

NEUROHYPOFYZÁRNÍ PEPTIDY V LÉKAŘSTVÍ Z PRAŽSKÝCH A ŠVÉDSKÝCH LABORATOŘÍ. ČÁST I: HISTORIE VÝZKUMU A POČÁTKY PRODUKCE LÉKOVÝCH FOREM

VLADIMÍR PLISKA^a, ANTONÍN PAŘÍZEK^b
a MARTIN FLEGEL^{c†*}

^a Department of Biology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH), Wolfgang-Pauli-Strasse 27, CH-8093 Zürich, ^b Gynekologicko-porodnická klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze, Perinatologické centrum, Apolinářská 18, 128 51 Praha 2, ^c Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
vladimir.pliska@biol.ethz.ch; parizek@porodnice.cz

Došlo 21.9.21, přijato 23.10.21.

Klíčová slova: neurohypofyzární hormony, oxytocin, vasopresin, deamino-D-arginin vasopresin, DDAVP, Glypresin, Terlipresin, Carbetocin, Ferring company, peptidová léčiva

• <https://doi.org/10.54779/chl20220020>

Úvod

V padesátých až sedmdesátých létech minulého století byly hormonální peptidy z neurohypofýzy, vasopresin a oxytocin, jedním z nejvýznamnějších výzkumných programů Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd (dále také ÚOCHB) a předmětem zájmů velmi podstatné části vědecké, klinické a farmaceutické obce v tehdejším Československu. Nově vyvinuté chemické, biofyzikální a farmakologické postupy umožnily v té době četným laboratorům v řadě dalších zemí zabývat se otázkou závislosti jejich biologických aktivit na struktuře jejich molekul. Pražský příspěvek k tomuto výzkumu je významně spojen s ÚOCHB a především se jmény Františka Šorma a Josefa Rudingera¹.

Historická poznámka: Neurohypofýza, oxytocin a vasopresin: první polovina 20. století

Klinický zájem o neurohypofyzární peptidy je pozoruhodně starého data, pozornost kliniků upoutaly již počátkem 20. století. Až do padesátých let byly ovšem, stejně jako jiné hormonální přípravky, k dispozici pouze ve formě extraktů z biologického materiálu, převážně z vepřových a dobytčích hypofýz získávaných z jatečních zvířat.

Uterotonické účinky hypofyzárních extraktů popsaly ve farmakologické studii poprvé v roce 1909 H. H. Dale². Jejich použití v porodnictví následovalo brzy po publikaci jeho sdělení v *Biochemical Journal*, zpočátku pro léčbu porodního krvácení v případech hypotonie/atonie myometria dělohy nebo po císařském řezu^{3,4}, později k posílení retrakce dělohy pro porod placenty⁵. Jako léčivé formy, zpravidla parenterálně aplikované, přicházely v úvahu mírně kyselé vodní extrakty hovězí neurohypofýzy, produkováné farmaceutickými firmami pod různými firemními názvy – Pitocin, Pituitrin (Parke Davis & Co), Pituglandel (Hoffmann-La Roche), Infundibulin. Jejich standardizaci definovala Farmakopéa Spojených států (USP): připouštěla 16 % celkového znečištění a preparáty měly obsahovat 10 mezinárodních jednotek oxytocinu^a a malé procento konzervačních látek (0,5 % chlorbutanolu).

Rovněž v nefrologii a angiologii nalezly pituitární extrakty od druhého desetiletí 20. století občasně použití. Souvislost neurohypofýzy s žíznivkou (*diabetes insipidus*) byla známa z klinických zkušeností⁶; o léčbě s ní spojené polyurie hypofyzárními extrakty referovali poprvé v roce 1913^b F. Farini⁷ a R. von den Velden⁸. Pozdější aplikace těchto extraktů pro hemostázu v gastroenterologii při variceálním krvácení, v protišokové terapii a při lokální anestezii cituje v přehledu K. Saameli⁹.

Preparáty připravované extrakcí zvířecích neurohypofýz obsahovaly ovšem kromě peptidových hormonů i řadu dalších komponent – potenciálních alergenů či pyrogenních látek – a je s podivem, že při parenterálním podávání jsou nežádoucí účinky v literatuře zmiňovány jen zřídka (viz např.⁸). Přesto se tyto formy peptidů jako úspěšná léčiva udržely až do poloviny padesátých let^c.

* † 15.7.2021. Nekrolog dr. Flegela viz Drašar P.: *Chem. Listy* 115, 575 (2021).

^a Mezinárodní jednotka (IU) oxytocinu je nově definována jako uterotonická aktivita 1,68 µg mezinárodního standardu NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control); viz <https://www.nibsc.org/documents/ifu/76-575.pdf>. V přepočtu: 1 mg (nového) mezinárodního standardu (ca. 10⁻⁶ mol oxytocinu) = 595 IU. Starý standard (lyofilizované hovězí neurohypofýzy) uváděl 500 IU.

^b U klinických případů popsanych v tehdejších sděleních šlo velmi pravděpodobně o neurogenní (centrální) formu žíznivky (*d.i. centralis*). U její renální formy (*d.i. renalis*), nezávislé na plasmatické koncentraci vasopresinu, jde zpravidla o mutaci genu vasopresinového receptoru V2R či jeho signální dráhy.

Oxytocin, vasopressin a jejich analoga: výzkum na ÚOCHB

Zásadní zlom v dostupnosti čistých preparátů peptidových léčiv nastal po publikaci první syntézy oxytocinu^{10,11} a vasopressinu¹² v laboratoři Vincenta du Vigneauda na Cornellově Univerzitě v New Yorku. Téměř současně navrhli alternativní postupy syntézy oxytocinu chemici basilejské firmy Sandoz AG¹³ a pražská laboratoř Josefa Rudingera¹⁴ na ÚOCHB ČSAV; diagramy stávajících syntéz shrnul koncem 60. let Boissonas s Guttmanem¹⁵. Koncem 50. let byly tedy k dispozici jen „spolehlivé“ metody peptidové syntézy „v roztoku“^d. Zdokonaleny a přizpůsobeny k daným účelům byly též farmakologické testy a fyziologické experimentální postupy. Tím byla dokončena první etapa jejich výzkumu, jejímž cílem bylo především objasnit závislost mezi strukturou peptidového řetězce a spektrem biologických aktivit hormonů, a to i z fylogenetického hlediska (v 60. letech bylo již známo, že v jednotlivých živočišných třídách se vyskytují analogy hormonů původně identifikovaných u savců). Výsledkem byly strukturálně modifikované neurohypofyzární hormony s pozoruhodnými farmakologickými charakteristikami a další možnost změn a kombinace aminokyselin v jednotlivých polohách peptidu. V průběhu první poloviny 60. let vyvstala přirozeně otázka, které z těchto látek mohou být klinicky použitelné; řada takto získaných analogů tuto možnost naznačovala.

Klinické užití nového léčiva je ovšem vždy spojeno s otázkou jeho syntézy ve velkém měřítku (upscaling); upscaling je kritickým limitem produkce jejich lékových forem. Postup laboratorních syntéz používaný v 50. a 60. letech byl pro výrobní techniku náročný a nadto neekonomický: na základě údajů ve starší literatuře^{10,14} jsou výtežky produktů syntézy oxytocinu v jednotlivých stupních 30–85 %; ztráty vztažené na výchozí produkty mohou být při devítistupňové syntéze až 92–99,8 %. Dnes používaná syntéza kratších peptidů v pevné fázi na různých nosičích v kombinaci s jejich čištěním vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) výrobu ovšem zrychlila a zjednodušila.

Nicméně, syntetický oxytocin byl již ke konci 50. let distribuován několika evropskými firmami. Šlo o produkt vyráběný v rozšířeném laboratorním měřítku, často patrně získávaný ve spolupráci firem s výzkumnými laboratořemi: Oxytocin-Spofa (Praha), Syntocinon Sandoz (Basel) – později Syntocinon Novartis, Oxytocin Ferring (Malmö, Kiel) – později Oxytocin Ferring-Léčiva (Praha), na počátku 60. let i firmou Sanabo GmbH Wien^e.

Ještě méně příznivá byla tato situace pro výrobu analogů oxytocinu, a to i přes to, že některé z nich byly pokládány za velmi nadějně pro klinické užití. Jejich reálnou šanci bylo ovšem těžké posoudit. Farmakologické testy na izolovaných tkáních i na zvířatech *in vivo* jsou zpravidla závislé na extrinzických (iontové složení okolního média ve farmakologickém textu, pH, atd.) a intrinzických faktorech testovacího systému (hormonální stav příslušné tkáň, atd.) a jejich účinek v klinické praxi nelze spolehlivě odhadnout. Rozhodující jsou proto pouze klinické testy. Uvedení nové léčivé látky a její lékové formy je velmi dlouhý a komplikovaný proces. Uspěť mohou jen společnosti pracující v systému „správné výrobní praxe“ (SVP).

Před koncem 20. století byly farmaceutické firmy pracující v systému SVP v Československu ojedinelé. Tím lze také vysvětlit, že se zde vyrábělo v gramovém množství pouze jediné nové peptidové uterotonikum, Methylxytocin Spofa, ačkoliv pražské laboratoře, zvláště na Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV, patřily v designu a syntéze peptidů ke světové špičce. Přitom šlo o analog, který v gynekologické a porodnické praxi nedosáhl velkého rozšíření. Farmakologické studie už tehdy dokládaly, že chránění hydroxyly methylovou skupinou na aromatickém jádru tyrosinu v poloze 2 vede ke snížení uterotonické aktivity při zachování jistého stupně afinity k oxytocinovému receptoru, tedy k posunu od agonismu k antagonismu^{16,17}. Obecně jsou starší údaje o aktivitách 2-*O*-methyltyrosin-oxytocinu spíše nejasné; přesnější data v oblasti agonisticky působícího peptidu uvádějí 0,05–0,1 % aktivity oxytocinu, nulovou (pouze antagonistickou) aktivitu vasopressorickou u krysy a 1,8 % u kohouta. Publikovaná data o klinických vlastnostech (Spofa) nejsou v tomto směru příliš přesvědčivá¹⁸. Z klinického hlediska zajíma-

^c Podobná situace přicházela v první polovině 20. století u většiny, ne-li u všech, hormonálních preparátů izolovaných běžnými biochemickými technikami ze živočišných tkání. Riziko, že dojde k nebezpečným následkům, bylo značné a spojeno s nebezpečím, že vývoj účinného léku bude na léta pozdržen. Snad nejdramatičtější situace vyvstala v případě inzulínu: jako prvním (14letému) pacientovi s infaustní prognózou diabetu (typy I, II nebyly tehdy ještě identifikovány) byl v kritické situaci v prosinci 1921 na jedné z klinik Toronto General Hospital intravenózně aplikován ještě nedokonale vyčištěný extrakt pankreatu připravený F. Bantigem a C. Bestem. Ošetřující lékař, Dr. W. Campbell, ho označil jako „a thick brown muck“. Nicméně, a naštěstí, hypoglykemický účinek byl neslýchaný a nepředpokládaný, žádná vážnější nežádoucí reakce nenastala, a proto další výzkum inzulínu nebyl blokován (viz Michael Bliss: „The Discovery of Insulin“, The University of Chicago Press, 1982, str. 112).

^d Pozoruhodné je, že oxytocin, vyráběný podle postupu z ÚOCHB v n.p. Léčiva – SPOFA, obsahující stopy diethyletheru po extrakci zbytků chránících skupin, se užíval v porodnictví ještě v 70. letech minulého století.

^e Peptidlaboratorium der Firma Sanabo Wien XII. Údaje o produkci v této firmě chybí. Ve firmě byl činný spolupracovník profesora Hanse Tuppyho, Hans Nesvadba, původně Organisch-chemischen Institut der Universität Wien. Firmu převzala podle ústního sdělení jednomu z autorů tohoto textu firma Sandoz AG (V. P., sdělení B. Berde, Sandoz AG, Basel, 1968).

vý, i když fyziologicky ne zcela podložený, je prokázán pokles laktacidozy u dlouhotrvajících porodů. U porodů, u nichž se děložní kontrakce zesilovaly oxytocinem, pokles laktacidozy pozorován nebyl: autoři z Ústavu pro matku a dítě v Praze-Podolí¹⁹ uvádějí hladinu laktátů při náhradě oxytocinu methyloxytocinem zhruba 20násobně nižší. Přesto se tento lék v zahraničí nerozšířil a měl význam spíše lokální.

Podstatně zajímavější pro klinickou praxi byla analoga vasopressinu (především 8-lysin-vasopressinu) syntetizovaných v laboratořích ÚOCHB. Šlo jednak o analoga hormonogenného typu^{20,21} s prodlouženým účinkem, z nichž [(Gly)₃-Cys¹,Lys⁸]vasopressin byl později vyráběn ve Švédsku jako Glypressin Ferring® (Terlipressin INN) a v Německé spolkové republice jako Haemopressin firmami Curatis Pharma GmbH a Meduna Arzneimittel GmbH. Jako velmi slibný se jevil analog vasopressinu s výrazným posunem ve farmakologickém spektru směrem k antidiuretické aktivitě 1-deamino-8-D-argininvasopressin (Desmopressin INN, dDAVP)^{22–24}. V prvním případě šlo o peptidy s použitím v případech, kde hrozil kardiovaskulární kolaps: traumatický šok či krvácení z ezofageálních varixů. Literatura přináší řadu zpráv o jejich terapeutickém použití, v konkurenci s dalšími kardiovaskulárními léky nebyly však na prvním místě. Pokud jde o dDAVP, byl hned po prvních klinických zkouškách rozpoznán jako potenciální peptid pro substituční terapii *diabetes insipidus* (viz^b). V menším množství, kolem 30 g za rok, byl dDAVP nejprve vyráběn v ÚOCHB, později po vybudování nových peptidových laboratoří v roce 1976 ve státním podniku Léčiva-SPOFA. Tehdejší ředitel ÚOCHB a předseda akademie věd František Šorm se snažil o jeho rychlé zavedení do výroby a tím i jeho rozšíření v klinické praxi. V Československu však nebyl příliš úspěšný, především v důsledku strnulé hospodářské a legislativní politiky.

Počátky spolupráce ÚOCHB s firmou Ferring Läkemedel AB Malmö

K prvnímu kontaktu ÚOCHB se zástupci firmy Ferring Läkemedel AB Malmö došlo na podzim roku 1967 na sympóziu „Pharmacology of Hormonal Polypeptides“

v Milánu prostřednictvím dánského neurofyziologa Nielse A. Thorny, profesora fyziologie na kodaňské univerzitě^f. Sympóziu bylo zaměřeno na hormonální polypeptidy a proteiny^g, z ÚOCHB se ho na pozvání účastnili s přednáškami Josef Rudinger, Karel Jošt a Vladimír Pliška. (Jejich souhrnné sdělení bylo publikováno v *Advances of Experimental Medicine and Biology*²⁵). Niels Thorn seznámil V. P. s tehdejšími vedoucími lékařské sekce firmy Ferring AB, Janem Mulderem, který rovněž patřil mezi účastníky sympózia. Účelem seznámení ovšem nebyla budoucí spolupráce firmy s ÚOCHB (a tím méně pozdější produkce dDAVP jako léčiva), nýbrž již dříve plánovaný společný projekt Thorny a V. P., týkající se tehdy ještě neobjasněného transportu neurohypofyzárních hormonů z nervových zakončení v neurohypofýze do periferní cirkulace^{26,27}. V laboratořích firmy Ferring syntetizovali krátce předtím Carlsson a Sjöholm^h oxytocin a 8-lysin-vasopressin specificky tritiovány na tyrosinu v poloze 2 (cit.^{28,29}). Oproti nespécificky tritiováným produktům se předpokládala podstatně omezená izotopová výměna s okolními molekulami vody; to se ostatně potvrdilo v dlouhodobé studii stability tritiování vasopressinu³⁰. Tritiování vasopressin mohl tedy být s výhodou použit v uvedeném projektu a Jan Mulder dal nejen najevo svůj souhlas, ale zaručil i svoji plnou podporu. Část kodaňského projektu se tím přesunula do Ferringovských laboratoří v Limhamn u Malmö, na druhém břehu Öresundu, kde bylo tehdy hlavní sídlo firmy. Vedle již jmenovaného Jana Muldera se na projektu podíleli především vedoucí chemických laboratoří Lars Aake Ingemar Carlsson a jeho asistent Jan-Åke Sköldböck, kteří syntetizovali a čistili oxytocin pro výrobu lékových forem, farmakolog Per Melin, zabývající se neurohypofyzárními hormony (jeho jméno je úzce spojeno s pozdějšími úspěšnými léky – Atosiban, Carbetocin), dále ekonomický ředitel Ferringa Sam Matarasso a především zakladatel firmy Ferring, její prezident a v té době ještě hlavní akcionář Frederick Paulsen a jeho manželka Eva Paulsen. V diskusích s V. P. byl také zmíněn nově syntetizovaný analog dDAVP z laboratoře Milana Zaorala na ÚOCHB a jeho pozoruhodné spektrum aktivit se silným posunem k aktivitě antidiuretické a s téměř úplnou absencí vazokonstrikční aktivity. Přes poměrně nízkou prevalenci centrální formy *diabetes insipidus* se dDAVP jevil jako naprosto preferenční prostředek

^f Niels Anker Thorn (1924–2014), Institute of Medical Physiology C, Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark.

^g International Symposium on the Pharmacology of Hormonal Polypeptides, held in Milan, Italy, September 14–16, 1967. (Publikace: Proceedings of an International Symposium on the Pharmacology of Hormonal Polypeptides, held in Milan, Italy, September 14–16, 1967. Editors: Nathan Back, Luciano Martini, Rodolfo Paoletti. Plenum Press, 1968).

^h Lars Aake Ingemar Carlsson byl vedoucí peptidový chemik ve firemních laboratořích firmy FERRING, Ingvar Gösta Holger Sjöholm, později profesor na Uppsalské univerzitě, pracoval v té době na Královském farmaceutickém institutu (Kungliga Farmaceutiska Institutet) ve Stockholmu. K syntéze použili v prvním stupni jimi syntetizovaný L-3 iodotyrosin-lysin-vasopressin, ve kterém v alkalickém prostředí substituovali jod plynným tritiem. Získali tak tritiování peptid s tehdy úctyhodnou specifickou radioaktivitou 2–3 Ci/mmol ($7,4 \cdot 10^{10}$ – $1,1 \cdot 10^{11}$ Bq/mmol) a vyhnuli se tehdy běžně používané přímé expozici závěrečného produktu – tedy oxytocinu či 8-lysin-vasopressinu – tritiem (Wilzbachova metoda), vedoucí k nespécifické výměně různých vodíkových atomů v molekulách obou peptidů tritiem.

pro substituční terapii; dosud používaný Pitressin různých výrobců vykazoval nepříjemné až nebezpečné vedlejší účinky spojené s vasokonstrikční aktivitou. Analog vzbudil pochopitelný zájem zvláště u Jana Muldera a u Frederika Paulsena. O tomto zájmu referoval V. P. po návratu řediteli ÚOCHB Františku Šormovi. Zdá se, že ten mezitím učinil další pokus prosadit výrobu dDAVP v Československu; po jeho nezdaru požádal Šorm o zprostředkování kontaktu s Ferringem. Jan Mulder přiletěl do Prahy k předběžnému jednání o podmínkách spolupráce, resp. pozdější licence, což bylo v této fázi počátkem roku 1969 během několika hodin dohodnuto. První dohoda byla písemně dokumentována a podepsána F. Šormem, J. Mulderem a V. P. a předložena právnímu oddělení Akademie ke schválení. Jeho platnost byla potvrzena ještě v průběhu odpoledne a Jan Mulder odletěl do Švédska s předběžnou písemnou dohodou, která přinesla firmě Ferring neočekávaný úspěch a zisk, chemikům obou stran prospěšné kontakty a také finanční výhody pro ÚOCHB.

Několik poznámek k firmě FERING v době počátku spolupráce s ÚOCHB

Na počátku 70. let, tedy v době počátku kontaktů mezi oběma institucemi, byla firma Ferring AB spíše menším farmaceutickým podnikem, od roku 1954 v Malmö-Limhamnuⁱ. Ještě v roce, kdy započala spolupráce s ÚOCHB, byl veškerý provoz firmy soustředěn ve vile blízko pobřeží Öresundu; k rozšíření o další nemovitosti v okolí a k rozsáhlé přístavbě došlo po tomto datu. V jejím čele stál již zmíněný zakladatel firmy Dr. med. Frederik Paulsen (1909–1997; původně Friedrich, narozen v Dagebüll, Nordfriesland, Schleswig-Holstein)³¹ (obr. 1). Byla to po všech stránkách vzácná a vysoce vzdělaná osobnost. Jeho zájmy zahrnovaly nejen jeho původní vědecký obor – endokrinní farmakologii; stejně intenzivně se zabýval historií a jazykem svého rodného kraje, Severofrižských ostrovů (od jména ostrova *Faroe a jeho obyvatel ferringů je odvozeno jméno společnost Ferring*), světovými dějinami, literaturou a lingvistikou. Současný politický vývoj a sociální otázky s ním spojené sledoval očima liberálně progresivního pozorovatele. Samozřejmě měl jako ředitel firmy odpovědnost za její ekonomický prospěch, avšak vědecká stránka byla jeho přednostním zájmem.

Z toho hlediska také pohlížel na spolupráci s českou stranou, i když se aktivně na jednáních s ÚOCHB nepodílel.

Prvním lékařským ředitelem výzkumu byl až do své tragické smrti (30. dubna 1976) Holanďan Dr. med. Jan Louis Mulder, který, jak již bylo zmíněno, navázal ze švédské strany spolupráci s ÚOCHB. Díky svým organizačním schopnostem a kontaktům na evropských klinikách dosáhl rychle povolení ke klinickým zkouškám. To, že dDAVP byl včas a široce dostupný v lékařské praxi byla především jeho zásluha. Jan Mulder podnikl rovněž koncem roku 1969 první kroky ke klinickým testům jednoho z prvních potentních oxytocinových antagonistů z laboratorii ÚOCHB, 1-*N*^{ac}-acetylcystein-2-*O*-methyltyrosin-oxytocinu^{32,33} ve Švédsku. Pozdější úspěšný rozvoj v aplikaci tokolyticky působících oxytocinových analogů (atosiban) nastal až po jeho smrti. Ve funkci ředitele jej vystřídal Hans Vilhardt (1940–2015) z Ústavu lékařské fyziologie na univerzitě v Kodani (pozdější profesor tamtéž)^k. Po něm následoval Jan Ivan Thorell (*1934), profesor klinické chemie na univerzitě v Lundu; odešel později do vedoucí funkce ve výzkumu Pharmacia Diagnostics AB (Uppsala). Poslední z této řady, dosazený ještě Frederikem Paulsenem sen., byl Iain C. A. F. Robinson (*1949) z National Institute for Medical Research, Mill Hill, London.

Vedoucí pozice ve firemním výzkumu zaujímaly dvě osobnosti, peptidový chemik Lars Aake Ingemar Carlsson a farmakolog Per Melin^l. První z nich byl zde již několikrát zmíněn jako významný syntetik, který se o svou publicitu mezi evropskými kolegy málo zajímal, publikoval spíše jako spoluautor; jeho doménou byly pečlivé náročné syntézy v laboratoři, nevyhýbající se ani operacím s radioizotopovým značením peptidů. Uvažoval je s ohledem na provozní produkci peptidových léčivých látek v širším smyslu. Tyto vlastnosti oceňovala řada mladých peptidových chemiků a v Malmö tak vznikla inovativní skupina peptidových syntetiků. Mezi jinými byl polský chemik Jerzy Trojnar (*1943), který později Carlssonovu funkci převzal (v letech 2003–2008 byl pak činný v Ferring Research Institute Ltd., San Diego, CA^m jako jeden z ředitelů).

Per Melin stál na počátku vývoje farmakologického testování a výzkumu ve firmě Ferring. Jeho publikační aktivita je rozsáhlá, byl vítaným partnerem v četných výzkumných a klinických projektech. Má velmi významný podíl na zavedení tokolytika atosibanu do klinické praxe

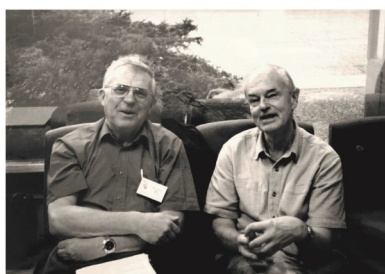
ⁱ Zmíněný dokument byl jen předběžnou verzí právnicky doložené pozdější licenční dohody a není dnes v archivech dostupný (či snad není na příslušných místech zájem zveřejnit průběh těchto jednání).

^j V roce 1956 byla otevřena pobočka FERRING GmbH v Kielu, vedená bratrem Frederika, Dr. Otto Paulsenem. Byla od počátku zaměřena na produkci léčiv a na jejich odbyt, zvláště na německém trhu.

^k Sdělení na okraj (V. P.): po návratu Hanse Vilhardta na kodaňskou univerzitu uvažoval F. Paulsen sen. o pozvání Tomislava Bartha (1938–2007) z ÚOCHB do této funkce. V té době (počátkem 80. let) existovaly ale oprávněné pochyby, že by kdokoliv z tehdejší ČSSR (a i z ostatních zemí pod sovětským vlivem) mohl takovou funkci převzít. Dokládá to nicméně tehdejší úzké vztahy mezi společností FERRING a ÚOCHB.

^l V současnosti nebylo autorům možné jejich životopisné údaje zjistit. Lars Carlsson zemřel – snad koncem 90. let – na následky diabetu, Per Melin odešel po roce 1999 do penze a přesídlil do Velké Británie.

^m Ústav zanikl v roce 2016.

Eva Paulsen, Alkersum (Föhr),
září 1991 (Foto V.P.)Frederik Paulsen (& V.P.)
Alkersum (Föhr), září 1991Hans Vilhardt (& V.P.)
Kopenhagen, září 1984Niels A. Thorn (& V.P.), severní
Zealand (Dánsko), květen 1968Per Melin (& V.P.), Edinburgh,
září 1999 (Foto Maurice Manning)Tom Barth (& V.P.), Edinburgh,
září 1999 (Foto Maurice Manning)

Obr. 1. Autorům dostupné fotografie osob spojených s projektem spolupráce ÚOCHB – Ferring Läkemedel AB, Malmö

a s jeho použitím jako inhibitoru oxytocinového receptoru ve farmakologických a fyziologických studiích^{34,35}

Výzkum neurohypofyzárních peptidů v Československu po roce 1968

Rok 1968 představoval v Československu mezník z mnoha historických hledisek. Byl kritický také z hlediska

výzkumu a vývoje peptidů v Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV. Vliv jeho zakladatele a ředitele Františka Šorma byl, pro jeho postoje a názory na okupaci Československa armádami zemí Varšavské smlouvy, potlačován a postupně slábl. Přes trvajících vědeckou kvalitu ústavu a jeho příslušníků byly podmínky výzkumu v důsledku politicky motivovaného omezení kontaktů se světovou vědeckou komunitou, nedostatku importovaných chemikálií a především snahami o byrokratické řízení výzkumu

velice ztíženy.

Laboratoř Josefa Rudingera (1924–1975) byla po jeho odchodu v roce 1968 do Švýcarska rozdělena na dvě části. Jednu z nich vedl Karel Bláha, jehož vědecká aktivita ve spolupráci s Ivo Fričem byla zaměřena spíše na problémy fyzikálně chemických a spektrálně chiroptických vlastností peptidů. Ve výzkumu neurohypofyzárních hormonů a hlavně pak analogů oxytocinu pak pokračoval zejména Karel Jošt a Karel Poduška, spolu s Vladimírem Gutem. Biochemické a biologické vlastnosti látek pak nadále studoval Tomislav Barth. Ve Výzkumném ústavu farmacie a biochemie v Praze (VÚFB) pak pokračoval ve výzkumu peptidů vedle Ivana Krejčího také žák Josefa Rudingera Evžen Kasafírek (tragicky zahynul v květnu 2001 (cit. ³⁶)ⁿ).

Druhou skupinu peptidů vedl Milan Zaoral. Především jeho zájmu byly zejména vasopressinová analoga, především již před rokem 1968 podrobně zkoumaný vliv modifikace struktury vasopressinu v poloze 8 (enantiomerní záměna L/D argininového postranního řetězce) v této pozici. Jak zmíněno výše, analogy 1-deamino-8-D-arginin-vasopressin (dDAVP, Desmopressin) a 1-triglycyl-8-lysin-vasopressin (Terlipressin) byly pak prodány v licenci firmě Ferring AB, která tak získala právo vyrábět tyto látky pro západoevropské státy a pro USA.

Produkce peptidových léčiv v Československu v 70. a 80. letech

V Československu byly tradičně peptidy vyráběny laboratorně v nepříliš velkých (gramových) množstvích v národním podniku (dále také n.p.) Léčiva v rámci skupiny SPOFA (zkratka pro Spojené farmaceutické závody). Vedení SPOFA a Léčiv sice spolupracovalo již od padesátých let s ÚOCHB, peptidy však představovaly z výrobního a ekonomického hlediska jen nepatrný objem a malý zisk. Tomu odpovídal i malý zájem českého farmaceutického průmyslu o tento druh kvalifikované chemie. Po prodeji licence firmě Ferring zájem o peptidovou výrobu v n.p. Léčiva poněkud vzrostl a v důsledku toho byly laboratoře peptidů v závodě Léčiv v pražských Komořanech postupně rozšířeny a rekonstruovány (nové oddělení peptidů v Léčivech bylo však otevřeno až v lednu 1976). Analogy neurohypofyzárních hormonů, které již v relativně velkém objemu licenčně vyráběl Ferring, byly v Léčivech v podstatně menším objemu vyráběny pro socialistické státy východní Evropy a Sovětského svazu. Zisk z výroby peptidů byl však v celkovém objemu výroby v n.p. Léčiva stále velmi malý.

V poloprovozním oddělení ÚOCHB byly některé peptidy, schválené jako léčivé látky, syntetizovány pro n.p. Léčiva. Je nutno zmínit, že v sedmdesátých letech nebyl ještě ani ve výrobních farmaceutických provozech zaveden systém SVP (viz výše). Přiměřeně, avšak z hlediska SVP stále nedostatečně vybavený poloprovoz ÚOCHB, mohl tak být ještě využit i pro výrobu léčivých přípravků.

Zejména čištění peptidů představovalo v n.p. Léčiva velký problém. První šarže léčivé látky desmopressinu byly proto vyráběny v poloprovozu ÚOCHB a čištěny přímo v laboratoři Milana Zaorala. 20–30 g desmopressinu bylo pak dodáváno pro výrobu lékové formy desmopressinu pod názvem Adiuretin SD (nosních kapek) v měcholupských Léčivech.

Analog oxytocinu 2-O-methyltyrosin-oxytocin (methyl-oxytocin) byl v oddělení peptidů ve skupině Karla Bláhy čištěn jen v malém množství (kolem 5 g) metodou protiproudého vytřepávání, zavedenou v roce 1944 L. C. Craigem³⁷. Surový methyloxycocin byl vyráběn přímo v Léčivech v Praze Komořanech postupem vyvinutým v ÚOCHB. ÚOCHB tak pomáhal při výrobě peptidů až téměř do poloviny osmdesátých let minulého století.

Pozdější vývoj

Vztahy mezi výzkumníky pražského okruhu a laboratořemi Ferring AB v Malmö byly od konce 60. do poloviny 70. let velmi produktivní a vedly k vývoji terapeuticky zajímavých analogů neurohypofyzárních peptidů. ÚOCHB se po uzavření zmíněné dohody stal pro švédskou firmu a pro její vedení součástí vědeckého zázemí, ke kterému se vedle již tradičních skandinávských univerzitních kontaktů (Uppsala, Lund), často vlivem pražských peptidových výzkumníků, připojovali vědci-peptidáři z dalších zemí. Ze švédské strany přišly naproti tomu impulsy, které v pozdějších šedesátých letech iniciovaly zahájení modernějšího přístupu k peptidové výrobě v Praze.

V té době ovšem autokratická politika v Československu vědeckému rozvoji – pokud nevedl ke krátkodobým ekonomickým přínosům – nepřála a styk mezi vědeckými pracovníky ze západních zemí a z evropských zemí pod sovětským vlivem administrativními a finančními opatřeními ztěžovala, či spíše znemožňovala. Po roce 1969 vedení ÚOCHB ztrácelo možnosti volné spolupráce se západním zahraničím; osobní styky s kolegy z Ferringovských laboratoří byly koncem sedmého desetiletí velmi omezené. Za takových okolností se výzkumné a i výrobní aktivity firmy Ferring postupně soustředily na spolupráci s dalšími evropskými a zámořskými laboratořemi.

V této situaci vznikla z iniciativy Frederika Paulsena v lednu 1981 menší mezinárodní skupina externích vědeckých pracovníků s názvem „Ferring Colloquium“ se záměrem sledovat vývoj v oboru peptidových farmaceutik a tak podporovat rozvíjející se výzkumnou komunitu v Malmö^o. Společné publikace autorů z této skupiny a výzkumníků z Ferringa byly až do ukončení její činnosti v říjnu 1986 obvyklé. Na její návrh sponzorovala firma Ferring (a později PolyPeptide Group) pro Evropskou peptidovou společnost (The European Peptide Society) „Josef Rudinger Memorial Award“, cenu udílenou za významné příspěvky k chemii peptidů, spojenou s plenární přednáškou na pravidelných Evropských peptidových symposiích (v dvouoř-

ⁿ http://www.csmbm.cz/bulletin/2002_2.pdf

ních cyklech)^p. V roce 1983 organizovali členové kolokvia ve Stockholmu mezinárodní sympozium na téma „biogenetika neurohormonálních peptidů“, v roce 1985 pak publikované v Academic Press^q. S řadou příslušníků tohoto seskupení pak Ferring navázal užší a občas i formální kontakty: Ulf Ragnarsson (Biomedical Center, University of Uppsala) byl v letech 1980–1987 konzultantem firmy, členové jeho laboratoře (Lars-Eric Larsson, Bengt Sandberg) spolupracovali v projektech týkajících se neurohypofyzárních hormonů; spolupráce s Michaellem Szelke vedla k založení výzkumné odbočky Ferringa v Anglii. Úzké vědecké kontakty existovaly s ústavu dalších členů kolokvia, z nichž dva z nich převzali dočasně vedoucí postavení laboratoří Ferring v Malmö (Hans Vilhardt, Iain C. A. F. Robinson). Skupina ukončila svou činnost, přes nesouhlas Frederika Paulsena sen., pro neshody s nastupujícím novým vedením Ferringu. V roce 1988 převzal vedení rodinného podniku nejmladší syn Frederika staršího Frederik Dag Arfst Paulsen (*1950).

Pod jeho vedením došlo k základním změnám ve struktuře firmy, které se velmi podstatně týkaly i spolupráce s českou stranou. V rámci „joint venture“ Ferringa se skupinou Léčiva Praha vznikla v letech 1990–1992 nejprve společnost Prague Polypeptide Institute spol. s r.o. a později Ferring-Léčiva a.s., kam postupně přešla část zaměstnanců společnosti Léčiva st.p. Praha, rozšířená o další peptidové chemiky. Výrobní prostory pro produkci základních peptidů pro farmaceutické preparáty zůstaly nejprve v laboratořích Léčiv v Praze – Komořanech, později se společnost již pod názvem Polypeptide Laboratories Praha přestěhovala do laboratoří v Hostivaři, kde firma pronajala prostory dřívějšího Ústavu pro výzkum, výrobu a využití radioizotopů.

Pro produkci lékových forem byl po roce 1997 určen nově vybudovaný farmaceutický podnik společnosti „Ferring Léčiva“ v Jesenicích u Prahy.

Podle firemní informace (<https://www.ferring.cz/>) byla pak česká pobočka v roce 2008 rozdělena na dvě samostatné jednotky:

- výrobní závod Ferring-Léčiva a.s. výroba lékových forem peptidů a dalších, pro společnost Ferring Group

zajímavých léčiv,

- marketingovou organizaci Ferring Pharmaceuticals CZ s.r.o.

Více než padesátileté vztahy mezi peptidovými výzkumníky v Praze a v původně malé švédské firmě Ferring AB, která se během času – a jistě i zásluhou českých partnerů – vyvinula ve významnou světovou farmaceutickou firmu, pokračovaly tak za nových historických podmínek již na zcela jiné osobní a institucionální úrovni.

LITERATURA

1. Pliska V., Pařízek A., Flegel M.: Chem. Listy 113, 675 (2019).
2. Dale H. H.: Biochem. J. 4, 427 (1909).
3. Blair Bell W.: Br. Med. J. 2, 1609 (1909).
4. Foges A.: Archiv für Gynäkologie 99, 455 (1913).
5. Blair Bell W.: Proc. R. J. Med. 8, 71 (1915).
6. Lindholm J.: Pituitary 7, 33 (2004).
7. Farini F.: Gazz. Osp. Clin. 34, 1135 (1913).
8. von den Velden R.: Berl. Klin. Wochenschr. 50, 2083 (1913).
9. Saameli K., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (Berde B., ed.), str. 577. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1968.
10. du Vigneaud V., Ressler C., Swann J. M., Roberts C. W., Gordon S., Katsoyannis P. G.: J. Am. Chem. Soc. 76, 3115 (1954).
11. du Vigneaud V., Ressler C., Swann J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G., Gordon S.: J. Am. Chem. Soc. 75, 4879 (1953).
12. du Vigneaud V., Gish D. T., Katsoyannis P. G.: J. Am. Chem. Soc. 76, 4751 (1954).
13. Boissonnas R., A., Guttmann S., Jaquenoud P.-A., J.-P. Waller J.-P.: Helv. Chim. Acta 28, 1491 (1955).
14. Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 21, 202 (1956).
15. Boissonnas R. A., Guttmann S., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (Berde B., ed.), str. 40. Springer Verlag, Berlin 1968.

^o Trvalí příslušníci (původní působiště): Rolf Håkanson (University of Lund), Vladimír Pliska (ETH Zürich), Ulf Ragnarsson (University of Uppsala), Iain C. A. F. Robinson (National Institute of Medical Research, London), Michael Szelke (Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London), Jan I. Thorell (FERRING AB, Malmö), Hans Vilhardt (University of Copenhagen), Karlheinz Voigt (Universität Ulm, později Philipps-Universität Marburg, Institut für Physiologie und Pathophysiologie), Wolfgang Wuttke (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen). Pozoruhodné je, že čeští výzkumníci do této skupiny začlenění nebyli, ačkoliv jejich přítomnost by bývala byla velice vítána, zvláště spolupráce s T. Barthem. Vznikly ale pochybnosti, že jejich pravidelná účast na zasedáních v západních zemích by se ze strany čs. úřadů neseťkala s pochopením a bylo by tudíž nutno počítat s jejich téměř pravidelnou absencí. Vedení firmy mělo rovněž oprávněné obavy, že pokud by jejich cesta povolena byla, byli by po návratu československými orgány dotazováni na důvěrné interní záležitosti firmy.

^p The Josef Rudinger Memorial Lecture Award is presented “in commemoration of Josef Rudinger’s role in the foundation of the European Peptide Symposia and of diverse contributions he made to peptide chemistry”. The Award is presented during the EPS Symposium and is sponsored by PolyPeptide Group.

^q The FERRING Symposium on “Biogenetics of Neurohormonal Peptides” held in Stockholm, Sweden, July 1–2, 1983; Biogenetics of Neurohormonal Peptides (eds. R. Håkanson, J. Thorell), Academic Press, London 1985.

16. Krejčí I., Poláček I.: *Eur. J. Pharmacol.* 2, 393 (1968).
17. Krejčí I., Poláček I., Rudinger J.: *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 30, 506 (1967).
18. Navrátil K.: *Československá Farmacie* 15, 540 (1966).
19. Hodr J., Štembera Z. K., Brotánek V., Rudinger J., Vondráček J., v knize: *Intra-Uterine Dangers to the Foetus: Based on an International Symposium, Prague, October 11th-14th, 1966* (Horský J., Štembera Z. K., Merkatz I. R., Dennis K. J., ed.), 12. díl, str. 445. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1967.
20. Kynčl J., Řežábek K., Kasafírek E., Pliška V., Rudinger J.: *Eur. J. Pharmacol.* 28, 294 (1974).
21. Rudinger J., Pliška V., Krejčí I.: *Rec. Prog. Horm. Res.* 28, 131 (1972).
22. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 1250 (1967).
23. Vávra I., Machová A., Holeček V., Cort J. H., Zaoral M., Šorm F.: *Lancet* 291, 948 (1968).
24. Vávra I., Machová A., Krejčí I.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188, 241 (1974).
25. Rudinger J., Pliška V., Rychlík I., Šorm F., v knize: *Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins* (Back N., Martini L., Paoletti R., ed.), str. 66. Plenum Press, New York 1968.
26. Pliška V., Barth T., Thorn N. A.: *Acta Endocrinol.* 67, 1 (1971).
27. Pliška V., Thorn N. A., Vilhardt H.: *Acta Endocrinol.* 67, 12 (1971).
28. Carlsson L., Sjöholm I.: *Acta Chem. Scand.* 20, 259 (1966).
29. Sjöholm I., Carlsson L.: *J. Labelled Compd.* 3, 3 (1967).
30. Pliška V., Meyer-Grass M., Bersinger N., Carlsson L., Melin P., Vilhardt H.: *Experientia* 36, 1145 (1980).
31. Amon B.: *Ahead of His Time*. Ferring GmbH, Kiel, BRD 1999.
32. Jost K., Pliska V., Krejčí I., Šorm F.: U.S. Patent 3,973/69 (1973).
33. Jošt K., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 36, 297 (1971).
34. Melin P.: *Regul. Pept.* 45, 285 (1993).
35. Melin P., Trojnar J., Johansson B., Vilhardt H., Åkerlund M.: *J. Endocrinol.* 111, 125 (1986).
36. Krejčí I.: *Bulletin České společnosti pro biochemii a molekulární biologii* 30, 67 (2002).
37. Craig L. C.: *J. Biol. Chem.* 155, 519 (1944).

V. Pliska^a, A. Pařízek^b, and M. Flegel^c
^aDepartment of Biology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH), Zürich, Switzerland, ^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, 1st Faculty of Medicine of Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, ^cDepartment of Chemistry of Natural Substances, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic): **Neurohypophyseal Peptides from Prague**

and Swedish Laboratories Used as Medications: Desmopressin, Terlipressin, Carbetocin. Part 1: History of Research and Beginnings of Industrial Production

From the fifties to the seventies of the last century, the neurohypophyseal peptides oxytocin and vasopressin constituted one of the main research areas at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry in Prague (IOCB). A significant contribution to this area is associated with the names of František Šorm, director of the said institute, and Josef Rudinger, head of the institute's peptide laboratory. At that time, newly developed research tools enabled to synthesize structural analogues of these hormones in numerous laboratories worldwide and hence to investigate the structure-activity relationships within this peptide group. Contributions of single peptide-chain positions to the respective biological activities were identified which opened a possibility to rationalize a design of peptides with a combination of changes in several positions. Several clinically interesting peptides were synthesized in the late 1960s at the IOCB and employed as therapeutics: [(Gly)₃-Cys¹,Lys⁸]-vasopressin (Glypressin Ferring[®], Terlipressin INN), 1-deamino-8-D-arginine vasopressin (Desmopressin INN, dDAVP), and later the uterotonic carbetocin (INN), widely used in obstetrics to prevent postpartum haemorrhage. Since the industrial production of peptide therapeutics was scarcely possible under the conditions of socialist economy in Czechoslovakia as well as in other countries under the Soviet influence, F. Šorm agreed to use the already established scientific contacts of IOCB with the Swedish pharmaceutical company Ferring AB and to transfer the production licences to Sweden. The license agreements were signed in 1969 and led to a quick spread of dDAVP in the substitution therapy of the central form of diabetes insipidus and, moreover, contributed to a fast upsurge of the Ferring company. Somewhat later, Glypressin was produced as a therapeutic with a prolonged action in cases of cardiovascular collapse. Contacts between Prague peptide chemists and the Ferring company lasted on a rather informal base until the end of the 1980s. After the fall of the totalitarian regime in Czechoslovakia in 1990, Ferring started a joint-venture collaboration with the newly organized Czech company Léčiva st.p. Praha in a newly established group Prague Polypeptide Institute spol. s. r.o. (later Ferring-Léčiva A.S.). A substantial part of the peptide-production capacities was then transferred to new buildings in Prague.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: neurohypophyseal hormones, oxytocin, vasopressin, deamino-D-arginine vasopressin, DDAVP, Glypressin, Terlipressin, Carbetocin, Ferring company, peptide drugs

● Pliska V., Pařízek A., Flegel M.: *Chem. Listy* 116, 20–27 (2022).

● <https://doi.org/10.54779/chl20220020>