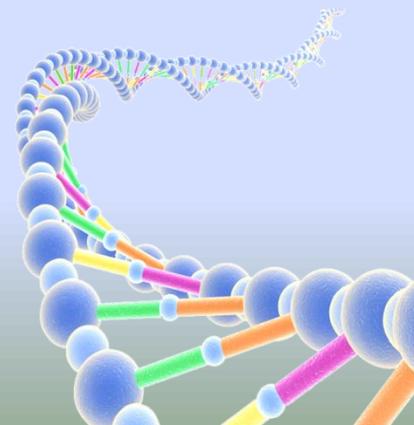


Новые вызовы в сфере генотоксикологической оценки лекарственных средств

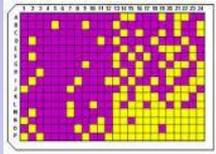
Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Середенин С.Б.
ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН, Москва

Санкт-Петербург, 5-6 июня
2013 г.

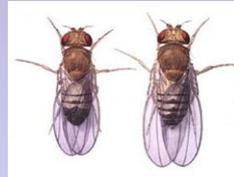
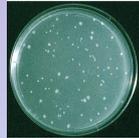


Общая схема тестирования лекарственных средств на мутагенную активность

Тест на индукцию генных мутаций



Тест Эймса

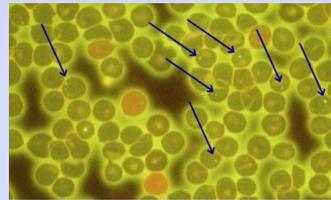


Тест на *D. melanogaster*

Тест на индукцию хромосомных повреждений



Хромосомные aberrации
in vivo



Микроядерный тест *in vivo*

Перед фазой III клинических исследований

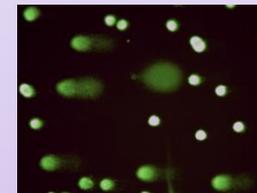


Тест на индукцию доминантных летальных мутаций

При тестировании на канцерогенность в краткосрочных тестах

+

Тест на индукцию ДНК-повреждений



Метод ДНК-комет

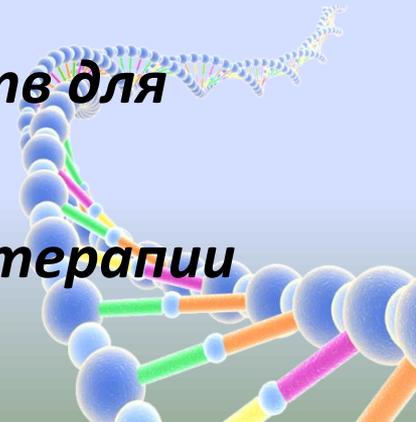


Метод щелочной элюции



Актуальные проблемы...

- **Органо- и тканеспецифичность действия**
- **Оценка эффектов в половых клетках, включая анеугенную активность**
- **Оценка мутаген-модифицирующего действия**
- **Оценка индукции мутаций в митохондриальной ДНК**
- **Оценка генотоксичности лекарственных средств на основе наноносителей**
- **Оценка генотоксичности лекарственных средств для генной терапии**
- **Оценка генетической безопасности клеточной терапии**



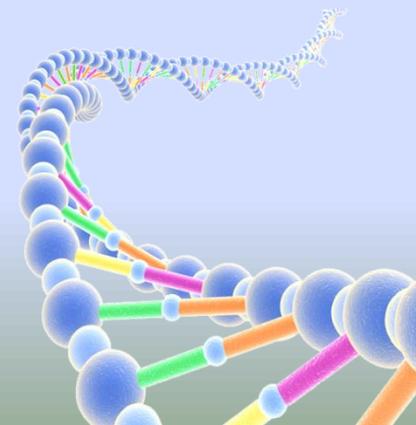
Методом ДНК-комет.....

- ❖ Из **117** канцерогенов-генотоксикантов, для **110** выявлен положительный эффект в тесте ДНК-комет *in vivo* (**94%**)
- ❖ Из **60** канцерогенов-негенотоксикантов, для **54** выявлен положительный эффект в тесте ДНК-комет *in vivo* (**90%**)
- ❖ Из **54 (35)** канцерогена, негативного в тесте на индукцию микроядер *in vivo*, для **49 (31)** выявлен положительный эффект в тесте ДНК-комет *in vivo* (**90.7%**)

Метод оценки ВПС в печени – **17.1%**

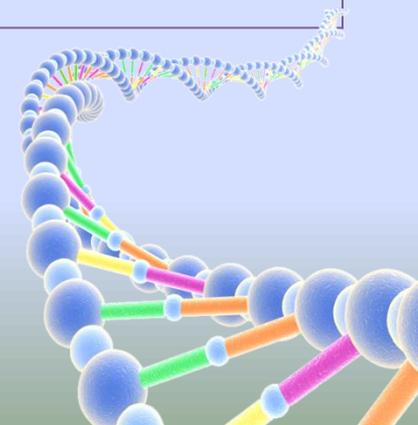
Метод оценки на трансгенных мышах – **56.7%**

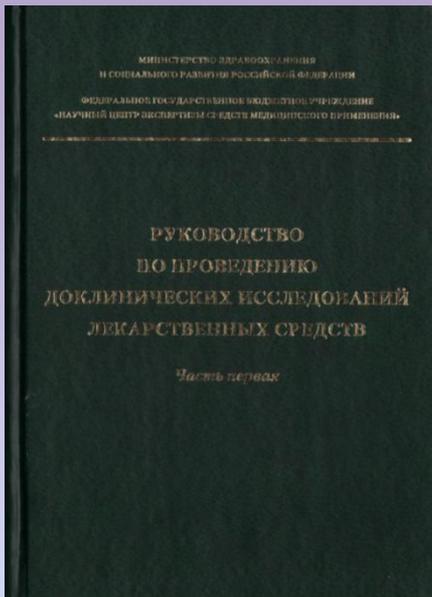
Sasaki et al, 2000
Kirkland et al, 2005; 2008



Сопоставимость результатов тестов

Методы оценки	Сходимость результатов
Тест Эймса – цитогенетика <i>in vitro</i>	78%
Тест Эймса – цитогенетика <i>in vivo</i>	89%
Тест Эймса – MLA	78%
Тест Эймса – ДНК-повреждения	92%
Цитогенетика <i>in vitro</i> – цитогенетика <i>in vivo</i>	80%
Цитогенетика <i>in vitro</i> – ДНК-повреждения	79%
Цитогенетика <i>in vivo</i> – ДНК-повреждения	97%





Методические указания по оценке мутагенных свойств фармакологических веществ

Методические указания по оценке канцерогенности фармакологических средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах.

Методические указания по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях



European Food Safety Authority

EFSA Journal 2012;10(11):2977

SCIENTIFIC REPORT OF EFSA

Minimum Criteria for the acceptance of *in vivo* alkaline Comet Assay Reports¹

European Food Safety Authority^{2,3}

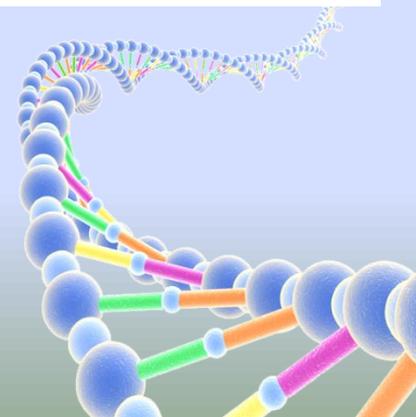
GUIDANCE ON GENOTOXICITY TESTING AND DATA INTERPRETATION FOR PHARMACEUTICALS INTENDED FOR HUMAN USE

ICH Harmonised Tripartite Guideline

Having reached *Step 4* of the ICH Process at the ICH Steering Committee meeting on 9 November 2011, this Guideline is recommended for adoption to the three regulatory parties to ICH

DRAFT OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Rodent alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay



Методы оценки генотоксичности в зародышевых клетках

Генные мутации:

- Метод учета мутаций в специфических локусах
- ESTR-метод (оценка вариабельности простых тандемных повторов ДНК)
- Метод ДНК-комет в клетках сперматогоний и спермиев

Хромосомные мутации:

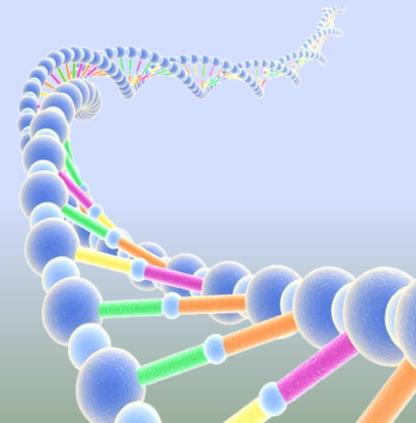
- Тест на индукцию доминантных летальных мутаций
- Тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках сперматогоний и сперматоцитов
- Тест на индукцию микроядер в клетках сперматогоний

Геномные мутации:

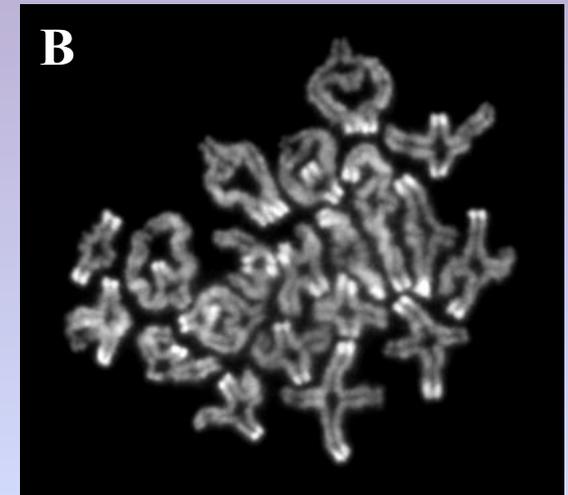
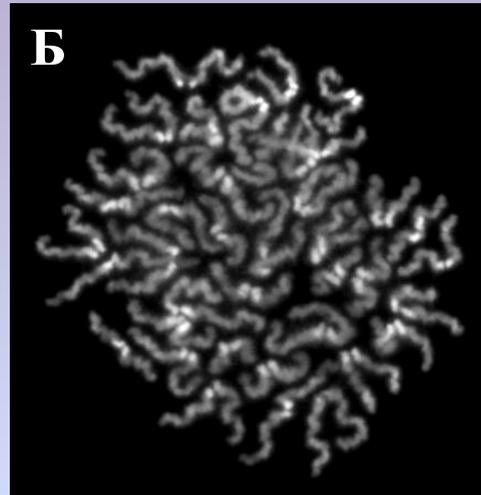
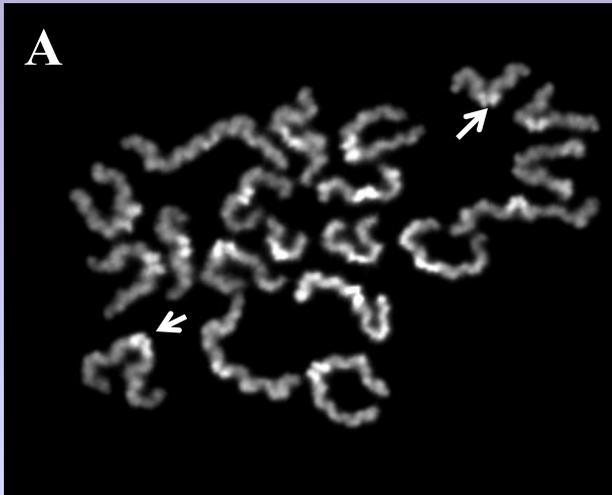
- Оценка анеугенного действия в сперматоцитах
- Оценка анеугенного действия в ооцитах
- Метод FISH-анализа в ооцитах, сперматогониях , спермиях

ДНК-повреждения:

- Метод ДНК-комет в клетках сперматогоний
- Метод ДНК-комет в спермиях
- ВПС в клетках сперматогоний



Цитогенетика половых клеток мышей



А – ооцит мыши с нормальным гаплоидным набором хромосом ($n=20$) (стрелка – центромерные участки)
Б – полиплоидный ооцит мыши ($n=40$)
В – ооцит мыши, остановка на стадии метафазы I мейоза
Г – сперматоцит (метафаза I мейоза) мыши со структурными повреждениями хромосом

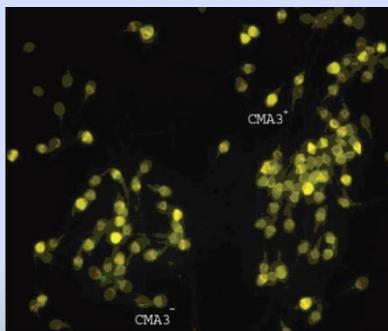


Предполагаемый комплекс тестов оценки генотоксичности в зародышевых клетках

Оценка целостности ДНК в клетках сперматогоний, сперматоцитах и спермиях

Оценка дефектов упаковки хроматина

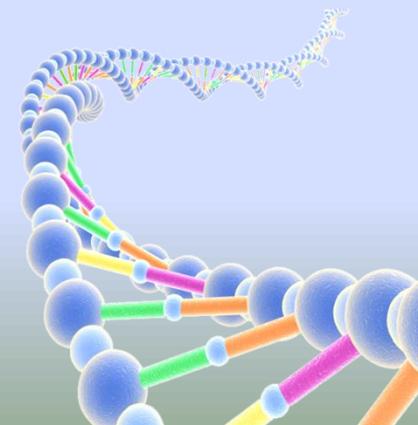
Цитогенетический анализ в ооцитах, в клетках сперматогоний и сперматоцитов



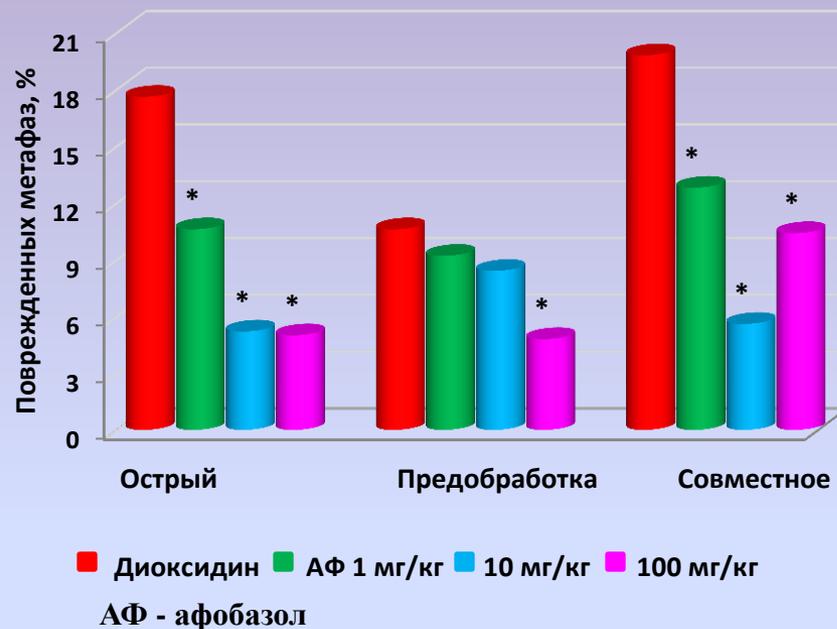
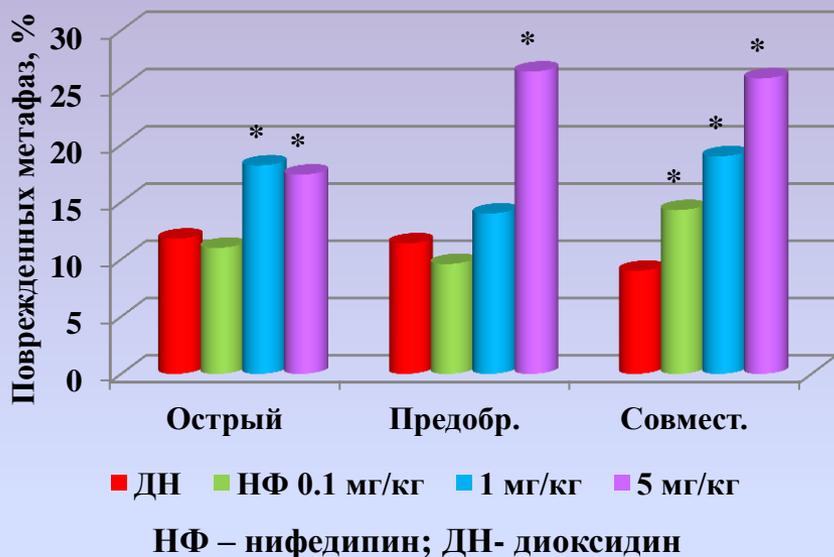
**Оценка дефектов упаковки хроматина
(окраска хромомицин А3)**



метод ДНК-комет



Модификация мутагенеза: двуликий Янус



(-) потенцирование мутагенных воздействий (эндо- или экзогенных)

(+) направленное (целевое) усиление терапевтического действия

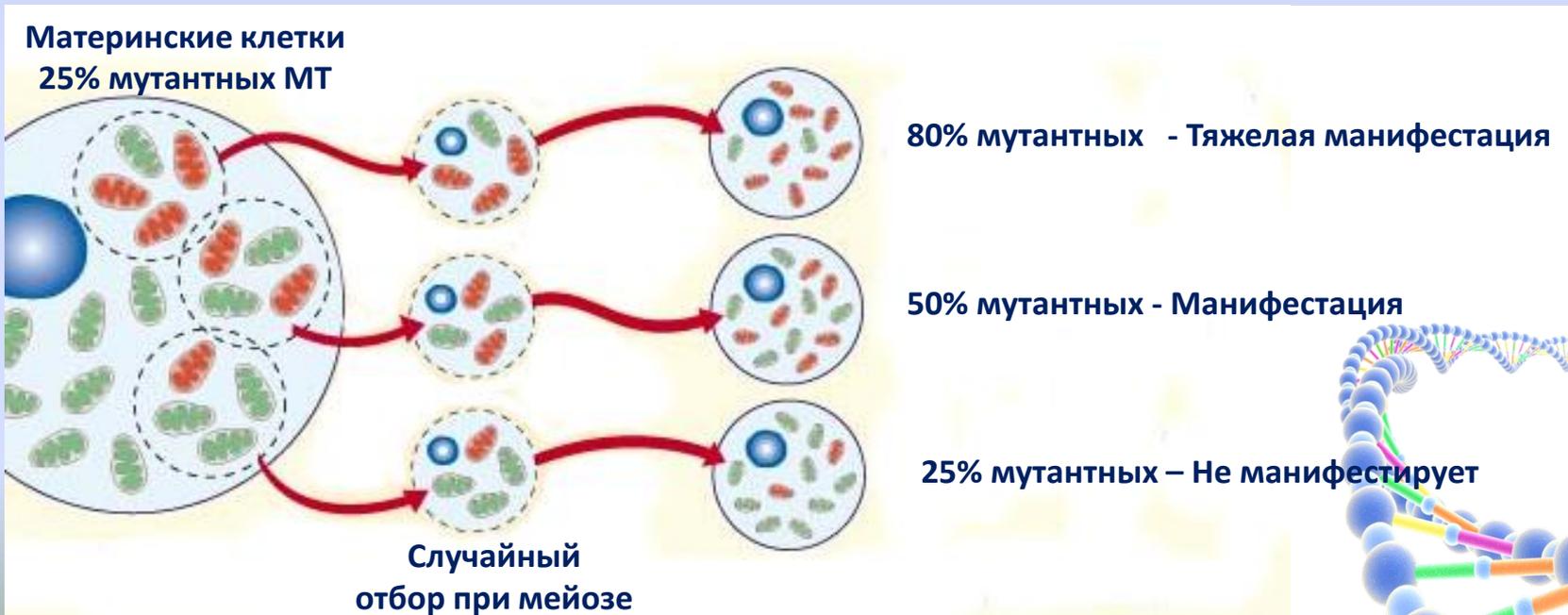
(+) Снижение/подавление мутагенной активности ЛС при сохранении терапевтического действия
Снижение/подавление эндогенного мутагенеза

(-) Снижение терапевтического действия ЛС

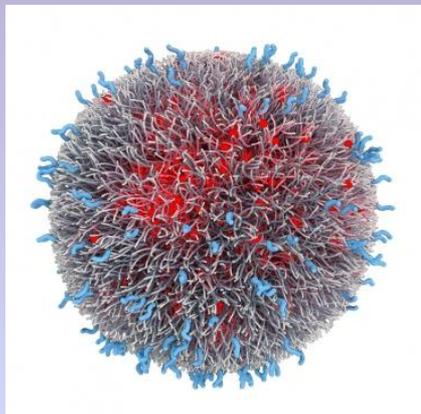


Последствия мутаций в митохондриальной ДНК

Миопатии
Энцефалопатии
Нейропатии
Сахарный диабет
Старение?



Генотоксичность средств на основе наноносителей



Фуллерены C₆₀
и другие
наночастицы
способны вызывать
окислительный стресс
(Yamakoshi et al, 2003)

Перспективы применения (по материалам C-Sixty Inc.)

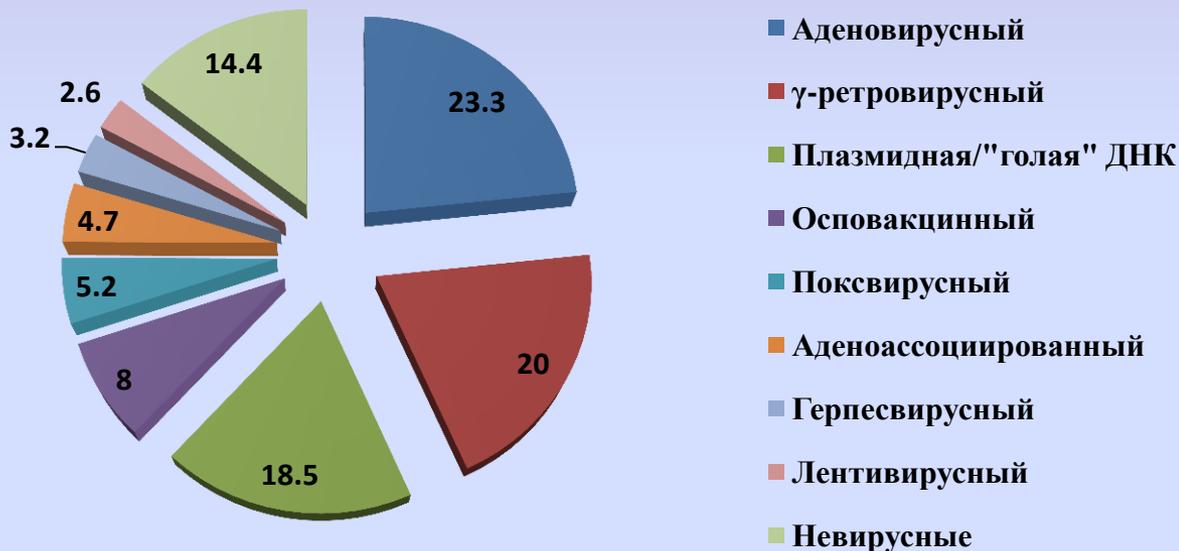
1. Микрокапсулы (~ 1 мк) с нанопорами для доставки и регулируемого высвобождения лекарств.
2. Наночастицы (< 100 нм), конъюгированные с лекарством, для адресной доставки к клеткам-мишеням.

Предполагаемые особенности генотоксического тестирования.

1. Использование в качестве тест-объектов исключительно млекопитающих.
2. Оценка эффектов в нескольких тканях.
3. Длительность экспозиции не менее 14 суток.
4. Существенные различия в эффектах наночастиц разных форм, размеров, материалов.
5. Принципиальные различия в эффектах наночастиц при разных путях введения.

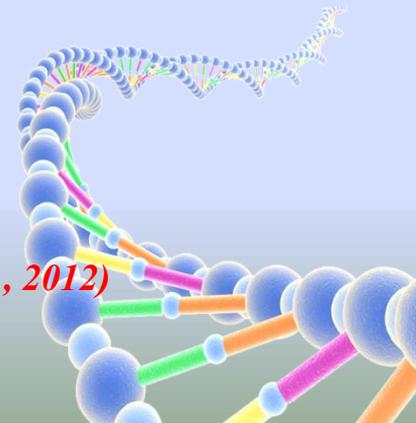
Носители целевой ДНК для генной терапии (ГТ)

- Плазмиды/ «голая» ДНК
- Вирусные векторы
- Невирусные векторы (*поликатионные комплексы, катионные липидсвязанные комплексы, лигандные комплексы*)
- Генетически-модифицированные соматические клетки



Носители целевой ДНК, используемые в клинических испытаниях

(приведено % соотношение к общему числу испытаний ; Богословская Е.В., и др., 2012)



Риски применения средств для ГТ на основе вирусных векторов

Вероятность образования репликационно-компетентных вирусов

Иммунный ответ

Инсерционный мутагенез и онкогенез

Вертикальный перенос генетической информации



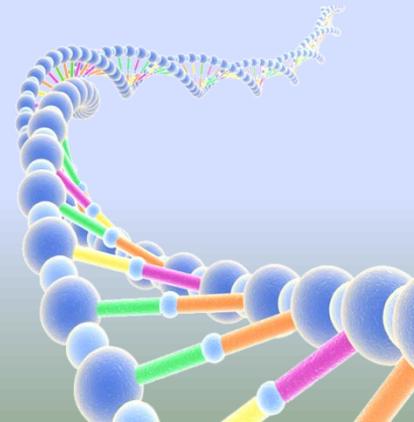
European Medicines Agency
Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use

London, 16 November 2006
Doc. Ref. EMEA/273974/2005

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE
(CHMP)

GUIDELINE ON NON-CLINICAL TESTING FOR INADVERTENT GERMLINE
TRANSMISSION OF GENE TRANSFER VECTORS

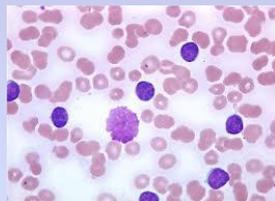
No gene therapy trials may be carried out which result in modifications to the subject's germline genetic identity (Cf. Directive 2001/20/EC)



Методологические аспекты оценки безопасности средств ГТ



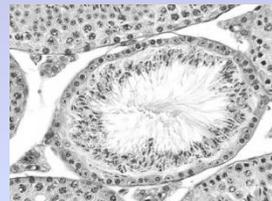
Введение препарата
(дозы, пути введения, сроки?)



**Соматические
клетки**



Ооциты

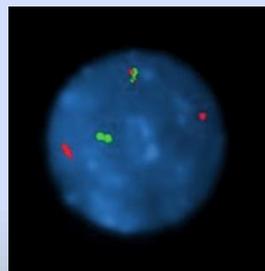


Сперматоциты/спермии

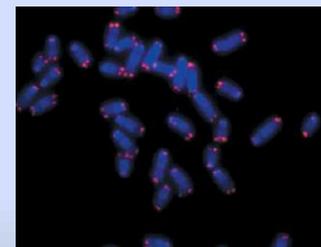
Вертикальный перенос

**Инсерционный мутагенез/
онкогенез**

Экспериментальные модели?
(in vivo, in vitro?)



Внутриклеточная локализация
(PCR, in situ PCR, FISH?)



Интеграция в геномную ДНК
(in situ PCR, FISH, PRINS, LAMP?)

**Из 838 лекарственных средств, выпускаемых на сегодня,
тестирование на мутагенность прошли:**

В соответствии с современными требованиями	24.8%
Не в соответствии с современными требованиями	31.5%
Тестирование не проводилось (нет данных)	43.7%

Brambilla et al., 2009

