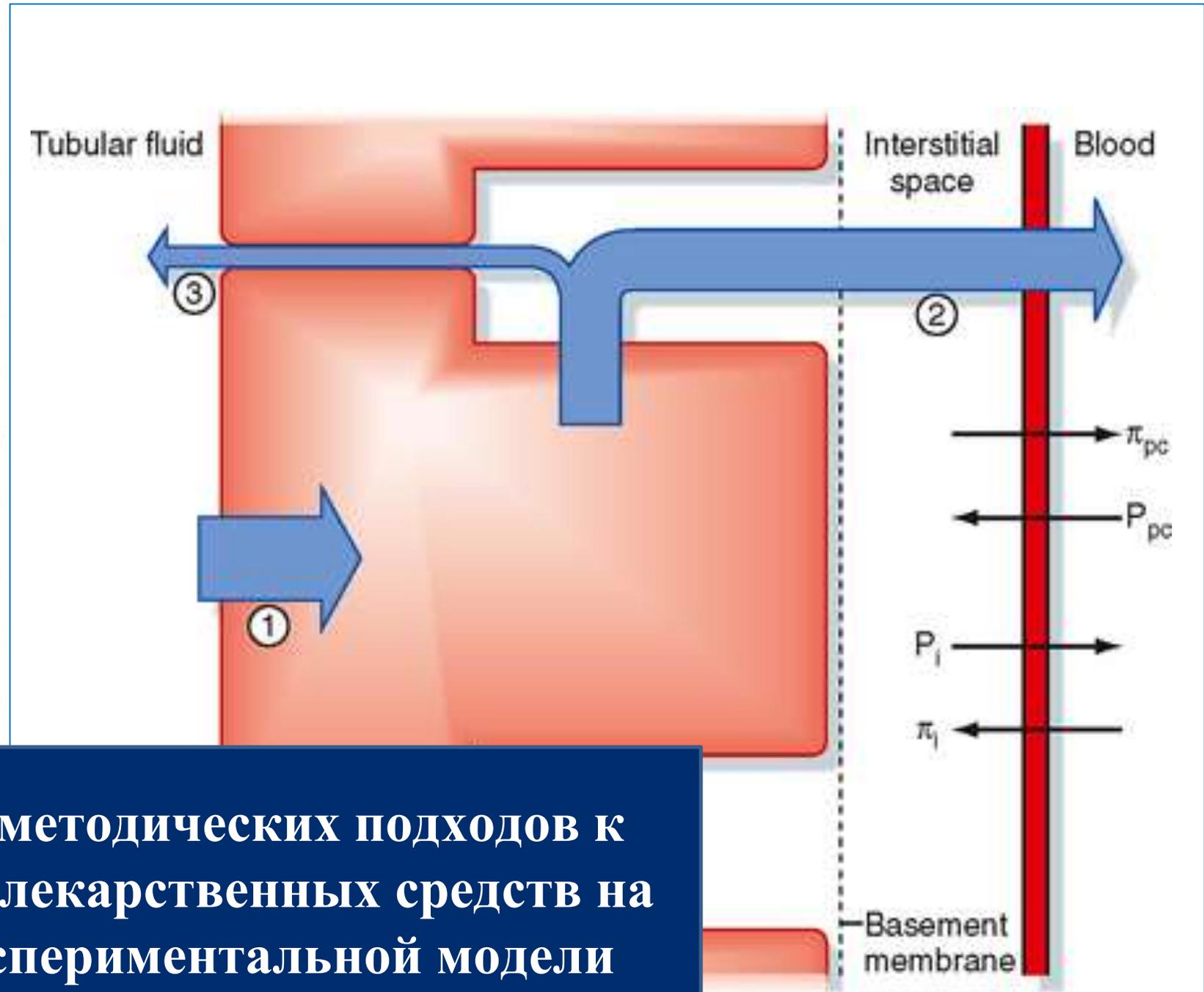




ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России



Разработка научно-методических подходов к оценке безопасности лекарственных средств на основе создания экспериментальной модели нефротоксичности

Прокофьев А.Б.
Начальник НОКФ

22.12.2023

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



Цель работы: разработка научно - методических подходов по повышению эффективности оценки токсичности ЛС на основе разработки экспериментальной модели клеточной линии RPTEC.

Задачи:

1. Проведение анализа данных литературы об экспериментальных моделях нефротоксичности *in vitro* состояния проблемы контроля безопасности лекарственных препаратов.
2. Выбор оптимальных экспериментальных условий культивирования для клеточной линии проксимальных почечных канальцев человека, обеспечивающий стабильный уровень транспортеров органических анионов



Задачи:

3. Сравнительная характеристика и обоснование выбора клеточной линии, используемой в экспериментальных моделях по изучению нефротоксичности лекарственных препаратов.
4. Выбор и отработка методики оценки функциональной активности почечных транспортеров лекарственных средств.
5. Выбор и отработка методики определения токсических эффектов, наблюдаемых при транспорте ЛС посредством почечных транспортеров в экспериментальной модели *in vitro*.
6. Изучение цитотоксических эффектов, специфических маркеров нефротоксичности на модели RPTEC.



- За последние 50 лет уровень смертности от острого повреждения почек (ОПП) практически не изменился и составляет примерно 50% -70%.
- Среди всех существующих лекарственных препаратов на рынке 30% имеют доминирующий почечный путь выведения (Feng B, Varma M. **Evaluation and quantitative prediction of renal transporter-mediated drug-drug interactions. J. Clin. Pharmacol., 56 (S7) S110–S121 (2016).**
- Развитие нефротоксичности различных лекарственных препаратов в процессе лечения в стационарах, по данным литературы, достигает 60% (Shahrbaf FG, Assadi F. **Drug-induced renal disorders. J Renal Inj Prev. 2015; 4(3): 57-602).**
- Более 20% из 100 лекарственных препаратов (ЛП), наиболее часто назначаемых взрослым пациентам, классифицируются как нефротоксичные.
- При разработке ЛС нефротоксические свойства выявляются чаще всего только в клинике. Всего у 2% ЛС обнаруживают нефротоксичность на доклинических этапах.



«Если данные фармакокинетики исследуемого ЛС указывают, что почечная секреция ЛС значительна (т.е. активное выведение исходного ЛС почками $\geq 25\%$ от общего клиренса), заявитель должен провести исследования ЛС *in vitro* на предмет, является ли оно субстратом OAT1/3, OCT2 и MATE1 и MATE2-K».

«Заявитель должен провести исследование *in vitro* для оценки, является ли исследуемое ЛС ингибитором P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OCT2, MATEs (MATE-1, MATE-2K), OAT1 и OAT3»

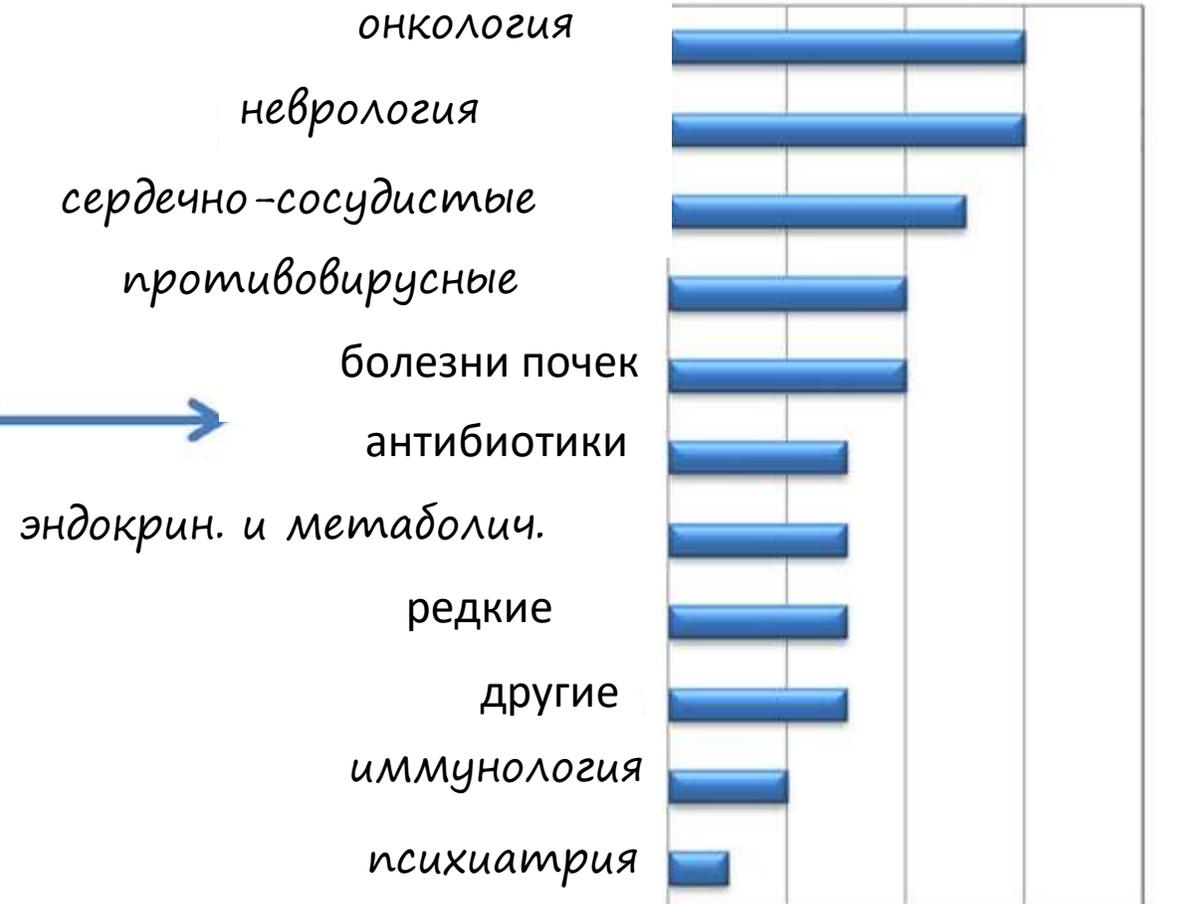
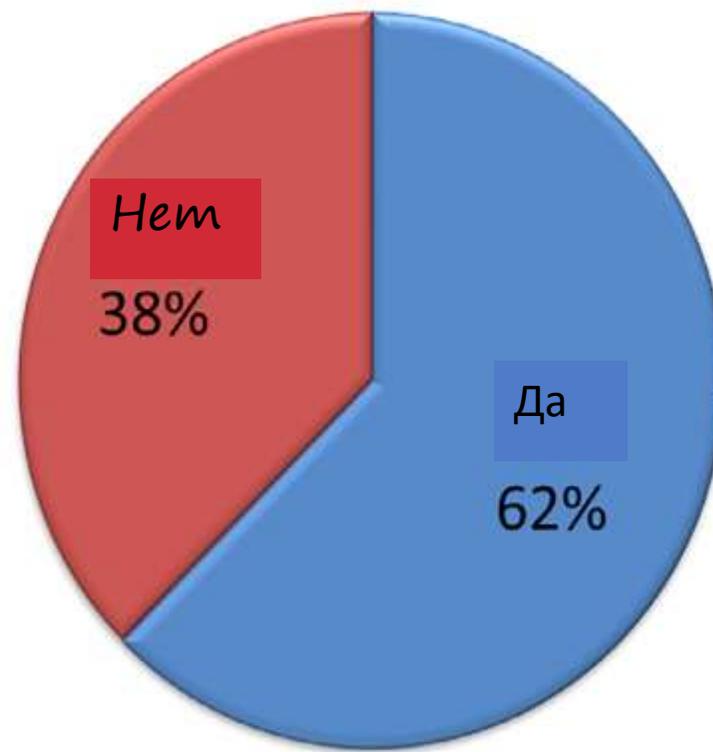
«Заявитель должен провести исследования по определению ингибирующей мощности (т.е. IC₅₀ или K_i) исследуемого ЛС на захвате известного субстрата почечными транспортерами (OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 и MATE2K) на клетках с избыточной экспрессией этих транспортеров».

*<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>



Дорегистрационный этап: отказ от разработки нового ЛС по причине нефротоксичности

Были ли случаи отказа от производства ЛС из-за нефротоксичности по данным доклинических и клинических испытаний за последние 10 лет?



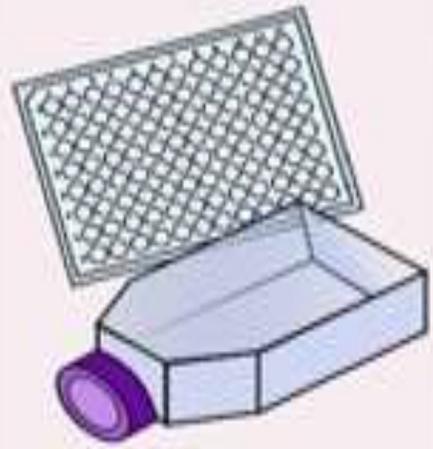
60% – на доклиническом этапе нефротоксичность не определялась

Troth SP с соавт. Kidney Safety Assessment: Current Practices in Drug Development. Semin Nephrol. 2019;39(2):120-131.

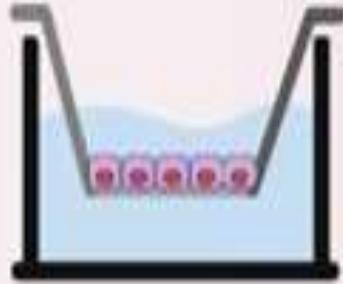


RPTEC/TERT1 - клетки проксимального канальца человека, иммортализованные с помощью человеческой обратной транскриптазы теломеразы hTERT

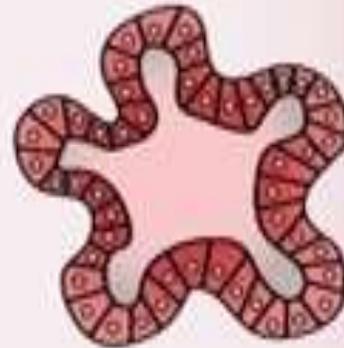
- ✓ обладают морфологическими и функциональными характеристиками эпителиальных клеток проксимального канальца человека: наличием микроворсинок, плотных контактов, активностью ГГТ, эндоцитозом, функционирующими транспортерами;
- ✓ могут прожить не менее 90 удвоений популяции.



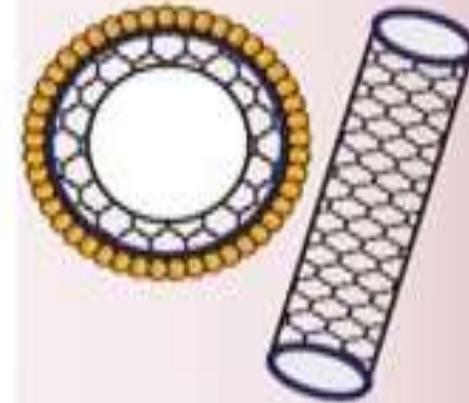
2D-культуры



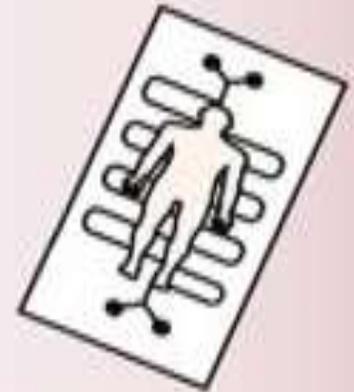
2,5D-культуры



3D-культуры
(ECM-матрикс)



3D-культуры
(scaffold)



3D-культуры
(kidney-on-chip)

- простота обращения
- воспроизводимость
- возможность генетических модификаций

- сложность в обращении
- повышенная чувствительность
- физиологическая значимость
- взаимодействие между клетками



Культивирование

Культивирование клеточной линии RPTEC начиналось с 5 пассажа и осуществлялось в 12 луночных плашках Costar "Transwell" с мембранными вставками с диаметром пор 0,4µm.

Для выяснения влияния условий культивирования на уровень экспрессии генов OAT-транспортеров клеточная линия RPTEC культивировалась в среде DMEM-F12 (ATCC 30-2006) с добавлением сыворотки, а так же без нее, где в качестве ростового фактора использовался hEGF.



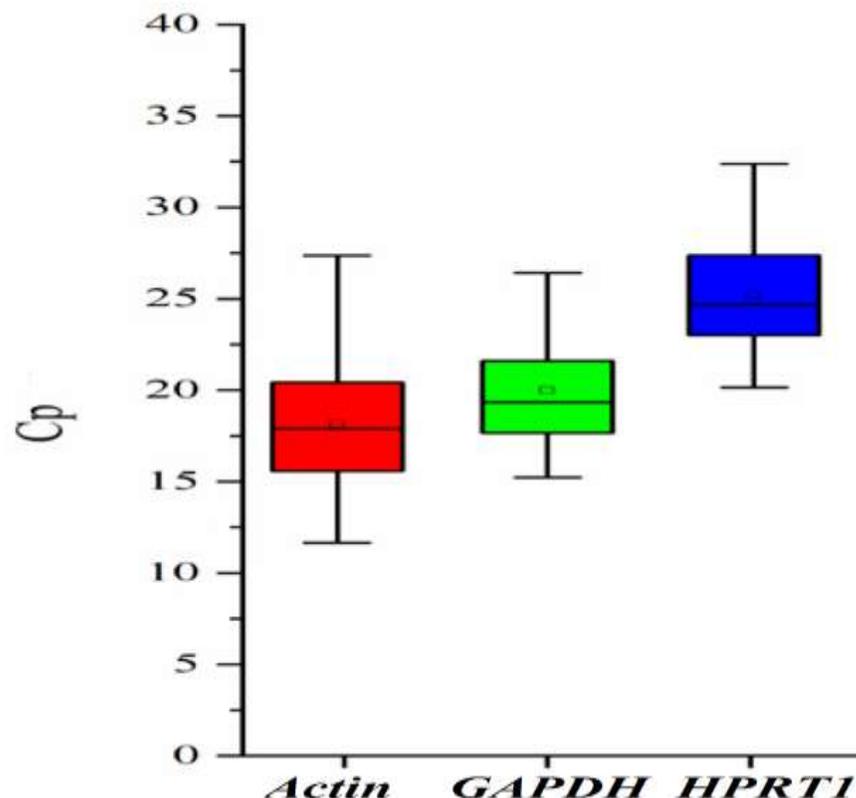
Подбор наиболее подходящего референсного гена для клеточной линии RPTEC (задача 2)

10

Выбор референсного гена для нормирования экспрессии OAT-транспортеров в клеточной линии RPTEC

Проводился на основе сравнения пороговых значений (C_p) - номер цикла, когда сигналы генерируемой флуоресценции достигают обнаружаемого уровня. Более низкие значения C_p указывают на более высокие уровни экспрессии; соответственно, более высокое значение C_p эквивалентно более низкому уровню экспрессии генов. В таблице приведены последовательности праймеров генов-кандидатов.

Ген	Прямой (5'->3')	Обратный (5'->3')	Размер ампликона, п.о.
GAPDH	ggatttggtcgtattggg	ggaagatggtgatgggatt	205
β -actin	ggacttcgagcaagagatgg	agcactgtgttggcgtacag	234
HPRT-1	cgagatgtgatgaaggagatgg	tgatgtaatccagcaggtcagc	132



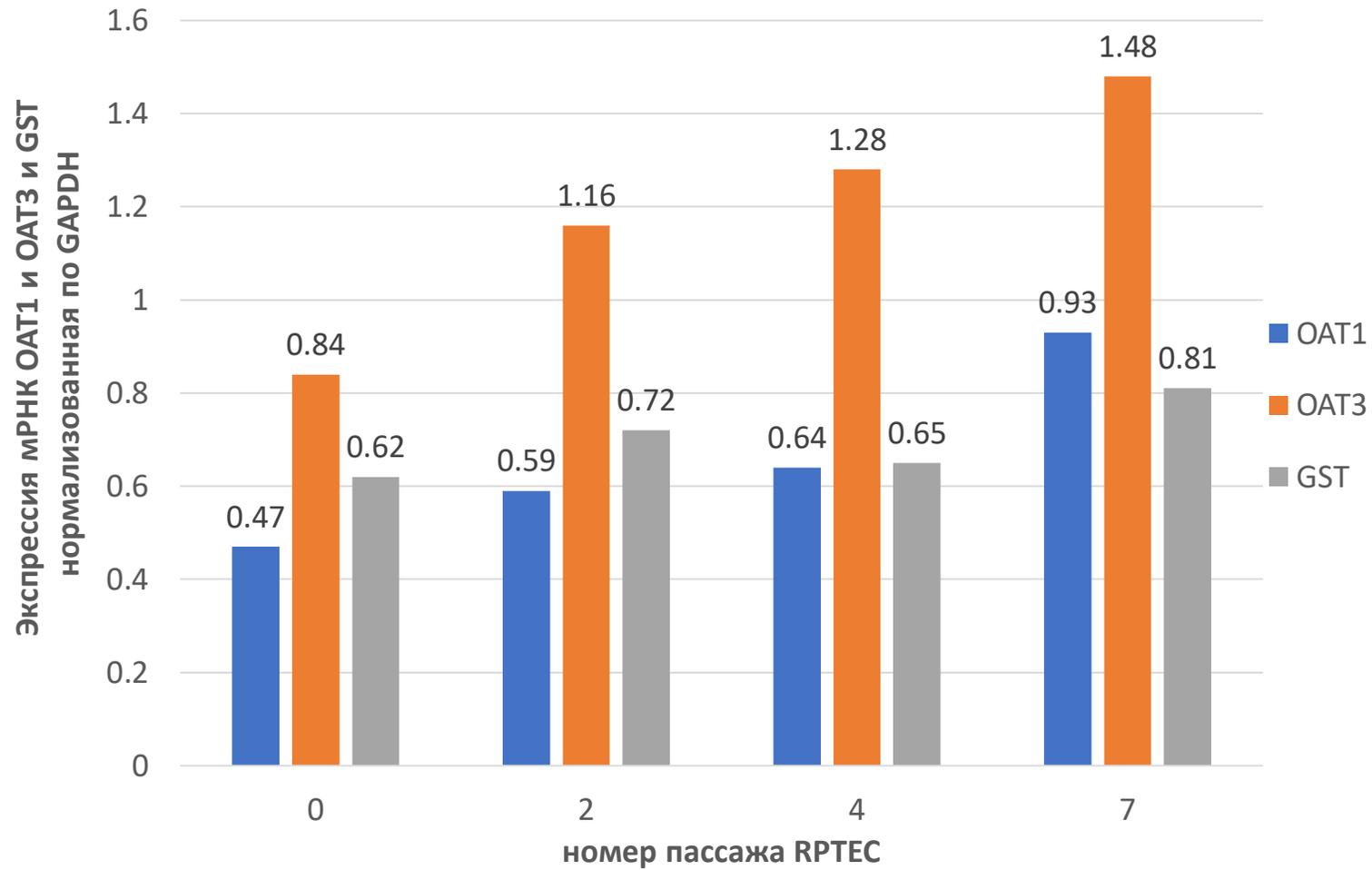
Как показано на графике, средние значения C_p трех референсных генов варьируются от 17,60 до 24,87. **Наименьший диапазон значений наблюдается у гена GAPDH – $18,63 \pm 1,72$.** Поэтому данный ген был выбран в качестве референсного при изучении экспрессии OAT-транспортеров.



В рамках 2 задачи

Влияние условий культивирования на уровень экспрессии генов OAT1, OAT3 и GST в клеточной линии RPTEC

11



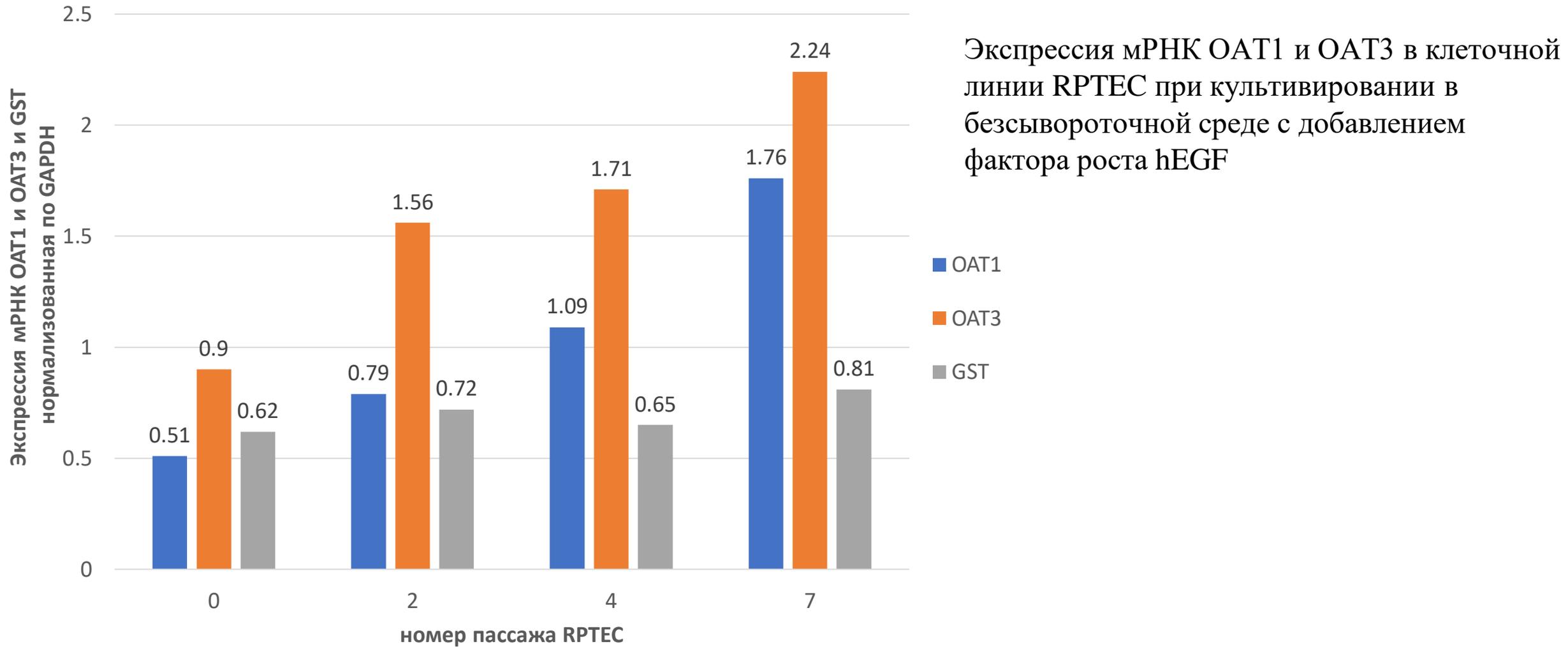
Экспрессия мРНК OAT1 и OAT3 в клеточной линии RPTEC при культивировании в среде с сывороткой



В рамках 2 задачи

Влияние условий культивирования на уровень экспрессии генов OAT1, OAT3 и GST в клеточной линии RPTEC

12





Установлено:

1. Наиболее подходящим референсным геном для клеточной линии RPTEC является GAPDH
2. Уровень экспрессии транспортеров органических анионов в клеточной линии RPTEC на 15-20% выше при культивировании в безсывороточной среде с добавлением hEGF чем при культивировании в среде с сывороткой, что делает эту методику более предпочтительной
3. Повышенный уровень экспрессии фермента GST в клетках RPTEC, культивирующихся в безсывороточной среде, является одним из показателей дифференцировки клеток



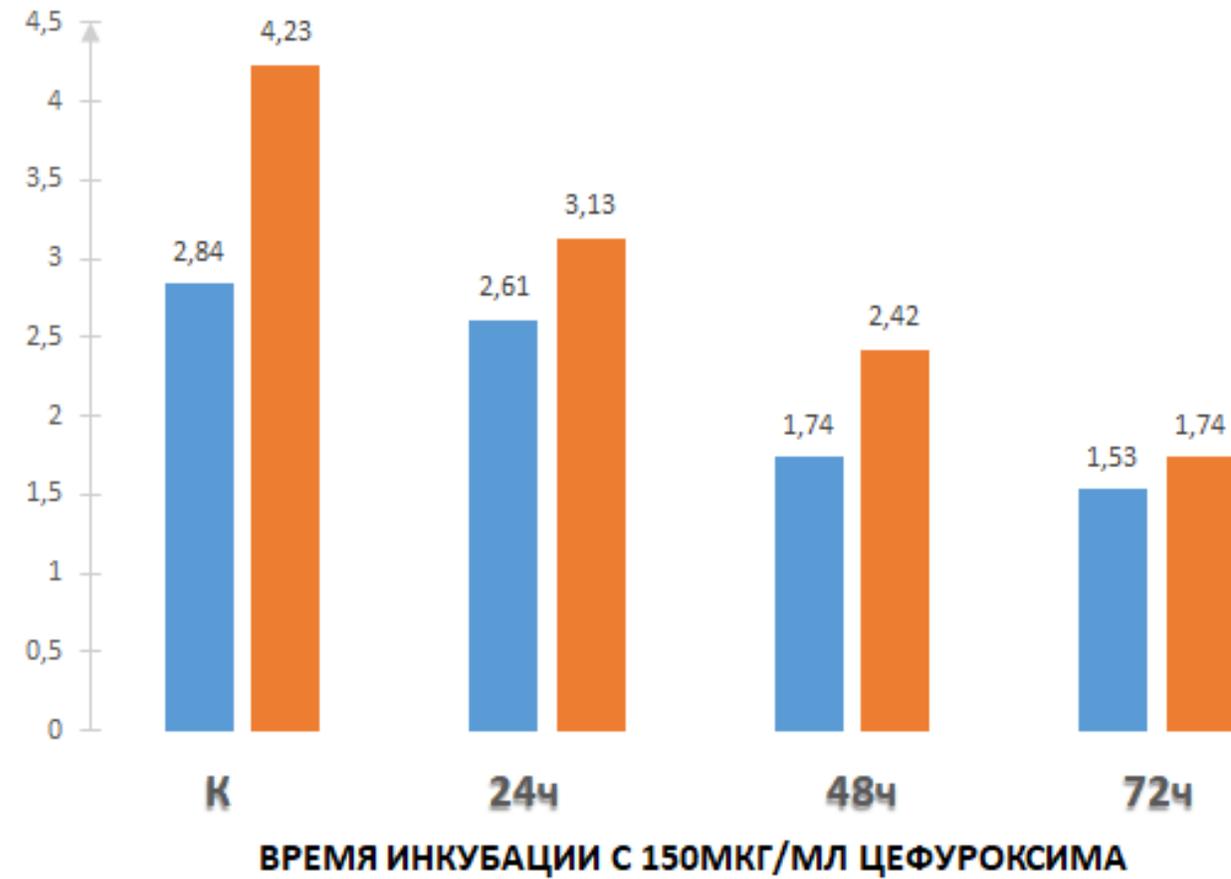
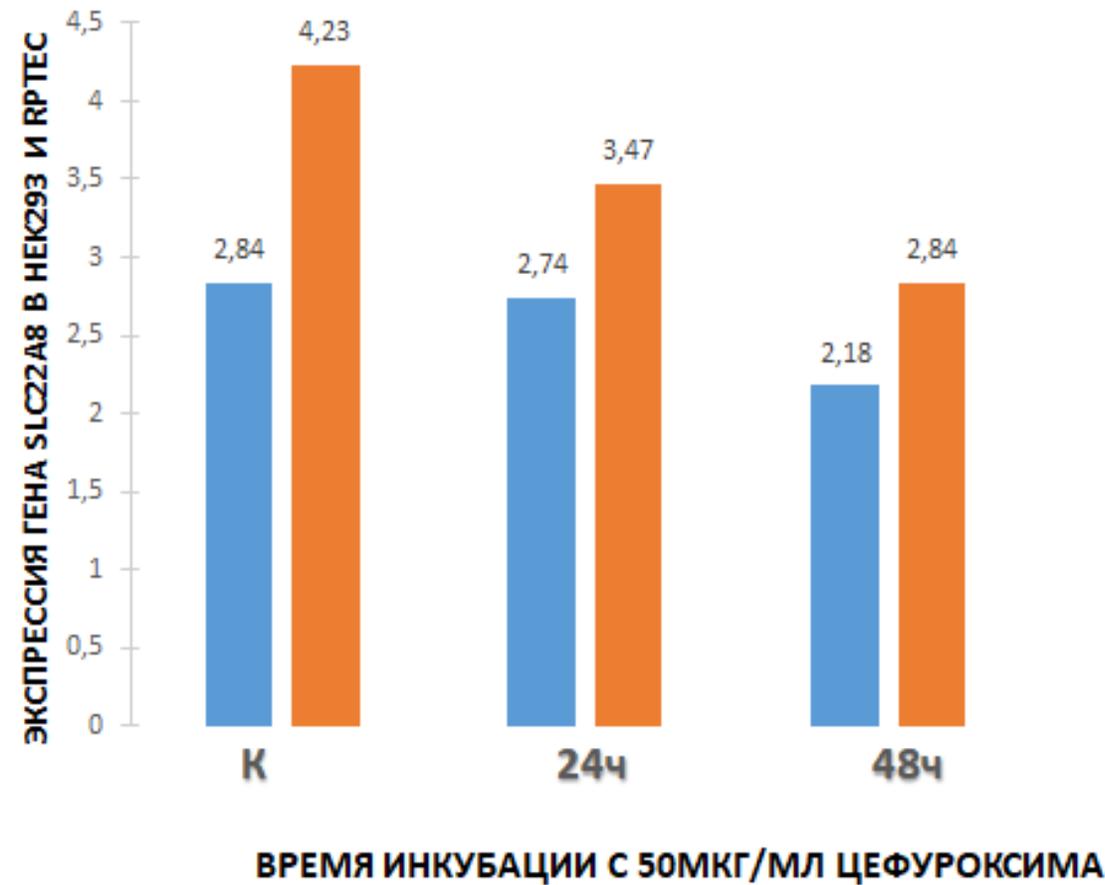
Проводили сравнительный анализ влияния цефалоспоринов-субстратов OAT на уровень экспрессии транспортеров OAT и токсические эффекты на модели клеточных линии RPTES и HEK293



В рамках 3 задачи

Экспрессия **OAT1** в HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом

■ HEK293 ■ RPTEC





Концентрация цефуроксима		50мкг/мл			150мкг/мл		
Время инкубации		24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Активность каспаз 3/7	HEK293	-	-	-	+	+	+
	RPTEC	-	-	+	+	+	+

Концентрация цефепима		30мкг/мл			120мкг/мл		
Время инкубации		24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Активность каспаз 3/7	HEK293	-	-	-	-	+	н.д.
	RPTEC			+	+	+	+

Таким образом, установлено, что клеточная линия RPTEC более чувствительная к токсическому действию цефалоспоринов по сравнению с HEK293.



Кинетические параметры транспорта

1. Клиренс субстрата:

$$CL_s = \frac{C_{t_2} - C_{t_1}}{(t_2 - t_1) \cdot C_m}$$

C_{t_1, t_2} – концентрации субстрата при времени t_1 и t_2 , C_m – нормализующий параметр транспорта (количество клеток, общий белок или площадь мембраны)

2. Коэффициент проницаемости:

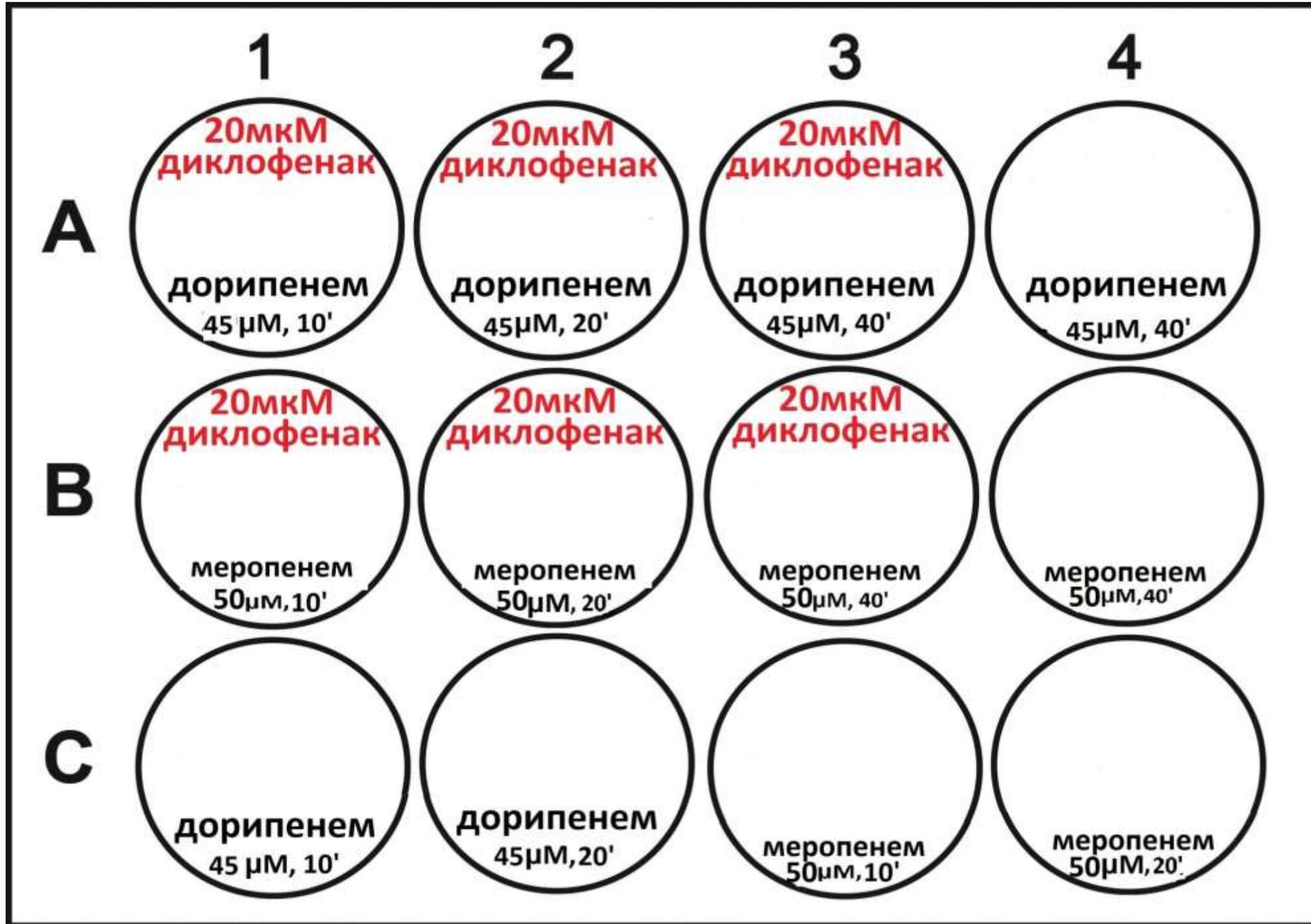
$$P = \frac{Vr}{C_0 \cdot S} \cdot \frac{dc}{dt}$$

Vr – объем апикальной области, cm^3 ; C_0 – начальная концентрация ЛС, mM ; S – площадь поверхности мембраны, cm^2 ; dC/dt – изменение концентрации ЛС за время t .



В рамках 4 задачи

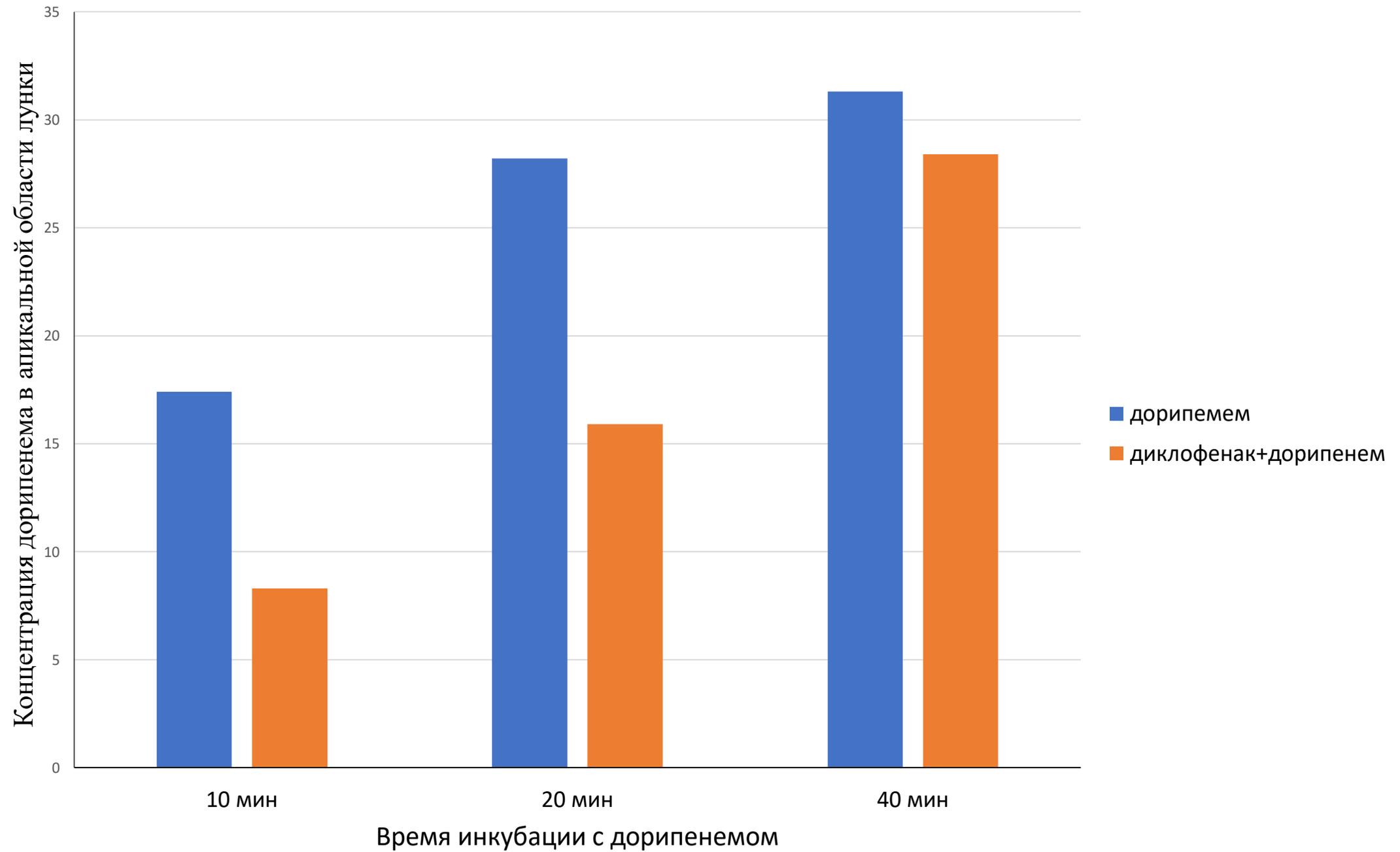
Ингибирование транспортеров ОАТ диклофенаком





В рамках 4 задачи

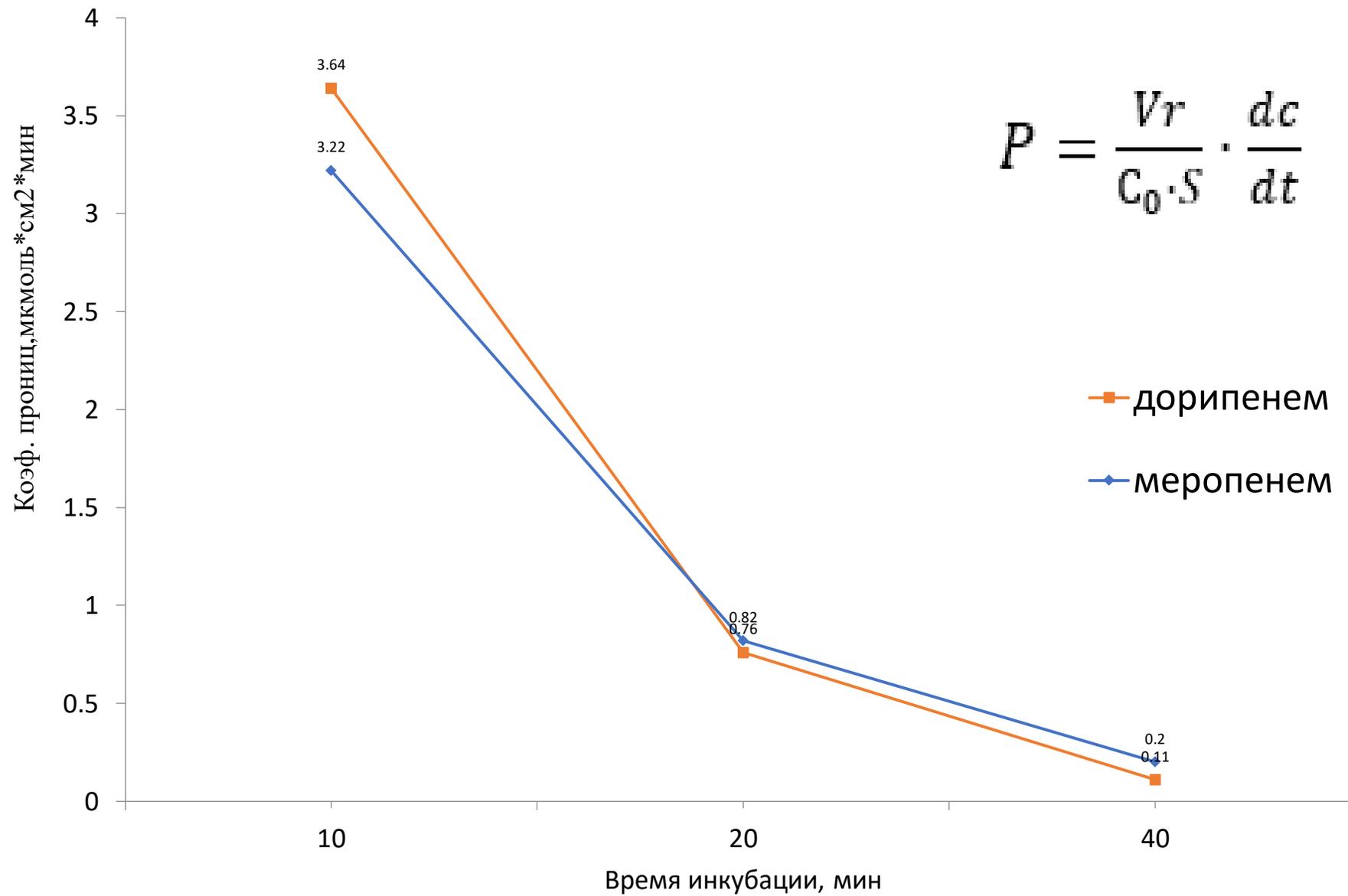
Влияние предварительной инкубации с диклофенаком клеточной линии RPTES на динамику транспорта дорипенема





В рамках 4 задачи

Коэффициент проницаемости мембраны РРТЕС
при транспорте дорипенема и меропенема

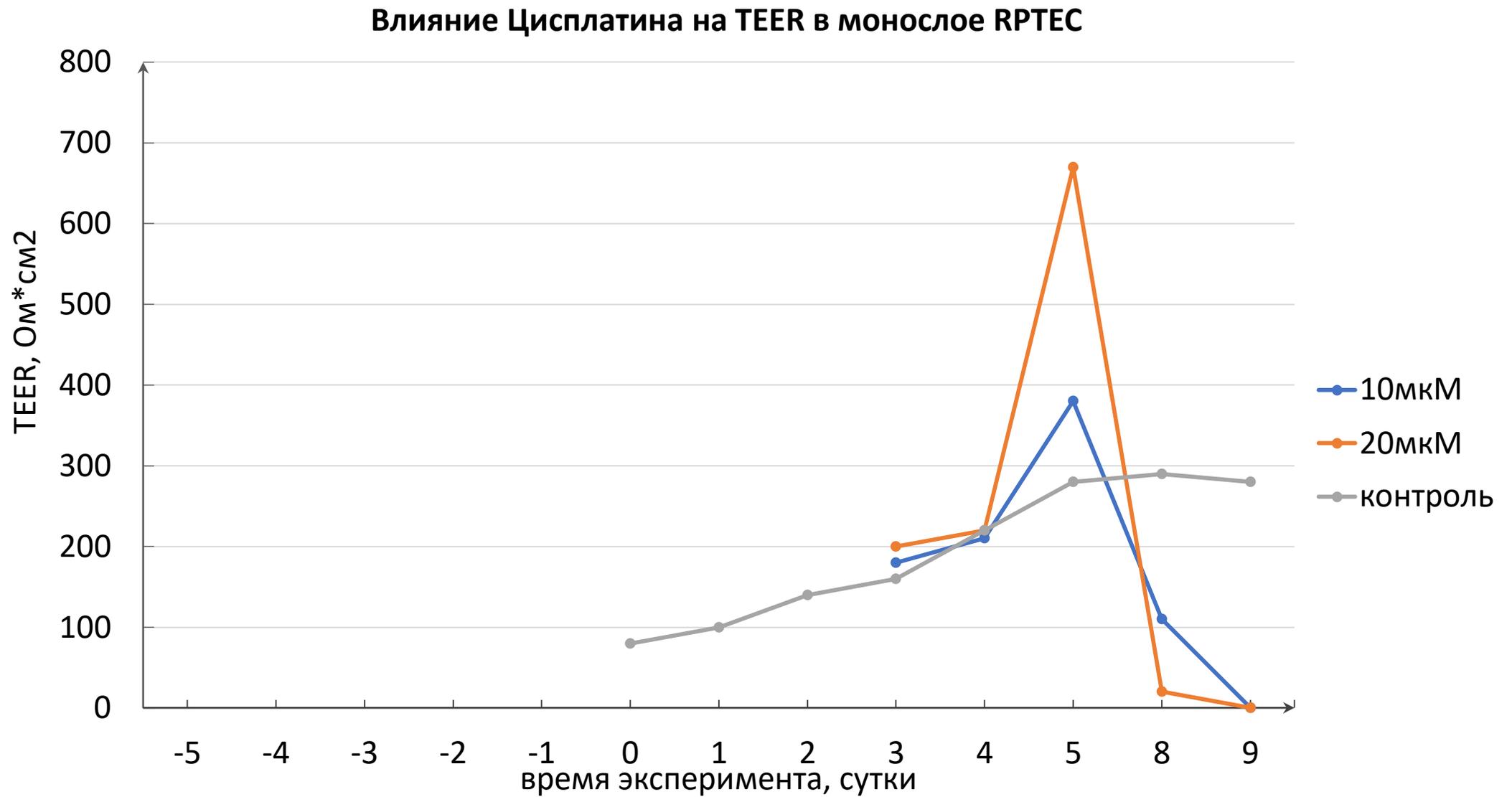




Измерение проводилось на приборе «ERS-2» («Millipore», США) с помощью электрода «MERSSTX01» («Millipore», США). Измерение проводилось на 5-й день после посева клеток в культуральный планшет один раз в сутки на протяжении 14 суток (кроме выходных дней).

Установлено: Показатель трансэпителиального сопротивления клеточной линии RPTEC достигает пороговых значений за 2 недели после посева, что соответствует данным полученных в других экспериментах.

Значения TEER (280-320 Ом*см²) изучаемого клона RPTEC отличаются от данных в других источниках*, но попадают в диапазон значений для данной клеточной линии (100-600 Ом*см²).

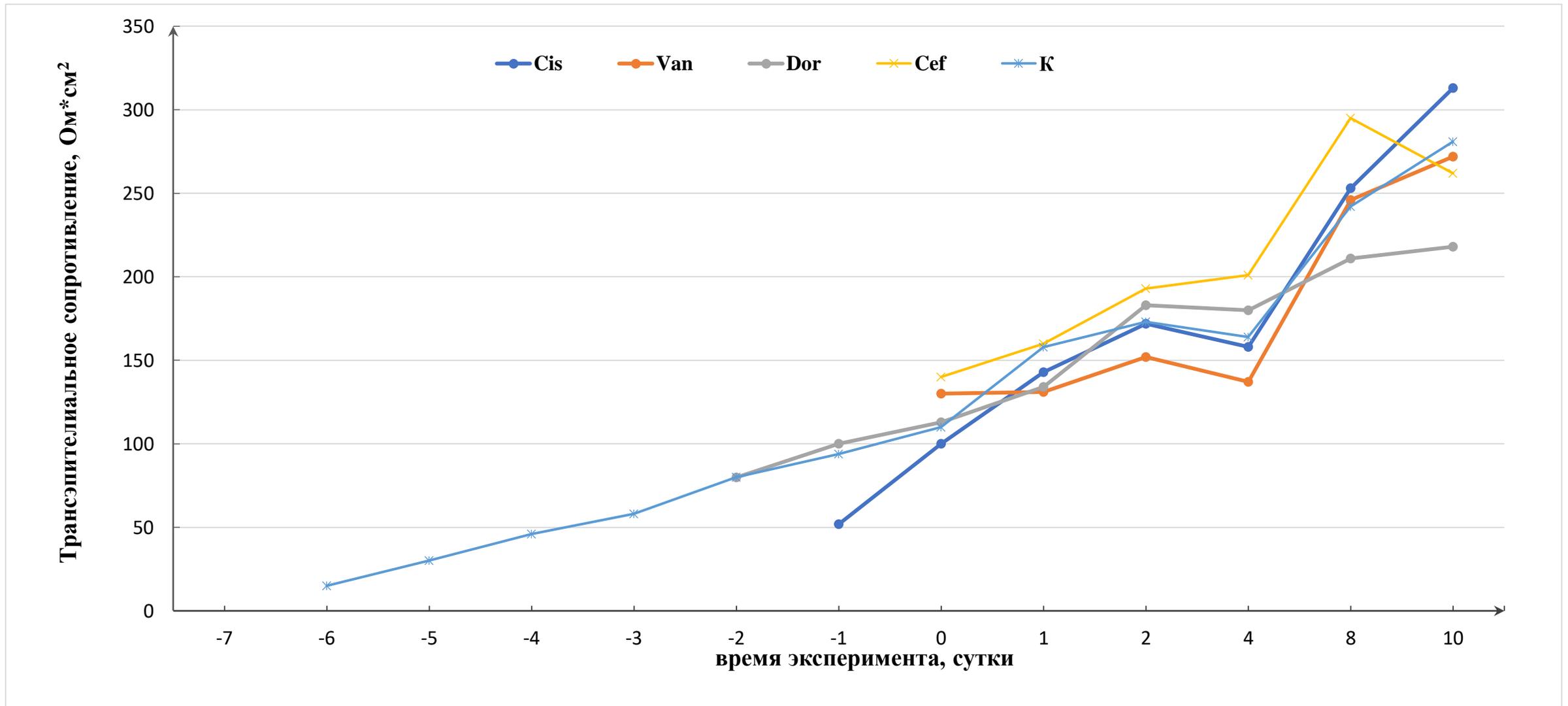


Резкое падение TEER спустя всего трое суток инкубации с цисплатином может означать высокую чувствительность исследуемой модели к данному препарату

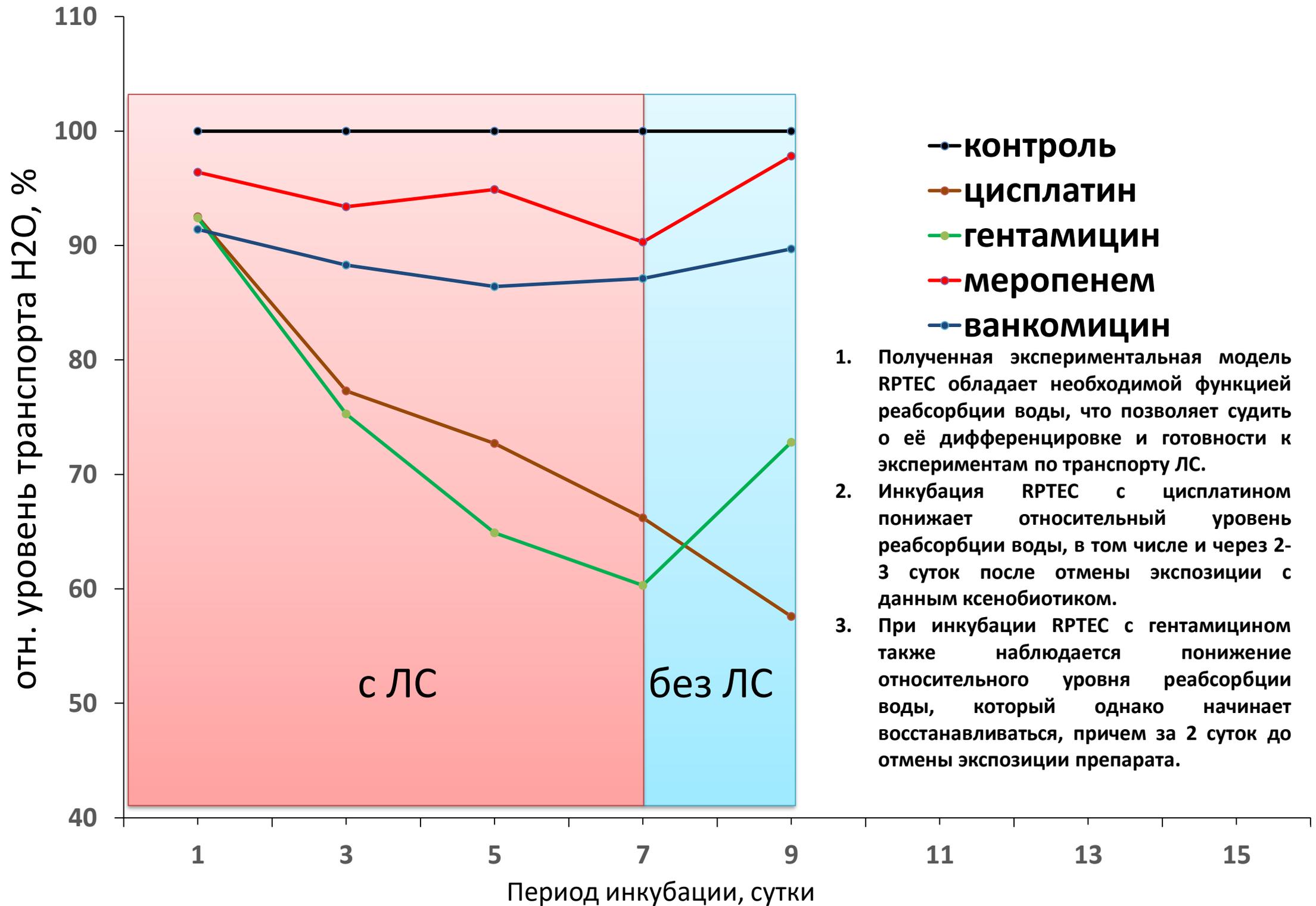


В рамках 5 задачи

Изучение влияния ЛС, выводящихся почками на TEER



Цисплатин в концентрации 2,5мкмоль/л, ванкомицин (50мкг/мл), дорипенем (20мкг/мл), цефепим (150мкг/мл) не оказывают токсического действия на клеточную линию RPTEC по данным динамики TEER.



1. Полученная экспериментальная модель RPTEC обладает необходимой функцией реабсорбции воды, что позволяет судить о её дифференцировке и готовности к экспериментам по транспорту ЛС.
2. Инкубация RPTEC с цисплатином понижает относительный уровень реабсорбции воды, в том числе и через 2-3 суток после отмены экспозиции с данным ксенобиотиком.
3. При инкубации RPTEC с гентамицином также наблюдается понижение относительного уровня реабсорбции воды, который однако начинает восстанавливаться, причем за 2 суток до отмены экспозиции препарата.



Цистатин С (Cys C) – белок массой 13 кДа, состоящую из 120 аминокислот. Цистатин С относится к ингибиторам лизосомальных протеиназ и продуцируется всеми ядерными клетками организма.

Основные характеристики:

- является альтернативным креатинину биомаркером почечного повреждения, так как его концентрация в крови не зависит от возраста, пола, диеты или воспаления

Кластерин (Clu) – гликопротеин, имеющий молекулярную массу порядка 70–80 кДа, синтезируется во многих тканях, обнаруживается во многих физиологических жидкостях, таких, как плазма, семенная и цереброспинальная жидкость.

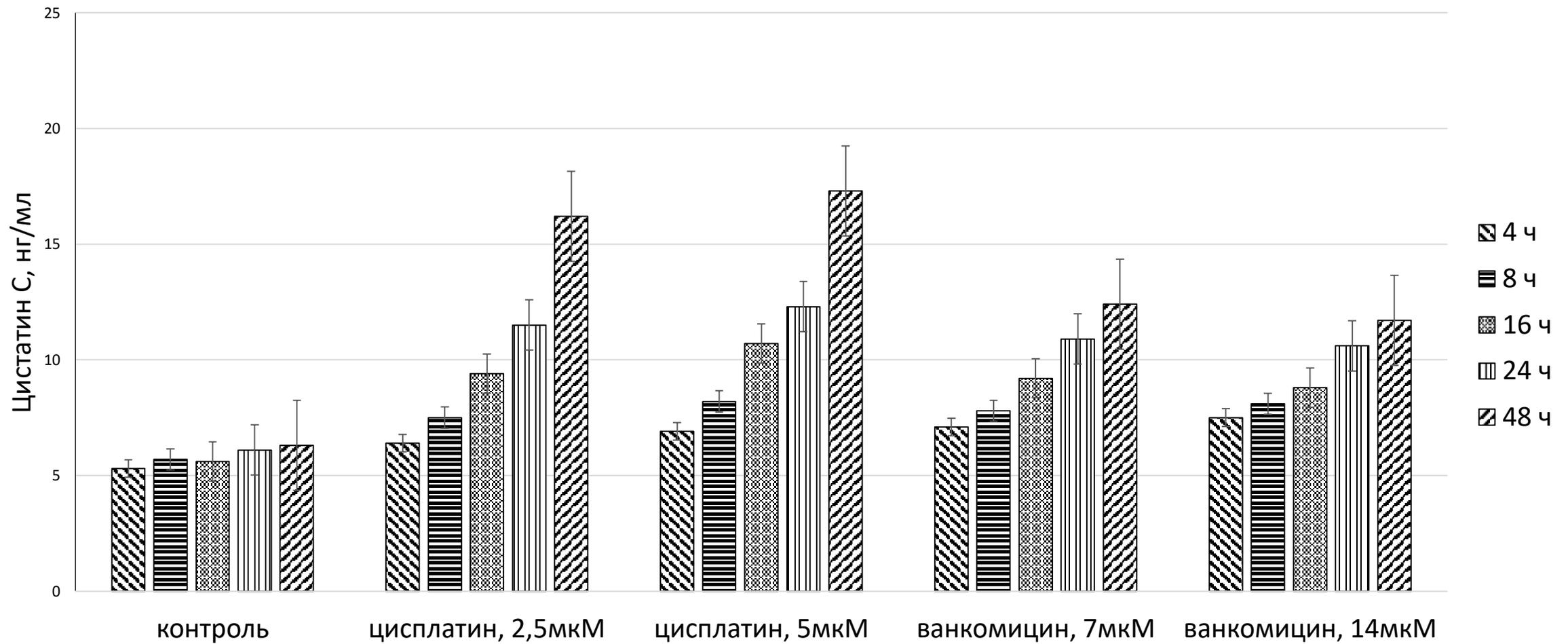
Основные характеристики:

- является биомаркером ОПШ на уровне проксимальных и дистальных почечных канальцев



В рамках 6 задачи

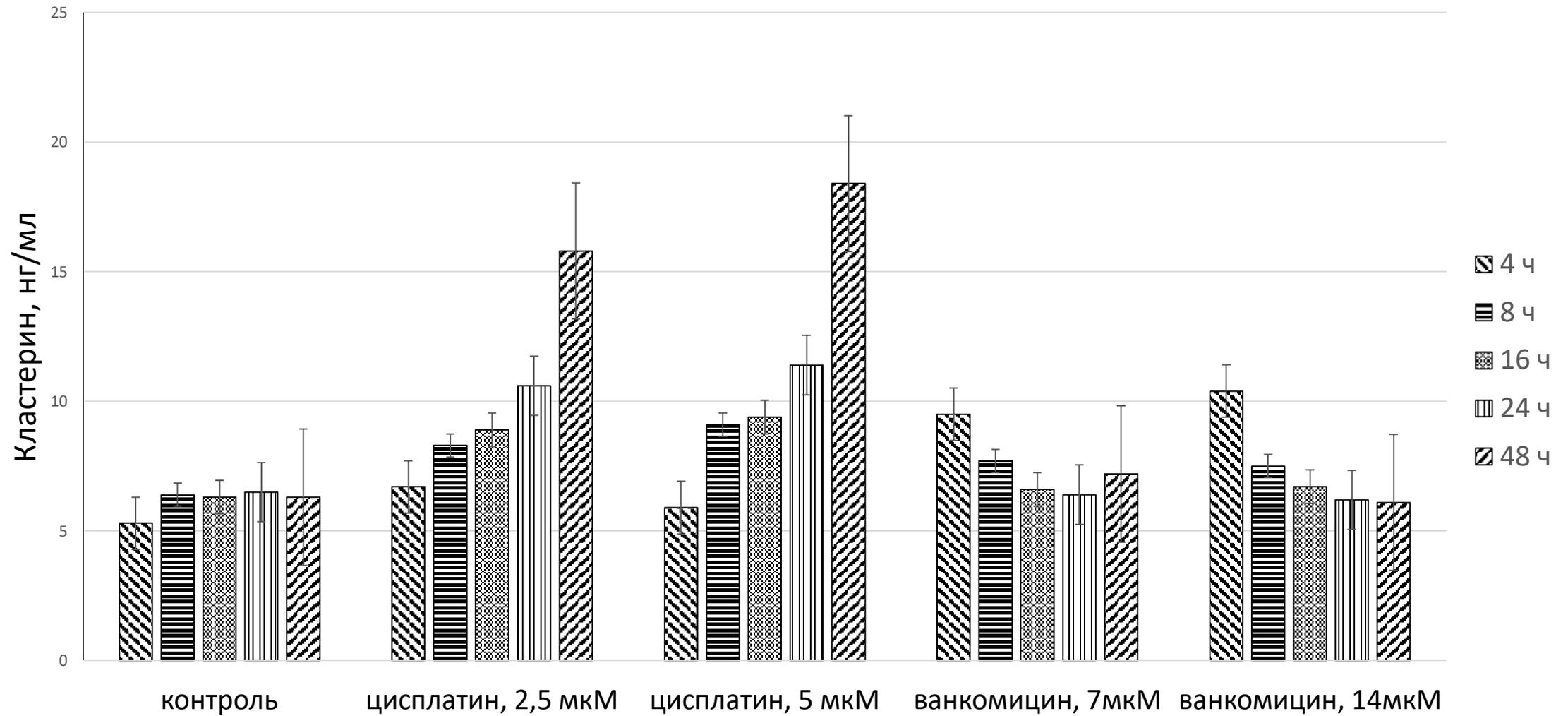
Концентрация Цистатина С в клеточной линии RPTEC/TERT1 при инкубации с цисплатином и ванкомицином в течение 4-48 часов.





В рамках 6 задачи

Концентрация Кластерина в клеточной линии RPTEC/TERT1 при инкубации с цисплатином и ванкомицином в течение 4-48 часов.





1. Кластерин при инкубации с ванкомицином является ранним маркером нефротоксичности, т.е. специфичным именно для данного ЛП.
2. Цистатин С не показал специфичность в зависимости от ЛП.
3. Концентрация цисплатина и ванкомицина не оказывает влияние на динамику изменения уровня цистатина С.
4. Изученные биомаркеры стабильно и однообразно повышаются на протяжении всего срока инкубации (48ч) цисплатина, что говорит о возможности применения любого из них для оценки нефротоксичности данного ЛП.



- установлены условия культивирования клеточной линии RPTEC для создания модели нефротоксичности;
- разработана методика «Оценка функциональной активности почечных транспортеров лекарственных средств на модели клеточной линии RPTEC» и определены ее параметры (клиренс субстрата, коэффициент проницаемости мембраны) OAT на модели RPTEC
- экспериментально установлено, что в клеточной линии RPTEC более чувствительная к токсическому действию цефалоспоринов по сравнению с HEK293;
- Отработана методика измерения трансэпителиального сопротивления (TEER) в клеточной линии RPTEC, полученные значения TEER (280-300 Ом*см²) соотносятся с данными литературы и свидетельствуют об образовании плотных межклеточных контактов в монослое
- Резкое падение TEER на четвертые сутки при инкубации с цисплатином свидетельствует о **высокой чувствительности данной модели клеточной линии** к этому ЛС, что может означать высокую чувствительность данной модели к данному препарату;
- Отработана методика количественного определения цефтриаксона, цефепима, дорипенема и меропенема в культуральной среде методом ¹H ЯМР
- получены достоверно значимые показатели чувствительности и специфичности биомаркеров нефротоксичности кластерина и цистатина С к токсическому действию лекарственных препаратов (ЛП) на модели RPTEC для разрабатываемой экспериментальной модели по оценке безопасности лекарственных средств (ЛС) при проведении доклинических исследований
- Разработанная экспериментальная модель клеточной линии RPTEC обладает необходимой функцией реабсорбции воды, что позволяет судить о её дифференцировке и готовности к экспериментам по транспорту ЛС
- На основании проведенных исследований разработан алгоритм оценки нефротоксичности *in vitro*



Патенты:

1. Патент на изобретение № 2762265 от 17.12.2021 «Способ оценки транспорта отрицательно заряженных лекарственных средств на экспериментальной модели клеточной линии HEK293»
2. Патент на изобретение № 2802345 от 25.08.2023 «Способ культивирования клеточной линии проксимальных почечных канальцев RPTEC/TERT1»

Программы для ЭВМ:

1. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Модуль биомаркеры нефротоксичности» № 2021680197 от 08.12.2021

Методические рекомендации «по экспертной оценке лекарственных средств, являющихся субстратами почечных транспортеров»

Обучающие лекции:

1. «Современные представления о биомаркерах нефротоксичности и их роли в диагностике острого лекарственного повреждения почек»
2. «Некоторые аспекты нефротоксического действия ЛС при противовирусной терапии»
3. «Сравнительный анализ нормативной документации разных стран по проведению доклинических исследований нефротоксичности лекарственных средств»

Научные публикации:

15 публикаций, из которых 5 в журналах с цитированием в Scopus и/или WoS

Участие в конференциях с международным участием 5 докладов в 5 конференциях

Внедрение: 1. ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

2. ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (лаборатория фармакологии и фармацевтической разработки №51)



**Благодарю
за внимание!**