

Chemie a farmacie

Převážná většina současných léků je založena na relativně malých molekulách a souvislost mezi chemií a farmacií je tak velmi těsná. Farmaceutická chemie vyšla historicky z alchymie, a i když slovo alchymie může znít poněkud ironicky, je to pouze vystižení nikdy nekončící snahy o hledání absolutní dokonalosti – léku, který funguje selektivně pouze na specifický patologický stav a nemá žádné vedlejší a nežádoucí účinky. Tento cíl je stejně prchavý jako věčný cíl alchymistů – transmutace méně ušlechtilých kovů ve zlato. Nicméně farmaceutická chemie dosáhla mnoha výrazných úspěchů a prodloužení průměrného věku v zemích s dobrou dostupností léků je toho dokladem.

Během posledních 30 let byly vyvinuty nové skupiny léků na většinu závažných onemocnění, které jsou velmi účinné a relativně i velmi bezpečné. Mnohé z nich znamenaly skutečný převrat v terapii v oblastech, kde ještě nedávno neexistoval opravdu účinný lék. Snad největší byl pokrok u kardiovaskulárních léků, psychofarmak, v onkologii, diabetologii a u protizánětlivých léků.

Snahou farmaceutických firem je najít lék, který by byl vhodný pro široké spektrum pacientů a prodával by se ve velkých kvantech s vysokým profitem. Takový lék se ve farmaceutické hantýrce nazývá „blockbuster“. Roční prodeje největších „blockbusterů“ dosahují mnoha miliard dolarů.

Léky se před uvedením na trh testují v rozsáhlých klinických zkouškách na pečlivě vybrané populaci dobrovolníků nebo pacientů, kteří jsou vybíráni podle předem stanovených selektivních kritérií týkajících se věku, pohlaví a dalších nemocí. Problém je ovšem v tom, že se potom dostanou do široké populace lidí, kteří sice mohou mít stejné symptomy na něž by lék měl působit, ale mohou trpět dalšími chorobami a užívat řadu dalších léků vyvolávajících interakce. U některých pacientů tak dochází k vážným vedlejším účinkům. V nejhrošším případě může lék u subpopulace pacientů vyvolá-

vat tak závažné nežádoucí účinky, že musí být stažen z trhu. To se také periodicky stává, z posledních let lze uvést například cerivastatin nebo rofecoxib. Paradoxně tím trpí většina ostatních pacientů, kteří by lék snášeli dobře.

Ukazuje se, že zejména u velmi specificky působících léků nelze spoléhat na princip „jedna velikost se hodí pro všechny“, ale je nutno terapii individualizovat a přizpůsobovat profilu jednotlivého pacienta. Proto je velmi důležité modifikovat existující léky a hledat jejich bezpečnější varianty, což lze nejlépe dosáhnout chemickými cestami. Do těchto modifikací patří např. optické enantiomery, navazování donorů oxidu dusnatého a další. Patří sem též moderní lékové formy, zejména systémy typu „drug delivery“, které řízeně uvolňují účinnou látku. Každý lékař ocení, když má k dispozici spektrum podobně působících léků s různými vedlejšími účinky a interakcemi. Takové léky se někdy označují jako „me too“ což má s jistým opovržením naznačit jejich nadbytečnost, praxe ale ukazuje že své místo z uvedených důvodů obvykle vždy získají.

V České republice má farmaceutická chemie velmi dobrou a dlouholetou tradici. V laboratořích Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii (VÚFB) a Akademie věd ČR bylo vyvinuto mnoho celosvětově úspěšných léků, jako například Prothiaden, Dithiaden, Trimepranol, až po poslední velmi úspěšná virostatika vyvinutá v ÚOCHB AV ČR, která nyní patří mezi základní léky proti AIDS.

Chemický výzkum je součástí farmaceutického průmyslu a ukazuje se, že integrovaná farmaceutické společnosti má daleko lepší konkurenční pozici ve srovnání s firmou, která chemickou expertizu nemá a je plně závislá na svých dodavatelích. Proto považují farmaceutickou chemii za velmi perspektivní oblast do budoucna.

Václav Rejchle
Zentiva

Vážení čtenáři,

ediční politika redakce Chemických listů se snaží vybírat taková témata, která by byla, ve spojení s chemií, nosná pro monotematická čísla. Již několik let je pravidelně sedmička věnována vztahu chemie, zemědělství a potravinářství a desítka vztahu chemie a životního prostředí. Dva roky po sobě (1999-2000) jsme vydali monotematické číslo zaměřené na chemický průmysl. Vzhledem k problémům nashromáždit potřebný počet rukopisů s průmyslově-chemickou tematikou k určitému termínu jsme přešli na příležitostnou rubriku Chemický průmysl, která lépe vyhovuje čtenářům z podniků. Letos jsme se rozhodli věnovat dvanáctku spojení chemie a farmacie. Rukopisy s farmakochemickou tematikou přichází do redakce v dostatečné míře, takže je oprávněné předpokládat, že toto téma bude aktuální i v příštích letech.

Léčiva jsou v drtivé míře chemoterapeutika a jejich vývoj, výzkum, výroba a kontrola je výsledkem spolupráce řady vědních a inženýrských oborů. Zatímco medicínská chemie, organická syntéza, biochemie, strukturní chemie, teoretická chemie, molekulární biologie, toxikologie aj. se uplatní přede-

vším ve stadiu výzkumu a vývoje, chemická technologie ve spojení s farmakologií hraje hlavní roli při výrobě jak aktivních substancí, tak lékových forem. Na druhé straně kontrolu kvality si nelze představit bez analytické chemie.

Farmaceutické podniky působící v ČR často spolupracují s akademickou sférou při řešení dílčích teoretických a technologických problémů, při konzultaci patentů, vytváření dokumentace a expertních posouzeních. Příkladem je Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, která dlouhodobě spolupracuje s našimi předními výrobci léčiv: Zentivou, Ivaxem, Chemopharmou, Nerapharmem, ICN, ProMedem a dalšími. Zpětným efektem této spolupráce jsou aktuální témata diplomových a doktorských prací, ovlivněná potřebami farmaceutického průmyslu a rozvoj nových studijních programů. Na VŠCHT Praha se připravuje k akreditaci nový bakalářský studijní program: Chemie a výroba léčiv.

Doufám, že čtenáři posoudí naši novou aktivitu shromáždit farmakochemické práce v jednom monotematickém čísle kladně.

Bohumil Kratochvíl

JAK SE RODÍ LÉK, ANEB VYBRANÉ ASPEKTY VÝZKUMU A VÝVOJE CHEMICKÝCH LÉČIV

STANISLAV RÁDL

Zentiva – Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii,
U kabelovny 130, 10201 Praha 10
stanislav.radl@zentiva.cz

Došlo 8.7.04, přijato 20.8.04.

Klíčová slova: farmaceutický výzkum, farmaceutický vývoj, originální léčivo, generické léčivo

Obsah

1. Úvod
2. Struktura farmaceutického průmyslu
3. Stručný přehled světových farmaceutických výrobců
 - 3.1. Inovativní firmy (originátoři)
 - 3.2. Generické firmy
 - 3.3. „High-tech“ společnosti
 - 3.4. Společnosti pracující na smlouvu
 - 3.5. Výrobci aktivních substancí a farmaceutických intermediátů
4. Výzkum originálních léčiv
 - 4.1. Vyhledávací výzkum
 - 4.1.1. Založení projektu
 - 4.1.2. Strategie objevení vůdčí struktury a výběru látky k preklinickému hodnocení
 - 4.2. Vývoj vybraného léčiva
 - 4.2.1. Preklinický vývoj
 - 4.2.2. Klinické hodnocení
 - 4.3. Zavedení léčiva na trh a jeho podpora
 - 4.3.1. Postmarketingové sledování
 - 4.3.2. Podpora nových klinických aplikací
 - 4.3.3. Vývoj nových lékových forem
 - 4.3.4. Podpora marketingu
5. Vývoj generických léčiv
 - 5.1. Historie generik
 - 5.2. Legislativní rámec zavádění generik
 - 5.3. Výhody a nevýhody generických výrobců
 - 5.4. Faktory úspěchu v oblasti generik
 - 5.5. Hlavní činnosti při vývoji generik
6. Závěr

1. Úvod

Tradiční jarní Publika na VŠCHT Praha byla v roce 2004 věnována tématice výzkumu a vývoje léčiv a já jsem byl požádán o přednesení úvodní přednášky tohoto cyklu. Nazval jsem ji „Jak se rodí lék, aneb vybrané aspekty vý-

zkumu a vývoje chemických léčiv“. Když jsem pak byl požádán o zpracování tohoto tématu pro Chemické listy, dlouho jsem přemýšlel o tom, jak toto téma pojmut. Je něco zcela jiného volně komentovat připravené obrázky a něco jiného zpracovat text, který je pouze několika obrázky i tabulkami doprovázen. Navíc jsem z diskuse k uvedené přednášce dospěl k názoru, že by bylo vhodné lépe osvětlit podstatu generických léčiv a poopravit názor některých diskutujících, že vývoj generik spočívá v bezduchem kopírování originálních léčiv a je z hlediska odborného něčím podřadným. Vzhledem k tomu, že jsem během svého působení jak ve výzkumném centru firmy Hoffmann-La Roche (1992–1993), tak ve Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii až do roku 2000 pracoval vlastně výhradně v oblasti vyhledávacího výzkumu nových léčiv a až v posledních letech se zabývám vývojem generik, mohu snad tyto dvě činnosti dosti fundovaně popsat. Rád bych proto v tomto článku také vysvětlil, v čem spočívají a jak se z hlediska práce chemika tyto dvě odnože farmaceutické chemie liší. Zdůrazňuji, že se jedná o vybrané aspekty této široké problematiky; pro systematické seznámení s oblastí chemie léčiv bych doporučil nedávno vydanou učebnici *Farmakochemie*¹. Přes nespornou budoucnost produktů genového inženýrství v terapii zde nebudu tuto oblast diskutovat, protože se necítím být k tomu kompetentní a v současné době není ani zcela ujasněná možnost výroby takových generických léčiv (viz článek L. Cvaka a M. Fuska v tomto čísle).

2. Struktura farmaceutického průmyslu

V současné době farmaceutický průmysl bezesporu patří ve většině technicky vyspělých zemí mezi nejvýznamnější odvětví. Je třeba zdůraznit, že hnací silou farmaceutického průmyslu je zisk a nikoliv etické pohnutky a že jde z tohoto hlediska o obor vysoce ziskový. Nejúspěšnější léčiva dosahují ročních prodejů řádově v miliardách USD (tabulka I), a i když čisté přínosy jednotlivých léčiv nebývají zveřejňovány, dá se předpokládat ziskovost v desítkách procent.

Mezi 10 v současnosti nejúspěšnějšími léčivy má 3 zástupce firma Pfizer, výrobce asi mediálně nejznámějšího léčiva Viagra používaného při erektilní dysfunkci. V roce 2003 byla Viagra s celosvětovými prodeji 1,879 miliard USD na 16. místě.

Na druhé straně je farmaceutický výzkum a vývoj extrémně finančně náročný a vložené investice jsou velice dlouhodobé a také rizikové. I přes neustálou koncentraci je farmaceutický průmysl vysoce kompetitivní. Dodatečné náklady pak plynou také z toho, že farmaceutický průmysl je značně regulovaný. Tyto aspekty budou diskutovány

Tabulka I
Pořadí léčiv podle celosvětových prodejů v roce 2003^a

Substance	Společnost	Miliardy USD	Změna [%]	Užití
Atorvastatin (Lipitor)	Pfizer	10,3	14	hypolipidemikum
Simvastatin (Zocor)	Merck & Co	6,1	– 4	hypolipidemikum
Olanzapin (Zyprexa)	Eli Lilly	4,8	13	antipsychotikum
Amlodipin (Norvasc)	Pfizer	4,5	7	antihypertensivum
Epoetin alfa (Procrit)	Johnson & Johnson	4,0	13	antianemikum
Lanzoprazol (Prevacid)	Tao Pharm.	4,0	0	antiulcerikum
Clopidogrel (Plavix)	Sanofi Synthelabo	3,7	40	antithrombotikum
Esomeprazol (Nexium)	Astra Zeneca	3,8	62	antiulcerikum
Seretide (Advair)	Glaxo Smith Kline	3,7	40	antiastmatikum
Sertralin (Zoloft)	Pfizer	3,4	11	antidepresivum

^a Každoročně se údaje z různých zdrojů liší podle toho, jak jsou přepočítávány. V tabulce uvedené údaje jsou převzaty z cit.²

v následujících odstavcích.

Do výzkumu, vývoje a výroby léčiv se různým způsobem zapojuje velké množství institucí a firem, mezi nimiž existuje řada synergických efektů, ale také tvrdý konkurenční boj. V oblasti farmaceutického průmyslu je obecně do výzkumu a vývoje dáván značný podíl z obrátu. U špičkových firem tento podíl kolísá obvykle mezi 10 až 20 %.

3. Stručný přehled světových farmaceutických výrobců

3.1. Inovativní firmy (originátoři)

Z hlediska celkového přínosu k úrovni léčby stojí na špici takzvané inovativní firmy (research based companies, brand name companies). Tyto firmy využívají nejnovější poznatky k vyhledávání a vývoji nových originálních léčiv, které přinášejí výrazný terapeutický prospěch. S rostoucími náklady na vývoj léčiv se v posledních 10–15 letech urychlil proces slučování těchto firem do větších celků, a to jak rovnocenným sloučením, tak nepřátelským převzetím. Nejnovějším příkladem je nedávno ohlášené převzetí firmy Aventis firmou Sanofi. Prvních 10 firem podle obrátu v roce 2003 je uvedeno v tabulce II.

3.2. Generické firmy

Pod pojmem generické firmy se rozumí společnosti, které po vypršení patentových či jiných dodatečných

ochran zcela legálně vyrábějí léčiva původně zavedená firmami inovativními. Tímto zcela logicky dochází k podstatnému snížení cen těchto léčiv. Hlavním přínosem generických firem je tedy zvýšení dostupnosti moderních léčiv pro širší okruh pacientů. Výrobou generik se ale zabývají i firmy inovativní a po vypršení ochrany úspěšného léku konkurenční firmy jej často začnou také vyrábět. Často přitom z hlediska své „image“ tuto činnost provádějí majetkovou provázaností s jinými firmami. Největší gene-

Tabulka II
Pořadí inovativních firem podle celkového obrátu v roce 2002

Pořadí	Společnost	Obrat 2002 [mil. USD]
1.	Pfizer Inc.	42 270
2.	GlaxoSmithKline Plc.	26 990
3.	Merck & Co	21 440
4.	Aventis	18 290
5.	Astra Zeneca	17 840
6.	Johnson & Johnson	17 200
7.	Bristol-Myers Squibb	14 700
8.	Novartis	13 550
9.	Wyeth	12 380
10.	Roche	12 370

Tabulka III
Pořadí generických firem podle celkového obratu v roce 2002

Pořadí	Společnost	Obrat 2002 [mil. USD]
1.	Teva (Israel)	2 519
2.	Novartis (Sandoz, Lek)	2 026
3.	Alpharma (USA)	1 238
4.	Watson (USA)	1 220
5.	Ivax (USA)	1 197
6.	Merck (SRN)	1 193
7.	Mylan (USA)	1 175
8.	Barr (USA)	1 171
9.	Hexal (SRN)	985
10.	Ratiopharm (SRN)	976
:		
13.	Zentiva	350

rickou odnož má firma Novartis, která jednak získala firmu Lek, jednak oživila značku Sandoz a soustředila pod ní výrobu generik. Pořadí největších generických výrobců je uvedeno v tabulce III.

3.3. „High-tech“ společnosti

Jedná se o vysoce flexibilní organizace, často přímo účelově zakládáné pro využití nějakého objevu, jehož autoři se domnívají, že by mohl být komerčně zajímavý pro farmaceutický průmysl. Typickým představitelem je firma Genentech, která stála u zrodu průmyslového využití genetického inženýrství. Velice rychle se ukázala nosnost jejich myšlenky a firma byla rychle koupena (nejprve z 50 %, později zcela firmou Hoffmann-La Roche). Dalším, zvláště u nás známým příkladem může být firma Selectide založená v Tusconu pro využití jedné z metodik syntézy na tuhé fázi v kombinatoriální chemii. Firma byla koupena firmou Marion Merell (později sloučenou s firmou Hoechst, která je nyní součástí firmy Aventis).

3.4. Společnosti pracující na smlovu

Zvláště menší a střední farmaceutické společnosti si nemohou dovolit mít všechny činnosti soustředěné ve vlastní společnosti. Na základě poptávky tak vznikla řada specializovaných firem (Contract Research Organization – CRO). Dokonce i největší farmaceutické firmy často využívají těchto firem k překlenutí úzkých míst ve svém výzkumu a vývoji. V současné době je situace taková, že si lze nasmlouvat u různých firem postupně vlastně všechny činnosti vedoucí k zavedení léčiva, počínaje vyhledávacím výzkumem, preklinickým vývojem, klinickými pokusy, až po zapatentování všech detailů a zaregistrování léčiva. Vše

je v podstatě otázkou ceny a možných rizik spojených s takovým postupem.

3.5. Výrobci aktivních substancí a farmaceutických intermediátů

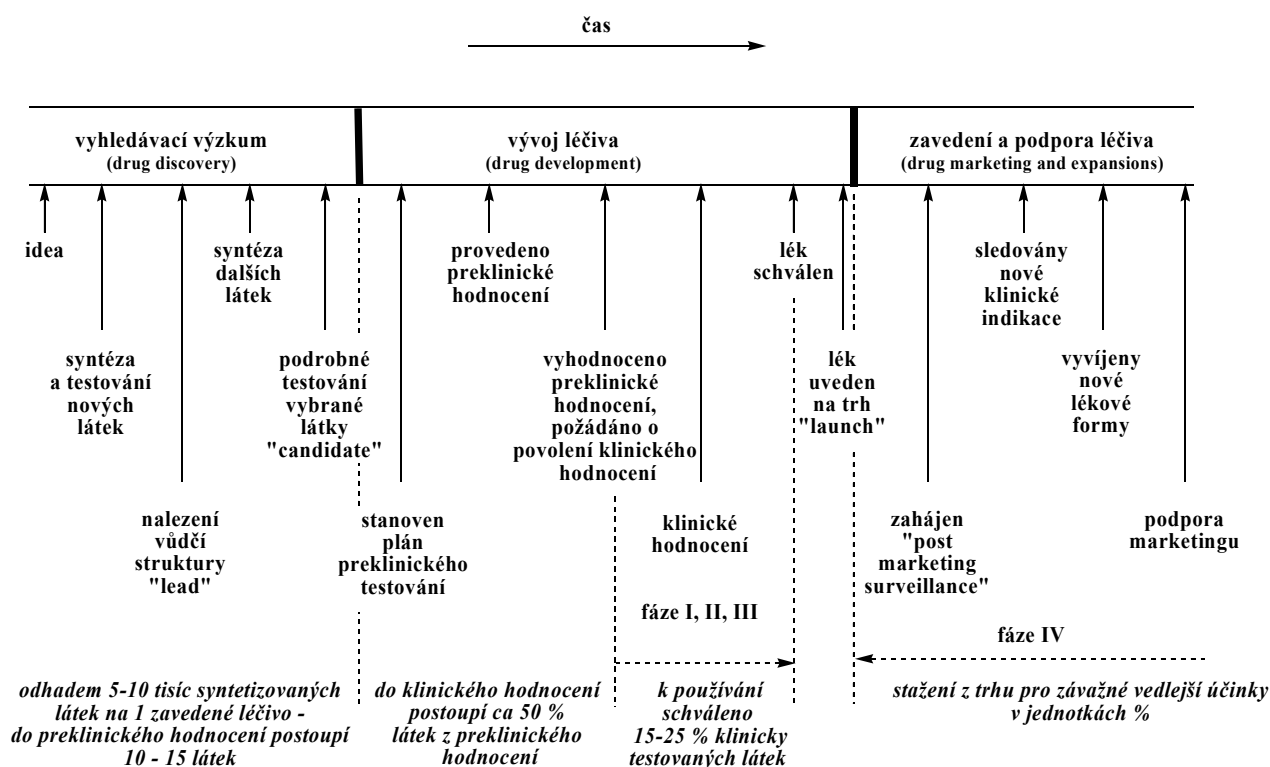
Zatímco inovativní i generické firmy se zaměřují na výrobu konečných lékových forem, řada výrobců se specializovala na výrobu aktivních substancí (Active Pharmaceutical Ingredient – API), popřípadě dokonce jen na produkci intermediátů těchto substancí (Pharmaceutical Intermediate – PhI). Během posledních cca 5 let se těžiště této činnosti soustředilo v Indii. Jedním z důvodů je i fakt, že Indie dosud neuznává látkové patenty (od roku 2005 se situace mění), a proto místní firmy mohly začít s vývojem generických substancí podstatně dříve, přičemž náklady vynaložené na tento vývoj získaly okamžitě zpět prodejem léčiv na indickém trhu. V současné době, díky vysoce kvalifikované pracovní síle a dobré technické vybavenosti, některé z těchto firem již příliš nestojí o prodej intermediátů a soustřeďují se buď jen na výrobu kvalitních API, nebo dokonce na proniknutí na světové trhy jako výrobci generik (Zyudus Cadila, Ranbaxy, Dr. Reddy's Labs a další). V současné době má více než 25 výrobních závodů certifikát FDA (Food and Drug Administration), řada z nich spolupracuje s originálními výrobci a dodává jim intermediáty i API, některé dokonce spolupracují na výzkumu nových léčiv³. Štafetu výrobců intermediátů přebírají dynamicky se rozvíjející čínské firmy.

4. Výzkum originálních léčiv

K hodnocení kvality, a tím i tržního ocenění inovativních firem, se často používá tzv. Pipeline Concept⁴, český překladaný obvykle jako princip produktovodu. V podstatě se jedná o grafické znázornění zachycující stav jednotlivých projektů od doby jejich otevření až do stadia výroby, které má na časové ose všechna stadia, kterým léčivo musí projít. Na obr. 1 jsou tato stadia znázorněna a rozčleněna na tři hlavní fáze – vyhledávací výzkum (Drug Discovery), vývoj léčiva (Drug Development), zavedení léčiva na trh a jeho podpora (Drug Marketing and Expansions) pro jedno hypotetické léčivo. Toto členění není samoúčelné, jednotlivé fáze bývají prováděny organizačně různými částmi společností.

Často diskutovanou otázkou jsou průměrné náklady nutné na vývoj jednoho léku. Samozřejmě konkrétní náklady jsou velmi rozdílné, závisí na mnoha hlediscích včetně strategie výběru projektu (obměna struktury, nový strukturální typ, atd.). V současné době se většinou uvádí, že na vývoj léčiva s novou strukturou náklady přesahují miliardu USD vynaloženou v průběhu 15 let. Často jsou náklady na vývoj léčiva zpochybňovány různými zájmovými skupinami (pacienti, zdravotní pojišťovny, generické firmy), lze totiž obtížně určit, které náklady jsou nutné pro vývoj a které už se vztahují na podporu marketingu nebo marketing samotný.

Se zvyšujícími se nároky na bezpečnost se zvýšil



Obr. 1. Grafické znázornění vývoje léčiva od počátečního vývoje až po zavedení výroby

i počet syntetizovaných látek nutných k zavedení jednoho nového léčiva; nyní se uvádí 5–10 tisíc látek (obr. 1). Z tohoto množství je průměrně 10–15 látek vybráno do preklinického hodnocení, kterým průměrně úspěšně projde zhruba 50 % z nich. Pravděpodobnost stažení látky z dalšího vývoje nadále roste v klinickém hodnocení, jímž úspěšně prochází 15 až 25 % testovaných léčiv.

4.1. Vyhledávací výzkum

Vyhledávací výzkum (Drug Discovery) je v případě nových léčiv stadium, které nejvíce ovlivní jak budoucí úspěšnost preparátu, tak i dobu jeho vývoje. Podle typu projektu (viz dále) se uvádí obvyklá délka této fáze u zavedených léčiv 2 až 10 let. To však zdaleka neznamená, že většina projektů končí zavedením léčiva. V posledních letech je ze 100 zahájených projektů do 2 let 75 zastaveno, do preklinické fáze se dostane obvykle 10–15 projektů a na konci zbyde jedno zavedené léčivo.

4.1.1. Založení projektu

Každá firma musí podle své strategie, ale i možností, dbát na to, aby měla rovnoměrně rozloženy projekty v různých stadiích vývoje. Při zakládání nových projektů musí pak brát v úvahu řadu kritérií. Podstatné je terapeutické zaměření a zamýšlený mechanismus účinku. Některé menší firmy se do určité míry specializují na určité terapeutické skupiny, velké celosvětové firmy se tímto způsobem obvykle neomezují. Vzhledem k době mezi započe-

tím projektu a uvedením léčiva na trh je velmi obtížné na začátku vyhodnotit tržní úspěch, a tím i návratnost projektu. Je to dáno mnoha faktory, v počátečních stadiích nejsou známy projekty konkurence a většinou ani potenciál léčiv, které se v té době nacházejí ve stadiu klinického hodnocení. I když jsou prostředky vynakládány největšími firmami na výzkum a vývoj ohromné (například firma Pfizer vynaložila v roce 2003 přes 7 miliard USD) a jsou do značné míry soustředěny na výzkum zcela nových cílových struktur (drug targets), přesto se i tyto firmy věnují vývoji léčiv na základě podobnosti s léčivy známými. Tato léčiva mohou být z jejich vlastního portfolia (backup products) nebo mohou být vyráběna konkurencí („me-too“ nebo „me-better drugs“). Je to dáno jednak tím, že tento způsob vývoje nového léčiva bývá podstatně rychlejší a levnější, ale i faktem, že řada takto objevených léčiv se dostala do skupiny komerčně nejúspěšnějších léčiv, pro něž se obvykle i v českých textech používá anglický termín „blockbuster“ (trháky). Statisticky se zjistilo, že nejúspěšnějším léčivem dané terapeutické skupiny nebývá první zavedené léčivo, ale druhé či třetí v pořadí.

Pokroky ve studiu základních procesů probíhajících na buněčné a receptorové úrovni, dosažené v posledních desetiletích, zcela změnily koncepci výzkumu v oblasti medicíny.

Minulostí je dlouho platný přístup spočívající v rozsáhlém testování nových látek *in vitro* a pak *in vivo* vedoucí k objevení skupiny účinných látek, u nichž byl

poté zjišťován mechanismus jejich účinku. U projektů zaměřených na modifikaci známé struktury, popř. na objevení látek nové struktury účinkujících známým mechanismem, se značné úsilí věnuje vyvinutí vhodných testovacích metod založených na receptorových, popř. enzymatických studiích. Špičkové farmaceutické firmy se samozřejmě snaží objevit léčiva fungující zcela novým mechanismem, u nichž se dá v případě úspěchu předpokládat výrazný terapeutický prospěch, a tím i komerční úspěšnost. Zaměřují se proto hned na počátku projektů na výběr vhodných „drug targets“, kterými jsou obvykle receptory, iontové kanály, nebo enzymy. Samotnou hypotézu, že taková cílová struktura je využitelná k léčbě určité choroby, je ale třeba důkladně ověřit, takzvaně validovat. Je nutné ověřit, zda ovlivnění cílové struktury nemá významné nepředvídané účinky. Často se také ukazuje, že pokud nějakým léčivem ovlivníme určitý děj v těle, organismus toto ovlivnění zpětně kompenzuje a nelze účinně takový způsob terapeuticky využít. Po rozšířování lidského genomu se odhaduje, že v těle je zhruba 30 tisíc potenciálních „drug targets“. V současné době je něco známo o 2000 takových struktur a pouze asi 500 z nich je terapeuticky využíváno. Nehledě na přesnost těchto odhadů je zřejmé, že existuje velké množství nových, dosud netušených možností léčby chorob. Celosvětově jsou vynakládány ohromné prostředky na tzv. „genomic driven target generation“, tzn. na objevování nových cílových struktur založené na studiu lidského genomu⁵⁻⁸.

4.1.2. Strategie objevení vůdčí struktury a výběru látky k preklinickému hodnocení

Základním algoritmem klasického vyhledávacího výzkumu nových léčiv je syntéza, analýza a biologické hodnocení sérií strukturálních analogů (congeners). Z výsledků hodnocení takové skupiny podobných látek se získávají informace o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou v této skupině (Structure-Activity Relationship – SAR; Quantitative Structure-Activity Relationship – QSAR). Při klasickém postupu byla tato série látek syntetizována postupně, v současné době se často využívá kombinatoriální chemie a syntetizují se tzv. cílené knihovny (targeted libraries), které jsou dále testovány. V současném výzkumu léčiv je významnou součástí studium mechanismu účinku na molekulové úrovni, při němž je extenzivně využíváno i současných možností molekulového modelování jak samotného léčiva, tak jeho komplexů s předpokládanými cílovými strukturami, jako jsou receptory nebo enzymy. Na základě těchto výpočtů jsou pak syntetizovány látky, které by měly dát lepší biologickou odpověď. Tak je možné snížit množství syntetizovaných látek nutných k získání příslušně aktivní látky. Je však nutné mít velké množství dat o daném receptoru nebo enzymu. Výsledkem takového cíleného výzkumu je látka, která je již výrazně účinná, nemá ale dosud všechny vlastnosti požadované od léčiva. Taková látka bývá nazývána vůdčí strukturou, nebo se používá anglického výrazu „lead“.

Před testováním strukturálních analogů je ale nejprve

nutné vybrat látku, jejíž analoga se mají syntetizovat. Původně se často jednalo o náhodný objev látky s biologickou aktivitou, popř. o využití poznatků z přírodního léčitelství (opiáty, námelové alkaloidy, kanabinoidy). Objev nových přírodních, biologicky aktivních látek je také často inspirován zkušeností přírodních národů. Tak studium obsahových látek indiánského šípového jedu kurare vedlo k zavedení kurarimimetik, vysoce analgeticky účinná látka epibatidin byla zase objevena v kůži jedovatých žab rodu *Epibates*.

V průběhu minulého století došlo k významným objevům v oblasti biochemie a bioorganické chemie a výsledkem bylo objevení řady biologicky aktivních látek přítomných v těle, jako jsou přirozené mediátory (katecholaminy, serotonin, histamin, dopamin, GABA), hormony a autakoidy¹. Některé z těchto látek byly zavedeny do terapie jako takové, staly se však také vděčnými strukturálními předlohami. Výsledkem bylo objevení velkého množství agonistů, antagonistů, nebo látek ovlivňujících příslušné receptory jiným mechanismem. Sem patří velké množství používaných léčiv, jen namátkou připomenu léčiva ovlivňující adrenergní systém využívaná jako antihypertenziva. V této oblasti dochází stále k objevování nových receptorových subtypů a k objasňování jejich role v organismu.

Významné pro zavádění nových léčiv je i objevování role různých enzymů a využití jejich inhibitorů jako léčiv. Příkladem může být využití inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) v léčbě hypertenze, inhibitorů HIV proteasy v terapii AIDS, nebo inhibitorů HMG CoA reduktasy ze skupiny statinů jako hypolipidemik.

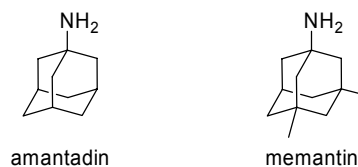


Schéma 1

Důkladné studium mechanismu hlavního účinku, ale i vedlejších účinků starších léčiv vedlo v některých případech k objevení nové indikace. Příkladem může být amantadin (Schéma 1), látka používaná k prevenci chřipky typu A. Bylo zjištěno, že u pacientů trpících parkinsonismem došlo ke zlepšení jejich stavu a v současné době je látka proto používána i jako antiparkinsonikum. Podrobnější studium biologických účinků derivátů aminoadamantanu vedlo k zavedení memantinu (Axura, Ebixa) pro léčbu Alzheimerovy choroby.

Na možnosti obměnou struktury dosáhnout zvýšení vedlejšího účinku a změnit jej tak na účinek hlavní, je založen přístup nyní označovaný jako SOSA (Selective Optimization of Side Activities). Známým vedlejším účinkem opiátů je obstipace (zácpa) a vhodnou změnou struktury zjednodušených opiátů bylo dosaženo potlačení analgetického účinku a odstranění návykovosti za současného zvýraznění obstipační aktivity. Příkladem jsou látky dife-

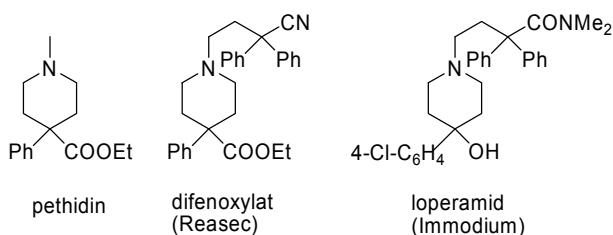


Schéma 2

noxylat a loperamid, strukturně podobné pethidinu (Schéma 2).

U vyvíjeného nebo staršího léčiva se běžně provádějí rozsáhlé metabolické studie. V některých případech lze těchto výsledků vhodně využít. V případě, že je účinná látka rozsáhle metabolizována na inaktivní metabolit nebo na metabolit s nežádoucím účinkem, je snaha tuto metabolickou cestu zablokovat. Jednou z možností, často využívanou ve vývoji nových léčiv, je možnost zablokovat metabolickou hydroxylaci aromatického jádra zavedením fluoru do polohy, kde k hydroxylaci dochází. Další možností využití výsledků metabolických studií jsou případy, kdy vzniklý metabolit je aktivnější, popř. nemá nežádoucí účinky původního léčiva. Po objevení kardiotoxicity antihistaminika terfenadinu (Schéma 3) byla tato látka v roce 1998 stažena z trhu a byla nahrazena jeho metabolitem fexofenadinem. Podobně je metabolitem hydroxyzinu i antihistaminikum cetirizin (Zyrtec). Dalším příkladem může být pravastatin, který byl izolován jako metabolit mevastatinu v moči krys a po objevení toxicity původního léčiva byl zaveden na trh pod názvem Pravachol.

Principiálně podobné je i zlepšení dostupnosti léčiva tím, že se do jeho molekuly zavedou substituenty, které zlepšují jeho biodostupnost. Ty pak jsou v organismu metabolicky odstraněny a je uvolněna aktivní látka. Takto modifikované léčivo se nazývá proléčivo (prodrug). Z velkého množství používaných proléčiv lze uvést hypo-

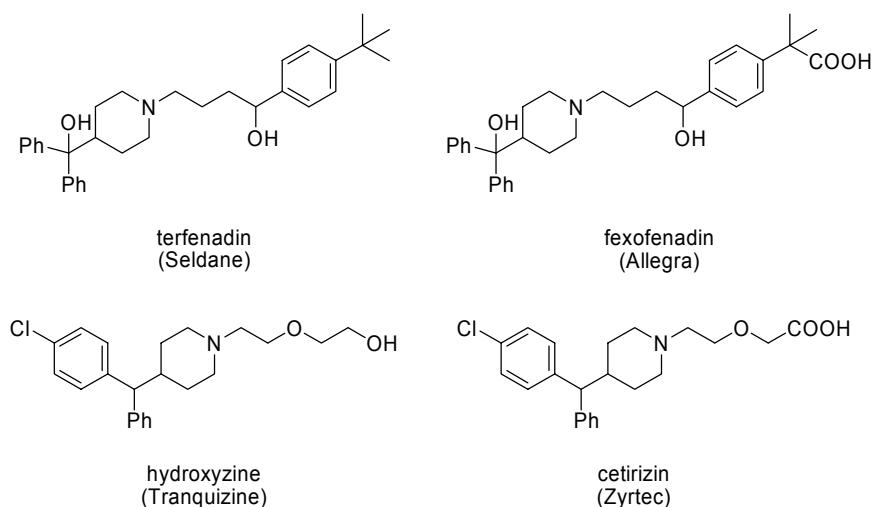


Schéma 3

lipidemika statinového typu obsahující laktonový kruh, např. lovastatin (Mevacor) a simvastatin (Zocor), nebo antagonistu angiotensinu II candesartan cilexetil (Schéma 4).

Kromě těchto klasických proléčiv lze v některých případech dosáhnout selektivního uvolnění účinné látky v požadovaném místě. To je žádoucí například při léčbě rakoviny, kdy jsou sice známy některé velmi účinné látky (např. doxorubicin), které jsou ale značně toxické. Navázáním na vhodný polymerní nosič lze ale dosáhnout snížení jejich toxicity. Navíc dochází k hromadění tohoto polymeru v nádorových buňkách a důsledkem nižšího pH v těchto buňkách pak k uvolnění vhodně vázané aktivní látky. Pokud se využívá enzymatického uvolnění, je tento přístup označován jako PDEPT (Polymer-Directed Enzyme Prodrug Therapy). Dalšími moderními přístupy zkoumanými pro léčbu rakoviny jsou tzv. ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) a GDEPT (Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy), které přesahují rozsah tohoto článku^{9–11}.

Řada léčiv obsahuje ve své molekule jeden nebo více asymetrických atomů, většinou se jedná o uhlík. U chirálního léčiva často mají enantiomery rozdílnou bioaktivitu (účinek, účinnost, toxicita) a obvykle je výhodnější podávat jeden z isomerů. Pokud je léčivo používáno jako racemát a později se na trh zavede výhodnější enantiomer, označuje se tento akt nemající dosud český ekvivalent jako „chiral switch“. Z úspěšných případů lze uvést levofloxacin, levocetirizin, escitalopram a esomeprazol (chirální sulfoxid). Jen výjimečně jsou dokumentovány příklady, kdy je výhodnější použít racemát. Jedním z nich je indacrinone, jehož isomer *R* má výraznou diuretickou aktivitu, způsobuje ale nežádoucí retenci močové kyseliny. Naopak isomer *S* nemá diuretickou aktivitu, ale podporuje vylučování močové kyseliny, takže při použití racemátu nedochází k její nežádoucí retenci.

V období klasického farmaceutického výzkumu se rozšířilo testování látek bez strukturní předlohy (random

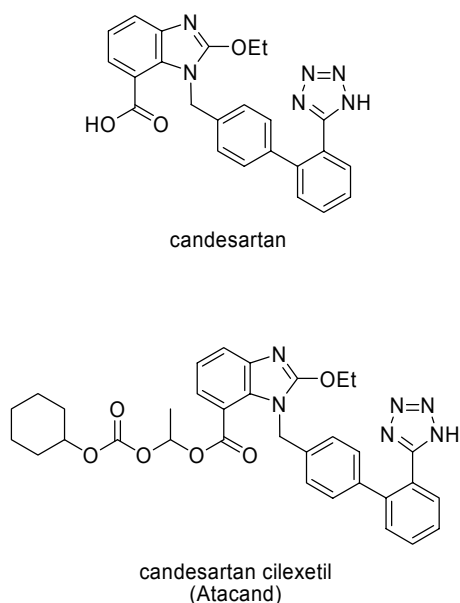


Schéma 4

screening). Byly testovány sbírky přírodních látek i sbírky látek syntetizovaných za jiným účelem. Např. významná skupina antibakteriálních léčiv, tzv. antibakteriální chinolony, byla objevena na základě testování antibakteriální aktivity nečistot izolovaných z matečných louhů z výroby antimalarika chlorochinu¹².

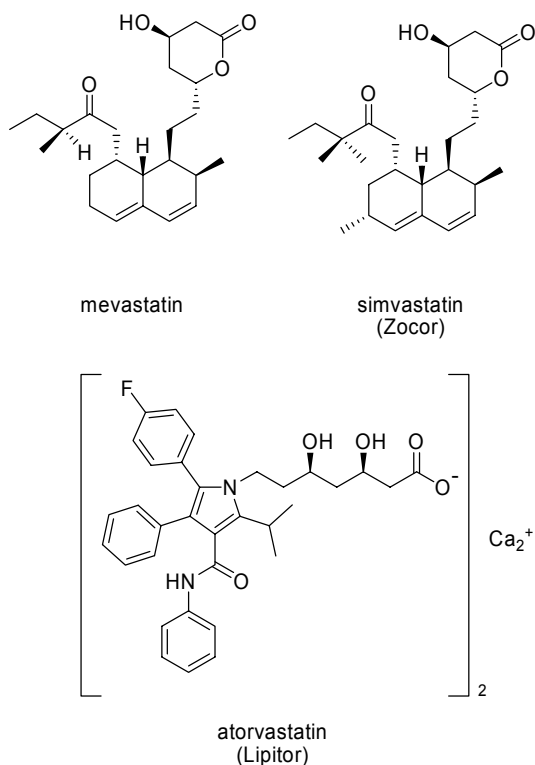


Schéma 5

Po nástupu kombinatoriální chemie na počátku 90. let minulého století bylo toto nové odvětví orientováno především na syntézu rozsáhlých nesměrovaných knihoven, od jejichž testování se slibovalo objevení léčiv zcela nových struktur. Další možností bylo testování produktů sbírek mikrobiálních kmenů z různých prostředí. Tento postup se osvědčil nejen v případě antibiotik, ale tímto způsobem byl objeven mevastatin, první látka z dnes komerčně nejúspěšnější skupiny léčiv – statinových hypolipidemik zahrnujících i vůbec nejúspěšnější léčiva posledních let simvastatin (Zocor) a atorvastatin (Lipitor) (viz Schéma 5, tabulka I).

Významnou součástí vyhledávacího výzkumu je vhodná testovací metodika syntetizovaných látek. Pro primární „screening“ se prakticky výlučně používá testování *in vitro*. Podle druhu cílového účinku se jedná o testování na tkáňových kulturách, testování na izolovaných orgánech, o vazebné studie na izolovaných nebo biotechnologicky připravených receptorech. Svým způsobem specifické je testování antimikrobiálních nebo antivirových látek, kdy je sledována inhibice růstu těchto organismů ve vhodném živném mediu. Samozřejmě i v této oblasti se používá „screening“ zaměřený na sledování inhibice enzymů životně důležitých pro tyto organismy (u bakterií např. DNA-gyrasy, což je bakteriální topoisomerasa II). Pro zvládnutí testování ohromného množství látek, získaného hlavně pomocí kombinatoriální chemie, byl vyvinut tzv. „high-throughput screening“. V etapě vyhledávacího výzkumu se jen výjimečně používá testování *in vivo*. To se běžně používá pouze pro ověření aktivity látek předběžně vybraných pro preklinické hodnocení (candidate) a na omezeném počtu zvířat (většinou malí hlodavci) pro orientační stanovení jejich akutní toxicity.

4.2. Vývoj vybraného léčiva

Po vybrání několika vhodných kandidátů následuje preklinické a klinické hodnocení, což jsou stadia mimořádně náročná jak na mezioborovou spolupráci, tak na finanční zdroje. Je nepopiratelným faktem, že v České republice není v současné době žádná společnost, která by si tento vývoj (Drug Development) mohla, bez spolupráce se silnějším subjektem, dovolit.

4.2.1. Preklinický vývoj

Nejdůležitější součástí preklinického vývoje je širší biologické hodnocení, při kterém se ověřuje aktivita *in vivo* na více zvířecích druzích. Sleduje se při tom jak osud léčiva v organismu a biodostupnost (farmakokinetické studie), tak biologická aktivita a vliv na kardiovaskulární systém, centrální nervový systém, gastrointestinální systém, urogenitální systém (farmakodynamické studie). Nedílnou součástí preklinického hodnocení jsou také toxikologické studie, které zahrnují jak testy speciální toxikologie (mutagenita, genotoxicita, teratogenita, kancerogenita, atd.), tak hodnocení subchronické a chronické toxicity. V období preklinického vývoje se obvykle také pracuje na optimalizaci syntézy a na vývoji analytických metod. U vybrané látky se také hodnotí stabilita a začíná se provádět vývoj léčivé formy.

Jak již bylo zmíněno, obvykle se provádí preklinické hodnocení několika vybraných látek a výsledkem je rozsáhlá studie vyhodnocení těchto výsledků. V kladném případě je po důkladném zvážení vypracována žádost o povolení klinického hodnocení, která je podána u příslušné regulační autority. V USA je to FDA, u nás Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Zdůrazňuji zde důkladné zvážení, které zahrnuje už i velmi detailní zhodnocení tržního potenciálu daného léčiva, který lze v této fázi obvykle mnohem lépe odhadnout než při založení projektu. Vývoj originálního léčiva je velice drahou záležitostí a v okamžiku ukončení preklinického hodnocení bývají sice už utraceny řádově desítky až stovky milionů USD, podstatnější část nákladů je ale vynaložena až v následujících stádiích.

4.2.2. Klinické hodnocení

Pro povolení první fáze klinického hodnocení nového léčiva se předkládá regulační autoritě rozsáhlá dokumentace, která jednak shrnuje výsledky preklinických studií, jednak obsahuje i plán studií klinických. Tato žádost se v případě FDA nazývá Investigational New Drug Application (INDA). Po prostudování příslušné dokumentace regulační autorita v kladném případě schválí provedení první fáze klinického hodnocení. Po každé fázi je nutno předat podrobné výsledky provedené studie spolu s plánem další fáze a její provedení si nechat opět schválit. Zmíním se pouze o základních charakteristikách jednotlivých fází klinického hodnocení, nebudu se zmiňovat o všech podrobnostech této vysoce regulované oblasti. Není to cílem tohoto článku a já nejsem odborníkem na tuto složitou problematiku.

Fáze I zahrnuje metabolické studie a farmakokinetiku u omezeného souboru (20 až 80) zdravých dobrovolníků, cílem je zjistit případné rozdíly účinku oproti účinkům na pokusných zvířatech. Fáze II zahrnuje jednotlivé a opakované podání pacientům (obvykle 100 až 300) trpícím chorobou, pro jejíž léčbu je léčivo určeno. Léčivo se podává v různých dávkách pro ověření hlavního účinku a zjištění možných vedlejších účinků. Fáze III je prováděna na velkém souboru pacientů (obvykle 1000 až 5000) již v podstatě způsobem, kterým by mělo být léčivo používáno v praxi. Je prováděna na několika pracovištích a pokud tomu nebrání etické důvody, provádí se srovnání s placebem, většinou metodou dvojitého slepého experimentu (double blind experiment), popř. srovnáním se známými standardy. Rozsah klinického hodnocení je zřejmý z toho, že v roce 2003 bylo ve fázi III klinického hodnocení celosvětově 1200 léčiv. Někdy se setkáváme i s výrazem fáze IV klinického hodnocení (viz též odstavec 4.3.1.). Jedná se o monitorování vedlejších účinků, které musí firma zajistit po zavedení léčiva na trh.

4.3. Zavedení léčiva na trh a jeho podpora

Po úspěšném skončení klinického hodnocení jsou veškerá data zpracována a firma podává žádost o schválení výroby léčiva. Vzhledem k ohromnému objemu předkláda-

ných dat se obvykle doba schválení počítá na léta. V té době se už připravuje rozsáhlá kampaň spojená s uvedením na trh (launch). Ta se týká jak hledisek striktně odborných, jako je úprava stávajících nebo často výstavba nových výrobních zařízení, školení prodejců a instruktorů, kteří budou léčivo po zavedení lékařům představovat, atd. Důležitější součástí je také zvolení marketingové strategie, reklamní kampaně apod.

4.3.1. Postmarketingové sledování

Firma je povinna si zajistit sledování vedlejších účinků i po zavedení na trh, a to jak z odborné literatury, tak z klinické praxe. V případě objevení nežádoucích účinků, které nebyly dokumentovány v klinickém hodnocení, musí okamžitě tyto účinky nahlásit regulační autoritě. V současné době díky moderním metodám i díky velice přísným požadavkům není sice běžné stažení nového léčiva z trhu, i to se ale občas stává. Nejnovějším případem je stažení cerivastatinu (LipoBay) firmy Bayer v roce 2001 z trhu po úmrtí více než 50 pacientů na rhabdomyolýzu (stav, kdy dochází k vážnému poškození svalů, přičemž obsah zničených svalových buněk se dostává do krevního oběhu a může poškodit ledviny a další orgány). Případ je o to složitější, že většina takto postižených pacientů užívala vedle cerivastatinu zároveň gemfibrozil přes varování v příbalovém letáku, že cerivastatin nemá být užíván spolu s fibráty.

4.3.2. Podpora nových klinických aplikací

Tato část vývoje je pro firmy velice atraktivní, protože bez enormních nákladů může dojít k podstatnému zvýšení prodeje. Příkladem mohou být látky ze skupiny oxetininů zavedené jako antidepresiva působící mechanismem selektivní inhibice zpětného vychytávání noradrenalinu. Po úspěšném fluoxetinu (Prozac) byly zavedeny další látky této skupiny duloxetin (Cymbalta) a tomoxetin (Strattera)

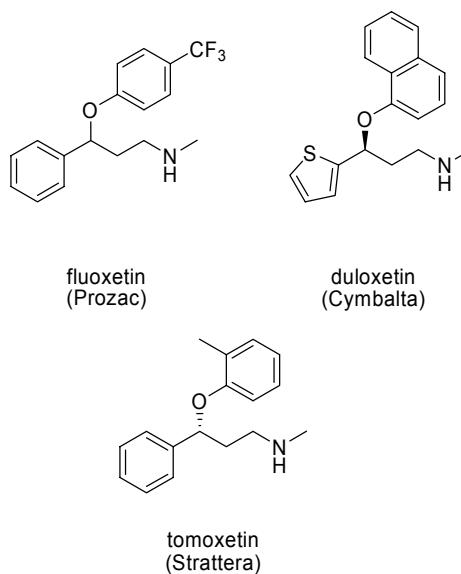


Schéma 6

(Schéma 6). První z nich je v současné době povolen i jako léčivo proti spontánnímu úniku moči, druhý zase k léčbě poruch pozornosti mladistvých označovaných zkratkou ADHD (Attention Deficit Hyperactivity Disorder).

4.3.3. Vývoj nových lékových forem

Po zavedení léčiva na trh je zpravidla pokračováno ve vývoji nových lékových forem, které jsou z nějakých důvodů žádoucí. Může se jednat o vývoj forem s protražovaným účinkem, které by bylo možno brát méně často, někdy naopak je žádoucí vyvinout formu s rychlým nástupem účinku. Pokud to jde, je snaha mít léčivo používané v injekční formě a také ve formě orální. To je zvláště důležité u onemocnění, kdy v akutní fázi je nutné použít injekční formu a po propuštění z nemocničního ošetření lze s výhodou přejít na totéž léčivo v orální formě. Existuje ale řada dalších možností, které se s pokrokem ve formulačních technologiích dále rozšiřují.

4.3.4. Podpora marketingu

Po zavedení léčiva na trh jsou k dispozici vlastně pouze odborné údaje zveřejněné příslušnou firmou. Obvykle se tedy firma snaží iniciovat všemožné studie tohoto léčiva i na nezávislých pracovištích a podporuje publikování kladných výsledků. Zvláště žádoucí jsou kladné studie srovnávající takový lék s konkurenčním, již používaným léčivem. Čas od času se objevují pochybnosti o tom, zda je zmíněná podpora studií ze strany farmaceutických firem etická. Skutečností ale zůstává, že po zavedení nového léčiva na trh je o něm publikováno velké množství prací a že výsledky těchto studií poskytují cenné informace o nových možnostech terapie. Odpovědnost za korektnost publikovaných údajů mají pochopitelně autoři těchto publikací.

5. Vývoj generických léčiv

5.1. Historie generik

Z podstaty patentové ochrany plyne, že po jejím vypršení může být toto léčivo volně vyráběno ostatními firmami¹³. K tomu ale původně musela každá firma podstoupit schvalovací řízení, které vyžadovalo i klinické hodnocení. S rostoucími požadavky na klinické hodnocení se stával tento fakt významným faktorem omezujícím zavedení léčiv s prošlou patentovou ochranou. Ve snaze omezit tato hodnocení byl v USA v roce 1962 přijat příslušný zákon označovaný jako DESI (Drug Efficacy Study Implementation). Na základě tohoto zákona bylo na účinnost testováno více než 3000 používaných léčiv. U léčiv s prokázaným účinkem nebylo nutné dělat klinické hodnocení. Tento zákon, který vlastně vedl ke zrodu průmyslu generických léčiv, se ale vztahoval jen na léčiva zavedená před rokem 1962. V případě nových léčiv nedošlo k žádné změně.

Ve snaze zvýšit bezpečnost léčiv docházelo k prodloužení doby vývoje léčiv, a tím i ke zkrácení doby, kdy měla firma patentovou exkluzivitu a následkem

toho bylo, že na konci 70. let minulého století se povážlivě snížil počet nově zaváděných originálních léčiv. Vytvoření rovnováhy mělo být dosaženo v USA zákonem přijatým v roce 1984, který je označován buď jako Drug Price Competition and Patent Restoration Act, nebo jako Hatch-Waxman Act. Tento zákon vycházel vstříc originálním výrobcům tím, že sjednotil dobu patentové ochrany pro nově zaváděné látky na 20 let. Pro generické výrobce pak bylo podstatné, že na látky zavedené po roce 1962 se vztahovala takzvaná zkrácená procedura ANDA (Abbreviated New Drug Application). Ta umožňovala vyhnout se nákladným klinickým studiím a provést na lidech pouze takzvanou bioekvivalenční studii prokazující u generika shodnost časové závislosti jeho dostupnosti v cílových tkáních s léčivem originálním. Účelnost tohoto zákona prokázal fakt, že během jednoho roku bylo na FDA podáno více než tisíc žádostí o schválení.

Rozsah používání generických léčiv se velmi různí a je závislý hlavně na místní legislativě. Na největším trhu léčiv, tj. v USA, se v posledních letech pohybuje tato hodnota na hranici 50 %. V EU se pohybuje od rozsahu jednotek % (např. Itálie, Belgie) do 70 % (např. Česko, Polsko).

5.2. Legislativní rámec zavádění generik

Základním principem zavádění generik je, že léčivý přípravek obsahující generické léčivo by měl dosáhnout stejného efektu jako originální, již zavedený, preparát. V EU je k dosažení tohoto principu požadována podmínka zásadní podobnosti (essential similarity). Vyžaduje se, aby oba léčivé přípravky (tj. originální i generický) obsahovaly identickou API, přičemž pomocné látky se mohou lišit. Generický léčivý přípravek smí být používán pouze ve stejné indikaci jako originální preparát, musí mít sílu (tj. obsah API) identickou se silou originálního léčiva, nemusí být ale dostupný ve všech silách jako originál. Generikum však musí mít stejný typ lékové formy a způsob podání. Kromě těchto více či méně formálních záležitostí musí být obě léčiva bioekvivalentní a generikum musí splňovat nebo být blízké specifikaci originátora. To se týká i identity a množství nečistot, což může být problém, zvláště pokud generický výrobce vyvine nový způsob výroby účinné látky. Samozřejmostí je také požadavek, aby byla generická léčiva vyráběna pod stejnými standardy správné výrobní praxe (GMP – Good Manufacturing Practice) jako léčiva originální.

Důležité jsou u generických výrobců otázky patentové či jiné ochrany léčiv¹³. V současnosti je délka patentové ochrany obecně 20 let. Pokud není léčivo zavedeno na trh do 5 let po patentování, je možné požádat o dodatečnou ochranu. Takto lze dosáhnout prodloužení ochrany až o 5 let, maximální souhrnná doba ochrany je 15 let. V EU se toto prodloužení označuje jako SPC (Supplementary Protection Certificate). V EU platí ještě další omezení plynoucí z tzv. exkluzivity dat (Data Exclusivity). Podstatou je to, že u žádného léčiva nelze podat registraci generika dříve než 6 (10) let po datu první registrace v EU. Doba

takové ochrany, tj. 6 nebo 10 let si stanovovaly jednotlivé státy dle svého uvážení. Od roku 2004 platí pro nově registrace v EU pravidlo 8 + 2 + 1. Pro registraci generika je nutno dodržet lhůtu 8 let od registrace originálního léčiva. S výrobou lze začít po dalších 2 letech a pokud se u originálního léčiva během prvních 8 let prokáže významná klinická výhodnost (significant clinical benefit), je možno tuto dobu prodloužit o další rok.

Poměrně přesně je také stanoveno, co lze dělat před vypršením patentové ochrany. Obecně lze provádět vývojové práce jak na API (vývoj syntézy API, vývoj analytického hodnocení, studie stability API) a vytvářet příslušnou dokumentaci, například DMF (Drug Master File). Podobné je to i v oblasti lékové formy. Je také dovoleno poskytovat vzorky API i lékové formy případným zájemcům. Striktně zakázáno je ale vyrábět jak API, tak konečnou lékovou formu ke komerčnímu použití, a to i budoucímu.

5.3. Výhody a nevýhody generických výrobců

Hlavní výhodou generických výrobců je fakt, že nemusí investovat do počátečních fází vývoje léčiva, které jsou značně rizikové. Obvykle nejsou nutné ani klinické studie, stačí průkaz bioekvivalence. Další výhodou je, že je známý tržní potenciál a že není nutná tak nákladná marketingová kampaň. V počátečním stadiu vývoje generika sice obvykle nejsou dostupné pokročilejší intermedie, to se ale zvláště u léčiv typu „blockbusterů“ časem mění a tak lze ve vhodných případech snížit počet reakčních stupňů a často i zlevnit produkt.

Na druhou stranu originátoři prodlužují patentovou ochranu patentováním nových postupů, nových polymorfů a nových lékových forem. Prodloužením patentové ochrany svého druhu je už zmíněný „chiral switch“. Další nepříjemností spojenou s vývojem generických substancí je nebyvalá konkurence generických firem. Je velmi obtížné předvídat konkurenci a nelze ani odhadnout skutečnou patentovou situaci. V současné době je běžné zahajovat vývoj generika 10 a více let před vypršením ochrany, a tak často některé procesní patenty originátora nejsou v té době ještě publikovány. Mnohem větší je pravděpodobnost, že vybraný postup je již popsán v dosud nepublikovaných patentových přihláškách konkurenčních generických firem. Navíc některé generické firmy se doslova specializují na objevování a následné patentování polymorfů. Např. v současné době je již patentováno více než 30 polymorfů atorvastatinu a bylo podáno více než 15 patentových přihlášek na výrobu amorfního atorvastatinu. Objevují se přihlášky chránící API, mající rozličné fyzikálně-chemické vlastnosti zjevně nerelevantní k zamýšlenému použití (např. schopnost se elektrostaticky nabít, sytný objem vyjádřený tzv. Hausnerovým číslem, poměr délek stěn krystalů v určitém rozmezí, atd.). Je tedy svízelným problémem prokousat se těmito mnohdy několikasetstránkovými patenty. Dalším problémem je zjistit, zda byly tyto patenty chránící API uděleny a pokud ano, tak v jakém rozsahu.

5.4. Faktory úspěchu v oblasti generik

V současné době je oblast výroby generických léčiv vysoce konkurenční oblastí a vzhledem k omezenému množství léčiv, kterým prochází patentová ochrana, je pro komerční úspěch nutné splňovat řadu kritérií. Klíčové je vhodné načasování, v době vypršení ochrany je nutné co nejdříve přijít na trh. Samozřejmě je kvalita produktu i dokumentace, stejně jako spolehlivost vůči odběratelům. Dalším důležitým kritériem je cena, přesto zvláště u API to není kritérium, které by stálo na prvním místě. Cena API obsažené v lékové formě je totiž v závislosti na charakteru léčiva řádově v jednotkách a jen vyjimečně přesáhne 10 % celkové ceny. Ostatní zmíněná kritéria jsou proto důležitější. Přesto je samozřejmě dosažení co nejnižších nákladů pro každou generickou firmu velmi důležité. Snaží se toho dosáhnout vlastní invencí a následnou ochranou duševního vlastnictví přihlašovaním vlastních patentů. Existence vlastního patentovaného nekolizního postupu je další přidanou hodnotou. Pro snížení nákladů je v současné době také důležitá spolupráce s dodavateli intermedie, hlavně z Indie a Číny. Nezanedbatelná je i nutnost modernizace výroby.

Ne každé originální léčivo se ve velké konkurenci prosadí, jen omezenému počtu se podaří proniknout na špičku prodeje a stát se „blockbustery“ (viz tabulka I). Na druhé straně řada malých preparátů, tzv. „niche“ produktů, si najde své místo na trhu, i když jejich spotřeba je omezená. A je velice obtížné se rozhodnout, zda se soustředit na „blockbustery“ nebo na „niche“ produkty. Obecně, pokud si firma vybere „blockbuster“ a splní všechna výše diskutovaná kritéria, má velkou pravděpodobnost dosažení slušného zisku. Protože se ale na oblast „blockbusterů“ soustředí většina firem, je tento úspěch možný jen pokud splní opravdu všechna kritéria. Na druhou stranu, pokud se podaří vytipovat nějaký menší produkt, na který se nesoustředil žádný větší výrobce a podaří se získat podstatnou část trhu, lze na „niche“ produktu vydělat podstatně více než na „blockbusteru“. To se v poslední době podařilo například firmě Farmak Olomouc s preparáty tizanidin a brimonidin (viz článek P. Hradila v tomto čísle).

5.5. Hlavní činnosti při vývoji generik

Důležitost správného výběru generika již byla diskutována. Tento výběr musí být udělán na základě zhodnocení patentové situace z hlediska délky ochrany a na základě rozboru tržního potenciálu. Podstatné je i zhodnocení syntetické dostupnosti látky podle všech do té doby zveřejněných publikací a patentů, ale i zhodnocení možnosti vlastního postupu. Je tedy nutné hned zpočátku provést důkladnou patentovou a literární rešerši.

Následně musí být provedena analýza originálního léčiva, pokud možno z několika trhů. Cílem je zjistit řadu parametrů, pro syntézu API je důležitá čistota, profil nečistot a použitá forma (amorfní, krystalická, v případě polymorfie i použitý polymorf). Pokud léčivo není lékopisné, slouží tato analýza ke stanovení specifikace generické

substance, popř. lékové formy.

Vlastní syntetické práce začínou obvykle prověřením původního postupu, při kterém se syntetik často musí seznámit s pro něj zcela novým typem chemie. Pokud to lze, následuje navržení vlastního výhodnějšího postupu. Z vlastních zkušeností vím, že je velmi důležité se pokud možno zaměřit na cesty, mající s původním postupem společné intermediáty. Poté, co je vybraným postupem syntetizována cílová látka, je třeba tímto postupem připravit obvykle několikagramový vzorek, který vyhovuje předem stanovené specifikaci. Všechny nečistoty přítomné v množství 0,1 % musí být jednoznačně identifikovány a je snahou je připravit jako standardy pro stanovení odezvočných faktorů pro HPLC (pokud je substance určena pro prodej mimo firmu, bývají často vzorky vyžadovány). Po definitivním výběru syntetické cesty se průběžně provádí vývoj analytických metod, zatím bez validací. Také se musí upravit specifikace podle použitých rozpouštědel a činidel tak, aby specifikace obsahovala přípustný obsah zbytkových rozpouštědel (maximální hodnoty jsou dány směrnici), těžkých kovů, atd.

Obvykle již v této fázi se nasadí malé vzorky k určení orientačních stabilit v běžném obalu (obvykle při 20 °C, 45 °C, 60 °C), vyhodnocení těchto orientačních stabilit bývá prováděno po 1 měsíci a dle výsledků se zvolí další odběry. Následuje provedení zátěžových testů, při nichž je substance podrobena zátěži, obvykle tepelné a UV záření. Stabilita roztoku substance je sledována po přidání kyseliny, zásad a oxidačních činidel. Podmínky těchto zátěží se volí podle charakteru substance. Opět je snaha identifikovat podstatné rozkladné produkty, popř. je syntetizovat.

Po definitivním výběru syntetické cesty následuje zvětšování měřítka syntézy, nejprve v laboratoři, posléze se provádějí ověřovací, tzv. „scale-up“ šarže, jejichž velikost je už směřována k velikosti příští výroby. Po nutných úpravách technologie během ověřovacích šarží se navrhne definitivní výrobní postup, kterým se vyrobí nejméně 3 pilotní šarže. Minimální velikost pilotní šarže je dána jednak velikostí budoucí výroby (ta by neměla přesáhnout desetinasobek pilotní šarže), jednak silou vyráběné lékové formy, kdy pro výrobu pilotní šarže léčiva je nutné použít substanci z jediné pilotní šarže API. Z vyhovující pilotní šarže se pak nasadí definitivní stabilitní pokusy v různých obalech, popř. u citlivých substancí s desikantem nebo pod inertním plynem. V této fázi už se také provádí validace analytických metod a kompletuje se dokumentace. V počáteční fázi jsou odběratelům vzorků poskytovány tzv. technické balíčky (Technical Package), jejichž rozsah závisí na momentálním stavu projektu. V konečné fázi je technický balíček v podstatě shodný s otevřenou částí definitivní dokumentace, která se nazývá DMF (Drug Master File). DMF se skládá z části otevřené (Open Part) a z části, která je předkládána obvykle jen regulačním autoritám a která se nazývá uzavřená část (Restricted Part).

Samostatnou kapitolou je vývoj lékové formy. Jak bylo již zmíněno, pro splnění podmínky zásadní podobnosti není třeba, aby byly použity tytéž pomocné látky (excipienty) jako u originálního léčiva. Přesto jsou údaje o

složení lékové formy originátora uvedené v dostupné dokumentaci cennou informací, protože navržená léková forma generika musí být stabilní a musí mít stejnou biodostupnost jako forma originální. Orientačně se podobnost formulací stanovuje disolučními testy za různých podmínek. Protože obvykle není snadné zjistit kvantitativní složení lékové formy originátora, provádí se zkoušky kompatibility jednotlivých složek. To je zvláště důležité, pokud se do lékové formy přidávají složky, které nejsou obsaženy v původní formulaci. Tomu se mnohdy nelze vyhnout, zvláště v případech, kdy originátor používá do lékové formy jiný, např. z patentových důvodů pro generického výrobce nepoužitelný polymorf. V takovém případě je obvykle nutné pro dosažení stejných disolucí vyvinout jinou formulaci. V případě použití méně stabilního polymorfu je pak často nutné přidávat stabilizační přísady. Po vyvinutí lékové formy se zkouší, podobně jako u API, orientační stability lékové formy, v případě existence několika polymorfů se musí sledovat i polymorfní stabilita (obvykle se používá RTG prášková difraktometrie, NMR v pevné fázi, IČ nebo Ramanova spektroskopie).

Po vyhodnocení orientačních stabilit se přejde k výrobě nejméně 3 pilotních šarží, které budou použity jednak k definitivním stabilitním studiím, jednak k bioekvivalenčním studiím. Pro velikost pilotní šarže platí, že prakticky pro každou sílu (obsah API v lékové formě) musí být vyrobeno minimálně sto tisíc jednotek (tablet, dražé, apod.). Výroba klinických šarží lékové formy ale není jedinou činností nutnou pro řádnou přípravu bioekvivalenčních studií. Pečlivá příprava zahrnuje i přípravu analytických metodik stanovení léčiva a jeho metabolitů v krvi. Často se používají metody zahrnující hmotnostní spektroskopii jako detekční techniku (HPLC/MS, GC/MS). Pro běžnou bioekvivalenční studii je nutno připravit několik standardů známých nebo předpokládaných metabolitů, často i značených vhodným izotopem.

6. Závěr

Jak jsem se zmínil již v úvodu, chtěl jsem v tomto přehledu kromě obecných informací o vývoji originálních a generických léků také přinést pohled syntetického organického chemika na tuto problematiku. Snad se mi to alespoň částečně podařilo.

Poznámka

Při korekturách prováděných koncem října autor přidal následující poznámky:

1. *Bylo schváleno převzetí firmy Aventis firmou Sanofi-Synthelabo (viz. kap. 3.1.) a nově vzniklá firma Sanofi-Aventis se stala druhou největší farmaceutickou společností na světě.*
2. *Označení cerivastatinu za poslední významné léčivo stažené z trhu pro závažné nežádoucí účinky (viz. kap.*

4.3.1.) již neplatí. V říjnu firma Merck stáhla pro možnost vážných kardiovaskulárních komplikací selektivní inhibitor cyklooxygenasy-II rofecoxib (Vioxx). Toto nesteroidní protizánětlivé léčivo ze skupiny coxibů zavedené v roce 1999 dosáhlo v roce 2003 celosvětových prodejů 2,5 miliard dolarů a jde o stažení dosud nejrozšířenějšího léčiva v historii. V současné době není zcela jasné, zda tento fakt ohrozí i ostatní léčiva této perspektivní, k žaludeční sliznici šetrné skupiny coxibů.

Seznam použitých zkratk

ACE	–	Angiotensin Converting Enzyme
ADEPT	–	Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy
ADHD	–	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
AIDS	–	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANDA	–	Abbreviated New Drug Application
API	–	Active Pharmaceutical Ingredient
CRO	–	Contract Research Organization
DESI	–	Drug Efficacy Study Implementation
DMF	–	Drug Master File
FDA	–	Food and Drug Administration
GABA	–	Gamma Amino Butyric Acid
GDEPT	–	Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy
HIV	–	Human Immunodeficiency Virus
HMG CoA	–	3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl Coenzyme A
INDA	–	Investigational New Drug Application
PDEPT	–	Polymer-Directed Enzyme Prodrug Therapy
PI	–	Pharmaceutical Intermediate
QSAR	–	Quantitative Structure-Activity Relationships
SAR	–	Structure-Activity Relationships
SOSA	–	Selective Optimization of Side Activities
SPC	–	Supplementary Protection Certificate
SÚKL	–	Státní ústav pro kontrolu léčiv

LITERATURA

1. Hampl F., Paleček J.: *Farmakochemie*, skriptum. VŠCHT Praha, Praha 2002.
2. IMS World Review 2004 (<http://www.imshealth.com>).
3. Imaggon K.: *Drug News Perspect.* 16 (Suppl.),1 (2003).
4. Spilker B., Cuatrecasas P.: *Inside the Drug Industry*. Prous Science Publishers, Barcelona 1990.
5. Nagy J. M., Brown K. A.: *Drug News Perspect.* 15, 601 (2002).
6. Jacoby E., Schuffenhauer A., Floersheim P.: *Drug News Perspect.* 16, 93 (2003).
7. Warne P., Page C.: *Drug News Perspect.* 16, 177 (2003).
8. Dutta A. S., Garner A.: *Drug News Perspect.* 16, 637 (2003).
9. Ferguson M. J., Ahmed F. Y., Cassidy J.: *Drug Resistance Updates* 4, 225 (2001).
10. Niculescu-Duvaz I., Springer C. J.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 26, 151 (1997).
11. Niculescu-Duvaz I., Cooper R.G., Stribbling S. M., Heyes J.A., Metacalf J. A., Springer C. J.: *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, 480 (1999).
12. Rádl S.: *Arch. Pharm.* 329, 115 (1996).
13. Knight H. J.: *Patent Strategy for Researchers and Research Managers*. Wiley, Chichester 2001.

S. Rádl (*Zentiva – Research Institute of Pharmacy and Biochemistry, U kabelovny 130, 102 01 Prague 10*): **The Origin of a Drug – Selected Aspects of the Research and Development of Synthetic Drugs**

The article is based on a lecture presented to the general chemical audience with the aim to describe some basic facts on pharmaceutical industry and on pharmaceutical research and development. Particular stages of drug discovery and development are explained and basic approaches to this process are mentioned, together with several case studies of either well-known or interesting drugs. Differences between research-based and generic companies are discussed and the importance of both these branches of pharmaceutical industry for the progress in medicinal chemistry as well as the health care accessibility is demonstrated.

RETROSPEKTIVNÍ POHLED NA VÝZKUM A JEHO VÝZNAM PRO SPOLEČNOST FARMAK ZA UPLYNULÝCH DESET LET

PAVEL HRADIL

*Farmak a.s., Na Vlčinci 3, 771 17 Olomouc
hradil@farmak.cz*

Došlo 30.6.04, přijato 10.9.04.

Klíčová slova: výzkum, Farmak, investice, tizanidin, brimonidin

Farmak a.s. je firma, která podniká v prostorách bývalého státního podniku Farmakon v Olomouci, který získala v rámci privatizace. Výrobní náplní je především výroba farmaceutických substancí, jejich intermediátů a chemických specialit. Více než 80 % produkce se exportuje především do USA, států EU a asijských zemí.

V roce 2002 došlo u společnosti Farmak k nárůstu prodeje asi na 960 mil Kč z přibližně 460 mil Kč v roce 2001. Došlo nejen k růstu prodeje, ale i růstu provozního hospodářského výsledku. Ten se zvýšil z 30 mil Kč v roce 2001 na 459 mil Kč v roce 2002. V roce 2003 prodej mírně poklesl, ale tržby stále dosahovaly 850 mil Kč. Ve firmě je také patrná mohutná investiční aktivita. V průběhu roku 2003 byly dokončeny nové analytické laboratoře a počátkem roku 2004 byla dokončena nová víceúčelová jednotka pro výrobu substancí. V prvním čtvrtletí roku 2004 byla rovněž dokončena přestavba bývalé výrobní jednotky vitamínu C, na jejímž místě byly vybudovány laboratoře výzkumu. V současné době je budován nový výzkumný poloprovoz. Celkové výše investic se budou pohybovat kolem 400 milionů Kč.

Co se za těmito čísly skrývá? Jedná se o výsledky práce za řadu let. V roce 2002 byl uveden na americký trh po vypršení ochrany generický preparát – tizanidin, který se používá jako myorelaxans. Farmaku se podařilo získat asi 60 % generického trhu. V roce 2003 došlo k poklesu jeho cen a tím k snížení tržeb o 200 mil Kč. Část propadu však byla vyrovnána zavedením dalšího produktu – brimonidinu. Ten se používá k léčbě glaukomu. Dalšími preparáty, které by se měly uplatnit v nejbližším období, jsou alfuzosin používaný při léčbě hypertenze a benigní hypertrofie prostaty a zolpidem, který slouží jako hypnotikum.

Samozřejmě se nabízí otázka, co je důvodem toho, že zrovna tyto preparáty uspěly.

Každý, kdo pracuje v chemicko-farmaceutickém průmyslu ví, že na úspěchu preparátu se podílí celý řetěz lidí a útvarů. Pouze tehdy, když všichni zainteresovaní pracovníci zvládnou svoji roli dobře, může se dostavit úspěch. V případě, že jeden z článků selže a jeho selhání se nepodaří včas napravit, i dobrá myšlenka zapadne. Farmaku se však podařilo zvládnout celou řadu klíčových faktorů.

Výzkum syntézy tizanidinu začal v roce 1995 a již

v roce 1997 bylo vyrobeno první množství. Jeho hlavní prodej však začal až v roce 2002. U brimonidinu byla situace podobná, ale práce na tomto preparátu byly zahájeny o rok později. I v případě zbývajících dvou produktů byl výzkum zahájen ještě před rokem 2000.

Vlastním vývojovým pracem předcházela řada kroků. Jedním ze základních předpokladů byla reorganizace výzkumu. Až do roku 1990 byl výzkum organizován převážně centrálně pro celou Spofu a byl zajišťován Výzkumným ústavem pro farmacii a biochemii v Praze. Firemní výzkum přebíral výsledky tohoto pracoviště a přenášel je do průmyslového měřítka. Po rozpadu Spofy bylo nutné výzkum reorganizovat tak, aby byl schopen samostatně zvládnout veškeré fáze výzkumného procesu, tzn. včetně vypracování základního laboratorního postupu. Bylo nutné vybudovat vlastní vývojovou analytiku. Ta byla ve firmě zajišťována centrálně útvarem kontroly jakosti. Vzhledem k odlišným prioritám tohoto útvaru a výzkumu výzkumné práce nabíraly často zpoždění.

Dalším klíčovým prvkem bylo vybudování poloprovozní jednotky, kde se provádí ověřování a optimalizace laboratorních předpisů. Stavební práce trvaly sice řadu let, ale v roce 1998 byla na tomto zařízení zahájena výroba.

V případě budování analytiky i poloprovozu bylo třeba přesvědčit vedení společnosti o nutnosti investic. Z dnešního pohledu nikdo o nezbytnosti vlastní analytiky ani poloprovozu nepochybuje. V té době to však nebylo samozřejmé a s výjimkou chemických podniků, kde chemický výzkum měl velmi dobrou reputaci (jako byla např. Galena), to nebylo běžné. Samozřejmě v té době byla řada pracovišť dobře vybavena, např. Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii Praha, Výzkumný ústav organických syntéz v Rybitví nebo pracoviště Akademie věd, tam byl ale chemický výzkum hlavní náplní celého pracoviště.

Naštěstí se snahy o vybudování tohoto pracoviště setkaly s pochopením vedení podniku a v roce 1998, po dokončení poloprovozu, bylo možné pružně reagovat na měnící se poptávku na zahraničních trzích.

Dalším faktorem, který Farmaku přinesl konkurenční výhody, byl fakt, že vývoj byl zaměřen na malotonážní preparáty, tj. látky, jejichž celosvětová spotřeba se pohybuje v desítkách až stovkách kilogramů. V dnešní době je opět samozřejmé, že rozhodující není množství vyrobených tun, ale přidaná hodnota a z ní pramenící dosažený zisk. Zejména tehdy, pokud nemusíme pro danou výrobu budovat speciální zařízení, ale můžeme všechny tyto látky vyrábět na stejném zařízení – poloprovoze. V té době si to však uvědomovalo relativně málo firem, takže u již zmínovaného tizanidinu a brimonidinu byl Farmak v situaci, kdy jediná nabízená generická substance na trhu byla jeho. Firmy vyrábějící lékovou formu z naší suroviny měly konkurenční výhodu a podařilo se jim získat velkou část trhu. Rovněž se podařilo získat slušnou cenu za naše zboží.

Další výhodou bylo, že poloprovoz měl po dokončení volnou kapacitu, v krátkých časových termínech bylo možné připravit validační šarže a na jejich základě vypracovat veškerou potřebnou dokumentaci. Postupně s narůstající výrobou a výkony poloprovozu probíhala i jeho dostavba až do dnešní podoby. V dnešní době toto zařízení představuje kompaktní jednotku, která i v současnosti zajišťuje jak výrobu tizanidinu, tak i brimonidinu. Negativní stránkou současného stavu však je skutečnost, že výroba těchto lukrativních produktů má přednost a zbývá málo času na vývoj nových preparátů.

V útvaru výzkumu a vývoje dnes pracuje asi 40 lidí. Z toho 15 pracovníků má vysokoškolské vzdělání. Vlastní výzkum je rozdělen do následujících oddělení:

- dvě syntetické skupiny,
- analytické oddělení,
- poloprovoz,
- technologické oddělení,
- administrativa – technická knihovna, patenty.

Syntetické oddělení se zabývá především vypracováváním vlastního laboratorního postupu, přípravou standardů a nečistot. Pracovníci tohoto oddělení se účastní přenosu výroby a zavádění do poloprovozního měřítka.

Analytické oddělení je zaměřeno na fyzikálně-chemické metody, především plynovou a kapalinovou chromatografii, kapilární elektroforézu a DSC. Používanou technikou je rovněž GC-MS a LC-MS.

Poloprovoz je vybaven 5 reaktory o objemu 400 až 900 litrů, odstředivkou a sušicím filtrem. Na tomto zařízení probíhá jak ověřování nových technologií, tak vlastní výroba menších množství látek. Poloprovoz je vybaven čistými prostorami jak na rozvažování a nasazování surovin, tak na balení a konečné zpracování vyrobených produktů. Vlastní výroba probíhá ve třech směnách.

Technologické oddělení se zabývá návrhy nových zařízení, dozorem nad stávajícími technologiemi, administrativou spojenou s výrobou, řešením provozních problémů a v neposlední řadě i přenosem výrob z laboratoře do provozního měřítka.

Administrativa vývoje zajišťuje chod technické knihovny a patentovou agendu.

Vedle technických parametrů spojených s vývojem nových preparátů, které byly zmíněny, hrála pozitivní roli celá řada dalších faktorů. Jedním z nich byla poměrně časná účast Farmaku na specializovaných výstavách v zahraničí, kde se podařilo nalézt solidního obchodního partnera. V případě, že by námi vyvinuté a vyráběné látky byly nabízeny maličkou firmou a nekvalifikovaně, výsledek by byl mnohonásobně horší.

Pro ekonomický a obchodní úspěch preparátu je neméně důležitým faktorem otázka regulační a dokumentační. Zcela nezbytné je, že produkty musí být vyráběny za podmínek Správné výrobní praxe, úspěšná inspekce SÚKL (Státní úřad pro kontrolu léčiv) a FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) je zcela nepostradatelná. Pro každý exportovaný výrobek musí být vypracován DMF (Drug Master File). Rovněž veškeré analytické práce musí probíhat podle zásad Správné výrobní praxe. Tyto podmínky byly ve Farmaku splněny již v ranném období.

Ve většině našich chemických podniků byl výzkum v devadesátých letech minulého století hodnocen jako nepotřebná přítěž. Mnohdy bylo jeho financování redukováno a často byl výzkum zrušen. Díky dobrým výsledkům je však ve Farmaku situace jiná a výzkum je chápán jako základ pro další existenci a rozvoj firmy.

P. Hradil (*Farmak Co., Olomouc*): Retrospective View of Research and Its Significance for the Farmak Co. in the Past Decade

During the past ten years the research in the Farmak was reshaped and became its key part. It contributed significantly to good economic results and development of the company. The current structure of the research, its aims and equipment are described.

MODERNÍ BIOTECHNOLOGIE A FARMACEUTICKÝ PRŮMYSL

LADISLAV CVAK^a a MARTIN FUSEK^b

^aIVAX Pharmaceuticals s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava, ^bSigma-Aldrich, s.r.o., Pobřežní 46, 186 00 Praha 8
ladislav_cvak@ivax-cr.com, mfusek@europe.sial.com

Došlo 22.4.04, přijato 4.8.04.

Klíčová slova: biotechnologie, biofarmacie, farmaceutický průmysl, genové terapie, rekombinantní proteiny, generická léčiva

Obsah

1. Úvod
2. Současný stav farmaceutického průmyslu
3. Biotechnologie a farmaceutický průmysl
4. Budoucnost biofarmacie
 - 4.1. Nové cíle, nové výsledky
 - 4.2. Nové diagnostické postupy
 - 4.3. Nové léčebné, aplikační postupy
 - 4.4. Úloha malých firem v počátečních fázích výzkumu
5. Náklady a zisky biofarmaceutických firem
6. Závěr

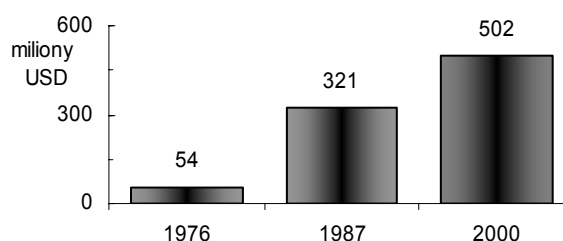
1. Úvod

Většina investorů, kteří se zajímají o farmaceutický průmysl, hledí s nadějí ke změnám, které přináší v rozvoji tohoto oboru moderní biotechnologie. Zvláště pak očekávají výsledky funkční genomiky. Dosavadní vývoj svědčí o tom, že biotechnologie přinese nové produkty, které významně rozšíří současnou paletu léčiv a přispějí k vymýcení řady chorob, které jsou nyní léčeny pouze symptomaticky. Blízká budoucnost by měla přinést i další možnosti, jako je ovlivnění exprese definovaných proteinů nemocného organismu či náhrada poškozených genů. Nové cílové molekuly a pochody pak dají předpoklad vývoje nových typů léčiv. Všechny tyto změny přinesou farmaceutickému průmyslu oživení a nový rozvoj.

Chtěli bychom v tomto článku stručně shrnout aktuální stav oboru a zamyslet se nad změnami, které lze v blízké budoucnosti očekávat. Zároveň chceme nastínit náš názor na současnou školicí a vývojové potřeby, které by měly zajistit budoucí rozvoj daného oboru v naší republice.

2. Současný stav farmaceutického průmyslu

Farmaceutický průmysl se po druhé světové válce nesmírně dynamicky rozvíjel a zažil meziroční nárůsty v desítkách procent jak v prodeji léčiv, tak v ziscích akcionářů. Tento růst byl podmíněn množstvím nově objevených etických léčiv, zahrnujících antibiotika, psychofarmaka, antireumatika, látky ovlivňující krevní tlak a řadu dalších civilizačních chorob aj. Objevem a výrobou antibiotik se na tomto růstu podílela i biotechnologie, která tak zaznamenala svůj první rozvoj a přerod v moderní vědeckou disciplínu. Tento rozvoj byl dále ovlivněn příhodnou patentovou politikou a v neposlední míře i zájmem veřejnosti utrácet za nová léčiva značné prostředky. Tento trend se zpomalil v polovině osmdesátých let a vedl k rozvoji výroby generických léčiv, tj. léčiv, jimž skončila patentová ochrana a které generičtí výrobci nabízejí za ceny podstatně nižší než originální výrobci. V roce 1984 americká vláda schválila novou úpravu patentové ochrany a umožnila výrobcům generických léků vstoupit na trh dříve a razantněji (podle tzv. Hatchova-Waxmanova zákona mohou americké generické firmy vyvíjet a registrovat generické léky už během platnosti patentové ochrany příslušného originálního léčiva). Velcí výrobci originálních léčiv pocítili pokles obrátu i zisku. Reagovali zvýšením výdajů na výzkum a vývoj (viz obr. 1), přičemž množství tzv. terapeutických cílů bylo omezené a nové cílové molekuly byly nacházeny jen pomalu. Zvýšená konkurence donutila velké firmy ke spojování a vzniku obřích firem. Vysoké náklady na výzkum a vývoj, relativně krátká patentová ochrana a s tím spojená konkurence generických výrobců a v neposlední řadě absence snadno dostupných cílů vede v posledních letech k malému počtu nově zavedených sloučenin (NCE – New Chemical Entities), přičemž řada z nich nepřináší očekávané zisky (říká se, že nové léčivo, které se nedostane mezi 100 nejprodávanějších léčiv, ne-



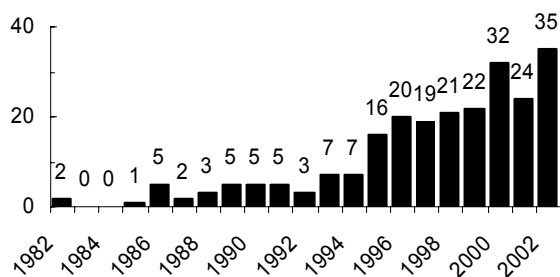
Obr. 1. Náklady na vývoj jednoho léčiva v milionech USD (přepočteno na hodnotu USD v roce 2000). Kompilováno z dat veřejně uváděných farmaceutickými výrobci

vrátí náklady spojené s jeho vývojem). V současnosti toto obrovské odvětví není schopno plnit očekávání akcionářů. A právě tyto problémy má vyřešit moderní biotechnologie, která se stala novou nadějí akcionářů.

3. Biotechnologie a farmaceutický průmysl

Jak již bylo uvedeno výše, vstoupila biotechnologie do farmacie razantně po druhé světové válce a znamenala obrovský rozvoj výroby antibiotik a později i některých dalších látek, jako námelových alkaloidů, lovastatinu, cyklosporinu, orlistatu aj. Všechny tyto látky však byly ve své podstatě malé organické molekuly, které se od jiných aktivních substancí (syntetických či izolovaných z rostlin) lišily pouze svým původem – byly produkovány fermentačně. Tyto bioprodukty byly vesměs izolovány extrakcí do organického rozpouštědla a potom dále čištěny metodami obvyklými pro běžné organické látky, tj. chromatografií a krystalizací. Také ke kontrole jejich kvality byly a jsou používány standardní analytické metody, obvykle tenkovrstvá, kapalinová či plynová chromatografie. Třebaže si tyto produkty stále udržují významné postavení mezi léčivy (mezi 100 nejprodávanějšími léčivy za rok 2000 jsme napočítali 11 malých organických molekul fermentačního původu¹), nejedná se o produkty, kterým je tento článek věnován. Produkty, které mění tvář dnešního farmaceutického průmyslu, jsou vesměs makromolekulární látky, většinou peptidy, bílkoviny nebo segmenty nukleových kyselin a jsou získávány metodami genetického inženýrství.

Jako první uvedly farmaceutické firmy na trh peptidy, které byly používány jako léčiva již dříve, ale byly izolovány z materiálů obvykle živočišného původu. Nové bioprodukty byly produkovány mikroorganismy, do jejichž DNA byl zaveden gen pro příslušnou aminokyselinovou sekvenci. První takový produkt byl rekombinantní insulin povolený v USA v roce 1982. Následovala řada produktů, jako rekombinantní lidský růstový hormon, rekombinantní



Obr. 2. Počet nově povolených biotechnologických léčiv nebo nových indikací biotechnologických léčiv v USA v letech 1982–2002. Zdroj – Biotechnology Industry Organization – www.bio.org

vakcína na Hepatitis B, interferon, erythropoietin a další. Mezi 500 celosvětově nejprodávanějšími léčivy v roce 2000 jsme napočítali 44 podobných bioproduktů, přičemž erythropoietin firmy Johnson & Johnson (Procrit) byl na sedmém místě a erythropoietin firmy Amgen (Epogen) byl čtrnáctý. Další příklady jsou uvedeny v tabulce I, která shrnuje většinu makromolekulárních bioléciv registrovaných do roku 2002. Na obr. 2 je pak uveden vývoj registrace všech bioléciv v USA do roku 2002. Světový prodej bioproduktů činil v roce 2001 28,5 miliard dolarů. Spektrum těchto produktů se v brzké budoucnosti ještě významně rozšíří, což můžeme dokumentovat několika údaji z literatury²:

- z 27 NCE povolených celosvětově v roce 2003 bylo 17 malých organických molekul a nových 10 bioproduktů,
- v roce 2002 bylo u FDA (Food and Drug Administration) registrováno 300 žádostí o registraci nových bioproduktů, což představuje cca polovinu všech žádostí,
- v roce 2002 bylo v různých fázích klinických zkoušek v Evropě 538 bioproduktů, celosvětově počet bioproduktů v klinických zkouškách už převyšuje počet malých organických molekul.

I když ne všechny produkty ve výzkumu skončí žádostí o registraci a ne všechny produkty v registračním řízení budou povoleny, je zřejmé, že jsme na prahu skutečné revoluce nových bioléciv, které v blízké budoucnosti změní naše terapeutické možnosti.

4. Budoucnost biofarmacie

Vedle výše uvedeného, řekněme, extenzivního rozvoje, kdy novými technikami byly vyvíjeny už dříve známé produkty (hormony, cytokiny a jiné proteinové faktory, monoklonální protilátky, vakcíny), je možno očekávat ještě další rozvoj spojený s vývojem nových oborů, jako je genomika a proteomika. Tyto obory přinesou zásadní převrat, a to jak ve vývoji nových léčiv, tak v diagnostice a léčbě nemocí. Vznikne nový obor, biofarmacie, která by měla přinést následující změny ve vývoji a výrobě léčiv a v diagnostice chorob.

4.1. Nové cíle, nové výsledky

Odhaduje se, že díky funkční genomice se výrazně rozšíří paleta terapeutických cílů, jejichž ovlivněním lze léčit choroby. V současnosti je popisováno 417 standardně studovaných a ovlivňovaných cílů v lidském těle, jejichž interakcí s léčivy dochází k léčení choroby nebo zmírnění jejich negativních vlivů. Současné cíle zahrnují enzymy, receptory a iontové kanály. Jako příklad můžeme použít inhibitory enzymu štěpícího angiotensin (ACE inhibitory), které snižují krevní tlak. Díky rozvoji biochemie, biologie, molekulární biologie a biotechnologie se předpokládá, že počet takových cílů vzroste na 3000–10 000.

Tabulka I

Vybraná makromolekulární bioléčiva registrovaná a prodávána v letech 2002 a 2003. Hodnota prodeje je uvedena pouze v případech, kdy se nám ji podařilo získat. Údaje o výrobci mohou být někdy matoucí vzhledem k tomu, že přípravek vyrábí a distribuují různé firmy, nebo když firma, která produkt vyvinula, byla pohlcena jinou firmou.

Název preparátu	Léčivo (vysvětlivka u obchodních názvů)	Indikace/Mechanismus působení	Povoleno FDA v roce	Prodej 2003 (mil USD)	Firma uvádějící produkt na trh
Aranesp [®]	darbepoietin α	léčení anemie	2002	1544	Amgen
Avonex [®]	interferon β 1- α	léčení roztroušené sklerózy	1996	1000	Biogen
BeneFix [®]	koagulační faktor IX	léčení hemofilie B	1997	900	Wyeth/ Baxter
Betaseron [®]	interferon β 1-B	léčení roztroušené sklerózy	1993	456	Berlex Lab a Chiron Corp.
Bioclata [™]	faktor VIII	léčení hemofilie typu A, prevence a kontrola krvácivosti, předoperační příprava pacientů s hemofilií A	1993	nenalezeno	Aventis Behring
Biotropin [™]	lidský růstový hormon	léčení nedostatku hormonu	1995	nenalezeno	Biotech General
Campath [®]	alemtuzumab (monoklonální protilátka)	léčení chronické leukémie B-buněk u specifické skupiny pacientů	2001	45	Ilex Oncology, Millenium pharm., Berlex
CEA-Scan [®]	acritumomab (protilátka značené techneciem 99)	kontrastní látka pro detekci metastáz u rakoviny střeva a konečníku	1996	nenalezeno	Immunomedics
Cerezyme [®]	imiglucerasa (rekombinantní β -glukocerebrosidasa)	léčení Gaucherovy choroby 1	1994	650	Genzyme
Comvax [™]	vakcína (proteinový konjugát antigenů meningokoku a hepatitidě B)	vakcinace proti <i>Haemophilus Influenzae</i> typ B a hepatitidě B u novorozenců matek HbsAg-negativních	1996	50	Merck and comp.
Elitek [®]	rasburicase (rekombinantní urát-oxidasa – produkováno v kvasinkách)	úprava plasmatické hladiny kyseliny močové u dětských chemoterapií	2002	nenalezeno	Sanofi-Synthelabo
Enbrel [®]	etanercept (blokování účinku „Tumor necrosis“ faktoru)	léčení pacientů revmatoidní artritidy (v určitých typech) a dalších autoimunitních chorob	1998 (inovace 2002)	1300	Amgen a Wyeth
Engerix-B [®]	vakcína proti hepatitidě typu B	vakcína proti hepatitidě B u pacientů trpících chronickou hepatitidou C	1989	nenalezeno	GlaxoSmithKline
Epogen [®]	erythropoietin α	léčení anemie	1989	2200	Amgen
Fabrazyme [®]	agalsidase β (α galactosidasa A, rekombinantní produkována v CHO buňkách)	léčení Fabryho nemoci	2001	61	Genzyme

Pokračování tabulky I

Název prepa- rátu	Léčivo (vysvětlivka u ob- chodních názvů)	Indikace/Mechanismus pů- sobení	Povoleno FDA v roce	Prodej 2003 (mil USD)	Firma uvádějící produkt na trh
Follistim TM	folliotropin β (rekombinantní folikuly stimulující hormon)	léčení určitých typů mužské sterility	1997	nenalezeno	Organon (AkzoNobel)
FORTEO [®]	teriparatide, (rekombinantní parathyroidní hormon)	léčení osteoporosy	2002	nenalezeno	Eli Lilly
GenoTropin [®]	somatotropin	léčení nedostatku růstového hormonu, léčení růstových poruch	1995	329	Pharmacia (Pfizer)
Geref [®]	29-amikyselinový peptid (GRF 1-29 NH ₂) odpoví- dající N konci hypofyzární- mu hormonu uvolňujícímu lidský růstový hormon („human growth hormone- releasing hormone“, GHRH nebo GRF)	léčení nedostatku růstového hormonu, léčení růstových poruch	1997	nenalezeno	Serono S.A.
GlucaGen [®]	glukagon	léčení těžkých hypoglykemií u diabetiků přijímajících insulin, diagnostika	1998	65	Novo Nordisk (Zymogenetics)
Gonal-F [®]	foliotropin α	léčení neplodnosti	1998	526	Serono S.A.
Helixate [®]	faktor VIII	léčení hemofilie typu A	1994	nenalezeno	Aventis Behring
Herceptin [®]	trastuzumab (monoklonální protilátka)	léčení metastáz rakoviny prsu u nádorů se zvýšenou expresí proteinu HER2	1998	385	Genentech Inc
Humalog [®]	insulin	léčení diabetes	1996	1060	Eli Lilly
Humatrope [®]	somatotropin	léčení nedostatku růstového hormonu	1996	370	Eli Lilly
HUMIRA TM	adalimumab, (monoklonální protilátka)	léčení revmatoidní artritidy určitých typů	2002	nenalezeno	Cambridge Antibo- dy Technologies, Abbot
Humulin [®]	insulin	léčení diabetes	1982	1021	Eli Lilly
Infergen [®]	interferon α 1	léčení určitých typů hepatiti- dy C	1997	20	InterMune Phram., Amgen
Intron A [®]	interferon α	léčení některých typů leuké- mie, Kaposiho sarkomu, hepatitidy a dalších indikací	1986	1851	Schering-Plough Corp.
Kineret TM	anakinra	léčení revmatoidní artritidy	2001	nenalezeno	Amgen
Kogenate [®] FS	faktor VIII	léčení hemofilie	1989	nenalezeno	Bayer
Lantus [®]	insulin glargine	biosyntetický insulin pro pacienty trpící diabetes 2. typu	2000	nenalezeno	Aventis

Pokračování tabulky I

Název preparátu	Léčivo (vysvětlivka u obchodních názvů)	Indikace/Mechanismus působení	Povoleno FDA v roce	Prodej 2003 (mil USD)	Firma uvádějící produkt na trh
Leukine®	„granulocyte macrophage colony stimulating factor“	při autologních transplantacích kostní dřeně, při léčení leukocytů, při chemoterapiích a dalších aplikacích	1991	nenalezeno	Berlex Lab.
LYMERix™	rekombinantní OspA lipoprotein	prevence boreliózy	1998	nenalezeno	SmithKlineBeecham
Mylotarg™	gemtuzumab ozogamycin (protilátka spojená s chemoterapeutikem)	léčení CD33 pozitivních, akutních myeloidních leukémií.	2000	nenalezeno	Celtech Pharm. and Wyeth
Neulasta™	pegfilgrastim, viz Neupogen	snížení výskytu infekcí u určitých typů rakoviny léčených chemoterapií	2002	1200	Amgen
Neumega®	oprelvekin (rekombinantní interleukin II)	prevence trombocytopenie indukované chemoterapií u pacientů s rakovinou	1997	nenalezeno	Wyeth/ Baxter
Neupogen®	filgrastim (rekombinantní „granulocyte colony-stimulating factor-G“ CSF)	léčení neutropenie indukované chemoterapií	1991	1267	Amgen
Norditropin®	somatotropin	léčení nedostatku růstového hormonu	1995	370	Novo Nordisk
Novolin®	insulin	léčení diabetes	1982	2880	Novo Nordisk
NovoSeven®	koagulační faktor VIIa	léčení krvácení u pacientů s hemofilií typu A a B s inhibitory faktorů VIII nebo IX	1999	645	Novo Nordisk
Nutropin®	somatotropin	léčení nedostatku růstového hormonu	1993	297	Genentech Inc
Ontak®	denileukin diftiox (fúzní protein IL-2 a fragmentu toxinu záškrty)	léčení pacientů s lymfomem jejichž maligní buňky exprimují CD25 část receptoru pro interleukin 2	1999	nenalezeno	Ligand pharm.
Orthoclone OKT3®	muromomad-CD3	prevence odmítnutí transplantovaných ledvin	1986	nenalezeno	OthoBiotech (Johnson and Johnson)
Pediarix™	směsná vakcína proti záškrtu, tetanu, černému kašli, obrně a hepatitidě B obsahující rekombinantní hepatitis.B antigen	prevence onemocnění záškrtem, tetanem, černým kašlem, obrnou a hepatitidou B	2002	nenalezeno	GlaxoSmithKline
Pegasys®	peg-interferon $\alpha - 2a$	léčení chronické hepatitidy C, léčení hepatitidy v kombinaci s Ribavirinem	2002	nenalezeno	Roche a Nektar Therap.
PEG-Intron™	modifikovaný interferon $\alpha 2b$	terapie chronické hepatitidy C	2001	zahrnuto v Intron A	Enzon Inc a Schering - Plough Corp.

Pokračování tabulky I

Název preparátu	Léčivo (vysvětlivka u obchodních názvů)	Indikace/Mechanismus působení	Povoleno FDA v roce	Prodej 2003 (mil USD)	Firma uvádějící produkt na trh
Procrit [®]	erythropoietin α	léčení anemie	1990	3984	Johnson & Johnson, Ortho Biotech Inc.
ProstaScint [®]	indium In 111, capromab pendetide	kontrastní látka pro detekci rakoviny prostaty pro pacienty u kterých byl pozitivní výsledek biopsie	1996	nenalezeno	Cytogen Corp.
Proleukin IL-2 [®]	aldesleukin (rekombinantní lidský interleukin 2)	léčení rakoviny ledvin/metastatického myelomu	1992	nenalezeno	Chiron Corp.
Protropin [®]	somatotropin	léčení nedostatku růstového hormonu	1985	nenalezeno	Genentech Inc
Pulozyme [®]	dornase α (rekombinantní deoxyribonukleasa I)	léčení cystické fibrosy	1993	nenalezeno	Genentech Inc
Rebetol [™]	kombinace Ribavirinu a α interferonu	léčení chronické hepatitidy C	1998	zahrnuto v Intron A	Schering-Plough Corp.
Rebif [®]	interferon β 1 - a	léčení roztroušené sklerozy	2002	819	Serono S.A. & Pfizer, Inc
Recombinate [®]	rekombinantní faktor VIII	srážlivost krve při hemofilii typu A	1992	nenalezeno	Baxter Health Corp.
Recombivax [®]	hepatitis B vakcína	vakcína proti hepatitidě B	1986	nenalezeno	Merck & Comp.
ReFacto [®]	rekombinantní faktor VIII	léčení krvácení v hemofilii	2000	nenalezeno	Wyeth/ Baxter
Refludan [®]	lepirudin (bivalentní inhibitor trombinu)	antikoagulant	1998	nenalezeno	Berlex Lab.
Remicade [®]	infiximab (monoklonální protilátka)	krátkodobé léčení Crohnovy choroby, léčení revmatoidní artritidy,	1998	1300	Centocor(Johnson & Johnson)
ReoPro [™]	abciximab (monoklonální protilátka)	snížení nebezpečí tvorby trombů u pacientů léčených angioplastikou a při koronárních operacích	1994	nenalezeno	Centocor(Johnson & Johnson)& Eli Lilly
Retavase [®]	reteplase (rekombinantní neglykosylovaná forma lidského tkáňového plasminogenu aktivátoru, obsahuje 357 z 527 aminokyselin původního proteinu)	pomoc při akutním infarktu myokardu u dospělých	1996	Nenalezeno	Centocor(Johnson & Johnson)
Rituxan [™]	rituximab (monoklonální protilátka)	léčení určitých typů „non-Hodgkin lymfoma“	1997	1163	IDEC and Genentech

Pokračování tabulky I

Název preparátu	Léčivo (vysvětlivka u obchodních názvů)	Indikace/Mechanismus působení	Povoleno FDA v roce	Prodej 2003 (mil USD)	Firma uvádějící produkt na trh
Roferon A [®]	interferon α 2a	léčení leukémie, hepatitidy C	1986	nenalezeno	Hoffmann-La Roche
Saizen [®]	somatotropin	nedostatek růstového hormonu u dětí	1996	152	Serono S.A.
Serostim [®]	somatotropin	léčení kachexie	1996	89	Serono S.A.
Simulect [®]	basiliximab (monoklonální protilátka)	ochrana proti odmítnutí u transplantace ledvin	1998	nenalezeno	Novartis Pharm. Corp.
Synagis [™]	thyrotropin α	diagnostické sledování thyroglobulinu u pacientů s rakovinou štítné žlázy	1998	nenalezeno	Genzyme
TNKase [®]	tenecteplase (527 aminokyseliny derivát tkáňového aktivátoru plasminogenu, váže se k fibrinu a aktivuje plasminogen na plasmin)	léčení akutního infarktu myokardu	2000	nenalezeno	Genzyme
Twinrix [®]	rekombinantní vakcína proti hepatitidě B a inaktivovaná vakcína proti hepatitidě A	vakcinace proti hepatitidě A a B	2001	nenalezeno	SmithKlineBeecham
Velosulin [®] BR	insulin (pufrovaný roztok)	léčení diabetes	1999	nenalezeno	Novo Nordisk
Xigris [™]	drotrecogin α (aktivovaný protein C)	těžká, životu nebezpečná sepsis	2001	nenalezeno	Eli Lilly & Comp.
Zenapax [®]	daclizumab	humanizované protilátky pro prevenci odmítnutí transplantovaných ledvin	1997	nenalezeno	Hoffmann-La Roche
Zevalin [™]	ibritumomab tixetan (monoklonální protilátka s navázanou radioaktivní látkou)	léčení určitých typů „non-Hodgkin lymfomu“	2002	14	IDEC Pharm.

Nové cíle jsou objevovány téměř denně na základě dat z výzkumu lidského genomu, v kombinaci s proteomickým výzkumem a obecně funkční genomikou. Proteomika využívá výsledků genomického výzkumu (genomika je, zjednodušeně řečeno – inventarizace genomového složení daného organismu), ale soustředí se na proteinovou výbavu daného organismu. Pro aplikaci v oblasti medicíny je potom důležité nalézt a studovat proteiny, jejichž syntéza je výrazně změněna u nemocné tkáně oproti tkáni zdravé. Pokud je nalezena výrazná změna (koncentrace nebo vlastností) určitého proteinu, je tento protein analyzován a je hledána jeho úloha v dané chorobě. Tímto způsobem je objevováno mnoho nových proteinů, které je možno novými terapeutickými postupy ovlivnit, např. blokováním podávanými monoklonálními protilátkami nebo zásahem do buněčné syntézy takových pro-

teinů. Příkladem mohou být protilátky používané pro léčbu revmatoidní artritidy nebo rozvíjené postupy genové terapie.

Další dramatickou změnou, kterou přinese biofarmacie, bude možnost plně se soustředit na příčiny choroby a na jejich léčbu, což bude zásadní rozdíl od současného stavu, kdy řada léčiv odstraňuje příznaky, ne však příčiny choroby. Vraťme se k již uvedenému příkladu inhibice ACE: inhibicí tohoto enzymu se zvyšuje životní komfort pacienta, snižují se negativní následky vysokého krevního tlaku na další životní procesy, prodlužuje se délka života pacienta, avšak neléčí se původní příčina zvýšení krevního tlaku. Je předpoklad, že nová bioléčiva se budou moci soustředit na skutečné primární příčiny chorob a ty odstranit. Pokud se podíváme např. na rozvoj metod, které jsou schopny selektivně zastavit intracelulární syntézu určitých

proteinů selektivní destrukcí příslušné informační RNA, dá se očekávat, že v několika málo letech bude možno minimálně zastavit syntézu proteinu, který organismu nějakým způsobem škodí (např. některé případy rakoviny nebo autoimunitní choroby). Zcela vážně se uvažuje, že v budoucnu bude při terapii možno nejen zastavit expresi určitého proteinu, ale i opravovat gen, který tento nežádoucí protein produkuje.

Obecně lze rozdělit léčebné postupy, které přinese moderní biotechnologie, na několik kategorií:

- náhrada chybějících peptidů a proteinů (rekombinantní insulin, růstový faktor),
- blokování funkce některých peptidů a proteinů (použití monoklonálních protilátek),
- využití genů pro léčení chorob (genová terapie),
- buněčné transplantace (transplantace buněk místo orgánů),
- stimulace imunitního systému (infekční choroby, rakovina),
- potlačení imunitního systému (autoimunitní choroby),
- regenerativní medicína zahrnující tkáňové inženýrství, regenerace přírodními proteiny (např. použití erythropoietinu pro stimulaci růstu červených krvinek) a použití kmenových buněk.

Některé z uvedených metod jsou již rutinně používány (doplňování chybějících proteinů či peptidů), jiné jsou krůček od aplikace (výzkum v oblasti kmenových buněk) a jiné jsou zatím ve stadiu základního výzkumu.

4.2. Nové diagnostické postupy

Samozřejmě všechna data získaná proteomickým výzkumem jsou využitelná také při včasnejším stanovení diagnózy mnoha chorob. Dá se předpokládat, že mnoho chorob bude možno diagnostikovat ještě před narozením. Pokud si dovolíme mírně futuristický pohled, lze očekávat, že diagnóza DNA lidského plodu dovolí ještě před narozením navrhnout, zda je třeba připravit se na určitou terapii a případně tuto terapii zahájit ještě před narozením. Takováto představa není zcela utopická, jak by se mohlo zdát.

Kromě prenatalní diagnostiky je již nyní velká pozornost věnována hledání lepších diagnostických postupů pro odhalení rakovinného bujení. Stále se zvyšuje počet markerů pro neoplastická onemocnění. Jedná se o proteiny, jejichž koncentrace se mění v důsledku růstu zhoubného nádoru, který se vymkl kontrole organismu. Počet nových markerů velmi rychle zvýší právě proteomický výzkum. Je známo, že řada zhoubných onemocnění je dobře léčitelná, pokud jsou zachycena včas. Proto je tolik výzkumů soustředěno právě na odhalování nových diagnosticky významných proteinů.

4.3. Nové léčebné, aplikační postupy

Samozřejmě se budou dále vyrábět preparáty, které budou aplikovány stejně jako současná farmaka, ale postu-

py, které dovolí opravu genu, jeho „uspání“, případně jeho nové zavedení nebo opravu, si vyžádají zcela nové způsoby podávání léčiv. Jedná se především o nové systémy zavádění náhrad a oprav genů – genovou terapii. Důležitou roli v genové terapii budou hrát „dopravní“ systémy, které budou schopny dodat DNA nebo RNA do buněk, tedy uchránit je před destrukcí organismem, zajistit jejich transport do cílových tkání, penetraci přes buněčnou membránu a umožnit jejich správnou intracelulární lokalizaci.

4.4. Úloha malých firem v počátečních fázích výzkumu

Lze očekávat, že vzroste licenční aktivita velkých farmaceutických firem, které budou řadu procesů, ale i preparátů, kupovat formou licencí od menších vědeckých laboratoří. To je dosti revoluční změna oproti současnému stavu, kdy je spíše výjimkou potvrzující pravidlo, když malé pracoviště je schopno nalézt a úspěšně komercializovat malou organickou molekulu ve farmaceutickém průmyslu. Z tohoto hlediska je třeba uvést, že „boom“ firem orientovaných na biotechnologie, který probíhal v západní Evropě před 5–8 lety, Českou republiku minul, především díky nedostatku rizikového kapitálu a absenci státní politiky v této oblasti.

5. Náklady a zisky biofarmaceutických firem

Při uvádění prvních bioproduktů na trh byly náklady na jejich vývoj podstatně nižší než v případě klasických syntetických léčiv. To bylo způsobeno tím, že šlo vlastně o známé látky a změnil se pouze způsob jejich výroby. Odpadla tudíž větší část preklinického výzkumu, která u syntetických léčiv zahrnuje syntézu nových látek a jejich základní biologické testování (odhaduje se, že pouze jedna z deseti tisíc syntetizovaných látek se stane léčivem). Výběr vhodných vůdčích sloučenin a jejich hlubší farmakologické a toxikologické testování tvoří cca 40 % celkových nákladů na vývoj nového léčiva. Zbýlých 60 % jsou náklady na klinické zkoušení a ty jsou v zásadě stejné jak pro malé organické molekuly, tak pro bioprodukty³. Nižší náklady nutné pro zavedení nových bioléčiv a vysoké zisky plynoucí z jejich prodeje byly příčinou toho, že se mezi největší farmaceutické firmy dostaly nové biotechnologické společnosti jako Amgen, Genentech, Serono, Genzyme, Baxter, Biogen aj. V jiných případech biotechnologické firmy nabídly své produkty velkým tradičním farmaceutickým firmám a ty financovaly klinické zkoušení a uvedení na trh.

Trend nízkých nákladů spojených se zaváděním nových bioproduktů však zřejmě nebude pokračovat. Lze očekávat, že náklady na vývoj budoucích bioléčiv a syntetických léčiv budou podobné a že i v budoucnosti dále porostou. To samozřejmě vyvolá snahu o zavedení levnějších biogenerik. Tady je však situace poněkud komplikovanější než u tradičních léčiv, a to ze dvou důvodů. Ten první souvisí s definicí čistoty makromolekulárních látek⁴.

Zatímco se všeobecně věří, že čistotu malých organických molekul lze jasně definovat a přítomné nečistoty identifikovat, stanovit a toxikologicky kvalifikovat, u makromolekulárních látek taková víra chybí. Proto musí každý výrobce definovat svůj výrobní postup a prokázat účinnost a neškodnost svého produktu v biologických testech zahrnujících kompletní klinické zkoušení. Druhý problém souvisí s definicí pravidel pro stanovení bioekvivalence. U malých organických molekul se bioekvivalence stanovuje farmakokineticky: po podání generického léčiva skupině zdravých dobrovolníků musí být dosaženo stejných plazmatických hladin jako u originálního léku. Takto jednoduše u bioléciv postupovat nelze. Pravidla pro definování bioekvivalence bioléciv jsou v současné době předmětem vědeckých diskusí a nezdá se, že budou definována v nejbližší budoucnosti, třebaže generické firmy i veřejnost se jich dožadují. Postupně jsou a budou definována pravidla pro jednotlivé produkty (inzulin, somatostatin, erythropoietin). Zatím jsou však všechny bioprodukty registrovány jako originální léčiva. Pokud chtějí generické firmy vstoupit na trh bioléciv, musí se podříditi pravidlům a prokázat čistotu, účinnost a neškodnost svých produktů stejně jako firma, která první daný produkt registrovala.

6. Závěr

Bioléciva mění tvář farmaceutického průmyslu a v brzké budoucnosti změní i naše terapeutické možnosti. Je otázkou, jsme-li v České republice na tyto změny připraveni, lépe řečeno, máme-li odborníky, kteří by se mohli zapojit do celosvětového vývoje.

Náš farmaceutický průmysl (humánní medicína) se na tomto vývoji zatím podílí jen minimálně. Situace našeho tradičního výrobce vakcín (dříve Ústav sér a očkovacích látek, později Sevac, Sevapharma) je nepříznivá. Provoz krevních derivátů firmy Sevac koupila firma Baxter a po přestavbě provozu zahajuje výrobu chřipkových vakcín s napojením na výzkum a vývoj mateřské firmy v Rakousku. Provoz pražské části firmy Sevapharma je omezen a neodpovídá dřívějšímu vědecko-výzkumnému a výrobnímu potenciálu. Aktivity v oblasti monoklonálních protilátek vyvíjí Ivax Pharmaceuticals ve spolupráci s firmou ExBio. V oblasti veterinárních preparátů je aktivní firma Biofarm, kde jsou ve spolupráci s pracovišti Akademie věd rozvíjeny metodiky transgenních zvířat. Jiné příklady moderních biotechnologií v domácím farmaceutickém průmyslu se nám nepodařilo zjistit.

Náš základní výzkum sice řeší řadu projektů, které souvisejí s výrobou i použitím bioléciv, ale nemá partnery ve farmaceutickém průmyslu, kteří by s nimi spolupracovali a jejich výsledky realizovali. V nynějším období probíhají závody v patentování genů, sekvencí, proteinů

a jiných entit využitelných pro výrobu budoucích bioléciv, bohužel na institucích, které jsou mimo tuto republiku. Nicméně lze alespoň konstatovat, že náš základní výzkum, jak na univerzitách, tak na pracovištích Akademie věd, může být zásobárnou odborníků pro případné aplikace ve výrobě či kontrole. Státní programy se v tomto směru soustřeďují na podporu vědecko-výzkumných center, ale vzhledem k důležitosti tohoto oboru je otázkou, zda je to podpora adekvátní.

V učebních plánech univerzit jistě studenti uslyší o technikách genové manipulace či o technikách izolace a charakterizace bioproduktů. Obáváme se však, že o současném trendu v pronikání bioléciv na trh se dozvědí jen málo a to dokonce i na farmaceutických fakultách.

Je mimo rámec našich možností hodnotit, jak jsou na nová bioléciva připraveni naši lékaři. Letmý pohled do aktuálních studijních textů z farmakologie o tom nesvědčí. Ona totiž tato léčiva poněkud vybočují z klasického konceptu farmakologie, založeném na poměrně malém počtu klasických receptorů.

LITERATURA

1. Pharma Business, May/June, 34 (2001).
2. Scrip, 2782, 14 (2002).
Pharma Marketletter, Nov. 11, 13 (2002).
Pharma Marketletter, Jan. 19, 24 (2004).
3. DiMasi J. A., Hansen R. W., Grabowski H. G.: *J. Health Econom.* 22, 151 (2003).
4. Crommelin D. J. A., Storm G., Verrijck R., de Leede L., Jiskoot W., Hennik, W. E.: *Int. J. Pharmaceutics* 266, 3 (2003).

L. Cvak^a and M. Fusek^b (^a*IVAX Pharmaceuticals Ltd, Opava*, ^b*Sigma-Aldrich Ltd, Prague*): **Modern Biotechnology and Pharmaceutical Industry**

The aim of this article is to give a brief overview of major changes in pharmaceutical industry due to development of new drugs based on biotechnology. Biotechnological approaches are the main hope for development of this industrial branch in coming decades. New drugs range from diagnostic tools to preventive drugs and new therapeutics. The new age of biotechnology drugs based on results of genomic and proteomic research promises an entirely new approach to prevention and cure of diseases. Unclear is the future of generic biotechnology drugs, which is an important factor for the local pharmaceutical industry. The situation of biopharmaceutics in the Czech Republic is also discussed. An overview of major drugs marketed until 2003 is given.

MANNICHOVA A PŘÍBUZNÉ REAKCE V TOTÁLNÍ SYNTÉZE ALKALOIDŮ

JOSEF HÁJÍČEK

Zentiva/Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, a.s.,
U kabelovny 130, 10237 Praha 10
josef.hajicek@zentiva.cz

Došlo 11.8.04, přijato 11.10.04.

Klíčová slova: alkaloidy, totální syntéza, Mannichova reakce, dvojná vazba C=N, imin, iminium, *N*-acyliminium, cyklizace, kaskádové/tandemové reakce

Obsah

1. Úvod
2. Rané období
3. Klasické období
4. Období systematického rozvoje
5. Mannichova a příbuzné reakce
6. Mannichova reakce na přelomu století. Výhled

Článek umožňuje stručný náhled do vývoje a současného stavu totální syntézy alkaloidů, přičemž se soustřeďuje na transformace dvojných vazeb C=N. Na konkrétních příkladech je ukázáno použití Mannichovy reakce a dalších příbuzných procesů, které reprezentují základní metody syntézy těchto sekundárních metabolitů.

1. Úvod

Alkaloidy představují patrně strukturně nejrozmanitější skupinu přírodních látek¹. Vznik cílené chemie alkaloidů můžeme klást zhruba do počátku 19. století, kdy byly izolovány první alkaloidy v čistém stavu. V mnoha případech však bylo nutno vynaložit enormní množství degra-

dační práce, v průběhu často více než celého století, k tomu, aby byla určena struktura izolovaných bazí. Postupné rozšiřování arzenálu strukturního chemika po 2. světové válce o efektivní metody, jako např. hmotnostní, a zvláště NMR spektroskopii a chiroptické metody, vedlo k nesmírnému urychlení procesu strukturní analýzy. V závěrečných dekadách 20. století izolační práce již prakticky bez výjimky popisují i úplně určené struktury izolovaných alkaloidů, včetně absolutní, nebo alespoň relativní stereochemie.

Obdobný vývoj zaznamenala i syntéza, a zvláště totální syntéza alkaloidů. Její pokrok souvisel s rozvojem teoretické organické chemie, obecné organické syntézy a speciálních metod, zvláště chemií C=N dvojných vazeb. Praktická realizace byla podporována dostupnými metodami strukturní analýzy. Některé z publikovaných syntéz alkaloidů patří ke zlatému fondu totální syntézy²⁻⁴.

Základním zdrojem informací o alkaloidech je několik mnohasvazkových monografií⁵⁻⁷, zvláště *The Alkaloids*, založené R. H. F. Manskem. Výborným zdrojem informací nejen o syntéze alkaloidů je referátový časopis *Natural Product Reports*⁸, v němž vychází pravidelně tématicky zaměřené články (přehledový článek je zpravidla označen R^x).

Omezený prostor je důvodem, proč se tento přehled pokouší pouze nastínit možnosti, které v syntéze těchto sekundárních metabolitů představují transformace dvojných vazeb C=N. Ze stejného důvodu je v některých případech ve schématech znázorněna pouze sekvence jinak dlouhé totální syntézy; rozšířená verze literatury se zachovaným číslováním je umístěna na webových stránkách časopisu Chemické listy (<http://chemicke-listy.vscht.cz>). Přehled používaných zkratk čtenář najde např. v cit.²⁻⁴, případně v citovaných pracích, a 0 °C 1 h → rfl (0,5 h) 2 h znamená, že směs byla nejprve udržována 1 h při 0 °C, potom zahřáta během 0,5 h k varu a dále zahřívána k varu 2 h.

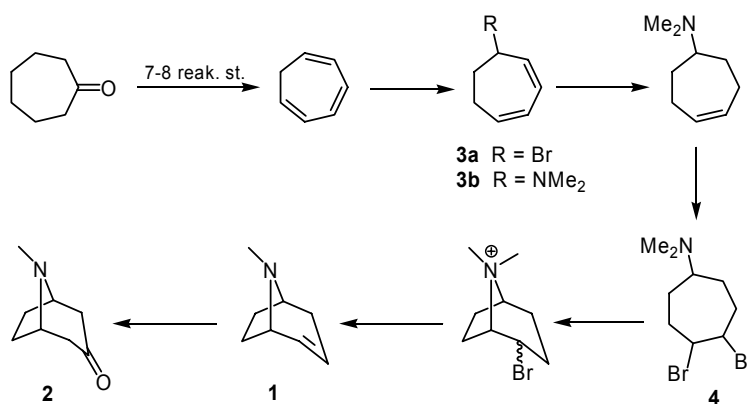


Schéma 1. Historická syntéza tropinonu

2. Rané období

Syntéza alkaloidů se zpočátku koncentrovala na jednodušší typy z praktických důvodů: U komplikovanějších alkaloidů prostě nebyly známy struktury; např. u morfinu trvalo úplné určení struktury 121 let (1804-1925), u strychninu 127 let (1819-1946). Prvním alkaloidem získaným totální syntézou je patrně racemický i opticky aktivní koinin, připravený v roce 1886 Ladenburgem⁹. Vývoj syntéz

alkaloidů ilustruje dobře příklad bicyklického tropanového skeletu. První syntéza tropidinu (1) a tropinonu (2) je poplatná době svého vzniku¹⁰ (konec 19. století), a spočívá v postupném budování skeletu cílové sloučeniny (Schéma 1). Výchozí cykloheptanon byl konvertován v cykloheptatrien a dále přes intermediát 3 v symetrický dibromamin 4; jeho cyklizace vedla přes tropidin (1) k tropinonu (2).

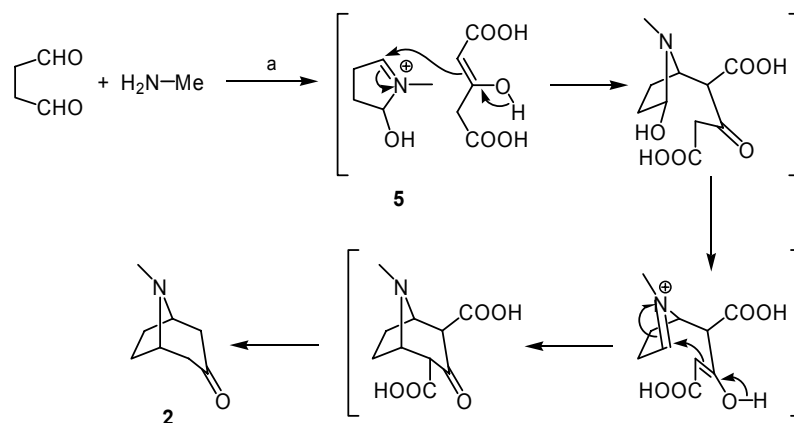


Schéma 2. Syntéza tropinonu; činidla a podmínky: a) H_2O , pufr, pH 3–11 (47–86 %)

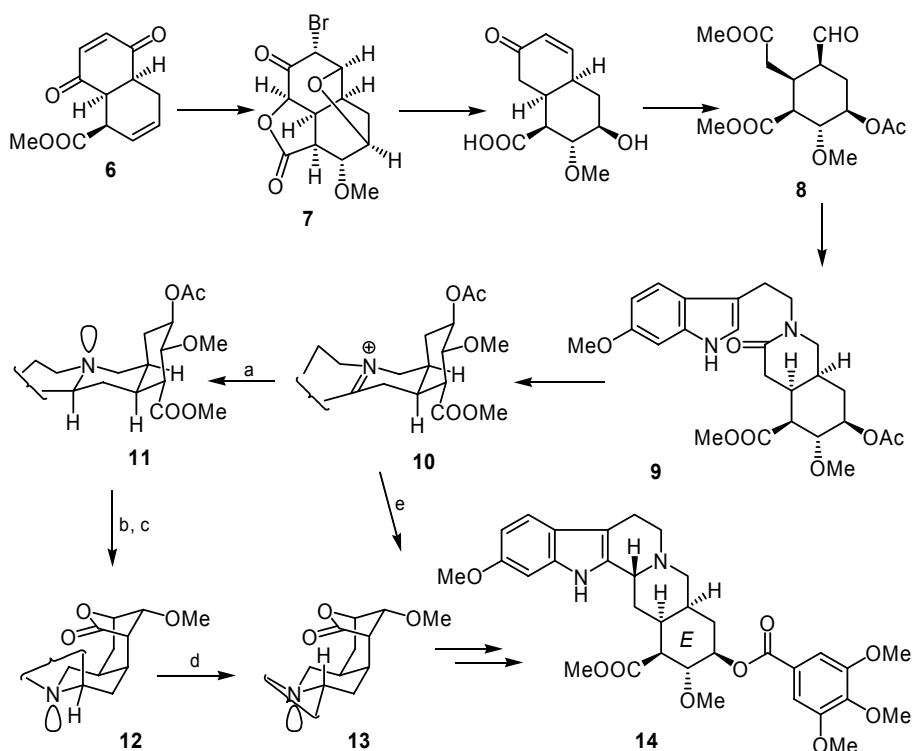


Schéma 3. Syntéza (-)-reserpinu; činidla a podmínky: a) NaBH_4 , MeOH vod. b) K_2CO_3 , MeOH vod., rfl 2 h. c) DCC, py, 100 °C 2 h. d) $\text{Me}_3\text{C.COOH}$, xylen, rfl 16 h. e) Zn, HClO_4 , Me_2CO , THF, H_2O , rfl 20 min ($\beta\text{-H}:\alpha\text{-H}$ 3:1).

3. Klasické období

Následující syntéza tropinonu¹¹ R. Robinsona (z roku 1917) je již na první pohled odlišná. Postupné budování skeletu s použitím „průhledných“ transformací je zde nahrazeno elegantním složením molekuly z jednoduchých stavebních kamenů (Schéma 2). Kondenzace jantarového dialdehydu s methylaminem a následná tandemová Mannichova reakce iminia **5** s kyselinou acetondikarboxylovou (nejprve intermolekulární) poskytla přímo tropinon (**2**) v nízkém výtěžku. Tato totální syntéza, realizovaná na základě úvah o biosyntéze „one-pot“ (R^{12}) způsobem, je současně první biomimetickou alkaloidní syntézou ($R^{13,14}$). Postup byl optimalizován Schöpfem¹⁴, a výtěžek byl zvýšen až na 83 %. Obdobným způsobem byl z glutarového aldehydu získán pseudopelletierin^{15,16}; pozdější aplikace¹⁷.

Touto syntézou začíná období klasické, vymezené z druhé strany přibližně pracemi R. B. Woodwarda a spolupracovníků. Je to období, kdy totální syntéza byla skutečným uměním, kdy výsledek závisel na chemikově umu. Nádhernou ilustrací je Woodwardova syntéza reserpinu¹⁸ (**14**), (Schéma 3). V sérii pečlivě plánovaných experimentů byl [4+2] cykloadukt **6** konvertován v lakton **7**, mající všechna chirální centra budoucího kruhu E reserpinu se správnou relativní konfigurací. Lakton **7** byl transformován v aldehyd **8**, a posléze přes piperidon **9** v imoniou sůl **10**. Redukce (NaBH_4) poskytla očekávatelný, avšak nežádoucí stereoisomer **11**. Jeho epimerizace na C-3 bylo dosaženo po změně konformace (\rightarrow lakton **12**) a následnou kyselou isomerizací (R^{19}); získaný 3- β H isomer **13** byl potom konvertován, s využitím optického štěpení, v (-)-reserpin (**14**). Později bylo zjištěno²⁰, že redukce

imoniových solí **10** kovy v kyselém prostředí vede přímo k produktům s 3- β H konfigurací.

V tomto období byly mj. dokončeny syntézy racemického fysostigminu (Julian)^{21,22}, morfinu (Gates)²³ a strychninu (Woodward)²⁴.

4. Období systematického rozvoje

Totální syntéza kobyrové kyseliny (a vitamínu B_{12}), společné dílo týmů Woodwarda a Eschenmosera²⁵, představuje i po více než třech desetiletích jeden z největších úspěchů totální syntézy přírodních látek; v souvislosti s touto syntézou byly vyvíjeny nové postupy a byla formulována pravidla zachování orbitalní symetrie (Woodward, Hoffmann).

Přibližně zde začíná dosud neukončené období systematického a bouřlivého rozvoje syntetických metod a stereoselektivních reakcí²⁶. Často jsou to právě požadavky totální syntézy, které vedou k vývoji nových, nebo variant známých reakcí a transformací^{27–29}. Na významu nabývají kaskádové/tandemové sekvence, v nichž reakce proces zahajující je následována jednou, nebo více reakcemi stejného, nebo odlišného typu^{30–33}. Je zřetelná tendence syntetizovat látky opticky aktivní. S tím souvisí bouřlivý rozvoj enantioselektivních, s výhodou katalytických procesů, a využívání chirálních ligandů³⁴ a stavebních kamenů³⁵.

Toto období přineslo Coreyho retrosyntetickou analýzu³⁶; plánování syntéz bylo převedeno na racionální základ. Rozvíjí se rovněž Mannichova reakce a příbuzné procesy^{37,38}, které patří k základním metodám syntézy alkaloidů³⁹.

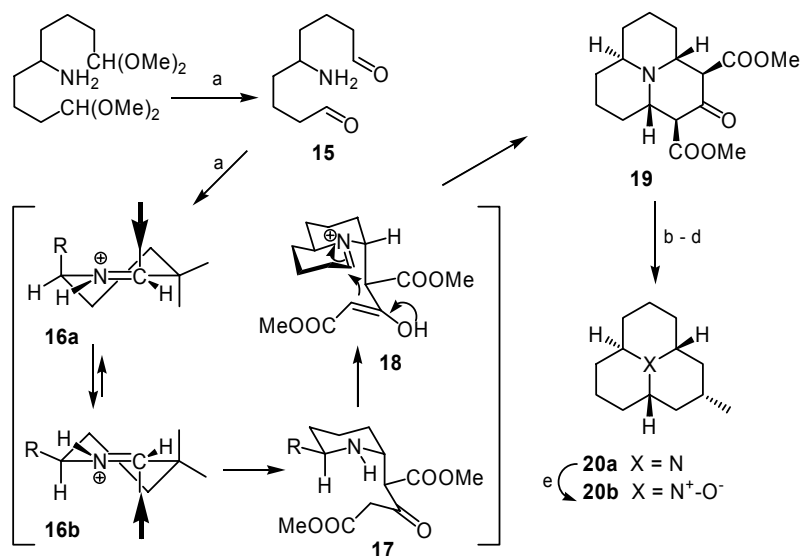
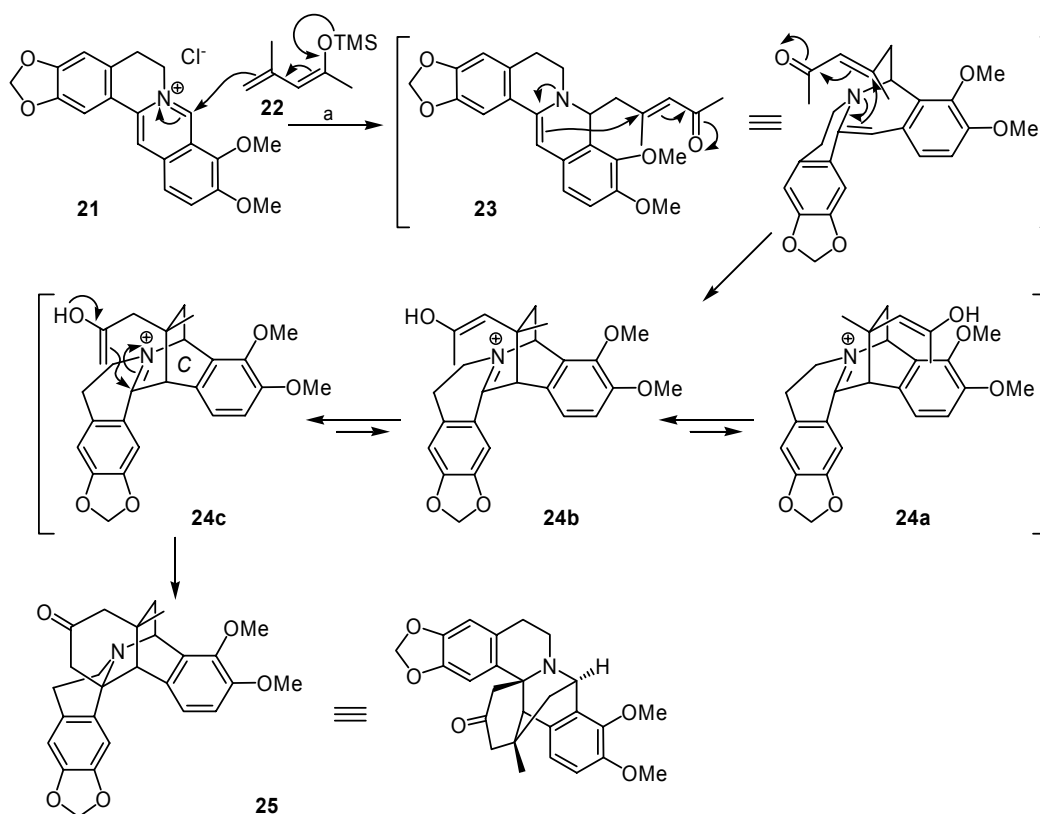


Schéma 4. **Syntéza kokcineinu**; činidla a podmínky: a) HCl vod. (pH 1), rt 1 h, potom pH \rightarrow 5,5 (25% NaOH vod. + citráto-fosfátový pufr), potom $\text{O}=\text{C}(\text{CH}_2\text{COOMe})_2$, rt 24 h, potom pH \rightarrow 8, rt 24 h (75 %). b) NaCl, H_2O (3,5 ekv.), DMF, rfl 4 h (56 %). c) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$, Et_2O , rt 1 h \rightarrow rfl 0,5 h (82 %). d) H_2 , 10% Pd/C, MeOH, rt 8 h. e) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , 0 °C 8 h (64 % 2 stupně)

Schéma 5. Syntéza (\pm)-karačínu; činidla a podmínky: a) DMSO, 100 °C (66 %)

5. Mannichova a příbuzné reakce

Pokročilejší variací chemie ukázané ve Schématu 2, a ilustrací uplatnění stereochemických vlivů v Mannichových procesech, je Stevensova syntéza⁴⁰ kokcineinu (**20b**) a prekococineinu (**20a**), (Schéma 4). Aminodialdehyd **15** cyklokondenzuje za vzniku iminia, které reaguje přednostně v židličkovém tranzitním stavu **16b**, v němž se vyvíjí menší pnutí během ataku nukleofilu. Obdobně se sterické a stereoelektronické efekty (R^{41}) uplatňují i v následující intramolekulární adici nukleofilu v bicyklickém iminiu (**18** \rightarrow **19**); viz R^{42} .

Pozornost si zaslouží i mnohé další totální syntézy založené na Mannichově cyklizaci, jako např. lucidulinu⁴³, lycopodinu⁴⁴ a porantherinu^{45,46}. Efektivní „one-pot“ syntéza karačínu⁴⁷ (**25**) bicykloanulací berberinu (**21**) se silyloxydienem **22** je založena na delikátní bilanci různých faktorů v Mannichově cyklizaci, (Schéma 5). Intermediát **23** podlehl intramolekulární Michaelově adici enaminu na enon a poskytl primárně směs imonií **24a** a **24b** s vaničkovou konformací kruhu C; v důsledku toho se neuplatní energetický faktor, který by jinak vedl k preferenční *anti*-adici v židličkovém tranzitním stavu. Navíc, kinetický enol **24c** je spotřebováván následnou Mannichovou kondenzací vedoucí k **25**, produktu jinak

nevýhodné *syn*-adice.

Z preparativního hlediska je celý proces velmi jednoduchý, neboť prosté zahřívání berberinu (**21**) s **22** poskytuje racemický karačín (**25**) ve výtěžku 66 %.

Elegantní konstrukce tetracyklického ketonu **31** ve Winklerově syntéze (\pm)-manzaminu A^{48} je založena na sekvenci [2+2] cykloadice a následné násobné retro-Mannichovy/Mannichovy reakce (Schéma 6). Vinylogický amid **26**, získaný adicí diynonu na azocin, fotocykloval za vzniku [2+2] cykloaduktu **27**. Cyklobutan (β -amino-keton) podlehl fragmentaci a intermediární enol okamžitě atakoval iminium **28**. Oxan **29** fragmentoval působením py/AcOH za vzniku iminia **30**; závěrečná Mannichova cyklizace umožnila izolaci tetracyklu **31** v celkovém 20% výtěžku.

Brilantní výstavba klíčového intermediátu v Magnusově novém přístupu k syntéze komplexních indolových alkaloidů⁴⁹ je založena na kaskádě iminio-vých cyklizací⁵⁰. Syntéza schizozyanového alkaloidu (-)-strepeliopinu⁵¹ (**39**) je založena na pravděpodobně biomimetickém reduktivním přesmyku⁵² indoleninu **35**, (Schéma 7). (+)-18-Methylenkadiiformin (**34**), přístupný „one-pot“ kondenzací aminu **32** s aldehydem **33**, adaptací klasického postupu dle Kuehneho, a následným optickým štěpením, byl nekysel⁵³ dekarboxylován. Získaný

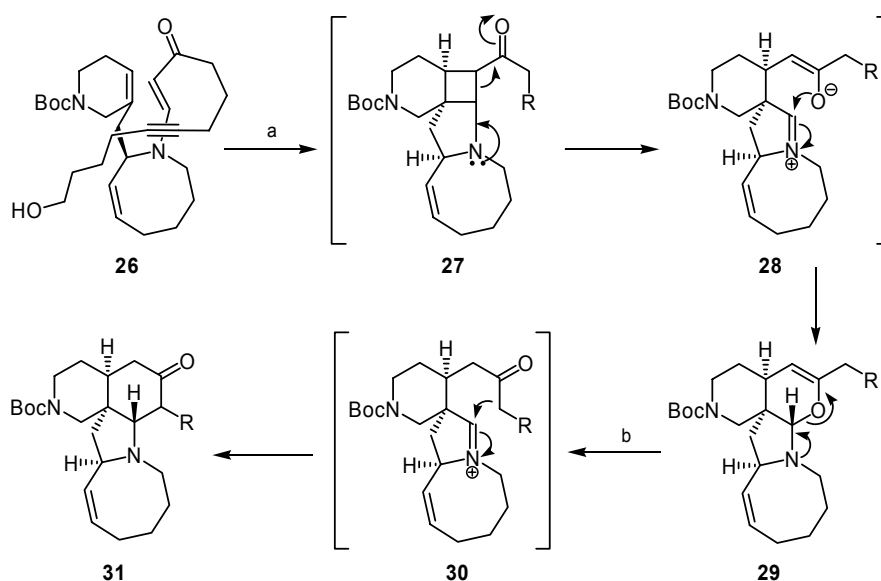


Schéma 6. Sekvence ze syntézy (\pm)-manzaminu **A**; činidla a podmínky: a) $h\nu$, MeCN. b) AcOH, py, MeCN, r.t. 4 h (20 % 2 stupně)

indolenin **35** byl v kyselém prostředí v rovnováze s iminiem **36**, které bylo atakováno stereoselektivně indolem, a generované iminium **37** okamžitě redukováno z více přístupné α -strany (Zn/CuSO₄, AcOH) za vzniku indolinu **38a**, izolovaného jako formanilid (-)-**38b**; během procesu byla vytvořena 3 chirální centra, a jejich absolutní konfigurace efektivně řízena uhlíkem C20. Obdobný přesmyk je základem biomimetické syntézy eburnanových alkaloidů⁵⁴. Předpokládané intermediáty typu **37** je možno za jistých podmínek zachytit a ve stabilizované podobě izolovat⁵⁵.

Intermediární iminia příbuzná **37** se uplatnila i v totální syntéze protinádorově účinných bisindolových alkaloidů⁵⁶. Schéma 8 ilustruje závěrečné stupně Fukuyamovy *de novo* totální syntézy (+)-vinblastinu (**39**, VLB)⁵⁷, která zahrnuje i nový radikálový postup konstrukce indolového jádra (**40** → **41**). Indol **42**, jehož 11-členný kruh byl uzavřen regioselektivním otevřením oxiranu **41** (82 %), byl elektrofilně chlorován za vzniku chlorakrylátu **43**. Působením TFA byl chlorderivát ionizován a generovaný konjugovaný akrylát **44** bezprostředně napaden vindolinem jako nukleofilem v α -poloze (obrácená regioselektivita). Takto byl izolován bis-indol **45** jako jediný stereoisomer v 97% (!) výtěžku z **42**. Odchráněním a uzavřením piperidinového cyklu byla dokončena syntéza (+)-VLB (**46**), která zahrnuje rovněž totální syntézu potřebného (-)-vindolinu⁵⁸; viz rovněž⁵⁹. Popsaný proces byl užit i v Kuehneho⁶⁰ a Magnusově⁶¹ totální syntéze VLB. V Potierově biomimetické parciální syntéze⁶² těchto bis-indolů byla konjugovaná iminia typu **44** generována fragmentací *N*-oxidu kataranthinu (Potierova-Polonovského reakce)⁶³; viz rovněž⁶⁴ pro alternativní syntézu.

Brilantní enantioselektivní syntézu alkaloidu (-)-aspidofytinu (**54**) zveřejnil Corey⁶⁵ (Schéma 9). Acetát **47**,

získaný CBS redukcí příslušného ketonu, byl konvertován v několika krocích v dialdehyd **48**. Jeho kondenzace s tryptaminem iniciovala kaskádu iminiových cyklizací, v níž primárně vzniklé dihydropyridinium **49** bylo nejprve atakováno arylem z méně bráněné α -strany (Pictet-Spengler), a potom rezultující indoleninium **50** allylsilánem z β -strany. Celý proces byl zakončen redukcí enamínu (NaBH₃CN) a pentacyklický ester **51** byl izolován v 66% výtěžku; stejně jako ve Schématu 7, přítomné chirální centrum (C20) indukovalo korektní konfiguraci 3 generovaných center chiralit. Za zmínku stojí i vysoce efektivní tvorba butanolidového cyklu, která je založena na efektivní tvorbě iminia **52** pomocí K₃[Fe(CN)₆] (**51** → **53** 92 %); další totální syntéza alkaloidu⁶⁶.

Na kaskádě nukleofilní adice na *N*-alkylpyridiniové soli a následné Pictetově-Spenglerově cyklizaci (R⁶⁷) je založen dnes již klasický Wenkertův přístup k syntéze indolových alkaloidů⁶⁸; pro příbuznou chemii viz⁶⁹. Cyklizace tohoto typu byly opakovaně užity v syntéze racemických⁷⁰ i opticky aktivních⁷¹ saframycinů. Rovněž dihydropyridiny se uplatňují jako intermediáty⁷². Klíčovým krokem v syntéze (+)-kannabisativinu je adice kovového enolátu na chirální *N*-acylpyridiniovou sůl⁷³.

Při adicích se mohou uplatnit i vinylsilany, allylsilany a propargylsilany⁷⁴, čehož bylo využito např. v syntéze pumiliotoxinů⁷⁵.

Mannichova reakce může navazovat na předřazenou reakci, a posouvat tak rovnováhu ve prospěch produktu. Na kombinaci azonia-Copeho přesmyku a Mannichovy reakce (R⁷⁶) je založena Overmanova syntéza (-)-strychninu⁷⁷ (**62**, Schéma 10); pro přehled syntéz tohoto alkaloidu viz R⁷⁸. Optická aktivita byla indukována již v úvodu syntézy: Racemický diacetát **56b**, připravený Pd-kataly-

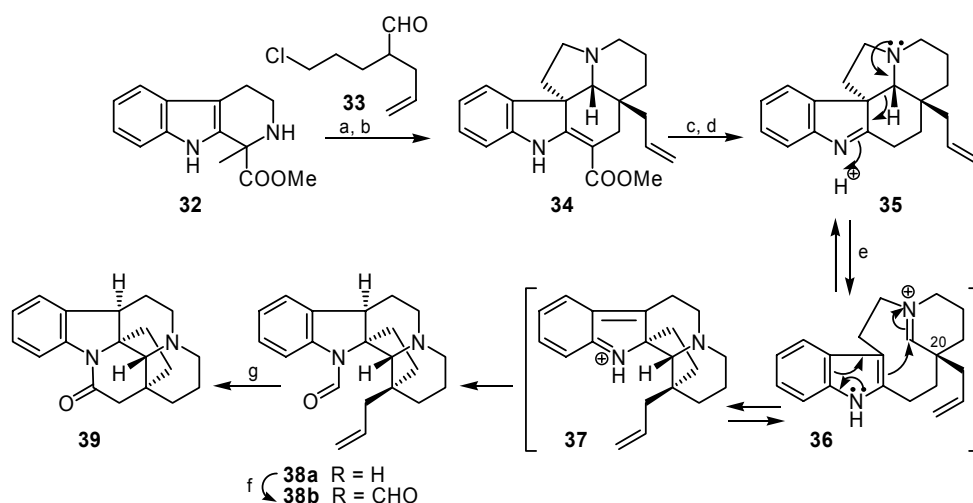


Schéma 7. **Syntéza (-)-strepeliopinu**; činidla a podmínky: a) TsOH (kat.), PhMe, rfl 110 h, potom DBU, rfl 15 h (50 %). b) kyselina (+)-vinná, EtOH, (97 %). c) KOH, EtOH, rfl 2 h. d) PhH, rfl 1 h (92 % 2 stupně). e) Zn, CuSO₄·5H₂O (kat.), AcOH, 60 °C → 102 °C 2 h, potom Zn, CuSO₄·5H₂O (kat.), 102 °C 2 h. f) HCOOH, Ac₂O, 10 °C → rt 9 h (34 % 2 stupně). g) O₃, 1N HCl vod., MeOH, rt, potom 30% H₂O₂ vod., rt 15 h (35–49 %)

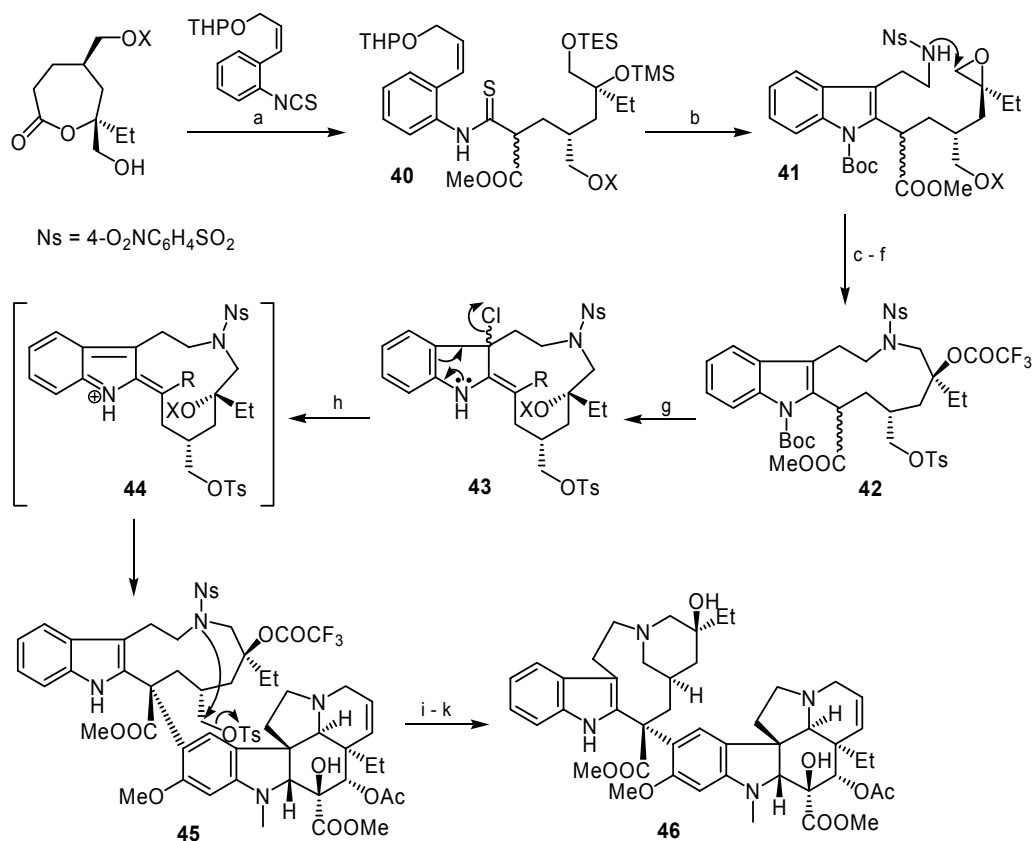


Schéma 8. **Syntéza (+)-vinkaleukoblastinu (VLB)**; činidla a podmínky: a) LDA, THF, -78 °C → 0 °C (76 %). b) Bu₃SnH, Et₃B, THF, rt (67 %); + 5 dalších stupňů. c) K₂CO₃, DMF, 90 °C (82 %). d) TFA, CH₂Cl₂, rt (85 %). e) TsCl, Me₂N(CH₂)₃NMe₂, MeCN/PhMe, rt (88 %). f) TFAA, py, CH₂Cl₂, rt (90 %). g) *i*-BuOCl, CH₂Cl₂, 0 °C. h) (-)-vindolin, TFA, CH₂Cl₂, 0 °C → rt (97 %). i) Et₃N, CH₂Cl₂, rt (kvant.). j) HSCH₂CH₂OH, DBU, MeCN, rt (76 %). k) NaHCO₃, *i*-PrOH vod., rt (66 %)

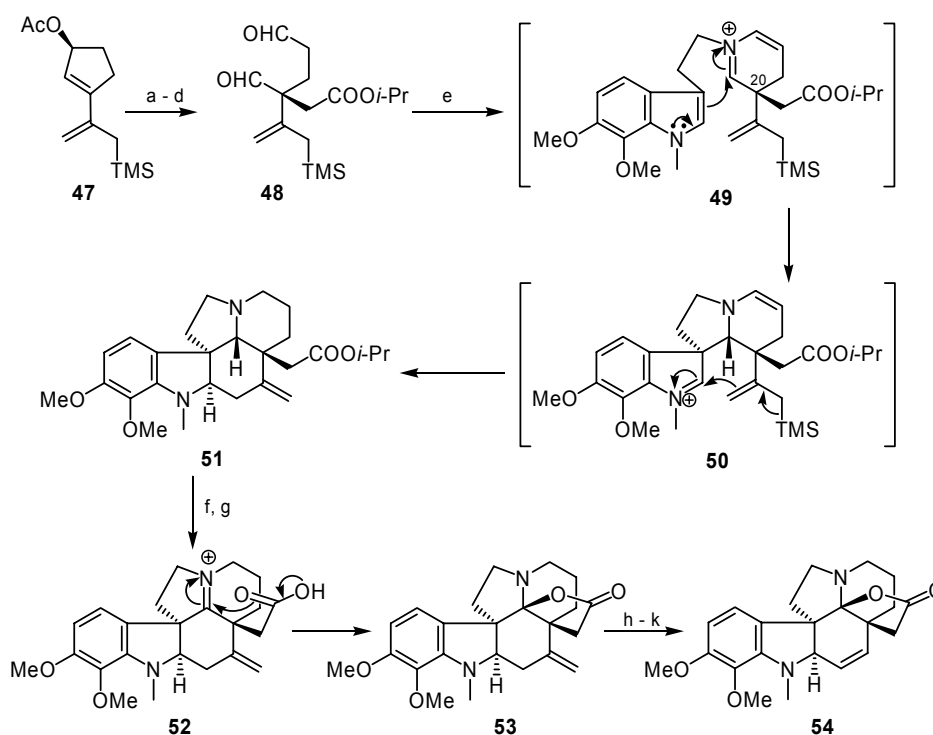


Schéma 9. **Syntéza (-)-aspidofytinu**; činidla a podmínky: a) LDA, THF, HMPA, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, potom TBDMSCl, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min \rightarrow rt 1 h \rightarrow rfl 3 h. b) EDCI, DMAP (kat.), *i*-PrOH, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 h (57 % 2 stupně). c) OsO_4 (0,05 ekv.), NMO, Me_2CO , $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ \rightarrow rt 6 h (57 %). d) NaIO_4 , THF/ H_2O (4:1), rt 35 min (98 %). e) 6,7-Dimethoxy-*N*_a-methyltryptamin, MeCN, rt 5 min, potom TFAA, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h, potom NaBH_3CN , $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ \rightarrow rt 30 min (66 %). f) NaOH vod., EtOH, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 h (88 %). g) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, NaHCO_3 , *t*-BuOH/ H_2O (1:2), rt (92 %). h) OsO_4 (1 ekv.), DMAP (2 ekv.), *t*-BuOH/ H_2O (1:2), rt 5–10 min, potom Na_2SO_3 . i) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, AcOH, CH_2Cl_2 , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (71 % 2 stupně). j) KHMDS, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, potom PhNTf_2 , $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (54 %). k) Bu_3SnH (8 ekv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,2 ekv.), THF, rt 1 h (86 %)

zovanou *syn*-1,4-adicí kyseliny octové na epoxycyklo-penten **55**, byl enantioselektivně hydrolyzován působením EEAC (pro biotransformace viz R^{79}). Získaný monoacetát (1*R*,4*S*)-**56c** byl konvertován v karbonát **56d**, přestavený v sérii reakcí na epoxid **57**. Otevření epoxidu poskytlo piperidin **58**, konvertovaný interakcí s formaldehydem v iminium **59a**. Následující stereoselektivní azonia-Copeův přesmyk vedl k isomernímu iminiu **59b**, které bylo bezprostředně atakováno C-nukleofilem (přesmykem generovaným enolem) za vzniku tricyklického aminoketonu ve výtěžku 98 % z aminu **60** byl transformován ve dvou stupních v anilinoakrylát **61**, a posléze přes Wielandův-Gumlichův aldehyd v přírodní (-)-strychnin (**62**). Postup byl rovněž aplikován v syntéze (+)-strychninu⁸⁰, aspidospermanových⁸¹, strychnanových⁸² i melodanových⁸³ bazí; byl rovněž klíčovým procesem v syntéze α -alokainové kyseliny⁸⁴ a antibiotika preussinu⁸⁵.

Adice vinylogického ($\text{R}^{86,87}$) nukleofilu **65** na C=N dvojnou vazbu dihydro- β -karbolinu **64** je úvodním krokem Martinovy syntézy⁸⁸ analogu akuammicinu **61**, a tudíž biomimetické formální syntézy racemického strychninu (\pm)-(**62**), (Schéma 11). Protože siloxydien **65** není dostatečně reaktivní, byla reakce prováděna v přítomnosti **66b**,

a probíhala tak pravděpodobně přes silně elektrofilní acyliminium (80 %). Získaný akrylaldehyd (1-oxadien) **67** podlehl intramolekulární hetero [4+2] cykloadici a získaný cykloadukt **68** (85 %) byl konvertován v indol **69b**, jehož chlorací vznikla směs 3-chlorindoleninů **70**. Pouze isomer **70b** podlehl působením silné báze transformaci (přes **71**) ve sloučeninu **61**. S využitím krotonylchloridu (**66a**) byl obdobně připraven (\pm)-akuammicin⁸⁹ (**63**).

Pěknou ilustraci opakované adice vinylogického nukleofilu (2-silyloxyfuranu) na C=N dvojnou vazbu (jedna z nich *N*-acyliminiiového typu, druhá generována dekarboxylací α -aminokyseliny) je možno nalézt⁹⁰ v enantioselektivní syntéze (+)-kroominu. Na generaci iminií dekarboxylací 5-substituovaných prolinů je založena rovněž enantioselektivní syntéza (+)-anatoxinu A^{91} (R^{92}), (+)-epibatidinu⁹³ a (+)-ferrugininu⁹⁴; příbuzný postup byl aplikován v syntéze (+)-apovinkaminu⁹⁵.

Klasickým příkladem užití *N*-acyliminiiových cyklizací ($\text{R}^{96,97}$) je syntéza (\pm)-lykpodinu (**77**) podle Storka⁹⁸, otcé enaminové chemie, (Schéma 12). *trans*-3,5-Disubstituovaný cyklohexanon **72** poskytl reakcí pyrrolidinového enaminu s akrylamidem enamidový isomer **74** (nizký výtěžek 20-25 % v důsledku neregioselektivní tvorby **73**). Přednostní *para*-adici arylu v odvozeném acyliminiu **75**

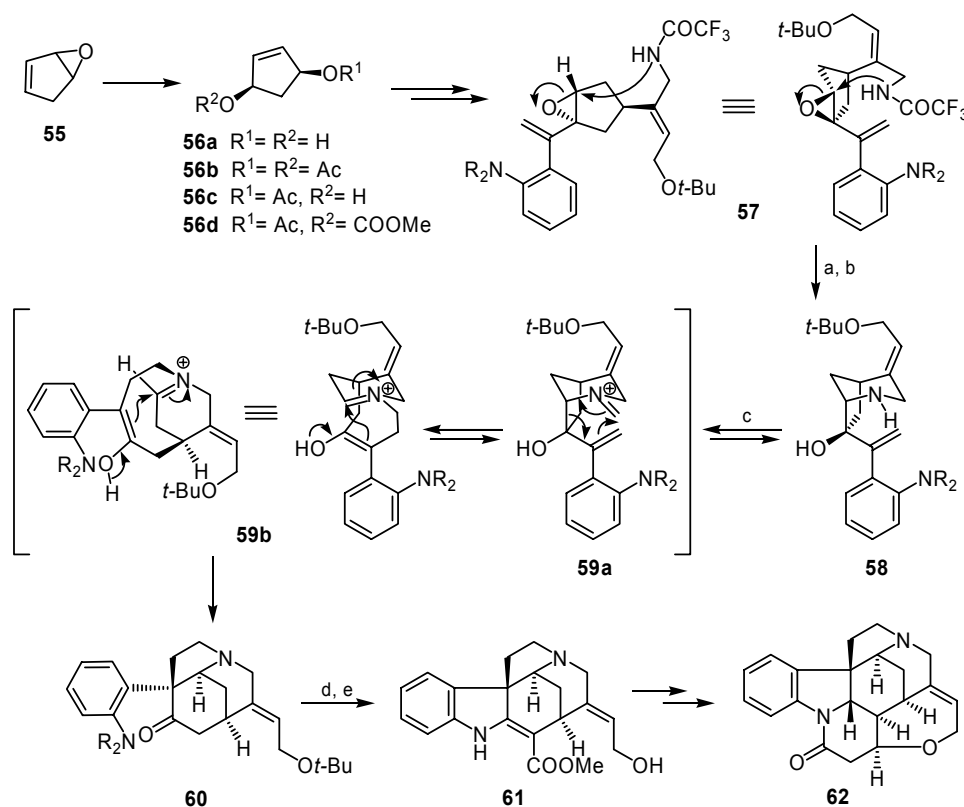


Schéma 10. **Syntéza (-)-strychninu**; činidla a podmínky: a) NaH, PhH, rt \rightarrow 100 °C 48 h. b) KOH, EtOH/H₂O (5:1), 70 °C 3 h (75 % 2 stupně). c) (CH₂O)_n, Na₂SO₄, MeCN, rfl 10 min (98 %). d) LDA, THF, -78 °C \rightarrow 0 °C 30 min, potom NC.COOMe, -78 °C 2 h, potom H₂O, -78 °C \rightarrow rt. e) 10% HCl/MeOH, rfl 12 h (70% 2 stupně)

byl získán tetracyklický laktam **76** (55 % + 29 % isomer). Zde, stejně jako ve Woodwardově syntéze strychninu²⁴, bylo degradace elektronově bohatého arylu využito k výstavbě potřebného substituentu.

Generaci *N*-acyliminiového intermediátu během kaskádového procesu (R⁹⁹) ilustruje Padwova syntéza¹⁰⁰ erythrinanového skeletu (Schéma 13). Sulfoxid **78** podlehl působením TFAA Pummererově reakci (R¹⁰¹); generované thionium bylo atakováno amidickým karbonylem za vzniku amidofuranu **79** (R¹⁰²), který poskytl intramolekulární [4+2] cykloadici intermediát **80**. Jeho bezprostřední isomerizace přítomným BF₃.OEt₂ vedla přes enamid **81** k acyliminiu **82**, které bylo atakováno arylem. Transformace proběhla stereoselektivně s výtěžkem 83 %. Spirocyclický laktam **83** byl posléze konvertován v (±)-erysotramidin (**84**), příbuzná sekvence byla užita např. v syntéze (±)-jamtinu¹⁰³; enamidů typu **81** bylo využito v syntéze dendrobinu¹⁰⁴. Syntéza (±)-aspidospermidinu je založena na kaskádové cyklizaci acyklického ketoaldehydu¹⁰⁵.

Redukce imoniových solí již byla zmíněna u reserpinu (Schéma 3). Redukce 3,4,5,6-tetrahydropyridinu je klíčovým stupněm Storkovy stereoselektivní syntézy (-)-chininu¹⁰⁶ (**92**), (Schéma 14). Tato syntéza svou celkovou strategií připomíná dnes již klasickou syn-

tézu (±)-chininu (Uskoković; Hoffmann-La Roche)¹⁰⁷, která stereosektivní nebyla, neboť za zvolených podmínek (AcOH, NaOAc) byla konjugovaná adice ve vinylicholinu **89** odvozeném z acetátu **88** reverzibilní, a vedla ke směsi deoxychininu (**90**) a deoxychinidinu (**91**) v poměru 43:57. Ve Storkově syntéze byla epimerní směs alkoholů **94** oxidována na keton, který za podmínek Staudingerovy reakce cyklizoval za vzniku tetrahydropyridinu **95** (69 %). Ten zaujímal přednostně konformaci s oběma substituenty s pseudoekvatoriální orientací a byl podle předpokladu redukován za vzniku piperidinu **95** jako jediného stereoisomeru (91 %). Z něj odvozený deoxychinin (**90**) byl konvertován v (-)-chinin (**92**) modifikovaným Uskokovićovým postupem, na jehož vysoké stereoselektivité (14:1) se podílel patrně chinuklidinový dusík (78 %).

Stereoselektivní redukce byla široce využívána např. v syntéze eburnanových alkaloidů, kde redukce tetracyklických imonií byla aplikována v syntéze (+)-vinkaminu¹⁰⁸. U téměř planárních pentacyklických imoniových solí jsou redukcí získávány nepřírozené *trans*-D/E eburnany¹⁰⁹ (sterická kontrola angulárním ethylem), zatímco redukce rozpouštějícími se kovy stereochemický průběh obrací¹¹⁰. Klíčovým stupněm v syntéze¹¹¹ monomorinu I je redukce imoniových specií s využitím stereoelektronic-

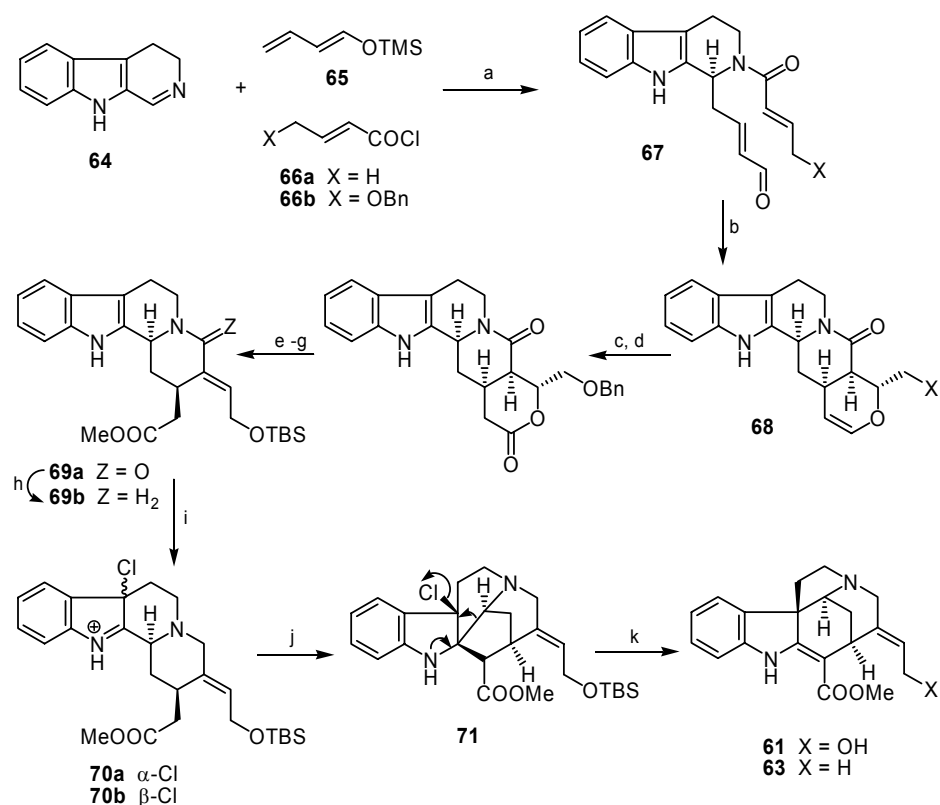


Schéma 11. **Formální syntéza racemického strychninu**; činidla a podmínky: a) **66b**, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h \rightarrow rt 1 h (79 %). b) mesitylen, $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 d (85 %). c) 70% HClO₄ vod. (kat.), THF/H₂O (5:1), $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 h (93 %). d) *trans*-PhCH=CHAc, (Ph₃P)₃RuCl₂, Et₃N, PhMe, rfl 24 h (79 %). e) H₂, 20% Pd(OH)₂/C, AcOEt, EtOH, rt 5 h (67 %). f) NaOMe (3 ekv.), MeOH, rt 24 h, potom TsOH (5 ekv.), $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h \rightarrow rt 5 h (74 %). g) TBSCl, DMAP, py, rt 24 h (71 %). h) Me₃O⁺BF₄⁻, 2,6-di-*t*-butylpyridin, CH₂Cl₂, rt 24 h, potom NaBH₄, MeOH, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min (83 %). i) SnCl₄, PhMe, $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, potom *t*-BuOCl, $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min. j) LiHMDS, THF, $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min \rightarrow rt 3 h (26 %). k) 2N HCl, MeOH, rt přes noc (83 %)

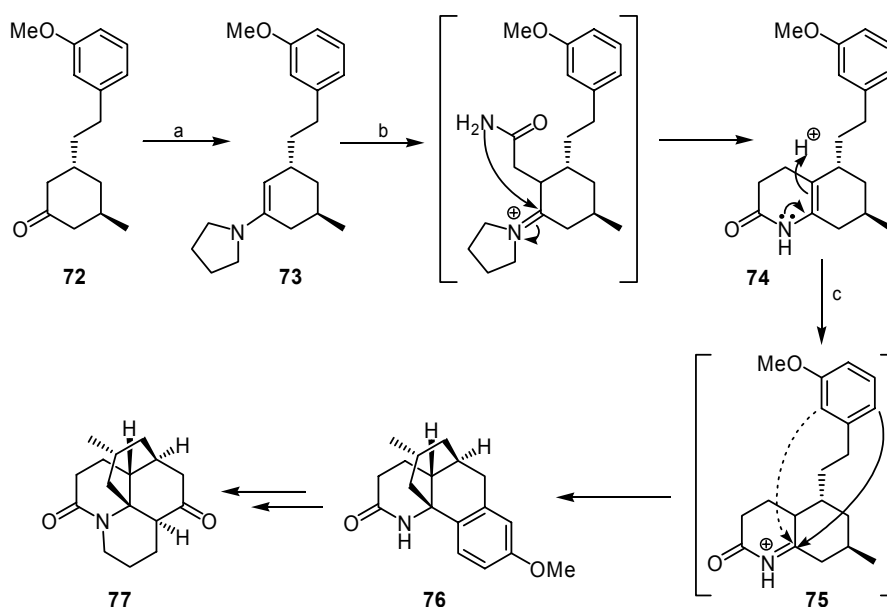


Schéma 12. **Syntéza (±)-lykopoдинu**; činidla a podmínky: a) pyrrolidin. b) CH₂=CHCONH₂, dioxan, rfl přes noc, potom H₂O, rfl 2 h (74 20–25 % + isomer). c) 80% H₃PO₄/HCOOH (1:1), rt 20 h (76 55 % + isomer 29 %)

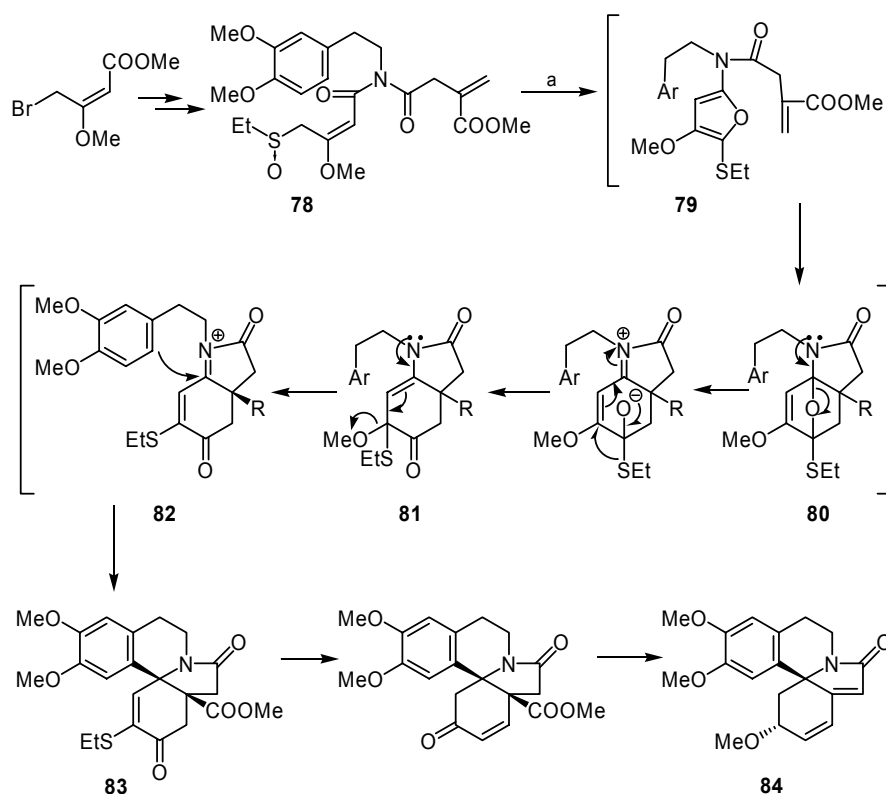


Schéma 13. Syntéza (\pm)-erysotramidinu; činidla a podmínky: a) TFAA, Et₃N, CH₂Cl₂, -78 °C 10 min, potom BF₃·OEt₂, → rt 30 min → rft 20 h (83 %)

kých efektů; obdobné efekty se uplatnily při adici kyanidového aniontu a následné reakci Grignardových činidel s rezultujícími aminonitryly¹¹².

Cyklické α -kyanaminy, odvozené od fenyglycinolu, jsou užitečné chirální syntony, které byly využity v asymetrické syntéze pestré škály alkaloidních typů (Husson, tzv. CN (*R,S*) metoda)¹¹³. Strategie se uplatnila např. v syntéze (+)-ferrugininu¹¹⁴, (-)-adalinu a (-)-eufokocininu¹¹⁵, a rovněž obou enantiomerů spirocyklického isonitraminu¹¹⁶. Schéma 15 ukazuje její užití v přípravě alkaloidu (+)-tetraponerinu-8 (**104**)¹¹⁷, v níž je dvakrát užito stereoselektivní alkylace aminonitrilu (**97** → **98** a **102** → **103**), následované, opět vysoce stereoselektivní, redukcí získaných produktů. Pozornost si zaslouží i elegantní transformace aminu **99** v tricyklický aminonitril **102**; tato „one-pot“ konverze, spočívající v ko-kondenzaci dvou aminoaldehydů, poskytla látku **102** jako výhradní stereoisomer v 84% výtěžku! Ve variantě postupu jsou univerzálními intermedii odpovídající laktamy¹¹⁸. Fenylylalaninol je rovněž využitelný v těchto strategiích a může být zabudován do molekuly, jak demonstruje syntéza erythrinanového skeletu¹¹⁹, probíhající přes acyliminina typu **82**.

Při konstrukci alkaloidních skeletů se uplatňují v adicích na C=N dvojnou vazbu i *N*-nukleofily, jak bylo již zmíněno v souvislosti s chininem. Adice anilinu je klíčovým krokem tvorby *N*-acylaminalové skupiny v totální

syntéze (\pm)-isoschizogaminu¹²⁰, z příbuzného enamidu byl vybudován alkaloid (\pm)-vallesamidin¹²¹. Přímochárý přístup k syntéze (-)-fysostigminu C-3 methylací tryptofanových derivátů a následným zachycením indoleninlia dusíkem se podařilo realizovat¹²² pomocí Coreyho-Kimova činidla (MeSCH₂Cl); pro příbuzný přístup s využitím aziridinů (R¹²³) viz¹²⁴.

Kapitulu uzavírá dominová sekvence reakcí, která byla použita^{125,126} Heathcockem při konstrukci skeletu dafnifyllových alkaloidů. Strategii ilustruje biomimetická syntéza (\pm)-methyl-homosekodafnifyllátu (**112**)¹²⁷, (Schéma 16). Pyridin **106a** podlehl působením kyseliny octové hetero [4+2] cykloadici v odvozeném 2-azoniadienu **107a**, a získané iminium **108a** bylo atakováno olefinem (aza-Prinsova reakce) za vzniku pentacyklického aminu **110** v celkovém 83% výtěžku z alkoholu **105**. Během transformace byly generovány 3 cykly a stereoselektivně 5 chirálních center! V případě *N*-methyliminiové soli **106b** (\equiv **107b**) podlehl karbokation **109b**, generovaný aza-Prinsovou cyklizací z iminia **108b**, hydridovému přenosu z *N*-methylu (nebo enová reakce?); hydrolýzou byl získán isopropyl-amin **111** ve výtěžku 75%! Aminy **110** a **111** byly konvertovány v (\pm)-methyl-homosekodafnifyllát (**112**); (-)-**112** a (-)-sekodafnifillin¹²⁸. Tato strategie byla využita i v syntéze dafnilaktonu A (**113**)¹²⁹ a (\pm)-bukittingginu¹³⁰; R¹³¹ zahrnuje i odlišné přístupy k syntéze těchto alkaloidů.

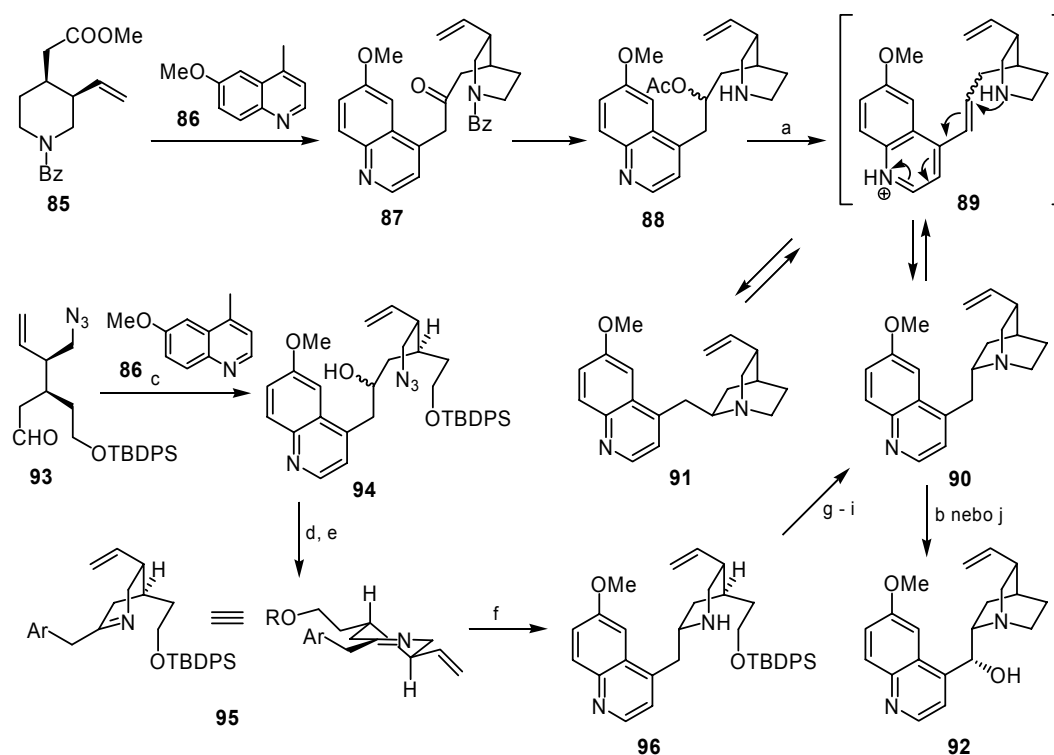


Schéma 14. **Syntéza (\pm)- a (-)-chininu**; činidla a podmínky: a) AcOH, NaOAc, PhH, rfl 14 h (79 %; **90:91** 43:57). b) O₂, KO^t-Bu, DMSO/*t*-BuOH (4:1), 20 °C 9 min (\pm)-**92** 32 % + chinidin 40 %). c) **86**, LDA, THF, -78 °C → 0 °C 15 min, potom **93**, -78 °C 15 min → 0 °C 20 min (70 %). d) (COCl)₂, Et₃N, DMSO, -78 °C 1 h (85 %). e) Ph₃P, THF, rfl 3 h (81 %). f) NaBH₄, MeOH/THF (1:1), rt 3 h (91 %). g) 40% HF vod., MeCN, rt 1 h (95 %). h) MsCl, py, CH₂Cl₂, rt přes noc. i) MeCN, rfl 3 h (68 % 2 stupně). j) O₂, NaH, DMSO, 45 min ((-)-**92** 78 %)

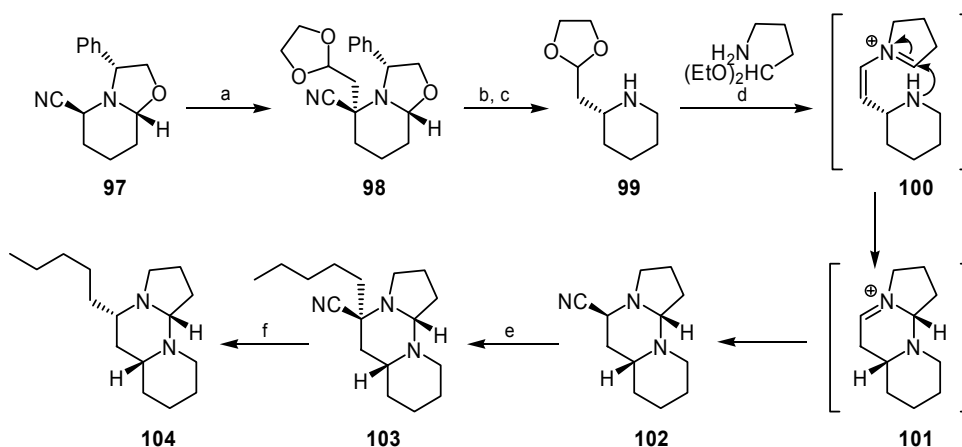


Schéma 15. **Syntéza alkaloidů CN(RS) metodou**; činidla a podmínky: a) (CH₂O)₂CHCH₂Br, LDA, HMPA, THF, -78 °C (84 %). b) NaBH₄, EtOH, rfl 2 h (kvant.). c) H₂, 10% Pd/C, MeOH, 40 min (81 %). d) HCl vod., rt přes noc, potom H₂NCH₂CH₂CH₂CH(OEt)₂, KCN, pH 2–3, rt 2 h (84 %). e) *n*-C₅H₁₁Br, LDA, HMPA, THF, -78 °C (61 %). f) Na, NH₃ (l) (97 %)

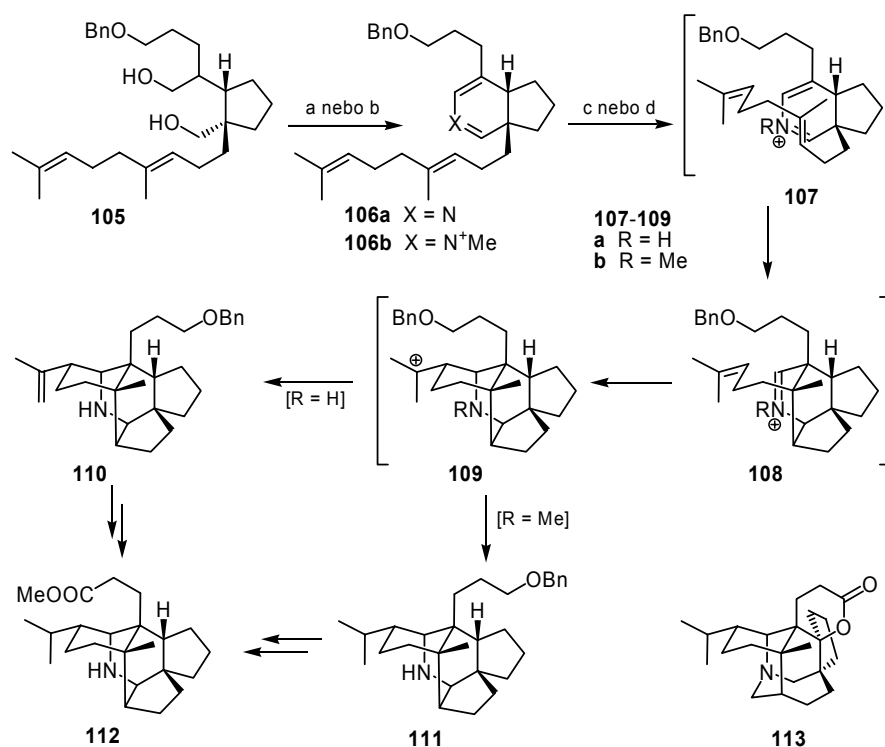


Schéma 16. Syntéza (+)-methyl-homosekodafrifyllátu; činidla a podmínky: a) $(\text{COCl})_2$, DMSO, CH_2Cl_2 , -78°C 15 min, potom Et_3N , -78°C 5 min $\rightarrow 0^\circ\text{C}$ 50 min, potom NH_3 (g), 0°C 10 min \rightarrow rt (45 min). b) $(\text{COCl})_2$, DMSO, CH_2Cl_2 , -78°C 30 min, potom Et_3N , -78°C 5 min $\rightarrow 0^\circ\text{C}$ 1 h, potom MeNH_2 (g), 0°C \rightarrow rt (1 h). c) **106a**, NH_4OAc , AcOH, rt 30 min $\rightarrow 70^\circ\text{C}$ 1,5 h (**110** 82 %). d) **106b**, NH_4OAc , AcOH, 85°C 10 h (**111** 75 %)

6. Mannichova reakce na přelomu století.

Výhled

Rozpoznání faktorů, ovlivňujících průběh pestré škály procesů založených na adici nukleofilů na dvojnou vazbu $\text{C}=\text{N}$, umožňuje cílené využívání takových procesů v efektivní konstrukci skeletů stále složitějších alkaloidů. Krásnou ilustraci můžeme nalézt ve vysoce stereo- a enantioselektivní syntéze ekteinascidinu 743 (**125**), kterou publikoval^{132,133} Corey se spolupracovníky (Schéma 17). Tento metabolit nebyl dostupný izolací v množství potřebném pro biologické studie, a jeho totální syntéza tak měla kromě prestižního i praktický důvod.

Pentacyklické jádro alkaloidu bylo vybudováno pomocí dvou *N*-acyliminiových cyklizací: Z acetalu **114** uvolněný aldehyd cyklodehydratoval za vzniku *N*-acyliminia **115**, jehož Pictetovou-Spenglerovou cyklizací ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) byl získán přemostěný isochinolin **116** (73 %). Jeho interakcí s aldehydem **117** generované imi-

nium bylo zachyceno kyanidem. Izolovaný α -kyanaminolakton **118** byl redukován na laktol. Za kyselé katalýzy (MsOH) utvořené další *N*-acyliminium **119** bylo následnou Pictetovou-Spenglerovou cyklizací (tvorba dalšího tetrahydroisochinolinu; 55 % ze **118**) a dalšími úpravami transformováno ve fenol **120**. Neméně zajímavá je následující výstavba 10-členného cyklu, která spočívá v regioselektivní oxidaci fenolu **120** a následné konverzi v hydroxyketon **121**. Pomocí Swernova činidla (není oxidace!) a bázi generovaný enon-thiolát **122** podlehl interní Michaelově adici za vzniku **123** (po acetylaci) v 79% výtežku! Konverze na α -ketolakton **124** umožnila další stereoselektivní Pictetovu-Spenglerovu kondenzaci (82 %) a nakonec transformaci v hemiaminal ekteinascidinu 743 (**125**); další totální syntézy^{134,135}.

Mannichova a příbuzné reakce se vyvinuly v mohutný nástroj syntézy dusíkatých heterocyklů; je více než pravděpodobné, že tyto procesy si významné postavení v totálních syntézách nejen alkaloidů i nadále udrží.

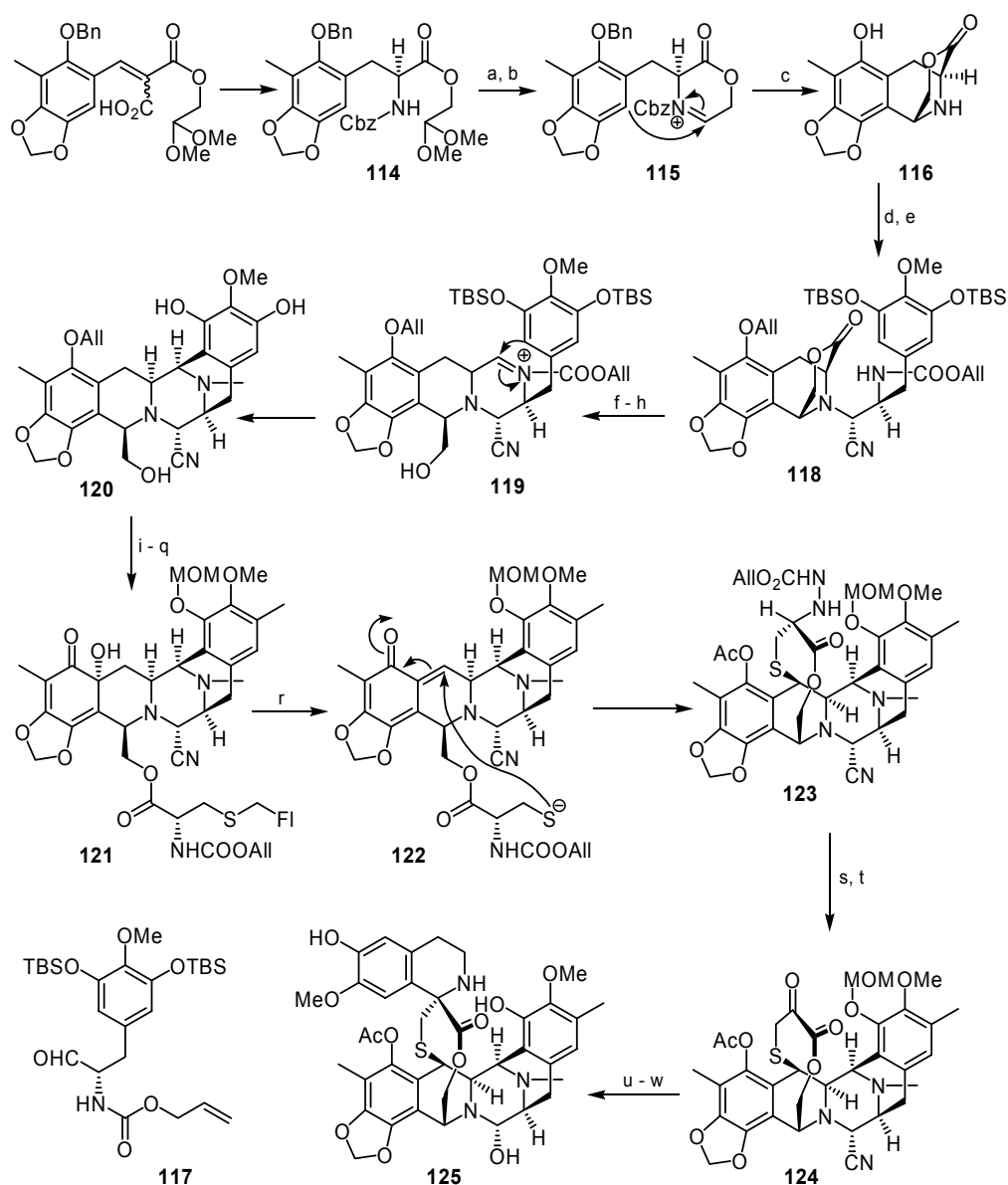


Schéma 17. **Syntéza ekteinascidinu 743**; činidla a podmínky: a) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (10 ekv.), H_2O (10 ekv.), CH_2Cl_2 , 0 °C 10 min. b) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (17 ekv.), 4 Å MS, CH_2Cl_2 , 23 °C 18 h (73 %). c) H_2 (1 atm), 10% Pd/C, AcOEt, 23 °C 6 h (100 %). d) **117**, KCN (25 ekv.), AcOH, 23 °C 18 h. e) $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}$ (5 ekv.), Cs_2CO_3 (2 ekv.), DMF, 23 °C 1 h (87 % 2 stupně). f) Dibal-H (1,2 ekv.), PhMe, –78 °C 5 h. g) $\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (přebytek), MeOH, 23 °C 20 min. h) MsOH (20 ekv.), 3 Å MS, CH_2Cl_2 , 23 °C 5 h (55 % ze **118**). i) TiF_2NPh (5 ekv.), Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , 23 °C 6 h (72 %). j) TBDPSCl (přebytek), DMAP, CH_2Cl_2 , 23 °C 13 h (89 %). k) MOMBr, *i*-Pr₂NEt, CH_2Cl_2 , 23 °C 20 min (92 %). l) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ (kat.), Bu_3SnH , AcOH (přebytek), CH_2Cl_2 , 23 °C 15 min (100 %). m) CH_2O (přebytek), NaBH_3CN , AcOH, MeCN, CH_2Cl_2 , 23 °C 30 min (95 %). n) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, Me_4Sn (přebytek), LiCl, DMF, 80 °C 2 h (83 %). o) $(\text{PhSeO})_2\text{O}$ (1,1 ekv.), CH_2Cl_2 , 23 °C 15 min. p) TBAF (2 ekv.), THF, 23 °C 10 min (75 % 2 stupně). q) *N*-AlloOC-S-CH₂FI-Cys-OH, EDC.HCl (5 ekv.), DMAP (5 ekv.), CH_2Cl_2 , 23 °C 30 min (91 %). r) TiF_2O , DMSO, –40 °C 30 min, potom *i*-Pr₂NEt, → 0 °C 30 min, potom *t*-BuOH, 0 °C, $(\text{Me}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}t\text{-Bu}$, 23 °C, potom Ac_2O , 23 °C (79 % celkem). s) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ (kat.), Bu_3SnH (přebytek), AcOH, CH_2Cl_2 , 23 °C 5 min (84 %). t) 4-Formyl-1-methylpyridinium jodid (20 ekv.), DBU (20 ekv.), DMF, CH_2Cl_2 , 23 °C 40 min (70 %). u) (3-Hydroxy-4-methoxyfenyl)ethylamin, silikagel, EtOH, 23 °C 10 h (82 %). v) TFA/THF/ H_2O (4:1:1), 23 °C 9 h. w) AgNO_3 (20 ekv.), MeCN/ H_2O (3:2), CH_2Cl_2 , 23 °C 11 h (77 %)

LITERATURA

- Hesse M.: *Alkaloids. Nature's Curse or Blessing*. Wiley-VCH, New York 2002.
- Nicolaou K. C., Sorensen E. J.: *Classics in Total Synthesis*. VCH, Weinheim 1996.
- Nicolaou K. C., Snyder S. A.: *Classics in Total Synthesis II*. Wiley-VCH, Weinheim 2003.
- Nicolaou K. C., Vourloumis D., Winssinger N., Baran P. S.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 44 (2000).
- The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. (Manske R. H. F., ed.), díl 1. Academic Press, New York 1950.
- Studies In Natural Products Chemistry*. (Rahman A., ed.), díl 1. Elsevier, Amsterdam.
- Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. (Pelletier S. W., ed.), díl 1. Elsevier Science, Amsterdam.
- Nat. Prod. Rep.* 1, 1 (1984).
- Ladenburg A.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 19, 2578 (1886).
- Willstätter R.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 34, 3163 (1901).
- Robinson R.: *J. Chem. Soc.* 111, 762 (1917).
- Posner G. H.: *Chem. Rev.* 86, 831 (1986).
- Scholz U., Winterfeldt E.: *Nat. Prod. Rep.* 17, 349 (2000).
- de la Torre M., Sierra M. A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 160 (2004).
- Schöpf C.: *Angew. Chem.* 50, 797 (1937).
- Cope A. C., Dryner H. L., Jr., Overberger C. G., D'Addieco A. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 3416 (1951).
- Paquette L. A., Heimaster J. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 88, 763 (1966).
- Woodward R. B., Bader F. E., Bickel H., Frey A. J., Kierstead R.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2023 (1956).
- Lounasmaa M., Berner M., Brunner M., Suomalainen H., Tolvanen A.: *Tetrahedron* 54, 10205 (1988).
- Protiva M., Jilek J. O., Ernest I., Novák L.: *Tetrahedron Lett.* 11, 12 (1959).
- Julian P. L., Pikl J., Boggess D.: *J. Am. Chem. Soc.* 56, 1797 (1934).
- Witkop B.: *Heterocycles* 49, 9 (1998).
- Gates M., Tschudi G.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1109 (1952).
- Woodward R. B., Cava M. P., Ollis W. D., Hunger A., Daeniker H. U., Schenker K.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4749 (1954).
- Nicolaou K. C., Sorensen E. J.: *Classics in Total Synthesis*, kap. 8. VCH, Weinheim 1996.
- Koskinen A. M. P.: *Asymmetric Synthesis of Natural Products*. John Wiley & Sons, New York 1993.
- Nicolaou K. C., Baran P. S.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2678 (2002).
- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2005 (2001).
- Sierra M. A., de la Torre M. C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 1538 (2000).
- Ho T. L.: *Tandem Organic Reactions*. Wiley, New York 1992.
- Tietze L. F.: *Chem. Rev.* 96, 115 (1996).
- Parsons P. J., Penkett C. S., Shell A. J.: *Chem. Rev.* 96, 195 (1996).
- Nicolaou K. C., Montagnon T., Snyder A. A.: *Chem. Commun.* 2003, 551.
- Roos G.: *Compendium of Chiral Auxiliary Applications*, díl 1–3. Academic Press, New York 2002.
- Synthesis of Natural Products: Problems of Stereoselectivity*, (Kočovský P., Tureček F., Hájíček J., eds.), díl I, kap. 8. CRC Press, Boca Raton 1986.
- Corey E. J., Cheng X.-M.: *The Logic of Chemical Synthesis*. Wiley, New York 1989.
- Royer J., Bonin M., Micoun L.: *Chem. Rev.* 104, 2311 (2004).
- Synthesis of Natural Products: Problems of Stereoselectivity*, (Kočovský P., Tureček F., Hájíček J., eds.), díl II, kap. 1. CRC Press, Boca Raton 1986.
- Arend M., Westermann B., Risch N.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 1045 (1998).
- Stevens R. V., Lee W. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 101, 7032 (1979).
- Deslongchamps P.: *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*. Pergamon Press, New York 1983.
- Stevens R. V.: *Acc. Chem. Res.* 17, 289 (1984).
- Scott W. L., Evans D. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4779 (1972).
- Heathcock C. H., Kleinman E. F., Binkley E. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 100, 8036 (1978).
- Corey E. J., Balanson R. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 96, 6516 (1974).
- Ryckman D. M., Stevens R. V.: *J. Am. Chem. Soc.* 109, 4940 (1987).
- Stevens R. V., Pruitt J. R.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1425 (1983).
- Winkler J. D., Axten J. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6425 (1998).
- Magnus P., Gazzard L., Hobson L., Payne A. H., Rainey T. J., Westlund N., Lynch V.: *Tetrahedron* 58, 3423 (2002).
- Magnus P., Gazzard L., Hobson L., Payne A. H., Lynch V.: *Tetrahedron Lett.* 40, 5135 (1999).
- Hájíček J., Trojánek J.: *Tetrahedron Lett.* 23, 365 (1982).
- Maupérin P., Lévy J. J.: *Tetrahedron Lett.* 1971, 999.
- Hájíček J., Trojánek J.: *Tetrahedron Lett.* 22, 1523 (1981).
- Hugel G., Massiot G., Lévy J., LeMen J.: *Tetrahedron* 37, 1369 (1981).
- Palmisano G., Danieli B., Lesma G., Trupiano F., Pilati T.: *J. Org. Chem.* 53, 1056 (1988).
- Rahman A.-u., Iqbal Z., Nasir H. v.: *Studies In Natural Products Chemistry*, (Rahman A., ed.), díl 14, str. 805. Elsevier, Amsterdam 1994.
- Yokoshima S., Ueda T., Kobayashi S., Sato A., Ku-

- boyama T., Tokuyama H., Fukuyama T.: *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 2137 (2002).
58. Kobayashi S., Ueda T., Fukuyama T.: *Synlett* 2000, 883.
59. Schneider C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* *41*, 4217 (2002).
60. Kuehne M. E., Bornmann W. G.: *J. Org. Chem.* *56*, 513 (1991).
61. Magnus P., Mendoza J. S., Stamford A., Ladlow M., Willis P.: *J. Am. Chem. Soc.* *114*, 10232 (1992).
62. Langlois N., Guéritte F., Langlois Y., Potier P.: *J. Am. Chem. Soc.* *98*, 7017 (1976).
63. Grierson D. v: *Organic Reactions*, (Paquette L. A., ed.), díl 39, str. 85. John Wiley & Sons, New York 1990.
64. Kutney J. P., Choi L. S. L., Nakano J., Tsukamoto H., McHugh M., Boulet C. A.: *Heterocycles* *27*, 1845 (1988).
65. He F., Bo Y., Altom J. D., Corey E. J.: *J. Am. Chem. Soc.* *121*, 6771 (1999).
66. Sumi S., Matsumoto K., Tokuyama H., Fukuyama T.: *Org. Lett.* *5*, 1891 (2003).
67. Cox E. D., Cook J. M.: *Chem. Rev.* *95*, 1797 (1995).
68. Le Ménez P., Kunesch N., Liu S., Wenkert E.: *J. Org. Chem.* *56*, 2915 (1991).
69. Bosch J., Bennasar M.-L.: *Synlett* 1995, 587.
70. Fukuyama T., Yang L., Ajeck K. L., Sachleben R. A.: *J. Am. Chem. Soc.* *112*, 3712 (1990).
71. Myers A. G., Plowright A. T.: *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 5114 (2001).
72. Lavilla R.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2002, 1141.
73. Kuethe J. T., Comins D. L.: *Org. Lett.* *2*, 855 (2000).
74. Blumenkopf T. A., Overman L. E.: *Chem. Rev.* *86*, 857 (1986).
75. Franklin A. S., Overman L. E.: *Chem. Rev.* *96*, 505 (1996).
76. Overman L. E.: *Acc. Chem. Res.* *25*, 352 (1992).
77. Knight S. D., Overman L. E., Pairedeau G.: *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 9293 (1993).
78. Bonjoch J., Solé D.: *Chem. Rev.* *100*, 3455 (2000).
79. Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P., Manzocchi A.: *Chem. Rev.* *92*, 1071 (1992).
80. Knight S. D., Overman L. E., Pairedeau G.: *J. Am. Chem. Soc.* *117*, 5776 (1995).
81. Overman L. E., Sworin M., Burk R. M.: *J. Org. Chem.* *48*, 2685 (1983).
82. Angle S. R., Fevig J. M., Knight S. D., Marquis R. W., Jr., Overman L. E.: *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 3966 (1993).
83. Overman L. E., Robertson G., Robichaud A. J.: *J. Am. Chem. Soc.* *113*, 2598 (1991).
84. Agami C., Cases M., Couty F.: *J. Org. Chem.* *59*, 7937 (1994).
85. Deng W., Overman L. E.: *J. Am. Chem. Soc.* *116*, 11241 (1994).
86. Martin S. F.: *Acc. Chem. Rev.* *35*, 895 (2002).
87. Bur S. K., Martin S. F.: *Tetrahedron* *57*, 3221 (2001).
88. Ito M., Clark C. W., Mortimore M., Goh J. B., Martin S. F.: *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 8003 (2001).
89. Martin S. F., Clark C. W., Ito M., Mortimore M.: *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 9804 (1996).
90. Martin S. F., Barr K. J.: *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 3299 (1996).
91. Sardina F. J., Howard M. H., Morningstar M., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* *55*, 5025 (1990).
92. Mansell H. L.: *Tetrahedron* *52*, 6025 (1996).
93. Hernandez A. S., Marcos M., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* *60*, 2683 (1995).
94. Hernandez A. S., Thaler A., Castella J., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* *61*, 314 (1996).
95. Christie B. D., Rapoport H.: *J. Org. Chem.* *50*, 1239 (1985).
96. Speckamp W. N., Hiemstra H.: *Tetrahedron* *41*, 4367 (1985).
97. Maryanoff B. E., Zhang H.-C., Cohen J. H., Turchi I. J., Maryanoff C. A.: *Chem. Rev.* *104*, 1431 (2004).
98. Stork G., Kretchmer R. A., Schlessinger R. A.: *J. Am. Chem. Soc.* *90*, 1647 (1968).
99. Padwa A., Waterson A. G.: *Curr. Org. Chem.* *4*, 175 (2000).
100. Padwa A., Hennig R., Kappe C. O., Reger T. S.: *J. Org. Chem.* *63*, 1144 (1998).
101. Bur S. K., Padwa A.: *Chem. Rev.* *104*, 2401 (2004).
102. Kappe C. O., Murphree S. S., Padwa A.: *Tetrahedron* *53*, 14179 (1997).
103. Padwa A., Danca D.: *Org. Lett.* *4*, 715 (2002).
104. Padwa A., Brodney M. A., Dimitroff M., Liu B., Wu T.: *J. Org. Chem.* *66*, 3119 (2001).
105. Toczko M. A., Heathcock.: *J. Org. Chem.* *65*, 2642 (2000).
106. Stork G., Niu D., Fujimoto A., Koft E. R., Balkovec J. M., Tata J. R., Dake G. R.: *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 3239 (2001).
107. Gutzwiller J., Uskokovic M.: *J. Am. Chem. Soc.* *100*, 576 (1978).
108. Szántay C., Szabó L., Kalaus G.: *Tetrahedron* *33*, 1803 (1977).
109. Massiot G., Oliveira F. S., Lévy J.: *Bull. Soc. Chim. Fr. II* 1982, 185.
110. Buzas A., Retourne C., Jacquet J. P., Lavielle G.: *Tetrahedron* *34*, 3001 (1978).
111. Stevens R. V., Lee A. W. M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1982, 102.
112. Stevens R. V., Lee A. W. M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1982, 103.
113. Royer J., Husson H.-P.: *Janssen Chim. Acta* *11* (No. 28), 3 (1993).
114. Gauthier I., Royer J., Husson H.-P.: *J. Org. Chem.* *62*, 6704 (1997).
115. Yue C., Royer J., Husson H.-P.: *J. Org. Chem.* *57*, 4211 (1992).
116. François D., Lallemand M.-C., Selkti M., Tomas A., Kunesch N., Husson H.-P.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *37*, 104 (1998).
117. Yue C., Royer J., Husson H.-P.: *J. Org. Chem.* *55*,

- 1140 (1990).
118. Amat M., Llor N., Hidalgo J., Escolano C., Bosch J.: *J. Org. Chem.* **68**, 1919 (2003).
119. Allin S. M., James S. L., Elsegood M. R. J., Martin W. P.: *J. Org. Chem.* **67**, 9464 (2002).
120. Hubbs J. L., Heathcock C. H.: *Org. Lett.* **1**, 1315 (1999).
121. Heathcock C. H., Norman M. H., Dickman D. A.: *J. Org. Chem.* **55**, 798 (1990).
122. Kawahara M., Nishida A., Nakagawa M.: *Org. Lett.* **2**, 675 (2000).
123. Tanner D.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **33**, 599 (1994).
124. Nakagawa M., Kawahara M.: *Org. Lett.* **2**, 953 (2000).
125. Heathcock C. H., Piettre S., Ruggeri R. B., Ragan J. A., Kath J. C.: *J. Org. Chem.* **57**, 2554 (1992).
126. Wallace G. A., Heathcock C. H.: *J. Org. Chem.* **66**, 450 (2001).
127. Heathcock C. H., Hansen M. M., Ruggeri R. B., Kath J. C.: *J. Org. Chem.* **57**, 2544 (1992).
128. Heathcock C. H., Stafford J. A.: *J. Org. Chem.* **57**, 2566 (1992).
129. Heathcock C. H., Ruggeri R. B., McClure K. F.: *J. Org. Chem.* **57**, 2585 (1992).
130. Heathcock C. H., Stafford J. A., Clark D. L.: *J. Org. Chem.* **57**, 2575 (1992).
131. Heathcock C. L.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **31**, 665 (1992).
132. Corey E. J., Gin D. Y., Kania R. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9202 (1996).
133. Martinez E. J., Corey E. J.: *Org. Lett.* **2**, 993 (2000).
134. Endo A., Yanagisawa A., Abe M., Tohma S., Kan T., Fukuyama T.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6552 (2002).
135. Menchaca R., Martínez V., Rodríguez A., Rodríguez N., Flores M., Gallego P., Manzanares I., Cuevas C.: *J. Org. Chem.* **68**, 8859 (2003).

J. Hájíček (*Zentiva – Research Institute of Pharmacy and Biochemistry, Prague*): **Mannich and Related Reactions in Total Synthesis of Alkaloids**

The review concentrates on various transformations of the C=N double bond as principal methods of total synthesis of alkaloids. Selected examples of Mannich reaction and related processes illustrate the development as well as present state of the art of synthesis of alkaloids.

31. konference s mezinárodní účastí

Projektování a provoz povrchových úprav

se koná 9. – 10. 3. 2005 v hotelu Pyramida v Praze

Hlavní témata: aktuální změny v platné legislativě
projektování povrchových úprav
progresivní materiály, technologie, zařízení
problematika provozu, emise, odpady, odpadní vody
hygiena a bezpečnost práce

Akce je určena pro široký okruh posluchačů: majitele lakoven, galvanizoven a zinkoven, konstruktéry, projektanty, technology povrch. úprav, řídicí technicko-hosp. pracovníky, pracovníky marketingu, odbytu, zásobování, výrobce, distributory a uživatele nář. hmot, požár. a bezpečnost. techniky, pracovníky hygien. stanic, inspektorátů ŽP, inspektorátů bezp. práce, odbor. škol a další.

Informace u pořadatele: PhDr. Zdeňka Jelínková, CSc. – PPK
Korunní 73, 130 00 Praha 3
tel./fax.: 224 256 668
E-mail: JelinkovaZdenka@seznam.cz
<http://sweb.cz/JelinkovaZdenka/>

SOUČASNÝ VÝVOJ V PROTEOMICE

MICHAELA COLLINSOVÁ, JIŘÍ JIRÁČEK

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo
nám. 2, 16610 Praha 6
jiracek@uochb.cas.cz

Došlo 19.3.04, přijato 8.10.04.

Klíčová slova: proteomika, proteom, 2-D elektroforéza,
hmotnostní spektrometrie

Obsah

1. Co to je proteomika?
2. Metody proteomiky
 - 2.1. Metody založené na dvoudimenzionální gelové elektroforéze (2-DE)
 - 2.1.1. Identifikace proteinů z 2-D gelů
 - 2.2. Metody nevyužívající 2-DE
 - 2.2.1. Proteinové čipy
3. Aplikace proteomiky
4. Zpracování proteomických dat
5. Závěr

1. Co to je proteomika?

Díky obrovskému rozkvětu molekulární biologie během posledních deseti let se podařilo rozluštit genomy řady organismů, mezi jinými též genomy modelových živočichů, jako jsou např. muška octomilka *Drosophila melanogaster*¹, nebo hlíst *Caenorhabditis elegans*². První rostlinou, pro niž byla stanovena sekvence celého genomu, je *Arabidopsis thaliana*³. První nástin sekvence lidského genomu byl publikován na počátku roku 2001 (cit.⁴). V dubnu 2003 bylo u příležitosti 50. výročí objevení dvoušroubovice DNA oznámeno dokončení sekvenace lidského genomu (Human Genome Project, http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/50yr.shtml, cit.⁵). Současné biologické a biochemické vědy by měly směřovat své další úsilí k vysvětlení a pochopení funkce genů. Genetická informace je v organismu vyjádřena ve formě proteinů. Proteiny jsou skutečnými funkčními molekulami. Proto se proteiny opět dostaly do středu zájmu a vznikl nový obor proteomika (proteomics). Proteomiku lze definovat jako kvantitativní analýzu proteinů přítomných v organismu v určitém okamžiku a za přesně definovaných podmínek⁶. Termín „proteom“ byl poprvé použit v roce 1994 jako vyjádření proteinového ekvivalentu genomu⁶. Proteom představuje sadu všech proteinů,

kteří jsou genomem v průběhu života buňky exprimovány a následně modifikovány. Termín se rovněž používá v méně obecném smyslu pro vyjádření proteinového složení organismu, orgánu, tkáně nebo tělesné tekutiny v určitém okamžiku a za přesně definovaných podmínek. Protože proteom odráží aktuální metabolický stav dané buňky nebo organismu, představuje vysoce dynamický systém, který je charakteristicky ovlivňován změnami podmínek v okolním prostředí^{7,8}.

Proteomika může nepochybně výrazně přispět k porozumění funkcí genů. Ovšem „pouhá“ znalost kompletní sekvence genomu není pro objasnění biologických funkcí dostatečná, jelikož poskytuje pouze relativně statický přehled o funkčním potenciálu organismu a neumožňuje pohled na celkovou podobu proteinové exprese v prostoru a čase. Proteomika se zaměřuje přímo na genové produkty, a proto mohou být zjištěny i modifikace proteinů, které nejsou zřejmé ze sekvence nukleotidů v DNA. Jedná se např. o isoformy, post-translační modifikace nebo interakce protein-protein⁹.

Přeměna genetické informace do formy proteinů probíhá jak během různých vývojových fází organismu, tak v buňkách různých typů, a za různých podmínek daných okolním prostředím. Proteinová exprese je precizně regulována na všech svých úrovních, počínaje transkripcí, přes translaci až po post-translační modifikace. Hladiny DNA, mRNA a proteinů si však zpravidla vzájemně neodpovídají⁶. To znamená, že pro hlubší porozumění biologii organismů je zapotřebí propojit informace získané analýzami DNA, mRNA, proteinů a poznatky o jejich metabolismu⁹⁻¹¹.

Znalost lidského proteomu bezpochyby nalezne široké spektrum praktického využití v biologických i lékařských aplikacích. Biologické tekutiny, jako jsou krevní plasma, moč, sliny a další exkreta a sekreta, obsahují proteiny, což jsou z fyziologického a diagnostického hlediska velmi významné molekuly. Jejich přímá analýza a charakterizace v tělních tekutinách jsou proto důležité⁹⁻¹¹. Proteiny jakožto funkční molekuly představují zároveň vhodné farmaceutické cíle. Proteomika se tak přímo podílí na vývoji nových léků¹⁰.

Cesta k rozluštění lidského proteomu bude nicméně ještě dlouhá a namáhavá, protože je třeba charakterizovat každý protein kódovaný lidským genomem a porozumět jeho funkci, struktuře, molekulárním interakcím a regulacím v různých typech buňek a za různých fyziologických podmínek.

Proteomiku lze podle aplikací rozdělit do tří hlavních oblastí¹⁰. První je mikrocharakterizace proteinů, která se využívá pro identifikaci proteinů a pro studium jejich post-translačních modifikací. Mikrocharakterizace proteinů nám pomáhá zjistit, jaká je aktivní a funkční forma, ve které se proteiny vyskytují v organismu. Druhou oblastí je tzv. srovnávací proteomika (differential display proteo-

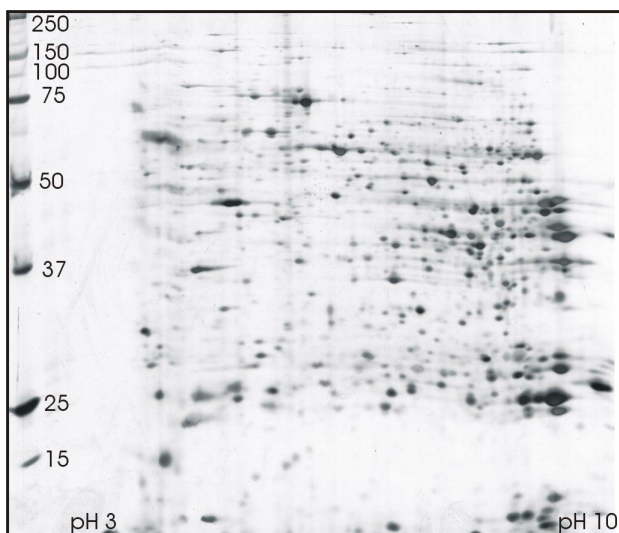
mics), zabývající se porovnáváním hladin proteinů. Tato technika je velmi důležitá a používána pro studium rozdílných stavů organismu, např. patologických či normálních, a pro vyhledávání proteinů, jejichž výskyt či hladina daný stav charakterizují. Výsledky srovnávací proteomiky mohou být využitelné při diagnostice a léčbě řady nemocí. Poslední oblastí je studium interakcí typu protein-protein technikami, jakými je např. hmotová spektrometrie. Sledování interakcí typu protein-protein může sloužit např. k identifikaci multienzymových komplexů či k hledání substrátu a ligandů pro enzymy a receptory.

2. Metody proteomiky

Proteomika je založena na metodách analýzy proteinů ve velmi komplexních směsích. V následujících kapitolách se pokusíme tyto metody podrobněji popsat.

2.1. Metody založené na dvoudimenzionální gelové elektroforéze (2-DE)

Nejvyužívanější metoda při proteomické analýze nejčastěji kombinuje vysokouúčinnou dvoudimenzionální gelovou elektroforézu (2-DE) sloužící k separaci proteinů s hmotovou spektrometrií (MS) používanou k identifikaci vybraných proteinových skvrn z gelů. Pomocí 2-DE lze rozdělit v ideálních případech až několik tisíc proteinů. Teoreticky může být na jediném 2-DE gelu rozlišeno až 10 000 skvrn^{9,12}. Příklad 2-D elektroforetické analýzy homogenátu z myších jater⁶⁸ je ilustrován na obr. 1.



Obr. 1. 2-D elektroforetická analýza homogenátu z myších jater. Bylo aplikováno 50 μ g proteinů. Pro první rozměr byl použit 17 cm „non-linear IPG strip“ o rozmezí pH 3-10 (zleva doprava). Druhý rozměr byl realizován v gradientovém (8-16% shora dolů) polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného. V levé části gelu jsou vidět proteinové standardy (15-250 kDa) analyzované pouze v druhém rozměru⁶⁸

Přestože 2-DE je velmi vhodnou metodou pro separaci komplexních směsí proteinů, má tato technika i svoje nevýhody. Jednou z nich je problém širokého rozpětí koncentrací jednotlivých přítomných proteinů. V případě lidských buněk představuje toto rozpětí přibližně 7 řádů, od nejmenšího výskytu (1 kopie) po nejhojnější (10⁶ kopií) zastoupení proteinů přítomných v buňce ve stejném okamžiku¹³. Používané metody barvení proteinů v gelech, včetně fluorescenčního zobrazování, však vizualizují pouze ty proteiny, které ve vzorku vykazují střední až vysokou míru výskytu^{13,14}. Ačkoliv technický pokrok v oblasti 2-DE a MS proteinů zvýšil citlivost, reprodukovatelnost a kapacitu proteomické analýzy, není možné analyzovat tak široké rozpětí výskytu proteinů současně. Další nevýhodou 2-DE je její časová náročnost a pracnost celého procesu, který vyžaduje specifické dovednosti a zručnost pro tvorbu kvantitativně a prostorově reprodukovatelných gelů^{15,16}.

Problém detekce a identifikace proteinů vyskytujících se v buňce v nízkých koncentracích může být částečně vyřešen předčištěním komplexních proteinových směsí. Pre-fractions zvyšuje množství proteinů málo zastoupených vzhledem k ostatním proteinům. Nejjednodušší je frakcionace na jednotlivé orgány. Směsi proteinů mohou být dále frakcionovány podle náboje. To je možné přímo během isoelektrické fokusace při použití pH gradientů o úzkém rozpětí. V takovém případě je analýza rozdělena do sady překrývajících se gelů. Další možnosti použití elektroforetických technik pro pre-fractions proteinových vzorků podává ve svém přehledu Righetti¹⁷. Pro odstranění nežádoucích proteinů se rovněž používají afinitní techniky, které umožňují odstranění specifických skupin proteinů. Afinitní techniky jsou velmi užitečné pro odstranění proteinů, které se vyskytují ve vysoké koncentraci, jako je např. albumin z krevního séra nebo plasmy¹⁸. Afinitním předčištěním můžeme ale také dosáhnout obohacení vzorku o specifické typy žádaných proteinů. Např. použitím afinitního nosiče s konkanavalinem A obohatíme vzorek o glykosylované proteiny^{18,19}.

Rabilloud²⁰ a Herbert a spol.²¹ zdokonalili techniky přípravy vzorku pro 2-DE za účelem zvýšení rozpustnosti proteinů v průběhu isoelektrické fokusace (IEF), a tím i ke zvýšení rozlišení a kapacity výsledných dvoudimenzionálních gelů. Molloyova metoda²² postupné extrakce je založena na odlišné rozpustnosti proteinů, kdy se v každém následujícím extrakčním kroku používá silnější solubilizující činidlo. Tímto způsobem je složitá proteinová směs rozdělena do několika 2-DE gelů. Všechna tato zdokonalení přispívají ke zvýšení relativního zastoupení hydrofobních proteinů ve výsledných 2-DE gelech. Tato skutečnost je žádoucí vzhledem k tomu, že hydrofobní membránové proteiny hrají významnou roli v buněčných procesech, jako např. při přenosu signálů v buňce nebo při membránovém transportu, a patří rovněž mezi významné cíle terapeutických látek. Membránové proteiny se na 2-DE gelu těžko vizualizují, protože se většinou vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, mají pI v alkalické oblasti a jsou velmi špatně rozpustné ve vodných rozpouštědlech²³. Je-

jich lepšímu rozlišení na výsledných gelech může napomoci přidavek trifluorethanolu do solubilizačního činidla²⁴. V roce 1988 byly zavedeny tzv. imobilizované pH gradienty²⁵ pro isoelektrickou fokusaci a jejich rychlý vývoj během několika posledních let umožnil tvorbu pH gradientů až do pH 12, což usnadňuje separaci velmi bazických proteinů²⁶.

2.1.1. Identifikace proteinů z 2-D gelů

V počátcích proteomiky sloužila k identifikaci mikroanalytických množství proteinů separovaných pomocí 2-DE sekvenace *N*-terminálních aminokyselin, tzn. Edmanovo odbourávání²⁷. Tato metoda je ovšem neúčinná v případě blokovaného *N*-konce proteinů. Dnes je Edmanovo odbourávání nahrazeno citlivější a výkonnější hmotovou spektrometrií (MS), která spolu s 2-DE vytvořila integrovanou technologii^{9,28}. Elektroforeticky separované a v gelu obarvené proteiny mohou být z gelu roboticky vyříznuty a poté štěpeny specifickou proteasou, např. trypsinem. Výsledné peptidy jsou pak identifikovány hmotnostní spektrometrií technikou MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) nebo ESI (elektrospray ionization). Signály peptidů a jejich fragmentů mohou být určeny s takovou přesností, že porovnání píků určitého peptidu a jeho fragmentace s databázemi (např. ProFound nebo Mascot) může vést k identifikaci proteinu včetně jeho modifikací⁹. V této fázi proteomický výzkum těží z genomického výzkumu poslední dekády, díky němuž jsou nyní k dispozici archivované a anotované databáze sekvencí proteinů nejrůznějších organismů. Tyto databáze poskytují výtečný podklad pro křížovou korelaci transkriptomických (transkriptomika je obor, který se zabývá studiem rozsahu a regulace přepisu genů do mRNA) a proteomických dat.

2.2. Metody nevyužívající 2-DE

Vedle přístupu kombinujícího 2-DE s hmotnostní spektrometrií, pomocí něhož nelze detegovat, identifikovat a kvantifikovat všechny proteiny přítomné ve vzorku²⁹, se objevují nové, na gelové elektroforéze nezávislé přístupy. Technologie multidimenzionální proteinové identifikace (MudPIT – multidimensional protein identification technology), která byla prvně použita v Yatesově laboratoři³⁰, je založena na multidimenzionální kapalinové chromatografii a tandemové hmotové spektrometrii. Analýzou celého proteomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* touto metodou bylo detegováno a identifikováno téměř 1500 proteinů (tj. 5× více než při použití 2-DE gelu), včetně proteinů přítomných v nízké koncentraci, membránových proteinů a rovněž proteinů velmi bazických a proteinů o vysoké molekulové hmotnosti³¹. Tato technologie dokáže detegovat a identifikovat proteiny v rámci dynamického rozpětí výskytu čtyř řádů včetně proteinů, které se vyskytují jen vzácně^{32,33}.

Jiný přístup, který je založený na hmotnostní spektrometrii, využívá izotopem kódované afinitní značky (ICAT – isotope coded affinity tags), které reagují se sulfhydrylo-

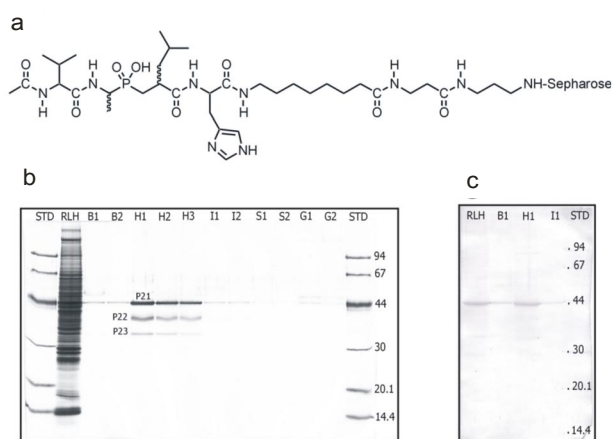
vými skupinami proteinů a obsahují raménko, které může být deuterované, a biotinovou značku. Cysteinové zbytky jsou derivatizovány pomocí „lehkých“ nebo „těžkých“ (deuterovaných) ICAT činidel. Vzorky jsou poté spojeny a štěpeny proteasou. Biotinem značené peptidy jsou následně izolovány afinitní chromatografií a identifikovány a kvantifikovány kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Každý peptid se v hmotnostním spektru objevuje jako dublet s rozdílem hmotnosti rovnajícím se počtu atomů deuteria. Relativní zastoupení daného proteinu v obou vzorcích je určeno poměrem píků této dvojice³⁴.

2.2.1. Proteinové čipy

Snaha vyvinout metody pro analýzu genové exprese, které by byly nezávislé na procesu separace, vyústila ve vývoj proteinových čipů („protein arrays“) podobných DNA čipům („DNA arrays“). Proteinové čipy jako alternativa k běžným proteomickým přístupům se zdají být novou, nadějnou a vysoce kapacitní technikou pro studium proteomu³⁵. Specifické proteiny, jako jsou např. protilátky schopné rozpoznávat a vázat jiné proteiny, mohou být imobilizovány na čipy se speciálně upravenými povrchy. Na povrch čipů s imobilizovanými protilátkami je poté aplikován vybraný proteinový vzorek. Na čipy zůstanou navázané pouze proteiny, které se vážou na odpovídající protilátku¹⁰. Zachycené proteiny mohou být detegovány přímo na čipu hmotnostní spektrometrií. Přístup propojující proteinové čipy s identifikací hmotovou spektrometrií je nazýván „surface-enhanced laser desorption/ionization“ (SELDI-MS) a byl zdokonalen firmou Ciphergen, která stála u zrodu proteinových čipů^{9,36}.

Na základě možností své aplikace rozeznáváme dva druhy proteinových čipů³⁷. Prvním jsou čipy sloužící ke studiu funkce proteinů (protein function arrays), kdy jsou na čipech imobilizovány proteiny. Tyto čipy se mohou používat pro paralelní studie aktivity nativních proteinů nebo pro studium interakcí protein-protein^{38,39}. Druhý typ čipů, tzv. čipy detegující proteiny (protein-detecting arrays) s navázanými specifickými proteinovými ligandy, může sloužit jako analytický nástroj pro monitorování hladin proteinů v biologických vzorcích³⁷ či pro identifikaci nových proteinových cílů pro chemicky připravené ligandy.

K aplikacím druhého typu (čipy detegující proteiny) patří i naše nedávno publikovaná práce⁴⁰, kdy jsme připravili kombinatorickou knihovnu pseudo-peptidů-fosfinátů imobilizovaných na pryskyřici. Knihovna byla připravena ve formě devatenácti směsí, z nichž každá obsahovala 19 imobilizovaných pseudo-peptidů. Tyto nosiče byly použity jako afinitní kolony pro purifikaci enzymů z homogenátu z potkaních jater. Řada studií prokázala, že pseudo-peptidy-fosfináty mohou být velmi účinnými inhibitory celé řady enzymů, zejména Zn-metaloenzymů^{41,42}. V našem případě⁴⁰ se podařilo za pomoci afinitních kolon s imobilizovanými pseudo-peptidy-fosfináty izolovat potkaní Zn-metaloenzym betain-homocystein S-methyltransferasu (BHMT). Pseudo-peptidy, které v imobilizova-



Obr. 2a. **Struktura afinitní matrice použitá pro izolaci potkaní jaterní betain-homocystein S-methyltransferasy (BHMT).** Obr. 2b. **Elektroforetická analýza frakcí získaných z afinitního nosiče zobrazeného na obrázku (a).** RLH je homogenát z potkaních jater. Frakce B1-B2 byly eluovány betainem, frakce H1-H3 DL-homocysteinem, frakce I1-I2 roztokem inhibitoru, frakce S1-S2 roztokem 1% dodecylsulfátu sodného a frakce G1-G2 roztokem 6M guanidinium chloridu. Relativní molekulové váhy standardů (STD) jsou znázorněny v kDa. Protein P21 je potkaní BHMT, protein P22 je příbuzný enzym BHMT 2 a protein P23 je fragment BHMT. Obr. 2c. „Western blot analýza“ vybraných frakcí z afinitní purifikace potkaní BHMT za použití polyklonálních protilátek proti lidské BHMT. Převzato z lit.⁴⁰

né formě posloužily k izolaci BHMT, byly poté testovány v roztoku za účelem zjištění jejich inhibičních vlastností vůči tomuto enzymu. Nejsilnější inhibitor byl poté sám imobilizován na nosiči. Pomocí této jednoduché afinitní kolony (obr. 2a) se podařilo v jednom kroku izolovat vysoce čistou potkaní BHMT a její homology a degradační produkty (obr. 2b). Tyto výsledky demonstrují, že novým proteomickým přístupem založeným na spojení kombinatorické chemie a afinitní chromatografie je možné identifikovat, bez jakékoli *a priori* hypotézy, nové proteinové cíle pro chemicky připravené zajímavé ligandy.

3. Aplikace proteomiky

Biologická aktivita proteinu často závisí na tom, zda je protein modifikován a jakým způsobem (např. fosforylovaný/defosforylovaný či glykosylovaný/deglykosylovaný). Právě schopnost analyzovat post-translační modifikace proteinů je jedním z výrazných přínosů proteomických studií. Fosforylace, glykosylace, stejně jako ostatní modifikace, jsou pro funkci proteinu nesmírně důležité, protože určují jeho aktivitu, stabilitu, lokalizaci či rychlost odbourávání. Nejvhodnější metodou pro určení modifikací proteinů je hmotnostní spektrometrie. Jde ovšem o úkol mnohem obtížnější než je pouhé určení identity proteinu. Např. purifikací peptidové směsi na koloně s pryskyřicí obsahující navázaný kov (IMAC – metal ion affinity chro-

matography) je možné obohatit vzorek o fosfopeptidy⁴³. Peptidy mohou být pak analyzovány metodou MALDI-MS jak před, tak po aplikaci alkalické fosfatasy¹⁰.

Jednou z klíčových otázek proteomiky, kromě toho kdy a kde jsou proteiny exprimovány, je otázka vzájemných interakcí mezi proteiny. Partneři, se kterými daný protein vstupuje do interakcí, jsou okamžitými vodítky k jeho biologickým funkcím a potencionálně mohou být využity pro terapeutické účely. Proteomika může ke studiu interakcí protein-protein významně přispět^{30,44}. Lákavou nicméně obtížnou cestou ke studiu protein-proteinových interakcí je purifikace celého multi-proteinového komplexu afinitními metodami (fúzní proteiny, protilátky). Proteinový komplex je následně separován elektroforézou a analyzován hmotnostní spektrometrií^{10,39}.

Srovnávací proteomika je diferenciální analýza komplexních směsí proteinů, která monitoruje změny proteomického složení za různých stavů organismu, např. nemocný *versus* zdravý, léčený *versus* neléčený, normální *versus* patologický stav apod.^{45,46}. Cílem je identifikovat proteiny, které jsou syntetizovány ve vyšší či nižší míře, určit, zda některé proteiny chybějí, jsou modifikovány, případně zjistit výskyt proteinů nových. Proteomika tak může sloužit k vyhledávání specifických proteinů (tzv. „protein markers“) na základě jejich zvýšené nebo snížené exprese při onemocnění⁴⁷. Novou, velice slibnou metodou pro srovnávání dvou proteinových vzorků, např. ze zdravých a rakovinných buněk, je tzv. DIGE („differential in-gel electrophoresis“)^{65–67}. Při DIGE je každý ze vzorků derivatizován rozdílnou fluorescenční značkou. Derivatizované proteiny obou vzorků jsou poté spojeny a separovány na jednom a tom samém 2-D gelu. Tento jediný gel je poté analyzován při dvou rozdílných vlnových délkách. Je tak možné zjistit rozdíly v expresi jednoho a toho samého proteinu v obou vzorcích při eliminování problémů spojených s reprodukovatelností elektroforetických analýz. Nevýhodou této metody je její značná finanční náročnost.

Toxikologické studie často využívají proteomickou analýzu ke zjištění mechanismu, jakým lék působí, nebo k identifikaci cílového místa jeho působení⁴⁸. Práce Steinerova a spol.⁴⁹, který zkoumal vliv lovastatinu (látky snižující hladinu lipidů) na složení proteinů z krysích jater, ukazuje možnost, jak objevit nové proteomické cíle analýzou již známých léků a drah, které regulují.

Srovnávací proteomika se může rovněž provádět bez separace nebo jen s omezenou separací proteinů následovanou kvantifikací hmotovou spektrometrií. Toho je dosaženo např. označením jednoho ze dvou proteinových vzorků stabilním izotopem (ICAT, cit.¹⁰).

Proteomická analýza se využívá v celé řadě biomedicínských aplikací, počínaje analýzou mozkových proteinů nebo proteinů mozkomíšního moku a s nimi souvisejících onemocnění, jako je např. Alzheimerova choroba⁵⁰, až po analýzu chorob ledvin, močového mechýře a moči a souvisejících nemocí^{51–53} (<http://biobase.dk/cgi-bin/celis>). Proteomika našla uplatnění také v lékařské mikrobiologii, jelikož může přispět k objasnění mechanismů patogenese nebo k porozumění mechanismu, jakým se vytváří antibi-

tická rezistence. Napomáhá tak zvýšení účinnosti současných antimikrobiálních léčiv⁵⁴.

Výzkum rakoviny je další oblastí, ve které může být proteomická technologie velmi přínosná. Řada proteinů vhodných pro diagnózu nádorů již byla objevena. Bude ovšem třeba identifikovat takové specifické proteiny, pomocí kterých bude možno rozlišovat maligní nádory od benigních a primární nádory a jejich metastázy. Ke správnému odhadu biologického chování různých nádorů a pro určení správných léčebných postupů je třeba kombinovat několik takových proteinů. Proteomika se také začíná uplatňovat při včasné diagnostice rakoviny⁵⁵ a rovněž může napomoci objasnit mechanismus její patogeneze⁵⁶.

4. Zpracování proteomických dat

Při proteomických studiích jsou získávána velká množství údajů, která musejí být logicky organizována, archivována a zpřístupněna. První databáze dvoudimenzionálních gelů proteinů z krysích jater byla publikována v roce 1991 Andersonem a spol.⁵⁷. Dnes jsou k dispozici proteomické databáze různých biologických druhů, které jsou pravidelně aktualizovány⁵⁸⁻⁶¹. Předběžné proteomické studie, které vytvořily dvoudimenzionální proteinové mapy různých organel⁶², orgánů nebo jejich částí⁶³, vytvářejí velmi užitečnou základnu pro budoucí studie mnoha různých procesů. Celis se spolupracovníky⁶⁴ vytvořil první detailní proteomickou mapu zahrnující nemocnou lidskou tkáň (<http://biobase.dk/cgi-bin/celis>). Tvorbu takových databází usnadňuje program pro analýzu 2D zobrazení, který umožňuje automatickou identifikaci rozdílů v proteomických vzorcích.

5. Závěr

Proteomika zaznamenala v několika posledních letech bouřlivý vývoj a poskytla obrovské množství dat o proteinovém složení specifických buněk, organel, rakovinných tkání či o interakcích protein-protein. Nicméně, pro rychlejší pokrok a naplnění všech možností proteomiky bude nutný další vývoj nových technologií, zejména čipových, organizování mezinárodních projektů a volný přístup k vědeckým výsledkům.

Práce byla podpořena grantem A4055302 Grantové agentury Akademie věd České republiky a výzkumným záměrem Z4 055 905.

LITERATURA

- Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. A., Galle R. F., George R. A., Lewis S. E., Richards S., Ashburner M., Henderson S. N., Sutton G. G., Wortman J. R., Yandell M. D., Zhang Q., Chen L. X., Brandon R. C., Rogers Y. H. C., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C. R., Miklos G. L. G., Abril J. F., Agbayani A., An H. J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R. M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E. M., Beeson K. Y., Benos P. V., Berman B. P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M. R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies A., de Pablos B., Delcher A., Deng Z. M., Mays A. D., Dew I., Dietz S. M., Dodson K., Doup L. E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B. C., Dunn P., Durbin K. J., Evangelista C. C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A. E., Garg N. S., Gelbart W. M., Glasser K., Glodek A., Gong F. C., Gorrell J. H., Gu Z. P., Guan P., Harris M., Harris N. L., Harvey D., Heiman T. J., Hernandez J. R., Houck J., Hostin D., Houston D. A., Howland T. J., Wei M. H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G. H., Ke Z. X., Kennison J. A., Ketchum K. A., Kimmel B. E., Kodira C. D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z. W., Lasko P., Lei Y. D., Levitsky A. A., Li J. Y., Li Z. Y., Liang Y., Lin X. Y., Liu X. J., Mattei B., McIntosh T. C., McLeod M. P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N. V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S. M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D. M., Nelson D. L., Nelson D. R., Nelson K. A., Nixon K., Nusskern D. R., Pacleb J. M., Palazzolo M., Pittman G. S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M. G., Reinert K., Remington K., Saunders R. D. C., Scheeler F., Shen H., Shue B. C., Siden-Kiamos I., Simpson M., Skupski M. P., Smith T., Spier E., Spradling A. C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A. H. H., Wang X., Wang Z. Y., Wassarman D. A., Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., Woodage T., Worley K. C., Wu D., Yang S., Yao Q. A., Ye J., Yeh R. F., Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G. G., Zhao Q., Zheng L. S., Zheng X. Q. H., Zhong F. N., Zhong W. Y., Zhou X. J., Zhu S. P., Zhu X. H., Smith H. O., Gibbs R. A., Myers E. W., Rubin G. M., Venter J. C.: *Science* 287, 2185 (2000).
- The *C. elegans* Sequencing Consortium: *Science* 282, 2012 (1998).
- The *Arabidopsis* Genome Initiative: *Nature* 408, 796 (2000).
- International Human Genome Sequencing Consortium: *Nature* 409, 860 (2001).
- Collins F. S., Morgan M., Patrinos A.: *Science* 300, 286 (2003).
- Lottspeich F.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 2476 (1999).
- Rao P. V., Garrow T. A., John F., Garland D., Millian N. S., Zigler J. S., Jr.: *J. Biol. Chem.* 273, 30669 (1998).

8. Abbott A.: *Nature* 402, 715 (1999).
9. Jenkins R. E., Pennington S. R.: *Proteomics* 1, 13 (2001).
10. Pandey A., Mann M.: *Nature* 405, 837 (2000).
11. Eisenberg D., Marcotte E. M., Xenarios I., Yeates T. O.: *Nature* 405, 823 (2000).
12. Klose J., Kobalz U.: *Electrophoresis* 16, 1034 (1995).
13. Corthals G. L., Wasinger V. C., Hochstrasser D. F., Sanchez J.-C.: *Electrophoresis* 21, 1104 (2000).
14. Anderson N. L., Anderson N. G.: *Electrophoresis* 19, 1853 (1998).
15. Görg A., Obermaier Ch., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W.: *Electrophoresis* 21, 1037 (2000).
16. Quadroni M., James P.: *Electrophoresis* 20, 664 (1999).
17. Righetti P. G., Castagna A., Herbert B., Reymond F., Rossier J. S.: *Proteomics* 3, 1397 (2003).
18. Lopez M. F.: *Electrophoresis* 21, 1082 (2000).
19. Lopez M. F., Kristal B. S., Chernokalskaya E., Lazarev A., Shestopalov A. I., Bogdanova A., Robinson M.: *Electrophoresis* 21, 3427 (2000).
20. Rabilloud T.: *Electrophoresis* 19, 758 (1998).
21. Herbert B. R., Molloy M. P., Gooley A. A., Walsh B. J., Bryson W. G., Williams K. L.: *Electrophoresis* 19, 845 (1998).
22. Molloy M. P., Herbert B. R., Walsh B. J., Tyler M. I., Traini M., Sanchez J.-C., Hochstrasser D. F., Williams K. L., Gooley A. A.: *Electrophoresis* 19, 837 (1998).
23. Santoni V., Molloy M., Rabilloud T.: *Electrophoresis* 21, 1054 (1999).
24. Deshusses J. M. P., Burgess J. A., Scherl A., Wenger Y., Walter N., Converset V., Paesano S., Corthals G. L., Hochstrasser D. F., Sanchez J.-C.: *Proteomics* 3, 1418 (2003).
25. Görg A., Postel W., Günther S.: *Electrophoresis* 9, 531 (1988).
26. Görg A., Obermaier Ch., Boguth G., Weiss W.: *Electrophoresis* 20, 712 (1999).
27. Aebersold R. H., Leavitt J., Saavedra R. A., Hood L. E., Kent S. B. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6970 (1987).
28. Rabilloud T.: *Proteomics* 2, 3 (2002).
29. Gygi S. P., Corthals G. L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9390 (2000).
30. Link A. J., Eng J., Schieltz D. M., Carmack E., Mize G. J., Morris D. R., Garvik B. M., Yates J. R. 3.: *Nat. Biotechnol.* 17, 676 (1999).
31. Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. 3.: *Nat. Biotechnol.* 19, 242 (2001).
32. Wolters D. A., Washburn M. P., Yates J. R. 3.: *Anal. Chemistry* 73, 5683 (2001).
33. Washburn M. P., Ulaszek R., Deciu C., Schieltz D. M., Yates J. R. 3.: *Anal. Chem.* 74, 1650 (2002).
34. Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R.: *Nat. Biotechnol.* 17, 994 (1999).
35. Templin M. F., Stoll D., Schwenk J. M., Potz O., Kramer S., Joos T. O.: *Proteomics* 3, 2155 (2003).
36. Wells W. A.: *Chem. Biol.* 6, R259-R260 (1999).
37. Kodadek T.: *Chem. Biol.* 8, 105 (2001).
38. MacBeath G., Schreiber S. L.: *Science* 289, 1760 (2000).
39. Cho S., Park S. G., Lee D. H., Park D. C.: *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 45 (2004).
40. Collinsová M., Castro C., Garrow T. A., Yiotakis A., Dive V., Jiráček J.: *Chem. Biol.* 10, 113 (2003).
41. Collinsová M., Jiráček J.: *Curr. Med. Chem.* 7, 629 (2000).
42. Dive V., Lucet-Levannier K., Georgiadis D., Cotton J., Vassiliou S., Cuniasso P., Yiotakis A.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 455 (2000).
43. Nuhse T. S., Stensballe A., Jensen O. N., Peck S. C.: *Proteomics* 2, 1234 (2003).
44. Blackstock W. P., Weir M. P.: *Trends Biotechnol.* 17, 121 (1999).
45. Witzmann F. A., Carpenter R. L., Ritchie G. D., Wilson C. L., Nordholm A. F., Rossi III J.: *Electrophoresis* 21, 2138 (2000).
46. Krapfenbauer K., Berger M., Lubec G., Fountoulakis M.: *Electrophoresis* 22, 2086 (2001).
47. McKerrow J. H., Bhargava V., Hansell E., Huling S., Kuwahara T., Matley M., Coussens L., Warren R.: *Mol. Med.* 6, 450 (2000).
48. Eberini I., Agnello D., Miller I., Villa P., Fratelli M., Ghezzi P., Gemeiner M., Chan J., Aebersold R., Gianazza E.: *Electrophoresis* 21, 2170 (2000).
49. Steiner S., Gatlin C. L., Lennon J. J., McGrath A. M., Aponte A. M., Makusky A. J., Rohrs M. C., Anderson N. L.: *Electrophoresis* 21, 2129 (2000).
50. Rohlff Ch.: *Electrophoresis* 21, 1227 (2000).
51. Celis J. E., Celis P., Ostergaard M., Basse B., Lauridsen J. B., Ratz G., Rasmussen H. H., Orntoft T. F., Hein B., Wolf H., Celis A.: *Cancer Res.* 59, 3003 (1999).
52. Celis J. E., Wolf H., Ostergaard M.: *Electrophoresis* 21, 2115 (2000).
53. Spahr C. S., Davis M. T., McGinley M. D., Robinson J. H., Bures E. J., Beierle J., Mort J., Courchesne P. L., Chen K., Wahl R. C., Yu W., Luethy R., Patterson S. D.: *Proteomics* 1, 93 (2001).
54. Cash P.: *Electrophoresis* 21, 1187 (2000).
55. Wulfschle J. D., Liotta L. A., Petricoin E. F.: *Nat. Rev. Cancer* 3, 267 (2003).
56. Alaiya A. A., Franzén B., Auer G., Linder S.: *Electrophoresis* 21, 1210 (2000).
57. Anderson N. L., Esquer-Blasco R., Hofmann J.-P., Anderson N. G.: *Electrophoresis* 12, 907 (1991).
58. Fountoulakis M., Berndt P., Boelsterli U. A., Cramer F., Winter M., Albertini S., Suter L.: *Electrophoresis* 21, 2148 (2000).
59. Fountoulakis M., Juranville J.-F., Berndt P., Langen H., Suter L.: *Electrophoresis* 22, 1747 (2001).
60. Fountoulakis M., Berndt P., Langen H., Suter L.: *Electrophoresis* 23, 311 (2002).

61. Perrot M., Sagliocco F., Mini T., Monribot Ch., Schneider U., Schevchenko A., Mann M., Jenö P., Boucherie H.: *Electrophoresis* 20, 2280 (1999).
62. Jung E., Heller M., Sanchez J.-C., Hochstrasser D. F.: *Electrophoresis* 21, 3369 (2000).
63. Witzmann F. A., Fultz C. D., Grant R. A., Wright L. S., Kornguth S. E., Siegel F. L.: *Electrophoresis* 19, 2491 (1998).
64. Celis J. E., Ostergaard M., Jensen N. A., Gromova I., Rasmussen H. H., Gromov P.: *FEBS Lett.* 430, 64 (1998).
65. Unlu M., Morgan M. E., Minden J. S.: *Electrophoresis* 18, 2071 (1997).
66. Zhou G., Li H., DeCamp D., Chen S., Shu H., Gong Y., Flaig M., Gillespie J. W., Hu N., Taylor P. R., Emmert-Buck M. R., Liotta L. A., Petricoin III E. F., Zhao Y.: *Moll. Cell. Proteomics* 1, 117 (2002).
67. Knowles M. R., Cervino S., Skynner H. A., Hunt S. P., de Felipe C., Salim K., Meneses-Lorente G., McAllister G., Guest P. C.: *Proteomics* 3, 1162 (2003).
68. Collinsová M., Jiráček J.: nepublikované výsledky.

M. Collinsová and J. Jiráček (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Current Development in Proteomics**

Proteomics is a quantitative, large-scale analysis of proteins present in organism at a certain time and under certain conditions. This review summarizes recent developments in this new rapidly developing field of biochemistry.

*Vážení čtenáři,
dovolujeme si Vás upozornit, že další číslo věnované farmaceutické chemii vyjde
v lednu 2006.
Věříme, že tato problematika najde mezi čtenáři odezvu a že o příspěvky nebude,
stejně jako v letošním roce, nouze.*

redakce

CHEMIE MUŽSKÉ SEXUALITY

KATEŘINA VALENTOVÁ^a, PAVLA ENTNEROVÁ^b, JAROSLAVA URBANÍKOVÁ^c
a VILÍM ŠIMÁNEK^a

^aÚstav lékařské chemie a biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, ^bPsychiatrická klinika FN Olomouc, I. P. Pavlova 22, 775 00 Olomouc, ^cFakultní lékárna, FN Olomouc, I. P. Pavlova 22, 775 00 Olomouc
kata.valentova@email.cz

Došlo 2.11.04, přijato 21.11.04.

Klíčová slova: erektilní dysfunkce, terapie, léky, fytopřípravky, doplňky stravy, mechanismus účinku, vedlejší účinky

Obsah

1. Úvod
2. Léky v terapii erektilní dysfunkce
 - 2.1. Inhibitory fosfodiesteras
 - 2.2. Látky s jiným mechanismem účinku
3. Fytopřípravky a doplňky stravy stimulující sexuální funkce
4. Látky s výraznými toxickými účinky stimulující erekci
5. Lékové interakce a zdravotní kontraindikace v terapii erektilní dysfunkce
6. Závěr

1. Úvod

Používání přírodních přípravků pro zvýšení pohlavní touhy a výkonnosti je staré téměř jako lidstvo samo. Jsou to převážně různé rostliny (více než 100 druhů), orgány živočichů a některé druhy hmyzu, ale také látky nerostného původu¹. Podle „bohyně smyslné lásky“ Afrodité se nazývají afrodisiaka. U většiny z nich není jejich účinnost prokázána, u některých jde spíše o účinky na libido než o účinek vyvolávající erekci. V současné době, kdy se pro řadu mužů sexuální výkonnost stala synonymem společenské úspěšnosti, asi polovina mužské populace ve věku 35 až 65 let přiznává problémy s erekcí². Erektální dysfunkce (ED), dříve traumaticky nazývaná impotence, je definována jako trvalá neschopnost dosáhnout nebo udržet erekci penisu dostatečnou pro uspokojivou sexuální aktivitu (obr. 1). ED trpí nejméně jeden muž z deseti. Nepostihuje jen sexualitu, ale jsou s ní také spojeny záporné emoce jako nejistota, stres a problémy v partnerském životě³. V

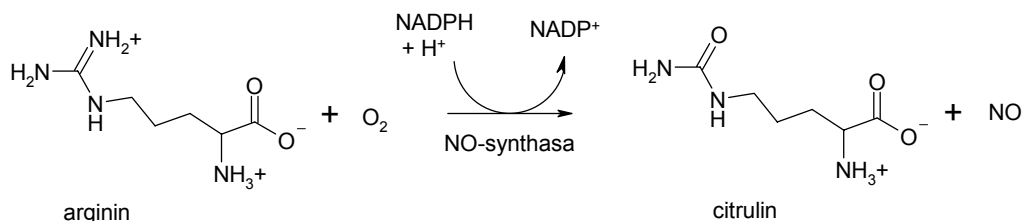
mladším věku převažují spíše psychické příčiny ED. Stále platí, že nejdůležitějším orgánem pro erekci je limbický systém v mozku. Erekcii potlačuje neurotický mechanismus vznikající z úzkosti, strachu z neúspěchu, psychického a fyzického vyčerpání. Zjednodušeně lze říci, že vše, co poškozuje zdraví, poškozuje také mužství, jako např. obezita, nedostatečná či jednostranná dieta, stres, kouření, alkohol, drogy, anabolika, ale také některé léky. Ve středním a starším věku je ED nejčastěji způsobena špatným stavem cév, které neumožňují dostatečné prokrvení penisu nebo poklesem hladiny mužských pohlavních hormonů (Partial Androgen Deficiency of Aging Male, PADAM) (cit.⁴). Častou příčinou ED je benigní hyperplazie nebo karcinom prostaty, radikální prostatektomie a diabetes mellitus⁵. Není proto překvapivé, že po objevu látek účinných při ED se lék Viagra[®] a další erektilika staly žádanými přípravky v zemích všech kontinentů^{6,7} (viz článek S. Rádra, kap. 2, v tomto čísle).

Hladké svaly penisu jsou obvykle udržovány v semikontraktilním stavu. Hlavním mediátorem relaxace hladkých svalových vláken penisu – erekce, je oxid dusnatý, jehož prekurzorem je L-arginin (obr. 2) (cit.²). Při vzrušení je NO, po nonadrenergní noncholinergní nervové stimulaci, uvolňován z endotelových buněk (obr. 3). V hladkém svalovém vlákně kavernózního tělesa (*corpora cavernosa*) aktivuje cytosolovou guanylátcyklasu (EC 4.6.1.2., GC) k produkci cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP). Cyklický GMP aktivuje specifickou proteinkinasu, která fosforyluje specifické proteiny a iontové kanály. Tyto kanály se otvírají pro draselné ionty, buněčné membrány se hyperpolarizují, a tím se zablokuje příjem vápenatých iontů buňkou. Následkem je pokles koncentrace Ca²⁺ v cytosolu a relaxace hladkého svalstva arterií a arteriol erektilní tkáně, což vede k několikanásobnému zvýšení přítoku krve do penisu. Současně relaxace trabe-

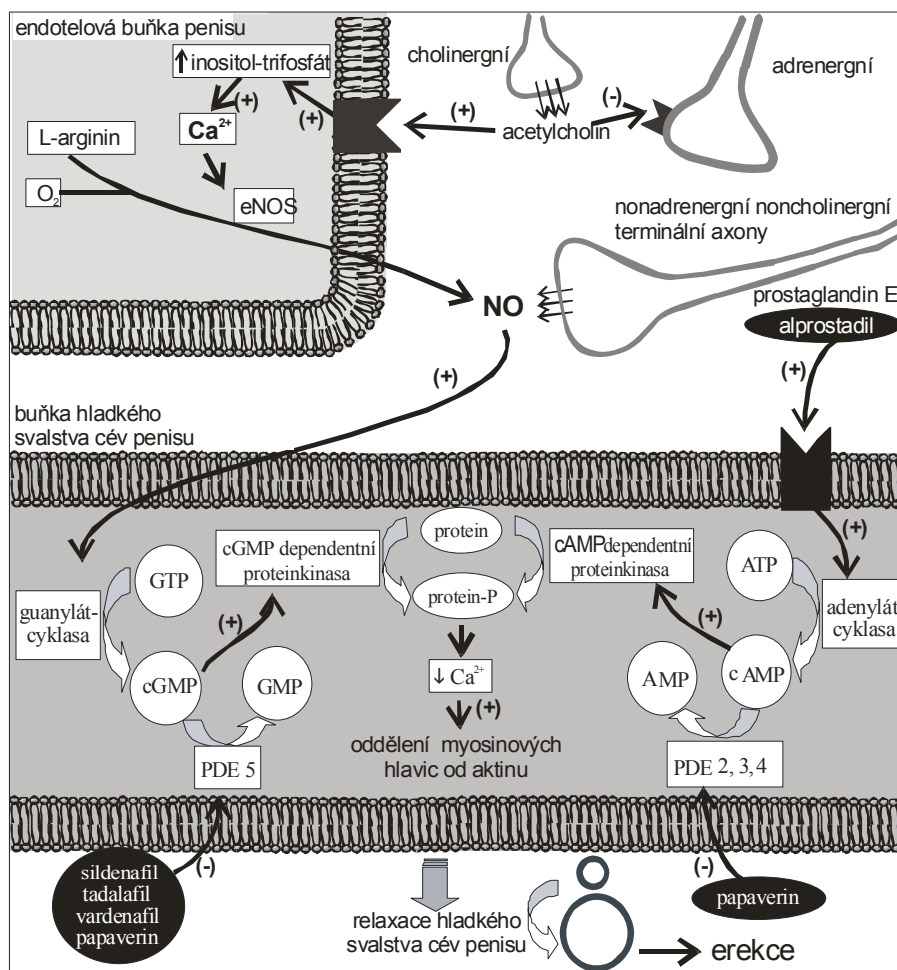


VÁŠ JĚŠTĚ SOULOŽÍ? MŮJ UŽ JENOM PUBLIKUJE...

Obr. 1.



Obr. 2. Biosyntéza oxidu dusnatého



Obr. 3. Relaxace buňky hladkého svalstva cév penisu a mechanismus působení některých látek s erektilním účinkem; (-) – inhibice, (+) – aktivace, eNOS – endotelová NO-synthasa, PDE – fosfodiesterasa

kul hladkých svalových vláken vede k rychlému naplnění lakunárních prostor kavernózních těles krve a jejich expanzi. Subtunikální žilní pletence jsou stlačeny a odtok krve je prakticky úplně zamezen. Tyto děje zadržují krev v kavernózních tělesech, kde je možné během masturbace či pohlavního styku dosáhnout tlaku až několik stovek mm Hg. Přechodně se zastaví výměna krve mezi penisem a ostatními částmi organismu. Během návratu penisu do ochablého stavu je cGMP hydrolyzován fosfodiesterasou

typu 5 (EC 3.1.4.17, PDE 5). Signální molekulou, která rovněž zprostředkovává relaxaci, je prostaglandin E_1 (PGE_1). Ten aktivuje produkci cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP), který je hydrolyzován enzymy PDE 2-4 (obr. 3) (cit.²).

Doporučení pro diagnózu a léčbu ED byla přijata v roce 2001 (cit.⁸). Mnoho pacientů však nadále upřednostňuje přírodní alternativy erektilik. V minulých letech nebývale vzrostl prodej fytopřípravků a doplňků stravy

s udávaným erektilním účinkem⁹. Tento článek je přehledem dosavadních poznatků o látkách a rostlinách, které jsou aktivními složkami léků, fytopřípravků a doplňků stravy používaných resp. doporučovaných mužům s poruchami erekce. Předmětem článku nejsou přírodní afrodisiaka a drogy s neprokázaným účinkem na ED. Článek rovněž neobsahuje žádná doporučení k výběru přípravku.

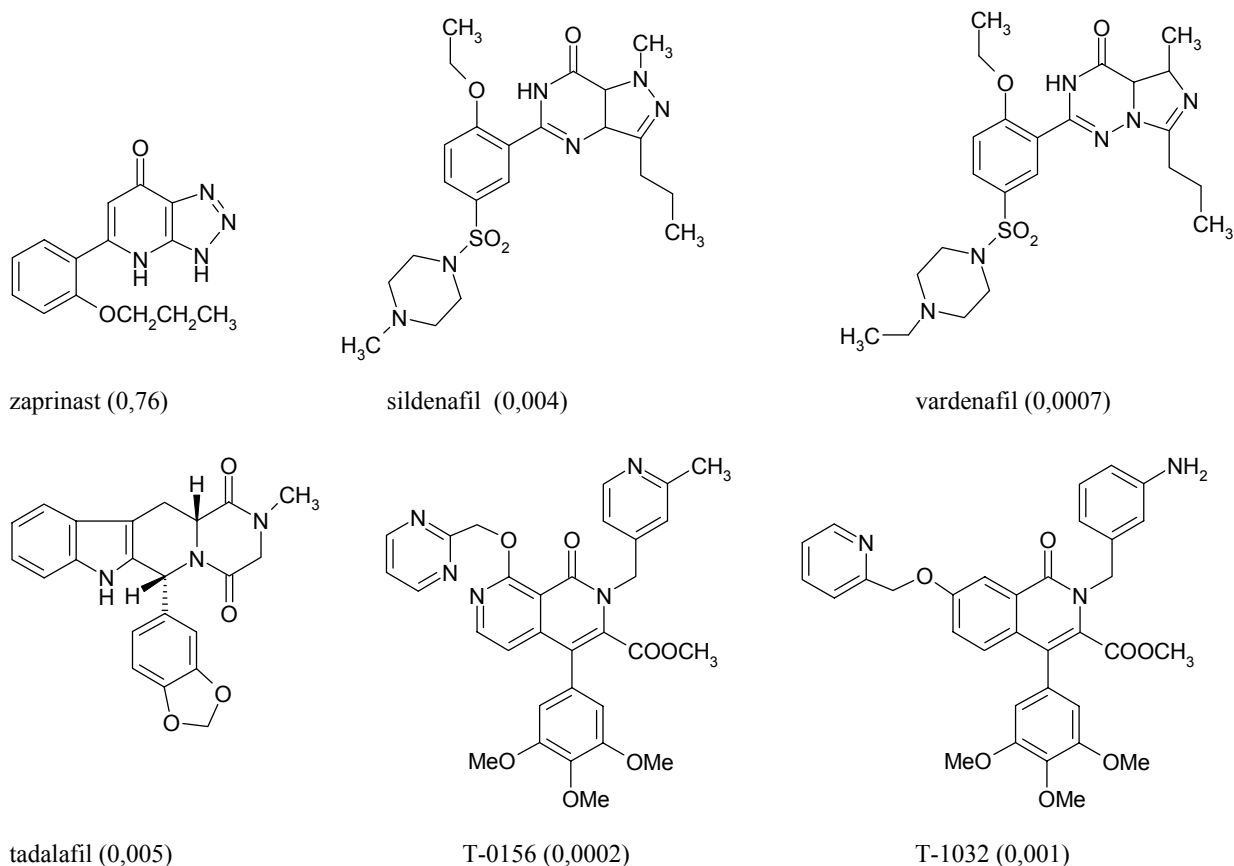
2. Léky v terapii erektilní dysfunkce

2.1. Inhibitory fosfodiesteras

Historie inhibitorů fosfodiesteras pro léčbu ED se datuje od roku 1986 (cit.¹⁰). Začala vývojem antihypertenziva, které by pozitivně ovlivňovalo vasodilatační a diuretický účinek endogenního atriálního natriuretického peptidu (ANP). ANP receptor aktivuje v ledvinách tvorbu GC, což vede ke zvýšení hladiny cGMP, snížení hladiny volného intracelulárního vápníku, zlepšení prokrvení ledvin, a tím ke zvýšenému vylučování sodíku a současnému po-

klesu krevního tlaku. Výzkumný tým firmy Pfizer se zaměřil na inhibitory PDE-enzymů, které regulují hladinu cGMP v buňce; výchozí modelovou strukturou byla sloučenina nazvaná zaprinast (obr. 4). V roce 1989 byla z několika perspektivních inhibitorů PDE 5 vybrána látka, která dostala generický název sildenafil. Poslední literární přehled inhibitorů fosfodiesteras cyklických nukleotidů byl publikován v roce 2004 (cit.¹¹), struktury některých z nich a hodnoty IC₅₀ jsou uvedeny na obr. 4.

Sildenafil (viz obr. 4). V tenkém střevě a játrech je sildenafil metabolizován formou cytochromu P450, CYP3A4, na *N*-desmethylsildenafil a jeho absolutní biologická dostupnost je kolem 40 %. Jako lék pro terapii ED byl sildenafil (Viagra[®]) schválen v roce 1998 (cit.¹²). Obvyklá doporučená dávka sildenafilu je 50 mg, maximálně 100 mg denně. Někteří pacienti uvádějí dobrý efekt i po dávkách 25 mg a méně. Účinek se dostavuje lépe při užití nalačno, lék lze kombinovat s malým množstvím alkoholických nápojů. Účinek nastupuje do 30 až 60 min a trvá 4 h. Lék je účinný pouze v reakci na sexuální stimulaci. K nejčastějším nežádoucím efektům patří návaly horka,



Obr. 4. **Struktury některých inhibitorů fosfodiesterasy PDE 5.** Hodnoty IC₅₀ v μmol·l⁻¹ jsou uvedeny v závorce za názvem sloučeniny, chemické názvy sildenafilu, vardenafilu a tadalafilu jsou: 5-[2-ethoxy-5-(4-methylpiperazin-1-sulfonyl)]-1-methyl-3-propyl-3a,7a-dihydro-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-on, 2-[2-ethoxy-5-(4-ethylpiperazin-1-sulfonyl)]-5-methyl-7-propyl-4a,5-dihydroimidazo[5,1-*f*][1,2,4]triazin-4(3*H*)-on a 6-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-methyl-12,12a-dihydro-6*H*,7*H*-pyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-*b*]indol-1,4-(2*H*,3*H*)-dion

bolesti hlavy, závratě, dyspepsie, zduření nosní sliznice, změny barevného vidění, zvýšená citlivost na světlo a rozostřené vidění^{13–15}. Pacienti uvádějí většinou výborný účinek a dobrou snášenlivost sildenafilu. Relativní nevýhodou sildenafilu je jeho rychlé vylučování z organismu a také poměrně vysoký inhibiční účinek na aktivitu PDE 6, enzymu lokalizovaného na tyčinkách a čípcích sítnice oka (má 10× menší afinitu než k PDE 5). Následkem inhibice PDE 6 jsou změny barevného vidění. Z těchto důvodů jsou hledány látky s větší selektivitou k PDE 5 (cit.¹⁶).

Vardenafil (viz obr. 4). Vardenafil (Levitra[®]) se od sildenafilu liší záměnou skeletu pyrazolopyrimidinu za imidazolotriazin a methylové skupiny za ethylovou na N₆ piperazinu. Lék je hodnocen jako nejúčinnější a nejselektivnější inhibitor PDE 5 s rychlým nástupem, 10 až 30 min po podání a menším výskytem nežádoucích účinků. Jeho biologický poločas je 4 až 5 h a afinita k PDE 6 je 15× menší než k PDE 5 (cit.⁶). Podle některých klinických studií vykázal vardenafil statisticky významné zlepšení erektilní funkce u více než 60 % pacientů nereagujících na sildenafil¹⁷, byl účinný u 72 % pacientů s diabetes mellitus a 71 % mužů po prostatektomii¹⁸. Na trhu jsou tablety obsahující 5, 10 a 20 mg účinné látky. Pro dosažení erekce je nutná sexuální stimulace. Vardenafil nevykazuje žádné interakce s malým množstvím alkoholu. Nejčastějšími nežádoucími účinky, které se objevují u 10 % pacientů, byly návaly horka a bolesti hlavy, časté byly dyspepsie, nauzea, závratě a rýma (1–10 %). Vzácněji se vyskytovalo zvýšení krevního tlaku, fotosenzitivita, poruchy vidění (0,1–1 %) a hypertonie, hypotenze a synkopa (0,01–0,1 %) (cit.^{19,20}). Stejně zkušenosti byly získány ze sexuologické poradny Fakultní nemocnice v Olomouci.

Tadalafil (viz obr. 4). Tadalafil (Cialis[®]) je zatím posledním schváleným inhibitorem PDE 5 a základním skeletem se liší od sildenafilu a vardenafilu (obr. 4). Poločas tadalafilu je 17,5 h a afinita k PDE 6 je více než 700× menší než k PDE 5 (cit.⁶). Nebyl u něj popsán žádný účinek na vidění. Na trhu jsou tablety obsahující 10 mg a 20 mg účinné látky. Výsledky klinických studií ukázaly, že ještě 36 h po podání 20 mg tadalafilu bylo 79 % pokusů o koitus úspěšných; k dosažení erekce je nutná sexuální stimulace. Nástup účinku je dostatečně rychlý. Více než polovina mužů po podání 20 mg tadalafilu dosahuje erekce během 30 min, účinek není příliš ovlivněn předchozím příjmem potravy a alkoholických nápojů. K nejčastějším vedlejším účinkům patří bolest hlavy (13 %), dyspepsie (10 %), bolesti zad (6 %) a svalů (5 %) a návaly horka (4 %). V naší poradně pacienti oceňovali rychlý nástup erekce neovlivněný dietou a prolongovaný účinek tadalafilu. Někteří však uváděli méně spolehlivý nástup erekce ve srovnání se sildenafilem.

Mezi dosud klinicky nezkoušené, *in vitro* účinné specifické inhibitory PDE 5 patří 2,7-naftthyridinový derivát T-0156 (obr. 4) (cit.²¹) a 4-aryl-1-isochinolinový derivát T-1032 (obr. 4) (cit.²²). Obě sloučeniny měly na izolované kavernózní těleso králíka relaxační účinek srovnatelný se sildenafilem.

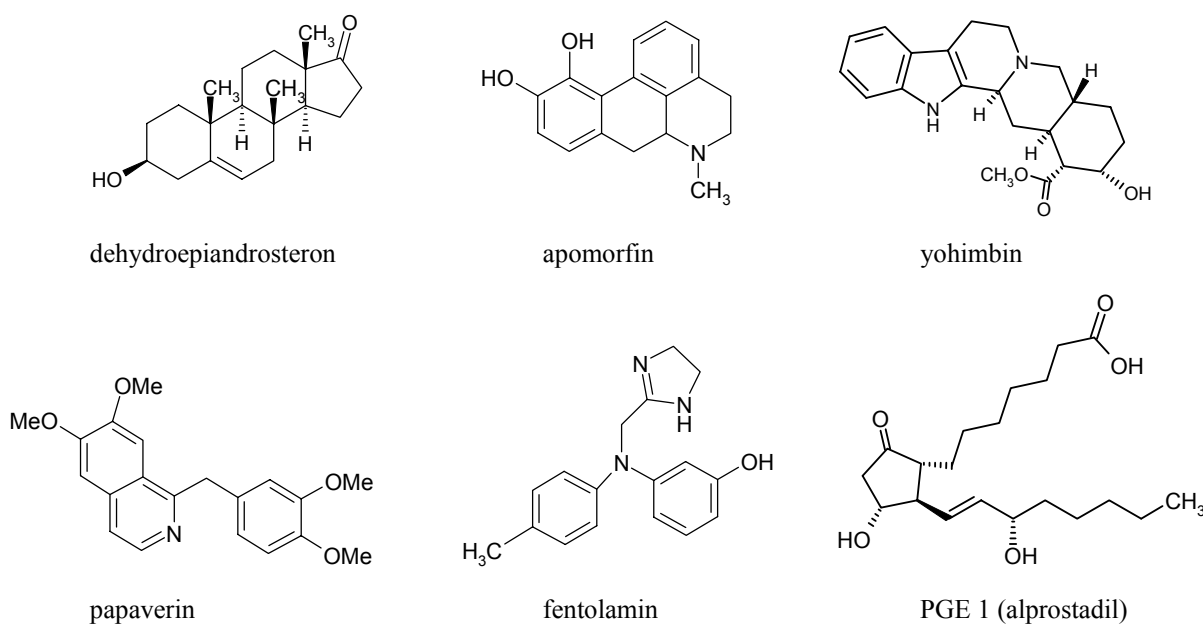
2.2. Látky s jiným mechanismem účinku

Apomorfin, yohimbin a dehydroepiandrosteron (DHEA) (obr. 5) jsou v éře inhibitorů PDE 5 používány v terapii ED méně častěji. U apomorfinu a yohimbinu je důvodem jejich malá účinnost, u DHEA jsou stále nedostačující znalosti o jeho celkovém působení, zejména je-li aplikován u mužů v podstatě zdravých. Papaverin, fentolamin, prostaglandin E₁ (obr. 5) a vazoaktivní intestinální polypeptidy jsou aplikovány v terapii ED, pokud jsou kontraindikována nebo jsou neúčinná orální erektilika.

Apomorfin. ((6*aR*)-6-Methyl-5,6,6a,7-tetrahydro-4*H*-dibenzo[*de,g*]chinolin-10,11-diol, viz obr. 5). Apomorfin je syntetický opiat připravovaný z morfinu, sexuální funkce ovlivňuje svým účinkem na dopaminergní systém centrálního nervového systému. Váže se na dopaminové receptory D₁ a D₂ a stimulací struktur hypotalamu v oblasti nucleus paraventricularis se zvyšuje intenzita nervových impulzů s následným vzestupem syntézy NO, což vede k vyšší tvorbě cGMP. Apomorfin (Uprima[®]) je dostupný ve formě sublingválních tablet v dávkách 2 nebo 3 mg. Lék vyžaduje sexuální stimulaci. Efekt se dostavuje přibližně za 20 min a trvá 2 h. Při překročení jeho optimální dávky se asi u 20 % pacientů objevují nauzea a zvracení. Nežádoucími účinky mohou být bolesti hlavy a závratě. Léčba nitráty není kontraindikací. Výhodou by měla být bezpečnost preparátu a 54 % efektivita erekcí dostačujících ke styku^{23,24}. Nedoporučuje se požívání alkoholických nápojů. Je paradoxem, že v letech 1987–2003 bylo publikováno nejméně 19 klinických studií potvrzujících účinnost apomorfinu v terapii ED (cit.²⁵), ale praktické zkušenosti a srovnávací klinické studie s inhibitory PDE 5 prokázaly jeho slabý erektilní účinek^{26–28}.

Yohimbin (viz obr. 5). Indolový alkaloid, izolovaný v roce 1896 Spiegelem z kůry západoafrického stromu bujarníku johimbé (*Corynanthe yohimbe*, Rubiaceae), je selektivním α_2 -adrenolytikem. Presynaptickou blokádu zvyšuje hladinu katecholaminů (dopaminu, noradrenalinu) v mozku, ovlivňuje hladinu serotoninu a má antidepresivní účinek. Uvádí se, že yohimbin může zlepšovat nebo stimulat sexuální funkce, ale tento účinek není u lidí, pro výrazné interindividuální rozdíly, spolehlivě prokázán^{9,28}. Perorálně lze podávat dávky 10–50 mg.den⁻¹ rozdělené do 2 nebo 3 dávek. Někdy dostačuje nárazové podání v dávce 5–20 mg jednu hodinu před stykem. K nejčastějším vedlejším účinkům patří návaly horka, pocení, vzrušivost, poruchy usínání, závratě, nauzea a třes rukou^{29,30}. Na trhu je lék obsahující pouze yohimbin (Yohimbin Spiegel[®]) (cit.³¹). Yohimbin hydrochlorid lze předepsat též magistraliter, event. v kombinaci s kofeinem, papaverinem, strychninem nebo diazepamem.

Dehydroepiandrosteron (viz obr. 5). Hormon produkováný v kůře nadledvinek cirkuluje ve vnitřním oběhu v konjugované formě jako DHEA-sulfát. Je to jediný hormon, jehož hladina v krvi klesá lineárně s biologickým věkem. Může být metabolizován jak na testosteron, tak na estradiol. V řadě zemí, s výjimkou České republiky, se prodává jako doplněk stravy s udávaným pozitivním účin-



Obr. 5. Přírodní látky a jejich analoga s erektilním účinkem

kem na celkový fyzický a mentální stav organismu, k prevenci nebo zmírnění průběhu většiny chronických onemocnění včetně ED (cit.³²). V jedné z mála klinických studií zaměřených na ED je popisován statisticky významný účinek na erekci u pacientů, kterým byl podáván DHEA v denní dávce 50 mg po dobu 24 týdnů³³.

Papaverin (viz obr. 5). Benzyloisochinolinový alkaloid, izolovaný z latexu *Papaver somniferum* (mák setý, Papaveraceae), je nespecifickým inhibitorem fosfodiesteras (PDE 2-4). Papaverin zvyšuje hladinu cAMP, má vazodilatační a spasmolytické účinky. U ED je papaverin účinný pouze, pokud je aplikován injekční formou intrakavernózně většinou v kombinaci s fentolaminem a prostaglandinem E₁ (cit.³⁴). Při předávkování hrozí riziko priapismu, t.j. dlouhotrvající bolestivé erekce, která po ejakulaci nemizí, a fibrosa kavernózních těles².

Fentolamin (viz obr. 5). Imidazolinový derivát, který kompetitivně blokuje α_1 - a α_2 -adrenergní receptory a rovněž inhibuje účinky serotoninu. U ED je používán v kombinaci s papaverinem a prostaglandinem E₁ (cit.^{2,34}).

Prostaglandin E₁ (viz obr. 5). (PGE₁, alprostadil). PGE₁ stimuluje G-proteinový receptor aktivující adenylát-cyklasu v kavernózním tělese. Zvýšená hladina cAMP vede k relaxaci sinusoid kavernózních těles a erekci². K navození erekce je PGE₁ aplikován intrakavernózně nebo intrauretrálně (do 10 μ g), často v kombinaci s papaverinem a fentolaminem. U vaskulogenně podmíněné ED se pohybuje aplikovaná dávka do 25 μ g. V praxi bývají hlavní indikací intrakavernózní nebo intrauretrální aplikace koktejlu vazoaktivních látek neurogenně podmíněné poruchy erekce, např. ED u diabetické neuropatie nebo podmíněné míšní lézí a nereagujících na jinou léčbu.

Na trhu jsou injekční formy PGE₁ Caverject[®] a Karon[®] a pelety pro intrauretrální podání (přípravek MUSE[®] není v ČR prozatím schválen). Přesto, že nebezpečí nežádoucích vedlejších účinků (návaly horka, bolestivost v místě vpichu, priapismus a fibrosa), je ve srovnání s papaverinem menší, lékař zpravidla vyžaduje písemný informovaný souhlas pacienta s léčbou.

Vazoaktivní intestinální polypeptidy. Směs polypeptidů izolovaná z tkáně tenkého střeva, mající výrazný relaxační účinek na hladké svalstvo penisu, byla aplikována v kombinaci s fentolaminem³⁵. U 70 % probandů vyvolala pevnou erekci. Přípravek je aplikován (pouze v USA) intrakavernózně a jeho vedlejší účinky jsou podobné jako u předchozích injekčně podávaných léků.

3. Fytopřípravky a doplňky stravy stimulující sexuální funkci

Tato část článku je věnována složkám fytopřípravků a doplňků stravy, u kterých je udáván pozitivní vliv na erekci. Byly vybrány ty rostliny a komponenty, u kterých se vycházelo při formulaci přípravku z výsledků studia jejich biologické aktivity *in vitro*, experimentů na zvířatech a dvojitě slepých, placebem kontrolovaných klinických studií na dobrovolnících. Jde většinou o intaktní části rostlin, jejich extrakty a chemicky definované přírodní látky. Nicméně, erektilní účinek přípravku je často zdůvodňován poznatky z etnofarmakologických studií^{9,36}.

Aspidosperma quebracho-blanco (kebračo, Apocynaceae). Stále zelený strom rostoucí v Jižní Americe. Biologicky aktivními látkami jsou pravděpodobně indolové alkaloidy aspidospermanového

typu. Z odhadovaného počtu asi 50 derivátů bylo strukturně charakterizováno 6 alkaloidů, např. aspidospermin a quebrachin^{37,38}. Yohimbin, jak je v literatuře často nesprávně uváděno, v rostlině nebyl nalezen. V tradiční medicíně se extrakt z kůry *A. quebracho-blanco* používá jako tonikum u onemocnění malých dýchacích cest, průduškového astmatu, emfyzému a ke zlepšení erekce³⁹. Extrakt je jednou z aktivních složek kombinovaného přípravku Afrodor 2000[®], který obsahuje ještě sedativum acekarbamol a vitamin E. Klinická studie tohoto přípravku uvádí zlepšení erekce u 14 % a zvýšení libida u 15 % pacientů po 4 týdenním užívání⁴⁰. Při předávkování byly jako nežádoucí účinky zaznamenány ztrnulost, závratě, nevolnost, křeče a bolesti hlavy. Sexuologové přípravek Afrodor 2000[®] hodnotí příznivě⁴¹.

Corynanthe yohimbe (s. *Pausinystalia yohimbe*, bujarník yohimbé, Rubiaceae). Strom yohimbé roste v západoafrických deštních pralesích. Kůra yohimbé obsahuje jako hlavní alkaloid yohimbin (obr. 5), z dalších to jsou např. isomery yohimbinu – korynthin, *pseudo-yohimbin* a heteroyohimbanu, např. ajmalicin a korynanthein⁴². V tradiční medicíně je extrakt z kůry používán především k léčbě nedostatečné erekce³⁹. Účinek doplňků stravy, které obsahují extrakt z kůry bujarníku, na erekci je individuální a ještě obtížněji hodnotitelný než u yohimbinu.

Epimedium sagittatum (škornice, Berberidaceae). Z patnácti druhů rodu *Epimedium* je *E. sagittatum* fytochemicky nejlépe charakterizovanou rostlinou. V čínské tradiční medicíně je *herba Epimedii* aktivní složkou fytopřípravků doporučených ke zlepšení erekce. Nadzemní část *E. sagittatum* obsahuje prenylované flavonolglykosidy, z nichž byl farmakologicky podrobněji studován pouze ikariin (obr. 6) (cit.^{43–45}). Tento flavonoid je specifickým inhibitorem PDE 5 (IC₅₀ 0,43 μmol.l⁻¹) s malým účinkem na PDE 4 (73,5 μmol.l⁻¹) (cit.⁴⁶). Literární údaje podporují uváděnou erektilní účinnost fytopřípravků obsahujících tuto drogu.

Eriosema kraussianum (Papilionaceae). Zakrslá keřovitá rostlina používaná v tradiční medicíně kmene Kwa-Zulu (jižní Afrika) ke zvýšení mužské potence⁴⁷. Pyranosoflavony nazvané kraussianony, izolované z kořenů byly aktivní v testu relaxace kavernózního tělesa králíka. Kraussianon 1 (obr. 6) vykázal v experimentu 85 % účinnosti sildenafilu⁴⁸. Ve fytopřípravcích prodávaných na evropském trhu se tato rostlina nevyskytuje.

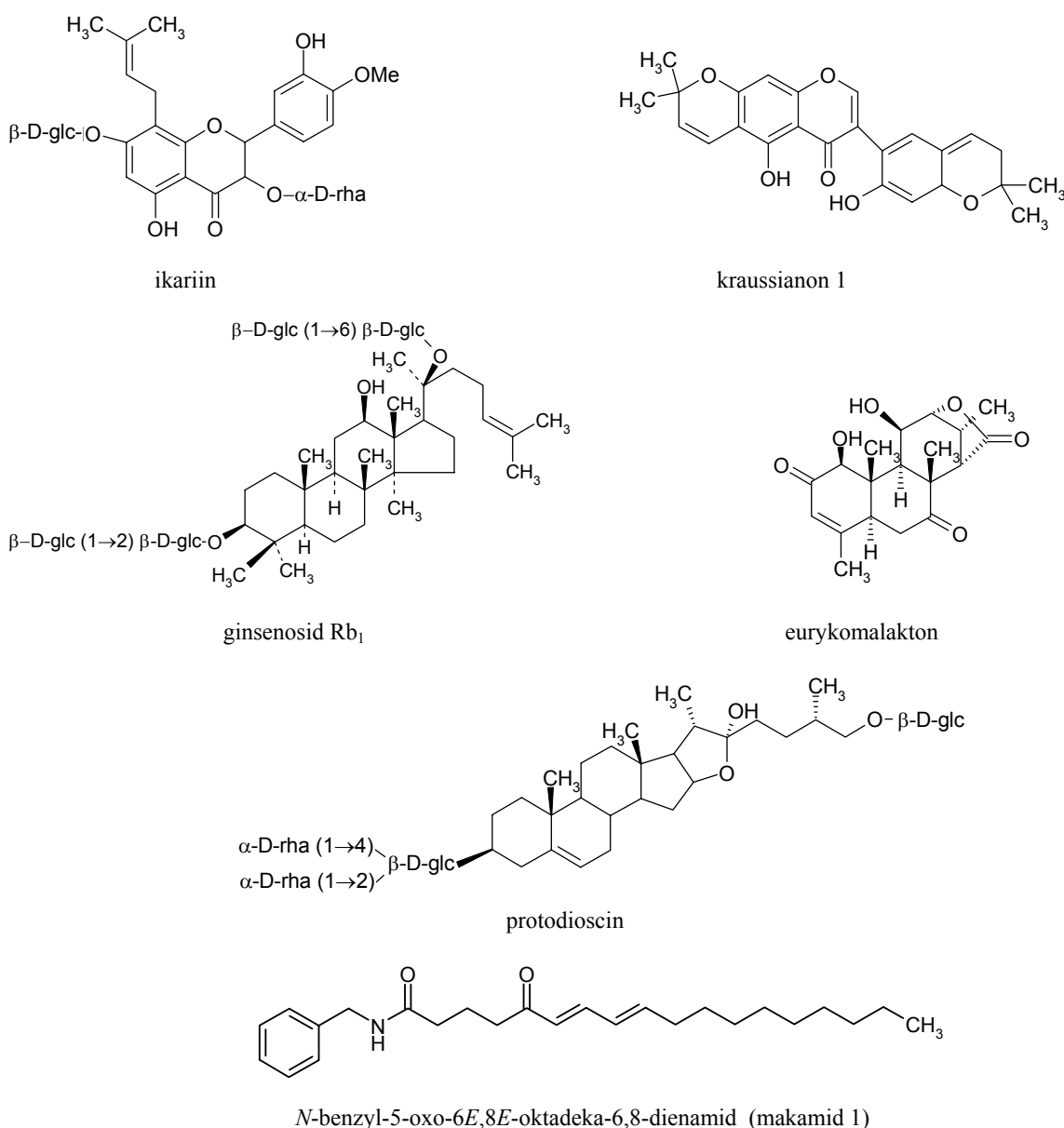
Eurycoma longifolia (Tongkat Ali, Simaroubaceae). Kořeny stromu rostoucího v deštných pralesích jihovýchodní Asie obsahují sloučeniny různých strukturních typů. Byly izolovány quassinoidy, např. eurykomalakton (obr. 6), kathin-6-onové a β-karbolinové alkaloidy, deriváty skvalenu a neolignany^{49,50}. V tradiční medicíně je extrakt *E. longifolia* používán hlavně u průjemových onemocnění, při malárii, gastritidách, horečnatých stavech a nedostatečné sexuální aktivitě. V experimentech na zvířatech, u kterých byl jako kontrola použit yohimbin, *E. longifolia* měla výrazně lepší výsledky ve všech sledovaných parametrech^{51,52}. Klinické studie ověřující erektilní účinek

extraktu Tongkat Ali na ED nejsou známy. Extrakt *E. longifolia* je složkou mnoha doplňků stravy s udávaným pozitivním účinkem na erekci.

Ginkgo biloba (jinan dvoulaločný, Ginkgoaceae). Listy jinanu se používají již více než 5000 let v tradiční čínské medicíně. Extrakt z listů, který obsahuje ginkgolidy, flavonoly, biflavony a fytosteroidy, má klinicky ověřené neuroprotektivní účinky⁵³. Výsledky ze dvou klinických studií prokázaly, že komplex látek obsažených v extraktu zlepšuje sexuální dysfunkci vyvolanou antidepresivou^{54,55}. Mechanismus účinku extraktu je vysvětlován potlačením inhibičního vlivu serotoninu na aktivitu neuronální NO-synthasy⁵⁶. Extrakt *G. biloba* je jednou ze stálých složek doplňků stravy zlepšujících sexuální funkci.

Lepidium meyenii (maka, Brassicaceae). Jídla a nápoje z hypokotylů této andské plodiny mají pozitivní vliv na zlepšení fyzické a psychické výkonnosti a reprodukční zdraví obou pohlaví. Stimulační účinek intaktních hypokotylů a celkového extraktu na sexuální aktivitu byl pozorován u myši a potkanů^{57,58}. Zvýšil se počet uskutečněných spojení a sperma-pozitivních samiček a snížila se latentní perioda erekce u potkaních samců. Vliv na parametry sexuálního výkonu byl u sexuálně nezkušených samců potkana pozorovatelný již po jednorázové dávce maky⁵⁹. Podávání maky zdravým dobrovolníkům v dávce 3 g.den⁻¹ po dobu 12 týdnů vedlo ke statisticky významnému zvýšení objemu spermatu, celkového počtu spermií a jejich pohyblivosti. Sérové hladiny 17α-hydroxyprogesteronu, testosteronu, 17β-estradiolu, luteinizačního hormonu a prolaktinu zůstaly nezměněny^{60–62}. U myších samic krmených makou došlo ke zvýšení plazmatické hladiny progesteronu a testosteronu, hladina 17β-estradiolu zůstala neovlivněna⁶³. Příznivé účinky maky na sexuální funkci u obou pohlaví jsou připisovány jak optimální kombinaci obsahových látek v hypokotylu – fytosteroidů, pyridinových a imidazolových alkaloidů, alkanamidů (obr. 6), glukosinolátů a isothiokyanátů, tak i vysoké nutriční hodnotě⁶⁴. Vzhledem k doporučené denní dávce (až 12 g) jsou na trhu většinou jako doplněk stravy prodávány pouze samotné rozemleté hypokotyle peruánské proveniencí.

Panax ginseng (korejský ženšen, Araliaceae). V kořenech ženšenu bylo strukturně identifikováno více než 200 sloučenin. Charakteristické obsahové látky jsou ginsenosidy (triterpenové saponiny, obr. 6) (cit.⁶⁵). Droga působí stimulačně na centrální nervový systém, podporuje srdeční činnost, snižuje hladinu glukosy v krvi a zlepšuje střevní peristaltiku. Svým komplexním účinkem na hemodynamiku organismu pomáhá ke zvládnutí fyzicky i psychicky náročných situací. Pozitivní vliv ženšenu na pohlavní aktivitu se připisuje biologické aktivitě ginsenosidů. *In vitro* tyto látky vyvolávaly relaxaci kavernózního tělesa stimulací tvorby endotelového NO (cit.⁶⁶). Klinické studie s korejským ženšenem prokázaly zlepšení sexuálních parametrů ve srovnání s placebem^{67,68}. Účinek na ED se však projevuje až po dlouhodobém používání (8 týdnů) relativně vysokých denních dávek ženšenu ve formě prášku (900 mg.den⁻¹). Korejský ženšen je stálíci doplňků stravy



Obr. 6. Přírodní látky s dosud nedostatečně prokázaným erektilním účinkem

s udávaným účinkem na sexuální vitalitu, ale často je nahrazován jinými druhy, např. *P. vietnamensis* nebo *P. quinquefolius* či eleutorokokem ostnatým (*Eleutherococcus senticosus*, Araliaceae). Adaptogenní účinky těchto rostlin jsou zpravidla menší³⁹.

Tribulus terrestris (kotvičnik pozemní, Zygophyllaceae). Letnička rostoucí v oblastech mírného a teplého klimatu Evropy a Asie a v jižní Africe. Hlavními obsahovými látkami jsou furostanolové saponiny, z nichž až 50 % je protodioscin (obr. 6) (cit.⁶⁹). *T. terrestris* byl v tradiční indické a čínské medicíně používán při onemocnění srdce, jater a ledvin a pro anabolický účinek. V současné době je vyhledávanou drogou pro zlepšení reprodukčních funkcí

u obou pohlaví⁷⁰. Předpokládá se, že protodioscin je v organismu transformován na DHEA. Studie na normálních a kastrovaných myších prokázaly stimulační vliv extraktu na sexuální chování zvířat, hladiny hormonů však nebyly sledovány^{71,72}. Extrakt měl relaxační účinek na hladké svalstvo kavernózního tělesa králíka⁷³. Klinické studie s extraktem *T. terrestris* zatím publikovány nebyly. Kotvičnik se stává stále populárnějším doplňkem stravy s udávaným proerektilním efektem, zejména v kombinaci s makou a L-argininem.

L-Arginin. Semiesenciální bazická aminokyselina, endogenně syntetizovaná z karbamoylfosfátu, L-ornithinu a α -aminoskupiny kyseliny asparagové. V organismu je

L-arginin metabolizován na řadu sloučenin, např. NO-synthasou (EC 1.14.13.39) v endotelových buňkách, makrofázích a centrálním nervovém systému na NO a L-citrulin (obr. 2), v játrech arginasou (EC 3.5.3.1) na ornithin, arginin:glycin-amidino-transferasou (EC 2.1.4.1) na kreatin a arginindekarboxylasou (EC 4.1.1.19) na agmatin⁷⁴. V doplňcích stravy je L-arginin ceněn zejména pro stimulační účinek na imunitní systém a ED (cit.^{9,75}). V dvojité slepé, placebem kontrolované klinické studii na 50 dobrovolnících, kterým bylo podáváno 6 týdnů 5 g L-argininu na den, 31 % probandů udávalo zlepšení erekce⁷⁶. Přímý účinek na zvýšení tvorby endotelového NO prokázán nebyl. Statisticky významné zvýšení koncentrace L-argininu, glycinu a L-ornithinu v krvi a moči bylo nalezeno u dobrovolníků až po týdenní dávce 9 g.den⁻¹ (cit.⁷⁷). Přidávek L-argininu v doplňcích stravy v dávkách 0,5–5 g L-argininu na den pravděpodobně nemá prokazatelný účinek na ED. Nicméně kombinace s látkami stimulačními aktivitu endotelové NO-synthasy může být zajímavá, jak ukázala klinická studie se 40 dobrovolníky (věk mezi 25 a 45 roky, diagnosa ED), kterým bylo podáváno 90 dní 1,7 g L-argininu na den v kombinaci s extraktem flavonoidů (Pycnogenol[®], 80 mg.den⁻¹) z *Pinus maritima* (mořská borovice) (cit.⁷⁸). Téměř 92 % účastníků studie uvádělo na konci studie normální erekci. Podávání samotného přípravku Pycnogenol[®] 18 pacientům v denní dávce 120 mg po dobu tří měsíců vedlo ke zlepšení sexuálních funkcí u 46 % (cit.⁷⁹). Podobných výsledků bylo jednorázově dosaženo u pacientů se slabou a střední ED po jednorázovém podání kombinace 3,25 g L-argininu a 6 mg yohimbinu⁸⁰.

L-Karnitin. L-Karnitin je v organismu syntetizován z esenciálních aminokyselin lysinu a methioninu. V buňce funguje jako přenašeč acylových skupin přes mitochondriální membránu. L-Karnitin a jeho acetylderivát jsou vyhledávanými doplňky stravy⁸¹. Nedávno byla publikována klinická studie, kde u pacientů, kterým byl podáván acetyl-L-karnitin (2 g.den⁻¹) a propionyl-L-karnitin (2 g.den⁻¹) po dobu 6 měsíců se statisticky významně zlepšila erekce ve

srovnání s kontrolou a skupinou, které byl aplikován testosteron (160 mg.den⁻¹) (cit.⁸²). Tento dosud nepopsaný účinek L-karnitinu je vysvětlován jeho nedostatkem v důsledku poklesu androgenů u stárnoucích mužů a podporuje účelnost nejednoznačně přijímané substituční terapie testosteronem nebo její nahrazení L-karnitinem.

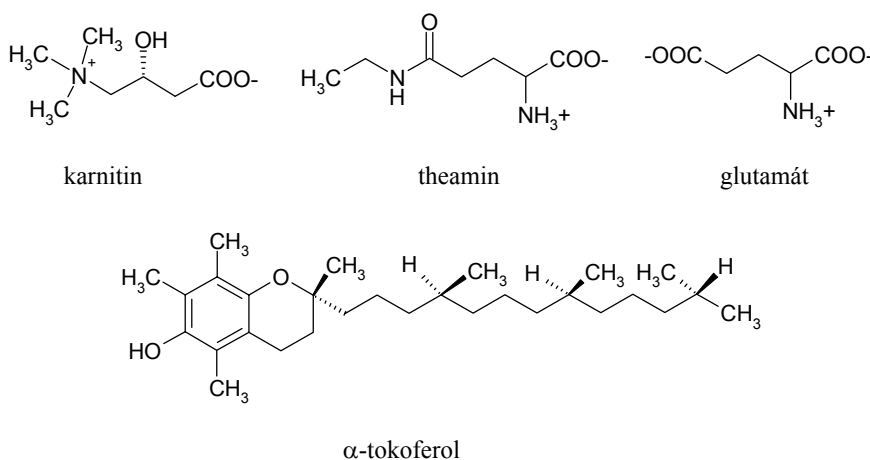
K nutraceutikům, které jsou často složkami doplňků stravy pro zlepšení sexuálních funkcí a mají pozitivní fyziologické účinky, patří theamin (obsahová látka zeleného čaje, *Camellia sinensis*), glutamát sodný a vitamin E (α -tokoferol, obr. 7).

4. Látky s výraznými toxickými účinky stimulační erekce

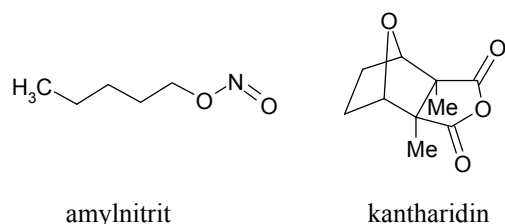
Dnes již pouze literárně známým afrodisiakem je *Lytta vesicatoria* (španělská muška) (cit.¹). Muška obsahuje silně toxický kantharidin (obr. 8, 2,3-dimethyl-7-oxabicyklo[2.2.1]heptan-2,3-dikarboxanhydrid), který je specifickým inhibitorem proteinfosfatasy 1A a 2A, enzymu v metabolismu glykogenu⁸³. Aktuálně nebezpečným přípravkem je amylnitrit (pentylnitrit), prodáváný v sexshopu pod názvem Poppers (obr. 8). Amylnitrit je při pokojové teplotě těkavý, působí jako donor NO a jeho inhalace má za následek rychle nastupující relaxaci hladkého svalstva vnitřních orgánů⁸³. Je dostupný v ampulích a jeho hlavní lékařské použití je jako protijed u otravy kyanidem. Vzácně je aplikován u akutních ledvinových a žlučnickových kolik. Inhaluje se bezprostředně před orgasmem pro zvýšení a prodloužení sexuálního potěšení. V mnoha zemích je populární na diskotékách. Působí podráždění dýchací sliznice a může vést k těžké hypotenzi s následnou zástavou srdce.

5. Lékové interakce a zdravotní kontraindikace v terapii erektilní dysfunkce

K nežádoucím farmakodynamickým interakcím dochází u všech tří inhibitorů PDE 5, sildenafilu, var-



Obr. 7. Nutraceutika podporující sexuální funkce



Obr. 8. Látky s výraznými toxickými účinky stimuluji erekci

denafilu a tadalafilu, pokud pacient užívá antihypertenziva (β -blokátory, centrální sympatolytika, periferní vazodilatancia, diuretika), antidepressiva (inhibitory monoaminoxidasy, tricyklická antidepressiva), inhibitory acetylcholinesterasy, sedativa (barbituráty), anxiolytika (benzodiazepiny), antagonisty aldosteronu (spironolakton), indometacin a klofibrát. Ze skupiny drog např. nadměrné množství alkoholických nápojů a deriváty morfinu. Absolutně kontraindikovány jsou všechny nitráty a donory NO (glycerol-trinitrát, isosorbid mono- a dinitrát, amylnitrit). Nutriční zdroje nitritů, nitrátů a L-arginin neovlivňují významně hladinu cirkulujícího NO (cit.^{84,85}). Z léků, které ovlivňují farmakokinetiku sildenafilu, jsou to zejména nespecifické inhibitory CYP3A4, azolová antimykotika (ketokonazol), antihistaminikum cimetidin (H_2 antagonist) a makrolidové antibiotikum erytromycin. Relativními kontraindikacemi pro sildenafil jsou: infarkt myokardu, cévní mozková příhoda či život ohrožující arytmie v posledních šesti měsících, nestabilní angina pectoris, měštnavé srdeční selhání a tlak krve (TK) pod 95/50 mm Hg nebo nad 170/110 mm Hg, selhávání jaterních a ledvinových funkcí⁸⁴. Pro rostliny/extrakty uvedené v tomto článku nebyly v literatuře nalezeny studie o jejich interakci s jinými xenobiotiky.

Z pohledu uživatele je zajímavý účinek furokumarinů, bergamottinu a 6,7-dihydroxybergamottinu, obsažených ve šťávě z grepů. Tyto látky ireversibilně inhibují CYP3A4 a P-glykoprotein. Tím se snižuje intestinální metabolismus sildenafilu, ale i vardenafilu a tadalafilu, zvyšuje se jejich absorpce z trávicího traktu do vnitřního prostředí a aktuální koncentrace v buňce⁸⁶. Šťávy z jiných citrusových plodů (pomeranč, citrón) látky inhibující CYP3A4 neobsahují.

6. Závěr

Erektální dysfunkce je jak sociální, tak zdravotní problém jednotlivce. Ať s tím souhlasíme nebo ne, peníze a sex jsou symbolem štěstí pro značnou část populace ve vyspělých zemích. Jaké závěry může čtenář udělat po přečtení článku? Pokud má problémy se svou sexuální aktivitou, neměl by v první fázi hledat řešení v chemii. Často stačí uspořádat si svůj životní styl a změnit dietu. Pokud tento postup nevede ke znatelnému zlepšení, pak dalším krokem jsou fytopřípravky a doplňky stravy. Staleté zkušenosti lidového léčitelství vycházejí nejen z efektu place-

Tabulka I

Příklady doplňků stravy na českém trhu s uváděným pozitivním vlivem na erekci

Doplňěk	Složení
1	L-Arginin, jinan dvoulaločný (<i>Ginkgo biloba</i>), ženšen (<i>Panax ginseng</i> , <i>P. quinquefolium</i>), vitaminy A, E, B _{1,2,5,6,12} , kyseliny listová, pantothenová, biotin, Zn, Se (pro muže)
2	L-Arginin, jinan dvoulaločný, ženšen, vitaminy A, E, B _{1,2,5,6,12} , kyseliny listová, pantothenová, biotin, Zn, Fe, Ca (pro ženy)
3	Maka (<i>Lepidium meyenii</i>)
4	Maka, jinan dvoulaločný, koenzym Q ₁₀ , vitamin E, Zn
5	Kůra bujarníku yohimbé (<i>Corynanthe yohimbe</i>), aloe, listy <i>Turnera diffusa</i> , extrakt semen cicimeku datlového (jube), listy jinanu dvoulaločného, aminokyseliny – L-glutamová, L-arginin, L-alanin
6	Skořicovník čínský (<i>Cinnammum chinensis</i>), kokotice čínská, kustovnice, klanopraška čínská (<i>Schizandra chinensis</i>), listy maliny, kořen vítodu úzkolistého (<i>Polygala amara</i>), kořen <i>Rehmannia glutinosa</i> , kůra gumojilmu (<i>Eucommia ulmoides</i>), česnek, semeno indického lotosu, kůra hlošiny úzkolisté (<i>Elaeagnus augustifolia</i>), semeno kozince blanitého (<i>Astragalus membranaceus</i>), semeno zeravu západního (<i>Thuja occidentalis</i>), ženšen, jinan dvoulaločný

ba, ale také z biologického účinku prověřeného na mnoha generacích. Nelze zcela odmítat přírodní látky či extrakty, které jsou řazeny mezi afrodisiaka. Pokud je muž přemýšlivý a dává přednost důkazům podloženým tvrzením, pak se bude snažit vybrat ty přípravky, které mají alespoň *in vitro* prokázané účinky na receptory či další struktury centrálního nervového systému. U rostlin, které obsahují vysoké procento fytosterolů, je určitým, byť ne zcela exaktně důkazem podloženým účinkem jejich metabolická transformace na některý z pohlavních hormonů. Pouze u mála rostlinných extraktů lze předpokládat, že kromě ovlivnění struktury CNS bude jejich pozitivní fyziologický efekt spočívat i v genové expresi, resp. přímé aktivaci např. konstituční či neuronální NO-synthasy⁸⁷. Většina rostlinných extraktů vykazuje biologický účinek daný souhrnem biologických aktivit všech komponent. Při výběru fytopřípravku nebo doplňku stravy se vyplatí také kriticky posoudit jeho složení, příklady jsou uvedeny v tabulce I. Zde většinou platí, že méně znamená více. Bylo také zjištěno, že v některých případech byl inzerovaný účinek podpořen přidávkem některého z farmakologicky respektovaných inhibitorů PDE 5 (cit.⁸⁸). Chce-li mít muž jistotu, že bude mít erekci,

pak mu nezbyvá, než přistoupit k lékové terapii. Na doporučení lékaře si může vybrat buď jeden z inhibitorů PDE 5 nebo léky, které účinkují přímo na hladkou svalovinu kavernózního tělesa inhibicí PDE 2-4. U těch druhých je jistota úspěchu vykoupena injekční aplikací. Stárnoucí muž se těmito úvahám nevyhne a záleží jen na rozhodnutí jednotlivce, jaký postoj k fyziologickým změnám ve svém organismu zaujme a zda je bude chtít zásahem zvenčí ovlivnit.

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu na řešení dané problematiky (grant MSM 151100003) a panu Vladimíru Jiráňkovi za laskavý souhlas k otištění kresby na obr. 1.

LITERATURA

- Rätsch C.: *Byliny lásky*. Volvox Globator, Praha 1997.
- Lue T. F.: New Engl. J. Med. 342, 1802 (2000).
- <http://www.erekce.com>, staženo 3.2.2004.
- Kloner R.A.: Compr. Ther. 30, 50 (2004).
- Montorsi F., Briganti A., Salonia A., Rigatti P.: Eur. Urol. 45, 123 (2004).
- Rosen R. C., Kostis J. B.: Am. J. Cardiol. 92, 9M (2003).
- Brock G.: Eur. Urol. Suppl. 1, 12 (2002).
- Lewis J.H., Rosen R., Goldstein I.: Am. J. Nurs. 103, 48 (2003).
- MacKay D.: Altern. Med. Rev. 9, 4 (2004).
- Kling J.: Mod. Drug Discovery 1, 31 (1998).
- Vasta V., Beavo J.: Celltransmissions Sigma RBI 20 (1), 1 (2004).
- Jezdinský J.: Klin. Farmakol. Farm. 13, 7 (1999).
- Padma-Nathan H., Steers W. D., Wicker P. A.: Int. J. Clin. Pract. 52, 375 (1998).
- Padma-Nathan H.: J. Urol. 159S, 238 (1998).
- Steers W., Guay A. T., Leriche A., Gingell C., Hargreave T. B., Wright P. J., Price D. E., Feldman R. A.: Int. J. Impotence Res. 13, 261 (2001).
- Mochida H., Noto T., Inoue H., Yano K., Kikkawa K.: Eur. J. Pharm. 485, 283 (2004).
- Anderson P. C., Gommersall L., Hayne D., Arya M., Patel H. R.: Expert Opin. Pharmacother. 5, 2241 (2004).
- Carson C.C.: Psychosomatic Med. 66, 664 (2004).
- Brock G.B., McMahon C.G., Chen K.K., Costigan T., Shen W., Watkins V., Anglin G., Whitaker S.: J. Urol. 168, 1332 (2002).
- Goldstein I., Young J. M., Fischer J., Bangerter K., Segerson T., Taylor T.: Diabetes Care 26, 777 (2003).
- Ukita T., Nakamura Y., Kubo A., Yamamoto Y., Moritani Y., Saruta K., Higashijima T., Kotera J., Fujishige K., Takagi M., Kikkawa K., Omori K.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 2341 (2003).
- Ukita T., Nakamura Y., Kubo A., Yamamoto Y., Moritani Y., Saruta K., Higashijima T., Kotera J., Takagi M., Kikkawa K., Omori K.: J. Med. Chem. 44, 2204 (2001).
- Heaton J. P. W.: Int. J. Impotence Res. 46, S35 (2001).
- Mirone V.G., Stief C.G.: Br. J. Urol. Int. 88, S25 (2001).
- <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>, staženo 31.8.2004.
- Eardley I., Wright P., MacDonagh R., Hole J., Edwards A.: Br. J. Urol. Int. 93, 1271 (2004).
- Derouet H., Osterhage J., Sittinger H.: Urologe A 43, 197 (2004).
- Schultheiss D., Stief C. G.: Urologe A 42, 1322 (2003).
- Vogt H. J., Brandl P., Kockott G., Schmitz J. R., Wiegand M. H., Schadrack J., Gierend M.: Int. J. Impotence Res. 9, 155 (1997).
- Ernst E., Pittler M. H.: J. Urol. 159, 433 (1998).
- Anonym: Farmakoter. Inf. č. 4, 1 (2004).
- Pepping J.: Am. J. Health-Syst. Pharm. 57, 2048 (2000).
- Reiter W. J., Pycha A., Schatzi G., Pokorny A., Gruber D. M., Huber J. C., Marberger M.: Urology 53, 590 (1999).
- Slob A. K., Verhulst A. C., Gijs L., Maksimovic P. A., van der Werff ten Bosch J. J.: J. Sex Marital Ther. 28, 61 (2002).
- Dinsmore W. W., Gingell C., Hackett G., Kell P., Savage D., Oakes R., Frenzt G. D.: Br. J. Urol. Int. 83, 274 (1999).
- Drewes S. E., George J., Khan F.: Phytochemistry 62, 1019 (2003).
- Unger M., Stöckigt D., Belder D., Stöckigt J.: Pharmazie 52, 691 (1997).
- Stöckigt J., Sheludk Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D.: J. Chromatogr., A 967, 85 (2002).
- Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., duCellier J., Duke P-A. K. v knize: *Handbook of Medicinal Herbs*, str. 603. CRC Press, Boca Raton 2002.
- Sperling H., Lummen G., Luboldt H. J., Rubben H.: Urologe A 38, 56 (1999).
- Zvěřina J.: Zdrav. Nov. 46 (7), 5 (1997).
- Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept, Andover 1995.
- Kuroda M., Mimaki Y., Sashida Y., Umegaki E., Yamazaki M., Chiba K., Mohri T., Kitahara M., Yasuda A., Naoi N., Xu Z. W., Li M. R.: Planta Med. 66, 575 (2000).
- Qiao L., Xin Z. C., Fu J., Liu W. J., Lin G. T., Chen S.: Chin. J. Urol. 23, 670 (2002).
- Kim J. H., Mun Y. J., Im S. J., Lee S. Y., Lee S. W., Woo W. H.: Biol. Pharm. Bull. 25, 1000 (2002).
- Xin Z. C., Kim E. K., Lin C. S., Liu W. J., Tian L., Yan Y. M., Fu J.: Asian J. Androl 5, 15 (2003).
- Bryant A. T. v knize: *Zulu Medicine and Medicine Men*, str. 61. Centaur Press, Cape Town 1983.
- Drewes S. E., Horn M. M., Munro O. Q., Dhlamini J. T. B., Meyer J. J. M., Rakuambo N. C.: Phytochemistry 59, 739 (2002).
- Ang H. H., Hitotsuyanagi Y., Fukaya H., Takeya K.: Phytochemistry 59, 833 (2002).

50. Kuo P-C., Damu A. G., Lee K-H., Wu T-S.: *Bioorg. Med. Chem.* 12, 537 (2004).
51. Ang H. H., Lee K. L., Kiyoshi M.: *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 14, 301 (2003).
52. Ang H. H., Ngai T. H., Tan T. H.: *Phytomedicine* 10, 590 (2003).
53. Ahlemeyer B., Krieglstein J., v knize: *Phytomedicines of Europe* (Lawson L. D., Bauer R. ed.), kap. 15, str. 210. ACS, Washington 1998.
54. Cohen A. J., Bartlik B.: *J. Sex Marital Ther.* 24, 139 (1998).
55. Kang B. J., Lee S. J., Kim M. D., Cho M. J.: *Hum. Psychopharmacol.* 17, 279 (2002).
56. Chen X., Salwinski S., Lee T. J.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24, 958 (1997).
57. Zheng B. L., He K., Kim C. H., Rogers L., Shao Y., Huang Z. Y., Qien L. C., Zheng Q. Y.: *Urology* 55, 598 (2000).
58. Cicero A. F. G., Piacente S., Plasa A., Sala E., Arletti R., Pizza C.: *Andrologia* 34, 177 (2002).
59. Cicero A. F. G., Bandieri E., Arletti R.: *J. Ethnopharmacol.* 75, 225 (2001).
60. Gonzales G. F., Córdova A., Gonzales C., Chung A., Vega K.: *Asian. J. Androl.* 3, 301 (2001).
61. Gonzales G. F., Córdova A., Vega K., Chung A., Villena A., Góñez C., Castillo S.: *Andrologia* 34, 367 (2002).
62. Gonzales G. F., Córdova A., Vega K., Chung A., Villena A., Góñez C.: *J. Endocrinol.* 176, 163 (2003).
63. Oshima M., Gu Y., Tsukada S.: *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1145 (2003).
64. Valentová K., Ulrichová J.: *Biomed. Pap.* 147, 119 (2003).
65. Bisset N. G., Wichtl M. ed. v knize: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, str. 236. CRC Press, Boca Raton 2001.
66. Murphy L. L., Lee T. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962, 372 (2002).
67. Hong B., Ji Y. H., Nam K. Y., Ahn T. Y.: *J. Urol.* 168, 2070 (2002).
68. Choi H. K., Seong D. H., Rha K. H.: *Int. J. Impotence Res.* 7, 181 (1995).
69. Ganzera M., Bedir E., Khan I. A.: *J. Pharm. Sci.* 90, 1752 (2001).
70. Adimoelja A.: *Int. J. Androl.* 23 (Suppl. 2), 82 (2000).
71. Gauthaman K., Adaikan P. G., Prasad R. N. V.: *Life Sci.* 71, 1385 (2002).
72. Gauthaman K., Gamesan A. P., Prasad R. N.: *J. Altern. Complement. Med.* 9, 257 (2003).
73. Adaikan P. G., Gauthaman K., Prasad R. N., Ng S. C.: *Ann. Acad. Med. Singapore* 29, 22 (2000).
74. Garrett R. H., Grisham C. M.: *Biochemistry*. Saunders College Publishing, Fort Worth (1995).
75. Appleton J.: *Altern. Med. Rev.* 7, 512 (2002).
76. Chen J., Wollman Y., Chernichovsky T., Iaina A., Sofer M., Matzkin H.: *Br. J. Urol. Int.* 83, 269 (1999).
77. Evans R. W., Fernstrom J. D., Thompson J., Morris S. M., Kuller L. H.: *J. Nutr. Biochem.* 15, 534 (2004).
78. Stanislavov R., Nikolova V.: *J. Sex Marital Ther.* 29, 207 (2003).
79. Trebatický B., Novotný V., Muchová J., Chovanová Z., Hauserová M., Vužňáková M., Ďuračková Z., Breza J.: *22th International Conference on Polyphenols, 25–28 August, Helsinki 2004*. Polyphenols Communications, str. 175.
80. Morales A.: *World J. Urol.* 19, 251 (2001).
81. Rapport L., Lockwood B. v knize: *Nutraceuticals*, str. 77. Pharmaceutical Press, London 2002.
82. Cavallini G., Caracciolo S., Vitali G., Modenini F., Biagiotti G.: *Urology* 63, 641 (2004).
83. Merck Manual. *Kompendium klinické medicíny*. Str. 448, 1404, 2652. X-Egem, Praha 1996.
84. Grundman M.: *Klin. Farmakol. Farm.* 13, 10 (1999).
85. Kloner R. A.: *Am. J. Cardiol.* 92, 1M (2003).
86. Bailey D. G., Dresser G. K.: *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 4, 281 (2004).
87. Grant M. K. O., El-Fakahany E. E.: *Life Sciences* 74, 1701 (2004).
88. Schaneberg B. T., Ganzera M., Khan S., Khan I. A.: *44th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Chapel Hill, NC, July 12–16, 2003*. Str. 176.

Seznam zkratek

ANP	atriální natriuretický peptid
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CNS	centrální nervový systém
CYP	cytochrom P450
DHEA	dihydroepiandrosteron
ED	erektilní dysfunkce
eNOS	endotelová NO-synthasa
IC ₅₀	koncentrace látky inhibující 50 % aktivity enzymu
PADAM	Partial Androgen Deficiency of Aging Male
PDE	fosfodiesterasa
PGE	prostaglandin E
TK	tlak krve

K. Valentová, P. Entnerová, J. Urbaníková, and V. Šimánek (*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Chemistry of Male Sexuality**

Erectile dysfunction is a problem of male aging. Many of the men concerned use drugs or alternative preparations for improvement of their sexual activity. This article is a review of synthetic compounds, natural substances and plants with a confirmed effect on sexual functions in men. Inhibitors of phosphodiesterases, compounds acting on structures in the central nervous system, medicinal plants and some nutraceuticals improving erection are discussed. The mechanism of their action at the cellular level and also in the whole organism is described; their interactions with some common drugs are mentioned as well.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKU PRO DVOUROZMĚRNOU ELEKTROFORÉZU

PETR VÁŇA a JAN ŠMARDA*

Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno
smarda@sci.muni.cz, petr_vana@centrum.cz

Došlo 6.5.04, přijato 15.9.04.

Klíčová slova: proteomika, dvourozměrná elektroforéza, příprava vzorku, solubilizace

Obsah

1. Úvod
 - 1.1. Dvourozměrná elektroforéza: charakteristika a význam v proteomice
 - 1.2. Experimentální postup při 2-DE a příprava vzorku
 - 1.3. Možnosti a význam solubilizace vzorku
2. Experimentální část
 - 2.1. Chemikálie a přístroje
 - 2.2. Buněčná linie BM2
 - 2.3. Příprava vzorku a rehydratace IPG stripu
 - 2.4. Isoelektrická fokusace, ekvilibrace, SDS-PAGE, vizualizace a analýza obrazu
3. Výsledky a diskuse
4. Závěr

1. Úvod

1.1. Dvourozměrná elektroforéza: charakteristika a význam v proteomice

Vysokorozlišovací dvourozměrná elektroforéza (2-DE), která spojuje isoelektrickou fokusaci (IEF) v prvním rozměru s polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti natrium-dodecyl-sulfátu (SDS-PAGE) v rozměru druhém, je vhodnou metodou pro separaci proteinů v komplexních vzorcích před jejich identifikací hmotnostní spektrometrií^{1,2}. Metoda 2-DE proto předsta-

vuje klíčovou součást proteomiky, tj. odvětví, zabývajícího se analýzou globálních proteinových profilů určitých biologických kompartmentů – tkání, buněk, organel atd. Na rozdíl od genomu, který je v rámci daného organismu stálý, je buněčný proteom proměnlivý a závisí na řadě vnějších i vnitřních faktorů. Studium proteomu je proto perspektivní přístup pro výzkum základních buněčných procesů, jakými jsou diferenciaci, proliferaci, apoptóza a další. Smyslem této studie je prezentace našich zkušeností s optimalizací 2-DE při analýze proteomu kuřecích monoblastů transformovaných onkogenem *v-myb* viru ptačí myeloblastózy – (linie BM2), které byly připraveny injekcí nezralých myeloidních buněk infikovaných virem AMV do kuřecích embryí a následnou izolací transformovaných monoblastů z kostní dřeně³.

1.2. Experimentální postup při 2-DE a příprava vzorku

Experimentální postup 2-DE zahrnuje tyto základní kroky: 1. přípravu vzorku, 2. rehydrataci komerčního proužku gelu s imobilizovaným pH gradientem – IPG stripu, 3. isoelektrickou fokusaci, 4. ekvilibraci IPG stripu, 5. SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu – SDS-PAGE, 6. vizualizaci proteinů a analýzu obrazu, 7. analýzu proteinů. Hned první z uvedených kroků, příprava vzorku, do značné míry rozhoduje o kvalitě výsledku 2-DE, a to především z hlediska úspěšnosti rozdělení buněčných proteinů. Vzhledem k velkým rozdílům v typech a původu vzorků je pro přípravu konkrétního typu vzorku zpravidla prováděna optimalizace podmínek jeho přípravy, která by měla zajistit účinnou extrakci proteinů ze vzorku a jejich kompletní solubilizaci, denaturaci a redukci^{1,4}. Součástí přípravy vzorků mohou být rovněž kroky vedoucí k odstranění neproteinových komponent, které by mohly komplikovat rozdělení proteinů a jejich následnou vizualizaci. Pro zamezení ztrát proteinů by pak měla být příprava vzorku zkrácena na minimum a zajištěna jeho ochrana před proteolýzou. Proteiny jsou proto nejdříve extrahovány ze vzorku tzv. lyzačním pufrem, který buď vyvolá lýzu buněk, nebo poslouží jako solubilizační prostředí, ve kterém je lýza vyvolána jinými způsoby (např. sonikací). K základním složkám lyzačního pufru patří chaotropní činidla, detergenty (surfaktanty), redukční činidla a amfolyty (tab. I). Lyzační pufr lze v dalším kroku použít pro rehydrataci IPG stripu a současně tak aplikovat vzorek pro isoelektrickou fokusaci. Někdy je však k tomuto účelu používán tzv. rehydratační pufr a to tak, že vzorek v lyzačním pufru je zředěn rehydratačním pufrem v míře potřebné pro dosažení požadovaného množství proteinů s ohledem na délku použitého stripu, metodu vizualizace i experimentální záměr. Vzorek nemusí být součástí rehydratačního pufru a může být rovněž aplikován na již rehydratovaný strip dodatečně. Základní složky rehydratačního

Tabulka I
Základní složky lyzačního pufru a jejich funkce

	Mechanismus působení	Význam	Příklady
Chaotropní činidla	přerušení vodíkových můstků, denaturace	↑solubilizace ^a proteinů, zlepšení rozlišení a hodnotitelnosti	močovina, thiomočovina
Detergenty (surfaktanty)	zamezení hydrofobních interakcí, pokles povrchového napětí	↑solubilizace ^a hydrofobních proteinů a proteinů po denaturaci a odkrytí hydrofobního jádra	Triton X-100, NP-40, CHAPS, ASB 14, SB 3-10
Redukční činidla	přerušení disulfidových můstků, udržení proteinů v redukovaném stavu	kompletní rozvinutí proteinů, zlepšení rozdělení na gelu	mnoha DTT, TBP, DET
Amfolyty	vysoká pufrující schopnost, rozpustnost a konduktivita v oblasti jejich pI, omezují elektrostatické interakce mezi proteiny	tvorba pH gradientu, ↑solubilizace ^a proteinů, minimalizace jejich agregace, zlepšení rozdělení na gelu	komerční přípravky (Ampholyte, Pharmalyte)

^a ↑ – vzestup

pufru jsou obdobné jako v pufru lyzačním (tj. chaotropy, detergenty, redukční činidla a amfolyty), ale pro eliminaci některých nežádoucích vedlejších účinků se doporučuje snížit jejich koncentraci⁵. Pravidelnou součástí rehydratačního pufru je rovněž barvivo (např. bromfenolová modř) umožňující kontrolu distribuce roztoku během rehydratace stripu.

1.3. Možnosti a význam solubilizace vzorku

Zvláště v proteomických studiích je pro kvalitu výsledku 2-DE velmi důležité zajištění solubility proteinů. Zlepšená rozpustnost proteinů zvyšuje počet rozlišitelných proteinových „spotů“ a umožňuje rozdělení hydrofobních proteinů¹. Zajištění rozpustnosti proteinů, tj. rozrušení proteinových agregátů a komplexů na jednotlivé peptidy, je proto zásadním požadavkem při přípravě vzorku, který podmiňuje účinnou extrakci proteinů. Navíc rozpustnost proteinů rozhoduje o jejich vstupu do IEF gelu, zabraňuje adsorpčním ztrátám v průběhu IEF a zlepšuje jejich přenos z IEF stripu do polyakrylamidového gelu užívaného při SDS-PAGE (cit.^{6–8}). Pro omezení ztrát proteinů a vzniku nežádoucích pruhů ve druhém rozměru elektroforézy je vhodné použít co nejúčinnější solubilizační postupy, a to zejména u špatně rozpustných membránových a jaderných proteinů, proteinů s velkou molekulovou hmotností a rovněž v případě nanášení velkého množství proteinového vzorku na IPG strip^{7,9}. Většina obvyklých solubilizačních postupů vychází z O'Farrellovy metody¹⁰ a užívá 2–4% směsi neiontových (např. NP-40 nebo Triton X-100) nebo zwitterionových (např. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]propan-1-sulfonát, CHAPS) detergentů, 9–10 M močoviny, 1% dithiotreitolu (DTT) a 2% amfolytů⁹. I když

je tento postup účinný u většiny vzorků, existují proteinové komplexy, které nejsou tímto způsobem účinně solubilizovány. Velkým zlepšením solubilizačních protokolů bylo zavedení thiomočoviny, vedoucí ve směsi s močovinou (optimálně směs 2 M thiomočovina/ 5–7 M močovina) k vytvoření silně chaotropního prostředí, které zlepšilo rozpustnost špatně rozpustných proteinů a proteinů s tendencí k isoelektrické precipitaci⁷. Další rozšíření škály účinných solubilizačních roztoků přinesla kombinace obou chaotropů s novými sulfobetainovými surfaktanty¹. Surfaktanty jsou vybírány na základě své rozpustnosti a účinnosti v přítomnosti použitých chaotropů a podle obtížnosti přerušování molekulárních interakcí v okolí příslušných proteinů^{1,11}. Záměrem naší práce bylo zlepšit podmínky přípravy vzorku leukemické buněčné linie BM2 pro 2-DE tak, abychom dvourozměrnou elektroforézou dosáhli maximálního množství rozdělených proteinů za vysokého rozlišení.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie a přístroje

Pro přípravu lyzačního a rehydratačního pufru byly použity následující chemikálie: močovina v analytické čistotě (Serva), thiomočovina v kvalitě ACS (Sigma-Aldrich), CHAPS, Nonidet P-40, DTT, koktejl inhibitorů fosfatas I, koktejl inhibitorů proteas (Sigma-Aldrich), fenylmethan-sulfonylfluorid – PMSF (Serva), amfolyty Pharmalyte pH 3–10 a Pharmalyte pH 8–10,5 (Sigma-Aldrich), bromfenolová modř – sodná sůl v kvalitě ACS (Amresco). Pro stanovení koncentrace proteinů bylo použito činidlo Bradford

dové (Sigma-Aldrich) a spektrofotometr Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Pro přípravu roztoků pro ekvilibraci IPG stripů, SDS-PAGE a vizualizaci proteinů byly použity tyto chemikálie: natrium-dodecyl-sulfát, glycerol 99,5+ % v kvalitě ACS, Trizma base-Reagent Grade, min. 99,9%, jodacetamid, akrylamid/methylenbisakrylamid 40% zásobní roztok (29:1) (Sigma-Aldrich); *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin (Serva), peroxosíran amonný, glycin, min. 99%, agarosa-typ II: Medium EEO (Sigma-Aldrich), Bio-Safe Coomassie Blue (Bio-Rad). Pro IEF byly použity IPG stripy pH 3–10 a pH 4–7 délky 7 cm (Bio-Rad). IEF byla provedena přístrojem Protean[®] IEF Cell (Bio-Rad). Pro SDS-PAGE byla použita elektroforetická aparatura a zdroj elektrického napětí Power-Pac 300 (Bio-Rad).

2.2. Buněčná linie BM2

Buněčná linie BM2 je linie kuřecích monoblastů transformovaných onkogenem *v-myb* viru ptačí myeloblastózy AMV (cit.³), která byla kultivována v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) doplněném o 5% fetální telecí sérum (Gibco BRL), teplotně inaktivované (1 h při 56 °C) 5% kuřecí sérum, 4,5 g.l⁻¹ glukosu, 2 mM L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný, 0,1 mg.ml⁻¹ penicilin a 0,1 mg.ml⁻¹ streptomycin (Sigma-Aldrich). Kultivace probíhala při 37 °C v atmosféře 10% CO₂. Pro analýzu proteinů byly buňky sklizeny v logaritmické fázi růstu.

2.3. Příprava vzorku a rehydratace IPG stripu

Buňky byly lyzovány 45 minut při laboratorní teplotě ve dvou základních typech lyzačních pufrů, jejichž hlavní odlišnost spočívala v přítomnosti či nepřítomnosti thiomocoviny (přesné složení je uvedeno v kap. 3). Následně byly vzorky podrobeny sonikaci (8 × 2 s) jehlovým sonikátorem Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Německo). Po sonikaci byly vzorky centrifugovány (30 min, 15 000 g, 15 °C) a v supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů podle Bradfordové. Objem supernatantu odpovídající 300 µg proteinu byl doplněn rehydratačním pufrům (složení je uvedeno v kap. 3) na konečný objem 125 µl a vzniklý roztok byl použit k 12 hodinové rehydrataci IPG stripu o délce 7 cm.

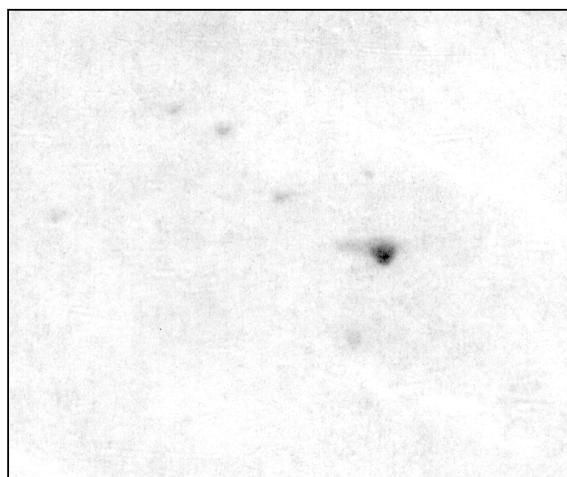
2.4. Isoelektrická fokusace, ekvilibrace, SDS-PAGE, vizualizace a analýza obrazu

Rehydratované IPG stripy o délce 7 cm byly fokusovány na fokusátoru Protean[®] IEF Cell (Bio-Rad) při 15 °C ve 3 krocích. V 1. kroku bylo elektrické napětí během 20 min lineárně zvyšováno z 0 V do 250 V; ve 2. kroku bylo elektrické napětí zvýšeno na 4000 V a na této hodnotě bylo udržováno 2 h. Ve 3. kroku byly elektrické parametry nastaveny tak, aby bylo celkově dosaženo hodnoty 30 kWh. Elektrický proud byl omezen hodnotou 50 µA/strip. Po ukončení IEF byly stripy inkubovány nejprve 15 min při pokojové teplotě na výkyvné třepačce

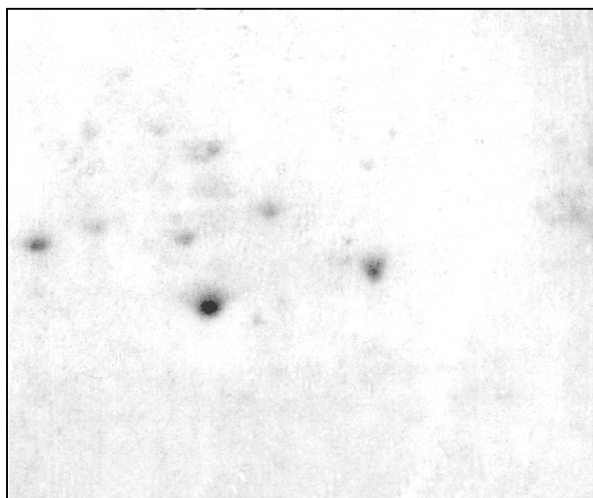
v ekvilibračním pufru [6 M močovina, 20% v/v glycerol a 2% w/v natrium-dodecyl-sulfát (SDS) v 0,375 M tris-HCl (zásobní roztok pH 8,8)] obsahujícím 2% w/v DTT a následně 7 min v ekvilibračním pufru obsahujícím 2,5% w/v jodacetamid a stopy bromfenolové modři. Ve druhém rozměru (SDS-PAGE) bylo rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti provedeno v 10% T dělicím gelu (4% T) ve vertikální elektroforetické aparatuře převrstveny 0,5% roztokem teplé agarosy. Při zaostřovací fázi probíhala SDS-PAGE při napětí 80 V; jakmile bromfenolová modř dosáhla dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 100 V. Zviditelnění proteinů rozdělených 2-DE byla provedeno obarvením Bio-Safe Coomassie Brilliant Blue podle návodu výrobce.

3. Výsledky a diskuse

K důležitým aspektům přípravy vzorku pro 2-DE, které zásadně ovlivňují kvalitu výsledku, patří zajištění solubility proteinů, zamezení jejich degradace a modifikace endogenní proteolytickou aktivitou, případně odstranění interferujících substancí (např. nukleových kyselin)^{1,4}. Ochrana před proteolýzou je zvláště významná u vzorků bohatých na proteasy, jakými jsou rostlinné extrakty, určité živočišné orgány jako např. slinivka břišní, žaludek, játra, slezina, a materiál bohatý na některé buněčné organely jako vakuoly a lysosomy¹². Na rozdíl od těchto vzorků jsme buňky BM2 nepovažovali za rizikové z hlediska obsahu endogenních proteolytických enzymů. Buňky byly podrobeny sonikaci, čímž jsme dosáhli fragmentace nukleových kyselin a omezili tak jejich případné nežádoucí

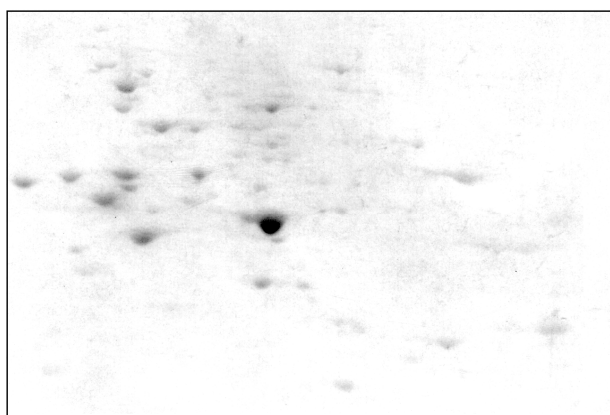


Obr. 1. Tradiční způsob přípravy vzorku dle O'Farrella¹⁰ neposkytuje po 2-DE kvalitní rozdělení proteinů izolovaných z buněk BM2; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 9 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5 a rehydratační pufr obsahující 8 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10

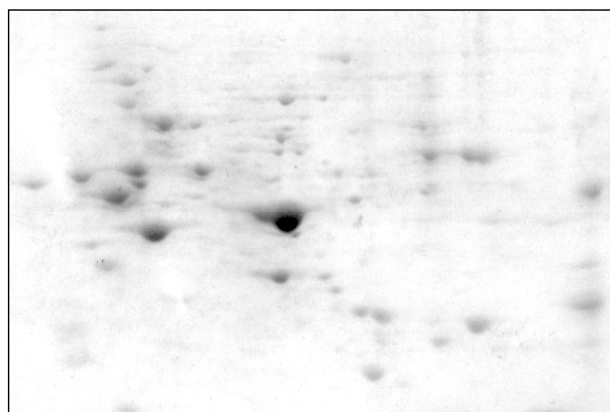


Obr. 2. Použití thiomocoviny v lyzačním pufru zlepšuje kvalitu rozdělení proteinů BM2 při 2-DE; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5 a rehydratační pufr obsahující 8 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10

účinky na 2-DE (cit.⁵). Při optimalizaci přípravy vzorku jsme se zaměřili především na zlepšení solubility proteinů, abychom dosáhli zvýšení celkového počtu proteinů rozlišitelných 2-DE a zároveň umožnili separaci hydrofobních proteinů. Vhodné podmínky pro solubilizaci proteinů jsme se snažili navodit změnou složení lyzačního a rehydratačního pufru a použitím sonikace, která se může uplatnit nejen jako prostředek pro navození buněčné lýzy, ale i jako prostředek solubilizační⁹. Pro výchozí experiment byly buňky lyzovány v lyzačním pufru obsahujícím 9 M močovinu, 2% nonidet P-40 (neiontový detergent P-40), 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5. Uvedený pufr lze považovat za jednu z modifikací původního O'Farrellova lyzačního pufru¹⁰ (kap. 1.3.), který je vyhovující pro většinu vzorků⁹. Navíc při úvodních experimentech s neznámými vzorky nebo při zaměření na dobře rozpustné cytosolické proteiny nebývají součástí solubilizačních roztoků silně denaturující látky^{1,5,12}. Rehydratace IPG stripu byla provedena v rehydratačním pufru obsahujícím 8 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10. 2-DE takto připravených vzorků však poskytla extrémně nízký počet rozdělených proteinů (obr. 1). Proto byla k lyzačnímu pufru přidána thiomocovina, která zlepšuje rozpustnost proteinů⁷ (2 M thiomocovina, 7 M močovina, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT a 2% amfolyt pH 8–10,5). Tento zásah se projevil zvýšením počtu proteinových „spotů“ rozlišitelných po 2-DE asi 1,5 krát (obr. 2). Současně přidání thiomocoviny k rehydratačnímu pufru (2 M thiomocovina, 7 M močovina, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolová modř a 0,2% amfolyt pH 3–10) spojené s užitím vysoké koncentrace směsi amfolytů v pufru lyzačním (2 M thiomocovina, 7 M močovina, 2%



Obr. 3. Přidání thiomocoviny do lyzačního i rehydratačního pufru dále zlepšuje počet proteinů detekovatelných 2-DE; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyt pH 8–10,5 a 2% amfolyt pH 3–10 a rehydratační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10



Obr. 4. Sonikace vzorku zlepšuje kvalitu a počet jednotlivých proteinových „spotů“ rozlišitelných 2-DE; pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 2% NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyt pH 8–10,5 a 2% amfolyt pH 3–10 a rehydratační pufr obsahující 2 M thiomocovinu, 7 M močovinu, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0,001% bromfenolovou modř a 0,2% amfolyt pH 3–10). Po lýzi buněk v lyzačním pufru byl vzorek podroben sonikaci (8 × 2 s)

NP-40, 3% CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyt pH 8–10,5 a 2% amfolyt pH 3–10) nejméně dvojnásobně zvýšilo počet rozdělených proteinů v porovnání se vzorky, kdy byla thiomocovina přítomna jen v pufru lyzačním (obr. 3). Pozitivní účinky, plynoucí z použití thiomocoviny jako součásti lyzačního pufru, lze zřejmě považovat za výsledek dvou faktorů, a to jednak její vysoké účinnosti při solubilizaci proteinů a zároveň ochraně proteinů před endogenní proteolýzou, která může být důsledkem velmi účinné interakce thiomocoviny s proteasami¹². Vzhledem

k délce rehydratace IPG stripu s vyšším rizikem proteolýzy citlivých proteinů by se ochrana před proteolýzou mohla částečně podílet na zlepšení výsledku 2-DE také po inkorporaci thiomocoviny do rehydratačního pufru. Kromě použití thiomocoviny v lyzačním i rehydratačním pufru vedla k dalšímu zvýšení počtu proteinových „spotů“ sonikace vzorku (obr. 4), a to přibližně 2,5 krát v porovnání s postupem, kdy byla sonikace vynechána (obr. 3). Použití ultrazvuku rovněž zvýšilo denzitu některých proteinových „spotů“ (obr. 4), což svědčí o pozitivním vlivu sonikace na kvantitu proteinů rozdělených 2-DE.

4. Závěr

Použití thiomocoviny v lyzačním a rehydratačním pufru a současné podrobení vzorku sonikací se velmi příznivě projevuje na kvalitě výsledku 2-DE. V našem systému jsme zaznamenali až osminásobné zvýšení počtu rozlišitelných proteinových „spotů“ ve srovnání s postupem bez užití thiomocoviny a bez sonikace. Uvedené kroky proto budou zařazeny do postupu přípravy vzorku pro analýzu změn proteomu leukemických monoblastů BM2 v průběhu jejich terminální diferenciaci a mohou se uplatnit při obdobných studiích jiných leukemických buněčných linií.

Tato práce byla podporována grantem GAČR č. 301/03/1055.

Seznam zkratk

AMV	virus ptačí myeloblastózy („avian myeloblastosis virus“)
ASB 14	3-[dimethyl(3-tetradekanamidopropyl)amonio]propan-1-sulfonát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]propan-1-sulfonát
2-DE	dvourozměrná elektroforéza („two-dimensional electrophoresis“)
DET	dithioerythritol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	dithiotreitol
IEF	isoelektrická fokusace („isoelectric focusing“)
IPG	imobilizovaný pH gradient („immobilised pH gradient“)
NP-40	nonidet P-40 (neiontový detergent P-40)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
SB 3-10	3-(decyldimethylamonio)propan-1-sulfonát
SDS	natrium-dodecyl-sulfát
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti natrium-dodecyl-sulfátu („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“)
% T	koncentrace gelu („total percentage of acrylamide plus crosslinker“)
TBP	tributylfosfin

LITERATURA

- Herbert B.: *Electrophoresis* 20, 660 (1999).
- Bouchal P., Kučera I.: *Chem. Listy* 97, 29 (2003).
- Moscovici C., Zeller N., Moscovici M. G., v knize: *Expression of Differentiated Functions in Cancer Cells* (Revolta R. F., Pontieri G. M., Basilico C., Rovera G., Gallo R., Subak-Sharpe J. H., ed.), str. 435. Raven Press, New York 1982.
- Rabilloud T.: *Electrophoresis* 17, 813 (1996).
- Westermeier R., Naven T.: *Proteomics in Practice. A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. Wiley-VCH, Weinheim 2002.
- Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J.: *Electrophoresis* 18, 307 (1997).
- Rabilloud T.: *Electrophoresis* 19, 758 (1998).
- Adessi C., Miege C., Albrieux C., Rabilloud T.: *Electrophoresis* 18, 127 (1997).
- Harder A., Wildgruber R., Nawrocki A., Fey S.J., Larsen P.M., Gorg A.: *Electrophoresis* 20, 826 (1999).
- O'Farrell J.: *Biol. Chem.* 250, 4007 (1975).
- Macri J., McGee B., Thomas J. N., Du P., Stevenson T. I., Kilby G. W., Rapundalo S. T.: *Electrophoresis* 21, 1685 (2000).
- Castellanos-Serra L., Paz-Lago D.: *Electrophoresis* 23, 1745 (2002).

P. Váňa and J. Šmarda (Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno): **Proteome Analysis in BM2 Leukemia Cell Line: Determination of Optimal Conditions for Sample Preparation for Two-Dimensional Electrophoresis**

Two-dimensional electrophoresis is a key experimental approach of proteomics. Quality of its result is significantly dependent on the way of sample preparation. The aim of this study was to set up optimal conditions for preparation of the sample of v-myb-transformed chicken monoblasts BM2 to get a high number of resolved proteins on two-dimensional gel. Starting composition of both lysis (9 M urea, 2 % NP-40, 3 % CHAPS, 70 mM DTT and 2 % ampholyte pH 8–10.5) and rehydration buffers (8 M urea, 4 % CHAPS, 100 mM DTT, 0.001 % bromphenol blue and 0.2 % ampholyte pH 3–10) have been modified by addition of thiourea causing clear increase of the number of protein spots detectable on two-dimensional gel. In addition, sonication of the sample before its loading to the gel further increased the number of resolved proteins as well as density of some of them. Addition of thiourea in the lysis and rehydration buffers and sonication increased the number of protein spots resolved in two-dimensional gel about 8-fold. These experimental conditions are going to be used in detailed analysis of proteome changes during terminal differentiation of BM2 monoblasts and they can also be of interest for researchers using two-dimensional electrophoresis as a tool for proteome analysis of another leukemic cells.

ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA PRO STANOVENÍ ISOFLAVONOIDŮ

MICHAELA VÍTKOVÁ^a, ZUZANA MACKOVÁ^b,
LADISLAV FUKAL^a a OLDŘICH LAPČÍK^b

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, ^bÚstav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
Michaela.Vitková@vscht.cz

Došlo 27.5.04, přijato 1.10.04.

Klíčová slova: ELISA, daidzein, genistein, biochanin A

Úvod

Isoflavonoidy patří mezi rostlinné fytoalexiny, vyskytující se v široké škále rostlin. Jejich typickými producenty jsou rostliny z čeledi bobovitých, ale byly nalezeny i v mnoha dalších, jak dvouděložných tak jednoděložných rostlinách¹. Poprvé vyvolaly isoflavonoidy zájem vědců ve 40. letech, kdy se ukázaly být zodpovědné za poruchy porodnosti ovcí při spásání velkého množství jetele², a jejich estrogenní aktivita se stala předmětem dalšího zkoumání. Prokázalo se, že účinek těchto látek nespočívá pouze v interakci s estrogenními receptory, ale také v inhibici některých důležitých enzymů, především tyrosin proteinkinasy a topoisomeras, zapojených v procesech buněčného růstu a proliferace³. Publikované epidemiologické studie dokazují, že tyto jejich schopnosti se projevují snížením rizika osteoporózy, kardiovaskulárních chorob a některých nádorových onemocnění^{4,5}. V posledních letech je prováděn intenzivní výzkum, týkající se zvláště karcinomu prsu a prostaty. Početné studie jak na zvířatech tak na tkáňových kulturách ukazují, že isoflavonoidy inhibují růst určitých nádorových linií a indukují jejich apoptózu. Nejvýznamější aktivita byla pozorována u genisteinu^{6,7}.

Pro stanovení isoflavonů se běžně používají chromatografické techniky, především HPLC-MS, dále pak HPLC s UV detektorem s diodovým polem (HPLC-UV-DAD) a v poslední době HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED, cit.⁸⁻¹¹), tyto metody však vyžadují nákladné instrumentální vybavení a neumožňují rychlé stanovení velkého počtu vzorků. Jmenované nevýhody překonávají metody imunochemické. Dříve vyvinuté radioimunochemické stanovení isoflavonoidů¹²⁻¹⁴ jsme v této práci převodili na metody ELISA, které mají oproti RIA výhodu větší stability značky a nemusí se potýkat s technickými a legislativními omezeními, která jsou spojena s použitím radioaktivních látek.

Experimentální část

Chemikálie

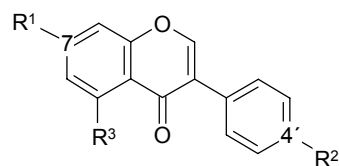
Isoflavonoidy daidzein, daidzin, genistein, genistin a biochanin A a dále *O*-fenylendiamin (OPD), peroxid vodíku, Tween-20, ovalbumin (OVA) a hovězí sérový albumin (BSA) byly od firmy Sigma (St. Louis, USA); 3'-hydroxydaidzein, formononetin a sissotrin byly od firmy Indofine (Somerville, USA). Isoformononetin a prunetin byly připraveny selektivní methyloací daidzeinu a genisteinu¹⁵. Struktury uvedených isoflavonoidů jsou znázorněny na obr. 1.

Prasečí protilátky (tzv. „druhé protilátky“) proti králíčím imunoglobulinům značené peroxidasou (SwaR/Px) byly od firmy SEVAC (Praha), mikrotitrační destičky COSTAR (cat No. 9018) byly dodány firmou Corning Incorporated (USA). Všechny další použité chemikálie pocházely z Lachemy (Brno). Specifické králíčí polyklonální protilátky proti jednotlivým isoflavonoidům byly připraveny v předchozí práci¹².

Konjugáty isoflavonů s proteiny

Jelikož isoflavonoidy jsou nízkomolekulární látky, bylo nutné je pro imunizaci i pro imobilizaci na mikrotitrační destičku navázat na vysokomolekulární nosič. Tímto nosičem byl hovězí sérový albumin (BSA) a syntéza byla provedena podle Yatsimirske a spol.¹⁶. Podrobný postup pro jednotlivé konjugáty byl popsán dříve^{13,14}. V případě daidzeinu a genisteinu byly vytvořeny konjugáty pomocí vazby v polohách 7 a 4', pro biochanin pouze přes polohu 7. Stejný postup byl použit pro syntézu konjugátu 7-karboxymethylgenisteinu s ovalbuminem (OVA).

Molární poměr haptenu : nosič byl zjištěn UV spektrofotometrií při 258 nm a pohyboval se pro jednotlivé konjugáty v rozmezí od 7 do 25 molekul haptenu na 1 molekulu bílkoviny.



Daidzein: R¹=R²= OH, R³=H;
Genistein: R¹=R²=R³=OH;
Formononetin: R¹=OH, R²= OCH₃, R³=H;
Isoformononetin: R¹= OCH₃, R²= OH, R³=H;
Biochanin: R¹=R³= OH, R²= OCH₃;
Prunetin: R¹= OCH₃, R²=R³=OH;
Daidzin: R¹= glukosa, R²= OH, R³=H;
Genistin: R¹= glukosa, R²=R³=OH.
Sissotrin: R¹=glukosa, R²=OCH₃, R³= OH

Obr. 1. Struktura důležitých isoflavonoidů

Enzymová imunoanalýza

Byla použita kompetitivní nepřímá enzymová imunoanalýza (ELISA) se separací vázaných a volných imunoreaktantů prostřednictvím zakotvení na pevnou fázi. Nejprve byl na stěny jamek mikrotitračních destiček imobilizován příslušný antigen (konjugát isoflavonu s BSA nebo OVA). Zásobní roztok antigenu byl vhodně naředěn karbonát-bikarbonátovým pufrém (0,05 mol.l⁻¹, pH 9,6) a pipetován do jamek v množství 100 µl; po inkubaci přes noc při laboratorní teplotě byl roztok konjugátu vylit a jamky čtyřikrát promyty 400 µl PBS-Tw (0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr, pH 7,4; 0,05% Tween 20). Vlastní kompetitivní imunochemická reakce byla zahájena pipetováním 50 µl roztoku antigenu (kalibračního standardu nebo vzorku) v PBS a 50 µl vhodně naředěné protilátky v PBS-Tw-0,1%BSA. Reakční roztoky byly inkubovány 1,5 hodiny při laboratorní teplotě za mírného třepání. Poté byly jamky čtyřikrát promyty 400 µl PBS-Tw. Kvantifikace navázaných protilátek byla učiněna pomocí tzv. druhé protilátky značené peroxidasou (100 µl konjugátu SwAR/Px ředěného 1:2000 v PBS-Tw). Po inkubaci 1 h při laboratorní teplotě byl nenavázaný konjugát odstraněn čtyřnásobným promytím 400 µl PBS-Tw. Dále bylo do jamek pipetováno 100 µl roztoku peroxidasového substrátu a chromogenní látky (0,03% H₂O₂ v citrátovém pufru 0,1 mol.l⁻¹, pH 5,0 s 0,05% *o*-fenylendiaminem). Enzymová reakce byla po 15 minutách zastavena přidávkem 50 µl H₂SO₄ (2 mol.l⁻¹). Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační destičky na přístroji Multiscan MCC/340 (Labsystems, Finsko).

Kalibrační křivka byla vytvořena jako závislost absorbance na dekadickému logaritmu koncentrace antigenu (v pg na jamku), přičemž závislost je prokládána čtyřparametrovou regresní rovnicí (sigmoida) v programu MS Excel:

$$A = C + \frac{D - C}{1 + \exp(-2 \cdot (\alpha + \beta \cdot \log(c)))}$$

kde A je absorbance při 492 nm, C je dolní asymptota křivky, D je horní asymptota, α charakterizuje posun lineární části sigmoidní křivky v systému souřadnic a β charakterizuje sklon lineární části sigmoidní křivky.

Důležité zjišťované parametry kalibrační křivky byly: 50% intercept (I_{50}), který představuje koncentraci analytu potřebnou k vyvážení 50 % protilátek přítomných v reakčním roztoku, a detekční limit – nejmenší koncentrace analytu, stanovitelná se správností 95 %. Pro výpočet lze použít vztah, který detekční limit definuje jako koncentraci c_{lim} , která odpovídá podle kalibrační křivky absorbanci $A_{\text{lim}} = A_{\text{blank}} - 3 \cdot \delta$, kde A_{blank} je průměr z absorbancí pro slepý vzorek a δ je směrodatná odchylka z těchto absorbancí.

$$\log(c_{\text{lim}}) = -\frac{1}{2 \cdot \beta} \cdot \left(\ln \left(\frac{D - A_{\text{lim}}}{A_{\text{lim}} - C} \right) + 2 \cdot \alpha \right)$$

Dále byly stanoveny křížové reakce jednotlivých protilátek. Křížové reakce vyjadřují specifitu protilátky vůči antigenu, proti kterému byla připravena, a tedy její schopnost reagovat se strukturálně podobnými analyty. Tyto interakce byly stanoveny jako poměr I_{50} vlastního analytu a I_{50} křížově reagujícího analytu.

Optimalizace metod ELISA

Vliv syčení destičky

Během experimentu může docházet k nespecifickým sorpcím reagujících látek na stěnu mikrotitrační destičky. Z tohoto důvodu bylo testováno použití různých syčících roztoků. Konkrétně se jednalo o Tween 20, želatinu, sušené mléko, kasein a jejich kombinace tak, že roztok byl vždy 1% (w/w).

Délka imunochemické reakce

Při reakci protilátky s navázaným a kompetujícím antigenem by mělo být dosaženo rovnováhy, ovšem při příliš dlouhém časovém úseku dochází k větším nespecifickým interakcím a také se ztrácí jedna z výhod metody, její rychlost. Je tedy nutné nalézt kompromis mezi těmito faktory. V našem případě byla testována délka kompetiční reakce v rozmezí 30 min až 2 h.

Vliv organických rozpouštědel

Extrakce isoflavonoidů z biologického materiálu se často provádí směsí vody a středně polárních organických rozpouštědel, jako jsou ethanol nebo methanol. Tato rozpouštědla mohou ovlivňovat nativní strukturu protilátek a tedy celkovou citlivost metody, byl proto sledován jejich vliv na systémy ELISA. Byly připraveny roztoky o koncentracích 0,5–40 % (v/v) ethanolu v PBS a v těch naředěny standardní kalibrační křivky pro jednotlivé isoflavonoidy. Výsledkem bylo zjištění, jak se mění jejich parametry v závislosti na použité koncentraci rozpouštědla.

Výsledky a diskuse

Při vývoji formátů ELISA pro stanovení biochaninu, daidzeinu a genisteinu jsme vycházeli z protilátek proti biochaninu-7-BSA, daidzeinu-7-BSA, daidzeinu-4'-BSA, genisteinu-7-BSA a genisteinu-4'-BSA, z nichž některé byly již použity u dříve publikovaných RIA metod^{12,14}. Pro každý antigen jsme testovali více protilátek, jejichž přehled spolu s odpovídajícím imunogenem a dalšími informacemi o jednotlivých metodách jsou uvedeny v tabulce I.

Prvním krokem při sestavování metody bylo určení vhodných koncentrací roztoku antigenu pro imobilizaci ve spojitosti s odpovídajícím ředěním příslušné protilátky. Bylo otestováno několik různých koncentrací protilátky i imobilizačního konjugátu a z nich vybrána taková kombinace, která zaručovala maximální využití signálu za současné dostatečné citlivosti spektrofotometru. Jednalo se o takové koncentrace imunoreagencií, u nichž se maximál-

Tabulka I
Přehled použitých konjugátů a protilátek při vývoji metod ELISA

Symbol systému ELISA	Imunogen	Imobilizovaný konjugát	Protilátka	Hlavní kompetitor
B7	biochanin 7-BSA	biochanin 7-BSA	PL 29	biochanin
D4	daidzein 4'-BSA	daidzein 4'-BSA	PL 3	daidzein
D4	daidzein 4'-BSA	daidzein 4'-BSA	PL 4	daidzein
D7	daidzein 7-BSA	daidzein 7-BSA	PL 24	daidzein
G4	genistein 4'-BSA	genistein 4'-BSA	PL 13	genistein
G4	genistein 4'-BSA	genistein 4'-BSA	PL 14	genistein
G7	genistein 7-BSA	genistein 7-OVA	PL 23	genistein
G7	genistein 7-BSA	genistein 7-OVA	PL 11	genistein
G7	genistein 7-BSA	genistein 7-OVA	PL 12	genistein

ní dosažená absorbance pohybovala v rozmezí 1–1,5. Pro zvolené varianty byla sestavena kompetitivní ELISA a stanoveny veškeré parametry a charakteristiky (I_{50} , detekční limit, sklon a délka lineární části kalibrační křivky). Často bylo testováno více kombinací a protilátek, z nichž byla po určení charakteristik jejich kalibračních křivek vybrána ta nejlepší. Ilustrativní kalibrační křivky pro biochanin a daidzein jsou uvedeny na obr. 2.

Jako imobilizovaný antigen byl ve čtyřech metodách použit stejný konjugát jako pro imunizaci. To je sice neobvyklé, ale jak se prokázalo, nemusí to být problém, pokud jsou přítomné protilátky proti BSA vyvážány přidávkou BSA do roztoku. Bylo zjištěno, že postačující koncentrace je 0,1 % BSA (w/w). Pro imunogen genistein-7-BSA se však tímto postupem metodou s dostatečnou citlivostí sestavit nepodařilo. Jako vhodné řešení se ukázalo využití konjugátu 7-karboxymetylgeneisteinu s ovalbuminem jako

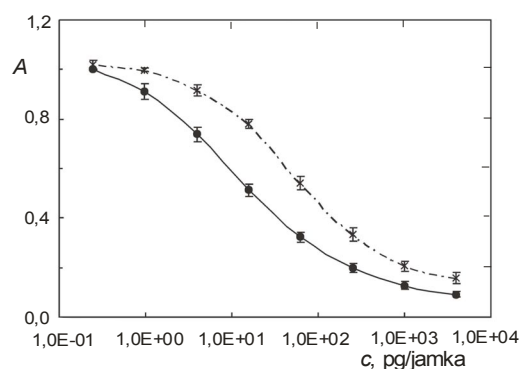
imobilizovaného antigenu, díky kterému se již podařilo sestavit kalibrační křivku s vhodnými parametry.

V další práci byly testovány různé roztoky pro ředění protilátek, sycení destičky, doba kompetiční reakce potřebná pro dosažení rovnováhy a v neposlední řadě vliv organických rozpouštědel na průběh kalibrační křivky.

Pro většinu metod bylo zjištěno, že není nutné sycení desky, neboť nespecifickým sorpcím na desku dostatečně zabráňuje použití 0,05% Tween v roztoku protilátky. Sycení bylo nutné pouze v případě metody pro genistein-7-OVA, jako nevhodnější bylo stanoveno sycení 1% želatinou. Doba kompetiční reakce byla určena na 1,5 h, kdy se již nemění parametry kalibrační křivky, pozadí (nespecifické interakce) je minimální a maximální signál (absorbance) je v rozsahu 1–1,5. Dále byl sledován vliv ethanolu v rozsahu koncentrací 0,5–40 %, neboť extrakty z rostlinného materiálu, které jsou analyzovány těmito metodami, často toto rozpouštědlo obsahují. Bylo zjištěno, že až do obsahu 5 % (v/v) nemá ethanol vliv na stanovení a parametry metody. Vyšší koncentrace již zhoršují detekční limit a průběh kalibrační křivky, především působením na nativní strukturu protilátek. Je tedy nutné extrakty s vyšším obsahem ethanolu vhodně ředit.

Parametry kalibračních křivek získaných takto optimalizovanými metodami jsou shrnuty v tabulce II. Variační koeficienty pro koncentrace analytů blízké I_{50} se pohybovaly v rozmezí 3,5–9,6 % pro stanovení v rámci jedné destičky, a 8–15 %, pro stanovení na čtyřech destičkách.

Z tabulky II je zřejmé, že detekční limity pro jednotlivé isoflavony byly v rozmezí 1,1–5,3 pg na jamku, což odpovídá 22–105 pg.ml⁻¹ a I_{50} se pohybovaly v rozmezí 15,1–60 pg na jamku, což odpovídá 0,3–1,2 ng.ml⁻¹. Dříve publikované ELISA pro stanovení isoflavonů uvádějí hodnoty detekčních limitů 21–70 pg na jamku, případně I_{50} 0,8–20 ng.ml⁻¹ (cit. ^{17,18}), což svědčí o tom, že námi sestavené metody jsou srovnatelné a v některých případech dokonce citlivější.



Obr. 2. Kalibrační křivky pro daidzein (1) a biochanin A (2) v systému D4 a B7

Tabulka II
Charakteristika kalibračních křivek ELISA

Parametr	Systém ELISA				
	B7	D4	D7	G4	G7
Protilátka	PL 29	PL 3	PL 24	PL13	PL 23
I_{50} , pg na jamku	60,6 ± 6,8	15,1 ± 2,9	45,8 ± 2,6	15,8 ± 2,8	33,4 ± 5,7
Detekční limit, pg na jamku	9,3 ± 1,2	1,1 ± 0,4	5,1 ± 0,9	2,9 ± 0,7	1,5 ± 0,3
Pracovní rozsah kalibrační křivky, ng na jamku	4–0,001	0,25–0,001	1–0,004	0,25–0,001	4–0,001
Koncentrace analytu pro imobilizaci, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1,0	0,2	0,5	0,2	0,2
Ředění protilátky	1:32 000	1:40 000	1:20 000	1: 60 000	1:20 000
Sklon kalibrační křivky, β	-0,96 ± 0,11	-0,75 ± 0,12	-0,98 ± 0,07	-1,2 ± 0,15	-0,66 ± 0,13

Tabulka III
Hodnoty křížových reakcí (%) vybraných isoflavonoidů s antiséry vůči biochaninu, daidzeinu a genisteinu

Analyt	Systém ELISA / Použitá protilátka				
	B7 / PL 29	D4 / PL 3	D7 / PL 24	G4 / PL 13	G7 / PL 23
Biochanin	100,00	0,48	< 0,01	178,20	0,41
Sissotrin	120,00	0,02	< 0,01	0,13	4,80
Daidzein	< 0,01	100,00	100,00	14,70	9,30
3',4',7-Trihydroxyisoflavon	< 0,01	3,52	3,55	0,06	2,70
Daidzin	< 0,01	0,03	42,10	0,05	1,23
Genistein	2,80	0,57	8,27	100,00	100,00
4', 7-Dihydroxy- 5 -methoxyisoflavon	< 0,01	0,03	5,20	0,15	1,35
5-Hydroxy-7,4' - dimethoxyisoflavon	46,50	< 0,01	< 0,01	0,01	0,22
Genistin	< 0,01	0,21	53,20	0,03	32,00
Formononetin	0,30	192,19	5,60	6,54	< 0,01
Isoformononetin	< 0,01	0,16	342,50	0,01	42,16
Prunetin	5,00	0,02	33,85	2,42	215,00

Pro určení specifity jednotlivých protilátek byly změněny křížové interakce vůči daidzeinu genisteinu a biochaninu s dalšími isoflavonoidy. Díky různým polohám (7, 4') použitým pro syntézu imunizačních konjugátů bylo dosaženo rozdílné specifity používaných metod, a tím i možnosti stanovení dalších analytů, proti nimž nebyly protilátky přímo připraveny. Hodnoty zjištěných křížových reakcí jsou uvedeny v tabulce III.

Jak se dalo očekávat, reagují séra proti imunogenům připraveným přes polohu 7 s odpovídajícími 7-methoxyderiváty, jak je tomu v případě isoformononetinu stanoveného metodou D7, prunetinu metodou G7 a 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy isoflavonu rozpoznávaného protilátkami proti biochaninu-7-BSA. Je zřejmé, že tato antiséra reagují i s příslušnými glykosidy daných analytů, což dokazuje reakce s daidzinem (7-O-glukosid daidzeinu), genisti-

nem (7-*O*-glukosid genisteinu) a sissotrinem (7-*O*-glukosid biochaninu). Vůči derivátům nesoucím odlišné substituenty v jiných polohách jsou křížové interakce minimální nebo žádné. V případě antisér získaných vůči daidzeinu-4'-BSA a genisteinu-4'-BSA dochází opět k předpokládané interakci s 4'-*O*-methoxyderiváty, biochaninem a formononetinem. Ostatní isoflavony reagují minimálně a můžeme tedy tyto metody považovat za specifické pro uvedené analyty. Tato zjištění jsou v dobré shodě s dříve publikovanými výsledky stanovení křížových reakcí uvedených protilátek v radioimunoanalýze¹².

Závěr

Za použití polyklonálních protilátek byly vypracovány a charakterizovány postupy nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy pro stanovení isoflavonoidů. Detekční limity pro jednotlivé analyty se pohybovaly v rozmezí 1,1–5,3 pg na jamku. Tyto hodnoty hovoří o vysoké citlivosti sestavených metod, které se v tomto parametru vyrovnají dříve publikovaným ELISA nebo je dokonce předčí. Imunochemické metody jsou vhodným doplněním obecně používaných instrumentálních technik. Svoji jednoduchostí, nenákladností a možností adaptace pro sériová vyšetření představují obrovský potenciál zejména ve screeningovém stanovení. Také vysoká citlivost a značný rozsah koncentrací, v němž mohou tyto metody pracovat, nám dává možnost jejich využití ke stanovení isoflavonoidů v nejrůznějších matricích. Zájem humaní a veterinární medicíny budí především detekce těchto estrogenních látek v potravinách, tělních tekutinách a dalších biologických materiálech. Další oblastí uplatnění popsaných metod je fytochemický výzkum, jemuž se na našem pracovišti nyní věnujeme v čeledích *Myrtaceae*, *Rutaceae* a *Brassicaceae*.

LITERATURA

1. Harborne J. B.: *Phytochemistry* 55, 481 (2000).
2. Bennets H. W., Underwood E. J., Shier F. L.: *Aust. Vet. J.* 22, 2 (1946).
3. Adlercreutz H., v knize: *Reproductive and Developmental Toxicology* (Korach K. S., ed.). Marcel Dekker, New York 1997.
4. Nestel P. J., Pomeroy S., Kay S., Komesaroff P., Behrsing J., Cameron J. D., West L.: *J. Clin. Endocr. Metab.* 84, 895 (1999).
5. Yamamoto S., Sobue T., Kobayashi M., Sasaki S., Tsugane S.: *J. Natl. Cancer I.* 95, 906 (2003).
6. Mizunuma H., Kanazawa K., Ogura S., Otsuka S., Nagai H.: *Oncology* 62, 78 (2002).
7. Rice L., Samedi V. G., Medrano T. A., Sweeney

- C. A., Baker H. V., Stenstrom A., Furman J., Shiverick K. T.: *Prostate* 52, 201 (2002).
8. Nurmi T., Mazur W., Heinonen S., Kokkonen J., Adlercreutz H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 1 (2002).
9. Wu Q. L., Wang M. F., Simon J. E.: *J. Chromatogr., A* 1016, 195 (2003).
10. Klejdus B., Štěrbová D., Stratil P., Kubáň V.: *Chem. Listy* 97, 530 (2003).
11. Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K.: *J. Agr. Food Chem.* 51, 571 (2003).
12. Hampl R., Lapčík O., Stárka L., Adlercreutz H.: *Chem. Listy* 92, 44 (1998).
13. Lapčík O., Hampl R., Hill M., Wähälä K., Nawaf A. M., Adlercreutz H.: *J. Steroid Molec. Biol.* 64, 261 (1998).
14. Lapčík O., Hill M., Hampl R., Wähälä K., Adlercreutz H.: *Steroids* 63, 14 (1997).
15. Lapčík O., Hill M., Černý I., Lachman J., Al-Maharik N., Adlercreutz H., Hampl R.: *Plant Science* 148, 111 (1999).
16. Yatsimirskaya E. A., Gavrilova E. M., Egorov A. M., Levashov A.: *Steroids* 58, 547 (1993).
17. Bennetau-Pelissero C., Le Houerou C., Lamothe V., Le Menn F., Babin P., Bennetau B.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 305 (2000).
18. Creeke I. P., Wilkinson A. P., Lee H. A., Morgan M. R. A., Price K. R., Rhodes M. J. C.: *Food Agric. Immun.* 10, 325 (1998).

M. Vítková^a, Z. Macková^b, L. Fukal^a, and O. Lapčík^b (^a*Department of Biochemistry and Microbiology,* ^b*Department of Chemistry of Natural Substances, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Enzyme Immunoassay for the Determination of Isoflavones**

Competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of isoflavones daidzein, genistein and biochanin were developed. Isoflavone conjugates coupled at positions C7 and C4' via a carboxymethyl spacer to bovine serum albumin were used as immunogens and also as coating antigens. Assay conditions, including concentrations of antisera and coating antigens, were optimized and the effect of reaction time, various blocking agents and organic solvents was investigated. The developed ELISA assays are highly sensitive, the I_{50} values of standard curves ranging between 15–60 pg/well, i.e. 0.3–1.2 ng.ml⁻¹. Cross reactivities to other isoflavones are in an acceptable range and interference of non-isoflavonoid molecules is negligible. The immunoassays have been used in phytochemical research for monitoring isoflavone levels in various plant families. We expect further use of the assays in analysis of food, body fluids, cell culture media and other biological materials.

VÝUKA CHEMIE

ZAPOJENÍ VYSOKÉ ŠKOLY CHEMICKO-TECHNOLOGICKÉ V PRAZE DO VÝZKUMU A VÝROBY LÉČIV

**BOHUMIL KRATOCHVÍL a ZDENĚK
BĚLOHLAV**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

bohumi.kratochvil@vscht.cz, zdenek.belohlav@vscht.cz

Došlo 4.11.04, přijato 18.11.04.

Klíčová slova: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, farmaceutický průmysl, bakalářský studijní program: Syntéza a výroba léčiv

Úvod

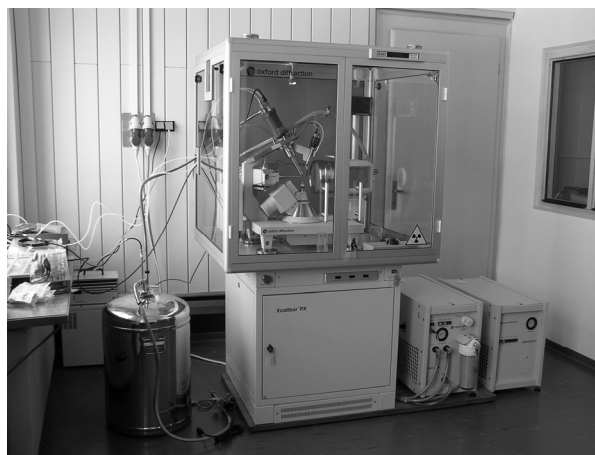
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze je největším chemickým vysokoškolským učilištěm v ČR. Na 4 fakultách školy studuje ve všech ročnících a typech studijních programů okolo 3000 studentů. Kromě toho je zde „pod jednou střechou“ soustředěn velký potenciál odborníků pokrývajících celé spektrum chemie a také velká kapacita přístrojové techniky. Právě tato lidská a instrumentační koncentrace je tradičně lákavá pro průmysl, který na VŠCHT Praha nachází široké možnosti spolupráce.

Spolupráce VŠCHT Praha s farmaceutickými firmami a medicínskými institucemi*

Zájem o spolupráci má i farmaceutický průmysl. Řešené farmaceutické projekty jsou většinou cíleny na vyřešení určitého dílčího problému při vývoji a výrobě generik. I když je třeba pochopitelně respektovat určitý a dočasný stupeň utajení při prezentaci výsledků, lze studovanou problematiku rozvíjet nekonfliktním akademickým směrem, což vede ke společným grantovým projektům a tématům pro bakalářské, magisterské a doktorské práce. Na jedné straně je v zájmu farmaceutických firem, aby pozornost věnovaná jejich produktům měla odpovídající vědeckou prestiž a na straně druhé akademická pracoviště VŠCHT Praha tak získávají zajímavou a prakticky realizo-

vatelnou tematiku výzkumu. Následující průřez spolupráce některých ústavů VŠCHT Praha s farmaceutickými firmami a medicínskými institucemi dokumentuje šíří studované problematiky. Zkrácená informace o uvedených spolupracích byla na vyžádání napsána a uveřejněna letos ve *Pharmaceutical Engineering*¹.

Ústav chemie pevných látek (vedoucí prof. Bohumil Kratochvíl) spolupracuje s firmami Ivax Pharmaceuticals, Zentiva, Chemopharma, ICN a ProMed v oblasti monitorování polymorfie pevných farmaceutických substancí a lékových forem metodami RTG fázové a strukturní analýzy (nově: řešení krystalových struktur substancí z RTG práškových dat). Spolupráce se dotýká především námelových alkaloidů, imunosupresiv, morfínů a jejich intermediátů, statinů, psychofarmak, flavonoidů silymarinu a dalších. Výsledky studií umožňují sledovat fázovou čistotu vyráběných substancí, zkoumat molekulární pakování polymorfních forem v krystalech, hodnotit flexibilitu/rigiditu biologicky aktivních molekul, modelovat kavity v krystalových strukturách substancí a sledovat jejich zaplňování molekulami solventů, modelovat interakci molekul s receptory atd. Řada těchto informací je pak použita pro dokumentaci léčiv. Kromě toho se na ústavu vyvíjí krystalografický software pro farmaceutické aplikace, provádí se vybrané krystalizace a mikroskopická pozorování. Důležitá je i školící činnost ústavu pro Státní ústav kontroly léčiv (kurz: Polymorfie farmaceutických substancí). Ústav disponuje Laboratoří RTG krystalových struk-



Obr. 1. RTG monokrystalový difraktometr Xcalibur PX firmy Oxford Diffraction – přístroj na měření a řešení molekulových a krystalových struktur farmaceutických substancí, který byl na VŠCHT Praha zakoupen v říjnu tohoto roku

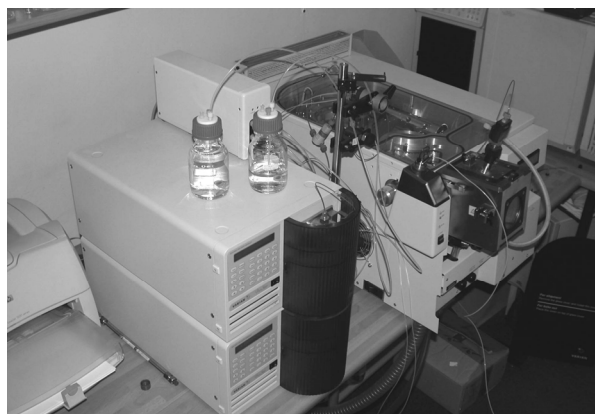
* Související oblastí jsou biomateriály, které jsou na VŠCHT Praha také studovány, ty však nejsou předmětem tohoto příspěvku.

tur, která je vybavena špičkovou instrumentací (obr. 1).

Pracovníci Ústavu organické chemie (vedoucí prof. Ivan Stibor) např. spolupracovali s odborem kvalifikované chemie Spolany Neratovice (nyní NeraPharm Neratovice) na výzkumu a vývoji syntéz různých generik ze skupiny eikosanoidů. Výsledkem této plodné spolupráce bylo zavedení výroby prostaglandinů $\text{PGF}_{2\alpha}$ (\pm)-cloprostenolu a (+)-cloprostenolu, používaných jako účinné látky v různých veterinárních přípravech sloužících k indukci a synchronizaci říje u skotu a bravu. Z prostaglandinů používaných v humánní medicíně lze uvést dinoprostone (PGE_2 derivát používaný v gynekologii) a alprostadil (PGE_1 derivát používaný při léčení některých dysfunkcí krevního oběhu, zejména erektilní dysfunkce). Dalším společným zájmem Spolany Neratovice a Ústavu organické chemie byl výzkum a vývoj syntéz generických nesteroidních protizánětlivých látek ibuprofenu a piroxicamu; výroba piroxicamu byla ve Spolaně zavedena v r. 1989. Z ostatních aktivit Ústavu organické chemie v oblasti výzkumu a vývoje léčiv lze uvést vypracování postupů pro výrobu generických inhalačních anestetik methoxyfluranu, enfluranu a isofluranu na základě požadavků firmy Zentiva.

Pracoviště Ústavu analytické chemie, Laboratoř molekulárního rozpoznávání LMR (vedoucí prof. Vladimír Král), se delší dobu zabývá aplikací supramolekulární chemie pro medicínální a farmaceutický výzkum. Výsledkem této aktivity je výzkum a vývoj nových fotosensitizerů pro fotodynamickou terapii nádorů (PDT), který je realizován jednak v oblasti výzkumu s I. LF UK, prof. Martásek a Biofyzikálním ústavem I. LF UK, doc. P. Poučková. V oblasti realizace metalokomplexů pro vývoj léčiv LMR spolupracuje s firmou Pharmacyclic, USA. Nově navázaná spolupráce LMR s firmou Zentiva (oddělení dr. Dohnala) směřuje do oblasti vývoje nových separačních technik na základě využití supramolekulárních komplexů a ligandů modifikovaných nanočástic. Vedle toho je rozvíjen výzkum v oblasti využití samoskladných systémů a nanočástic pro cílený transport léčiv.

Na Ústavu organické technologie (vedoucí prof. Libor Červený) jsou ve vztahu k farmaceutickému průmyslu řešeny úkoly související se syntézou preparátů, s analýzou nečistot, návrhem a optimalizací průmyslových technologií. Největší podíl spolupráce s farmaceutickými firmami je orientován na vývoj a optimalizaci výrob generik, případně jejich prekurzorů. Do této oblasti spadá spolupráce s firmami Zentiva, Q-chem a CMS (Velká Británie), ICN, CIBA-Geigy (Švýcarsko), Chemopharma, VÚOS Pardubice a Interpharma Praha na celé řadě prekurzorů generik z různých farmakologických skupin. Spolupráce ústavu s akciovou společností Zentiva je orientována na optimalizaci řízení procesu mokré granulace a sledování homogenity směsí při výrobě tablet. Zahrnuje kromě provozních a poloprovozních experimentů analýzu citlivosti parametrů procesu, přenos dat z poloprovozních do provozních podmínek a také vývoj a využití matematických modelů na bázi umělých neuronových sítí a „fuzzy“ logiky. Spolupráce v oblasti analytické chemie spočívají ve stanovení, izolaci a identifikaci nečistot. Ústav disponu-



Obr. 2. Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem Varian 1200L (vpravo). Přístroj je spojen s kapalinovým chromatografem (vlevo) vybaveným duální pumpou

je laboratoř hmotnostní spektrometrie vybavené nejen GC/MS přístroji (kvadrupólový analyzátor, iontová past s interní ionizací, obr. 2), ale rovněž HPLC/MS přístrojem vybaveným trojitým kvadrupólem a ionizací elektro-sprayem (ESI) a chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI), které v kombinaci s preparativní HPLC představují velmi účinný nástroj pro řešení problematik z uvedené oblasti. Z konkrétních řešení lze např. zmínit identifikaci nečistot v originálním rentgenovém diagnostiku připraveném ve firmě Interpharma Praha. Metody analytické chemie jsou často kombinovány s teoretickými výpočty na bázi molekulárního modelování, které mohou poskytnout praktické informace o stabilních strukturních uspořádáních léčivých látek. Ústav organické technologie disponuje hardwarovým a softwarovým vybavením (Gaussian 98, Cerius, CASTEP), které patří k nejlepším produktům v této oblasti a spolupracuje v této oblasti s Univerzitou Vídeň, kde se nachází jedno z nejprestižnějších pracovišť v této oblasti v Evropě. Kombinací analytické metody s teoretickými výpočty byla identifikována ve spolupráci s Interpharmou Praha řada stabilních rotamerů v nově vyvinutém rentgenovém diagnostiku, což umožnilo jeho zavedení na trh.

Příprava bakalářského studijního programu „Syntéza a výroba léčiv“

Na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze je v současné době připravován bakalářský studijní program „Syntéza a výroba léčiv“, který navazuje na tradici výuky chemie, chemického inženýrství a chemické technologie a na širokou a intenzivní vědecko-výzkumnou činnost školy v oblasti malotonážních technologií, optimalizace technologických procesů, vývoje syntéz generických léčiv, syntézy a výroby chemických specialit, zpracování a analýzy laboratorních a provozních dat a vývoje nových materiálů pro aplikaci ve farmacii a medicíně.

Cílem studijního programu je příprava absolventů

chemiků a chemických technologů s uplatněním především ve farmaceutickém průmyslu. Studijní program „Syntéza a výroba léčiv“ je proto koncipován s ohledem na potřeby a specifika farmaceutických výrob. Základ studia tvoří přednášky a semináře ze základních oborů chemie, matematiky a fyziky. V laboratorních cvičeních ze základních oborů chemie si posluchači osvojí též odpovídající praktické dovednosti a návyky. Na tyto předměty navazují discipliny chemicko-inženýrské a chemicko-technologické s vysokým podílem laboratorních cvičení. Tradiční předměty jsou doplněny o základy biologie, biochemie, mikrobiologie, fyziologie, farmakochemie, farmakologie a farmaceutické průmyslové technologie. Záměrem profilujících předmětů je seznámit absolventy se základními pojmy uvedených oborů tak, aby byli schopni komunikovat s autoritami dohlížejícími na výrobu aktivních farmaceutických substancí, popř. léčiv. Posluchači se rovněž seznámí se zásadami správné výrobní a laboratorní praxe, s jistěním kvality a validací technologických procesů, s moderními analytickými metodami, s vývojem, výzkumem a registrací léčiv a jejich patentovou ochranou. Nabídka povinně volitelných a doporučených předmětů umožňuje posluchačům profilovat se směrem chemickým nebo technologickým. Bakalářské studium současně vychovává studenty pro navazující magisterské studium.

Absolventi studijního programu naleznou uplatnění jako kvalifikovaní odborní a techničtí pracovníci při řízení a kontrole chemických a fyzikálních procesů ve farmaceutických firmách, vyrábějících jak vlastní substance, tak lékové formy. Ve farmaceutickém průmyslu se proto uplatní především jako výrobní technologové, pracovníci analytických laboratoří a odborní a techničtí pracovníci ve vývoji a výzkumu. Další, příbuznou oblast uplatnění absolventů studijního programu představují inovativní a „high-

tech“ společnosti podnikající v oblasti malotonážní chemie.

Závěr

Dlouholeté praktické zkušenosti ústavů a pracovišť VŠCHT Praha s farmaceutickým průmyslem a medicínskými institucemi dávají záruku, že budoucí pedagogické aktivity školy v této oblasti budou opřeny o solidní základ.

Autoři děkují kolegům z VŠCHT Praha: prof. Červenému, prof. Královi, doc. Hamplovi a Ing. Kačerovi za spolupráci při mapování aktivit ústavů VŠCHT Praha ve farmaceutickém průmyslu a medicíně.

LITERATURA

1. Bělohav Z., Hampl F., Kratochvíl B.: *Pharm. Eng.* 24 (5), 74 (2004).

B. Kratochvíl and Z. Bělohav (*Institute of Chemical Technology, Prague*): **Involvement of Institute of Chemical Technology Prague in the Research and Manufacturing of Pharmaceuticals**

The contribution brings a brief list of main topics of joint projects of the Institute and medical institutions as well as information on instrumentation of workplaces at the Institute. Intensive cooperation of the Department of Solid State Chemistry, Organic Chemistry, Organic Technology, and Analytical Chemistry also became a basis of preparation of the new BS study program “Synthesis and manufacture of pharmaceuticals”. The goal of the program is education of chemists and chemical technologists primarily for pharmaceutical industry.

VÝZKUM A VÝUKA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE V BRNĚ

MILOSLAVA RABIŠKOVÁ

Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
rabiskovam@vfu.cz

Došlo 5.11.04, přijato 19.11.04.

Klíčová slova: farmaceutická technologie, výzkum, výuka, transportní lékové systémy

Farmaceutická fakulta byla v Brně obnovena v roce 1991 na tehdejší Vysoké škole veterinární, nyní Veterinární a farmaceutické univerzitě (VFU). První dva roky integrované výuky základních předmětů chemických, biologických a medicínských pro tři fakulty univerzity následuje v magisterském programu farmacie studium profilových farmaceutických disciplin zabezpečované pěti farmaceutickými ústavu. Jedním z nich je také Ústav technologie léků, v jehož laboratořích se rozvíjí výzkum až od roku 1998, kdy se podařilo díky úspěšné grantové aktivitě a podpoře VFU překonat hlavní potíže s jejich přístrojovým vybavením.

Ústav technologie léků VFU zabezpečuje pre- i postgraduální výuku profilového farmaceutického oboru farmaceutická technologie – galenická farmacie. Hlavní obor je doplněn povinným předmětem *Teorie lékových forem* a výběrově povinnými předměty *Lékové formy vyšších generací*, *Radiofarmaka* a *Kosmetické prostředky*. Od příštího akademického roku se plánuje rozšíření nabídky volitelných předmětů o *Průmyslovou farmacii*. Farmaceutická technologie je farmaceutický vědní obor, který se zabývá složením, formulací, hodnocením a jištěním jakosti léků individuálně připravovaných nebo hromadně vyráběných. Studuje podmínky, za nichž je možné léčiva a farmaceutické pomocné látky přetvářet na léky, zákonitosti, kterými se tyto procesy řídí a vztahy léků k účinku v nich aplikovaných léčiv. Většinu z uvedených předmětů doplňují laboratorní cvičení, která umožňují studentům získat praktické dovednosti potřebné při nástupu do farmaceutické praxe. Samozřejmostí jsou experimentálně zaměřené diplomové práce v pregraduálním a rigorózní nebo disertační práce v postgraduálním studiu jako součásti výzkumného programu ústavu.

Vzhledem k finanční náročnosti výzkumu aplikačních forem se ústav prozatím specializuje na orální a perorální lékové systémy a aplikační formy určené k dermální aplikaci. Výzkumné aktivity zahrnují oblast perorálních lékových forem s řízeným uvolňováním léčiva, kde největší podíl tvoří v souladu se světovým trendem částicové lékové systémy reprezentované peletami, mikrotobolkami



Obr. 1. Výroba pelet extruzí-sferonizací umožňuje získat sférické částice matricového typu až 90% obsahu léčiva a úzkým velikostním rozpětím

a nanočásticemi. Obliba těchto forem souvisí jak s výhodami technologickými (možnosti kombinací léčiv, flexibilita v návrhu lékových forem) tak i farmakoterapeutickými (snížený výskyt nežádoucích účinků léčiv, zjednodušení dávkovacího režimu). Další projekty se věnují mukoadhezivním a matricovým systémům založeným na polymerních nosičích kontrolujících liberaci aktivních látek. Z veterinární oblasti se studují postruminální transportní systémy pro výživu skotu. Témata obhájených a zpracovávaných dizertačních prací konkretizuje tabulka I.

Při vývoji sofistikovaných lékových forem a systémů využívá Ústav technologie léků (ÚTL) kromě nových nosných pomocných látek také nové technologie prováděné na moderních zařízeních, ke kterým patří zejména výroba aktivních pelet metodou extruze-sferonizace (obr. 1) a nová technologie peletizace rotační aglomerací (obr. 2). Hlavní předností posledně zmíněné technologie je výroba léku v jediném zařízení od prachových substancí až po konečný produkt, což představuje ekonomické úspory, výhody z hlediska správné výrobní praxe a odstranění nedostatků vznikajících přenosem meziproductů na jiná zařízení. Kontrola obsahu a řízení liberace léčiv v souladu s bezpečnou a účinnou farmakoterapií je zabezpečena lékopisnými metodami Českého lékopisu 2002, který vychází z evropských norem. Další jakostní parametry částicových lékových forem se hodnotí obrazovou analýzou, heliovým pyknometrem, přístroji určenými k měření mechanické odolnosti a dalšími speciálními analytickými postupy.

Výzkumná i pedagogická činnost ÚTL se odvíjí na

Tabulka I

Témata obhájených a zpracovávaných dizertačních prací

Číslo	Název práce
<i>Obhájené dizertační práce</i>	
1.	Lékové formy s řízeným uvolňováním diltiazemu hydrochloridu
2.	The Dosage Form of Controlled Release Pellets Containing an Anti-asthmatic Drug
3.	Částicové lékové formy s modifikovaným uvolňováním diltiazemu
4.	Studium fyzikálně chemických vlastností polotuhých topických léků
5.	Měkké želatinové tobolky s obtížně absorbovatelným léčivem
6.	Perorální hydrofilní nosiče pro řízený účinek léčiv
<i>Zpracovávané dizertační práce</i>	
1.	Transformace výrobního procesu: vlhká granulace – přímé lisování
2.	Pseudofluidní vrstva v technologii perorálních léků – porovnávací studie
3.	Formulační parametry a kvalita pelet přípravných extruzí a sferonizací
4.	Využití rotační aglomerace v technologii částicových systémů
5.	Výroba a hodnocení mukoadhezivních tablet
6.	Celulózové deriváty při modifikaci uvolňování léčiv z výlisků
7.	Vliv karbomerů na perorální přívod léčiva
8.	Perorální forma pro ruminálně chráněný protein u skotu
9.	Možnosti využití technologie vrstvení léčiva v rotoprosoru

základě domácí i mezinárodní spolupráce. ÚTL spolupracuje s farmaceutickými průmyslovými podniky Zentivou, a.s. Praha, Biovetou, a.s. Ivanovice na Hané a brněnskou společností Lunaria. Ústav je zapojen do mezinárodních



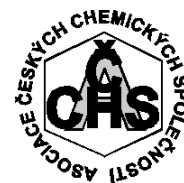
Obr. 2. V rotoprosoru (součást multifunkčního zařízení Multi-processor) lze získat homogenní pelety z prachové směsi léčiva a pomocných látek a současně je opatřit obalem, který může řídit uvolňování aktivní substance. Nová technologie je v ČR ojedinělá, také v mezinárodním měřítku ji studuje pouze několik málo pracovišť

výzkumných aktivit reprezentovaných například programem Galenos – Euro PhD, který se věnuje výměně a zvyšování kvalifikace mladých vědeckých pracovníků především v zemích EU, ale také USA a dalších. ÚTL se aktivně podílí na práci České farmaceutické společnosti ČLS – JEP zejména při organizování každoročních pracovních dnů Sekce technologie léků, i na celoživotním vzdělávání farmaceutů, lékařů a veterinárních odborníků.

Kolektiv ÚTL je poměrně mladý a počtem nevelký. Tvoří jej 5 vysokoškolských učitelů, 9 studentů DSP a technický personál. Při realizaci 20 grantových projektů a více než 100 publikačních výstupů má však dobrou šanci zapojit se mezi podobné instituce v EU.

M. Rabišková (*Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*): **Pharmaceutical Technology Research and Education in Brno**

Pharmaceutical technology education at Faculty of Pharmacy in Brno is organised according to the EU recommendations. Research projects on this field are dealing with oral drug delivery systems and medical forms for dermal application. National and international cooperation with industrial companies and universities allows high level of these activities.



57. sjezd chemických společností

4. – 8. září 2005

Vysoké Tatry

Dovolujeme si Vás pozvat, jménem organizačního výboru, Asociace českých chemických společností, Asociace slovenských chemických a farmaceutických společností, garantů a sponzorů, na společný 57. sjezd chemiků. Sjezd se bude konat v hotelovém komplexu Hutník v Tatranských Matliaroch. V případě velkého zájmu je možné rozšířit ubytovací kapacitu o sousední hotely. Tatranské Matliare mají výhodnou výchozí polohu pro výlety do všech hlavních tatranských lokalit. Předpokládané vložné na konferenci je

175 Euro,

zahrnuje konferenční poplatek, sborník, ubytování, plnou penzi, občerstvení během sekcí, společenské večery a možnost využití sportovního vybavení hotelu (plavecký bazén, bowling). Hotelový komplex s možností cen-trálního ubytování a stravování všech účastníků zajistí lepší podmínky pro odbornou i společenskou komunikaci účastníků sjezdu. Odborná úroveň bude podpořena přítomností řady pozvaných přednášejících, zahajovací přednášku přislíbil prof. Zewail (Kalifornský technologický institut, nositel Nobelovy ceny za chemii pro rok 1999).

Předběžné přihlášky zasílejte na adresu Slovenské chemické společnosti písemně nebo E-mailem co nejdříve, nejpozději do 6. ledna 2005. další informace budou zveřejňovány na webových stránkách sjezdu a obou národních chemických společností.



Kontaktní adresa

E-mail: upolzhl@savba.sk, schs@chtf.stuba.sk

Slovenská chemická spoločnosť

FCHPT STU

Radlinského 9/1111

812 37 Bratislava

Slovensko

CHEMICKÝ PRŮMYSL

MOKRÁ GRANULACE PŘI VÝROBĚ LÉČIV

ZDENĚK BĚLOHLAV^a, LUCIE BŘENKOVÁ^a,
PETR DURDIL^b, JIŘÍ HANIKA^c, PAVEL
ŘÁPEK^b, VÁCLAV TOMÁŠEK^b a MIKULÁŠ
LEHOCKÝ^b

^aVysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bZentiva a.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, ^cÚstav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
zdenek.belohlav@vscht.cz

Došlo 14.10.04, přijato 8.11.04.

Klíčová slova: granulace, tabletování, léčivo

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus mokré granulace
3. Promíchávané granulátory
4. Průběh a řízení granulace
5. Příkon motoru hlavního míchadla
6. Teplota granulované směsi
7. Citlivost mokré granulace na vlastnosti účinné látky
8. Přenos dat z poloprovozního granulátoru do provozního měřítka
9. Závěr

1. Úvod

Granulací se obecně označuje proces spojování částic jemných prášků do větších aglomerátů, které obvykle vykazují vyšší porozitu. Důvodem granulování práškových směsí je dosažení větší a rovnoměrnější velikosti částic. Zgranulovaná směs umožňuje popř. zlepšuje tabletování, briketování, balení, vytlačování a stlačování materiálů, snižuje prašnost původních směsí a umožňuje výrobu materiálů s požadovanými fyzikálními vlastnostmi, např. hustotou a rozpustností.

Granulace je široce využívána ve farmaceutickém průmyslu při tabletování léčiv¹. Úkolem granulace je zajistit výrobu tablet požadovaných vlastností, hlavně pevnosti, rozpadu a oděru tablet. V procesu mokré promíchávané granulace se nejprve suchá směs účinné látky a pomocných látek důkladně promíchá a následně zvlhčí rozpouště-

dlem, případně předem připraveným roztokem pojiva. K rozpouštění pojiva se nejčastěji používá voda, pojivo tvoří např. kollidon (polyvinylpyrolidon) nebo předželovaný škrob. Intenzivním hnětením vlhké lepidivé směsi dochází postupně během několika minut k tvorbě granulí.

Při zevrubném hodnocení procesu mokré granulace by se mohlo zdát, že optimalizace provozních parametrů, přenos dat z laboratorního nebo poloprovozního měřítka do provozních podmínek a řízení procesu nejsou obtížné úlohy. Při mokré granulaci totiž neprobíhají chemické reakce ani fázové přeměny, relativně krátký proces není doprovázen intenzivní výměnou tepla. Současně je po chemické stránce přísně kontrolována a stabilizována kvalita používaných surovin. Ve skutečnosti je však mokrá granulace mimořádně citlivá na velikost a tvar krystalů účinné látky, na způsob postřiku a množství přidávané kapaliny, teplotu vsádky (zejména s ohledem na rychlost rozpouštění některých pojiv), rychlost otáček míchadla při hnětení granulované směsi a na míře zaplnění nádob granulátorů. Výsledkem proměnlivosti uvedených faktorů je rozdílná rychlost granulace u jednotlivých vsádek, která komplikuje v provozních podmínkách řízení a hlavně optimální ukončení procesu.

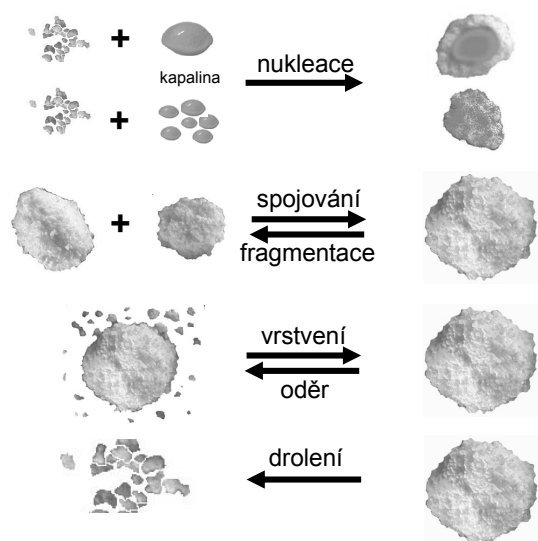
2. Mechanismus mokré granulace

Mokrá granulace představuje komplex simultánně probíhajících a vzájemně se ovlivňujících procesů. Nejdůležitější z nich je vznik, růst a rozpad granulí. Na začátku procesu je granulovaný materiál složen převážně z jemných suchých částic, které při promíchávání aglomerují pouze vlivem elektrostatických a van der Waalsových sil. Jakmile je prášková směs zvlhčena, vznikají zárodky vlhkých granulí. Následným hnětením vlhké směsi obsahující rozpuštěné pojivo dochází k intenzivnímu růstu a zpevňování granulí. Současně však v promíchávané směsi probíhá rozpad granulí, zvláště těch největších. V závěrečné fázi mokré granulace přechází granulovaná směs do pseudostacionárního stavu, charakterizovaného přibližnou rovnáhou procesů růstu a rozpadu granulí. Výsledkem jsou relativně pevné, středně velké granule.

V z n i k a r ů s t g r a n u l í

Granule vznikají během procesu granulace nukleací a zvětšují se spojováním nebo vrstvením² (obr. 1). Ke vzniku granulí dochází již při homogenizaci suché práškové směsi a hlavně během přidávání kapaliny do promíchávané směsi. Růst granulí je soustředěn především do fáze intenzivního hnětení vlhké směsi.

Vznik zárodků granulí v suché práškovité směsi je důsledkem tření mezi částicemi a vysvětluje se obvykle účinkem elektrostatických a van der Waalsových sil.



Obr.1. Vznik granulí nukleací, spojováním a vrstvením, rozpad granulí fragmentací, oděrem a drolením

Jakmile je suché práškového lože zvlhčeno kapalinou (vlhčivem), dochází na základě vzniku kapalinových můstků k tvorbě zárodků vlhkých granulí. Nukleace může probíhat dvěma různými mechanismy^{3,4}. Pokud dochází ke kontaktu pevných částic s jemnými kapkami vlhčiva, přilnou kapky vlhčiva k povrchu částic. Pokud jsou naopak kapky vlhčiva větší než pevné částice, nukleace probíhá vnošením menších částic do větší kapky.

Při spojování granulí se střetnou dvě menší granule a vytvoří jednu větší granuli. K spojování dochází vlivem rozpuštěného pojiva a částečně i samotného vlhčiva. Spojování granulí proto ovlivňuje především lepidlost a množství pojiva.

K růstu granulí dochází také vrstvením – nalepováním drobných částic na povrch větší granule. Stejně jako na spojování granulí mají i na vrstvení dominantní vliv vlastnosti a množství pojiva.

Rozpad granulí

Opakem růstu granulí je jejich rozpad⁵. Rozpad může nastat drolením, fragmentací nebo oděrem (obr. 1). Na rozdíl od růstu granulí mohou všechny mechanismy rozpadu probíhat nejen v granulátoru, ale i při sušení nebo při následné manipulaci s již usušeným granulátem⁶.

Srážky granulí s hlavním míchadlem popř. se stěnou granulátoru vedou nejčastěji k rozpadu granulí drolením. Granule se vlivem nárazu rozdrolí zpět na jemnější částice.

Fragmentace je způsobena převážně účinkem sekačích nožů umístěného na boku pláště granulátoru. Sekací nůž rozděljuje velké granule na dvě menší granule.

K oděru dochází vlivem vzájemné kolize granulí, kontaktem granulí s míchadlem a se stěnou granulátoru. Z povrchu atakované granule se oddělují jemné částice a zároveň se pozvolna zmenšuje a mění tvar původní granule.

3. Promíchávané granulátory

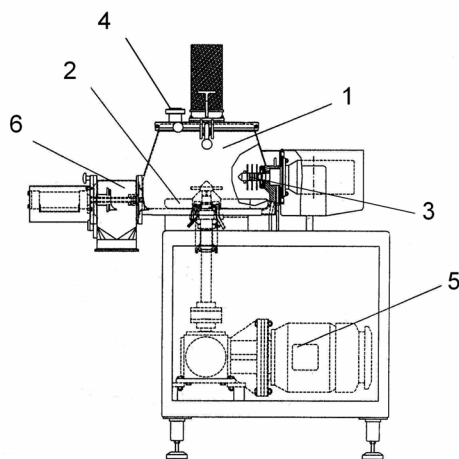
K mokré granulaci léčiv se v průmyslu používají hlavně míchané granulátory, řídicí granulátory s fluidním ložem⁷. Na rozdíl od fluidních granulátorů, které mohou zároveň plnit funkci sušárny nebo sloužit k obalování tablet, jsou promíchávané granulátory využitelné jen pro mokrou granulaci nebo pouze pro homogenizaci směsí látek.

Promíchávaný granulátor tvoří válcovitá, v horní části kónicky zúžená nádoba o objemu asi 0,1 až 1,2 m³, opatřená dvěma typy míchadel (obr. 2). U dna granulární nádoby je umístěno hlavní, velké lopatkové míchadlo, které zajišťuje při 80 až 200 otáčkách/min homogenizaci vsádky, promíchání s vlhčivem a hnětení granulované směsi. Druhé, relativně malé míchadlo s ostrými sekačimi noži a s 2500 až 3000 otáčkami/min je upevněno ve svislé poloze na boku granulátoru. Kromě zrychlení promíchávání granulované směsi ve vertikálním směru se toto míchadlo uplatňuje hlavně při rozmělnění hnětené hmoty na granulátová zrna. Ve víku nádoby granulátoru je otvor pro nastříkávání kapaliny, která je do granulární nádoby dopravována peristaltickým čerpadlem.

4. Průběh a řízení granulace

Řízení a optimální ukončení provozní granulace je obvykle založeno na sledování příkonu motoru hlavního míchadla, který je úměrný odporu granulované směsi, a také na vizuálním posouzení výsledného granulátu obsluhou⁸. Z hlediska řízení lze proces mokré granulace rozdělit do 4 stupňů:

1. V prvním stupni, počáteční homogenizaci, se nejprve suchá účinná látka promíchává s práškovitými pomocnými látkami. Jednotlivé složky směsi se dokonale promísí a zároveň se rozdrolí případné hrudky.



Obr. 2. Schéma promíchávaného granulátoru; 1 – granulární nádoba, 2 – hlavní míchadlo, 3 – sekačí nože, 4 – přívod kapaliny, 5 – pohon granulátoru, 6 – vypouštěcí prostor

- Otáčky hlavního míchadla jsou v této fázi nastavovány pouze v rozmezí 80 až 100 otáček/min.
2. V dalším stupni granulace dochází k postřiku práškového lože vlhčivem popř. roztokem pojiva při nezměněných otáčkách hlavního míchadla. Kapalina je do granulované směsi vstříkována tryskou umístěnou ve víku granulátoru. V této fázi dochází ke smočení povrchu částic a jejich následnému spojování v důsledku kapalných můstků mezi práškovitými částicemi.
 3. Následuje druhá fáze homogenizace vedená stále při nízkých otáčkách hlavního míchadla. Kapalina je během tohoto stupně rovnoměrně distribuována do celého objemu granulované směsi. Při nerovnoměrné distribuci kapaliny by mohlo docházet k saturaci pouze části vsádky a granule více nasycené by měly tendenci růst rychleji než sušší granule. Výsledkem by byla nežádoucí, silně nerovnoměrná distribuce velikosti částic granulované směsi.
 4. V posledním stupni granulace se obvykle skokově zvyšují otáčky hlavního míchadla na 150 až 200 otáček/min. Tím je zajištěno intenzivní hnětení granulované směsi a následný růst a zpevňování granulí. Granulace je obvykle ukončena na základě dosažení určité hodnoty příkonu motoru hlavního míchadla.

Vznik, postupné zvětšování a zpevňování granulí během procesu mokré granulace lze sledovat vizuálně (obr. 3). Pokud není granulátor ihned po dosažení optimální hodnoty příkonu motoru hlavního míchadla vypnut, přechází systém s relativně konstantní velikostí granulí v poměrně krátké době do nestabilního stavu (obr. 4). Vytvoří se hutná kompaktní vrstva, která klade silný odpor pohybu hlavního míchadla a obvykle vyřazuje z činnosti sekací nože. Vzniklý granulát je znehodnocen, případně musí být použito speciálního mlýnu, ve kterém se vzniklé hroudy rozmělní pro následné sušení.

5. Příkon motoru hlavního míchadla

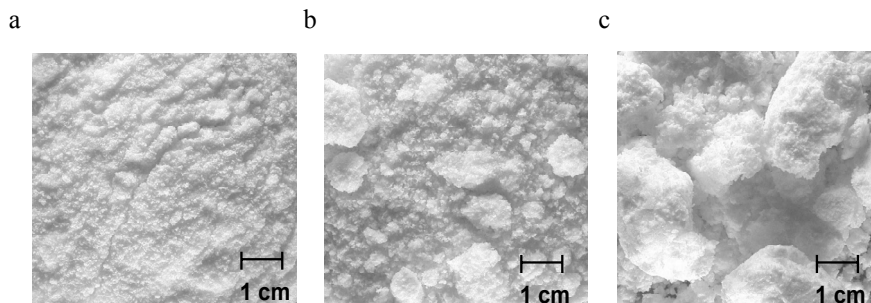
Dosažení určité hodnoty příkonu nebo přírůstku příkonu motoru hlavního míchadla je pro detekci optimálního konce granulace v provozních podmínkách využíváno



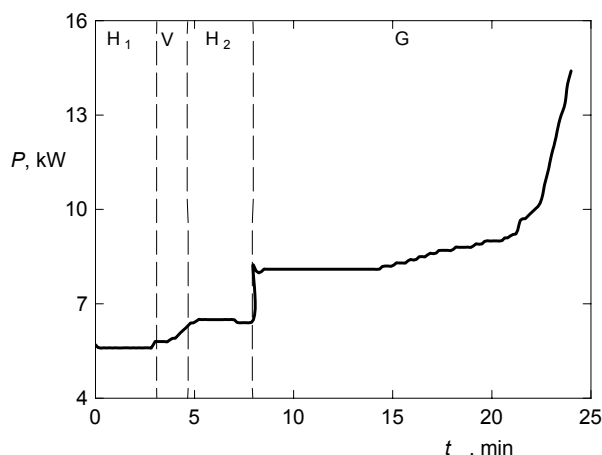
Obr. 4. Přegranulovaná směs

především pro relativní jednoduchost a spolehlivost této měřicí metody⁹. Během granulace příkon motoru roste jako důsledek zvyšujícího se odporu míchané směsi v důsledku postupně se tvořících hutných granulí. Příklad časové závislosti příkonu motoru hlavního míchadla je uveden na obr. 5. Při postřiku granulované směsi dochází k mírnému nárůstu příkonu z důvodu tvorby zárodků granulí. Prudký nárůst příkonu ve stupni vlastní granulace je způsoben skokovým zvýšením otáček hlavního míchadla a exponenciální nárůst v závěrečném stupni granulace intenzivní tvorbou hutných granulí. Jakmile příkon dosáhne určité hodnoty, je proces granulace ukončen.

Příkon motoru hlavního míchadla granulátorů je obvykle měřen wattmetrem připojeným k motoru míchadla. Hodnoty jsou zaznamenávány počítačem a pro kontrolu lze příkon také vizuálně odečítat z analogového měřicího přístroje vestavěného v ovládacím panelu. Nespornou výhodou měření příkonu je jeho závislost pouze na míře zgranulování směsi. Případné zkrácení nebo naopak prodloužení doby granulace např. vlivem rozdílných fyzikálních vlastností zpracovávaných surovin nemá proto na příkon motoru výraznější vliv.



Obr. 3. Vzhled směsi během procesu mokré granulace; a) granulovaná směs po zvlhčení, b) poločas granulace, c) konec granulace – optimální složení granulované směsi



Obr. 5. Časový profil příkonu motoru hlavního míchadla při granulaci; P – příkon motoru, t – čas, H₁ – první fáze homogenizace, V – vlhčení, H₂ – druhá fáze homogenizace, G – vlastní granulace

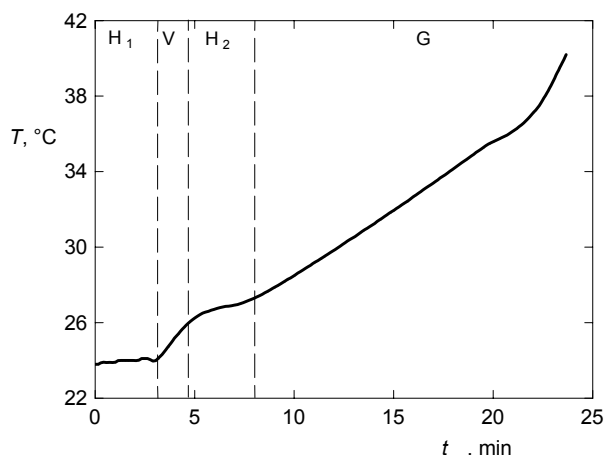
6. Teplota granulované směsi

Během procesu mokré granulace dochází podobně jako u měření příkonu k nárůstu teploty¹⁰. Granulovaná směs se při hnětení zahřívá především následkem disipace mechanické energie hlavního míchadla. Na druhé straně přechází část tepla přes stěnu granulátoru do jeho okolí.

V provozních a poloprovozních podmínkách je teplota granulované směsi obvykle měřena odporovým teploměrem umístěným na vnitřní straně pláště granulátoru. Takto snímané hodnoty teplot jsou však často velmi nepřesné z důvodu značné tepelné setrvačnosti čidla. Náhradním způsobem měření tepelných projevů při homogenizaci a granulaci je měření teploty vnějších povrchů stěn granulátorů¹¹. Tato metoda je založena na ověřeném předpokladu, že odpor k přestupu tepla na vnější straně granulátoru (rozhraní stěna-vzduch) je řádově větší než odpor na straně vsádky (rozhraní stěna-granulovaná směs) a odpor tenké ocelové stěny granulátoru. Lze proto předpokládat, že teplota vsádky a stěny granulátoru je velmi podobná. K měření teploty pláště granulátoru je vhodný odporový teploměr s velmi rychlou odezvou. Umístění čidla teploměru ve spodní části granulátoru byla určena na základě určení maxima teplotního pole na plášti granulátoru infračervenou termokamerou.

Ukázka teplotního profilu je na obr. 6. Během fáze homogenizace je teplota vsádky téměř konstantní. Teplota výrazně stoupá většinou až při postřiku granulované směsi, tzn. při zhutňování míchané směsi. Po zvýšení počtu otáček hlavního míchadla a při související intenzivní tvorbě granulí v závěru vlastní granulace začne teplota podobně jako příkon motoru hlavního míchadla prudce narůstat.

Teplotu granulované vsádky by bylo možné použít podobně jako příkon motoru hlavního míchadla k detekci optimálního ukončení granulace. Teplota vsádky však není tak citlivým ukazatelem stupně zgranulování směsi jako příkon motoru. Navíc je úměrná době vlastní granulace



Obr. 6. Časový profil teploty granulované směsi; T – teplota, t – čas, H₁ – první fáze homogenizace, V – vlhčení, H₂ – druhá fáze homogenizace, G – vlastní granulace

vsádky, která vykazuje v běžné provozní praxi značný rozptyl (běžně např. 8 až 15 minut). Teplota by se mohla uplatnit jako detektor optimálního ukončení granulace pouze v případě, že by byly důsledně stabilizovány všechny vlastnosti zpracovávaných surovin a množství přidávaného vlhčiva v jednotlivých vsádkách.

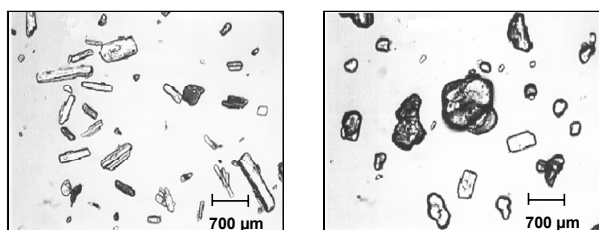
7. Citlivost mokré granulace na vlastnosti účinné látky

K výrobě daného léčiva se často používá účinná látka od různých výrobců. Pokud účinná látka tvoří hlavní součást léčiva, mají její vlastnosti dominantní vliv i na průběh mokré granulace. U účinných látek se určuje tvar částic, distribuce velikosti částic, sypaná a setřesná hustota^{8,12}. V rámci poloprovozních testů v Zentivě a.s. bylo zjištěno^{11,13}, že chování granulované směsi je odlišné jednak při použití účinné látky od různých výrobců, jednak při odběru účinné látky z různých míst skladovacích obalů.

Účinná látka od různých výrobců

Příklad vlastností účinné látky od dvou různých výrobců je uveden v tab. I. Z tabulky je zřejmé, že se jedná z fyzikálního hlediska o zcela odlišné látky. Z mikroskopických fotografií na obr. 7 plyne, že krystaly účinné látky od výrobce č. 1 mají pravděpodobně důsledkem užití různých způsobů krystalizace jehličkovitý a částice účinné látky od výrobce č. 2 spíše kulovitý tvar. Jehličkovitý nebo kulovitý tvar krystalů je tak příčinou nižší popř. vyšší sypané hustoty účinných látek, zároveň však jehličkovité částice vykazují větší specifický povrch než částice kulovité.

Distribuce velikosti částic účinné látky od obou výrobců je znázorněna na obr. 8. Účinná látka od výrobce č. 1 obsahovala větší podíl velmi jemných částic do 90 μm na rozdíl od účinné látky s převládající velikostí částic mezi 125 až 250 μm od výrobce č. 2.



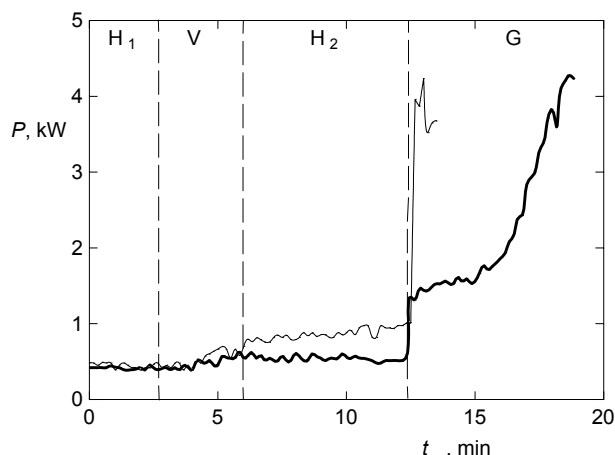
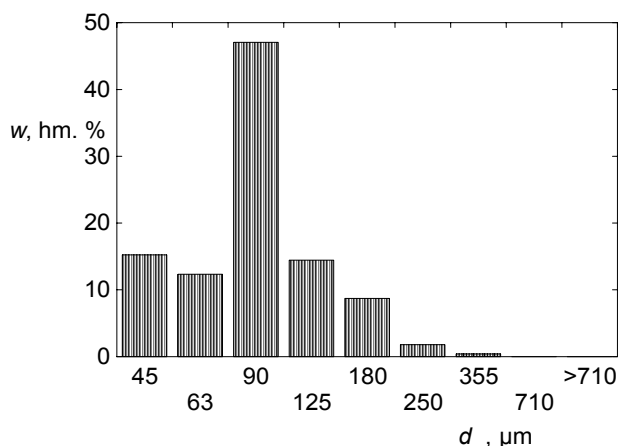
Obr. 7. Vzhled krystalů účinné látky od různých výrobců; vlevo – výrobce č. 1, vpravo – výrobce č. 2

Tabulka I

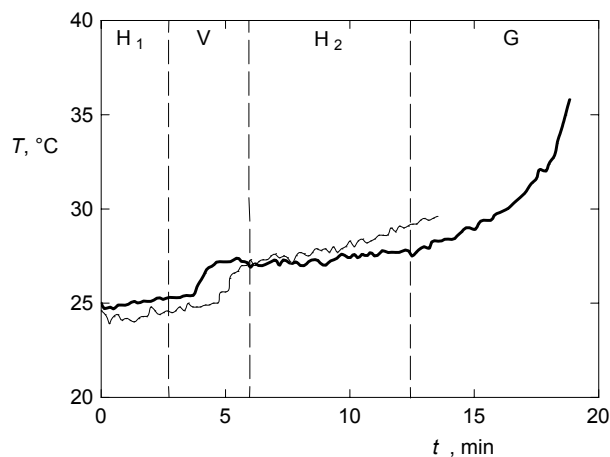
Vlastnosti účinné látky od dvou různých výrobců

Výrobce č.	Sypná hustota, [g.l ⁻¹]	Setřesná hustota [g.l ⁻¹]
1	505	625
2	595	725

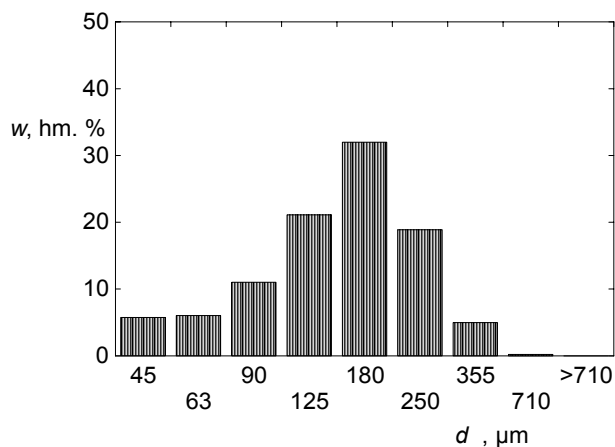
Odlíšný tvar a rozdílná distribuce velikosti částic jsou klíčovými parametry určujícími optimální množství vlhčiva¹³. Větší množství kapaliny vyžaduje účinná látka od výrobce č. 1, která má vyšší podíl částic s větším specifickým povrchem. K smočení takového povrchu je tudíž nutné větší množství vlhčiva. Opačné vlastnosti vykazuje účinná látka od výrobce č. 2. Tyto závěry byly potvrzeny časovými průběhy příkonu motoru hlavního míchadla a teploty vsádky během poloprovozní granulace obou účinných látek se stejným množstvím vlhčiva (obr. 9 a 10). U směsi s účinnou látkou od výrobce č. 2 došlo ve fázi vlastní granulace během krátké doby k prudkému nárůstu příkonu motoru. Na druhé straně se velmi krátká doba granulace projevila pouze mírným nárůstem teploty granulované směsi. Zatímco pro směs s účinnou látkou od výrobce č. 1 bylo přidáno množství vlhčiva z hlediska průběhu granulace optimální, relativně menší specifický povrch



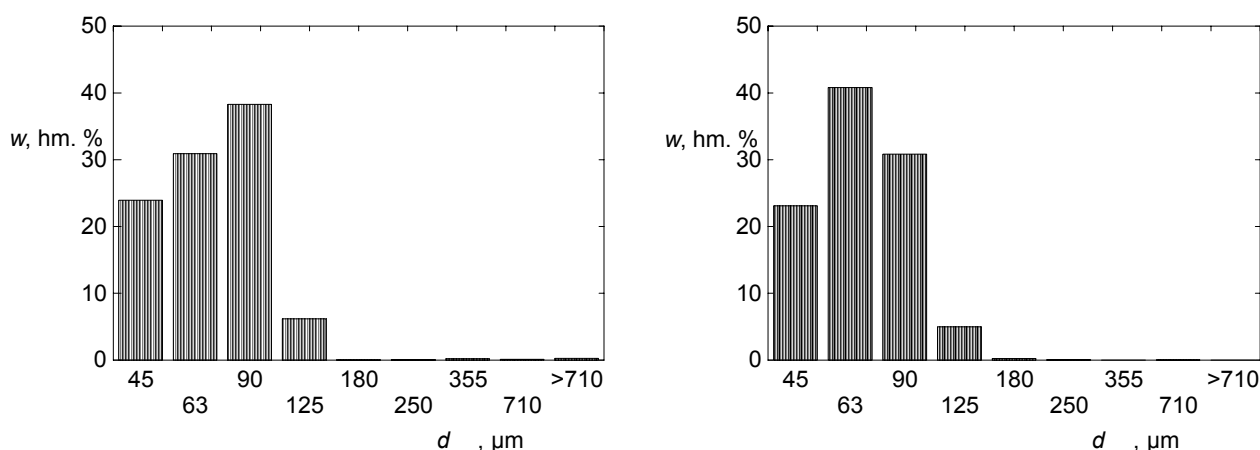
Obr. 9. Časový profil příkonu motoru hlavního míchadla při poloprovozní granulaci směsi s účinnou látkou od různých výrobců; P – příkon motoru, t – čas, — výrobce č. 1, — výrobce č. 2



Obr. 10. Časový profil teploty vsádky při poloprovozní granulaci směsi s účinnou látkou od různých výrobců; T – teplota, t – čas, — výrobce č. 1, — výrobce č. 2



Obr. 8. Distribuce velikostí částic účinné látky od různých výrobců; w – hmotnostní podíl částic, d – velikost ok síta, vlevo – výrobce č. 1, vpravo – výrobce č. 2



Obr. 11. Porovnání distribuce velikosti částic účinné látky odebrané z různých míst skladových obalů; vlevo – horní vrstva soudku, vpravo – dno soudku

účinné látky od výrobce č. 2 vedl k přebytku vlhčiva, a tím i ke vzniku nekvalitního, příliš vlhkého granulátu.

Velikost částic v různých místech skladovacích obalů

Za účelem posouzení vlivu místa odběru účinné látky ze skladovacích obalů na distribuci velikosti částic byly odebrány vzorky účinných látek z horního okraje, středu a dna 50 kg skladovacích soudků^{11,13}. Účinné látky měly mírně hrudkovitý charakter a již pouhým vizuálním posouzením obsahovala většina vzorků ze dna obalů méně hrudek a více jemných částic. Na obr. 11 je uveden příklad výsledků síťových analýz vzorků odebraných z horní vrstvy a dna soudku. Ve vzorku ze dna soudku je vyšší podíl jemných částic než ve vzorku z jeho horního okraje. Příčinou rozdílné distribuce velikosti částic je pravděpodobně segregace částic podle jejich velikosti během dopravy a manipulace s obaly.

Různá distribuce velikosti částic účinné látky ve skladovacích obalech výrazně ovlivní průběh granulace podobně jako tvarová a rozměrová různorodost částic účinných látek od různých výrobců. Účinná látka ze dna obalu s vyšším podílem jemných částic bude mít větší specifický povrch částic a vyžadovat tak větší přídavek vlhčiva. Negativní vliv segregace částic v obalech je v provozních podmínkách eliminován použitím relativně velké vsádky, zahrnující obvykle obsah několika soudků účinné látky. Rozdílné chování a výsledné vlastnosti granulované směsi se však mohou projevit při odběru menšího množství účinné látky ze skladovacího obalu pro malé várky či pro laboratorní nebo poloprovozní experimenty.

8. Přenos dat z poloprovozního granulátoru do provozního měřítka

Optimální složení granulované směsi, množství přidávané kapaliny a optimální provozní parametry jsou v průmyslové praxi obvykle zjišťovány v poloprovozních

granulátorech^{14,15} geometricky velmi podobných provozním aparátům. Pro úspěšný přenos dat z poloprovozních do provozních podmínek by však měla být zachována nejen geometrická podobnost granulátorů, ale zajištěn také stejný stupeň zaplnění použitých granulátorů, stejná obvodová rychlost hlavního míchadla, stejné pořadí a trvání jednotlivých stupňů granulace.

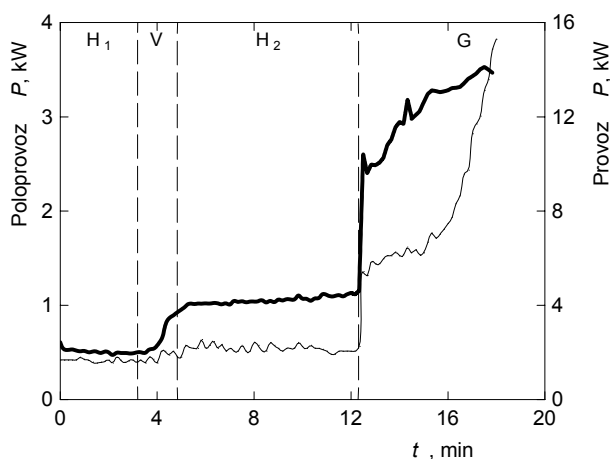
Příklad porovnání příkonových a teplotních profilů v provozním a poloprovozním granulátoru při granulaci identické suroviny je uveden na obr. 12 a 13. Časový profil příkonu motoru hlavního míchadla se pohybuje u každého granulátoru v jiné oblasti hodnot, vykazuje různou stabilitu a tvar jako důsledek odlišného způsobu měření příkonu motoru. Nárůst teploty vsádky je naopak velmi podobný v provozním i poloprovozním měřítku¹⁶. I když poměr povrchu a objemu granulátoru je u provozního zařízení menší než u poloprovozního granulátoru, vzhledem k téměř adiabatickému režimu granulátorů (viz. kap. 6) neovlivňuje tento poměr výrazně celkovou bilanci tepla.

9. Závěr

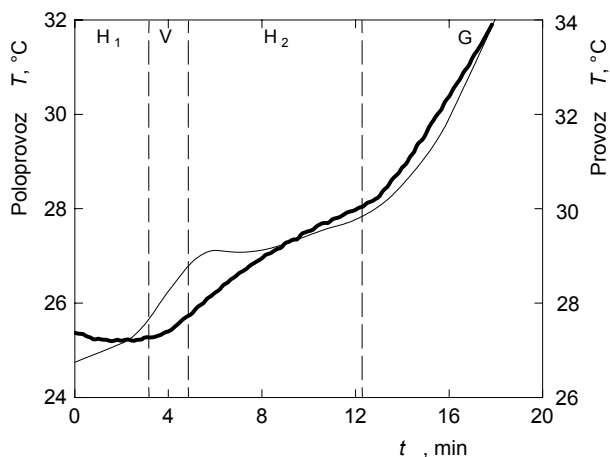
Měření příkonu motoru hlavního míchadla představuje nejspolehlivější provozní metodu sledování průběhu mokré promíchávané granulace a detekce dosažení optimálního složení granulované směsi. Sledovat lze i teplotu vsádky, která však není tak citlivá na aktuální stav granulované směsi jako příkon a je navíc závislá na celkové době promíchávání směsi. Na druhé straně příliš malý nebo naopak příliš velký nárůst teploty během granulace indikuje nedostatečné nebo naopak přebytečné zvlhčení granulované směsi.

Volba optimálního množství vlhčiva a následně i průběh mokré granulace léčiv jsou silně ovlivněny tvarem a velikostí částic účinných látek. Rozdíly v tvaru a velikosti částic lze očekávat nejen u stejných surovin od jednotlivých výrobců, ale i u stejných šarží účinných látek v různých místech skladovacích obalů.

Úspěšný přenos dat z poloprovozních do provozních



Obr. 12. Porovnání časových profilů příkonu motoru hlavního míchadla v provozním a poloprovozním granulátoru; P – příkon motoru, t – čas, — provoz, — poloprovoz



Obr. 13. Porovnání časových profilů teploty granulovaných směsí v provozním a poloprovozním granulátoru; T – teplota,

podmínek vyžaduje geometrickou podobnost granulátorů a také zajištění stejného stupně zaplnění použitých granulátorů, stejné obvodové rychlosti míchadel a shodného pořadí a délky trvání jednotlivých stupňů granulace.

LITERATURA

1. Chalabala M.: *Technologie léků*. Galén, Praha 2001.
2. Hapgood K. P., Lister J. D., Smith R.: *AICHE J.* 49, 350 (2003).
3. Litster J. D., Hapgood K. P., Michaels J. N., Sims A., Roberts M., Kameneni S. K., Hsu T.: *Powder Technol.* 114, 32 (2000).
4. Hapgood K. P., Litster J. D., Biggs S. R., Howes T.: *J. Colloid Interface Sci.* 253, 353 (2002).

5. Ramaker J.S.: *Dissertation*. Rijkuniversitet Groningen, Groningen 2001.
6. Dries K., Vegt O., Girard V., Vromans H.: *Powder Technol.* 133, 228 (2003).
7. Shaefer T.: *Acta Pharm. Suec.* 25, 205 (1998).
8. Faure A., York P., Rowe R. C.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 269 (2001).
9. Betz G., Burgin P. J., Leuenberger H.: *Int. J. Pharm.* 252, 11 (2003).
10. Holm P., Shaefer T., Kristensen H. G.: *Powder Technol.* 43, 213 (1985).
11. Bělohav Z., Břenková L., Durdil P., Hanika J., Lehocký M., Řápek P., Tomášek V.: *Chisa 2004, Prague, 22-26 Aug. 2004*, CD-ROM of Full Texts, F5.2.
12. Kibbe A.H.: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, London 2000.
13. Bělohav Z., Břenková L., Durdil P., Hanika J., Lehocký A., Řápek P., Tomášek V.: *Chem. Listy* 98, 587 (2004).
14. Litster J. D.: *Powder Technol.* 130, 35 (2003).
15. Levin M.: *Pharmaceutical Process Scale Up*. Decker, New York 2002.
16. Bělohav Z., Durdil P., Hanika J., Přečková O., Řápek P., Skálová V., Tomášek V.: *Chem. Listy* 97, 747 (2003).

Z. Bělohav^a, L. Břenková^a, P. Durdil^b, J. Hanika^c, R. Lehocký^b, P. Řápek^b, and V. Tomášek^b (^aInstitute of Chemical Technology, Prague, ^bZentiva-Léčiva Co., Prague, ^cInstitute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **High-Shear Wet Granulation Process in Drug Production**

The authors resume the most important knowledge on the mechanism, course and control of industrial wet granulation of pharmaceuticals in stirred granulators. Measurement of main impeller power input, conditions and consequences of heat transfer in granulation, sensitivity of the process to the shape and size of particles of active substance and transfer of data from a pilot-plant granulator to plant conditions are discussed more in detail. The most reliable method of monitoring the course of wet stirred granulation and for detection of the optimum state of granulated mixture is the measurement of main impeller power input. In addition to the input, also the batch temperature can be monitored which, however, depends more on the total time of stirring than on the actual state of the granulated mixture. The selection of an optimum amount of moisture and, subsequently, also the course of wet granulation are affected by the shape and size of particles of active substances. Their shape and size can differ with manufacturers and also depending on storage package. The successful data transfer from pilot-plant to plant conditions requires not only geometrical similarity but also the same process parameters.

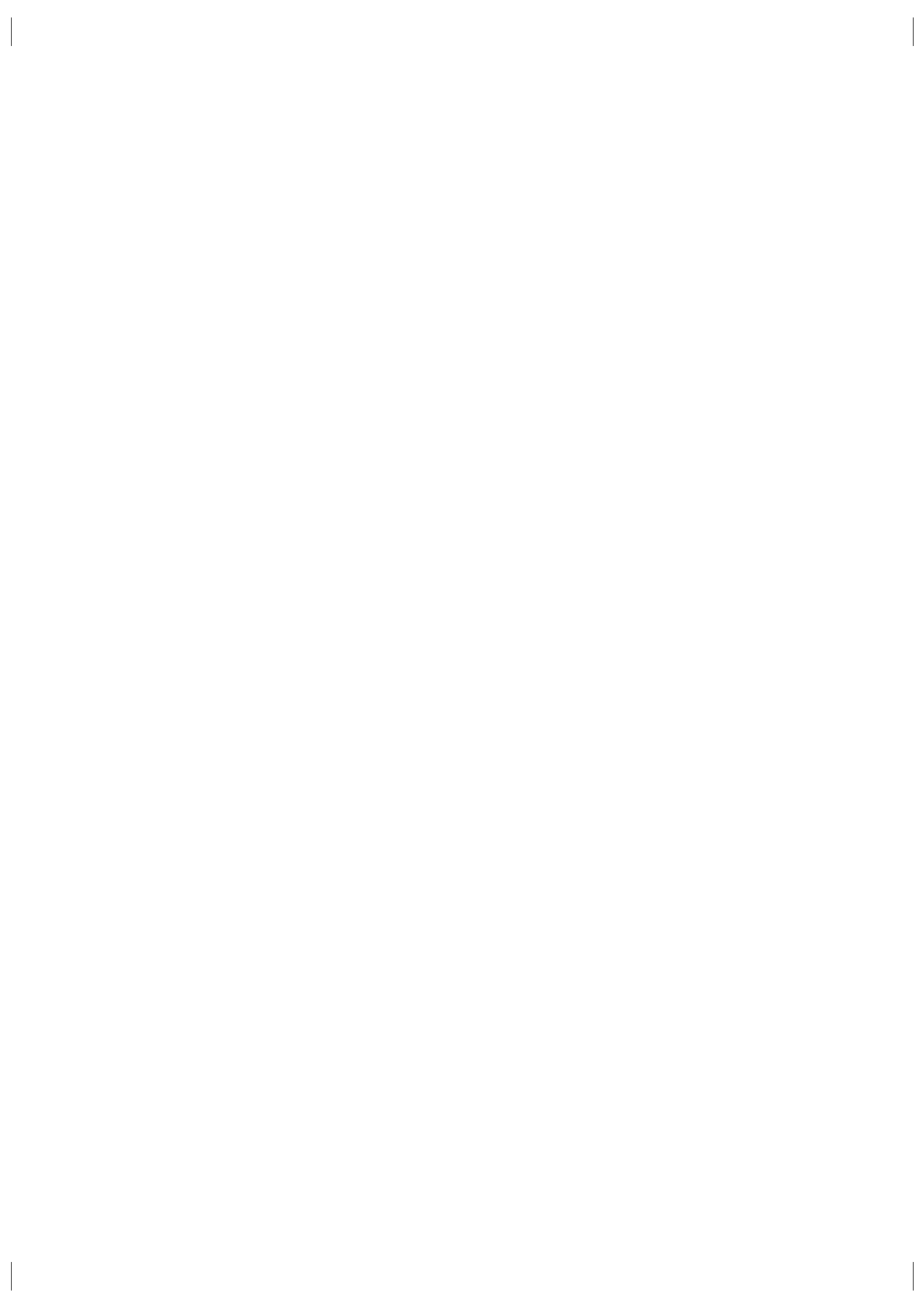
OBSAH

ÚVODNÍK	1072
REFERÁTY	
Jak se rodí lék, aneb vybrané aspekty výzkumu a vývoje	1073
S. Rádl	
Retrospektivní pohled na výzkum a jeho význam pro společnost Farmak za uplynulých deset let	1085
P. Hradil	
Moderní biotechnologie a farmaceutický průmysl	1087
L. Cvak a M. Fusek	
Mannichova a příbuzné reakce v totální syntéze alkaloidů	1096
J. Hájiček	
Současný vývoj v proteomice	1112
M. Collinsová a J. Jiráček	
Chemie mužské sexuality	1119
K. Valentová, P. Entnerová, J. Urbaníková a V. Šimánek	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Optimalizace přípravy vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu	1130
P. Váňa a J. Šmarda	
Enzymová imunoanalýza pro stanovení isoflavonoidů	1135
M. Vítková, Z. Macková, L. Fukal a O. Lapčík	
VÝUKA CHEMIE	
Zapojení Vysoké školy chemicko-technologické v Praze do výzkumu a výroby léčiv	1140
B. Kratochvíl a Z. Bělohav	
Výzkum a výuka Farmaceutické technologie v Brně	1143
M. Rabišková	
CHEMICKÝ PRŮMYSL	
Mokrý granulace při výrobě léčiv	1146
Z. Bělohav, L. Břenková, P. Durdil, J. Hanika, M. Lehotský, P. Řápek a V. Tomášek	

CONTENTS

EDITORIAL	1072
REVIEW ARTICLES	
The Origin of a Drug; Selected Aspects of the Research and Development of Synthetic Drugs	1073
S. Rádl	
Retrospective View of Research and Its Significance for the Farmak Co. in the Past Decade	1085
P. Hradil	
Modern Biotechnology and Pharmaceutical Industry	1087
L. Cvak and M. Fusek	
Mannich and Related Reactions in Total Synthesis of Alkaloids	1096
J. Hájiček	
Current Development in Proteomics	1112
M. Collinsová and J. Jiráček	
Chemistry of the Male Sexuality	1119
K. Valentová, P. Entnerová, J. Urbaníková, and V. Šimánek	
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Proteome Analysis in BM2 Leukemia Cell Line: Determination of Optimal Conditions for Sample Preparation for Two-Dimensional Electrophoresis	1130
P. Váňa and J. Šmarda	
Enzyme Immunoassay for the Determination of Isoflavones	1135
M. Vítková, Z. Macková, L. Fukal, and O. Lapčík	
EDUCATION IN CHEMISTRY	
Involvement of Institute of Chemical Technology Prague in the Research and Manufacturing of Pharmaceuticals	1140
B. Kratochvíl and Z. Bělohav	
Pharmaceutical Technology Research and Education in Brno	1143
M. Rabišková	
CHEMICAL INDUSTRY	
High-Shear Wet Granulation Process in Drug Production	1146
Z. Bělohav, L. Břenková, P. Durdil, J. Hanika, M. Lehotský, P. Řápek, and V. Tomášek	

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 98 (2004), čís./no. 12 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 128, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 114 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORI/ EDITORS: J. Berek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: M. Bláhová, I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámostný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: mblahova@csvts.cz, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2004 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 140 Kč, roční plné předplatné 2004 (12 čísel) 1440 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 720 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2004 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností.



ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ

vydává

CHEMICKÉ LISTY

CHLSAC 98, 1 – 370 (2004)

Vedoucí redaktor

Editor

B. KRATOCHVÍL

Redakční kruh

Editorial Board

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. HETFLEJŠ, P. HOLÝ, J. HORÁK, P. CHUCHVALEC,
J. PODEŠVA, P. RAUCH, J. VOLKE

Zahraniční a oblastní redaktori

Foreign and Regional Editors

F. ŠVEC (USA), V. VĚTVIČKA (USA), L. OPLETAL (HRADEC KRÁLOVÉ)

Redakční rada

Advisory Board

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUSZOVÁ, J. HANIKA, I. KADLECOVÁ, J. KAŠ, J. KOUBEK,
T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA, V. RŮŽIČKA, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka

Editorial Assistant

R. ŘÁPKOVÁ

Ročník 98 (2004)

Volume 98 (2004)

Listy chemické, ročník 128 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 114

Str. 1 – 370

ISSN 0009-2770



Úvodníky

Editorials

Vážení čtenáři (<i>D. J. Giachardi</i>)	1
Vysoká škola chemicko-technologická v Mostě-Velebudicích (<i>Z. Bělohav</i>)	67
Společné kořeny českých a rakouských chemiků (<i>U. Schubert</i>)	115
„Nejlepší dostupná technika“ – BAT – nový aktuální pojem chemického průmyslu (<i>J. Horák</i>)	159
Vážení čtenáři (<i>V. Šimánek</i>)	231
Budoucnost češtiny v chemii již není co bývala (<i>P. Chuchvalec</i>)	319
Nový úkol pro chemický průmysl - zpracování pšenice na technický ethanol (<i>J. Horák</i>)	371
Jak to nejlépe říci mládeži? (<i>R. Zahradník</i>)	823
REACH – nová strategie EU v oblasti chemických látek (<i>K. Bláha</i>)	875
Chytrý glukán (<i>V. Větvíčka</i>)	963
Chemie a farmacie (<i>V. Rejholec</i>)	1072
Vážení čtenáři (<i>B. Kratochvíl</i>)	1072

Referáty

Review Articles

<i>M. Šípek, K. Friess a V. Hynek</i> : Membránové dělení směsí plynů a par: praxe	4
<i>J. Blahoš, M. Havlíčková, A. Ziková, J. Trojanová, B. Hrušková, D. Franková a V. Hlaváčková</i> : Aktivace G-proteinů metabotropními glutamátovými receptory a GABA _B receptory	10
<i>J. Lukáš, T. Fenclová, J. Mokřý a J. Karbanová</i> : Chemie, fyzikální vlastnosti a biokompatibilita hydrogelů pro imunoprotekci savčích buněk	14
<i>V. Šindelář, R. Hobzová a P. Sysel</i> : Modifikované polyimidy	22
<i>R. Vicha a M. Potáček</i> : Kde roste adamantan	68
<i>L. Čuboňová a P. Šmigáň</i> : Unikátní lipidy a struktury membrán archaebaktérií	75
<i>J. Mikošková, L. Čáp a K. Lemr</i> : Postupy izolace polyaromatických uhlovodíků a polychlorovaných bifenylů při jejich stanovení	80
<i>B. Balla, J. Mocák, E. Varmusová, D. Kavková a I. Tudík</i> : Hodnotenie úspešnosti laboratórných metód	86
<i>M. Holík</i> : Optimalizace analytických postupů pomocí Plackettova-Burmannova plánu	92
<i>R. Zahradník</i> : Hans Hellmann: Životní příběh vědce ve 20. století	98
<i>M. Marková a B. Králová</i> : Pyridoxalfosfát – katalyzátor přeměn aminokyselin	102
<i>Z. Kupková a L. Beneš</i> : Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého	116
<i>M. Mihajlovič, L. Strnad a O. Šebek</i> : Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v goechemii	123
<i>L. Svobodová a M. Šnejdárková</i> : Poly(amidoaminové)dendriméry: syntéza, vlastnosti a možnosti	

samosporiadania	161
<i>R. Kizek, J. Vacek, L. Trnková, B. Klejduš a L. Havel:</i> Využití katalytických reakcí na rtuťové elektrodě pro elektrochemické stanovení metalothioneinů	166
<i>H. Paulová, P. Bochořáková a E. Táborská:</i> Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek <i>in vitro</i> ..	174
<i>D. Vojtěch, B. Bártová, J. Verner a J. Šerák:</i> Rychlé chlazení kovů – význam, technologie a využití	180
<i>J. Patočka a M. Stiborová:</i> Kyselina betulinová: perspektivní cytotstatikum	185
<i>F. Švec:</i> Monolitické stacionární fáze pro HPLC. Místo narození: Praha	232
<i>J. Slanina a E. Táborská:</i> Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka	239
<i>J. Kopečný, L. Kurc a L. Červený:</i> Využití metatéze při syntéze chemických specialit	246
<i>E. Zatloukalová:</i> Afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech a její použití	254
<i>M. Chlupáčová a V. Opletalová:</i> Chalkony jako potenciální inhibitory aldosareduktasy	320
<i>V. Štengl a J. Šubrt:</i> Výkonový ultrazvuk a jeho aplikace	324
<i>Z. Kolská:</i> Odhadové metody pro výparnou entalpii	328
<i>V. Škeříková, L. Grynová a P. JaM. Smetková, P. Ondra a K. Lemr:</i> HPLC-MS a CE-MS s ionizací za atmosférického tlaku v analýze morfinu a příbuzných látek	336
<i>V. Škeříková, L. Grynová a P. Jandera:</i> Využití coulometrického detektoru coularray pro analýzu přírodních antioxidantů	343
<i>J. Bárta a V. Čurn:</i> Bílkoviny hlíz bramboru (<i>Solanum Tuberosum</i> L.) – klasifikace, charakteristika, význam ..	373
<i>P. Stratil a V. Kubáň:</i> Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách	379
<i>J. Száková a P. Mader:</i> Základní metody rozkladu nadzemních částí vyšších rostlin pro stanovení obsahu vybraných esenciálních prvků (Ca, K, Mg, P, B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo a Zn)	388
<i>M. Kirchner a E. Matisová:</i> SúčasnÉ metody a nové trendy v izolácii reziduí pesticídov z beztukových potravín	396
<i>P. Hofta, P. Dostálek a G. Basařová:</i> Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol?	825
<i>R. Kalvoda:</i> Polarografie a medicína (očima internetového vyhledávače MEDLINE v údobí od roku 1997)	831
<i>P. Tarkowski, K. Doležal a M. Strnad:</i> Analytické metody studia cytokininů	834
<i>M. Hráčková, E. Šturdík, T. Maliar a J. Zemanovič:</i> Biochemické vlastnosti proteolytických enzymů	842
<i>M. Stiborová, J. Hudeček, J. Páca Jr., V. Martinek a J. Páca:</i> Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí	876
<i>M. Hubinová a G. Čík:</i> Reakcie prchavých organických zlúčenín v troposfére	891
<i>M. Vošahlíková, J. Pazlarová a K. Demnerová:</i> Přehled remediačních technologií methylterc.butyletheru (MTBE)	903
<i>I. Melenová a K. Demnerová:</i> Nové možnosti odstraňování polutantů ze životního prostředí a využití multifunkčního permeabilního bariérového systému – multibariéry	908
<i>M. Černá:</i> Opatření mezinárodních institucí a České republiky k omezování rizika znečištění životního prostředí rtuťí	916
<i>O. Šedý, A. Solladié-Cavallo, M. Sališová a A. Boháč:</i> Organické fosfázenové bázy a ich využitie v organickej chémii	964
<i>B. Mičková, P. Rauch a L. Fukal:</i> Možnosti imunochemického stanovení organochlorových a karbamátových pesticidů	970
<i>M. Bejblova a L. Červený:</i> Hydrogenační deoxygenace aromatických ketonů a aldehydů	981
<i>P. Vašek, J. Bížová a V. Janda:</i> Odstraňování halogenovaných uhlovodíků z vody elementárním železem	985
<i>S. Rádl:</i> Jak se rodí lék, aneb vybrané aspekty výzkumu a vývoje	1073
<i>P. Hradil:</i> Retrospektivní pohled na výzkum a jeho význam pro společnost Farmak za uplynulých deset let ..	1085

<i>L. Cvak a M. Fusek</i> : Moderní biotechnologie a farmaceutický průmysl	1087
<i>J. Hájiček</i> : Mannichova a příbuzné reakce v totální syntéze alkaloidů	1096
<i>M. Collinsová a J. Jiráček</i> : Současný vývoj v proteomice	1112
<i>K. Valentová, P. Entnerová, J. Urbaníková a V. Šimánek</i> : Chemie mužské sexuality	1119

Nomenklatura a terminologie

Nomenclature and Terminology

Doporučení IUPAC. Nomenclature of Inorganic Chemistry (<i>J. Kahovec</i>)	366
Doporučení IUPAC. Numbering of Fullerenes (<i>J. Kahovec</i>)	366
Slovník základních pojmů vztahujících se k polymerům (Doporučení IUPAC 1996) (<i>M. Beneš, J. Kahovec, B. Meissner, J. Roda a J. Vohlídal</i>)	406
Doporučení IUPAC. Name and Symbol of the Element with Atomic Number 111 (<i>J. Kahovec</i>)	417

Laboratorní přístroje a postupy

Laboratory Equipment and Methods

<i>J. Pavlů, J. Kudová, A. Zikánová, M. Kočířik, P. Uchytíl, O. Šolcová, J. Roček, V. Fila, B. Bernauer, V. Krystl, P. Hrabánek</i> : Keramické porézní elementy pro filtraci plynů a příbuzné aplikace	29
<i>R. Kostrhounová, A. Hrdlička a L. Sommer</i> : Stanovení fenolu a chlorfenolů ve směsích metodou HPLC po předchozím zkoncentrování na pevné hydrofóbní sorbenty	33
<i>I. Šmídová, J. Čopíková, A. Sikora a M. Maryška</i> : Krystalizace a skelný přechod kandytů vyrobených z isomaltu	142
<i>T. Majtán, L. Majtánová, D. Mlynářčík</i> : Účinos biskvartérnych amóniových solí na rast a metabolické procesy <i>Syomonela enterica</i> subspecies <i>Enterika</i> sérovar typhimurium DT104	148
<i>L. Hanyšová, P. Kastner a J. Klimeš</i> : Studium stability <i>p</i> -aminofenolu jako dominantního rozkladného produktu paracetamolu	152
<i>M. Dřevínek a F. Trojánek</i> : Voltametrický systém pro simultánní měření více vzorků	188
<i>V. Šolínová, I. Jelínek, F. Opekar a V. Kašíčka</i> : Stanovení vybraných kationtů v minerálních vodách a infúzním roztoku prokainu kapilární elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí	191
<i>J. Chýlková a R. Fadrná</i> : Postup izotachoforetického stanovení kyseliny thiodiglykolové v moči za odsolení a úpravy pH analyzovaného vzorku	260
<i>J. Lenčo a J. Stulík</i> : Identifikace proteinů kombinací peptidového mapování a fragmentace sulfonovaných peptidů	264
<i>J. Prousek a E. Palacková</i> : Oxidační degradace 1,4-dioxanu, morfolinu, cyklohexanonu a herbicidu bentazonu fentonovou a modifikovanou fentonovou reakcí	349
<i>A. Popovičová, G. Čík a M. Hubinová</i> : Meranie adsorpcie benzénu na vláknitých uhlíkatých sorbentoch	354
<i>M. Pohořelý, K. Svoboda a M. Hartman</i> : Komůrkový suvný dávkovač sypkých materiálů	361
<i>M. Dušek, F. Kvasnička a J. Moravcová</i> : Stanovení organických kyselin v silážích kapilární isotachoforézou a kapilární zónovou elektroforézou	418

<i>M. Hrušková, M. Bednářová a P. Šmejda: Předpověď reologických parametrů pšeničného těsta analýzou NIR spekter pšeničné mouky</i>	423
<i>D. Smělá, P. Pechová, T. Komprda, B. Klejdus a V. Kubáň: Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování</i>	432
<i>J. Hanusek a J. Svoboda: Metodika řešení systému následných reakcí prvního a pseudoprvního řádu z časového záznamu UV-VIS spekter</i>	851
<i>V. Tukač a J. Hanika: Vliv periodicky modulovaného nástřiku na zádrž kapaliny a tlakovou ztrátu zkrápěného reaktoru</i>	859
<i>P. Pipek, P. Fila, J. Jeleníková, J. Brychta, and J. Miyahara: Technological Aspects of Acid Decontamination of Carcasses</i>	865
<i>V. Pitschmann, E. Halámek a Z. Koblíha: Trubička pro stanovení oxidu siřičitého v ovzduší</i>	923
<i>I. Hagarová a M. Žemberyová: Stanovenie antimónu v pôdach metódou elektrotermickej atómovej absorpčnej spektrometrie</i>	926
<i>M. Halata, D. Milde a P. Svozilová: Stanovení uranu v pitné vodě metodou indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní spektrometrií</i>	930
<i>M. Blazsek, O. Ištvánfy a S. Roman: Použitie vysokoúčinnnej tenkovrstvovej chromatografie a stolného skenera na kvantitatívne stanovenie vedľajších metabolitov antibiotika salinomycínu</i>	989
<i>M. Foltin, J. Šuláková, M. Foltin a I. Sekaj: Porovnanie viacrozmerných kalibračných techník pri stanovení RNA-nukleotidov</i>	993
<i>P. Váňa a J. Šmarda: Optimalizace přípravy vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu</i>	1130
<i>M. Vítková, Z. Macková, L. Fukal a O. Lapčík: Enzymová imunoanalýza pro stanovení isoflavonoidů</i>	1135

Recenze

Book Reviews

A. Gossauer: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (<i>P. Drašar</i>)	157
K. C. Nicolaou, S. A. Snyder: Classics in Total Synthesis II, More Targets, Strategies, Methods (<i>P. Drašar</i>)	157
Takeshi Takeda, ed.: Modern Carbonyl Olefination (<i>D. Dvořák</i>)	268
I. Chorkendorff a J. W. Niemantsverdriet: Concepts of Modern Catalysis and Kinetics (<i>P. Zámostný</i>)	268
Chemistry and Mathematics: Two Scientific Languages of the 21st Century (<i>P. Chuchvalec</i>)	268
W. Hürz, H. Falk a G. W. Kirby, eds: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / progress in the Chemistry of Organic Natural Products (<i>P. Drašar</i>)	269
D.C. Harris: Quantitative Chemical Analysis (<i>J. Vacek a R. Kizek</i>)	871
I. Malijevská, A. Malijevský a J. Novák: Záhady, klíče, zajímavosti očima fyzikální chemie (<i>R. Zahradník</i>)	872

Výuka chemie

Education in Chemistry

Koloidní chemie v praktických úlohách (<i>A. Panáček, L. Kvítek a M. Klečková</i>)	39
Elektrochemická sbírka příkladů z fyzikální chemie (<i>S. Labík, M. Bureš, P. Chuchvalec, J. Kolafa, J. Novák a K. Řehák</i>)	197

Schopnosť študentov aplikovať vedomosti na reálne situácie (<i>J. Reguli</i>)	201
Dubletové testy A / N (<i>J. Pacák a H. Klímová</i>)	368
Stačí ke zlepšení vysokoškolské výuky jen více peněz? (<i>J. Pacák</i>)	870
Nová maturita z chemie – nový způsob hodnocení absolventů středních škol (<i>H. Čtrnáctová a M. Vasilešková</i>) ...	934
Mullikenovy hodnoty elektronegativit aplikované na některé organické sloučeniny (<i>J. Pacák a J. Podešva</i>)	998
Zapojení Vysoké školy chemicko-technologické v Praze do výzkumu a výroby léčiv (<i>B. Kratochvíl a Z. Bělohav</i>)	1140
Výzkum a výuka Farmaceutické technologie v Brně (<i>M. Rabišková</i>)	1143

Chemický průmysl

Chemical Industry

<i>J. Seidlerová, M. Nováčková a Z. Weiss</i> : Hodnocení popílku pomocí vyluhovacího testu „Toxicity characteristic leaching procedure“	108
<i>J. Poživil a J. Chudoba</i> : Možnosti rozšíření programu pro simulaci chemických procesů	131
<i>P. Horbaj</i> : Teoretický výpočet vzniku metánu z komunálního odpadu	137
<i>I. Palmová a J. Schöngut</i> : Perspektivy výroby a využití vodíku	205
<i>J. Horák</i> : Novinky z chemického průmyslu	367
<i>J. Horák</i> : Zprávy z chemického průmyslu	873
<i>Z. Bělohav, L. Břenková, P. Durdil, J. Hanika, M. Lehotský, P. Řápek a V. Tomášek</i> : Mokrý granulace při výrobě léčiv	1146

Sigma – Aldrich - IV. mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Devět skal – Žďárské vrchy, 9. – 12. 6. 2004)	271
56. Sjezd chemických společností (Ostrava, 6.9. – 9.9. 2004)	463
ICSS&T 2004 CONGRESS – Supramolecules (Praha, 5.9. – 9.9. 2004)	s1
COST D-31 Action (Praha, 4.– 6.11. 2004)	s121
Liblice 2004 (Nymburk, 26. – 28.11. 2004)	1001

Zprávy

News

Břežnový Norimberk ve znamení chemických veletrhů (<i>P. Chuchvalec</i>)	113
--	-----

Bulletin Asociace českých chemických společností

Do you know Knowel? Plná nůše elektronických tabulek a referenčních příruček pro přírodovědce a techniky (<i>J. Kadleček</i>)	45
Validace importovacího filtru fy ACD/Labs (<i>P. Drašar</i>)	46
O předvídání budoucnosti podniku (<i>B. Tesářík</i>)	47
Nahlédnutí do nové verze programů z kuchyně ACD/LABS (<i>P. Drašar</i>)	215
Studium chemie v evropském prostoru vysokoškolského vzdělávání: „Drážďanská doporučení“ (<i>P. Drašar</i>)	441
Speciální rozpouštědla pro aplikace LC/MS (<i>D. Procházková</i>)	945
VersaFlashÔ - jednoduchý systém pro izolaci přírodních látek a reakčních produktů (<i>D. Procházková</i>)	946
Doporučení redaktorům odborných a popularizačních časopisů přírodovědného zaměření, autorům vysokoškolských i středoškolských přírodovědných učebnic a tvůrcům odborných právních textů s touto tematikou (<i>J. Duchoň, J. Kahovec, A. Kotyk a K. Oliva</i>)	947
Ze života chemických společností	48, 216, 443, 950
Členská oznámení a služby	51, 444
Chemik na studiích, cestách	52
Z vědeckých, odborných a zahraničních společností	53, 217
Evropský koutek	54, 220, 446
Česká společnost průmyslové chemie	953
Zprávy	452
Osobní zprávy	54, 225, 453, 955
Střípky a klípky o světových chemících	57, 220, 447
Technické zajímavosti a služby	58
Zákony, které ovlivní život chemiků	56
Knihy, literatura, informace a web	221, 448
Zajímavosti ze světa vědy a techniky	57
Aprílový klub	59, 221, 450, 954
Odborná setkání	60, 223, 451, 949
Akce v ČR a v zahraničí	61, 222, 449, 953
Zprávy z redakce a dopisy redakci	62, 224
Poděkování	224
Bulletin představuje	955
Noví členové ČSCH	61, 457
Výročí a jubilea	62, 228, 459, 960

Autorský rejstřík 98 (2004)

Autor Index 98 (2004)

(úv) úvodník, (ref) přehledný referát, (nt) nomenklatura a terminologie, (l) laboratorní přístroje a postupy, (ch.p.) chemický průmysl, (rec) recenze, (d) diskuse, (os.zp.) osobní zprávy, (s) odborná setkání, (v.ch.) výuka chemie, (z) zprávy, (b) bulletin

- Balla B.: (ref) 86
Barek J.: (os.zp.) 959
Bárta J.: (ref) 373
Bártová B.: (ref) 180
Basařová G.: (ref) 825
Bednářová M.: (l) 423
Bejblová M.: (ref) 981
Bělohav Z.: (ch.p.) 1146, (úv) 67, (v.ch.) 1140
Beneš L.: (ref) 116
Beneš M.: (nt) 406
Bernauer B.: (l) 29
Bížová J.: (ref) 985
Bláha K.: (úv) 875
Blahoš J.: (ref) 10
Blazsek M.: (l) 989
Boháč A.: (ref) 964
Bochořáková H.: (ref) 174
Brychta J.: (l) 865
Břenková L.: (ch.p.) 1146
Bureš M.: (v.ch.) 197

Cizner J.: (os.zp.) 958
Collinsová M.: (ref) 1112
Cvak L.: (ref) 1087

Čáp L.: (ref) 80
Černá M.: (ref) 916
Červený L.: (os.zp.) 956, (ref) 246, 981
Čík G.: (l) 354, (ref) 891
Čopíková J.: (l) 142
Čtrnáctová H.: (v.ch.) 934, (z) 950
Čuboňová L.: (ref) 75
Čurn V.: (ref) 373

Demnerová K.: (ref) 903, 908
Dibuszová E.: (z) 365
Doležal K.: (ref) 834
Dostálek P.: (ref) 825
Drašar P.: (b) 46, 215, 441, (rec) 157, 269
Dřevínek M.: (l) 188
Duchoň J.: (b) 947
Durdil P.: (ch.p.) 1146
Dušek M.: (l) 418
Dvořák D.: (rec) 268

Entnerová P.: (ref) 1119

Fadrná R.: (l) 260
Fenclová T.: (ref) 14
Fíla P.: (l) 865
Fíla V.: (l) 29
Foltín Mar.: (l) 993
Foltín Mil.: (l) 993
Franková D.: (ref) 10
Friess K.: (ref) 4
Fukal L.: (l) 1135, (ref) 970
Fusek M.: (ref) 1087

Giachardi D. J.: (úv) 1
Grynová L.: (ref) 343

Hagarová I.: (l) 926
Hájíček J.: (ref) 1096
Halámek E.: (l) 923
Halata M.: (l) 930
Hanika J.: (ch.p.) 1146, (l) 859, (os.zp.) 957
Hanusek J.: (l) 851
Hanyšová L.: (l) 152
Hartman M.: (l) 361
Havel L.: (ref) 166
Havličková M.: (ref) 10
Hlaváčková V.: (ref) 10
Hobzová R.: (ref) 22
Hořta P.: (ref) 825
Holík M.: (ref) 92
Horák J.: (ch.p.) 873, (os.zp.) 955, (úv) 159, 371
Horbaj P.: (ch.p.) 137
Hrabánek P.: (l) 29
Hradil P.: (ref) 1085
Hrčková M.: (ref) 842
Hrdlička A.: (l) 33
Hrušková B.: (ref) 10
Hrušková M.: (l) 423
Hubinová M.: (l) 354, (ref) 891
Hudeček J.: (ref) 876
Hynek V.: (ref) 4

Chlupáčová M.: (ref) 320
Chudoba J.: (ch.p.) 131
Chuchvalec P.: (rec) 268, (úv) 319, (v.ch.) 197, (z) 113
Chýlková J.: (l) 260

Ištvánfy O.: (l) 989

Janda V.: (ref) 985
Jandera P.: (ref) 343
Jeleníková J.: (l) 865
Jelínek I.: (l) 191
Jiráček J.: (ref) 1112

Kadleček J.: (b) 45
Kahovec J.: (b) 947, (nt) 366, 406, 417
Kalvoda R.: (ref) 831
Karbanová J.: (ref) 14
Kastner P.: (l) 152
Kašička V.: (l) 191
Kavková D.: (ref) 86
Kirchner M.: (ref) 396
Kizek R.: (rec) 871, 166
Klečková M.: (v.ch.) 39
Klejduš B.: (l) 432, (ref) 166
Klimeš J.: (l) 152
Klímová H.: (v.ch.) 368
Kobliha Z.: (l) 923
Kočířík M.: (l) 29
Kolafa J.: (v.ch.) 197
Kolská Z.: (ref) 328
Komprda T.: (l) 432
Kopečný J.: (ref) 246
Kostrounová R.: (l) 33
Kotyk A.: (b) 947
Králová B.: (ref) 102
Kratochvíl B.: (v.ch.) 1140, (úv) 1072
Krystl V.: (l) 29
Kubáň V.: (l) 432
Kubáň V.: (ref) 379
Kudová J.: (l) 29
Kupková Z.: (ref) 116
Kure L.: (ref) 246
Kvasnička F.: (l) 418
Kvítek L.: (v.ch.) 39

Labík S.: (v.ch.) 197
Lapčík O.: (l) 1135
Lehotský M.: (ch.p.) 1146
Lemr K.: (ref) 80, 336
Lenčo J.: (l) 264
Lukáš J.: (ref) 14

Macková Z.: (l) 1135
Mader P.: (ref) 388
Majtán T.: (l) 148
Majtánová L.: (l) 148

- Maliar T.: (ref) 842
Marková M.: (ref) 102
Martínek V.: (ref) 876
Maryška M.: (l) 142
Mašlaňová L.: (os.zp.) 959
Matisová E.: (ref) 396
Meissner B.: (nt) 406
Melenová I.: (ref) 908
Mičková B.: (ref) 970
Mihaljevič M.: (ref) 123
Mikošková J.: (ref) 80
Milde D.: (l) 930
Miyahara M.: (l) 865
Mlynářčik D.: (l) 148
Mocák J.: (ref) 86
Mokřý J.: (ref) 14
Moravcová J.: (l) 418
Mrázková E.: (z) 951
- Nováčková M.: (ch.p.) 108
Novák J.: (v.ch.) 197
- Oliva K.: (b) 947
Ondra P.: (ref) 336
Opekar F.: (l) 191
Opletalová V.: (ref) 320
- Páca J. Jr.: (ref) 876
Páca J.: (ref) 876
Pacák J.: (v.ch.) 368, 870, 998
Palacková E.: (l) 349
Palmová I.: (ch.p.) 205
Panáček A.: (v.ch.) 39
Pánek P.: (s) 949
Pašek J.: (os.zp.) 957
Patočka J.: (ref) 185
Paulová H.: (ref) 174
Pavlů J.: (l) 29
Pazlarová J.: (ref) 903
Pechová P.: (l) 432
Pipek P.: (l) 865
Pitschmann V.: (l) 923
Podešva J.: (v.ch.) 998
Pohořelý M.: (l) 361
Popovičová A.: (l) 354
Potáček M.: (ref) 68
Poživil J.: (ch.p.) 131
Procházková D.: (b) 945, 946
- Prousek J.: (l) 349
Rabišková M.: (v.ch.) 1143
Rádl S.: (ref) 1073
Rauch P.: (ref) 970
Reguli J.: (v.ch.) 201
Rejholec V.: (úv) 1072
Roček J.: (l) 29
Roda J.: (nt) 406
Roman S.: (l) 989
- Řápek P.: (ch.p.) 1146
Řehák K.: (v.ch.) 197
- Sališová M.: (ref) 964
Seidlerová J.: (ch.p.) 108
Sekaj I.: (l) 993
Schöngut J.: (ch.p.) 205
Schubert U.: (úv) 115
Sikora A.: (l) 142
Slanina J.: (ref) 239
Smělá D.: (l) 432
Smetková M.: (ref) 336
Solladié-Cavallo A.: (ref) 964
Sommer L.: (l) 33
Stiborová M.: (ref) 185, 876
Stratil P.: (ref) 379
Strnad L.: (ref) 123
Strnad M.: (ref) 834
Stulík J.: (l) 264
Svoboda J.: (l) 851
Svoboda K.: (l) 361
Svobodová L.: (ref) 161
Svozilová P.: (l) 930
Sysel P.: (ref) 22
Száková J.: (ref) 388
- Šebek O.: (ref) 123
Šedý O.: (ref) 964
Šerák J.: (ref) 180
Šimánek V.: (ref) 1119, (úv) 231
Šindelář V.: (ref) 22
Šípek M.: (ref) 4
Škeříková V.: (ref) 343
Šmarda J.: (l) 1130
Šmejda P.: (l) 423
Šmídová I.: (l) 142
Šmigáň P.: (ref) 75
- Šnejdárková M.: (ref) 161
Šolcová O.: (l) 29
Šolínová V.: (l) 191
Štengl V.: (ref) 324
Šturdík E.: (ref) 842
Šubrt J.: (ref) 324
Šuláková J.: (l) 993
Švec F.: (ref) 232
- Táborská E.: (ref) 174, 239
Tarkowski P.: (ref) 834
Tesařík B.: (b) 47, (os.zp.) 959
Tomášek V.: (ch.p.) 1146
Trnková L.: (ref) 166
Trojánec F.: (l) 188
Trojanová J.: (ref) 10
Tudík J.: (ref) 86
Tukač V.: (l) 859
- Uchytíl P.: (l) 29
Urbaníková J.: (ref) 1119
- Vacek J.: (rec) 871, (ref) 166
Valentová K.: (ref) 1119
Váňa P.: (l) 1130
Varmusová E.: (ref) 86
Vasileská M.: (v.ch.) 934
Vašek P.: (ref) 985
Verner J.: (ref) 180
Větvíčka V.: (úv) 963
Vícha R.: (ref) 68
Vítková M.: (l) 1135
Vohlídal J.: (nt) 406
Vojtěch D.: (ref) 180
Vošahlíková M.: (ref) 903
- Weiss Z.: (ch.p.) 108
- Zahradník R.: (rec) 872, (ref) 98, (úv) 823
Záměstný P.: (rec) 268
Zatloukalová E.: (ref) 254
Zemanovič J.: (ref) 842
Zikánová A.: (l) 29
Ziková A.: (ref) 10
- Žemberyová M.: (l) 926

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ

vydává

CHEMICKÉ LISTY

CHLSAC 98, 371 –1153 (2004)

Vedoucí redaktor

Editor

B. KRATOCHVÍL

Redakční kruh

Editorial Board

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. HETFLEJŠ, P. HOLÝ, J. HORÁK, P. CHUCHVALEC,
J. PODEŠVA, P. RAUCH, J. VOLKE

Zahraniční a oblastní redaktoři

Foreign and Regional Editors

F. ŠVEC (USA), V. VĚTVIČKA (USA), L. OPLETAL (HRADEC KRÁLOVÉ)

Redakční rada

Advisory Board

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUSZOVÁ, J. HANIKA, I. KADLECOVÁ, J. KAŠ, J. KOUBEK,
T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA, V. RŮŽIČKA, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka

Editorial Assistant

R. ŘÁPKOVÁ

Ročník 98 (2004)

Volume 98 (2004)

Listy chemické, ročník 128 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 114

Str. 371– 1153

ISSN 0009-2770

