

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 615.2/015.4.07

Самсонов М.Ю.¹, Дмитриева А.А.¹, Коноплева Г.Е.¹, Шипаева Е.В.¹, Барбашов С.Ф.², Лавровский Я.В.²

СПЕЦИФИКА ТЕОРИИ И ПРАКТИКИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

¹АО «Р-Фарм», 119421, Москва

²Р-Фарм Оверсиз инк, Соединенные Штаты Америки, 92037, Сан-Диего

♦ В обзоре обсуждаются особенности доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов на примере разработки оригинального слитого белка RPH-104 — высокоактивного ингибитора ИЛ-1β-опосредованного сигнального пути. Особенность препаратов данного класса определяется сложностью молекул и их видовой специфичностью. Исследования эффективности, фармакокинетики и токсичности биотехнологических препаратов необходимо проводить на релевантных видах животных. Важно учитывать возможность появления иммуногенности, а также оценивать риск возникновения цитотоксических реакций. Правильное планирование доклинических исследований позволяет получить достоверную и достаточную информацию о потенциальных органах-мишенях токсического воздействия, установить его обратимость и определить параметры безопасности для лекарственного препарата. Соблюдение этических принципов предусматривает оптимизацию исследований *in vivo* с помощью применения современных методов анализа *in silico*, компьютерного моделирования и тестирования *in vitro*.

Ключевые слова: биотехнологические лекарственные препараты; доклинические исследования; Евразийский экономический союз; оценка безопасности; оценка эффективности; слитые белки.

Для цитирования: Самсонов М.Ю., Дмитриева А.А., Коноплева Г.Е., Шипаева Е.В., Барбашов С.Ф., Лавровский Я.В. Специфика теории и практики доклинических исследований биотехнологических лекарственных средств. *Российский медицинский журнал*. 2018; 24(6): 324-331. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2106-2018-24-6-324-331>

Для корреспонденции: Самсонов Михаил Юрьевич, канд. медицинских наук, директор медицинского департамента АО «Р-Фарм», 119421, Москва, E-mail: samsonov@rpharm.ru

Samsonov M. Yu.¹, Dmitrieva A. A.¹, Konopleva G. E.¹, Shipaeva E. V.¹, Barbashov S. F.², Lavrovsky Ya. V.²

NONCLINICAL STUDIES OF BIOTECHNOLOGY DERIVED MEDICINAL PRODUCTS — THEORY AND PRACTICE SPECIFICITY

¹JSC «R-Pharm», 119421, Moscow, Russian Federation

²R-Pharm Overseas Inc. 92037, San-Diego, USA

♦ Nonclinical studies of biotechnology-derived medicinal products are discussed in the article in terms of new original fusion protein RPH-104 – high potency IL-1β signal pathway antagonist. Specificity of biotherapeutics is connected to complexity of molecules. Efficacy, pharmacokinetic and toxicity nonclinical studies of the biotherapeutics are conducted using relevant species taking into consideration potent immunogenicity. Cytotoxic reactions risk assessment is also important. Accurate nonclinical studies planning can help to obtain sufficient information about potential target organs for toxicity, reversibility of toxic effects and determine safety parameters. According to ethical principles *in vivo* studies can be optimized using modern *in silico* analysis, computer modelling and *in vitro* testing.

Keywords: review; biotechnology derived medicinal products; nonclinical studies; Eurasian Economic Union; safety assessment, efficacy assessment, fusion proteins.

For citation: Samsonov M. Yu., Dmitrieva A. A., Konopleva G. E., Shipaeva E. V., Barbashov S. F., Lavrovsky Ya. V. Nonclinical studies of biotechnology derived medicinal products — theory and practice specificity. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal (Medical Journal of the Russian Federation, Russian journal)*. 2018; 24(6): 324-331. (in Russ.) DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2106-2018-24-6-324-331>

For correspondence: Mikhail Yu. Samsonov, candidate of medical sciences, Chief Medical Officer JSC «R-Pharm», 119421, Moscow, Russian Federation, E-mail: samsonov@rpharm.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 14.09.18
Accepted 25.09.18

Достижения последних десятилетий в понимании роли специфических белков и рецепторов в патогенезе заболеваний, а также развитие биотехнологических процессов производства привели к появлению значительного числа инновационных лекарственных средств. Использование в клинической практике биотехнологических лекарственных препаратов (БП) открыло новые возможности для лечения онкологических, аутоиммунных и аллергических, эндокринных и других заболеваний. Важность разработки препаратов этого класса подчеркивается в «Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации до 2020 г.». Ожидается существенное увеличение объема производства БП, что должно привести к сокращению их импорта [1].

Активный компонент БП произведен или выделен из биологического источника. К БП относятся: цитокины, активаторы плазминогена, рекомбинантные факторы плазмы крови, факторы роста, гибридные белки (фьюжн белки, химерные белки), ферменты, рецепторы, гормоны и моноклональные антитела. Производятся такие препараты с использованием современных технологий, например, методов рекомбинантной ДНК, гибридом, контролируемой экспрессии генов и других [2, 3].

Важным аспектом разработки новых лекарственных средств является получение информации об их безопасности и эффективности на основании проведенных доклинических исследований (ДКИ) [4]. Особенности составления программы ДКИ для БП связаны со сложностью структуры действующего вещества белковой

природы, а также с его высокой видовой специфичностью и возможной иммуногенностью [2, 5].

Целью данного обзора является обсуждение специфики проведения ДКИ БП (в частности, терапевтических моноклональных антител и слитых белков) на примере разработки оригинального слитого белка димерной структуры RPH-104 (РФМ-104), который планируется использовать для лечения интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β)-опосредованных заболеваний, таких как подагра, болезнь Бехчета, средиземноморская семейная лихорадка и других.

Регуляторные требования к проведению доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов в Российской Федерации

Современные тенденции развития отечественных регуляторных требований к проведению ДКИ направлены на гармонизацию российских рекомендаций с международными – документами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Европейского Медицинского Агентства (EMA), Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), Международной конференции по гармонизации (ICH) [3, 6-11]. Во многом этому способствует работа организации региональной экономической интеграции - Евразийского экономического союза (ЕАЭС), объединяющего национальные рынки обращения лекарственных средств Российской Федерации, Республики Беларусь, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Казахстан [12].

Евразийской экономической комиссией по вопросам обеспечения качества лекарственных средств выпущен ряд наднациональных регуляторных документов, регламентирующих проведение ДКИ БП [2,4,13]. В Российской Федерации действуют национальные регламентирующие документы, а также рекомендации по проведению ДКИ [14-23]. Подход к проведению ДКИ, применявшийся ранее в Российской Федерации, в некоторых аспектах не совпадает с международными требованиями, например, отличается сложившаяся терминология, классификация исследований, соблюдение правил надлежащей лабораторной практики, требования к объему, последовательности и этапности проведения ДКИ и другие [24]. С 2021 года наднациональные требования ЕАЭС будут приоритетными при регистрации лекарственного препарата, что определяет актуальность их использования при разработке БП [4].

В целом реализуется использование международного опыта разработки БП для получения максимально полной характеристики на уровне производства и доклинических исследований, а также потенциальной возможности проведения клинических исследований и регистрации БП за рубежом.

Особенности формирования программы доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов

Программу ДКИ формируют с учетом правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения [4]. К моменту начала ДКИ важно располагать информацией о физико-химических свойствах БП. Эта информация включена в модуль 3 (качество) общего технического документа регистрационного досье, а также модуль 4, посвященный ДКИ. Модуль

4 включает результаты фармакологических, фармакокинетических и токсикологических ДКИ [4].

Первичную фармакодинамическую активность БП в отношении основного терапевтического показания демонстрируют в тестах *in vitro* и в исследованиях *in vivo* (при наличии подходящих моделей на животных) [2, 3, 5]. Важно получить информацию об эффективных дозах и наиболее приемлемых схемах введения препарата, которые в дальнейшем будут использоваться при лечении пациентов. Обязательны для изучения вторичные фармакодинамические эффекты, не связанные с первичной терапевтической активностью, а также фармакологическая безопасность БП в отношении сердечно-сосудистой, центральной нервной, дыхательной и других систем организма [2, 3, 22].

Чтобы прогнозировать широту терапевтического действия препарата с учетом его экспозиции необходимо до начала клинических исследований понимать особенности абсорбции, распределения и клиренса БП. Для БП проводят как самостоятельные фармакокинетические исследования и оценку биодоступности, так и токсикокинетические исследования в рамках изучения токсичности на релевантных видах животных. Метаболизм БП не требует отдельного изучения, поскольку известно, что белки деградируют до пептидов и аминокислот [2, 3, 21].

При планировании исследований общетоксического действия при однократном и многократном введении БП уделяют внимание изучению иммунологической безопасности (оценка потенциальной иммуногенности, влияние на уровень цитокинов и основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток). Т-зависимый клеточный иммунный ответ можно изучить в рамках исследования длительной токсичности. Оценка местной переносимости включают в исследование токсичности, при этом важно использовать ту лекарственную форму БП, которая будет применяться в клинических исследованиях. Стандартные методы исследований генотоксичности для БП не применяют. Решение в отношении проведения ДКИ репродуктивной и онтогенетической токсичности, а также канцерогенности принимают на основании полученных ранее данных ДКИ, учитывая свойства БП, терапевтическое показание, популяцию пациентов, наличие подходящего вида животных, иммуногенность и т.д. ДКИ должны обеспечить получение исчерпывающей информации для расчета первоначальной безопасной дозы и схемы увеличения доз в клинических исследованиях, понимание органов-мишеней для токсического действия препарата [2, 3, 21].

Оценка физико-химических свойств и контроль качества биотехнологических лекарственных препаратов

Известно, что специфические биологические и иммунохимические свойства активной фармацевтической субстанции БП зависят от особенностей химической и конформационной структуры белка (рис. 1 на 2-й стр. обложки). Группа БП включает молекулы различных классов, поэтому при составлении программы исследований и для подбора методов оценки учитывают специфику конкретного препарата. Как правило, проводят исследование аминокислотной последовательности, вторичной и третичной структуры белка, профиля гликозилирования и других параметров [2, 3]. Для терапевтических моноклональных антител должны быть

определены класс, строение легких цепей, микрогетерогенность, точки гликозилирования, молекулярная масса, N- и C-концевые последовательности, вторичная и третичная структура [21].

При разработке БП необходимо получить данные об основных характеристиках как активной фармацевтической субстанции, так и готовой лекарственной формы, поскольку состав вспомогательных веществ разрабатывается с учетом пути введения препарата в клинической практике и обуславливает стабильность молекулы [2, 5, 21].

Для БП первостепенную роль играет контроль производственных процессов. Изменения клеток системы экспрессии и условий их культивирования при производстве БП влияют на последующие свойства молекулы, например, профиль гликозилирования, вероятность лизиса или агрегации белка. В процессе производства возможно появление примесей: белков родительских клеток, ДНК штамма-продуцента, остаточного белка А, эндотоксинов, а также появление примесей, связанных с активной фармацевтической субстанцией - продуктов деградации, усеченных продуктов, агрегатов и мультимеров. Следует исключить возможность контаминации вирусами, компонентами культуральной среды или материалами, которые были использованы в процессе производства и очистки белка [2, 5, 21]. Многоэтапный процесс производства требует строгого контроля каждой из стадий, поскольку качество произведенного БП влияет на результаты ДКИ.

Фармакодинамика *in vitro*

Изучение эффективности препарата *in vitro* предполагает оценку связывания с мишенью и функциональное тестирование на клеточных линиях. Специфику взаимодействия исследуемого препарата с мишенью можно продемонстрировать различными методами, в частности, используют проточную цитометрию, иммуноферментный анализ, поверхностный плазмонный резонанс и другие [2, 3, 5, 21].

В качестве иллюстрации особенностей проведения ДКИ БП рассмотрим пример разработки компанией Р-Фарм оригинального препарата RPH-104.

RPH-104 — новый антагонист ИЛ-1 с молекулярной массой 153 кДа, представляющий собой гетеродимерный гибридный белок, в котором одна часть состоит из внеклеточного домена человека ИЛ1-R1 и Fc-фрагмента IgG1 человека. Вторая часть гетеродимера состоит из части ИЛ1-RAcP человека и второй версии Fc-фрагмента IgG1 человека. ИЛ-1 является центральным медиатором врожденного иммунитета и воспаления. Семейство цитокинов ИЛ-1 состоит из 11 компонентов, включая наиболее изученные — ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИЛ-1RA, связывающиеся с рецептором ИЛ-1 типа 1 (ИЛ-1R) [25, 26]. После связывания ИЛ-1 α и ИЛ-1 β запускается каскад провоспалительных медиаторов, хемокинов и цитокинов, в отличие от ИЛ-1RA, который не активирует провоспалительные стимулы [27, 28].

RPH-104 является высокоактивным ингибитором ИЛ-1 β -опосредованного сигнального пути, что было продемонстрировано в исследовании ингибирующего действия RPH-104 на ИЛ-1 β -стимулированную секрецию ИЛ-6 клетками линии MRC-5. В серии экспериментов с использованием метода плазмонного резонанса была проведена оценка связывания RPH-104 с ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИЛ-1RA. Результаты исследований демонстри-

руют, что ИЛ-1 β является предпочтительной мишенью RPH-104, поскольку аффинность связывания препарата с ИЛ-1 β выше, чем с ИЛ-1RA и ИЛ-1 α .

Оценка вторичной фармакодинамики *in vitro* для препаратов терапевтических моноклональных антител и гибридных белков, содержащих Fc-фрагмент, включает исследование связывания с Fc γ -рецепторами и изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

Считается, что лекарственные препараты, распознающие антигены на поверхности клетки, могут связываться с Fc γ -рецепторами, расположенными на эффекторных клетках (моноцитах, макрофагах, натуральных киллерах, нейтрофилах и других) или с фрагментом комплемента Iq, индуцировать цитотоксические реакции — АЗКЦ, КЗЦ и прямой апоптоз [29]. Известно, что АЗКЦ и КЗЦ являются критическим эффекторным механизмом действия противоопухолевых биологических препаратов для селективного уничтожения опухолевых клеток. Однако для других видов терапии эти функции могут представлять потенциальный риск появления нежелательных явлений у человека [30].

Связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) способствует увеличению периода полувыведения препарата [31]. FcRn представляет собой гетеродимерный рецептор, гомолог молекулы основного комплекса гистосовместимости класса I, который широко экспрессируется почти во всех клетках крови, а также эндотелиальных клетках, эпителиальных клетках и синцитиотрофобластах плаценты [32, 33]. Механизм FcRn-зависимого рециклинга заключается в pH-зависимом поглощении белка в клетки путем эндоцитоза. Связывание с рецепторами FcRn в эндосомах обеспечивает защиту от разрушения лизосомальными ферментами и последующее возвращение белка обратно в кровотока при физиологическом pH (рис. 2 на 2-й стр. обложки) [34].

Аффинность связывания RPH-104 с Fc-рецепторами (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIb и FcRn) оценивали методом плазмонного резонанса. Было показано, что связывание RPH-104 с Fc-рецепторами ниже по сравнению с контролем — IgG1 человека, что свидетельствует о малой вероятности возникновения реакций цитотоксичности. Однако чтобы исключить потенциальную цитотоксичность были проведены исследования по оценке влияния RPH-104 на АЗКЦ и КЗЦ. В результате проведения экспериментов доказано, что АЗКЦ и КЗЦ для RPH-104 незначительны и обнаруживаются только при использовании препарата в очень высокой концентрации. Эти данные свидетельствуют о низком риске возникновения АЗКЦ и КЗЦ при введении RPH-104 человеку, что было подтверждено в клинических исследованиях препарата.

Для моноклональных антител и слитых белков выполняют оценку тканевой перекрестной реактивности. С помощью этого иммуногистохимического исследования возможно изучить непредусмотренную реактивность или цитотоксичность в отношении тканевых антигенов человека, не являющихся тканями-мишенями для антител заданной специфичности [21]. В Российской Федерации рекомендовано использование 26 типов нормальных тканей одного донора: миндалина, тимус, лимфатические узлы, костный мозг, клетки крови, легкие, печень, почки, желчный пузырь, селезенка, желудок, кишечник, поджелудочная железа, околоушная железа, щитовидная железа, парашитовидная железа, надпочеч-



Рис. 3. Алгоритм принятия решения по проведению ДКИ *in vivo*.

ник, гипофиз, головной мозг, периферические нервы, сердце, поперечно-полосатые мышцы, яичник, яичко, кожа, кровеносные сосуды [21, 35].

В исследовании перекрестной тканевой реактивности RPH-104 оценивали связывание препарата с криообразцами тканей человека и яванских макаков. В качестве контроля использовали ткани небных миндалин человека и белковые пятна ИЛ-1 α и ИЛ-1 β . Препарат RPH-104 и IgG1 (контроль) предварительно конъюгировали с биотином. Было выявлено минимальное специфическое положительное окрашивание комплексом RPH-104–биотин образцов, причем окрашивание для тканей человека и яванских макаков показало высокую сопоставимость.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о предпочтительной мишени препарата RPH-104 — ИЛ-1 β , особенностях вторичной фармакодинамики и безопасности RPH-104 с точки зрения проявления реакций цитотоксичности. Данные исследования перекрестной тканевой реактивности подтверждают возможность использования яванских макаков в ДКИ и дают информацию о специфичности препарата, помогая адекватно оценить его терапевтический эффект в клинических исследованиях.

Подбор подходящего вида для доклинических исследований *in vivo*

Достоверность полученных результатов ДКИ и возможность их использования для планирования клинических исследований зависят от правильности выбора

релевантного (подходящего) вида животных. Релевантным признается вид, у которого экспрессируется и является функционально активным таргетный рецептор или эпитоп (для моноклональных антител). Существуют различные подходы для выбора релевантного вида: тестирование *in vitro*, *ex vivo* исследования на тканях, анализ литературных данных и другие (рис. 3) [2, 3].

In vitro исследования по выбору релевантного вида включают сравнительное межвидовое исследование аффинности связывания БП с мишенью, а также оценку занятости рецепторов и кинетики рецептор-лигандного взаимодействия [2, 3, 21]. При планировании экспериментов необходимо учитывать возможность отличия фактической локализации мишени *in vivo* от теоретически предполагаемой на основании результатов тестов *in vitro*. Таргетная мишень может отсутствовать в здоровом организме и обнаруживаться только в опухолях. У лабораторных животных не исключено участие мишени в процессах, отличных от таковых у человека [2, 3, 36].

Одним из экспериментов, который может быть использован для подбора релевантного вида, является перекрестная тканевая реактивность. Важно принимать во внимание тот факт, что данный способ не является основным, следовательно, его результаты

интерпретируют в комплексе с другими данными, так как само по себе связывание не свидетельствует о наличии биологической активности *in vivo* [2, 3].

Достоверная информация о релевантности вида может быть получена *in silico* путем сравнительного анализа гомологии последовательностей аминокислот таргетного белка человека и различных видов животных. При высокой степени гомологии между разными видами вероятность выявления одинакового связывания с мишенью исследуемого препарата у этих видов будет достаточно большой. Ограничения метода обусловлены тем, что значимость каждой аминокислоты в последовательности различна и иногда трудно оценима. Та часть молекулы, которая отвечает за связывание, должна быть консервативна для всех видов, как и последовательности, отвечающие за поддержание вторичной и третичной структуры белка [37].

Для препарата RPH-104 проводили сравнительный анализ последовательности аминокислот ИЛ-1R1 и ИЛ-1RAcP человека в составе молекулы RPH-104 с гомологичными последовательностями ИЛ-1R и ИЛ-1RAcP других видов животных (мышь, крыса, шимпанзе, игрушка обыкновенная, яванский макак, макак-резус). Сходство последовательностей аминокислот во фрагменте ИЛ-1R1 препарата с гомологичными фрагментами грызунов (мыши и крысы) составляет 64%, тогда как сходство с последовательностями приматов значительно выше (91-99%). Результаты проведенного анализа были подтверждены в экспериментах по ис-

следованию связывания RPH-104 с ИЛ-1 β разных видов методом поверхностного плазмонного резонанса. Было показано, что предпочтительной мишенью для препарата является ИЛ-1 β человека и макаки. Результаты исследования перекрестной тканевой реактивности препарата RPH-104 показали хорошую сопоставимость окрашивания тканей человека и яванских макак, что является дополнительным подтверждением возможности использования яванских макак в ДКИ.

Дополнительно следует отметить, что подтверждение релевантности вида может быть продемонстрировано на моделях заболеваний [2, 3]. Эти исследования позволяют не только оценить фармакологическую активность препарата, но и изучить его фармакокинетику и безопасность для лучшего понимания предполагаемой токсичности, терапевтического индекса, влияния препарата на возможную прогрессию заболевания [2, 3, 36].

***In vivo* исследования эффективности**

Фармакологическую эффективность препарата оценивают с помощью моделей соответствующего заболевания с использованием подходящих видов животных. Модели заболевания *in vivo* предполагают спонтанное или индуцированное развитие заболеваний, нокаут гена (генов), а также использование трансгенных животных [2, 3]. При планировании исследования учитывают возможность предсказать действие БП у человека по результатам, полученным в эксперименте с использованием *in vivo* модели [38].

Препарат RPH-104 разрабатывается для лечения ИЛ-1 β -опосредованных заболеваний: подагры, болезни Бехчета, синдрома Шницлера, средиземноморской семейной лихорадки и других. Согласно литературным данным, доклиническое изучение эффективности препаратов для лечения подагры проводят на модели подагрического артрита с использованием мышей (включая трансгенных мышей), крыс, кроликов или собак в качестве подопытных животных (таблица).

Отсутствие четкого понимания этиологии и патогенеза болезни Бехчета и средиземноморской семейной лихорадки обуславливает сложность создания адекватной *in vivo* модели этих заболеваний [48-55].

Препарат RPH-104 содержит участки рецепторов человека, опосредующие его биологическую активность, которые по своему строению существенно отличаются

от аналогичных рецепторов у всех перечисленных видов животных. В связи с этим представленные выше стандартные модели подагрического артрита не подходят для изучения фармакологической активности препарата RPH-104. Подходящим биологическим видом для изучения фармакологической активности могли бы быть яванские макаки, однако модели подагрического артрита, средиземноморской семейной лихорадки, болезни Бехчета у этого вида животных не разработана. Учитывая оценку эффективности RPH-104 в тестах *in vitro*, фармакологическую активность препарата в *in vivo* моделях не изучали.

Предположение об эффективности препарата RPH-104 у пациентов с острым приступом подагры основывается на сходстве в механизме действия RPH-104 и препарата Канакинумаб (Иларис®), а также доступных данных ДКИ эффективности канакинумаба.

Канакинумаб (Иларис®) — представитель класса ингибиторов ИЛ-1 β , полностью человеческое моноклональное антитело к ИЛ-1 β . Эффективность канакинумаба при ИЛ-1 β -ассоциированном артрите показана в доклинических экспериментах *in vivo* и клинических исследованиях. В ДКИ активность канакинумаба была продемонстрирована на модели ИЛ-1 β -ассоциированного артрита у мышей [56]. В этом исследовании артрит был индуцирован внутрисуставным введением трансгенных мышинных фибробластов, продуцирующих большое количество ИЛ-1 β человека. Канакинумаб, вводимый внутривенно однократно, полностью купировал симптомы артрита [56]. Эффективность канакинумаба при ревматоидном и подагрическом артрите была показана впоследствии в клинических исследованиях [57, 58]. Таким образом, литературные данные по канакинумабу и сходство механизма действия препаратов RPH-104 и канакинумаба создают предпосылки к тому, чтобы считать, что препарат RPH-104 может быть эффективен в терапии пациентов с острым приступом подагры и других ИЛ-1 β -ассоциированных заболеваний.

Немаловажной частью планирования ДКИ является применение этического подхода при проведении исследований *in vivo*. Для БП вопрос использования животных в исследованиях особенно критичен. Как известно, для данного класса препаратов часто единственным релевантным видом являются яванские макаки (особенно для моноклональных антител) [36, 59]. На сегодняшний день в Европе и Соединенных Штатах Америки использование животных в биомедицинских разработках строго регламентированный и контролируемый процесс. Одним из Европейских нормативных актов является Директива 2010/63/еу европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [60, 61]. В документе установлен принцип 3R («replacement, refinement and reduction» - замена, оптимизация и сокращение) - правила, предполагающие использование животных в экспериментах только при отсутствии удовлетворительного альтернативного метода [36, 60, 61].

В Российской Федерации при планировании любого *in vivo* исследования также требуется применять принцип 3R [20]. Продолжительность исследования должна быть обоснована, и в зависимости от используемых конечных точек учитывают возможность не проводить эвтаназию животных [2]. Принимая во внимание этические принципы обращения с лабораторными животными, широко обсуждаются и внедряются альтернативные

Биологические модели подагры

Модель	Вид	Ссылка
Подагрический артрит (внутрисуставное введение мононатрия урата)	Мыши	[39]
	Крысы	[40]
	Кролики	[41]
	Собаки	[42, 43]
	Трансгенные мыши C57BL/6J, дефицитные по рецептору к ФНО- α	[44]
Трансгенные мыши, дефицитные по транспортному мембранному белку TRPA1	[45]	
Трансгенные мыши C57BL/6J, дефицитные по ИЛ-1 β и ИЛ-1R1	[46]	
Трансгенные мыши C57BL/6J, дефицитные по рецепторному белку G	[47]	

способы доказательства эффективности препаратов с использованием методов *in vitro* (рис. 3) [36, 60, 61].

Исследования фармакокинетики и токсичности биотехнологических препаратов

Для БП фармакокинетические (токсикокинетические) исследования и оценку биодоступности нередко изучают в рамках исследований токсичности на релевантных видах животных [2]. Для RPH-104 исследование токсикокинетики и биодоступности проводили при однократном и многократном 4-недельном введении яванским макакам, используя данные фармакокинетического моделирования, в рамках которого были вычислены некомпартментные характеристики на основании спрогнозированных значений показателей фармакокинетики.

Основной подход к оценке общетоксического действия препарата при однократном и многократном введении предполагает проведение исследований с использованием двух подходящих видов животных, у которых экспрессируется соответствующая таргетная молекула [2, 3, 36].

Стратегия развития БП направлена на разработку гуманизированных и полностью человеческих препаратов, чтобы уменьшить их иммуногенность при введении человеку. Следовательно, по причине высокой видоспецифичности для многих БП не применимы стандартные исследования токсичности на обычно используемых видах (крысы, собаки). Чаще всего в ДКИ используют яванских макаков (*Сynomolgus monkey*), однако в некоторых случаях проводят исследования на макаках-резус (*Macaca mulatta*) или обыкновенных игрунках (*Callithrix jacchus*) [36].

Если релевантного вида не существует, рекомендуется подбор трансгенных животных, у которых экспрессируются рецепторы, сходные по структуре с рецепторами человека или использование гомологичных белков. При обосновании невозможности использовать эти подходы, допускается проведение ДКИ 14-дневной токсичности на любом виде животных с целью неспецифической оценки потенциальной токсичности и тестирования безопасности в отношении наиболее важных систем организма [2, 3].

Дизайн ДКИ токсичности определяет получение исчерпывающей информации о свойствах препарата. Число животных, способ введения, выбор доз играют решающую роль при планировании ДКИ токсичности. Объем выборки должен быть достаточным, а способ и частота введения должны быть максимально близки к предполагаемым для использования в клинической практике. При выборе продолжительности исследования следует принимать во внимание длительность периода полувыведения препарата. Необходимо подобрать корректный объем вводимого препарата, учитывать фармакокинетические характеристики и биологическую доступность препарата у тех видов животных, которые используются в эксперименте. Используемый в исследовании диапазон доз выбирают таким образом, чтобы получить информацию о дозовой зависимости токсического действия, токсических дозах и высшей нетоксической дозе [2, 3, 5, 20, 21, 36].

До начала токсикологических исследований при многократном введении важно принять во внимание возможную иммуногенность БП у животных. При повторном введении человеческого белка организм жи-

вотного может вырабатывать нейтрализующие антитела к исследуемому препарату, что в свою очередь приведет к уменьшению его экспозиции [7, 37]. В ДКИ токсичности при многократном введении БП необходимо проводить оценку концентрации антител к препарату [2, 3, 7].

До начала клинических исследований для RPH-104 были проведены исследования токсичности при однократном и многократном введении. Исследование 4-недельной токсичности RPH-104 с 4-недельным периодом восстановления было выполнено на 16 самцах и 16 самках яванских макаков. RPH-104 вводили в дозах 5, 50 и 100 мг/кг подкожно один раз в неделю. В качестве контроля был использован буферный раствор. В ходе эксперимента регистрировали клинические симптомы, массу тела, артериальное давление, частоту дыхания, уровень цитокинов, проводили электрокардиографию, нейрорепродуктивную оценку, иммунофенотипирование, офтальмологическое и гистопатологическое исследование. В результате исследования было установлено, что введение RPH-104 в дозе 5 мг/кг не вызвало появления признаков токсичности. При введении препарата в дозах 50 и 100 мг/кг у животных были выявлены легкие обратимые нарушения двигательной активности, дискоординация движений и незначительные лабораторные отклонения, что было связано с выработкой антител к препарату. Согласно данным проведенного исследования высшая нетоксическая доза RPH-104 при 4-недельном введении яванским макакам составляет 100 мг/кг.

На основании результатов ДКИ RPH-104 было получено разрешение на клиническое исследование первой фазы на здоровых добровольцах, которое было успешно завершено. В настоящее время проводится исследование 26-недельной токсичности RPH-104 на яванских макаках. Получение данных этого ДКИ позволит принять решение о проведении клинических исследований у пациентов с ИЛ-1 β -опосредованными заболеваниями, предусматривающими длительную терапию RPH-104.

Заключение

Таким образом, ДКИ БП необходимо проводить на подходящих видах животных, что не всегда возможно из-за высокой видовой специфичности таргетных молекул. Введение человеческих белков животным приводит к иммуногенности, которую необходимо учитывать при интерпретации результатов. Следует отметить, что данные по иммуногенности, полученные у животных, не предсказывают возможность появления иммуногенности у человека.

Современные подходы к разработке БП в отдельных случаях позволяют заменить проведение исследований на животных использованием моделей *in vitro*. Выбранная стратегия должна гарантировать получение исчерпывающей информации для определения первоначальной безопасной дозы и последующей схемы повышения доз в клинических исследованиях. Важно выявить потенциальные органы-мишени токсического воздействия препарата, установить обратимость проявлений токсичности, определить параметры безопасности лекарственного препарата.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (остальные источники см. REFERENCES)

1. Комплексная программа развития биотехнологий в российской Федерации на период до 2020 года от 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8.
2. Решение Совета ЕЭК №89 «Об утверждении правил исследования биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 г.
4. Решение Совета ЕЭК №78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» от 03.11.2016 г.
5. Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Солдатов А.А., Бондарев В.П., Бунятян Н.Д., Меркулов В.А. и др. Особенности доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов. *Иммунология*. 2015; 36(5): 306-12.
12. Декларация от 18 ноября 2011 года «О евразийской экономической интеграции».
13. Решение Совета ЕЭК №81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г.
14. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
15. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».
16. ГОСТ Р 56701-2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств. М.: Стандартинформ; 2016.
17. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ; 2016.
18. ГОСТ Р 56699-2015. ДКИ безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. М.: Стандартинформ; 2016.
19. ГОСТ Р 56700-2015. Доклинические фармакологические исследования безопасности. М.: Стандартинформ; 2016.
20. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014.
21. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.
22. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 3. М.: Гриф и К; 2014.
23. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 4. М.: Гриф и К; 2014.
24. Васильев А.Н., Ниязов Р.Р., Гавришина Е.В., Драницына М.А., Куличев Д.А. Проблемы планирования и проведения доклинических исследований в Российской Федерации. *Ремедиум*. 2017; 9: 2-14.
35. Остроухова Т.Ю., Иванов В.А., Морозова Е.Л., Иванов Р.А. Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека: основные подходы и методические приемы. *БИОпрепараты*. 2016; 16(4): 237-44.
60. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.
61. Вольская Е. Оптимизация доклинических исследований: на пути к гуманному опытам. *Ремедиум*. 2016; 1-2: 6-12.
- products for medicinal use” dated 3 November 2016. (in Russian)
5. Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Soldatov A.A., Bondarev V.P., Bunyatjan N.D., Merkulov V.A. et al. Specificity of nonclinical studies of biotechnology derived medicinal product. *Immunologiy*. 2015; 36(5): 306-12. (in Russian)
6. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins (EMA/cHMP/BMwP/14327/2006). London: European Medicines Agency; 2008.
7. Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for *in vivo* clinical use (EMA/cHMP/ BMwP/86289/2010). London: European Medicines Agency; 2012.
8. Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London: European Medicines Agency; 2008.
9. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DnA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, no. 814. world Health Organization October. 2013.
10. Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development, 2nd ed. Geneva, UNDP/world Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 2009.
11. Guidance for Industry. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products; 2014.
12. Declaration dated November, 18 2011. «About Eurasian economic integration». (In Russian)
13. Resolution № 81 of Council of the Eurasian Economic Commission “Concerning adoption of the Good laboratory practice of EAEU in the field of drug circulation” dated 3 November 2016. (in Russian)
14. Federal Law of the Russian Federation, April 12, 2010, No. 61-FZ «On circulation of Medicines». (in Russian)
15. Executive Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 199н “On approval of the Good Laboratory Practice requirements” dated 01 April 2016. (in Russian)
16. State Standard R 56701-2015. Medicinal products for medical use. Guidelines for the planning of preclinical safety studies for the purpose of subsequent clinical trials and registration of drugs. Moscow: Standartinform; 2016. (in Russian)
17. Interstate Standard GOST 33044-2014. The principles of Good Laboratory Practice. Moscow: Standartinform; 2016. (in Russian)
18. State Standard R 56699-2015. Nonclinical safety study biotechnology derived medicinal products. Moscow: Standartinform; 2016. (in Russian)
19. State Standard R 56700-2015. Nonclinical pharmacological safety studies. Moscow: Standartinform; 2016. (in Russian)
20. Guidance on evaluation of medicines. V. I. Moscow: Grif I K; 2014. (in Russian)
21. Guidance on preclinical studies of medicinal products conduction. part. II. Moscow: Grif I K; 2012. (in Russian)
22. Guidance on evaluation of medicines. V. III. Moscow: Grif I K; 2014. (in Russian)
23. Guidance on evaluation of medicines. V. IV. Moscow: Grif I K; 2014. (in Russian)
24. Vasiliev A.N., Niyazov R.R., Gavrishina E.V., Dranytsina M.A., Kulichev D.A. Problems of planning and conduct of preclinical trials in the Russian Federation. *Remedium*. 2017; 9: 2-14. (in Russian)
25. Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. 2013; 39(6): 1003-18. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.010
26. Schett G., Dayer J.M., Manger B. Interleukin 1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12(1): 14-24. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.166
27. Dinarello C.A., Simon A., Van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11(8): 633-652. DOI: 10.1038/nrd3800
28. Dinarello C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011; 111(14): 3720-32. DOI: 10.1182/blood-2010-07-273417
29. Masuda A., Yoshida M., Shiomi H., Morita Y., Kutsumi H., Inokuchi H. et al. Role of Fc Receptors as a therapeutic target. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009; 8(1): 80-6.
30. Beck A., Reichert J.M. Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies. *MAbs*. 2011; 3(5): 415-6. DOI: 10.4161/mabs.3.5.17334

REFERENCES

1. Comprehensive program for development of biotechnology in Russian Federation until year 2020 dated April, 24 2012. №1853п-П8. (in Russian)
2. Resolution № 89 of Council of the Eurasian Economic Commission “Concerning adoption of guidance on biotechnology derived medicinal products studies in EAEU” dated 3 November 2016. (in Russian)
3. ICH S6 (R1) guideline. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Geneva, International conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2011.
4. Resolution № 78 of Council of the Eurasian Economic Commission “Concerning guidance of registration and expertise of medicinal

31. Baker K., Qiao S.-W., Kuo T., Kobayashi K., Yoshida M., Lencer W.I., Blumberg R.S. Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor. *FcRn. Semin Immunopathol.* 2009; 31: 223-6. DOI: 10.1007/s00281-009-0160-9
32. Levin D., Golding B., Strome S.E., Sauna Z.E. Fc fusion as a platform technology: potential for modulating immunogenicity. *Trends Biotechnol.* 2015; 33(1): 27-34. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.11.001
33. Giragossian C., Clark T., Piche-Nicholas N., Bowman C.J. Neonatal Fc receptor and its role in the absorption, distribution, metabolism and excretion of immunoglobulin G-based biotherapeutics. *Curr Drug Metab.* 2013; 14: 764-90.
34. Baker K., Qiao S.-W., Kuo T., Kobayashi K., Yoshida M., Lencer W.I., Blumberg R.S. Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor. *FcRn. Semin Immunopathol.* 2009; 31: 223-6. DOI: 10.1007/s00281-009-0160-9
35. Ostrouhova Ju., Ivanov V.A., Morozova E.L., Ivanov R.A. Cross-reactivity study of therapeutic medicinal products based on monoclonal antibodies in human tissue: main principles and methodology. *BIOpreparaty.* 2016; 16(4): 237-44. (in Russian)
36. Joy A. Cavagnaro. Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2008.
37. Subramanyam M, Rinaldi N, Mertsching E, Hutto D. Selection of Relevant Species. In: Joy A. Cavagnaro, eds. *Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals.* Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2008; 181-207.
38. Parvova I, Danchev N, Hristov E. Animal models of human diseases and their significance for clinical studies of new drugs. *J Clin Med* 2011; 4(1): 19-29.
39. Wang P., Ren D., Chen Y., Jian M., Wang R., Wang Y.G. Effect of sodium alginate addition to resveratrol on acute gouty arthritis. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 36 (1): 201-7.
40. Dos Santos R.M., Oliveira S.M., Silva C.R., Hoffmeister C., Ferreira J., Assreuy J. Anti-nociceptive and anti-edematogenic effects of glibenclamide in a model of acute gouty attack in rats. *Inflamm Res.* 2013; 62: 617-25.
41. Pineda C., Fuentes-Gomez A.J., Hernandez-Diaz C., Zamudio-Cuevas Y., Fernandez-Torres J., Lopez-Macay A. et al. Animal model of acute gout reproduces the inflammatory and ultrasonographic joint changes of human gout. *Arthrit Res Ther.* 2015; 17(37): 1-9.
42. Phelps P., McCarty D.J. Suppressing effects of indomethacin on crystal-induced inflammation in canine joints and on neutrophilic motility *in vitro.* *JPET.* 1967; 158(3): 546-553
43. Schumacher H.R., Phelps P., Agudelo C.A. Urate crystal induced inflammation in dog joints: sequence of synovial changes. *J Rheumatol.* 1974; 1(1): 102-13.
44. Amaral F.A., Bastos L.F., Oliveira T.H., Dias A.C., Oliveira V.L., Tavares L.D. et al. Transmembrane TNF- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. *Eur J Immunol.* 2016; (46): 204-11.
45. Moilanen L.J., Hamalainen M., Lentimaki L., Nieminen R.M., Moilanen E. Urate crystal induced inflammation and joint pain are reduced in Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Deficient mice – potential role for Transient Receptor Potential Ankyrin1 in gout. *Plos one.* 2015; 10(2): 1-13.
46. Reber L.L., Marichal T., Sokolove J., Starkl P., Gaudenzio N., Iwakura I. et al. Mast cell-derived IL-1 β contributes to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. *Arthrit Rheumat.* 2014; 66(10): 2881-91.
47. Vieira A.T., Macia L., Galvao I., Martins S.F., Canesso M.C., Amaral F.A. et al. A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthrit Rheumat.* 2015; 67(6): 1646-56.
48. Yildirim O. Animal Models in Behçet's Disease. *Patholog Res Int.* 2012; 2012: 1-8.
49. Cori Y., Miyazawa S., Nishiyama S. Experimental Behçet's disease and ultrastructural X-ray microanalysis of pathological tissues. *Journal of dermatology.* 1979; 6(1): 31-7.
50. Sohn S., Lutz M., Kwon H.J., Konwalinka G., Lee S., Schirmer M. Therapeutic effects of gemcitabine on cutaneous manifestations in an Adamantiades- Behçet's disease-like mouse model. *Experimental Dermatology.* 2004; 13(10): 630-4.
51. Islam S.M.S., Sohn S. HSV-induced systemic inflammation as an animal model for Behçet's disease and therapeutic applications. *Viruses.* 2018; 10(9): 1-14.
52. Chae J.J., Cho Y.H., Lee G.S., Cheng J., Liu P.P., Feigenbaum L. et al. Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity.* 2011; 34(5): 755-68.
53. Hofmann S.R., Heymann M.C., Hermsdorf A., Roesen-Wolff A. Recent advances in Autoinflammatory disease and animal models. *J Genet Syndr Ther.* 2011.
54. Chae J.J., Komarow H.D., Cheng J., Wood G., Raben N., Liu P.P. et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell;* 11 (3): 591-604.
55. Kanneganti A., Malireddi S.R.K., Saavedra P.H.V., Walle L.V., Gorp H.V., Kambara H. et al. GSDMD is critical for autoinflammatory pathology in a mouse model of Familial Mediterranean Fever. *J Exp Med.* 2018; 215(6): 1519-29.
56. Alten R., Gram H., Joosten L.A. et al. The human anti-IL-1 β monoclonal antibody ACZ 885 is effective in joint inflammation model in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthrit Res Ther.* 2008;10(3).
57. Church L.D., McDermott M.F. Canakinumab, a fully human mAb against IL-1 β for the potential treatment of inflammatory disorders. *Curr Opin Mol Ther.* 2009; 11(1): 1-10.
58. Dhimolea E. Canakinumab, mAbs. 2010; 2(1): 3-13.
59. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research 2006. <http://www.nc3rs.org.uk>
60. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes dated 22 September 2010. (in Russian)
61. Vol'skaja E. Nonclinical studies optimization: to the humane experiments. *Remedium.* 2016; 1-2: 6-12. (in Russian)

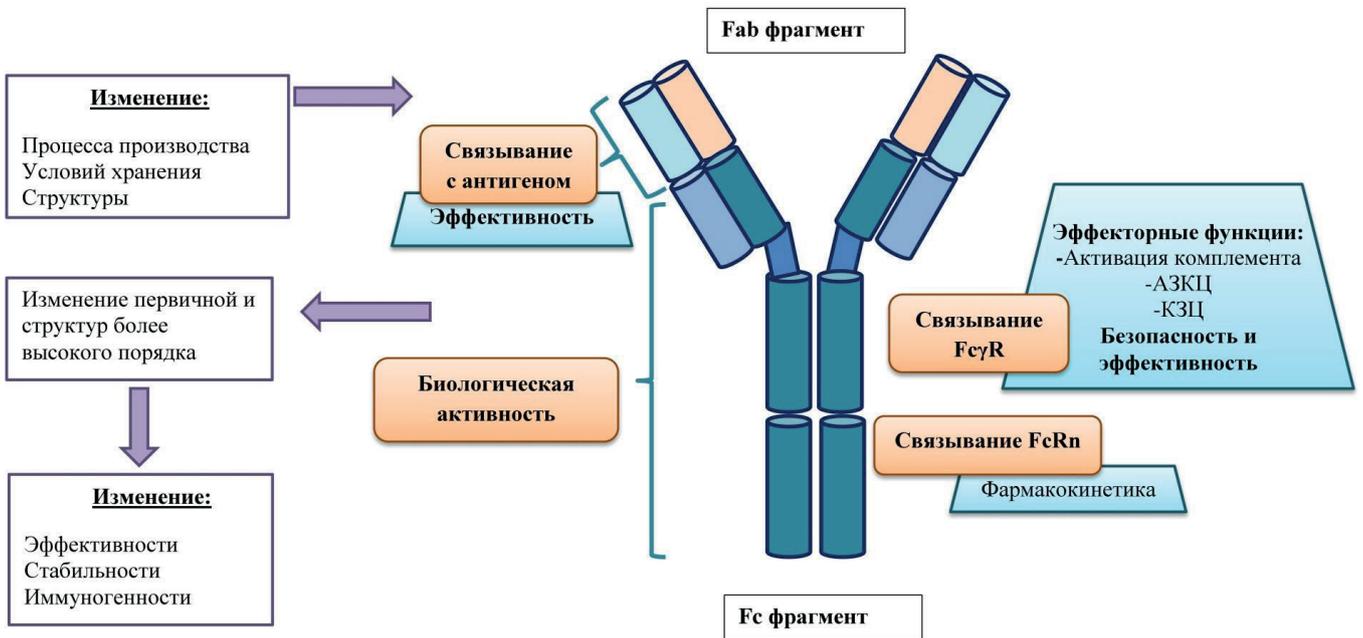


Рис. 1. Влияние структуры терапевтического моноклонального антитела на его биологические свойства.

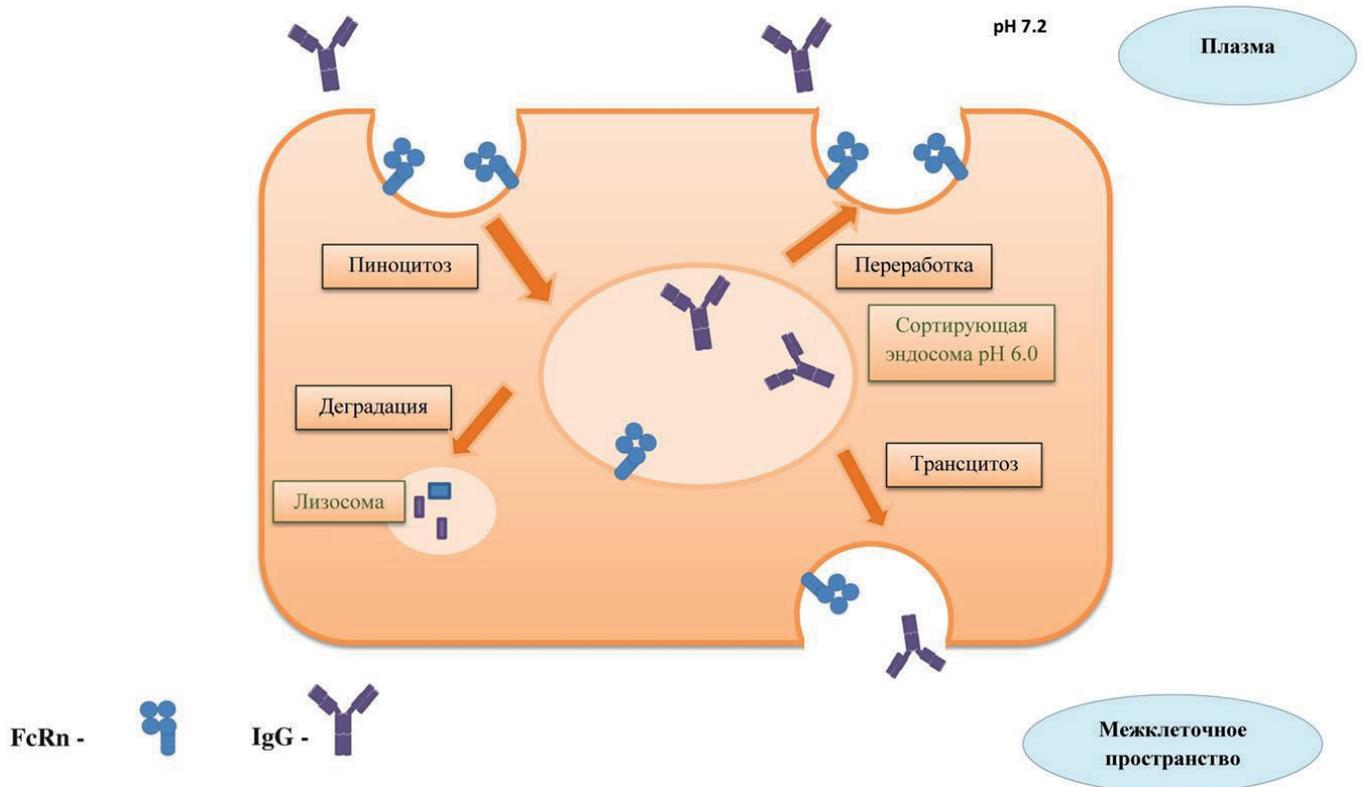


Рис. 2. Механизм влияния FcRn на фармакокинетику IgG.