

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-9-3-7
© Коллектив авторов, 2018

*Р. Д. Сюбаев, Г. Н. Енгальчева, Д. В. Горячев, А. В. Соколов,
В. В. Чистяков, Е. С. Степанова*

ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТОКСИКОКИНЕТИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения РФ, Россия, 127051, Москва; e-mail: Subaev@exrmed.ru

Представлен анализ данных литературы, отечественных и зарубежных методических документов по доклиническим исследованиям безопасности и токсикокинетики лекарственных средств. Согласно Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения ЕАЭС в общий технический документ разработчик обязан включать сведения о токсикокинетических исследованиях, которые подлежат оценке при проведении экспертизы результатов доклинических исследований. Сформулированы основные подходы к экспертной оценке результатов токсикокинетических исследований лекарственных средств. Определено основное содержание экспертного анализа, включающего методологическую базу исследований, результаты исследований, характеристику профиля безопасности, экстраполяцию доклинических данных, характеристику факторов риска и прогнозируемого профиля клинической безопасности для пациентов. Включение токсикокинетических исследований в программу доклинического токсикологического изучения имеет принципиальное значение для адекватной экстраполяции экспериментальных данных и прогноза безопасности применения лекарственных средств у человека. Экспертный анализ токсикокинетических данных позволяет оценить корректность интерпретации результатов токсикологических исследований, характеристики профиля токсичности лекарственного средства и риска развития токсических эффектов.

Ключевые слова: токсикокинетика; доклинические исследования; безопасность лекарственных средств; экспертные критерии; интерпретация результатов исследований.

Создание общего рынка лекарственных средств (ЛС) Евразийского экономического союза (ЕАЭС) диктует необходимость совершенствования научных и организационных аспектов доклинических исследований новых ЛС, включая требования к планированию, порядку проведения, оформлению результатов и их представлению в составе регистрационного досье для проведения экспертизы с целью регистрации.

Согласно Правилам регистрации и экспертизы ЛС для медицинского применения ЕАЭС [1] в общий технический документ разработчик обязан включать сведения о токсикокинетических исследованиях, которые подлежат оценке при проведении экспертизы результатов доклинических исследований [2].

В Российской Федерации доклинические исследования проводят согласно руководству по проведению доклинических исследований ЛС [3], которое включает "Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики ЛС" и не содержит рекомендаций по изучению токсикокинетики. Фармакокинетические исследования непосредственно не связаны с токсикологическими исследованиями, что затрудняет их использование для оценки корреляции между экспозицией и токсическим действием и, как следствие, правильной интерпретации

токсикологических данных. В руководстве по научно-методическому обеспечению экспертизы ЛС токсикокинетические исследования указаны в качестве общепринятого вида исследований при изучении токсичности [4].

Таким образом, в России отсутствуют специальные методические рекомендации по проведению токсикокинетических экспериментов.

Анализ данных литературы и зарубежных методических документов международного и национального статуса указывает на то, что токсикокинетические исследования в настоящее время являются рутинным компонентом комплексных токсикологических экспериментов при доклиническом изучении безопасности ЛС и проводятся в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики GLP [5].

В рамках ЕАЭС приняты и разрабатываются документы, регламентирующие регистрацию и экспертизу ЛС, а также методические документы, аналогичные методическим руководствам Европейского медицинского агентства (ЕМА) по доклиническому и клиническому изучению ЛС, в частности методические рекомендации по доклиническому изучению токсикокинетики. За основу разрабатываемых методических рекомендаций ЕАЭС принято руководство ICH S3A [6].

Токсикокинетика изучает связь между фармакокинетикой лекарственного вещества в различных дозах и его токсичностью. Токсикокинетические исследования, как правило, интегрированы в исследования токсичности (сопутствующая, параллельная токсикокинетика) или проводятся в других вспомогательных исследованиях, которые имитируют условия исследований. Для оценки корреляции системной экспозиции с токсическими эффектами используются основные токсикокинетические параметры: C_{\max} (значение максимальной концентрации), T_{\max} (время достижения максимальной концентрации) и AUC (area under curve, интегральная площадь под фармакокинетической кривой “концентрация — время”).

Токсикокинетические параметры зависят от свойств вещества и от видовых и индивидуальных особенностей организма: процессов поступления, распределения метаболизма и элиминации. При этом изменение концентрации препарата в крови может иметь нелинейный характер, поэтому изменение дозы может сопровождаться непропорциональным изменением концентрации и, как следствие, непропорциональным изменением фармакологических и токсических эффектов. Причины непропорционального увеличения концентрации препарата в плазме крови различны: насыщение ферментов печени, снижение функции почек, изменение активности транспортеров и др. Насыщение связывания с белками плазмы крови может приводить к увеличению несвязанной фракции препарата [7]. Снижение связывания с 99 до 96 % приводит к 4-кратному увеличению “свободной” плазменной концентрации препарата [8]. Связывание вещества с белками плазмы и других тканей, как правило, обратимо и всегда насыщаемо [9]. Увеличение концентрации в крови также может повлиять на распределение вещества в организме, способствовать проникновению вещества в такие ткани, как, например, нервная ткань [7]. Плазменные концентрации препарата при многократном введении могут увеличиваться из-за повреждений органов, снижения активности ферментных систем, участвующих в процессах метаболизма, снижения концентрации белков плазмы [10]. Накопление препарата в плазме крови может происходить также в результате частого приема дозы относительно периода полуэлиминации ($T_{1/2}$) [11]. Концентрация препарата в плазме крови при повторных дозах может и понижаться, например, из-за индукции ферментов биотрансформации [12]. Влияние возраста на токсикокинетику определяется состоянием организма. Как у животных, так и у человека с возрастом изменяется состав организма (количество жира, общей воды, мышечной массы), что может привести к существенному изменению “объема распределения”. Существенное влияние на токсикокинетические параметры оказывает возрастное снижение печеночного и почечного кровотока. Плазменный клиренс у неполовозрелых животных может существенно изменяться в зависимости от функциональной зрелости метаболической системы

CYP450 (цитохрома P450) и концентрации сывороточного альбумина. Отмечены специфические патологии и различия токсикокинетики, связанные с полом (гендерный эффект). В частности, установлено, что мужские особи грызунов нередко имеют более высокий уровень экспрессии изоферментов CYP450 [13, 14].

Особенности токсикокинетических исследований во многом определяет использование препаратов в токсических дозах, что отличает их от исследований фармакокинетики [15]. Высокие дозы могут изменять растворимость и всасывание вещества в желудочно-кишечном тракте, подавлять или активировать процессы метаболизма, что может привести к изменению биодоступности самого вещества или его метаболитов [16, 17]. С другой стороны, высокая концентрация ЛС может привести к индукции печеночных ферментов [7]. Для некоторых лекарственных препаратов всасывание из желудочно-кишечного тракта зависит от активности транспортеров, таких как гликопротеин P [18]. Почечная экскреция может быть как насыщаемым, так и ненасыщаемым процессом, и может заметно зависеть от концентрации циркулирующего вещества.

Все эти факторы могут привести к изменению кинетики вещества и появлению у нее нелинейного характера. Измененная кинетика введенного в токсическом количестве вещества, в конечном счете, может привести к токсичности на клеточном уровне, что проявится клиническими симптомами отравления или передозировки [7].

ЛС, как правило, редко используются в качестве монотерапии, поэтому необходимо учитывать изменения токсикокинетических параметров, обусловленные фармакокинетическим взаимодействием, что особенно актуально при изучении токсикокинетики комбинированных препаратов [7].

Цели и задачи токсикокинетики [6]

Основная цель токсикокинетики — описание системной экспозиции, возникающей у животных, и ее взаимосвязи с величиной дозы и продолжительностью курса в токсикологическом исследовании.

Вторичные цели:

связать экспозицию, полученную в токсикологических исследованиях, с результатами таких исследований и определить значимость указанных результатов для анализа клинической безопасности;

обосновать выбор видов животных и режим введения в доклинических токсикологических исследованиях;

получить сведения, которые вместе с результатами токсикологических исследований помогают составить дизайн последующих доклинических токсикологических исследований.

Указанные цели достигаются определением одного или более фармакокинетических параметров из измерений, осуществленных в надлежащие временные точки в ходе отдельных исследований. К таким измерениям, как правило, относятся концентрации в плазме (цельной крови или сыворотке) исходного соединения и (или) его метаболитов; их выбор осуществляют в индивидуальном порядке. Для оценки экспозиции в

токсикокинетических исследованиях наиболее часто используемыми параметрами являются AUC , C_{\max} и $C_{\text{время}}$ в плазме (цельной крови или сыворотке). Для некоторых соединений экспозицию целесообразно рассчитывать на основании концентрации соединения, не связанного с белками плазмы.

К токсикологическим исследованиям, в которые целесообразно включать сбор токсикокинетических данных, относятся исследования токсичности при однократном и многократном введении, исследования репродуктивной токсичности, генотоксичности и канцерогенности. Токсикокинетические данные также представляют интерес при анализе последствий изменения клинического пути введения.

Принципы проведения исследований токсикокинетики

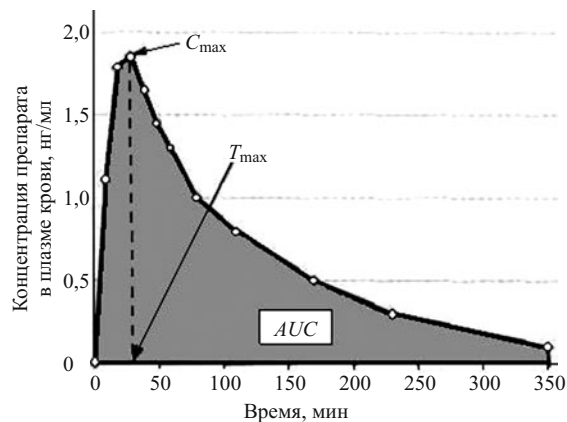
Исследования токсикокинетики, так же как исследования токсичности, должны проводиться в условиях надлежащей лабораторной практики (GLP).

Количественное определение экспозиции

Количественная оценка системного воздействия ЛС помогает в интерпретации сходства и различия токсического действия в зависимости от вида, пола и возраста животных, пути введения и режима дозирования. Для оценки экспозиции в токсикокинетических исследованиях наиболее часто используемыми параметрами являются AUC , C_{\max} и T_{\max} исходного соединения и/или метаболита(ов) в плазме (цельной крови или сыворотке), при необходимости можно измерять концентрацию вещества в тканях (рисунок).

Для некоторых соединений экспозицию целесообразно рассчитывать на основании концентрации соединения, не связанного с белками плазмы. Следует принимать во внимание возможность различия фармакодинамики вещества (качественной и количественной) у различных видов животных.

Фармакодинамические эффекты или токсичность также могут быть доказательствами, подтверждающими воздействие, и в некоторых случаях могут заменить фармакокинетические параметры. Исследования токсичности и токсикокинетики должны установить, какой уровень воздействия был достигнут в ходе исследований, а также могут служить для предупреждения токсикологов о нелинейном, дозозависимом изменении экспозиции. Токсикокинетические данные позволяют проводить более корректное межвидовое



Фармакокинетический профиль.

сравнение, чем простые сравнения на основе соотношения дозы/массы тела (или площади поверхности).

Токсикокинетика в различных токсикологических исследованиях

При необходимости допускается увеличить или снизить частоту мониторинга или профилирования экспозиции в зависимости от характера токсикологических исследований.

Токсичность при однократном введении

Исследования токсичности при однократном введении — первый шаг доклинических исследований ЛС, когда могут отсутствовать биоаналитические методики, необходимые для оценки экспозиции, поэтому токсикокинетический мониторинг таких исследований часто бывает невозможен. В качестве альтернативы после завершения исследований токсичности при однократном введении допускается проведение дополнительных токсикологических исследований. Результаты кинетических исследований при однократном введении могут содействовать выбору состава ЛС и прогнозированию скорости и продолжительности экспозиции. Они также могут способствовать выбору необходимых доз для изучения в последующих исследованиях.

Токсичность при многократном введении

При выборе режима введения и видов животных необходимо, по возможности, руководствоваться фармакодинамическими и фармакокинетическими принципами. В самых ранних исследованиях, когда отсутствуют данные как для животных, так и для человека, это не всегда достижимо. Необходимо надлежащим образом встроить токсикокинетическую в дизайн исследования. Она может представлять собой профилирова-

Таблица 1

Пример таблицы с данными токсикокинетических исследований [2]

Идентификационный номер исследования	Суточная доза (xx/xx)	AUC у животных, нг · ч/мл*		Животные: человек XXX Повторная экспозиция	
		♂	♀	♂	♀
Комментарий эксперта					

Примечание: * Для сравнения желательно использовать AUC для несвязанной доли препарата.

Таблица 2

Пример таблицы для сравнения экспозиции в исследованиях на животных с экспозицией в клинических исследованиях [2]

Идентификационный номер исследования	Суточная доза (xx/xx)	AUC у животных, нг · ч/мл*		C_{\max}		$t_{1/2}$	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Комментарий эксперта							

ние или мониторинг экспозиции при соответствующих дозах в начале и ближе к завершению периода введения первого исследования при многократном введении. Используемая в последующих исследованиях процедура будет зависеть от результатов первого исследования и всех изменений в предлагаемом режиме введения. При возникновении затруднений в интерпретации результатов предыдущих токсикологических исследований для определенных соединений допускается расширить, сузить или модифицировать мониторинг или профилирование.

Генотоксичность

Для исследований генотоксичности *in vivo* с отрицательными результатами целесообразно показать системную экспозицию у использованных видов животных или описать экспозицию в ткани-индикаторе.

Канцерогенность

Для получения токсикокинетических данных, требующихся для планирования основных исследований, необходимо осуществлять надлежащий мониторинг или профилирование наблюдательных исследований или исследований подбора диапазона доз. Необходимо уделить особое внимание видам и породам, включенным в предыдущие токсикологические исследования, а также использованным путям и способам введения. Следует также уделить отдельное внимание получению необходимых токсикокинетических данных при введении лекарственного препарата в составе пищи.

При выборе режима введения, видов и породы животных в основном исследовании необходимо, насколько это возможно, руководствоваться имеющимися фармакокинетическими и токсикокинетическими сведениями. Большинство таких исследований на практике проводятся на крысах и мышах. Рекомендуется убедиться, что экспозиция в основном исследовании соотносится с кинетическими профилями, установленными в отдельных или специальных исследованиях подбора диапазона доз. В некоторых случаях в ходе исследования рекомендуется осуществлять такой мониторинг, но его длительность в целом не должна превышать 6 мес.

Репродуктивная токсичность

До начала исследований репродуктивной токсичности целесообразно обладать определенными данными о фармакокинетике, так как они могут потребовать изменения выбранного вида животных, дизайна исследования и режима дозирования. Для этого сложной информации не требуется, включая данные, полученные на беременных или лактирующих животных. Однако впоследствии при анализе результатов исследований в зависимости от их содержания могут потребоваться фармакокинетические показатели беременных и лактирующих животных. Ограничение экспозиции в исследованиях репродуктивной токсичности, как правило, диктуется материнской токсичностью. Таким образом, несмотря на определенную ценность токсикокинетического мониторинга в исследованиях репродуктивной токсичности, особенно в отношении

малотоксичных соединений, такие данные, как правило, для всех соединений получать не требуется.

Если вследствие отсутствия фармакологических или токсических эффектов достижение необходимой системной экспозиции ставится под сомнение, использование токсикокинетических принципов представляет собой ценный инструмент определения экспозиций при введении лекарственного препарата на различных этапах репродуктивного процесса. Для сбора токсикокинетических данных допускается использование вспомогательной группы животных женского пола.

В исследованиях фертильности применяются общие принципы, описанные для исследований токсичности при многократном введении. Необходимость осуществлять мониторинг таких исследований зависит от используемого режима дозирования и сведений, полученных по результатам ранее проведенных исследований на выбранных видах животных.

В исследованиях на беременных и лактирующих животных при выборе режима дозирования в течение периода экспозиции необходимо руководствоваться результатами токсикологических исследований, фармакокинетическими и токсикокинетическими принципами. Необходимо принимать во внимание возможность различия кинетики у беременных и небеременных животных. Изучение токсикокинетики может включать оценку показателей матерей, эмбрионов, плодов и новорожденных в определенные дни. Для оценки вклада в экспозицию у новорожденных изучению подлежит степень экскреции в грудное молоко. В некоторых случаях с целью определения эмбрио-фетального переноса и секреции в грудное молоко требуется проведение дополнительных исследований.

Особенности экспертизы токсикокинетических исследований ЛС

Форма экспертного отчета, регламентируемого Приказом Минздрава РФ № 558н от 24.08.2017 [19] не содержит требований к оценке результатов токсикокинетических исследований при проведении экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ЛС и при проведении экспертизы документов для получения разрешения на проведение клинического исследования лекарственного препарата.

Форма экспертного отчета по оценке результатов доклинических (неклинических) исследований, утвержденная решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 [2], предусматривает необходимость экспертной оценки токсикокинетических исследований (табл. 1, 2). Также эксперту необходимы сведения о токсикокинетических параметрах для оценки результатов изучения канцерогенности и репродуктивной токсичности.

Экспертная оценка результатов доклинических токсикологических исследований безопасности с определением токсикокинетических параметров экспозиции проводится на основании соответствия следующим основным критериям:

1. Адекватность программы, дизайна и результатов токсикологических исследований (соответствие GLP,

выбор и характеристика методов, тест-систем, исследуемого вещества, доз, пути введения, режима дозирования, статистической обработки данных, оформления результатов и др.).

2. Адекватность программы, дизайна и результатов исследований токсикокинетики (соответствие GLP, выбор и характеристика методов, сопутствующих или вспомогательных исследований, анализа, матриц, доз, пути введения, схемы отбора проб, статистической обработки данных, оформления результатов и др.).

3. Корректность токсикокинетической интерпретации профиля токсичности препарата (достоверность данных, характеристика зависимости “доза — экспозиция — токсическое действие”, органы-мишени, токсические эффекты, диапазон токсических и нетоксических доз/экспозиций, обратимость токсических эффектов и др.).

4. Корректность токсикокинетической интерпретации профиля безопасности препарата (определение границ безопасности по соотношению безопасных экспозиций у животных и ожидаемой терапевтической экспозиции у человека, обоснование безопасной стартовой дозы для первого применения препарата у человека и безопасной максимальной дозы, адекватность клинического мониторинга безопасности и др.).

Необходимо отметить, что полноценная характеристика профиля токсичности ЛС требуется не только для оценки пользы и риска на этапе клинических исследований и составления инструкции по медицинскому применению препарата, но также для анализа нежелательных реакций, регистрируемых системой фармаконадзора при его медицинском применении [20].

Токсикокинетические исследования позволяют получить наиболее адекватную интерпретацию результатов токсикологических исследований, необходимую для определения условий безопасного применения препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 “О Правилах регистрации и экспертизы

- лекарственных средств для медицинского применения”; Available from: <https://goo.gl/s9NsVS>.
2. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 “О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения”, Приложение 6, Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, Приложение 6; Available from: <https://goo.gl/s9NsVS>.
3. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Гриф и К., Москва (2012).
4. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, Т. I, Гриф и К, Москва (2013).
5. DIRECTIVE 2001 / 83 / EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
6. ICH S3A Harmonised tripartite guideline note for guidance on toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies (1994).
7. P. G. Welling, *Toxicol. Pathol.*, **23**, 143 – 147 (1995).
8. L. Z. Benet, B. A. Hoener, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **71**, 115 – 121 (2002).
9. M. Rowland, T. N. Tozer, *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*, Lea &Febiger, Philadelphia (1980).
10. J. Tibbitts, *Toxicol. Pathol.*, **31** (suppl), 17 – 24 (2003).
11. M. Rowland, T. N. Tozer, *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*, 3rd ed., Williams & Wilkins, New York (1995).
12. P. D. Worboys, D. J. Carlile, *Xenobiotica*, **31**(8 – 9), 539 – 556 (2001).
13. J. H. Lin, A. Y. H. Lu, *Pharmacol. Rev.*, **49**, 404 – 449 (1997).
14. A. Ghosal, N. Sadrieh, L. Reik, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **332**(1), 153 – 162 (1996).
15. J. P. Jan Ploemen., H. Kramer, E. I. Krajnc, I. Martin, *Toxicol. Pathol.*, **35**, 834 – 837 (2007).
16. David B. Troy (ed.) *Remington: The science and practice of pharmacy* (21st ed.), Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia (2005).
17. P. R. Mayer, *Toxicol. Pathol.*, **23**, 165 – 169 (1995).
18. D. K. Walker, S. Abel, P. Comby, et al., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 587 – 595 (2005).
19. Приказ Минздрава РФ от 24.08.2017 № 558н.; *Справочно-правовая система “Консультант Плюс”*: режим доступа: локальный [электронный ресурс] http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_285813/.
20. Б. К. Романов, Р. Н. Аляутдин, С. В. Глаголев, В. А. Поливанов, *Безопасность и риск фармакотерап.*, **2**, 11 – 27 (2016).

Поступила 09.06.18

EXPERT EVALUATION OF PRE-CLINICAL STUDIES OF THE TOXICOKINETICS OF PHARMACEUTICALS PREPARATIONS (REVIEW)

R. D. Subaev*, G. N. Engalycheva, D. V. Goryachev, A. V. Sokolov, V. V. Chistyakov, and E. S. Stepanova

¹ Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

* e-mail: Subaev@expmed.ru

An analysis of the available literature data and the domestic and foreign methodological documents on studying the safety and toxicokinetics of drugs is presented. According to the rules of marketing authorization and assessment of medicinal products for the EAEU, a developer must include information on toxicokinetic studies in the General Technical Document, which have to be evaluated during examination of the results of preclinical studies. Main approaches to the expert assessment of the results of toxicokinetic studies of drugs are formulated. The main content of the expert analysis is determined, including the methodological basis and results of the research, characteristics of the safety profile, extrapolation of preclinical data, and characteristics of risk factors and predictable clinical safety profile for patients. The inclusion of toxicokinetic studies in the program of preclinical toxicological studies is of principal importance for the adequate extrapolation of experimental data and the prediction of the safety of drug use in humans. The expert analysis of toxicokinetic data allows estimating the correct interpretation of the results of toxicological studies, characteristics of the drug toxicity profile, and the risk of toxic effects.

Keywords: toxicokinetics; preclinical studies; drug safety; expert criteria; interpretation of research results.