

P-Гликопротеин (Pgp, ABCB1-белок) – АТФ-зависимый белок-транспортер, участвующий в транспорте эндогенных и экзогенных субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости (Schinkel A.H., 1997). Впервые Pgp был выявлен в 1976 году в опухолевых клетках яичников китайских хомячков (Juliano R.L., Ling V., 1976), поэтому первоначально предполагалось, что основная функция данного белка-транспортера связана с защитой опухолевых клеток от химиотерапии. Однако в дальнейшем многочисленные исследования показали широкую распространенность Pgp во многих органах и тканях как человека, так и животных: в слизистой оболочке кишечника человека, где его роль заключается в ограничении абсорбции потенциальных субстратов из кишечника (Cavet M. E., West M., Simmons N. L., 1996; Haslam I.S. et al., 2008), на билиарной поверхности гепатоцитов, апикальной поверхности эпителиоцитов проксимальных канальцев почек, протоков поджелудочной железы соответственно (Thiebaut F. et al., 1987), где он осуществляет эффлюкс субстратов в желчь, первичную мочу и панкреатический секрет. Pgp локализован в эндотелии капилляров, формирующих гистогематические барьеры (гематоэнцефалический, гематоовариальный, гематотестикулярный и гематоплацентарный), где транспортер защищает забарьерные органы от токсичных эндогенных веществ и ксенобиотиков (Cordon-Cardo C. et al., 1990; Linlin S.C., Yan Cheng, Mruk D.D., 2009). При этом повышение активности данного белка-транспортера в гематоэнцефалическом барьере связывают с развитием лекарственнорезистентной формы эпилепсии (Braakman H.M., Vaessen M.J., 2011; S.S. Cleave, R. Panda, P.K. Suresh, 2013; A. Rosillo-de la Torre et al., 2014; P.S. Chan et al., 2014).

Таким образом, в настоящее время считается, что Pgp играет важную роль не только в развитии множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, но также и в формировании фармакорезистентных форм эпилепсии и фармакокинетики лекарственных веществ – его субстратов.

P-гликопротеин имеет широкую субстратную специфичность. Его субстратами являются соединения с молекулярной массой от 330 Да до 4000 Да. К его субстратам относятся органические катионы, слабые органические основания, некоторые органические анионы и незаряженные соединения, в том числе полипептиды и полипептидные производные. Группы лекарственных средств, транспортируемых P-гликопротеином включают противоопухолевые препараты, флуоресцентные красители, стероидные гормоны, сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, макролиды, фторхинолоны, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, статины,

иммунодепрессанты и др. (Кукес В.Г. и др., 2008; Середенин С.Б., 2004; Chin L.W., Kroetz D.L., 2007).

Воздействие ряда лекарственных веществ может модулировать активность белка-транспортера. Ингибиторы Р-гликопротеина (верапамил, амиодарон, кетоконазол и др.), снижают его функциональную активность, что ассоциировано в ряде случаев с развитием нежелательных лекарственных реакций. Индукторы (рифампицин), напротив, повышают активность белка-транспортера, что меняет фармакокинетику вводимых субстратов и способствует снижению эффективности проводимой фармакотерапии.

Учитывая данные обстоятельства, ведущие организации США (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration и Center for Drug Evaluation and Research) рекомендуют все новые лекарственные средства подвергать тестированию на принадлежность к субстратам и ингибиторам Р-гликопротеина. Первоначально исследования проводятся на моделях *in vitro* (на культурах клеток). Если в опытах *in vitro* устанавливается, что новый лекарственный препарат является субстратом или ингибитором белка-транспортера, то в дальнейшем его изучают *in vivo*.

В Российской Федерации на данный момент тестирование лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам Рgp при регистрации не является обязательным.

Предлагаемые услуги:

а) тестирование разрабатываемых или уже зарегистрированных лекарственных препаратов на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам белка-транспортера Р-гликопротеина;

б) скрининговое тестирование разрабатываемых ингибиторов Р-гликопротеина в опытах *in vitro*;

в) изучение проникновения лекарственных веществ через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 (модель абсорбции лекарственных веществ в желудочно-кишечном тракте).

Конкурентные преимущества

На данный момент в Российской Федерации аналогичные исследования не выполняются. По сравнению с зарубежными конкурентами преимуществами являются:

а) более низкая стоимость исследования

б) нахождение на территории Российской Федерации (доступная логистика, меньшие сроки организации исследований)

Инновационность

Объект исследования - клетки линии Caco-2 (клетки карциномы ободочной кишки), которые способны спонтанно дифференцироваться в энтероцит-подобные клетки. Отличительной чертой данных клеток является гиперэкспрессия Р-гликопротеина (Kishimoto W. et al., 2013; Perloff M.D. et al., 2002; FDA guidance).

Принцип метода тестирования веществ на принадлежность к индукторам и ингибиторам Р-гликопротеина. Клетки линии Caco-2 высеиваются на полупроницаемую мембрану специализированной transwell-системы и культивируются до образования монослоя. Затем оценивается транспорт маркерных субстратов Pgp (транспортируются преимущественно данным белком-транспортером и не подвергаются биотрансформации) через полупроницаемую мембрану с клетками Caco-2 и влияние на данный транспорт тестируемого вещества. Если вещество является индуктором Pgp, транспорт через полупроницаемую мембрану с клетками Caco-2 увеличивается, если ингибитором – то уменьшается. В качестве маркерного субстрата мы используем гистаминолитик III поколения фексофенадин.

Принцип метода тестирования веществ на принадлежность к субстратам Р-гликопротеина. Клетки линии Caco-2 высеиваются на полупроницаемую мембрану специализированной transwell-системы и культивируются до образования монослоя. Затем оценивается транспорт тестируемого вещества через полупроницаемую мембрану с клетками Caco-2. После этого оценивается влияние известного индуктора Pgp (рифампицин) и ингибитора (верапамил) на транспорт тестируемого вещества. Если он изменяется (на фоне индуктора – повышается, а на фоне ингибитора снижается), делается вывод о принадлежности тестируемого вещества к субстратам Pgp.

Принцип метода тестирования проницаемости веществ через билипидную мембрану клеток Caco-2. Клетки линии Caco-2 высеиваются на полупроницаемую мембрану специализированной transwell-системы и культивируются до образования монослоя. Затем оценивается транспорт тестируемого вещества через полупроницаемую мембрану с клетками Caco-2 в присутствии ингибитора Pgp (верапамил), чтобы исключить влияние белка-транспортера на транспорт веществ.

Концентрацию веществ в транспортной среде определяют методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Данный метод тестирования лекарственных веществ является общепризнанным (FDA guidance; EMA guidance).

Однако в Российской Федерации на данный момент такие исследования не проводятся.

Особенностью нашего метода является:

- 1) использование в качестве маркерного субстрата фексофенадина
- 2) более длительные сроки инкубирования клеток при проведении транспортных экспериментов.