

**Molekulární
biofyzika**



Farmakologie

**Molekulární
biofyzika**



Farmakologie

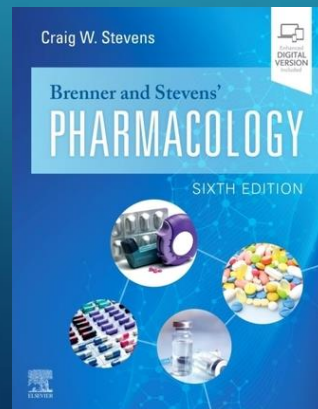
Farmakologie

(z řečtiny: farmakon (φάρμακον) znamená „léčivo“, logos (λόγος) znamená „věda“)

- odvětví medicíny a biologie zabývající se vývojem a studiem účinku léčiv (složením léčiv, jejich, molekulárními a buněčnými mechanismy, mechanismy orgánů a orgánových systémů).

Léčivo = uměle vytvořená, přírodní či endogenní (pocházející z těla jedince) látka, která biochemickou a/nebo fyziologickou cestou ovlivňuje buňku, tkáň, orgán či dokonce celý organismus.

Přesněji je farmakologie vědou zabývající se interakcemi mezi živými organismy a chemickými látkami, které ovlivňují normální či abnormální biochemické funkce v organismu.



Biofyzika

- Pokročilá interdisciplinární věda zahrnující:
→ fyziku, biologii, chemii, matematiku

HISTORIE

- 1892: Karl Pearson (chybějící spojení mezi biologií a fyzikou => pojmenování biofyzika),

The Grammar of Science

- 1943: Erwin Schrodinger (Nobelova cena, 1933),
přednášková série a kniha: „*What is Life*“

- 1946: *Biophysics Research Unit, King's College, Londýn*,
cíl: zapojit fyziky do práce na otázkách biologického
významu; Maurice Wilkins, Rosalind Franklin:

X-ray difrakce DNA

- 1953: Francis Crick (částicový fyzik, přešel na
biofyziku v Cambridgi) and James Watson (biolog):

struktura dvouřetězcové DNA

- 1957: založena *The Biophysical Society*

CO JE “BIOFYZIKA”

- Biofyzika je interdisciplinární věda, která vysvětluje zákony a principy fyziky, jimiž se řídí různé biologické procesy. Biofyzika zahrnuje všechny úrovně biologické organizace od molekulárního měřítká až po celý organismus. Biofyzika je obor, který aplikuje principy fyziky a chemie a metody matematické analýzy a počítačového modelování k pochopení toho, jak fungují biologické systémy.

KLASIFIKACE

- Biofyziku lze klasifikovat v závislosti na relativní velikosti biologického subjektu (např. molekul, buněk nebo celého organismu), nebo na tom, která technika a aplikace se používá..
- Biofyzikální směry na základě relativní velikosti subjektu.

Molekulární a subcelulární biofyzika

Fyziologická a anatomická biofyzika

Environmentální biofyzika.

- Biofyzikální techniky a aplikace
 - Obecné biofyzikální techniky
 - Zobrazovací techniky
 - Lékařská biofyzika

MOLEKULÁRNÍ A SUBCELULÁRNÍ BIOFYZIKA

- Většina běžných oborů biofyziky se zabývá molekulami a subcelulární funkcí. Toto odvětví biofyziky se někdy také nazývá biochemická fyzika, fyzikální biochemie nebo biofyzikální chemie. Všechny tři pojmy znamenají totéž – to, co budeme nazývat molekulární a subcelulární biofyzika. Je to obor, kde se setkává biologie, chemie a fyzika.

- Struktura a konformace biologických molekul.
- Vztah funkce a struktury
- Konformační přechody.
- Ligandová vazba a intermolekulární vazba.
- molekulární transport

- Biofyzika membrán
- DNA and RNA biofyzika
- Toky energií a bioenergetika
- Statistická mechanika
- Kinetika
- Molekulární motory



RESEARCH GROUP

PHARMACEUTICAL BIOPHYSICS

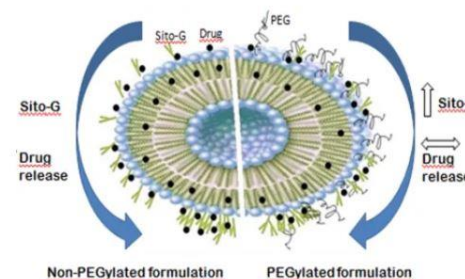
[Home](#)

Research

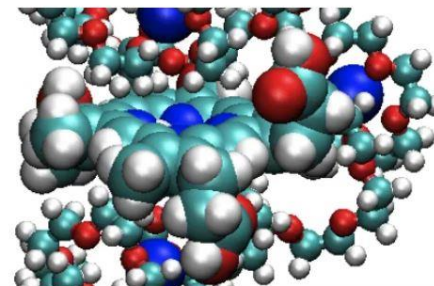
[Advanced drug design strategies](#)[Bioinspired and biomimicking surfaces](#)[Drug delivery liposomes and extracellular vesicles](#)[Label-free experimental platforms in pharmaceutical research](#)[Other nanomedicine and drug delivery related topics](#)[Home](#) / [Research](#)

RESEARCH

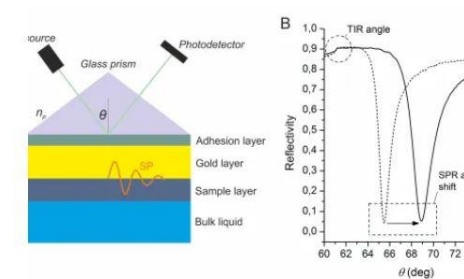
Our group is involved in several projects related to our overall theme. These can, roughly, be divided into five research areas, shown below.



Drug delivery liposomes and extracellular vesicles

[Read more](#)

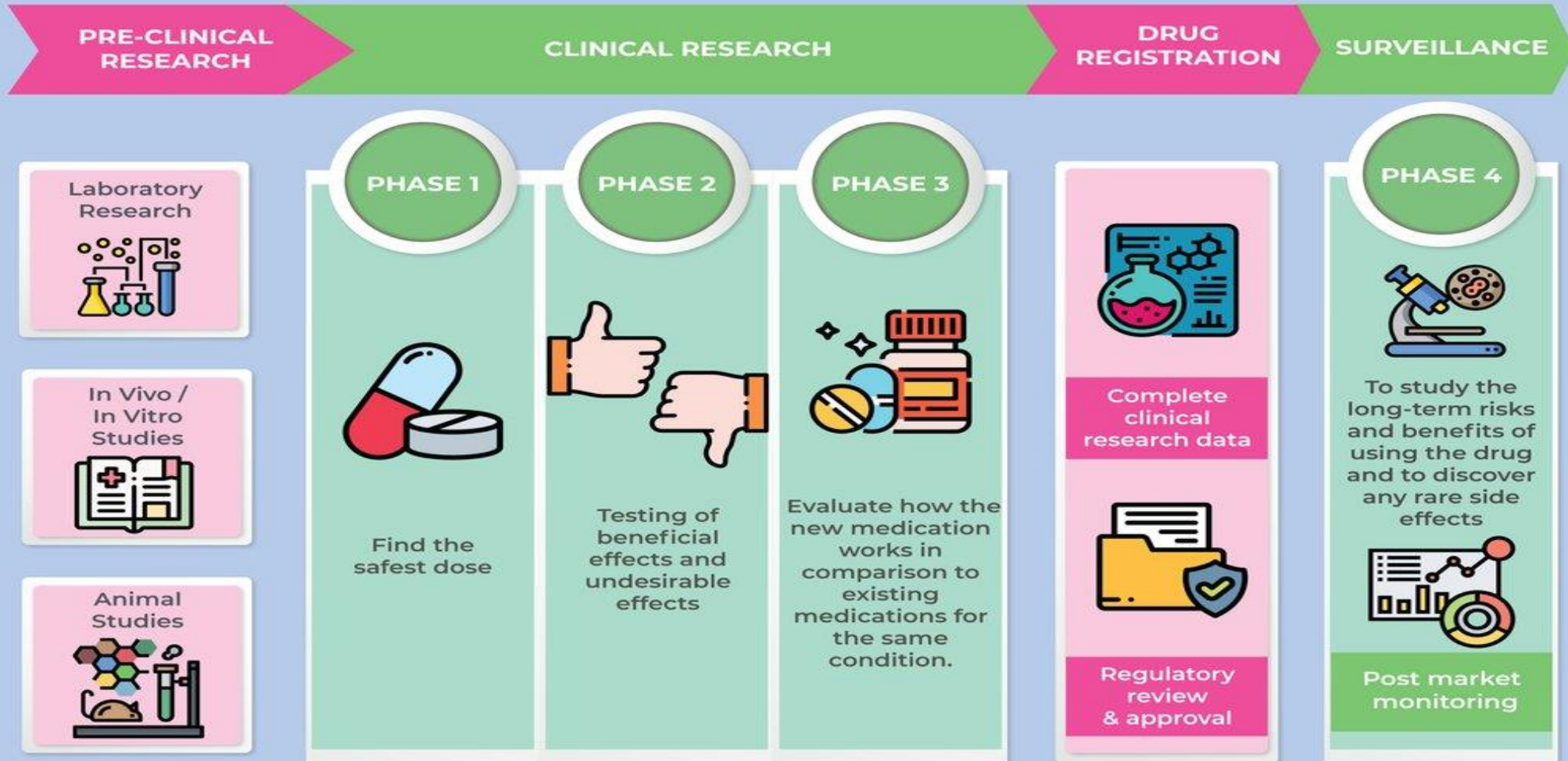
Other nanomedicine and drug delivery related topics

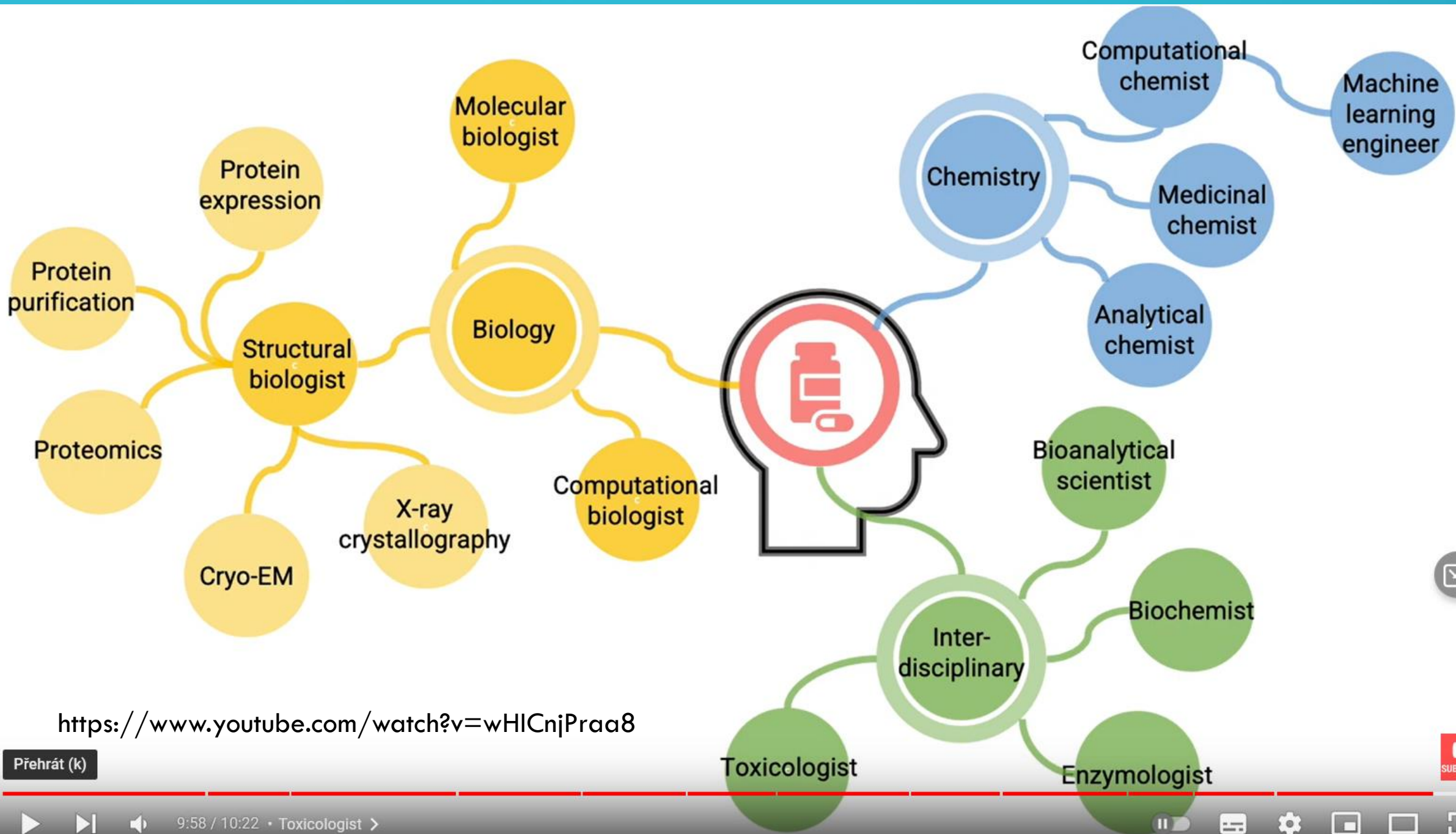
[Read more](#)

Label-free experimental platforms in pharmaceutical research

[Read more](#)

DRUG DEVELOPMENT FROM BENCH TO BEDSIDE





<https://www.youtube.com/watch?v=wHlCnjPraa8>

Přehrát (k)

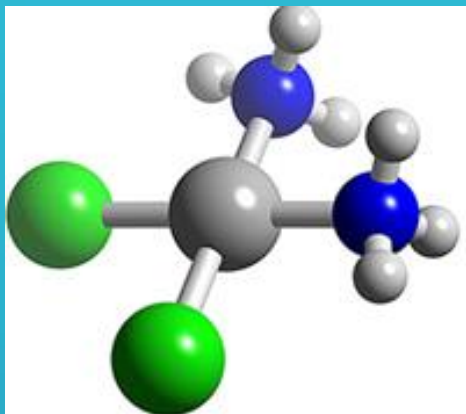
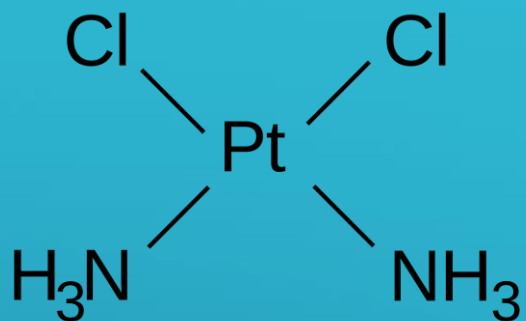


9:58 / 10:22 • Toxicologist >



SUBSCRIBE

OBJEV PROTINÁDOROVÉHO ÚČINKU CISPLATINY

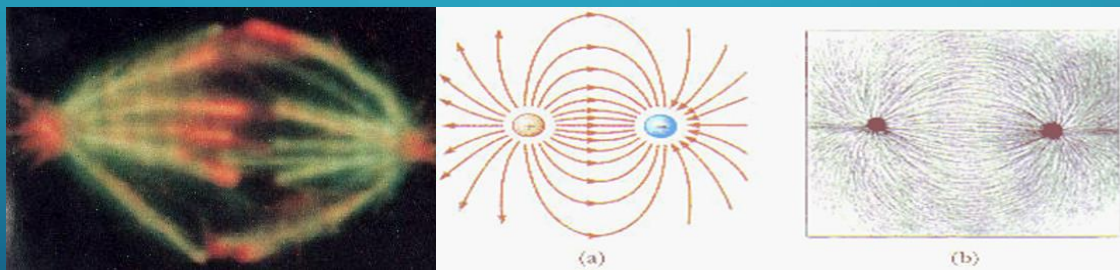


Cisplatina (*cis*-diamindichloroplatnatý komplex)

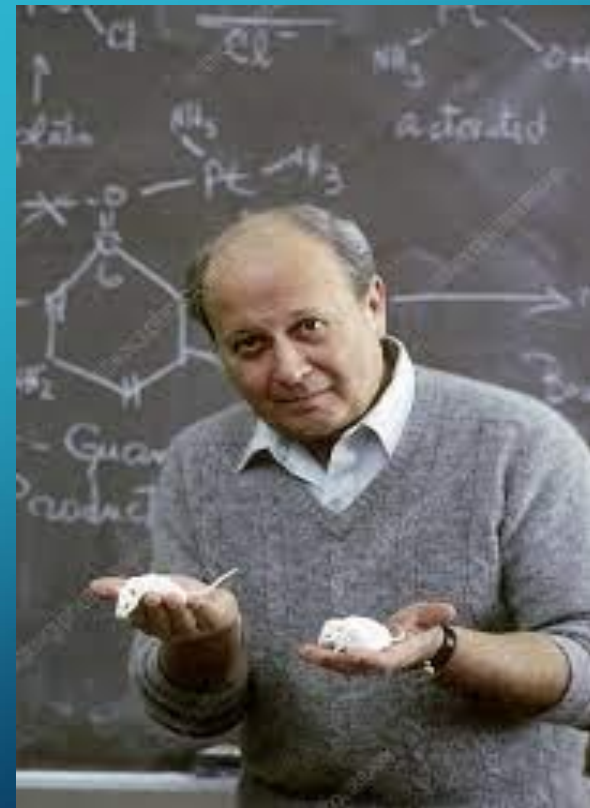
- v roce 1978 schválena FDA jako léčivo
- k léčbě nádorů varlat, vaječníků, močového měchýře, plic a některých malignit oblasti hlavy a krku
- účinnost pouze v *cis* geometrii, *trans* izomer je neaktivní
- nežádoucí vedlejší účinky

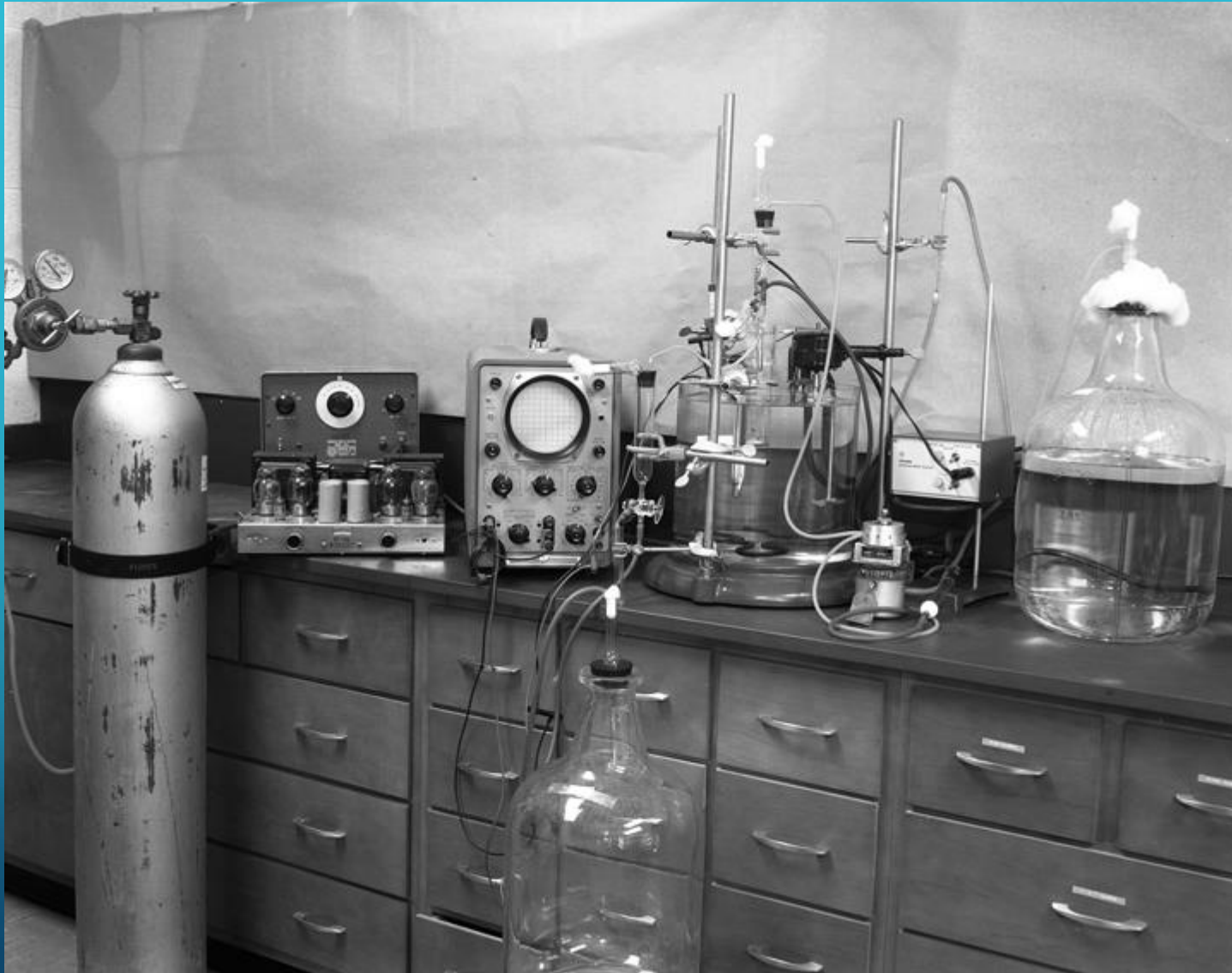


- the story of the invention of the anticancer drug cisplatin is a story of chemistry hidden in the science of biology
- prof. Barnett Rosenberg
 - 1961, vliv el. pole na růst bakterií *Escherichia coli* za použití platinových elektrod



Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205: 698–99.





Description: Equipment used in experiments by Barnett Rosenberg in 1965. Rosenberg used platinum electrodes to study the effects of an electric field on *E. coli*. As a result of the experiment, the bacteria did not divide but grew into long strands. He found the cause to be the platinum in the electrodes. This led to the study of the effects of platinum on cancer cells and the discovery of the cancer drug cisplatin.

Date: January 14, 1965

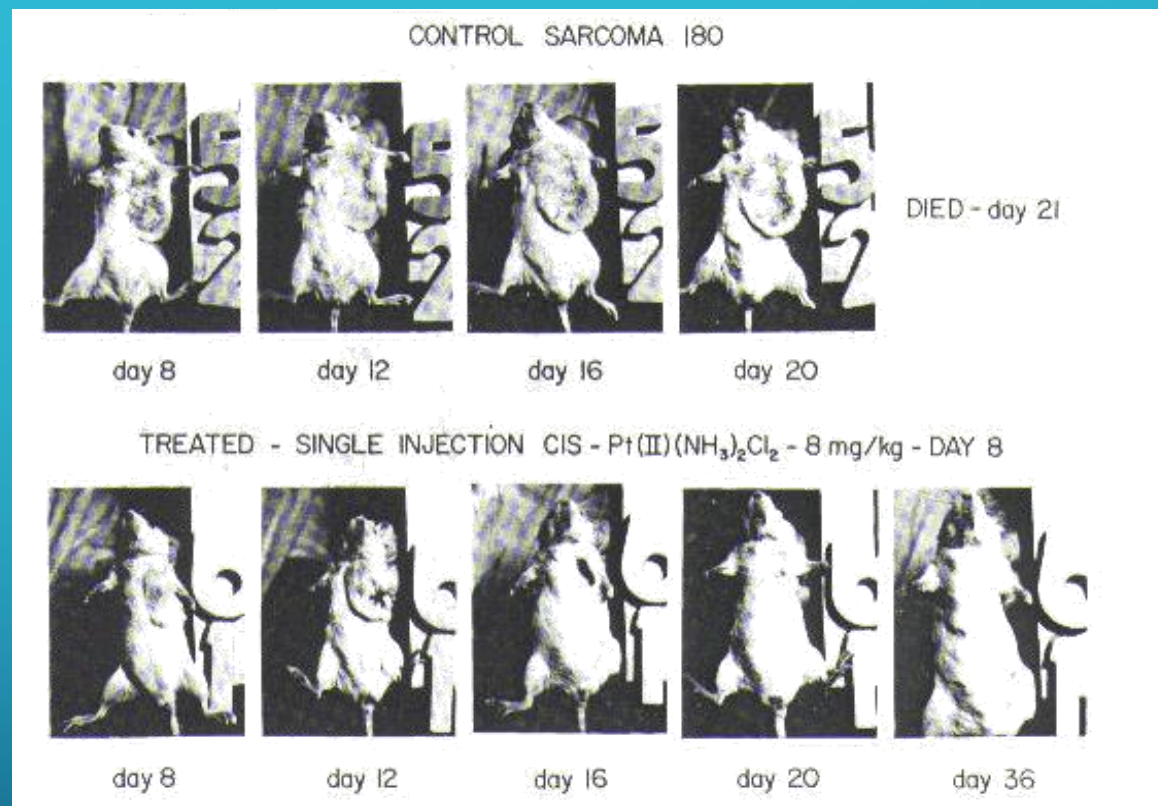
OBJEV PROTINÁDOROVÉHO ÚČINKU CISPLATINY

- platinové elektrody umístěny v nádobce s bakteriemi a živným médiem
- po vložení napětí se bakteriální buňky přestaly dělit, avšak bez inhibice jejich růstu
- dělení bakterií zastaveno působením cisplatiny vznikající při elektrolýze materiálu platinových elektrod
- skupina vědců z Michigan State University následně ukázala, že cisplatina inhibuje také růst nádorových buněk



Normal and elongated *E. coli*: scanning electron microphoto-graph
<https://ar.iarjournals.org/content/34/1/417.2>

TESTOVÁNÍ ÚČINKU CISPLATINY *IN VIVO*



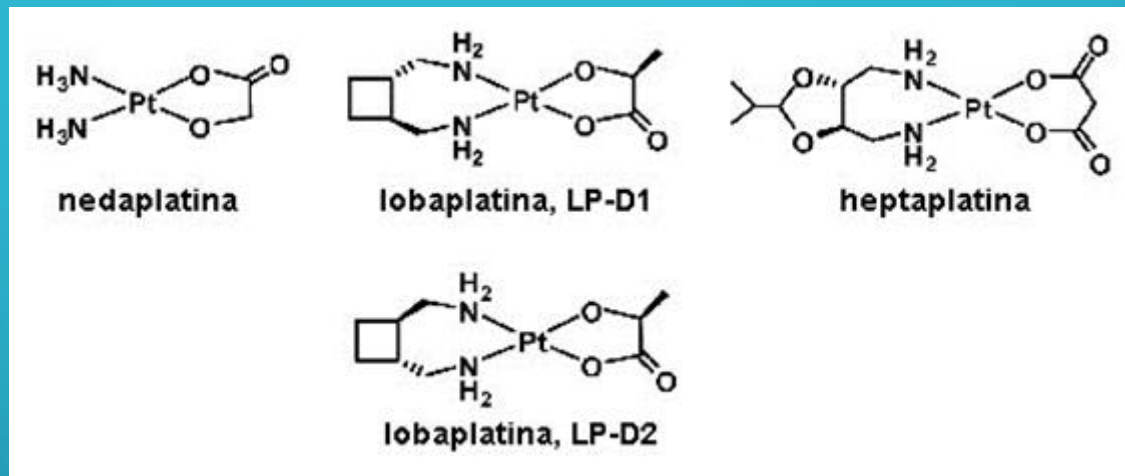
Time sequence photographs of two mice with solid Sarcoma 180 tumors. The mouse at the top was an untreated negative control. She died on day 21 when the tumor weighed about 3g. The bottom mouse was in the group treated on day 8 with an intraperitoneal injection of *cis*-diamminedichloroplatinum(II). Her tumor was completely regressed six days after treatment, and she died of age-related causes almost 3 years later.

- 1996: testy odhalily rakovinu varlete v pokročilém stadiu, která se již rozšířila do plic a mozku
→ nasazena velmi intenzivní chemoterapie pomocí Platinolu
- 1998: vítězství nad rakovinou a "oficiální" návrat do USA
(výhra závodu Sprint 56K Criterium)
- 1999: vítězství na Tour de France, narození syna
- 2001: narození dvojčat – dcer
- 2009: narození syna
- 2010: narození dcery

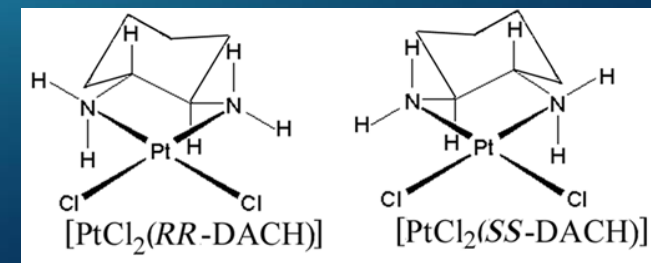
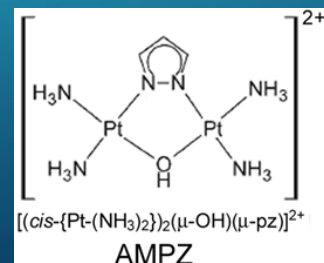
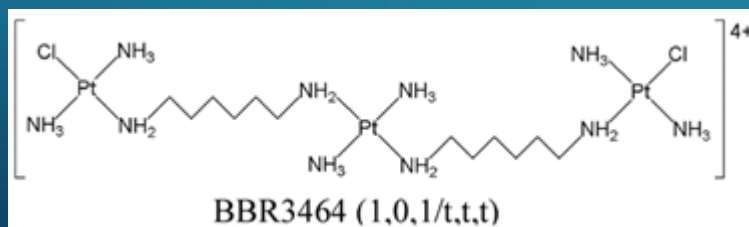


PLATINOVÁ LÉČIVA NOVÉ GENERACE

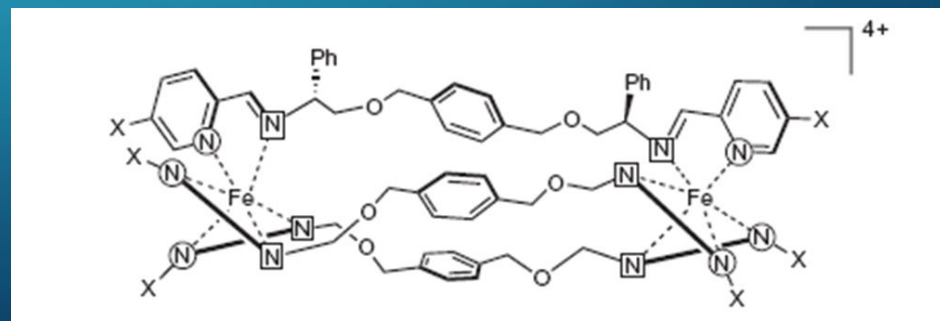
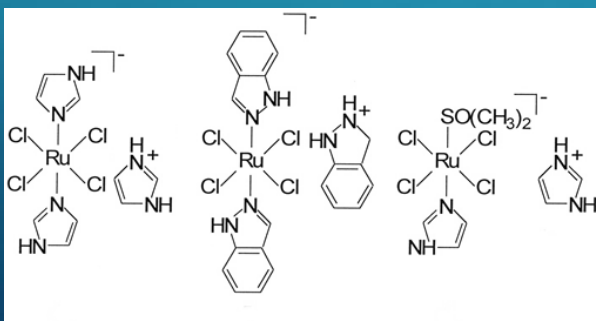
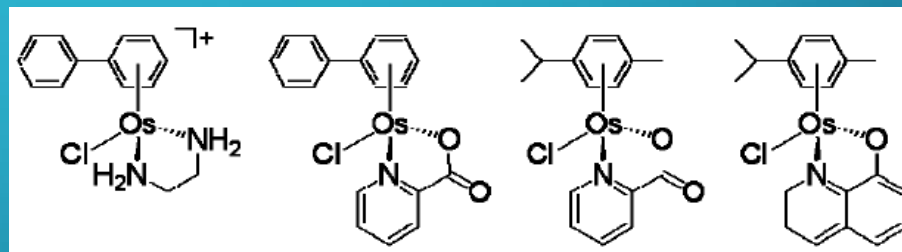
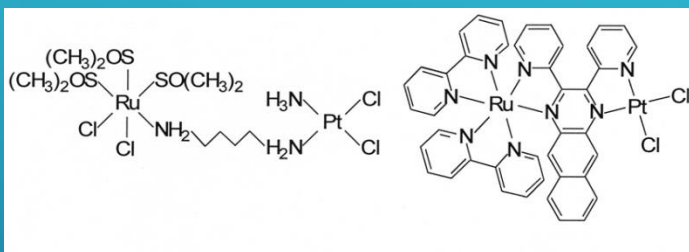
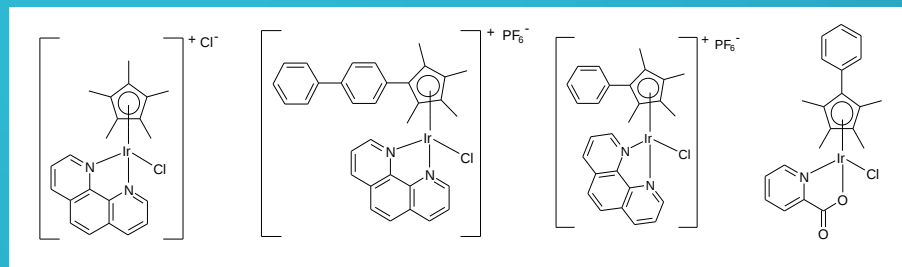
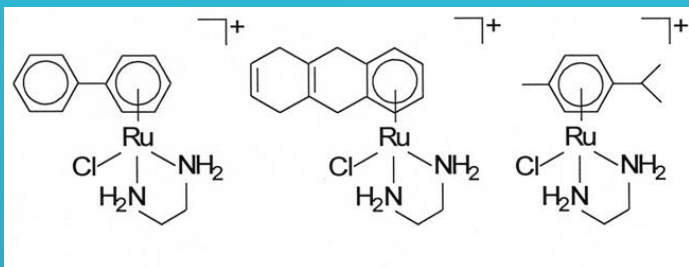
Léčiva schválená pro použití v klinické praxi mimo ČR:



Látky strukturně odlišné od cisplatiny (ve fázi testování):



NOVÁ LÉČIVA NA BÁZI DALŠÍCH TĚŽKÝCH KOVŮ



Fotodynamická terapie

je diagnostická a léčebná metoda využívaná zejména při léčbě tumorů. Je založená na aplikaci fotosenzitivní látky, jež se po aplikaci hromadí přednostně v nejrychleji proliferujících (tedy nádorových) buňkách a po ozáření světlem určitého spektra způsobí smrt odpovídajících buněk.

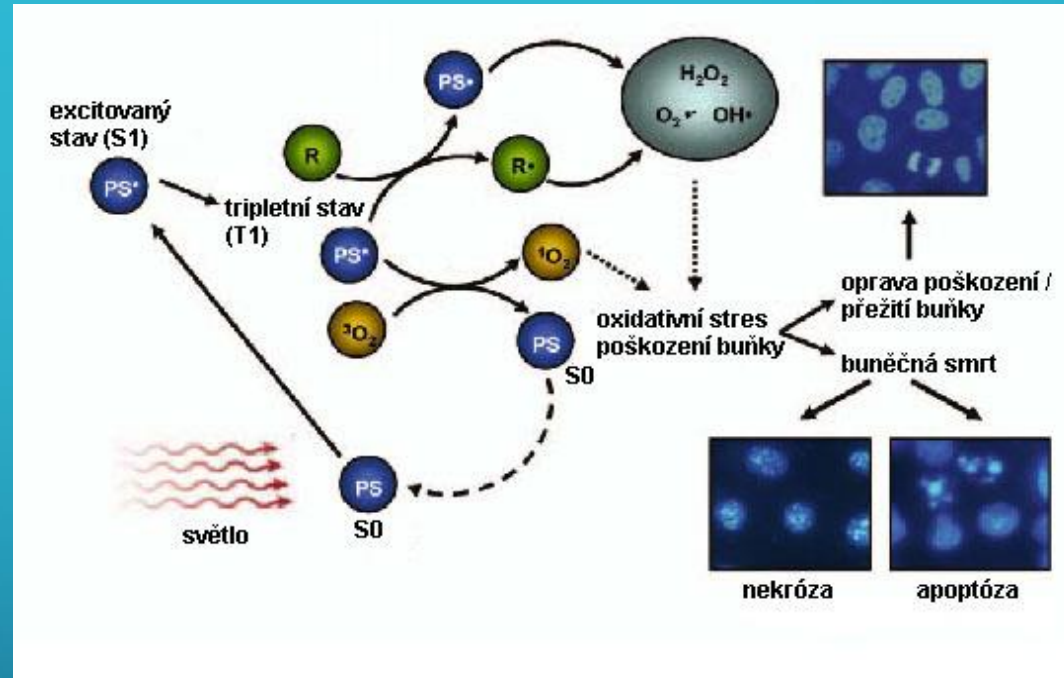


https://novojicinsky.denik.cz/zpravy_region/nova-zbran-proti-rakovine-kuze-20160921.html



<https://zdravi.euro.cz/denni-zpravy/profesi-aktuality/fotodynamicka-terapie-v-ceske-republice-pet-let-zkusenosti-460931>

MECHANISMUS ÚČINKU LÉČIV PRO PDT



Převzato z: A. Juarranz, P. Jaén, F. Sanz-Rodríguez, J. Cuevas, S. González (2008), Clin Transl Oncol 10: 148-154.

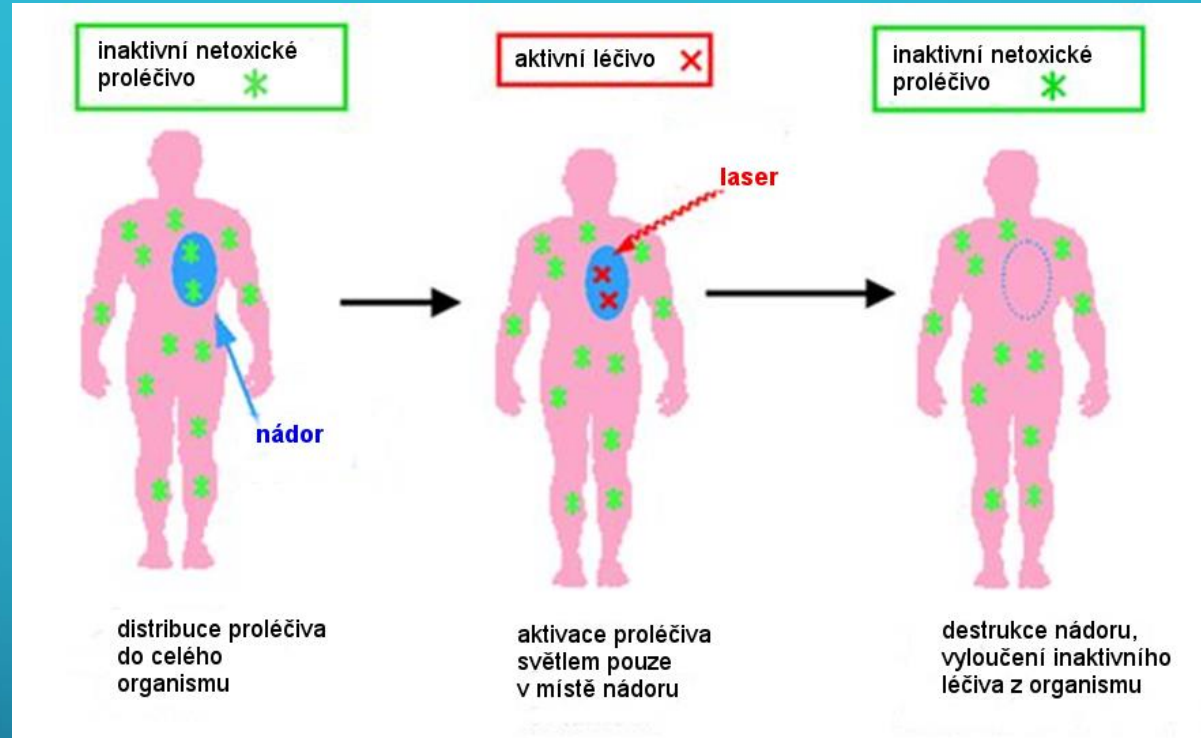
Mechanismus:

Vznik reaktivních forem kyslíku, které indukují buněčnou smrt.

Problém:

Nádory bývají hypoxické a mechanismus vyžadující kyslík tedy není ideální.

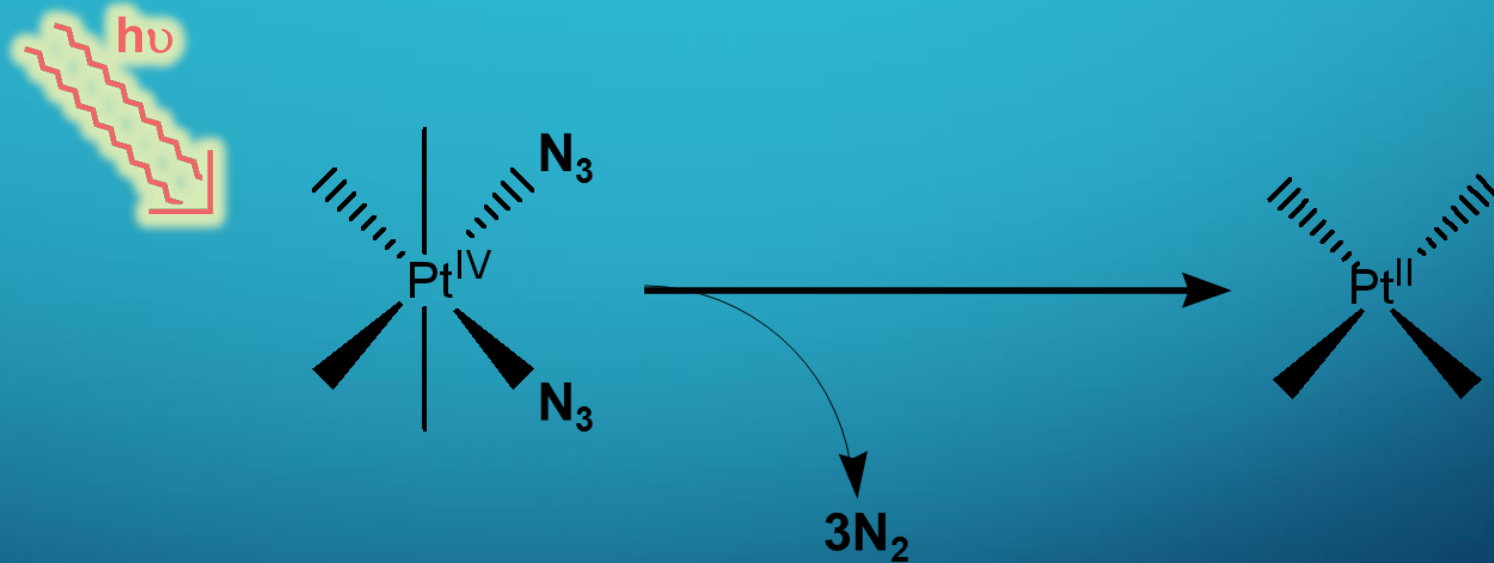
FOTOAKTIVACE PLATIČITÝCH KOMPLEXŮ



- nízká systémová kumulativní toxicita umožňující opakované podání
- selektivní destrukce nádorových buněk
- minimální poškození normálních buněk
- zvýšení úspěšnosti léčby

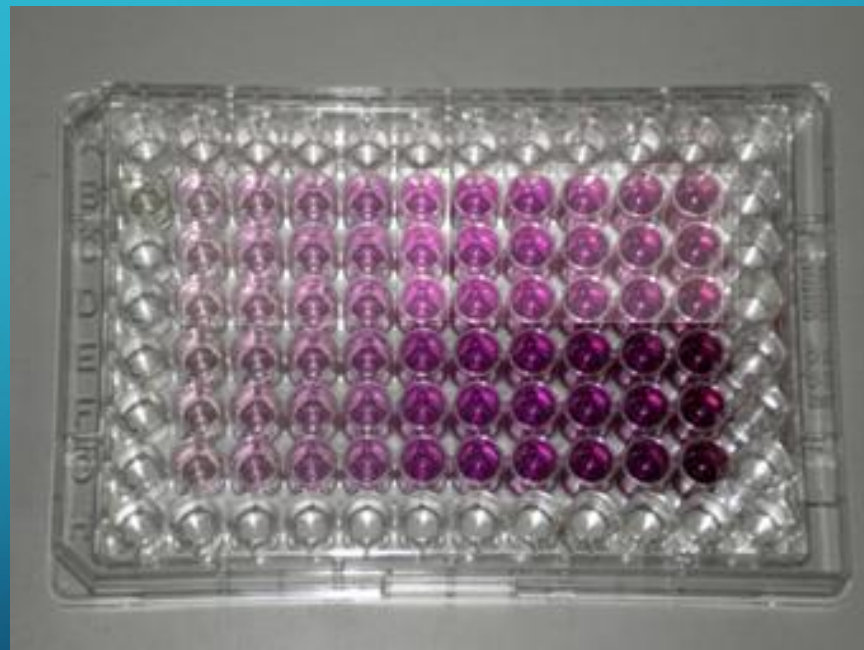
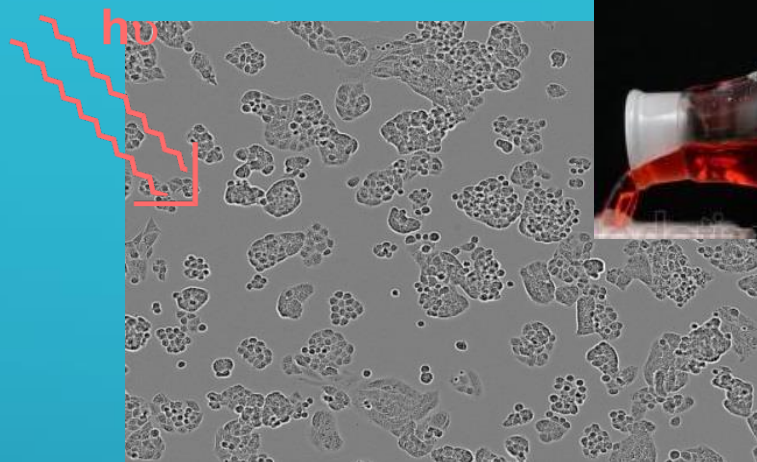
FOTOAKTIVACE PLATIČITÝCH KOMPLEXŮ

- fotoredukce Pt^{IV} proléčiva do Pt^{II} aktivní formy
- závisí na typu ligandů v koordinační sféře

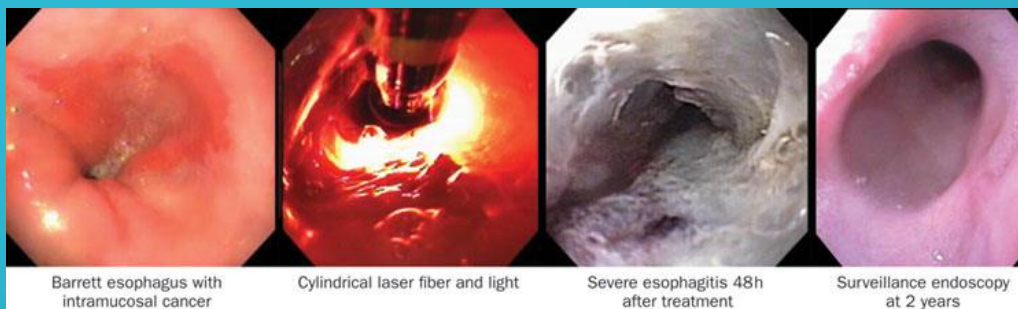


Mechanismus fotoredukce umožňující lokální terapii nádorů, vedoucí k snížení vedlejších účinků.

TESTY FOTOTOXICITY PLATIČITÝCH KOMPLEXŮ



FOTOTERAPIE V PRAXI



Převzato z: S. Ibbotson, R. Dawe, H. Moseley, J. Woods (2014), Ninewells Hospital and Medical School Dundee, NHS Tayside.

Nosičové systémy pro transport farmak



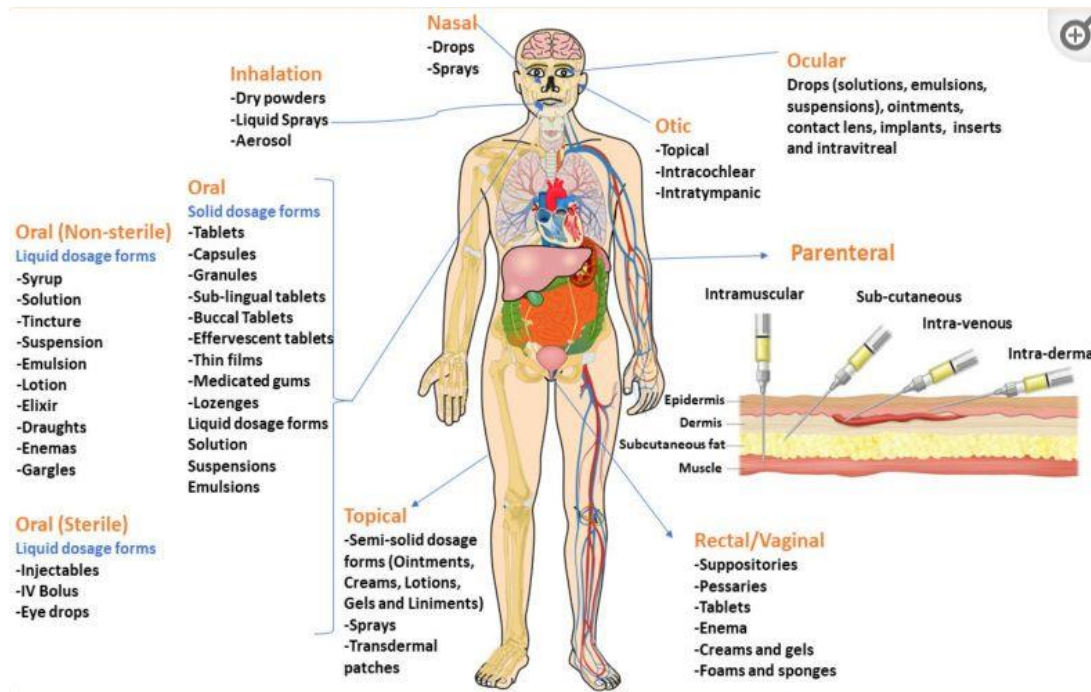
Jitka Prachařová

7. listopadu 2022

Laboratoř molekulární biofyziky a farmakologie Katedra biofyziky, PŘF UPOL

System podávání farmak

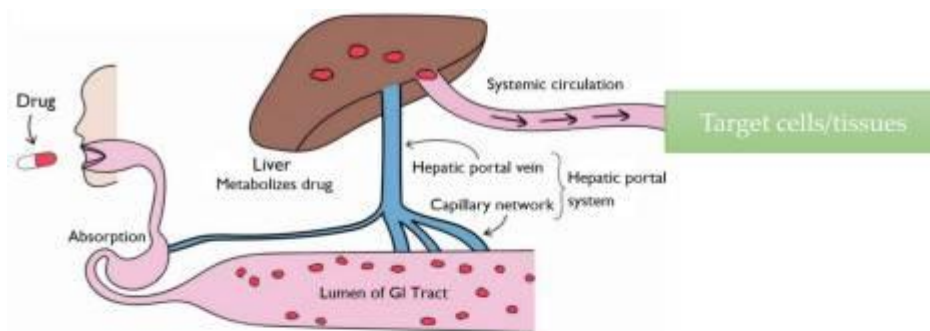
- „Drug delivery“ = jakýkoli způsob nebo proces podávání určité substance za účelem dosažení terapeutického účinku u člověka či zvířete
- Konvenční léčiva většinou založena na rychle působících účinných látkách podávaných orálně (pilule, tekutiny) nebo injekčně



Farmakokinetika

- Zkoumá osud léčiva v organismu:
absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece

Co dělá organismus s léčivem?



Pharmacokinetics

1. Absorption



How the drug moves from the site of administration to the systemic circulation

Factors affecting: Food, drug permeability

2. Distribution



Journey through the blood stream to reach the target cells and molecules

Factors affecting: Binding to plasma proteins

3. Metabolism



Drug modification by Liver enzymes rendering drug ineffective

Factors affecting: Liver diseases, alcohol and certain drugs

4. Elimination

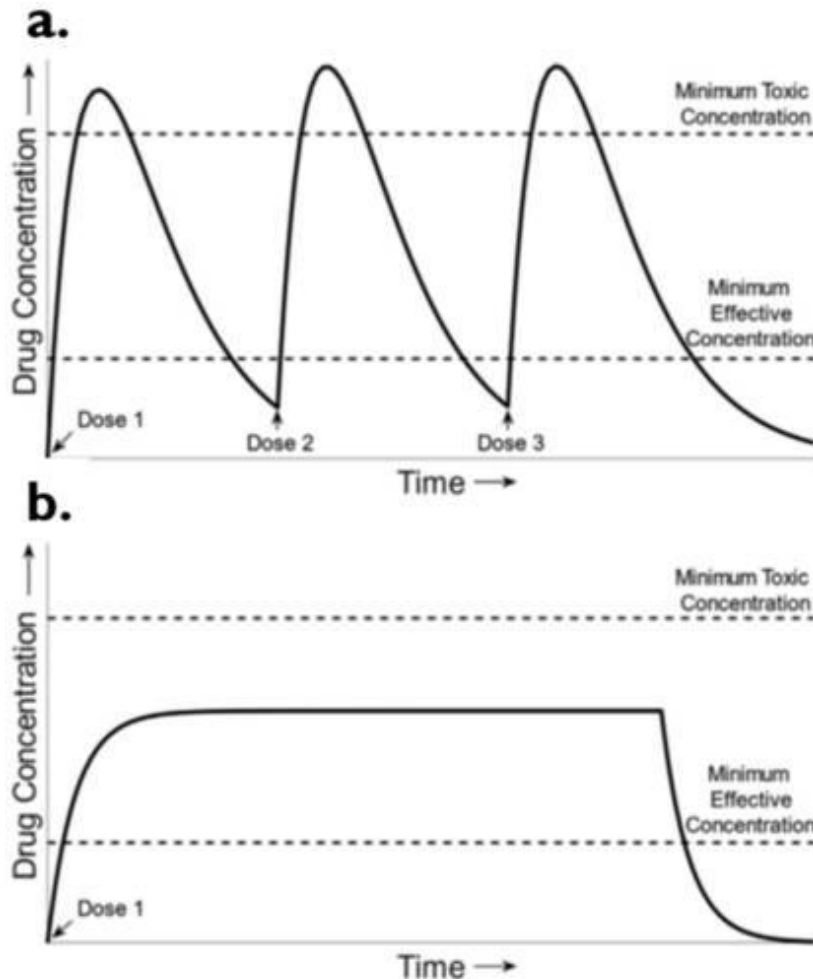


Excretion of drug/metabolites through Urine/faeces

Factors affecting: Glomerular filtration rate, Kidney diseases (e.g. Nephritis), Intestinal bowel disease

System podávání farmak

- Konvenční (a) vs. ideální systém podávání farmak (b)



Terapeutické okno

= je rozmezí dávky léčiva (resp. jeho koncentrace v určité části těla) schopné účinně léčit dané onemocnění, aniž by lék měl toxický účinek na organismus pacienta



Nosičové systémy pro léčiva

- Prodloužení cirkulace látek v krevním řečišti
- Řízená aktivace a účinek v cílovém místě (např. v tkáni nádoru)
- Zmírnění nežádoucích účinků léčiva na organismus
- Do současnosti vyvinuto mnoho typů nosičů založených na rozpustných polymerech, liposomech, nanočásticích či polymerních micelách

Nosiče kancerostatik

- Nejintenzivnější vývoj zejména nosičů kancerostatik (častý výskyt nádorových onemocnění v populaci, málo účinná léčba, vysoká úmrtnost)
- Protinádorová léčiva často nedostatečně selektivní pro nádorovou tkáň = nežádoucí vedlejší účinky na organismus pacienta



Jaký by měl být ideální nosičový systém?

- Biokompatibilní
- Netoxický
- Neimunogenní
- Možnost kontrolovaného uvolňování léčiva
- Zlepšení rozpustnosti léčivé látky
- Zvýšení stability léčiva
- Předvídatelné a reprodukovatelné uvolňované dávky léčivé látky
- Eliminace nežádoucích vedlejších účinků léčiva
- Snížení nutnosti velmi častého podávání léčiva (např. díky postupnému uvolňování)
- Optimalizace terapie

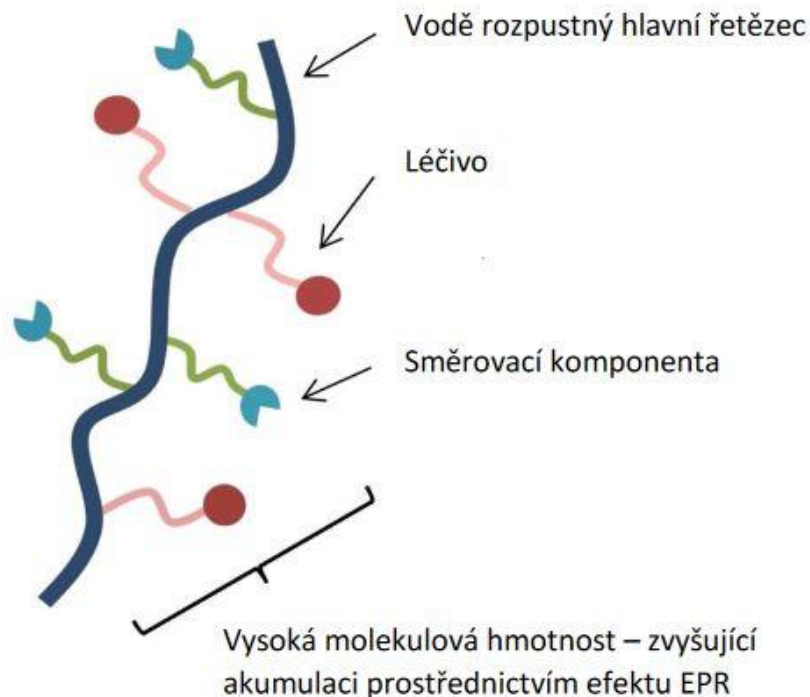


???



Lékové polymerní nosiče

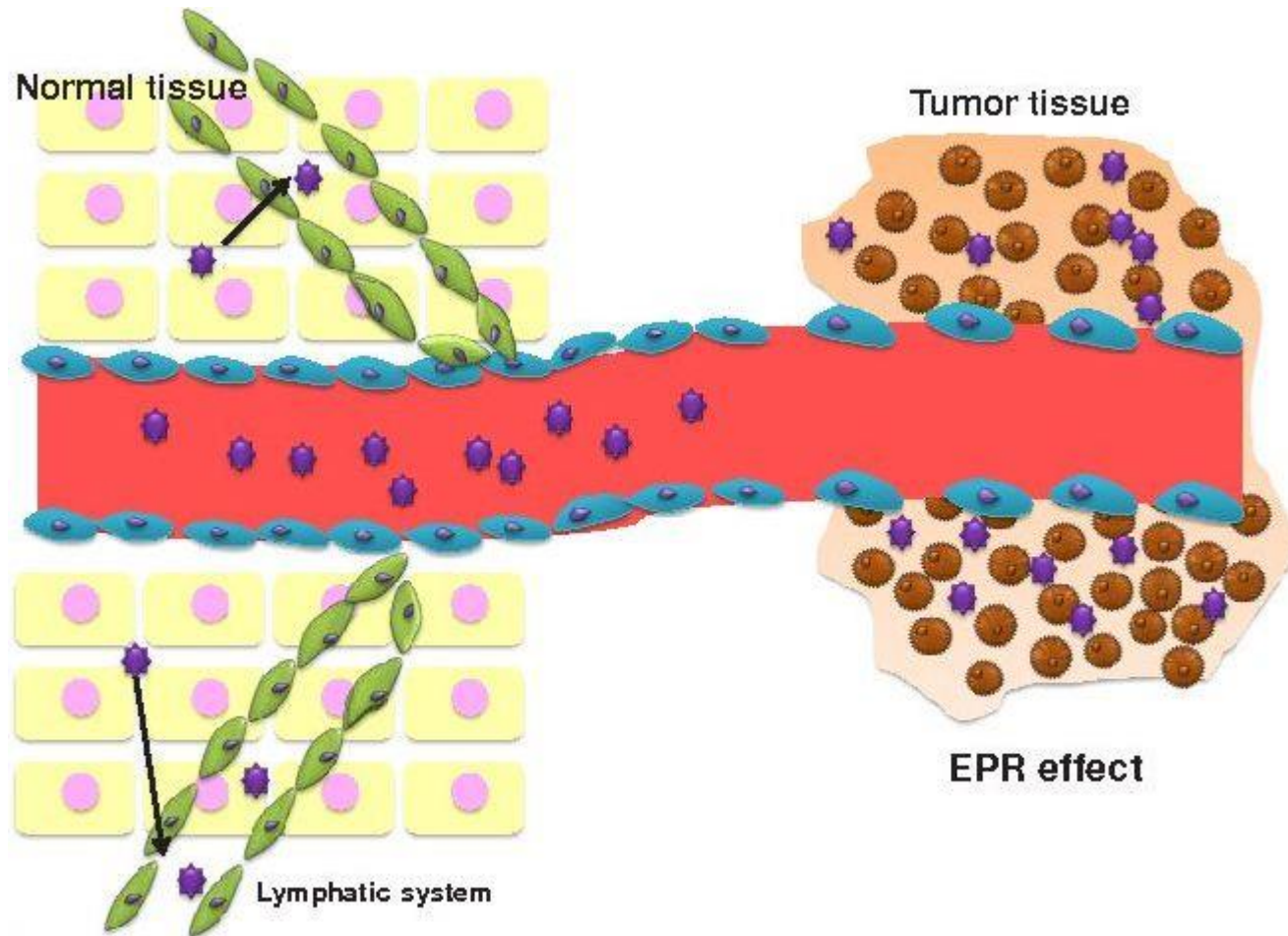
- Polymer chrání léčivo před biodegradací během transportu
- Doprava léčiva do cílové tkáně/buněk
- Možnost kontrolovaného uvolňování léčiva



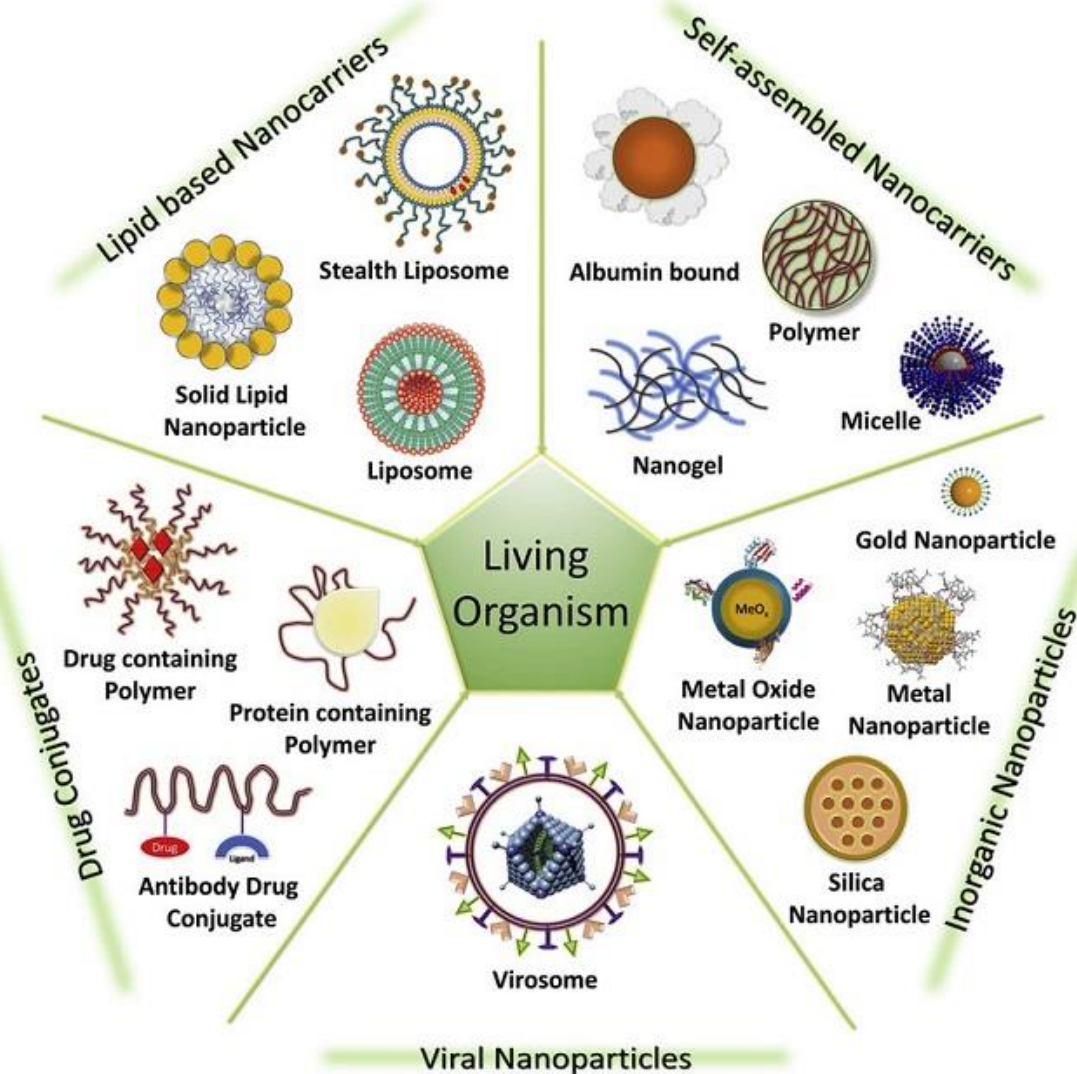
Aktivní cílení – díky navázání specifických skupin cílících např. na receptory na membráně nádorových buněk

Pasivní cílení – při vysoké molekulové hmotnosti polymerního nanomateriálu je tento akumulován v pevných nádorech díky efektu zvýšené permeability a zadrže (EPR)

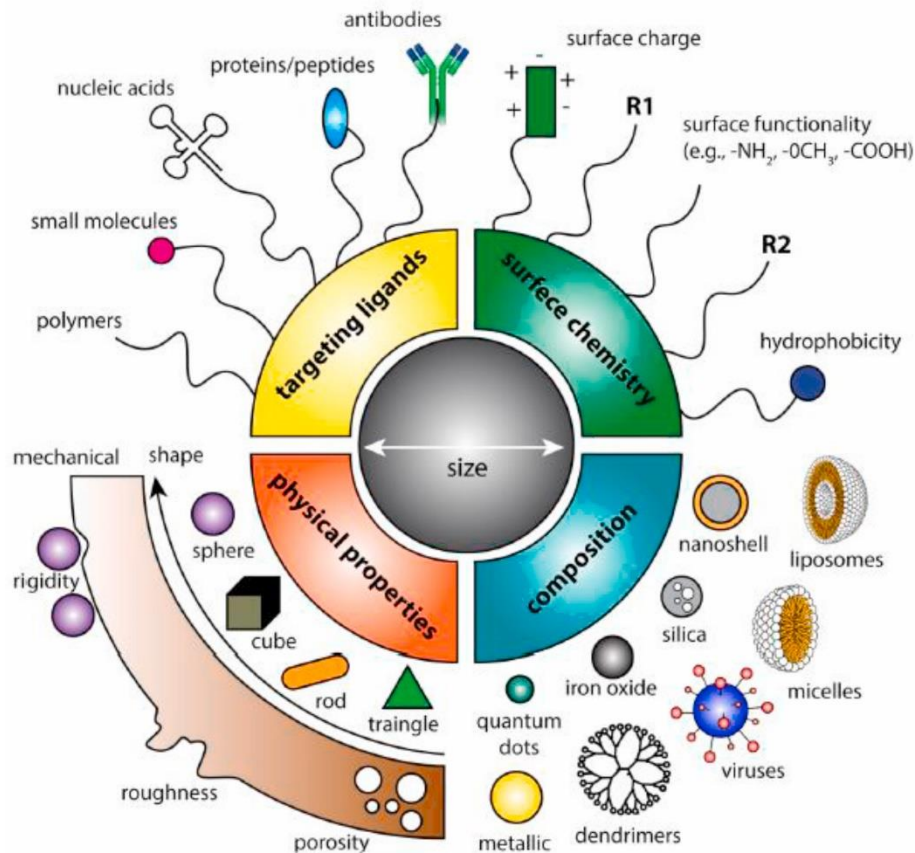
EPR – jak to funguje?



Nanonosičové systémy farmak



Nanonosiče rozdělí



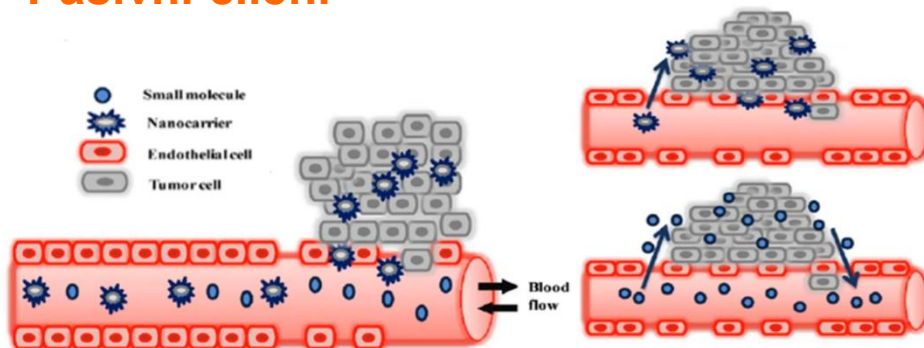
Nanonosiče lze dělit podle složení z různých materiálů dále se dělí podle tvaru, velikosti a „cílicích“ ligandů pro možné specifické dodávání léků.

Nanofarmaka schválená pro léčbu nádorů

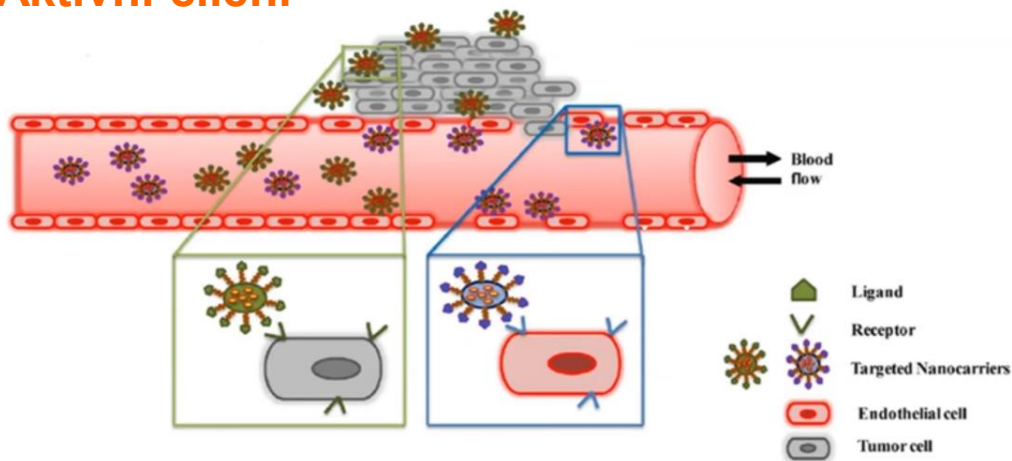
Obchodní název	Forma	Léčivo	Výrobce	Terapie
Abraxan	Nanočástice s navázaným albuminem	Paclitaxel	Abraxis Bioscience	Metastazující nádory prsu, rakovina slinivky
DaunoXom	Liposom	Cytarabin	Galen	Kaposiho sarkom (HIV asociovaný)
Genexol	Polymerní micelární nanočástice	Paclitaxel	Samyang Biopharmaceuticals	Nádory prsu
Marqibo	Liposom	Vincristin	Acrotech	Akutní lymfoblastická leukemie
Onivyde	Liposom	Irinocetan	Merrimack Pharmaceuticals	Metastazující nádory slinivky
Doxil®/Caelyx™	Liposom	Doxorubicin	Janssen	Kaposiho sarkom, ovariální karcinom, mnohočetný myelom
Myocet	Liposom	Doxorubicin	Teva UK	Metastazující nádory prsu

Pasivní vs. aktivní cílení nanofarmak

Pasivní cílení

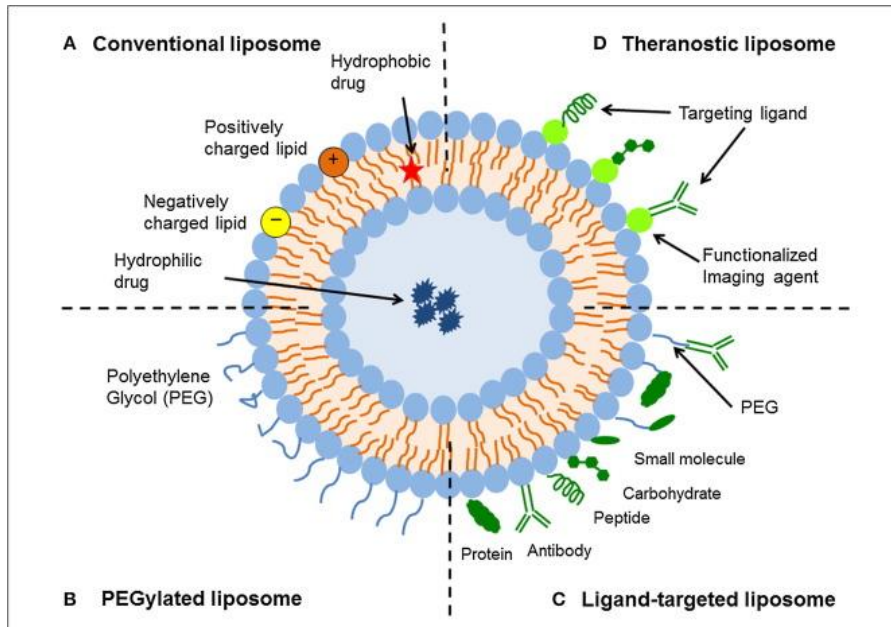


Aktivní cílení



Liposomální nosičové systémy

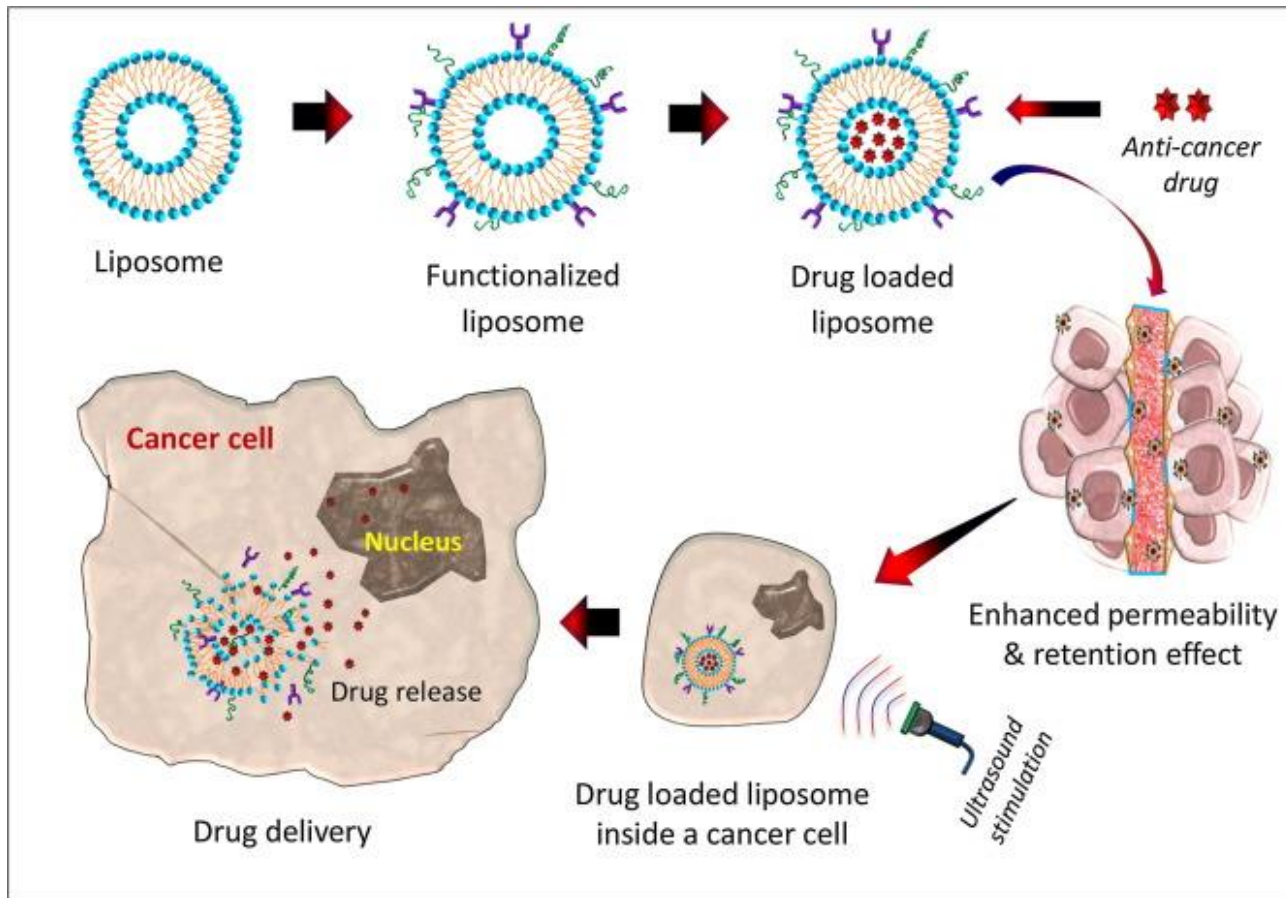
- Konvenční liposomy (A) – nejsou chytré
- PEGylované liposomy (B) – delší cirkulace v krvi
- Liposomy cílené na povrchové determinanty (protilátky, fragmenty protilátek, proteiny, peptidy, vitamíny, sacharidy, glykoproteiny) buněk (C)
- Teranostické liposomy (D) - mohou nést terapeutika i zobrazovací činidla



Liposomy
– umožňují také
podávání např.
kombinace dvou
léčivých látek
(synergický efekt)

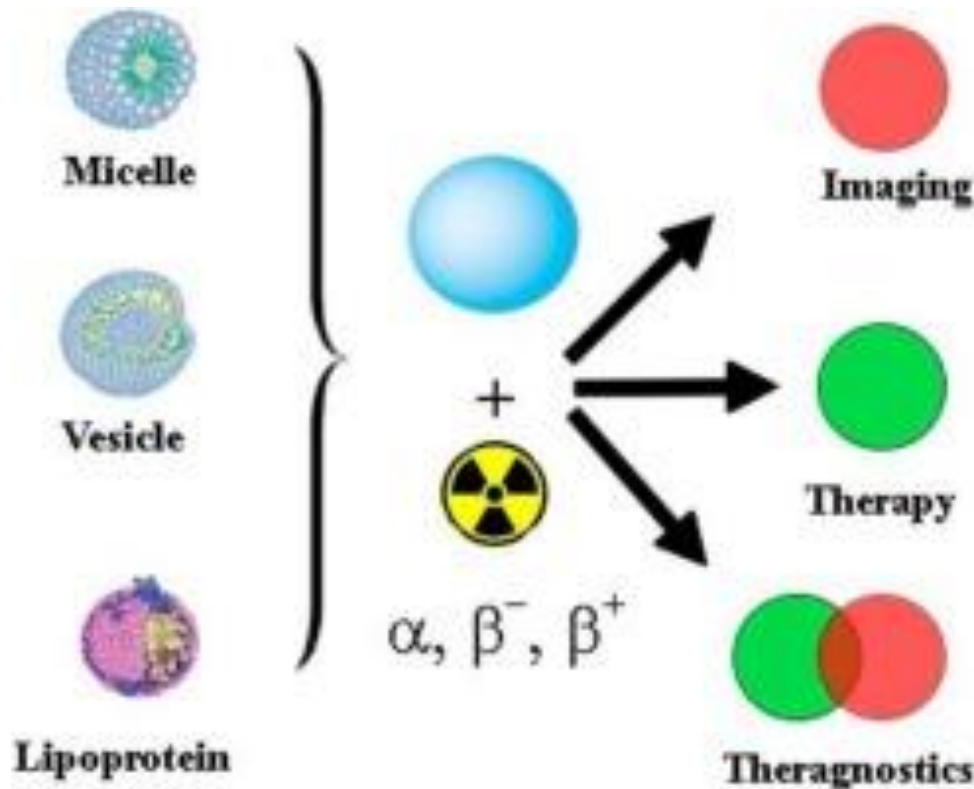
„Chytrý“ systém doručování léčiv

„Chytré liposomy“ reagují na různé vnější a vnitřní stimuly (změny pH, transformace enzymů, redoxní reakce, světlo, ultrazvuk, mikrovlny)

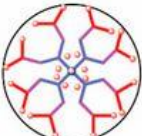
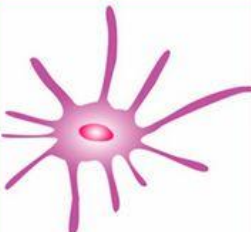
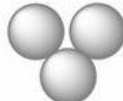
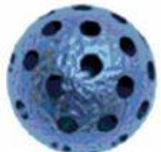


Radioaktivně značené liposomy a další

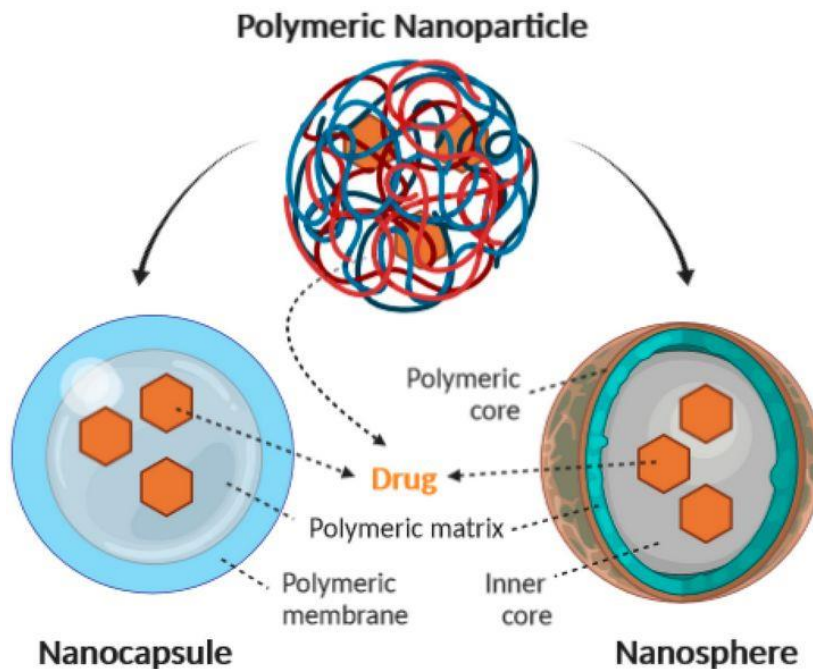
- Např. chytré liposomy funkcionalizované radioligandem
- Lze použít ke stanovení biodistribuce liposomů v těle a k diagnostice nádoru spolu s prováděním terapie



Chytré nosiče farmak a jejich „spouštěče“

Drugs	Nanocarriers			Stimuli Triggers	Early diagnosis
Chemotherapy drug 					Chemotherapy
Antibody drug 	Liposomes	Polymeric NPs	Dendrimer		
Immunoadjuvant 					
mRNA vaccines 	Au NPs	Silica NPs	Magnetic NPs		mRNA vaccine therapy
Photosensitizer 					Photodynamic therapy
Radionuclides 	Carbon nano tube	MTM NPs	Nano-Erythrocytes	X-rays	Combination therapy

Polymerní nanočástice

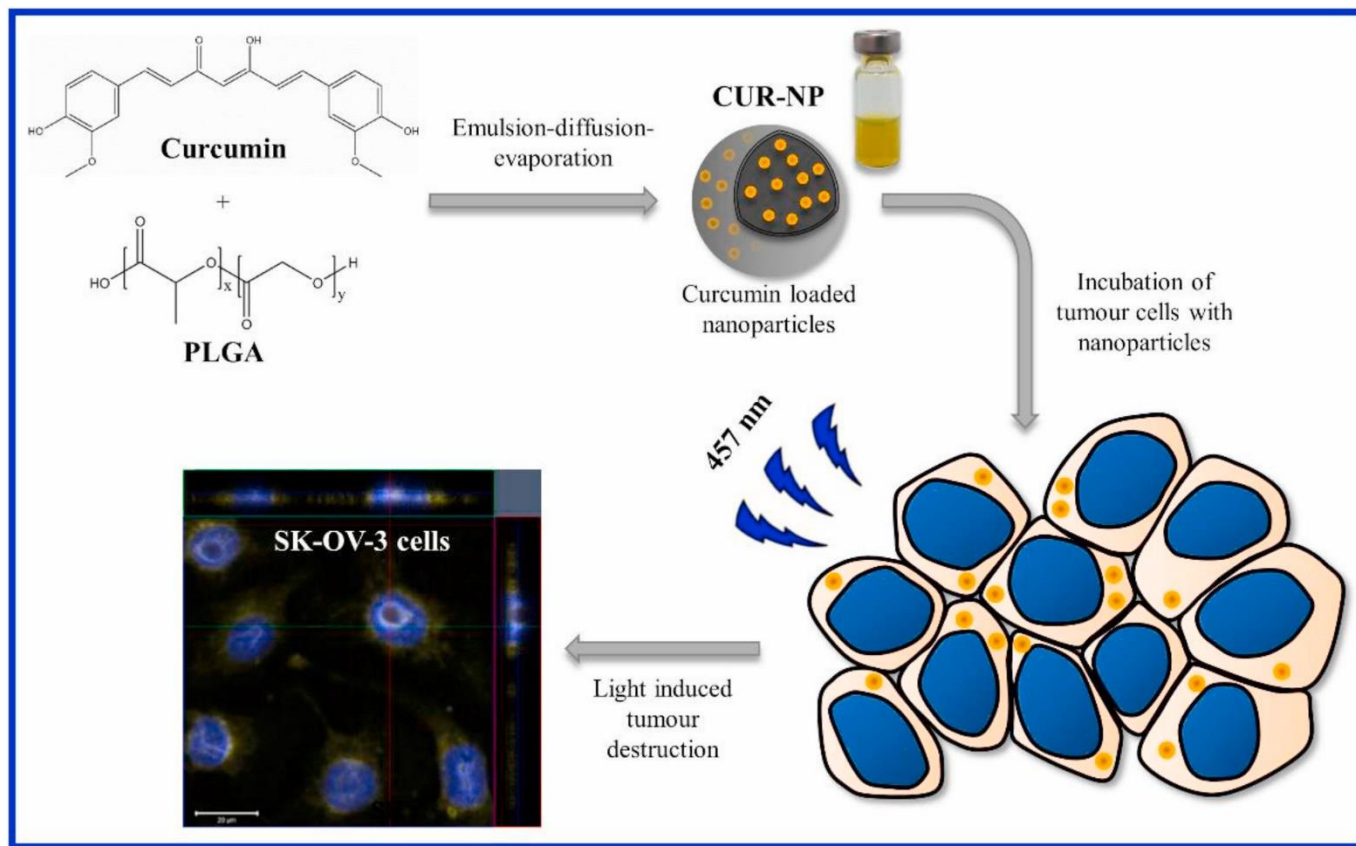


Zielińska et al., 2020; (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123218300791>)

- Biologicky odbouratelné nanočástice
 - Velmi stabilní – možnost uvolňování léčiva po dlouhou dobu
 - PLGA (Poly(D, L-lactide-co-glycolide)) nanočástice využívány pro enkapsulaci malých molekul používaných v protinádorové terapii (cisplatina, paclitaxel, doxorubicin, camptothecin, atd.)
- PEGylované PLGA nanočástice s doxorubicinem (nižší nežádoucí vedlejší účinky a vyšší protinádorová aktivita při srovnání s „holým“ doxorubicinem)

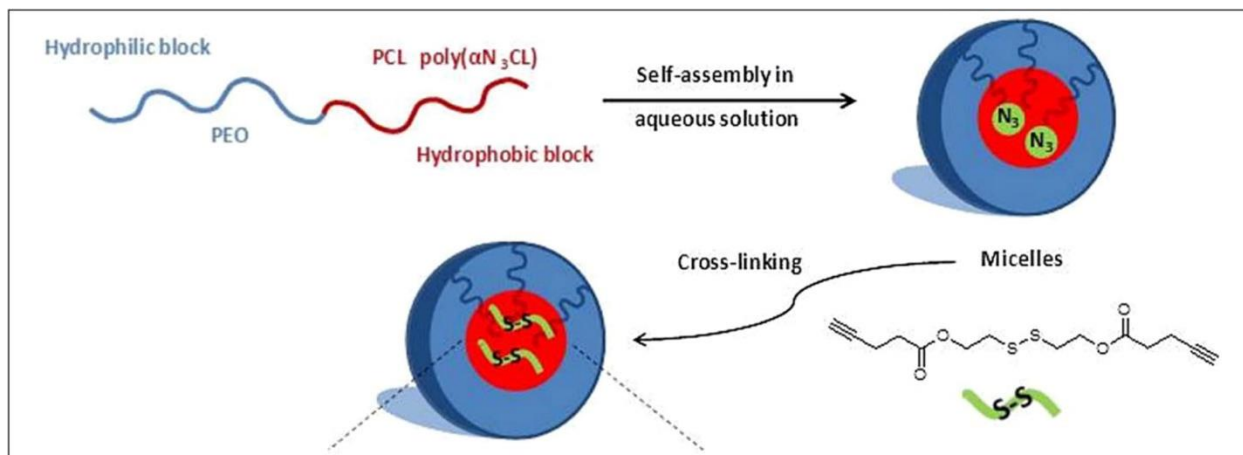
PLGA pro fotodynamickou terapii

- Fotodynamická terapie buněk ovariálního karcinomu s využitím PLGA NPs s navázaným kurkuminem



Polymerní micely

- Amfifilní molekuly
- Hydrofobní části tvoří jádro, hydrofilní části pak korónu

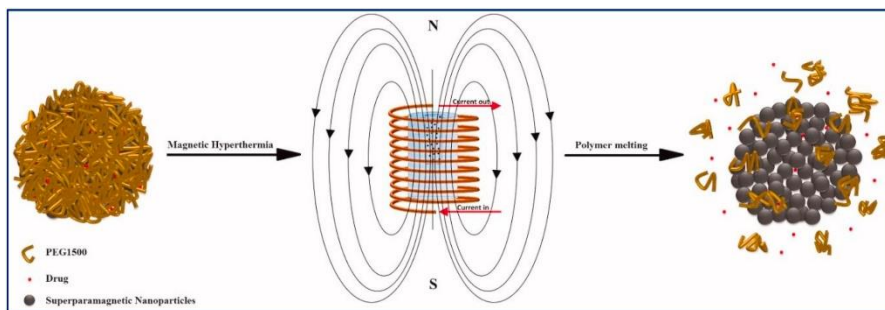


Hossen *et al.*, 2019; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123218300791>

- K aktivnímu zacílení rakovinných buněk se povrch micel modifikuje různými typy ligandů (např.: kyselina listová, peptidy, sacharidy, protilátky)
- K uvolnění léčiva z micely slouží různé stimuly (změny pH, teploty, ultrazvuk, enzymy či oxidace)
- Povrch micel lze modifikovat, aby byl detekovatelný zobrazovacími metodami

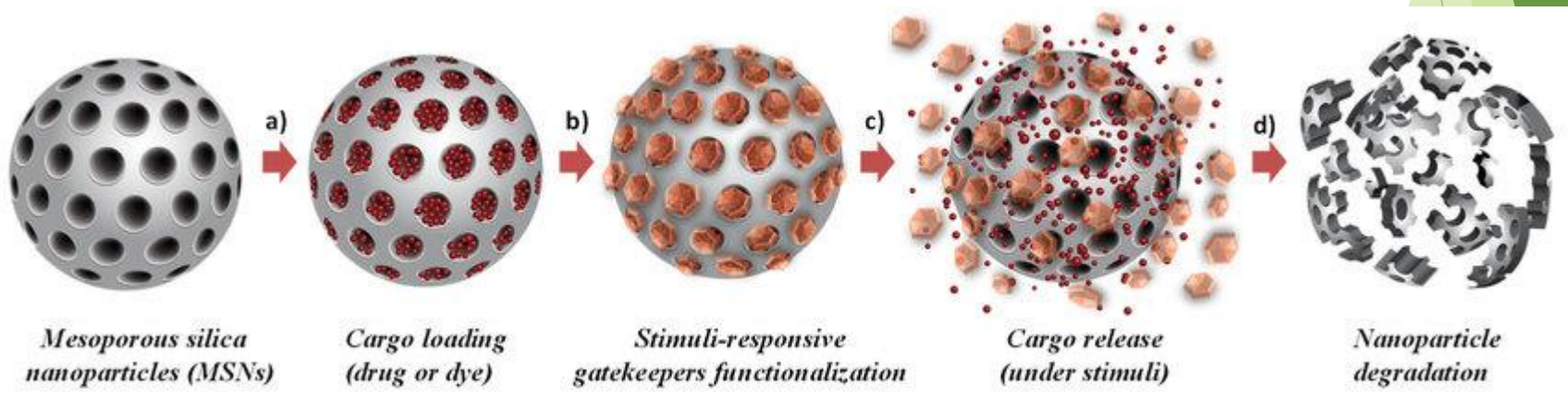
Magnetické nanočástice (MNP)

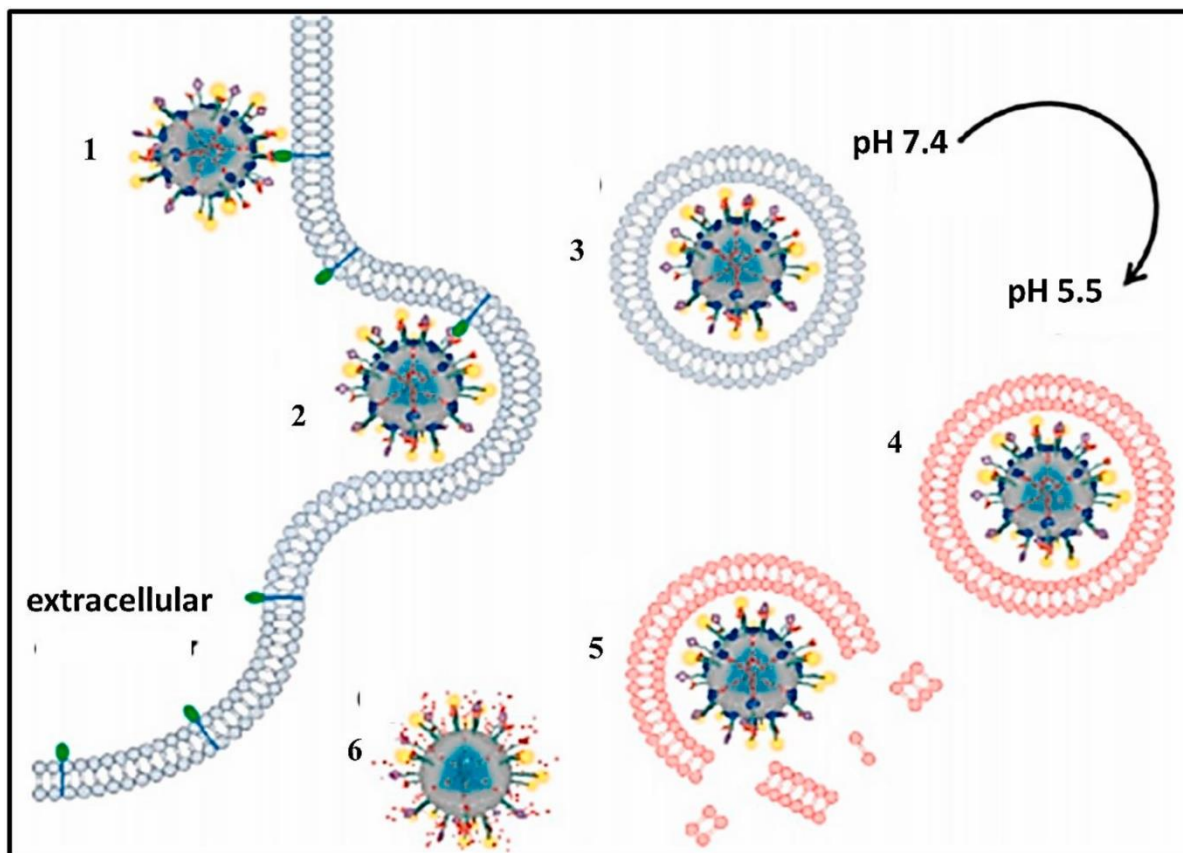
- MNP potaženy terapeutickými činidly
- Směrování do cílových buněk nebo tkání aplikací magnetického pole
=> dosažení maximální koncentrace léčiva v místě onemocnění
- Využívány zejména oxidy železa (supramagnetické, biokompatibilní, dobře odbouratelné v organismu pacienta)
- Nevýhody
 - tvorba shluků = možná embolizace uvnitř krevního řečiště
 - zaznamenána cytotoxicita pro jaterní buňky



Mesopory jako nosičové systémy

- Mesoporous silica nanoparticles (MSNs)
- Nanočástice s póry různé velikosti a tvaru
- Léčivo akumulováno uvnitř MSNs a chráněno proti předčasné degradaci před dosažením stanoveného cíle či znehodnocení vazbou mimo biolog. cíl
- K přesnému cílení na mesopory navázány specifické ligandy nebo protilátky
- Endocytóza do buněk a kontrolované uvolňování léčiva v nádorových buňkách (hypoxické prostředí, nižší pH)



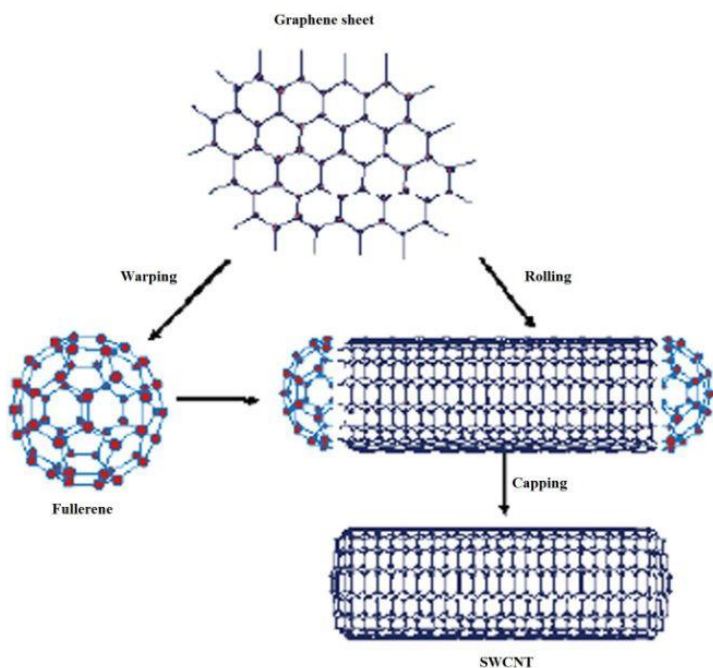


liposome-based smart drug delivery system for cancer therapy (Hossen et al., 2019)

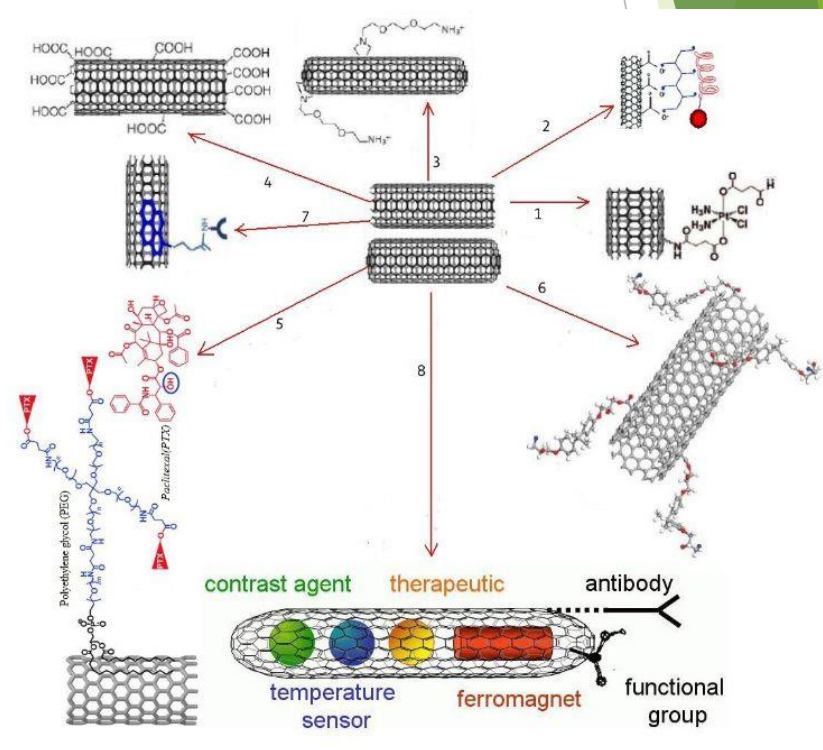
(1) Aktivní připojení nanonosičů k receptoru buněčného povrchu; (2) Endocytóza intermediovaná ligandem/receptorem; (3) Zachycení MSNs (mesoporous silica nanoparticles) uvnitř endozomu; (4) Vliv intracelulárního prostředí na endozom; (5) Aktivace vypuštění „nákladu“ nanonosičů, tedy získání přístupu k cytoplazmě; (6) Řízené doručení léčiva do buňky.

Karbonové nanotrubičky

- Schopné procházet bariérou různých buněčných kompartmentů

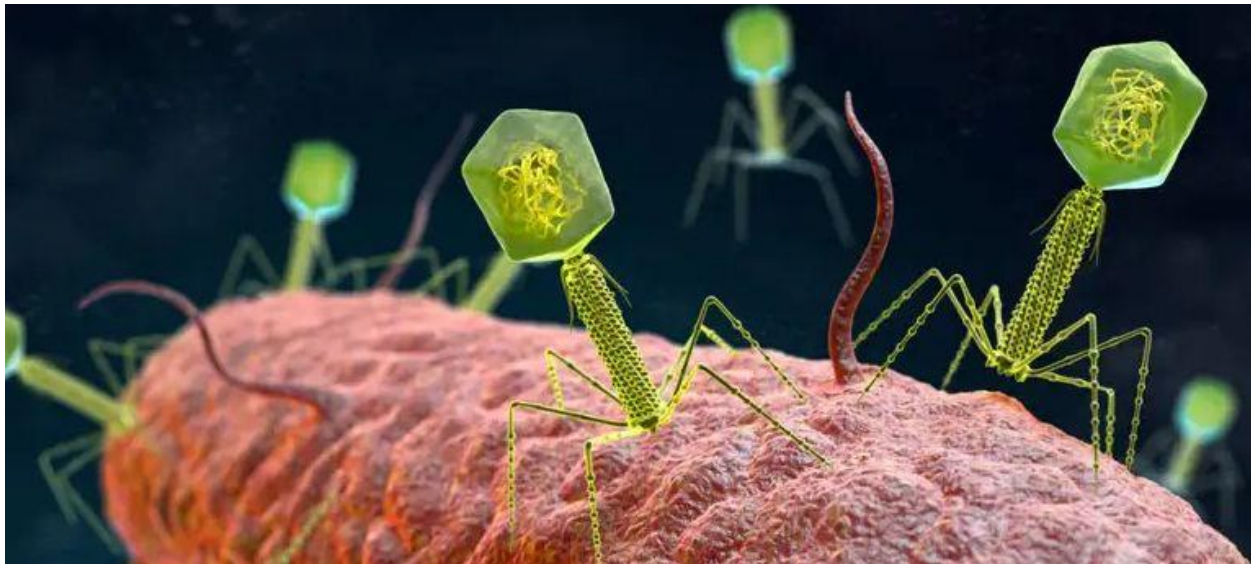


Kushwaha *et al.*, 2013; <https://core.ac.uk/download/pdf/268264698.pdf>



Viry jako nanotransportéry léčiv

- Nanotransportéry pro dopravu léčiv, ale i genů či DNA vakcín
- Biokompatibilní
- Strukturně uniformní
- Snadno produkovány ve velkých množstvích
- Kapsida lehce modifikovatelná funkčními skupinami
- Proces uzavření léčiva do virové kapsidy se liší podle druhu viru



Viry testované pro transport léčiv

Adenovirus

- Doprava tumor supresorových genů p53 a p16, antisense DNA, ribozymů a protilátek do lidských buněk

CCMV (Virus chlorotické skvrnitosti vigny)

- Doprava ftalocyaninu pro fotodynamickou terapii



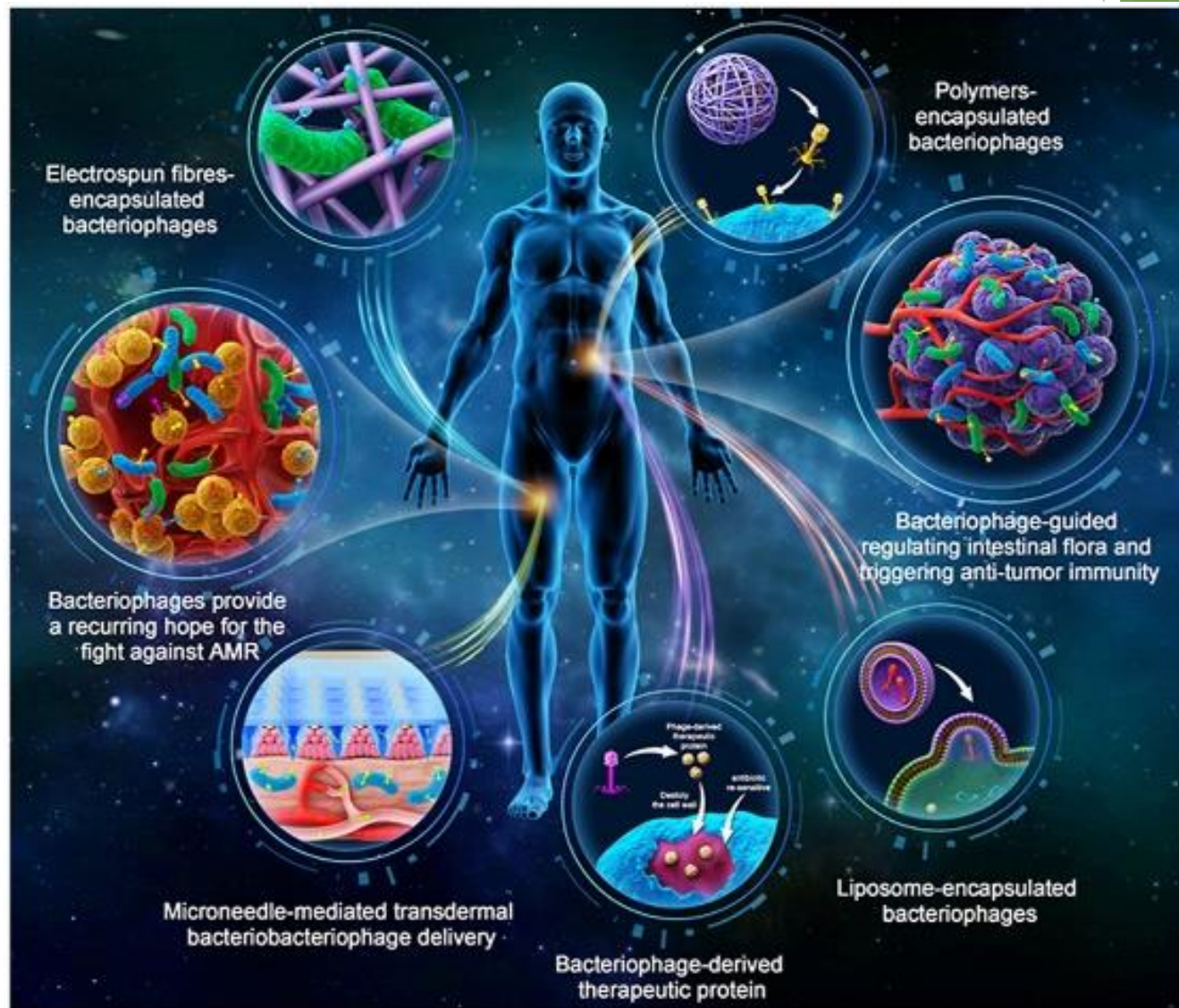
MS2 bakteriofág

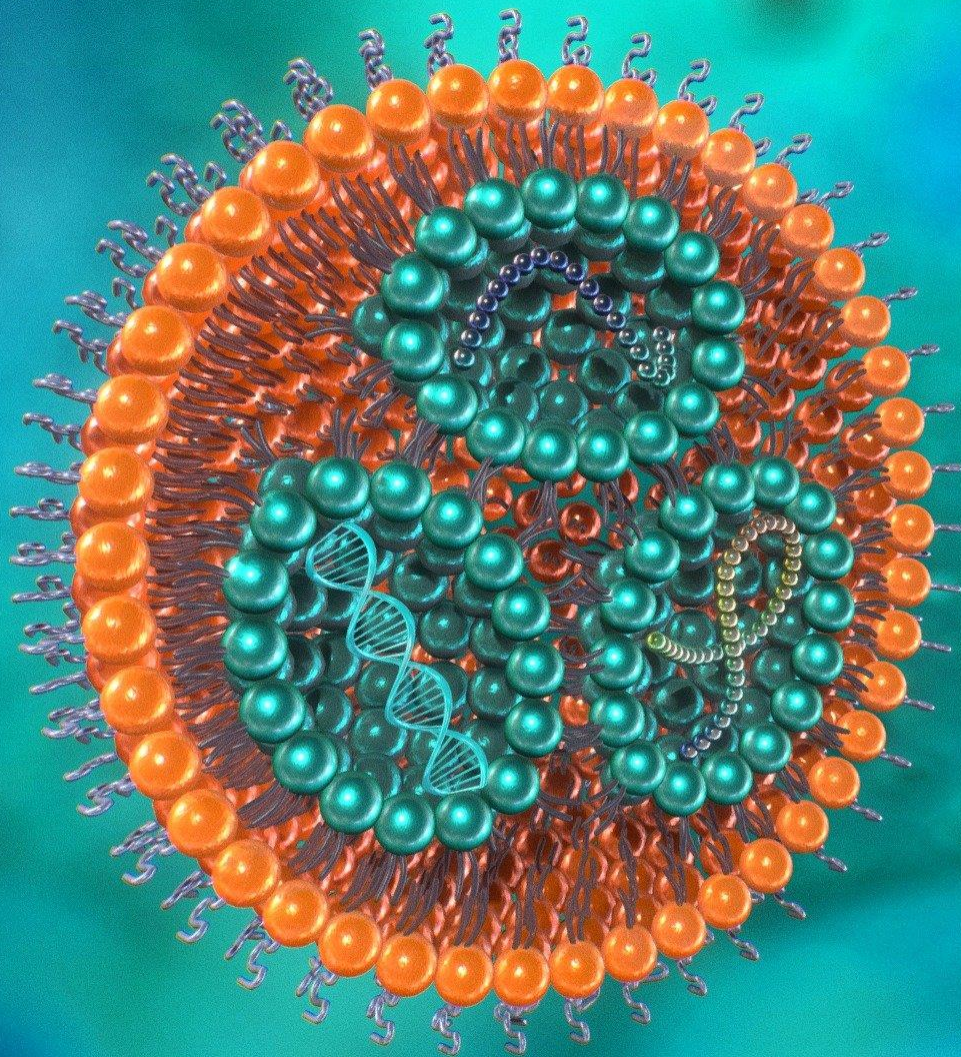
- Doprava porfyrinů pro fotodynamickou terapii, doxorubicinu a cisplatiny do buněk lidského hepatocelulárního karcinomu

M13 bakteriofág

- Doprava ftalocyaninu zinku uzavřeného v liposomech do buněk nádoru prsu
- Cílená doprava doxorubicinu (povrch bakteriofága byl konjugován s folátem pro cílení do nádorové tkáně a uvolnění „nákladu“ po snížení pH)

Bakteriofágové transportéry





Děkuji Vám za pozornost