



Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

кафедра фармакологии с курсом фармации ФДПО



**Метод тестирования лекарственных препаратов на
принадлежность к субстратам, индукторам и
ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р**

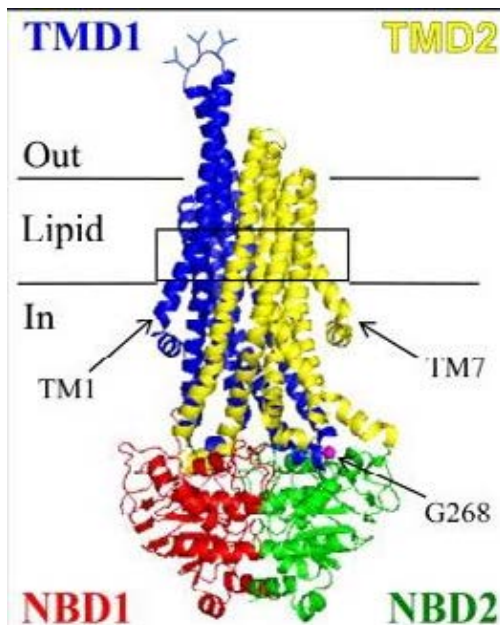
А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева

2 ноября, Москва, 2017



Гликопротеин-Р

- **Гликопротеин-Р (АВСВ1-белок)** – АТФ-зависимый белок-транспортер, участвующий в выведении эндогенных и экзогенных веществ из клетки.
- Впервые гликопротеин-Р был выявлен в 1976 году Juliano R.L. и Ling V. в **опухолевых клетках яичника** китайского хомячка (Juliano R.L., Ling V., 1976). Поэтому считалось, что его главная роль – **развитие резистентности опухолевых клеток к химиотерапии**



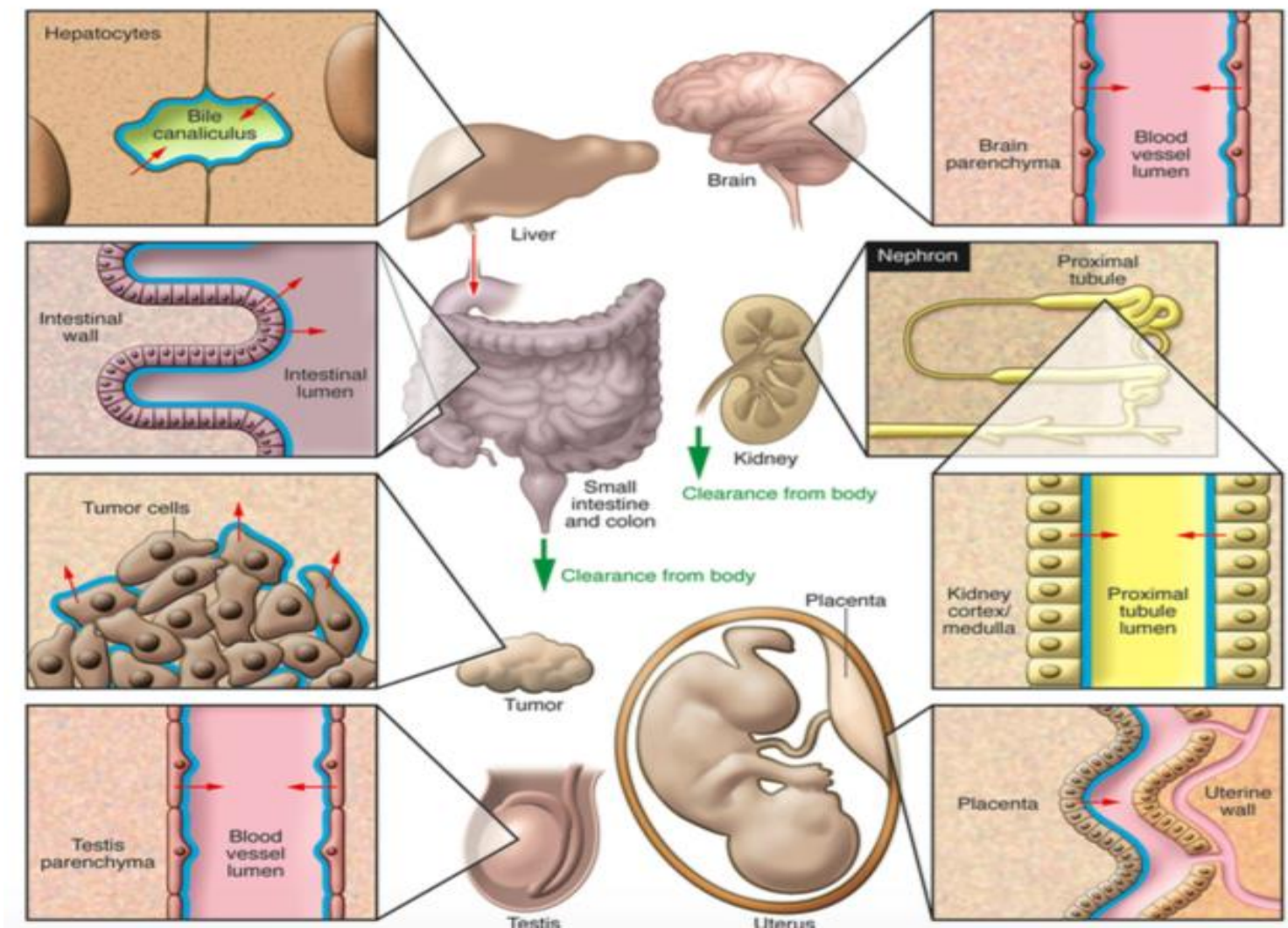
- Гликопротеин-Р – это крупный трансмембранный белок с молекулярной массой 170 кДа, который состоит из 1280 аминокислотных остатков, сгруппированных в 2 гомологичные половины.
- Каждая половина представляет собой большой трансмембранный гидрофобный домен (TMD) и один консервативный нуклеотидсвязывающий цитоплазматический домен (NBD), в котором находится АТФ-связывающий сайт.

R.L. Juliano et al. // Biochem. Biophys. Acta. 1976. 455; 155-162.

S.G. Aller et al. // Science. 2009; 323(5922): 1718-1722



Локализация и структура гликопротеина-Р





Функции гликопротеина-Р

- **Резистентность** опухолей к химиотерапии
- **Транспорт** эндогенных веществ (стероидные, тиреоидные гормоны)
- **Участие в фармакокинетике** (всасывании, распределении, выведении) лекарственных веществ

Субстраты, индукторы, ингибиторы гликопротеина-Р

Субстраты	Алискирен , колхицин, дабигатрана этексилат , дигоксин , фексофенадин , ранолазин, сиролимус, ситаглиптин, талинолол, домперидон , лоперамид, эдоксабан, толваптан
Ингибиторы	Амиодарон, азитромицин, каптоприл, карведилол, кларитромицин, циклоспорин, дилтиазем, дронедазон, кетоконазол, ритонавир, хинидин, ранолазин, верапамил
Индукторы	Карбамазепин, фенитоин, рифампин, зверобой

Е.Н. Якушева и соавт. *Успехи физиологических наук*. 2014; 45 (4); 90-99

Guidance for Industry: Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, USA 2012



U.S. Food and Drug Administration

Protecting and Promoting Your Health

[A to Z Index](#) | [Follow FDA](#) | [FDA Voice Blog](#)

SEARCH

[Search the FDA Archive](#)

[Home](#)

[Food](#)

[Drugs](#)

[Medical Devices](#)

[Radiation-Emitting Products](#)

[Vaccines, Blood & Biologics](#)

[Animal & Veterinary](#)

[Cosmetics](#)

[Tobacco Products](#)

Drugs

[Home](#) [Drugs](#)

[Development & Approval \(Drugs\)](#)

[Development Research](#)

[Drug Interactions](#)

[Drug Development Interactions](#)

Guidance for Industry

Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

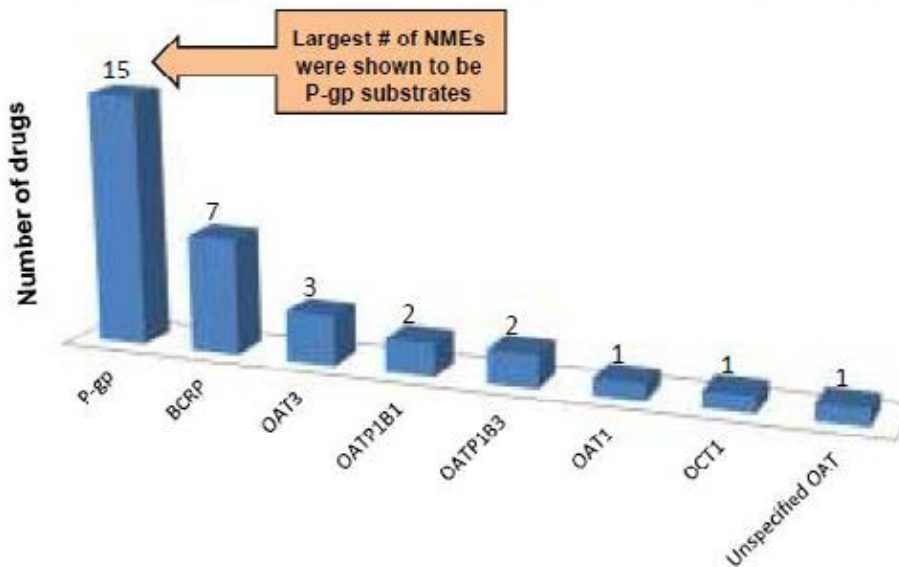
21 June 2012
CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr.*
Committee for Human Medicinal Products (CHMP)

Guideline on the Investigation of Drug Interactions

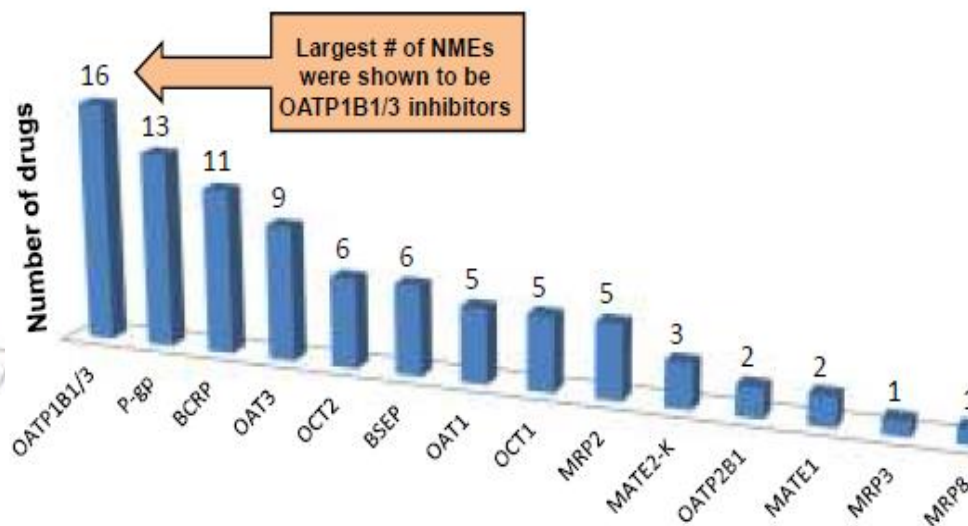


Принадлежность новых лекарственных препаратов, зарегистрированных FDA в 2014 к субстратам и ингибиторам ферментов метаболизма и белкам-транспортерам (n=35)

NMEs as **Substrates** of Transporters:
In vitro positive studies (n = 16 NMEs, 46%)

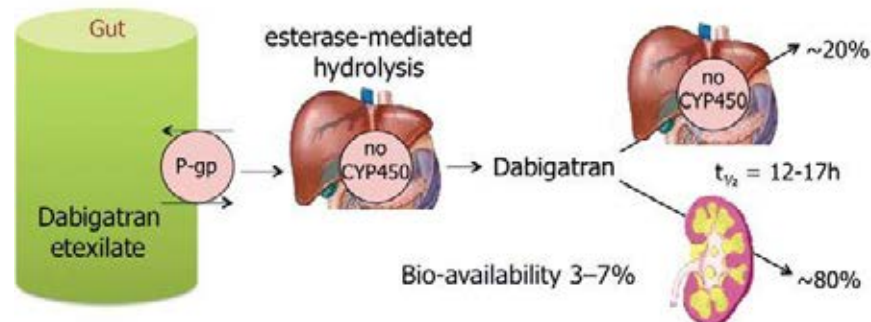


NMEs as **Inhibitors** of Transporters:
in vitro positive studies (n = 18 NMEs, 51%)

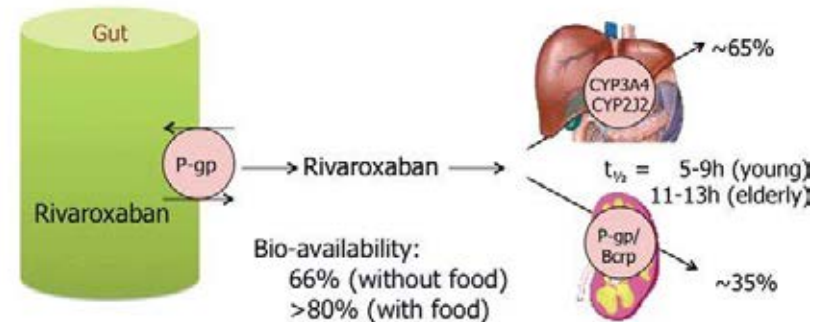


European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of new oral anticoagulants in patients with non-valvular atrial fibrillation

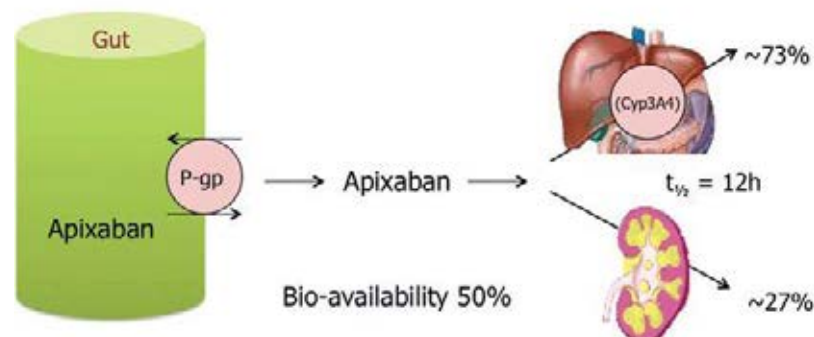
Dabigatran



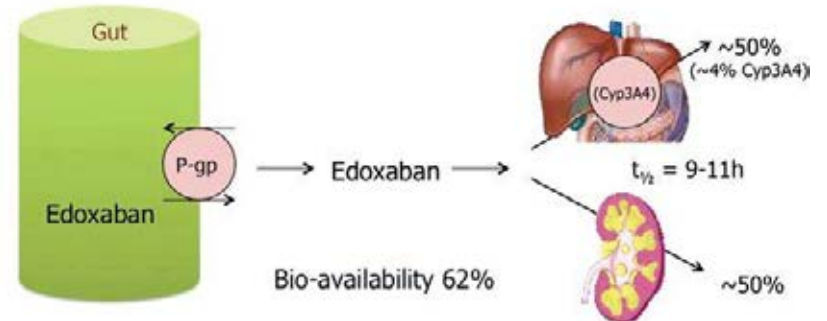
Rivaroxaban



Apixaban



Edoxaban



Научное направление кафедры фармакологии РязГМУ –

тестирование лекарственных препаратов на
принадлежность к субстратам, индукторам и
ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P

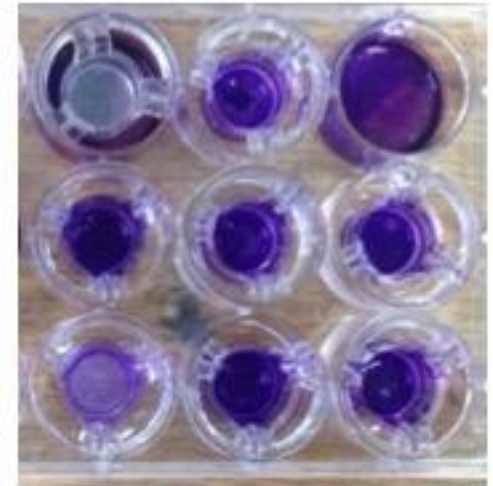
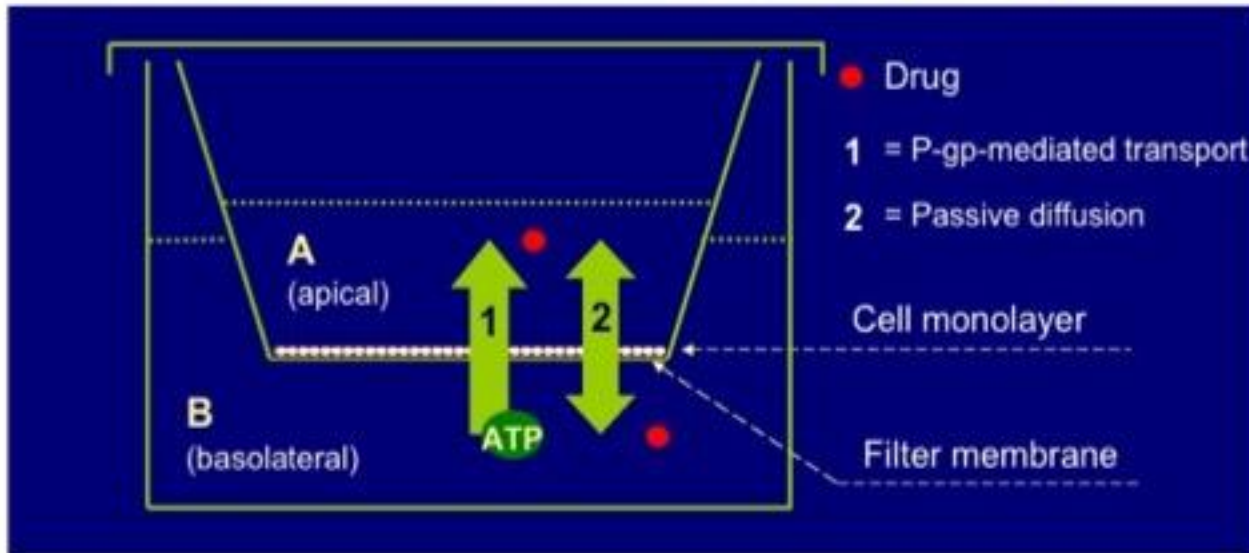
тестирование лекарственных препаратов на
принадлежность к субстратам, индукторам и
ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P

Исследования in vitro

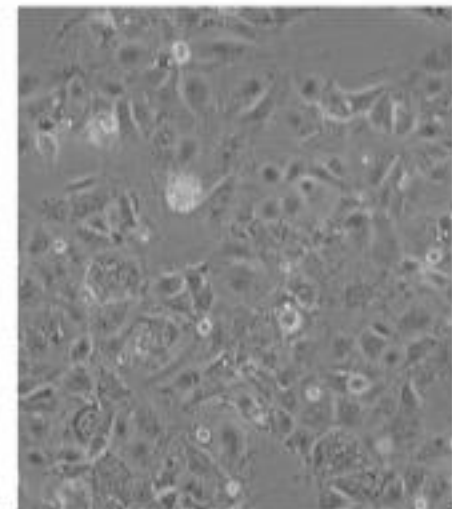
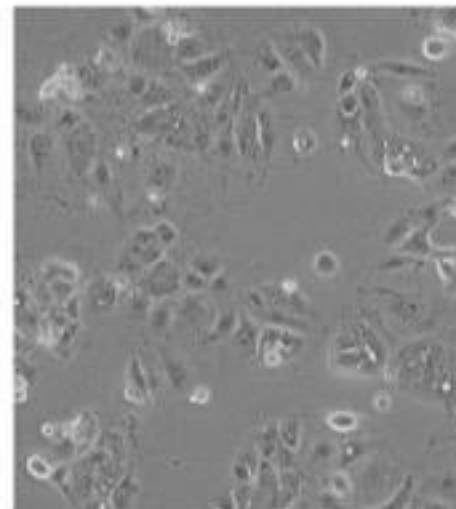


Исследования in vitro

- Культуры клеток, гиперэкспрессирующие Pgp: **Caco-2**



Культивирование проводят при температуре 37°C, при 90% влажности и 5% CO₂ в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) с L-глутамином, 10% фетальной бычей сывороткой, 1% незаменимых аминокислот.



Определение субстратов гликопротеина-P in vitro

В двунаправленной транспортной системе (например линия клеток Caco-2 или эпителиальные клеточные линии, гиперэкспрессирующие Pgp) является ли результирующий коэффициент потока ≥ 2

Суммарный коэффициент
потока ≥ 2

Суммарный коэффициент
потока < 2

Подавляется ли эффлюкс одним или
несколькими ингибиторами*

Слабый или не субстрат Pgp

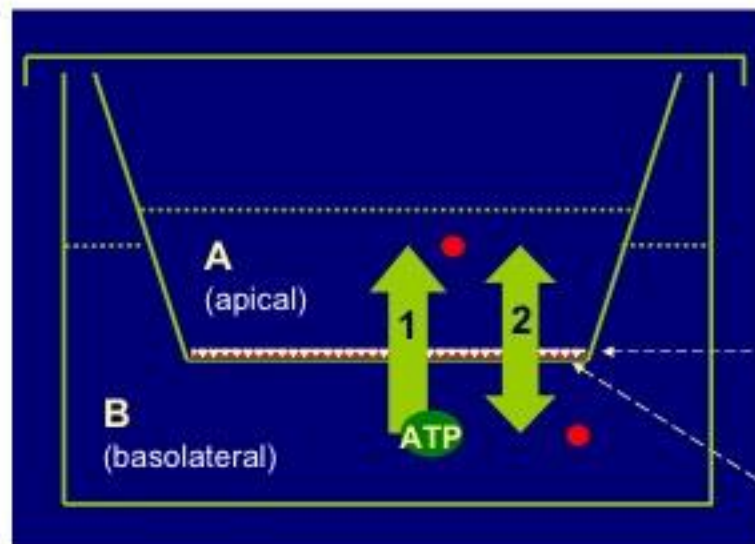
Да

Нет

Другие эффлюксные транспортеры
ответственны за полученные результаты****

Вероятно субстрат Pgp**

Завершить оценку доклинической и
клинической информации для решения
вопроса о целесообразности оценки
межлекарственных взаимодействий in vivo***



Определение ингибиторов гликопротеина-P in vitro

Анализ двунаправленного транспорта с истинным субстратом Pgp (например линия клеток Caco-2 или эпителиальные клеточные линии, гиперэкспрессирующие Pgp)

Суммарный коэффициент потока истинного субстрата снижается с повышением концентрации исследуемого препарата

Вероятно ингибитор Pgp

Определение K_i или IC_{50} ингибитора

$[I]_1/IC_{50}$ (или K_i) $\geq 0,1$
Или
 $[I]_2/IC_{50}$ (или K_i) ≥ 10

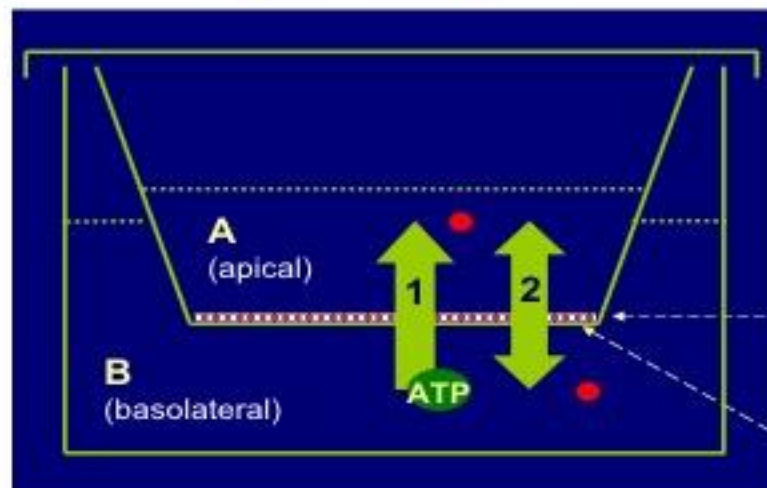
Рекомендовано исследование межлекарственных взаимодействий с субстратами Pgp, например дигоксином in vivo

$[I]_1/IC_{50}$ (или K_i) $< 0,1$
Или
 $[I]_2/IC_{50}$ (или K_i) < 10

Суммарный коэффициент потока истинного субстрата не изменяется с повышением концентрации исследуемого препарата

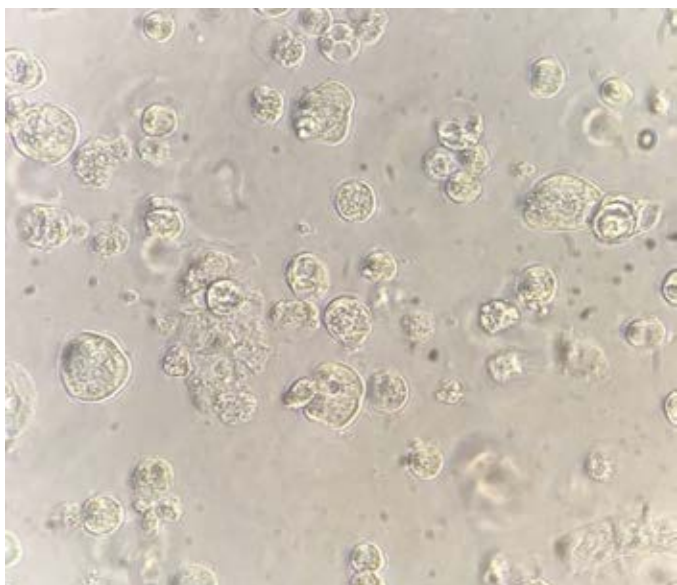
Слабый или не ингибитор Pgp

Исследование межлекарственных взаимодействий с субстратами Pgp in vivo могут быть не нужны





Исследования in vitro

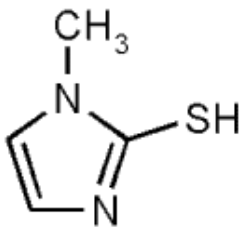
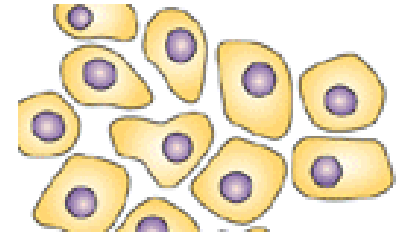


Доклинические исследования in vivo

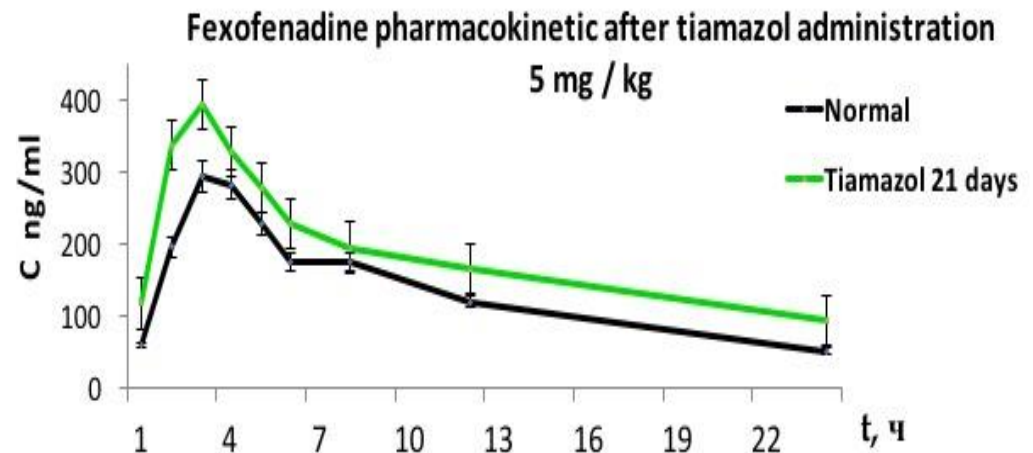
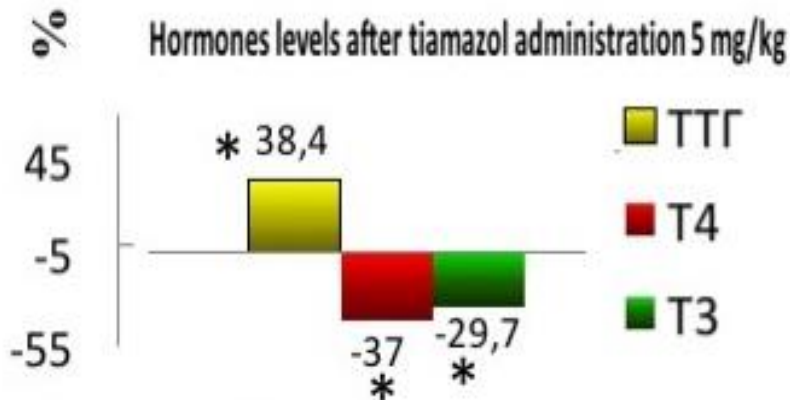


Тестирование на принадлежность к ингибиторам и индукторам Pgp

- Прямое влияние большинства лекарственных веществ на активность Pgp можно выявить *in vitro*.
- Однако, если лекарственное вещество влияет на Pgp опосредовано, то это нельзя выявить в опытах *in vitro*.



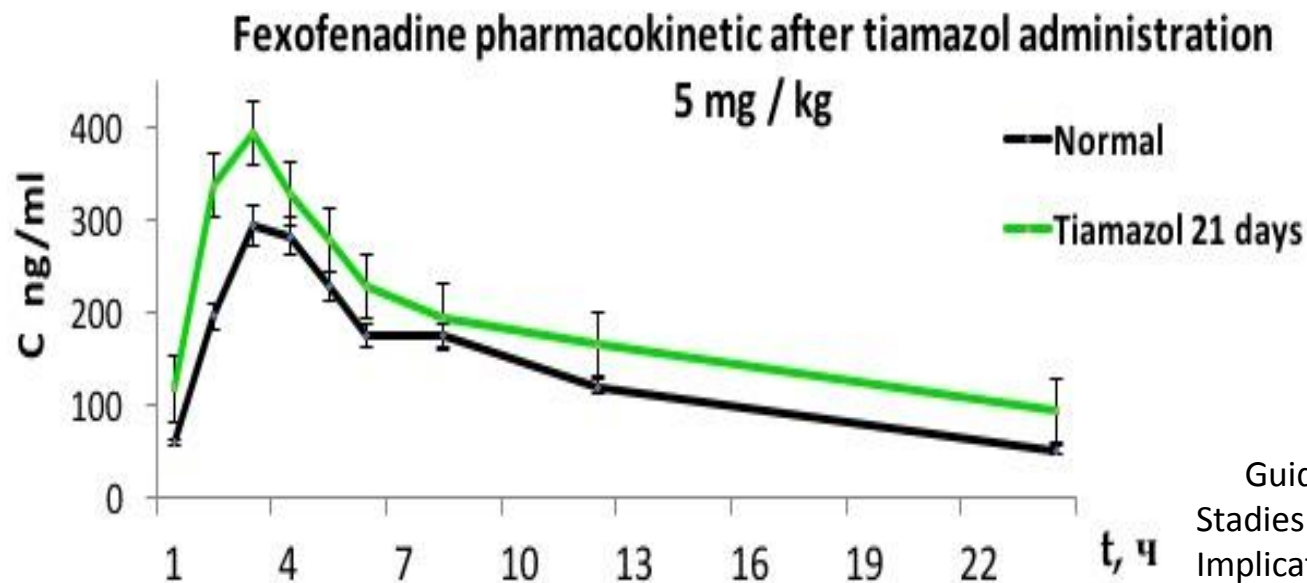
- Например, **тиамазол** *in vitro* не влияет на активность Pgp.





Оцениваемые фармакокинетические параметры

- Максимальная концентрация – $C_{\max}$
- Площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время – AUC
- Время достижения максимальной концентрации - $T_{\max}$
- Клиренс – Cl
- Константа элиминации – K_{el}

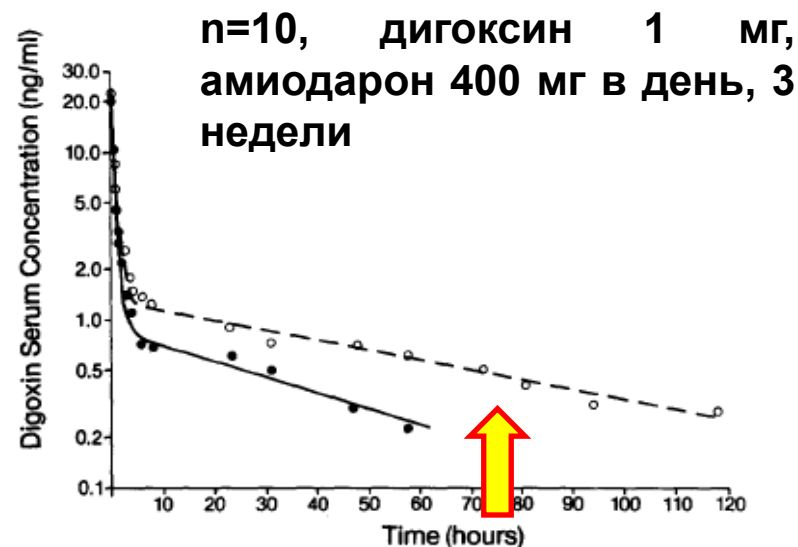
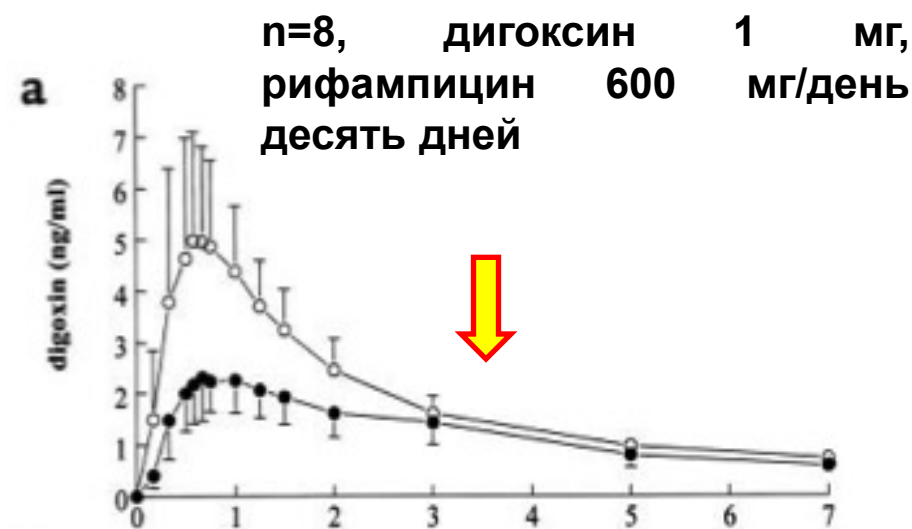


Guidance for Industry: Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, USA 2012



Оценка принадлежности лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р

Принцип метода: оценка фармакокинетики изучаемого вещества до и после введения индуктора/ингибитора



Ингибиторы

Амиодарон, азитромицин, каптоприл, карведилол, кларитромицин, циклоспорин, дилтиазем, дронедазон, кетоконазол, ритонавир, хинидин, ранолазин, **верапамил**

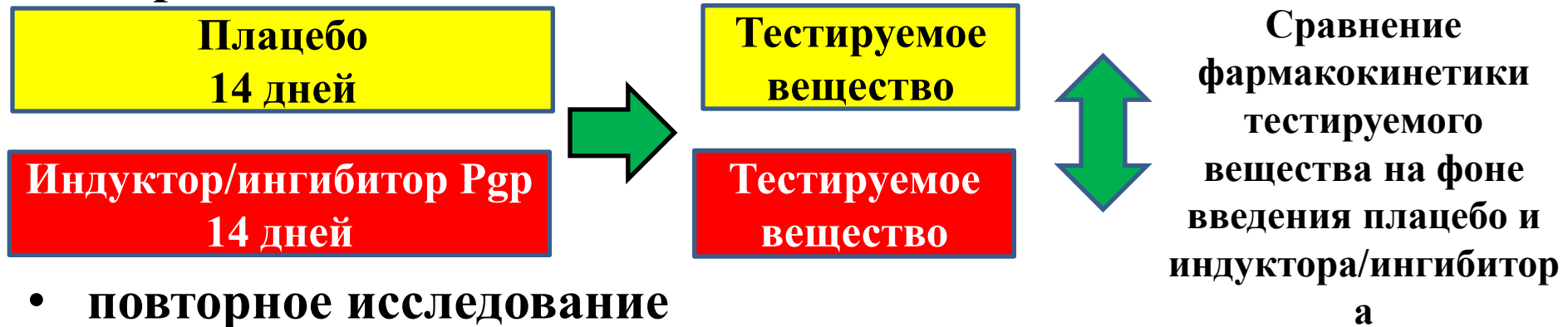
Индукторы

Карбамазепин, фенитоин, **рифампин**, зверобой



Оценка принадлежности лекарственных веществ к субстратам Pgp

- параллельное исследование

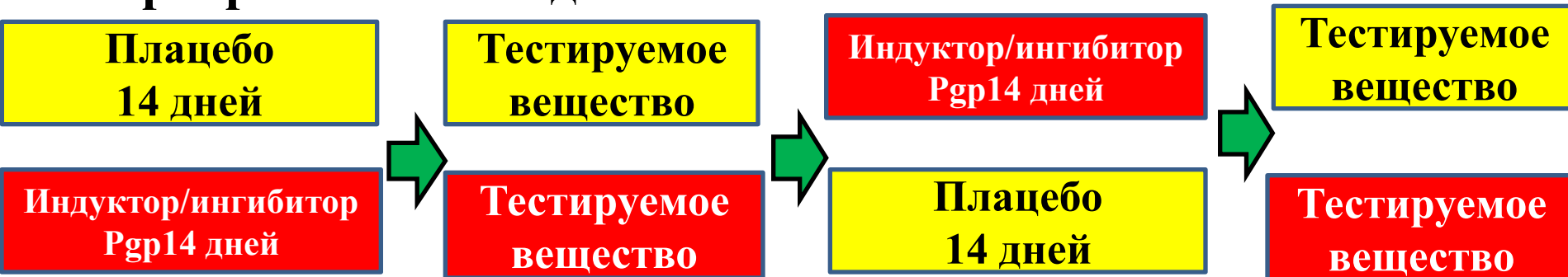


- повторное исследование



Сравнение фармакокинетики тестируемого вещества до и после введения индуктора/ингибитора

- перекрестное исследование

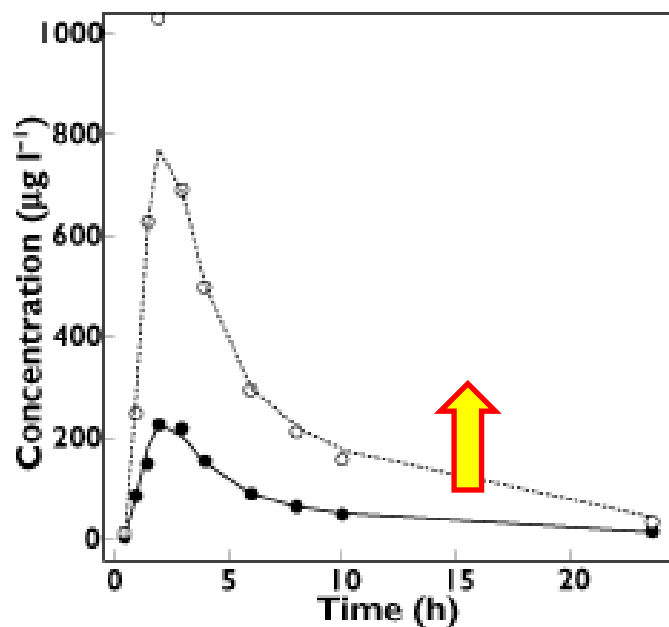


Сравнение фармакокинетики тестируемого вещества до и после введения индуктора/ингибитора



Оценка принадлежности лекарственных веществ к индукторам/ингибиторам гликопротеина-P

Принцип метода: оценка фармакокинетики маркерного субстрата до и после введения изучаемого вещества



- Дабигатран этексилат (маркерный субстрат) вводили в дозе 300 мг per os.
- Кларитромицин вводили 4 дня в дозе 500 мг 2 раза в день.

Маркерные
субстраты

Алискирен, дабигатрана
фексофенадин, домперидон

этексилат,

дигоксин,



Оценка влияния лекарственных веществ на активность Pgp

• параллельное исследование



• повторное исследование



• перекрестное исследование





Преимущества кроликов как биологической модели

- Высокая гомология гена и белка
- Сходные механизмы регуляции
- Сходная фармакокинетика маркерного субстрата
- Сходная субстратная специфичность?
- Доступная цена
- **Возможность выполнения «повторного» и «перекрестного» дизайнов исследований**





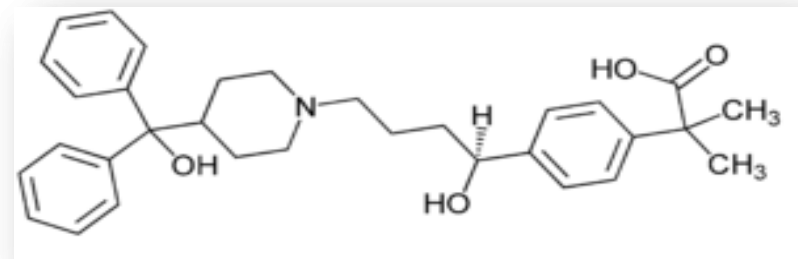
Фексофенадин

Преимущества фексофенадина

- Отсутствие биотрансформации;
- Большая широта терапевтического действия;
- Достаточно высокие концентрации в плазме крови при введении в терапевтической дозе;
- Назначение препарата внутрь позволяет оценить функционирование Pgp в кишечнике;
- Пути выведения: печень и почки, что позволяет судить о функционировании Pgp в обоих органах;
- Низкая частота неблагоприятных побочных реакций;
- Отсутствие кумуляции в организме;
- Доступная стоимость оригинального препарата;
- Безрецептурный отпуск из аптек.

Недостатки фексофенадина

- Трудоемкая методика экстракции препарата из плазмы крови и определения его концентрации методом ВЭЖХ;
- Фексофенадин является субстратом других белков-транспортеров, например, organic anion transporter (OATP1B3)





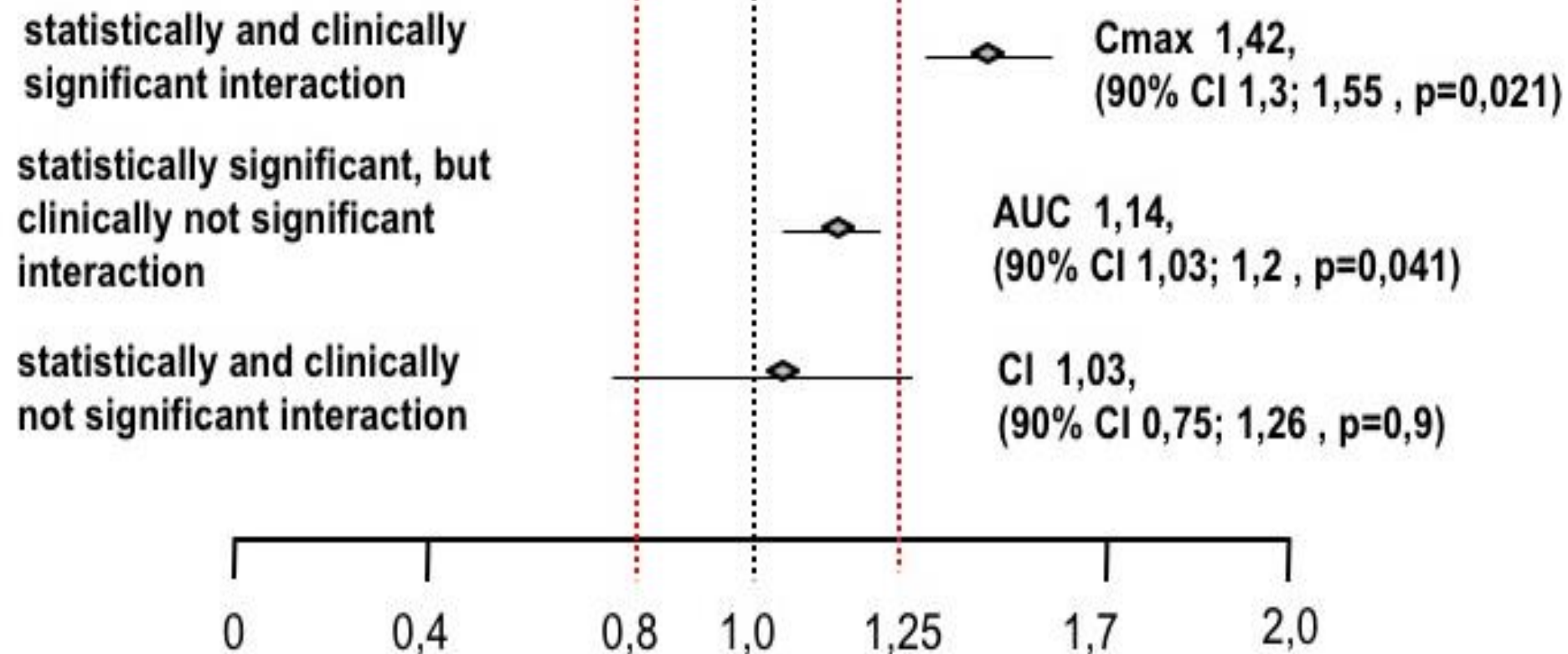
Статистическая обработка результатов

- При параллельном дизайне исследования используется критерий **Стьюдента** или **Манна-Уитни** (в зависимости от типа распределения данных)
- При повторном дизайне – критерий **Стьюдента повторных измерений** или критерий **Вилкоксона**
- При перекрестном дизайне – **многофакторный дисперсионный анализ** или критерий **Вилкоксона**
- Дополнительно оценивают **90-процентный доверительный интервал** отношения геометрических средних фармакокинетических параметров. Значимым считается взаимодействие лекарственных препаратов если 90%-й доверительный интервал изменения фармакокинетических параметров не укладывается в диапазон **80–125%**.



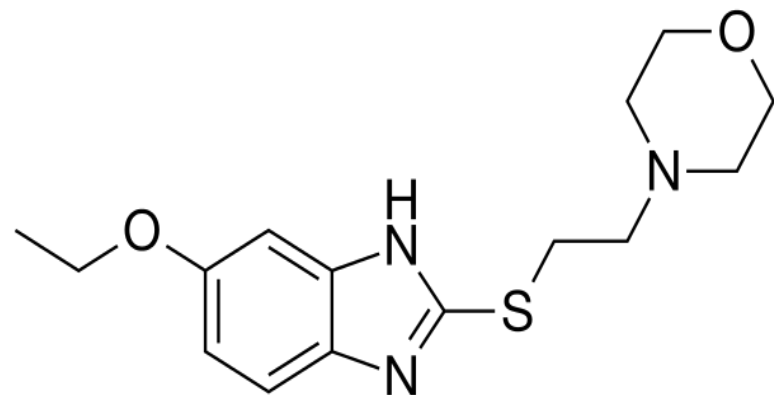
Статистическая оценка полученных результатов

80-125% Confidence Interval of Geometric Mean





Афобазол



Афобазол (фабомотизола дигидрохлорид) – оригинальный отечественный селективный анксиолитик с нейропротекторной активностью.



Безрецептурный отпуск из аптек и широкий спектр показаний к применению повышает вероятность его комбинации с другими лекарственными средствами а, значит, и **межлекарственных взаимодействий**.



Тестирование афобазола на принадлежность к индукторам/ингибиторам гликопротеина-Р

- Тест система – кролики-самцы породы шиншилла, массой 3000-3500 г, n=8
- Дизайн исследования – повторное исследование

Введение афобазола per os в дозе
3,8 мг/кг массы три раза в день

1 день
эксперимента

15 день
эксперимента

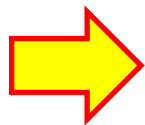
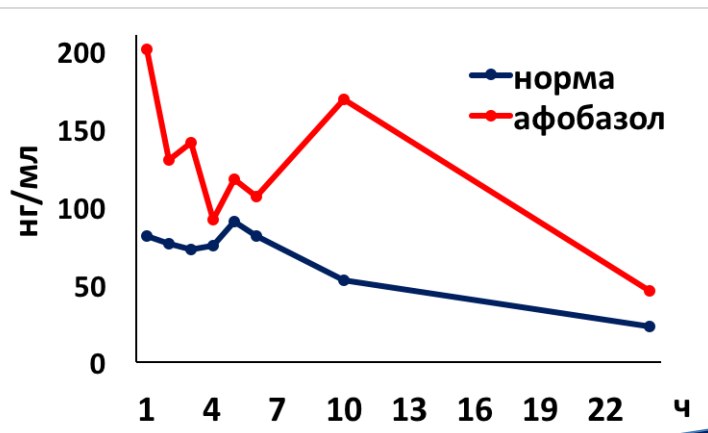


Определение функциональной активности гликопротеина-Р по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина

- Фексофенадин вводили per os в дозе 67,5 мг/кг. Кровь забирали из ушной вены через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 и 24 ч.
- Концентрацию фексофенадина определяли методом ВЭЖХ с УФ детектированием.

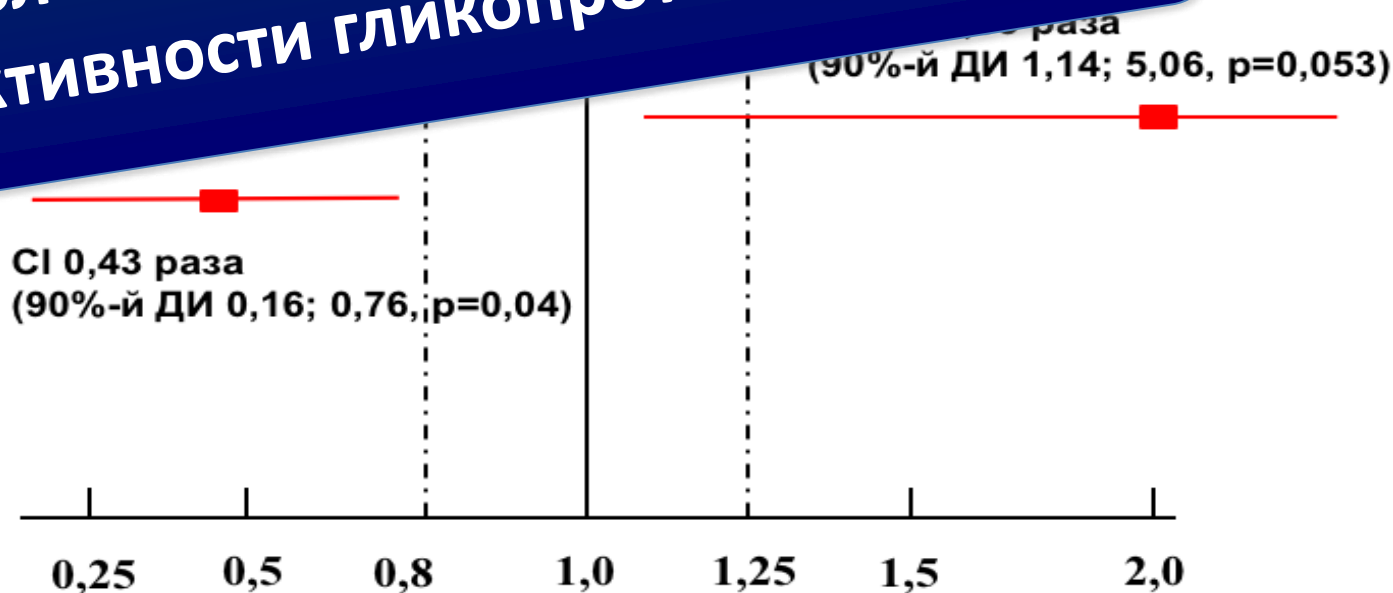


Экспериментальное исследование in vivo



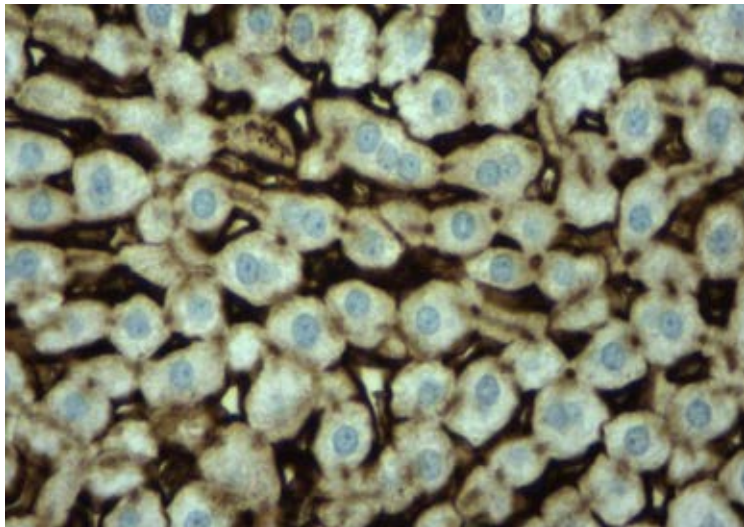
Накопление фексофенадина в организме кроликов, замедление его выведения

Афобазол – ингибитор функциональной активности гликопротеина-P

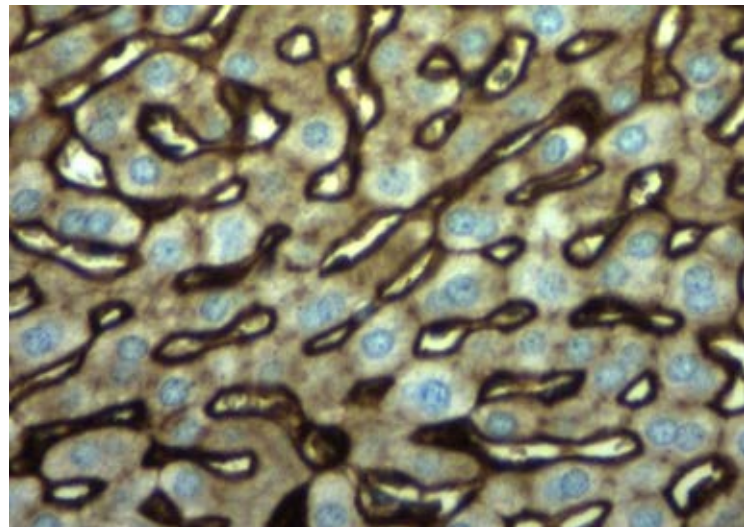




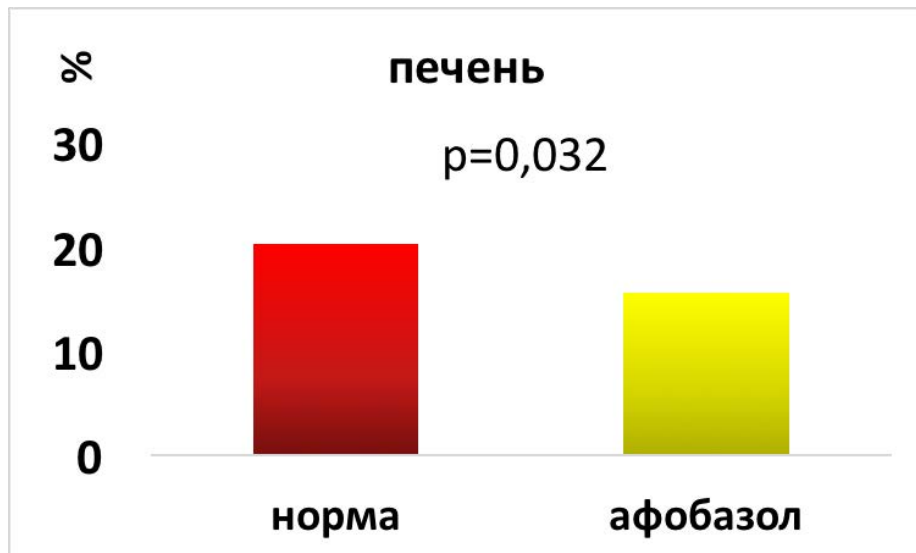
Иммуногистохимическое окрашивание печени



норма



афобазол



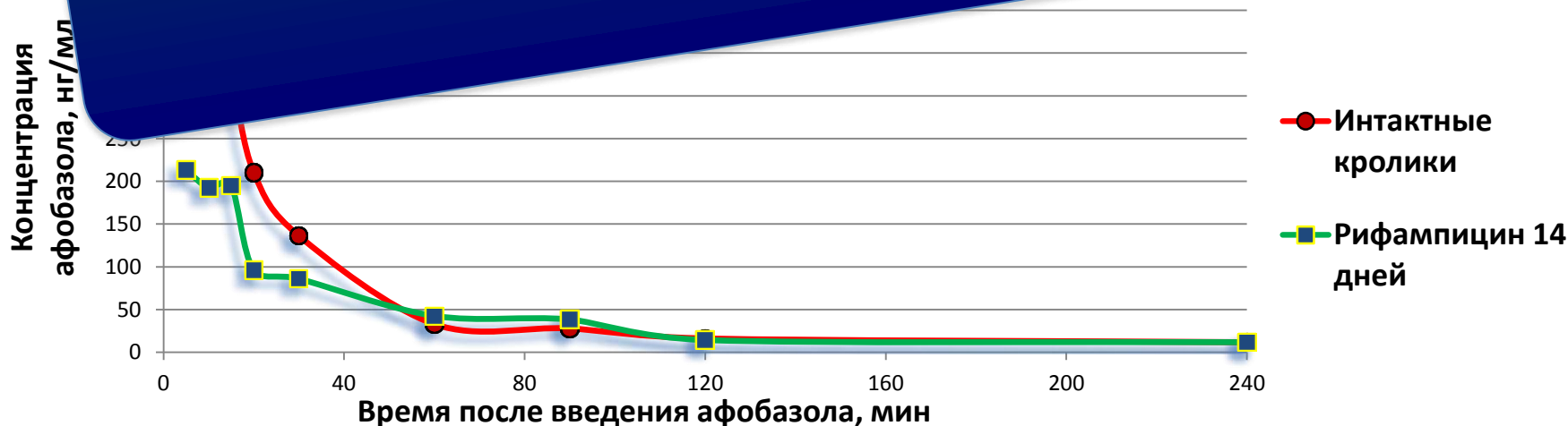
ABCB1-позитивные мембраны в гепатоцитах, окрашивание DAB+гематоксилин, увеличение 400 раз, относительная площадь ABCB1-позитивных мембран гепатоцитов



Фармакокинетика афобазола на фоне курсового введения верапамила и рифампицина



Афобазол – не является субстратом гликопротеина-Р



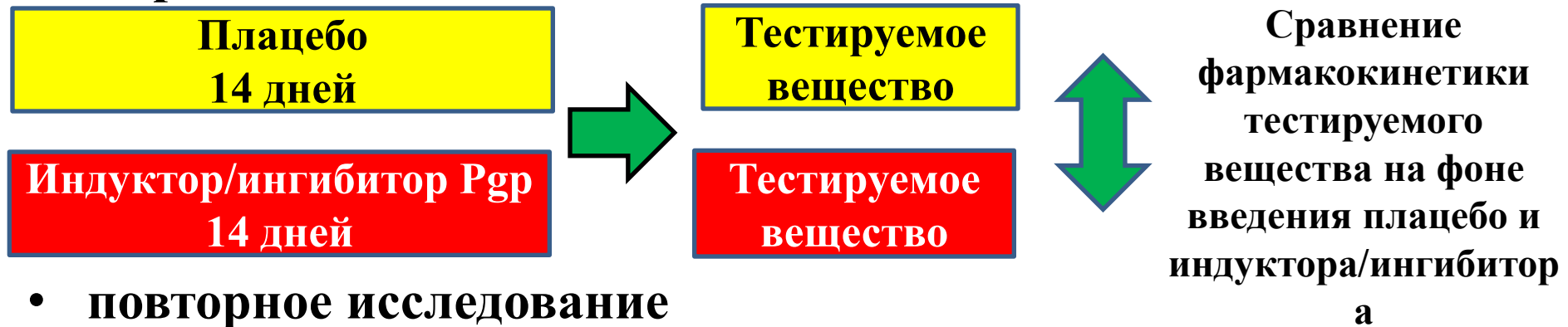
Усредненные фармакокинетические кривые афобазола в норме и на фоне 14-дневного введения рифампицина

Клинические исследования in vivo



Оценка принадлежности лекарственных веществ к субстратам Pgp

- параллельное исследование

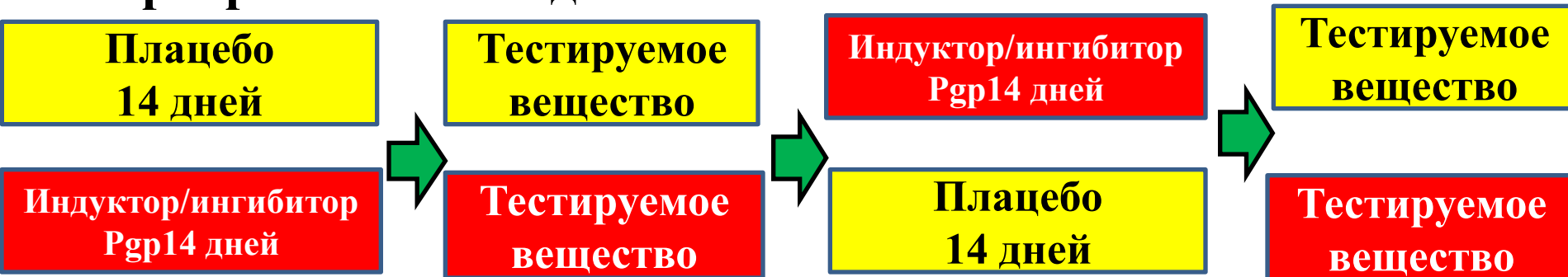


- повторное исследование



Сравнение фармакокинетики тестируемого вещества до и после введения индуктора/ингибитора

- перекрестное исследование



Сравнение фармакокинетики тестируемого вещества до и после введения индуктора/ингибитора



Оценка влияния лекарственных веществ на активность Pgp

• параллельное исследование



• повторное исследование



• перекрестное исследование





Дизайн исследования

- Одноцентровое, простое слепое, плацебоконтролируемое, рандомизированное, перекрестное, двухэтапное исследование функциональной активности гликопротеина-Р по фармакокинетике фексофенадина
- Исследование осуществлялось на клинической базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и было одобрено ЛЭК.
- Все добровольцы подписали информированное согласие.



Критерии включения

- Возраст 18-45 лет
- Индекс массы тела от 18,5 до 30,0 кг/м²
- **Генотип СТ по полиморфным маркерам С3435Т гена MDR1, кодирующего гликопротеин-Р**
- Способность выполнять требования протокола исследования
- Низкая тревожность оцененная по шкале Спилбергера-Ханина
- Поллиноз в анамнезе



Критерии невключения

- Гиперчувствительность к афобазолу и фексофенадину
- Заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной, иммунной систем, желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови
- Острые инфекционные заболевания
- Прием веществ, влияющих на активность гликопротеина-Р, гемодинамику и функцию пищеварительной системы в течение 4 недель до включения в исследование
- Наличие на скрининге отклонений от норм показателей инструментальных и лабораторных методов исследования
- Потеря более 450 мл крови менее чем за 2 месяца до начала исследования



Расчет количества добровольцев

Eur J Clin Pharmacol (2010) 66:721–725
DOI 10.1007/s00228-010-0797-2

PHARMACOKINETICS AND DISPOSITION

Effect of metronidazole on the pharmacokinetics of fexofenadine, a P-glycoprotein substrate, in healthy male volunteers

Kyoung-Ah Kim • Ji-Young Park

Table 1 Pharmacokinetic parameters of fexofenadine after a single dose of fexofenadine 120 mg in 12 healthy subjects, following 7 days pretreatment with placebo or 500 mg metronidazole three times daily

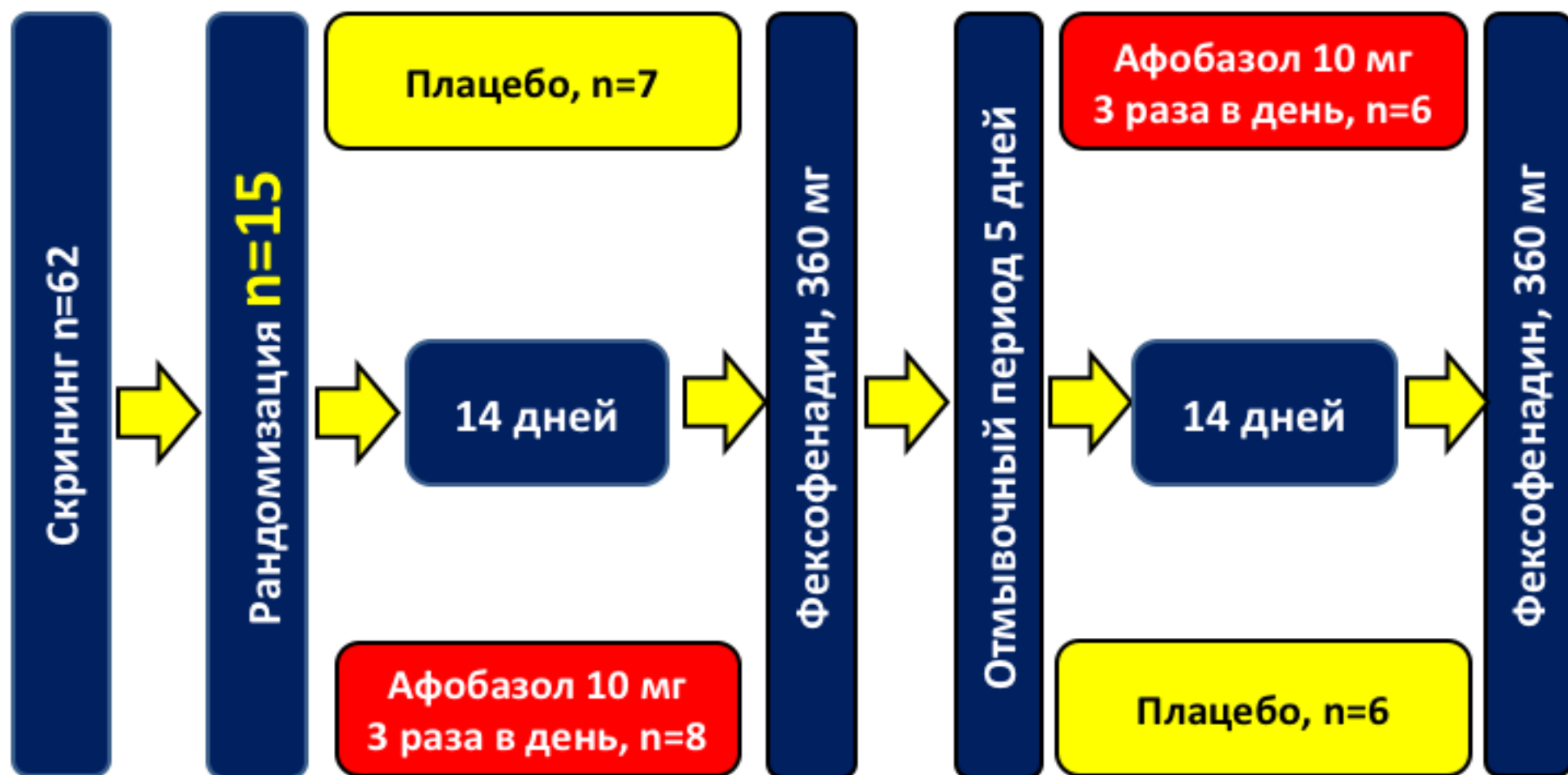
Parameters	Placebo phase (R)	Metronidazole phase (T)	T/R ratio	90% CI	<i>P</i> value
$t_{\max}$ (h)	2.2 ± 1.1	2.4 ± 1.1	1.106	(0.862, 1.419)	0.295
$C_{\max}$ (ng/mL)	304.4 ± 139.6	293.2 ± 137.7	0.965	(0.908, 1.027)	0.423
K_e (h^{-1})	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.935	(0.823, 1.062)	0.573
Half-life (h)	4.7 ± 1.0	5.4 ± 2.8	1.070	(0.942, 1.215)	0.314
AUC_{all} (ng h/mL)	2075.7 ± 557.1	1999.2 ± 397.3	0.978	(0.920, 1.039)	0.356
AUC_{inf} (ng h/mL)	2159.2 ± 573.0	2141.7 ± 538.2	0.998	(0.924, 1.078)	0.882
CL/F (L/h)	60.1 ± 19.7	59.7 ± 17.5	1.002	(0.928, 1.083)	0.891

$CV_{\text{intra}} AUC_{0-24} - 11\%$, а $C_{\max} - 12,75\%$

При отношении геометрических средних AUC_{0-24} и $C_{\max}$ в пределах 0,90-1,10, для достижения статистической мощности 80% с уровнем значимости $\alpha=5\%$ достаточно 12 добровольцев



Дизайн исследования

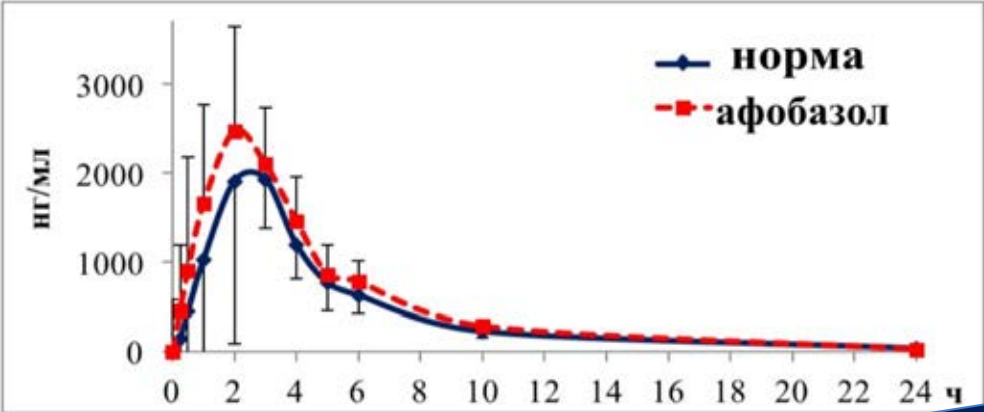


- два добровольца выбыли из исследования из-за развития ОРВИ,
- один доброволец отказался от участия после завершения первого периода исследования.



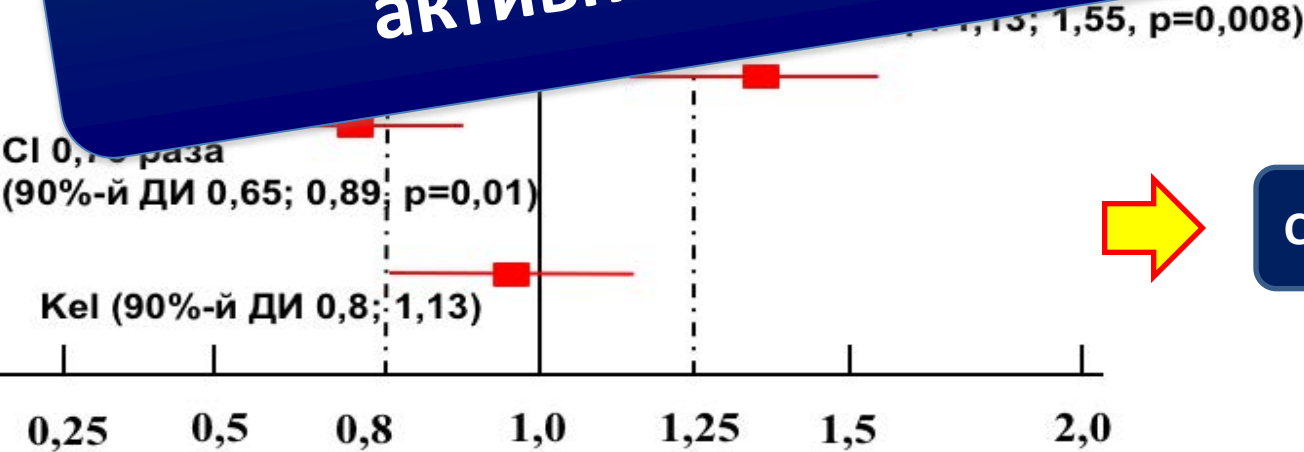
Результаты

Фармакокинетика фексофенадина



Учитывали влияние таких факторов, как **последовательность** приема афобазола или плацебо, **период исследования**, различия между **испытываемыми**

Афобазол – ингибитор функциональной активности гликопротеина-P



CV_{intra} AUC_{0-t} – 21,5%



Выводы

- Афобазол является ингибитором гликопротеина-Р
- Кролики породы шиншилла могут являться экспериментальной моделью для оценки влияния лекарственных веществ на активность гликопротеина-Р

Спасибо за внимание!!!



Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-97522 р_центр_a, 16-44-620292 р_a, 16-04-00320 а
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru, e.yakusheva@rzgmu.ru