklinické fázi**, tedy až do fáze prvního podání lidskému subjektu, se využívají nejčastěji experimenty na zvířecích modelech, ať již na celém zvířeti, nebo na izolovaných orgánech. Preklinické zkoušky by měly poskytnout následující údaje:

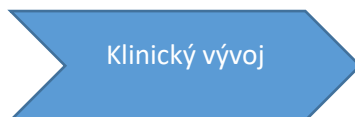
- akutní toxicita (jednorázové podání),
- MTD (maximální tolerovaná dávka)
- subakutní toxicita (opakované podání – do 2 týdnů),
- dávková závislost farmakokinetických parametrů
- subchronická toxicita (opakované podání – 1–3 měsíce),
- chronická toxicita (opakované podání – 3–24 měsíců),
- karcinogenita,
- genotoxicita,
- reprodukční a vývojová toxicita,
- lokální a orgánová toxicita (kardiotoxicita, nefrotoxicita, hepatotoxicita ...atd.)
- imunotoxicita
- neurotoxicita

Preklinické testy toxicity jsou dlouhodobé a poměrně nákladné. K provedení všech zkoušek a analýz je zapotřebí 2–5 let. Pro preklinické zkoušení je potřeba velké množství laboratorních zvířat. Tímto problémem se zabývá mnoho vědeckých pracovníků a určitého pokroku ve snížení počtu zvířat potřebného k zachování spolehlivosti získaných údajů bylo již dosaženo. Stále více jsou využívány tkáňové kultury a počítačové modely.

Využití všech těchto možností pro predikci účinku léčiva u člověka je však ještě poněkud omezené, proto jsou experimenty se zvířecími modely stále součástí vývoje nových léčiv. I v případě využití zvířecích modelů je však nutno konstatovat, že extrapolace toxicity ze zvířat na člověka není jednoduše aplikovatelná. Důvodem jsou zejména mezidruhové rozdíly v anatomii, fyziologii, genetice a metabolismu, navíc vzácné vedlejší efekty jsou zřídka u zvířat detekovány. Tak jako v případě správné klinické praxe i správné statistické praxe, existují dokumenty ICH S 1–9 a ICH M 3 (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), které se zabývají obecnými principy preklinického testování včetně hodnocení bezpečnosti.

Publikovány byly i doporučené postupy Evropské lékové agentury (EMA) s konkrétními požadavky na testování v rámci výzkumné či registrační fáze, které jsou specifické dle typu přípravku, a to včetně doporučení k problematice pomocných látek a nečistot a požadavků v oblasti dopadu na životní prostředí. Definují i požadavky na časovou posloupnost a vyhodnocení preklinických testů před zahájením jednotlivých fází klinických hodnocení.

3. Klinický vývoj



Celý proces **klinického hodnocení (klinických studií)** je tradičně dělen na čtyři fáze, přičemž fáze I–III předcházejí registraci léčiva. Z hlediska informačního lze studie méně tradičně rozdělit na studie explorační a studie konfirmační.

3.1. Fáze I

Klinická hodnocení fáze I navazují bezprostředně na preklinické experimenty. Jedná se tedy o studie, ve kterých je nově vyvíjený léčivý přípravek poprvé podán lidským subjektům, nejčastěji zdravým dobrovolníkům a jejím primárním cílem je **prokázání bezpečnosti**. Součástí klinických hodnocení fáze I jsou i farmakokinetické studie (PK), jejichž cílem je získat podrobnější informace o osudu léčivých přípravků v lidském organismu, údaje o vstřebávání přípravku (absorpce), dále o jeho rozdělování (distribuci) v organismu, metabolických přeměnách (biotransformaci), interakcích s ostatními látkami a vylučování (exkreci) přípravků z organismu do prostředí.

Počty zařazovaných subjektů jsou nízké (desítky subjektů). V této fázi bývá také nejčastějším hodnoceným primárním cílem stanovení tzv. maximální tolerovatelné dávky (MTD), kterou je možné definovat jako takovou dávku přípravku, při které jsou projevy toxicity ještě akceptovatelné, případně zvládnutelné ošetřujícím personálem. Taková dávka přípravku, která již způsobuje nepřijatelné a nevládnutelné projevy toxicity, se označuje jako tzv. dávku limitující toxicita (DLT – dose limiting toxicity).

Na základě exaktně stanovené MTD v projektech fáze I se stanovují optimální dávkovací režimy hodnoceného přípravku pro testování v následných fázích klinického hodnocení zaměřených již především na analýzu účinnosti (fáze II–IV).

3.2. Fáze II

Jestliže primárním cílem klinického hodnocení fáze I je posouzení bezpečnosti, stanovení MTD a stanovení optimálního dávkovacího režimu pro další testování hodnoceného léčiva, ve studiích fáze II je naším cílem **zhodnocení účinnosti**. Výsledky těchto experimentů jsou významným rozhodovacím bodem žadatele o registraci léčivého přípravku pro jeho testování v dalších fázích. Každý krok testování je značně finančně a organizačně náročný, a je proto nutné testovat jen přípravky se skutečně velmi nadějnými vlastnostmi. Hlavním cílem této fáze testování je tedy neukončit je v případě slibné účinnosti, a naopak, ukončit je v případě průkazu účinnosti nedostatečné.

V rámci studií fáze II se tedy hodnocené léčivo podává v dané indikaci určitému počtu vybraných, protokolem přesně definovaných nemocných (desítky až stovky). Ověřují se léčebné účinky na lidský organismus, primárním cílem bývá hodnocení účinnosti, shromažďují se samozřejmě i data o bezpečnosti. Z hlediska hodnocení účinnosti je primární hodnocený parametr volen s ohledem na diagnózu, ve které je léčivo zkoušeno.

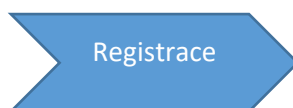
3.3. Fáze III

Navazují na předchozí dvě fáze výzkumu. Při jejich plánuování máme tedy k dispozici základní data o bezpečnosti, známe optimální dávkovací schéma přípravku a máme data dokladující jeho účinnost. Cílem studií fáze III je provést prostřednictvím řízeného experimentu přímé srovnání bezpečnosti a účinnosti hodnoceného přípravku s kontrolou, kterou bývá aktuálně nejlepší standardní léčba. Hlavním cílem těchto experimentů je tedy přinést data prokazující, že účinnost a bezpečnost nového hodnoceného přípravku je stejná nebo lepší než u dosud standardně používaných přípravků.

Do těchto experimentů jsou zařazovány subjekty hodnocení s podobnými vstupními a vylučujícími kritérii jako v případě projektů fáze II. Počet zařazovaných subjektů bývá však vyšší, často v rozmezí 100–1 000 podle designu konkrétní studie a samozřejmě podle incidence daného onemocnění.

Tato čísla je však nutno brát jako velmi přibližná, existují experimenty fáze III s pouze desítkami subjektů a na druhé straně projekty, do kterých je zařazeno subjektů několik tisíc. V této fázi výzkumu rovněž nebývají zařazováni zdraví dobrovolníci.

4. Registrace



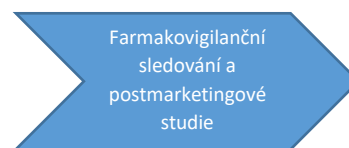
Registrace probíhá v rámci jednotlivých států na základě jejich legislativy o lécích. Státní úřady pro kontrolu léčiv hodnotí předloženou dokumentaci, která musí dostatečně prokázat všechna kritéria bezpečnosti a účinnosti nového léčivého přípravku. Tato kritéria jsou zakotvena v rozsáhlém systému navzájem provázaných předpisů a směrnic, které většinou kopírují mezinárodně uznávané zásady lékové regulace. Ty vycházejí z historické zkušenosti národních i mezinárodních registračních úřadů. Lze říci, že v současné době celosvětovou lékovou regulační politiku vytváří 3 úřady:

- FDA (Federal Drug & Food Agency, U.S.A)
- EMA (European Medicin Agency)
- PMDA (Pharmaceutical & Medical Device Agency, Japan)

Mezi těmito agenturami probíhá permanentní a poměrně intenzivní jednání o harmonizaci, takže se předpisy a směrnice pro vývoj, výrobu, kontrolu a distribuci léčiv neustále sblíží. Nicméně, jsou v nich stále určité rozdíly. Jednotlivé suverénní státy pak přijímají s většími či menšími odchylkami jeden ze systémů předpisů, pokynů a směrnic výše uvedených 3 regulačních autorit. Je proto nutné, aby aplikant vytvořil pro každý trh specifický dossier, který bude tyto rozdíly respektovat.

Rozsah registrační dokumentace (dossier) odpovídá rozsáhlosti systému regulatorních pokynů a směrnic předepisujících velké množství experimentů a důkazů bezpečnosti a účinnosti léku. Proto nepřekvapí, že běžný dossier obsahuje několik tisíc stran a doba posouzení registračním úřadem trvá zpravidla 1-3 roky, někdy i déle.

5. Farmakovigilanční sledování a postmarketingové studie



5.1. Farmakovigilance

Farmakovigilance je v podstatě sledování rizik léčiv po jejich uvedení do klinické praxe a studium nežádoucích účinků a jiných problémů spojených s podáváním léčiv, jež má za účel snížit rizika spojená s podáním léků a také šířit informace o možných rizicích.

Zdrojem informací o závažných neočekávaných nežádoucích účincích pro farmakovigilanční systém jsou především spontánní hlášení (jak od lékařů, což jim ukládá zákonná povinnost, tak i od pacientů), dále pak různé druhy studií. Srovnání počtu hlášení nežádoucích účinků léčiv v rámci EU přibližuje obr. 11.2.3. Povinnost sledovat chování léčivého přípravku má jak držitel registračního rozhodnutí, tak i státní instituce, jež zajišťují systém sledování a přehodnocování bezpečnosti léčivých přípravků.

5.2 Postmarketingové studie, Fáze IV

Klinická hodnocení fáze IV jsou prováděna až po registraci testovaného přípravku, a tedy po zahájení jeho běžného používání v klinické praxi. Význam těchto experimentů bývá někdy podceňován, což vede k relativně malému počtu realizovaných projektů této fáze.

Hlavním smyslem těchto experimentů je ověření skutečností o bezpečnosti a účinnosti přípravků zjištěných v průběhu předchozích fází vývoje v reálných populacích pacientů. V některých případech se tyto projekty realizují často jen z marketingových důvodů, nicméně v řadě případů jsou prováděny s cílem testování hodnotných vědeckých hypotéz. Výsledky těchto experimentů mohou vést např. k úpravě dávkovacích režimů, k rozšíření indikace apod. Dle současné legislativy se jedná většinou o neintervenční klinické hodnocení (léčivý přípravek je podáván v souladu se souhrnem údajů o přípravku, tedy v souladu s registračním rozhodnutím). Další možností je pak neintervenční poregistrační klinické hodnocení bezpečnosti jako významný nástroj farmakovigilance.

Tento manuál byl kompilován s použitím literatury:

- 1) **Radim Nencka:** Základní principy výzkumu nových léčiv (skripta Přírodovědecké fakulty University Palackého v Olomouci, 2015)
- 2) **Regina Demlová, Petr Džubák, Milan Urban, Marián Hajdúch:** 11 Kapitola z knihy „Molekulární medicína“, Ondřej Slabý et al., nakl. Galén 2015
- 3) **Cyprotex:** ADME Guide, 2nd Edition