



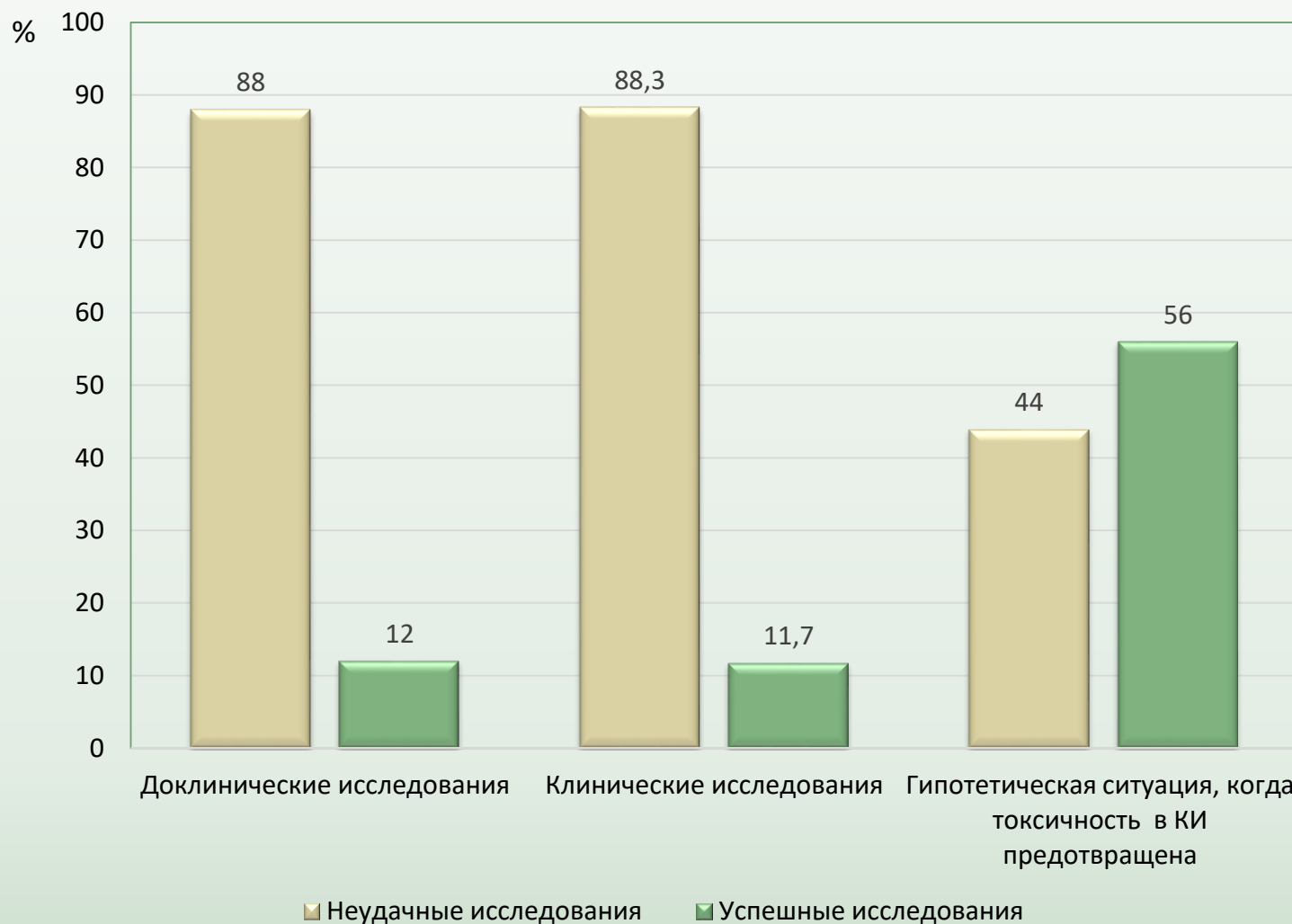
Трансляционные аспекты использования данных доклинических исследований

**Е.В. Шипаева, к.м.н.
Руководитель группы ДКИ,
Медицинский департамент
АО «Р-Фарм»**



Соотношение неудач и успеха доклинических и клинических исследований

клинических исследований





Виды токсичности при неудачах клинических исследований





Причины проблем трансляции данных





TGN1412 – ошибка экстраполяции данных



TGN1412 (анти-CD28 антитела, суперагонист) - гуманизированное моноклональное антитело для лечения хронического В-клеточного лимфоцитарного лейкоза и ревматоидного артрита. Препарат разрабатывался компанией TeGenero Immuno Therapeutics. Исследование КИ фазы 1 было проведено CRO Parexel в госпитале Норсвик Парк (Лондон, Великобритания).

13 марта 2006 г здоровым добровольцам в рамках КИ фазы 1 был введен препарат TGN1412. У 4/6 добровольцев развился синдром выброса цитокинов, полиорганная недостаточность и некроз фаланг пальцев.

Доза в КИ - в 500 раз ниже, чем самая высокая доза, введенная животным в ходе доклинических исследований.

Причины

- Использование в ДКИ обезьян, у которых нет эффекторных CD4+ клеток памяти – основной мишени препарата
- Высокая стартовая доза
- Практически одновременное введение препарата всем шестерым добровольцам



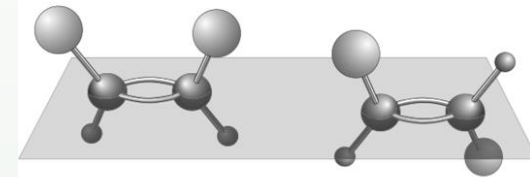
Примеры видовых различий действия лекарственных препаратов

- **Изотретиноин** оказывает тератогенное действие на плод у кроликов и обезьян, а также у людей, но не у мышей или крыс
- **Кортикостероиды** – тератогенное действие у животных, но не у человека
- **Талидомид** не является тератогенным для многих видов животных, но оказывает тератогенное действие у человека
- **Фиалуридин**, разработанный для лечения гепатита В, успешно прошел доклинические исследования на мышах, крысах, собаках, сурках и приматах, но во время проведения клинического исследования в 1993 году у семи человек развилась печеночная недостаточность. Пятеро погибли, а двое других были спасены с помощью трансплантации печени
- **Ибупрофен** – высокая токсичность у собак





Влияние изомерии



Хинин - противомаларийное действие

Хинидин – антиаритмические свойства

L - соталол - альфа-блокатор

D - соталол – антиаритмические свойства

Левометорфан - сильнодействующий опиоидный анальгетик

Декстрометорфан подавляет кашель

R - талидомид обладает седативным действием

S - талидомид – тератогенное действие

R - напроксен используется при артралгической боли

S - напроксен – тератогенное действие

D - этамбутол является противотуберкулезным препаратом

L - этамбутол вызывает слепоту

L - допа - используется для лечения болезни Паркинсона

D - допа вызывает дефицит лейкоцитов и, следовательно, восприимчивость к инфекциям

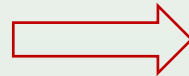
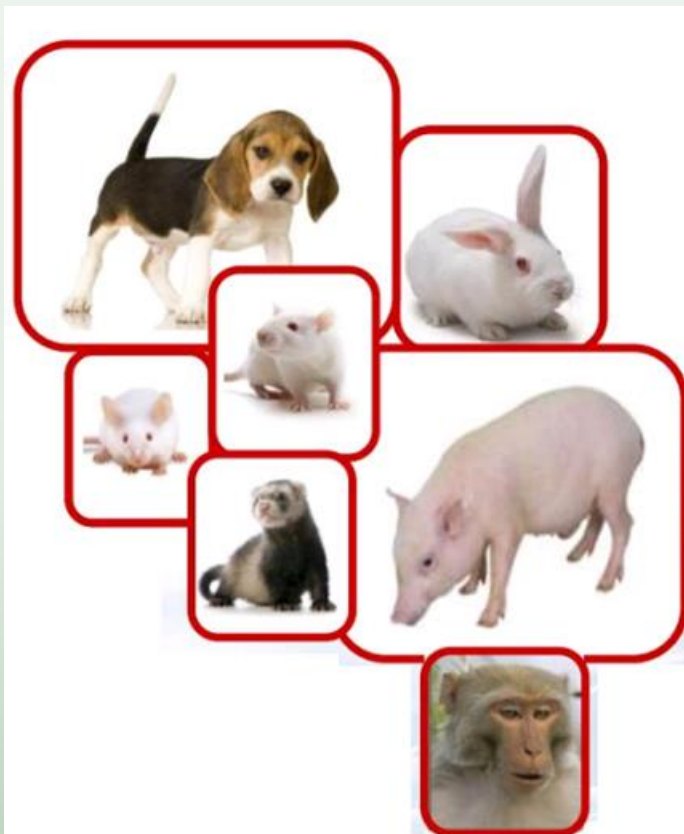


Видовые различия

Различия строения и функционирования
органов и систем



- Разнообразие метаболических путей и метаболитов лекарственных препаратов
- Различия реакции иммунной системы на лекарственный препарат





Метаболизм у разных видов

Характеристика метаболизма лекарственных препаратов в печени человека и широко используемых экспериментальных видов животных



Профиль активности CYP, наиболее напоминающий человеческий, наблюдался у мышей, за которыми следовали микросомы печени обезьяны, мини-свиньи и собаки, причем наиболее сильно отличались крысы.

Наиболее широкая индивидуальная вариабельность была обнаружена в активности CYP3A-опосредованной мидазолам-гидроксилазы и омепразолсульфоксидазы в микросомах печени человека и обезьяны.

Если бы характеристики метаболизма ксенобиотиков в печени были единственной причиной выбора видов животных для исследований токсичности, то крысы - не самая подходящая модель для имитации паттернов активности CYP человека.

P450 activity towards	Antibody/chemical inhibitor	Inhibition pattern most similar to man	K_m/V_{max} or enzymatic activity most similar to man	Species most similar to man
7-Ethoxy-resorufin	antisera for human CYP1A	mouse, rabbit, micropig	mouse, rat, rabbit, micropig, monkey	(1) mouse, (2) rabbit, micropig
	furaflyline α -naphthoflavone	mouse mouse, rabbit, micropig		
Coumarin	anti-human 2A6	micropig, monkey	rabbit, micropig, monkey	micropig, monkey
7-ETC	anti-rat 2B1	-	mouse	mouse
Diclofenac	anti-rat 2C11	-	rat	?
	sulphaphenazole	dog, micropig, monkey		
Mephenytoin	anti-rat 2C11	-	monkey ¹	monkey
Bufuralol	sulphaphenazole	no inhibition		
	anti-human 2D6	rat, monkey	dog	(1) dog, (2) rat, monkey
Chlorzoxazone	quinidine	dog		
	DDC	moderate inhibition in dog, weak in rat/monkey		
Testosterone	anti-rat 2E1	-	no large differences between species	no large differences between species
	DDC	-		
Lauric acid	anti-rat 3A2	mouse, male rat (1) mouse, male rat, (2) micropig, monkey	mouse, male rat, rabbit, micropig, monkey	(1) mouse, male rat, (2) micropig, monkey
	ketonazole	no large differences between species	no large differences between species ¹	no large differences between species

7-ETC, 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin; DDC, diethylthiocarbamate; -, prediction not reliable due to the large extent of cross-reactivity of the antibody/chemical inhibitor.

¹ Similarities not based on K_m and V_{max} , but on enzymatic activity.



Данные иммуногенности в ДКИ не предсказывают иммуногенность в КИ

Биологический препарат	Иммуногенность в ДКИ	Иммуногенность в КИ
Стрептокиназа и стафлиокиназа	↑	↑
Гемоцианин моллюска <i>Megathura crenulata</i> (Keyhole Limpet Hemocyanin)	У грызунов ↑	↑
Человеческий интерферон альфа-2а	У грызунов ↑	↓
Человеческий гормон роста	У грызунов ↑	↓
Человеческий Интерферон-гамма	У яванских макак ↑	↓
Человеческий Интерлейкин-3	У макак резусов ↑	↓



Особенности исследований на животных



- Медленный прогрессирующий характер развития хронических заболеваний с воздействием многих факторов у человека и **краткосрочные модели** у животных.
- В моделях in vivo в ряде случаев используются **профилактические схемы** введения исследуемого препарата, что отличается от клинической ситуации, когда лечение, как правило, начинается после появления симптомов заболевания.
- **Стандартизованная популяция** животных vs. пациенты разного возраста с разной массой тела, могут быть сопутствующие заболевания и терапия.
- **Возраст, пол, показатели здоровья, в том числе различия в микробиоте, генетический статус, условия транспортировки и содержания животных** могут оказывать влияние на результаты исследования.
- **Количество животных** в группе сведено к минимуму по этическим и другим причинам.
- **Различия в функционировании ЦНС.** Нельзя оценить головную, мышечную боль у животных.



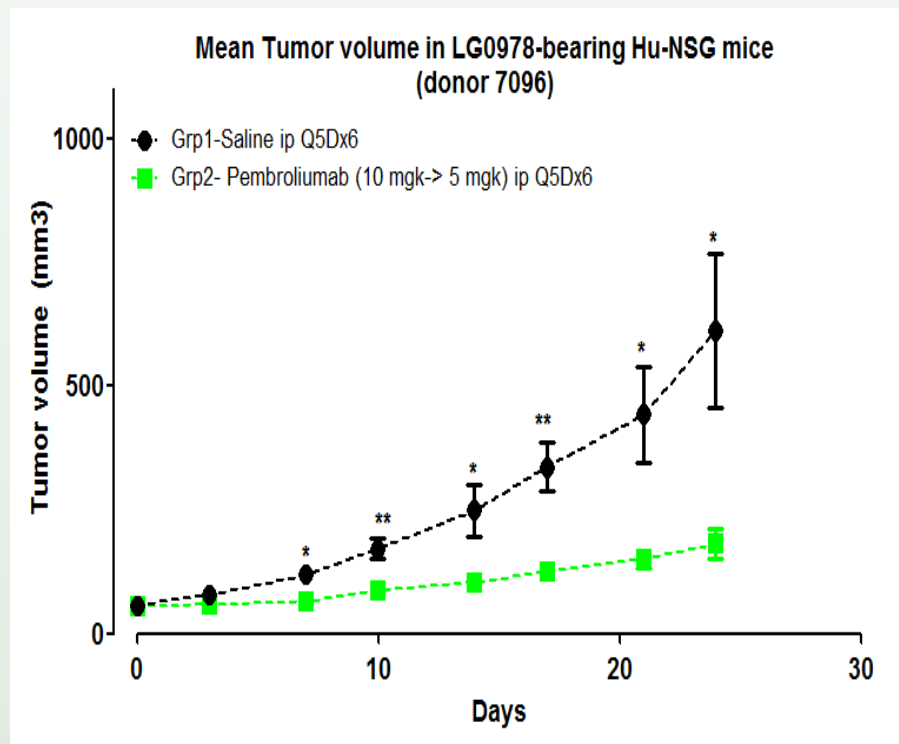
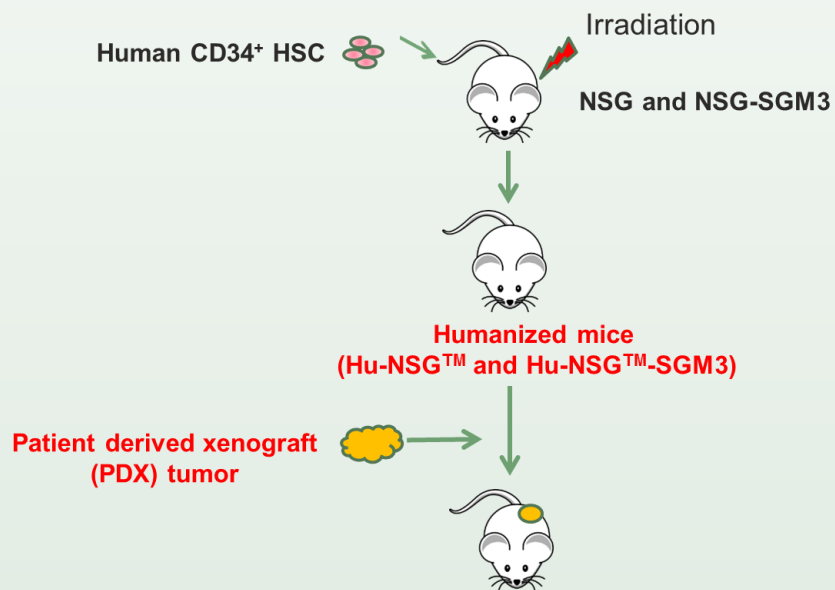
Проблемы моделирования онкологических заболеваний



- Мышиные сингенные модели имеют ограниченное разнообразие
- Многие препараты более токсичны для клеток человека, чем для клеток мыши – ложноположительный терапевтический эффект на моделях ксенографтов
- Отличия биораспределения
- Сложно смоделировать метастазирование
- При изучении антиангиогенных или антивазкулярных стратегий - воздействие на мышиные, а не человеческие мишени
- При изучении гуманизированных/человеческих антител (иммунотерапия) нет возможности воспроизвести иммунную систему человека у мыши
- Сокращенное время развития опухоли у мышей



Модель гуманизированных мышей для изучения эффективности PD-1/PD-L1 ингибиторов





Ошибки исследователей при проведении эксперимента



Рандомизация

Заслепленная команда исследователей



Ошибки планирования исследований на животных



- Сокращенное количество животных в группах
- Проведение эксперимента на животных, ранее использованных в других исследованиях
- Ошибки выбора способа введения лекарственного препарата, расчёта дозы и схемы применения препарата
- Использование препарата в одной дозе при оценке эффективности – не изучается дозовая зависимость эффекта
- Неправильный выбор методов статистического анализа или отсутствие такового
- Применение неотработанных моделей
- Использование единственной модели *in vivo* при наличии нескольких
- «Экономия» на контрольных группах
- Для биоаналогов: нарушение пошаговой программы – переход к *in vivo* исследованиям до сопоставления физико-химических свойств и *in vitro* тестирования



Принципы проведения экспериментов

- Способ введения вещества, который соответствует предполагаемому клиническому способу применения препарата
- По меньшей мере, в одном из основных тестов должна быть изучена кривая зависимости доза-эффект в возможно более широком диапазоне доз и определена продолжительность эффекта при использовании того пути введения, который соответствует предполагаемому клиническому применению
- Сравнение с наиболее известными эталонными препаратами
- Достаточное количество методов
- Статистический анализ результатов исследования, расчет объема выборки при данном уровне значимости статистических различий
- Анализ и исключение факторов, влияющих на принятие решений при рандомизации и оценке исходов





Критерии обоснованности модели



Для того, чтобы модель на животных была обоснованным аналогом соответствующей болезни человека, она должна удовлетворять следующим критериям:

- **face validity** – соответствие симптоматики и особенностей, характерных для этого вида расстройства
- **predictive validity** – предсказательная сила модели, сходное действие фармакологических воздействий в модельной ситуации на животных и нарушениях у человека
- **construct validity** – конструктивное соответствие – одинаковые или близкие молекулярные механизмы, лежащие в основе моделируемой патологии
- модель должна быть воспроизводима другими исследователями

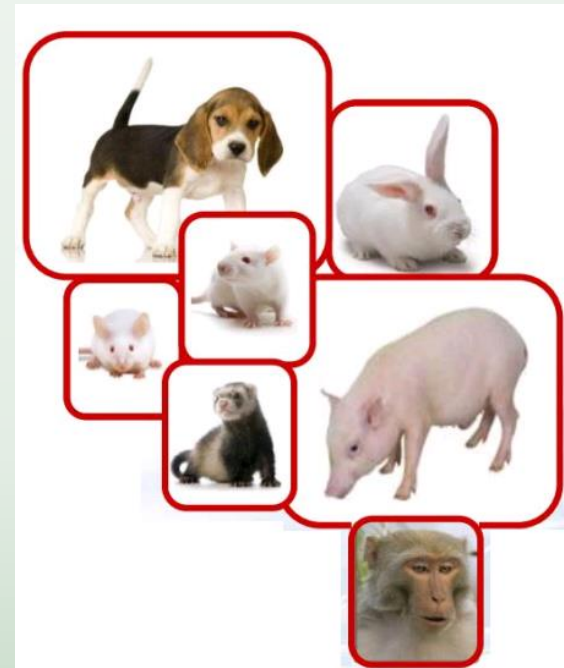


Подбор подходящего вида животных

Соответствующим (подходящим) является вид животного, исследуемый материал которого проявляет фармакологическую активность за счет связывания с целевой молекулой

Определение подходящего вида животных

- **In silico**
 - Компьютерный анализ гомологии последовательности таргета между разными видами
- **Ex vivo / in vitro**
 - Взаимодействие с таргетом (проточная цитометрия, связывание с тканями, и т.д.)
 - Анализ изменений мРНК под действием исследуемого препарата (на тканях или используя первичные/трансформированные клетки)
 - Связывание с рецептором (сравнение аффинности связывания)
 - Сравнительный анализ распределения в тканях человека и животных





Подбор подходящего вида для RPH-104 - гибридного белка-ловушки для IL-1

Межвидовое сравнение белковых последовательностей IL-1R и IL-1RAcP частей RPH-104

Вид	333 аминокислотная последовательность IL-1R человека	358 аминокислотная последовательность IL-1RAcP человека
	идентичность	
<i>Mus musculus</i>	63%	84%
<i>Rattus norvegicus</i>	64%	86%
<i>Pan troglodytes</i>	99%	100%
<i>Macaca fascicularis</i>	94%	99%



- Низкое сходство (~64% для IL-1R) у грызунов в сравнении различными видами обезьян (более 90% гомологии)

Характеристика ингибирующих свойств в отношении IL-1 β человека, мыши и макаки

Источник IL-1 β	Кл. линия	IC50, pM	Kd, pM
<i>Homo sapience</i>	MEFs	0.94	0.13
<i>Homo sapience</i>	MRC5	1.1	0.38
<i>Mus musculus</i>	MEFs	28	15
<i>Macaca mulatta</i>	MRC5	1.9	0.61



- RPH-104 является эффективным ингибитором IL-1 β сигнального каскада человека и макаки
- RPH-104 подавляет мышинный IL-1 β менее эффективно, чем IL-1 β человека или макаки



Благодарю за внимание!

shipaeva@rpharm.ru

