VÝZKUMNÝ ZÁMĚR 1 - SYNTÉZA LÁTEK OVLIVŇUJÍCÍCH GLUTAMÁTERGNÍ NEUROTRANSMISI

Výzkumný cíl 4 : Zavedení nových výzkumných metodik

Aktivita 1 – Monitoring sledování neurochemických mechanismů poruch CNS

Cílem aktivity je navrhnout a vyvinout nové analytické metodiky a biomarkerové panely pro standardizované testování nových glutamatergních neurotransmisních látek pro efektivní sledování vybraných signálních molekul (neurotransmitery a jejich metabolity, aminokyseliny, biomarkery zánětlivých reakcí, biomarkery oxidativního stresu, atd.), v mozkové tkáni, mozkových mikrodialýzách, krvi a případně dalších biologických matricích. Cílem je vyvinout standardizované metodiky a panely těchto biomarkerů, aby byla zajištěna rychlá a přesná identifikace těchto molekul. Toho bude dosaženo splněním následujících kroků:

1) Výběr vhodných biomarkerů (pomocí fingerprintingu a profilování) pro včasnou diagnostiku, sledování patofyziologických procesů, sledování zázemí aplikované terapie.
2) Validace vyvinutých metod. Příprava biomarkerových panelů a jejich testování.
3) Validace metod pomocí testovacích panelů.
4) Použití vyvinutých metabolomických a proteomických panelů v modelových experimentálních studiích.
5) Využití vyvinutých metabolomických a proteomických panelů v klinických studiích.
6) Vývoj metod pokročilého statistického vyhodnocení.
7) Zavedení vyvinutých panelů biomarkerů do experimentální a lineární praxe.

Jedním z hlavních problémů moderní společnosti je identifikovat potenciální biomarkery, které poslouží jako cenný včasný diagnostický nástroj k identifikaci podskupiny pacientů se zvýšeným rizikem vzniku neuropsychiatrických poruch. Dnešní molekulární vhled s využitím přístupů OMIC (metabolomika, proteomika, transkriptomie, genomika atd.) otevřel nové možnosti v diagnostice, patogenezi a farmakoterapeutickém monitorování těchto onemocnění. Technologie založená na technologiích OMIC pro detekci a kvantifikaci signalizačních molekul jsou slibné, protože změny metabolické exprese, změny jejich struktury nebo funkce mohou být použity jako indikátory patologických abnormalit ještě před rozvinutím klinických příznaků neuropsychiatrických poruch.

Průzkum o molekulární úrovni různých patologií umožňuje individuální přístup k pacientovi. Použití technologií hmotnostní spektrometrie umožňuje, díky jejich extrémně vysoké citlivosti, identifikovat nové biomarkery těchto onemocnění založené na identifikaci proteinů / metabolitů ve snadno přístupných tělesných tekutinách. Ideální biomarker je přítomen v tělesné tekutině dříve, než je onemocnění klinicky potvrzeno, má vysokou citlivost a specificitu a jeho koncentrační úroveň stanovená metodou je reprodukovatelná.

Plánujeme využít metody OMIC pro konstrukci standardizovaného souboru metod pro experimentální a klinické použití, které budou sloužit k objasnění molekulárních mechanismů a budou aplikovány pro diagnostiku a terapeutika psychiatrických poruch jako je úzkost, deprese, Alzheimerova choroba, Schizofrenie a bipolární poruchy. Naší ambicí je vyvinout biomarkerové panely pro různé patologické scénáře (neurotransmitery a jejich metabolity, záněty, oxidativní stres, léky a jejich metabolity atd.) psychiatrických poruch. Cílem této aktivity je také vybudovat výzkumnou infrastrukturu pro sledování

molekulárních základů neuronálních onemocnění se zaměřením na včasnou detekci a lepší porozumění jejich molekulárních mechanismů a monitorování pokroku nebo úspěchu zvolené terapie. Bude rozšířen repertoár biochemikálií nebo malých molekul přítomných v buňkách, tkáních a tělních tekutinách známých jako proteom a metabolom. Dnes lékaři využívají jen velmi malou část informací obsažených v proteomu a metabolomu. Cílem navrhované činnosti je vytvořit strukturně-analytickou platformu pro detekci a kvantifikaci neurologicky významných molekul a rychle monitorovat důležité biochemické procesy.

Laboratoř bude akreditována Českým institutem pro akreditaci podle mezinárodní normy **EN ISO / IEC 17025:** V souladu s MRA CIPM (viz http://www.bipm.org/en/cipm-mra/) bude rovněž přidružená laboratoř Českého metrologického ústavu, která je v rámci dohody Mezinárodního výboru pro váhy a opatření mezi národními metrologickými institucemi. V oblasti analytické chemie v České republice má status nejvyšší autority v oblasti měření v chemii. Pokud centrum prokáže nejvyšší úroveň v nové oblasti metrologie, bude integrováno do Českého metrologického ústavu jako nejvyšší autorita v oblasti proteomiky, metabolomiky a některých lékařsky atraktivních markerů.

Aktivitou bude dodsaženo zavedení bioanalytických metod založených na využití statistice, které by měli přinést i následující konkrétní výsledky, které jsou stručně shrnuty v následujících bodech:

1) zavedení včasné diagnostiky a léčebných metod pro pacienty s těžkými neurologickými onemocněními a pro navrhování základních výzkumných studií v těchto oblastech
2) umožnit doktorským studentům pracovat s nejmodernějšími analytickými nástroji
3) zvýšit přitažlivost zahraničních doktorských studentů i vedoucích vědců
4) zvýšit konkurenceschopnost pracovišť mimo město s cílem získat zahraniční granty
5) zajistit větší spolehlivost při interpretaci dat v biomedicíně
6) posílit základní výzkum v instrumentální chemii, který v současné době v České republice není příliš silný
7) rozšířit spektrum odborných znalostí pro jiné odvětvové organizace
8) klíčový výstup na mezinárodní úrovni je zapojit projekt do prestižních evropských výzkumných konsorcií

Zúčastněné instituce: Národní ústav duševního zdraví - doc. Ing. Petr Kačer, PhD.

Aktivita 2 – Systémy transportu léků do CNS

V této aktivitě se práce zaměří na transportní systémy pro podávání léků zaměřených na nízkou stabilitu léčiva v krevní plazmě, a proto systém pro podávání farmaka bude použit jako ochrana proti řadě enzymatických systémů přítomných v krevním řečišti. Připravíme několik transportních systémů pro nově připravené kandidátské API a zhodnotit jejich biologickou dostupnost pro CNS. Pozornost bude věnována především liposomům, dopravním systémům nanočástic a micelům.

Hematoencefalická bariéra účinně chrání mozek, ale představuje velkou výzvu pro podávání léků přes tuto bariéru. Mnohé tradiční léky nemohou překonat hematoencefalickou bariéru v znatelných koncentracích, přičemž méně než 1% většiny léků přichází do centrální nervové soustavy. Vzhledem k neefektivní povaze většiny léčby poruch centrální nervové soustavy je vývoj nových systémů pro podávání léků oblastí zájmu a aktivního výzkumu. Do farmaceutické praxe bylo zavedeno několik nových způsobů podávání léků, včetně intranazálního podávání léčiva, nanočástic, modifikací léků, infuze s konvexní podporou a ultrazvukem zprostředkovaného podávání léků. Zlepšené podávání léků centrální nervové soustavy je mimořádně důležité a umožní lepší léčbu onemocnění centrálního nervového systému, což vede ke zlepšení léčby u těch, kteří trpí onemocněním centrálního nervového systému.

Cílená doprava drog z hlediska nanomedicíny je založena na obecném přístupu, kdy nanočástice zapouzdřují drogu. Místo toho samotné nanočástice nebo rozpoznávací prvky na jejich povrchu mohou na základě specifických receptorů na povrchu buněk najít správné místo pro činnost. Skutečná realizace zahrnuje přípravu nanočástic, zachycování léčiv a připojení specifických receptorových protilátek. Ačkoli je základní koncepce TDD (cílová dodávka léku) jednoduchá, dopravní systém musí splňovat řadu podmínek. Za prvé, nanočástice musí mít vysokou kapacitu pro vybranou drogu. Dále musí zůstat stabilní za fyziologických podmínek. Tyto požadavky dobře splňují liposomy.

Liposomy

Patří do lipidových dvojvrstev tvořených hydrofilním jádrem. Tyto látky jsou připraveny z různých amfifilních fosfolipidů. Od svého objevu v roce 1965 Dr. B. Banghamem et al. jsou liposomy farmaceuticky používané jako nosiče v mnoha praktických aplikacích. Bylo připraveno a testováno mnoho liposomálních formulací a mnoho z nich je v současné době v klinickém testování. Liposomy jsou sférické částice s hydrofilním jádrem a jednou nebo více dvojvrstvovými lamelami (vrstvami) složenými z fosfolipidů o průměru 30 nm řádu několika mikrometrů. Liposomy mohou být rozděleny do několika podtypů podle velikosti a struktury vrstev. Vícelamelové liposomy typicky mají průměr od 500 nm do 10 um, zatímco malé unilamelární liposomy obvykle mají méně než 50 nm a velké unilamelární lipozomy jsou větší než 50 nm. Liposomy se tvoří, když je tenká lipidová fólie hydratována vodným pufrovacím roztokem, následovaným ultrazvukem nebo opakovaným protlačováním přes 100nm polykarbonátovou membránu, aby se snížila jejich velikost a snížila veliksot distribuce liposomů.

Fyzikální a chemické vlastnosti liposomů (např. povrchový náboj, velikost a stabilita) závisí na složení liposomů. Pro řízení náboje na povrchu liposomů lze použít odlišně nabité lipidy. Výhodou liposomů je biokompatibilita a možnost ukotvení do jejich struktury jak hydrofilních, tak lipofilních látek ve vodném prostředí nebo v membráně. Ukotvení hydrofobních léčiv uvnitř liposomu významně zvyšuje jejich rozpustnost ve vodných roztocích. Velikost, povrchová náplň a vlastnosti povrchu silně ovlivňují

farmakokinetický profil ukotveného léčiva. Tyto vlastnosti se mohou měnit v závislosti na požadovaných vlastnostech přidáním excipientů do lipidové směsi před přípravou liposomu nebo vhodným nastavením reakčních podmínek. Liposomální formulace použitá v klinické praxi je formulována z dimyristoylfosfatidylcholinu a dimyristoylfosfatidylglycerolu (DMPG). Předklinické údaje ukázaly rozdílný profil biodistribuce a účinnosti liposomu oproti původnímu API.

Polymerní micely

Polymerní micely jsou agregační bloky kopolymeru s jádrovou strukturou, do které mohou být ukotveny léčivé látky. Jednoduchost přípravy micel a vázání účinné složky na strukturu společně se schopností změnit chemické složení, blokovou délku kopolymeru, velikost kontrolních micel a morfologii umožňuje jejich široké farmaceutické použití. Polymerní micely předpokládají ve svém účinku akumulaci léčiva.

Propustnost membrán může být řízena efektivními micelovými průměry, které jsou připraveny od 20 do 100 nm. Polymerní micely mohou tak chránit API před degradací a dosáhnout řízeného dodávání látky do místa působení. Polymerní micely v různých lékových kompozicích byly zkoumány pro parenterální, orální, nosní a oční aplikace. Mnoho z těchto studií ukázalo jasné výhody, včetně zvýšení biologické dostupnosti nebo snížení nežádoucích účinků. Nejběžněji používanými kopolymery pro léčivé přípravky jsou polyaminové kyseliny (například kyselina poly (asparagová) nebo kyselina poly (glutamová)). Maeda a jeho kolegové poprvé popsali komplexaci API s kopolymerem PEG-PAsp, který vedl k spontánní formulaci stabilní polymerní micely s vysokou vazebnou kapacitou pro API.

Příklad polymerních micel jako transportního systému pro API je blokový kopolymer PEG a blokový kopolymer poly (glutamové kyseliny). Hydrofilní PEG řetězec je umístěn na vnější straně micely a řetězec komplexu PGlu-API vyplňuje vnitřní jádro micely. Molekulová hmotnost PEG-□-PGlu ve formě sodné soli je 18 kDa s obsahem API 19,6-47,6% v závislosti na době přípravy. Klinické studie ukázaly lepší toleranci (tj. méně nežádoucích účinků) než samotný API (zejména toxicita).

Nanočástice

Zlaté nanočástice se již dlouho používají pro katalýzu, biotest a zobrazovací techniky. Výhodou nanočástic zlata je jejich inertnost, zanedbatelná toxicita, biologická kompatibilita a snadná příprava. Nanočástice zlata mohou být také snadno modifikovány cílovými transportními skupinami, aby se zlepšila biologická dostupnost, a tak mají velký potenciál v cílené přepravě drog. Vstup nanočástic zlata do buněk je zprostředkován endocytózou. V současné době bylo připraveno několik typů nanočástic zlata s různými API, kde byl platinový komplex vložen na povrch nanočástic zlata, který se vyskytoval ve formě Au-Au2S. Příprava různých velikostí nanočástic zlata v rozmezí od 13 do 60 nm je proveditelná redukcí solí zlata ve vodě. To umožňuje dosáhnout velkého vazebného povrchu API.

Magnetické nanočástice železa

Magnetické nanočástice jsou slibným nosičem pro cílené přivádění léčiv do místa působení, protože mají schopnost úmyslně navádět léčivo na biologický cíl pomocí magnetického pole. Tato vlastnost magnetických nanočástic se již používá při zobrazování magnetickou rezonancí, kde se jako kontrastní médium používají magnetické nanočástice. Navíc povrch nanočástic může být modifikován různými cílovými transportními činidly, jako jsou monoklonální protilátky, peptidy nebo malé molekuly schopné usnadnit vstup magnetických nanočástic do mozku. Povrchová modifikace takzvaného superparamagnetického oxidu železa

(SPION) je jednou z variant nosiče léčiva, která dosahuje biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost a schopnost vytvářet disperzní roztoky při zachování magnetických vlastností, čímž se dosáhne přesnějšího transportu do požadovaného oddělení mezi dvojvrstvy v hydrofobním prostředí nebo uvnitř jádra v matici SiO_2. Tyto konjugáty také vytvářejí stabilní disperzní konjugáty a jejich relativní velikost je poměrně velká (asi 200 nm) oproti jiným anorganickým c nanočásticím. Látky s takovými rozměry mohou být vyloučeny z těla retikuloendoteliálním systémem. Nanočástice Au-Fe_3O_4 o průměru 32 nm byly použity jako multifunkční platforma pro specifickou cílenou dopravu dalších API.

Nanočástice oxidu titaničitého

Jednou z možných potenciálních cest se zdá být příprava nanočástic na bázi titanu. Pórovitý oxid titaničitý (TiO_2) nabízí mnoho možností použití kvůli vysoké fotokatalytické aktivitě nebo specifickému povrchu schopnému různých modifikací. Oxid titaničitý je typický polovodivý materiál, který má širokou škálu aplikací, jako je fotokatalýza, senzorická energie, skladování energie nebo lék (například protirakovinné léčivo a implantáty). Nanočástice TiO_2 vykazují chemickou stabilitu, zanedbatelnou toxicitu a vynikající biologickou kompatibilitu. V současné době byly připraveny hybridní nanočástice na bázi polyethyleniminu (PEI) s ukotveným lékem, kde se uvolňování léčiva zabraňuje vytvořením hydrofilní PEI vrstvy. Následné použití UV záření vede k destrukci hydrofilní PEI vrstvy OH radikály, což umožňuje uvolňování léčiva. Tato cesta se zdá být potenciální pro cílenou dopravu.

Nanočástice oxidu křemičitého

Aplikace nosičů porézních nanomateriálů pro cílenou dopravu je v současnosti předmětem zájmu. Jednou z dalších možných metod je použití mezoporézních nanočástic křemíku, které vykazují vynikající chemicko-fyzikální vlastnosti, které mají vhodný poměr objemu k povrchu, s nanočásticemi až 700-1000 $m^2 \cdot$ kg-1, s velkým počtem pórů až 0, 9 $cm^3 \cdot$ g-1. Další výhody nanočástic křemíku zahrnují vysokou tepelnou, chemickou a mechanickou stabilitu, homogenní stabilitu, zanedbatelnou toxicitu, biologickou rozložitelnost a biologickou kompatibilitu, které byly prokázány jak in vitro, tak i in vivo. U nanočástic SiO_2, jako u titanu, zlata a magnetických nanočástic, se mohou nanočástice pohybovat v rozmezí od nanometrů do stovek nanometrů a modifikovat svůj povrch pro cílené použití ve farmacii. Imobilizace léčiva se může nastat buď v rámci struktury nanočástic nebo na povrchu modifikovaných nanočástic SiO_2 pomocí kovalentní vazby přes polymerní řetězec. Uvolňování léků se obvykle vyskytuje, když se nanočástice degradují erozí, desorpcí, difúzí nebo v prostředí s nižším pH.

Zúčastněné instituce: Národní ústav duševního zdraví: doc. Ing. Petr Kačer, PhD.

Literatura:

1) Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S: Nanoscale Res Lett. *8*, 102 (2013).
2) Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C.: J. Mol. Biol. *13*, 238 (1965).
3) Butler J., Sadler P.: Curr. Opin. Chem. Biol. *17*, 175 (2013).
4) Ganta S., Singh A., Patel N., Cacaccio J., Rawai Y., Davis B., Amiji M., Coleman T.: Pharm. Res. *31*, 2490 (2014).
5) Gregoriadis G., Swain C. P., Wills E. J., Tavill A.S.: Lancet. *303*, 1313 (1974).
6) Liu D., He Ch., Wang A., Lin W.: Int. J. Nanomed. *8*, 3309 (2013).
7) Maeda H., Nakamura H., Fang J.: Adv. Drug Delivery Rev. *65*, 71 (2013).
8) Maeda H.: Adv. Enzyme Regul. *41*, 189 (2001).
9) Oberoi H., Nukolova N., Kabanov A.: Adv. Drug Delivery Rev. *63*, 1667 (2013).
10) Wang X., Guo Z.: Chem. Soc. Rev. *42*, 202 (2013).

Aktivita 3 – Zavedení GLP/GMP pro syntézu CNS farmak

Cílem je vybudování laboratoře pod správnou výrobní praxí (SVP) a její certifikace Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL).

Zejména se jedná o tyto dílčí cíle:

1) Vybudování a vybavení laboratoře odpovídající nárokům na SVP pro přípravu léčiv (syntéza, formulace, balení) a části pro analýzu léčiv dle lékopisu.
2) Certifikace pracoviště a vybavení Státním ústavem pro kontrolu léčiv, získání povolení k výrobě (syntéza, formulace, balení) a povolení k výrobě v rozsahu kontroly kvality (analýza surovin a léčiv, kontrola kvality).
3) Vývoj postupu pro přípravu metodou organické syntézy vybraných potenciálních psychofarmak, příprava 3 šarží (nezbytné pro schválení SÚKLem), získání certifikace pro výrobu daných psychofarmak.

Výzkum nových léků a přípravků pro diagnostiku chorob je v ČR podporován v rámci mnoha grantů a center, jejichž výstupem je řada skutečně nadějných látek, avšak drtivá většina z nich končí ve stádiu základního výzkumu. Pro přenos z akademického výzkumu do praxe je nezbytné projít několika fázemi klinických studií, kterým předchází tzv. preklinická studie. Pokud tyto májí být provedeny, je nezbytné jako vstup dodat látku v lékopisné kvalitě (resp. vyrobenou pod SVP, certifikováno Státním ústavem pro kontrolu léčiv po inspekci; obnova (s inspekcí) každé 2 roky). SVP definuje vyhláška 2003/94/EC, zákon o léku, předpis VYR-32 na stránkách SÚKL a jejím cílem je systém (za)jištění kvality ve farmacii, zejména se jedná o prostory s řízenou kvalitou vzduchu, kvalifikované (validované, kalibrované) přístroje, systém školení pracovníků, předpisovou a záznamovou dokumentaci, kontrola vstupních a surovin výstupních produktů (dle lékopisu).

V případě psychofarmak vč. omamných a psychotropních látek je nezbytné, aby výrobce této látky v lékopisné kvalitě byl držitelem také oprávnění nakládání s OPL. Žádný výrobce léčiv v ČR toto oprávnění nemá, v EU pouze jedna společnost (THC Pharm), která se však specializuje pouze na kanabinoidy. Toto velmi limituje možnosti pokročilých fází klinických studií, které se bez látky vyrobené pod SVP neobejdou. NUDZ jako jedno z mála pracovišť, které má povolení k nakládání s OPL, je ideálním místem pro vybudování vlastní laboratoře pod správnou výrobní praxí. Toto usnadní posun výzkumu z akademické úrovně k praktickému využití.

Cílem projektu je tady vybudování a vybavení laboratoře odpovídající nárokům na SVP pro přípravu léčiv klasickým syntetickým vybavením, velikost šarží v desítkách až stovkách gramů. Produkované množství je dostačující pro preklinické i klinické studie. Dalším krokem je tzv. formulace (využití pomocných látek, tzv. excipientů, přípravě finální formy), plnění do tabletek, kapslí a želatinových tobolek a následné balení. Součástí je vlastní certifikované analytické vybavení jako tzv. povolení k výrobě v rozsahu kontroly kvality (analýza surovin a léčiv, kontrola kvality), čímž je minimalizována nutnost externích certifikovaných analýz (tyto jsou velmi finančně nákladné). Součástí projektu je vývoj postupu pro přípravu metodou organické syntézy vybraných potenciálních psychofarmak, příprava 3 šarží (nezbytné pro schválení SÚKLem) a získání certifikace pro výrobu těchto psychofarmak.