

Farmacologia Applicata
CTF
AA 2023/24

Prof.ssa Patrizia Romualdi, PhD

PRESENTAZIONE DEL CORSO, 2 CFU

Modulazione farmacologica dell'interazione farmaco-recettore

Metodi di studio delle interazioni farmaco-recettore; Recettori e trasduzione del segnale; Modulazione delle risposte recettoriali.

Recettori accoppiati alle proteine G : attivazione e modulazione.

Modulazione farmacologica dei meccanismi intracellulari di trasduzione del segnale.

Modulazione delle risposte recettoriali: mediante la farmacologia applicata si studiano i recettori per mettere a punto nuovi farmaci

Modulazione farmacologica dell'espressione genica

Sistema oppioide endogeno - Meccanismi intracellulari di regolazione dell'espressione genica. Farmacologia della trascrizione genica –

Impiego di metodiche di biologia molecolare per la caratterizzazione farmacologica di farmaci peptidici e loro recettori, applicate alla farmacologia.

Modelli in vitro, alternativi all'utilizzo di animali, nella sperimentazione preclinica (colture cellulari, cellule staminali , c. *elegans*, zebrafish) - applicazioni in farmacologia.

Regola delle 3R e sperimentazione preclinica in modelli animali - applicazioni in farmacologia.

Testi consigliati:

F. Clementi, G. Fumagalli, "Farmacologia generale e molecolare" EDRA, V[^] Edizione, 2018.

Afferenza: Dipartimento FaBiT, sede ex Farmacologia, via Irnerio 48 Bologna

E-mail: patrizia.romualdi@unibo.it

Modalità di svolgimento dell'esame: orale

Orario di ricevimento: su appuntamento

Metodi di studio delle interazioni Farmaco-Recettore

✓ Caratteristiche del RECETTORE:

- tipologia
- localizzazione
- conformazione
- clonaggio
- sequenza

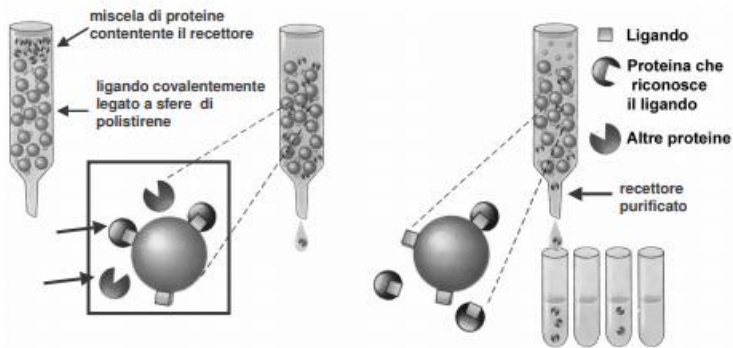


conoscere EFFETTO

Isolamento e purificazione di recettori

- Isolamento dell'organo
- Omogenizzazione
- Trattamento con detergenti

Tecniche di purificazione: la cromatografia di affinità



Sequenziamento dei recettori proteici

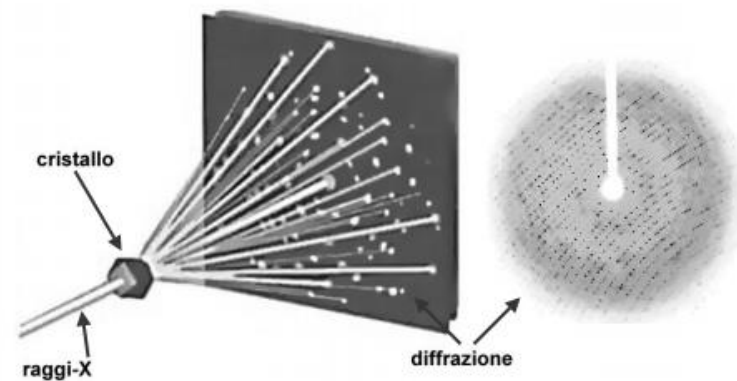
La degradazione di Edman
in quattro passi:

- 1) PITC si lega all'estremità N-terminale
- 2) Liberazione del derivato PITC/aminoacido (PTH)
- 3) Identificazione del PTH mediante HPLC
- 4) Si ripete dal punto 1) fino all'idrolisi della proteina intera



Sequenziatore automatizzato

Determinazione della struttura tridimensionale



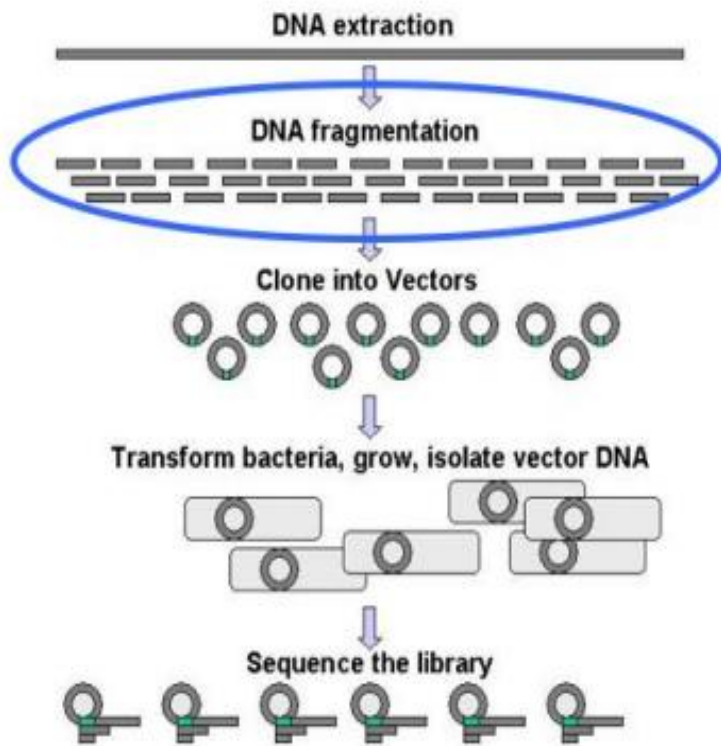


APPROCCIO SHOTGUN per il sequenziamento dei recettori (ma in generale del genoma):

Una molecola di DNA viene divisa in brevi frammenti che vengono sequenziati separatamente e successivamente assemblati.

La molecola di DNA è sottoposta a frammentazione fisica utilizzando la tecnica della **sonicazione** che mediante onde sonore ad alta frequenza, effettua rotture casuali della molecola.

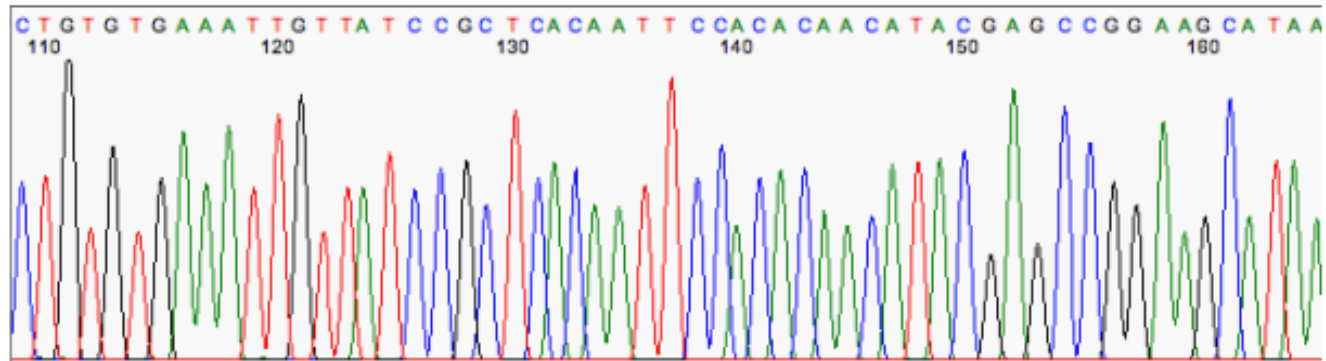
La **separazione** dei frammenti avviene mediante elettroforesi su gel di agarosio. I frammenti di DNA vengono **purificati e amplificati** mediante l'inserimento in un vettore plasmidico **per produrre una libreria di cloni sui quali vengono effettuati esperimenti di sequenziamento**. L'assemblaggio delle sequenze ottenute, chiamate **coting di sequenza**



Sequenziatori automatici a capillari tramite metodo di Sanger

I metodi più recenti di sequenziamento =>
Next Generation Sequencing
Pyrosequencing

CROMATOGRAMMA



Emissioni in fluorescenza che identificano ciascuna delle 4 basi del DNA

VANTAGGI :

- possibilità di identificare e decodificare le sequenze che codificano **per sottotipi recettoriali , isoforme**
- **medicina personalizzata:** ad esempio, l'analisi di tratti che rendono più o meno sensibili ad un farmaco può consentire la produzione dello stesso farmaco a dosaggi differenziati, che possono essere adeguatamente somministrati ad individui in possesso di una "carta d'identità genomica"

SVANTAGGI :

- **Problemi di assemblaggio**
- **Sequenze ripetute**
- **Gap di sequenze**

➤ Caratteristiche dell'interazione F-R

(in condizioni normali si parla di interazioni e legami reversibili)

- ❖ studi di *binding*
- ❖ studi di curve dose-risposta o concentrazione-risposta

Studi di *binding* = valutazione quantitativa dell'interazione fra un ligando marcato con un isotopo radioattivo ed una preparazione contenente il recettore (eventualmente isolato e purificato)

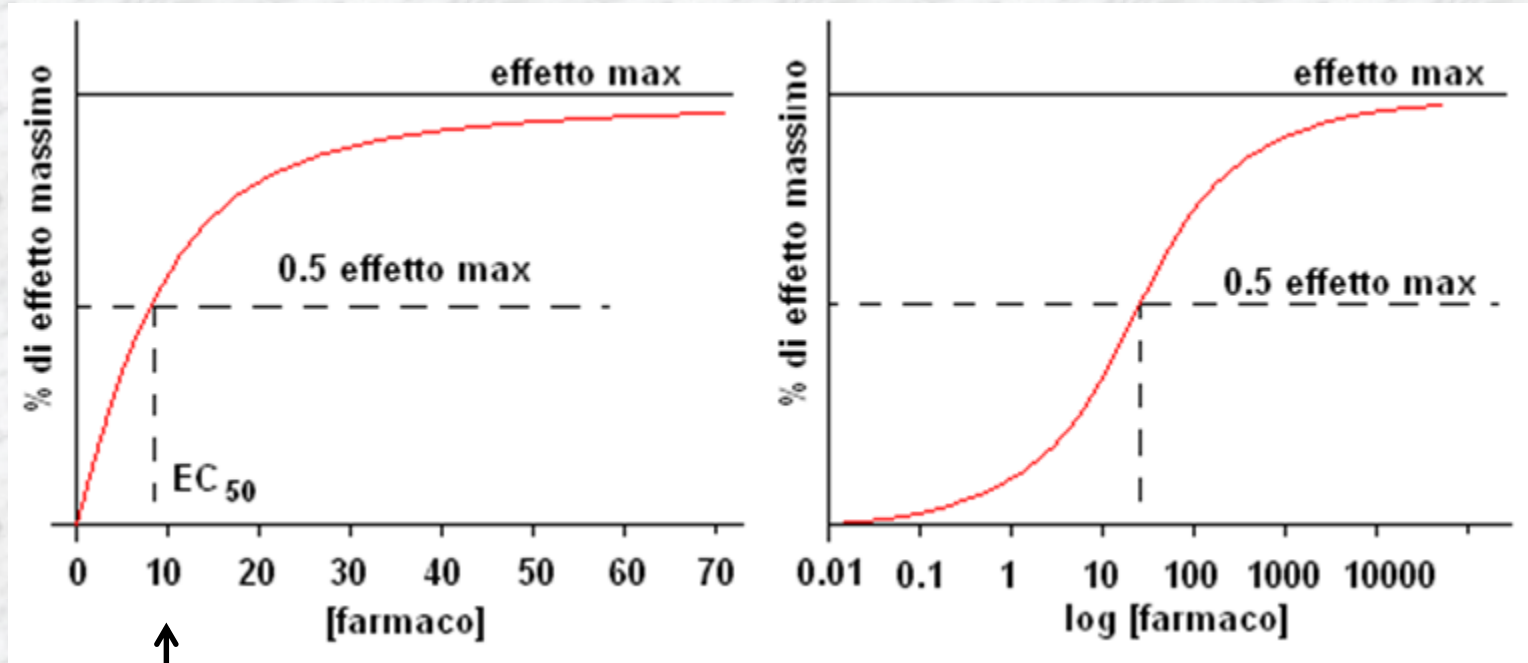
❖ **VANTAGGI:**

- *Determinare la specificità farmacologica*
- *Determinare caratteristiche dell'interazione F-R, es. affinità*
- *Determinare la localizzazione dei recettori*

❖ **SVANTAGGI : non distinguiamo agonisti da antagonisti**

Analisi delle curve dose-risposta dei farmaci

AGONISTA PIENO attività intrinseca = 1



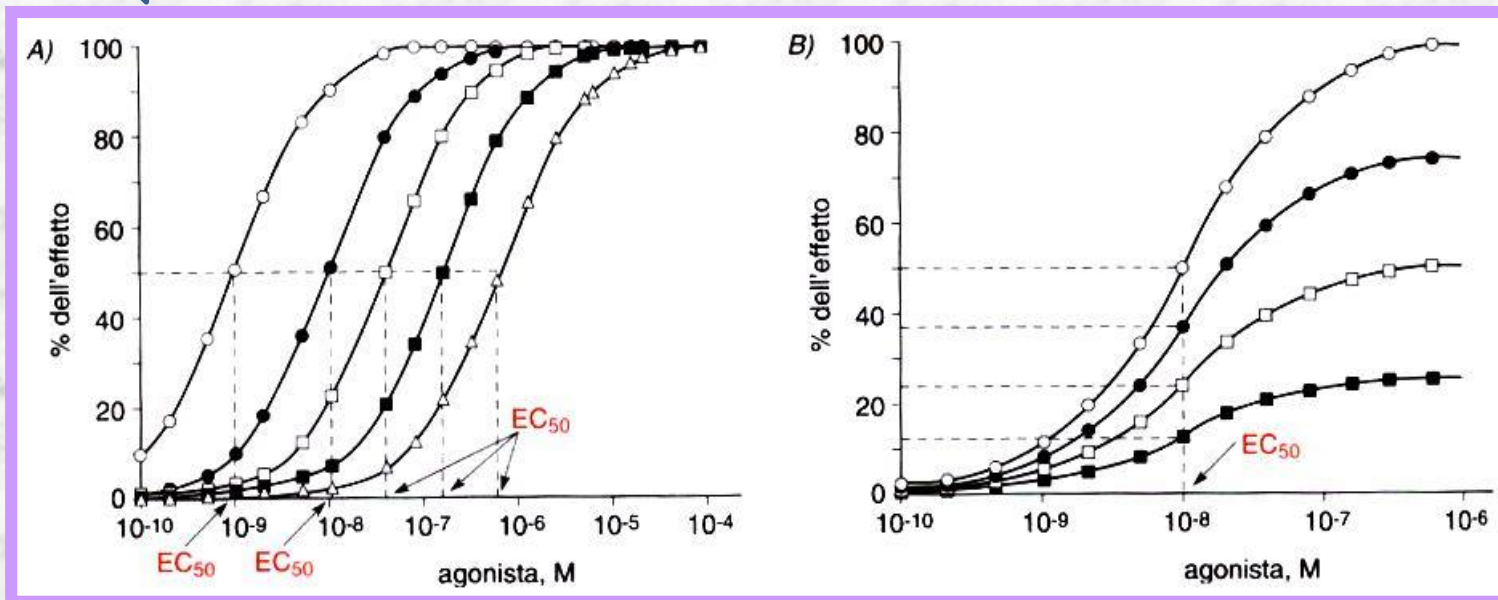
ED50 (o EC50)

ED50 (o EC50)

Analisi delle curve dose-risposta dei farmaci

AGONISTA PIENO

POTENZA ←



AGONISTA PARZIALE

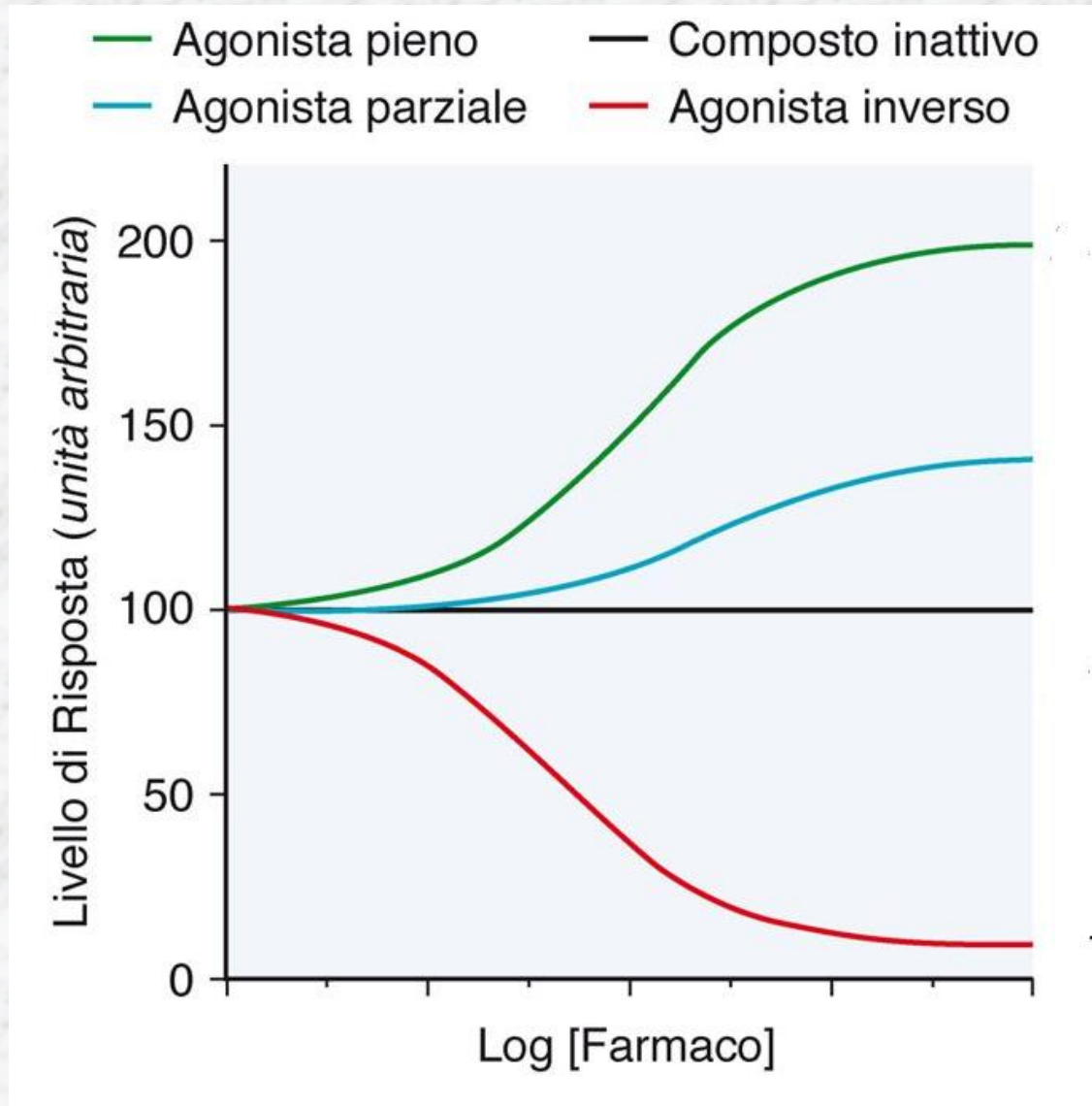
L'AGONISTA parziale è un

intermedio tra

AGO e ANTAGO >> INIBISCE in parte la risposta AGO completa

Attività intrinseca < 1

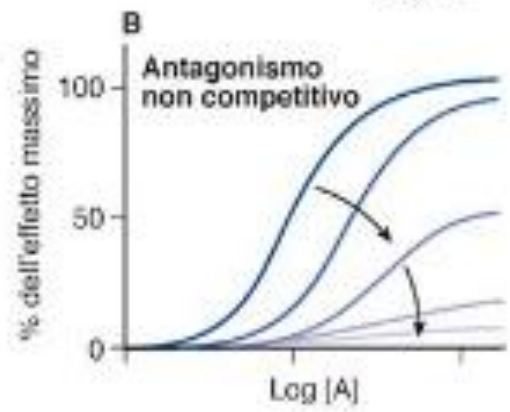
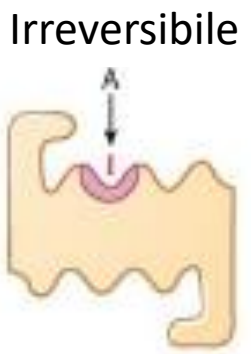
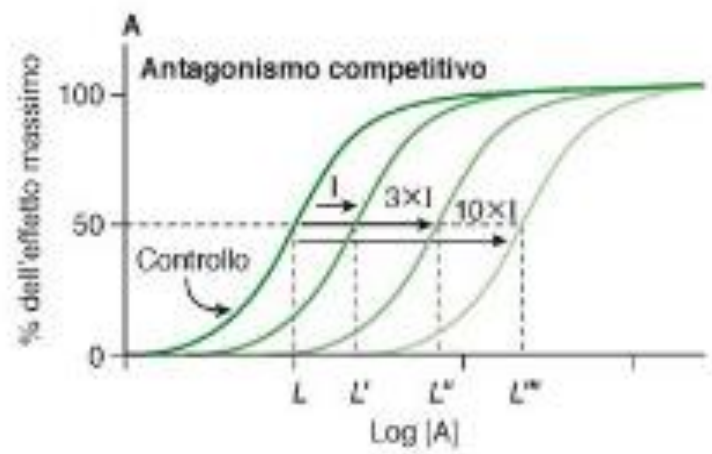
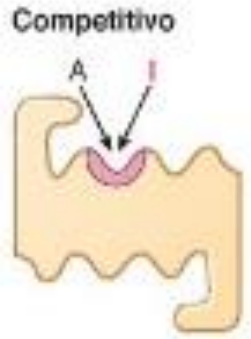
L'AGONSITA inverso =
posseggono attività intrinseca opposta a quella del ligando (-1)



ANTAGONISTA

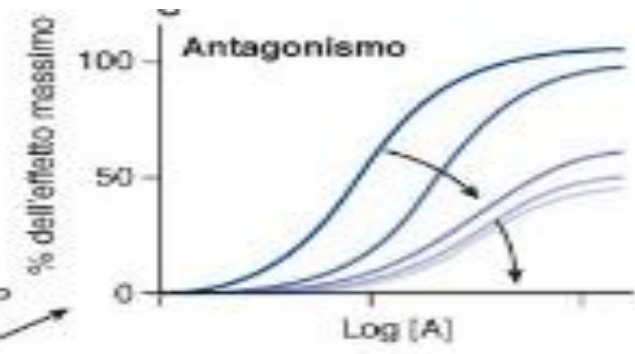
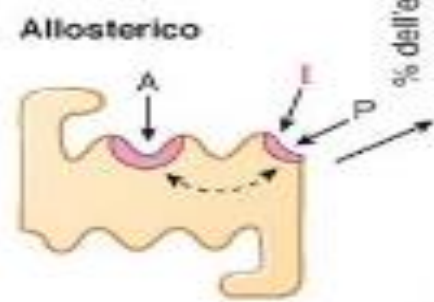
Possiede affinità ma non
attività intrinseca = 0

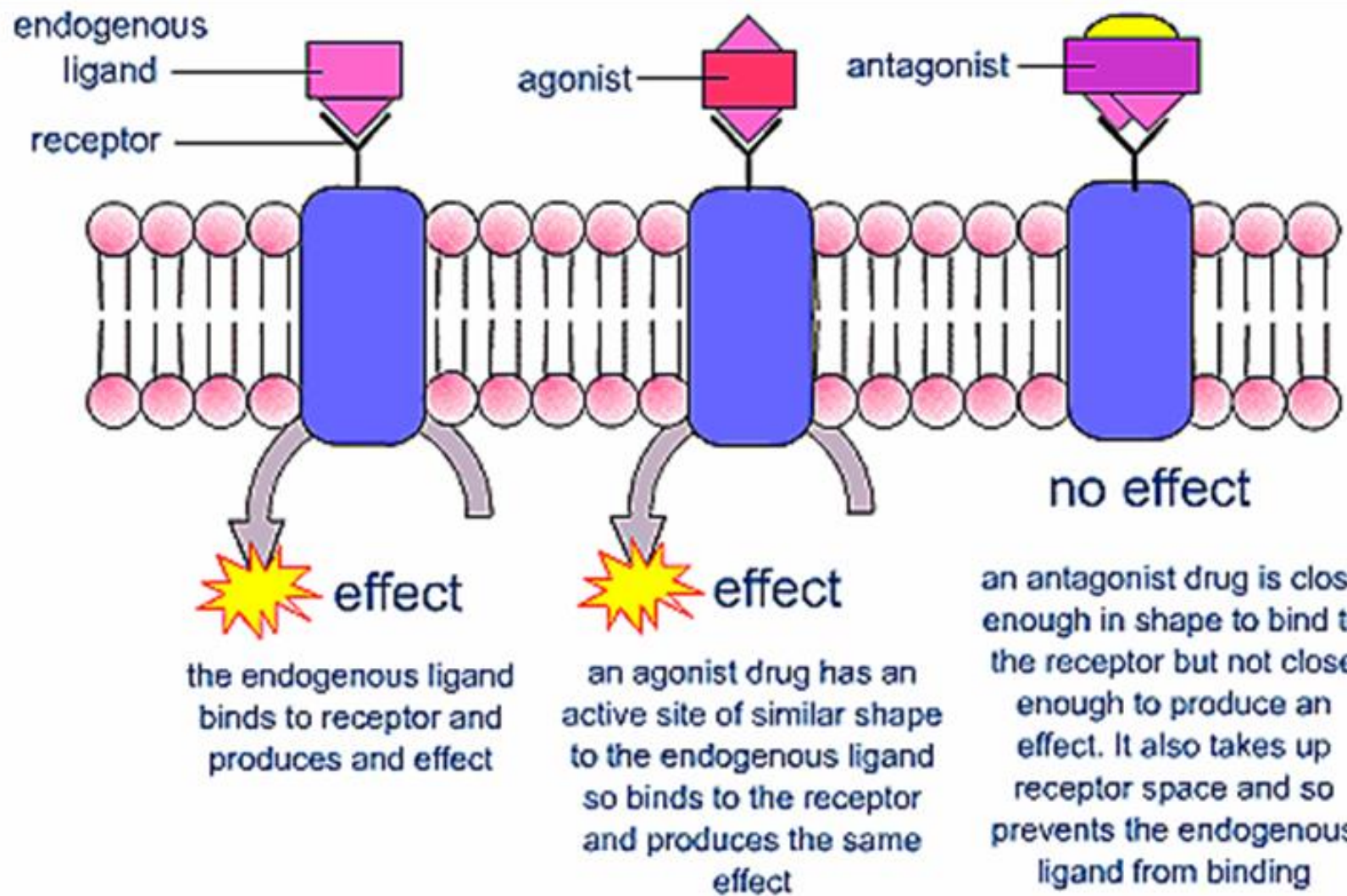
COMPETITIVO → → →



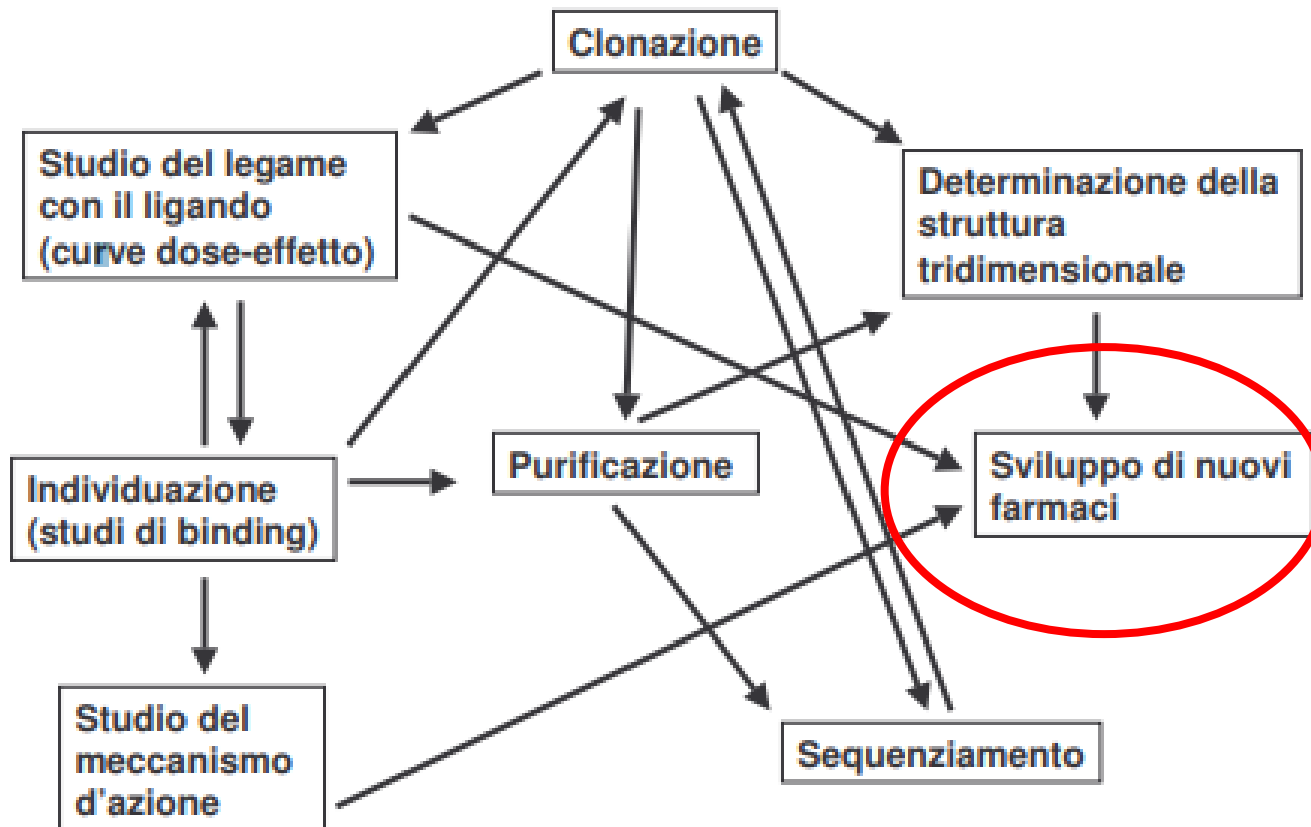
NON COMPETITIVO → →

→ non è sormontabile quindi
l'agonista non riesce a generare
una risposta biologica





Approcci allo studio dei recettori



Recettori e Trasduzione del segnale

- **Lo studio dei recettori è fondamentale nelle ricerche farmacologiche per la definizione del meccanismo d'azione dei farmaci e per la comprensione delle risposte cliniche**
- **Per avere la sua azione un farmaco deve raggiungere specifici siti nell'organismo.**
- **Il sito d'azione non è indicatore della qualità dell'effetto farmacologico: lo stesso effetto può essere dato da due farmaci che agiscono su siti differenti**

Siti cellulari (o recettori in senso ampio) dei farmaci

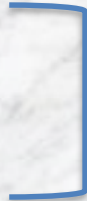
Ogni molecola cellulare (o macromolecola) a cui il farmaco si lega per iniziare la catena di eventi biochimici che portano all'effetto farmacologico osservato

- *proteine regolatorie (recettori per i mediatori endogeni)*
- *Enzimi*
- *Canali ionici*
- *Acidi nucleici*
- *Proteine strutturali*
- *Trasportatori molecolari*

L'interazione farmaco- recettore è l'elemento **CHIAVE** dell'effetto terapeutico!

Grazie alla presenza di una grande variabilità di tipi di recettori (o bersagli molecolari) presenti nelle cellule è possibile effettuare un controllo molto accurato dei segnali fisiologici cellulari a diversi livelli.

RECETTORE
EFFETTORE
TRASDUTTORE



VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

- ❑ **I RECETTORI svolgono una importante funzione integrata di coordinamento tra segnali extra-cellulari e intracellulari**
- ❑ **Possono essere divisi in superfamiglie al cui interno i recettori condividono una certa omologia strutturale e meccanismo d'azione**