

ROLE PERMEAČNÍCH TESTŮ *IN VITRO* V PREKLINICKÉM VÝZKUMU POTENCIÁLNÍCH LÉČIV

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

HELENA MERTLÍKOVÁ-KAISEROVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Flemingovo nám.2, 166 10 Praha 6, Česká republika
mertlikova@uochb.cas.cz

Došlo 2.10.23, přijato 7.11.23.

Testy membránové permeability patří společně s testy metabolické stability a stanovením rozpustnosti mezi základní pilíře časných fází vývoje nových léčiv. Pro většinu terapeutických indikací je potřeba, aby látka na své cestě k cílové tkáni, receptoru, enzymu překonala i několik biologických bariér, aniž by se přitom extenzivně biotransformovala. K vyšetřování permeability je k dispozici řada nástrojů, své nezapustitelné místo zde mají buněčné testy. Nejčastěji se používají zjednodušené dvoukómpartmentové systémy, tzv. „Transwelly“, kde je na pomezí obou oddílů nosič s umělou lipidovou dvouvrstvou nebo monovrstvou těsně přiléhajících buněk. K dispozici jsou i mnohem sofistikovanější nástroje, kokultury více buněčných typů, případně 3D dynamické modely na čipu, jejich širšímu použití však brání časová i finanční náročnost. V základních testovacích cyklech, kde se pracuje s velkým množstvím látek, se proto nejčastěji uplatňuje Caco-2 nebo MDCK test.

Klíčová slova: ADME, permeabilita, absorpce, biologická dostupnost, Caco-2, hematoencefalická bariéra, MDCK

Obsah

1. Úvod
2. Výpočetní přístupy k predikci permeability
3. PAMPA – indikátor pasivního transportu
4. Caco-2 – predikce perorální biodostupnosti
5. Modely permeace přes hematoencefalickou bariéru
6. Závěr

1. Úvod

V posledních desetiletích jsme byli svědky významného rozšíření miniaturizace a automatizace v procesu systematického vyhledávání bioaktivních látek, tzv. testování s vysokou propustností (High-Throughput Screening, HTS)¹. To, co bývalo doménou velkých farmaceutických firem, je dnes možné realizovat na řadě akademických pracovišť. V kombinaci se snadnou dostupností knihoven látek – ať už menších knihoven originálních látek, jakou je např. ÚOCHB knihovna čítající k dnešnímu dni okolo devíti tisíc látek nebo řádově větších komerčních knihoven – dochází průběžně k identifikaci velkého množství látek, které vykazují vysokou aktivitu vůči zvolenému zásahovému místu s cílem ovlivnit patofyziologické procesy v organismu. Vzniká tak potřeba vybrané molekuly dále filtrovat. Druhým krokem ve vývoji je obvykle ověření biologické aktivity nezávislou, tzv. ortogonální metodou, optimálně buněčnou (pokud nebyl buněčný test primární metodou). Výrazný pokles aktivity při přechodu na

vání s vysokou propustností (High-Throughput Screening, HTS)¹. To, co bývalo doménou velkých farmaceutických firem, je dnes možné realizovat na řadě akademických pracovišť. V kombinaci se snadnou dostupností knihoven látek – ať už menších knihoven originálních látek, jakou je např. ÚOCHB knihovna čítající k dnešnímu dni okolo devíti tisíc látek nebo řádově větších komerčních knihoven – dochází průběžně k identifikaci velkého množství látek, které vykazují vysokou aktivitu vůči zvolenému zásahovému místu s cílem ovlivnit patofyziologické procesy v organismu. Vzniká tak potřeba vybrané molekuly dále filtrovat. Druhým krokem ve vývoji je obvykle ověření biologické aktivity nezávislou, tzv. ortogonální metodou, optimálně buněčnou (pokud nebyl buněčný test primární metodou). Výrazný pokles aktivity při přechodu na



PharmDr. Helena Mertlíková-Kaiserová, Ph.D. je absolventkou Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kde rovněž získala doktorát. Během něj se věnovala problematice kardiotoxicity antracyklinových cytostatik a možnostmi její prevence pomocí nízkomolekulárních chelátorů železa. Část doktorského studia strávila na Maastrichtské univerzitě v Nizozemí. V roce 2007 získala Cenu ministra školství za mimořádné studijní výsledky a tvůrčí činnost v oboru Patobiochemie a xenobiochemie. Téhož roku nastoupila na ÚOCHB AVČR, kde začínala ve skupině prof. Holého a od roku 2010 je vedoucí samostatné vědecko-servisní skupiny Biochemická farmakologie, kde působí dodnes. Usiluje o poskytování kvalitní biologické podpory medicínální chemie v rámci cílených programů lékového výzkumu, především se zaměřením do onkologie, virologie a neurovědy.

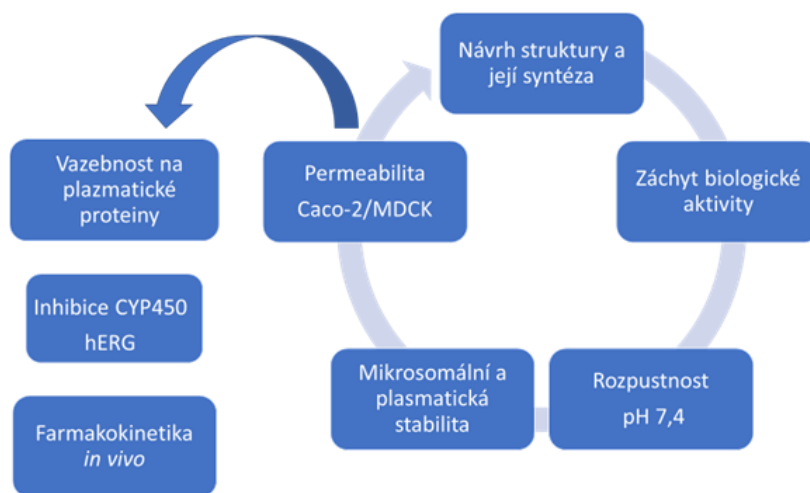
celobuněčnou úroveň může upozornit na látky s potenciálním problémem, jakým je např. extenzivní biotransformace nebo obtížný přístup látky přes membrány. Rozklíčování těchto mechanismů pouze na základě biologické aktivity není přímočaré a pro syntetické optimalizace struktury je nedostačující. Proto se do základního testovacího cyklu projektů lékového výzkumu (obr. 1) zařazuje baterie testů definujících chování látky v organismu, tj. Absorpci – Distribuci – Metabolismus – Eliminaci, zkráceně ADME (cit.²). Tyto metody zahrnují především metabolickou stabilitu, membránovou permeabilitu a rozpustnost, a to na úrovni *in vitro*. Použití experimentálních zvířat má být striktně vyhrazeno pro jednotky látek, které úspěšně prošly všemi předem stanovenými testy „ve zkumavce“. Soubor jednotlivých parametrů a jejich hraniční hodnoty jsou projektově specifické s ohledem na zamýšlený způsob podání, místo účinku, nutnost bioaktivace případných proléčiv apod. Obvykle jsou shrnuty v dokumentu označovaného jako CDTP (Candidate Drug Target Profile), kde je zohledněna nejen vlastní aktivita molekuly vůči zásahovému místu v primárním a sekundárním screeningu, ale také soubor žádaných vlastností ADME s ohledem na zamýšlený způsob podání (perorálně či parenterálně).

Absorpci látek podmiňují především vlastnosti definované v tzv. biofarmaceutickém klasifikačním systému (BCS)³, který třídí látky na základě rozpustnosti a permeability, případně také disoluce (uvolňování z léčivého přípravku) do čtyř tříd (I–IV), obr. 2. Tento systém slouží k predikci perorální biodostupnosti a umožňuje za podmínek definovaných v evropské normě ICH M9 (cit.⁴) vynechat bioekvivalenční studie *in vivo* za předpokladu, že existují robustní *in vitro* data dokládající výše uvedené vlastnosti substance. Optimální biologickou dostupnost a dobrou korelaci *in vitro* a *in vivo* účinku (IVIVC) lze

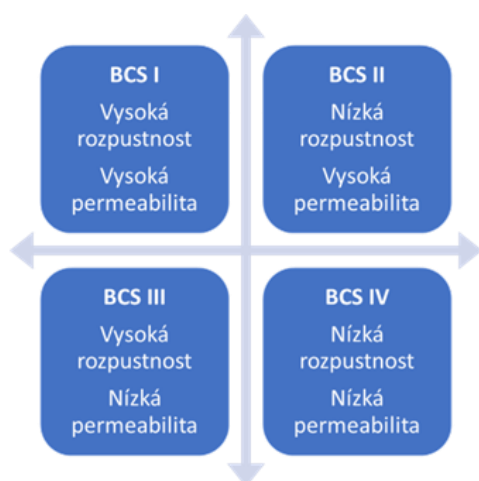
očekávat u látek zařazených ve třídě I, naproti tomu třída IV bude vykazovat nejmenší korelaci IVIVC. U tříd II–IV je možné zlepšení vlastností pomocí vhodné technologické formulace léčiva (např. liposomální enkapsulace, dispergace apod.).

Metabolickou stabilitu a rozpustnost je možné vyšetřovat poměrně rychle a s nízkými náklady, což je pro dynamické projekty lékového výzkumu naprosto zásadní. Rozpustnost ve vodných roztocích se v drtivé většině případů stanovuje tzv. kinetickou metodou (ze zásobního DMSO roztoku), která má proti fyziologicky relevantnější termodynamické rozpustnosti (z prášku) tu výhodu, že kromě rychlosti provedení spotřebovává významně menší množství testované látky⁵. Metabolická stabilita je charakterizována především stabilitou látky v jaterních mikrosomech a v plasmě^{6,7}. Díky dostupnosti kvalitních komerčních enzymových preparátů odpadá dříve běžná nutnost zdlouhavé izolace preparátů z živočišných tkání – převážně laboratorních myší a potkanů – a zvyšuje se výpočetní hodnota testů. Dále k ní přispívá i spojování vzorků z desítek jedinců (tzv. pooling), kdy výsledný směšný vzorek mnohem lépe reprezentuje reálnou populaci. Specializované firmy významně zvýšily širokou dostupnost dříve vzácného materiálu – dnes není problém za rozumnou cenu sehnat i lidské, opičí nebo psí mikrosomy, z jaterní, ale i střevní nebo ledvinové tkáně, přičemž testování na minimálně jednom nehlodavčím modelu je dnes běžně vyžadováno již v raných fázích vývoje. Podobné principy jsou uplatňovány i při hodnocení stability látek v plasmě. Je známo, že např. myší plasma má vyšší hydrolysovací aktivitu proti jiným species⁸.

V dalším textu bych se ráda soustředila především na testy sloužící k hodnocení schopnosti látek procházet přes biologické bariéry. Paleta permeačních testů je velice široká v závislosti na tom, zda sledujeme primárně absorpci



Obr. 1. Typizované schéma projektu lékového výzkumu v časně fázi, jehož základ tvoří opakování (iterace) několika základních testů



Obr. 2. Čtyři třídy biofarmaceutického klasifikačního systému založené na kombinaci rozpustnosti a permeability látek

látek ve střevě, vstup přes hematoencefalickou bariéru mozku nebo přechod přes kůži (transdermální terapeutické systémy). Drtivá většina těchto testů zahrnuje buněčné modely, mnohdy vyžadující i několikadenní přípravu. Jedná se tedy o pokročilejší, materiálově i časově náročnější testy. Jejich hodnota je však natolik vysoká, že bývají v některé své formě zařazovány již do velmi raných fází testování potenciálních léčiv.

2. Výpočetní přístupy k predikci permeability

Podobně jako pro řadu dalších parametrů, i pro vyšetřování permeability byly vyvinuty různé výpočetní přístupy, z nichž většina využívá kvantitativní vztahy mezi strukturou a permeabilitou (QSPR)⁹. Zásadním faktorem v těchto studiích je lipofilita, charakterizována rozdělovacím koeficientem oktanol-voda – logP. Prediktivní hodnota těchto modelů je významně závislá na struktuře konkrétní látky, což mírně snižuje jejich hodnotu pro praxi. Přesnější, ale výpočetně náročnější *in silico* techniky využívají molekulární dynamiku¹⁰, kdy umožňují věrně odhadnout pasivní permeační profil látek a obecně dobře korelují s empirickými testy typu PAMPA (viz níže). Popis aktivních transportních mechanismů sice výpočetní aplikace umožňují také, ale v praxi bývají často v rozporu s realitou pozorovanou experimentálně¹¹ a opatrnost při interpretaci softwarem generovaných dat z buněčných testů je rozhodně namístě. S dalším rozvojem umělé inteligence budou bezpochyby *in silico* modely postupně dále vylepšovány.

3. PAMPA – indikátor pasivního transportu

Nejjednodušší *in vitro* permeační test je založený na pasivní difuzi látky skrze uměle připravenou membránu usazenou na porézním filtru. PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) představuje dvoukompartimentový systém, zasazený obvykle do 96jamkové destičky, kdy se testovaná látka aplikuje do spodní donorové části a membrána s akceptorem se umístí přes ni a společně vytvoří tzv. sendvič. Inkubace může nebo nemusí zahrnovat míchání, to nicméně zabraňuje tvorbě nefyziologických koncentračních gradientů. PAMPA test ve své nejjednodušší podobě je tvořen kompartmenty o stejném pH a je oddělen jednoduchou membránou např. na bázi hexadekanu (bez přítomnosti fosfolipidů) nebo dodekanu, v němž je rozpuštěn diolelylfosfatidylcholin¹². Postupem času doznal i PAMPA test řady změn, ať už jde o sofistikovanější složení lipidové vrstvy (negativní náboj) nebo použití pufrů o různém pH v jednotlivých kompartmentech, což lépe vystihuje situaci v organismu. Kombinace specifických podmínek lipidového složení a pH dala vzniknout modifikacím, jako jsou PAMPA-GIT, PAMPA-HEB nebo skin-PAMPA, napodobující vstup přes střevní, hematoencefalickou, resp. kožní bariéru. Vysokou reprodukovatelností mezi experimenty se vyznačují komerční předpřipravené zamražené destičky (např. Corning® Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System), které jsou po ekvilibraci při laboratorní teplotě připraveny rovnou k použití, což šetří čas a umožňuje větší flexibilitu v plánování experimentů.

Nespornou výhodou PAMPA proti buněčným testům je vysoká propustnost (throughput). Dále je to vyšší odolnost vůči rozpouštědlům, což umožňuje testování vyšších koncentrací látek. To je obzvláště výhodné v případech, kdy máme co do činění s obtížnějšími analyty. Jako příklad můžeme uvést mnohé látky steroidního charakteru, které typicky špatně ionizují při použití elektrospreje¹³, který je v současných hmotnostních spektrometrech nejčastěji využívaným iontovým zdrojem. Při použití testovacích koncentrací obvyklých v buněčných testech (jednotky μM), se v důsledku nedostatečné ionizace látek v akceptorovém kompartmentu snadno dostaneme pod detekční limit analytické metody.

Vzhledem k absenci proteinových transportérů ve všech těchto modelech neumožňuje PAMPA posouzení aktivního transportu, který může být v některých případech převažujícím způsobem vstupu látek do buňky. Mnohé látky mohou být naopak proteinovými přenašeči aktivně vypuzovány proti směru koncentračního gradientu ven z buňky. Přes to všechno představuje PAMPA užitečný test v případech, kdy je potřeba rychle a s nízkými náklady otestovat velké série látek.

4. Caco-2 test – predikce perorální biodostupnosti

Zlatým standardem v oblasti hodnocení membránové permeability zůstává Caco-2 test, který je hojně využíván i ve firemním farmaceutickém výzkumu. Uspořádání experimentu je ve své podstatě podobné jako v případě PAMPA testu. Na rozdíl od něj není donorová a akceptorová část systému oddělena umělou membránou, ale permeabilním nosičem označovaným též jako kultivační vložka (insert). Na ni je nanášena suspenze epitelálních střevních buněk odvozených od adenokarcinomové buněčné linie Caco-2, jež za určitých podmínek vytvoří souvislou monovrstvu s charakteristickými vlastnostmi¹⁴. Teprve pak je tento tzv. „Transwell“ (obr. 3) kompletní. Použití neomezeně se dělící buněčné linie umožňuje snadnou propagaci buněk v potřebném množství, chybí jí však fenotyp terminálně diferencovaných enterocytů. Po nanášení na nosič je proto nutné buňky volbou vnějších podmínek přimět k diferenciaci. Diferencovaná buňka se polarizuje, tzn. lze rozlišit její apikální část (A, fyziologicky směrem do střevního lumen) a bazolaterální část (B, fyziologicky směrem do krevního řečiště). Unikátní vlastnosti obou buněčných pólů pak umožňují sledovat transport látek v jednom i druhém směru (A-B, B-A). Pokud je transport ve směru B-A významně větší než A-B, signalizuje to, že testovaná látka je substrátem tzv. efluxních pump¹⁵, což je jedna z častých příčin nízké biodostupnosti látek po perorálním podání.

Diferenciační protokoly

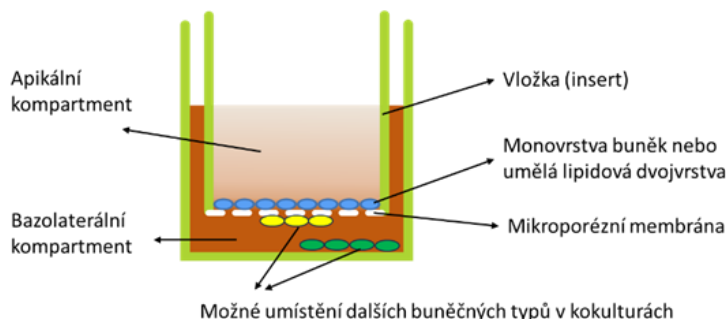
Caco-2 buňky lze diferencovat několika způsoby. Pokud buňky ponecháme dorůst do konfluency (tj. stavu, kdy je porostlá celá plocha kultivační nádoby), pak zhruba po 21 dnech diferencují spontánně. Nevýhodou tohoto přístupu je nutnost pravidelné výměny živného média v obou kompartmentech systému (3× do týdne). To s sebou nese kromě časové a finanční zátěže i zvýšené riziko kontaminace. Takto utvořená monovrstva je ale vysoce kvalitní a navzdory nepříznivému časovému hledisku je využívána i většinou komerčních firem. Aby se takto při-

pravené buňky využily na maximum, byly publikovány i snahy o recyklaci monovrstev po vymytí testovaných látek a jejich opětovné využití pro návazný experiment¹⁶. Jelikož je příprava buněk pro Caco-2 transportní experiment opravdu zdoluhavá, byly vyvinuty i uživatelsky příjemnější, zkrácené protokoly. Komerčně dostupným řešením je např. souprava BioCoat[®] HTS 1.0 μ m Caco-2 Assay System od firmy Corning. Kromě potřebného plastiku dostane uživatel i sadu médií vhodných pro nasazení buněk na inserty a pro následnou diferenciaci. Díky použití suplementu MITO+ patentovaného složení je dosaženo diferenciacie buněk do 3 dnů. Přestože existují publikace poukazující na srovnatelné výsledky 3denní zrychlené a 21denní spontánní diferenciacie¹⁷, řada laboratoří dává přednost standardnímu protokolu s odkazem na vyrovnanější výsledky takto provedených testů. Nevýhodou komerční soupravy je, že po přidání suplementu do diferenciacního média má toto kompletní médium garantovanou stabilitu pouze 3 týdny. Pro menší laboratoře s nižší propustností je obtížné médium během této doby spotřebovat. Postupně klesající množství růstových faktorů v médiu může být jednou z příčin variability.

Další možností zrychlené diferenciacie je inkubace Caco-2 buněk s nízkou (submikromolární) koncentrací puromycinu. Tento protokol byl popsán v roce 2013 Sevínem¹⁸ a diferenciacie zde trvá 6–7 dnů, což je stále velmi příznivá doba proti standardnímu postupu. Na rozdíl od komerčních souprav uvedených výše je puromycinová diferenciacie dostupnější. Limitujícím faktorem pak zůstává už jen cena plastiku, která ovšem také není zanedbatelná – částečně i díky omezenému počtu výrobců na trhu. Navzdory své jednoduchosti a rychlosti se puromycinová varianta protokolu příliš nerozšířila, i když minimálně jedna z evropských firem komerčně dodávajících ADME data, jej adoptovala.

Kvantitativní hodnocení permeace látek

Vlastní transportní experiment trvá zpravidla dvě nebo tři hodiny (někdy se provádí i časová závislost). Začíná aplikací roztoku látky o definované koncentraci do apikálního (donorového) kompartmentu, přičemž



Obr. 3. Obecné schéma Transwellového permeačního systému

v bazolaterálním (akceptorovém) kompartmentu je čistý transportní pufr. V čase 0 se z donoru ihned odebere vzorek pro pozdější stanovení počáteční koncentrace látky C_0 . Na konci inkubace se odebere vzorek z obou kompartmentů. Ve všech vzorcích se stanoví koncentrace parentní látky, nejčastěji metodou LC/MS. Výpočet permeačního koeficientu P_{app} je pak definován rovnicí:

$$P_{app} = (dQ/dt)/C_0 \cdot A$$

kde dQ/dt vyjadřuje rychlost průniku látky přes buňky, C_0 je koncentrace v donorovém kompartmentu v čase 0 a A je plocha filtru (monovrstvy). Efluxní index je pak vyjádřen poměrem $(P_{app} B-A) / (P_{app} A-B)$. Součástí výstupu každého permeačního testu je obvykle i informace o výtěžnosti (%). Ta je definována jako poměr celkové koncentrace látky na konci pokusu (v donoru i akceptoru) a počáteční koncentrace látky do pokusu vložené. Pokud je výtěžnost velmi nízká, může to signalizovat nízkou rozpustnost látek, jejich metabolizaci při průchodu buněčnou monovrstvou nebo adsorpci na plastik. Tyto procesy je možné dále vyšetřovat specifickými postupy, ale s výjimkou rozpustnosti se to rutinně nedělá. K výtěžnosti je ale dobré přihlídnout při interpretaci dat, kdy výrazně nízká hodnota poněkud oslabuje výpovědní hodnotu testu.

Kontrola kvality

V případě buněčných permeačních testů je mnohem víc než u jiných ADME testů důležitá kontrola kvality. Obvykle je víceúrovňová, jelikož i drobná nedokonalost buněčné monovrstvy bude mít zásadní vliv na hodnotu permeačního koeficientu (P_{app}). Dobrou laboratorní praxí je používat buňky v rozmezí určitých pasáží¹⁹ – hranice není jasně daná, některé laboratoře používají nižší pasáže, jiné vyšší, ale vždy platí, že pro konzistentní výsledky je dobré se držet pravidla, že zhruba po 20 pasážích se buňky obmění.

Po proběhlé diferenciaci Caco-2 buněk se zpravidla hodnotí transepiteliální odpor (tzv. TEER) v každé jednotlivé jamce. K tomuto účelu slouží speciální elektrody, z nichž jedna je zanořena do kapaliny v apikální části a druhá v bazolaterální části. Nepoškozená monovrstva se správně vytvořenými těsnými spoji (tight junctions) má vysoký odpor, tedy nízkou konduktivitu. Hodnota TEER zohledňuje také velikost plochy, na které buňky rostou, mezní hodnoty pro kvalifikaci jamky se v literatuře liší, případně nejsou uvedeny vůbec, výrobci souprav uvádějí jako minimum hodnoty 250–350 $\Omega \text{ cm}^2$. Dalším markerem integrity monovrstvy je míra permeace fluorescenční sondy typu Lucifer Yellow (LY), která za normálních okolností přes Caco-2 buňky neprochází. Pokud ano, je to známka paracelulárního transportu, tedy průchodu mezi-buněčným prostorem mezi buňkami²⁰. Tento test se nejčastěji provádí *ex post* po proběhlém transportním experimentu a zachytí tak i případné toxické účinky látek na buňky, které hodnoty permeačního koeficientu kompromitují. Výhodou je, že vstup LY je možné rychle a pohodlně měřit běžnými destičkovými čtečkami. Některé protokoly přidávají LY přímo do transportního experi-

mentu spolu s testovanými látkami, čímž se šetří čas a případné problémy se okamžitě vizualizují, na druhou stranu nelze zcela vyloučit interferenci s transportovanými látkami. Posledním krokem v kontrole kvality je zařazení alespoň dvou (lépe tří) referenčních látek, u nichž je permeační koeficient znám a naměřené hodnoty lze porovnat s tabelárními hodnotami. Obvykle se volí látka s nízkou propustností (např. atenolol, $P_{app} < 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) a látka s vysokou propustností (např. propranolol, $P_{app} > 10 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). V případě, vyšetřování obousměrného transportu se pak přidávají referenční látky s různě vysokými hodnotami efluxního indexu (např. chinidin, digoxin)¹³.

Navzdory obecným pokrokům v automatizaci a miniaturizaci, Caco-2 test ve svém nejobvyklejším formátu je ve většině laboratoří stále prováděn ve 24jamkovém formátu. Z velké části je to dáno tím, že 24jamkový formát umožňuje manuální měření TEER pomocí malého a cenově dostupného laboratorního ohmmetru. Měření v menších jamkách už vyžaduje speciální a nákladnější přístrojové vybavení (EVOMTM Auto, ECIS[®] TEER96). Výhodou je, že tyto systémy umožňují měření TEER v reálném čase. Obecně bývají data z větších jamek robustnější, mimo jiné i díky tomu, že mají menší tendenci k okrajovým efektům. Ne každá laboratoř zabývající se ADME profilováním má také k dispozici robotické dispenzační systémy, které eliminují lidský faktor při práci s vícejamkovými destičkami (záměna vzorků, poškození monovrstvy špičkou).

Navzdory snahám o standardizaci protokolů, Caco-2 test je příznačný značnou variabilitou mezi jednotlivými pracovišti²¹, což je dáno především rozdíly v kultivačních podmínkách (číslo pasáže, použitá média a suplementy...) a různými zdroji buněk.

5. Modely permeace přes hematoencefalickou bariéru

Mezi nejčastější řešené problémy při vývoji léčiv patří i otázka jejich prostupu přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Ať už jde o efekt žádoucí, pro centrálně působící léčiva nebo naopak nežádoucí, v případě sedativních účinků léčiv cílených na periferii (typicky např. antihistaminika 1. generace). HEB tvoří vysoce selektivní bariéru mezi kapilární vaskulaturou a mozkovou tkání. Jejím základem je vrstva endoteliálních buněk v kapilárním lumen, jež se odlišují od endoteliálních buněk na periférii tím, že k sobě těsně přiléhají a postrádají transcelulární póry, tzv. fenestrace. Endoteliální buňky jsou obklopeny vrstvou pericytů, kontraktilních buněk v kapilární bazální membráně a z mozkové strany jsou k bazální membráně připojeny výběžky astrocytů. Celý tento komplex tvoří tzv. neurovaskulární jednotku. Z výše uvedeného popisu je zřejmé, že jakýkoli *in vitro* model HEB jen obtížně vystihne komplexitu bariéry *in vivo*, přičemž kokultury více buněčných typů, a především pak dynamické modely typu orgány na čipu se situací *in vivo* přibližují nejvíce. Jde však o modely komplikované, fi-

nančně, časově i technicky náročné, proto si své místo v akademickém i průmyslovém lékovém výzkumu drží i podstatně jednodušší metody evaluace prostupu přes HEB. Limitace jednotlivých modelů je zapotřebí mít vždy na zřeteli při interpretaci dat.

MDCK test

Oblíbeným modelem je další z modifikací Transwellového systému, technicky velmi podobného Caco-2 testu. Namísto monovrstvy střevních epitelálních buněk jsou však použity psi ledvinové epitelální buňky (MDCK) – buďto ve variantě MDCK I pocházející z nízké pasáže nebo MDCK II z vysoké pasáže (liší se hodnotou TEER, která je výrazně vyšší u MDCK I)²². Navzdory svému původu se linie stala standardem ve screeningu látek (ne)prostupujících přes HEB. Nejčastěji se používá její částečně humanizovaná modifikace MDCK-MDR1 (cit.²³), kde je genetickou modifikací psi P-glykoprotein (P-gp) nahrazen jeho lidskou variantou. Vyšší úroveň exprese P-gp je jedním z hlavních rozdílů mezi Caco-2 a MDCK-MDR1, dalším rozdílem je těsnost bariéry (na níž usuzujeme z relativně vyšších hodnot P_{app} v Caco-2 modelu proti MDCK modelu). Jakýkoli *in vitro* model je však řádově propustnější než HEB *in vivo*. Existují studie poukazující na identické řazení látek dle permeability v modelech MDCK, Caco-2 i mozkových endotelálních buněk^{24,25}. Pokud je tedy primárním cílem porovnání látek mezi sebou a nikoli absolutní hodnota P_{app} , nehraje volba konkrétního modelu velkou roli. Je obtížné najít v literatuře vědecké opodstatnění masového rozšíření MDCK testu jako optimálního modelu permeace přes HEB. Můžeme hypotetizovat, že za tím stojí především fakt, že s touto linií se dobře pracuje – diferenciace je rychlejší než v případě Caco-2 buněk (5 vs. 21 dní), buňky nevyžadují speciální média, a proto jde o metodu vhodnou pro screeningová pracoviště, kterými prochází velké množství látek, pro jejich rámcové rozřazení do jednotlivých permeačních kategorií.

Endotelální buňky a jejich kokultury

Fyziologicky relevantnějším *in vitro* modelem HEB jsou buďto primární endotelální buňky izolované z mozku laboratorních hlodavců nebo ještě lépe lidské mozkové mikrovaskulární buňky (hBMEC)²⁶. Jejich nevýhodou je omezená možnost propagace *in vitro* a z toho vyplývající vysoká cena. Z tohoto důvodu byla vytvořena řada imortalizovaných endotelálních buněčných linií (lidských i zvířecích), jež si do značné míry ponechávají vlastnosti primárních kultur (markery těsných spojů, exprese přenašečů). Jejich nevýhodou je, že proti primokulturám jsou přece jen propustnější²⁷. Jelikož endotelální buňky tvoří pouze jednu (byť klíčovou) součást HEB, vyšší hodnotu těmto modelům přidává kokultivace s dalšími buněčnými typy (astrocyty, pericyty). Ty mohou být umístěny buďto na spodní straně insertu nebo na dně akceptorové komůrky (obr. 3). Příslibem do budoucna je také možné širší využití

diferencovaných indukovaných pluripotentních buněk (iPSC)²⁸, které mohou být diferencovány jak do endotelální, tak do astrocytární linie. Patrně i vzhledem k vysokým nákladům zatím není dostatek studií, které by (ko)kultury buněk odvozených od iPSC dostatečně validovaly.

Mikrofluidní čipy („HEB na čipu“)

Doposud popsané modely reprezentují statické 2D systémy. V posledních letech dochází k dramatickému rozvoji dynamických třídízených (3D) modelů typu mikrofluidních čipů²⁹. V mikrokapilárách čipů je mimikován tok krve a působení smykových sil na bariéru, která tímto upevňuje těsné spoje. Endotelální buňky na čipech navíc mohou tvořit tubulární struktury kolem vnitřního povrchu kanálku. Do dnešní doby byla vyvinuta řada modifikací HEB na čipu a tyto jsou k dostání i komerčně. Pro rutinní testování permeace látek přes HEB tyto pokročilé modely nejsou příliš vhodné, jejich hlavní využití je a do budoucna zřejmě i bude v základním výzkumu různých patologií CNS (např. Alzheimerova choroba, poruchy angiogeneze)²⁷, případně pouze pro ověření permeability přes HEB pro úzkou skupinu látek v návaznosti na dříve provedené jednodušší testy.

Lékový výzkum je závodem o to, kdo bude první v cíli, v raných fázích tedy potřebuje především nástroje, které lze snadno začlenit do screenovací kaskády a urychlit tak proces identifikace „lead compound“ neboli molekuly s optimálními vlastnostmi dle vytyčeného CDTP. A to i za cenu značného zjednodušení přirozeně komplikovaného modelu.

6. Závěr

Všeobecné rozšíření *in vitro* permeačních testů, jakož i dalších ADME charakteristik a jejich zařazení do časných fází vývoje léčiv významně snížilo spotřebu laboratorních zvířat, jež byla v minulosti jediným relevantním modelem pro hodnocení biologické dostupnosti látek. Ani sebelepší *in vitro* test však nedokáže plně nahradit komplexitu celého organismu. Slouží pouze jako jakýsi předfiltr, který má z testů na zvířatech vyloučit látky, u nichž se dá předpokládat, že by *in vivo* selhaly. Teprve u látek, které prošly stanovenými *in vitro* testy s dobrým výsledkem, lze uvažovat o prvním podání zvířeti. Není výjimkou, že i takováto nadějná látka ve farmakokinetických, distribučních a/nebo toxicitních studiích *in vivo* selže, naší povinností však je těmto situacím v co možná největší míře aktivně předcházet a nepoužívat laboratorní zvířata předčasně a bezmyšlenkovitě.

Seznam zkratk

BMEC	endotelální buňky mozkových kapilár
Caco-2	buněčná linie odvozená od kolorektálního adenokarcinomu (epitelální buňky)

CDTP	cílový profil kandidátního léčiva, soubor předem vytyčených vlastností léčiva, kterých chceme dosáhnout a rozhodovacích kritérií
CNS	centrální nervový systém
CYP450	cytochrom P450, hlavní enzymový systém podílející se na metabolismu léčiv
DMSO	dimethylsulfoxid
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky; dediferencované buňky ze somatických buněk schopné volbou podmínek diferencovat na různé buněčné typy
hERG	draslíkový iontový kanál, častý cíl kardiotoxicky působících léčiv
LY	Lucifer Yellow, fluorescenční sonda
MDCK	(Madin-Darby) psi ledvinové epitelální buňky
MDR	mnohočetná léková rezistence, resp. membránové přenašeče, jejichž aktivita k ní vede
TEER	transepitelální elektrický odpor, parametr těsnosti buněčné monovrstvy

Tato práce vznikla za institucionální podpory AVČR (RVO: 61388963) a programu TAČR Zéta TJ02000276. Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Evě Tloušťové, Ing. Alexandře Dvořákové, Dr. Karlu Chalupskému a Dr. Timoteji Strmeňovi za jejich nasazení v implementaci a odladění in vitro ADME testů na ÚOCHB AVČR.

LITERATURA

- Hansel C. S., Plant D. L., Holdgate G. A., Collier M. J., Plant H.: *Drug Discovery Today* 27, 2051 (2022).
- Thompson T. N.: *Curr. Drug Metab. I*, 215 (2000).
- Papich M. G., Martinez M. N.: *AAPS J.* 17, 948 (2015).
- Bransford P. a 11 spoluautorů: *Mol. Pharm.* 17, 361 (2020).
- Saal C., Petereit A. C.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 589 (2012).
- Fonsi M., Orsale M. V., Monteagudo E.: *J. Biomol. Screen* 13, 862 (2008).
- Reed G. A.: *Curr. Protoc. Pharmacol.* 75, 761 (2016).
- Bahar F. G., Ohura K., Ogihara T., Imai T.: *J. Pharm. Sci.* 101, 3979 (2012).
- Pham-The H., Gonzalez-Alvarez I., Bermejo M., Garrigues T., Le-Thi-Thu H., Cabrera-Perez M. A.: *Mol. Inform.* 32, 459 (2013).
- Bennion B. J. a 10 spoluautorů: *J. Phys. Chem. B* 121, 5228 (2017).
- Smidkova M., Dvorakova A., Tloust'ova E., Cesnek M., Janeba Z., Mertlikova-Kaiserova H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 664 (2014).
- Avdeef A., Tsinman O.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 28, 43 (2006).
- Athanasiadou I., Angelis Y. S., Lyris E., Vonaparti A., Thomaidis N. S., Koupparis M. A., Georgakopoulos C.: *Bioanalysis* 4, 167 (2012).
- Krishna G., Chen K., Lin C., Nomeir A. A.: *Int. J. Pharm.* 222, 77 (2001).
- Press B.: *Methods Mol. Biol.* 763, 139 (2011).
- Pires C. L., Praca C., Martins P. A. T., Batista de Carvalho A. L. M., Ferreira L., Marques M. P. M., Moreno M. J.: *Pharmaceutics* 13, (2021).
- Yamashita S., Konishi K., Yamazaki Y., Taki Y., Sakane T., Sezaki H., Furuyama Y.: *J. Pharm. Sci.* 91, 669 (2002).
- Sevin E., Dehouck L., Fabulas-da Costa A., Cecchelli R., Dehouck M. P., Lundquist S., Culot M.: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 68, 334 (2013).
- Siissalo S., Laitinen L., Koljonen M., Vellonen K. S., Kortejarvi H., Urtti A., Hirvonen J., Kaukonen A. M.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 548 (2007).
- Zhao W., Han L., Bae Y., Manickam D. S.: *J. Visualized Exp.* 150, e58900 (2019).
- Lee J. B., Zgair A., Taha D. A., Zang X., Kagan L., Kim T. H., Kim M. G., Yun H. Y., Fischer P. M., Gershkovich P.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114, 38 (2017).
- Dukes J. D., Whitley P., Chalmers A. D.: *BMC Cell Biol.* 12, 43 (2011).
- Wang Q., Rager J. D., Weinstein K., Kardos P. S., Dobson G. L., Li J., Hidalgo I. J.: *Int. J. Pharm.* 288, 349 (2005).
- Jin X. a 16 spoluautorů: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 70, 188 (2014).
- Hellinger E. a 22 spoluautorů: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 340 (2012).
- Eigenmann D. E., Jahne E. A., Smiesko M., Hamburger M., Oufir M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 2095 (2016).
- Eigenmann D. E., Xue G., Kim K. S., Moses A. V., Hamburger M., Oufir M.: *Fluids Barriers CNS* 10, 33 (2013).
- Delsing L., Herland A., Falk A., Hicks R., Synnergren J., Zetterberg H.: *Mol. Cell. Neurosci.* 107, 103533 (2020).
- Wan J., Zhou S., Mea H. J., Guo Y., Ku H., Urbina B. M.: *Chem. Rev.* 122, 7142 (2022).

H. Mertlíková-Kaiserová (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic): The Role of Permeation Assays in Preclinical Drug Discovery

Membrane permeability assays – together with metabolic stability and solubility assays – belong to the essential tools of early drug discovery process. In most therapeutic indications, a drug needs to pass several biological barriers to exert its desired effect to a target tissue, receptor, enzyme, without significant decay. There are numerous models available allowing us to evaluate compounds permeability, with cellular assays being particularly useful. Most frequently, these assays are based on

a „Transwell“ system, where two compartments are separated by a filter bearing either artificial membrane or a monolayer of tightly connecting cells. More sophisticated permeability assays have been developed during the last decade, e.g., co-cultures of relevant cell types or 3D microfluidics on a chip. However, their high costs and time-consuming preparation prevent their widespread use. In basic drug development screening cycles Caco-2 and MDCK assays remain the gold standard.

Keywords: ADME, permeability, absorption, bio-availability, Caco-2, blood-brain barrier, MDCK

Acknowledgements

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO: 61388963) and Technology Agency of the Czech Republic (#TJ02000276). My sincere thanks go to Ing. Eva Tloušťová, Ing. Alexandra Dvořáková, Dr. Chalupský and Dr. Strmeň for their enthusiasm and help while implementing and tuning the in vitro ADME assays at IOCB ASCR.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.