

ЗВІТ
про доклінічні дослідження

1. Назва лікарського засобу (за наявності - номер реєстраційного посвідчення)	ГАВРЕТО
1) тип лікарського засобу, за яким проводилася або планується реєстрація	Лікарський засіб за повним досьє (автономне досьє), інший лікарський засіб, нова діюча речовина згідно пункту 1 (підпункту 1.1) розділу III Порядку наказу МОЗ України від 23 липня 2015 року № 460
2) Проведені дослідження:	<input checked="" type="checkbox"/> так <input type="checkbox"/> ні якщо ні, обґрунтувати
2. Фармакологія:	Пралсетиніб розроблений як потужний та селективний інгібітор онкогенних перебудованих під час трансфекції (RET) мутантних білків та білків злиття.
1) первинна фармакодинаміка	<p>Інгібіція RET дикого типу (WT) та онкогенних мутантів і злиття RET in vitro</p> <p>In vitro пралсетиніб інгібував WT RET ($IC_{50} = 0,43$ нмоль), кінази RET V804L ($IC_{50} = 0,33$ нмоль), RET V804M ($IC_{50} = 0,38$ нмоль) та RET M918T ($IC_{50} = 0,40$ нмоль), а також кіназу злиття CCDC6-RET ($IC_{50} = 0,45$ нмоль). Пралсетиніб мав щонайменше в 10 разів потужніший вплив на RET у біохімічному аналізі порівняно з кабозантінібом та вандетанібом (звіт BPM-0015).</p> <p>З метою диференціювання пралсетинібу від мультикіназних інгібіторів з біохімічною активністю до RET, вивчали активність пралсетинібу щодо рекомбінантного рецептора із вбудованою кіназою вставкою (KDR) (також відомий як рецептор фактора росту судинного ендотелію [VEGFR] 2) і рецептора 1 фактора росту фібробластів (FGFR), оскільки інгібіція цих кіназ асоціюється із дозолімітуючим токсичним впливом у людини (звіт BPM-0015). Пралсетиніб був у 81 та у 26 разів активнішим щодо WT RET, ніж до KDR/VEGFR2 та FGFR1 відповідно. На відміну, мультикіназні інгібітори кабозантініб, вандетаніб і регорафеніб пригнічували KDR у порівнянні з WT RET приблизно однаково або більш інтенсивно.</p> <p>Вибірковість впливу пралсетинібу на RET порівняно з іншими кіназами людини вперше була охарактеризована за допомогою аналізу профілю зв'язування із застосуванням панелі більше 450 кіназ людини та значущих для захворювання мутантних кіназ (звіти BLU005-03-s, BLU005-04-p). Пралсетиніб мав високу ступінь селективності щодо RET і мутантних форм кінази RET порівняно з усіма випробовуваними кіназами. При скринінговій концентрації 1000 нмоль пралсетиніб зв'язував 7% кіназ у панелі (відсоток контролю < 10%). Для визначення афінності зв'язування для кіназ, що зв'язувалися з пралсетинібом при скринінгу кінома та інших</p>

Сергій Віталійович
Ілля - Максим П.В.

додаткових кіназ, що представляють інтерес, була визначена константа дисоціації (K_d). Визначення K_d продемонструвало, що додатково до RET (RET $K_d = 0,39$ нмоль) пралсетиніб виявляв дію щодо 21 кінази із показником $K_d < 50$ нмоль, у той час як пралсетиніб зв'язував усі інші протестовані кінази із $K_d > 50$ нмоль, що у 125 разів перевищувало афінність зв'язування пралсетинібу з RET. На заключення, пралсетиніб проявляв вищу ніж у 100 разів біохімічну селективність для RET порівняно з 95 % кінома, випробовуваного в аналізах зв'язування. Окрім того, лише Янус-кіназа (JAK)1, JAK2 і кіназа рецептора тропоміозину C продемонстрували значення K_d в межах 10-кратного показника для RET, що додатково демонструє активність та селективність пралсетинібу.

Була досліджена здатність пралсетинібу інгібувати ферментативну активність великої панелі кіназ (звіт BPM-0022). Аналіз інгібуючої активності пралсетинібу у одній концентрації 0,3 мкМ на панелі 374 кіназ ідентифікував 22 кінази, інгібовані пралсетинібом на > 50 %. Були виконані подальші аналізи для визначення IC_{50} пралсетинібу для кожної із 22 кіназ, ідентифікованих при скринінгу великої панелі, що дало можливість порівняти активність пралсетинібу щодо декількох кіназ. Дані щодо селективності пралсетинібу в цьому скринінгу кіназної активності *in vitro* були подібними до даних, отриманих в описаному вище аналізі зв'язування *in vitro*, і свідчать, що пралсетиніб є потужним інгібітором кіназної активності RET. Пралсетиніб є більш потужним інгібітором RET, ніж будь-якої іншої з випробовуваних кіназ, і лише інші 2 кінази пригнічувались пралсетинібом із IC_{50} в межах 20-кратної інгібуючої активності щодо RET: рецептор домена дискоїдину 1 і JAK1 із IC_{50} у 14 та 16 разів менш активною відповідно.

У клітинних системах активність пралсетинібу визначалась шляхом інгібіції автофосфорилування мутантного RET або злиття RET, RET-залежної передачі сигналу та інгібіції RET-залежної проліферації клітин. У моделях Ba/F3, розроблених для експресії KIF5B-RET, пралсетиніб потужно пригнічував передачу сигналу, опосередкованого білком злиття RET, що визначалось інгібіцією автофосфорилування RET ($IC_{50} = 5$ нмоль). Кабозантініб і вандетаніб в цих клітинних аналізах були в 12 разів ($IC_{50} = 61,9$ нмоль) та в 167 разів ($IC_{50} = 833,1$ нмоль) менш активними, ніж пралсетиніб, відповідно (звіт BPM-0016). В аналізі проліферації пралсетиніб пригнічував KIF5B-RET-залежний ріст клітин Ba/F3 із IC_{50} у діапазоні від 4,6 до 21,9 нмоль.

Інгібіція активності RET пралсетинібом також пригнічувала проліферацію цієї клітинної лінії, що експресує CCDC6-RET (звіт BPM-0017). Подібним чином пралсетиніб пригнічував RET-опосередкований шлях передачі сигналу і RET-залежну проліферацію клітинних ліній MTC TT та MZ-CRC-1 людини, обумовлену мутаціями RET C634W або RET M918T відповідно. В

Терешко Віктор
Доктор-медицинский М.В.

усіх RET-опосередкованих випробовуваних клітинних лініях пралсетиніб пригнічував активність RET і RET-обумовлену проліферацію більш потужно, ніж мультикіназні інгібітори кабозантініб та вандетаніб (звіти BPM-0016 і BPM-0017). На відміну, пралсетиніб погано пригнічував проліферацію первинних клітин Ва/Ф3, які не експресують злиття KIF5B-RET ($IC_{50} = 1873,1$ нмоль) (звіт BPM-0016), що демонструє селективність пралсетинібу щодо клітинних ліній, залежних від онкогенного RET.

З метою дослідження селективності пралсетинібу на рівні клітин активність пралсетинібу щодо опосередкованих KDR/VEGFR і FGFR шляхів передачі сигналу вивчалась за допомогою традиційних клітинних моделей для кожного кіназа-опосередкованого шляху передачі сигналу. Шляхи KDR/VEGFR і FGFR моніторувались за допомогою фосфо-специфічних антитіл для кожного сімейства рецепторів, у той час як опосередкований JAK шлях передачі сигналу моніторувався шляхом фосфорилування трансдуктора сигналу субстрату JAK2 та активатора транскрипції 5. Пралсетиніб пригнічував опосередковані KDR/VEGFR, FGFR та JAK шляхи передачі сигналу зі зменшеною активністю порівняно з клітинною інгібіцією RET. Пралсетиніб був у 14, 40 та 12 разів активнішим щодо впливу на RET в клітинах порівняно з представниками сімейства KDR/VEGFR, FGFR або JAK (звіт BPM-0018).

Інгібіція онкогенної активності RET *in vivo*

Протипухлинна ефективність пралсетинібу була продемонстрована в декількох RET-опосередкованих моделях *in vivo*.

Проведено дослідження для оцінки послідовностей кіназного домена RET у різних видів щодо відмінностей в послідовності, які можуть суттєво впливати на афінність зв'язування BLU-667 з природним кіназним доменом RET. Аналіз виявив, що щури, миші, собаки та мавпи мають ідентичні або високогомологічні амінокислоти, які оточують ділянку зв'язування BLU-667 із RET, що робить усі ці види придатними для оцінки RET-опосередкованої фармакології в доклінічних токсикологічних дослідженнях (звіт BPM-0021).

Модель аллогенного трансплантата Ва/Ф3-KIF5B-RET була розроблена шляхом створення залежних від злиття KIF5B-RET клітин Ва/Ф3 (звіт BPM-0019). Пралсетиніб застосовували перорально дозами 3, 10, 30 мг/кг два рази на добу або 20 мг/кг один раз на добу, що призвело до стійкої та залежної від дози інгібіції росту Ва/Ф3-KIF5B-RET алогенних пухлин. У дозах 10 мг/кг два рази на добу, 30 мг/кг два рази на добу або 20 мг/кг один раз на добу прийом пралсетинібу призвів до повної інгібіції росту та регресії пухлини. Усі дози пралсетинібу добре переносились, при цьому не спостерігалось суттєвих змін маси тіла тварин. На відміну від цього, застосування кабозантінібу в максимальній переносимій дозі (MTD) для мишей (60 мг/кг один раз на добу) призвело до неповної інгібіції

Гершмаєв Віктор
 Д.А. Фіщенко М.В.

росту пухлини (TGI) (73 %) і швидкого погіршення здоров'я тварин із кількома смертями в день 15 (звіт CPB-P16-5665).

Протипухлинну ефективність пралсетинібу оцінювали в моделі ортотопічної інокуляції Va/F3-KIF5B-RET-luc у головний мозк (звіт CPB-P18-21802). Пралсетиніб при пероральному застосуванні дозою 10 та 30 мг/кг два рази добу призводив до збільшення виживаності порівняно з контрольною групою, яка отримувала носій лікарського засобу; це свідчить про протипухлинну активність пралсетинібу щодо внутрішньочерепних пухлин. Усі дози пралсетинібу добре переносились.

Протипухлинну ефективність пралсетинібу також вивчали в моделі Va/F3-KIF5B-RET (V804L) підшкірного алогенного трансплантата пухлини в BALB/c безтимусних мишей для визначення активності пралсетинібу щодо білка злиття KIF5B-RET V804L (звіт CPB-P15-5515). Пралсетиніб при застосуванні перорально дозами 3, 10, 30 мг/кг два рази на добу або 20 мг/кг один раз на добу призводив до стійкої та залежної від дози інгібіції росту Va/F3-KIF5B-RET (V804L) алотрансплантата пухлини через 14 днів. При застосуванні доз 10 мг/кг, 30 мг/кг два рази на добу або 20 мг/кг один раз на добу пралсетиніб призводив до повної TGI та регресії пухлини при прийомі дози 30 мг/кг два рази добу. Усі дози пралсетинібу добре переносились, не впливаючи на активність або зовнішній вигляд та мінімально впливаючи на масу тіла тварин при застосуванні в найвищій дозі. Декілька мишей, які отримували носій лікарського засобу та кабозантініб, були виявлені мертвими з дня 12 до дня 14, при цьому TGI не спостерігалось.

Для оцінки прямої інгібіції кіназної активності злиття KIF5B-RET (V804L) в пухлинах Va/F3-KIF5B-RET (V804L) пралсетиніб застосовували перорально мишам-носіям пухлини (3, 10 або 30 мг/кг два рази на добу, або 20 мг/кг один раз на добу) протягом 4 днів, і забір плазми та пухлини здійснювали у окремих мишей через 4, 12 або 24 години після прийому останньої дози (звіт BPM-0020). Концентрації пралсетинібу в плазмі крові визначали методом рідинної хроматографії/тандемної мас-спектрометрії, а інгібіцію KIF5B-RET (V804L)-опосередкованої передачі сигналу в тканинах пухлини оцінювали за допомогою фосфо-RET твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) та імуноблотингу. Кількісне визначення сигналу фосфо-RET методом ELISA визначало відсоток інгібіції KIF5B-RET V804L у лікованих пралсетинібом тварин порівняно з контрольними, яким вводили носій лікарського засобу. Пригнічення нисхідного шляху RET-опосередкованої передачі сигналу було продемонстровано шляхом інгібіції Shc фосфорильовання. Спостерігалася залежна від дози та часу кореляція між концентрацією пралсетинібу в плазмі крові мишей та рівнем фосфорильованої KIF5B-RET (V804L). У дозах, що призводили до 100 % TGI в дослідженнях ефективності (пралсетиніб дозою 10 та 30 мг/кг два рази на добу) (звіт CPB-P15-5515), дослідження

Тереза Вітні
Доктор-вчений Д.В.

фармакодинаміки (ФД) продемонстрували, що інгібіція KIF5B-RET (V804L) досягла 90 %.

Збір плазми крові і пухлин у окремих мишей-носіїв пухлин Ba/F3-KIF5B-RET або Ba/F3-KIF5B-RET (V804L) проводився через 4, 12 або 24 години після прийому пралсетинібу для визначення зв'язку між концентрацією пралсетинібу в плазмі крові та кіназною активністю RET у пухлинах. Кіназна активність RET була виявлена за допомогою фосфо-RET імуноблоту та ELISA. Компіляція 175 фармакокінетичних/ФД даних, зібраних після перорального прийому пралсетинібу в багаторазових експериментах з алотрансплантатом на цих 2 моделях, продемонструвала зниження RET-кіназної активності в пухлинах з підвищенням рівня пралсетинібу в плазмі крові. Стійка протипухлинна ефективність асоціювалась із дозами пралсетинібу, що продемонстрували інгібіцію RET кінази приблизно на рівні 90 %. Концентрація в плазмі крові мишей, необхідна для 90 % інгібіції фосфорилування RET, в усіх експериментах була розрахована за допомогою підбору кривої нелінійної регресії за 4 параметрами і була визначена на рівні 769 нг/мл (звіт BPM-0020).

Додатково до розроблених моделей алотрансплантата Ba/F3-KIF5B-RET, пралсетиніб продемонстрував стійку протипухлинну активність в моделі KIF5B-RET NSCLC PDX. Застосування пралсетинібу перорально протягом 28 днів дозами 3, 10 або 30 мг/кг два рази на добу або 60 мг/кг один раз на добу продемонструвало суттєву та залежну від дози TGI порівняно з тваринами, які отримували носій лікарського засобу. Пралсетиніб дозою 10 мг/кг два рази на добу призводив до TGI на рівні 94 %; дозами 30 мг/кг два рази добу і 60 мг/кг один раз добу індукував повну TGI. Пралсетиніб добре переносився впродовж експерименту і при цьому не спостерігалось змін маси тіла (звіт 1110-003).

Протипухлинну активність пралсетинібу оцінювали в додаткових RET-опосередкованих моделях, включаючи клітинну лінію ксенотрансплантата медулярного раку щитоподібної залози (MPЩЗ), обумовленого мутацією RET C634W, і отриманого у пацієнта ксенотрансплантата (PDX) колоректального раку зі злиттям CCDC6-RET. Пероральний прийом пралсетинібу дозою 3, 10, 30 мг/кг два рази на добу або 60 мг/кг один раз на добу призвів до протипухлинної ефективності із повною TGI, що спостерігалася в обох моделях при застосуванні дозами 10 та 30 мг/кг два рази на добу та 60 мг/кг один раз на добу (звіти CPB-P16-5645, E0400-U1608). Пралсетиніб добре переносився протягом періодів прийому. Кабозантініб застосовувався мишам в MTD (60 мг/кг один раз на добу) і продемонстрував протипухлинну активність, подібну до пралсетинібу. Однак, в експерименті з використанням ксенотрансплантата клітинної лінії TT тварини, які отримували кабозантініб, страждали від швидкого погіршення здоров'я, включаючи 1 та 3 смерті на 14 і 15 дні відповідно. Подібно до

Тереза Віршич
Дир. Масок Т.В.

	<p>моделей алотрансплантата Ва/F3-KIF5B-RET, таке швидке погіршення здоров'я вимагало евтаназії тварин з цієї групи лікування.</p> <p>Для підтвердження внутрішньочерепної протипухлинної активності пралсетинібу щодо злиття CCDC6-RET сполуку оцінювали на PDX внутрішньочерепної інокуляції колоректального раку (звіт E0400-U1804). Пралсетиніб при пероральному прийомі доз, включаючи 10 і 30 мг/кг два рази на добу, призводив до суттєвої залежності від дози TGI із частотою виявлення внутрішньочерепної пухлини відповідно 6/10 та 0/10 наприкінці дослідження. Це контрастує з даними в групі, яка отримувала носій лікарського засобу, в якій кожна тварина загинула від хвороби до 58 днів при наявності внутрішньочерепних пухлин, що піддаються виявленню, у кожній миші. При застосуванні дози 10 або 30 мг/кг два рази на добу пралсетиніб продемонстрував невизначену медіану виживаності до дня 96.</p>
2) вторинна фармакодинаміка	Дослідження вторинної фармакодинаміки не проводились.
3) фармакологія безпеки	<p>Фармакологія безпеки in vitro</p> <p>Вплив пралсетинібу на клітини яєчника китайського хом'ячка, що стабільно трансфіковані комплементарною ДНК гена hERG та експресують канали hERG. Метою цього дослідження було дослідити вплив пралсетинібу <i>in vitro</i> на каналний потік hERG (сурогатний маркер для I_{Kr}, кардіального калієвого потоку з уповільненим випрямленням, що швидко активується) в клітинах яєчника китайського хом'ячка, що стабільно трансфіковані комплементарною дезоксирибонуклеїною кислотою (кДНК) hERG та експресують канали hERG, при майже фізіологічній температурі (звіт CPB-25-15-010A-0169). Пралсетиніб пригнічував потік hERG на (середнє значення \pm стандартне відхилення) $17,4 \pm 2\%$ при $1\ \mu\text{M}$ ($n = 2$), $33,7 \pm 1,2\%$ при $3\ \mu\text{M}$ ($n = 2$), $64,6 \pm 1,8\%$ при $10\ \mu\text{M}$ ($n = 2$) і $87,2 \pm 1,5\%$ при $30\ \mu\text{M}$ ($n = 2$). IC_{50} для інгібіторного впливу пралсетинібу на калієвий потік hERG становила $5,18\ \mu\text{M}$ (коефіцієнт Хіла = 0,92), що свідчить про низький потенціал подовження інтервалу QT. В ідентичних умовах IC_{50} для інгібіторного впливу цизаприду (позитивний контроль) становила $0,073\ \mu\text{M}$.</p> <p>Фармакологічну специфічність пралсетинібу оцінювали на панелі фармакологічних мішеней, включаючи рецептори, транспортери та ферменти (звіти 100023499, 100023915). Зв'язування зі сполукою обчислювали як відсоток інгібіції зв'язування радіоактивно міченого ліганда, специфічного для кожної мішені. Інгібіція пралсетинібом $> 50\%$ при скринінговій концентрації $10\ \mu\text{M}$ продемонстрована при аналізі таких мішеней: рецептор 5-HT_{2A} і ділянка 2 каналу Na⁺. У подальшому дослідженні пралсетиніб мав біохімічні показники IC_{50} на рівні $3600\ \text{нмоль}$ щодо 5-HT_{2A} і $3400\ \text{нмоль}$ щодо ділянки 2 каналу Na⁺. Клінічне значення цих взаємодій невідоме.</p>

Олександр Вірмасей
 Директор Видавництва

Фармакологія безпеки in vivoДослідження впливу на серцево-судинну систему після перорального прийому пралсетинібу

Метою досліджень, що не відповідають критеріям належної лабораторної практики (GLP), було оцінити потенційний гострий вплив перорального прийому пралсетинібу на артеріальний тиск, пульсовий тиск, частоту серцевих скорочень (ЧСС) і температуру тіла несплячих самців щурів лінії Спрег-Доулі за допомогою радіотелеметрії.

У першому дослідженні (звіт WIL-124581) носій лікарського засобу (0,5 % карбоксиметилцелюлоза [СМС; середня в'язкість]-Na [маса/об'єм]:1 % Tween 80 [маса/об'єм] у деіонізованій воді [рН від 2 до 3]) або пралсетиніб з носієм застосовували 3 групам по 6 самців щурів лінії Спрег-Доулі/групу однократною дозою по 0, 50 або 200 мг/кг відповідно. Вихідний рівень артеріального тиску (сistolічний, діастолічний та середній артеріальний тиск [САТ]), пульсовий артеріальний тиск, ЧСС і температуру тіла визначали постійно протягом щонайменше 2 годин до прийому носія або пралсетинібу до щонайменше 24 годин після прийому. Клінічні спостереження проводились два рази на день, приблизно через 4 та 24 години після прийому препаратів. Застосування однократної пероральної дози 50 або 200 мг/кг пралсетинібу у самців щурів лінії Спрег-Доулі призводило до сповільнення ЧСС, підвищення систолічного, діастолічного та середнього артеріального тиску і зниження температури тіла (лише 200 мг/кг). За умов даного дослідження неможливо встановити дозу, що не викликає видимих ефектів (NOEL).

У другому дослідженні (звіт WIL-124606) носій (0,5 % СМС [середня в'язкість]-Na [маса/об'єм]:1% Tween 80 [маса/об'єм] у деіонізованій воді [рН від 2 до 3]) або пралсетиніб з носієм застосовували 2 групам по 18 самців щурів лінії Спрег-Доулі у групі як однократну дозу по 10 або 25 мг/кг відповідно. Вихідний рівень артеріального тиску (сistolічний, діастолічний та середній артеріальний тиск), пульсовий артеріальний тиск, ЧСС та температуру тіла визначали постійно протягом щонайменше 24 годин до прийому носія або пралсетинібу до приблизно щонайменше 24 годин після прийому. Клінічні спостереження проводили два рази на день, приблизно через 4 і 24 години після прийому препаратів. Застосування однократної пероральної дози 25 мг/кг пралсетинібу у самців щурів лінії Спрег-Доулі призвело до сповільнення ЧСС, підвищення систолічного, діастолічного та середнього артеріального тиску. Не спостерігалось змін серцево-судинної функції або температури тіла при прийомі пралсетинібу дозою 10 мг/кг або 30 мг/кг. За умов даного дослідження NOEL для серцево-судинних ефектів пралсетинібу у щурів становила 10 мг/кг.

Тереза Віссел
Дж. А. - Томас Дж. В.

4) фармакодинамічні взаємодії	Дослідження фармакодинамічної взаємодії з іншими лікарськими засобами не проводились.
3. Фармакокінетика:	
1) аналітичні методики та звіти щодо їх валідації	<p>Біоаналітичні методи, що підтверджують дослідження фармакокінетики, які не відповідають вимогам належної лабораторної практики</p> <p>Зразки плазми крові, отримані в дослідженнях ФК із використанням калію ЕДТА (K2-EDTA) у якості антикоагулянта, аналізували щодо концентрацій пралсетинібу за допомогою валідованого методу високоефективної рідинної хроматографії (HPLC)/тандемної мас-спектрометрії (MS/MS) із селективною реєстрацією обраних реакцій розпаду декількох іонів.</p> <p>У дослідженнях <i>in vitro</i> концентрації пралсетинібу визначали за допомогою методів рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS/MS) та кількісно визначали за допомогою або стандартної кривої, або відношення відгуку детектора, вираженого у вигляді площі піку порівняно з внутрішнім стандартом.</p> <p>Біоаналітичні методи, що підтверджують дослідження токсикокінетики, які відповідають вимогам належної лабораторної практики</p> <p>Зразки плазми крові, отримані в дослідженнях токсикокінетики з використанням K2-EDTA в якості антикоагулянта, аналізували щодо концентрацій пралсетинібу за допомогою валідованого, чутливого та селективного методу LC-MS/MS із використанням інтерфейсу TurboIonSpray® та селективною реєстрацією обраних реакцій розпаду декількох іонів. Розробка та валідація методу проводились відповідно до галузевих рекомендацій Управління з контролю лікарських засобів та продуктів харчування (FDA): валідація біоаналітичних методів (FDA, 2001).</p> <p>Звіти щодо валідації аналітичних методик: Звіт з валідації № BLU-R5992: Звіт з валідації методу BTM-2134-R0: визначення X581238 в обробленій K2-EDTA плазмі крові щурів методом LC/MS-MS. Звіт з валідації № BLU-R5954: Звіт з валідації методу BTM-2135-R0: визначення X581238 в обробленій K2-EDTA плазмі крові мавп методом LC/MS-MS. Звіт з валідації № BLU-R6395: Звіт з валідації методу BTM-2256-R0: визначення BLU-667 (X581238) в обробленій K2-EDTA плазмі крові людини методом LC/MS-MS. Дослідження випробовувального обладнання № WIL-124574: Аналітична валідація і дослідження стабільності X581238 (BLU-667) у лікарських формах на основі води та диметилсульфоксиду.</p>
2) всмоктування	ФК пралсетинібу в плазмі крові вивчали після перорального введення одноразової дози самцям щурів лінії Спрег-Доулі (n = 3)

Тереза Віршич
Доктор - Філософ Т. В.

натще вранці та годування через 4 години після введення дози (звіт CPB-P15-10033R02). Пралсетиніб застосовували в цільовій дозі 10 мг/кг у вигляді розчину в 10 % диметилсульфоксиді (DMSO), 10 % Solutol™ і 80 % 20 % гідроксипропіл- β -циклодекстрину (HP- β -CD) у воді. Зразки крові відбирали через 5, 15 та 30 хвилин і через 1, 2, 4, 8 та 24 години після введення дози. Концентрація пралсетинібу в плазмі крові визначалась методом LC-MS/MS. Абсорбція після перорального введення була відносно швидкою із середньою (стандартне відхилення) C_{max} на рівні 2345 нг/мл (341 нг/мл), що спостерігалась при середньому (стандартне відхилення) t_{max} 2,7 години (1,2 години) після введення дози. Середня (стандартне відхилення) AUC_{0-last} становила 18 797 год•нг/мл (4483 год•нг/мл). Біодоступність пралсетинібу при пероральному застосуванні становила 100 %.

У цьому дослідженні ФК пралсетинібу в плазмі крові також вивчали після однократного внутрішньовенного болюсного введення самцям щурів лінії Спрег-Дулі ($n = 3$) натще і годування через 4 години після введення дози (звіт CPB-P15-10033R02). Пралсетиніб вводили шурам через дорзальну вену стопи в цільовій дозі 1 мг/кг у вигляді розчину в 10 % DMSO, 10 % Solutol і 80 % 20 % HP- β -CD у воді. Забір зразків крові здійснювали через 5, 15 та 30 хвилин і через 1, 2, 4, 8 та 24 години після введення дози. Концентрації пралсетинібу в плазмі крові визначали методом LC-MS/MS. Після внутрішньовенного введення середній (стандартне відхилення) $CL_{плазма}$ пралсетинібу у щурів був від низького до помірного, на рівні 14,6 мл/хв/кг (1,6 мл/хв/кг), і середній (стандартне відхилення) V_{ss} становив 3,3 л/кг (0,4 л/кг). Середня (стандартне відхилення) AUC_{0-24} становила 1137 год•нг/мл (128 год•нг/мл). Очевидний термінальний період напіввиведення ($t_{1/2}$) з плазми становив 3,5 години.

ФК пралсетинібу в плазмі крові вивчали після однократного перорального введення собакам породи бігль ($n = 3$) натще та годування через 4 години після введення дози (звіт CPB-P15-10204D03). Пралсетиніб вводили перорально (через шлунковий зонд) в цільовій дозі 1 мг/кг у вигляді розчину в 5 % DMSO та 5 % Solutol HS в 90 % фізіологічного розчину. Забір зразків крові здійснювали через 5, 15 та 30 хвилин і 1, 2, 4, 8 та 24 години після введення дози. Концентрації пралсетинібу в плазмі крові визначали методом LC-MS/MS. Абсорбція після перорального застосування була швидкою із середньою (стандартне відхилення) C_{max} 1789 нг/мл (784 нг/мл), яка була досягнута в середньому (стандартне відхилення) через t_{max} 2 години (0 годин) після введення дози. Середня (стандартне відхилення) AUC_{0-last} становила 16 910 год•нг/мл (8008 год•нг/мл). Біодоступність після перорального прийому була повною, розрахованою на рівні 100 %.

ФК властивості пралсетинібу в плазмі крові оцінювали після однократного перорального введення самцям яванських макак ($n = 3$) (звіт CPB-P15-10204K04). Пралсетиніб застосовували в цільовій дозі

Терешак Віктор
Доктор наук А. В.

1 мг/кг у вигляді розчину в 5 % DMSO і 5 % Solutol HS в 90 % фізіологічного розчину. Забір зразків крові здійснювали через 5, 15, та 30 хвилин і через 1, 2, 4, 8 та 24 години після введення дози. Концентрації пралсетинібу в плазмі крові визначали методом LC-MS/MS. Абсорбція після перорального застосування була швидкою із середньою (стандартне відхилення) C_{\max} 396 нг/мл (51 нг/мл), що спостерігалась в середньому через t_{\max} 2 години після введення дози. Середня (стандартне відхилення) $AUC_{0-\text{last}}$ становила 2917 год•нг/мл (638 год•нг/мл). Біодоступність після перорального прийому була повною, розрахованою на рівні 100 %.

ФК пралсетинібу в плазмі крові вивчали після однократного внутрішньовенного болюсного введення самцям собак породи бігль ($n = 3$) (звіт CPB-P15-10082D01). Пралсетиніб застосовували в цільовій дозі 0,5 мг/кг у вигляді розчину в 5 % DMSO та 5 % Solutol HS в 90 % фізіологічного розчину. Забір зразків крові здійснювали через 5, 15 та 30 хвилин і через 1, 2, 4, 8 та 24 години після введення дози. Концентрації пралсетинібу в плазмі крові визначали методом LC-MS/MS. Середній (стандартне відхилення) $CL_{\text{плазма}}$ пралсетинібу у собак був низьким, на рівні 2 мл/хв/кг (0,34 мл/хв/кг), і середній (стандартне відхилення) V_{ss} був встановлений на рівні 0,5 л/кг (0,1 л/кг). Середня (стандартне відхилення) $AUC_{0-\text{last}}$ становила 4184 год•нг/мл (771 год•нг/мл). Середній (стандартне відхилення) $t_{1/2}$ виведення з плазми становив 3,5 години (0,2 години).

ФК пралсетинібу в плазмі крові вивчали після однократного внутрішньовенного болюсного введення яванським макакам ($n = 3$) (звіт CPB-P15-10082K01). Пралсетиніб вводили через підшкірну вену передньої лапи в цільовій дозі 0,5 мг/кг в розчині 5 % DMSO, 5 % Solutol HS в 90 % фізіологічного розчину. Забір зразків крові здійснювали через 5, 15 та 30 хвилин і через 1, 2, 4, 8 та 24 години після введення дози. Концентрації пралсетинібу в плазмі крові визначали методом LC-MS/MS. Після внутрішньовенного введення пралсетиніб визначався кількісно в плазмі крові до 24 годин після введення у 2 із 3 мавп і до 8 годин після введення у третьої мавпи. Середній (стандартне відхилення) $CL_{\text{плазма}}$ був від низького до помірного, на рівні 6,5 мл/хв/кг (3 мл/хв/кг), і середній (стандартне відхилення) V_{ss} був встановлений на рівні 1,7 л/кг (0,2 л/кг). Середня (стандартне відхилення) $AUC_{0-\text{last}}$ становила 1389 год•нг/мл (548 год•нг/мл). Середній (стандартне відхилення) $t_{1/2}$ виведення з плазми становив 3,7 години (1,2 години).

3) розподіл

Дослідження розподілу *in vitro*

Дослідження зв'язування з білками плазми крові

Зв'язування пралсетинібу з білками плазми крові *in vitro* визначали в плазмі крові мишей, щурів, собак, мавп та людини за допомогою швидкого рівноважного діалізу (звіт 1905093). Зв'язування пралсетинібу (10 μM) з білками плазми крові оцінювали в 100 % плазмі крові. Пралсетиніб інкубували в плазмі крові протягом

Державна фірма
В.В. - Власенко Т.В.

4 годин при температурі 37 °С. Зразки від донора та реципієнта аналізували на предмет концентрації пралсетинібу методом LC-MS/MS. Концентрації пралсетинібу на стороні донора та реципієнта приладу визначали кількісно за допомогою такого рівняння:

$$fb^* (\%) = 100 \times ([\text{донор}]_{4\text{год}} - [\text{реципієнт}]_{4\text{год}}) / [\text{донор}]_{4\text{год}}$$

$$fu,p^* (\%) = 100 - \% \text{ зв'язування}^*,$$

де $[\text{донор}]_{4\text{год}}$ є визначеною концентрацією у донора через 4 години; $[\text{реципієнт}]_{4\text{год}}$ є визначеною концентрацією у реципієнта через 4 години; fb^* є зв'язаною фракцією, визначеною в плазмі крові; fu,p^* обчислюється як незв'язана фракція в плазмі крові. У цьому дослідженні варфарин та хінідин застосовувались як позитивний контроль.

У плазмі мишей, щурів і людини пралсетиніб зв'язувався з білками значною мірою, при цьому незв'язана фракція становила < 5 %. У плазмі мишей та щурів незв'язана фракція пралсетинібу (середня концентрація 1 і 10 μM) становила ~0,8 % і 2,45 % відповідно. У плазмі собак та мавп (середня концентрація 1 і 10 μM) незв'язана фракція становила 1,8 % та 4,2 % відповідно, а в плазмі людини (середня концентрація 1 і 10 μM) незв'язана фракція становила 2,9 %. Виведення пралсетинібу варіювало від 85 % до 102 %.

Розподіл у цільній крові *in vitro*

Розподіл пралсетинібу в крові *in vitro* вивчали на свіжозаготовленій крові мишей, щурів, собак, мавп та людини (звіт CPB-P15-10118). Зразки крові з додаванням 5 μM пралсетинібу або верапамілу (позитивний контроль) інкубували при 37 °С протягом 60 хвилин. Після інкубації концентрації пралсетинібу в крові та плазмі крові визначали методом LC-MS/MS. Не спостерігалось переважного розподілу пралсетинібу *in vitro* в еритроцити в цільній крові людини, щурів, мишей, собак або мавп.

Метаболічну стабільність пралсетинібу оцінювали після інкубації в плазмі крові людини протягом 60 хвилин при 37 °С і при концентрації 2 μM (звіт CPB-P15-10307). Пралсетиніб був стабільним у плазмі крові людини ($T_{1/2} > 120$ хв).

Дослідження розподілу *in vivo*

Розподіл [^{14}C]-пралсетинібу в плазмі крові, цільній крові та тканинах щурів

Дослідження *in vivo* проведено з метою оцінки розподілу пралсетинібу та його метаболітів у крові і тканинах (звіт 00124834). Самці щурів ліній Спрег-Доулі ($n = 8$) і Лонг-Еванс ($n = 10$) отримували одноразову пероральну дозу (через шлунковий зонд) [^{14}C]-пралсетинібу 30 мг/кг при цільовій радіоактивності на рівні 100 $\mu\text{Kю}/\text{кг}$ у вигляді суспензії в 0,5 % СМС (маса/об'єм)-Na:1 % Tween[®] 80 (маса/об'єм) у деіонізованій воді. Забір зразків цільної крові та тіл відбувався через ~0,25, 1, 2, 6, 24, 48, 96 і 168 годин після введення дози щурам лінії Спрег-Доулі та через ~0,25, 1, 2, 6, 24, 48,

Сергій Віталійович
 Директор Інституту

96, 168, 336 та 504 годин після введення щурам лінії Лонг-Еванс, 1 тварина/контрольний момент часу. Концентрація загальної радіоактивності в плазмі крові та крові визначалась за допомогою безпосередньої рідинної скінтиляційної детекції, а концентрація загальної радіоактивності в окремих тканинах визначалась за допомогою кількісної авторадіографії всього тіла.

Після перорального прийому (через шлунковий зонд) разової дози значення C_{\max} [^{14}C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності у самців непігментованих щурів лінії Спрег-Доулі була найвищою в стінці тонкого кишечника (191 000 нг екв./г), печінці (165 000 нг екв./г) та наднирниках (109 000 нг екв./г) при t_{\max} . T_{\max} варіював від 2 до 6 годин після введення дози. Концентрація [^{14}C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності в інших тканинах загалом варіювала від ~4130 нг екв./г (яєчки) до 59 900 нг екв./г (кірковий шар нирок) при C_{\max} . Найнижча концентрація при C_{\max} була визначена в яєчках, жировій тканині (жовтій) та кістках (стегно), при цьому концентрація в головному мозку та органі зору була нижче рівня кількісного визначення (BQL) (нижня межа визначення в тканинах = 781 нг екв./г) при всіх інтервалах забору. До 48 годин після введення дози концентрація [^{14}C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності була BQL в усіх тканинах, за винятком печінки та наднирників, при цьому в печінці спостерігалась вимірювана концентрація [^{14}C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності до 168 годин після введення дози. Експозиція, визначена за $AUC_{0-\text{last}}$, загалом відображала ранговий порядок, аналогічний C_{\max} у тканинах. Відношення тканина:плазма $AUC_{0-\text{last}}$ для більшості тканин становило ≥ 1 , що свідить про те, що [^{14}C]-пралсетиніб-похідна радіоактивність широко розподілялась у більшості проаналізованих тканин при відношенні тканина:плазма $AUC_{0-\text{last}}$ із найвищим рівнем 32 в печінці та найнижчим рівнем 0,50 в судинній оболонці очного яблука.

У пігментованих щурів лінії Лонг-Еванс [^{14}C]-похідна радіоактивність була найвищою в судинній оболонці очного яблука (C_{\max} : 210 000 нг екв./г) та пігментованій шкірі (C_{\max} : 8590 нг екв./г) із концентрацією в решті тканин в діапазоні від 2000 нг екв./г (орган зору) до 6470 нг екв./г (жирова тканина) при C_{\max} . До 336 годин після введення дози концентрація [^{14}C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності була BQL в усіх тканинах за винятком судинної оболонки очного яблука, в якій була виявлена вимірювана концентрація [^{14}C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності впродовж 504 годин після введення дози. Виявилось, що концентрація [^{14}C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності в судинній оболонці очного яблука у самців пігментованих щурів лінії Лонг-Еванс виводиться повільніше і є в ~20 разів вищою, ніж в судинній оболонці очного яблука у самців непігментованих щурів лінії Спрег-Доулі (C_{\max} : 10 200 нг екв./г), що свідчить про те, що радіоактивність у результаті одноразової пероральної (через шлунковий зонд) дози [^{14}C]-

Терешко Віршій
Директор - Мисюк Т.В.

	<p>пралсетинібу при 30 мг/кг та цільовій радіоактивності 100 μКю/кг мала афінність до цієї тканини, що містить меланін.</p> <p>Висока концентрація [14C]-пралсетинібу була визначена в судинній оболонці очного яблука, де значні залишки, еквівалентні 68 мкг/г, були виявлені в термінальній часовій точці. Тому обмежуючим фактором для прийому [14C]-пралсетинібу людиною є не ефективна доза для усього організму, а доза для органу зору. Як розраховано на основі площі під кривою концентрація в плазмі крові-час від нуля до нескінченності (за розрахунками), результуюча поглинена доза радіації у людини після прийому 100 μКю [14C]-пралсетинібу становитиме ~680 мбер. Ця ефективна доза становить ~22,7 % від 3 бер, встановленої FDA граничної експозиції однократної дози для кришталіка ока. Тому до 441 μКю [14C]-пралсетинібу можна ввести людині, і ця доза є прийнятною відповідно до керівництва 21 CFR 361.1.</p> <p><u>Розподіл пралсетинібу в головному мозку після перорального застосування щурам</u></p> <p>Дослідження <i>in vivo</i> проведено з метою оцінки розподілу пралсетинібу в тканини головного мозку (звіт 1598). Самцям щурів лінії Спрег-Доулі (n = 4/групу) із хірургічно вживленими в область смугастого тіла (стріатум) головного мозку зондами для мікродіалізу вводили однократну пероральну дозу (через шлунковий зонд) пралсетинібу 10 мг/кг у вигляді розчину в 10 % Solutol HS15 та 90 % HP-в-CD (20 %). Забір цільної крові відбувався через ~0, 30, 60, 120, 240, 420 хвилин та через 24 години після введення дози. Забір інтерстиційної рідини з стріатуму головного мозку відбувався за допомогою зондів для мікродіалізу протягом 30 хвилин через 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 7 та 24 години після введення дози. Наприкінці дослідження (24 години) отримували головний мозок та цереброспінальну рідину. Рівень пралсетинібу в плазмі крові, інтерстиційній рідині стріатуму головного мозку (діалізат), тканині головного мозку і цереброспінальній рідині визначали за допомогою методу HPLC-MS/MS.</p> <p>Рівень пралсетинібу в плазмі крові досяг найвищої концентрації через 2,5 години після введення дози, у той час як концентрація в інтерстиціальній рідині стріатуму головного мозку досягла піку через 4,4 години після введення дози, що свідчить про повільне поглинання в головний мозок. AUC₀₋₂₄ і C_{max} в плазмі крові становили 850 586 год•нг/мл і 1375,25 нг/мл відповідно. AUC₀₋₂₄ і C_{max} для концентрації в інтерстиційній рідині становили 2904 год•нг/мл і 4,2 нг/мл відповідно. Обчислений коефіцієнт розподілу незв'язаного пралсетинібу в головному мозку до незв'язаного пралсетинібу в плазмі крові становив ~0,14, що свідчить про високий потенціал розподілу пралсетинібу в головний мозок.</p>
4) метаболізм	Дослідження метаболізму <i>in vitro</i>

Терешак Віктор
 [Підпис] - Іванова О. В.

Метаболічний кліренс у мітросомах печінки

Дослідження проведено для визначення власного системного кліренсу (CL_{int}) пралсетинібу в мітросомах печінки мишей, щурів, собак, мавп та людини (звіт CPB-P15-10033). Пралсетиніб ($1 \mu M$) інкубували з мітросомами печінки ($0,5 \text{ мг/мл}$) в присутності та відсутності нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату, відновленої форми (НАДФН), протягом 45 хвилин при $37^\circ C$. Відсоток вихідної сполуки, що зберігався з часом, визначали за допомогою LC-MS/MS. Відношення відгуку детектора, вираженого у вигляді площі піка, до внутрішнього стандарту після інкубації протягом 5, 15, 30 та 45 хвилин порівнювали із таким в час 0 для визначення відсотку залишку досліджуваної сполуки в кожній часовій точці. CL_{int} був обчислений на основі швидкості зникнення пралсетинібу з часом.

Пралсетиніб метаболізувався в мітросомах печінки усіх видів. Рейтинг метаболічної стабільності (від найбільш до найменш стабільного) був таким: людина (стабільний), собаки, щури, миші та мавпи. Коефіцієнт очищення становив 0,34, 0,10, 0,21 і 0,48 у мітросомах печінки мишей, щурів, собак та мавп відповідно. Вимірюваного зменшення пралсетинібу не спостерігалось під час інкубації протягом 45 хвилин із мітросомами печінки людини. Тому коефіцієнт очищення не був визначений для мітросом печінки людини.

Метаболічний кліренс у гепатоцитах

Дослідження проведено для визначення *in vitro* CL_{int} пралсетинібу в гепатоцитах мишей, щурів, собак, мавп та людини (звіти 150604, 150521). Пралсетиніб ($0,5 \mu M$) інкубували в суспензіях гепатоцитів ($0,5 \text{ млн клітин/мл}$) протягом 240 хвилин при $37^\circ C$. Інкубація проводилась по одному разу для кожного виду, за винятком гепатоцитів людини, для яких інкубація проводилась тричі. Відсоток вихідної сполуки, що зберігався з часом, визначали за допомогою LC-MS/MS. У щурів відношення відгуку детектора, вираженого у вигляді площі піка, до внутрішнього стандарту після інкубації через 10, 30, 60, 120 і 240 хвилин порівнювали із відношенням відгуку детектора, вираженого у вигляді площі піка, в час 0 для визначення відсотка залишку досліджуваної сполуки в кожній часовій точці. CL_{int} був обчислений на основі швидкості зникнення пралсетинібу з часом. Кліренс в гепатоцитах *in vivo* і коефіцієнт очищення печінки також був екстрапольований з показників CL_{int} в печінці *in vitro* за допомогою широко використовуваної моделі печінки з добрим перемішуванням. Ця модель передбачає, що лікарський засіб миттєво та гомогенно розподіляється в печінці та незв'язані концентрації у плазмі крові та печінці є ідентичними.

CL_{int} у гепатоцитах *in vitro* становив 2,3, 0,8, 1,8, 2,5 і 3,7 мкл/хв/млн клітин у мишей, щурів, собак, мавп та людини відповідно. Рейтинг метаболічної стабільності (від найбільш до найменш стабільного) був таким: щури, мавпи, миші, людина, собаки. Розрахований

Тереза Віршич
В.А. Русаків Т.В.

коефіцієнт очищення становив: 0,231 (миші), 0,063 (щурів), 0,310 (собаки), 0,170 (мавпи) та 0,309 (людина).

Результати цього дослідження показують, що пралсетиніб повільно метаболізується в гепатоцитах мишей, щурів та мавп і помірно метаболізується у собак та людини.

Ідентифікація метаболітів у мікросомах печінки та гепатоцитах за допомогою [¹⁴C]-пралсетинібу

Дослідження *in vitro* проведено для вивчення вірогідних шляхів метаболізму пралсетинібу в мікросомах печінки та кріоконсервованих гепатоцитах мишей, щурів, собак, мавп та людини (звіт BLU-R9667). [¹⁴C]-пралсетиніб (1 та 10 μM) інкубували у фортифікованих НАДФН мікросомах печінки (1 мг/мл) кожного виду при 37 °C протягом 60 хвилин. Окрім того, [¹⁴C]-пралсетиніб (1 та 10 μM) інкубували в суспензіях кріоконсервованих гепатоцитів (106 клітин/мл) кожного виду протягом 0 і 4 годин. Профілі метаболітів були отримані шляхом аналізу екстрактів мікросом печінки та гепатоцитів методом HPLC разом із радіоактивним детектором. Ідентифікаційні характеристики пов'язаних зі сполукою метаболітів були визначені за допомогою аналізу LC-MS/MS.

Було показано, що метаболізм пралсетинібу є обмеженим або помірним в присутності мікросом печінки мишей, щурів, собак, мавп та мікросом печінки людини і/або гепатоцитів. Загалом було ідентифіковано 18 метаболітів пралсетинібу, що утворюються у результаті окислення, дефторування, глюкуронізації та кон'югації з відновленим глутатіоном (GSH). Профіль метаболітів при концентрації 1 та 10 μM якісно був подібним, і дещо інтенсивніший метаболізм спостерігався при концентрації 10 μM.

У присутності НАДФН у мікросомах печінки [¹⁴C]-пралсетиніб підлягав обмеженому метаболізму у мишей, собак та у мікросомах печінки людини і дещо інтенсивнішому метаболізму у щурів та мавп. [¹⁴C]-пралсетиніб був основним пов'язаним зі сполукою радіоактивним піком (~54 %–93 % від загальної радіоактивності) в усіх досліджуваних видів. Метаболіти, виявлені в мікросомах печінки: M453, M464, M531, M549a,b,d,e,f,g,h, M563a,b, M650, M652, M836 та M838. Усі виявлені метаболіти становили < 10 % загальної радіоактивності, за винятком M563a в мікросомах печінки щурів (~12 %) і M549b у мікросомах печінки собак (~11 %) та мавп (~16 %) при концентрації 1 μM.

У кріозаморожених гепатоцитах [¹⁴C]-пралсетиніб підлягав обмеженому метаболізму в гепатоцитах мишей, щурів та собак та більш інтенсивному метаболізму в гепатоцитах мавп та людини. Метаболіти, виявлені при інкубації з гепатоцитами: M453, M531, M549b,e,f,g,h, M563b, M652, M707, M709, M836 та M838. Метаболіт M709, утворений в результаті безпосередньої глюкуронізації пралсетинібу, був єдиним основним метаболітом в гепатоцитах людини (загальна радіоактивність ~55 % і ~31 % при 1 та 10 μM

Терешко Віктор
Доктор наук Ю. В.

відповідно). Усі інші метаболіти, виявлені в гепатоцитах, становили < 10 % загальної радіоактивності.

Безпосередня кон'югація з N-глюкуронідом була основним шляхом метаболізму пралсетинібу *in vitro* при інкубації з гепатоцитами людини, і приблизно 90 % та 76 % метаболітів утворювались в результаті кон'югації з глюкуронідом при концентрації 1 і 10 μM відповідно. Окислення було другим основним шляхом, і приблизно 8 % та 18 % метаболітів утворювались в результаті реакцій окислення при концентрації 1 та 10 μM відповідно. Метаболіти, пов'язані з кон'югацією з глютаміном, становили приблизно 2 % і 1 % від загального метаболізму при концентрації 1 та 10 μM відповідно. Поєднання окислення, глюкуронізації та кон'югації з GSH становило приблизно 5 % від загального метаболізму при концентрації 10 μM .

На заключення, пралсетиніб підлягав обмеженому або помірному метаболізму в мікосомах печінки та кріоконсервованих гепатоцитах мишей, щурів, собак, мавп та людини в умовах проведення даного дослідження. Загалом було ідентифіковано 18 метаболітів пралсетинібу. Шляхи метаболізму пралсетинібу *in vitro* включали окислення, дефторування, глюкуронізацію та кон'югацію з GSH. Метаболіт M709, утворений в результаті безпосередньої N-глюкуронізації пралсетинібу, виявився основним метаболітом, що спостерігався у гепатоцитах людини. Унікального специфічного для людини метаболіту пралсетинібу не було виявлено в цьому дослідженні.

Дослідження метаболізму *in vivo*

Метаболічний профіль після перорального або внутрішньовенного введення щурам

Метаболічний профіль [^{14}C]-пралсетинібу *in vivo* вивчали в інтактних самців щурів та щурів з дренажем жовчної протоки (BDC) лінії Спрег-Доулі після однократного перорального або внутрішньовенного введення відповідно (звіт BLU-R5482AM1).

Дослідження включало 3 групи щурів. Група 1 (n = 3, інтактні) отримувала однократну пероральну дозу [^{14}C]-пралсетинібу (30 мг/кг); забір сечі та фекалій здійснювався впродовж 168 годин. У групу 2 (n = 4) увійшли щури BDC, які отримували [^{14}C]- пралсетиніб внутрішньовенно (до 30 мг/кг). Забір жовчі, сечі та фекалій в цій групі відбувався протягом 72 годин. Група 3, щури з катетером яремної вени (n = 3 на часову точку), отримували дозу 30 мг/кг перорально і використовувались для відбору крові та плазми крові для визначення профілю метаболітів та відношення розподілу кровдо-плазми.

Профілі метаболітів [^{14}C]-пралсетинібу в плазмі, сечі, жовчі та фекаліях загалом були отримані за допомогою HPLC із виявленням радіоактивності та вискоефективної рідинної хроматографії у поєднанні з діодно-матричним виявленням по ультрафіолетовому

Державна лікарня
Д-р А. Мисюк М. В.

випромінюванню та мас-спектрометрією (LC-UV-MS). Потенційні метаболіти [^{14}C]-пралсетинібу виявляли за допомогою LC-MS/MS.

[^{14}C]-пралсетиніб підлягав суттєвому метаболізму у щурів після внутрішньовенного або перорального введення. Метаболіти [^{14}C]-пралсетинібу швидко та повністю виводилися з сечею, жовчю і фекаліями після прийому пероральної одноразової дози 30 мг/кг. Шляхи метаболізму [^{14}C]-пралсетинібу у щурів включали окислення (M549a,b, M563b), N-глюкуронізацію (M709) та кон'югацію з GSH (M836, M838).

У плазмі крові єдиний радіоактивний пік, що спостерігався, відповідав незміненому пралсетинібу, і жодні метаболіти не були виявлені.

У сечі основними пов'язаними з лікарським засобом компонентами були 2 аналоги пралсетинібу, які утворилися в результаті окислення: M549a,b, (який становив $\sim 45\%$ радіоактивності в сечі і $\sim 0,7\%$ дози, що виводилась із сечею) і кон'югат глюкуроніду (M709, який становив $\sim 30\%$ радіоактивності в сечі і $\sim 0,5\%$ дози, що виводилась із сечею). Незмінений [^{14}C]-пралсетиніб був незначним піком у сечі.

Елімінація з жовчю була основним шляхом виведення [^{14}C]-пралсетинібу у щурів BDC (43,96 % дози) після однократного внутрішньовенного введення. Виявлені у жовчі метаболіти включали глюкуронід (M709), кон'югат GSH (M838) і метаболіт карбонової кислоти (M563b). Метаболіти пралсетинібу, що утворилися в результаті окислення (M549a,b) та окисної кон'югації з GSH (M836), також були виявлені у жовчі, однак у невеликих кількостях. Незмінений [^{14}C]-пралсетиніб був незначним компонентом у жовчі.

У фекаліях після перорального введення незмінений [^{14}C]-пралсетиніб був найбільш суттєвою пов'язаною з лікарським засобом сполукою, що спостерігалась, становивши $\sim 51\%$ радіоактивності у фекаліях ($\sim 47\%$ введеної дози). Залишкова радіоактивність ($\sim 49\%$) складалась із щонайменше 5 метаболітів, включаючи 2 окислених аналоги пралсетинібу, кон'югат глюкуроніду (M709) і вторинний метаболіт окислення (M563b).

Метаболічний профіль після перорального введення мавпам

Метаболічний профіль [^{14}C]-пралсетинібу *in vivo* вивчали в плазмі крові, сечі та фекаліях яванських макак (n = 3) після прийому однократної пероральної дози [^{14}C]-пралсетинібу 10 мг/кг (100 $\mu\text{Kю}/\text{кг}$) (звіт BLU-R9705).

Після введення пероральної однократної дози 10 мг/кг [^{14}C]-пралсетинібу самцям мавп LC-MS/MS та LC профілі радіоактивності пралсетинібу та його метаболітів були отримані в об'єднаних зразках плазми крові через 0,5, 1, 2, 4, 6 та 24 години після введення дози і в об'єднаних зразках плазми крові мавп через 0–24 години.

Пралсетиніб відповідав найбільш поширеному піку і складав більше 90 % загальної радіоактивності в плазмі крові в усіх об'єднаних зразках плазми крові. Декілька метаболітів, які

Сергій Віриш
ДМФ - Масак М. В.

утворилися в результаті окислення та N-глюкуронізації, були виявлені в плазмі крові мавп, включаючи M549b,g, M453 та M709, і кожен становив < 10 % радіоактивності в плазмі крові.

Виведення з сечею становило $\leq 5\%$ введеної мавпам радіоактивної дози. В об'єднаних зразках сечі (що представляли > 90 % радіоактивності, виведеної з сечею) незмінена вихідна сполука пралсетинібу була виявлена в усіх 3 об'єднаних зразках сечі і становила приблизно 12%–46 % радіоактивності в сечі і < 2 % дози у 3 мавп у цьому дослідженні. Подібно до плазми крові декілька метаболітів, утворені в результаті окислення та N-глюкуронізації, були виявлені в сечі мавп, включаючи M549b,g, M453 і M709, і кожен становив $\leq 2\%$ дози. Метаболіти, які утворилися в результаті окислення, M549h, M563b і M549e, також виявлялися в сечі методом MS в слідових кількостях і не спостерігалися на радіохромограмах.

У фекаліях самців мавп виявлялось приблизно 42%–89 % введеної радіоактивної дози. В об'єднаних зразках фекалій (що представляли > 90 % виведеної з фекаліями радіоактивності) незмінена вихідна сполука пралсетинібу була виявлена як основний пов'язаний зі сполукою компонент в усіх 3 об'єднаних зразках фекалій і становила приблизно 48%–58 % радіоактивності у фекаліях і приблизно 21%–50 % дози у 3 мавп. Декілька метаболітів, які утворилися в результаті окислення та кон'югації з цистеїном, були виявлені у фекаліях, включаючи M652, M531, M549b,d,e,h і M563b. Метаболіт M549b був виявлений як другий найбільший радіоактивний пік у фекаліях і становив приблизно 6%–16 % дози, при цьому решта метаболітів була виявлена в меншій кількості на рівні $\leq 5\%$ дози для кожного. Метаболіти в результаті окислення та N-глюкуронізації M549g, M709 і M453 також були виявлені у фекаліях методом мас-спектрометрії в слідових кількостях і не спостерігалися на радіохромограмах.

На заключення, після прийому пероральної дози 10 мг/кг [^{14}C]-пралсетинібу самцями мавп більша частина радіоактивності (42%–89 %) виводилася з фекаліями та сечею, що становило $\leq 5\%$ отриманої радіоактивної дози. Пралсетиніб метаболізувався у мавп загалом до 10 метаболітів, як виявлено в плазмі крові, сечі та фекаліях, поєднаними шляхами метаболізму, включаючи окислення, кон'югацію з цистеїном та глюкуронізацію. Основним радіоактивним компонентом у плазмі крові був пралсетиніб (> 90 %), а декілька метаболітів окислення і N-глюкуронізації склали незначну кількість (< 10 % кожен) загальної радіоактивності в плазмі крові. В об'єднаних зразках сечі мавп були виявлені незмінений пралсетиніб і декілька метаболітів окислення та глюкуронізації (кожен $\leq 2\%$ дози). В об'єднаних зразках фекалій мавп був виявлений пралсетиніб як основний пов'язаний зі сполукою компонент (~21%–50 % дози), і також спостерігалися кілька метаболітів, що утворилися в результаті окислення, кон'югації з цистеїном та кон'югації глюкуронізації. Метаболіт M549b був

Степанов Віктор
В.В. - Мочалов Н.В.

	<p>виявлений як другий найбільший радіоактивний пік у фекаліях (~6%–16% дози), при цьому решта метаболітів були виявлені в менших кількостях ($\leq 5\%$ дози). Загалом пралсетиніб підлягав обмеженому метаболізму у самців мавп після прийому одноразової пероральної дози 10 мг/кг.</p>
5) виведення	<p><u>Виведення після перорального введення [^{14}C]-пралсетинібу щурам</u> Шляхи метаболізму, балансу маси та виведення [^{14}C]-пралсетинібу в інтактних самців щурів та щурів BDC лінії Спрег-Доулі вивчали після однократного перорального та внутрішньовенного введення дози 30 мг/кг (звіт BLU-R5482AM1).</p> <p>Після однократного перорального прийому дози пов'язані з [^{14}C]-пралсетинібом компоненти швидко виводилися з фекаліями протягом 24 годин після введення і повністю виводилися до 168 годин (середнє [стандартне відхилення] 93,30% [2,45%]). Більша частина радіоактивності (середнє [стандартне відхилення] становило 90,10% [3,04%]) виводилась до 48 годин. Середнє [стандартне відхилення] виведеної з сечею радіоактивності, включаючи промивання клітки, становило 1,55% (0,10%) дози і середнє (стандартне відхилення) виведення з фекаліями становило 91,75% (2,38%) дози.</p> <p>У сечі інтактних щурів, яким вводили дозу перорально, [^{14}C]-пралсетиніб був єдиним незначним компонентом, що складав ~5% радіоактивності в сечі ($< 0,1\%$ дози). Основними пов'язаними з лікарським засобом компонентами в сечі були 2 метаболіта пралсетинібу, які утворилися в результаті окислення (M549a,b, який складав ~45% радіоактивності в сечі або ~0,7% дози, виведеної з сечею), і глюкуронід пралсетинібу (M709, який складав ~30% радіоактивності в сечі або ~0,5% дози).</p> <p>У фекаліях інтактних щурів, яким вводили дозу перорально, незмінений [^{14}C]-пралсетиніб був найбільш значущим пов'язаним з лікарським засобом компонентом, що складав ~51% радіоактивності у фекаліях (~47% дози). Залишкова радіоактивність у фекаліях (~49%) була зумовлена щонайменше 4 метаболітами, включаючи 2 аналоги, утворені в результаті окислення (M549a,b, ~21% радіоактивності у фекаліях або ~19% дози), 1 кон'югат глюкуроніду (M709) і 1 вторинний метаболіт окислення (M563b). Вторинний метаболіт і кон'югат глюкуроніду не відновлювались і разом становили 23% радіоактивності у фекаліях або ~21% дози.</p> <p>Після однократного внутрішньовенного введення дози 30 мг/кг BDC щурам загальна радіоактивність швидко виводилась з жовчю та фекаліями протягом 24 годин після введення і майже повністю виводилась протягом 72 годин.</p> <p>Середнє (стандартне відхилення) виведення радіоактивності з сечею у BDC щурів, включаючи промивання клітки, становило лише 5,44% (0,25%) дози. У сечі незмінений [^{14}C]-пралсетиніб був основним радіоактивним піком (~51% радіоактивності у сечі або</p>

Терекмеєв Біржан
Директор Інституту А.В.

~3 % дози). Також спостерігались два метаболіта пралсетинібу, утворені в результаті окислення (M549a,b; що складав ~32 % радіоактивності у сечі і ~2 % дози) і 1 глюкуронід пралсетинібу (M709; що складав ~17 % радіоактивності у сечі і ~1 % дози).

Середнє (стандартне відхилення) виведення з жовчю та фекаліями у BDC щурів становило 43,96 % (4,48 %) і 37,63 % (4,17 %) дози відповідно.

Загалом пралсетиніб підлягав значному метаболізму у щурів після або внутрішньовенного, або перорального введення сполуки. Незмінена вихідна сполука була єдиним радіоактивним піком, що спостерігався в плазмі крові, а метаболіти швидко виводилися з жовчю, фекаліями та сечею. Після однократного внутрішньовенного або перорального введення [^{14}C]-пралсетиніб і його пов'язані зі сполукою компоненти швидко та повністю виводилися. Виведення з сечею було незначним шляхом виведення пралсетинібу. Виведення із жовчю було основним шляхом виведення у щурів, при цьому більша частина радіоактивності виводилась у вигляді метаболітів окислення або кон'югатів GSH та глюкуроніду.

Виведення після перорального введення [^{14}C]-пралсетинібу мавпам
 Метаболізм, баланс маси та шляхи виведення [^{14}C]-пралсетинібу у самців яванських макак вивчали після перорального введення однократної дози 10 мг/кг та цільової радіоактивності 100 $\mu\text{Кю}/\text{кг}$ (звіт 00124835).

Однократне пероральне (через шлунковий зонд) введення [^{14}C]-пралсетинібу самцям яванських макак ($n=3$) призводило до експозиції еквівалентів [^{14}C]-пралсетинібу в цільній крові та плазмі крові. Еквіваленти [^{14}C]-пралсетинібу були кількісно вимірюваними в усіх зразках цільної крові та плазми крові від 0,25 години до 168 годин після введення дози. Середня концентрація еквівалентів [^{14}C]-пралсетинібу в цільній крові і плазмі крові досягла C_{max} 3240 нг екв./г (цільна кров) і 3880 нг екв./г (плазма крові) через 2 години після введення дози. Результуючі $t_{1/2}$ і $\text{AUC}_{0-\text{last}}$ еквівалентів [^{14}C]-пралсетинібу в цільній крові становили 79,8 години і 43 900 год•нг екв./г відповідно. Результуючі $t_{1/2}$ та $\text{AUC}_{0-\text{last}}$ еквівалентів [^{14}C]-пралсетинібу в плазмі крові становили 151 годину і 53 200 год•нг екв./г відповідно.

Індивідуальні відношення $\text{AUC}_{0-\text{last}}$ цільної крові-до-плазми після одноразової пероральної (через шлунковий зонд) дози [^{14}C]-пралсетинібу для тварин варіювали від 0,816 до 0,842, із середнім відношенням 0,825. Це відношення $\text{AUC}_{0-\text{last}}$ цільна кров:плазма свідчить про низький потенціал переважного розподілу еквівалентів [^{14}C]-пралсетинібу в клітини крові після перорального (через шлунковий зонд) введення дози.

Біоаналітичний аналіз зразків плазми крові самців яванських макак за допомогою методу LC-MS/MS свідчить про експозицію пралсетинібу в плазмі крові після перорального введення (через

Тереза Вірнес
Дж. А. - Фіаско М. В.

	<p>шлунковий зонд) дози [¹⁴C]-пралсетинібу. Пралсетиніб загалом визначався кількісно в зразках плазми крові від 0,25 години до 72 годин після введення дози. Середня концентрація пралсетинібу в плазмі крові досягла C_{max} 2660 нг/мл в період від 2 до 4 годин після введення дози.</p> <p>Результуючі $t_{1/2}$ і AUC_{0-last} пралсетинібу в плазмі крові становили 6,18 години і 29 400 год•нг/мл відповідно. Найменша загальна експозиція в плазмі крові, як визначено за допомогою AUC_{0-last} і меншого $t_{1/2}$ пралсетинібу у самців яванських макак порівняно з еквівалентами [¹⁴C]-пралсетинібу, свідчить про присутність циркулюючих метаболітів, похідних [¹⁴C]-пралсетинібу.</p> <p>Після однократного перорального прийому (через шлунковий зонд) дози [¹⁴C]-пралсетинібу самцями яванських макак більша частина прийнятої дози виводилася з фекаліями, при цьому 71,4 % (фекалії) загальної прийнятої [¹⁴C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності вивелось протягом 168 годин після введення дози. Виведення з сечою [¹⁴C]-пралсетиніб-похідної радіоактивності було мінімальним і становило 3,8 % загальної прийнятої радіоактивності. Більша частина радіоактивності у випорожненнях виводилася протягом 48 годин після введення дози, при цьому ~92 % прийнятої дози виводилися протягом 168 годин після введення.</p>
<p>б) фармакокінетичні взаємодії (доклінічні)</p>	<p>Опосередковані метаболізмом взаємодії з іншими лікарськими засобами</p> <p><u>Інгібіція активності цитохрому P450</u></p> <p>Дослідження проведено для оцінки потенціалу пралсетинібу інгібувати каталітичну активність CYP450 <i>in vitro</i> в мікросомах печінки людини (звіт 1812081).</p> <p>Для оцінки пралсетинібу як безпосереднього інгібітора активності CYP маркерні субстрати, специфічні для ізоформи CYP (при концентрації, приблизно рівній їх очевидній константі Міхаеліса – Ментен) інкубували з мікросомами печінки людини в присутності або відсутності пралсетинібу. Для оцінки залежної від часу інгібіції пралсетиніб попередньо інкубували з мікросомами печінки людини з або без НАДФН-відновлюючої системи за 30 хвилин до інкубації з маркерними субстратами. Метод LC-MS/MS застосовували для кількісного визначення метаболітів маркерних субстратів. Були розраховані швидкість утворення метаболітів маркерних субстратів, відсоток залишкової активності (нормалізовано до концентрації інгібітора 0 μM) і відсоток інгібіції при кожній концентрації інгібітора для кожного CYP. Інгібітори позитивного контролю для визначення безпосередньої та залежної від часу інгібіції продемонстрували функціонуючу належним чином випробувальну систему.</p> <p>Пралсетиніб не був зворотним інгібітором каталітичної активності CYP1A2, CYP2B6 та CYP3A4/5 (мідазолам-1'-гідроксилювання) в мікросомах печінки людини (показники $IC_{50} > 100 \mu$M); однак він</p>

Терешко Віктор
 [Підпис] Маска М.В.

продемонстрував залежну від концентрації інгібіцію каталітичної активності CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 та CYP3A4/5 (тестостерон-6 β -гідроксилування). Значення напівмаксимальної інгібуючої концентрації для інгібіції CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 та CYP3A4/5 (тестостерон-6 β -гідроксилування) становили 20, 8,4, 48, 59 і 29 μ M відповідно. Значення константи інгібіції (K_i) пралсетинібу щодо інгібіції CYP2C8, CYP2C9 і CYP3A4/5 (тестостерон-6 β -гідроксилування) були визначені на рівні 9,6, 4,1 і 24 μ M відповідно. Механізм інгібіції CYP2C8 пралсетинібом був визначений як змішана інгібіція, а для CYP2C9 та CYP3A4/5 (тестостерон-6 β -гідроксилування) був визначений як конкурентна інгібіція.

Пралсетиніб у досліджуваних концентраціях не був залежним від часу інгібітором каталітичної активності CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 та CYP2D6 у мікросомах печінки людини. Однак, пралсетинібом продемонстрована залежна від часу інгібіція каталізованого CYP3A4/5 мідазолам-1'-гідроксилування і тестостерон-6 β -гідроксилування в мікросомах печінки людини із K_{inact} та K_I 0,12 xv^{-1} і 77 μ M та 0,24 xv^{-1} і 154 μ M відповідно.

Індукція ферментів CYP450

Індукція ферментів CYP450 у гепатоцитах людини

Потенціал пралсетинібу індукувати ферменти CYP450 (CYP1A2, CYP2B6 та CYP3A4) *in vitro* вивчали в первинних культурах гепатоцитів людини від 3 донорів; усі жіночої статі (серія 336, серія 348B і серія 412) (звіт 1811301). Гепатоцити обробляли один раз на день протягом 3 днів поспіль пралсетинібом (0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 5 і 10 μ M), препаратами позитивного контролю – індукторами омепразол (50 μ M), фенобарбіталом (1000 μ M) або рифампіцином (20 μ M), або контрольним розчином носія лікарської форми (0,1 % DMSO [об/об]). Індукцію ферментів визначали шляхом вимірювання змін в експресії іРНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією і аналізу каталітичної ферментативної активності *in situ* за допомогою CYP-специфічних маркерних субстратів. Обробка індукторами позитивного контролю, такими як омепразол, фенобарбітал та рифампіцин, призводила до вираженої індукції іРНК CYP1A2 (у 81–115 разів), іРНК CYP2B6 (у 10–12 разів) та іРНК CYP3A4 (у 9,4–24 рази) відповідно в гепатоцитах від 3 донорів. Виражена індукція активності CYP1A2 (у 12–61 раз), активності CYP2B6 (у 4,4–10 разів) та активності CYP3A4 (у 2,6–23 рази) також спостерігалась для індукторів позитивного контролю в 3 серіях гепатоцитів.

Загалом обробка культури гепатоцитів пралсетинібом (від 0,03 до 10 μ M) призводила до залежної від концентрації індукції експресії іРНК CYP1A2, CYP2B6 та CYP3A4 для щонайменше 2 із 3 випробовуваних серій. *In vitro* пралсетиніб був слабким індуктором CYP1A2. Напівмаксимальна ефективна концентрація пралсетинібу

Тереза Віршець
Dr. Teresia Virshets M.D.

(EC₅₀) і максимальний ефект (E_{max}) щодо індукції CYP2B6 (на підставі експресії іРНК) визначалась при 0,22 μМ і 3,6-кратно та 0,36 μМ і 3,7-кратно в серіях 336 та 412 відповідно. EC₅₀ та E_{max} пралсетинібу щодо індукції CYP3A4 (на підставі експресії іРНК) були визначені на рівні 1,4 μМ і 8,7-кратно і 3 μМ та 3,7-кратно в серіях 336 і 348В відповідно. EC₅₀ та E_{max} пралсетинібу щодо індукції CYP3A4 (на підставі рівня ферментативної активності) були визначені на рівні 0,35 μМ і 3,2-кратно в серії 336.

Активация прегнан-Х-рецептора людини

В аналізі активації прегнан-Х-рецептора (PXR) людини *in vitro* клітини DPX2 обробляли пралсетинібом у шести концентраціях (0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 μМ) та інкубували протягом 24 годин (звіт CYP0915-R10b). Наприкінці періоду інкубації визначали кількість життєздатних клітин і порівнювали із життєздатними клітинами, обробленими носієм лікарського засобу. Позитивні контролю склалися з клітин, оброблених рифампіцином в 7 концентраціях. Пралсетиніб виявляв залежну від концентрації активацію PXR із активацією на рівні 26 % при 10 μМ.

Ензимологія метаболізму пралсетинібу у людини

Фенотипування цитохрому P450

Швидкість метаболізму пралсетинібу (0,5 μМ) вивчали в НАДФН-фортифікованих мікросомах печінки людини та панелі рекомбінантних ферментів CYP (rCYP) (звіт BLU-R9696). Концентрації пралсетинібу зменшились при t_{1/2} 173,3, 99 і 49,5 хвилин після інкубації з rCYP1A2, rCYP2D6 та rCYP3A4 відповідно. Відповідні значення CL_{int} становили 0,04, 0,07 і 0,14 мкл/хв/пмоль відповідно. Не спостерігалось метаболізму пралсетинібу в присутності rCYP2B6, rCYP2C8, rCYP2C9, rCYP2C19 або rCYP3A5. Коли CL_{int} у rCYP1A2, rCYP2D6 і rCYP3A4 була скоригована на поширеність у нативних мікросомах печінки людини, ці ізоформи становили 9,5 %, 2,6 % і 87,9 % метаболізму пралсетинібу відповідно.

Вклад ізоформ CYP в метаболізм пралсетинібу надалі вивчався шляхом застосування селективних інгібіторів в мікросомах печінки людини. Пралсетиніб повільно метаболізувався в мікросомах печінки людини, при цьому зменшення сполуки становило лише приблизно 16,2 % через 60 хвилин. Згідно з даними щодо рекомбінантного ферменту, кетоконазол/CYP3-цид (селективний інгібітор CYP3A4) повністю інгібував метаболізм пралсетинібу в мікросомах печінки людини (100 %). Кетоконазол зменшував утворення метаболітів пралсетинібу M549a і M549b на 96,5 і 91,4 % відповідно. Подібним чином α-нафтофлавіон (селективний інгібітор CYP1A2) зменшував утворення метаболітів пралсетинібу M549a і M549b на 59,4 % та 32,3 % відповідно. Хінідин (селективний інгібітор CYP2D6) зменшував утворення метаболітів пралсетинібу M549a та M549b на 44,7 % і 21,3 % відповідно. Хімічні інгібітори інших

*Терешко Віктор
Д-р мед. наук - Мисюра М.В.*

ферментів CYP не мали очевидного впливу на метаболізм пралсетинібу в мікосомах печінки людини.

Загалом дані *in vitro* (рекомбінантний фермент, хімічна інгібіція та утворення метаболітів) свідчать, що фаза I метаболізму пралсетинібу в основному каталізується CYP3A4 із мінімальною участю CYP1A2 та CYP2D6.

Фенотипування уридин 5'-дифосфат-глюкуронілтрансферази (UGT)

Для вивчення ізоформ UGT, залучених в глюкуронізацію пралсетинібу, проведено дослідження *in vitro* з мікосомами людини та з використанням окремих ферментів UGT, що експресують комплементарну ДНК (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7 та 2B15) (звіт BLU-R5500).

Метаболізм пралсетинібу *in vitro* у мікосомах печінки людини, фортифікованих уридин дифосфат глюкуроною кислотою, показав присутність одиничного глюкуроніду пралсетинібу. Дослідження рекомбінантних ферментів UGT *in vitro* показали, що UGT1A4 був основним ферментом, відповідальним за утворення N-глюкуроніду пралсетинібу. UGT1A1 та UGT1A3 також були відповідальні за утворення N-глюкуроніду пралсетинібу, однак лише на низькому рівні.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами, опосередкована транспортерами

Неспецифічне зв'язування пралсетинібу з аналізатором оцінювали при застосуванні пралсетинібу у концентрації 0,0701 μM в HBSSg_7.4 з або без 200 μM барвника Люцифера жовтого (що використовується для оцінки ефлюксного транспортера) і HBSSg_8.5 (що використовується для оцінки транспортера поглинання) (звіт 19BLUPP1R1). Відновлення пралсетинібу було на рівні від 54,8 % до 62,8 % і від 52,4 % до 58,1 % в буферах HBSSg_7.4 та HBSSg_8.5 відповідно. Додавання 1 % бичачого сироваткового альбуміну покращило відновлення до діапазону від 76 % до 81,9 % і від 68,6 % до 75,6 % у буферах HBSSg_7.4 та HBSSg_8.5 відповідно. Тому субстрати транспортерів та інгібіція пралсетинібу оцінювалась у присутності 1 % бичачого сироваткового альбуміну.

Ідентифікація субстратів транспортерів лікарських засобів

При відсутності інгібітора P-гр коефіцієнт ефлюксу пралсетинібу становив 3,02 при 1 μM в клітинах C2BBe1 (звіт 19BLUPP1R1). Коефіцієнт ефлюксу становив 0,667 і 1,05 в присутності валсподару або циклоспорину А відповідно, що відповідає повній та 97,7 % інгібіції. Таким чином, коефіцієнт ефлюксу пралсетинібу становив > 2 при відсутності інгібітора P-гр, а присутність валсподару або циклоспорину А спричиняла інгібіцію > 50 % його ефлюксного транспорту в клітині C2BBe1. Подібним чином у клітинах MDR1-MDCK і MDCK відношення результуючого потоку пралсетинібу

Терешак Віршес
В.В. - Мохачев М.В.

становило > 2 , і вальсподар зменшував його ефлюксний транспорт на $> 50\%$. Оскільки результат відповідав критеріям, пралсетиніб є субстратом P-гр.

У клітинах BCRP-MDCK і MDCK відношення результуючого потоку пралсетинібу становило > 2 , і Ko143 зменшував його ефлюксний транспорт на $> 50\%$. Оскільки результат відповідав критеріям, пралсетиніб є субстратом BCRP. При відсутності інгібітора BCRP коефіцієнт ефлюксу пралсетинібу в клітинах C2BBe1 становив 2,28 при $1 \mu\text{M}$. Коефіцієнт ефлюксу становив 2,99 і 3,04 в присутності Ko143 або FTC відповідно, що відповідає відсутності інгібіції. Можливе пояснення цього відхилення: окремий ефлюксний транспортер (P-гр або BCRP) гіперекспресується в клітинах MDR1-MDCK чи BCRP-MDCK, і транспорт субстратів, таких як пралсетиніб, посилюється в системах, де гіперекспресується окремий транспортер. На відміну, в клітинах C2BBe1, в яких присутні ендogenous як P-гр, так і BCRP, P-гр очевидно відповідальний за основну частину ефлюксного транспорту пралсетинібу, і інгібіція BCRP за допомогою Ko143 або FTC не мала впливу, оскільки P-гр все ще був активним.

Загалом пралсетиніб є подвійним субстратом P-гр і BCRP.

При випробовуваних концентраціях 0,1, 1, 4 і $10 \mu\text{M}$, коефіцієнт інфлюксу пралсетинібу становив < 2 для BSEP, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2K, OAT1 і OAT3, що свідчить, що пралсетиніб не є субстратом будь-якого з цих транспортерів за умов даного дослідження.

Оцінка інгібіції транспортера лікарського засобу

Потенціал пралсетинібу інгібувати транспортери поглинання або ефлюксу вивчали *in vitro* за допомогою специфічних маркерних субстратів (звіт 19BLUPP1R1).

Інгібіція 11 транспортерів пралсетинібом оцінювалась у лініях трансфікованих клітин або мембранних пухирцях за допомогою специфічних маркерних субстратів.

Пралсетиніб не інгібував OCT1 та OCT2 людини. Тому існує низька ймовірність OCT1- або OCT2-опосередкованої взаємодії з іншими лікарськими засобами за участю пралсетинібу. З іншого боку, пралсетиніб інгібував транспортну активність P-гр, BCRP, BSEP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, MATE1 та MATE2K людини. Показники IC_{50} *in vitro* для інгібіції P-гр (клітини C2BBe1), OATP1B3, MATE1, MATE2K, BCRP (клітини C2BBe1), OATP1B1, BCRP (клітини BCRP-MDCK), P-гр (клітини MDR1-MDCK), OAT1, OAT3 та BSEP становили 0,344, 0,680, 0,796, 0,999, 2,49, 3,59, 4,62, 9,86, < 10 , 17,7 і $20,7 \mu\text{M}$ відповідно (від найнижчого до найвищого). Тому, пралсетиніб може мати потенціал ФК взаємодій з субстратами цих транспортерів.

Александр Віршич
 Директор - Максим А.В.

<p>7) інші фармакокінетичні дослідження</p>	<p><u>Фармакокінетичне дослідження після перорального (назогастральне введення або капсули) введення самцям яванських макак</u></p> <p>Метою цього дослідження було оцінити ФК профіль пралсетинібу у мавп після прийому 2 різних лікарських форм пралсетинібу і вивчити ФК профіль пралсетинібу при застосуванні в комбнації з фамотидином (звіт WIL-124618).</p> <p>Лікарська форма пралсетинібу (пралсетиніб:лимонна кислота; 33,3:66,7 [маса/маса]) застосовувалась перорально натще в капсулах (4 × 66,25 мг/капсулу) 2 групам самців мавп (n = 4/групу. Лікарська форма пралсетинібу у вигляді колоїдного розчину, висушеного розпиленням (SDD) (пралсетиніб:гідроксипропіл метилцелюлоза 3, 50:50 [маса/маса]), застосовувалась перорально натще за допомогою назогастральної інтубації (аналогічні дози) 2 групам самців мавп (n = 4/групу). Одній групі з кожної лікарської форми попередньо вводили однократну внутрішньовенну ін'єкцію фамотидину (0,03 мг/кг) за ~30 хвилин до прийому пралсетинібу. Забір крові здійснювали через 30 хвилин, 1, 2, 4, 8, 12, 24 та 48 години після введення. Концентрація пралсетинібу в плазмі крові визначалась за допомогою ультра HPLC-MS/MS.</p> <p>У цьому дослідженні ФК профіль пралсетинібу у мавп після перорального прийому в 2 різних лікарських формах (капсули порівняно з SDD) був подібним. Окрім того, попереднє лікування фамотидином не змінювало ФК профіль будь-якої з цих 2 лікарських форм.</p>
<p>4. Токсикологія:</p>	
<p>1) токсичність у разі одноразового введення</p>	<p>У дослідженні, що не відповідало вимогам GLP (звіт WIL-124550), 4 групи самців щурів лінії Спрег-Доулі (n = 3/група) отримували пралсетиніб перорально одноразовими дозами 10, 100, 300 мг/кг (носій 1: 10 % розчин [HS15], в 20 % гідроксипропіл-бетациклодекстрині [BP-β-CD]) або 300 мг/кг (носій 2: 0,5 % карбоксиметилцелюлоза [СМС; середня в'язкість]-Na (маса/об'єм):1% Tween 80 (маса/об'єм) в деіонізованій воді [pH 2-3]). Огляди тварин у клітці були задокументовані до введення дози та перед збором зразків крові для аналізу токсикокінетики (тобто, обчислення C_{max} і AUC_{0-24}). У щурів не спостерігалось клінічних ознак при дозах до 300 мг/кг до часової точки 48 годин.</p> <p>У дослідженні, що не відповідало вимогам GLP (звіт WIL-124557), 4 групи самців собак породи бігль (n = 3/групу) отримували пралсетиніб перорально одноразовими дозами 5, 25 мг/кг (носій 1: 0,5 % карбоксиметилцелюлоза (СМС; середня в'язкість)-Na(маса/об'єм):1 % Tween 80 (маса/об'єм) в деіонізованій воді [pH 2–3]), 25 мг/кг (носій 2: 50 % Labrasol у деіонізованій воді) або 75 мг/кг. Огляди тварин у клітці були задокументовані до введення дози та перед збором зразків крові для ФК аналізу. Три тварини в групі дозування 75 мг/кг були піддані евтаназії у термінальному стані до</p>

Тереза Віршич
Директор - Мажар М.В.

огляду через 48 годин після введення дози. При аутопсії виявлені множинні темно-червоні ділянки на поверхні тонкого та товстого кишечника, що було підтверджено мікроскопічно як некроз та зменшення лімфоїдної тканини, асоційованої з ШКТ (GALT).

У дослідженні, що не відповідало вимогам GLP (звіт WIL-124569), 3 групам самців яванських макак ($n = 3/\text{групу}$) застосовували пралсетиніб одноразовими пероральними дозами 10, 30 або 300 мг/кг. Огляди тварин у клітці були задокументовані до введення дози та перед збором зразків крові для ФК аналізу. Одна тварина в групі дозування 300 мг/кг була знайдена мертвою до огляду через 48 годин після введення дози. При аутопсії виявлені множинні темно-червоні ділянки на поверхні тонкого та товстого кишечника, що було підтверджено мікроскопічно як ерозії епітелію слизової оболонки та звизракування, асоційоване із запаленням та крововиливом.

Дослідження (звіт No. WIL-124590) проведено з метою оцінки фармакокінетичного профілю пралсетинібу після однократного перорального введення через шлунковий зонд самцям щурів лінії Спрег-Доулі. У цьому дослідженні вивчали нову серію пралсетинібу, яка призначена для застосування у подальших дослідженнях, які виконуються згідно вимог GLP, на предмет потенційних відмінностей в експозиції порівняно з попередніми серіями матеріалу.

Шість тварин були включені в дослідження з колонії щурів WIL Research. Доза в поточному дослідженні (50 мг/кг) раніше вивчалась в 7-денному дослідженні повторних введень (звіт WIL-124551) і була вибрана для порівняння фармакокінетики між альтернативними серіями – серії BG0637 з попередніми серіями матеріалу, зокрема серією 5 (звіт WIL-124551). Однократні дози випробовуваного препарату застосовувались через оральний зонд.

Резюме фармакокінетичного дослідження: AUC_{0-t} 149 000 нг•годин/мл, AUC_{0-inf} 150 000 нг•годин/мл, C_{max} 12 900 нг/мл, T_{max} 4,67 год.

Після одноразової дози 50 мг/кг при застосуванні серії BG0637 AUC_{0-24} була порівнянною до AUC_{0-24} , досягнутої після прийому одноразової дози 50 мг/кг серії 5 (111 000 нг•год/мл).

Дослідження (звіт No. WIL-124591) проведено для оцінки фармакокінетичного профілю пралсетинібу після назогастрального введення самцям яванських макак. У цьому дослідженні вивчали нову серію X581238, яка призначена для застосування для подальших досліджень, які виконуються згідно вимог GLP, на предмет потенційних відмінностей в експозиції порівняно з попередніми серіями матеріалу.

Пралсетиніб у носії (0,5 % карбоксиметилцелюлоза [СМС; середня в'язкість]-Na [маса/об'єм]: 1% Tween® 80 в 50 мМ цитратного буферу [рН 2–3]) вводили як одноразову дозу шляхом назогастральної інтубації 1 групі з 3 самців яванських макак дозою на рівні 30 мг/кг і

*Сергій Віталійович
Директор - Іванова Т. В.*

	<p>об'ємом 10 мл/кг. Тварини спостерігались двічі на день на предмет смертності та стану агонії. Детальний фізикальний огляд проводився у день введення дози, і клінічні спостереження проводились у день введення дози в кожен часову точку забору крові і приблизно через 72 години після введення дози. Особлива увага приділялась моніторингу тварин на предмет абдомінального дискомфорту і суттєвих змін консистенції фекалій. Забір крові для фармакокінетичних досліджень здійснювали приблизно через 30 хвилин і через 1, 2, 4, 8, 12, 24 та 48 годин після введення дози.</p> <p>Спостерігався один випадок набряку абдомінальної області у 1 тварини приблизно через 48 годин після введення дози. Суттєві клінічні дані не спостерігались під час детального фізикального огляду до введення дози або у будь-якій часовій точці після введення 30 мг/кг пралсетинібу. Ця доза відповідала середньому значенню AUC_{0-t} 145 000 нг•год/мл і середньому значенню C_{max} 12 300 нг/мл в день 0 дослідження.</p>
<p>2) токсичність у разі повторних введень</p>	<p>Необхідно зазначити, що у звітах про дослідження токсичності у разі повторних введень застосовуються різні терміни для площі під кривою концентрація в плазмі крові-час (AUC) як синоніми (тобто, AUC від часу 0 до останньої вимірюваної концентрації вище нижньої межі кількісного визначення [AUC_{0-last}], AUC під час інтервалу дозування (τ) [$AUC_{0-\tau}$], або AUC_{0-24}). В усіх дослідженнях зразки крові для оцінки токсикокінетики збирали протягом 24 годин після введення дози, і AUC обчислювали для цього періоду часу, де застосовно. Тому, якщо не зазначено інакше, дані щодо AUC наведені як AUC_{0-24}.</p> <p><u>7-денне дослідження токсичності та токсикокінетики при пероральному введенні (через зонд) на самцях щурів лінії Спрег-Доулі (звіт WIL-124551).</u></p> <p>Цілями цього дослідження було оцінити потенціал токсичності та профіль токсикокінетики пралсетинібу при введенні через оральний зонд один раз на добу самцям щурів лінії Спрег-Доулі протягом 7 днів поспіль.</p> <p>Пралсетиніб застосовували перорально один раз на добу протягом 7 днів поспіль у 3 групах з вивчення токсикології (групи 2–4) і 3 групах з вивчення токсикокінетики (групи 2А–4А). Препарат вводили щурам у носії, 0,5 % СМС (середня в'язкість)-Na (маса/об'єм): 1 % Tween 80 (маса/об'єм) в деіонізованій воді (рН від 2 до 3). Рівень дозування становив 15, 50, і 200 мг/кг/добу (90, 300 і 1200 мг/м²/добу відповідно) у групах 2/2А, 3/3А та 4/4А відповідно. Супутні контрольні групи (групи 1 та 1А) отримували носій лікарського засобу в порівнянному режимі. Об'єм дози становив 10 мл/кг в усіх групах. Кожна з груп 1–4 складалася з 6 самців, і кожна з груп 1А–4А складалася з 3 самців. Після заключного збору крові (день 7) усі виживші тварини в дослідженні токсикокінетики</p>

Тереза Вірніш
Dr. Teresia V. B.

були піддані евтаназії. Проведено стандартні оцінки, включаючи смертність і перевірку здоров'я, клінічні ознаки, масу тіла, споживання їжі і відбір зразків для токсикокінетики, гематологічного та біохімічного аналізу. Заплановані аутопсії із гістопатологічною оцінкою тварин у токсикологічному дослідженні проведено в день 8.

Доза 200 мг/кг/добу не переносилась щурами. Усі 9 самців у групі дозування 200 мг/кг/добу були або знайдені мертвими (4 самці в дослідженні токсичності та 2 самці в дослідженні токсикокінетики), або піддані евтаназії в термінальному стані (2 самці в дослідженні токсичності та 1 самець в дослідженні токсикокінетики) в день 4. Клінічні дані у помираючих тварин до евтаназії включали знижену активність, виражену слабкість, холодні кінцівки та тіло та/або згорблену позу. Причиною смерті або захворюваності у кожній тварини був крововилив у серце. У 1 самця в групі з вивчення токсикокінетики крововилив у легені був зареєстрований як додаткова причина смерті. Решта досліджуваних тварин вижили до запланованої аутопсії (день 8). Не спостерігалось пов'язаних з пралсетинібом прижиттєвих змін у будь-яких щурів, що вижили до запланованої аутопсії.

Пов'язані з пралсетинібом гематологічні зміни у тварин при запланованій аутопсії включали низьке середнє число ретикулоцитів при дозуванні 15, 50 та 200 мг/кг/добу, низьку середню ширину розподілу еритроцитів по концентрації гемоглобіну при дозуванні 15 та 50 мг/кг/добу, відхилення у лейкоцитарній формулі (низьке середнє число нейтрофілів, моноцитів та лейкоцитів при дозуванні 50 мг/кг/добу і низьке число базофілів при дозуванні 15 і 50 мг/кг/добу) та більш високе середнє число нейтрофілів при дозуванні 200 мг/кг/добу. Пов'язані з пралсетинібом дані з боку біохімічних показників в сироватці крові у тварин при запланованій аутопсії включали вищий середній рівень АЛТ і АСТ при дозуванні 50 та 200 мг/кг/добу, вищий середній рівень лужної фосфатази, креатинкінази (КК) і концентрації азоту сечовини в крові при дозуванні 200 мг/кг/добу та вищий середній рівень холестерину при дозуванні 15, 50 та 200 мг/кг/добу. Спостерігалися пов'язані з пралсетинібом зменшення середнього рівня кальцію, хлоридів, бікарбонатів натрію при дозуванні 200 мг/кг/добу, підвищення середнього рівня фосфору при дозуванні 50 та 200 мг/кг/добу і підвищення середнього рівня калію та магнію при дозуванні 200 мг/кг/добу. Середні рівні Т3 і Т4 у сироватці крові були нижчими в групі дозування 50 мг/кг/добу.

При аутопсії пов'язані з пралсетинібом макроскопічні зміни спостерігались у самців у групі дозування 200 мг/кг/добу. Ці дані включали темно-червоне забарвлення наднирників та пахвових лімфатичних вузлів, зменшення селезінки, темно-червоні зони в легенях, шлунку та тимусі; набряк тимусу; та ущільнене серце. Ці макроскопічні зміни відповідали крововиливу (темно-червона зона[и] або зміна забарвлення наднирників, легень, шлунка і тимусу;

Терешак Віктор

Директор - Прокопенко А.В.

та ущільнене серце), синусовий еритроцитоз (пахвові лімфатичні вузли), некротизуюче запалення (набряк тимусу) і атрофія еритроцитів/лімфоїдна деплеція (селезінка).

Спостерігались пов'язані з пралсетинібом зменшення середньої маси селезінки та тимусу при дозуванні 15 та 50 мг/кг/добу і зменшення середньої маси печінки при дозуванні 50 мг/кг/добу. Смертність не дозволила оцінити масу органів при дозуванні 200 мг/кг/добу.

Мікроскопічні зміни у самців у групі дозування 50 мг/кг/добу при запланованій аутопсії (подібно до таких, що спостерігались у самців у групі дозування 200 мг/кг/добу) включали крововилив і некроз міофібрил серця; зменшення клітинності та/або некроз лімфоїдної тканини тимусу, Пейєрових бляшок, пахвових, брижових та нижньощелепних лімфатичних вузлів; атрофію червоної пульпи селезінки; зменшення клітинності кісткового мозку стегна та грудини; дисплазію зон росту стегна та грудини; мінералізацію шлунка і слинних залоз. Усі ці зміни вважались несприятливими.

Доза, що не спричиняє видимих побічних ефектів (NOAEL) для щурів становила 15 мг/кг/добу (90 мг/м²/добу). Ця доза відповідала середньому значенню AUC₀₋₂₄ 17 100 год•нг/мл і середньому значенню C_{max} 1930 нг/мл в день 6. Максимальна доза 75 мг/кг/добу рекомендована для подальшого 28-денного дослідження токсичності у разі повторних введень, що відповідає вимогам GLP.

7-денне дослідження токсичності і токсикокінетики при пероральному застосуванні (через зонд) самцям собак породи бігль (звіт WIL-124558).

Цілями даного дослідження було оцінити потенціал токсичності та профіль токсикокінетики пралсетинібу після щоденного перорального введення через зонд собакам породи Бігль протягом 7 днів поспіль.

Дванадцяти раніше нелікованим самцям собак погоди бігль віком приблизно 6–7 місяців на початку введення препарату вводили пралсетиніб щоденно протягом 7 днів поспіль, використовуючи носій, 0,5 % СМС (середня в'язкість)-Na (маса/об'єм): 1% Tween 80 (маса/об'єм) в деіонізованій воді (рН від 2 до 3). Рівень дози становив 3, 10 і 30 мг/кг/добу (60, 200, 600 мг/м²/добу відповідно) в групах 2, 3 і 4 відповідно. Супутня контрольна група (група 1) отримувала носій у порівнянному режимі. Об'єм дози становив 5 мл/кг для усіх груп. Проводилася стандартна оцінка, включаючи смертність і перевірку здоров'я, клінічні ознаки, масу тіла, вживання їжі і відбір крові для визначення токсикокінетики, гематологічного та клінічного біохімічного аналізу. Заплановані аутопсії тварин із гістопатологічною оцінкою в токсикологічному дослідженні проводилися в день 8.

Доза 30 мг/кг/добу собаками не переносилась, оскільки всі 3 тварини в групі дозування 30 мг/кг/добу були піддані евтаназії в

Тереза Вірнелл
Dr. Terese V. V.

термінальному стані в день 3 дослідження. Причиною захворюваності кожної тварини були токсичні зміни GALT, при цьому у тварин спостерігались такі клінічні ознаки: абдомінальний біль, діарея і різна кількість червоного матеріалу у фекаліях.

Пов'язані з пралсетинібом зміни в гематологічному аналізі у тварин при запланованій аутопсії включали зменшення абсолютного числа ретикулоцитів, абсолютного числа нейтрофілів та абсолютного числа моноцитів у групах дозування по 3 і 10 мг/кг/добу порівняно із відповідними середніми вихідними значеннями. Це зниження відповідало мікроскопічним ознакам зменшення клітинності кісткового мозку. Спостерігалось пов'язане з пралсетинібом зменшення середнього рівня T4 та кальцитоніну в групі дозування 30 мг/кг/добу (зразки до планової евтаназії в день 3) порівняно з відповідними середніми вихідними значеннями.

При аутопсії було по 1 тварині в групах дозування 3 та 10 мг/кг/добу, в яких були виявлені множинні зони темно-червоного забарвлення (спостерігалися в ободовій кишці в групі дозування 3 мг/кг/добу, спостерігалися в сліпій кишці та ободовій кишці в групі дозування 10 мг/кг/добу); мікроскопічних корелятив не спостерігалось. У групі дозування 10 мг/кг/добу в 1 тварини виявлено маленький тимус; це відповідало мікроскопічним ознакам зменшення клітинності лімфоїдної тканини тимусу. В групі дозування 30 мг/кг/добу було 3/3 тварини, у яких виявлені множинні зони темно-червоного забарвлення на поверхні шлунка, дванадцятипалої кишки, сліпої кишки, товстої кишки та/або прямої кишки. Ці макроскопічні ознаки відповідали мікроскопічним ознакам лімфоїдного некрозу та виснаження GALT.

Спостерігалось пов'язане з пралсетинібом зменшення абсолютної маси тимусу і абсолютної маси селезінки в групі застосування дози 10 мг/кг/добу порівняно із середніми показниками при застосуванні носія як контролю. Масу органів не визначали в групі дозування 30 мг/кг/добу (тварини, що були піддані евтаназії в термінальному стані).

Спостерігалися пов'язані з пралсетинібом мікроскопічні зміни в GALT (клубова кишка, сліпа кишка і товста кишка), а також зміни з боку кісткового мозку (грудина), тимусу та периферичних лімфатичних вузлів у групах дозування 10 та 30 мг/кг/добу. В клубовій кишці, сліпій кишці і товстій кишці бар'єр слизової оболонки був інтактним, але в межах GALT виявлено мультифокальні зони некрозу лімфоїдного гермінативного центру, що асоціювались із нейтрофільною інфільтрацією та мінімальною кровотечею у 3 з 3 тварин у групі дозування 30 мг/кг/добу і в 1 з 3 тварин у групі дозування 10 мг/кг/добу. Дифузне зменшення клітинності (виснаження лімфоїдної тканини) в GALT від мінімального до вираженого спостерігалось також в усіх тварин у групах дозування 10 та 30 мг/кг/добу, при цьому тяжкість була вищою в групі дозування 30 мг/кг/добу. Зміни в GALT відповідали

Терешак Віршій
В.В. - Фізіолог М.В.

зонам темно-червоного забарвлення на поверхні шлунково-кишкового тракту в групі дозування 30 мг/кг/добу і вважались несприятливими. У лімфатичних вузлах (пахвових, нижньощелепних та/або брижових) спостерігалось дифузне зменшення клітинності від мінімального до помірного у 3 з 3 тварин в групі дозування 30 мг/кг/добу. В кістковому мозку (грудина) спостерігалось зменшення мієлоїдної та еритроїдної клітинності від мінімального до помірного у 3 з 3 тварин у групі дозування 30 мг/кг/добу та у 1 з 3 тварин у групі дозування 10 мг/кг/добу. Ця зміна відповідала зменшенню числа ретикулоцитів, нейтрофілів та моноцитів і не вважалася несприятливою. У тимусі спостерігалось дифузне зменшення лімфоїдної клітинності від мінімального до помірного у 2 з 3 тварин у групі дозування 10 мг/кг/добу та у 3 з 3 тварин у групі дозування 30 мг/кг/добу. Ця зміна відповідала зменшенню маси тимусу і не вважалася несприятливою. Спостерігалися множинні зони гострого крововиливу в легені у 2 з 3 тварин у групі дозування 30 мг/кг/добу, а в 1 тварини в групі дозування 30 мг/кг/добу спостерігався дифузний крововилив у стінку жовчного міхура. Інші пов'язані з пралсетинібом зміни, які не вважались несприятливими, включали зменшення лімфоїдної клітинності в тимусі у 3 з 3 тварин у групі дозування 30 мг/кг/добу, що відповідало зменшенню маси тимусу. Зменшення клітинності в кістковому мозку, що відповідало зменшенню числа ретикулоцитів, нейтрофілів та моноцитів, спостерігалось у цьому дослідженні і було пов'язане зі зменшенням сигналів, опосередкованих еритропоетином та гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором, внаслідок інгібіції JAK2 відповідно.

NOAEL для собак становила 3 мг/кг/добу (60 мг/м²/добу). Ця доза відповідала середньому значенню AUC₀₋₂₄ 24 500 год•нг/мл і середньому значенню C_{max} 2600 нг/мл в день 6. У результаті чутливості до інгібіції р38 MAPK-опосередкованого шляху передачі сигналу собаки породи бігль не рекомендовані для використання в 28-денному дослідженні токсичності у разі повторних введень, що відповідає вимогам GLP.

7-денне дослідження токсичності і токсикокінетики при пероральному введенні (через зонд) самцям яванських макак (звіт WIL-124572)

Метою цього дослідження було оцінити потенціал токсичності та профіль токсикокінетики пралсетинібу після щоденного введення через назогастральний зонд самцям яванських макак протягом 7 днів поспіль.

Чотирнадцять раніше нелікованих самців яванських макак отримували пралсетиніб через назогастральний зонд щоденно протягом 7 днів поспіль із використанням носія 0,5 % СМС (середня в'язкість)-Na (маса/о'б'єм): 1 % Tween 80 (маса/о'б'єм) в 50 мМ цитратного буфера, рН 2,2.

Терешак Віктор

В.В. - Володимир П.В.

Рівні доз становили 10, 30 та 150 мг/кг/добу (120, 360 і 1800 мг/м²/добу відповідно) у групах 2, 3 та 4 відповідно. Супутня контрольна група (Група 1) отримувала носій у порівнянному режимі. Одній тварині, що вижила, в групі 2 дозу зменшили із 150 до 75 мг/кг/добу (900 мг/м²/добу) в день 3. Об'єм дози становив 10 мл/кг в усіх групах. Проводилася стандартна оцінка, включаючи смертність і перевірку здоров'я, клінічні ознаки, масу тіла, вживання їжі і відбір крові для визначення токсикокінетики, гематологічного та клінічного біохімічного аналізу. Заплановані аутопсії тварин із гістопатологічною оцінкою в токсикологічному дослідженні проводились в день 8.

Доза 150 мг/кг/добу мавпами не преносилась, оскільки усі 3 тварини в групі дозування 150 мг/кг/добу і 1 тварина в групі дозування 30 мг/кг/добу були піддані евтаназії в термінальному стані. Причиною смертності у кожної тварини була токсична дія на шлунково-кишковий тракт із вторинним бактеріальним сепсисом. Клінічні ознаки, що узгоджуються з цим, у 2 тварин у групі дозування 150 мг/кг/добу, підданих евтаназії в термінальному стані в день 2, включали тремор, діарею, атаксію, знижену активність, згорблену позу, зменшення частоти дихання, холодне тіло та/або бліді ясна. Єдиній тварині, що вижила, дозування 150 мг/кг/добу було зменшене до 75 мг/кг/добу; в день 4 ця тварина була піддана евтаназії в термінальному стані із подібними клінічними ознаками, включаючи водянисту діарею, слабкість, згорблену позу, прострацію, знижену активність, бліді кінцівки, холодне/блїде тіло, поверхнєве дихання. Одна тварина в групі дозування 30 мг/кг/добу була піддана евтаназії в термінальному стані на день 6, маючи водянисту діарею, тремор, знижену активність, згорблену позу, частково закриті очі та бліді ясна.

Спостерігалось пов'язане з пралсетинібом зменшення абсолютного числа ретикулоцитів, абсолютного числа нейтрофілів, абсолютного числа моноцитів у групі дозування 30 мг/кг/добу порівняно з відповідними середніми вихідними показниками. Спостерігалось пов'язане з пралсетинібом збільшення середнього рівня АЛТ, АСТ, фосфора, КК та лактатдегідрогенази в групі дозування 30 мг/кг/добу порівняно з відповідними середніми вихідними показниками.

При аутопсії пов'язані з пралсетинібом ознаки у вигляді темно-червоного забарвлення на поверхні шлунка, дванадцятипалої кишки, тонкої кишки, клубової кишки, сліпої кишки та товстої кишки спостерігалися в групі дозування 150/75 мг/кг/добу. Пов'язані з пралсетинібом ознаки (маленька селезінка) спостерігалися в групах дозування по 30 та 150/75 мг/кг/добу. Пов'язані з пралсетинібом зміни темно-червоного забарвлення в усіх долях легень, ущільнена права діафрагмальна доля легені і червона рідина в грудній клітці спостерігалися в 1 тварини, якій вводили носій; ці спостереження корелювали з мікроскопічними ознаками та підтвердили діагноз аспірації (помилка при зондуванні).

Директор Виршеет
Д-р М. В. Мясной

Спостерігалось пов'язане із пралсетинібом зменшення абсолютної маси тимусу та абсолютної маси селезінки в групах дозування по 30 та 150/75 мг/кг/добу порівняно з середніми значеннями контрольної групи, якій вводили носій. Іншого пов'язаного з пралсетинібом впливу на масу органів не спостерігалось.

Спостерігалися пов'язані із пралсетинібом мікроскопічні зміни в шлунково-кишковому тракті, пахвових та нижньощелепних лімфатичних вузлах, кістковому мозку, тимусі, селезінці, GALT та брижових лімфатичних вузлах та легенях у групах дозування 30 і 150/75 мг/кг/добу. В шлунково-кишковому тракті спостерігалися мультифокальні зони ерозій та/або звиразкування епітелію слизової оболонки, асоційовані із крововиливом та внутрішньовогнищевими бактеріями (суміш грампозитивних і грамнегативних) в шлунку, дванадцятипалій кишці, тонкій кишці, клубовій кишці, сліпій кишці, товстій кишці та/або прямій кишці в групі дозування 150/75 мг/кг/добу. Ці зміни відповідали мікроскопічним проявам запалення і бактеріальних колоній в пахвових та нижньощелепних лімфатичних вузлах у групі дозування 150/75 мг/кг/добу, а також у однієї тварини в групі дозування 30 мг/кг/добу. В кістковому мозку (грудина) спостерегалось зменшення як мієлоїдної, так і еритроїдної клітинності від мінімального до легкого ступеня в групі дозування ≥ 30 мг/кг/добу; ця зміна супроводжувалась зменшенням числа ретикулоцитів, нейтрофілів та моноцитів. У тимусі спостерегалось дифузне зменшення лімфоїдної клітинності від легкого до важкого ступеня при дозуванні ≥ 30 мг/кг/добу, що відповідало зменшенню маси тимусу. В селезінці спостерегалось дифузне зменшення лімфоїдної клітинності від легкого до помірного ступеня тяжкості в групі дозування ≥ 30 мг/кг/добу, що відповідало зменшенню маси селезінки. У GALT та брижових лімфатичних вузлах спостерегалось дифузне зменшення лімфоїдної клітинності від мінімального до помірного ступеня тяжкості в групі дозування ≥ 30 мг/кг/добу.

NOAEL для мавп становила 10 мг/кг/добу (120 мг/м²/добу). Ця доза відповідала середньому значенню AUC_{0-24} 42 700 год•нг/мл і середньому значенню C_{max} 4570 нг/мл в день 6. Максимальна доза 40 мг/кг/добу рекомендована для подальшого 28-денного дослідження токсичності у разі повторних введень, що відповідає вимогам GLP.

Дослідження токсичності та токсикокінетики на самках шурів лінії Спрег-Доулі проведено для вивчення потенціалу токсичності та профілю токсикокінетики пралсетинібу при введенні через оральний зонд при дозуванні по 15 і 50 мг/кг протягом 7 днів поспіль (звіт WIL-124592). Пероральне введення добре переносилось в усіх дозах; тому NOAEL була встановлена на рівні 50 мг/кг/добу. Ця доза відповідала показникам AUC_{0-24} і C_{max} 221 000 год•нг/мл і 17 700 нг/мл, відповідно, в день 6.

Тереза Віршець

Дир. - Маша М.В.

28-денне (один раз на добу) дослідження токсичності та токсикокінетики при пероральному введенні (через зонд) щурам лінії Спрег-Доулі із 14-денним періодом відновлення (звіт WIL-124570).

Метою цього дослідження було оцінити потенціал токсичності та профіль токсикокінетики пралсетинібу при щоденному введенні через оральний зонд щурам лінії Спрег-Доулі протягом 28 днів поспіль, а також оцінити відновлення, персистенцію чи прогресування будь-яких ефектів після як мінімум 14-денного періоду відновлення.

Пралсетиніб у носії (0,5% карбоксиметилцелюлоза натрію [середня в'язкість; маса/об'єм]:1% Tween® 80 [маса/об'єм] в деіонізованій воді [рН 2-3]) вводили через оральний зонд один раз на добу протягом 28 днів поспіль 4 групам щурів для вивчення токсичності (групи 2–5) та 4 групам щурів для вивчення токсикокінетики (групи 2А–5А). Застосовувались такі рівні доз: 10, 20, 30 і 75 мг/кг/добу в групах 2/2А, 3/3А, 4/4А і 5/5А відповідно. Супутні контрольні групи (групи 1 і 1А) отримували носій у порівнянному режимі. Об'єм дози становив 10 мл/кг для усіх груп. Групи 1–5 (кожна) складалась із 15 тварин/стать. Група 1А складалась із 3 тварин/стать і групи 2А–5А (кожна) складалась із 9 тварин/стать. Через надмірну токсичність усі решта тварин для вивчення токсичності та токсикокінетики в групі дозування 75 мг/кг/добу були піддані евтаназії в день 8 (самки) або 9 (самці) після 8–9 введень. Через 28 днів після введення дози 9–10 тварин/стать/групу для вивчення токсичності в групах дозування 10, 20 та 30 мг/кг/добу були піддані евтаназії; решта 4–5 тварини/стать/групу були піддані евтаназії після 15-денного періоду без введення препарату (відновлення). Після заключного забору крові (день 28 дослідження) усі тварини, що вижили, в групі вивчення токсикокінетики були піддані евтаназії.

Токсикологічні оцінки включали клінічні спостереження, детальне фізикальне обстеження, визначення маси тіла, визначення споживання їжі, оцінку офтальмологічної функції, біохімічний аналіз крові, аналіз крові та коагуляції, повну аутопсію, визначення маси органів, гістопатологічне обстеження і токсикокінетику.

Для оцінки токсикокінетики забір зразків крові здійснювали у 3 тварин/стать в групі 1А приблизно через 2 години після введення дози і 3 тварин/стать/групу/часову точку в групах лікування пралсетинібом до введення дози і приблизно через 30 хвилин та 1, 2, 8 і 24 години після введення дози в день 0 (групи 2А–5А) і 27 (групи 2А–4А). Забір зразків крові здійснювали у 6 тварин/стать/групу в групі 5А до введення дози і через 30 хвилин та 2 і 8 годин після введення дози в день 9.

Пероральне введення пралсетинібу щурам лінії Спрег-Доулі дозами на рівні 10, 20, 30 і 75 мг/кг/добу (60, 120, 180 та 450 мг/м²/добу відповідно) протягом 28 днів призвело до летальності > 10 % самців та самок (38 % і 42 % відповідно) при дозуванні 75 мг/кг/добу. Несприятливі клінічні ознаки, такі як розкидування кінцівок після

Тереза Вірмей
Дж. А. Массон М.В.

обробки, спостерігались у групі дозування 30 мг/кг/добу у самців та самок. Зниження маси тіла самців у групах дозування 10, 20 і 30 мг/кг/добу відповідало зменшенню споживання їжі в групі дозування 30 мг/кг/добу у самців та самок. Несприятливі мікроскопічні зміни включали дисплазію зон росту в стегновій кістці та дегенерацію зуба різця, які спостерігалися в групах дозування 20 та 30 мг/кг/добу (ненесприятливі при дозуванні 10 мг/кг/добу). Додаткові несприятливі зміни включали зменшення клітинності кісткового мозку (несприятливі при дозуванні 20 та 30 мг/кг/добу та ненесприятливі при дозуванні 10 мг/кг/добу), що корелювало зі зниженням середнього числа еритроцитів, рівня гемоглобіну, гематокриту та числа ретикулоцитів і мінералізації залозистого шлунка (несприятливі при дозуванні 30 мг/кг/добу, ненесприятливі при дозуванні 10 та 20 мг/кг/добу), що корелювало із вищим середнім рівнем фосфору. Ненесприятливі зміни включали вогнища мінералізації в серці, нирках, яєчниках і спинному мозку, дисплазію зони росту груднини, крововиливи в кору надниркових залоз, аутофагоцитоз у підшлунковій залозі, посилення фонових змін каналцевої мінералізації в нирках і мінералізації судин у легенях та зменшення лімфоїдної клітинності в тимусі, селезінці, Пейєрових бляшках, нижньощелепних, брижових і пахвових лімфатичних вузлах, що корелювало з макроскопічними змінами (маленький тимус і маленькі пахвові лімфатичні вузли, зменшення середньої маси тимусу і селезінки та зменшення середнього числа лімфоцитів та еозинофілів). Спостерігалися пов'язані з пралсетинібом підвищення в сироватці крові середнього рівня АЛТ, АСТ, сорбітолдегідрогенази, холестерину, тригліцеридів, азоту сечовини, креатиніну, кальцію і калію та зменшення в сироватці крові середнього рівня альбуміну та білка, однак не спостерігалось макроскопічних та гістологічних корелятив. Пов'язані з пралсетинібом зміни, що спостерігались при первинній аутопсії в стегні, зубах, кістковому мозку, залозистому шлунку, серці, спинному мозку, легенях, нирках, яєчниках та підшлунковій залозі, були наявні і при аутопсії у період відновлення. За винятком зубів, у групі дозування 30 мг/кг/добу тяжкість та частота змін зменшились.

З огляду на значну смертність у групі дозування 75 мг/кг/добу, відсутність летальності, пов'язаної із пралсетинібом, та/або змін, що оцінюються як загрожуючі летальністю щонайменше 10 % тварин із групи 30 мг/кг/добу, небезпечна токсична доза (STD10) для щурів становила 30 мг/кг/добу (180 мг/м²/добу) для самців та самок. Цей рівень дози відповідав середньому показнику C_{max} і AUC_{0-24} 7180 нг/мл і 125 000 год•нг/мл у самців та 9120 нг/мл і 101 000 год•нг/мл у самок, відповідно, в день 27.

28-денне (один раз на добу) дослідження токсичності та токсикокінетики при пероральному введенні (через назогастральний

Тереза Вернесс

Джон-Франческо М. В.

зонд) яванським макакам із 14-денним періодом відновлення (звіт WIL-124571).

Метою цього дослідження було оцінити потенціал токсичності та профіль токсикокінетики пралсетинібу при щоденному введенні через назогастральний зонд яванським макакам протягом 28 днів поспіль, а також оцінити відновлення, персистенцію чи прогресування будь-яких ефектів після як мінімум 14-денного періоду відновлення.

Випробовувану речовину вводили один раз на добу протягом 28 днів у групах 2 і 3 і до 5 днів поспіль у групі 4. Початковий рівень дози становив 5, 15 і 40 мг/кг/добу в групах 2, 3 і 4 відповідно. Об'єм дози становив 10 мл/кг в усіх групах. Супутня контрольна група (група 1) отримувала носій в порівнянному режимі. Через явну токсичність та смертність для решти тварин групи 4 зроблено перерву в дозуванні в період дослідження на 5 день (самці) або 4 день (самки), і надалі їх піддали ранньому умертвленню в той самий день. На 5 день дослідження (самці) і на 4 день дослідження (самки) в групі 2 дозу було зменшено до 2,5 мг/кг/добу. Окрім того, для решти тварин групи 3 зроблено перерву в дозуванні в період дослідження на 5 та 6 день для самців та 4 і 5 день для самок. На 7 день дослідження для самців та на 6 день для самок дозу в групі 3 було зменшено до 7,5 мг/кг/добу через надмірну токсичність та смертність. На початку введення дози кожна група складалась із 5 тварин/стать. Однак, 2 самці в групі дозування 5/2,5 мг/кг/добу були знайдені мертвими на 9 і 11 день дослідження (не пов'язано із застосуванням досліджуваного препарату), що призвело до залучення додаткових тварин, які початково не були включені в дослідження. Таким чином, група 2 складалась із 7 самців та 5 самок. Додаткові самці в групі 2 отримували дозу 2,5 мг/кг/добу в ході дослідження. Тварини в групах дозування 0, 5/2,5 і 15/7,5 мг/кг/добу отримували дози протягом 28 днів (за винятком 2 днів без введення препарату в групі 15/7,5 мг/кг/добу), після чого 3 тварини/стать були піддані евтаназії (день 28 дослідження); решта 1–2 тварини в цих групах були піддані евтаназії після 15-денного періоду відсутності введення (відновлення) (день 42 дослідження).

Оцінювані параметри включали клінічне спостереження, визначення індивідуальної маси тіла, клінічні патологічні параметри (гематологічні показники, коагуляція, біохімічний аналіз крові і загальний аналіз сечі), оцінку токсикокінетики, офтальмологічне обстеження, електрокардіограму (ЕКГ), повну аутопсію, визначення маси окремих органів і всебічне гістопатологічне обстеження.

Пов'язана із пралсетинібом летальність самців та/або самок спостерігалася в групі дозування 40 та 15 мг/кг/добу.

Дози 40 та 15 мг/кг/добу призвели до пов'язаних із пралсетинібом смертей та стану агонії, що вимагав евтаназії (3 самці і 4 самки в групі дозування 40 мг/кг/добу і 1 самець в групі дозування 15 мг/кг/добу) в дні 3–5. Усі решта тварин в групі дозування 40 мг/кг/добу були

Тереза Вейс

Вікторія - Анастасія М. В.

піддані евтаназії при ранній запланованій аутопсії в день 4 (самки) або день 5 (самці).

Пов'язані з пралсетинібом клінічні ознаки у рано померлих самок у групі дозування 40 мг/кг/добу включали діарею, коричневий матеріал (фекалії) навколо аногенітальної області, червоний матеріал у фекаліях, атаксію, згорблену позу, прохолодні та/або бліді кінцівки та/або тіло, зниження активності, виснаження, атонію шкіри, худе тіло, недоглянутий вигляд і зменшення частоти дихання. На підставі цих несприятливих клінічних змін та втрати маси протягом днів 0–3, решта 2 самці і 1 самка в групі дозування 40 мг/кг/добу були піддані ранньому умертвленню в дні 5 і 4 відповідно.

Пов'язані із пралсетинібом клінічні ознаки у єдиного рано померлого самця в групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу (лише після отримання дози 15 мг/кг/добу) включали прохолодні і бліді кінцівки, зниження активності, поверхнєве дихання, часткове закриття обох очей, виснаження, відкриту рану на лівій задній кінцівці та червоний матеріал на задній кінцівці та в аногенітальній ділянці перед смертю. Ця тварина також втратила приблизно 9 % маси тіла в період з 0 по 3 день.

Причиною захворюваності кожної з рано померлих тварин була ерозія та звиразкування епітелію слизової шлунково-кишкового тракту із супутнім запаленням та кровотечею. Вторинний бактеріальний сепсис був підтверджений у 7 із 10 тварин за наявності запалення/некрозу та внутрішньовогнищевих бактерій в системних лімфатичних вузлах (суміш грампозитивних та грамнегативних), селезінці, серці та/або нирках. Ураження шлунково-кишкового тракту корелювали з макроскопічними червоними/темно-червоними та/або припухлими ділянками в кишечнику. Зменшена клітинність лімфатичних органів (лімфатичні вузли, селезінка, пейєрові бляшки та тимус) виникла в усіх тварин і корелювала зі зменшенням середньої маси селезінки та тимусу в групі дозування 40 мг/кг/добу, а також із макроскопічними змінами (зменшення селезінки та тимусу) у тварин, які рано померли. Зменшена клітинність в кістковому мозку груднини також спостерігалась у цих тварин, що незаплановано померли/рано умертвлені, та крововилив у кістковий мозок спостерігався при дозуванні 40 мг/кг/добу. Відповідними змінами в клінічній патології були підвищення рівня протромбіну та активованого часткового тромбoplastинового часу та показників АЛТ та АСТ і зменшення рівня кальцію в сироватці крові. Зменшення рівня загального білка, альбумінів, глобулінів, хлоридів та натрію і підвищення рівня холестерину і фосфору були вторинними до дефіциту харчування, недостатності шлунково-кишкового тракту та термінального сепсису. Підвищення рівня креатиніну та азоту сечовини були вторинними до зневоднення. Два самці в групі дозування 5/2,5 мг/кг/добу були піддані евтаназії під час дослідження через механічні пошкодження, не пов'язані із застосуванням пралсетинібу, і були замінені під час дослідження.

Тереза Вітс
Тереза Вітс Т.В.

Пошкодження у цих 2 самців (набряк/порушення використання задньої кінцівки та порушення використання передньої кінцівки) були випадковими і не пов'язаними із застосуванням пралсетинібу. У цих тварин не спостерігалось пов'язаних із застосуванням пралсетинібу змін в клінічній патології або макроскопічних змін. Усі інші тварини вижили до аутопсії на 28 або 42 дні.

Клінічні ознаки, що спостерігалися в групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу у самок, які вижили до запланованої аутопсії, включали згорблену позу, зменшення дефекації, м'які фекалії, худе тіло, атонію дерми, блювоту, що містила їжу або прозорий білий, жовтий або червоний матеріал, слиновиділення, прозорий матеріал навколо рота та/або почервоніння області морди. Також спостерігались порушення використання правої передньої кінцівки, червоний матеріал на передній(их) кінцівках та/або розрив пальців правої кінцівки (не пов'язані із застосуванням пралсетинібу). За винятком втрати маси тіла, що спостерігалась у рано померлих тварин, маса тіла не змінювалась у тварин, які вижили до запланованої евтаназії.

Пов'язаними із пралсетинібом змінами гематологічних показників та коагуляції були подовження активованого часткового тромбoplastинового часу у самців через 7 та 28 днів. Вище абсолютне число нейтрофілів через 7 та 28 днів у тварин обох статей, і вище загальне число лейкоцитів на 28 день у самців відповідало лейкоцитарній формулі стресу. Пов'язаними із пралсетинібом змінами біохімічних параметрів сироватки крові в групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу були зниження рівня глобулінів у самців та самок на 7 день, зменшення рівня загального білка у самок на 7 та 28 день і зменшення рівня кальцію у самців та самок на 7 день і у самців на 28 день. Вищі значення рівня АЛТ та АСТ спостерігались у самців та самок в групах дозування 5/2,5 і 15/7,5 мг/кг/добу на 7 та 28 день. Жодна з цих відмінностей в гематологічних показниках або біохімічних показників сироватки крові не корелювала із мікроскопічними змінами.

Висока відносна щільність сечі та низький загальний обсяг сечі у самців у групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу на 7 день корелювали із зневодненням/зменшенням споживання води і не мали мікроскопічних корелятив.

Мінімальне зменшення лімфоїдної клітинності тимусу спостерігалась у однієї самки у групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу після 14-денного періоду без введення дози. Не спостерігалось пов'язаних із пралсетинібом макроскопічних змін або змін у показниках клінічних біохімічних параметрів при аутопсії на 42 день.

Пов'язаними із пралсетинібом мікроскопічними змінами були зменшення лімфоїдної клітинності тимусу у самок в групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу, зменшення клітинності кісткового мозку груднини у самців та самок у групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу (корелювало з меншими значеннями абсолютного числа та відсотку ретикулоцитів

Тереза Бірнш
Dr. Terese Birnsh

у самців та самок у групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу в день 7 та з меншим числом еритроцитів, рівнем гемоглобіну та гематокриту у самців та самок, а також з меншим абсолютним числом ретикулоцитів та лімфоцитів у самок в групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу в день 28), дисплазія зон росту стегнової кістки у самців у групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу. За винятком одиничного виникнення почервоніння морди в день 33 і мінімального зменшення лімфоїдної клітинності тимусу в однієї самки в групі дозування 15/7,5 мг/кг/добу при аутопсії на 42 день, усі інші пов'язані з пралсетинібом клінічні ознаки, кінцеві точки клінічної патології, маса органів і макроскопічні та мікроскопічні зміни при аутопсії на 28 день вже не відмічались після 14-денного періоду відновлення.

Виходячи з результатів цього дослідження, пероральне застосування пралсетинібу яванським макакам при початковому рівні доз 5, 15 і 40 мг/кг/добу протягом 28 днів призводило до пов'язаної із пралсетинібом летальності самців та/або самок при дозуванні 15 і 40 мг/кг/добу та подальшого раннього умертвлення в групі дозування 40 мг/кг/добу і зменшення дози до 2,5 і 7,5 мг/кг/добу в групах 2 і 3 відповідно.

З огляду на відсутність пов'язаної із пралсетинібом летальності та/або змін, що вважались життєво небезпечними, після введення препарату дозою 7,5 мг/кг/добу протягом 21 (самці) чи 22 (самки) днів, максимальна нетяжка токсична доза (HNSTD) для мавп становила 7,5 мг/кг/добу (90 мг/м²/добу) для самців і самок. Цей рівень дози відповідав середнім показникам C_{max} і AUC_{0-24} 3190 нг/мл і 28 400 год•нг/мл у самців та 3320 нг/мл і 25 800 год•нг/мл у самок, відповідно, в день 27.

13-тижневе (один раз на добу) дослідження токсичності та токсикокінетики при пероральному введенні (через зонд) щурам лінії Спрег-Доулі (звіт 00124770).

Метою цього дослідження було оцінити потенціал токсичності та профіль токсикокінетики пралсетинібу при щоденному введенні через оральний зонд щурам лінії Спрег-Доулі протягом як мінімум 91 дня поспіль.

Застосовували такі дози: 0 (носій), 5, 10 і 20 мг/кг/добу в групі 1, 2, 3 та 4 відповідно. Вибір дози для цього дослідження ґрунтувався на результатах 28-денного дослідження перорального застосування пралсетинібу на щурах лінії Спрег-Доулі, у якому STD10 становила 30 мг/кг/добу (180 мг/м²/добу) для самців та самок (звіт WIL-124570).

У цьому дослідженні оцінювали такі параметри та кінцеві точки: клінічні ознаки, маса тіла, набір маси тіла, споживання їжі, дані офтальмологічного обстеження, клінічні патологічні параметри (гематологічні, коагуляції, біохімічні та загальний аналіз сечі),

Терешко Віктор

В.А. Терешко

параметри токсикокінетики, макроскопічні зміни при аутопсії, маса органів та гістопатологічне обстеження.

Усі тварини вижили до запланованої аутопсії. Не спостерігалось пов'язаних із пралсетинібом офтальмологічних змін або впливу на параметри коагуляції чи загального аналізу сечі.

Пов'язані із пралсетинібом клінічні ознаки, що спостерігалися в групі дозування 20 мг/кг/добу, полягали в згорбленій поставі та/або схудненні самців та самок і зламаних зубах у самок; окрім того, у одного самця в цій групі спостерігалось обмеження використання лівої задньої кінцівки, зігнутий хвіст і зламані зуби.

Пов'язане з пралсетинібом зменшення набору маси тіла було виявлено у самців у групі дозування 20 мг/кг/добу при оцінці всього періоду введення препарату (дні 1–91) і призвело до зменшення маси тіла в цій групі протягом 50–92 днів. Пов'язане із пралсетинібом зменшення середньої маси тіла також спостерігалось у самців в групі дозування 10 мг/кг/добу. Пов'язане із пралсетинібом зменшення споживання їжі спостерігалось в групі дозування 20 мг/кг/добу у другій половині періоду введення препарату (дні 43–91 для самців та дні 50–91 для самок).

Пов'язаний із пралсетинібом вплив на гематологічні параметри включав зменшення числа лейкоцитів та лімфоцитів, еозинофілів та базофілів у самців та самок в групах дозування 5, 10 і/або 20 мг/кг/добу, зменшення числа еритроцитів та вищий середній об'єм еритроцитів та середній вміст гемоглобіну в еритроцитах у самців та самок в групах дозування 10 і 20 мг/кг/добу, менше абсолютне число ретикулоцитів у самців в групах дозування 10 і 20 мг/кг/добу та у самок в групах дозування 5, 10, і 20 мг/кг/добу, вище число тромбоцитів спостерігалось у самців та самок в усіх групах дозування. Спостерігалось зменшення параметрів еритроцитів та ретикулоцитів, що відповідало зниженню гемопоезу в кістковому мозку.

Пов'язаний із пралсетинібом вплив на біохімічні параметри крові включав підвищення рівнів лужної фосфатази, АЛТ, АСТ, холестерину та фосфору у самців і самок в групах дозування 10 та/або 20 мг/кг/добу, збільшення рівня азоту сечовини у самців у групі дозування 20 мг/кг/добу і збільшення рівня калію і зменшення рівня альбуміну, загального білка та відношення альбуміни/глобуліни у самок в групах дозування 10 та/або 20 мг/кг/добу.

Застосування пралсетинібу призводило до небажаних змін з боку зубів (порушення матриксу дентина, дегенерація амелобластів та одонтобластів і некроз одонтобластів), а також переломи зубів у самців та самок в групі дозування 20 мг/кг/добу. Додаткові небажані явища включали зниження гемопоезу в кістковому мозку груднини та стегнової кістки в групі дозування 20 мг/кг/добу, зменшення лімфоїдної клітинності в тимусі, що відповідало зменшенню середньої маси тимусу і макроскопічним змінам у вигляді

Тереза Віршич
В.В. - Ірина Т.В.

зменшеного тимусу в групі дозування 20 мг/кг/добу, тубулярну дегенерацію/атрофію яєчок із вторинними продуктами клітинного розпаду і зменшенням кількості сперми в просвіті придатка яєчка, що відповідало зменшенню середньої маси яєчок та придатку яєчок відповідно і макроскопічним змінам у вигляді м'яких та зменшених яєчок у групі дозування 20 мг/кг/добу і дегенерації жовтого тіла яєчників у групі дозування 20 мг/кг/добу.

Мінімальна дегенерація одонтобластів спостерігалась у самців у групі дозування 10 мг/кг/добу, тубулярна дегенерація/атрофія яєчок (від мінімальної до легкого ступеня) із вторинними продуктами клітинного розпаду в просвіті придатка яєчка спостерігались у самців у групі дозування 10 мг/кг/добу, що відповідало зменшенню середньої маси яєчок і макроскопічно зменшеним яєчкам самців у групі дозування 10 мг/кг/добу, мінімальна дегенерація жовтого тіла спостерігалась в яєчниках самок у групі дозування 10 мг/кг/добу, а також мінімальне зменшення гемопоезу спостерігалось у самців та самок в групах дозування 5 і 10 мг/кг/добу. Ці зміни в групах дозування 5 та 10 мг/кг/добу у самців та самок не розцінювались як несприятливі. Додаткові несприятливі патогістологічні зміни включали збільшення товщини зон росту в стегновій кістці та грудині, мінералізацію скелетних м'язів, залозистого шлунка та нирок, канальцеву мінералізацію в нирках, зменшення лімфоїдної клітинності в нижньощелепних лімфатичних вузлах та агрегацію альвеолярних макрофагів у легенях. Додаткові несприятливі зміни включали зменшення середньої маси селезінки, печінки, гіпофізу, нирок та серця у самців і самок. Зменшення середньої маси селезінки відповідало макроскопічним змінам у вигляді маленької селезінки у самок. Відмінності у масі вищезгаданого органу не супроводжувались відповідними гістопатологічними змінами.

Максимальна концентрація пралсетинібу спостерігалась від 1 до 8 годин після введення в усіх дозах та в усі дні оцінки, при цьому у більшості випадків максимальна концентрація спостерігалася через 2 години після введення дози у самців та самок. Після часу досягнення максимальної концентрації (t_{max}) пралсетинібу в плазмі крові концентрація дещо зменшувалась через 24 години після введення дози. Не спостерігалось помітних відмінностей (< 2 рази) в експозиції пралсетинібу щодо AUC_{0-24} та C_{max} між самцями та самками щурів; однак, спостерігалась тенденція до збільшення експозиції у самок. Експозиція пралсетинібу щодо AUC_{0-24} і C_{max} , зростала зі збільшенням дози більше ніж пропорційно дозі від 5 до 20 мг/кг/добу у самців та самок в дні 1 і 91. Коефіцієнти накопичення після повторного введення становили 2,36, 2,64 і 2,43 у самців та 2,72, 3,27 і 2,32 у самок в групах дозування 5, 10 і 20 мг/кг/добу відповідно.

За результатами цього дослідження, пероральне застосування пралсетинібу у щурів лінії Спрег-Доулі дозами 5, 10 та 20 мг/кг/добу мінімум протягом 91 дня призвело до небажаних гістопатологічних змін у самців та самок у групі дозування 20 мг/кг/добу. Тому NOAEL

Терешар Вірнес
Дж. Ф. - Массен Дж. В.

для щурів становив 10 мг/кг/добу (60 мг/м²/добу). Цей рівень дози відповідав середнім значенням AUC₀₋₂₄ 33 300 та 42 300 год•нг/мл і середнім значенням C_{max} 2360 та 3580 нг/мл у самців та самок відповідно в день 91.

13-тижневе (один раз на добу) дослідження токсичності та токсикокінетики при пероральному введенні (через зонд) яванським макакам (звіт 00124768).

Метою цього дослідження було оцінити потенціал токсичності та профіль токсикокінетики пралсетинібу при щоденному введенні через оральний зонд яванським макакам протягом як мінімум 91 дня поспіль.

Рівні доз становили: 0 (носій), 2, 5 і 10 мг/кг/добу в групах 1, 2, 3 і 4 відповідно. Це відповідало концентраціям 0, 0,2, 0,5 і 1 мг/мл відповідно. Вибір дози в цьому дослідженні ґрунтувався на результатах 28-денного дослідження перорального застосування пралсетинібу на яванських макаках, у якому HNSTD становила 7,5 мг/кг/добу (90 мг/м²/добу) для самців та самок через смертність, що спостерігалась при дозуванні 15 мг/кг/добу (звіт WIL-124571).

Такі параметри і кінцеві точки оцінювали в цьому дослідженні: клінічні ознаки, маса тіла, приріст маси тіла, споживання їжі, дані офтальмологічного обстеження, електрокардіографія (з частотою серцевих скорочень), клінічні патологічні параметри (гематологічні, коагуляція, біохімічні та загальний аналіз сечі), параметри токсикокінетики, макроскопічні зміни при аутопсії, маса органів та гістопатологічне обстеження.

Усі тварини вижили до запланованої аутопсії. Не спостерігалось пов'язаного з пралсетинібом впливу на результати клінічного спостереження, масу тіла, споживання їжі, електрокардіографію та частоту серцевих скорочень, коагуляцію, біохімічний аналіз крові та загальний аналіз сечі. Не спостерігалось пов'язаних із пралсетинібом офтальмологічних та макроскопічних змін. Пов'язане із пралсетинібом зменшення числа еритроцитів, рівнів гемоглобіну, гематокриту та середнього об'єму тромбоцитів (лише самці) спостерігались у групі дозування 10 мг/кг/добу у самців і самок, а також зменшення рівня гемоглобіну спостерігалось у самок в групі дозування 5 мг/кг/добу. Окрім того, пов'язане з пралсетинібом збільшення числа ретикулоцитів (лише самці), числа тромбоцитів (лише самці) та ширини розподілу еритроцитів (лише самки) спостерігалось в групі дозування 10 мг/кг/добу.

Пов'язане із пралсетинібом зменшення маси тимусу (абсолютної та відносно маси тіла та головного мозку після смерті) спостерігалось у самок у групі дозування 10 мг/кг/добу.

Пов'язані із пралсетинібом мікроскопічні зміни, що обмежувалися зменшенням лімфоїдної клітинності від мінімального до легкого ступеня тяжкості, спостерігались в тимусі самців та самок у групі дозування 10 мг/кг/добу.

Тереза Віршич
Д-р Тімаша М.В.

	<p>Клінічні та анатомічні патологічні зміни в цьому дослідженні були розцінені як несприятливі.</p> <p>Більша частина максимальної концентрації пралсетинібу спостерігалась через 1 або 2 години після введення дози в усіх тварин та при всіх рівнях дози в дні 1 та 91. Після t_{max} зниження концентрації пралсетинібу спостерігалось через 24 години після введення дози. Експозиція пралсетинібу щодо AUC_{0-24} та C_{max} у самців та самок мавп зростала приблизно пропорційно дозі зі збільшенням дози від 2 до 10 мг/кг/добу в дні 1 та 91 після врахування варіабельності AUC_{0-24} і C_{max}. Експозиція пралсетинібу щодо AUC_{0-24} була подібною в день 91 порівняно з днем 1, що свідчить про відсутність кумуляції пралсетинібу після повторних введень.</p> <p>За результатами цього дослідження, пероральне застосування пралсетинібу яванським макакам дозами 2, 5 та 10 мг/кг/добу протягом мінімум 91 дня добре переносилось в усіх дозах. Тому NOAEL для мавп становив 10 мг/кг/добу (120 мг/м²/добу). Ця доза відповідала середньому значенню AUC_{0-24} 43 200 і 31 900 год•нг/мл і середньому значенню C_{max} 2790 і 2850 нг/мл в день 91 у самців та самок відповідно.</p>
<p>3) генотоксичність: in vitro</p>	<p>Дослідження, що не відповідало вимогам GLP, проведено з метою оцінки потенціалу пралсетинібу індукувати зворотні мутації у штамх <i>Salmonella</i> TA1537, TA98, TA100 та TA1535 і штаму <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) WP2 <i>uvrA</i> як з метаболічною активацією, так і без неї (звіт WIL-124598). В умовах цього аналізу пралсетиніб не проявляв мутагенної дії до преципітуючої концентрації в штамх TA1537, TA98, TA100, TA1535 і WP2 <i>uvrA</i> з або без метаболічної активації.</p> <p>Пралсетиніб (серія BG0637) досліджували на предмет мутагенної активності <i>in vitro</i> у тесті Еймса на зворотну мутацію на <i>Salmonella-E. coli</i>/мікросомах ссавців (звіт WIL-124573). Для випробування на мутагенність використовували чотири тест-штами <i>Salmonella typhimurium</i> (TA1537, TA98, TA100 та TA1535) і 1 штаму <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i>). Пралсетиніб був приготовлений як вихідний препарат в диметилсульфоксиді в концентрації 50 мг/мл для кожного аналізу. Тест на мутагенність проводився в трьох повторях для кожної концентрації з або без індукованої Aroclor™ 1254 системи метаболічної активації з фракцією S9 печінки шурів.</p> <p>В аналізі мутагенності пралсетиніб досліджували в дозі 100, 250, 500, 1000, 2500 та 5000 мкг/планшет за допомогою методу попередньої інкубації. Преципітати спостерігались при дозуванні ≥ 500 мкг/планшет в усіх штамх з або без метаболічної активації. Щільність преципітатів заважала спостерігати ревертанти при 5000 мкг/планшет з або без метаболічної активації; тому ці планшети не могли бути оцінені на предмет мутагенності. Цитотоксичність (тобто зменшення фонового бактеріального газону та/або середне</p>

Терешко Віктор
Д-р мед. наук Т.В.

число ревертантних колоній) спостерігалась при 2500 мкг/планшет в ТА100 із метаболічною активацією.

В аналізі мутагенності критерії негативної відповіді були досягнуті в усіх тест-штамах з або без метаболічної активації. Середнє число ревертантних колоній було порівнянним з історичним контролем в діапазоні усіх концентрацій для усіх тест-штамів з або без метаболічної активації. Дані, отримані при застосуванні носія лікарського засобу та позитивних контролів продемонстрували валідність та чутливість цієї тест-системи для виявлення хімічних мутагенів з або без метаболічної активації. В умовах цього аналізу пралсетиніб не проявляв мутагенної активності у штаммах *Salmonella* TA1537, TA98, TA100 і TA1535 та штамі *E. coli* WP2 *uvrA* з або без метаболічної активації.

Пралсетиніб вивчали на предмет потенціалу індукувати утворення мікроядер в клітинах ТК6 під час короткотривалої (4 години) і довготривалої (27 годин) інкубації з або без екзогенної системи метаболічної активації (звіт 00124797).

Культури клітин ТК6 були оброблені пралсетинібом, позитивним контролем або носієм як контролем в присутності або відсутності індукованої Agoclog™ 1254 фракції S9 мікросом печінки шурів.

Концентрація диметилсульфоксиду в культуральному середовищі становила 1% (об'ємна частка). Концентрації пралсетинібу, що вивчались в аналізі пошуку діапазону, варіювали від 0,977 до 500 мкг/мл, до найвищих концентрацій, рекомендованих керівництвом ІСН. Преципітати спостерігались при ≥ 125 мкг/мл при 4-годинній обробці із метаболічною активацією та 27-годинній обробці без метаболічної активації та при ≥ 250 мкг/мл при 4-годинній обробці без метаболічної активації наприкінці обробки пралсетинібом.

На основі результатів аналізу з пошуку діапазону цільові концентрації пралсетинібу, що використовувались під час мікроядерного тесту, варіювали від 5 до 70 мкг/мл для обробки протягом 4 годин з або без метаболічної активації та від 2 до 35 мкг/мл для обробки протягом 27 годин без метаболічної активації. Преципітати не спостерігались при будь-якій обробці. При обробці протягом 4 годин без метаболічної активації обрані концентрації для оцінки мікроядер ґрунтувались на цитотоксичності і були такими (з відсотком цитотоксичності): 5 мкг/мл (7%), 25 мкг/мл (24%) і 40 мкг/мл (53%). При обробці протягом 27 годин без метаболічної активації обрані концентрації для оцінки мікроядер ґрунтувались на цитотоксичності і були такими (з відсотком цитотоксичності): 2 мкг/мл (31%), 5 мкг/мл (37%) і 14,5 мкг/мл (50%). При обробці протягом 4 годин із метаболічною активацією концентрації для оцінки мікроядер ґрунтувались на цитотоксичності і були такими (з відсотком цитотоксичності): 5 мкг/мл (9%), 20 мкг/мл (21%) і 35 мкг/мл (50%). Ці культури разом із носієм і 1 концентрацією позитивного контролю для умов кожної обробки аналізували на

Сергій Віталійович
Доктор наук Т.В.

	<p>предмет наявності мікроядер. Мікроядра оцінювали щонайменше у 2000 клітинах/концентрацію.</p> <p>Статистично значуще підвищення відсотка клітин з мікроядрами спостерігалось при 2 мкг/мл ($p \leq 0,05$) і 14,5 мкг/мл ($p \leq 0,01$) при обробці протягом 27 годин без метаболічної активації, і обробка була суттєвою для тенденції за допомогою тренду Кохрана – Армитажа. Однак відсоток клітин з мікроядрами знаходився в межах діапазону історичного контролю. Іншого статистично значущого збільшення відсотка клітин з мікроядрами не спостерігалось між культурами, обробленими пралсетинібом, і супутнім контролем за допомогою носія за будь-яких умов аналізу. На основі результатів 27-годинної обробки без метаболічної активації в мікроядерному тесті обробку повторили. Цільові концентрації пралсетинібу, яка використовувалась під час повторного мікроядерного тесту варіювали від 1 до 22,5 мкг/мл при обробці протягом 27 годин без метаболічної активації.</p> <p>При повторному мікроядерному тесті преципітати не спостерігались при будь-якій обробці. При повторній обробці протягом 27 годин без метаболічної активації обрані концентрації для оцінки мікроядер ґрунтувались на цитотоксичності і були такими (з відсотком цитотоксичності): 1 мкг/мл (20 %), 5 мкг/мл (34 %) і 14,5 мкг/мл (54 %). Ці культури разом із носієм та 1 концентрацією позитивного контролю аналізували на наявність мікроядер. Мікроядра оцінювали в 2000 клітинах на концентрацію. Статистично значуще підвищення відсотка клітин з мікроядрами не спостерігалось між культурами, обробленими пралсетинібом, і супутнім контролем за допомогою носія. Відсоток клітин з мікроядрами в культурах носія та позитивного контролю був порівнянним з історичними контрольними даними. Пралсетиніб не викликав індукцію мікроядер в клітинах ТК6 при обробці протягом 27 годин без метаболічної активації та при обробці протягом 4 годин з або без метаболічної активації в умовах даної тест-системи.</p>
<p><i>in vivo</i> (включаючи додаткову оцінку з токсикокінетики)</p>	<p><u>Мікроядерний тест <i>in vivo</i> при введенні пралсетинібу через оральний зонд щурам лінії Спрег-Доулі (звіт 00124769)</u></p> <p>Метою цього дослідження було оцінити потенціал пралсетинібу індукувати утворення мікроядер в поліхромних еритроцитах кісткового мозку щурів після 2 послідовних днів лікування із введенням через оральним зонд.</p> <p>Рівні доз були такими: 0 (носій), 75, 150 і 300 мг/кг/добу в групах 1, 2, 3 та 4 відповідно. Це відповідало концентраціям 0, 6,25, 12,5 і 25 мг/мл відповідно. У групі 5 (позитивний контроль) доза становила 60 мг/кг із концентрацією 6 мг/мл. Рівень дози для цього дослідження був обраний на підставі результатів попереднього 7-денного дослідження токсичності у разі повторних введень на самцях щурів (звіт WIL-124551).</p>

Терешко Вікторія
 ТМД - Іванко С.В.

	<p>У цьому дослідженні пов'язана із пралсетинібом смертність (лише для дози 200 мг/кг/добу), клінічні спостереження, зміни в масі тіла та споживанні їжі і зміни параметрів клінічної патології спостерігались при дозуванні 50 та 200 мг/кг/добу після 4 днів введення дози.</p> <p>Оцінювали такі параметри та кінцеві точки: клінічні ознаки, маса тіла, приріст маси тіла, споживання їжі і частота виявлення мікроядер у кістковому мозку.</p> <p>Усі тварини вижили до запланованої аутопсії. Пов'язані із пралсетинібом ефекти були обмежені зменшенням приросту маси тіла/незначними втратами маси тіла і відповідним зменшенням вживання їжі у самців щурів в групах дозування 150 та 300 мг/кг/добу та в усіх самок щурів, які отримували лікування пралсетинібом. Пралсетиніб не призводив до будь-якого статистично значущого або залежного від дози збільшення відсотка поліхромних еритроцитів з мікроядрами у самців чи самок щурів при будь-якому рівні дозування порівняно з контролем носієм. Не спостерігалось цитотоксичності з боку кісткового мозку (зменшення поліхромних еритроцитів:загальне відношення еритроцитів) у будь-яких самців чи самок щурів при будь-якому рівні дозування пралсетинібу.</p> <p>За результатами цього дослідження, пероральне застосування пралсетинібу щурам лінії Спрег-Доулі при дозуванні 75, 150 і 300 мг/кг/добу (450, 900 і 1800 мг/м²/добу) один раз на добу протягом 2 днів поспіль призвело до негативної відповіді щодо індукції мікроядер в кістковому мозку при рівні дозування до 300 мг/кг/добу (1800 мг/м²/добу).</p>
4) Канцерогенність:	Відповідно до керівництва ICH S9 дослідження канцерогенності не плануються і не є виправданими.
довгострокові дослідження	-
короткострокові дослідження або дослідження середньої тривалості	-
додаткові дослідження	-
5) Репродуктивна токсичність та токсичний вплив на розвиток потомства:	Відповідно до керівництва ICH S9 дослідження впливу на репродуктивну функцію, ранній ембріональний розвиток, постнатальний розвиток та вплив на ювенільних тварин відсутні. Немає інформації щодо безпеки або ефективності застосування пралсетинібу самкам під час лактації.
вплив на фертильність і ранній ембріональний розвиток	У 13-тижневому дослідженні токсичності у разі потворних введень на щурах лінії Спрег-Доулі, що відповідає вимогам GLP (звіт 00124770), небажані явища, які спостерігались при дозуванні 20 мг/кг/добу (120 мг/м ² /добу), включали тубулярну дегенерацію/атрофію в ячках із вторинними продуктами клітинного розпаду та зменшенням сперми в просвіті придатка ячка, що відповідало зменшенню середньої маси ячок та придатків

Терешко Віктор
Високий М.В.

	<p>відповідно, і макроскопічні зміни у вигляді м'яких та зменшених яєчок; дегенерацію жовтого тіла в яєчниках. У 28-денних дослідженнях на щурах лінії Спрег-Доулі та яванських макаках (звіти WIL-124570 і WIL-124571 відповідно) та в 13-тижневому дослідженні на яванських макаках (звіт 00124768) не спостерігалось небажаного впливу на тканини репродуктивних органів.</p>
ембріотоксичність	<p>Слід зазначити, що в звіті про дослідження використовується AUC_{0-24}. В усіх групах дозування збір зразків крові для оцінки токсикокінетики здійснювали протягом періоду 24 години після введення дози, і AUC розраховували для цього періоду, де це застосовно. Тому, якщо не зазначено інакше, дані щодо AUC наведені як AUC_{0-24}.</p> <p><u>Дослідження пошуку розширеного діапазону доз із вивченням впливу пралсетинібу на ембріофетальний розвиток та оцінкою токсикокінетики при пероральному введенні через зонд щурам лінії Спрег-Доулі (звіт 00124766)</u></p> <p>Метою цього дослідження було охарактеризувати токсичність пралсетинібу при застосуванні вагітним самкам щурів лінії Спрег-Доулі. Окрім того, проводилась оцінка токсикокінетики пралсетинібу в плазмі крові.</p> <p>Рівень доз становив: 0 (носій), 5, 10, 20 та 30 мг/кг/добу для груп 1, 2, 3, 4 і 5 відповідно. Це відповідало концентрації 0, 0,5, 1, 2 та 3 мг/мл відповідно. Тварини отримували препарат через оральний зонд один раз на добу протягом 6–17 днів гестації. Вибір рівня доз для цього дослідження ґрунтувався на результатах попередніх 7-денних (звіти WIL-124551 [самці] та WIL-124592 [самки]) і 28-денного (звіт WIL-124570) досліджень токсичності при повторному введенні на щурах.</p> <p>У цьому дослідженні оцінювали такі параметри та кінцеві точки: клінічні ознаки, маса тіла, приріст маси тіла, маса вагітної матки, споживання їжі, параметри токсикокінетики, макроскопічні зміни при аутопсії, внутрішньоутробний ріст та виживаність, а також морфологія плода (внутрішня, зовнішня та зміни з боку скелету).</p> <p>Усі самки вижили до запланованої аутопсії і були вагітними. Не спостерігалось пов'язаних із пралсетинібом клінічних ознак при щоденному огляді або через 4–6 годин після введення дози.</p> <p>Середній приріст маси тіла в усіх групах загалом був порівняним або дещо більшим, ніж в контрольній групі, протягом 6–13 днів гестації. Менший середній приріст маси тіла або середня втрата маси тіла спостерігалися в групах дозування 20 і 30 мг/кг/добу, починаючи з 13 дня гестації, і тривали протягом решти періоду лікування (дні гестації 13–18) і протягом періоду після лікування (дні гестації 18–21). У результаті такого зменшення набору маси тіла середня абсолютна маса тіла в день гестації 21 була на 19 % і 25 % меншою, ніж в контрольній групі, в групах дозування 20 і 30 мг/кг/добу</p>

Терешко Віктор
Д-р мед. наук А.В.

відповідно. Середнє споживання їжі в групах дозування 20 і 30 мг/кг/добу загалом було порівняним або вищим, ніж в контрольній групі, у період лікування (дні гестації 6–18). Протягом періоду після лікування (дні гестації 18–21) середнє споживання їжі в цих групах було меншим, ніж в контрольній групі, та вважалось вторинним до меншої маси тіла в цих групах. Середня маса вагітної матки в групах 20 і 30 мг/кг/добу становила 2,4 і 0,7 г відповідно (проти 92,7 г у контрольній групі). Однак, середня чиста маса тіла і зміна чистої маси тіла в цих групах не змінювались в результаті лікування. Таким чином, ці відмінності в середньому наборі маси тіла при дозуванні 20 та 30 мг/кг/добу були зумовлені не системним токсичним впливом на організм матері, а відсутністю життєздатних плодів в цих групах. Менша середня маса вагітної матки також спостерігалась в групі дозування 10 мг/кг/добу. Середня абсолютна маса тіла, приріст маси тіла, чиста маса тіла, приріст чистої маси тіла і споживання їжі в групах дозування 5 і 10 мг/кг/добу та маса вагітної матки в групі 5 мг/кг/добу не змінювались при застосуванні пралсетинібу.

Не спостерігалось пов'язаних із пралсетинібом макроскопічних змін в організмі матері при запланованій аутопсії.

В усіх самок у групах дозування 20 і 30 мг/кг/добу спостерігались втрати після імплантації на рівні 100 % (ранні резорбції), що перешкоджало оцінці маси плода, відношення статі і морфології в цих групах. У групі дозування 10 мг/кг/добу спостерігалась дещо вища середня частка втрат після імплантації (ранні резорбції), що призвело до зменшення середнього числа і частки виживших плодів у цій групі порівняно з супутньою контрольною групою. Ці дані стосувались 1 самки в цій групі із вищою індивідуальною часткою ранніх резорбцій (60 %); однак, зв'язок із застосуванням пралсетинібу не можна виключити з огляду на 100 % втрати після імплантації, що спостерігались в групах дозування 20 і 30 мг/кг/добу. На внутрішньоутробну виживаність в групі 5 мг/кг/добу і внутрішньоутробний ріст в групах 5 і 10 мг/кг/добу не впливало застосування пралсетинібу. Множинні вісцеральні аномалії (відсутність нирки та сечоводу, відсутність або вузький матковий ріг, неправильне розташування яєчка або нирки, ретрозофагеальна дуга аорти та/або вузька частина сечоводу) та аномалії скелету (аномалія хребців з або без супутньої аномалії ребер, а також аномалії ребер, реберних хрящів та центральних хребців) спостерігалися в групах дозування 5 та 10 мг/кг/добу. Окрім того, спостерігалось збільшення частоти відхилень розвитку м'яких тканин у вигляді нерозвинутих ниркових сосочків та/або розширеного сечоводу(ів) та зменшених нирок та зміни розвитку скелета у вигляді зменшення окостеніння 13 ребра(ребер) в групах дозування 5 і 10 мг/кг/добу.

Вади розвитку нирок пов'язані з цільовою інгібіцією RET-опосередкованої передачі сигналу.

Терешко Віктор

Власенко М. В.

	<p>Вагітні щури, які отримували пралсетиніб перорально дозами 5, 10, 20 та 30 мг/кг/добу, підлягали системній дії пралсетинібу. Експозиція пралсетинібу щодо AUC_{0-24} (слід зазначити, що остання часова точка відбору зразків для вивчення токсикокінетики щодо AUC_{0-24} в групі дозування 5 мг/кг/добу становила 8 годин через те, що 24-годинний зразок був менше межі визначення) та C_{max} збільшувалася більше, ніж пропорційно дозі, зі збільшенням рівня доз від 5 до 30 мг/кг/добу на 6 і 17 дні гестації.</p> <p>Кумуляція спостерігалась при застосуванні дози 5 мг/кг/добу, однак не інших доз, при цьому коефіцієнт накопичення становив 2,5, 1,4, 1,4 і 1,4 при застосуванні 5, 10, 20 та 30 мг/кг/добу відповідно.</p> <p>Максимальні концентрації загалом спостерігались через 2 години після введення дози, за винятком дозування 20 мг/кг/добу на 17 день гестації, при якому t_{max} становив 1 годину після введення дози.</p> <p>На заключення, зменшення середнього приросту маси тіла та/або втрата маси тіла під час останньої стадії гестації і менша середня маса вагітної матки, що спостерігались в групах дозування 20 і 30 мг/кг/добу, були пов'язані з втратами після імплантації на рівні 100 % в цих групах. Менше середнє споживання їжі також спостерігалось в цих групах у період після лікування; цей ефект був пов'язаний не з системною токсичністю для материнського організму, а з відсутністю життєздатних плодів в цих групах. Не спостерігалось пов'язаних із пралсетинібом клінічних ознак або змін при аутопсії при застосуванні будь-якого рівня доз; тому NOAEL для системної токсичності для материнського організму становив 30 мг/кг/добу (180 мг/м²/добу). При дозі 30 мг/кг/добу AUC_{0-24} становила 90 600 нг•год/мл і C_{max} становила 8700 нг/мл. Усі самки в групах дозування 20 і 30 мг/кг/добу мали втрати після імплантації на рівні 100 % (усі ранні резорбції), і вищу середню частку втрат після імплантації та меншу середню частку життєздатних плодів у групі дозування 10 мг/кг/добу. Множинні вісцеральні вади та відхилення в розвитку (в першу чергу з боку нирок та сечоводів) і вади розвитку скелету (аномалії хребців, ребер, реберних хрящів та центральних хребців) і відхилення в розвитку (зменшення окостеніння ребер) спостерігались при дозуванні 5 та/або 10 мг/кг/добу. На підставі несприятливого впливу на внутрішньоутробну виживаність та/або морфологію плода при усіх рівнях доз неможливо встановити NOAEL для ембріофетального розвитку.</p>
<p>пренатальна і постнатальна токсичність</p>	<p>Відповідно до керівництва ICH S9 та на підставі результатів дослідження ембріофетальної токсичності дослідження щодо пре/постнатального розвитку не є обґрунтованими.</p>
<p>дослідження, при яких препарат уводиться потомству (нестатевозрілим тваринам) та/або оцінюється віддалена дія</p>	<p>Дослідження на ювенільних тваринах не проводились, оскільки пралсетиніб не показаний для застосування дітям.</p>

Терешук Віктор
Д-р мед. наук Іванов С.В.

6) місцева переносимість	<p>Місцева переносимість пралсетинібу в шлунково-кишковому тракті щурів лінії Спрег-Доулі та яванських макак була охарактеризована в 28-денному та 13-тижневому дослідженнях токсичності, що відповідали вимогам GLP (звіти WIL-124570, WIL-124571, 00124770 та 00124768). У 28-денному дослідженні на щурах STD10 (30 мг/кг/добу або 180 мг/м²/добу) асоціювалась із мінералізацією тканин в слизовій залозистого шлунка. Це було пов'язано із гіперфосфатемією, опосередкованою інгібіцією FGFR. Не спостерігалось ознак пов'язаного із пралсетинібом орофарінгеального/езофагеального пошкодження при застосуванні в дозі до летальної (75 мг/кг/добу або 450 мг/м²/добу). У 13-тижневому дослідженні на щурах дозування 5 мг/кг/добу асоціювалося з ознаками мінералізації в слизовій оболонці залозистого шлунка.</p> <p>У 28-денному дослідженні на мавпах не спостерігалось ознак порушень з боку шлунково-кишкового тракту при HNSTD (7,5 мг/кг/добу або 90 мг/м²/добу). При застосуванні в дозах 15 і 40 мг/кг/добу (180 і 480 мг/м²/добу) ерозії та звиразкування епітелію шлунково-кишкового тракту (вторинні до інгібіції VEGFR) були причиною смерті. Не спостерігалось ознак пов'язаного з пралсетинібом орофарінгеального/езофагеального пошкодження при застосуванні до летальної дози включно. У 13-тижневому дослідженні на мавпах не спостерігалось ознак порушення з боку шлунково-кишкового тракту при застосуванні у дозах до NOAEL, яка була найвищою дозою, що вивчалася в цьому дослідженні (10 мг/кг/добу або 120 мг/м²/добу).</p>
7) додаткові дослідження токсичності:	
антигенність (утворення антитіл)	-
імунотоксичність	Відповідно до керівництва ICH S9 дослідження імунотоксичності не вважаються необхідними для пралсетинібу, оскільки препарат не є імуномодуючим лікарським засобом.
дослідження механізмів дії	<p>Пралсетиніб є потужним субнанолярним інгібітором RET та активуючих онкогенних мутацій RET, включаючи точкові мутації V804L, V804M, M918T, ідентифіковані при МРЦЗ та онкогенне злиття CCDC6-RET, що спостерігається при папілярному раку щитоподібної залози та НДКРЛ. У біохімічному аналізі BLU-667 був у 80 разів активнішим щодо впливу на RET, ніж KDR і у 25 разів активнішим щодо впливу на RET, ніж FGFR1 (звіт BPM-0015).</p> <p>В усіх клітинних моделях активність пралсетинібу моніторувалась шляхом інгібіції автофосфорилування RET, інгібіції фосфорилування субстратів RET і шляхом інгібіції RET-опосередкованої проліферації. Пралсетиніб пригнічував RET-опосередковану проліферацію в усіх клітинних лініях у низькому нанолярному діапазоні (3,7–21,9 нмоль) і більш потужно</p>

Дерешає Вікторія
В.В. Мисюк

	<p>пригнічував проліферацію, ніж кабозантініб або вандетаніб, у кожній клітинній лінії (звіти BPM-0016 і BPM-0017).</p> <p>Селективність пралсетинібу щодо RET була охарактеризована шляхом профілювання зв'язування на панелі більше 450 кіназ людини і значущих для захворювання мутантних форм кіназ (звіти BLU005-03-s, BLU005-04-p). Пралсетиніб мав вищу ступінь селективності щодо RET і мутантних форм кіназ RET порівняно з іншими досліджуваними кіназами.</p>
лікарська залежність	-
токсичність метаболітів	Дані відсутні.
токсичність домішок	<p>Віртуальна оцінка мутагенності проведена для пралсетинібу і 15 домішок пралсетинібу. Використовували програмне забезпечення стандартного віртуального зв'язку структури та активності DEREK і SARAH, результати узагальнено в Модулі 2.6.7.</p> <p>Три домішки випробовували в аналізах зворотних мутацій у бактерій, що не відповідали та відповідали вимогам GLP.</p> <p>У дослідженнях, що не відповідали та відповідали вимогам GLP, ідентифіковані для пралсетинібу потенційні домішки BLU140878, BLU140880 і BLU146829 не були мутагенними в аналізі зворотних мутацій у бактерій <i>in vitro</i> у штамх <i>Salmonella typhimurium</i> (TA1537, TA98, TA100 та TA1535) та штамі <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i>) з або без метаболічної активації (звіти 00124872A, 00124872B, 00124872C, 00124873, 00124874 і 00124875).</p>
інше	<p>Дослідження фототоксичності</p> <p>Потенціал пралсетинібу щодо фототоксичності послідовно вивчався <i>in vitro</i> за допомогою фібробластів 3Т3 в аналізі поглинання нейтрального червоного, що не відповідав вимогам GLP (звіт WIL-124562). Цитотоксичність спостерігалась після обробки клітин в присутності та відсутності ультрафіолетового світла (UV)-А. Напівмаксимальна інгібуюча концентрація (IC₅₀) в присутності або відсутності UV-А становила 2,02 мкг/мл і 3 мкг/мл відповідно. Фотоіндукційний фактор на основі показника IC₅₀ становив 0,67. На підставі цих даних пралсетиніб був класифікований як такий, що не має фототоксичної дії.</p> <p>Дослідження фототоксичності, що відповідало вимогам GLP (звіт 20143108), проведено з метою оцінки потенціалу фототоксичності пралсетинібу шляхом визначення відносного зниження життєздатності фібробластів мишей BALB/c 3Т3, які піддавали дії пралсетинібу та УФ-випромінювання (+UV-R), порівняно із життєздатністю фібробластів, які піддавали дії пралсетинібу без УФ-випромінювання (+UV-R). Не продемонстровано фототоксичного потенціалу пралсетинібу при експозиції клітин 5 Дж/см² UV-А та 24–26 мДж/см² UV-В з ксенонової дугової лампи імітатора сонячного випромінювання, обладнаного фільтром Schott WG 320.</p>

Тереза Вірссет
 Д.Ф. Мадоні М.В.

	<p>У дослідженнях токсичності, що не відповідали та відповідали вимогам GLP, у щурів лінії Спрег-Доулі та яванських макак не спостерігалось пошкодження епітелію шкіри або очей.</p>
<p>5. Висновки щодо доклінічного вивчення</p>	<p>Пралсетиніб є потужним інгібітором RET дикого типу (WT) і онкогенних білків злиття RET та мутантних білків, які включають кіназу злиття KIF5B-RET, мутантну кіназу RET M918T і, особливо, мутантний RET V804L/M (гейткіпер), що викликають захворювання. Пралсетиніб продемонстрував високу ступінь селективності щодо WT та мутантних кіназ RET порівняно з широким класом фармакологічно активних рецепторів, ферментів (включаючи інші кінази) та іонних каналів. Пралсетиніб також є селективним до каналу hERG, і це було підтверджено відсутністю змін на ЕКГ у 28-денному та 13-тижневому дослідженнях токсичності у разі повторних введень на мавпах.</p> <p>Пралсетиніб продемонстрував високу пероральну біодоступність у всіх видів тварин у доклінічних дослідженнях (100%). Це корелювало із відповідним зв'язком між дозою та експозицією в 13-тижневих дослідженнях токсичності у разі повторних введень на щурах і мавпах. Пралсетиніб є субстратом, а також інгібітором ефлюксних транспортерів P-gp та BCRP, однак це не впливає на пероральну біодоступність пралсетинібу, можливо через автоінгібіцію P-gp та BCRP. Пралсетиніб значною мірою зв'язується з білками і є стабільним у плазмі крові мишей, щурів, собак, мавп та людини. Препарат також мінімально зв'язується з еритроцитами. Пралсетиніб широко розподіляється в більшість тканин щурів, включаючи головний мозок. Пралсетиніб також продемонстрував потенційну афінність до тканин, що містять меланін, таких як шкіра та судинна оболонка очного яблука.</p> <p>Пралсетиніб підлягав обмеженому або помірному метаболізму в мікросомах печінки та гепатоцитах доклінічних видів тварин та людини. Метаболізм пралсетинібу в основному опосередковується CYP3A4 (фаза 1) та UGT1A4 (фаза 2) і характеризується окисненням/гідроксилуванням, прямою N-глюкуронізацією та кон'югацією GSH. Метаболіт M709, що утворювався в результаті прямої N-глюкуронізації, був основним метаболітом у гепатоцитах людини. Не спостерігалось унікальних метаболітів, що виявлялись <i>in vitro</i> в гепатоцитах або мікросомах печінки людини, та усі метаболіти людини утворювались <i>in vivo</i> у щурів та/або мавп. Гепатобіліарна екскреція була основним шляхом виведення із незначною участю активної секреції епітелієм кишечника у щурів. Пралсетиніб є прямим інгібітором CYP2C8, CYP2C9 та CYP3A4/5 і залежним від часу інгібітором CYP3A4/5. Окрім того, пралсетиніб є потенційним індуктором CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 та CYP3A4. Основними транспортерами людини, які інгібував пралсетиніб, були P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, MATE1 та MATE2K.</p>

Александр Вірніков
Докл. Мавпа А.В.

Всебічна доклінічна програма вивчення токсичності відповідно до керівництва ICH S9 оцінювала потенціал пралсетинібу спричиняти генотоксичність, фототоксичність, ембріофетальну токсичність, а також вплив короткочасного та тривалого повторного введення (один раз на добу) у фармакологічно реагуючих щурів та мавп. У 28-денних дослідженнях усі ефекти були зворотними після 14-денного періоду відновлення, і більшість вторинних фармакологічних ефектів пралсетинібу вважались контрольованими. Завершені дослідження надають належну інформацію з безпеки застосування пралсетинібу, і немає необхідності в проведенні додаткових доклінічних токсикологічних досліджень.

Загалом доклінічна фармакологія, ФК та профіль безпеки свідчать, що пралсетиніб може застосовуватись для лікування НДКРЛ та раку щитоподібної залози зі злиттям RET, має відповідний профіль ФК для дозування один раз на добу і має прийнятний доклінічний профіль безпеки. Тому дані доклінічних досліджень підтверджують реєстрацію пралсетинібу.

Базель, 27 квітня 2021 року

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд

Підпис

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Підрозділ з міжнародних регуляторних питань
Базель, Швейцарія
Лейла Лістер

Підпис

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Підрозділ з міжнародних регуляторних питань
Базель, Швейцарія
Каталіна Рохас

Therapeutic benefit

Dr. J. - Maria M.B.