



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ОТЧЕТ

по этапу № 1 «Научный анализ современного состояния проблемы оценки безопасности лекарственных препаратов при осуществлении экспертизы лекарственных средств. Подбор оптимальных экспериментальных условий культивирования для клеточной линии проксимальных почечных канальцев человека» НИР «Разработка научно-методических подходов к оценке безопасности лекарственных средств на основе создания экспериментальной модели нефротоксичности»

Прокофьев А.Б., директор ЦКФ.
18.10.2021

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



Цель: Отработать методику культивирования клеточной линии RPTEC/TERT1 в 3D-среде с использованием экстрацеллюлярного матрикса.

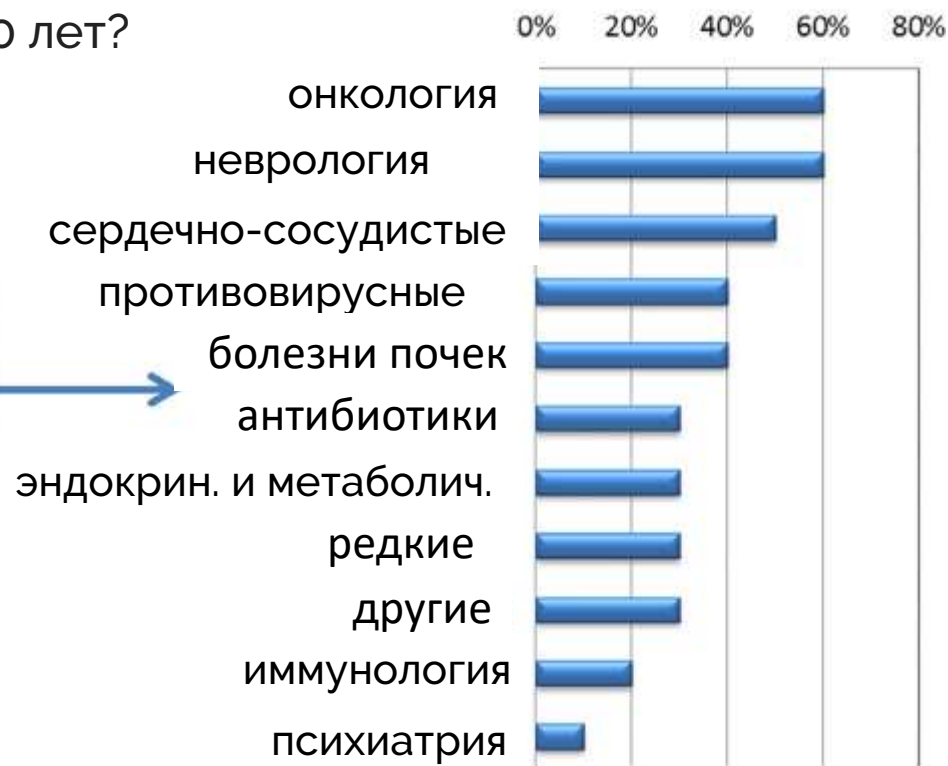
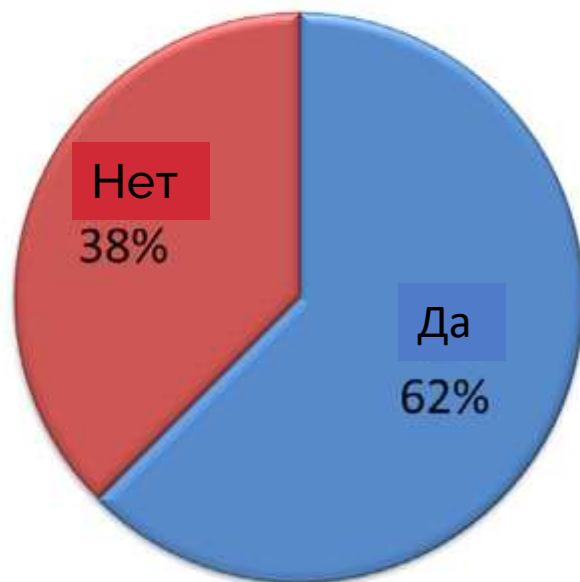
Задачи:

1. Обзор экспериментальных моделей клеточных линий для скрининга нефротоксичности
2. Культивировать клеточную линию RPTEC на протяжении трех пассажей в 2D-среде.
3. Осуществить перенос клеточной линии RPTEC в условия 3D-среды с использованием экстрацеллюлярного матрикса
4. Культивировать клеточную линию RPTEC в условиях 3D в течение как минимум двух недель



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

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

Рекомендации FDA (2020) по исследованию взаимодействия с транспортерами *in vitro* при разработке новых ЛС

Если активное выведение ЛС почками $\geq 25\%$ от общего клиренса, следует провести исследования *in vitro* на предмет, является ли оно субстратом OAT1/3, OCT2 и MATE1 и MATE2-K на клетках с избыточной экспрессией этих транспортеров.

Транспортер	Система <i>in vitro</i>
Кассетные АТФ-связывающие транспортеры (ABC)	
BCRP, P-gp	Клетки Сасо-2, <u>трансфицированные</u> клетки (MDCK, LLC-PK, др.)
Транспортеры семейства SLC	
OATP1B1/3	Гепатоциты, <u>трансфицированные</u> клетки (CHO, HEK293, MDCK, др.)
OAT1/3, OCT2	<u>Трансфицированные</u> клетки (CHO, HEK293, MDCK, др.)
MATEs	Коммерческие или собственной разработки <u>трансфицированные</u> клетки (CHO, HEK293, MDCK)



Рекомендации ЕМА (2012) по исследованию межлекарственного взаимодействия

«Исследования ингибирования *in vitro* рекомендуются для определения, ингибирует ли исследуемое лекарственное средство какой-либо из транспортеров, про которые известно, что они участвуют в межлекарственном взаимодействии *in vivo*»

«Желательно, чтобы данные *in vitro* по ингибированию транспортера были получены до начала фазы III».

«Выбор исследуемых транспортеров должен основываться на научных данных... может возникнуть необходимость исследования влияния на другие транспортеры для уточнения механизма непрогнозируемого взаимодействия, возникшего *in vivo*».

«Поскольку наука в данной области развивается быстро, никаких списков субстратов для исследований *in vitro* и *in vivo* не предоставляется... Выбор субстратов/контрольных ЛС следует основывать на данных из современной научной литературы».

«Рекомендовано использовать такую систему *in vitro*, в которой функционируют транспортеры, присущие человеку *in vivo*».



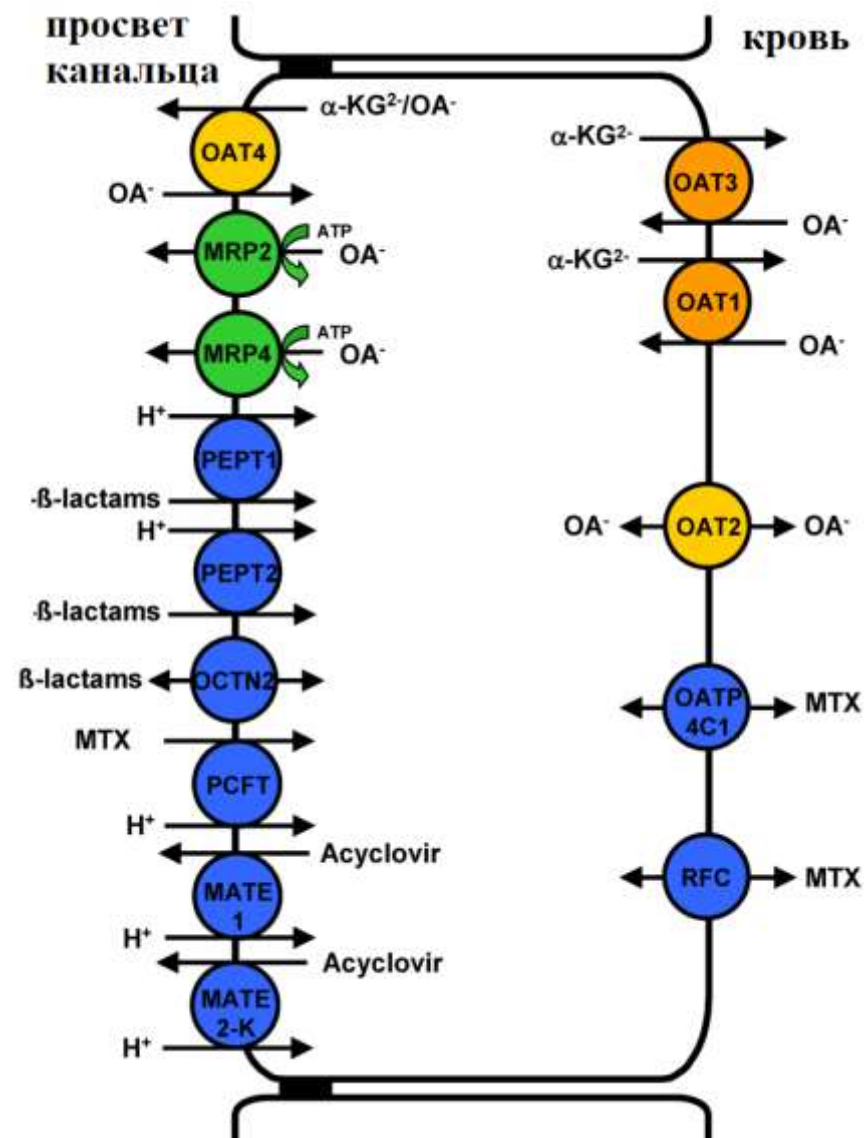
Применение не-органоспецифичных клеточных линий для исследования нефротоксичности

- 273 гепатотоксичных, 191 кардиотоксичное и 85 нефротоксичных веществ;
- Линии клеток, относящихся к разным тканям: HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), H9c2 (миокард эмбриона) и NRK-52E (проксимальный почечный каналец).
- Абсолютное большинство веществ оказывало токсическое действие независимо от типа клеток



Эпителий проксимальных почечных канальцев – основа для экспериментальной модели транспорта ЛС

Процессы транспорта и концентрации ЛС происходят в проксимальном отделе почечных канальцев





Видо- и органоспецифичные клеточные линии для исследования нефротоксичности

Клетки НК-2 – клетки почки человека

- ✓ получены путем иммортализации с помощью генов вируса папилломы человека;
- ✓ при росте они демонстрируют специфические маркеры эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев;

Основные недостатки:

- ✓ для экспрессии некоторых транспортеров (например, OAT и OCT) требуется дополнительная трансфекция;
- ✓ слабая экспрессия мегалина – рецептора, который участвует в обратном захвате путем эндоцитоза, например, аминогликозидов



НРТС (Human Proximal Tubular Cells) - первичные клетки проксимальных почечных канальцев человека

- ✓ получают непосредственно от доноров;
- ✓ экспрессия OAT, OATN-2, MRP, P-гликопротеина, BCRP;
- ✓ метаболические ферменты: ГГТ, гамма-глутамилцистеин синтетазы, глутатион-S-трансферазы и других;

Основные недостатки:

- ✓ большая межиндивидуальная вариабельность;
- ✓ ограниченная способность к размножению;
- ✓ склонность к потере дифференцировки и экспрессии транспортеров при пассажах.



HPTC-like cells - клетки, подобные эпителиальным клеткам проксимального почечного канальца, полученные из стволовых клеток эмбриона человека

- ✓ выращиваются из эмбриональных клеток человека;
- ✓ большая доступность и сохранение функциональных свойств при пассажах;
- ✓ лучшая чувствительность к нефротоксикантам по сравнению с линией НК-2.

Недостатки:

- ✓ низкая экспрессия мегалина у клеток, выращенных из стволовых (ложноотрицательный тест на нефротоксичность с гентамицином)
- ✓ более низкая чувствительность к нефротоксикантам по сравнению с НРТС.



ciPTES – условно иммортализованные эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев

- ✓ получены из мочи добровольцев трансфекцией hTERT и чувствительного к температуре антигена SV40T;
- ✓ размножаются при 33°C и созревают при 37°C;
- ✓ обладают морфологическими и функциональными свойствами эпителиальных клеток проксимального почечного канальца.

Недостатки:

- ✓ быстрое снижение экспрессии OAT1 и OAT3 (предложена их дополнительная трансфекция)



RPTEC/TERT1 - клетки проксимального канальца человека, иммортиализованные 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.



Видо- и органоспецифичные клеточные линии для исследования нефротоксичности

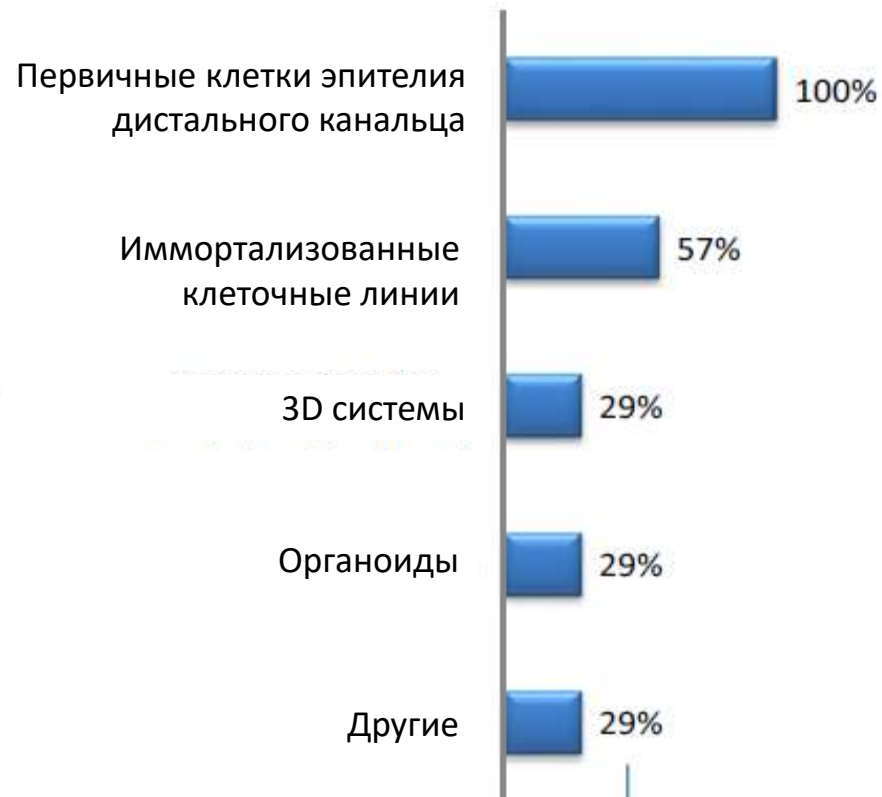
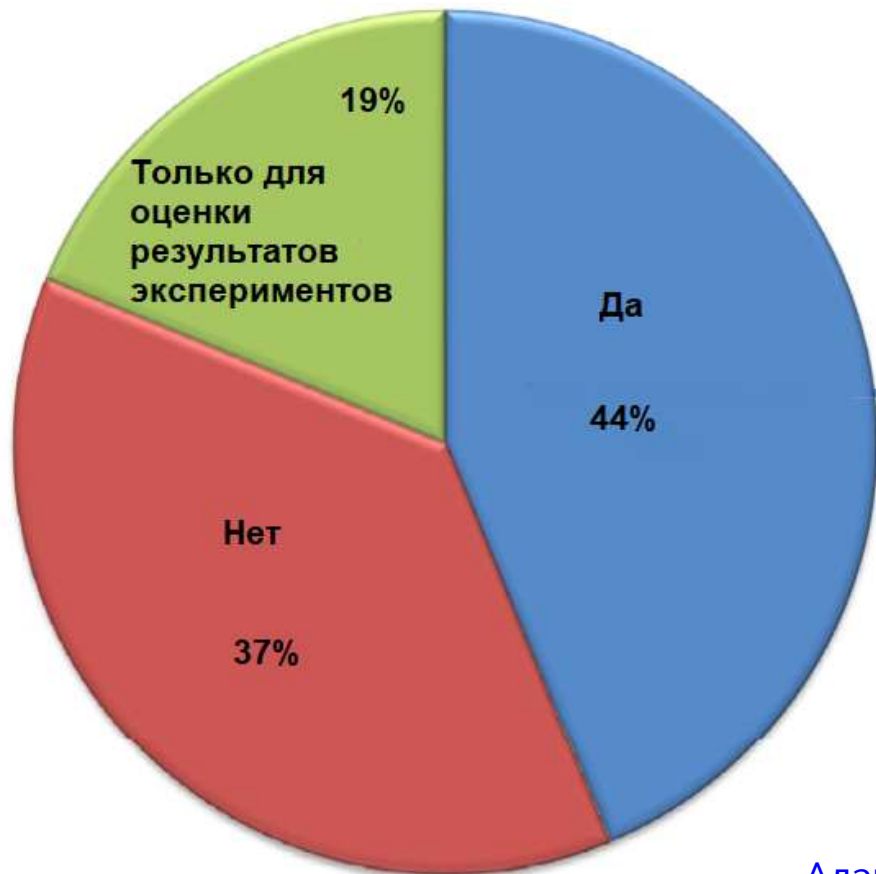
SA7K - псевдо-иммортизированные первичные клетки эпителия проксимальных почечных канальцев человека

- ✓ получены из первичных клеток эпителия проксимальных почечных канальцев путем трансфекции фактора, выключившего белок клеточного цикла (cell cycle protein);
- ✓ пролонгированная способность к размножению;
- ✓ экспрессия основных транспортеров;
- ✓ чувствительность к некоторым известным нефротоксикантам;
- ✓ неприхотливы к условиям культивирования;
- ✓ предлагаются для исследования нефротоксичности при многократном лекарственном воздействии



Применение исследований *in vitro* для определения нефротоксичности при разработке ЛС

Использовали ли Вы тесты *in vitro* на токсичность для решения вопросов доработки или решения проблем?



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



Методы оценки нефротоксичности на клеточных моделях

- ✓ **Оценка жизнеспособности клеток** – подсчет живых и мертвых клеток и вычисления % живых к общему количеству клеток.
- ✓ **Оценка апоптоза** - морфологические изменения клеток (фазово-контрастная микроскопия; активность каспаз, количественная оценка нуклеосом (иммунноферментный анализ); регистрация апоптоза методом двойного окрашивания аннексин/V-ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат).
- ✓ **Оценка изменения электрофизиологических показателей** - трансэпителиального электрического сопротивления TEER (Transepithelial electrical resistance); электрического импеданса; митохондриальный мембранный потенциал
- ✓ **Оценка метаболических изменений** - активность ЛДГ, глутатион-S-трансферазы (GST), остаточный лактат, и др. Также оценивается оксидативный стресс определением активных форм кислорода
- ✓ **Исследование транскриптома** - оценка изменения генной регуляции при воздействии токсических факторов.
- ✓ **Определение биомаркеров острого повреждения почек** – на клетках RPTEC/TERT1 было показано повышение не только значения, но и регуляции кластерина, цистатина С, GSTπ и TIMP-1 в ответ на воздействие нефротоксикантов (Qiu X. с соавт. 2020 г.)



Достижения

- ✓ Созданы клеточные линии, длительно сохраняющие функции эпителиальных клеток проксимального почечного канальца
- ✓ Расширяется панель методик для комплексной оценки токсического действия ЛС
- ✓ Функциональный уровень клеточных систем позволяет применять биомаркеры нефротоксичности, которые определяются в клинической практике.

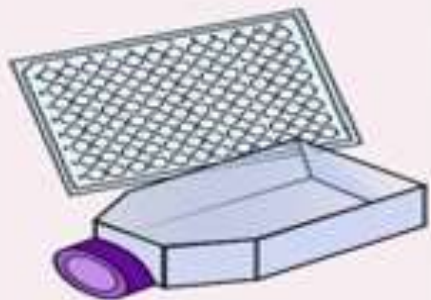


Вопросы, которые предстоит решить

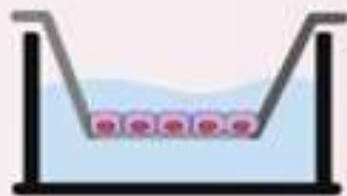
- ✓ Стандартизация экспериментальных моделей клеточных линий
- ✓ Стандартизация методик оценки нефротоксических эффектов ЛС
- ✓ Обеспечение качественной экстраполяции результатов *in vitro* на клиническую практику



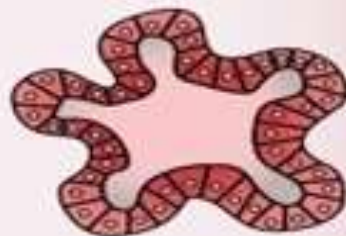
Классификация экспериментальных моделей клеточных линий почек



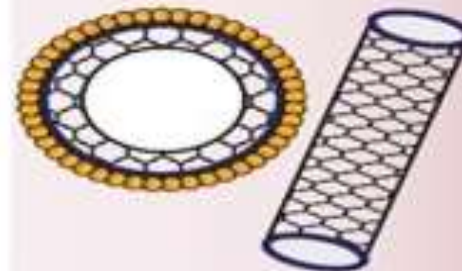
2D-культуры



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



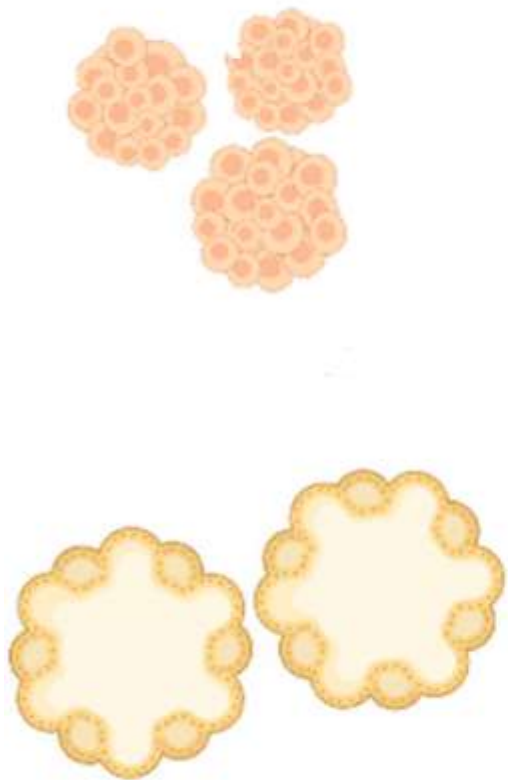
Сравнение 2D и 3D клеточных линий

2D-культуры	3D-культуры
Контакт с культуральной средой неполный	Полный контакт с культуральной средой
Межклеточные контакты только по краям клеток, основной контакт с пластиком	Межклеточные контакты более развиты чем в 2D-культуре и благодаря им клетки обмениваются между собой ионами и небольшими молекулами
Обмен между клетками ионами и небольшими молекулами затруднен	Относительно свободный обмен между клетками ионами и небольшими молекулами
Более низкая степень дифференцировки	В 3D-культуре клетки находятся на более высокой степени дифференцировки
Менее чувствительны к воздействию ЛС	Более чувствительны к воздействию ЛС

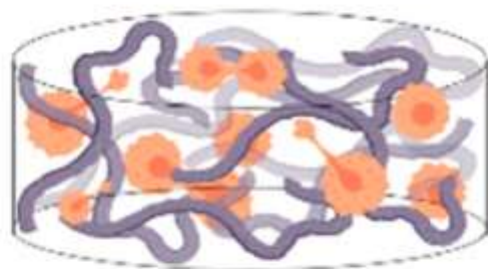


Виды 3D-культур

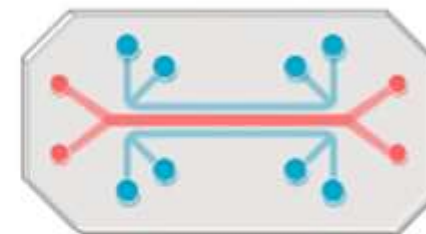
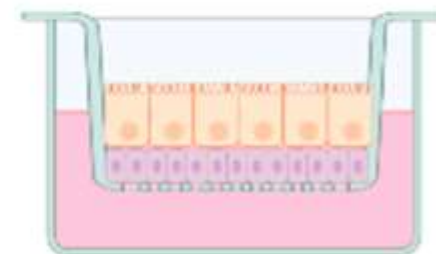
ECM



Scaffold



гибриды (2,5D)





Чувствительность клеточной линии RPTEC к токсическому действию цисплатина при различных методах культивирования

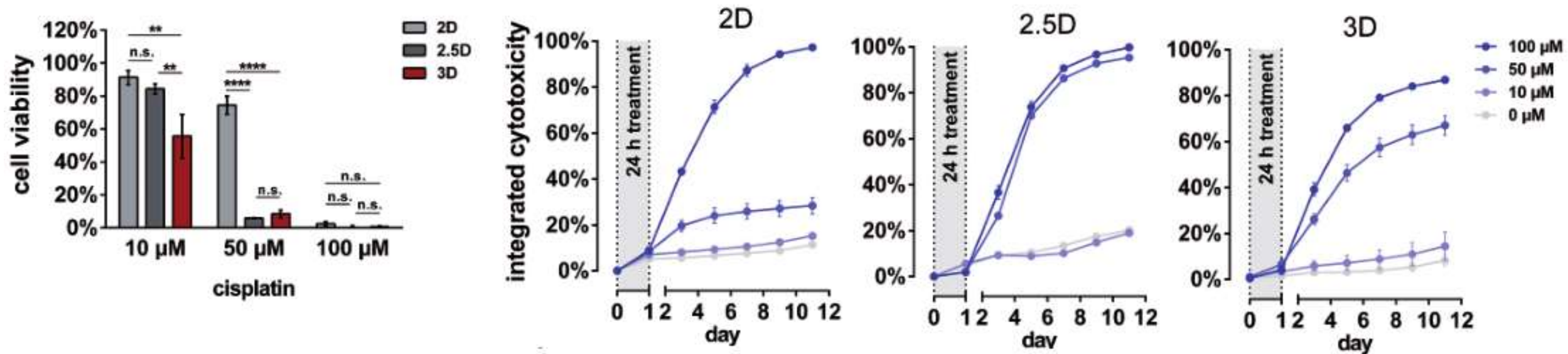
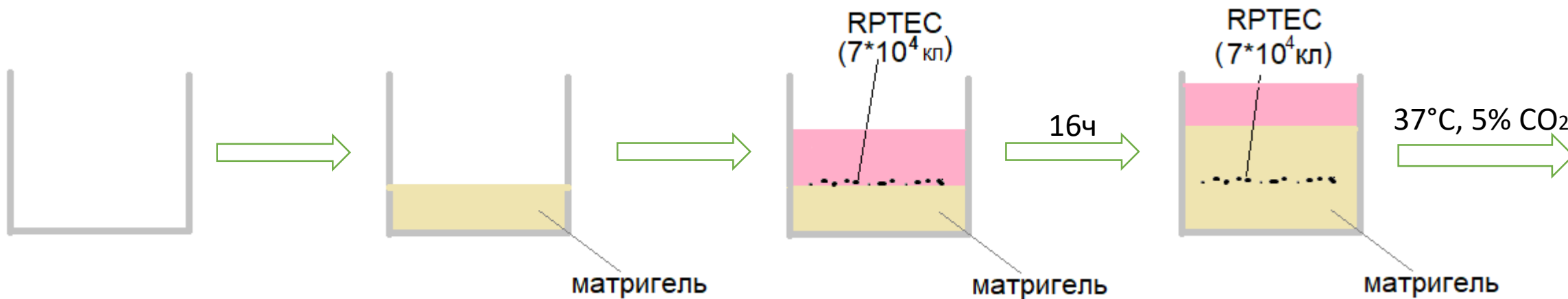


Fig. 4: 3D cultured RPTEC/TERT1 cells are sensitive towards delayed cisplatin toxicity



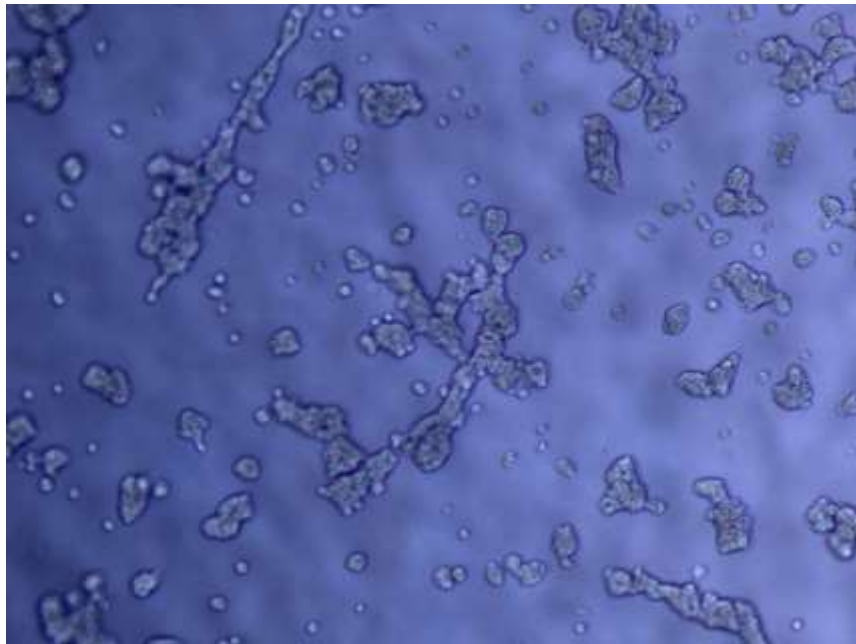
Дизайн эксперимента по 3D-культивированию



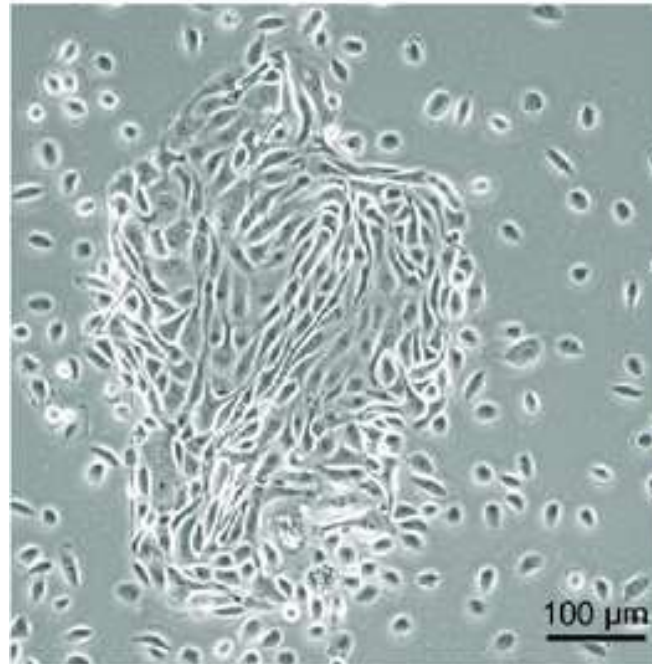
Полимеризация
(30 мин, 37°C)



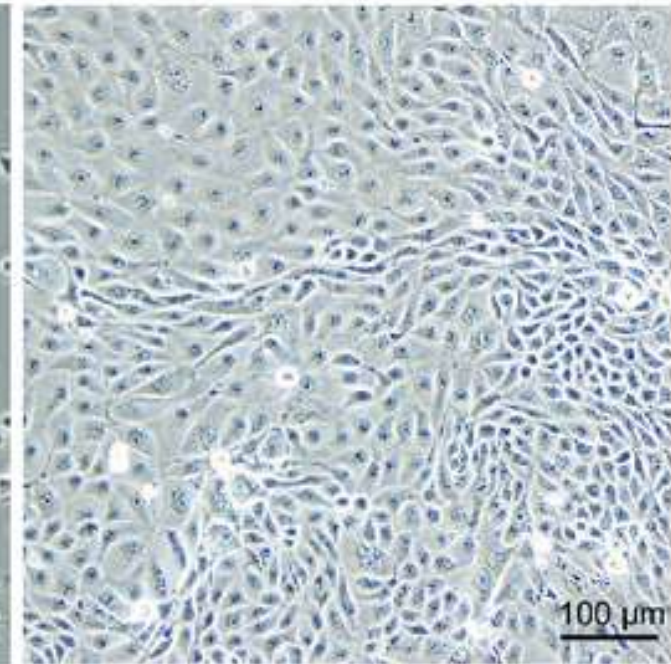
Результаты



3D



3D



2D



1. Процент восстановленных клеток - 92% позволяет сделать вывод о том, что восстановление было проведено правильно.
2. Пролиферативная активность клеточной линии RPTEC 9-го пассажа при культивировании в 2D-среде не изменилась по сравнению с экспериментом, проведенным во втором квартале 2021 года.
3. Образование характерных сфероидных структур из клеток RPTEC при культивировании в среде экстрацеллюлярного матрикса может являться начальной стадией формирования микротрубочек, подобных проксимальным канальцам.



Публикации по теме в 2021 году

1. Демченкова Е.Ю., Городецкая Г.И., Мазеркина И.А. Журавлева М.В., Сереброва С.Ю. – Актуальные вопросы выявления и мониторинга нежелательных реакций при применении цефалоспориновых антибиотиков. Безопасность и риск фармакотерапии. 2021; 9 (1): 34-42.
2. Евтеев В.А., Прокофьев А.Б., Бунятян Н.Д. - Изучение токсических эффектов при транспорте субстратов ОАТ на модели клеточной линии проксимальных почечных канальцев. Биофармацевтический журнал. 2021; 13 (1):12-14.
3. Прокофьев А.Б., Журавлева М.В., Дмитриева А.И., Белков С.А., Мельников Е.С., Родина Т.А., Городецкая Г.И. - Персонализированный подход к повышению эффективности и безопасности терапии артериальной гипертензии эналаприлом. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2021; 84 (3): 11-16.
4. Евтеев В.А., Семенова И.С., Мельникова Е.В., Прокофьев А.Б., Бунятян Н.Д. - Влияние условий культивирования на экспрессию генов транспортеров органических анионов в клеточной линии РРТЕС. «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». 2021

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения