

Moderne lægemiddelforskning

Fokus på terapeutisk effekt, sikkerhed og udviklingsegnethed

Af Kim Andersen, Medicinalkemisk Forskning, kia@lundbeck.com og Anders Buur, Kemisk og Farmaceutisk Forskning, abu@lundbeck.com, H. Lundbeck A/S

Det ultimative mål for et forskningsprojekt i den farmaceutiske industri er at opnå stoffer, der kan udvikles og markedsføres som succesfulde lægemidler. Dvs. produkter, som er til gavn for den patientgruppe, de er rettet imod, og som giver en god tilbagebetaling af den betydelige investering, det er at føre lægemidler frem til markedet.

Hertil kræves først og fremmest, at det aktuelle lægemiddelstof opfylder de farmakologiske kriterier, der er relateret til lægemidlets terapeutiske effekt, samt at det er sikkert for patienten at anvende. Endvidere skal stoffet besidde egenskaber, der gør det muligt at udvikle det til et farmaceutisk produkt.

Ensidig fokusering på terapeutisk effekt og sikkerhed kan lede frem til stoffer med uønskede egenskaber, hvilket gør dem vanskelige eller umulige at udvikle til brugbare lægemidler. Eksempelvis vil et stofs ringe evne til at kunne absorberes fra mave-tarmkanalen bevirke, at det enten ikke kan gives oralt i form af f.eks. tabletter, eller at det efter indgift aldrig når frem til virkningsstedet i kroppen. I sidstnævnte tilfælde vil stoffet aldrig få nogen klinisk relevans.

For at kunne udvikle et lægemiddel er det derfor nødvendigt at optimere stoffets struktur i forhold til terapeutisk effekt, sikkerhed og udviklingsegnethed (figur 1).

Begrebet udviklingsegnethed dækker over mange faktorer, hvoraf skal nævnes:

- i) Fysisk-kemiske egenskaber som f.eks. opløselighed og kemisk stabilitet, hvilket er af stor betydning for design og udvikling af farmaceutiske produkter (f.eks. tabletter).
- ii) Biologiske egenskaber, som f.eks. metabolisk stabilitet og farmakokinetik, har vital betydning for stoffers evne til at kunne transporteres i tilstrækkeligt omfang (mængde og hastighed) til målområdet i kroppen.

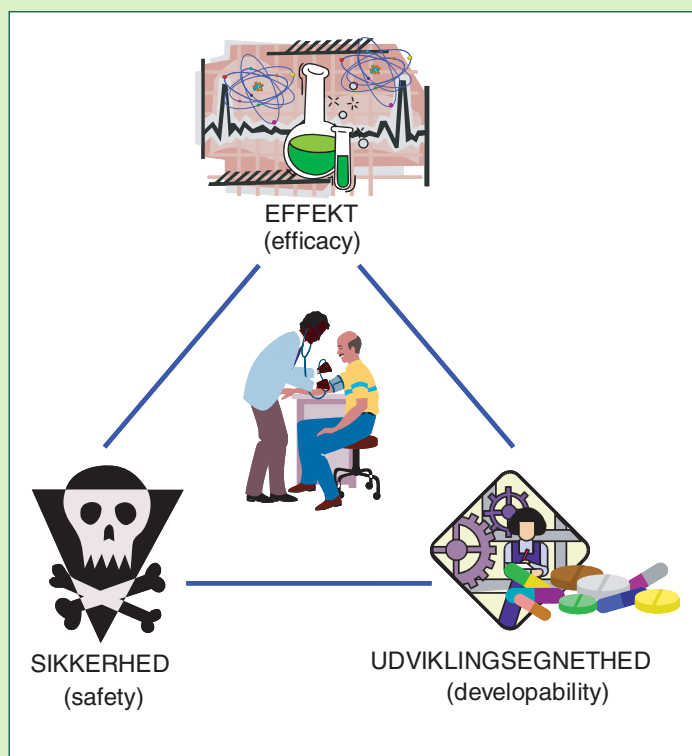
Behørig hensyntagen til betydningen af nederste højre hjørne i trekanten i figur 1 er væsentlig. Dette skyldes i høj grad indførelsen af nye metoder inden for farmakologisk og kemisk lægemiddelforskning. Disse har været medvirkende til, at et øget antal af de stoffer, der kommer igennem det farmakologiske nåleøje som potentielle nye lægemidler, besidder en ringe udviklingsegnethed i forhold til ovennævnte fysisk-kemiske og biologiske egenskaber.

Her beskrives det hvordan lægemiddelforskningen, som leder frem til potentielle lægemiddelkandidater, kan foregå, således at der fokuseres på terapeutisk effekt, sikkerhed og udviklingsegnethed gennem hele forløbet, samtidig med at forløbet gennemføres på den kortest mulige tid. Sidstnævnte er vigtigt, for at lægemidlet kan markedsføres rettidigt i forhold til konkurrerende produkter, og for at der kan etableres en god patentposition, der giver kommercielle rettigheder til produktet i en passende årrække.

De første faser i lægemiddelforskningen

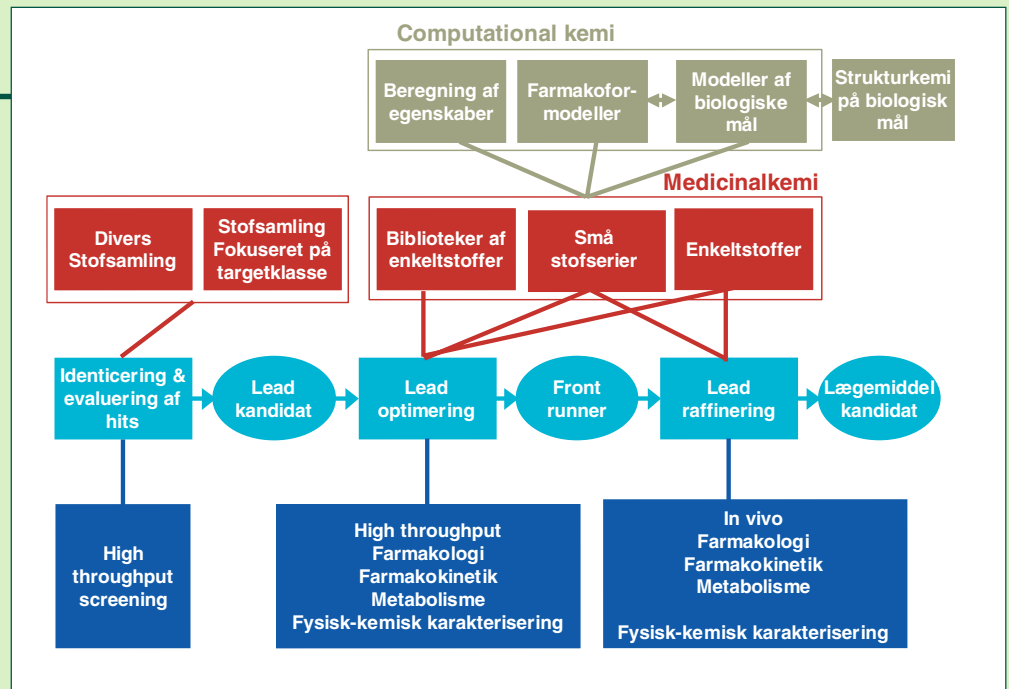
Den intensive molekylærbiologiske forskning, bl.a. med opklaring af det humane genom, har bevirket, at der er identificeret en lang række nye biologiske systemer, f.eks. i form af proteiner, der kan være relevante som mål (targets) for nye lægemidler. Fælles for disse mål er, at der ofte ikke findes anden viden end proteinets aminosyresekvens, og hermed hvilken biologisk klasse det tilhører. Evaluering af sådanne biologiske systemers terapeutiske relevans er en meget central og vanskelig proces, der er vigtig for udnyttelse af det enorme potentiale, der ligger i den moderne molekylærbiologiske forskning. Rettes lægemiddelforskningen mod et sådant mål, må hele den proces, som er skitseret i figur 2, gennemføres. Initialt identificeres og evalueres stoffer (hits) med passende aktivitet på målproteinet, hvorefter de såkaldte leadkandidater optimeres og raffineres frem til lægemiddeludviklingskandidat, som ultimativt sættes i udvikling.

Er der tale om et nyt biologisk mål, hvortil der ikke i forvejen kendes stoffer eller stofklasser med passende aktivitet, er udgangspunktet for et medicinalkemisk projekt ofte farmakologisk screening af en større stofsamling i et såkaldt »high-throughput« format. Det inkluderer udvikling og automatisering af et biologisk målesystem (et assay), der kan måle stoffers aktivitet på det biologiske mål. For at opnå et



Figur 1. Et lægemiddelstof må besidde effekt, sikkerhed og udviklingsegnethed.

Figur 2. Fra biologisk målmolekyle til lægemiddelkandidat.



rimeligt antal hits screenes ofte stofsamlinger af en anseelig størrelse. De fleste medicinalfirmaer opererer med stofsamlinger på mellem nogle få hundredetusinde stoffer op til nogle få millioner stoffer. For at øge sandsynligheden for at finde stoffer, der har aktivitet på det biologiske mål, er stofsamlingerne ofte sammensat med så stor diversitet (forskellighed) som muligt.

Findes der relevant information om det biologiske mål, kan man ud fra strukturelle overvejelser designe og fremstille stoffer, som har en større sandsynlighed for at udgøre hits. Hertil bruges kombinatoriske biblioteker af stoffer, der indeholder relevante farmakoforelementer fra stoffer med aktivitet på beslægtede biologiske mål, eller direkte analoger af stoffer med aktivitet på beslægtede biologiske mål.

Det er ikke nødvendigt at køre hele processen (skitseret i figur 2) igennem i alle medicinalkemiske projekter. Et projekt kan med fordel tage udgangspunkt i kendskab til stoffer med aktivitet på det pågældende biologiske mål. Her kan f.eks. være tale om endogene ligander, om stoffer kendt fra tidligere projekter eller om stoffer, hvor viden er tilgængelig i form af f.eks. publicerede patenter og videnskabelig litteratur.

Designhypotese og leadoptimering

I et lead-optimeringsprojekt (figur 2) udvikles en designhypotese i tæt samarbejde mellem kemikere specialiseret i computational- og medicinalkemi. Her spiller forskellige computerbaserede metoder en vigtig rolle. På basis af strukturer af aktive stoffer samt en forståelse af sammenhængen mellem kemisk struktur og aktivitet (SAR) kan der genereres såkaldte farmakofor-modeller. En farmakofor-model beskriver en hypotese om den rumlige placering af strukturelementer i de aktive molekyler i den konformation, hvormed de vekselvirker med det biologiske målmolekyle. Såfremt strukturen af det biologiske målmolekyle eller dermed beslægtede mål er kendt - med eller uden ligand bundet - kan disse modeller raffineres ved at indpasse molekylstrukturer i modellen for målmolekylet. Der findes desuden programmer, der kan generere farmakoforhypoteser på basis af bindingskaviteter i biologiske målmolekyler. De udviklede modeller kan bruges som inspirationskilde til medicinalkemikere ved design af

næste serie af stoffer og til evaluering og raffinering af designede serier.

På basis af den opnåede forståelse af forholdet mellem kemisk struktur og aktivitet designer medicinalkemikerne serier - biblioteker - af stoffer med sammenhørende synteseveje. Disse forslag evalueres og raffineres i de opstillede computerbaserede modeller og evalueres for deres udviklingsegnethed på basis af beregnede fysisk-kemiske egenskaber. Når medicinalkemikere har udviklet en designhypotese og et synteseprogram, skal kemien udvikles til at kunne fremstille de ønskede stoffer. Stofferne fremstilles og evalueres i det opstillede testprogram. På basis af de opnåede resultater, designes, syntetiseres og evalueres nye stoffer. Denne cykliske proces kører i en periode, hvorefter der forhåbentligt opnås en lægemiddelkandidat.

Parallel syntese og automatisering

Efterhånden som et medicinalkemisk projekt skrider frem, ændres det testprogram, som anvendes i projektet og samtidig tilpasses stofmængde og -kvalitet samt antallet af stoffer, der fremstilles (figur 2). I leadoptimeringsfasen sammensættes testprogrammet, så man kan teste mange stoffer inden for et kort tidsrum, hovedsageligt *in vitro*, og man kan derfor anvende meget små mængder stof.

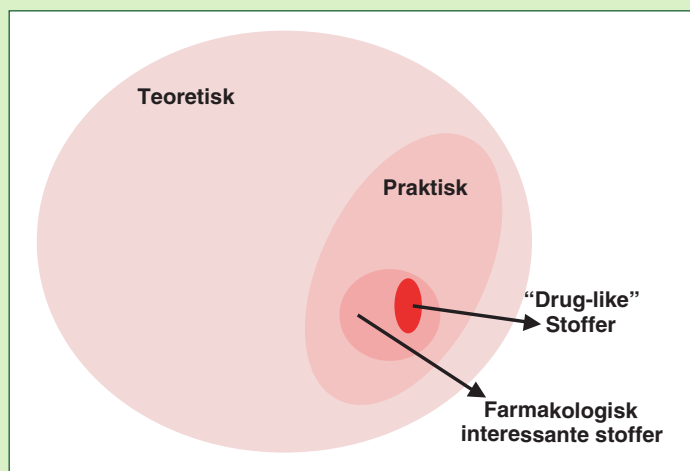
På tilsvarende måde er synteseprogrammet fokuseret på fremstilling af mange stoffer i små mængder (typisk 2-20 mg). Det giver mulighed for at eksplorere mange forskellige strukturelle muligheder på et tidspunkt, hvor der endnu er et minimalt kendskab til forholdet mellem struktur og aktivitet. I ↵

Teknisk oversættelse - kemi og kemiteknik
 Forskrifter - Datablade - Vejledninger - Afhandlinger
 Engelsk - Fransk - Italiensk - Norsk
Tetralix
 Postboks 323 • 2830 Virum
 Tlf.: 4583 5438 • Fax: 4583 5448 • e-mail: ecwpg@mail.tele.dk

denne fase syntetiseres biblioteker bestående af 100-1000 stoffer samt mindre serier på 20-100 stoffer. Der anvendes en blanding af syntese på fast fase og parallelsyntese i opløsning under anvendelse af fastfase supporterede reagenser. Der anvendes en høj grad af automatisering til gennemførelse af syntese i serier af reaktorblokke, der kan anvendes til både syntese i opløsning og på fast fase. Reaktionerne oparbejdes også vha. automatiserede metoder, f.eks. ionbytchromatografi og væske-væske ekstraktioner. I denne fase kan der accepteres en lavere renhed >70-90%, men alle stoffer analyseres vha. HPLC/MS, og de kan om nødvendigt oprenses ved såkaldt præparativ HPLC/MS, hvor fraktionsopsamlingen styres af et tilkoblet massespektrometer. Når der identificeres stoffer, der helt eller delvist opfylder de opstillede farmakologiske kriterier, starter den såkaldte lead-raffinering. I denne fase er det væsentligt at teste stoffer i levende dyr (*in vivo*) både for farmakologisk og farmakokinetisk evaluering. Det er derfor væsentligt hurtigt at resyntetisere nøglestoffer i større mængder og i høj renhed. Dette udføres med udstyr, hvor det hovedsageligt med manuelle og parallelle metoder er muligt at fremstille 100-500 mg mængder i små serier på 10-20 stoffer. Samtidigt er det væsentligt at have oprensningmetoder, der kan chromatografere små serier på 10-20 stoffer i den relevante skala. Først i den allersidste fase af projektet syntetiseres ganske få stoffer i gramskala.

Udviklingsegnethed

Efter en række optimeringscykler vælges der ét stof til den fortsatte udvikling samt optimalt et eller flere back-up-stoffer, i tilfælde af at noget uventet indtræffer i det efterfølgende udviklingsforløb. Udviklingsforløbet er kostbart - størrelsesordenen er vel omkring 2 mia. kr. Design, syntese og udvælgelse af det rette stof til udvikling er helt afgørende, idet der ikke på et senere tidspunkt kan ændres ved stoffets basale egenskaber. Det er derfor vitalt, at der i udvælgelsesprocessen anvendes gode (screenings)metoder, som sigter på at afdække stoffernes terapeutiske effekt, sikkerhed og udviklingsegnethed.

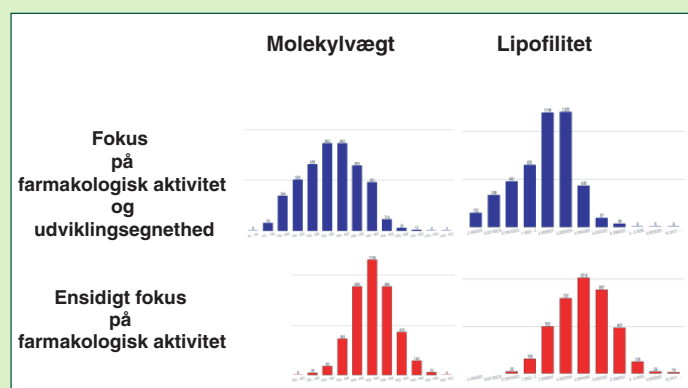


Figur 3. Grafisk repræsentation af forskellige kemiske rum. Teoretisk rum = alle tænkelige stoffer; praktisk rum = alle syntetiserbare stoffer.

Historisk har vurdering af stoffers udviklingsegnethed ikke været så meget i fokus i lægemiddelforskningen. Det kan skyldes, at forskerne i perioden før indførelse af farmakologisk high-throughput screening og kombinatorisk kemi overvejende har hentet inspiration fra eksisterende lægemidler samt fra patentlitteraturen og den videnskabelige litteratur inden for medicinalkemi. Man har derfor uundgåeligt beskæftiget sig

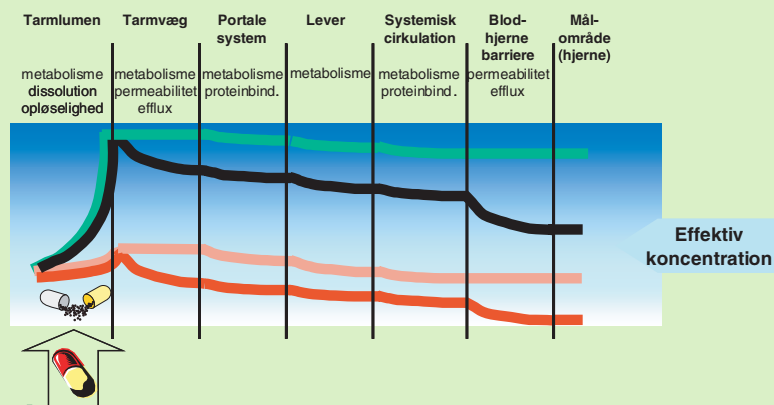
med en subpopulation af stoffer, som i højere grad end et teoretisk gennemsnitsstof besidder »drug-like« egenskaber. Dvs. stoffernes oprindelse har i sig selv været med til at garantere en vis og oftest tilstrækkelig udviklingsegnethed. Dette er søgt illustreret i figur 3, hvor »det teoretiske rum« symboliserer alle tænkelige stofstrukturer, mens »det praktiske rum« symboliserer stoffer, som i praksis kan fremstilles. I undergrupper er vist stoffer, som ud fra en farmakologisk synsvinkel er interessante (dvs. påvirker et biologisk mål) og stoffer, som tillige besidder god udviklingsegnethed (er »drug-like«).

Med indførelse af farmakologiske høj-hastigheds screeningsmetoder er diversiteten af stoffer i aktiv lægemiddelforskning øget markant. Fokuserer man kun på at udvælge stoffer med gode bindingsegenskaber til det biologiske målmolekyle, kan man komme til at bevæge sig væk fra det »drug-like«. Dette er eksemplificeret i figur 4, hvor der er vist typiske eksempler på fordelinger af stoffers molekylvægte og lipofilitet, når der i optimerings- og udvælgelsesforløbet i) alene fokuseres på farmakologisk aktivitet og ii) fokuseres på både farmakologisk aktivitet og udviklingsegnethed.



Figur 4. Fordeling af stoffers molekylvægt og lipofilitet hvis der kun fokuseres på farmakologisk aktivitet, og hvis der både fokuseres på farmakologisk aktivitet og udviklingsegnethed.

Det fremgår, at ensidig fokusering på farmakologisk aktivitet resulterer i øget molekylvægt og lipofilitet. Det betyder, at flere og flere stoffer, der identificeres som farmakologisk interessante, besidder en særdeles ringe vandopløselighed og dermed en ringe udviklingsegnethed, idet de kun vanskeligt transporteres frem til målområdet i organismen i intakt form. Dette er illustreret i figur 5, hvor stofkoncentrationen i et givet punkt er relateret til farveintensiteten.



Figur 5. Eksempler på stoffers vej fra farmaceutisk produkt til målområdet i organismen.

Den grønne kurve viser et stof, som besidder god udviklings-egnethed i form af god vandopløselighed, god permeabilitet gennem biomembraner og god metabolisk stabilitet. Stoffets koncentration i væskefasen af tarmlumen stiger, indtil den indgivne dosis i form af f.eks. en kapsel er fuldstændig opløst. Da stoffet besidder gode egenskaber til at penetrere biomembraner (tilstrækkelig lipofilitet), går der ikke stof »tabt«, idet alt absorberes over tarmslimhinden, hvorefter det via det portale system transporteres til leveren. Det hypotetiske stof er metabolisk stabilt, det nedbrydes næsten ikke i leveren, og føres intakt til det systemiske kredsløb (blodbanen). Såfremt målområdet er centralnervesystemet, vil stoffet skulle passere endnu en biologisk barriere i form af blod-hjerne-barrieren. Når denne sidste barriere er overvundet, vil stoffet kunne udøve sin farmakologiske effekt på f.eks. receptorsystemet i hjernen. Det er indlysende, at det qua sine gode udviklings-egenskaber vil have god mulighed for at kunne udvikles til et lægemiddel.

Den lyserøde kurve viser forholdene for et stof, som besidder lav vandopløselighed og god permeabilitet. Her er typisk tale om stoffer med høj lipofilitet. Dosis kan – med mindre der er tale om et meget potent stof – ikke opløses i det tilgængelige væskevolumen i mave-tarmkanalen. Konsekvensen er, at der på trods af stoffets gode permeabilitetsegenskaber kun absorberes en ringe del af dosis. Muligheden for at kunne bruge stoffet som lægemiddel er derfor væsentligt forringet i forhold til et stof med større vandopløselighed.

De øvrige kurveforløb er eksempler på et stof med ringe vandopløselighed samt ringe permeabilitet (den røde kurve) og et stof med høj vandopløselighed og relativt ringe permeabilitet. For sidstnævnte stof kan forholdene være yderligere forværret, idet den ringe permeabilitet kan være så alvorlig, at (næsten) intet trænger igennem (dette er ikke illustreret i eksemplet).

Det skal understreges, at metabolisk labilitet i lige så høj grad kan være begrænsende for et stofs anvendelighed, idet koncentration af det aktive stof kan reduceres meget væsentligt, f.eks. under passage af leveren (first-pass metabolisme).

Evaluerings af udviklings-egnethed

Der bør på et meget tidligt tidspunkt indgå vurdering af de parametre, der har betydning for stoffernes udviklings-egnethed. I fasen med high-throughput screening defineres og indlægges derfor forskellige »filtre« for beregnede fysisk-kemiske egenskaber samt kemisk og biologisk reaktive funktionelle grupper. Endvidere medvirker erfarne medicinalkemikere ved

»frafiltring« af stoffer og stofgrupper, som erfaringsmæssigt volder problemer. En slags »modus operandi« ved vurdering af udviklings-egnethed tidligt i lægemiddelforskningen kunne være som beskrevet herunder.

Den første vurdering bør foretages på baggrund af stoffernes molekylstruktur, som giver oplysning om molekylvægt samt evne til hydrogenbinding (acceptor- og donatorer). Derudover kan man med rimelig stor sikkerhed udregne lipofilitet og protolytiske egenskaber (pKa) alene ud fra en strukturformel. Vanskeligere forholder det sig med en sammensat parameter som vandopløselighed. Det er dog ofte muligt (med en nøjagtighed på ca. en faktor 10 fra den korrekte værdi) at beregne et kvalificeret bud.

Ud fra de første beregninger vurderes stoffets eller stofgruppens egnethed som lægemiddel. Pionerarbejde af Christoffer Lipinski fra medicinalfirmaet Pfizer har sandsynliggjort, at er mere end et af følgende kriterier er opfyldt, så skal der »rejses et rødt flag« i forhold til et stofs udviklings-egnethed:

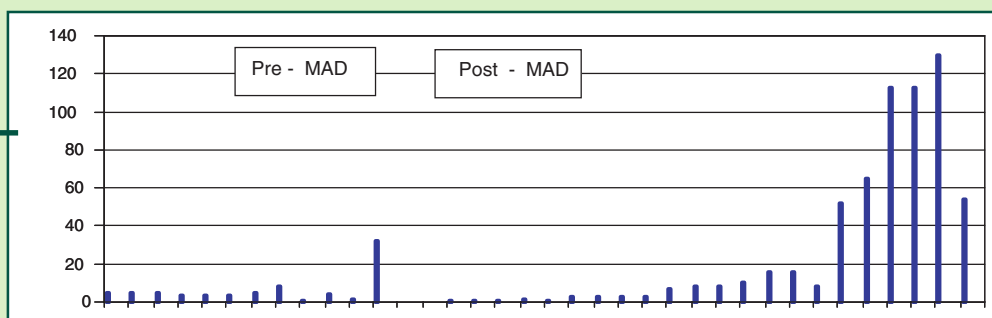
- Molekylvægt større end 500
- log P (lipofilitet) større end 5
- Antal hydrogenbindingsdonorer større end 5
- Antal hydrogenbindingsacceptorer større end 10

Der er skærpede krav til stoffer, der skal anvendes i centralnervesystemet. Hertil skal lægges, at det på baggrund af strukturformlen ofte vil være muligt at give et kvalificeret bud på kemisk og metabolisk stabilitet af et stof eller en stofgruppe.

Denne non-eksperimentelle førstehåndsvurdering er vigtig og giver medicinalkemikere værdifuld information om muligheden for at kunne optimere et givet stofs eller en given stofgruppes egenskaber.

Når der foreligger stof i tilstrækkelig mængde og renhed, kan eksperimentel bestemmelse af ovennævnte fysisk-kemiske parametre starte. Først i high-throughput opsætning, hvor der bestemmes approksimative værdier, og senere mere korrekte bestemmelser. Det har været og er stadig en stor udfordring for de analytisk kemiske discipliner at udvikle velegnede metoder, idet dette kræver en eksperimentel opsætning, der modsvarer high-throughput formatet. Her handler det om brug af meget små stofmængder ofte af ringe renhed - i et højt tempo. Det er helt nødvendigt, at dette bidrag kan leveres meget tidligt i forløbet, såfremt fysisk-kemiske parametre skal kunne påvirke design af stoffer og stofgrupper til det fortsatte forsknings- og udviklingsforløb i positiv retning. ↗

Figur 6. Maximum Absorbable Dose beregnet for kemiske strukturer, hhv. før og efter introduktion af parameteren i lægemiddelstofoptimeringen.



MAD-parameteren og udviklingsegnethed

De simple fysisk-kemiske parametre vandopløselighed, lipofilitet, protolytiske egenskaber og eventuelt permeabilitets- evnen over biomembraner i form af beregnede, estimerede og/ eller eksperimentelt bestemte værdier giver anledning til en første vurdering af de enkelte stoffers udviklingsegnethed. På Lundbeck har vi valgt at gøre dette ved udregning af den såkaldte MAD-parameter (Maximum Absorbable Dose), som blev introduceret af Johnson og Swindell i 1996 (Pharm. Res. 13(1996)1795). MAD beregnes som:

$$MAD = S \times P_{app} \times V \times T$$

hvor S angiver stoffets vandopløselighed, P_{app} permeabiliteten over biomembraner, mens V og T er henholdsvis det tilgængelige væskevolumen og transittiden i mave-tarmkanalen.

MAD-parameteren giver et oversimplificeret billede af den reelle situation *in vivo*, men den kan bidrage væsentligt til en øget forståelse af vigtigheden af de simple fysisk-kemiske parametre for lægemiddelabsorption, samt pege på hvilke parametre der er af særlig betydning. Væskevolumenet og transittiden i mave-tarmkanalen vil naturligvis kunne variere fra person til person og fra dag til dag, men denne variation vil sjældent overstige en faktor 3-6, hvorfor variation i disse parametre næppe har stor indflydelse på beregningen af MAD for et stof eller en stofgruppe. Hvad angår stoffers evne til at passere biomembraner, vil det dynamiske område mellem »gode« og »dårlige« stoffer typisk være af størrelsen en faktor 50-100. Vandopløseligheden kan derimod variere enormt -

langt over 6 størrelsesordner - og er derfor en overordentlig vigtig parameter for optimering i lægemiddelforskning og -udvikling.

MAD-parameteren er en simpel parameter, som indeholder information om såvel vandopløselighed og biomembranpassage, og den tjener derfor som en god indikator for stoffers udviklingsegnethed.

Vi har beregnet eksempler på MAD-parameteren for stoffer i aktiv lægemiddelforskning hos Lundbeck før og efter indførelse af begrebet. Som det fremgår af figur 6, har indførelse af MAD-begrebet været medvirkende til at øge opmærksomheden på optimering af strukturer med henblik på at forbedre stoffer- nes udviklingsegnethed. De senest fremstillede stoffer og stofgrupper besidder i gennemsnit langt større MAD-værdier end tidligere - uden at det har påvirket stoffer- nes evne til at påvirke de definerede biologiske mål.

Flere stoffer og bedre evaluering - hurtigere

I den moderne lægemiddelforskning designer medicinalkemikere i tæt samarbejde med kemikere, specialiseret i computational kemi, serier og biblioteker af stoffer, der fremstilles ved anvendelse af manuelle og automatiserede metoder i optimal mængde og renhed. Samtidig bruges og udvikles metoder, der gør det muligt at evaluere stoffers terapeutiske potentiale og sikkerhed tidligere og tidligere i lægemiddelforskningsforløbet. Det samme gælder for evaluering af stoffers udviklingsegnethed. Dermed er vi er nået et langt stykke hen imod opfyldelse af biofarmaciens fader Tekaru Higuchi's ord:

»Drugs need to be designed with delivery in mind«.

Nyt om grøn kemi

Kemikere taler om grøn kemi, men hvad mener vi egentlig med det? Paul T. Anastas & John C. Warner har forsøgt at opstille 12 principper:

Forebyggelse.

Det er bedre at undgå affald end at behandle eller fjerne det.

Atomøkonomi.

Synteser skal planlægges og gennemføres med støkiometriske mængder.

Minimal risiko.

Synteser skal, så vidt det er muligt, gennemføres med ugiftige stoffer.

Fremstil sikrere stoffer.

Benyttelse af hjælpestoffer - opløsningsmidler, adskillelses- hjælpemidler - skal undgås, når det er muligt.

Energibesparelse.

Når det er muligt, skal stoffer fremstilles ved normale omstændigheder, tryk og temperatur.

Genbrug.

Alle udgangsstoffer skal genbruges, så vidt det er muligt.

Undgå derivater.

Unødvendig anvendelse af derivater og beskyttende grupper.

Katalyse.

Katalytisk virkende reagenser er at foretrække frem for stoffer, der anvendes i støkiometriske mængder.

Degradering.

Stoffer, der efter deres brug nedbrydes af sig selv, er at foretrække.

Forureningsanalyse.

For alle anvendte stoffer skal der udvikles metoder til stoffer- nes bestemmelse.

Risikoanalyse.

Alle anvendte stoffer skal, før de tages i brug, undersøges for risiko ved udslip, eksplosion eller brand.

Bos

2001: Twelve Principles Of Green Chemistry. *Chemical & Engineering News*. 16. juli: 29.