

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ЕКСПЕРТНИЙ ЦЕНТР

**Доклінічне вивчення безпеки лікарських засобів біотехнологічного
походження**
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ - 2011

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ЕКСПЕРТНИЙ ЦЕНТР

Схвалено на засіданні
Науково-експертної ради
ДП “Державний експертний
центр” МОЗ України
(протокол № від)

ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ БЕЗПЕКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ – 2011

Укладачі:

Докт. біол. наук, проф. В.М.Коваленко

Акад. НАМН України та чл.-кор. НАН України Г.М.Бутенко

Рецензенти:

Д-р мед. наук, проф. Драннік Г. М.

Д-р біол. наук Кокшарева Н.В.

ЗМІСТ

1.	Вступ	6
1.1.	Обґрунтування	6
1.2.	Сфера застосування	6
2.	Характеристика тест-зразка	7
3.	Доклінічне вивчення безпеки	8
3.1.	Загальні принципи	8
3.2.	Біологічна активність/фармакодинаміка	9
3.3.	Види тварин/вибір моделі	11
3.4.	Кількість та стать тварин	14
3.5.	Введення препарату та визначення дози	15
3.6.	Імуногенність	16
4.	Види досліджень	18
4.1.	Фармакологія безпеки	18
4.2.	Вивчення тривалості дії	19
4.2.1.	Фармакокінетика і токсикокінетика	19
4.2.2.	Проведення дослідження	20
4.2.3.	Метаболізм	21
4.3.	Токсичність за одноразового уведення (гостра токсичність)	21
4.4.	Вивчення токсичності при повторних уведеннях	21
4.5.	Вивчення імунотоксичності	22
4.6.	Дослідження репродуктивної токсичності та токсичності щодо розвитку потомства	23
4.6.1.	Загальні коментарі	23
4.6.2.	Фертильність	25
4.6.3.	Ембріо-фетальний, донатальний та постнатальний розвиток	26
4.7.	Вивчення генотоксичності	28
4.8.	Дослідження канцерогенності	28

4.9.	Вивчення місцевої переносимості	31
	Перелік використаної літератури	32

1. ВСТУП

1.1. Обґрунтування

Ці методичні рекомендації забезпечують основу для розробки та впровадження нових лікарських засобів біотехнологічного походження. Їх призначенням є визначення основних принципів розробки науково обґрунтованої програми доклінічної оцінки безпеки вказаної групи фармакологічних засобів. Основними завданнями таких досліджень є: 1) встановити початкову безпечну дозу та наступне розширення схеми дозування при проведенні клінічних випробувань; 2) визначити потенційні органи-мішені токсичної дії та в разі виявлення токсичності дослідити її зворотність; 3) запропонувати параметри безпеки при проведенні моніторингу клінічних випробувань. Дотримання принципів, наведених в даних рекомендаціях, сприятиме удосконаленню якості та узгодженості доклінічних даних безпеки при впровадженні лікарських засобів біотехнологічного походження.

Ці методичні рекомендації укладені відповідно до вимог регуляторних настанов Міжнародної Конференції по гармонізації технічних вимог при реєстрації лікарських засобів для використання людиною (ICH), а саме: ICH S6: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Note for Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (CHMP/ICH/302/95 adopted November 2009); Addendum to ICH S6: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6 (R1);

1.2. Сфера застосування

В цілому, дані методичні рекомендації визначають базисну структуру доклінічної оцінки безпеки лікарських засобів біотехнологічного походження. Вони застосовуються для препаратів, отриманих з клітин, що мають визначену характеристику завдяки використанню різних систем експресії, включаючи бактерії, дріжджі, комахи, рослини та клітини ссавців. Такі лікарські засоби можуть використовуватись з метою діагностики, лікування або профілактики.

Білки, пептиди, їх похідні є діючими речовинами або входять до складу таких препаратів, і можуть бути отримані від культури клітин або виготовлені з використанням методу генної інженерії, в тому числі продукуванням трансгенними рослинами та тваринами. Як приклади можна навести такі препарати, як цитокіни, активатори плазміногену, рекомбінантні плазматичні фактори, фактори росту, гібридні білки, ферменти, рецептори, гормони та моноклональні антитіла. В принципі, схема даних методичних рекомендацій також може бути застосована до ДНК-рекомбінантних білків вакцин, пептидів, синтезованих хімічним шляхом, препаратів, отриманих з плазми крові, ендогенних білків, екстрагованих з тканин людини та олігонуклеотидних лікарських засобів.

Даний документ не стосується антибіотиків, алергенних екстрактів, гепарину, вітамінів, компонентів клітин крові, традиційних бактеріальних та вірусних вакцин, ДНК-вакцин, препаратів клітинної та генної терапії.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-ЗРАЗКА

Наявність домішок та забруднень може впливати на безпеку препарату. Тому перед затвердженням програми доклінічного вивчення має бути підтверджена придатність тест-зразка з огляду на методи його очистки для видалення забруднень та домішок. В будь-якому разі надаються достатні дані щодо характеристики препарату, які враховуються при підготовці відповідної програми доклінічного вивчення безпеки.

Існує потенційний ризик, пов'язаний із забрудненням продуктами клітин хазяїна: бактерій, дріжджів, комах, рослин та клітин ссавців. Наявність контамінації клітинами хазяїна може призводити до виникнення алергічних реакцій та інших імунопатологічних проявів. Лише теоретично існує небезпека побічної дії, пов'язаної з наявністю домішок нуклеїнових кислот, проте цілком реальним є їх потенційна інтеграція в геном хазяїна. Для препаратів, отриманих

від комах, рослин та ссавців або трансгенних рослин і тварин існує ризик переносу вірусних інфекцій.

Як правило, препарат, що використовується у фармакологічних та токсикологічних дослідженнях, має бути аналогічним препарату, що пропонується для клінічних випробувань. Разом з тим допускається, що в ході програми розробки можуть мати місце зміни процесу виробництва для покращення якості та виходу препарату. Для забезпечення адекватної екстраполяції на людину даних, отриманих для тварин, необхідно розглядати потенційний вплив таких змін на результати.

Порівняння досліджуваного препарату в ході програми розробки має враховувати, на якій стадії в ході зазначеної програми розробки відбулось оновлення чи зміна процесу виробництва, або зроблені суттєві зміни препарату чи його складу. Порівняння може оцінюватись на основі біохімічних та біологічних властивостей (напр., ідентичності, чистоти, стабільності, активності). В деяких випадках може виникнути необхідність додаткових досліджень (напр. фармакокінетики, фармакодинаміки та/або безпеки), доцільність яких має бути науково обґрунтованою.

3. ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ БЕЗПЕКИ

3.1. Загальні принципи

Предметом доклінічного вивчення безпеки є визначення фармакологічної та токсикологічної дії перед початком клінічних випробувань. Вивченню зазначених властивостей можуть сприяти дослідження як *in vitro*, так і *in vivo*. Для лікарських засобів біологічного походження, які за структурою та фармакологічними властивостями можна прирівняти до препаратів, стосовно яких є великий досвід використання в клінічній практиці, токсикологічні дослідження можуть проводитись не в повному обсязі.

При проведенні доклінічного вивчення безпеки необхідно враховувати наступне: 1) вибір придатного для досліджень виду тварин; 2) вік; 3) фізіологічний стан; 4) спосіб уведення тест-зразка, включаючи дозу, шлях уведення та режим застосування, 5) стабільність тест-зразка в умовах використання.

Передбачається, що токсикологічні дослідження виконуються у відповідності до принципів Належної лабораторної практики; але в деяких випадках, коли використовується тест-система, специфічна для лікарських засобів біологічного походження, випробування можуть не повністю відповідати вимогам Належної лабораторної практики. Обсяг таких досліджень має бути означений та їх значимість оцінена відповідно до загальної оцінки безпечності. Якщо дані досліджень не використовуються для забезпечення клінічних випробувань та реєстрації лікарського засобу, повна відповідність вимогам Належної лабораторної практики не є обов'язковою.

З огляду на унікальність та різноманітність структури препаратів біологічного походження, їх біологічні властивості, зумовлені видовою специфічністю, імуногенністю та неочікуваною плейотропією, загальноприйняті підходи щодо вивчення токсичності таких лікарських засобів можуть бути непридатними.

3.2. Біологічна активність/фармакодинаміка

Біологічна активність препарату стосовно його клінічної ефективності може визначатись в дослідях *in vitro*. З метою перевірки наявності прямої дії щодо фенотипу або проліферації клітин можуть використовуватись лінії клітин та/або первинна культура клітин. Враховуючи видову специфічність багатьох лікарських засобів біотехнологічного походження для вивчення токсичності важливо обирати придатні для цього види тварин. Для прогнозування специфічних аспектів активності в дослідях *in vitro*, а також з метою кількісної

оцінки порівняльної чутливості лікарського засобу біологічного походження для різних видів тварин (включаючи людину) можуть бути використані лінії клітин *in vitro*, що походять від клітин ссавців. Такі дослідження використовуються для визначення, напр., ступеня рецепторного зв'язування, рецепторної спорідненості та/або фармакологічної дії, а також вибору відповідного виду тварин для подальших фармакологічних та токсикологічних досліджень *in vivo*. Сумісні результати досліджень *in vitro* та *in vivo* сприяють екстраполяції висновків щодо людини. Дослідження *in vivo* для оцінки фармакологічної активності, включаючи визначення механізму(ів) дії, часто допомагають сформулювати раціональні рекомендації щодо використання препарату при проведенні клінічних випробувань.

Для моноклональних антитіл в деталях описуються імунологічні властивості антитіл, включаючи їх антигенну специфічність, зв'язування з комплементом та будь-які неочікувані прояви реактивності та/або цитотоксичності по відношенню до тканин людини, відмінні від очікуваної дії на мішені. Такі дослідження перехресної реактивності виконуються із застосуванням відповідних імуногістохімічних методів з використанням ряду тканин людини.

Існують методи оцінки наявності очікуваної мішені (напр. гібридизація *in situ*, проточна цитометрія), здатні забезпечити інформаційну підтримку при виборі видів тварин. Разом з тим, дані перехресної тканинної реактивності з тканинами людини можуть сприяти отриманню корисної додаткової інформації про розподіл мішеней, а також неочікуваного зв'язування з антигенною детермінантою. З огляду на обмежену важливість даних доклінічного вивчення перехресної тканної реактивності з використанням тварин, проведення таких досліджень, як правило, не рекомендується. Зв'язування з ділянками, що в більшості випадків є недоступними для лікарських засобів біологічного походження *in vivo*, тобто в цитоплазмі, може бути не суттєвим. Для

двоспецифічних антитіл не вимагається окрема оцінка кожного місця зв'язування.

3.3. Види тварин/вибір моделі

Програма оцінки безпеки, як правило, включає використання двох видів тварин (один гризуни та один негризуни). Обидва зазначені види тварин використовуються в короткотермінових (тривалістю до одного місяця) токсикологічних дослідженнях. В разі, якщо в цих токсикологічних дослідженнях отримані дані, згідно яких профіль токсичності для обох видів є подібним, при проведенні довготермінових досліджень зазвичай достатнім є використанням одного виду. Слід також розглянути доцільність використання одного виду гризунів, за виключенням випадків, коли обґрунтовано використання лише негризунів.

Крім того, за наявності відповідного обґрунтування в деяких випадках достатньо одного виду тварин (напр., якщо біологічна активність препарату біологічного походження добре вивчена або він проявляє фармакологічну активність лише у тварин одного виду). Також не рекомендується додаткове вивчення ризику гомологічних препаратів на тваринах другого виду.

За умови зростання потенціалу токсичності нових токсинів або токсичних комбінацій, таких, як ліки-антитіла/кон'югати токсинів, що, очевидно, відбувається незалежно від мішені, має оцінюватись на двох видах тварин(один гризуни та другий негризуни). При цьому бажано використовувати види тварин, для яких показано наявність специфічного зв'язування з мішенню. Для токсинів або отруйних речовин, які не є новими та для яких існує достатня кількість доступних наукових даних, допускається дослідження безпечності кон'югатів антитіл з ліками з використанням одного релевантного виду тварин.

Біологічна активність, а також видова та тканинна специфічність для багатьох лікарських засобів біотехнологічного походження часто не дозволяє

застосування стандартного протоколу вивчення токсичності з використанням загальноприйнятих видів тварин (напр. щури та собаки). Програма оцінки безпеки таких препаратів повинна враховувати необхідність використання придатних для цих досліджень видів тварин.

Для вибору придатного для доклінічного вивчення виду тварин можуть бути використані різні методичні підходи (напр. імунохімічний або функціональний тести). Відомості про розподіл рецепторів/епітопів також можуть сприяти кращому прогнозуванню потенційної токсичності *in vivo*. При виборі тест-системи необхідно враховувати ряд факторів: порівнюваність гомології послідовності мішеней різних видів, дослідження на клітинах кількісних та якісних перехресних порівнянь відповідної спорідненості взаємодії з мішенню і насичення рецептора/ліганда та кінетики процесу. Модуляція відомих біологічних відгуків або фармакодинамічних маркерів також може обумовлювати наявність функціональної активності для підтвердження правильності обраного виду тварин. Розгляд міжвидових відмінностей щодо зв'язування з мішенню та функціональної активності в контексті очікуваного режиму дозування має забезпечити впевненість того, що модель здатна виявити всі потенційні побічні наслідки модуляції мішені. Якщо мішень недостатньо виражена для типових видів, що використовуються в доклінічних дослідженнях, критерієм вибору виду тварин може бути подібність зв'язування та активності в клітинних системах.

Для дослідження моноклональних антитіл придатними є види тварин, у яких відбувається експресія заданої антигенної детермінанти та показано подібність профілю перехресної реактивності тканин тварини та людини. Це дозволяє оптимізувати визначення токсичності за результатами зв'язування з антигенною детермінантою та наявністю неочікуваної перехресної реактивності тканин. Певною мірою придатними для оцінки токсичності можуть бути види тварин, у яких не відбувається експресія заданої антигенної детермінанти, за

умови доведення наявності порівнянної неочікуваної перехресної реактивності тканин людини.

Для моноклональних антитіл та споріднених з ними препаратів, спрямованих на зовнішні мішені (напр., бактерії, віруси тощо), бажано визначити безпечність на моделях захворювань у тварин. Якщо це здійснити нереально, за наявності обґрунтування можуть бути проведені адаптовані до клінічних випробувань короткотермінові дослідження безпеки на одному виді тварин (вибір виду має бути обґрунтований спонсором) за відповідної стратегії зменшення ризику.

Визначення токсичності на нерелевантному виді тварин може призводити до невірного висновку і має бути відкинуто. В разі, якщо релевантний вид тварин не може бути визначений у зв'язку з тим, що лікарський засіб біологічного походження не взаємодіє з ортологічними мішенями будь-якого виду тварин, розглядається доцільність використання гомологічних молекул (білків), трансгенних тварин, у яких відбувається експресія рецептора людини або моделей захворювань у тварин.

Дані, отримані завдяки використанню трансгенних тварин з моделюванням експресії рецептора людини, забезпечують отримання оптимальних результатів, якщо взаємодія препарату з таким рецептором має фізіологічні наслідки, аналогічні тим, що представлені у людини. Незважаючи на те, що корисна інформація може також бути отримана завдяки використанню гомологічних білків, слід відмітити, що процес виробництва, вміст домішок та контамінантів, фармакокінетика та точний фармакологічний механізм(и) дії можуть відрізнятися між гомологічними формами та препаратом, призначеним для клінічного використання. Якщо використання трансгенних тваринних моделей або гомологічних білків є неможливим, можна задовольнитись оцінкою деяких аспектів потенційної токсичності за обмеженими токсикологічними дослідженнями на одному виді тварин, напр., вивчення токсичності при

повторних уведеннях протягом ≤ 14 днів, які включають аналіз важливих функціональних кінцевих точок (напр., серцево-судина та дихальна системи).

За останні роки здійснено значний прогрес у розробці моделей тварин, які мають захворювання, подібні до таких, що спостерігаються у людини. Такі моделі тварин включають індуковані та спонтанні моделі патологій, виключення (knock-out) гену(ів) та трансгенні тварини. Ці моделі здатні сприяти подальшому поглибленню розуміння не лише щодо фармакологічної дії препарату, фармакокінетики та дозиметрії, але можуть бути корисними і при визначенні безпеки (напр., оцінці неочікуваного стимулювання прогресування захворювання). У деяких випадках при визначенні кінцевих точок токсичності, виборі клінічних показань, визначенні відповідного складу, шляху введення та режиму лікування може бути корисним моделювання захворювань у тварин як адекватна альтернатива дослідженням токсичності у нормальних тварин.

Слід зазначити, що такі моделі захворювань часто вимагають історичних даних як вихідної точки при оцінці результатів дослідження. Тому сукупність супутніх контролів та вихідних даних є обов'язковими для оптимізації плану (протоколу) дослідження. Використання моделювання захворювань у тварин з метою вивчення безпеки лікарського засобу має бути науково обґрунтованим.

3.4. Кількість та стать тварин

Кількість тварин на кожну дозу визначається в залежності від можливості встановлення токсичності. Малий обсяг вибірки може призвести до помилок у виявленні токсичності в результаті реєстрації часто поодиноких проявів, незважаючи на сильну інтоксикацію. Обмеження, зумовлені обсягом вибірки, що часто спостерігається у випадку досліджень на нелюдиноподібних приматах, може бути частково компенсоване збільшенням частоти та тривалості спостереження. Як правило, використовуються тварини обох статей; за

наявності відповідного обґрунтування можуть використовуватись тварини однієї відповідної статі.

3.5. Введення препарату та визначення дози

Шлях та частота введення препарату залежать від запропонованого використання його в клініці. Токсичність більшості фармакологічних засобів біологічного походження залежить від механізму їх дії на мішень. Тому відносно високі дози викликають побічну дію, що розглядається як надмірне збільшення фармакологічної дії.

Необхідно враховувати фармакокінетику та біодоступність для виду тварин, що використовуються в дослідженні, а також об'єм препарату, що вводиться, з огляду на безпечність та гуманність при введенні дослідним тваринам. При виборі високої дози необхідно дотримуватись раціональних підходів, що врахують дані фармакокінетики та фармакодинаміки. Вони сприятимуть визначенню діапазону доз шляхом встановлення: а) дози, що забезпечує максимальний очікуваний фармакологічний ефект в доклінічних дослідженнях; б) дози, яка в 10 разів більша за ту, що проявляє максимальну ефективність в клініці. Найвища з цих двох доз має бути використана як вища доза для групи тварин при проведенні доклінічних досліджень, за винятком, якщо, згідно наукових даних, ця доза має бути нижчою. За відсутності кінцевих точок фармакодинаміки достатньою є доза, яка в 10 разів перевищує найвищу очікувану дозу для клініки за умови корекції відмінностей зв'язування з мішенню та фармакологічної активності *in vitro* для неклінічних тест-систем та людини. Напр., відносно великі відмінності афінитету зв'язування та/або потенціалу *in vitro* можуть свідчити про необхідність збільшення дози при проведенні доклінічних досліджень. У випадку, коли токсичність не може бути продемонстрована згідно зазначених підходів, проведення додаткових

досліджень токсичності при збільшенні кратності дозування є неперспективним щодо отримання додаткової корисної інформації.

Використання шляху введення відмінного від того, що планується для клініки, може бути прийнятним, якщо цей шлях змінений в результаті низької біодоступності, обмежень ділянки введення або розміру/фізіології виду тварин. Вибір рівнів доз повинен забезпечити отримання даних щодо дозозалежних взаємозв'язків, включаючи токсичну дозу та дозу, при якій не спостерігається шкідлива дія. Для деяких класів препаратів, що є нетоксичними або мають низьку токсичність, неможливо визначити конкретну максимальну дозу. В цих випадках науково обґрунтовується логічне пояснення вибору доз з урахуванням повторних уведень людині. Пояснення вибору високої дози повинні бути надані з урахуванням фармакологічної/фізіологічної дії, можливості використання відповідного тест-зразка та визначеного клінічного використання. Якщо препарат має нижчий рівень спорідненості або дії щодо клітин обраного виду тварин у порівнянні з клітинами людини, важливо випробувати вищі дози.

Тривалість повторних уведень, необхідних для визначення адекватної межі безпеки, може мінятись в залежності від конкретного лікарського засобу біотехнологічного походження та клінічних показань. Наприклад, з метою компенсувати прискорену швидкість кліренсу або низьку розчинність активної складової частота введення лабораторним тваринам може бути більшою у порівнянні з запропонованим режимом для клінічних випробувань. В таких випадках визначається рівень можливого впливу на дослідних тварин відносно дії в клініці. Необхідно також враховувати вплив об'єму, концентрації, складу препарату та ділянки введення.

3.6. Імуногенність

Значна кількість лікарських засобів біотехнологічного походження проявляють імуногенні властивості у тварин. Тому, з метою сприяння більш

досконалої інтерпретації результатів вивчення токсичності за повторного введення препаратів біотехнологічного походження та планування подальших досліджень проводиться контроль імуногенності за ступенем утворення антитіл до тест-зразка за такими показниками як, наприклад, титр антитіл, кількість тварин, у яких відмічено відповідну реакцію, нейтралізуючі або ненейтралізуючі антитіла. Якщо встановлено, що тест-зразок призводить до утворення антитіл, необхідно оцінити вплив цих процесів на результати досліджень, включаючи дані фармакокінетики, фармакологічної та токсикологічної дії. Зокрема, при інтерпретації цих даних слід враховувати вплив утворення антитіл на фармакокінетичні або фармакодинамічні параметри, ступінь та/або серйозність побічної дії, активацію комплементу або виникнення непередбачених нових токсичних ефектів. Також необхідно звернути увагу на оцінку можливих патологічних змін внаслідок утворення та відкладення імунних комплексів.

Визначення параметрів, особливо потенціалу нейтралізації, як правило, не є обов'язковим, особливо в разі, якщо відповідна дія і фармакологічний ефект можуть бути доведені завдяки фармакодинамічним маркерам активності в токсикологічних дослідженнях *in vivo*. У випадку встановлення здатності нейтралізуючих антитіл певним чином впливати на інтерпретацію результатів досліджень, визначення нейтралізуючої активності може бути проведене непрямим методом аналізу біологічної активності *ex-vivo*, комбінуванням методів у форматі вивчення фармакокінетики та фармакодинаміки або прямим специфічним методом нейтралізації антитіл.

Визначення антитіл не повинно бути єдиним критерієм для дочасного завершення доклінічного вивчення безпеки або зміни тривалості дослідження за виключенням випадків, коли імунна відповідь призводить до нейтралізації фармакологічної дії та/або токсичного ефекту біологічного фармакологічного засобу у відносно великій кількості тварин. У більшості

випадків імунна відповідь на лікарський засіб біологічного походження у тварин варіює так само, як це спостерігається й у людей.

Індукція утворення антитіл у тварин не є важливим показником в сенсі прогнозування потенціалу імуногенності для людини. У людини за наявності антитіл в сироватці крові до гуманізованих білків їх терапевтична відповідь часто зберігається. Випадки важких анафілактичних реакцій на рекомбінантні білки у людей виникають рідко. Тому результати анафілактичного тесту у мурчаків, які для білкових препаратів, найчастіше позитивні, не є прогностичними для таких реакцій у людей; отже, ці дослідження слід розглядати як неважливі для узагальненої оцінки препаратів даного типу.

Якщо існує вірогідність стабільної фармакодинамічної активності, відсутні неочікувані зміни фармакокінетики та токсикокінетики тест-зразка в ході введення препарату або протягом відновного періоду, а також за відсутності реакцій, зумовлених імунітетом (пов'язаних з імунними комплексами, васкулітом, анафілаксією та ін.), тобто при інтерпретації даних вивчення безпеки у тварин не виникає ризик проблем безпеки застосування лікарського засобу у людини, специфічна значимість антитілоутворення не розглядається і визначення антитіл до препарату в доклінічних дослідженнях не є обов'язковим. Крім антитілоутворення існують і інші типи імунних реакцій.

4. ВИДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Фармакологія безпеки

Метою вивчення фармакології безпеки є виявлення функціонального впливу препарату на основні фізіологічні системи (напр. серцево-судинну, дихальну, ниркову, центральну нервову). З використанням відповідних моделей тварин важливо встановити можливість виникнення неочікуваної фармакологічної дії, а за необхідності, здійснити детальний моніторинг таких ефектів при проведенні токсикологічних досліджень. Дослідження можуть

також включати використання ізольованих органів або інших тест-систем без залучення інтактних тварин. Вивчення фармакології безпеки передбачає визначення функціональних показників потенційної токсичності, які можуть досліджуватись при проведенні окремих досліджень або входити до протоколу токсикологічного вивчення. Всі ці дослідження сприяють встановленню механізмів специфічної органної токсичності досліджуваного препарату, які мають бути враховані з огляду на використання препарату людиною або показань до застосування.

4.2 Вивчення тривалості дії

4.2.1. Фармакокінетика і токсикокінетика

Складно створити уніфіковану настанову з фармакокінетичних досліджень для біотехнологічних лікарських засобів. Вивчення фармакокінетики і токсикокінетики при одноразовому та повторних уведеннях, розподіл по тканинам проводиться з використанням відповідних видів тварин. При цьому загальноприйняті дослідження, спрямовані на оцінку балансу мас, не застосовуються. Відмінності у фармакокінетиці для різних видів тварин можуть визначати суттєвий вплив на прогнозування подальших експериментів на тваринах та оцінку дозозалежності в токсикологічних дослідженнях. Зміни фармакокінетичного профілю відносно кліренсу, зумовлені імунними механізмами, здатні впливати на кінетичний профіль та інтерпретацію даних токсичності. Для деяких препаратів може бути властивим суттєве відтермінування експресії фармакодинамічної дії відносно фармакокінетичного профілю (напр. цитокінів) або мати місце пролонгація прояву фармакодинамічних ефектів відносно рівня вмісту в плазмі.

У фармакокінетичних дослідженнях, бажано використовувати препарати, призначені для токсикологічного вивчення та клінічних випробувань і важливо використовувати шлях уведення, очікуваний для клінічних випробувань. На

абсорбцію тест-зразка може впливати лікарська форма, концентрація, шлях уведення, об'єм. В ході токсикологічних досліджень проводиться моніторинг системної дії препарату.

Якщо використовуються радіоактивно мічені білки, важливо показати, що мічений досліджуваний матеріал зберігає свою активність та біологічні властивості на тому ж рівні, що й немічений матеріал. Внаслідок швидкого метаболізму *in vivo* або нестабільності зв'язку з радіоактивною міткою дані концентрації радіоактивності в тканинах та/або авторадіографії при використанні радіоактивно мічених білків можуть бути складними для інтерпретації. Слід бути обережними щодо тлумачення досліджень з використанням радіоактивних міток, включених в специфічні амінокислоти із-за рециркуляції амінокислот в білки/пептиди, що не є ліками.

Для прогнозування запасу безпеки, що базується на даних часу експозиції та дози перед початком клінічних випробувань, в дослідженнях з використанням відповідних моделей на тваринах мають бути отримані дані стосовно абсорбції, розподілу та виведення.

4.2.2. Проведення дослідження

Використання одного або більше методів дослідження визначається в кожному конкретному випадку окремо на основі наукового обґрунтування. Як правило, вважається достатньо обґрунтованим використання затвердженого методу. Наприклад, кількісний аналіз радіоактивності осаду трихлороцтовою кислотою після введення радіоактивно міченого білка дозволяє отримати відповідну інформацію, але перевага надається спеціальному аналізу досліджуваної речовини. Бажано, щоб методи, які використовуються в дослідгах на тваринах та у випробуваннях на людях, були однаковими. Необхідно визначати можливий вплив зв'язування білків плазми та/або антитіл в плазмі або сироватці крові на результати випробувань.

4.2.3. *Метаболізм*

Очікуваним наслідком метаболізму лікарських засобів біотехнологічного походження є розпад на малі пептиди та окремі амінокислоти. Тому метаболічний шлях, в цілому, зрозумілий. Вивчення біотрансформації лікарських засобів в класичному розумінні не вимагається.

Для розуміння фармакодинамічної дії важливою є інформація щодо поведінки ліків біологічного походження в біологічному середовищі (напр. плазмі, сироватці крові, спинномозковій рідині) та можливого впливу зв'язування з білками.

4.3. Токсичність за одноразового введення (гостра токсичність)

Вивчення токсичності за одноразового введення дає можливість отримати інформацію щодо взаємозв'язку між дозою та системною та/або локальною токсичністю. Такі дані можуть бути використані при визначенні доз при проведенні досліджень токсичності при повторних уведеннях. Інформація про взаємозалежність між дозою та ефектом може бути отримана в результаті проведення досліджень токсичності при одноразовому введенні як складова вивчення фармакології або досліджень ефективності з використанням моделей на тваринах. Доцільно розглянути включення до протоколу таких досліджень визначення параметрів фармакології безпеки.

4.4. Вивчення токсичності при повторних уведеннях

Підходи до вибору виду тварин для проведення досліджень токсичності за повторного введення препаратів біологічного/біотехнологічного походження наведені в підрозділі 3.3. Шлях та режим уведення мають відповідати очікуваним при клінічному застосуванні. За можливості, дослідження мають включати вивчення токсикокінетики.

У протоколі досліджень доцільно передбачити використання групи тварин для вивчення періоду відновлення (період спостережень без уведення

препарату) для визначення зворотності або можливого погіршення фармакологічної або токсикологічної дії та/або потенційного затримання токсичного впливу.

Для лікарських засобів біологічного походження пролонгованої фармакологічної або токсикологічної дії моніторинг тварин, що входять до групи відновлення, здійснюється поки не буде показано повернення до початкового стану. Проте очікування повного відновлення не вимагається. Якщо побічна дія відсутня, або науково підтверджено, що побічні ефекти є зворотними, або діапазон безпеки для запропонованої популяції при проведенні клінічних випробувань є достатнім, оцінка зворотності ефектів не проводиться. При оцінці імуногенності додаткові дослідження періоду відновлення не проводяться.

Тривалість досліджень токсичності при повторних уведеннях має ґрунтуватись на очікуваній тривалості введення в клініці та симптомах хвороби. Для більшості лікарських засобів біотехнологічного походження тривалість експозиції для тварин, як правило, складає 1 – 3 місяці. Для препаратів, що застосовуються протягом короткого періоду часу (напр., до 7 днів), а також для лікування гострих небезпечних для життя захворювань вивчення токсичності за повторних уведень здійснюється протягом періоду, що не перевищує двох тижнів. Для лікарських засобів, призначених для тривалого застосування, дослідження проводяться, як правило, протягом 6 місяців. Але в деяких випадках тривалість їх може більшою або меншою, проте достатньою для отримання дозволу на впровадження. Тривалість вивчення токсичності для таких препаратів має бути науково обґрунтованою.

4.5. Вивчення імунотоксичності

Однією з сторін імунотоксикологічних досліджень є оцінка потенційної імуногенності (див. підрозділ 3.6). Численні фармакологічні засоби

біотехнологічного походження здатні стимулювати або пригнічувати імунну систему, і, таким чином, впливати не лише на гуморальний, але й на клітинний імунітет. На стимуляцію імуногенності може вказувати реакція запалення на місці введення. Проте слід враховувати, що проста травма, зумовлена ін'єкцією препарату, та/або певна токсична дія розчинника (носія) лікарського засобу також може призводити до токсичних змін в місці введення. До того ж експресія поверхневого антигену на клітинах-мішенях здатна змінюватись під впливом препарату, що може призводити до аутоімунних ефектів.

Стратегія випробувань з імунотоксичності може включати необхідність проведення скринінгових досліджень поряд з вивченням механізмів для пояснення таких даних. Проте, для препаратів біотехнологічного походження не рекомендується використовувати рутинні випробування або стандартні комплекси методів.

4.6. Дослідження репродуктивної токсичності та токсичності щодо розвитку потомства

4.6.1. Загальні коментарі

Необхідність вивчення репродуктивної токсичності та токсичного впливу на розвиток потомства залежить від конкретного препарату, клінічних показань до застосування та очікуваної популяції пацієнтів. Для окремих класів речовин (напр., інтерферонів), де придатними видами є нелюдиноподібні примати, може бути достатньою наявність загальнодоступної інформації щодо потенціалу їх дії на репродуктивну функцію та/або розвиток потомства. В таких випадках вивчення механізму дії, що вказує на вірогідність подібності ефектів нової, але спорідненої молекули, дозволяє не проводити рутинне вивчення репродуктивної токсичності та токсичності розвитку потомства. Але при цьому має бути надане наукове обґрунтування оцінки потенціалу репродуктивної токсичності.

Вивчення репродуктивної токсичності препаратів біотехнологічного походження проводиться у відповідності до загальних вимог, що висуваються до досліджень гонадотоксичності лікарських засобів, але в залежності від видової специфічності, походження препарату, механізму дії, імуногенності, та/або характеру фармакокінетики і ембріо-фетальної дії індивідуальний дизайн дослідження та режим дозування можуть бути змінені. Наприклад, настороженість відносно потенціалу імунотоксичності щодо розвитку потомства, що особливо стосується різних моноклональних антитіл з пролонгованою імунологічною дією, може обумовлювати необхідність корегування протоколу досліджень з метою оцінки імунної функції у новонароджених. В кожному конкретному випадку вивчення потенціалу можливого впливу на репродукцію/розвиток проводиться за умови наукового обґрунтування.

Дослідження репродуктивної токсичності має проводитись лише на придатних щодо фармакологічної дії видах тварин. Якщо потенційний лікарський засіб проявляє фармакологічну активність у гризунів та кролів, мають використовуватись ці види тварин, за виключенням випадків, коли науково обґрунтованим є використання нелюдиноподібних приматів. Для визначення впливу на ембріо-фетальний розвиток може бути достатнім використання одного виду тварин. Спонсор має забезпечити надання наукового обґрунтування вибору видів тварин для оцінки впливу на ембріо-фетальний розвиток. Якщо досліджуваний препарат проявляє фармакологічну активність лише у нелюдиноподібних приматів, як правило, перевага надається відповідній оцінці репродуктивної токсичності з використанням нелюдиноподібних приматів у порівнянні з альтернативними методами такими, як вивчення гомологічних препаратів на інших видах тварин. Разом з тим, спонсор має надати наукове обґрунтування щодо запропонованого альтернативного методу. Якщо існують достатні підтвердження (напр., за механізмом дії, даними

фенотипу, отриманими від “knockout” мишей, ефектами сполук даного класу) наявності побічного впливу на вагітність, такі дані можуть слугувати достовірною інформацією про наявний ризик, і, отже, додаткові доклінічні дослідження можуть не проводитись. За відсутності виду тварин, придатних для дослідження даного конкретного препарату, слід розглянути доцільність використання трансгенних мишей, які забезпечують експресію людської мішені, або гомологічних білків у видів тварин, у яких відбувається експресія ортологів людини.

4.6.2. Фертильність

Якщо для оцінки впливу препаратів на фертильність придатними є гризуни, дослідження проводяться на тваринах цього виду. Дизайн дослідження може змінюватись напр., в залежності від походження препарату та потенціалу імуногенності. Якщо єдиним релевантним видом тварин є нелюдиноподібні мавпи, можливий вплив на фертильність самців та самок може бути визначений за даними стандартних гістопатологічних досліджень та оцінкою циклічності менструацій при вивченні токсичності за повторних введень принаймні протягом 3-х місяців з використанням статевозрілих нелюдиноподібних мавп. Якщо ж існують особливі причини для занепокоєння, при вивченні токсичності препарату при повторних введеннях проводяться спеціальні дослідження, такі, як кількість, рухливість, морфологія сперматозоїдів, об'єм сім'яників, рівень статевих гормонів у самців та самиць. Слід враховувати, що вивчення спарювання для нелюдиноподібних мавп не практикується. Якщо з огляду на фармакологічну активність існують певні передумови щодо можливого впливу на запліднення або імплантацію, а нелюдиноподібні примати є єдиним релевантним видом, проблема має бути вирішена експериментальним шляхом. Якщо існує особливе занепоєння, єдиним реальним способом оцінки потенційної дії на запліднення та імплантацію може бути використання гомологічних препаратів або трансгенних моделей. Однак, недоцільно

виготовляти гомологічні продукти або створювати трансгенні моделі для вивчення лише спарювання у гризунів.

4.6.3. Ембріо-фетальний, донатальний та постнатальний розвиток

При визначенні виду тварин, придатного для дослідження ембріо-фетального, до-/ післянатального розвитку необхідно враховувати тип молекули та потенціал відмінностей щодо трансплацентарного проходження. Білки, що мають велику молекулярну масу (понад 5 000 D) не проходять через плаценту шляхом простої дифузії. Для моноклональних антитіл з великою молекулярною масою (150 000 D) існує специфічний механізм транспорту, Fc-рецептор, який визначає вплив на плід та варіює в залежності від виду тварин. IgG не проходить через плаценту нелюдиноподібних мавп та людини раніше, ніж у другому триместрі, і трансплацентарне надходження зростає до вищих рівнів в третьому триместрі. Таким чином, у нелюдиноподібних мавп та людини IgG проходить через плаценту лише після органогенезу. Отже, стандартні ембріо-фетальні дослідження IgG на нелюдиноподібних мавпах, починаючи з раннього періоду вагітності і до 50-го дня вагітності, не є репрезентативними щодо дії на плід людини протягом усього періоду вагітності при парентеральному введенні IgG і може вказувати лише на непрямую дію щодо ембріо-фетального розвитку. IgG проходить через жовтковий міхур зародку у гризунів та кролів завдяки транспортному механізму, в якому задіяний Fc-рецептор, і його дія відбувається протягом пізнього періоду органогенезу. До того ж, якщо препарат уводиться в період лактації, IgG через молоко впливає на потомство самок щурів та мишей.

Для препаратів, що проявляють фармакологічну активність лише у нелюдиноподібних мавп, розглядається можливість проведення чітко спланованого дослідження на нелюдиноподібних мавпах, яке включає уведення препарату протягом 20 днів вагітності до народження. При цьому кесаревий розтин не проводиться, а здійснюється оцінка результату вагітності за

природних родів. Кінцеві точки включають дані стосовно самок (виживання, результати клінічних спостережень, маса тіла, термін вагітності), вагітності (кількість самок, що завагітніли на початок дослідження, стан вагітності в кінці періоду органогенезу, тобто на 50-й день вагітності, та щонайменше на 100-й день вагітності, викиди, терміни випадків викидів), результати вагітності (кількість живих/неживих плодів, маса тіла плодів, кількість новонароджених, що вижили на 7-й день постнатального періоду, та маса їх тіла, якісна зовнішня морфологічна оцінка щодо відповідності межам норми).

В цих дослідженнях також встановлюється життєздатність потомства та виживання, наявність зовнішніх порушень розвитку, вплив на скелет (напр., шляхом рентгенографії) та в решті решт, морфології внутрішніх органів при проведенні розтину. Ультразвук використовується для контролю наявності вагітності, але не з метою моніторингу ембріо-фетального розвитку або встановлення порушень. Іншими кінцевими точками можуть виступати наявність фармакологічної активності (напр., функція імунної системи або оцінка поведінкових реакцій). Тривалість постнатальної фази залежить від додаткових кінцевих точок, які визначаються фармакологічними властивостями.

Також можливе надання спонсором наукового обґрунтування використання альтернативного дизайну дослідження або гомологічних препаратів у гризунів для оцінки впливу на ембріо-фетальний та постнатальний розвиток. Прикладом такого наукового обґрунтування можуть бути моноклональні антитіла, які зв'язуються з розчинним компонентом мішені, а режим дозування в клініці моделюється насиченням зв'язування з мішенню. Якщо таке насичення зв'язування з мішенню може бути показане на обраних видах тварин і воно сягає 10-кратного перевищення терапевтичного рівня лікарського засобу, одна дозова та контрольна групи здатні забезпечити адекватну вірогідність ризику щодо ембріо-фетального розвитку.

4.7. Вивчення генотоксичності

Вивчення генотоксичності, що зазвичай проводиться для фармакологічних засобів, не застосовується для препаратів біотехнологічного походження, тому немає необхідності в таких дослідженнях. Більше того, введення великої кількості пептидів/білків може призвести до отримання даних, які неможливо пояснити. Не слід чекати, що такі речовини будуть взаємодіяти з ДНК або іншим хромосомним матеріалом. Стосовно деяких фармакологічних засобів біологічного походження все ж існує потенційна небезпека накопичення спонтанно мутованих клітин (напр., через сприяння селективній перевазі процесів проліферації), що призводить до канцерогенезу. Стандартний комплекс методів з генотоксичності, в даному випадку, не є придатним. Для вирішення таких питань мають бути розроблені та оцінені альтернативні методи *in vitro* або моделі *in vivo*. Дослідження з використанням відповідних та релевантних систем, включаючи системи новонароджених, що розвиваються, мають проводитись в тих випадках, коли існують причини для занепокоєння щодо препарату (напр., якщо він має органічну молекулу, зв'язану з білком). Не властиво використовувати стандартні генотоксичні дослідження для оцінки потенціалу генотоксичності забруднень в процесі виробництва. Якщо ж такі дослідження пропонуються, необхідно надати логічне обґрунтування доцільності таких дослідів.

4.8. Дослідження канцерогенності

Стандартні дослідження канцерогенної дії, як правило, не придатні для фармакологічних засобів біотехнологічного походження. Разом з тим, в залежності від тривалості клінічного застосування, популяції пацієнтів та/або біологічної активності препарату (напр., фактори росту, агенти імуносупресивної дії тощо) може виникати необхідність специфічної оцінки потенціалу канцерогенності для окремого препарату. В разі обґрунтування

необхідності проведення досліджень потенціалу канцерогенної дії спонсор має визначити стратегічний план досліджень для досягнення поставленої мети. Стратегія має базуватись на огляді даних різних джерел, до яких входять опубліковані дані (напр., інформація стосовно трансгенних, “knock-out” тварин, моделей захворювань на тваринах, генетичних захворювань людини), інформація про властивості речовин даного класу, детальні дані про біологічну мішень, дані *in vitro*, результати вивчення хронічної токсичності. Специфічна оцінка канцерогенного потенціалу препарату використовується для отримання даних про ризик та забезпечення відповідної інформації про безпеку та необхідність обережного поводження шляхом пропозицій щодо маркування, клінічного моніторингу, постмаркетингового нагляду або комплексу цих заходів. В деяких випадках доступна інформація може бути достатньою для обґрунтування ризику канцерогенного потенціалу без підтвердження даними доклінічних досліджень. Наприклад, це стосується імуномодуляторів та факторів росту, які несуть в собі потенційний ризик щодо канцерогенності, яку краще оцінити в ході постмаркетингового нагляду, ніж в доклінічних дослідженнях. Спосіб дії деяких лікарських засобів біологічного походження може підвищувати занепокоєння з огляду на потенціал неопластичної індукції або стимуляції новоутворень. Якщо існують дані *in vitro* або дослідження з хронічної токсичності, що підтверджують наявність ризику щодо канцерогенного потенціалу, дослідження на гризунах не є обов’язковими. Якщо досліди *in vitro* та дослідження хронічної токсичності не підтверджують наявність такого теоретичного ризику, але спонсор не бажає вносити відповідну вказівку, він може запропонувати додаткові дослідження для зменшення занепокоєння. За недостатності даних стосовно властивостей препарату та способу дії відносно канцерогенного потенціалу доцільно провести більш глибокі дослідження. Спонсор може розглянути включення додаткових кінцевих точок при проведенні токсикологічних досліджень. Якщо вагомість

доказів, отриманих при вивченні специфічних властивостей препарату (напр., дослідження *in vitro* та хронічної токсичності), не передбачає наявності канцерогенного потенціалу, не рекомендується проводити дослідження на щурах.

Якщо все ж існує небезпека канцерогенного потенціалу, мають визначатись підходи для оцінки ризику. Препарати, що можуть бути потенційно здатними забезпечувати або індукувати проліферацію трансформованих клітин та розмноження клону клітин, призводячи до неоплазії, мають оцінюватись з огляду на рецепторну експресію в різних злоякісних та нормальних клітинах людини, які є потенційно важливими для популяції пацієнтів. Необхідно визначити здатність препарату стимулювати ріст нормальних або злоякісних клітин, що експресують рецептор. Якщо дані *in vitro* свідчать про наявність потенційної небезпеки канцерогенезу, необхідно проводити подальші дослідження з використанням придатних моделей тварин. Залучення чутливих показників клітинної проліферації при проведенні довготривалих досліджень токсичності при повторному введенні може сприяти отриманню корисної інформації. Якщо препарат є біологічно активним, не виявив імуногенності у гризунів, а в інших дослідженнях не отримано достатньої інформації для оцінки канцерогенного потенціалу, слід обґрунтувати використання одного виду гризунів. Особливо уважно слід підходити до вибору доз. Використання комбінації фармакокінетичних і фармакодинамічних кінцевих точок з урахуванням співставлення властивостей рецепторів з очікуваним застосуванням у людини дозволяє отримати найбільш науково обґрунтовані підходи для визначення адекватних доз. В разі наявності достатніх доказів щодо можливості канцерогенної дії необхідно зробити відповідну вказівку про такий ризик, проте, спонсор може запропонувати додаткові доклінічні дослідження з метою пом'якшення такого занепокоєння. Дослідження на гризунах або короткотермінові дослідження канцерогенності з гомологічними препаратами,

як правило, мають обмежене значення для оцінки канцерогенного потенціалу препарату, що планується до впровадження.

4.9. Вивчення місцевої переносимості

Необхідно оцінити місцеву переносимість. Препарат має досліджуватись в лікарській формі, що планується до впровадження. Проте, за певних обґрунтованих обставин допускається проведення випробувань з використанням відомої найбільш поширеної лікарської форми препарату. В деяких випадках потенціал побічної місцевої дії препарату може бути досліджений в межах вивчення токсичності при одноразовому або повторних уведеннях, уникаючи таким чином необхідності проведення окремих досліджень.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ICH Topic S6 (R1) Document “Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Note for Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals”.
2. ICH Topic S5(R2) Document “Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products and Toxicity to Male Fertility”.
3. ICH Topic S1A Document “Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies for Pharmaceuticals”.
4. ICH Topic S9 Document “Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals”.