

Ny lovende cellemodel

- tester lægemiddelstoffers interaktion med hjernens "udsmiderpumpe", P-glykoprotein

Transportproteinet, P-glykoprotein, begrænser effektiviteten af mange lægemiddelstoffer. Det er derfor vigtigt at kunne bestemme P-glykoproteins indflydelse på nye lægemiddelstoffer tidligt i udviklingsfasen. Her præsenteres et nyt lovende testsystem til undersøgelse af, hvordan lægemiddelstoffer interagerer med menneskelig P-glykoprotein.

Af Lasse Saaby¹, Hans Christian Helms² og Birger Brodin²

¹Bioneer A/S,

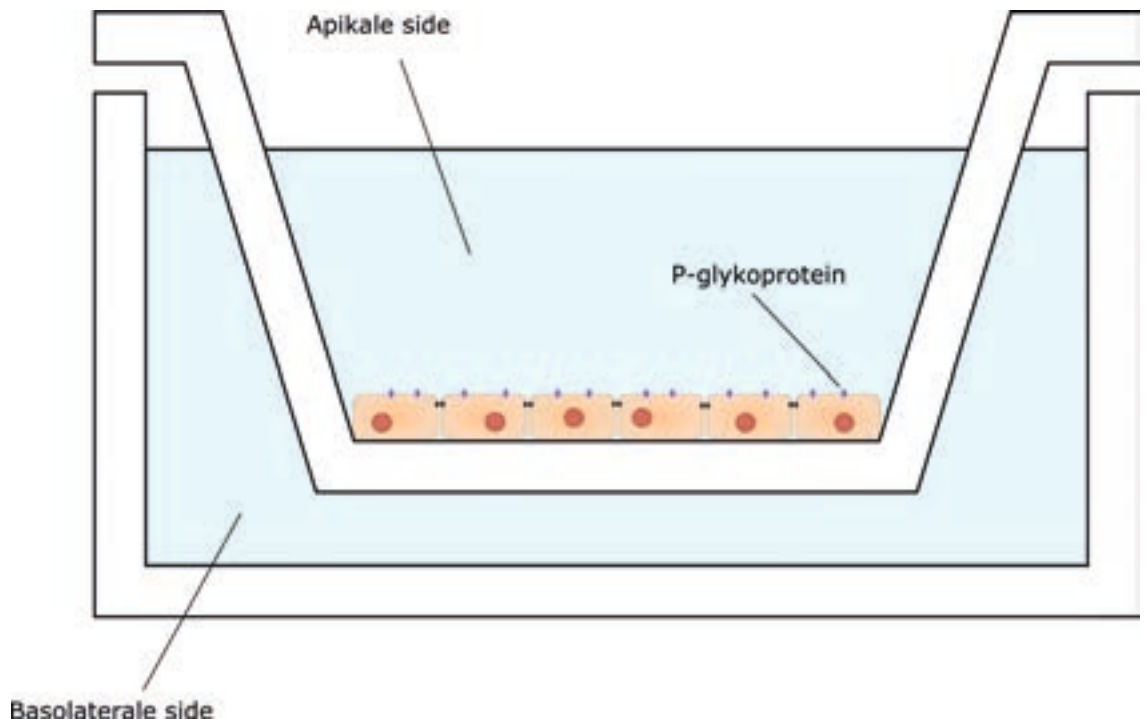
²Institut for Farmaci, Københavns Universitet

P-glykoprotein er et membranprotein, der under forbrug af energi, pumper en lang række stoffer ud af levende celler. P-glykoprotein findes i forskellige væv, blandt andet i tarmen, nyrerne, leveren, moderkagen, samt i karvæggen i hjernens små blodkar, den såkaldte blod-hjernebarriere [1-3]. P-glykoprotein er med til at begrænse optag af fremmede stoffer fra føden, holde fremmede stoffer ude af hjernen og hjælpe med at udskille fremmede stoffer i nyrerne og leveren [4-6].

En lang række kræftceller danner også store mængder af P-glykoprotein, hvilket hjælper kræftcellerne til at overleve, da P-glykoprotein også er i stand til at pumpe kræftmedicin ud af cellerne [7,8]. Det er derfor ofte nødvendigt at undersøge om nye lægemiddelstoffer genkendes af P-glykoprotein, så det kan sikres, at de er i stand til at virke det ønskede sted. Det kan især være interessant for lægemiddelstoffer til behandling af hjernesygdomme, da P-glykoprotein spiller en afgørende rolle for, om lægemiddelstoffer kan trænge igennem blod-hjernebarrieren [9].

Der findes forskellige metoder til at under-

søge, om lægemiddelstoffer genkendes af P-glykoprotein. En udbredt metode er at undersøge transporten af det pågældende lægemiddelstof gennem en cellebarriere, der indeholder store mængder P-glykoprotein. Typisk anvendes celler af menneskelig oprindelse, eller cellelinjer af ikke-menneskelig oprindelse, der er blevet genmanipuleret til at udtrykke menneskelig P-glykoprotein. Det kan imidlertid være vanskeligt at undersøge lægemiddelstoffers interaktion med P-glykoprotein med de eksisterende cellelinjer, da de også danner andre transportproteiner. Tilstedeværelsen af andre transportsystemer gør det vanskeligt at afgøre, om lægemiddelstoffer genkendes af P-glykoprotein.



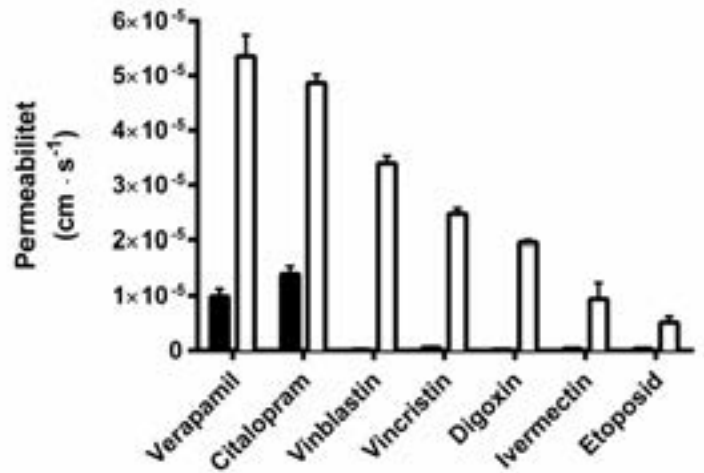
Figur 1. Figuren illustrerer IPEC-J2 MDR1-cellemodellen. IPEC-J2 MDR1-cellerne danner et enkelt lag af tætliggende celler, der er fæstnet til hinanden ved bindinger mellem naboceller. Enkeltlaget af IPEC-J2 MDR1-celler udgør således en barriere, som adskiller oversiden af filteret (den apikale side) fra undersiden af filteret (den basolaterale side). Menneskelig P-glykoprotein findes hovedsageligt i den apikale cellemembran af IPEC-J2 MDR1-cellerne.

Vi har derfor etableret en ny cellelinje, IPEC-J2 MDR1, som er karakteriseret ved at danne meget menneskelig P-glykoprotein. Denne cellelinje adskiller sig fra eksisterende cellelinjer ved kun i ringe grad at danne andre transportproteiner end menneskelig P-glykoprotein. Desuden danner cellerne en barriere, der er mange gange tættere end eksisterende cellelinjer, hvilket gør det nemmere at undersøge, om lægemiddelstoffer genkendes af P-glykoprotein.

Etablering af celled modellen

IPEC-J2-cellelinjen blev valgt på baggrund af dens manglende evne til selv at danne P-glykoprotein og andre transportproteiner, samt dens fordelagtige barriereegenskaber. Det menneskelige gen for P-glykoprotein - MDR1-genet, blev indsat i genomet af IPEC-J2 cellerne ved en transfektion med et plasmid. Tilstedeværelse af MDR1-genet, og dannelsen af det humane P-glykoprotein i cellerne, blev efterfølgende bekræftet gennem molekylærbiologiske metoder som DNA-sekventering og Western blot. Celler, der dannede små mængder af P-glykoprotein, blev frasorteret. Det blev gjort ved at dyrke de transfekterede celler i nærvær af det celletoksiske stof puromycin, der genkendes og pumpes ud af cellerne af P-glykoprotein. Celler, som danner lidt, eller intet P-glykoprotein, vil dø i nærvær af puromycin, mens celler, der indeholder meget P-glykoprotein, vil overleve.

Til transportforsøg dyrkes IPEC-J2 MDR1-cellerne på små filtre (1,13 cm²). Herpå danner cellerne et enkelt lag af tætliggende celler, som dækker hele filteret, figur 1. Cellerne er fæstnet på filtermaterialet og forankres yderligere ved binding



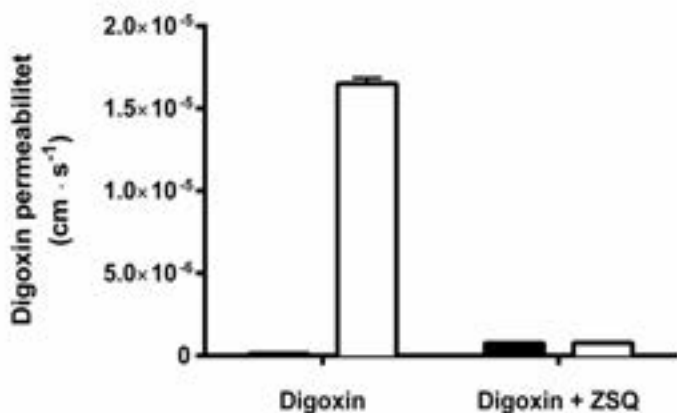
Figur 2. Transport af lægemiddelstoffer som genkendes af P-glykoprotein gennem IPEC-J2 MDR1-celler. De sorte søjler angiver transport af de enkelte stoffer i den apikale til basolaterale retning, og de hvide søjler angiver transport i den basolaterale til apikale retning. Resultater er vist som gennemsnit ± standardfejl. Figuren er reproduceret med tilladelse fra Saaby et al. [10]. Copyright (2016) American Chemical Society.

ger med naboceller. Cellelaget udgør en barriere, som adskiller oversiden af filteret (den apikale side) fra undersiden (den basolaterale side, se figur 1). På grund af denne orientering af cellerne er der forskel på den apikale og den basolaterale side, ►

NEED A CREATIVE ADVISOR?

Between you and your ideas, we'll find the spark for brilliant business opportunities. From IP strategy, legal services and analysis to patents, trademarks, design and copyright, we help illuminate the vast potential in your creation. www.awapatent.com

AWAPATENT



Figur 3. Transport af digoxin gennem IPEC-J2 MDR1-cellerne i nærvær og fravær af stoffet zosuquidar (ZSQ), som er en kendt hæmmer af P-glykoprotein. De sorte søjler angiver transport af digoxin i den apikale til basolaterale retning, og de hvide søjler angiver transport af digoxin i den basolaterale til apikale retning. Resultater er vist som gennemsnit ± standardfejl. Figuren er reproduceret med tilladelse fra Saaby et al. [10]. Copyright (2016) American Chemical Society.

og cellelaget siges at være polariseret. P-glykoprotein findes hovedsageligt i den apikale cellemembran, figur 1, hvor det sørger for at pumpe fremmede stoffer ud af cellerne.

Når man dyrker cellerne på filtre, kan man undersøge transporten af lægemiddelstoffer gennem cellebarrieren. Det gøres ved at tilsætte lægemiddelstoffet til opløsningen på den ene side af cellelaget og tage prøver ud fra opløsningen på den anden side på forskellige tidspunkter. Da udsmiderpumpen P-glykoprotein kun findes i den apikale cellemembran, er transporten af lægemiddelstoffer, som genkendes af P-glykoprotein, større fra den basolaterale side til den apikale side end transporten i den modsatte retning. Er transporten fra den basolaterale side til den apikale side mere end dobbelt så stor som transporten i den modsatte retning, anses den observerede transport for at være forårsaget af P-glykoprotein, og det undersøgte stof genkendes altså af P-glykoprotein. Hvis den observerede transport af et lægemiddelstof er af samme størrelsesorden i begge retninger, betyder det, at det undersøgte lægemiddelstof ikke genkendes af P-glykoprotein, og det vil derfor være en bedre kandidat til at trænge ind i kræftceller og gennem blod-hjernebarrieren.

Validering af cellemodellen

Vi gennemførte en række transportforsøg med lægemiddelstoffer, som genkendes af P-glykoprotein, for at undersøge, om IPEC-J2 MDR1-cellelinjen faktisk kunne bruges til at fastslå, hvilke stoffer der interagerer med P-glykoprotein, figur 2. Lægemiddelstofferne citalopram, digoxin, etoposid, ivermectin, verapamil, vinblastin og vincristin genkendes af P-glykoprotein, og de blev derfor inkluderet i forsøget. For alle syv stoffer var transporten fra den basolaterale side til den apikale side markant højere end transporten i den modsatte retning, figur 2. Transporten af de syv stoffer var mellem 4 og 250 gange større fra den basolaterale til apikale side i forhold til transporten i den modsatte retning, og der er således ikke tvivl om, at alle syv stoffer genkendes af P-glykoprotein i IPEC-J2 MDR1-cellemodellen.

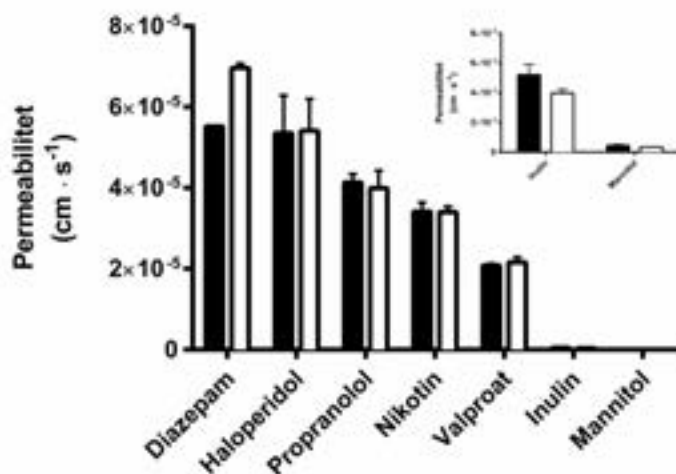
Zosuquidar er en velkendt hæmmer af P-glykoprotein, hvilket vil sige, at stoffet kan begrænse eller blokere P-glykoproteins evne til at pumpe fremmede stoffer ud af cellen. Transportforsøg i nærvær af zosuquidar og andre hæmmere af

P-glykoprotein, kan anvendes til at undersøge transporten af et lægemiddelstof uden påvirkning fra P-glykoprotein. Et sådan forsøg blev gennemført med lægemiddelstoffet digoxin for at bekræfte, at transporten af dette afhæng af P-glykoprotein i IPEC-J2 MDR1-cellerne. Uden zosuquidar til stede i forsøgsopløsningerne var den basolaterale til apikale transport af digoxin 136 gange større end transporten fra den apikale til basolaterale side, figur 3. Tilsætning af zosuquidar til forsøgsopløsningerne stoppede fuldstændigt udpumpningen af digoxin, og der var nu ingen forskel mellem transporten i de to retninger, figur 3, hvilket bekræfter, at digoxin genkendes af P-glykoprotein dannet i IPEC-J2 MDR1-cellerne.

Nogle lægemiddelstoffer, f.eks. diazepam, haloperidol, inulin, mannitol, nikotin, propranolol og valproat genkendes ikke af kendte transportproteiner, og transporten af disse stoffer fra den apikale til den basolaterale side forventes at være af samme størrelsesorden, som transporten i den modsatte retning. Transportforsøg med disse lægemiddelstoffer i IPEC-J2 MDR1-cellerne viste da også, at der ikke var forskel mellem transporten fra den apikale til basolaterale side og transporten fra den basolaterale til apikale side, figur 4. Transportforsøgene viste desuden, at der var stor forskel på hastigheden, hvorved de forskellige stoffer bevæger sig gennem cellebarrieren. Transporten af de relativt hydrofile stoffer som mannitol og inulin, var næsten 2.000 gange lavere end transporten af de mere lipofile stoffer som diazepam, haloperidol, propranolol, nikotin og valproat, figur 4. Denne forskel skyldes, at de relativt lipofile stoffer kan trænge igennem den fedtholdige cellemembran og gennem cellerne, mens de mere hydrofile stoffer kun kan passere cellebarrieren gennem det snævre rum mellem to naboceller, som er meget tæt lukkede i IPEC-J2 MDR1-cellerne, figur 1. Med IPEC-J2 MDR1-cellerne er det derfor muligt at skelne mellem lægemiddelstoffer, som passerer cellebarrieren langsomt, fra lægemiddelstoffer, som nemt trænger gennem cellebarrieren.

Anvendelse af IPEC-2 MDR1-cellemodellen

På grund af IPEC-J2 MDR1-cellernes evne til at danne store mængder menneskelig P-glykoprotein, mens andre transport-



Figur 4. Transport af lægemiddelstoffer som ikke genkendes af transportproteiner gennem IPEC-J2 MDR1-celler. De sorte søjler angiver transport af de enkelte stoffer i den apikale til basolaterale retning, og de hvide søjler angiver transport i den basolaterale til apikale retning. Resultater er vist som gennemsnit ± standardfejl. Figuren er reproduceret med tilladelse fra Saaby et al. [10]. Copyright (2016) American Chemical Society.

proteiner kun dannes i ringe mængder, samt cellernes evne til at danne en særdeles tæt barriere, er cellerne velegnet som et testsystem til at undersøge, hvordan lægemiddelstoffer interagerer med menneskelig P-glykoprotein. Udover at undersøge om lægemiddelstoffer genkendes af P-glykoprotein, kan cellemodellen også anvendes til at analysere sammenhænge mellem molekylestruktur og evne til at binde til P-glykoprotein for en serie af strukturelt beslægtede stoffer.

Den høje tæthed af cellebarrieren og evnen til at danne store mængder P-glykoprotein er samtidig også egenskaber, der kendetegner den menneskelige blod-hjernebarriere. Det er tidligere blevet vist, at information omkring lægemiddelstoffers evne til at trænge gennem en cellebarriere og hvorvidt disse stoffer genkendes af P-glykoprotein, er vigtige parametre for at kunne forudsige om lægemiddelstofferne kan trænge gennem blod-hjernebarrieren.

IPEC-J2 MDR1-cellemodellen kan derfor anvendes som en surrogatmodel for den menneskelige blod-hjernebarriere. IPEC-J2 MDR1-cellerne danner imidlertid ikke de optagsproteiner, der findes i den rigtige blodhjernebarriere, og forskningsgruppen arbejder derfor med at lave cellemodeller, der også indeholder optagsproteiner. På længere sigt er det vores mål at udvikle redskaber, der både kan anskueliggøre udpumpning og optag af lægemiddelstoffer gennem den menneskelige blod-hjernebarriere.

Projektet blev støttet af Styrelsen for Forskning og Innovation under Uddannelses- og Forskningsministeriet, samt af "The Research Initiative on Brain Barriers and Drug Delivery", en projektbevilling fra Lundbeck Fonden.

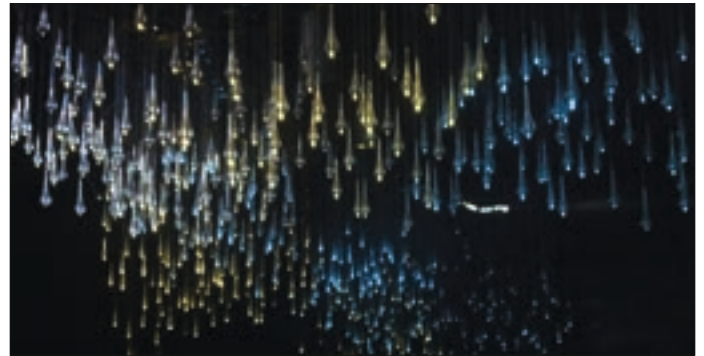
E-mail:

Birger Brodin: birger.brodin@sund.ku.dk

Lasse Saaby: lsa@bioneer-farma.dk

Referencer

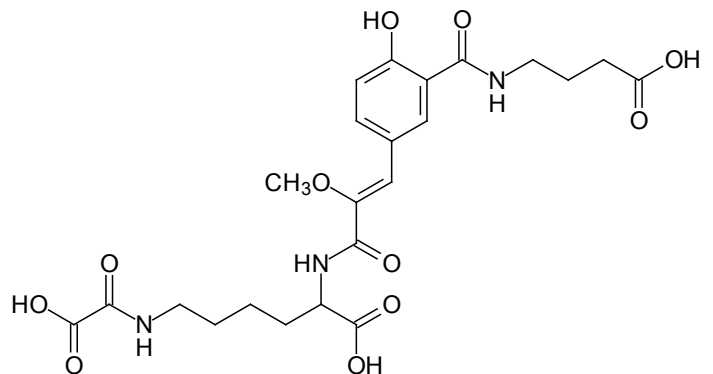
- Ernest S, Rajaraman S, Megyesi J, Bello-Reuss EN. Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney. *Nephron* 1997; 77: 284-289.
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 265-269.
- Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S *et al.* Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* 1988; 48: 1926-1929.
- Hori R, Okamura N, Aiba T, Tanigawara Y. Role of P-glycoprotein in renal tubular secretion of digoxin in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266: 1620-1625.
- Kalvass JC, Maurer TS, Pollack GM. Use of plasma and brain unbound fractions to assess the extent of brain distribution of 34 drugs: comparison of unbound concentration ratios to in vivo p-glycoprotein efflux ratios. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 660-666.
- Mayer U, Wagenaar E, Beijnen JH, Smit JW, Meijer DK, van Asperen J *et al.* Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1038-1044.
- Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 105-127.
- Safa AR, Glover CJ, Meyers MB, Biedler JL, Felsted RL. Vinblastine photoaffinity labeling of a high molecular weight surface membrane glycoprotein specific for multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 6137-6140.
- Di L, Rong H, Feng B. Demystifying brain penetration in central nervous system drug discovery. Miniperspective. *J Med Chem* 2013; 56: 2-12.
- Saaby L, Helms HC, Brodin B. IPEC-J2 MDR1, a Novel High-Resistance Cell Line with Functional Expression of Human P-glycoprotein (ABC1) for Drug Screening Studies. *Mol Pharm* 2016. (accepteret til publikation, december 2015)



Nyt om ...

... Lysende orm

Der kendes en række dyr og alger som f.eks. Sankt Hans orm, ildfluer og morild, der lyser, når de udsættes for mekanisk påvirkning. Russiske forskere har nu undersøgt en orm, *Fridericia heliota*, der lever i mulden i sibiriske skove. Den er kun 15 mm lang. Den lyser blå på samme måde, når den bliver mekanisk



LUCIFERIN

påvirket. Ud fra 60.000 orme isolerede de 0,005 mg stof, som de, ved hjælp af NMR og massespektrometri, viste, havde vist struktur, der er en isomer til den luciferin, der er årsagen til ildfluens lysen. De syntetiserede denne forbindelse, som viste sig at lyse ved indvirkning af enzymet luciferase, som ildfluen også betjener sig af.

Carl Th.

A Novel Type of Luciferin from the Siberian Luminous Earthworm *Fridericia heliota*. *Angewandte Chemie International Edition* 2014, 53, DOI: 10.1002/anie.201400529.



Solutions in Milling & Sieving

The revolution in ultra-fine grinding: The new Emax achieves finer and faster grinding results than any other ball mill!





Kvinderupvej 30 · 3550 Slangerup · Tlf: 4738 1014 · www.retsch.dk