



JAGIELLONIAN UNIVERSITY
IN KRAKOW



Farmakologia
przyszłości

CDT-CARD: Laboratorium Farmakokinetyki i Wstępnych Badań Toksykologicznych

Dr hab. Gniewomir Latacz

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych

Wydział Farmaceutyczny UJ CM

Spotkanie naukowe

**Farmakologia
Przyszłości**

16-19 LISTOPADA 2021



**Fundusze
Europejskie**
Inteligentny Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



Centrum Rozwoju Terapii Chorób Cywilizacyjnych i Związanych z Wiekiem UJ CM (CDT-CARD)

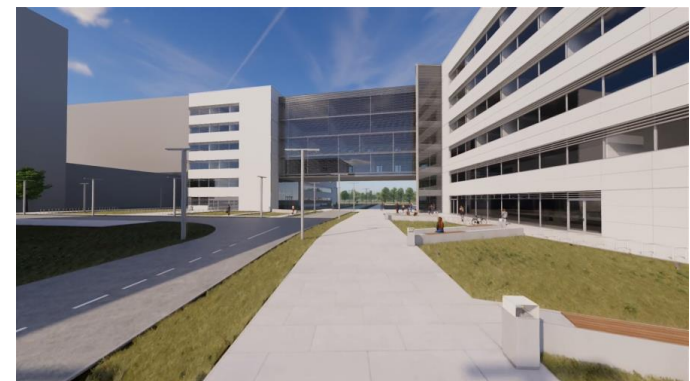
***Laboratorium
Farmakokinetyki
i Wstępnych Badań
Toksykologicznych***



- ***Pracownia badań biochemicznych***
- ***Pracownia hodowli mikrobiologicznych***
- ***Pracownia hodowli komórkowych i organotypowych***
- ***Pracownia mikroskopowa***

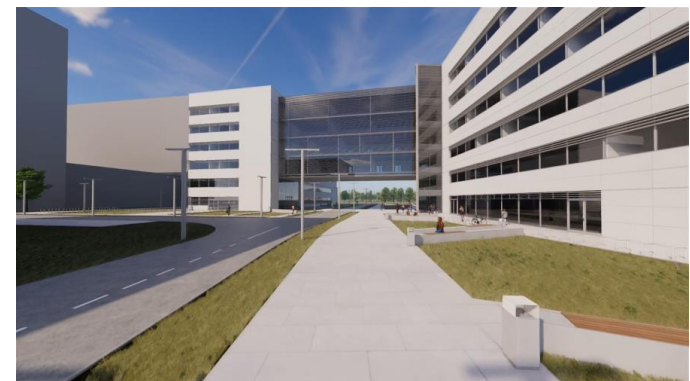
Projekt CDT-CARD - interdyscyplinarny, innowacyjny ośrodek zajmujący się projektowaniem i testowaniem nowych terapii chorób cywilizacyjnych i związanych z wiekiem w badaniach przedklinicznych.

- poszukiwanie nowych celów terapeutycznych
- prowadzenie badań przedklinicznych
- selekcja nowych kandydatów na leki
- rozwój leku wspomagany modelami
- modelowanie in silico przebiegu choroby oraz skuteczności leczenia
- prowadzenie niekomercyjnych badań klinicznych
- rozwój pozafarmakologicznych metod terapii i profilaktyki.



Projekt CDT-CARD - interdyscyplinarny, innowacyjny ośrodek zajmujący się projektowaniem i testowaniem nowych terapii chorób cywilizacyjnych i związanych z wiekiem w badaniach przedklinicznych.

- poszukiwanie nowych celów terapeutycznych
- **prowadzenie badań przedklinicznych**
- **selekcja nowych kandydatów na leki**
- rozwój leku wspomagany modelami
- modelowanie in silico przebiegu choroby oraz skuteczności leczenia
- prowadzenie niekomercyjnych badań klinicznych
- rozwój pozafarmakologicznych metod terapii i profilaktyki.



„Drug-like properties,” czyli **lekoopodobne właściwości związku** to parametr, którym określa się związek, posiadający satysfakcjonujące wyniki badań w zakresie ADME-Tox (absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, eliminacji i toksyczności) przez co z dużym prawdopodobieństwem pomyślnie przejdzie I fazę badań klinicznych,,

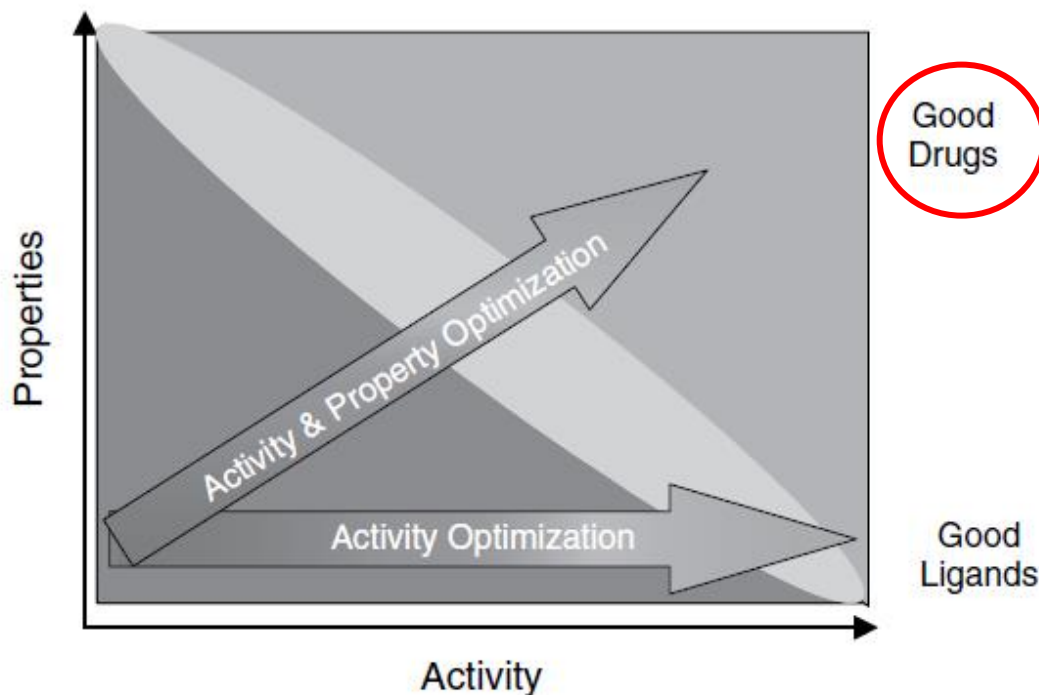
Prof. Christopher A. Lipinski

*Laboratorium
Farmakokinetyki
i Wstępnych Badań
Toksykologicznych*



*Oszacowanie parametrów
ADME-Tox metodami in vitro*

W nowoczesnym podejściu do opracowania nowego leku badania parametrów ADME-Tox nowych związków chemicznych prowadzone są **jak najwcześniej, najlepiej równoległe z określeniem ich aktywności farmakologicznej**



Dlaczego metody *in vitro*?

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE
w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych



Wprowadzone zasady są zgodne ze sformułowaną w 1959 r. zasadą 3R:

reduction,
refinement,
replacement

(ograniczenie, udoskonalenie i wyeliminowanie badań na zwierzętach)

William Russell, Rex Burch **1959 r.**

15 stycznia 2015 r. - wdrożenie dyrektywy 2010/63/UE w PL

10 sierpnia 2021 r. - Nowelizacja ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych.



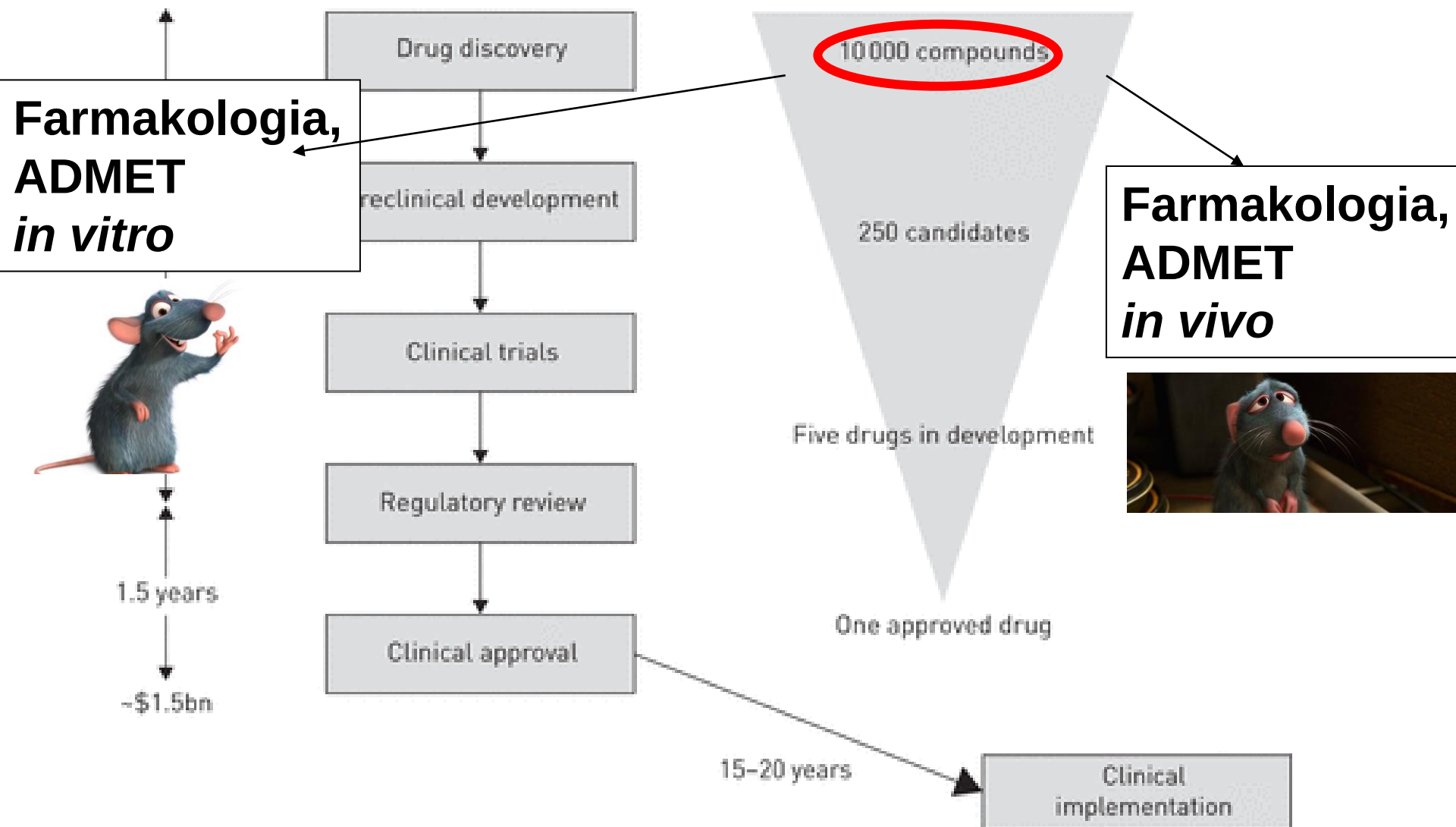


Ispra, Italy

<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam>

- opracowywanie
- walidacja
- zatwierdzanie metod alternatywnych wobec badań na zwierzętach

Pomimo znacznych postępów, na razie nie jest możliwe pełne zastąpienie badań na zwierzętach metodami alternatywnymi.





Laboratorium Farmakokinetyki i Wstępnych Badań Toksykologicznych



Fundusze
Europejskie
Inteligentny Rozwój

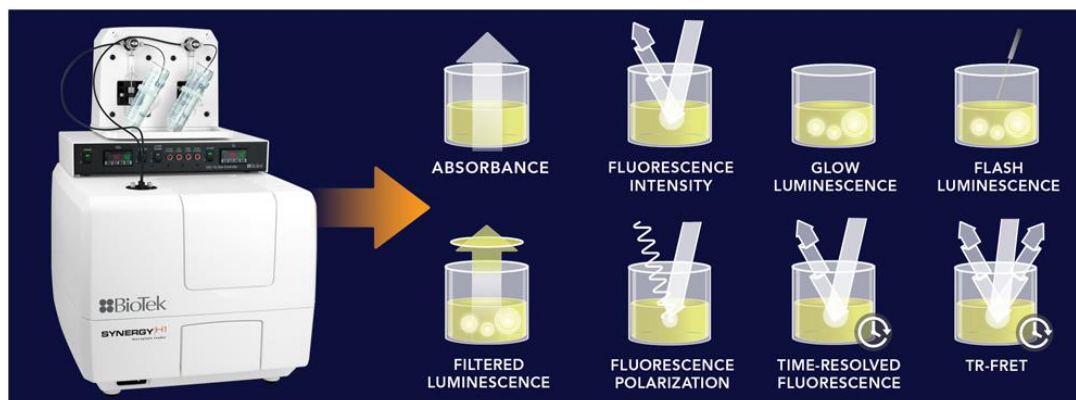
Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



2014 - 2020 działanie 4.2

Pracownia badań biochemicznych

- Wielofunkcyjny czytnik płytek BioTek Synergy H1MF



- Wirówki, wytrząsarki
- Wytrząsarki termostatowane
- Wagi analityczne

Analiza UPLC-MS, HRMS:
Laboratorium Małych Cząstek
w obrębie Centralnego
Laboratorium Analitycznego
CDT-CARD

Pracownia hodowli mikrobiologicznych

- Stół laminarny BSL II
- Wirówki, wytrząsarki
- Wytrząsarki termostatowane

Laboratorium Farmakokinetyki i Wstępnych Badań Toksykologicznych



**Fundusze
Europejskie**
Inteligentny Rozwój

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



2014 - 2020 działanie 4.2

Pracownia hodowli komórkowych i organotypowych

- *Agilent xCELLigence RTCA CardioECR System
(system do analizy indukowanych pluripotencjalnych
kardiomiocytów pochodzących z komórek macierzystych)*

- *Stoły laminarne BSL II (2 stanowiska)*
- *Inkubatory CO2*
- *Wirówki, wytrząsarki*
- *Wytrząsarki termostatowane*



Laboratorium Farmakokinetyki i Wstępnych Badań Toksykologicznych



**Fundusze
Europejskie**
Inteligentny Rozwój

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



2014 - 2020 działanie 4.2

Pracownia mikroskopowa

- Mikroskop odwrócony Leica DMI8 dedykowany do pracy we wszystkich dostępnych technikach obserwacji*
- Inkubator nastolikowy TOKAI HIT (komora do obserwacji przyżyciowych)*



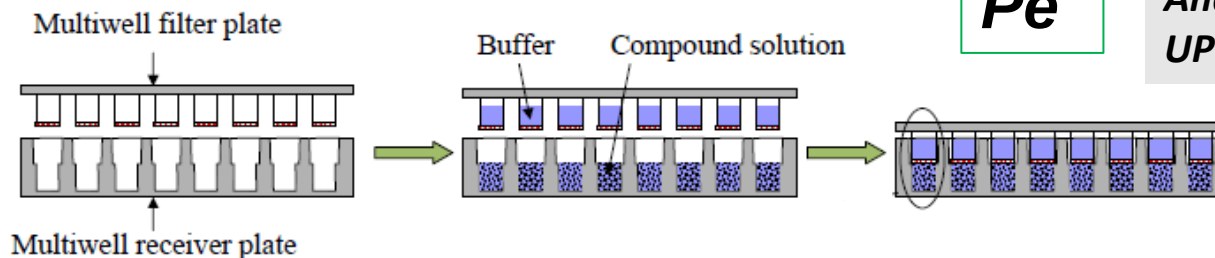


***Laboratorium
Farmakokinetyki
i Wstępnych Badań
Toksykologicznych***





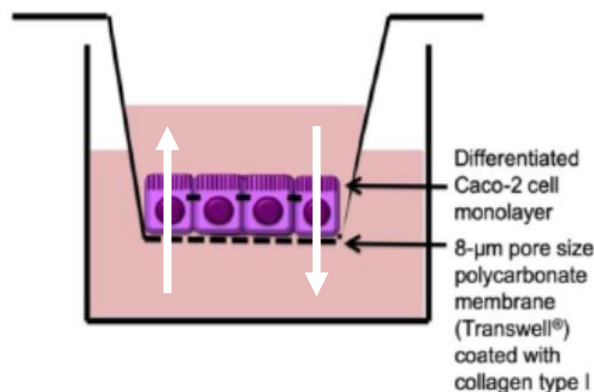
PAMPA



P_e

Analiza
UPLC-MS

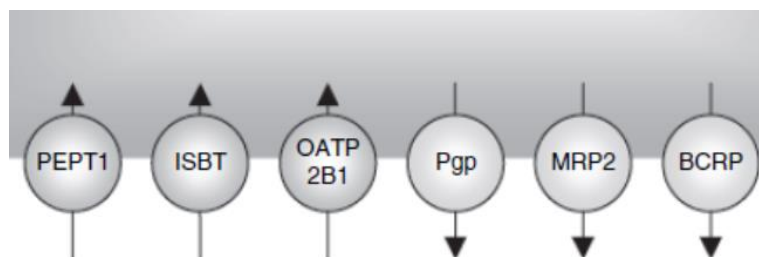
Caco-2, kokultury Caco-2/HT29-MTX, modele 3D na szkieletach hydrożelowych



P_{app}

Analiza
UPLC-MS

Identyfikacja substratów i inhibitorów transporterów „efflux” (Pgp) i „up-take” SLC (ang. solute carrier) OATP, OAT, OCT, PEPT



Luciferin →
Firefly
Luciferase



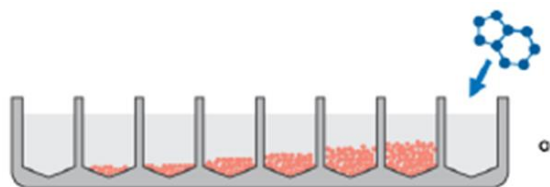
Analiza
UPLC-MS



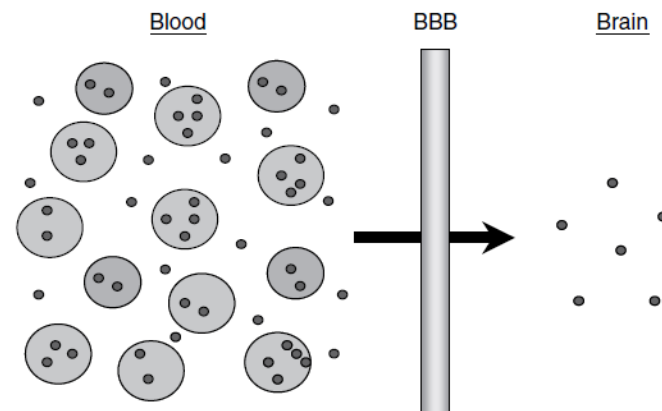


Powinowactwo do białek osocza

Metoda płytkowa (15 min.)

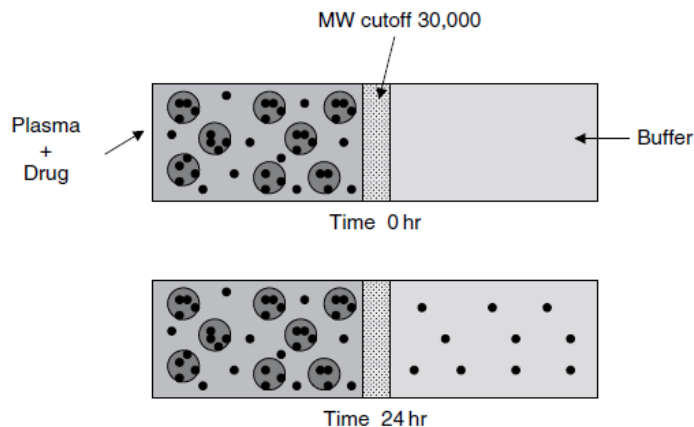


**Analiza
UPLC-MS**



Free drug molecules permeate through the BBB

Powinowactwo do białek osocza – dializa równowagowa (24h)



**Analiza
UPLC-MS**

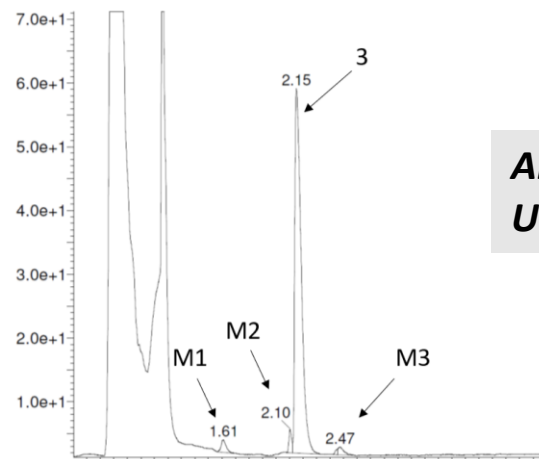
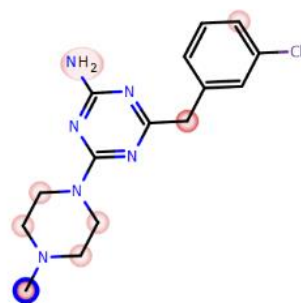
f_u, K_D

Stabilność w osoczu

**Analiza
UPLC-MS**

Określenie struktur metabolitów I i II fazy przy użyciu mikrosomów, frakcji S9 wątroby lub hepatocytów pierwotnych

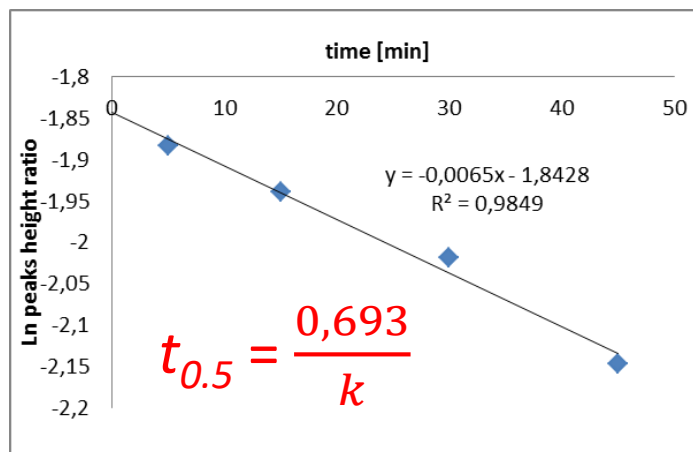
Metabolizm



**Analiza
UPLC-HRMS**

Wstępna analiza farmakokinetyczna przy użyciu mikrosomów, frakcji S9 wątroby lub hepatocytów pierwotnych.

Eliminacja



$Cl_{int}, t_{0.5}$

**Analiza
UPLC-MS**



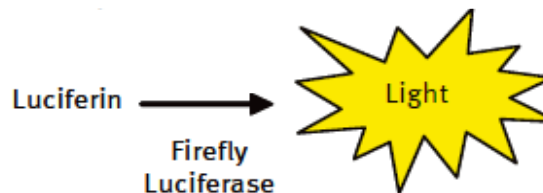
Metabolizm

*Fenotypowanie izoform enzymów zaangażowanych w I i II fazę metabolizmu
(cytochromy P-450, UDP-glukuronylotransferazy)*

**Analiza
UPLC-MS**

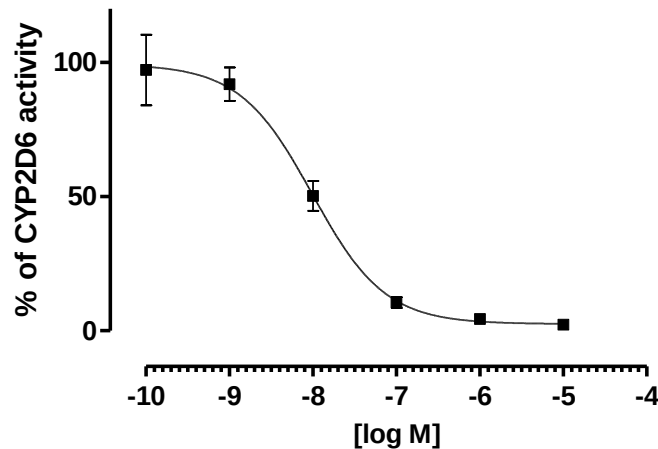
Toksyczność
(DDI)

Określenie inhibicji/aktywacji cytochromów p450



**Analiza
UPLC-MS**

CYP2D6



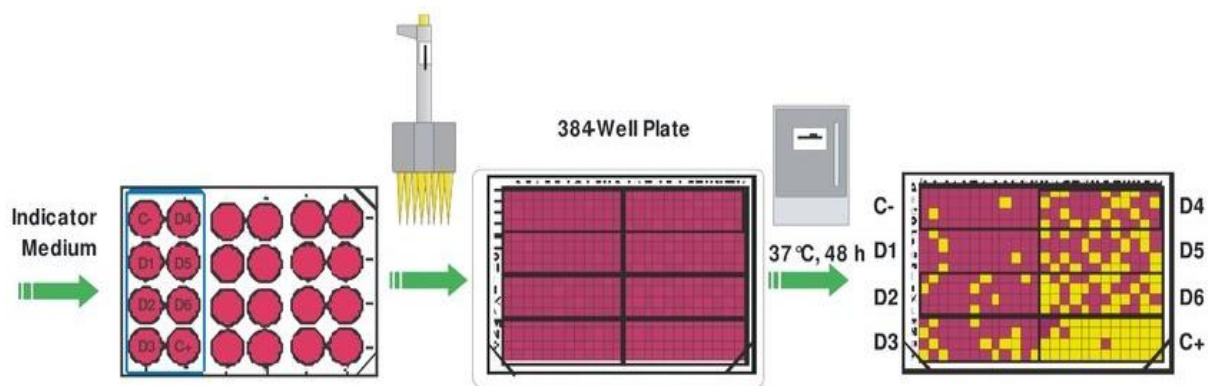
■ Quinidine
 $IC_{50} = 0.01 \mu M$

IC_{50}



Toksyczność

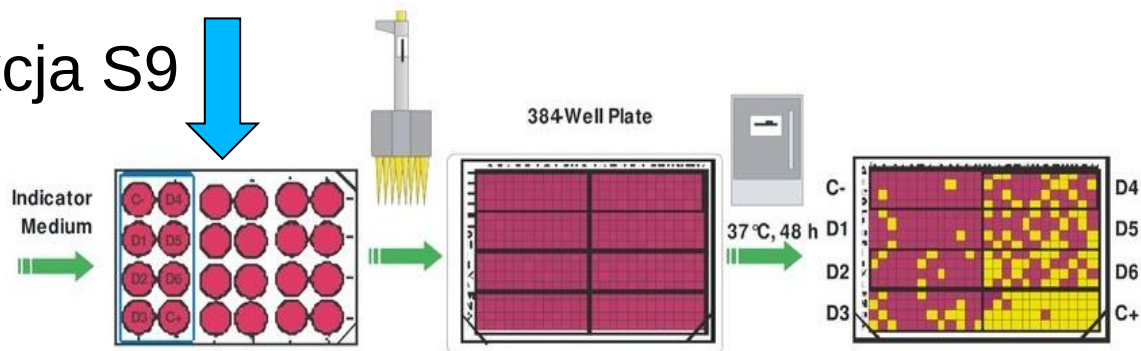
*Analiza mutagenności – mikrobiologiczny test Amesa (*Salmonella Typhimurium*)*



Metabolizm

Analiza mutagenności metabolitów – test Amesa w obecności frakcji S9 wątroby

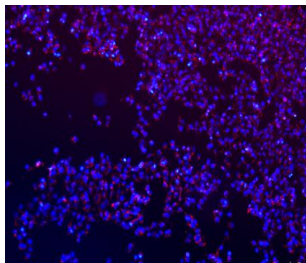
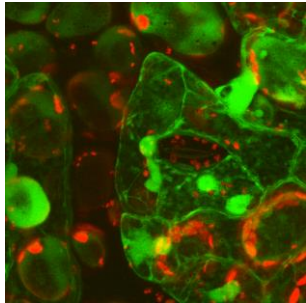
+ frakcja S9



Toksyczność

***Wieloparametrowa analiza cytotoksyczności
(komórki HepG2 lub inne linie komórkowe po uzgodnieniu)***

- Rozmiar i liczba komórek
- Analiza poszczególnych organelli
- Morfologia jądra komórkowego
- Genotoksyczność (test mikrojąder w kom. CHO-K1)
- Migracje komórek
- Potencjał błony mitochondrialnej
- Przepuszczalność błony komórkowej
- Stres oksydacyjny
- Fosfolipidoza
- Apoptoza



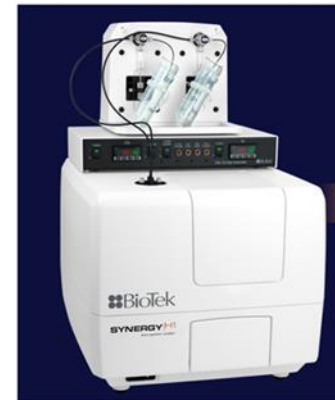
Toksyczność

Analiza toksyczności

(komórki HepG2 lub HepaRG 2D, 3D lub inne linie lub kokultury komórkowe po uzgodnieniu)

- Test MTS
- Test LDH
- Apoptoza
- Poziom wewnątrzkomórkowego ATP
- Poziom ROS

IC_{50}



Metabolizm

- Poziom GSH – wykrywanie reaktywnych metabolitów

Toksyczność

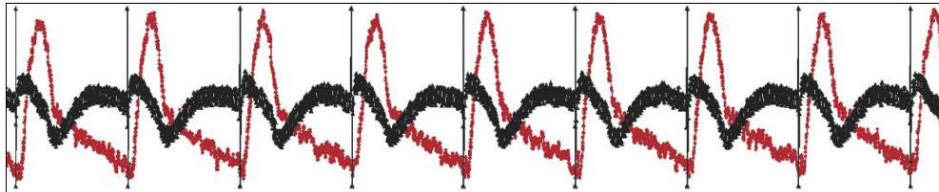
Analiza kardiotoksyczności



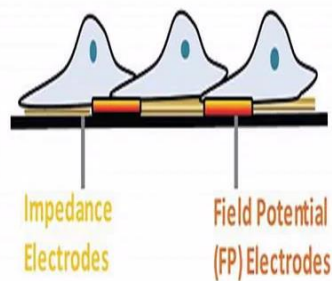
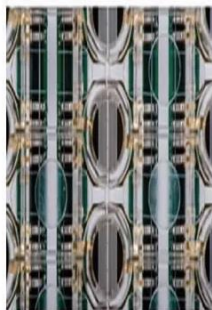
- *Agilent xCELLigence RTCA CardioECR System (system do analizy indukowanych pluripotencjalnych kardiomiocytów pochodzących z komórek macierzystych)*
- ***pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. induced pluripotent stem cells, iPSC) to rodzaj nadrzędnych komórek, które potrafią różnicować się w dowolną komórkę lub tkankę.***
- ***iPSC przekształcone w kardiomiocyty są obecnie **kluczowym modelem badawczym i narzędziem w badaniach kardiologicznych in vitro*****

Toksyczność

Analiza kardiotoksyczności



- Jednoczesny pomiar w czasie rzeczywistym aktywności skurczowej i elektrycznej kardiomiocytów na płytce 48-dołkowej
- Nieinwazyjne, oparte na **technologii impedancji elektrycznej** monitorowanie krótkoterminowej (ms) i długoterminowej (dni i tygodnie) aktywności komórkowej oraz potencjału pola w obecności badanej substancji



Optymalne warunki hodowli komórkowej dzięki umieszczeniu urządzenia w inkubatorze CO₂

Toksyczność

Analiza kardiotoksyczności



- *System xCELLigence RTCA CardioECR oferuje unikalną metodę oszacowania różnych przyczyn kardiotoksyczności ostrej lub długoterminowej:*

- *Toksyczność związana ze **zmianą kurczliwości***
- *Toksyczność związana ze **zmianą aktywności elektrycznej** (wpływ na poszczególne kanały jonowe: Na^+ , Ca^{2+} i hERG oraz charakterystyka potencjalnych blokerów wielokanałowych)*
- *Wpływ na **żywołność kardiomiocytów**, oszacowanie toksyczności długoterminowej leków onkologicznych*

Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay

Nowatorska inicjatywa badań przesiewowych w zakresie bezpieczeństwa wprowadzona przez: *FDA, Health and Environmental Sciences Institute, Safety Pharmacology Society*

Modyfikacja aktualnych wymagań zgodnie z wytycznymi ICH S7B dotyczącymi farmakologii bezpieczeństwa - **rozszerzenie analizy aktywności proarytmicznej!**



Dziękuję za uwagę!