

Actualități și perspective privind cercetarea rezistenței multimedicamenteose în farmacoterapia afecțiunilor sistemului nervos central

NEWS AND PERSPECTIVES ON MULTIDRUG RESISTANCE RESEARCH IN PHARMACOTHERAPY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISORDERS

Alina Crenguța Nicolae, Cristina Manuela Drăgoi, Andreea-Letiția Arsene

Facultatea de Farmacie, Disciplina Biochimie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

INTRODUCERE

În ciuda eforturilor enorme, obținerea unui profil de concentrare în condiții de siguranță și eficacitate în creier rămâne una dintre cele mai mari provocări pentru descoperirea și dezvoltarea de medicamente destinate sistemului nervos central (SNC). Deși există mai multe motive, multe eșecuri sunt datorate subestimării complexității creierului și, de asemenea, a farmacocineticii (PK) specific la acest nivel.

Până în momentul de față, sprijinul PK în descoperirea medicamentelor destinate

SNC se bazează foarte mult pe îmbunătățirea permeabilității *in vitro* și/sau a raportului creier/plasmă (K_p) *in vivo* al barierei hemato-encefalice (BHE), chiar dacă nici un parametru nu poate fi legat în mod evident de rapoartele farmacodinamice (PD) și de eficacitate. În timp ce creșterea permeabilității BHE poate scurta debutul acțiunii medicamentelor, o creștere a concentrației totale la nivel cerebral nu asigură neapărat creșterea concentrației medicamentului în cauză, la nivelul țintei farmacologice. Raportul tradițional K_p se

bazează pe o evaluare omogenă, brută, a țesutului cerebral, ignorându-se compartimentarea creierului. Pentru o înțelegere mai bună a legăturii expunere/PK și eficacitatea/PD și pentru a delimita parametrii cheie, este în curs de evoluție o abordare integrată a dezvoltării de medicamente SNC active, care distinge concentrația totală față de cea liberă la nivelul creierului. Având în vedere că trebuie luate în considerare diferitele compartimente, specifice pentru natura complexă a creierului, atunci când se încearcă a se înțelege

Adresa de corespondență:

Cristina Manuela Drăgoi, Facultatea de Farmacie, Disciplina Biochimie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București
E-mail: manuela.dragoi@gmail.com

și a îmbunătăți compușii noi, trebuie să fie măsurați mai mulți parametri complementari *in vitro* și *in vivo*, și să fie integrate într-un model coerent de penetrare și distribuție la nivelul creierului.

Astfel, noul concept se concentrează pe găsirea de noi medicamente cu un echilibru perfect între fracțiunile libere din plasmă și din creier și între raportul și gradul de penetrare la nivel SNC. Integrarea acestor date într-un model coerent de distribuție SNC, care poate fi legat de eficacitate, va permite proiectarea unor compuși cu proprietăți fizico-chimice, farmacologice și farmacocinetice optime, ce vor conduce către reducerea riscurilor de dozare și eventualelor eșecuri clinice. (1,10)

PREMISELE CERCETĂRII PENTRU DESCOPERIREA ȘI DEZVOLTAREA DE NOI MEDICAMENTE ACTIVE LA NIVELUL SNC

Descoperirea și dezvoltarea de noi medicamente pentru a trata boli ale SNC este una dintre cele mai dificile ramuri ale industriei farmaceutice, cu o rată de eșec mai mare decât în orice alt domeniu terapeutic. Riscul ridicat de eșec pentru noile medicamente SNC active este legat de complexitatea extraordinară a anatomiei și fiziologiei creierului uman și patologiilor sale. Bolile SNC sunt definite în mod tradițional de simptome clinice, nu de mecanismele farmacologice, prin urmare, există o mare parte din

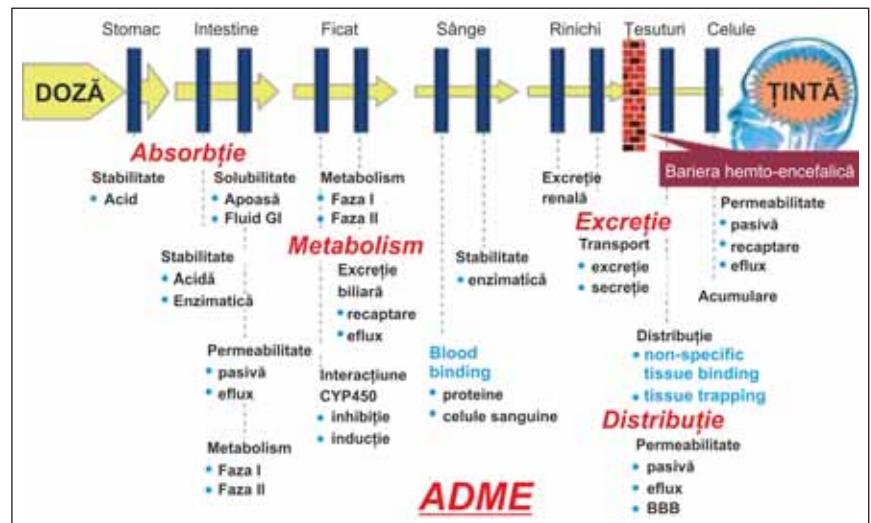


FIGURA 1. Bariere farmacocinetice existente între medicamentul administrat oral și țesutul țintă de la nivelul SNC. Figura prezintă țesuturile, procesele și factorii ce controlează absorbția, distribuția, metabolismul și epurarea medicamentelor (Reichel, 2009)

pacienți care nu răspund la medicamentele cu mecanisme de acțiune bine definite, mascând efectul pentru o sub-populație cu potențial de răspuns la acestea. O parte a problemei constă în înțelegerea încă insuficientă a fiziopatologiei subiacente a bolilor. După cum s-a văzut, de exemplu, în cele mai multe studii clinice bazate pe patologia accidentului vascular cerebral, medicamentele aflate în studiu adesea nu au nici un efect asupra omului, în ciuda faptului că s-au observat efecte semnificative în laborator, punând la îndoială relevanța testelor efectuate asupra modelelor animale. De asemenea, efectele favorabile pe termen scurt ar putea avea efecte inverse la aplicarea pe termen lung, demonstrând că rezultatele după tratamentul cronic pot diferi de efectele terapiei acute, așa cum SNC poate răspunde la tratament în moduri foarte complexe. O altă problemă care persistă este identificarea unei doze optime și o schemă corespunzătoare pe parcursul

studiului clinic, în condiții de siguranță și eficacitate, această dificultate fiind agravată și mai mult în cazul în care medicamentul aflat în studiu are o fereastră terapeutică foarte îngustă, și nu există biomarkeri de monitorizare la îndemână. În final, dar nu în ultimul rând, vascularizația creierului care formează bariera hemato-encefalică (BHE) poate servi drept un obstacol formidabil la intrarea medicamentelor în creier, făcând concentrația țesutului țintă de la nivelul SNC să fie insuficientă pentru a asigura eficacitatea farmacologică. (2,13)

Pentru medicația orală a SNC, situația este complicată și prezintă multe obstacole farmacocinetice pe care un compus trebuie să le depășească între administrarea orală și atingerea locului de acțiune țintă în cadrul SNC, de exemplu absorbția intestinală, distribuția în organism, inclusiv în creier, și, ulterior, metabolismul și excreția (Fig. 1).

Prin urmare, oamenii de știință în domeniul farmacocineticii (PK) trebuie să evalueze mai multe procese de absorbție, distribuție, metabolizare și epurare (ADME) din fazele inițiale ale procesului de dezvoltare de medicamente, cu scopul de a optimiza și echilibra diferitele proprietăți ale compușilor astfel încât să crească șansele de succes în clinică. Există în momentul de față o gamă largă de teste ADME *in vitro* și studii PK *in vivo* disponibile, alături de abordări bine stabilite pentru a identifica și optimiza mecanismele implicate în metabolismul și farmacocinetica medicamentelor în procesul actual de descoperire de noi medicamente. În plus, în cadrul proiectelor de descoperire a unor noi substanțe terapeutice active la nivelul SNC, introducerea în creier de noi compuși este o proprietate cheie care trebuie atent evaluată. Cu toate acestea, deși există acum o serie de metode de studiu *in silico*, *in vitro* și *in vivo*, cunoștințele despre penetrarea substanțelor la nivelul creierului s-au bazat foarte mult pe măsurarea concentrațiilor totale cerebrale la animale mici de experiență.

Mai mult decât atât, concentrațiile totale cerebrale, exprimate ca raport la nivelul cerebral/plasmatic, poate fi prezis *in silico* prin modularea compușilor spre niveluri cerebrale totale înalte. Totuși, cu toate că au fost generați din ce în ce mai mulți compuși cu concentrații cerebrale totale înalte, nu a existat o creștere

corespunzătoare în eficacitatea *in vivo* a acestor compuși, în ciuda unei potențe excelente demonstrate *in vitro* prin evaluarea mecanismului țintă. Într-adevăr, atât potența, cât și concentrația cerebrală totală *in vitro* sunt determinate în principal de lipofilia compușilor, astfel că multe studii de descoperire a unor noi medicamente active la nivel SNC au ajuns la un compus cu profil lipidic optim, care însă nu a condus studiul către o finalitate terapeutică. (6,14)

Eșecul abordării tradiționale a dus la apariția unui nou concept pentru examinarea pătrunderii la nivel cerebral în descoperirea de noi medicamente. Această abordare ține seama de complexitatea creierului, considerând creierul ca având compartimente separate din punct de vedere farmacocinetic, diferențiind mult mai bine distribuția cerebrală în ceea ce privește nivelul total și nivelurile libere de medicamente și cu o discriminare mult mai riguroasă între viteza și gradul de pătrundere la nivel cerebral.

METODE DE STUDIU PENTRU DESCOPERIREA DE NOI MEDICAMENTE SNC ACTIVE

Metode clasice pentru studierea pătrunderii medicamentelor în creier

Problema pătrunderii în creier a fost abordată încă de la începutul studiilor de descoperire a unor noi medicamente cu acțiune la nivel SNC, folosind o cascadă

de instrumente de complexitate din ce în ce mai mare, de la predicțiile *in silico*, la studiile pe animale *in vitro* și *in vivo*. (3,5,11,16)

Teste *in vitro* de evaluare a permeabilității ca măsură a pătrunderii medicamentelor în creier

Pătrunderea unui medicament din sânge în creier este controlată de rata de permeabilitate a stratului strâns al celulelor endoteliale cerebrale. S-a stabilit că modelele de culturi celulare pot reconstitui BHE *in vitro* pentru a oferi o măsură rapidă a permeabilității pentru compușii nou sintetizați.

Deși au trecut trei decenii de experiență în domeniul culturilor de celule endoteliale cerebrale, nu există încă disponibil un model *in vitro* satisfăcător al BHE. În timp ce culturile de celule endoteliale cerebrale primare sunt prea greoaie pentru a fi aplicate în mod obișnuit, toate liniile celulelor endoteliale cerebrale imortalizate, generate astfel, nu dispun de etanșitatea necesară. Prin urmare, cele mai multe grupuri de cercetare în domeniul SNC preferă să utilizeze linia de celule MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) pentru a evalua compușii privind permeabilitatea lor prin BHE. Deși celulele MDCK nu sunt nici celulele endoteliale și nici nu provin din creier, monostratul acestora este foarte dens și celulele sunt perfect sudate, permițând astfel identificarea și respingerea compușilor recunoscuți de pompele de eflux ale BHE.

Datele despre permeabilitate sunt utile pentru a clasifica compușii în funcție de permeabilitatea lor și pentru a exclude compușii cu permeabilitate foarte slabă din studiile *in vivo*, pentru că este puțin probabil ca aceștia să devină substanțe terapeutice. Ele oferă, de asemenea, primele indicii cu privire la implicarea proceselor de transport activ. Datele despre permeabilitate nu furnizează nici o informație cu privire la concentrațiile libere ce pot fi atinse în creier, deoarece acest lucru este determinat de proprietățile de legare ale compusului în creier, raportat la sânge, și concentrația de compus circulant la nivel sangvin. Datele despre permeabilitate oferă doar un aspect al pătrunderii în SNC, rata de acces la acest nivel, trebuind completate cu informații cu privire la distribuția în creier. (16)

Metode de studiu *in vivo* a pătrunderii medicamentelor în creier

Raportul concentrației creier/plasmă este folosit ca măsură a gradului de pătrundere la nivelul întregului creier. Cea mai utilizată metodă pentru a studia *in vivo* pătrunderea în creier a unei substanțe este determinarea raportului creier/plasmă la rozătoare. De obicei, compusul de testat este administrat intraperitoneal (ip), subcutanat (sc) sau *per os* (po) și concentrațiile din plasmă și creierul sunt evaluate în 3-5 perioade de timp diferite, de la administrare. Alternativ, compusul este administrat în perfuzie, intravenos, până

când se atinge starea de echilibru, iar plasma și creierul sunt prelevate la un singur interval de timp, reducând astfel numărul de animale folosite în studiu. Țesutul cerebral este omogenizat, iar concentrația cerebrală totală a compusului este determinată (mai ales prin LC/MS) și raportată la concentrația sa din plasmă.

În timp ce măsurarea concentrației cerebrale permite clasificarea compușilor în funcție de concentrația cerebrală totală (raportat la doză) și penetrabilitatea generală la nivel SNC (raportată la plasmă), aceste date nu oferă informații concludente cu privire la concentrația din țesutul țintă. Având în vedere că omogenizarea țesutului cerebral distruge toate compartimentele tisulare, această metodă nu poate furniza informații cu privire la concentrațiile compușilor, în nici un compartiment specific, de exemplu, ISF sau ICF cerebral. În plus, raportul creier/plasmă este, în general, independent de doză și, prin urmare, nu pot fi stabilită o curbă doză-răspuns. (4,17)

Pentru a evita această limitare cheie a evaluării concentrațiilor totale din creier, se folosește prelevarea de probe din CSF sau se poate folosi microdializa cerebrală a ISF. Cu toate acestea, ambele metode au dezavantajele lor, în special aplicabilitatea (microdializa) și fiabilitatea (prelevare de probe din CSF), care limitează aplicabilitatea lor în descoperirea de noi medicamente.

Metode noi *in vitro* pentru a completa metodele clasice

Deși tehnicile *in vivo*, cum ar fi prelevarea de probe din CSF și microdializa creierului, s-au folosit de mulți ani, abia din momentul în care metodele *in vitro* au devenit disponibile, fracțiunea liberă a compusului din creier a început să fie studiată mai mult în descoperirea de medicamente SNC active.

Studii de legare *in vitro* pe omogenat cerebral sau secțiuni de creier – concentrația liberă din creier ca informație cheie despre distribuția cerebrală a medicamentului

Maurer și echipa sa de cercetare introdus o metodă *in vitro*, simplă și elegantă, pentru a determina fracțiunea liberă din creier, bazată pe dializa la echilibru a compusului, între o soluție tampon și omogenatul cerebral. Metoda poate fi realizată în paralel cu estimarea fracției libere din plasmă și este capabilă să furnizeze rapid date privind $f_{u,creier}$ și $f_{u,plasma}$ ($f_{u,creier}$ - fracțiune liberă în creier; $f_{u,plasma}$ - fracțiune liberă în plasmă) pentru un număr mare de compuși. Aceste date permit evaluarea comportamentul de distribuție al compușilor în creier, *in vivo*. Cum ISF din creier conține numai o cantitate foarte mică de proteine, $f_{u,creier}$ poate fi folosit direct pentru a estima concentrațiile libere ale unui compus în ISF cerebral. De remarcat că există o corelație foarte slabă între $f_{u,plasma}$ și $f_{u,creier}$, prin urmare, fracțiunea

liberă din plasmă nu este un marker adecvat pentru concentrațiile cerebrale libere, motivul cel mai probabil fiind profilul foarte diferit lipidic și proteic al compoziției plasmei și creierului, deoarece plasma are de două ori mai multe proteine, în timp ce creierul are de 20 de ori mai multe lipide. (7,9)

Alte echipe de cercetare au dezvoltat o metodă *in vitro*, alternativă, pentru a determina fracțiunea liberă a creierului prin utilizarea secțiunilor cerebrale care, față de metoda de omogenizare, menține structura celulară a țesutului cerebral pe durata studiului privind distribuția *in vitro*. Avantajul acestei metode mai elaborate este că diferențele dintre concentrațiile din ISF și din ICF pot fi obținute ca rezultate valorice ale $f_{u,creier}$, în timp ce metoda mai simplă pe omogenat cerebral nu a reușit să facă distincția între nivelurile ISF și ICF. Din fericire, această ipoteză se aplică în marea majoritate a cazurilor, astfel încât tehnica mai elaborată pe secțiuni cerebrale poate fi utilizată numai pentru acei compuși pentru care procesele de transport la nivelul celulelor cerebrale modifică echilibrul între ISF și ICF semnificativ față de unitate, de exemplu, prin transport activ celular, așa cum este cazul gabapentinei.

Metodele de mai sus, care oferă informații rapide cu privire la fracțiunea liberă a multor compuși din țesutul cerebral *in vitro*, au reprezentat un pas important în înțelegerea pătrunderii și distribuției în creier.

Totodată, acestea au permis accesul la informații relevante privind concentrațiile dintr-un compartiment cerebral specific, cu un anumit efect farmacologic. S-a deschis astfel calea aplicării acestor metode în mod sistematic pentru descoperirea de medicamente utile în bolile SNC, putând astfel stabili relații cantitative farmacocinetică/expunere – farmacodinamie/efect. (12)

PERSPECTIVE

Structura complexă a sistemului nervos central face ca pătrunderea medicamentelor la nivelul creierului să fie o caracteristică foarte complexă, care nu poate fi raționalizată pe baza unui singur parametru. Deși concentrațiile medicamentelor de la nivelul întregului creier sunt în continuare cele mai comune măsuri de evaluare a expunerii SNC-ului la medicamente, în ultima vreme este creditată ipoteza că ar fi mai mult o indicație a unei înalte legări non-specific la țesutul cerebral decât că ar reprezenta concentrații relevante farmacologic. Nici titrul la nivelul întregului creier și nici permeabilitatea BHE nu pot fi luate în considerare fără a evalua capacitatea de legare a țesutului cerebral. (8,16)

Așadar, paradigma actuală cu privire la pătrunderea la nivelul creierului evoluează către o viziune mai compartimentată ce permite o mai bună raționalizare a distribuției compușilor în cadrul creierului și folosește compartimentele creierului, ce prezintă o mai mare

relevanță din punct de vedere farmacologic. Cheia de boltă a acestei noi paradigme este diferențierea clară între viteza și gradul de pătrundere a medicamentelor la nivelul creierului, și între nivelurile medicamentoase totale și libere ca parametri pentru distribuția medicamentelor la nivelul țesutului cerebral. Încercând o viziune mai holistică, conceptul este capabil să rezolve o serie de observații aparent contradictorii, de exemplu, de ce efectele asupra SNC-ului pot fi văzute în clinică, deși un medicament activ la nivelul SNC-ului pătrunde cu greu BHE, este substrat al pompei de eflux, are niveluri scăzute pentru întregul creier, se leagă într-o măsură mică de țesutul cerebral sau are o legătură proteică plasmatică foarte stabilă.

Noua paradigmă nu cere renunțarea la testele tradiționale, ci le completează și analizează rezultatele într-un mod mai integrat. Metodele propuse și interpretarea combinată a parametrilor se face foarte mult în analogie cu farmacocinetica convențională, ceea ce va face mai ușor pentru noua paradigmă să fie acceptată în programele de descoperire a medicamentelor active la nivel SNC, în dezvoltare. Cu toate acestea, noua paradigmă interzice folosirea exclusivă a raportului (populare, dar înșelătoare) creier total/plasmă totală.

Aceasta este, de asemenea, o schimbare importantă care poate perima multe modele *in silico*, ce prezic acest parametru (adesea exprimat ca LogBB) și ar putea

schimba, în cele din urmă, eforturile de evaluare chimică spre mai multe evaluări bazate pe structură, ce încearcă să îmbunătățească aceste proprietăți particulare ale unui compus care prezintă o legătură clară cu efectele dorite.

Conceptul holistic de pătrundere la nivelul SNC consideră rata de permeabilitate prin BHE, gradul de pătrundere al medicamentelor la nivelul creierului și distribuția intracerebrală a unui medicament activ SNC ca proprietăți distincte, dar legate între ele, ceea ce trebuie cercetat prin diferite metode *in vitro* și *in vivo*. Prin urmare, integrarea datelor din diferite teste și studii devine o parte centrală a paradigmei în plină evoluție, cu scopul de a dezvolta relații cantitative între doza, expunerea și eficacitatea medicamentelor.

Înglobarea datelor privind ocuparea receptorilor și a biomarkerilor va permite un

mai bun *design* al studiului farmacologic precum și predicții despre doză mai corecte reducând, în cele din urmă, riscurile asociate cu eficacitatea clinică slabă și siguranța medicamentelor, care sunt în prezent principalele motive pentru care medicamentele aflate în dezvoltare eșuează în studiile clinice. În prezent, există, de asemenea, încercări de a combina conceptul de pătrundere la nivelul SNC, cu domeniul de dezvoltare preclinic și clinic al medicamentelor, cu intenția de a face extrapolările de la animal la om mult mai realiste.

Prin integrarea acestor date și tehnologii în modelarea și simularea farmacocinetică/farmacodinamică (PK/PD), va fi posibilă o înțelegere a farmacocineticii și a farmacodinamicii potențialelor medicamente în sistemul nervos central uman. (1,13,15)

O astfel de înțelegere va fi esențială pentru a defini

parametrii farmacocinetici favorabili pentru indicația dorită, pentru a ghida dezvoltarea preclinică de compuși (de exemplu, cum ar fi alegerea dozei pentru testarea toxicității la speciile evaluate, precum și la om, și în dozele terapeutice) și, în cele din urmă, pentru a crește șansele de succes a fazei II din studiu, la pacienți umani. Accentul tot mai mare pe medicina translațională pentru a reduce decalajul dintre cercetarea și dezvoltarea de medicamente pentru SNC, precum și aplicarea, concentrată, a noilor tehnologii, în special în imagistica creierului, pot accelera nu numai descoperirea de noi medicamente și îmbunătățirea ratei de succes a noilor medicamente active SNC, dar poate oferi, de asemenea, un nou impuls de motivație pentru dezvoltarea de medicamente care este încă îngreunată de prea multe incertitudini.

BIBLIOGRAFIE

1. Reichel A. – Addressing Central Nervous System (CNS) Penetration in Drug Discovery: Basics and Implications of the Evolving New Concept, *Chemistry & Biodiversity*, 2009 – Vol. 6, 2030-2049.
2. Clark D.E. – What has polar surface area ever done for drug discovery? *Future Medicinal Chemistry*, 3, 469-484, 2011
3. Colabufo N.A., Berardi F., Cantore M., Contino M., Inglese C., Niso M. et al. – Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *J Med Chem*, 2010, 53: 1883-1897.
4. Drăgoi C.M., Mitrea N., Arsene A.L., Ilie M., Nicolae A.C., Jurkat E – 6.1 cell line studies regarding the effects of some bio-indols on the membrane fluidity, *Farmacia*, 2012, Vol. 60, 1, 13-20
5. Drăgoi C.M., Mitrea N., Arsene A.L., Nicolae A.C., Ilie M. – In vitro effects of some bio-indoles on the transmembrane potential of Jurkat E 6.1 lymphoblasts, *Farmacia*, 2012, Vol. 60, 2, 240-248
6. Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee C., Shi Y., Gelinas C., Fan Y. et al. – Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006, 10, 51-64.
7. Kalvass J.C., Pollack G.M. – Kinetic considerations for the quantitative assessment of efflux activity and inhibition: implications for understanding and predicting the effects of efflux inhibition. *Pharm Res* 2007, 24: 265-276.
8. Kannan P., John C., Zoghbi S.S., Halldin C., Gottesman M.M., Innis R.B., Hall M.D. – Imaging the Function of P-Glycoprotein With Radiotracers: Pharmacokinetics and In Vivo Applications. *Clin Pharmacol Ther*, 2009, 86, 368-377.

9. **Liu X., Chen C., Smith B.J.** – Progress in brain penetration evaluation in drug discovery and development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, 325, 349-356
 10. **Mihai L.G., Mitrea N., Papacocea R.I., Badarau A.I.** – Dynamic activity of some antioxidant enzymes in primary cultures of neurons under hypoxia and ischemia. *Farmacia*, 2012, 60,1, 49-57
 11. **Mitrea N., Arsene A.L., Drăgoi C.M., Ilie M.** – Experimental research regarding melatonin effect on lymphoblastic cells membrane potential and fluidity, 2nd PharmSciFair 2009, Nice, Franța
 12. **Mueller S., Arnhold J.** – Fast and sensitive chemiluminescence determination of H₂O₂ concentration in stimulated human neutrophils. *J Biolumin Chemilumin.* 1995, 10, 4, 229-237
 13. **Pariente C.M., Lightman S.L.** – The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, 2008, 31: 464-468
 14. **Sadeque A.J., Wandel C., He H., Shah S., Wood A.J.** – Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 68:231-237
 15. **Vilar S., Chakrabarti M., Costanzi S.** – Prediction of passive blood-brain partitioning: Straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28, 899-903, 2010
-