

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Strategie vývoje léčiv ALS zaměřených na
modulaci superoxiddismutasy 1**

Bakalářská práce

Autor: Lucie Hlavová

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: 1407R016 Toxikologie a analýza škodlivin

Vedoucí práce: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.



Zadání bakalářské práce

Autor:	Lucie Hlavová
Studium:	S17CH028BP
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Toxikologie a analýza škodlivin
Název bakalářské práce:	Strategie vývoje léčiv ALS zaměřených na modulaci superoxiddismutasy 1
Název bakalářské práce AJ:	Strategy of drug design against ALS focused on modulation of superoxide dismutase 1

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Amyotrofni laterální skleróza (ALS) je neurodegenerativní onemocnění, jehož příčina není v současné době stále objasněna. Řada přístupů, které se pokouší objevit léčivo na ALS, se však zaměřuje na modulaci aktivity superoxiddismutasy 1 (SOD1). Tato bakalářská práce se věnuje charakterizaci ALS, dále předkládá stručný popis možných biologických cílů využitelných při léčbě této nemoci a konečně se zabývá rozбором různých strategií návrhu nízkomolekulárních látek, které by mohly zpomalit nebo zastavit progresi ALS.

Corcia, P., et al.: Staging amyotrophic lateral sclerosis: A new focus on progression, *Rev. Neurol. (Paris)*, 2018, 18,30733-30740.

Mathis, S., et al.: Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis, *Neural Regen. Res.*, 2017, 12:181-184.

Martinez, A., et al.: Drugs in clinical development for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis, *Ex. Op. Inve. Drugs*, 2017, 26:403-414.

Garantující pracoviště: Katedra chemie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 27.6.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Lucie Hlavová

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, trpělivost, ochotu a vstřícnost při konzultacích a vypracování mé bakalářské práce.

Anotace

HLAVOVÁ, L. *Strategie vývoje léčiv ALS zaměřených na modulaci superoxidodismutasy 1*. Hradec Králové, 2021. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Rafael Doležal. 85 s.

Tato rešeršní bakalářská práce se zaměřuje na vývoj a výzkum léčiv. Stručně popisuje biologické cíle pro hledání nových léčiv. V souvislosti s těmito tématy je zde rozebrána nemoc amyotrofická laterální skleróza (ALS) a problémy hledání léčiva, které by zpomalilo či zastavilo progresi ALS. Nejvíce se zaměřuje na klíčový enzym superoxidodismutasu 1.

Klíčová slova

Amyotrofická laterální skleróza, výzkum, vývoj, superoxidodismutasa 1, léčivo, biologický cíl

Annotation

HLAVOVÁ, L. *Strategy of drug design against ALS focused on modulation superoxide dismutase 1*. Hradec Králové, 2021. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Rafael Doležal. 85 p.

This Bachelor thesis focuses on review of the actual development and research of drugs. It briefly describes the biological targets for finding new drugs. In connection with these topics, the disease amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and the problems of finding a drug that would slow down or stop the progression of ALS are discussed. It focuses mostly on the key enzyme superoxide dismutase 1.

Key word

Amyotrophic lateral sclerosis, research, development, superoxide dismutase 1, drug, biological target

*Neustále hledejme, navzdory všemu.
Bez přestání zkoumejme. Je to skutečně ta nejlepší
cesta k poznání a snad díky našemu úsilí
vyneseme zítra pacientovi verdikt, který nebude
stejný, jaký musíme tomuto muži dát dnes.*

Charcot (1889)

Obsah

Úvod	10
1 Principy výzkumu a vývoje léčiv.....	11
1.1 Operační management výzkumu a vývoje léčiv.....	11
1.1.1 Výzkumná fáze léčiv.....	12
1.1.2 Fáze preklinického vývoje léčiv.....	13
1.1.3 Fáze klinického zkoušení léčiv.....	15
1.2 Financování vývoje a výzkumu originálních léčiv	16
2 Historie výzkumu a vývoje léčiv	16
2.1 Příběh objevu aspirinu	17
2.2 Příběh objevu penicilinu	18
3 Farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti potenciálních léčiv	19
3.1 Farmakodynamika potenciálních léčiv	19
3.2 Farmakokinetika potenciálních léčiv	20
4 Biologický cíl a jeho chemická modulace	22
4.1 Typologie biologických cílů	24
4.2 Enzymy jako biologické cíle.....	25
4.2.1 Reverzibilní inhibitory enzymů.....	26
4.2.2 Ireverzibilní inhibitory	29
4.3 Receptory.....	29
4.3.1 Agonista receptoru	30
4.3.2 Antagonista receptoru	30
4.4 Jaderné receptory a iontové kanály.....	31
4.5 Transportéry	31
5 Racionální design chemických struktur.....	32
6 Počítačové metody návrhu léčiv	34
6.1 Ligandově založené metody návrhu léčiv	34

6.1.1	QSAR metoda	35
6.1.2	Virtuální screening založený na farmakoforech	37
6.1.3	Lékový charakter a Lipinského pravidlo	38
6.2	Metody návrhu léčiv založené na struktuře biologického cíle.....	39
6.2.1	Virtuální screening založený na dockingu	39
6.2.2	Screening založený na podobnosti tvaru ligandů.....	41
6.2.3	Objevování léčiv na základě fragmentů.....	41
7	Metody designu léčiv v klasické medicíně.....	42
7.1	Homologie.....	42
7.2	Izosterie a bioizosterie	43
8	Neurodegenerativní onemocnění.....	44
8.1	Struktura neuronu.....	44
9	Amyotrofická laterální skleróza (ALS)	46
9.1	Rozdělení ALS podle Světové neurologické federace	49
9.2	State of the art diagnostiky ALS	49
9.3	Současná farmakoterapie ALS	52
10	Struktura, funkce a vlastnosti SOD1	55
10.1	Vlastnosti superoxidů.....	56
10.2	Struktura SOD1	56
10.3	Funkce a vlastnosti SOD1	57
10.4	Nejčastější mutace v genu SOD1.....	58
11	SOD1 jako biologický cíl pro racionální design léčiv ALS.....	59
11.1	SOD1 a glutamatergní systém	60
12	Aktuální hitové struktury ve výzkumu léčiv ALS.....	61
12.1	Antiagregátory SOD1	61
12.2	Protektory homodimerů SOD1	64
13	Léčiva ALS v preklinické fázi testování	64

13.1	Natotechnologie v léčbě ALS.....	64
13.2	Léčba ALS pomocí iPSC metody	65
14	Aktuální léčiva ALS ve fázi klinického testování.....	66
15	Diskuse	70
	Závěr.....	72
	Citovaná literatura.....	73
	Použité zkratky	84

Úvod

Amyotrofická laterální skleróza neboli Lou Gehrigova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které je již poměrně probádané, ale přesto je s ním spojeno množství nezodpovězených otázek. Nejčastěji jsou nemocí zasaženi muži ve věku 50-70 let. Na začátku onemocnění se nemoc projevuje oslabováním svalstva a následně ovlivňuje i jemnou motoriku. V pozdějších fázích se pacienti o sebe nedokáží postarat, ztrácí schopnost mluvy a jsou čím dál více závislí na pomoci blízkých. Nejznámějším pacientem této nemoci byl anglický vědec a teoretický fyzik Stephen Hawking (8.ledna 1942 – 14. března 2018). Mezi známé české osobnosti trpící touto nemocí patří například bývalý premiér Stanislav Gross či česká překladatelka Dana Gálová. I po několikaletém výzkumu se stále netuší, co přesně toto onemocnění způsobuje. V posledních letech vědci zkouší mířit léčiva směrem na enzym superoxidodismutasu 1 (SOD1). Při mutaci genu SOD1 získává tento enzym toxické vlastnosti. Enzym má funkci zbavovat tělo toxických superoxidových radikálů, které poškozují buňky. Při mutaci enzymu SOD1 dochází k poruše homeostázy a enzym nefunguje, jak má.

V této rešeršní bakalářské práci bych ráda popsala nejdůležitější metody výzkumu a vývoje léčiv. Následně se zaměřím na ALS a základní poznatky ohledně léčiv ALS, které jsou zatím pouze ve vývoji jak *in silico*, tak *in vitro* a *in vivo*. Ačkoli bylo výzkumu léčiv ALS již věnováno značné úsilí, kauzální léčivo proti této nemoci není stále nalezeno, pouze se využívají symptomatická léčiva. Vyhledávání léčiva proti ALS je poměrně důležité, protože by se mohlo využívat i pro jiná neurodegenerativní onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba či spinální svalová atrofie. V této bakalářské práci shrnuji pouze střípek informací o této velmi komplikované nemoci. Důkladné pokrytí problematiky by si vyžádalo mnohem více textu.

1 Principy výzkumu a vývoje léčiv

Za výzkum můžeme považovat jakoukoliv teoretickou či experimentální vědeckou práci, která vede k získání nových vědomostí a poznatků v dané oblasti. Účelem výzkumu léčiv je nalezení vhodné chemické struktury, která má vlastnosti potenciálního léčiva (tzv. drug-like vlastnosti). Dále do výzkumu léčiv náleží posouzení bezpečnosti a účinnosti vybraných chemických struktur, které se zjišťují testováním *in vitro* či prováděním experimentů *in vivo* na zvířatech. Ve výzkumné části se také stále více začínají uplatňovat metody *in silico*, které pomocí počítačových výpočtů mohou značně urychlit a zefektivnit design optimálních struktur potenciálních léčiv. Ve vývojové části se tyto získané informace vyhodnocují, vlastnosti kandidátních chemických struktur se dále optimalizují, a nejslibnější chemické látky následně vstupují do klinické fáze, kde dochází k testování na lidech. Na rozdíl od výzkumné fáze, která může mít divergentní charakter, pokud jde o pestrost studovaných chemických struktur, ve vývojové části mnohdy dochází jen k minimálním chemickým obměnám zkoumaných struktur, jejichž cílem je zachovat klíčové farmakologické vlastnosti (např. selektivitu vůči vybranému biologickému cíli, nízkou toxicitu), a zároveň např. zvýšit jejich metabolickou stabilitu nebo prostupnost přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Přestože se metody racionálního designu léčiv stále zdokonalují, praxe ukazuje, že většina kandidátů léčiv selhává až v pozdějších fázích projektů pro výzkum a vývoj léčiv, kdy již byla vykonána značná odborná práce a spotřebovány nemalé finanční prostředky. Díky této zkušenosti můžeme charakterizovat výzkum a vývoj léčiv jako vysoce náročnou a ekonomicky riskantní činnost. Náročnost, důkladnost a nekompromisnost výzkumu a vývoje léčiv je ovšem nezbytná, protože do klinické praxe farmakoterapie nesmí proniknout látka, která by ohrozila život a zdraví pacientů.

1.1 Operační management výzkumu a vývoje léčiv

Získání nového léčiva a jeho uvedení na trh je dle současné odborné literatury všestranně náročný proces, jehož délka je v průměru odhadována na 10-15 let [1]. Proces uvedení nového léčiva na trh začíná u základního výzkumu daného onemocnění, pokračuje specifickým výzkumem a vývojem, dále několika úrovněmi

klinického testování, a nakonec je v optimálním případě uzavřen komplexními právními a ekonomickými opatřeními, které umožní prodej a aplikaci léčiva v klinické praxi. Jednotlivé výzkumné a vývojové fáze vyžadují kooperaci několika výzkumných skupin, které se zabývají specifickými odbornými činnostmi. Je důležité, aby jednotlivé pracovní skupiny sdílely své poznatky a byly vedeny profesionálním managementem, jehož úkolem je strategicky volit nejvýhodnější cesty k získání léčiva. Etapami výzkumu léčiv jsou především určení biologického cíle, syntéza a screening ligandových knihoven, selekce předlohy struktury (lead structure) a její optimalizace. Tato fáze trvá v průměru dva až pět let. Vývoj léčiv zahrnuje zejména preklinické studování vybrané kandidátní struktury, a následně klinickou studii na lidech. Preklinická fáze výzkumu obsahuje farmakokinetické a farmakodynamické studie i toxikologické analýzy léčiva na vybraných buněčných liniích (např. ovariální buňky čínského křečička, CHO) či organismech (např. myš, potkan). Z 10 000 slibných látek jich průměrně pouze 10 vstoupí do klinického testování, protože mnoho studovaných látek vykáže nevhodné biologické vlastnosti již během preklinické fáze výzkumu [2].

1.1.1 Výzkumná fáze léčiv

Výzkum léčiv bývá zahájen náročnými studii, které po mnohaletém úsilí končí výběrem několika vůdčích či předlohových chemických struktur (tzv. lead structure) pro preklinický vývoj. Finančně nejnáročnější část této fáze je základní badatelský výzkum. Tento výzkum se snaží najít účinnou látku, která má predispozici stát se léčivem na nějakou nemoc. Hlavní podmínkou pro hledání konkrétních struktur potenciálních léčiv je nalezení biologického cíle. Tato výzkumná etapa zaměřuje svou pozornost k základním biochemickým pochodům na receptorové a buněčné úrovni, které souvisí s vybranými patologickými procesy. Biologickým cílem se může stát např. enzym, receptor, iontový kanál, nukleová kyselina, transportér nebo cytoplasmatická membrána a lze ho nalézt např. na základě identifikace mutací genomu, srovnáním transkriptomu zdravých a nemocných buněk či proteomickou analýzou vzorků od zdravých a nemocných jedinců. Jakmile je biologický cíl nalezen, je možné hledat vhodné ligandy, které ovlivňují jeho funkci příhodným způsobem (např. inhibice nebo aktivace). Druhou kritickou částí výzkumu se tedy stává vyhledávací (screeningový) program pro

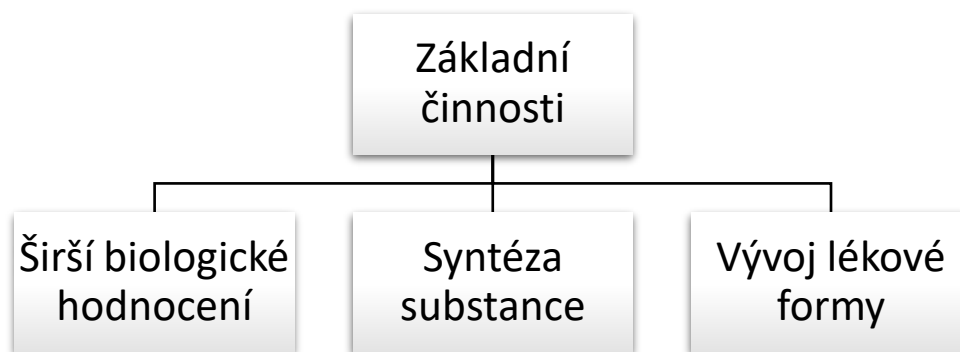
kandidátní struktury a nalezení malé molekuly neboli tzv. hitu, která vyvolává alespoň minimální žádoucí biologickou odpověď při interakci s vybraným biologickým cílem.

Odlišnou metodikou hledání hitových struktur je fenotypický screening, kdy se testují ligandové knihovny (např. z rostlinných výtažků) na postižených buňkách, tkáních či celých organismech. Látky, které vyvolávají příznivou biologickou odpověď, je možné využít rovněž jako markérů potenciálních biologických cílů. Důkladnou a systematickou analýzou dat získaných fenotypickým screeningem lze tedy v principu získat informaci jak o vhodné struktuře hitu, tak identifikovat biologický cíl, jak o tom podrobně píše např. Nencka [2]. Tato metoda je ovšem použitelná ve vývoji humánních léčiv pouze za určitých podmínek. Na druhé straně však může být ve fenotypicky pojaté metodice hledání nových léčiv využito cenných informací získaných během klinického testování vyřazených potenciálních léčiv, neboť v nich může být zaznamenán nežádoucí či vedlejší biologický účinek, který by mohl být novým výzkumem optimalizován na jiný, avšak kýžený farmakoterapeutický účinek.

1.1.2 Fáze preklinického vývoje léčiv

Po výzkumné fázi, která vrcholí nalezením biologického cíle a selekcí několika hitových struktur, navazuje vývojová fáze designu léčiv. Obě fáze mají velmi podobné charakteristiky a plynule na sebe přecházejí. Z metodologického hlediska hovoříme o vývojové fázi tehdy, když bylo shromážděno dostatečné množství poznatků, které umožňuje eliminovat neperspektivní hity a zaměřit se v ideálním případě pouze na získání a optimalizaci jediné předlokové struktury.

Fáze preklinického vývoje se dělí na 3 části, které se vzájemně ovlivňují a kontrolují (viz Obrázek 1.1). V této fázi se podrobněji zkoumají farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti zvolených hitů, jejich toxicita. Na základě racionálních principů se organickou syntézou připravují biologicky výhodnější předlokové struktury, které mají ve srovnání s hity mnohem silnější účinek na biologický cíl. Farmakokinetické testy se provádějí nejméně na dvou zvířecích modelech. V toxikologických studiích se u vybraných látek stanovuje akutní, subakutní a chronická toxicita, teratogenita, mutagenita, změny v reprodukci a kancerogenita hitů i jejich metabolitů.



Obrázek 1.1. Základní činnosti v preklinickém vývoji léčiv. Vlastní tvorba.

V širším biologickém hodnocení se provádí několik zkoušek, a to zejména: farmakokinetické hodnocení na modelech *in vitro* a na zvířatech *in vivo*. Dále probíhá detailní farmakodynamické studium mechanismu účinku kandidátních struktur, zjišťují se vedlejší účinky především na kardiovaskulární systém a centrální nervovou soustavu, testuje se mutagenita a vliv na plodnost. Speciální toxikologická vyšetření, testování farmakokinetiky, biodostupnosti, biotransformace a distribuce látky se provádí na zvířecím modelu [3].

Podstatným krokem, který umožňuje modulovat nevýhodné farmakokinetické vlastnosti nebo nízkou účinnost hitů, je organická syntéza racionálně navržených derivátů. K tomuto účelu se využívají přístupy klasické medicínální chemie (např. bioizosterní substituce) a *in silico* metody náležející do kategorie počítačem asistovaného designu léčiv (např. kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou, core-hopping, molekulární dynamika). Úspěšné obměny chemických struktur hitů vedou k získání předlokové struktury (tzv. hit-to-lead proces), která je nakonec strukturně optimalizována do podoby léčiva. Racionální organická syntéza nových předlokových struktur vyžaduje zpětnovazebnou kontrolu biologickými testy, která dokazuje, zda připravené látky jsou výhodnější a zvolená metodika designu validní. V této etapě je výhodné využívat nástroje, které umožňují predikovat u navržených struktur např. rozpustnost ve vodě, lipofilitu, či optimální fyzikálně-chemické vlastnosti pro prostup biomembránami. V syntéze nových substancí je důležitá optimalizace syntézy a analytické hodnocení meziproductů, produktů a jejich metabolitů, příprava vzorkového léčiva validační šarže pro následující klinický vývoj, vyhotovení dokumentů s detailní charakterizací léčiva pro orgány zaměřující se na registraci léčiva [3].

Důležitou pomůckou, která doplňuje úsilí organické syntézy o získání biologicky nejvýhodnější struktury, je farmaceutická technologie. Její hlavní rolí je vývoj vhodné lékové formy (např. přídavek enkapsulační látky, příprava enterosolventní tablety), která zlepšuje absorpci a zajišťuje dostupnost léčiva v postižené tkáni. Dalšími klíčovými tématy ve finální fázi přípravy návrhu aplikačního protokolu léčiva je forma podání léčiva a jeho dávka, výrobní plán léčiva pro potřeby klinického testování [3].

1.1.3 Fáze klinického zkoušení léčiv

Klinický vývoj léčiv se dělí do tří fází. V první fázi se lék podává 20-80 zdravým dobrovolníkům. Sleduje se farmakokinetika a metabolismus po jednom anebo opakovaném podání. Zjištěné výsledky se poté uplatní v další fázi klinického testování při předběžném určení terapeutické dávky a jejího podávacího intervalu. Tato fáze trvá asi 6-9 měsíců [2].

Ve fázi druhé je léčivo podáváno 100-500 pacientům trpící chorobou, pro kterou se léčivo vyvíjí. Znovu se zkoumají nežádoucí účinky po jednorázovém nebo opakovaném podání. V této fázi polovina náhodně vybraných účastníků dostává *placebo*, které neobsahuje žádnou účinnou látku (tj. může to být např. tableta s glukosou). O tom, zda pacient užívá lék či *placebo*, neví ani pacient ani lékař. Trvání této fáze je 6 měsíců až 3 roky. Jejím smyslem je prokázat významné účinky zkoumaného léčiva ve srovnání s farmakologicky neaktivním *placebem*.

Třetí fáze klinického testování se účastní 1000-5000 pacientů trpících chorobou, pro kterou se léčivo vyvíjí. V této části je velmi podrobná studie účinnosti a bezpečnosti testovaného léčiva. Znovu se využívá testováním s *placebem*. Je to nejdelší fáze a může trvat od 1 roku do 4 let [2].

Zjednodušeně můžeme říci, že pokud látka zdárně projde všemi těmito fázemi, dostává se do fáze schvalování léčiva. V této fázi je o léčivu vypracován dokument obsahující všechny informace zjištěné v průběhu testování. Dokument musí obsahovat jednoznačné dokázání, že léčivo má prohlášený efekt, je bezpečné a nevykazuje závažnější vedlejší účinky. V ČR se tento dokument označuje jako Žádost o registraci léčivého přípravku. V USA můžeme stejný dokument najít pod názvem New Drug Application (NDA). Postmarketingové sledování léčiva (angl.

Postmarketing surveillance (PMS)) je pojem, kterým se označuje kontrola účinků léčiva v populaci po uvedení léčiva na trh. V PMS se sledují vedlejší účinky, které nebyly zachyceny v klinických zkouškách. Pokud nastane závažný stav, může dojít ke stažení léčiva z trhu [2].

1.2 Financování vývoje a výzkumu originálních léčiv

Originální léčivo je první zaregistrovaný lék s konkrétní léčivou látkou. Jedním z charakteristických rysů vývoje a výzkumu nového léčiva jsou vysoké finanční náklady [4]. Náklady se v posledních letech pohybují mezi 2-3 miliardami EUR za jedno zavedené léčivo. Ruku v ruce s vysokou cenou jde i dlouhé období mezi jeho testováním a převedením do praxe. Náklady na výzkum a vývoj neustále rostou z důvodu vyšších nároků na bezpečnost nových léčiv. Dříve tato bezpečnostní kontrola léčiv nebyla tak důkladná, což se v několika případech projevilo těžkým poškozením organismu (např. po podávání Conterganu těhotným ženám). Tímto aktem se prodlužuje i doba preklinického a klinického testování. Zvyšuje se zde také tlak mezi konkurenčními společnostmi o boj v prvenství při registraci nového léčiva. Odhaduje se, že každá desátá látka, která je vybraná na základě náročných hodnocení v průběhu jejího výzkumu, projde následujícím preklinickým a klinickým vývojem do klinického užití. Nejvyšší finanční ztráty jsou zaznamenávány v klinickém testování [3].

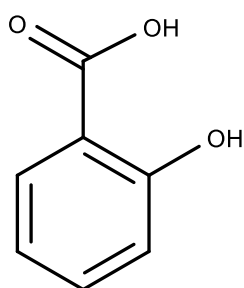
2 Historie výzkumu a vývoje léčiv

Výzkum léčiv v dřívějších dobách byl založen na náhodném objevu či zkoumání preparátů z lidového lékařství. Snahu o rozumem odůvodněný a řízený výzkum léčiv můžeme pozorovat od poloviny minulého století. Nesmíme však zapomenout ani na iatrochemii, v 17. a 18. století, která s sebou nesla značné intelektuální úsilí a velký zápal pro léčbu nemocí, i když našich měřítek vědeckosti nebylo dosaženo. Jeden z nejznámějších objevů léčiva je např. penicilín (více v kapitole 2.2 Příběh objevu penicilinu), což je exemplární demonstrace skutečnosti, jak je v medicíně chemii vedle úzce chápané racionality důležitý a také praktický přínosný princip tzv. walpolovské serendipity čili šťastné náhody [5].

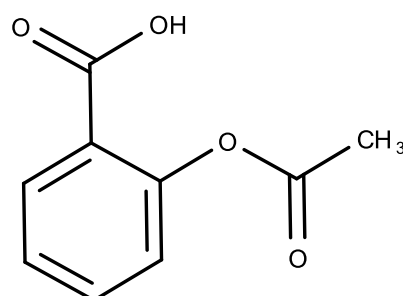
2.1 Příběh objevu aspirinu

Píše se rok 1758 a kaplan Edward Stone z hrabství v Oxfordshire již po několikáté trpí horečkou a revmatickými bolestmi. Pouze zvláštní náhodou rozžvýká větvičku bílé vrby (*Salix alba*), aniž by tušil, že takto zahájí novou kapitolu v historii farmakologie velmi známého léčiva. Edward popisuje chuť větvičky jako nadmíru hořkou. Další překvapení přišlo ve chvíli, kdy zjistil, že mu snížila horečku a bolest. Vymyslel proto způsob, jak kůru vrby sušit a drtit. Pak začal experimentovat na optimalizaci dávkování. V několika dalších letech podal lék asi 50 lidem a vždy došlo ke zlepšení stavu pacienta. V roce 1763 napsal o účinku vrbových větvíček do Královské společnosti v Londýně, kde byl ale jeho objev zprvu ignorován [6].

Příběh aspirinu ale pokračoval na jiném místě a v jiné době dále. Ve 20. letech 19. století se švýcarský lékárník Johann Pagenstecher snažil vyextrahovat účinnou látku z tužebníku (*Spirea ulmaria*). Tužebník byl využíván v prostém lékařství jako analgetikum. Své poznatky poslal do časopisu Swiss Journal, které si o 3 roky později přečetl chemik Löwig a extrahoval kyselinu známou pod názvem kyselina salicylová (Obrázek 2.1)



Obrázek 2.1. Kyselina salicylová, $M_R= 138,12$ g/mol; $\log P= 1,98$; $HBD=2$; $HBA= 3$



Obrázek 2.2. Kyselina acetylsalicylová, $M_R= 180,16$ g/mol; $\log P= 1,24$; $HBD=1$; $HBA= 3$

Kyselina salicylová, jejíž některé fyzikálně-chemické vlastnosti vypočítané v programu MarvinSketch 20.04 jsou uvedené na obrázku 2.1., má velmi negativní vedlejší účinky. Po požití dráždí žaludeční sliznici a vyvolává silnou bolest. Z tohoto důvodu ji lidé požívali pouze v případě, že samotná bolest byla větší než bolest z iritace žaludeční sliznice. Bylo běžnou praxí podávat toto léčivo v dávce 6-8 gramů.

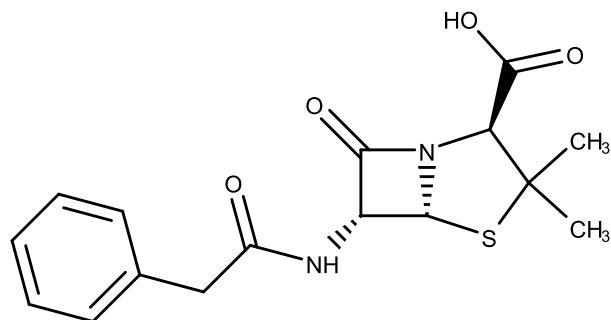
Poslední dějství příběhu o zrození aspirinu se odehrálo na konci 19. století v Německu. Felix Hoffman, zaměstnanec firmy Bayer, měl otce trpícího revmatismem. V roce 1895 se snažil upravovat kyselinu salicylovou, aby bez vedlejších příznaků pomohla jeho otci. Syntetizoval kyselinu acetylsalicylovou (Obrázek 2.2.) a přinesl ji otci domů. Otec konečně zažil bezbolestnou noc. Hoffmanův kolega začal kyselinu acetylsalicylovou zkoumat. Měl nějaké teorie, které si chtěl ověřit. Proto sám spolkl tabletku kyseliny acetylsalicylové a po 12 hodin si v pravidelných intervalech vyšetřoval moč. V moči nebyla žádná známka původní sloučeniny, ale pouze kyseliny salicylové. Tímto pokusem dokázal, jak se látka opravdu rozkládá.

V roce 1898 se tito dva spolupracovníci dohodli na jméno léku: aspirin – a jako acetyl, spir z botanického názvu *Spirea* a in jako vhodné zakončení. V následujícím roce farmaceutická firma Bayer nechala aspirin patentovat [7].

2.2 Příběh objevu penicilinu

V roce 1928 našel Alexander Fleming v zapomenuté Petriho misce, že spolu s bakteriemi zde roste i plíseň. Okolo této plísně nerostly žádné kolonie bakterií. Plíseň proto dále zkoumal a pozoroval. Vědci Howard Walter Florey a Ernst Boris Chain díky Flemingovým poznatkům dokázali v roce 1939 izolovat čistý penicilin. Za tento objev dostali v roce 1945 všichni tři vědci Nobelovu cenu. V našich zemích byl penicilin vyráběn od roku 1944 firmou pod dnešním názvem Zentiva.

Penicilín je po chemické stránce karboxylovou kyselinou, jejíž bicyklická struktura je složená z aminokyselin cysteinu a valinu. V současné době existuje několik derivátů toho β -laktamového antibiotika (např. F, G, X, K), přičemž se za standardní variantu považuje benzylpenicilin (G), vůči němuž se srovnává biologická aktivita jiných antibiotik na vybrané spirochety a streptokoky. Molekula penicilinu G (Obrázek 2.3.) vykazuje výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, jak dokládají vybrané molekulární deskriptory vypočítané v programu MarvinSketch 20.04.



Obrázek 2.3. Vzorec penicilinu G, $M_R= 334,39$ g/mol; $\log P= 1,08$; $HBD=2$; $HBA= 4$

3 Farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti potenciálních léčiv

Farmakologie se obecně dělí na dva důležité podobory, které jsou v dnešní době chápány jako základní pilíře racionálního výzkumu a vývoje léčiv. První je farmakodynamika, která zkoumá účinky léčiv na organismus, druhá je farmakokinetika, která analyzuje účinky organismu na léčivo. Více o farmakodynamických účincích je možné nalézt v kapitole 5, kde je popsán účinek léčiva na biologický cíl. Do základních farmakokinetických parametrů můžeme zařadit: eliminační konstantu, distribuční objem, poločas rozpadu a clearance.

3.1 Farmakodynamika potenciálních léčiv

Fyzikálně-chemické vlastnosti chemických látek jsou příčinou jejich biologického účinku na organismus. Z farmakodynamického pohledu je za tuto aktivitu zodpovědná interakce chemických látek s biologickými cíli, které mají většinou povahu enzymů a receptorů (např. receptory spřažené s G-proteiny, GPCR), ale mohou to být také nukleové kyseliny, cytoplasmatická membrána nebo nejrůznější proteinové nosiče a transportéry (tzv. carriers a transporters). Míru farmakodynamického účinku na biologický cíl ve zjednodušených *in vitro* modelech běžně udáváme formou nějaké ekviefektivní koncentrace (např. IC_{50} , MIC) nebo kvantifikovanou mírou biologické odpovědi na expozici biologického cíle určité koncentraci studované látky (jde o tzv. ekvikoncentrační kritéria, jako je např.

relativní reaktivace inhibovaného enzymu). Kvantifikace farmakodynamického účinku chemické látky, popřípadě potenciálního léčiva, je klíčovou informací, na jejímž základě mohou vědci rozhodovat o tom, která molekula může být považována za nadějného kandidáta na léčivo, či kterou látku by bylo vhodnější z výzkumu naopak vyřadit. Zásadní problematikou, se kterou se při posuzování farmakodynamických kritérií setkáváme, je přílišná zjednodušenost většiny farmakodynamických experimentů. Na jedné straně jsou *in vitro* farmakodynamické experimenty (např. měření hodnot IC_{50} v systému enzym – pufr – ligand) vysoce validní, protože platně vypovídají o konkrétní molekulární interakci, na druhou stranu není automatická projekce těchto dat na komplexní systém celého organismu dobře zdůvodněná, musí být tudíž na tyto data pohlíženo v perspektivě klinické farmacie s dostatečnou opatrností.

3.2 Farmakokinetika potenciálních léčiv

V literatuře se velmi často v pojednání o farmakokinetice využívá didakticky přínosný akronym ADME/T, který v podstatě vyjadřuje problematiku farmakokinetiky jako soubor 5 fenoménů: 1) absorpce, 2) distribuce, 3) metabolismus, 4) eliminace/exkrece, 5) toxicita. Absorpci chápeme jako první krok vstřebávání látky z místa podání (např. ústa, žaludek) do krevního oběhu. Na účinnost absorpce látek má především vliv jejich lipofilita a rozpustnost ve vodě. Látky, které mají tzv. vysokou biodostupnost, velmi dobře přecházejí do krve, mohou cirkulovat celým organismem a vyvolávat jak pozitivní, tak negativní biologickou odpověď. Vlivem distribuce, metabolizace, exkrece a interakcí s různými biologickými cíli se koncentrace látek časem většinou mění. V následující části se zmíním alespoň stručně o několika nejdůležitějších farmakokinetických kritériích.

Distribuční objem (V_d , Obrázek 3.1.) udává poměr mezi množstvím léčiva (M) v těle a koncentrací v plazmě (c). Distribuční objem není reálný objem. Udává objem, ve kterém by se muselo léčivo rozpustit, aby byla koncentrace léčiva v krvi stejná. Jednotkou distribučního objemu je litr, ale často se vyjadřuje ve vztahu k tělesné hmotnosti (l/kg). Léčiva mají tu vlastnost, že se distribuují mezi krví a tkání nerovnoměrně. Čím vyšší je hodnota V_d , tím je koncentrace léčiva v krvi nižší [3].

$$V_d = \frac{M}{c}$$

Obrázek 3.1 Rovnice distribučního objemu

Název léku	Distribuční objem [l/kg]
Riluzol	3,4
Levodopa	0,36 - 1,6
Endokapon	0,27
Exelon	1,8 - 2,7
Ebixa	10

Tabulka 3.1 Distribuční objem některých léčiv na neurodegenerativní onemocnění, čerpáno z [8-11].

Pojem clearance označuje objem plazmy, která je zbavena léčiva za jednotku času. Tato hodnota nevypovídá o mechanismu vylučování, a proto se uvádí renální a nerenální clearance (např. jaterní clearance). Renální clearance můžeme zjistit jako podíl celkového množství léčiva vyloučené močí za určitý čas.

Poločas eliminace léčiva udává, za jak dlouho klesne koncentrace léčiva v plazmě na polovinu. Poločas eliminace $t_{1/2}$ je označován za sekundární farmakokinetický parametr. Zjistíme ho pomocí clearance (Cl) a distribučního objemu (V_d) podle následující rovnice:

$$t_{1/2} = \frac{0,693 * V_d}{Cl}$$

Obrázek 3.2. Rovnice poločasu rozpadu.

Pokud hovoříme o enzymatické reakci léčiva s biologickým cílem, je důležité zmínit rovnici Michaelise a Mentenové. Ta podle všeobecného názoru patří mezi důležité parametry kinetiky účinku bioaktivních látek [12]. Rovnice Michaelise a Mentenové (Obrázek 3.3.) je zjednodušeným popisem reality. Charakteristikou Michaelis-Mentenové rovnice je závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, která platí pouze v předpokladu vytvoření rovnováhy a platí pouze pro počáteční rychlost reakce (v_0), kdy se přemění maximálně 10 % substrátu [S] na produkt [12]. Veličina K_M značí Michaelisovu konstantu a V_{max} nám udává maximální rychlost enzymové reakce:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Obrázek 3.3. Rovnice Michaelise a Mentenové

V této kapitole je také důležité stručně zmínit, jaké chemické a fyzikální vlastnosti by potencionální léčivo mělo mít. Protože transport léčiva probíhá krví, je důležitá rozpustnost léčiva v krvi, avšak nesmíme zapomínat na rozpustnost v lipidech, protože léčiva musí procházet přes membrány, jež mají významnou lipidickou složku. Pro léčivo, které se obvykle nedostává do buněk aktivním transportem, ale pasivní difuzí, je rovněž výhodné, aby mělo co nejmenší molekulu. Rychlost difuze léku do buňky je závislá tedy na jeho velikosti: čím menší molekula, tím vyšší rychlost difuze. Látka by také neměla obsahovat žádné vysoce reaktivní skupiny nebo skupiny, které se vyskytují ve vysoce toxických látkách, které mohou mít kancerogenní či mutagenní účinek na člověka.

Sledování fyzikálně-chemických vlastností potenciálních léčiv je klíčovým prvkem pro racionální vývoj léčiv. O této problematice bude proto více uvedeno v kapitole 6.1.3.

4 Biologický cíl a jeho chemická modulace

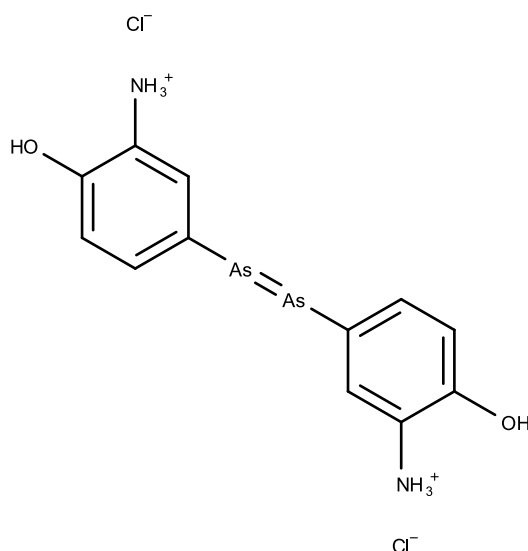
Biologický cíl hraje kardinální roli při vývoji léčiv, protože vůči němu hledáme aktivní látku. Je velmi důležité znát biologický cíl a jeho mechanismus funkce. Tento cíl nemusí být původcem nemoci, ale může být např. patogenem využíván, jak je tomu v případě mechanismu účinku některých antiinfektiv [13]. Po navázání substrátu do cílového místa mohou nastat dvě situace. V první situaci hovoříme o antagonistech receptorů, inhibitech enzymu či blokádě iontových kanálů, kdy nedochází ke změně biologického cíle, ale látka navázaná na aktivní místo znemožní navázání jiných substrátů. V druhém případě dochází ke konformační změně biologického cíle. Následně může dojít buďto k aktivaci enzymu nebo dojde ke změnám, které naruší celkovou funkci cíle.

Výzkum a vývoj léčiv může být směřován k látkám, které mají obecně dva typy účinku na biologický cíl:

- 1) inhibice, antagonistický efekt či deaktivace,
- 2) aktivace nebo agonistický efekt.

Ve výzkumu léčiv, a to zvláště těch, které působí na receptory, se často také hovoří o modulátorech, což jsou látky, které mění funkci biologického cíle. Objev modulátorů je tedy snadnější než objev ligandu s určitým účinkem na biologický cíl. Modulátory jsou v pozdějších etapách výzkumu a vývoje upravovány tak, aby byl optimalizován např. specifický nekompetitivně inhibiční účinek nebo agonistický efekt.

S pojmem biologický cíl léčiva (drug target) se pojí jméno Paul Ehrlich. Byl to německý chemik, lékař, imunolog a sérolog, který jako první navrhl kauzální vztah mezi biologickým účinkem léčiva a jeho vazbou na biologický cíl. Je považován za jednoho z prvních novátorů screeningu. S jeho kolegou Sahachirem Hatou vyhledával neškodná barviva proti infekcím. Otestovali skoro tisíc sloučenin na zvířecím modelu. Díky této práci objevili lék sarvalsan (Obrázek 4.1.), za který dostal v roce 1908 Nobelovu cenu. Tento lék se používal na léčbu syfilisu (lat. *Syphilis*) až do objevení penicilínu. Z pohledu Lipinského pravidla splňuje salvarsan všech pět základních požadavků na účinnou absorpci po podání *per os*. Lipinského pravidlo bude vysvětleno v následujících kapitolách.



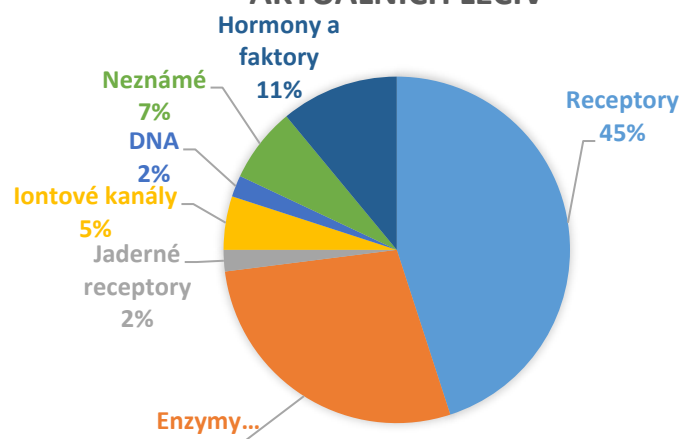
Obrázek 4.1. Struktura salvarsanu(2-amino-4-(3-amino-4-hydroxyfenyl)arsanylidenarsanylfenol),
 $M_R = 439,0 \text{ g/mol}$; $\log P = 1,92$; $HBD = 4$; $HBA = 2$

4.1 Typologie biologických cílů

V roce 1990 začalo mapování lidského genomu na půdách U. S. Department of Energy (DOE) a National Institutes of Health (NIH). O 13 let později bylo toto mapování hotové a díky skokovému pokroku v technologii sekvenování genů se výzkum povedl o 2 roky dříve, než bylo plánováno. Pomocí tohoto výzkumu můžeme předpovídat kvantum proteinů, u kterých neznáme strukturu ani funkci, ale mohou sloužit jako teoretické biologické cíle pro racionální vývoj léčiv. Vědci předpokládají, že v lidském genomu je zakódováno až 3 tisíce potencionálních biologických cílů. V současné době využívají léčiva pouze 330 molekulárních cílů [14].

Biologické cíle se mohou nacházet uvnitř i na povrchu buňky. Ve většině dějů se aktivní místo biologického cíle nachází na enzymu nebo na jaderném receptoru, může se také nacházet v nukleové kyselině. Na povrchu buňky se biologické cíle mohou vyskytovat na přenašečích (tzv. transportérech), iontových kanálech nebo receptorech. Procentuální zastoupení těchto biologických cílů je zobrazeno na obrázku 4.2.

PROCENTUÁLNÍ POROVNÁNÍ BIOLOGICKÝCH CÍLŮ AKTUÁLNÍCH LÉČIV



Obrázek 4.2. Graf s procentuálním porovnáním biologických cílů aktuálních léčiv. Převzato a upraveno z [15].

Jedním z nejkritičtějších bodů v problematice tzv. on-target racionálního vývoje léčiv jsou informace o struktuře biologického cíle a o mechanismu jeho funkce. Je proto nezbytné věnovat studiu funkce biologických cílů náležitou pozornost, protože k vývoji léčiv může přispět pouze důkladná znalost cílového biologického systému v celé jeho složitosti. Následující kapitoly se tuto oblast výzkumu léčiv pokusí stručně nastínit.

4.2 Enzymy jako biologické cíle

Enzymy jsou biokatalyzátory složené z proteinů. Mají velmi důležitou roli ve většině biochemických dějích, které se uskutečňují v buňkách. Enzymy v našem těle jsou životně důležité, protože bez jejich existence by nemohly probíhat za fyziologických podmínek vitální biochemické reakce. Jejich změněná exprese, mutace, popřípadě různá poškození jsou proto velmi často příčinou různých onemocnění. Místo, kde probíhá reakce substrátu s enzymem, se nazývá aktivní místo enzymu. Toto místo má specifický tvar, na který se naváže substrát, a posléze zde proběhne obvykle vysoce specifická či dokonce enantiospecifická biochemická reakce. Při reakci se enzym konformačně změní, aminokyselinami v aktivním místě zásadně ovlivní stereoselektivní či stereospecifickou reaktivitu substrátu, a tím umožní charakteristické urychlení enzymových reakcí, které poskytují rovněž specifické produkty. V souvislosti s modulací aktivity enzymů se rovněž hovoří v odborné

literatuře o aktivátorech a inhibítorech. Aktivátor enzymu je látka, která zvyšuje účinnost enzymatických reakcí. Aktivátory jsou z pohledu farmaceutické praxe v porovnání s inhibítory enzymu (látky, které snižují aktivitu enzymu) naprosto zanedbatelné. Podle reverzibility můžeme inhibítory dělit na reverzibilní (vratné) a ireverzibilní (nevratné).

4.2.1 Reverzibilní inhibítory enzymů

Inhibítory enzymů jsou častým případem léčiv (např. kaptopril) a z hlediska racionálního designu léčiv představuje jejich vývoj relativně nejméně komplexní problematiku. U reverzibilní inhibice se inhibitor váže na vazebné místo enzymu pomocí nekovalentních vazeb (tzv. slabé intermolekulární interakce van der Waalsova typu), a díky této vazbě je poté možné uvolnění inhibitoru ze struktury. Zde se využívá rovnice Michaelise a Mentenové. Tuto rovnici můžeme znázornit graficky jako závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu (Obrázek 4.3.). Reverzibilní inhibítory se dělí na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a inhibítory vykazující smíšený druh inhibice.

Kompetitivní inhibítory soupeří se substrátem o vazbu na aktivním místě enzymu. Porovnání s reverzibilním inhibítorem můžeme sledovat v obrázku 4.4. Rychlost enzymatické reakce (V_{max}) se nemění, ale zvyšuje se tzv. zdánlivá Michaelisova konstanta (K'_M). Zvýšením koncentrace substrátu je možné vytěsnit inhibitor z vazby na enzymu, a tím může dojít ke zvýšení rychlosti průběhu reakce znovu na V_{max} .

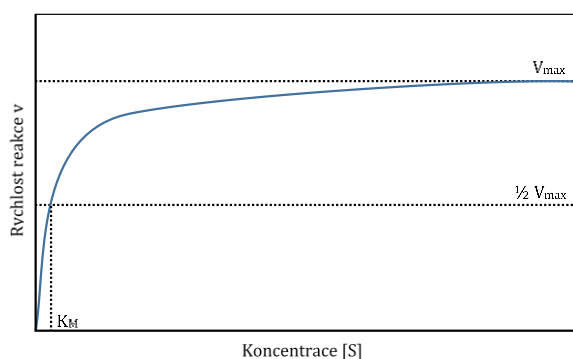
Nekompetitivní inhibítory nemění hodnotu Michaelisovy konstanty (Obrázek 4.5.), ale mění hodnotu maximální rychlosti reakce. Tyto inhibítory nesoutěží o tzv. ortosterické místo v enzymu. Inhibitor se může navázat např. na alosterické centrum, dojde ke změně tvaru molekuly enzymu a nemožnosti navázání substrátu na aktivní místo.

Pokud se inhibitor naváže na komplex enzym-substrát a zabrání katalytické reakci, mluvíme o inhibici akompetitivní (Obrázek 4.6.). Pro akompetitivní inhibítory platí, že snižují rychlost reakce i Michaelisovu konstantu, a to ve stejném poměru. U tohoto typu inhibice musí dojít nejprve k navázání substrátu na enzym. Z tohoto

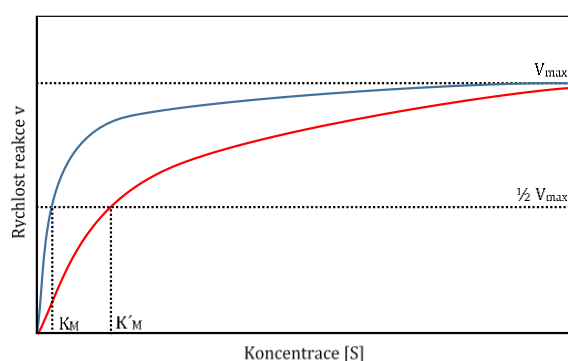
důvodu nepomůže zvýšení koncentrace substrátu ke zvýšení aktivity enzymu, jako tomu bylo u kompetitivního inhibitoru.

U inhibitorů, které vykazují smíšený typ inhibice (Obrázek 4.7.), nejsou v poměru rychlost a Michaelisova konstanta. V tomto případě může docházet jak ke zvýšení, tak i ke snížení Michaelisovy konstanty.

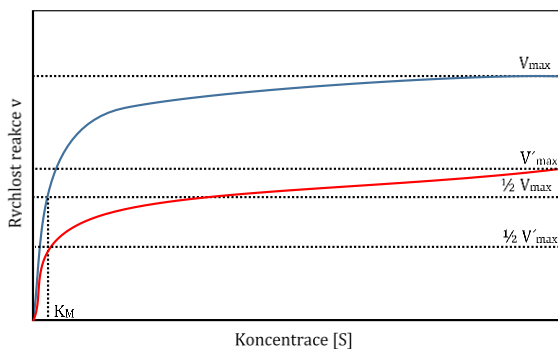
V biochemických analýzách reakční kinetiky enzymů v prostředí modulátorů je možné ke stanovení hodnot K_M a V_{max} využít jak přímých závislostí reakční rychlosti na koncentraci substrátu a modulátoru, tak tzv. dvojitě reciproké závislosti (Linweaver-Burkeho grafy). Dvojitě reciproké závislosti se v biochemické praxi využívají velice často, protože mají některé didaktické výhody. Informaci ale obsahují stejnou jako grafy přímých závislostí mezi reakční rychlostí a koncentracemi.



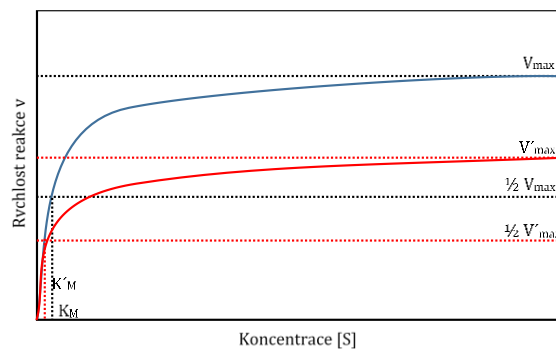
Obrázek 4.3. Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu reverzibilního inhibitoru.



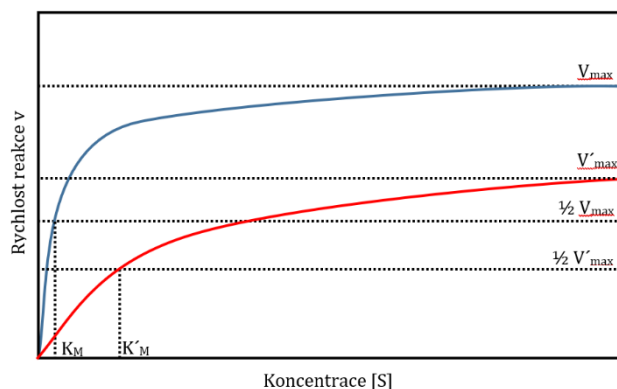
Obrázek 4.4. Závislost rychlosti reakce substrátu na koncentraci reverzibilního inhibitoru (modrá čára) v porovnání s kompetitivní inhibicí (červená čára).



Obrázek 4.5. Závislost rychlosti reakce substrátu na koncentraci reverzibilního inhibitoru (modrá čára) v porovnání s nekompetitivní inhibicí (červená čára).



Obrázek 4.6. Závislost rychlosti reakce substrátu na koncentraci reverzibilního inhibitoru (modrá čára) v porovnání s akompetitivní inhibicí (červená čára).



Obrázek 4.7. Závislost rychlosti reakce substrátu na koncentraci reverzibilního inhibitoru (modrá čára) v porovnání se smíšenou inhibicí (červená čára).

V racionálním vývoji léčiv se využívá ještě několika dalších kvantitativních kritérií, které charakterizují sílu interakce mezi ligandem a enzymem či receptorem. Za zmínku stojí především inhibiční konstanta K_i , která je klasickým vyjádřením podílu rovnovážných koncentrací chemických entit v systému ligand-enzym/receptor za standardizovaných podmínek. Dalším důležitým měřítkem užívaným k popisu intenzity interakce v těchto komplexech je Gibbsova energie ΔG , kterou predikují četné *in silico* metody nebo ji stanovují některé experimentální metody, jako je izotermální kalorimetrická titrace. V případě potřeby je rovněž možné využít matematické vztahy (např. Cheng-Prusoffovu rovnici) a zmíněné veličeny mezi sebou převádět.

4.2.2 Ireverzibilní inhibitory

Ireverzibilní inhibitory (např. omeprazol) jsou navázány na cílový enzym silnou, resp. kovalentní vazbou, a tudíž vzniklé komplexy nemají možnost disociovat. Tyto inhibitory nemohou být vytěsněny z komplexu enzym-inhibitor ani vysokou koncentrací substrátu. Dochází tedy ke kovalentní modifikaci enzymu, kterou může odstranit pouze chemická reaktivace. Stejně jako reverzibilní inhibitory můžeme ireverzibilní inhibitory rozdělit do několika skupin. Dělení je založeno na povaze interakce inhibitoru s enzymem. Dělíme je na:

- inhibitory působící v aktivním místě,
- inhibitory založené na mechanismu katalyzované reakce,
- inhibitory tranzitního stavu.

Inhibitory, které jsou orientované do aktivního místa (např. aspirin), se navazují v aktivním místě enzymu nebo v jeho bezprostřední blízkosti. V tomto místě jsou inhibitory vázány silnou kovalentní vazbou, ke které dochází mezi reaktivní skupinou (např. nukleofilní, elektrofilní) skupinou enzymu a reaktivním centrem inhibitoru.

Inhibitorům, které jsou založené na mechanismu katalyzované reakce (např. penicilin), se může říkat také sebevražedné inhibitory, a to z důvodu jejich mechanismu účinku. Tyto inhibitory se účinkem enzymu aktivují a poté se navážou na jeho aktivní místo. Po proběhnutí tohoto aktu se trvale zablokuje aktivní centrum a dochází k tzv. „sebevraždě enzymu“, neboť aktivaci neúčinného inhibitoru si enzym způsobuje sám.

4.3 Receptory

Receptory jsou bílkovinného charakteru a jsou umístěné v cytoplazmatické membráně buněk. Díky nim je zprostředkováván přenos signálu z vnějšího do vnitřního prostředí buňky. Ligandy jsou látky, které se váží na receptor. Mohou to být hormony, neurotransmitery, růstové faktory, ale i léčiva. Vazba léčiva s receptorem může jak stimulovat, tak i potlačovat přirozenou funkci receptoru. Více o látkách (tzv. modulátorech), které ovlivňují funkci receptorů, bude uvedeno v následujících kapitolách.

4.3.1 Agonista receptoru

Agonista receptoru (např. pilokarpin je neselektivní agonista muskarinových receptorů, muskarin - agonista muskarinových receptorů) napodobuje funkci přirozeného ligandu, a tím stimuluje funkci receptoru. Agonista a přirozený ligand receptoru si často jsou svou strukturou podobní a vyvolávají kvalitativně i kvantitativně srovnatelnou odpověď. Díky jejich podobnosti se přirozené ligandy využívají jako počáteční bod k vytvoření návrhu těchto agonistů. Podle účinku na receptor se dále dělí na plné a parciální agonisty. Plný agonista vyvolává plnou odpověď receptoru. Parciální agonista vyvolává pouze částečnou odpověď i ve vysoké koncentraci vůči receptoru. Z tohoto důvodu můžeme parciálního agonistu označovat i jako antagonistu, protože jednak plně neaktivuje receptor a současně zamezuje vazbě přirozeného ligandu.

Zvláštním typem agonistů jsou inverzní agonisté. Tito agonisté se váží na stejné místo a způsobují protichůdný efekt.

4.3.2 Antagonista receptoru

Antagonisté receptorů inhibují efekt přirozeného ligandu nebo agonisty na receptor. Pokud není přítomen přirozený ligand, tak se efekt antagonisty vůbec neprojeví. Antagonisté se dělí na kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Kompetitivní antagonist se nejčastěji váže na stejné místo jako přirozený ligand, a tím zamezí odpovědi receptoru, která by nastala v případě navázání přirozeného ligandu. Kompetitivního antagonistu můžeme z vazby vyvázat pomocí zvýšení koncentrace přirozeného ligandu, a tím dojde znovu k dosažení maximální odpovědi receptoru. Nekompetitivní antagonist se nejčastěji váže na alosterickém centru receptoru, a tak změní konformaci receptoru. V tom případě není možné navázání ligandu nebo agonisty na receptor. Z tohoto důvodu nedochází k obnovení funkce receptoru i po zvýšení koncentrace agonisty. Antagonisté receptorů (např. skopolamin, který je neselektivní antagonist muskarinových receptorů) jsou analogické k inhibitorům enzymu.

4.4 Jaderné receptory a iontové kanály

Jaderné receptory jsou specifický typ receptorů, které se nacházejí v cytosolu buňky. Na tyto receptory se váží ligandy, které ovlivňují proces genové exprese. Jaderné receptory jsou považovány za nadějně biologické cíle pro mnoho onemocnění, jako je diabetes, Alzheimerova choroba a několik druhů rakoviny.

Iontové kanály umožňují přechod iontů přes plasmatickou membránu. Po rozsáhlých studiích lidského genomu existují informace, že existuje více než 400 různých iontových kanálů [16]. Poruchy těchto kanálů jsou často zodpovědné za vzniklá onemocnění (např. epilepsie [17]). Iontových kanálů je celá řada. Iontový kanál je protein, který se nachází v plasmatické membráně a umožňuje průchod iontů přes tuto bariéru. Nejčastěji se dělí podle toho, jaké ionty propouštějí nebo díky kterým iontům dochází k podněcování jeho funkce. Podle mechanismu iniciace je můžeme dělit na:

- napětěvé kanály,
- světlem řízené kanály,
- mechanicky řízené kanály,
- kanály řízené cyklickými nukleotidy,
- kanály řízené ligandy.

4.5 Transportéry

Transportéry plní v organismu roli přenašečů různých chemických látek přes cytoplazmatickou membránu. Tyto přenašeče se vyskytují na povrchu buněk i uvnitř buňky a můžeme u nich najít substrátovou specifitu a schopnost saturace.

Mezi nejznámější membránové přenašeče patří přenašeče iontů. Jedná se o takzvané pumpy. Pumpy umožňují pohyb iontů přes membrány proti koncentračnímu gradientu. Funguje zde princip aktivního transportu. Při aktivní transportu se spotřebovává energie, která vzniká rozštěpením ATP a tím je možné tento přenos uskutečnit i proti koncentračnímu gradientu.

Dalším typem přenašečů jsou přenašeče neurotransmiterů (např. acetylcholin, aminokyseliny glycin a kyselina glutamová, dopamin, nonadrenalin). Ty přenášejí

neurotransmitery ze synaptické štěrby zpět do neuronu. Patří mezi skupinu důležitých biologických cílů pro psychofarmaka.

Přenašeče glukózy jsou významnými přenašeči z pohledu medicíny. Využívají se v protinádorové teranostice. V buněčné membráně mají nádorové buňky těchto přenašečů více v porovnání s buňkami zdravými. Nádorové buňky jsou závislé na dodávce energie, kterou získávají z glukózy. Pokud jí mají nedostatek, dochází k inhibici bujení a smrti nádorových buněk.

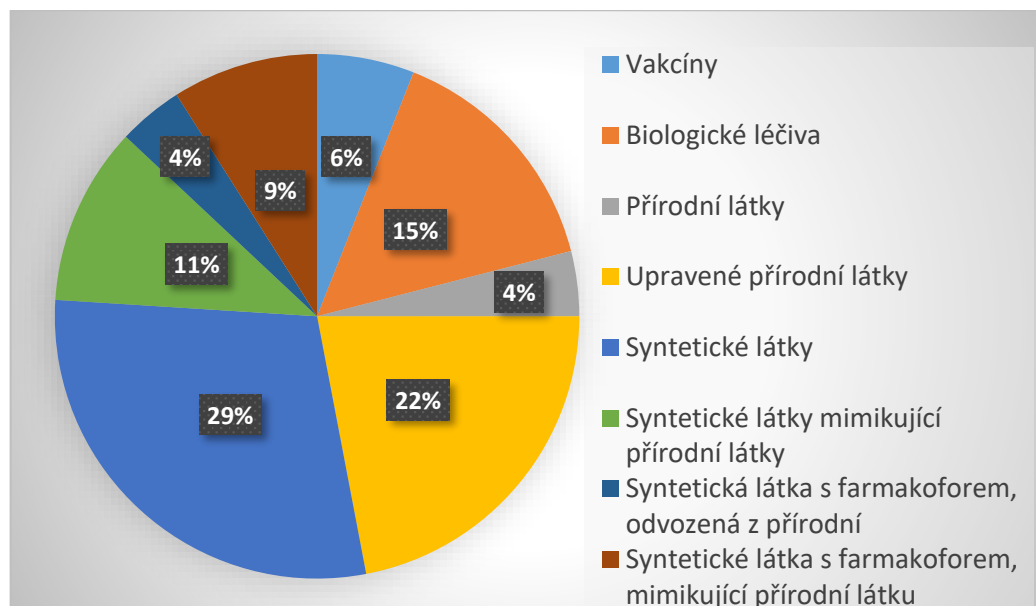
Nejširše zastoupenou skupinou přenašečů jsou tzv. ABC Transportéry (ATP Binding Cassette Transporters). Jejich využití je v mnohočetné lékové rezistenci u nádorových onemocnění [18].

5 Racionální design chemických struktur

Navržení nového léčiva je velmi těžké a také drahé. Jako zásadní problémy spojené s designem léčiv můžeme uvést nutnost uvažovat důsledky biotransformace léčiva v organismu, jeho vedlejší účinky a také odhalení cíle, na který lék působí. Pokud zvážíme náklady na vývoj a testování, výrobu, patentování a distribuci, tak farmakoekonomické studie odhadují částky pohybující se v jednotkách miliard dolarů, přesněji \$2.87 miliard (v roce 2013) [19]. Velká část těchto peněz je využita na klinické a biologické testy. Díky možnosti testování *in silico* může být tento proces zlevněn, urychlen a zároveň také usnadněn. Jako nejčastější možnost testování potenciálních léčiv je v nynější době využíván tzv. High Throughput Screening (HTS).

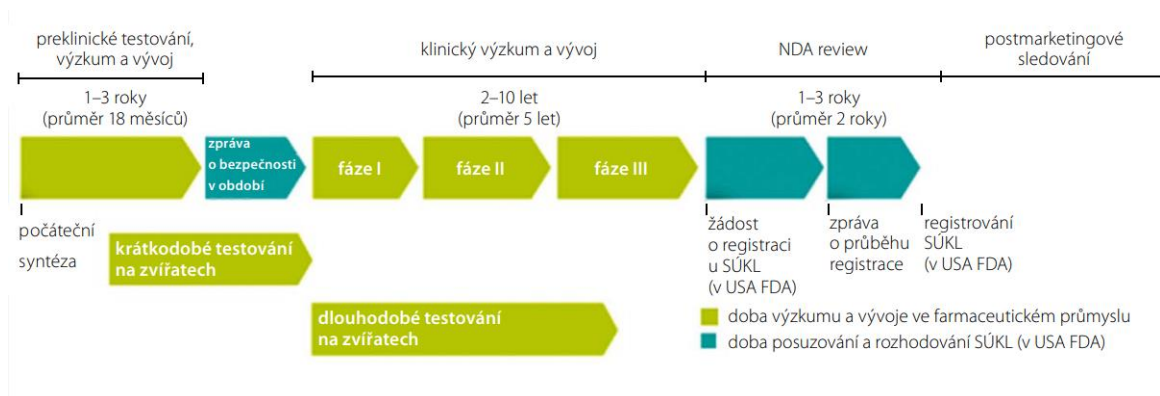
HTS je experimentální metoda využívaná v procesu vývoje nových léčiv. Z technického hlediska se jedná o automatizovanou jednotku, která dokáže provádět rutinní biologické, chemické i genetické experimenty v kontinuálním provozu. Systémy pro HTS jsou stále zdokonalovány, aby hodnocení biologické aktivity látek v rozsáhlých ligandových knihovnách prováděly s vysokou citlivostí, přesností a také rychlostí. Ve farmaceutickém průmyslu byla tato metoda využívána a vylepšena za účelem identifikace nových chemických látek pro vývoj léčiv. Výsledky těchto experimentů jsou základním kamenem pro návrh léčiva a také porozumění aktivního místa v cíli léčiva. [20]

Dříve byla léčiva vyhledávána v přírodě, nyní se nabízí např. semisyntetický přístup, který využívá chemické modifikace přírodně získaných sloučenin. V následujícím grafu (Obrázek 5.1.) můžeme najít procentuální zastoupení registrovaných léčiv od roku 1981 do 2006 dle FDA, kde vycházíme z celkového čísla 1355 registrovaných léčiv.



Obrázek 5.1. Graf procentuálního zastoupení nově registrovaných léčiv od 01/1981–06/2006 dle FDA, upraveno z[21]

Při hledání správného léčiva se v dnešní době postupuje podle ustáleného pracovního schématu. Nejprve je nutné nalézt a izolovat biologický cíl (2-5 let), který je zodpovědný za chorobu. Následně dochází k preklinickému testování (1-3 roky) kandidátních struktur na biologickém cíli. Nalezení hitové struktury ve srovnání s hledáním biologického cíle může trvat až 5 let. Hitová struktura obvykle není finální formou léku, nýbrž jen důležitým východiskem pro vývoj předlohy struktury, z níž se dochází po složitých optimalizacích k preklinickému kandidátu léčiva. Následují klinické testy na lidech (2-10 let) a po zdárných výsledcích si musíme počkat další 2-3 roky na schválení orgánu pro registraci léčiv v dané zemi (např. SÚKL, FDA). Grafické zobrazení těchto kroků můžeme vidět na obrázku 5.2.



Obrázek 5.2 Vývoj nového léčiva od vývoje po registraci a užití v klinické praxi. Převzato z [22].

6 Počítačové metody návrhu léčiv

Počítačový návrh nového léčiva (tzv. computer-aided drug design, CADD) je díky své racionalitě považován za perspektivní nástroj při vyhledávání léčiv. Velmi významnou aplikací metody *in silico* je tzv. virtuální screening (VS), kdy je testování biologické aktivity prováděno na počítačovém modelu biologické cíle. VS se využívá pro rychlý předvýběr látek pro další testování a optimalizaci pravděpodobných léčiv. Pro vysokou účinnost VS je nutné využít sofistikované výpočetní programy počítačové chemie a provádět výzkum na vysoce výkonných počítačových clusterech nebo superpočítačích [23]. V principu existují dvě základní *in silico* screeningové metody:

- ligandově založené metody (ligand-based methods),
- metody založené na struktuře biologického cíle (structure-based methods).

6.1 Ligandově založené metody návrhu léčiv

Ligandově založené metody (angl. ligand-based) jsou ve srovnání se strukturně založenými metodami starší a využívají se v případě, kdy neznáme strukturu biologického cíle. Vznik ligandově založených metod návrhu léčiv je spojován s pracemi Corvina Hansche v 60. letech 20. století, které vycházely z postulátů fyzikální organické chemie a opíraly se o aplikaci statistických výpočetních metod [24]. Východiskem těchto přístupů je pouze znalost chemické struktury ligandů a numericky či kategoricky vyjádřená biologická aktivita. Na základě těchto vstupních informací se především určuje, které části molekul jsou zodpovědné za

pozorovanou biologickou aktivitu a které molekuly by mohly být v tomto smyslu účinné či neúčinné. Validované ligandově založené metody návrhu léčiv mohou být využity k vyhledávání podobností mezi molekulami formou rozsáhlého virtuálního screeningu, a posloužit tak k poměrně rychlému nalezení hitových struktur. Z výpočetního hlediska jsou ligandově založené metody mnohem méně náročné na výpočetní čas než strukturně založené metody. Je nutné ale také podotknout, že ligandově založené metody návrhu léčiv mohou být zatíženy značnou chybou. Někdy můžeme proto v literatuře najít zmínku i o třetí kategorii CADD metod, která nese název hybridní metoda. Kombinuje přednosti ligandových a strukturně založených metod.

6.1.1 QSAR metoda

QSAR neboli kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou (quantitative structure-activity relationships), je nejznámější ligandově založená metoda užívaná při návrhu a analýze léčiv. Tato QSAR analýza se v moderní podobě používá od rozhraní 50. a 60. let minulého století. Nejprve se začala využívat ve farmakologii a farmacii ve snaze najít co nejúčinnější léčiva. V 80. letech se také objevila v toxikologii, kdy se tato metoda využívala pro odhad velikosti toxicity a nežádoucích účinků chemických látek doposud netestovaných.

QSAR metody si kladou za cíl odvodit matematický model pro predikci biologické aktivity pomocí regresních nebo klasifikačních nástrojů pro dolování dat a strojové učení [25]. QSAR modely se primárně využívají pro predikci biologických či fyzikálně-chemických vlastností látek, a díky těmto informacím následně pro návrh léčiv. QSAR modely popisují kvantitativní vztah mezi chemickou strukturou a biologickou účinností, dále také předvídají vlastnosti chemických látek (např. toxicita, schopnost interakce s biologickým cílem, biodegradabilita), a to vše na základě molekulárních struktur biologicky aktivních látek. V této metodě se také užívají kvantitativní algoritmy pro stanovení podobnosti molekul ve zvolených ligandových knihovnách nebo se ligandové knihovny tzv. filtrují podle určitých molekulárních deskriptorů. QSAR metoda se často využívá i pro zamezení zbytečných zkoušek na zvířatech, protože *in silico* metody mohou za určitých podmínek poskytnout vysoce korelované informace jako testy na zvířatech.

Analýza QSAR je analýzou experimentálních či vypočítaných charakteristik ligandů a následné zpracování dat matematickou statistikou do podoby rovnice QSAR či QSAR modelu. Tato rovnice QSAR vyjadřuje vztah mezi velikostí změny v biologické účinnosti a velikostí změny ve struktuře molekuly (např. změna substituentů – homologie či izosterie). Formálně můžeme rovnici zapsat jako (Obrázek 6.1.):

$$BA_i = f(X_i).$$

Obrázek 6.1. Matematické vyjádření modelu QSAR, kde BA_i je biologická účinnost látky i , f je matematická funkce a X_i je vlastnost příslušející struktuře látky [26].

QSAR model je tedy matematickým předpisem, který udává BA látek jako funkci molekulárních deskriptorů X_i . Při QSAR analýze se obvykle postupuje tak, že se nejprve připraví pomocí vhodného počítačového programu soubor molekulárních modelů studovaných látek (např. v HyperChemu), přičemž se tyto modely mohou optimalizovat náročnými metodami kvantové chemie, neboť se často jedná o nízkomolekulární látky. Následuje fáze generování molekulárních deskriptorů, které mohou popisovat např. počet dvojných vazeb v molekule či vyjadřovat složité 3D topologické indexy daných molekul. V dnešní době je běžné vypočítat pro jeden ligand několik tisíc molekulárních deskriptorů, přičemž lze tento soubor rozšířit o experimentální fyzikálně-chemické veličiny, jako je pK_A či chemické posuny vybraných atomů z nukleární magnetické rezonance. Matice získaných molekulárních deskriptorů a soubor příslušných biologických aktivit (např. IC_{50}) se následně počítačově zpracovává např. metodami několikanásobné lineární regrese, metodou částečně nejmenších čtverců nebo pomocí umělých neuronových sítí. Výsledkem výpočtů je QSAR model, u něhož byla ověřena statistická významnost [27].

Tradičně se v QSAR využívají bezrozměrné binární molekulární deskriptory (např. Free-Wilsonovy deskriptory přítomnosti funkčních skupin) nebo jednorozměrné molekulární deskriptory (např. molekulová hmotnost, molekulový objem) v duchu Hanschova modelu s deskriptory lipofilních, elektronických a sterických vlastností ligandů. Aktuálně jsou v praxi také využívány mnohorozměrné QSAR metody, které analyzují např. 3D elektrostatické pole ligandů (3D QSAR), zohledňují konformační flexibilitu ligandů (4D QSAR), faktorizují akomodaci tvaru receptoru (5 QSAR)

nebo implementují vliv rozpouštědla a solvatace (6D QSAR) [28]. Náročné QSAR metody vyžadují speciální software a je nutné je validovat pokročilými statistickými metodami.

6.1.2 Virtuální screening založený na farmakoforech

Pro tento typ ligandově založeného screeningu není důležitá opravdová struktura biologického cíle, nýbrž jeho rozložení center, které reagují s farmakoforem v molekule ligandu. Farmakofor je tedy skupina atomů v molekule ligandu, která se vyznačuje specifickým postavením sterických a elektronových chemických skupin. Také zásadním způsobem ovlivňuje interakci mezi ligandem a biologickým cílem (např. donory a akceptory vodíkových vazeb, hydrofobní a hydrofilní části molekuly a další). Nejčastěji se farmakoforový screening provádí korelační analýzou chemické struktury ligandů ve vztahu ke známé biologické aktivitě, avšak model farmakoforu můžeme vytvořit i na základě analýzy struktury makromolekuly biologického cíle [29].

Ligandová farmakoforová analýza může být založena na rozložení struktury ligandů na orientované vektory s mnoha proměnnými (např. fingerprinty) a na následné statistické analýze, která odhalí významné elementy v těchto vektorech. Z významných elementů ligandových vektorů se poté rekonstruuje farmakofor. Dalším přístupem farmakoforové analýzy může být 3D superimpozice konformerů ligandů nebo elementarizace Tanimotova indexu podobnosti. K provedení farmakoforové analýzy těmito metodami je nezbytná znalost biologické aktivity ligandů. Dále je také nutné zahrnout do farmakoforové analýzy dostatečný počet ligandů, aby byl výsledný farmakoforový model byl spolehlivý.

Farmakoforový screening porovnává prostorové uspořádání farmakoforu s ligandy v databázi a hledá struktury, které jsou mu nejpodobnější. V porovnání s experimentálním HTS je farmakoforový screening zásadně méně časově náročný. U experimentálního HTS dochází přímo i nepřímo k detekování interakcí mezi malými molekulami v ligandové knihovně oproti VS, který využívá filtrování pomocí určitých pravidel a vlastností a tím dochází ke snížení celkového času [23].

6.1.3 Lékový charakter a Lipinského pravidlo

V racionálním vývoji léčiv se klade značný důraz na včasnou eliminaci chemických struktur, které mají zvýšenou pravděpodobnost selhání v klinické fázi testování. Vysoce závažná problematika preliminární selekce látek pro perspektivní design léčiv je v současné době řešena kontrolou tzv. lékového charakteru chemických struktur (drug-likeness). Paradigmatem tohoto přístupu je Lipinského pravidlo pěti (tzv. rule of five, Ro5) či pravidlo 3. Obě uvedená pravidla poukazují na skutečnost, že klinicky užívaná léčiva jsou biodostupná zejména tehdy, pokud mají vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti v určitém rozsahu hodnot. V principu se tedy jedná o ligandově založenou metodiku, která se opírá o statistickou analýzu závislosti farmakokinetické absorpce po podání *per os* či centrální dostupnosti na několika molekulárních deskriptorech. Lipinského pravidlo popisuje, zda chemická sloučenina je vhodná jako léčivo, avšak nepopisuje, zda je farmakologicky aktivní. Pravidlo se skládá z pěti podmínek [30]:

- obsah maximálně 5 donorů vodíkových vazeb (HBD),
- obsah maximálně 10 akceptorů vodíkových vazeb (HBA),
- molární hmotnost menší než 500 g/mol,
- log P menší než 5,
- méně než 5 rotovatelných vazeb.

Postupem času se však zjistilo, že pouze polovina léků schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) neporušuje ani jedno z kritérií Lipinského pravidla [31]. Lipinského pravidlo si přesto uchovává svou důležitost, ačkoliv se dnes uplatňují více některé jeho optimalizované formy, které berou v úvahu např. topologickou plochu polárního povrchu molekuly nebo pK_A. Všechna tato post-Lipinského pravidla se v současné době opírají o analýzu vypočítaných molekulárních deskriptorů s využitím ligandově založených metod *in silico*.

Protože Lipinského pravidlo 5 patří mezi základní kritéria pro farmakokinetické posouzení chemických struktur, připojila jsem k významným látkám v této bakalářské práci příslušné molekulární deskriptory (MarvinSketch 20.04).

6.2 Metody návrhu léčiv založené na struktuře biologického cíle

Návrh léčiva na základě struktury cíle je přímý způsob, jak navrhnout léčivo. Pokud známe strukturu biologického cíle, nabízí se nám několik možností, které můžeme využít k vybrání správného ligandu k této biomakromolekule. V dnešní době je tato metoda návrhu léčiv více využívaná než dříve zmiňovaná ligandově založená metoda. Vedle velice často uváděného termínu strukturně založené metody se setkáváme v literatuře rovněž s označením receptorově založené metody. Druhý termín se jeví jako adekvátnější, ale v souladu s praxí budu v této práci uvádět termín strukturně založené metody.

6.2.1 Virtuální screening založený na dockingu

Nejnámější *in silico* metoda založená na struktuře biologického cíle vychází z výpočetní molekulárně mechanické metody zvané molekulární docking. Principem molekulárního dockingu je jednak nalezení optimální geometrie vazebného módu v komplexu ligand-enzym/receptor a jednak predikce příslušné vazebné energie tohoto komplexu. Molekulární docking lze provádět pomocí širokého spektra počítačových programů (např. AutoDock, Glide, Gold), přičemž lze nastavovat různou míru složitosti výpočtů, což má podstatný vliv na jejich rychlost a správnost dosažených výsledků. Metodika molekulárního dockingu je obecně rozložitelná na 3 typické kroky. Prvním krokem je pečlivá příprava modelu biologického cíle, který se v základní podobě ve většině případů získává rentgenostrukturní analýzou, popřípadě se přímo stahuje z online proteinové databanky (rcsb.org). Následuje příprava modelů ligandů, jejichž molekula musí být ionizovaná a geometrie optimalizovaná v souladu s podmínkami skutečné interakce s biologickým cílem. Posledním krokem je příprava vlastního výpočtu, který zahrnuje definování parametrů tzv. silového pole, dále definici variabilních torzních úhlů a flexibilních částí komplexu ligand-enzym/receptor, nastavení tzv. skóringové funkce, která aproximuje Gibbsovu vazebnou energii, a složitosti výpočetního algoritmu, který hledá globální minimum Gibbsovy nebo totální potenciální energie systému.

Paralelizací a distribucí molekulárně dockovacích úloh lze realizovat strukturně založený virtuální screening. Tento typ screeningu je založen na opakovaném

molekulárním dockingu jednotlivých ligandů z databází či uživatelských ligandových knihoven. Každý ligand se k makromolekule váže jinou vazebnou energií, kterou molekulárně dokovací programy aproximují skórovací funkcí (scoring function). Díky této skórovací funkci můžeme seřadit jednotlivé ligandy podle velikosti pravděpodobné síly vazby k biologickému cíli.

Pro provedení tohoto typu screeningu je potřeba znát strukturu cíle, kterou můžeme získat pomocí vlastních experimentů (např. proteinová NMR) nebo můžeme použít strukturu z veřejně dostupných chemických databází. Mezi nejznámější databáze, ve kterých jsou obsaženy struktury známých makromolekul, patří EMDataBank, Worldwide Protein Data Bank a RCSB Protein Data Bank. Třetí možností, jak získat model biologického cíle, je metoda homologního modelování, která predikuje jeho 3D strukturu na základě primární sekvence. Abychom strukturně založený virtuální screening mohli provést, musíme využít databáze ligandů. Mezi nejznámější a volně dostupné databáze patří například ZINC a NCI Open Database. Screening se poté uskutečňuje pomocí speciálního softwaru, který opakovaně vyhledává a spojuje ligandy s makromolekulou. Ligandy, které ve výpočtech získají nejlepší skóre, jsou pokládány za nejvýhodnější kandidáty léčiv a postupují do dalších fází vývoje.

Nejčastější variantou strukturně založeného VS je hledání ligandů, které mají největší afinitu k vybranému biologickému cíli (tzv. on-target přístup). Správnost nastavení výpočetního softwaru je nutné ověřit na ligandech, které mají známou afinitu k vybranému biologickému cíli, popřípadě je známá i geometrie jejich vazebného módu. Validovaná metoda VS by měla být schopná dobře reprodukovat experimentální data a měla by s vysokou spolehlivostí rozlišit aktivní ligandy s vysokou afinitou od neaktivních ligandů.

Druhou variantou strukturně založeného VS je off-target screening, kdy se pro jeden ligand hledají v databázi biologické cíle, na něž se ligand může vázat. Tímto přístupem lze např. předpovědět vedlejší účinky zvoleného potenciálního léčiva nebo potenciální toxicitu

Na fázi využívající molekulární docking obvykle navazuje molekulárně dynamická studie, která zohledňuje vliv teploty, času, rozpouštědla a iontů na geometrické a energetické změny komplexu ligand-enzym/receptor. Tyto výpočetně velmi

náročné studie obvykle poskytují přesnější výsledky než molekulární docking. Získané predikce se mohou v některých případech ve své přesnosti a správnosti blížit k experimentálním měřením (např. metody perturbace volné energie nebo potenciálu střední síly).

6.2.2 Screening založený na podobnosti tvaru ligandů

Screeningové metody, které jsou založené na tzv. flexibilním molekulárním dockingu, jsou známé svou výpočetní náročností. Screening knihovny s tisícem ligandů pomocí flexibilního molekulárního dockingu ve střední výpočetní obtížnosti vyžaduje zhruba 200 000 jádrohodin, což je na běžném počítači se 4 logickými CPU možné realizovat za 5,7 let nepřetržitého provozu. V praxi se proto uplatňují jednodušší a méně výpočetně náročné metody, kterými lze vyhodnotit rozsáhlé ligandové knihovny za podstatně kratší dobu. Populární alternativou je v tomto případě virtuální screening na základě tvarové podobnosti ligandu a aktivního místa biologického cíle. Model aktivního místa lze také nahradit strukturním farmakoforovým modelem, a následně využít ligandově založenou metodiku pro virtuální screening [2]. V nejjednodušší variantě, která rovněž náleží mezi ligandově založené metody, lze provést screening knihoven sloučenin a hledat virtuální hity pouze na základě jejich podobnosti s nejučinnějším známým ligandem. Podobnost se určuje v rovině struktury a elektrostatických vlastností. Jelikož se ale výkon počítačových technologií zvyšuje, vyvíjejí se další metody tvarově podobnostního screeningu, jako je např. metoda Phase Shape, která generuje přesné 3D ligandy s nejuvhodnějším tvarem pro zakotvení do aktivního místa biologického cíle.

6.2.3 Objevování léčiv na základě fragmentů

Atraktivním přístupem v designu léčiv se v poslední době stalo hledání malých molekulárních fragmentů, které vykazují malou afinitu k biologickému cíli. Principem této fragmentární metody je inkubace biologického cíle v prostředí malých fragmentů a následné NMR analýze, která po důkladném prozkoumání výsledků vedla k odhalení struktur fragmentů s relativně vysokou afinitou k biologickému cíli [2].

Tento přístup se dnes využívá také pro návrh nových ligandů pomocí výpočetní techniky. Tato metoda je jednou s důležitých technik medicínské chemie. Principem je molekulární docking malých molekul neboli fragmentů a selekce těch fragmentů

kteře se vázou do aktivního centra v biologickém cíli. Přestože při testování může být vazba fragmentu na biologický cíl relativně slabá, kombinací fragmentů do větší molekuly pomocí speciálních algoritmů můžeme predikovat látku s velmi vysokou afinitou k vybrané makromolekule.

7 Metody designu leciv v klasické medicínální chemii

Po uspešnem nalezení hitové struktury je důležitá optimalizace hitu. Nejcastejši je potřeba zvýšit aktivitu, selektivitu nebo potlačit toxicitu pro organismus. Na základě empirického poznání byla ustanovená jednoduchá pravidla pro vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou (tzv. structure-activity relationships, SAR), která vycházela z poznatku, že podobne látky mají podobný biologicky ucinek. Dále bylo také velmi dobře známo, že i na prvnı pohled málo zřetelne změny struktury látek (např. změna absolutní konfigurace chirálního centra) mohou mít podstatný vliv na biologickou aktivitu. A konene nejdůležitější pravidlo bylo dane zkušeností, že hledání leciv je znacne náročný proces a jen velmi málo struktur dosahuje žádoucího biologického ucinu. Klasické medicnlne chemické postupy tedy obecne navrhují jen malé systematické obměny hituı cıi p ředlohove struktury, aby v souladu s receptorovou teorií nedošlo k porušení stereochemicky determinované vazby mezi ligandem a zvoleným receptorem nebo enzymem. Nosným principem zde je např. analogie nebo zjednodušení struktury leciv.

Pomocí medicínální chemie dokazeme p řipravit nove analogy, a tím vylepšit vlastnosti vybraného hitu. Rozlišujeme dva základní typy p řístupu k p řıprave analogů, a to homologii a bioizosterii.

7.1 Homologie

U homologie vytvarıme analoga, které se liší v homologické řadě o určitou konstantní jednotku (nejcastejši se jedná o $-CH_2-$). Pokud prodlužujeme délku uhlovodíkového řetězce, dochází také k rıstu lipofilní části, která má vliv na fyzikálně chemické parametry jako je log P (rozdělovací koeficient oktanol/voda –

určuje prostupnost léčiva přes plasmatické membrány), $\log S$ (míra rozpustnosti ve vodě), R_f (retenční faktor).

Homologii můžeme dále rozlišovat podle derivátů:

- A) Monoalkylované deriváty – tyto deriváty se liší pouze v délce postranního řetězce,
- B) Cyklopolymetylenové deriváty – k prodlužování řetězce dochází v cyklu, může také docházet ke zmenšování cyklu,
- C) Polymetylenové deriváty – na molekule se nacházejí dvě různá místa, kde se může postranní řetězec prodlužovat,
- D) Substituované kationty – specifický příklad homologie, dochází k substituci derivátů na kationtech (např. nahrazením -H za $-\text{CH}_3$).

Při prodloužení řetězce dochází k optimalizaci koeficientu $\log P$, který spoluurčuje prostupnost přes biologické membrány a průchod do buněk. Avšak kvůli tomuto jevu dochází zároveň k poklesu rozpustnosti ve vodě v místě působení nebo dochází k tvorbě micel, které jsou v tomto případě nežádoucí a zabraňují posunu léčiva k biologickému cíli. Při prodlužování řetězce může u některých látek docházet k růstu aktivity (od metylu k nonylu), a následně stejně rychlému poklesu aktivity při dalším prodloužení.

Příbuznou technikou k homologii potenciálních léčiv je technika zdvojení molekuly, kdy se chemicky spojují dvě stejné či rozdílné molekuly (např. kombinace ampicilinu a sulbaktamu v molekule sultamicilinu). Cílem takového designu může být zlepšení absorpce léčiva, tvorba proléčiva, popřípadě zasáhnutí více biologických cílů jednou látkou.

7.2 Izosterie a bioizosterie

Izosterie je považována za druh analogie. Při izosterii dochází k nahrazení atomu nebo skupiny, kdy odvozená sloučenina má podobné biologické vlastnosti a zároveň je zachováno rozložení elektronové hustoty a tvar molekuly. Klasické izostery jsou molekuly, které mají stejný počet atomů a/nebo stejný počet valenčních elektronů. Neklasické izostery nemusí splňovat tyto podmínky a požadavkem se stává podobnost účinků *in vivo* [32]. Izostery rozdělujeme do dvou skupin a to:

- Izostery 1. řádu – seskupení s prvky, které patří do různé skupiny, ale stejné řady periodického systému (např. -CH₂-, -NH- a -O-, ...),
- Izostery 2. řádu – atomy prvků, které mají stejný valenční stav, avšak patří do různé řady periodického systému (např. -O- a -S- nebo -F- a -Cl-, ...).

V lékařské chemii se využívá názvu bioizosterie. Bioizosterii můžeme charakterizovat stejně jako izosterii, jen s rozdílem, že bioizosterní látky vyvolávají *in vitro* či *in vivo* biologicky srovnatelné účinky.

8 Neurodegenerativní onemocnění

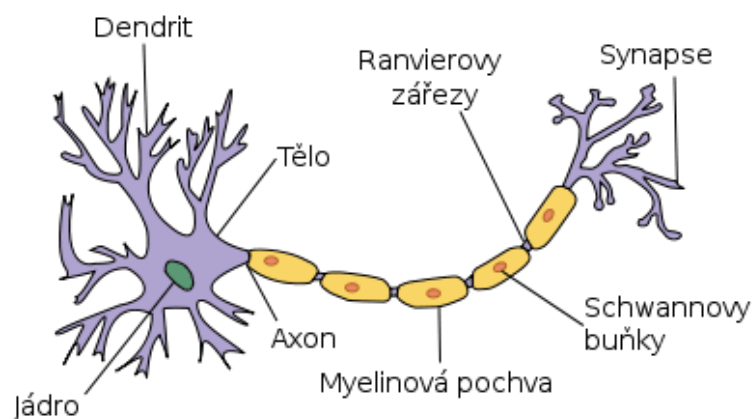
Předmětem této bakalářské práce je stručné představení nejdůležitějších metod výzkumu a vývoje léčiv a možností jejich využití při optimalizaci farmakoterapie amyotrofické laterální sklerózy (ALS). Dříve než přistoupím k samotné problematice neurodegenerativního onemocnění ALS, představím některé základní informace o nervovém systému, které jsou nezbytné pro porozumění ALS, její etiologii a patofyziologii.

Nervový systém (NS) v sobě zahrnuje mozek a míchu a za jeho stavební jednotky jsou považovány neurony. Neurony nemají reprodukční či nahrazovací schopnost, takže pokud se poškodí nebo zahynou, tělo je nedokáže nahradit. Mezi nejznámější NO patří amyotrofická laterální skleróza, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či Huntingtonova choroba.

Neurodegenerativní onemocnění (NO) můžeme stručně charakterizovat jako změnu probíhající v neuronech v mozku. Při tomto onemocnění můžeme pozorovat progresivní zánik neuronů, reaktivní zmnožení glií a ukládání proteinových depozit v intracelulárním i extracelulárním prostoru. NO jsou v tuto chvíli prakticky neléčitelné a mají za následek progresivní degeneraci nebo úhyn nervových buněk.

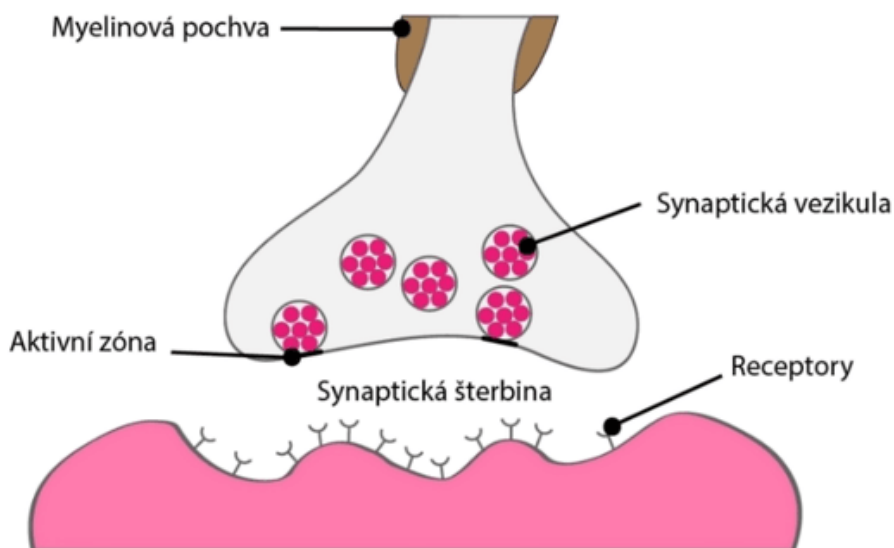
8.1 Struktura neuronu

Jádro nervové buňky se nachází v těle neuronu. Na toto tělo navazuje tzv. axon, který bývá obalený myelinovou vrstvou. Myelinová vrstva urychluje přenos elektrochemického vzruchu, který se do další buňky dostane pomocí synapsí (Obrázek 8.1.).



Obrázek 8.1. Popis nervové buňky. Převzato z [33]

Při průchodu vzruchu neuronem se na synaptickém konci nervové buňky uvolní synaptické vezikuly přenašeče signálu do synaptické štěrbině (Obrázek 8.2.). Tito přenašeči dosedají na receptory na další buňce a tím dochází k přenosu signálu.



Obrázek 8.2. Synaptická štěrbinu. Převzato z [34]

Společným znakem neurodegenerativních onemocnění je porušení funkce neuronu, poškození jeho cytoskeletu a vnitřních transportních mechanismů, které nakonec vedou k jeho apoptóze. Složitá problematika neurodegenerace může být zkoumána z několika rovin, přičemž téměř všechna neurodegenerativní onemocnění vykazují multifaktorovou etiologii (tj. vícere příčiny vzniku).

9 Amyotrofická laterální skleróza (ALS)

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je idiopatické neurodegenerativní onemocnění, které je fatální a pro které zatím neexistuje žádné kauzální léčivo. Nemoc byla v literatuře poprvé pojmenována francouzským neurologem Jean-Martinem Charcotem roku 1889. Označuje se za progresivní onemocnění a projevuje se degenerací motoneuronů předních míšních rohů, motorického kortexu, motoneuronů hlavových nervů a degenerací kortikospinální dráhy. Z počátku může neurodegenerace postihovat horní motorické neurony v mozku (upper motor neurons, UMN) nebo dolní motorické neurony v mozkovém kmeni a míše (lower motor neurons, LMN), ačkoli raný projev onemocnění je u UMN obvyklejší. Na začátku choroba způsobuje atrofii velkých svalů na končetinách a hrudi, později zasahuje do jemné motoriky. Pacienti s rozvinutou ALS se o sebe nedokáží postarat, přestávají chodit, ovládat svaly tváře, ztrácí hlas a postupně jsou paralyzováni. Stávají se z nich vězni ve vlastním těle, přičemž senzorycké neurony jim zůstávají funkční. Pro většinu pacientů je z důvodu bulbární dysfunkce a respirační nedostatečnosti toto onemocnění fatální po 3-5 letech od začátku vývoje nemoci. V omezeném počtu případů a při kvalitní paliativní péči mohou pacienti s ALS žít deset i více let po propuknutí onemocnění.

Existují dva typy ALS, a to sporadická (sALS) a familiární (fALS)(dědičná forma, 5-10 % případů) [35]. Onemocnění ALS má u mužů vyšší výskyt než u žen v poměru 1,2-1,6:1 [36]. Nejčastěji se tato nemoc projevuje mezi 50.-70. rokem. Incidence je uváděna 2/100 000 obyvatel/1 rok, což ji zařazuje mezi vzácná onemocnění [35].

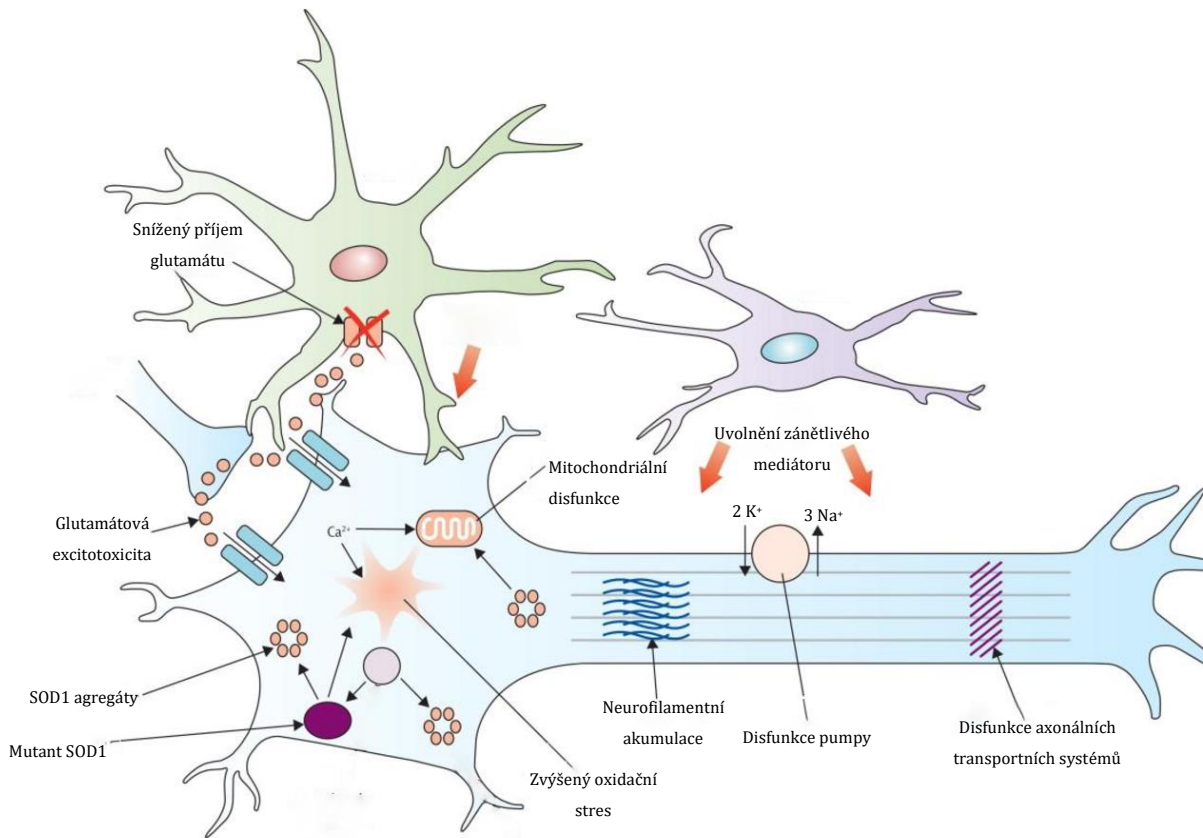
Etiopatogeneze nemoci ALS je podrobně zkoumána po řadu let, ale není zcela objasněna. Od roku 1980 se provádějí také klinické testy různých léčiv ALS, ale žádné kauzální léčivo zatím nebylo nalezeno, což bývá zdůvodňováno neuspokojivým poznáním této nemoci. Je uváděno pouze několik hypotéz o etiologii ALS, jako je např. virová infekce, porucha imunitního systému, vliv exotoxinů či hormonální porucha, avšak neexistují přesvědčivé důkazy, které by potvrdily příčinu ALS. Mezi majoritní etiologické teorie ALS však náleží především genotypické teorie, které vznik ALS spojují mutacemi zhruba 20 genů, z nichž nejvýznamnější jsou otevřený čtecí rámec 72 na chromozomu 9 (C9orf72),

superoxiddismutasa 1 (SOD1), RNA vázající protein spojených sarkomů (FUS) a transaktivační DNA vázající protein 43 (TARDBP). Epidemiologickým zkoumáním této nemoci bylo zjištěno, že u fALS s mendelovskou dědičností se až u 20 % pacientů vyskytuje defekt v genu superoxiddismutasy 1 (SOD1) na chromozomu 21. (více v kapitole SOD1 jako biologický cíl pro racionální design léčiv ALS). Až 90 % případů ALS je ovšem zastoupeno sporadickou formou sALS, u které zůstávají genotypické příčiny neobjasněny [37].

Z etiologického hlediska se ALS jeví jako multifaktorové onemocnění, na jehož vzniku a rozvoji se podílí současně několik patofyziologických procesů. Mezi nejčastěji zmiňované procesy, které podmiňují vznik ALS, řadíme tyto patofyziologie:

- a. patologická glutamátová excitotoxicita,
- b. tvorba volných radikálů,
- c. agregace SOD1 a dalších proteinů v cytosolu neuronů,
- d. neurozánět,
- e. mitochondriální disfunkce,
- f. porucha axonálního transportu.

Goetz ve své knize uvádí další možnou hypotézu, a to, že tuto nemoc může způsobovat narušení celulárního a axonálního transportu vlivem agregace hyperfosforylovaných neurofilament [38]. Schématické znázornění patologického vlivu výše uvedených faktorů na neurální buňku lze vidět na obrázku 9.1.



Obrázek 9.1. Hlavní patologické procesy, které se považují za faktory vzniku ALS. Převzato z [39]

Podle fenotypických známek ALS se rozlišují dvě etiologické teorie, které částečně vysvětlují některé aspekty tohoto onemocnění. První teorie vzniku ALS předpokládá, že onemocnění začíná degradací kortikálních motoneuronů, které monosynapticky regulují zadní rohové buňky v míše a způsobují anterográdní neurodegeneraci prostřednictvím glutamátové excitotoxicity. Rozklad neuronu je ve finálním stádiu způsoben nadměrným zvýšením koncentrace Ca^{2+} v cytosolu neuronu.

Druhá teorie naopak předpokládá, že patofyziologie ALS začíná ve svazech díky nedostatku neurotrofního hormonu, který se následně neuvolňuje z postsynaptických buněk a nemůže být retrográdně transportován presynaptickým axonem. Tuto teorii podporuje fakt, že synaptické poškození předchází degeneraci motoneuronů.

Z obou zmíněných teorií etiologie ALS se větší význam přikládá tzv. dopředné teorii, která vysvětluje vznik této nemoci kauzální posloupností od mutací genů, chybného

složení proteinů a jejich agregaci, přes retenci nukleárních faktorů v cytosolu, narušení biochemických drah, poškození organel a cytoskeletu až po apoptózu. Velmi důležitou roli v neurodegeneraci má také nadměrná aktivace mikroglií, které produkují cytokiny, a vyvolávají tak neurozánět.

9.1 Rozdělení ALS podle Světové neurologické federace

Světová neurologická federace (WFN) dělí toto onemocnění podle klinické formy do několika kategorií:

- klasická forma ALS,
- progresivní bulbární paralýza,
- progresivní (spinální) svalová atrofie,
- primární laterální skleróza.

Při klasické formě ALS se postižení centrálního i periferního motoneuronu vyskytuje asi v 65 %. V případě progresivní bulbární paralýzy postižení dosahuje 25 %. Při progresivní svalové atrofii (PSA) dochází pouze k postižení periferního motoneuronu, a to do hodnot 8 %. Dalším rozdělením je primární laterální skleróza (PLS), kdy centrální postižení je okolo 2 %. Existuje i typ monomelické spinální muskulární atrofie, kdy poranění tkáně zůstává bez výraznější progresy a je lokalizováno pouze v končetinách.

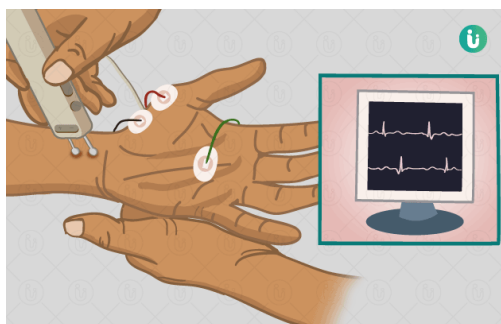
9.2 State of the art diagnostiky ALS

V této době stále neexistuje spolehlivý diagnostický test, který by nemoc ALS jednoznačně potvrdil. Nemoc můžeme s určitou pravděpodobností identifikovat pomocí analýzy klinického průběhu a následným vyloučením ostatních onemocnění s analogickým vývojem (tzv. diferenciální diagnózou). Mezi klinické příznaky ALS, které nejsou specifické, náleží zhoršená nervosvalová koordinace, poruchy řeči (tj. disartrie), poruchy polykání, palatální slabost, ubývání na váze, hypermetabolismus, emoční labilita, fyzická slabost a kognitivní disfunkce. Podobné příznaky však mají i jiné neurodegenerativní onemocnění, jako je např. frontotemporální demence. V literatuře se objevují kritické studie, které dokládají, že v 8 % případů diagnóz dochází k falešně pozitivní identifikaci ALS. K falešně negativnímu vyloučení ALS

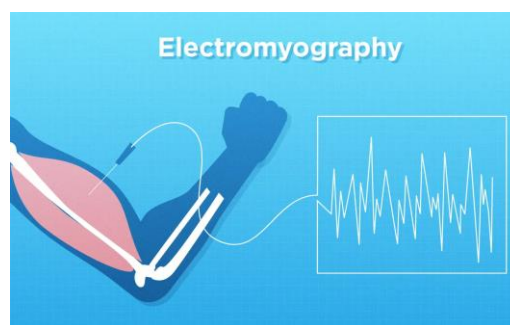
dochází až ve 44 % případů diagnóz. Nejčastěji je při falešně pozitivní diagnóze ALS zaměněno za multifokální motorickou neuropatii nebo Kennedyovu nemoc [39].

Vyšší spolehlivost diagnózy ALS může být podpořena sledováním tzv. El Escorial kritérií, které byly publikovány na konferenci ve Španělsku roku 1990 [40]. Vedle důkladného vyšetření funkce UMN a LMN je to např. sledování mimovolného svalového trháni (zvláště na jazyku) a záškubů svalových snopečků ve velkých svalech (např. fascikulace ve čtyřhlavém svalu stehenním). Kromě hledání klinických příznaků ALS jsou pro diagnózu *lege artis* samozřejmě nezbytná instrumentální vyšetření [41].

Základním instrumentálním vyšetřením ALS je tzv. elektromyografie (EMG). EMG je elektrodiagnostická metoda, která se využívá k diagnostice poruch nervosvalového aparátu. Měří se elektrický potenciál vzniklý činností kosterní svaloviny. Využívají se jak povrchové, tak i jehlové elektrody.



Obrázek 9.2. Vyšetření EMG pomocí povrchové elektrody. Převzato z [42]

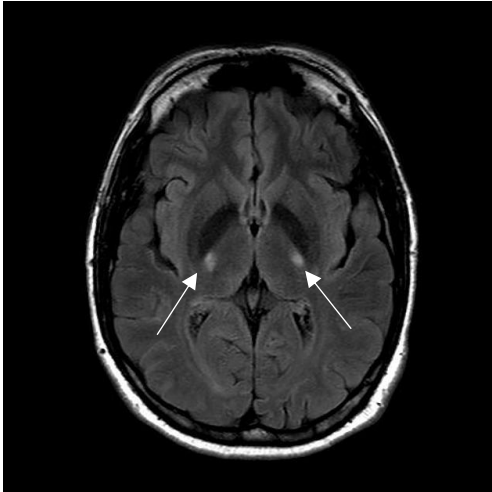


Obrázek 9.3. Vyšetření EMG pomocí jehlové elektrody. Převzato z [43]

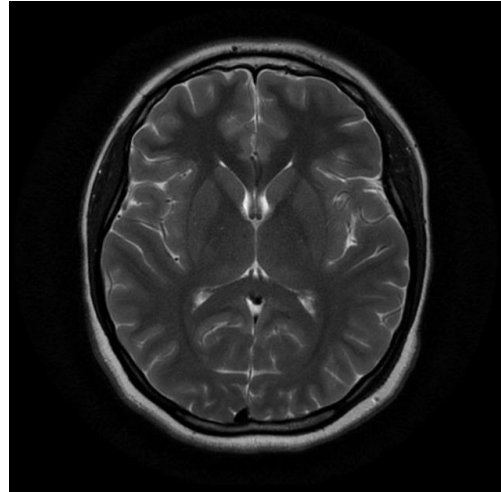
EMG v případě počínající ALS nezachytí výrazné odchylky od normálního stavu. Při začínající progresi ALS lze u pacientů pomocí EMG již zaznamenat sníženou amplitudu elektrochemické aktivity motoneuronů ve svalech a rovněž je zachytitelný relativní pokles neurální vodivosti, a to jak u motoneuronů, tak u sensorických nervů. Dle současně navržených Awaji kritérií pro EMG diagnostiku lze ALS určit se senzitivitou 81 % a specificitou až 92 % [44].

Další diagnostika ALS je prováděna pomocí magnetické rezonance (magnetic resonance imaging, MRI). MRI je neinvazivní zobrazovací technika využívána ve zdravotnictví k zobrazování vnitřních orgánů. V tomto případě na zobrazení mozku

(Obrázek 9.5.). Můžeme porovnat MRI zdravého člověka (Obrázek 9.5.) a muže (35 let), který trpí ALS (Obrázek 9.4.). Na obrázku 9.4. je možné si povšimnout bílých skvrn ve středu MRI, které jsou způsobené právě nemocí ALS. Tzv. MRI hyperintenzita je v případě ALS pozorována i v kortikospinálním traktu.



Obrázek 9.4. MRI muže trpící ALS. Převzato a upraveno z [39]



Obrázek 9.5 MRI hlavy zdravého člověka. Převzato z [46]

Kromě rutinních MRI vyšetření (např. T2 vážená FLAIR sekvence), je velmi přínosné využít pokročilé MRI varianty, které mohou zachytit další patologické změny mozku a míchy, a podpořit tak spolehlivost diagnózy ALS. Důležité informace o objemu bílé mozkové hmoty přináší voxelová MRI morfometrie, metabolickou aktivitu v různých částech mozku může charakterizovat funkční BOLD MRI experiment, pohyb molekul vody ve tkáni lze zachytit pomocí MRI metody pro zobrazení a traktografii difuzního tensoru. Dále je možné při diagnostice ALS využít tzv. molekulární zobrazování, jehož principem je aplikace radioaktivního ligandu (např. inhibitor benzodiazepinového receptoru ^{11}C -flumazenil) do krve, následné navázání ligandu na receptory v mozku a zobrazení komplexovaného ligandu pomocí pozitronové emisní tomografie. Velmi významný výzkumný potenciál má rovněž metoda transkraniální magnetické stimulace, pomocí níž lze neinvazivně při plném vědomí pacienta stimulovat některá centra v mozku, a sledovat následně míru reakce těla (např. šubnutí některého prstu na ruce) [47].

Další důležitou pomůckou v diferenciální diagnostice ALS je histologické vyšetření vzorků svalové tkáně z biopsie a proteomická analýza cerebrospinální tekutiny

(cerebrospinal fluid, CSF). Nеспецифickým markerem, který se při diagnostice ALS sleduje v CSF, je protein TDP-43, tau protein nebo lehká a fosforylovaná neurofilamenta. Aktuální výzkum ALS také poukazuje na možnou souvislost progresu tohoto onemocnění s hladinami cholesterolu, triglyceridů a mastných kyselin. Klíčové objevy v oblasti patofyziologie ALS může také přinést současný bioinformatický výzkum zaměřený na specifické svalové mikro-RNA řetězce, které regulují svalový metabolismus [48].

Diagnostika pacienta může trvat až 9-12 měsíců, v závislosti na době navštívení neurologa, objevení prvních příznaků a zda má nemoc typický průběh. Kromě diagnostických nástrojů je pro identifikaci ALS také důležitá anamnéza pacientů, která může odhalit přítomnost rizikových faktorů. Jedná se např. o zranění hlavy, vysokou fyzickou aktivitu, intenzivní sportování, službu v armádě, kouření, špatnou výživou nebo mladistvost matky při početí.

Velmi novou zkoušenou léčebnou metodu je buněčná terapie, která se zabývá léčbou kmenovými buňkami. Většina studií se opírá o hypotézu, že kmenové buňky (kmenové, mezenchymální a neurální) jsou schopny podpořit přežití motoneuronu několika různými mechanismy a to:

- sekrecí růstových faktorů [49],
- imunomodulačním působením na aktivované astrocyty a mikroglie [50],
- diferenciací do podoby funkční glie [51].

Přestože mnoho experimentálních prací ukazují pozitivní efekt buněčné terapie na průběh nemoci, dosud publikované klinické studie tento efekt neprokazují. Důvod je, že se studovala bezpečnost léčby a způsob aplikace, než vliv na průběh nemoci.

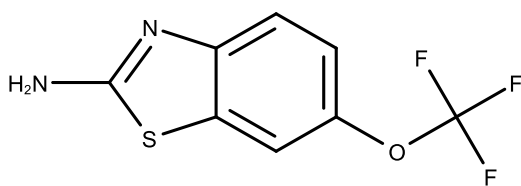
9.3 Současná farmakoterapie ALS

Současná farmakoterapie se zaměřuje pouze na symptomatickou léčbu, neboť kauzální terapie nebyla nalezena. Nejznámější léky spojené s farmakoterapií ALS jsou riluzol (Obrázek 9.6.) a edaravon (Obrázek 9.7.). Při podávání léku riluzol bylo vypořádáno zpomalení progresu choroby zejména v počátečních stádiích onemocnění. Vedou se spory o jeho efektu na ALS, avšak studie prokázaly, že dávka

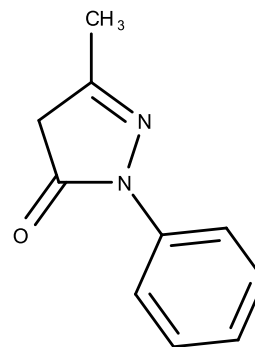
100 mg riluzolu (doporučená denní dávka) prodloužilo život pacientů [52]. Tento přípravek slouží jako inhibitor působící v kaskádě emise glutamátu.

Neuroprotektivní riluzol ovlivňuje několik biologických cílů v CNS a jeho přesný mechanismus účinku při terapii ALS není znám. Obecně je tento zástupce centrálně aktivních léčiv benzothiazolové třídy považován za antagonistu glutamátu, který reguluje jeho excitotoxický účinek na motorické neutrony. Jeden typ účinku riluzolu spočívá v blokaci napětím řízených sodíkových kanálů v nervových zakončeních glutamátergního systému. Sodíkové ionty nemůžou pronikat do buňky a vytvářet napěťový gradient, který je hlavním energetickým zdrojem glutamátových transporterů při reverzním efluxu glutamátu. Dále bylo zjištěno, že riluzol inhibuje N-methyl-D-aspartátové a kainátové receptory, a také potencuje receptory γ -aminomáselné kyseliny [53].

Pokud bychom měli hodnotit léčivo na základě Lipinského pravidla, zjistili bychom, že riluzol splňuje všechny základní parametry. Lék edaravon je poměrně nově uvedený na trh. V roce 2015 bylo registrováno v Japonsku a od května roku 2017 je registrován v USA. Při dvouletém užívání u některých nemocných postupnou ztrátu hybných funkcí o 30 % [54]. Edaravon zmírňuje účinky oxidačního stresu, který může souviset s degenerací motoneuronu. Udržuje zdravé motorické nervy, a tím zachovává funkci svalů. Nevýhodou edaravonu je, že se musí podávat intravenózně [55]. Současná farmakoterapie slouží pouze k symptomatické léčbě, kauzální terapie nebyla nalezena. Z pohledu fyzikálně-chemických vlastností riluzol i edaravon splňují podmínky Lipinského pravidla. Hodnoty těchto sloučenin byly vypočítány v MarvinSketch 20.04.



Obrázek 9.6. Struktura riluzolu (2-amino-6-(trifluormethoxy)benzothiazol), $M_R= 234,20$ g/mol; $\log P= 3,40$; $HBD=1$; $HBA= 3$

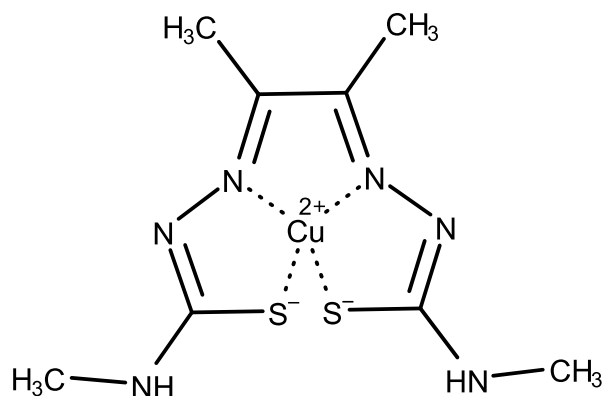


Obrázek 9.7. Struktura edaravonu (5-methyl-2-fenyl-4H-pyrazol-3-on), $M_R= 174,20$ g/mol; $\log P= 1,53$; $HBD=0$; $HBA= 2$

Při studiích na zvířatech se léčba ALS zkoušela pomocí vysokých dávek vitamínu B12, který také prokazoval zpomalení progresu motorických funkcí [56], avšak jeho klinický efekt na lidech nebyl doposud osvědčen.

U pacientů s bulbárním postižením se může vyskytovat zvýšená salivace, která v některých případech podporuje bakteriální onemocnění ústní dutiny. Salivace se může potlačit podáním anticholinergik (např. amitriptylin, atropin) nebo se využívá lokální aplikaci botulotoxinu do slinných žláz, kdy klinický efekt trvá asi 3-4 měsíce [57]. Amitriptylin má vliv na více symptomů. Tím je výšené slinění, močové poruchy a deprese. Můžeme se setkat i s podáváním diazepam, který slouží na snížení vzniklé úzkosti a fascikulace. Často vyskytujícím symptomem bývají křeče, na které se využívá např. baclofen či vitamín E. Podle široké metaanalýzy z databáze Cochrane nebyly potvrzeny účinky těchto léků [58]. V konečné fázi života mnoho pacientů využívá plicní ventilaci a nutriční péči, protože nemohou sami dýchat, žvýkat ani polykat.

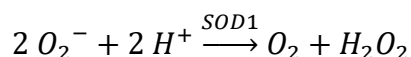
V současné době v Austrálii probíhají testy na sloučeninu měďnaté soli (2E,2'E)-2,2'-[(2E,3E)-2,3-butandiyliden]bis(N-methylhydrazinkarbimidothioátu) (Obrázek 9.8.). Testování se nachází ve fázi I/II klinické studie u ALS pacientů. Existují předpoklady, které naznačují, že by tato molekula mohla fungovat nejen u pacientů s ALS, ale i u pacientů, kteří trpí jakoukoliv nemocí, která způsobuje poškození buněk oxidativním a nitrosativním stresem [59].



Obrázek 9.8. Mědnatá sůl (2E,2'E)-2,2'-[(2E,3E)-2,3-butandiyliden]bis(N-methylhydrazinkarbimidothioátu, $M_R = 319,89 \text{ g/mol}$; $\log P = 0,95$; $HBD = 0$; $HBA = 4$.

10 Struktura, funkce a vlastnosti SOD1

Superoxiddismutasa 1, známá pod zkratkou SOD1, je enzym, který je kódován genem SOD1. Tento gen se nachází na chromozomu 21. SOD1 na sebe váže měďnaté a zinečnaté ionty, přičemž jeho hlavní funkcí je rozklad toxické nabité molekuly kyslíku zvané superoxidový radikál. Katalytický účinek superoxiddismutasy 1 na superoxid můžeme vidět níže:



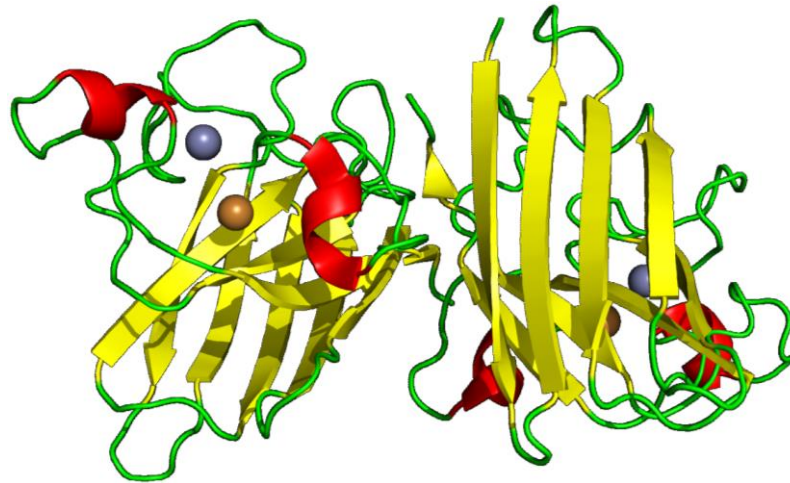
Superoxidy jakožto reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) jsou vedlejšími produkty normálních buněčných procesů. Musí se pravidelně rozkládat, aby nedošlo k poškození buněk. Mutace, které postihují SOD1, vedou k poruše homeostázy měďnatých iontů v míše a tím snižují účinnost SOD1. Bylo zjištěno, že nejméně dvě stovky mutací v genu SOD1 může mít vazbu na patofyziologii ALS [60]. Většina těchto mutací mění jeden z proteinových stavebních bloků v enzymu superoxiddismutasy 1. SOD1 je jednou ze tří lidských superoxiddismutas. SOD2 ve své struktuře ukrývá Mn^{2+} a shlukuje se do podoby homotetrameru. SOD3 je považována za extracelulární superoxiddismutasu a agreguje se do podoby homotetrameru [61].

10.1 Vlastnosti superoxidů

Superoxidy, starším názvem hyperoxidy, jsou chemické sloučeniny, které se v anorganické chemii většinou skládají z kationtu kovu a superoxidového aniontu s chemickým vzorcem O_2^- . Jak bylo již výše zmíněno, v organismu vznikají jako vedlejší produkt volně probíhajících redoxních buněčných procesů. V tomto případě má kyslík formální oxidační číslo 0.5 a délka vazby je 1,33 nm. Tím leží v řadě délek vazeb u kyslíku mezi vazbou O_2^0 (s hodnotou 1,21 nm) a vazbou v O_2^{-II} (s hodnotou vazby 1,49 nm). Můžeme je připravit reakcí peroxidů s kyslíkem za vyššího tlaku nebo přímou syntézou z prvků při teplotě 450 °C a tlaku 15 MPa [62]. Superoxidy jsou produkovány ve velké míře enzymem NADPH-oxidasa, která je součástí fagocytárních buněk. Dále také vzniká v dýchacím řetězci na vnitřní membráně mitochondrií. Předchozí studie superoxidů ukazují, že mají za následek rozvoj chorobných změn a také pravděpodobně stárnutí buněk oxidačním vlivem [63].

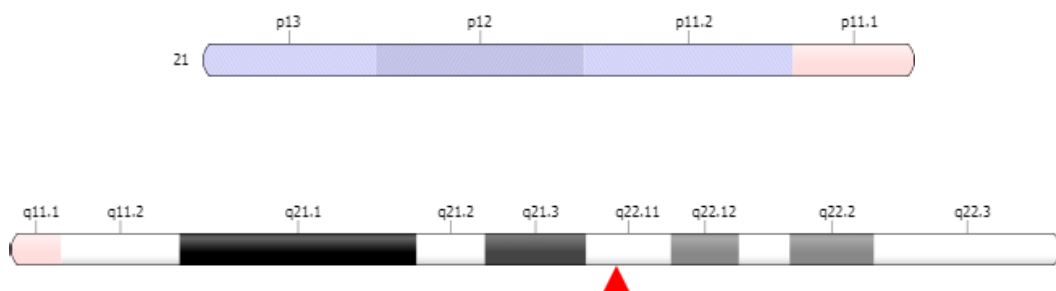
10.2 Struktura SOD1

SOD1 je globulární protein s hmotností 16 kDa, který se nejčastěji vyskytuje jako homodimer (32 kDa) (viz Obrázek 10.1.). Strukturně každá z podjednotek obsahuje ve střední části molekuly konformaci β -skládaného listu a sedm smyček na periferních částech, které jsou k sobě vázány pomocí nevazebných i vazebných interakcí, jako jsou disulfidické vazby, vodíkové vazby nebo koordinační vazby s Cu^{2+} a Zn^{2+} ionty. Tyto kovové ionty jsou velmi důležité pro katalýzu aktivity SOD1.



Obrázek 10.1. Struktura SOD1 v podobě homodimeru s ionty Cu^{2+} a Zn^{2+} . Převzato z online databáze rcsb.org (PDB ID: 4A7G)

SOD1 se exprimuje z 21. chromozomu (zobrazeno na Obrázek 10.2.) a jeho sekvenci tvoří 153 aminokyselin. SOD1 je klasifikována jako oxidoreduktasa.

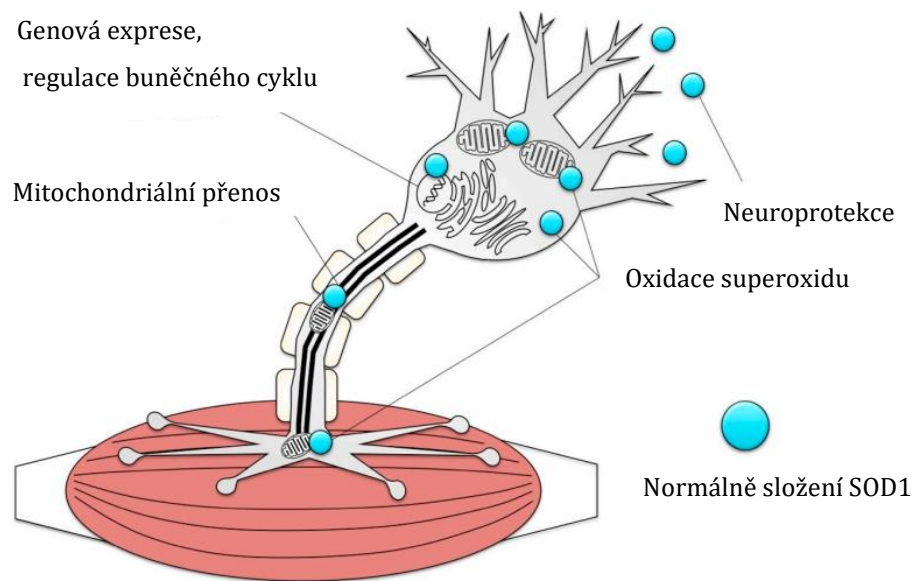


Obrázek 10.2. Místo transkripce SOD1 na chromozomu 21. V horní části obrázku je malá chromatida (p), dole je velká chromatida (q) chromozomu 21.

10.3 Funkce a vlastnosti SOD1

Superoxid je nejběžnější volný radikál, který vzniká v lidském těle. Nachází se v cytoplasmě, v mezimembránovém prostoru mitochondrií a také na synapsích. Je velmi reaktivní a relativně neškodný oproti metabolitům, které z něj vznikají. SOD1 katalyzuje přeměnu superoxidu (dismutaci) na peroxid vodíku, který je okamžitě odstraňován následnými reakcemi s enzymem katalasou. Avšak ze superoxidu mohou vznikat i další velmi škodlivé formy kyslíku (hydroxylový radikál, peroxynitril nebo kyselina chlorná). SOD1 se považuje za nejsilnější antioxidant v lidském těle. SOD1 se nachází ve všech aerobních organismech, které se liší pouze

ve svém kovovém kofaktoru. Za fylogeneticky mladší považujeme SOD1, která ve své struktuře obsahuje kofaktor Mn^{2+} a Fe^{2+} . Tyto typy SOD1 se nacházejí v prokaryotických buňkách a prvocích. Typ SOD1 s kofaktorem Cu^{2+}/Zn^{2+} se nachází v eukaryotických buňkách, tedy v rostlinách i v živočiších. SOD1 s Cu^{2+}/Zn^{2+} je enzym dimerické struktury, který v každé podjednotce obsahuje jeden kovový zinečnatý a měďnatý iont[64]. Při zkoumání následků ztráty funkce enzymu SOD1 bylo zjištěno, že SOD1 se také účastní na axonovém transportu mitochondrií k synapsi [65].



Obrázek 10.3. Zobrazení přenosu mitochondrií k synapsi pomocí SOD1. Převzato a upraveno z [65].

10.4 Nejčastější mutace v genu SOD1

Je udáváno, že až polovina všech Američanů s ALS má mutaci, kdy se v genu SOD1 nahradí alanin valinem v kodonu 4 na exonu 1 (zapsáno jako Ala4Val, A4V) [66]. Mutace A4V, která je způsobena záměnou GCC → GTC, je spojena s progresivní průběhem ALS a s kratší délkou života ve srovnání s ALS způsobenou jinými genetickými mutacemi. Tato mutace vyskytuje v 50 % případů mutací SOD1 u familiární formy ALS a zřídka kdy se objevila mimo Ameriku. Odhaduje se, že k této hereditární mutaci došlo před 540 generacemi u asijských předků domorodých Američanů. Průměrná délka přežití s touto mutací je uváděna od nástupu příznaků do 1,4 roku [67].

Další známé mutace v genu SOD1 jsou na kodonu č. 46 a 93. V kodonu 47 se mění histidin na arginin (H46R). Mutace H46R je označována za nejběžnější mutaci způsobující ALS v japonské populaci, kdy tuto mutaci nese až 40 % populace trpící na nemoc ALS. Průměrná délka života s touto mutací je uváděna od propuknutí nemoci až 15 let [68].

U mutace G93A se mění glycin na pozici 94 na alanin. Tato mutace je poměrně vzácná, ale byla studována velmi intenzivně, protože to byla první mutace, která byla modelována u myši. Tato modifikace nechává neporušenou enzymatickou aktivitu. Bylo provedeno mnoho studií na potencionální cíle léčiv a mechanismy toxicity. Avšak stále nebylo zjištěno, zda jsou nálezy specifické pouze pro mutaci G93A nebo použitelné na všechny ALS způsobující mutace SOD1. Při zkoumání mutace G93A a H46R bylo zjištěno, že patogeneze těchto modifikací je silně odlišná a některé léky, které jsou v jednom modelu vysoce prospěšné nebo škodlivé, mají v druhém modelu opačný nebo žádný účinek [69].

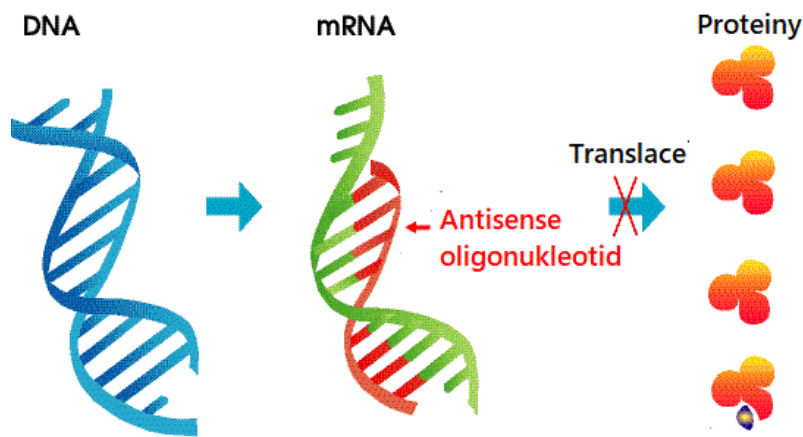
11 SOD1 jako biologický cíl pro racionální design léčiv ALS

Dřívější studie SOD1 na modelu myši ukázaly, že i při totální absenci SOD1 se nevyvíjí nemoc ALS. Naopak transgenní myši, které exprimovaly mutantní formu SOD1, postupně ochrnuly, ačkoli SOD1 u nich vykazovala normální úroveň katalytické aktivity. Z těchto studií dále vyplynul fakt, že při mutaci určitých genů SOD1 získává toxické vlastnosti (tzv. toxic-gain of function). Abnormální akumulace mutované SOD1 v motorických neuronech je patologickým znakem některých forem nemoci ALS. Snížení hladiny SOD1 a omezení její agregace je proto slibným terapeutickým cílem.

Velmi vysokou pozornost dostala genová terapie ve spojení se SOD1. Genová terapie se týká přenosu terapeutického genu do cílové tkáně a zachování funkce genu po přiměřenou dobu. Tato terapie se zprostředkovává pomocí tzv. antisense oligonukleotidů (ASO). ASO jsou syntetické zrcadlové kopie malého úseku mRNA, které se vážou na ribonukleovou kyselinu (RNA) a funguje několika způsoby:

- cílení RNA na degradaci,
- bránění translace specifické RNA.

Tato metoda, která snižuje expresi SOD1, byla poprvé navržena v roce 2006 [70], ale první studie této myšlenky byly publikovány až v roce 2013 Millerem a kol. [71]. Výsledek této studie dopadl poměrně nepříznivě. Při podávání ASO ISIS 333611 Miller a kol. nebyli schopni překročit hematoencefalickou bariéru (HEB). V tu chvíli již Chen a kol. pracovali na přenosu ASO přes HEB. Dosáhli úspěšných výsledku na modelu myši, avšak u testování na lidech tato studie nebyla nikdy provedena [72].

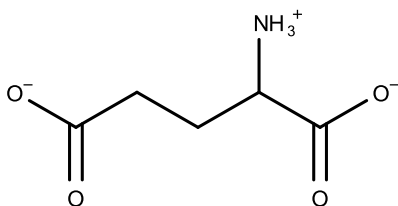


Obrázek 11.1. Funkce antisense oligonukleotidu, upraveno z [73]

11.1 SOD1 a glutamátergní systém

Glutamát (Obrázek 11.2.) je považován za nejhojněji se vyskytující excitační neurotransmitter v NS a je velmi důležitý pro správnou funkci systému. Hraje roli ve vývoji nervové tkáně, její schopnosti se přizpůsobit prostředí a během přenosu excitačního signálu na synapsích. Přesto je ve velkém množství excitotoxický jako nervový jed. Při masivní stimulaci N-methyl-D-aspartátového receptoru (NMDA), receptoru α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny (AMPA) a kainátových receptorů glutamátem dojde k nadměrné propustnosti membrány neuronu pro vápenaté ionty a dochází k řadě letálních reakcí včetně nitrosativního stresu [74]. Nadměrná stimulace glutamátových receptorů se považuje za první buněčnou reakci při cévní mozkové příhodě (CMP). Například takový riluzol urychluje vstřebávání glutamátu a také zabraňuje jeho uvolňování

v presynaptických zakončeních. S glutamátovou excitotoxicitou se můžeme setkat i v některých formách ALS.



Obrázek 11.2. Vzorec glutamátu

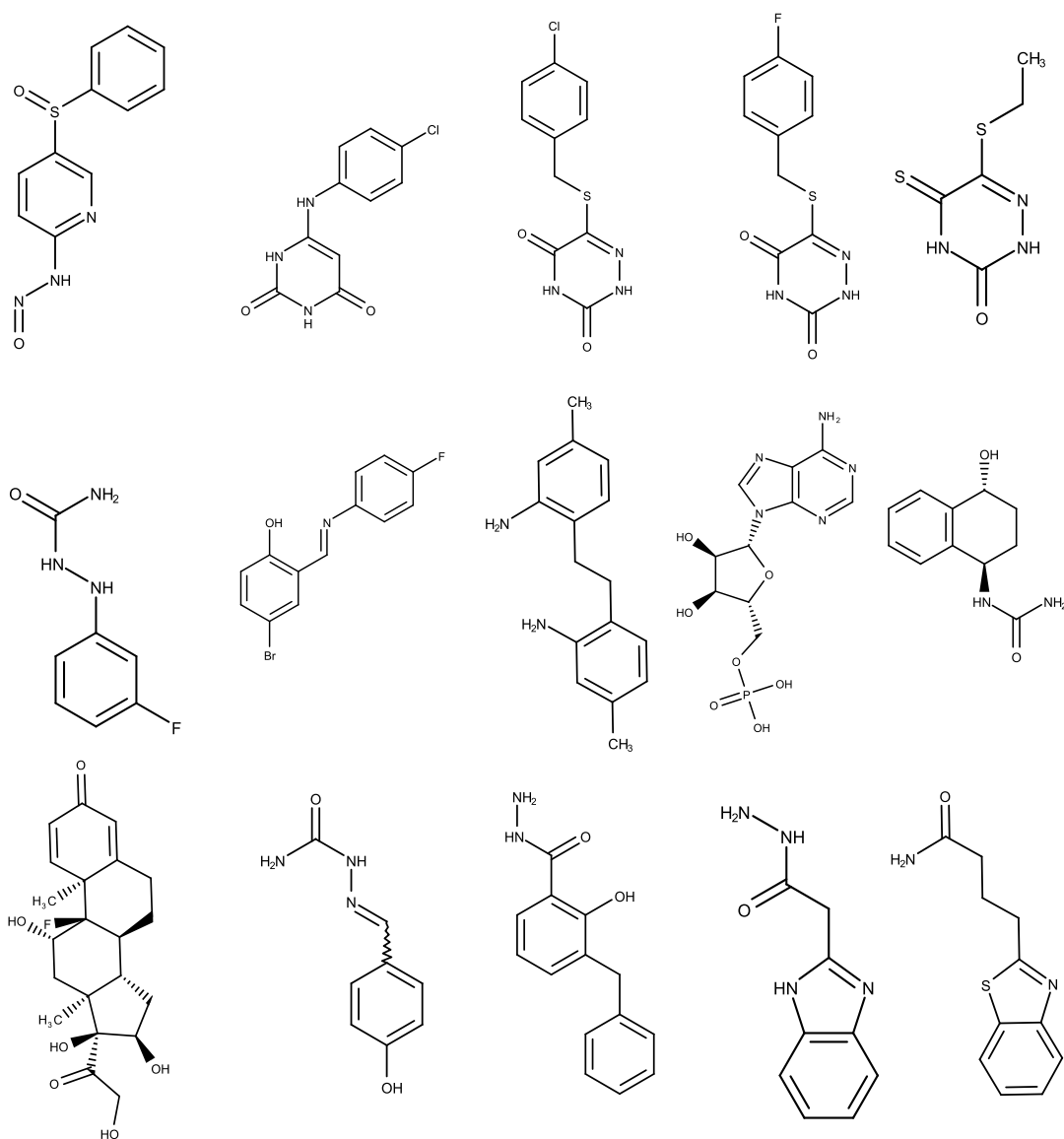
12 Aktuální hitové struktury ve výzkumu léčiv ALS

12.1 Antiagregátory SOD1

Hlavním zdrojem nových struktur pro výzkum léčiv ALS je HTS a jeho *in silico* varianty v podobě ligandového či strukturního virtuálního screeningu. Současný výzkum se např. zaměřuje na hledání antiagregátorů SOD1, které brání monomerům SOD1 vytvářet oligomery. Pracovní hypotéza v tomto typu výzkumu předpokládá, že SOD1 je stabilní jako dimer, a v této podobě má neuroprotektivní účinek. Ray a kol. popsali strukturně založený VS ligandové knihovny s 1,5 milionem komerčně dostupných látek (tzv. drug-like knihovny s relaxovaným Ro5), u nichž ověřovali jejich antiagregační účinek na mutovanou SOD1 [75]. Principem použitého VS byl molekulární docking s využitím programu Schrödinger.

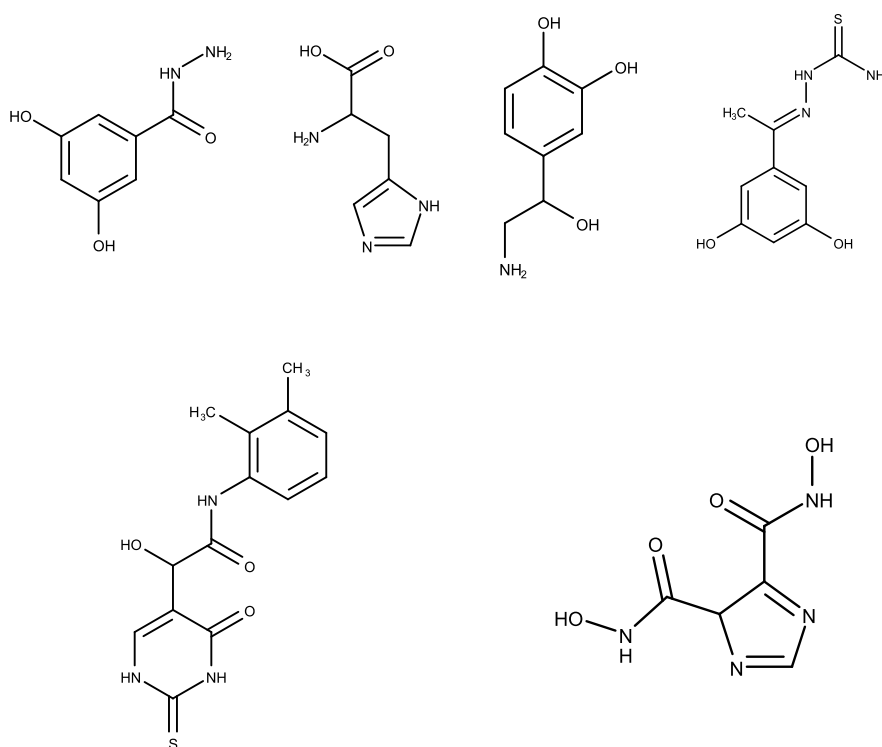
Ligandová knihovna byla ve studii Ray a kol. připravena pomocí aplikace LigPrep (Schrödinger) a zahrnovala geometrickou optimalizaci, polarizaci molekul pro fyziologické pH a generování možných tautomerů. Jako biologický cíl byl použit mutantní model SOD1 (tzv. wild-type s mutací A4V), který je dostupný online pod označením PDB ID: 1UXM v proteinové databance rcsb.org. Model biologického cíle byl náležitě optimalizován a použit pro molekulární docking. Jako aktivní místo byla vybrána oblast okolo valinu č. 148, který je zhruba v těžišti rozhraní mezi dvěma monomery SOD1 v jejich agregátu. VS byl proveden s využitím výkonného linuxového clusteru.

Tato *in silico* studie poskytla 100 slibných hitových struktur, které byly následně testovány *in vitro* na antiagregační schopnosti vůči třem typům mutovaných SOD1: A4V, G85R a G93A. 15 látek vykazovalo schopnost stabilizovat dimer SOD1 a rovněž relativně účinně zabránilo agregaci SOD1 (Obrázek 12.1.). Studie poskytla velmi důležité poznatky o možných antiagregátorech SOD1. Látky se ale nedostaly do další fáze vývoje, protože působily rovněž na jiné biologické cíle (tzv. off-target efekt). Ukázalo se však, že hledání antiagregátorů je obecně spojeno s off-target efektem, protože interakce nízkomolekulárních ligandů s místy na povrchu proteinů nejsou tak specifické jako vazebné módy v kavitách enzymů či receptorů.



Obrázek 12.1.15 vybraných struktur antiagregátorů SOD1. Převzato z[75].

Jiná komplexní studie skupiny Nowak a kol. si vytkla za cíl eliminovat off-target působící antiagregátory SOD1 a s využitím pokročilých nástrojů CADD byl v jejím rámci uskutečněn VS 2,2 milionů ligandů [75]. Tato práce se opírala o stejnou metodiku jako výše uvedená studie Ray a kol., využívala software Schrödinger a molekulární docking jako nástroj pro VS. Jako biologický cíl byl vzat taktéž model SOD1 s označením PDB ID: 1UXM. Pro výběr ligandů byl použit speciální filtrovací algoritmus na bázi predikce ADME vlastností. Tato studie vedla k identifikaci šesti látek, které vykazovaly vysokou afinitu k SOD1 *in vitro* a zároveň měly výrazně slabší afinitu k plazmatickým proteinům (Obrázek 12.2.). Nalezené hity měly navíc protektivní charakter vůči chybnému složení SOD1 (tzv. misfolding) a posléze se staly předlohovými strukturami pro vývoj nových antiagregátorů SOD1.



Obrázek 12.2. Slibné hitové struktury antiagregátorů SOD1 se sníženým off-target efektem. Převzato z [76].

12.2 Protektory homodimerů SOD1

Ve výzkumu ALS a funkce SOD1 se také objevila pracovní hypotéza, že správná biologická funkce SOD1 je svázána jen s její homodimerní formou a že za hlavní toxický efekt je zodpovědný monomer SOD1. Dokonce se objevuje vědecký názor, že monomerní forma je významnějším původcem neurotoxicity než agregáty SOD1 [77]. Antiagregátory SOD1 tedy musí inhibovat interakci jen specifických oblastí SOD1, aby nedošlo ke znemožnění tvorby homodimerů.

Tyto pozoruhodné poznatky o významu homodimerů SOD1 motivovaly skupinu Ip a kol. k počítačovému výzkumu protektorů dimerů molekul SOD1, které stabilizují toto uspořádání. Pomocí strukturně založeného VS s využitím molekulárního dockingu bylo ověřeno zhruba 4400 ligandů z databáze Sweetlead. Jako biologický cíl byl zvolen krystalografický model homodimeru SOD1 s označením PDB ID: 1SPD. Výsledkem práce byla selekce 7 hitových struktur protektorů homodimerů SOD1, které byly posléze testovány *in vitro* na jejich schopnost potlačovat chybné konformační složení enzymu (tzv. misfolding) a na antiagregační účinky. V *in vitro* testech, které zahrnovaly také stanovení vazebné afinity ligandů k enzymu pomocí izotermální kalorimetrické titrace, byla využita SOD1 s mutací A4V. Nejvýhodnějšími kandidáty pro další výzkum se ukázaly glykosid quercitrin a quercetin-3- β -D-glukosid (Q3BDG).

13 Léčiva ALS v preklinické fázi testování

13.1 Natotechnologie v léčbě ALS

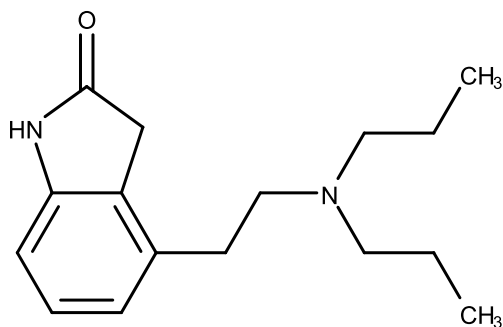
Nízká prostupnost léčiv přes HEB je velký problém, kterému čelí testované látky v klinických studiích. Tohoto problému bychom se mohli zbavit pomocí nanotechnologie. V nynější době jsou pouze tři pokusy vyvinout terapii kombinující léčivo s nanotechnologií proti nemoci ALS. Všechny tyto pokusy však nemají zatím žádné klíčové závěry pro následující klinické testy. Nanočástice s riluzolem a čistý riluzol byly podávány krysám a následně byly výsledky porovnány. Nanočástice byly schopny difundovat přes HEB a dodat riluzol do mozku ve zvýšeném množství oproti normálnímu riluzolu. Povedlo se to díky lipofilním vlastnostem nanočástic. Dalším velmi důležitým poznatkem z této studie byla koncentrace léčiva v krevním

řečišti. Ta byla při podání nanočástic s riluzolem nižší než u obyčejného riluzolu. Díky tomu byly sníženy některé vedlejší účinky tohoto léčiva. Odlišné studie, které zahrnovaly jiné látky než riluzol, ukázaly, že terapie založená na nanočásticových nosičích zvyšuje šance na dosažení pozitivních výsledků [78].

13.2 Léčba ALS pomocí iPSC metody

Zajímavou metodu, která může být využita také v léčbě ALS, vytvořil Shinya Yamanaka v roce 2006, za kterou v roce 2012 získal Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Objevil způsob, jak přeprogramovat specializované buňky a přeměnit je na buňky kmenové (iPSC, angl. Induced Pluripotent Stem Cells). Yamanaka dodal čtyři geny kožním myším buňkám. Buňky ihned začaly proces reprogramace a během 2-3 týdnů se přeměnily v IPS buňky. Díky tomuto objevu můžeme přeměnit jakoukoliv dělicí buňku v těle na buňku kmenovou [79].

Zástupci léčiv, které se využívají spolu s touto metodou, jsou například ropinirol, retigabin a bosutinib. Ty mají sloužit jako léčiva proti ALS. Ropinirol (Obrázek 13.1.) pracuje jako agonista dopaminového receptoru. Potlačuje oxidační stres a zlepšuje mitochondriální funkce. Ropinirol má oxindolový skelet, který je bioizoster fenolu (známý antioxidant). I přesto, že nemá vysokou antioxidační aktivitu, v porovnání s jinými antioxidanty, bylo hlášeno, že zachycuje reaktivní formy kyslíku. Také ve své struktuře, za fyziologických podmínek pH, nese lipofilní kationt, který mu zajistí snadný vstup přes buněčnou membránu [80].



Obrázek 13.1. Vzorec ropinolu, $M_R = 260,381$ g/mol; $\log P = 3,06$; $HBD = 1$; $HBA = 3$.

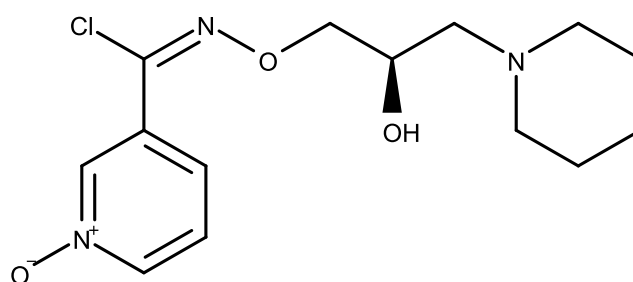
14 Aktuální léčiva ALS ve fázi klinického testování

Ročně je podáváno mnoho návrhů léčiv na ALS, ale ne všechny se dostanou do fáze testování na lidech. Volba dávky se provádí v první fázi vývoje, ve druhé fázi se testuje bezpečnost léčiva, avšak až ve třetí fázi se testuje účinnost léčiva. Z tohoto důvodu nejvíce léčiv selhává ve třetí fázi klinického testování, a to díky předchozí nedostatečné definici markerů dávky a farmakodynamiky ve studiích *in vitro* [81]. Vědci také zpochybňují přesnost použití modelu transgenních myší s mutovanou SOD1 k extrapolaci dat pro lidskou sporadickou ALS, protože mají omezené zkušenosti se studii ALS. Dodnes není totiž jisté, zda jsou lidské ALS a ALS v myších modelech navzájem skutečně odpovídající [82].

Hlavní překážkou ve vývoji léčiv pro ALS zaměřených na CNS je přenos léčivé látky přes HEB. Ta brání průchodu xenobiotických molekul do mozku, a tím ztěžuje průnik těchto léčiv do cílových míst. HEB je relativně nepropustná pro řadu větších molekul jako jsou proteiny, malé peptidy či aminokyseliny [83]. Malé lipofilní látky jsou schopny přes tuto membránu procházet z krevních kapilár pomocí pasivní difuze, na rozdíl od nabitých molekul, které potřebují pomoc ve formě iontových kanálů [84]. Při novém testování léčiva je očekáváno, že spolu s problémy v klinických studiích bude i problém s nedostatečnou účinností těchto látek. Z důvodu přechodu xenobiotické látky přes HEB je biologická dostupnost většiny těchto látek velmi nízká. Dalším problémem je žaludeční absorpce, která je snížena u některých látek. Zvýšením dávky se snaží překonat toto snížení je častokrát kontraproduktivní [85]. Bylo zjištěno, že HEB u pacientů s ALS obsahuje změny [86]. Tato změna je evidentní u degenerace endotelových buněk. Většina mechanismů podávání léčiv se opírá o neporušenou HEB, což představuje velmi velkou komplikaci pro objevování léku ALS. Pro další vývoj léku pro ALS je proto velmi důležité brát v potaz její poškození.

Arimoclomol je malý ligand, který moduluje protein teplotního šoku a aktivuje molekulární chaperony opravující agregované proteiny. Nachází se ve fázi testování na myších a několika lidských buňkách. Klinicky je dobře snášen a snadno prochází HEB. Výsledky studie naznačují, že léčba arimoclomolem je velmi slibná. U myší SOD1 brání denervaci a udržují hladinu aktivity enzymů spojenou

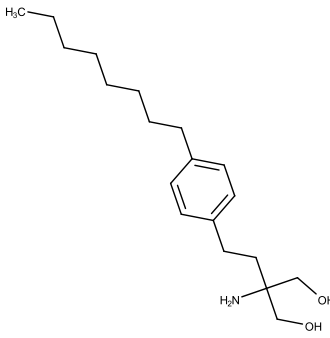
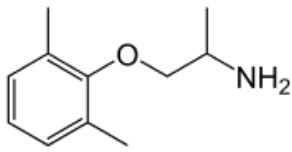
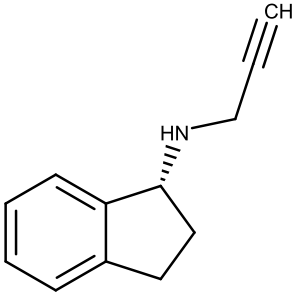
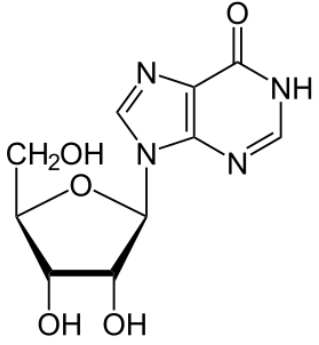
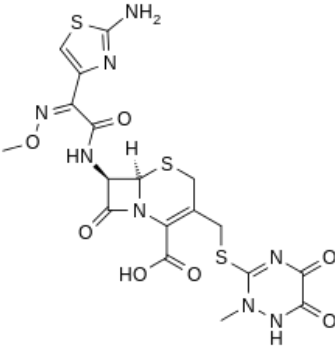
s neuromuskulárním přenosem. Arimoclomol rovněž funguje vícečetným mechanismem, který zahrnuje regulaci exprese proteinu tepelného šoku, a to nejprve na periférii svalů, a následně i v gliích a motorických neuronech. Výsledky studií naznačují, že by arimoclomol mohl být účinným léčivem pro boj nejen proti ALS, ale i dalších neuromuskulárních a periferních nervových poruch. [87, 88]

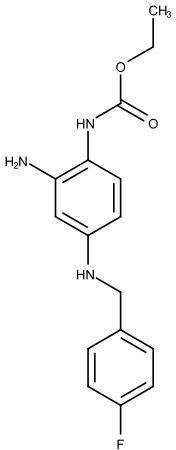


Obrázek 14.1. Vzorec arimoclomolu, $M_r = 313,78 \text{ g/mol}$; $\log P = 0,31$; $HBD = 1$; $HBA = 5$.

Ve fázi klinického testování je i několik dalších léčiv, které jsou zaznamenány v následující tabulce (Tabulka 14.1):

Lék	Vzorec	Fáze	Závěr
Reldesemtiv		II. fáze	dobře snášen subjekty, nutné další studie, které plně vyhodnotí účinek a přínos reldesemtivu u pacientů s ALS, III. fáze vývoje v plánu [89]
Ozanezumab	monoklonální protilátka – vzorec není znám	II. fáze	nebyla zaznamenána účinnost oproti <i>placebu</i> , zavrhnuto další testování pro pacienty s ALS [90]

Gilenya		II. fáze	léčba byla u pacientů s ALS dobře tolerována [91]
Mexiletin		IV. fáze	účinně snižoval frekvence a závažnost svalových křečí, potenciální lék pro terapii v první fázi nemoci [92]
Rasagiline		II. fáze	byl dobře snášen, ale nebyli schopni splnit 30%-ní zlepšení rychlosti funkčního poklesu [93]
Inosin		II. fáze	poměrně bezpečný, účinný při zvyšování hladiny urátu v séru, vysoké hladiny urátu korelují s délkou přežití pacientů, postupuje do III. fáze [94]
Ceftriaxone		III. fáze	v době této studie nebyly poskytnuty žádné farmakodynamické markery, proto nebylo možné určit, zda léčivo aktivovalo svůj cíl [95]

Ezogabine		II. fáze	došlo ke snížení excitability motorických neuronů, potřeba provést další studie, aby se zjistilo, zda může delší léčba udržet účinky na excitabilitu a pomalou progresi onemocnění [96]
-----------	---	----------	---

Tabulka 14.1 Aktuální léčiva ve fázi výzkumu.

15 Diskuse

Výzkum nového léčiva je proces, který je velmi zdoluhavý a finančně velice náročný. Řádově činí tyto částky několik miliónů korun a výsledek nalezení léčiva i přes všechny testy nemusí být kladný. Velmi zásadním krokem v této fázi léčiva je modulování nevýhodných farmakologických vlastností, např. pomocí bioizosterie. Častokrát tuto fázi provází tápání a vyhledávání, co nejlepších vlastností molekuly. Většina farmaceutických firem využívá metody *in silico*, které jsou v poslední době velice oblíbené, avšak nemohou zdaleka nahradit metody *in vitro* a už vůbec ne *in vivo*. Metody *in silico*, i přes fakt, že se provádí pomocí superpočítače, jsou velmi časově, výpočetně a teoreticky náročné. Často se nejprve provádí výzkum pomocí superpočítače a následně se výsledky ověří i na zvířecím modelu. Při získání pozitivních výsledku v této části testování se následně provádí na dobrovolnících. Existuje spousta symptomatických léčiv. V tuto chvíli se na nemoc ALS využívají pouze dvě léčiva, a to riluzol a edavaron. I přes veškerou snahu vědců nezabraňují nemoci ALS propuknout, dokáží však prodloužit pacientovi život o několik měsíců [52].

Velkou částí při vývoji léčiv se stává nalezení biologického cíle. V této bakalářské práci jsem se zaměřila na vývoj léčiv pro ALS zaměřených na biologický cíl superoxidodismutasu 1. Přestože o této nemoci bylo zjištěno již mnoho informací, stále není jasná její etiologie a léčba. Existují dvě teorie vzniku. První popisuje vznik nemoci ve svalech nedostatkem neurotrofního hormonu a jeho neschopnost se uvolňovat z postsynaptických buněk. Tato teorie je opřena i o fakt, že degeneraci motoneuronů předchází synaptické poškození. Druhá teorie je poněkud odlišná. Pojednává o předpokladu, že nemoc vzniká postupně od mutace genu až po agregace SOD1. Při studii SOD1 na myším modelu, byl objeven fakt, že při totální absenci funkce SOD1 se nemoc ALS nevyvíjí, avšak při mutaci tohoto genu a vzniku mutantní SOD1 začaly myši vykazovat, i přes normální úroveň katalytické aktivity SOD1, nemoc ALS. Díky tomuto objevu je snížení funkce SOD1 a omezení její agregace slibným terapeutickým cílem.

Vědci jsou i navzdory všem těmto testům skeptičtí ohledně podobnosti role myši a lidské SOD1 [82]. I přes tyto starosti se zaměřují při hledání léčiva ALS na enzym

SOD1 a zamezení její agregace pomocí tzv. antiagregátorů [75]. Zde se, ale rozcházejí názory na nebezpečnost agregace SOD1 na oligomery. Druhý názor tvrdí, že neuroprotektivní SOD1 se nachází v těle pouze ve formě homodimeru a pokud se z tohoto homodimeru stane monomer, může získat excitotoxický účinek [97]. Čím dál častěji se ve výzkumu léčiv využívají inovativní přístupy. Moderní počítačové technologie přinesly pokrok ve virtuálním screeningu, který využíváme na předvýběr látek při hledání vhodného hitu. Poměrně novým poznatkem je využívání nanotechnologie. Jde například o terapii riluzolem, který je navázaný na nanočástice. Ty mu pomáhají překonat přenos přes HEB [78].

Dle mého názoru by se při dalším zkoumání mohla najít látka, která by byla účinná proti ALS pomoci. V posledních letech byl výzkum této nemoci posílen a stále je ve výzkumu mnoho látek, které by se mohly stát slibným léčivem. I přes tyto snahy stále nebylo léčivo proti ALS nalezeno.

Závěr

Amyotrofická laterální skleróza je poměrně vzácné neurodegenerativní onemocnění, ale mnozí neurologové, hospicovní pečující a příbuzní pacientů touto nemocí trpící se shodují, že se jedná o jednu z nejhrošších diagnóz. Rozlišujeme dvě základní formy ALS, a to sporadickou a familiární. Při mém studiu této nemoci jsem se zaměřila na zmutovaný enzym SOD1, který se přepisuje z chromozomu 21. SOD1 je klasifikován jako oxidoreduktasa a v těle se vyskytuje nejčastěji ve formě dimeru, který v sobě nese navázané molekuly Cu^{2+} a Zn^{2+} . Je považován za nejsilnější antioxidant v lidském těle. Jeho mutací pravděpodobně dochází ke vzniku nemoci ALS, proto jeho inhibice by pravděpodobně pomohla k ovládnutí této nemoci. Avšak prozatím neexistuje žádné kauzální léčivo na léčbu ALS. Využívají se pouze symptomatická léčiva. V této chvíli je ve vývoji a výzkumu několik kandidátních struktur, které by se potencionálně mohly stát léčivy proti této nemoci.

Po důkladném tříletém studiu této problematiky jak v české, tak i anglické literatuře, jsem dospěla k názoru, že nemoc ALS bude pravděpodobně nemoc několika faktorů a mutací. Navzdory obrovskému množství informací o této nemoci, stále není nalezení léku v dohledné době očekávatelné, avšak jsme o krůček blíže k nalezení léčiva pro tuto devastující neurodegenerativní nemoc.

Citovaná literatura

- [1] SOUČKOVÁ, Lenka, Hana KOSTKOVÁ a Regina DEMLOVÁ. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékárenství* [online]. 2015, (11). ISSN 1803-5329. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/04/07.pdf>
- [2] NENCKA, Radim. *Základní principy výzkumu nových léčiv*. 2015. ISBN 978-80-244-4538-0.
- [3] KUCHAR, Miroslav a VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. *Výzkum a vývoj léčiv: studijní program: syntéza a výroba léčiv*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-677-7.
- [4] DICKSON, Michael a Jean Paul GAGNON. The Cost of New Drug Discovery and Development. *Discovery Medicine*. 2009, 4(22), 172–179.
- [5] MELÍKOVÁ, Michaela. *Molekulárně dynamické simulace receptorů spřažených s G proteinem v počítačovém návrhu léčiv*. Hradec Králové, 2018. Univerzita Hradec Králové.
- [6] STONE, Edward. XXXII. An account of the success of the bark of the willow in the cure of agues. In a letter to the Right Honourable George Earl of Macclesfield, President of R. S. from the Rev. Mr. Edward Stone, of Chipping-Norton in Oxfordshire. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* [online]. 1763, 53, 195–200. Dostupné z: doi:10.1098/rstl.1763.0033
- [7] DUIN, Nancy. *Historie medicíny od pravěku do roku 2020 /*. 1. vyd. B.m.: Slovart, 1997. ISBN 978-80-85871-04-3.
- [8] *riluzole-zentiva-epar-product-information_cs.pdf* [online]. [vid. 2019-12-15]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/riluzole-zentiva-epar-product-information_cs.pdf
- [9] *entacapone-orion-epar-product-information_cs.pdf* [online]. [vid. 2020-02-22]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/levodopa/carbidopa/entacapone-orion-epar-product-information_cs.pdf
- [10] *exelon-epar-product-information_cs.pdf* [online]. [vid. 2020-02-22]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/exelon-epar-product-information_cs.pdf
- [11] *ebixa-epar-product-information_cs.pdf* [online]. [vid. 2020-02-22]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ebixa-epar-product-information_cs.pdf
- [12] VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemie*. Přel. Arnošt KOTYK. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 978-80-85605-44-0.

- [13] DIXON, Scott J a Brent R STOCKWELL. Identifying druggable disease-modifying gene products. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2009, **13**(5–6), 549–555. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2009.08.003
- [14] YILDIRIM, Muhammed A, Kwang-Il GOH, Michael E CUSICK, Albert-László BARABÁSI a Marc VIDAL. Drug—target network. *Nature Biotechnology* [online]. 2007, **25**(10), 1119–1126. ISSN 1087-0156, 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1338
- [15] DR. PRASHANT SHUKLA. G- Protein Coupled Receptors. In: [online]. B.m. 12:40:29 UTC [vid. 2021-05-05]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/prashantshukla927/gpcr-58146894>
- [16] *Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective | Journal of Medicinal Chemistry* [online]. [vid. 2021-04-30]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm3011433>
- [17] DALEMANS, W., P. BARBRY, G. CHAMPIGNY, S. JALLAT, K. DOTT, D. DREYER, R. G. CRYSTAL, A. PAVIRANI, J. P. LECOCQ a M. LAZDUNSKI. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* [online]. 1991, **354**(6354), 526–528. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/354526a0
- [18] HEE CHOI, Young a Ai-Ming YU. *ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development* [online]. 2014 [vid. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2014/00000020/00000005/art00009>
- [19] DIMASI, Joseph A., Henry G. GRABOWSKI a Ronald W. HANSEN. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics* [online]. 2016, **47**, 20–33. ISSN 1879-1646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhealeco.2016.01.012
- [20] INGLESE, James a Douglas S. AULD. High Throughput Screening (HTS) Techniques: Applications in Chemical Biology. In: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* [online]. B.m.: American Cancer Society, 2008 [vid. 2020-05-28], s. 1–15. ISBN 978-0-470-04867-2. Dostupné z: doi:10.1002/9780470048672.wecb223
- [21] NEWMAN, David J. a Gordon M. CRAGG. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* [online]. 2012, **75**(3), 311–335. ISSN 0163-3864. Dostupné z: doi:10.1021/np200906s
- [22] SVOBODNÍK, Adam, Regina DEMLOVÁ a Ladislav PECEN. *ADAM SVOBODNÍK, REGINA DEMLOVÁ, LADISLAV PECEN AT AL. Klinické studie v praxi (Clinical trials in practice)* ISBN 978-80-904731-8-8, *Facta Medica*, 2014, Brno, Czech republic. 2014. ISBN 978-80-904731-8-8.

- [23] SUN, Hongmao. Pharmacophore-Based Virtual Screening. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2008, **15**(10), 1018–1024. Dostupné z: doi:10.2174/092986708784049630
- [24] DEBNATH, A. K. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) paradigm-Hansch era to new millennium. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2001, **1**(2), 187–195. ISSN 1389-5575. Dostupné z: doi:10.2174/1389557013407061
- [25] CHERKASOV, Artem, Eugene N. MURATOV, Denis FOURCHES, Alexandre VARNEK, Igor I. BASKIN, Mark CRONIN, John DEARDEN, Paola GRAMATICA, Yvonne C. MARTIN, Roberto TODESCHINI, Viviana CONSONNI, Victor E. KUZ'MIN, Richard CRAMER, Romualdo BENIGNI, Chihae YANG, James RATHMAN, Lothar TERFLOTH, Johann GASTEIGER, Ann RICHARD a Alexander TROPSHA. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2014, **57**(12), 4977–5010. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm4004285
- [26] TICHÝ, Miloň. *Predikční toxikologie, SZÚ* [online]. [vid. 2021-03-16]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/predikcni-toxikologie>
- [27] BANCHI, Leonardo, Mark FINGERHUTH, Tomas BABEJ, Christopher ING a Juan Miguel ARRAZOLA. Molecular docking with Gaussian Boson Sampling. *Science Advances* [online]. 2020, **6**(23), eaax1950. ISSN 2375-2548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.aax1950
- [28] POLANSKI, Jaroslaw. Receptor dependent multidimensional QSAR for modeling drug-receptor interactions. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2009, **16**(25), 3243–3257. ISSN 1875-533X. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788803286
- [29] ALAMRI, Mubarak A. a Mohammed A. ALAMRI. Pharmacophore and docking-based sequential virtual screening for the identification of novel Sigma 1 receptor ligands. *Bioinformation* [online]. 2019, **15**(8), 586–595. ISSN 0973-2063. Dostupné z: doi:10.6026/97320630015586
- [30] LIPINSKI, Christopher A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. 2004, **1**(4), 337–341. ISSN 1740-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007
- [31] ZHANG, Ming-Qiang a Barrie WILKINSON. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2007, **18**(6), Chemical biotechnology / Pharmaceutical biotechnology, 478–488. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2007.10.005
- [32] *THE ALTERNATION RULE: AN OLD HEURISTIC PRINCIPLE OR A NEW CONSERVATION LAW* [online]. [vid. 2021-03-13]. Dostupné z: <http://www.chem.msu.ru/eng/misc/babaev/match/rcj/index.htm>
- [33] QUASAR, Jarosz. *Neuron* [online]. 11. srpen 2009 [vid. 2020-05-07]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron_Hand-tuned.svg

- [34] MAĎA, Patrik a Josef FONTANA. *Synaptický přenos* [online]. [vid. 2020-10-02]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/4-synapticky-prenos/>
- [35] AMBLER, Zdeněk. AMYOTROFICKÁ LATERÁLNÍ SKLERÓZA. *Neurologie pro praxi*. 2006, (1), 9–12.
- [36] BENTO-ABREU, André, Philip VAN DAMME, Ludo VAN DEN BOSCH a Wim ROBBERECHT. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *The European Journal of Neuroscience* [online]. 2010, **31**(12), 2247–2265. ISSN 1460-9568. Dostupné z: doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07260.x
- [37] TRAYNOR, B. J., M. B. CODD, B. CORR, C. FORDE, E. FROST a O. HARDIMAN. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Archives of Neurology* [online]. 2000, **57**(1), 109–113. ISSN 0003-9942. Dostupné z: doi:10.1001/archneur.57.1.109
- [38] GOETZ, Christopher G. *Textbook of Clinical Neurology*. B.m.: Elsevier Health Sciences, 2007. ISBN 978-1-4160-3618-0.
- [39] KIERNAN, Matthew C., Steve VUCIC, Benjamin C. CHEAH, Martin R. TURNER, Andrew EISEN, Orla HARDIMAN, James R. BURRELL a Margaret C. ZOING. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet (London, England)* [online]. 2011, **377**(9769), 942–955. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7
- [40] BROOKS, B. R. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial „Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis“ workshop contributors. *Journal of the Neurological Sciences* [online]. 1994, **124 Suppl**, 96–107. ISSN 0022-510X. Dostupné z: doi:10.1016/0022-510x(94)90191-0
- [41] ŠTĚTKÁŘOVÁ, Ivana a Edvard EHLER. Diagnostics of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Up to Date. *Diagnostics* [online]. 2021, **11**(2), 231. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics11020231
- [42] Electromyography (EMG): Procedure, Purpose, Results, Cost, Price, Online booking. *myUpchar* [online]. [vid. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.myupchar.com/en/test/emg-electromyography>
- [43] *Electromyography (EMG) | One Call* [online]. [vid. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://onecallcm.com/resources/injured-worker-resources/electromyography-emg/>
- [44] COSTA, João, Michael SWASH a Mamede DE CARVALHO. Awaji Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review. *Archives of Neurology* [online]. 2012, **69**(11), 1410. ISSN 0003-9942. Dostupné z: doi:10.1001/archneurol.2012.254

- [45] IBRAHIM, Dalia. Amyotrophic lateral sclerosis | Radiology Case | Radiopaedia.org. *Radiopaedia* [online]. [vid. 2021-02-26]. Dostupné z: <https://radiopaedia.org/cases/amyotrophic-lateral-sclerosis>
- [46] GAILLARD, Frank. Normal brain (MRI) | Radiology Case | Radiopaedia.org. *Radiopaedia* [online]. [vid. 2021-02-26]. Dostupné z: <https://radiopaedia.org/cases/normal-brain-mri-6?lang=us>
- [47] ŠTĚTKÁŘOVÁ, Ivana a Edvard EHLER. Diagnostics of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Up to Date. *Diagnostics* [online]. 2021, **11**(2), 231. Dostupné z: [doi:10.3390/diagnostics11020231](https://doi.org/10.3390/diagnostics11020231)
- [48] TASCA, Elisabetta, Valentina PEGORARO, Antonio MERICO a Corrado ANGELINI. Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy in ALS. *Clinical Neuropathology* [online]. 2016, **35**(1), 22–30. ISSN 0722-5091. Dostupné z: [doi:10.5414/NP300889](https://doi.org/10.5414/NP300889)
- [49] HWANG, D. H., H. J. LEE, I. H. PARK, J. I. SEOK, B. G. KIM, I. S. JOO a S. U. KIM. Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice. *Gene Therapy* [online]. 2009, **16**(10), 1234–1244. ISSN 1476-5462. Dostupné z: [doi:10.1038/gt.2009.80](https://doi.org/10.1038/gt.2009.80)
- [50] VERCELLI, A., O. M. MEREUTA, D. GARBOSSA, G. MURACA, K. MARESCHI, D. RUSTICHELLI, I. FERRERO, L. MAZZINI, E. MADON a F. FAGIOLI. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* [online]. 2008, **31**(3), 395–405. ISSN 1095-953X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.nbd.2008.05.016](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.016)
- [51] LEPORE, Angelo C., Britta RAUCK, Christine DEJEA, Andrea C. PARDO, Mahendra S. RAO, Jeffrey D. ROTHSTEIN a Nicholas J. MARAGAKIS. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nature Neuroscience* [online]. 2008, **11**(11), 1294–1301. ISSN 1546-1726. Dostupné z: [doi:10.1038/nn.2210](https://doi.org/10.1038/nn.2210)
- [52] AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS/RILUZOLE STUDY GROUP II, L LACOMBLEZ, G BENSIMON, V MEININGER, P. N LEIGH a P GUILLET. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* [online]. 1996, **347**(9013), 1425–1431. ISSN 0140-6736. Dostupné z: [doi:10.1016/S0140-6736\(96\)91680-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)91680-3)
- [53] DOBLE, A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* [online]. 1996, **47**(6 Suppl 4), 233S-241S. ISSN 0028-3878, 1526-632X. Dostupné z: [doi:10.1212/WNL.47.6_Suppl_4.233S](https://doi.org/10.1212/WNL.47.6_Suppl_4.233S)
- [54] WRITING GROUP a EDARAVONE (MCI-186) ALS 19 STUDY GROUP. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* [online]. 2017, **16**(7), 505–512. ISSN 1474-4465. Dostupné z: [doi:10.1016/S1474-4422\(17\)30115-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30115-1)

- [55] Edaravone Uses, Side Effects & Warnings. *Drugs.com* [online]. [vid. 2020-03-09]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/mtm/edaravone.html>
- [56] *Neuroprotective effect of ultra-high dose methylcobalamin in wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.* - *PubMed - NCBI* [online]. [vid. 2020-03-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25982504>
- [57] HOSP, Christine, Markus K. NAUMANN a Henning HAMM. Botulinum Toxin Treatment of Autonomic Disorders: Focal Hyperhidrosis and Sialorrhea. *Seminars in Neurology* [online]. 2016, **36**(1), 20–28. ISSN 1098-9021. Dostupné z: doi:10.1055/s-0035-1571214
- [58] NG, Louisa, Fary KHAN, Carolyn A. YOUNG a Mary GALEA. Symptomatic treatments for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. 2017, **1**, CD011776. ISSN 1469-493X. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD011776.pub2
- [59] HEMERKOVÁ, Pavlína a Martin VALIŠ. Copper homeostasis as a therapeutic goal in amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in superoxide dismutase 1 and CuATSM molecule. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2020, **83/116**(1), 21–27. ISSN 12107859, 18024041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn202021
- [60] BERNARD, Emilien, Antoine PEGAT, Juliette SVAHN, Françoise BOUHOIR, Pascal LEBLANC, Stéphanie MILLECAMPS, Stéphane THOBOIS, Claire GUISSART, Serge LUMBROSO a Kevin MOUZAT. Clinical and Molecular Landscape of ALS Patients with SOD1 Mutations: Novel Pathogenic Variants and Novel Phenotypes. A Single ALS Center Study. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(18). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21186807
- [61] ZELKO, Igor N, Thomas J MARIANI a Rodney J FOLZ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2002, **33**(3), 337–349. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X
- [62] GREENWOOD, Norman Neill a A EARNSHAW. *Chemie prvků. Sv. 1.* Praha: Informatorium, 1993. ISBN 978-80-85427-38-7.
- [63] MULLER, Florian L., Michael S. LUSTGARTEN, Youngmok JANG, Arlan RICHARDSON a Holly VAN REMMEN. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine* [online]. 2007, **43**(4), 477–503. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034
- [64] VALENTINE, Joan Selverstone, Peter A. DOUCETTE a Soshanna ZITTIN POTTER. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2005, **74**, 563–593. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647

- [65] ALLISON, W. Ted, Michèle G. DUVAL, Kim NGUYEN-PHUOC a Patricia L. A. LEIGHTON. Reduced Abundance and Subverted Functions of Proteins in Prion-Like Diseases: Gained Functions Fascinate but Lost Functions Affect Aetiology. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(10). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18102223
- [66] CUDKOWICZ, M. E., D. MCKENNA-YASEK, P. E. SAPP, W. CHIN, B. GELLER, D. L. HAYDEN, D. A. SCHOENFELD, B. A. HOSLER, H. R. HORVITZ a R. H. BROWN. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* [online]. 1997, **41**(2), 210–221. ISSN 0364-5134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.410410212
- [67] BROOM, W. J., D. V. JOHNSON, K. E. AUWARTER, A. J. IAFRATE, C. RUSS, A. AL-CHALABI, P. C. SAPP, D. MCKENNA-YASEK, P. M. ANDERSEN a R. H. BROWN. SOD1A4V-mediated ALS: absence of a closely linked modifier gene and origination in Asia. *Neuroscience Letters* [online]. 2008, **430**(3), 241–245. ISSN 0304-3940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2007.11.004
- [68] ZOU, Zhang-Yu, Ming-Sheng LIU, Xiao-Guang LI a Li-Ying CUI. H46R SOD1 mutation is consistently associated with a relatively benign form of amyotrophic lateral sclerosis with slow progression. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration* [online]. 2016, **17**(7–8), 610–613. ISSN 2167-9223. Dostupné z: doi:10.1080/21678421.2016.1199698
- [69] MULLER, Florian L., Yuhong LIU, Amanda JERNIGAN, David BORCHELT, Arlan RICHARDSON a Holly VAN REMMEN. MnSOD deficiency has a differential effect on disease progression in two different ALS mutant mouse models. *Muscle & Nerve* [online]. 2008, **38**(3), 1173–1183. ISSN 0148-639X. Dostupné z: doi:10.1002/mus.21049
- [70] SMITH, Richard A., Timothy M. MILLER, Koji YAMANAKA, Brett P. MONIA, Thomas P. CONDON, Gene HUNG, Christian S. LOBSIGER, Chris M. WARD, Melissa MCALONIS-DOWNES, Hongbing WEI, Ed V. WANCEWICZ, C. Frank BENNETT a Don W. CLEVELAND. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2006, **116**(8), 2290–2296. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI25424
- [71] MILLER, Timothy M., Alan PESTRONK, William DAVID, Jeffrey ROTHSTEIN, Ericka SIMPSON, Stanley H. APPEL, Patricia L. ANDRES, Katy MAHONEY, Peggy ALLRED, Katie ALEXANDER, Lyle W. OSTROW, David SCHOENFELD, Eric A. MACKLIN, Daniel A. NORRIS, Georgios MANOUSAKIS, Matthew CRISP, Richard SMITH, C. Frank BENNETT, Kathie M. BISHOP a Merit E. CUDKOWICZ. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet. Neurology* [online]. 2013, **12**(5), 435–442. ISSN 1474-4465. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(13)70061-9
- [72] CHEN, Liyu, Clare WATSON, Marco MORSCH, Nicholas J. COLE, Roger S. CHUNG, Darren N. SAUNDERS, Justin J. YERBURY a Kara L. VINE. Improving the Delivery of SOD1 Antisense Oligonucleotides to Motor Neurons Using Calcium

- Phosphate-Lipid Nanoparticles. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2017, **11**, 476. ISSN 1662-4548. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2017.00476
- [73] Antisense Drugs. *Pharma Mirror Magazine* [online]. 16. leden 2014 [vid. 2020-10-02]. Dostupné z: <https://www.pharmamirror.com/knowledge-base/pharmaceutical-dictionary/antisense-drugs-definition-technology-mechanism/>
- [74] AARTS, Michelle, Yitao LIU, Lidong LIU, Shintaro BESSHOH, Mark ARUNDINE, James W. GURD, Yu-Tian WANG, Michael W. SALTER a Michael TYMIANSKI. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2002, **298**(5594), 846–850. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1072873
- [75] RAY, S. S., R. J. NOWAK, R. H. BROWN a P. T. LANSBURY. Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2005, **102**(10), 3639–3644. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0408277102
- [76] NOWAK, Richard J., Gregory D. CUNY, Sungwoon CHOI, Peter T. LANSBURY a Soumya S. RAY. Improving Binding Specificity of Pharmacological Chaperones That Target Mutant Superoxide Dismutase-1 Linked to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Using Computational Methods. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **53**(7), 2709–2718. ISSN 0022-2623, 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm901062p
- [77] IP, Philbert, Priya Roy SHARDA, Anna CUNNINGHAM, Sumon CHAKRABARTTY, Vijay PANDE a Avijit CHAKRABARTTY. Quercitrin and quercetin 3- β -d-glucoside as chemical chaperones for the A4V SOD1 ALS-causing mutant. *Protein Engineering, Design and Selection* [online]. 2017, **30**(6), 431–440. ISSN 1741-0126. Dostupné z: doi:10.1093/protein/gzx025
- [78] BONDÌ, Maria Luisa, Emanuela Fabiola CRAPARO, Gaetano GIAMMONA a Filippo DRAGO. Brain-targeted solid lipid nanoparticles containing riluzole: preparation, characterization and biodistribution. *Nanomedicine (London, England)* [online]. 2010, **5**(1), 25–32. ISSN 1748-6963. Dostupné z: doi:10.2217/nnm.09.67
- [79] YAMANAKA, Shinya. A Fresh Look at iPS Cells. *Cell* [online]. 2009, **137**(1), 13–17. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.03.034
- [80] OKANO, Hideyuki, Daisuke YASUDA, Koki FUJIMORI, Satoru MORIMOTO a Shinichi TAKAHASHI. Ropinirole, a New ALS Drug Candidate Developed Using iPSCs. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2020, **41**(2), 99–109. ISSN 0165-6147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2019.12.002
- [81] LEVY, G., P. KAUFMANN, R. BUCHSBAUM, J. MONTES, A. BARSDORF, R. ARBING, V. BATTISTA, X. ZHOU, H. MITSUMOTO, B. LEVIN a J. L. P. THOMPSON. A two-stage design for a phase II clinical trial of coenzyme Q10 in ALS. *Neurology*

- [online]. 2006, **66**(5), 660–663. ISSN 1526-632X. Dostupné z: doi:10.1212/01.wnl.0000201182.60750.66
- [82] SUZUKI, Masatoshi a Clive N. SVENDSEN. Combining growth factor and stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Trends in Neurosciences* [online]. 2008, **31**(4), 192–198. ISSN 0166-2236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2008.01.006
- [83] GABATHULER, Reinhard. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease* [online]. 2010, **37**(1), 48–57. ISSN 1095-953X. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2009.07.028
- [84] RONEY, Celeste, Padmakar KULKARNI, Veera ARORA, Peter ANTICH, Frederick BONTE, Aimei WU, N. N. MALLIKARJUANA, Sanjeev MANOHAR, Hsiang-Fa LIANG, Anandrao R. KULKARNI, Hsing-Wen SUNG, Malladi SAIRAM a Tejraj M. AMINABHAVI. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. 2005, **108**(2–3), 193–214. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2005.07.024
- [85] RAIS, Rana, Steven FLETCHER a James E. POLLI. Synthesis and in vitro evaluation of gabapentin prodrugs that target the human apical sodium-dependent bile acid transporter (hASBT). *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, **100**(3), 1184–1195. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.22332
- [86] NICAISE, Charles, Dinko MITRECIC, Pieter DEMETTER, Robert DE DECKER, Michèle AUTHELET, Alain BOOM a Roland POCHE. Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain Research* [online]. 2009, **1301**, 152–162. ISSN 1872-6240. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2009.09.018
- [87] AHMED, Mhoriam, Charlotte SPICER, Jasmine HARLEY, Nikolaj PETERSEN, Paul TAYLOR, Thomas JENSEN, Michael HANNA, Rickie PATANI a Linda GREENSMITH. *Amplifying the heat shock response ameliorates pathology in mouse and human models of ALS and FTD*. [online]. preprint. B.m.: In Review. 2021 [vid. 2021-05-02]. Dostupné z: doi:10.21203/rs.3.rs-152813/v1
- [88] KALMAR, B, E EDET-AMANA a L GREENSMITH. Treatment with a coinducer of the heat shock response delays muscle denervation in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* [online]. 2012, **13**(4) [vid. 2021-05-02]. ISSN 1471-180X. Dostupné z: doi:10.3109/17482968.2012.660953
- [89] SHEFNER, Jeremy M., Jinsy A. ANDREWS, Angela GENGE, Carlyne JACKSON, Noah LECHTZIN, Timothy M. MILLER, Bettina M. COCKROFT, Lisa MENG, Jenny WEI, Andrew A. WOLFF, Fady I. MALIK, Cynthia BODKIN, Benjamin R. BROOKS, James CARESS, Annie DIONNE, Dominic FEE, Stephen A. GOUTMAN, Namita A.

GOYAL, Orla HARDIMAN, Ghazala HAYAT, Terry HEIMAN-PATTERSON, Daragh HEITZMAN, Robert D. HENDERSON, Wendy JOHNSTON, Chafic KARAM, Matthew C. KIERNAN, Stephen J. KOLB, Lawrence KORNGUT, Shafeeq LADHA, Genevieve MATTE, Jesus S. MORA, Merrilee NEEDHAM, Bjorn OSKARSSON, Gary L. PATTEE, Erik P. PIORO, Michael PULLEY, Dianna QUAN, Kourosh REZANIA, Kerri L. SCHELLENBERG, David SCHULTZ, Christen SHOESMITH, Zachary SIMMONS, Jeffrey STATLAND, Shumaila SULTAN, Andrea SWENSON, Leonard H. Van Den BERG, Tuan VU, Steve VUCIC, Michael WEISS, Ashley WHYTE-RAYSON, James WYMER, Lorne ZINMAN a Stacy A. RUDNICKI. A Phase 2, Double-Blind, Randomized, Dose-Ranging Trial Of Reldesemtiv In Patients With ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration* [online]. 2021, **22**(3-4), 287-299. ISSN 2167-9223. Dostupné z: doi:10.1080/21678421.2020.1822410

- [90] MEININGER, Vincent, Angela GENGE, Leonard H. VAN DEN BERG, Wim ROBBERECHT, Albert LUDOLPH, Adriano CHIO, Seung H. KIM, P. Nigel LEIGH, Matthew C. KIERNAN, Jeremy M. SHEFNER, Claude DESNUELLE, Karen E. MORRISON, Susanne PETRI, Diane BOSWELL, Jane TEMPLE, Rajat MOHINDRA, Matt DAVIES, Jonathan BULLMAN, Paul REES, Arseniy LAVROV, a NOG112264 STUDY GROUP. Safety and efficacy of ozanezumab in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Neurology* [online]. 2017, **16**(3), 208-216. ISSN 1474-4465. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(16)30399-4
- [91] BERRY, James D., Sabrina PAGANONI, Nazem ATASSI, Eric A. MACKLIN, Namita GOYAL, Michael RIVNER, Ericka SIMPSON, Stanley APPEL, Daniela L. GRASSO, Nichte I. MEJIA, Farrah MATEEN, Alan GILL, Fernando VIEIRA, Valerie TASSINARI a Steven PERRIN. Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability. *Muscle & Nerve* [online]. 2017, **56**(6), 1077-1084. ISSN 1097-4598. Dostupné z: doi:10.1002/mus.25733
- [92] WEISS, Michael D., Eric A. MACKLIN, Zachary SIMMONS, Angela S. KNOX, David J. GREENBLATT, Nazem ATASSI, Michael GRAVES, Nicholas PARZIALE, Johnny S. SALAMEH, Colin QUINN, Robert H. BROWN, Jane B. DISTAD, Jaya TRIVEDI, Jeremy M. SHEFNER, Richard J. BAROHN, Alan PESTRONK, Andrea SWENSON a Merit E. CUDKOWICZ. A randomized trial of mexiletine in ALS. *Neurology* [online]. 2016, **86**(16), 1474-1481. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0000000000002507
- [93] STATLAND, Jeffrey M., Dan MOORE, Yunxia WANG, Maureen WALSH, Tahseen MOZAFFAR, Lauren ELMAN, Sharon P. NATIONS, Hiroshi MITSUMOTO, J. Americo FERNANDES, David SAPERSTEIN, Ghazala HAYAT, Laura HERBELIN, Chafic KARAM, Jonathan KATZ, Heather M. WILKINS, Abdulbaki AGBAS, Russell H. SWERDLOW, Regina M. SANTELLA, Mazen M. DIMACHKIE, Richard J. BAROHN, a RASAGILINE INVESTIGATORS OF THE MUSCLE STUDY GROUP AND WESTERN ALS CONSORTIUM. Rasagiline for amyotrophic lateral sclerosis: A randomized, controlled trial. *Muscle & Nerve* [online]. 2019, **59**(2), 201-207. ISSN 1097-4598. Dostupné z: doi:10.1002/mus.26335

- [94] NICHOLSON, Katharine, James CHAN, Eric A. MACKLIN, Mark LEVINE-WEINBERG, Christopher BREEN, Rachit BAKSHI, Daniela L. GRASSO, Anne-Marie WILLS, Samad JAHANDIDEH, Albert A. TAYLOR, Danielle BEAULIEU, David L. ENNIST, Ovidiu ANDRONESI, Eva-Maria RATAI, Michael A. SCHWARZSCHILD, Merit CUDKOWICZ a Sabrina PAGANONI. Pilot trial of inosine to elevate urate levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology* [online]. 2018, **5**(12), 1522–1533. ISSN 2328-9503. Dostupné z: doi:10.1002/acn3.671
- [95] CUDKOWICZ, Merit E., Sarah TITUS, Marianne KEARNEY, Hong YU, Alexander SHERMAN, David SCHOENFELD, Douglas HAYDEN, Amy SHUI, Benjamin BROOKS, Robin CONWIT, Donna FELSENSTEIN, David J. GREENBLATT, Myles KEROACK, John T. KISSEL, Robert MILLER, Jeffrey ROSENFELD, Jeffrey D. ROTHSTEIN, Ericka SIMPSON, Nina TOLKOFF-RUBIN, Lorne ZINMAN, Jeremy M. SHEFNER, a CEFTRIAZONE STUDY INVESTIGATORS. Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Neurology* [online]. 2014, **13**(11), 1083–1091. ISSN 1474-4465. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(14)70222-4
- [96] WAINGER, Brian J., Eric A. MACKLIN, Steve VUCIC, Courtney E. MCILDUFF, Sabrina PAGANONI, Nicholas J. MARAGAKIS, Richard BEDLACK, Namita A. GOYAL, Seward B. RUTKOVE, Dale J. LANGE, Michael H. RIVNER, Stephen A. GOUTMAN, Shafeeq S. LADHA, Elizabeth A. MAURICIO, Robert H. BALOH, Zachary SIMMONS, Lindsay POTHIER, Sylvia Baedorf KASSIS, Thuong LA, Meghan HALL, Armineuza EVORA, David KLEMENTS, Aura HURTADO, Joao D. PEREIRA, Joan KOH, Pablo A. CELNIK, Vinay CHAUDHRY, Karissa GABLE, Vern C. JUEL, Nicolas PHIELIPP, Adel MAREI, Peter ROSENQUIST, Sean MEEHAN, Björn OSKARSSON, Richard A. LEWIS, Divpreet KAUR, Evangelos KISKINIS, Clifford J. WOOLF, Kevin EGGAN, Michael D. WEISS, James D. BERRY, William S. DAVID, Paula DAVILA-PEREZ, Joan A. CAMPRODON, Alvaro PASCUAL-LEONE, Matthew C. KIERNAN, Jeremy M. SHEFNER, Nazem ATASSI a Merit E. CUDKOWICZ. Effect of Ezogabine on Cortical and Spinal Motor Neuron Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA neurology* [online]. 2021, **78**(2), 186–196. ISSN 2168-6157. Dostupné z: doi:10.1001/jamaneurol.2020.4300
- [97] IP, Philbert, Priya Roy SHARDA, Anna CUNNINGHAM, Sumon CHAKRABARTTY, Vijay PANDE a Avijit CHAKRABARTTY. Quercitrin and quercetin 3- β -d-glucoside as chemical chaperones for the A4V SOD1 ALS-causing mutant. *Protein Engineering, Design and Selection* [online]. 2017, **30**(6), 431–440. ISSN 1741-0126, 1741-0134. Dostupné z: doi:10.1093/protein/gzx025

Použité zkratky

ADME – zkratka ve farmakokinetice (adsorpce, distribuce, metabolismus, exkrece)

ALS – amyotrofická laterální skleróza

AMPA – receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny

ASO – antisense oligonukleotid

ATP – adenosintrifosfát

CADD – počítačem podporovaný design (angl. computer-aided drug design)

CMP – cévní mozková příhoda

CSF – cerebrospinální tekutina (angl. cerebrospinal fluid)

EMG – elektromyografie

fALS – familiární ALS

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FUS – RNA vázající protein spojených sarkomů

HBA – akceptory vodíkových vazeb

HBD – donory vodíkových vazeb

IC₅₀ – poloviční maximální inhibiční koncentrace

LMN – dolní motorické nervy (angl. lower motor neurons)

log P – rozdělovací koeficient oktanol/voda

log S – míra rozpustnosti ve vodě

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MRI – magnetická rezonance

NMDA – N-methyl-D-aspartátový receptor

NDA – New Drug Application

NO – neurodegenerativní onemocnění

NS – nervový systém

PLS – primární laterální skleróza

PMS – Postmarketingové sledování léčiva

PSA – progresivní svalová atrofie

QSAR – Modely kvantitativní závislosti aktivity na struktuře (angl. quantitative structure-activity relationships)

RF – retenční faktor

RNA – ribonukleová kyselina

ROS – reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species)

sALS – sporadická ALS

SAR – vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou (angl. structure-activity relationships)

SOD1 – superoxiddismutasa 1

SÚKL – státní úřad pro kontrolu léčiv

TARDBP - transaktivační DNA vázající protein 43

UMN – horní motorické nervy (angl. upper motor neurons)

V_d – distribuční objem

VS – virtuální screening

WFN – Světová neurologická federace