

Basel, 28 July 2021

To Whom It May Concern

Subject: Evrysdi® (risdiplam), powder for oral solution

We, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland, hereby kindly ask you to take for expert evaluation the Reports on nonclinical trials and the Reports on clinical trials for the drug product Evrysdi® (risdiplam), powder for oral solution, submitted for state registration according to the Order of the Ministry of Health of Ukraine of 27 June, 2019 No. 1528

Also, we F. Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland give you permission to publish the Reports on nonclinical trials and the Reports on clinical trials on the official site of the Ministry of Health of Ukraine

Yours sincerely,

F. Hoffmann-La Roche Ltd



F. Hoffmann-La Roche Ltd
International Regulatory
Basel, Switzerland
Leyla Lister



F. Hoffmann-La Roche Ltd
International Regulatory
Basel, Switzerland
Erika Eckel

[Зображення логотипу: Рош]

Базель, 28 липня 2021 р.

Всім зацікавленим особам**Тема: Еврісді (рисдилам), порошок для орального розчину**

Ми, Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Грензахерштрассе 124, СН-4070 Базель, Швейцарія, цим просимо Вас прийняти на експертизу звіти про доклінічні дослідження та звіти про клінічні випробування для лікарського засобу Еврісді (рисдилам), порошок для орального розчину, поданого на державну реєстрацію, відповідно до наказу Міністерства охорони здоров'я України № 1528 від 27 червня 2019 р.

Також ми, Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцарія, надаємо дозвіл на публікацію звітів про доклінічні дослідження та звітів про клінічні випробування на офіційному сайті Міністерства охорони здоров'я України.

З повагою,

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд

[підпис]
Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Міжнародне нормативно-правове
регулювання
Базель, Швейцарія
Лейла Лішер

[підпис]
Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Міжнародне нормативно-правове
регулювання
Базель, Швейцарія
Еріка Екель



Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Підрозділ лікарських засобів
Грензахерштрассе 124
СН-4070 Базель
Швейцарія

PDRAR
Нормативно-правове
регулювання лікарських
засобів
Будівля 686. 3-й поверх

Сара Метьюс
Тел. +41 61 68 72468
пошта: sarah.mattheis@roche.com



To Whom It May Concern,

**State Expert Center of the
Ministry of Health of Ukraine
10, Smolenskaya Str., Kyiv, 03057,
Ukraine**

Basel, 10 March 2021

Evrysdi® (risdiplam) 60mg, powder for oral solution 0.75 mg/ml: SG41616 NatHis-SMA study

We, F. Hoffmann-La Roche, Ltd., Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland, hereby inform that we have the rights to use but not to publish the data of the observational prospective study SG41616 NatHis-SMA (Secondary data use analysis of the 2-years natural history data from patients with Type 2 and 3 spinal muscular atrophy) which final Clinical Study Report is included in the dossier submitted to the Ministry of Health of Ukraine for the registration of **Evrysdi® (risdiplam) 60mg, powder for oral solution 0.75 mg/ml,**

Consequently, this study data was excluded from the set of summary reports provided as requested by the Ministry of Health of Ukraine to complement the current application and to be posted on the Ministry of Health of Ukraine website.

Yours sincerely,

F. Hoffmann – La Roche Ltd


F. Hoffmann-La Roche Ltd
International Regulatory
Basel, Switzerland
Leyla Lister


F. Hoffmann-La Roche Ltd
International Regulatory
Basel, Switzerland
Catalina Rojas

[Зображення логотипу: Рош]

Всім зацікавленим особам**Державний експертний центр
Міністерства охорони здоров'я України
вул. Смоленська, 10, Київ, 03057,
Україна**

Базель, 10 березня 2021 р.

**Еврісді (рисдиплам) 60 мг, порошок для орального розчину 0,75 мг/мл: дослідження
SG41616 NatHis-SMA**

Ми, Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Грензахерштрассе 124, СН-4070 Базель, Швейцарія, цим повідомляємо, що ми маємо право використовувати, але не публікувати дані спостережного проспективного дослідження SG41616 NatHis-SMA (вторинний аналіз з використанням даних перебігу захворювання за 2 роки від пацієнтів із спінальною м'язовою атрофією типу 2 та 3), для якого остаточний звіт про клінічне дослідження включений у досьє, подане до Міністерства охорони здоров'я України для реєстрації ЛЗ **Еврісді (рисдиплам) 60 мг, порошок для орального розчину 0,75 мг/мл.**

Відповідно, дані цього дослідження були виключені з набору узагальнених звітів, наданих на вимогу Міністерства охорони здоров'я України для доповнення даної заявки та розміщення їх на веб-сайті Міністерства охорони здоров'я України.

З повагою,

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд

[підпис]
Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Міжнародне нормативно-правове
регулювання
Базель, Швейцарія
Лейла Лішер

[підпис]
Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Міжнародне нормативно-правове
регулювання
Базель, Швейцарія
Каталіна Ройяс

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд Фармацевтична розробка
СН-4070 БазельPDRAR
Нормативно-правове
регулювання лікарських
засобів
Будівля 686Тел. +41 79 770 8703
пошта: Brigitte.schott@roche.com

Тереза Вірнесс
Директор - Зв'язок з В.В.



To Whom It May Concern

27 May 2020

**International Regulatory Manager
Signature authorization**

We, F. Hoffmann-La Roche Ltd, CH-4070 Basel, Switzerland, herewith confirm that International Regulatory Managers within the International Regulatory Team have delegated signing authority and are allowed to sign documents pertaining to their specific duties.

Sincerely,

F. Hoffmann-La Roche Ltd

A handwritten signature in black ink that reads "Leyla Lister".

Leyla Lister
Head International Regulatory

A handwritten signature in black ink that reads "Catalina Rojas".

Catalina Rojas
Team Lead International Regulatory

Non-Clinical Study Reports

1. Name of the medicinal product (number of registration certificate, if available):	EVRYSDI®
1) type of the medicinal product, by which registration was conducted or planned	Medicinal product with complete dossier (stand-alone dossier). Other medicinal product. New active substance (AS). Original (innovative) medicinal product (the molecule is not presented on the Ukrainian market) for treatment of rare disease according item 10 (sub-item 10.1) of section V of the Procedure of Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 23.07. 2015 № 460.
2) Trials conducted	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no If not, substantiate
2. Pharmacology:	
1) primary pharmacodynamics	<p>The ability of risdiplam to modify the alternative splicing of the SMN2 pre-mRNA towards exon 7 inclusion and to subsequently increase survival of motor neuron (SMN) protein levels was investigated in vitro, ex vivo and in mouse models in vivo. The effect of risdiplam treatment in terms of rescuing spinal muscular atrophy (SMA)-like phenotypes has been demonstrated in two different mice models.</p> <p>In Vitro and Ex Vivo Activity</p> <p><u>Effect on SMN2 Exon 7 Inclusion</u></p> <p>The effect of risdiplam on SMN2 transcript splicing to enhance exon 7 inclusion was validated in Type 1 SMA patient-derived fibroblasts in vitro and in blood cells from healthy volunteers ex vivo. In patient-derived fibroblasts, risdiplam showed strong efficacy to increase SMN2 transcript exon 7 inclusion (SMN full length [FL] transcript) with a 50% effective concentration (EC₅₀) of 29±7 nM (mean±SEM) and to decrease the levels of the truncated SMN2 transcript (lacking exon 7; SMNΔ7) with an IC₅₀ of 12±1 nM (mean±SEM). This effect saturated (>90%) at 121 nM of risdiplam. In human blood cells ex vivo, risdiplam caused a dose-dependent increase of FL SMN2 transcripts with an EC₅₀ of 75±19 nM (100% at 2 μM) and decrease of SMNΔ7 transcripts with an IC₅₀ of 60±8 nM (minimum of 2% at 3 μM).</p> <p>Similar results for risdiplam were obtained in a repeated experiment (EC₅₀ of 24 nM for the inclusion of exon 7 into the SMN2 transcript).</p> <p><u>Effect on SMN Protein Levels</u></p> <p>The effect of risdiplam on SMN protein levels was assessed in cultured Type 1 SMA patient-derived fibroblasts and in motor neuron cultures obtained from Type 1 SMA patient induced pluripotent stem cells (iPSCs). Risdiplam increased SMN protein levels with an EC₅₀ of 12±3 nM in fibroblasts and with an EC₅₀ of 182±114 nM in motor neuron cell cultures. The maximum SMN protein level increase of about two-fold was comparable in all tested cell types.</p>

To evaluate the effect of risdiplam on SMN Δ 7 mice, groups of SMN Δ 7 mice were dosed with either vehicle or risdiplam from PND3 until the study end at PND220.

HET mice, which carry a single copy of the mouse *Smn1* allele and do not show any SMA-related phenotypes, served as positive controls. Mice were dosed from PND3 to PND23 once a day by IP injection and from PND24 onwards by oral gavage. Risdiplam-dosed SMN Δ 7 mice were assessed for survival, body weight, distal tissue necrosis, effects on the neuromuscular circuitry and muscle performance (righting reflex).

Animal Survival

Risdiplam treatment significantly prolonged animal survival at all doses as compared to vehicle-treated animals in the long-term study. A statistically significant prolongation of median survival time (MST) was already observed in the low dose group (26 days versus 10.5 days in the vehicle-treated group). The effect of risdiplam on MST prolongation increased with the dose applied, with the highest dose group showing a substantial increase of survival over vehicle-treated mice with an MST of over 6 months.

Body Weight

Risdiplam treatment resulted in a 67%, 82% and 91% improvement in body weight gain at PND140 for mid, mid/high and high dose groups as compared to heterozygous controls.

Animals in the low dose group showed only slight recovery compared with vehicle-dosed SMN Δ 7 mice. No statistically significant difference between the highest dose group and HET controls was observed for maximal body weight, day of reaching the maximal body weight and the area under the body weight-time curve from PND3 to PND220. The improvement of body weight gain was dose-dependent.

Neuromuscular Circuitry

Vehicle-treated SMN Δ 7 mice showed a significant loss of vesicular glutamate transporter 1 (vGluT1) proprioceptive motor neuron inputs in lumbar section 3–5 (L3–5), loss of lumbar section 4 (L4) motor neurons, neuromuscular junction (NMJ) denervation in longissimus muscle, and muscle atrophy of extensor digitorum longus (EDL). Risdiplam treatment rescued these observed phenotypes in SMN Δ 7 mice. The improvement was dose-dependent and maximum efficacy was achieved at mid-dose level. The number of vGluT1 boutons in L3–5 and the number of L4 spinal nerve ventral root axons in mid, mid-high and high dose groups only slightly, yet statistically significantly differed from those in HET controls. The longissimus muscle showed significant denervation at

Type 1 SMA patient-derived fibroblasts. In this study, the focus was on identifying potential secondary effects of risdiplam due to changing in splicing of other genes. For this purpose, fibroblasts from Type I SMA patients were treated with risdiplam, and an RNA sequencing analysis was performed and specific algorithms applied to overall assess splicing events in fibroblasts treated with risdiplam. For each analyzed splice event, normalized mRNA read counts supporting either variant were calculated, and the ratios (and log fold changes [$\Delta\log\text{FC}$]) were compared with the corresponding values in control (DMSO-treated) samples. A value of 0 corresponds to identical ratios between the two variants in control and treated samples.

Overall Results: risdiplam corrects dysfunctional splicing of the human *SMN2* gene in vitro to quantitatively include exon 7 and create FL mRNA. Apart from *SMN2*, only very few genes including *FOXMI*, *STRN3* and *SLC25A17* were identified as being alternatively spliced as well.

To identify secondary pharmacological effects of *SMN2* splicing modifier (risdiplam and RO6885247) in selected *Cynomolgus* monkey tissues spleen, skin, retina, and choroid/retinal pigment epithelium (RPE) were analyzed by RT-qPCR assays specific for four secondary splicing targets (*APLP2*, *FOXMI*, *MADD*, *STRN3*). Compound-related changes in alternative splicing were stronger for risdiplam than for RO6885247 under the conditions of this study. Furthermore, splicing analysis with selected marker assays suggest only minor effects for these markers in monkey retina and choroid/RPE compared to effects observed in spleen and skin.

The study with similar design and results was conducted in rats.

Receptor, Enzyme and Channel Interactions

Risdiplam and its major human metabolite M1 were tested for off-target activity (including targets considered of importance for abuse potential) in vitro at a single test concentration of 10 μM in radioligand binding and enzymatic assays looking at 101 different binding sites or enzyme targets (radioligand binding: 69 human and 13 rat sites; 19 human enzymatic sites). In these studies, both risdiplam and M1 inhibited COX1 and COX2 by >84% ($\text{IC}_{50} \sim 2 \mu\text{M}$) and acetylcholinesterase by >77% ($\text{IC}_{50} \sim 0.6 \mu\text{M}$ for risdiplam, and 2 μM for M1). Risdiplam also inhibited radioligand binding at histamine H3 and muscarinic M1 receptors with K_i values of 1 and 5.6 μM , respectively. Risdiplam inhibited the δ -opioid receptor by 62% on primary screening, whilst a follow-up assay identified only 35% inhibition at 10 μM . This could be due to solubility limitations

	<p>based on protein precipitation extraction, reversed phase chromatographic separation and mass spectrometric detection in positive ion selected reaction monitoring mode. Depending on the study requirements, the methods were exploratory, qualified or validated according to the current regulatory guidelines. Validation reports are presented in Module 4.2.2.1.</p>
2) absorption	<p>Absorption – Overall Pharmacokinetic Profile</p> <p><u>In vitro permeability</u></p> <p>Risdiplam and M1 are highly permeable molecules. Permeability of risdiplam and M1 in LLC-PK1 cells is 350 nm/s and 310 nm/s respectively, in MDCKII cells – 318 nm/s and 522 nm/s respectively. Risdiplam is not a substrate of human multidrug resistance protein 1 (MDR1) and at most a weak substrate of human breast cancer resistance protein (BCRP). M1 is a weak to good substrate of human MDR1 and a weak substrate of human BCRP.</p> <p><u>Single-dose Pharmacokinetics</u></p> <p>Risdiplam pharmacokinetics was assessed following IV, oral (PO) or IP administration in the same species/strain and at similar age as in toxicology or pharmacology studies (for all studies in adult animals, males were used, for pups sex was not determined):</p> <ul style="list-style-type: none"> - PND4, PND12, PND21 and adult Wistar rats; - PND10 wild type or heterozygous FVB mice from the delta7 colony]; - adult Dutch Belted rabbits (New Zealand rabbits were used in reproductive toxicology studies); - adult Cynomolgus monkeys. <p>After IV administration, half-life was short, clearance was low and volume of distribution of risdiplam was moderate in rats and monkeys. After PO administration, bioavailability was moderate to high in both species. Half-life was longer and t_{max} delayed in young pups (PND4 and PND12 rats) compared to older rats.</p>
3) distribution	<p><u>In Vitro Plasma Protein Binding and Distribution to Red Blood Cells</u></p> <p>Plasma protein binding of risdiplam and its major metabolite M1 is moderate (7–11% free fraction) without significant species differences in adults.</p> <p>Risdiplam free fraction showed a strong age dependency in rats with a markedly higher free fraction and a high inter-individual variability in juvenile rats (up to 90% in PND4 rat plasma—with high variability—versus 16% in adult). Age dependency was less pronounced in mice (27% free fraction at PND11 versus 12% in adult) and monkeys (25% free fraction</p>

monkeys. Drug levels decreased rapidly and in parallel in plasma and muscle of rats after end of treatment.

Distribution into Other Organs Affected in SMA

In a tissue distribution study in monkeys, risdiplam concentrations in muscle, brain, heart and larynx were all comparable to the total plasma concentration with a less than 2 fold difference between the two animals after 7 days of daily administration. Risdiplam concentrations in bone marrow and spleen showed a high inter-individual variability and spleen showed a risdiplam tissue/plasma concentration ratio of >2 . Tissue/plasma ratios were higher for kidney (10), liver and duodenum (both 33). In two other animals sacrificed 6 weeks after the last dose, risdiplam concentrations in muscle, brain, heart, duodenum, spleen, testis and larynx were below 1 ng/g (below 1 ng/mL for plasma and CSF) and around 4 ng/g in liver and kidney.

Ocular Distribution

In albino rats, tissue to plasma ratios of risdiplam in the different ocular substructures were equal or lower than one. In pigmented rats and monkeys, risdiplam distribution into melanin-containing parts of the eye (choroid and RPE, iris, sclera) was significantly higher than in non-pigmented ocular structures (retina, lens, vitreous body) or the rest of the body (muscle, brain, CSF), which is in line with the observed melanin binding in vitro. After treatment-free periods, risdiplam concentrations were still considerably high in the eye, especially in melanin-containing parts in both pigmented rats and monkeys, although they clearly declined from the end of the treatment, thus indicating a noticeable elimination.

In vivo tissue distribution study (QWBA)

Tissue distribution after single PO (5 mg/kg) and single IV (2 mg/kg) administration of ^{14}C -risdiplam to male albino and partially pigmented rats was assessed using quantitative whole-body autoradiography (QWBA). The tissues which showed highest concentrations over the entire study period (168 h) were the Steno's gland, preputial gland, exorbital lachrymal gland, intraorbital lachrymal gland, adrenal (cortex and medulla), salivary gland, meibomian gland, bulbo-urethral gland, and thyroid. Tissues that had little exposure to radioactivity included the brain (brain:plasma ratio=1), spinal cord, white fat, fur and lens of the eye. In the pigmented rat, higher levels of radioactivity were measured in pigmented skin compared to non-pigmented skin. High levels of radioactivity were associated with the uveal tract/retina of the eye of the partially pigmented rat, but were at low levels in albino rats.

Placenta transfer (QWBA)

The covalent binding of risdiplam was assessed using ^{14}C -labelled risdiplam in human liver microsomes. The covalent binding value of risdiplam was in the low range (background adjusted value 59 pmol/mg reduced to 20 pmol/mg in the presence of glutathione).

M1 in vitro metabolism

Metabolite M1 can be further metabolized by many CYP and FMO enzymes including CYPs 1A1, 2C8, 2C19, 2J2, 3A4 and FMOs 1 and 3. Of these, CYP2J2, CYP3A4, FMO1 and FMO3 are the most active.

In vivo metabolism

In Vivo Metabolism in Rats and Monkeys

The exploratory metabolite identification in rat (adult and juvenile) and monkey plasma after PO administration of unlabeled risdiplam, indicated that the parent was the major circulating entity representing more than 84% in both species. M1, M6 and M7 were detected in monkey plasma and M2, M3, M4 and M5 were trace level circulating components in both species.

Further metabolite characterization was performed following ^{14}C -risdiplam administration to naïve and Bile-Duct Cannulated (BDC) rats. The most abundant drug-related material in plasma, feces and urine was the unchanged parent drug. The most abundant circulating metabolite was M1, representing 4% drug-related material in plasma 1 h after PO administration. In excreta, the unchanged parent drug accounted for 50% of the orally administered dose while M5 was the most abundant metabolite identified in feces and urine.

In BDC rats after IV administration, 19% of the dose was recovered in bile and unchanged parent accounted for 0.8% of the dose. Metabolites resulting from biotransformation of the piperazine and imidazopyridazine moieties and sulfate conjugation were identified in bile. No single metabolite in the bile accounted for greater than 2% of the dose. Results in BDC following oral administration were very similar.

In Vivo Metabolism in Humans from the Human ADME Study

In plasma samples from human after a single PO dose of ^{14}C -risdiplam, parent drug was the major component, accounting for 83% of drug-related material in circulation (percent of AUC_{0-48}). Parent drug was also the main drug-related component in excreta (urine and feces combined), accounting for 22% of the administered dose. M1 accounted for 14% of total radioactivity of AUC_{0-48} in plasma and was found excreted in urine.

The PK profile of risdiplam was explored after multiple PO administrations in female Cynomolgus monkeys over 10 days (0.25 mg/kg/day). There was no indication of a time-dependent clearance over the dosing period. Exposures only slightly increased with an accumulation ratio of up to 2.5.

Juvenile rat pharmacokinetics/toxicokinetics/metabolism

The pharmacokinetic profile of risdiplam was explored in pre- and post-weaning rats from PND4 and compared to adults in single dose PK and toxicity studies. Total risdiplam exposure increased relevantly (from PND4 until PND14), likely due to accumulation caused by a slower elimination ($t_{1/2}$ of 15 and 20 h on PND4 and PND12) and decreased thereafter on PND 31 to total AUCs similar to those observed at PND4.

Total exposures on PND31 were consistent with the exposure from other adult rats. In PND4 and PND12 pups, risdiplam also showed a delayed t_{max} (7 h) as compared to the PND31 and adult rats (3 h).

Plasma free fraction in rats showed strong age dependency and a high inter-individual variability.

The exploratory metabolite identification in rat plasma showed that the metabolic profile was not markedly different in juvenile rats (single time point explored) as compared to adult rats. The percentage of parent molecule in plasma sample was slightly lower in PND10 juvenile rat (88%) compared to adult rat (>98%). In the 4-week juvenile toxicity study, M1 to parent ratio was 32% at PND4, 19% at PND12 and 24% at PND31.

Prediction of Human Pharmacokinetics by a PKPB ModelThe human exposure following oral administration of risdiplam was predicted through physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling using Gastro Plus v8.6 software. Based on in vitro and in vivo nonclinical data, risdiplam was predicted to be well absorbed in human (>90%), to show a rather slow turnover ($t_{1/2}$ in plasma in the range of 10 to 70 hour) and to significantly distribute into tissues (V_{ss} in the range of 2.56 to 5.32 L•kg⁻¹). The pharmacokinetic profile was expected to be linear in human because no nonlinear processes were identified.

In order to predict the efficacious dose in human, a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PKPD) model previously developed for a molecule of the same chemical class with the same mode of action (RO6885247) was applied to risdiplam. This model was validated with healthy volunteer (HV) and SMA patient data from RO6885247. In this model, only unbound (free) drug in plasma was assumed to be pharmacologically active. The pharmacologically active drug

Summary and conclusions: RO7034067 (risdiplam) was administered daily to 1 cynomolgus monkey per dose group, in order to investigate the maximum tolerated dose. RO7034067 was tested at 1, 3, 10 and 20 mg/kg/day. RO7034067 exceeded maximal toleration at 20 mg/kg/day, and both animals were euthanized prematurely after two doses, owing to excessive clinical signs and weight loss. Test item effects also included clinical pathology changes and histopathological changes in the skin/subcutis, eyelid, tongue, gastro-intestinal tract, larynx and testis.

Risdiplam was tested in a subsequent fixed dose phase, where dose levels of 0, 0.75, 1.5, 3 and 6 mg/kg/day were given for 2 weeks, and were well tolerated. At 6 mg/kg/day there were test item-related histopathological changes of minimal severity in the skin/subcutis, eyelid and jejunum. There were no microscopic effects at 3 mg/kg/day, which was associated with systemic exposures (AUC_{0-24h}) and C_{max} values at Day 14 for males/females, respectively of 3130/6720 (ng•h)/mL and 378/604 ng/mL. Doses up to 6 mg/kg/day were therefore considered likely to be well-tolerated in subsequent repeat-dose studies.

Report No. 1073193: RO7034067: A 7-day dose range-finding toxicity and toxicokinetic study in 001178-W (wild type) RasH2 mice.

Species/Strain: mouse/RasH2

Doses: 0; 10; 20; 30; 100 mg/kg/day.

Duration of Dosing: 7 days, once daily, followed by 14 day recovery.

Male and female RasH2 (wild type) mice were originally assigned to four groups. Due to findings in the 30 and 100 mg/kg/day dose groups, 10 toxicity animals/sex/group were subsequently assigned to Group 5. Dosing of Group 5 was initiated 8 days following the initiation for Groups 1 through 4.

Noteworthy Findings:

≥30 mg/kg/day: from Day 4 (at 100 mg/kg/day) and Day 5 (at 30 mg/kg/day) onwards, clinical observations of hunched appearance, hypoactivity, piloerection, ataxia, squinting eyes, entire body cold-to-the-touch, green genital discharge, nonformed feces and/or rough hair coat, correlating with reduced food consumption and body weight loss. Animals dosed at 100 and 30 mg/kg/day were sacrificed on Day 4 and 5, respectively.

Clinical pathology effects were markedly decreased absolute reticulocyte count, without a prominent decrease in red cell mass, which suggested reduced erythropoiesis. All other hematology and clinical chemistry changes were considered

present and ERG amplitudes had increased by the end of the recovery phase at 7.5/5 mg/kg/day. There were no test item-related findings in the skin (including the eyelid skin) and thymus of animals previously administered 7.5/5 mg/kg/day, indicating complete reversal of the test item-related findings in these tissues.

NOAEL is considered to be 1.5 mg/kg/day, corresponding to systemic risdiplam exposures of 414/396 ng/mL (C_{max}) and 1870/2060 ng•hr/mL (AUC_{0-24}) during Week 39 of the dosing phase for males/females.

Report No. 1064057: RO7034067: 4 week oral (gavage) administration toxicity study in the rat with a 4 week treatment-free period.

Species/Strain: Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han); initial age: 7 weeks.

Duration of Dosing: 4 weeks.

Duration of Postdose: 4 weeks.

Doses: 0 (vehicle), 1, 3 or 9 mg/kg/day once daily. Four additional groups were similarly dosed and used for toxicokinetic assessments.

An additional 10 male animals included in the main group dosed at 3 mg/kg/day for determination of risdiplam levels in plasma, eye, brain and skin.

Conclusion: daily oral gavage administration of risdiplam to Crl: WI (Han) rats at doses of 1, 3 and 9 mg/kg/day for at least 4 weeks was generally well-tolerated. At 9 mg/kg/day there was reduced body weight gain in both sexes, non-adverse histopathological findings in the thymus, testis and gastrointestinal tract, and pronounced increases in the incidence of micronucleated (MN) erythrocytes in the bone marrow. Under the conditions of this study, the NOAEL was considered to be 3 mg/kg/day with C_{max} and $AUC_{(0-24h)}$ values at Day 28 of 584/684 ng/mL and 5450/5890 (ng•h)/mL for males/females, respectively.

Report No. 1066289: RO7034067: 2 week oral (gavage) administration toxicity study in the monkey with a 2 week treatment-free period.

Species/Strain: Monkey/cynomolgus; initial age: 26-32 months.

Duration of Dosing: 2 weeks.

Duration of Postdose: 2 weeks.

Doses: 0 (vehicle), 2, 4 or 6 mg/kg/day once daily.

Conclusion: administration of risdiplam to cynomolgus monkeys at dose levels of 2, 4 or 6 mg/kg/day for 2 weeks was primarily associated with clinical findings in the skin at 6 mg/kg/day correlating with adverse microscopic findings of

Report No. 1067962: A 26-week oral gavage retinopathy study of RO7034067 and RO6885247 in pigmented rats.

Species/Strain: Rat/ Brown Norway; initial age: 8.5 weeks.

Doses: 0 (Reference Item);

- RO7034067 (risdiplam) – 7.5/5 mg/kg/day (dosing at 7.5 mg/kg/day was stopped on study day 47/46 due to severe clinical signs and after a treatment-free period, dosing has resumed on study day 53/52 at 5 mg/kg/day);

Duration of Dosing: 26 weeks.

Conclusion: daily oral gavage administration of risdiplam to rats for up to 26 weeks at doses of 7.5/5 mg/kg/day did not result in any signs of retinopathy based on the ophthalmology examination, ERG, sdOCT or histopathological evaluations with steady state in choroid and retina having been reached by week 13 or before. Observation of a hazy vitreous body in the area of the retina in test item treated eyes appeared to coincide with vitreal observations in the OCT.

Significant systemic toxicity was observed for both test items. Administration of risdiplam resulted in early decedents due to decreased cellularity of the bone marrow in combination with intestinal tract findings; scheduled sacrificed animals showed reduced body weight and food intake, and red cell mass reductions, as well as cortical lipofuscin/ceroid pigmentation in the adrenal gland at Week 26...

Report No. 1077199: RO7034067: 4-Week oral gavage repeat-dose toxicity and toxicokinetic doserange finding (DRF) study with RO7034067 in the 001178-W (wild type) RasH2 mouse.

Species/Strain: Mice/ RasH2 (001178-W [wild type], CByB6F1-Tg[HRAS]2Jic); initial age: 8 weeks.

Doses (mg/kg/day): 0 (control); 3; 9; 20/16 (dosing was suspended on Days 17 to 19 due to excessive effects at 20 mg/kg/day, then restarted on Day 20 at 16 mg/kg/day and continued for 14 days).

Duration of Dosing: 28 Days.

Conclusion: Test item-related clinical observations were noted at 20 mg/kg/day, along with decreased body weights and food consumption. Test item-related microscopic findings were noted in the GI track and bone marrow. Clinical pathology changes at 20 mg/kg/day likely correlated with microscopic findings in the intestine and bone marrow. Similar findings were not noted in surviving animals administered 16 mg/kg/day, which was considered the NOAEL. This suggests not only a steep dose-toxicity relationship but also full recovery of animals previously administered 20 mg/kg/day. This dose level was associated with systemic exposures (Day 29 of the

	aneugenic) mechanism of MN induction by risdiplam in cultured mammalian cells.
in vivo (including additional assessment on toxicokinetics)	<p>In two acute combined MNT-Comet studies in rats, at low doses of up to 1.5 mg/kg and at doses of up to 25 mg/kg, liver and jejunum tissue were analyzed for the presence of DNA strand breaks using the Comet assay in addition to the MNT with bone marrow. No induction of DNA strand breaks could be detected at dose levels which were clearly associated with increased frequencies of MN erythrocytes. At the highest dose of 25 mg/kg three times in 48 h, increases in MN containing erythrocytes were associated with evidence of bone marrow toxicity (reduction in PCE/normochromatic erythrocytes [NCE] ratio), yet at doses of 6 and 12.5 mg/kg/day, increased MN frequencies were not associated with evidence of toxicity. At 3 mg/kg/day, no effect on the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) was observed.</p> <p>In addition, MN studies were integrated with the adult rat 4-week toxicity study and with the 13-week rat juvenile toxicity study. In these studies, risdiplam increased the frequencies of MN-PCEs in a sublinear, dose-related manner with 3 mg/kg/day being a critical dose at which weak effects start to be seen in the 4-week study in female animals, and in the 13-week rat juvenile toxicity study, increased frequencies of MN-PCEs were seen at 7.5 mg/kg/day.</p> <p>In a comprehensive statistical approach, individual animal MN data from the MNT studies were plotted against AUC_{0-24} and analyzed with the benchmark dose (BMD) software PROAST using a critical effect size (CES) of 50%. The overall lowest (most conservative) BMD values for the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes of rats by risdiplam were 4570 ng•h/mL (AUC_{0-24h}) and 438 ng/mL (C_{max}). These values were obtained in a 4-week study with adult rats and in an acute study with male adult rats, respectively.</p> <p>The most conservative 90% lower confidence level of the BMD is 2915 ng•h/mL (AUC_{0-24h}) and 236 ng/mL (C_{max}). Both values were calculated from data obtained in the acute study with male adult rats.</p>
4) Carcinogenicity:	
long-term studies	<p>To evaluate the carcinogenic potential of risdiplam the 26-week study was conducted. Male and female RasH2 mice were administered vehicle control article; water control article; or 1.0, 3.0, or 9.0 mg/kg/dose risdiplam via oral gavage once daily for 26 weeks. No test article-related clinical observations, body weight (gains) or food consumption alterations, or differences in survival, hematology, incidence of neoplasms, incidence of macroscopic findings, or incidence or severity of microscopic</p>

	<p>risdiplam. No conclusion regarding a possible involvement of risdiplam in the etiology of these malformations could be made on the basis of this preliminary study.</p> <p>In the main EFD study risdiplam was administered to pregnant New Zealand White rabbits from Days 6 to 19 of gestation, at doses of 1, 4 and 12 mg/kg/day. Severe maternal toxicity was observed at 12 mg/kg/day, characterized by the premature termination of 3 does following prolonged periods of little or no food intake (2 after aborting), reduced food intake (-28%) and weight loss (-120 g on average over the dosing period vs 210 g body weight gain in controls). There was also a marked increase in the incidence of late resorptions at this dose level. Fetal weight was not affected. Four fetuses (4%) from 4 litters (22%) had hydrocephaly at 12 mg/kg/day. An association between the incidences of hydrocephaly and risdiplam could not be discounted, although marked maternal toxicity was noted at this dose level. Only the malformations seen in the 12 mg/kg/day dose groups were considered to be of non-spontaneous origin. Also, at 12 mg/kg/day, there were increased incidences of fetuses with absent accessory lung lobes and with a small gallbladder. The NOAEL for maternal toxicity was 4 mg/kg/day (for risdiplam C_{max} 1500 ng/mL, AUC_{0-24h} 7990 ng•h/mL on GD 15).</p>
prenatal and postnatal toxicity	<p>Effects of risdiplam on pre- and postnatal development (PPND), including female oocyte development, were assessed in rats.</p> <p>In the DRF PPND study, risdiplam was administered once daily by oral gavage to Wistar Hannover (CrI:WI[Han]) rats from GD6 to PND6 at dose levels of 1, 3 and 7.5 mg/kg/day. At 7.5 mg/kg/day, 3 out of 6 females were euthanized on GD23/24 due to difficult parturition (dystocia) and one female was euthanized on PND1 following total litter loss. There was a dose-related increase in the length of gestation at ≥ 3 mg/kg/day. The live birth index at ≥ 3 mg/kg/day was lower than in the control group, although the number of implant scars was similar in all groups.</p> <p>The live litter size at birth at ≤ 3 mg/kg/day and the length of gestation and live birth index at 1 mg/kg/day were comparable to the control group. All live pups were externally normal at birth. There were no risdiplam-related clinical observations in pups at any dose level. Pup survival and mean body weight gains in the two surviving litters at 7.5 mg/kg/day was markedly lower than in controls. At scheduled necropsy, dark discoloration of the adrenal glands was noted in the dams at ≥ 3 mg/kg/day. There were no risdiplam-related clinical observations in females surviving to scheduled euthanasia;</p>

Changes in hematology parameters at 3.75 and 5 mg/kg/day indicate a complete myelosuppression of all cell lineages.

- 10 mg/kg/day:

Microscopic findings (selected pups): necrosis of the cryptal cells in the intestine and hemorrhage in the esophagus, stomach and brain.

NOAEL: 2.5 mg/kg/day for treatment on PND4-31; 9 mg/kg/day (post-weaning, PND22-36).

The exposure to risdiplam in terms of AUC_{0-24h} at 2.5 and 3.75 mg/kg/day was 0.7- or 0.5-fold higher on PND4 compared to PND31, respectively. Based on the limited data obtained, exposure in terms of AUC_{0-24h} generally increased 2-fold between PND22 and PND36 in females at 1 and 3 mg/kg/day after repeat dosing.

Since in the DRF study in rats major differences in tolerability between the pre- and post-weaning phase were observed, the pivotal juvenile rat toxicity studies were conducted in two parts, a pre-weaning and a post-weaning part. The pre-weaning study was initially conducted with only two dose levels (1 and 2.5 mg/kg/day) and did not identify a NOAEL. Hence, a second study with PND4-31 treatment was conducted with three dose levels (0.75, 1.5 and 2.5 mg/kg/day).

In the first 4-week rat pre-weaning juvenile study, treatment with the high dose of 2.5 mg/kg/day resulted in decreased food consumption and lower body weight gain, which was correlated with reduced long bone growth and delayed preputial separation in males. In male animals, reversible degeneration of the seminiferous epithelium was observed at ≥ 1.0 mg/kg/day. Based on testicular microscopic changes at 1 and 2.5 mg/kg/day, there was no NOAEL for males. The NOAEL for females was 2.5 mg/kg/day.

In the second 4-week toxicity study, daily oral administration of risdiplam to juvenile rats from PND4 to PND31 resulted in reduced body weight gain, reduced bone length and delayed male sexual maturation at ≥ 1.5 mg/kg/day and reduced food intake in males only at 2.5 mg/kg/day. In males there were risdiplam-related reversible minimal decreases in the lymphocyte count at 2.5 mg/kg/day, decreases in testis and epididymis weights at ≥ 1.5 mg/kg/day which persisted following an 8-week off-drug period and reversible adverse degenerative testicular microscopic changes at 2.5 mg/kg/day.

Reduced body weight by more than 10% and presence of testicular microscopic changes at 2.5 mg/kg/day leads to the overall conclusion of 1.5 mg/kg/day as NOAEL. This corresponds to a mean AUC_{0-24h} of 1570 ng•h/mL for males and 1880 ng•h/mL for females for risdiplam on PND31.

	<p>transcription factor, all four compounds were also tested for their impact on cell cycle progression. Treatment with the test items for 24 h from 0.64 nM to 10 µM revealed comparable IC₅₀ values between human and Cynomolgus monkey cells with respect to the down-regulation of FOXM1B/C transcript variants. In this regard, RO6885241 (the metabolite M1 of RO6885247) and risdiplam were more potent than RO6885247, whereas the major metabolite of risdiplam, M1 did not appear to affect the expression levels of the FOXM1B/C transcript variants. Furthermore, a concentration-dependent effect to induce mitotic arrest in Cynomolgus monkey and human iPSCs was detected for RO6885247, RO6885241 and risdiplam, but not for risdiplam M1.</p>
drug dependence	<p>No dedicated non-clinical studies for drug dependence were conducted with risdiplam. The nature of the mechanism of action and the properties of risdiplam do not trigger concerns regarding drug dependence.</p>
toxicity of metabolites	<p>RO7112063 is the major circulating metabolite (M1) of risdiplam in human (median M1/parent ratio 0.287 in SMA patients). Human exposure to M1 is qualified in all key toxicology studies (repeat dose toxicity, juvenile toxicity, genotoxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity) at the respective NOAELs.</p>
toxicity of impurities, and toxicity assessment of excipients	<p>Key toxicity studies with risdiplam were conducted with batches produced by the registration relevant synthesis. The specifications for impurities (individuals and sum) are compliant with ICH Q3A(R2). None of the impurities in the registration relevant batches exceeds the level of qualification given by ICH Q3A. Consequently, no individual impurities are specified above the level of toxicological qualification (≥0.15%) and thus, no specific additional impurity coverage studies for toxicity were deemed necessary.</p> <p>Toxicological assessment on excipients in an oral drug formulation (Ro703-4067/F12) for pediatric use was conducted. Ro703-4067/F12 represents the low dose strength of 0.25 mg/mL risdiplam, which is planned for use in neonates, infants and young children.</p> <p>Overall, based on available knowledge, the planned use of the oral drug formulations Ro703-4067/F12 and Ro703-4067/F13 are considered acceptable from a toxicological view, even under worst-case scenarios for the planned use in all age groups (i.e., highest dose of 0.21 mg/kg applying the low dose strength of 0.25 mg/mL up to a limit dose volume of 5 mL).</p> <p>A particular risk for neonates due to the content of sodium benzoate (risk for jaundice and related sequelae) is considered</p>

	<p>sensitizing or irritating potential was ascribed to risdiplam after dermal exposure on the ears with the highest dose representing the clinical human formulation at 1-5x strength or by oral gavage with a dose representing the expected human therapeutic exposure for 3 consecutive days and/or followed by an oral or dermal challenge.</p>
<p>5. Conclusions on non-clinical studies</p>	<p>The nonclinical pharmacology, pharmacokinetics and safety profile of risdiplam has been profoundly studied.</p> <p>The pharmacological activity of risdiplam to modify SMN2 exon 7 splicing and to increase SMN protein levels was demonstrated in a variety of in vitro and ex vivo systems. This effect was further confirmed in mouse models of SMA. The increase in SMN protein levels translated into significant efficacy in rescuing disease phenotype in Type 1 SMA-like SMNΔ7 mouse model.</p> <p>Risdiplam has significant specificity for SMN2 exon 7 splicing, however, it also affects a number of secondary splice targets, which all share the same 5' splice site. Most prominent secondary splice targets for risdiplam at relevant exposures were STRN3, FOXM1, MADD, APLP2 and SLC25A17 mRNAs, of which FOXM1 and MADD were identified as likely contributors to observed toxicities due to their role in cell cycle and apoptosis.</p> <p>Relevant receptor interactions were found for risdiplam and its major metabolite M1 only for COX1 and COX2 and for acetylcholinesterase. These were not associated with any findings at possible target organs in in vivo toxicity studies. However, an association of COX1/COX2 inhibition with the delayed parturition seen in the PPND studies in rats at exposures in excess of 2-fold the clinical exposure guidance cannot be excluded.</p> <p>Risdiplam freely distributes from the blood into the CNS and multiple peripheral tissues in animals, including muscle. In line with the PK properties of risdiplam, a parallel dose-dependent increase of SMN protein levels was seen in the CNS and muscle tissues in the two SMA mouse models after risdiplam administration.</p> <p>In contrast to juvenile animals, risdiplam showed similar plasma protein binding in human blood sampled at various ages from birth to adulthood (non-SMA and Type 1, 2, and 3 SMA patients). Hence, no major differences in tolerability due to age-related variation in plasma protein binding are expected for the pediatric SMA population.</p> <p>There is no clinically significant DDI expected for risdiplam as a victim. Based on in vitro investigations, a potential for DDI effects by risdiplam on concomitant medications which are</p>

ЗВІТ про доклінічні дослідження

1. Назва лікарського засобу (за наявності - номер реєстраційного посвідчення)	ЕВРІСДІ (EVRYSDI®)
1) тип лікарського засобу, за яким проводилася або планується реєстрація	Лікарський засіб за повним досьє (автономне досьє). Інший лікарський засіб. Нова діюча речовина (ДР). Оригінальний (інноваційний) лікарський засіб (молекула не представлена на ринку України) для лікування рідкісного захворювання згідно пункту 10 (підпункту 10.1) розділу V 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:	
1) первинна фармакодинаміка	<p>Здатність ридипламу модифікувати альтернативний сплайсинг попередника матричної РНК (пре-мРНК) гена, що кодує білок виживання мотонейронів 2 (SMN2), для включення екзона 7 і завдяки цьому збільшити виживаність білка мотонейронів (SMN) в необхідних рівнях вивчалась в моделях <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> та в мишачих моделях <i>in vivo</i>. Ефекти лікування ридипламом стосовно порятунку при фенотипах, подібних до СМА (спінальної м'язової атрофії), були продемонстровані в двох різних мишачих моделях.</p> <p>Активність <i>in vitro</i> та <i>ex vivo</i> Вплив на включення екзона 7 SMN2 Вплив ридипламу на сплайсинг транскрипту SMN2 з метою посилення включення екзона 7 був підтверджений в фібробластах, отриманих у пацієнтів із СМА 1 типу, <i>in vitro</i> та в клітинах крові, отриманих у здорових добровольців, <i>ex vivo</i>. У фібробластах, отриманих у пацієнтів, ридиплам продемонстрував потужну ефективність з метою збільшення включення екзона 7 транскрипту (первинний транскрипт SMN) із 50% ефективною концентрацією (EC₅₀) 29±7 нМ (середнє ± стандартна похибка середнього значення) та зниження рівня процесованого транскрипту SMN2 (відсутній екзон 7; SMNΔ7) із IC₅₀ на рівні 12±1 нМ (середнє ± стандартна похибка середнього значення). Цей ефект є інтенсивним (>90%) при 121 нМ ридипламу [звіт № 1066987]. В клітинах крові <i>ex vivo</i> ридиплам спричиняв дозозалежне збільшення первинних транскриптів SMN2 із EC₅₀ на рівні 75±19 нМ (100% при 2 мкМ) і зниження транскриптів SMNΔ7 при IC₅₀ на рівні 60±8 нМ (мінімум 2% при 3 мкМ) [звіт № 1066984].</p> <p>Подібні результати для ридипламу були отримані в повторному експерименті (EC₅₀ при 24 нМ для включення екзона 7 в транскрипт SMN2, звіт № 1078515).</p>

Терешак Вікторія

Власюк Т.В.

Вплив на рівень білка SMN

Вплив ридипламу на рівень білка SMN вивчався в культивованих фіброблестах, отриманих у пацієнтів із СМА 1 типу, та в культурі мотонейронів, отриманій з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSC) пацієнтів із СМА 1 типу. Ридиплам збільшував рівень білка SMN при EC₅₀ на рівні 12±3 нМ в фіброблестах і при EC₅₀ на рівні 182±114 нМ в клітинній культурі мотонейронів. Максимальне збільшення рівня SMN приблизно вдвічі було порівняльним в усіх випробовуваних типах клітин [звіт № 1066984].

Активність основного метаболіту M1

Метаболіт M1 був ідентифікований як основний метаболіт ридипламу у людини. Його активність стосовно модулювання сплайсингу SMN2 вивчалась в культивованих фіброблестах, отриманих у пацієнтів із СМА 1 типу, і в зразках цільної крові здорових добровольців [звіт № 1078515]. При тестуванні на фіброблестах M1 характеризувався меншою активністю при EC₅₀ для індукції синтезу первинного транскрипту SMN2 і при IC₅₀ для індукції зниження рівня транскрипту SMN2 з відсутнім екзоном 7, що приблизно в 34 та 28 разів перевищують такі для ридипламу відповідно. В зразках цільної крові здорових добровольців не спостерігалась активність для M1 при концентрації до 3 мкМ.

Активність in vivo

З метою вивчення активності ридипламу in vivo застосовувались дві різні мишачі моделі СМА (SMNΔ7 і C/C), які є носіями трансгену SMN2 людини.

Мишам SMNΔ7 в ранньому постнатальному періоді (модель, подібна до СМА 1 типу тяжкого ступеня) виконувались інтраперитонеальні ін'єкції протягом 7 днів один раз на день (3–9 дні після народження) диметилсульфоксиду (DMSO; наповнювач) або ридипламу (0,1, 0,3, 1 або 3 мг/кг/день). Гетерозиготні миші одного виводку, носії однієї копії мишачого алеля SMN1 без демонстрації СМА-пов'язаного фенотипу, були позитивним контролем. Через 1 годину після останнього введення були відібрані мозок і чотириголові м'язи і були визначені рівні білка SMN [звіт № 1063288]. Лікування ридипламом призводило додозалежного збільшення рівня білка SMN в мозку та чотириголових м'язах у мишей SMNΔ7, яке досягло плато при введенні ридипламу у дозі 1 мг/кг/день із максимальним збільшенням рівня SMN у 3–3,5 рази у порівнянні з контрольними мишами, яким вводився наповнювач. Різниця в рівні білка SMN була статистично достовірною у мишей, яким вводили ридиплам по 0,3, 1 і 3 мг/кг/день (p<0,01; множинні порівняння ANOVA у порівнянні з контролем). Однак

Терешко Віктор

Директор - Василь Т.В.

рисдиплам не збільшував білок SMN до рівня, визначеного в контролі НЕТ.

Мишам С/С віком близько 7 тижнів давали один раз на день протягом 10 днів перорально через шлунковий зонд наповнювач або рисдиплам (1, 3, 10 мг/кг/день). Через 1 годину після останнього введення були відібрані мозок і чотириголові м'язи і були визначені рівні білка [звіт № 1065078]. Було виявлене дозозалежне збільшення рівня рисдипламу в аналізованих тканинах усіх мишей, які отримували рисдиплам. Лише найвища доза (10 мг/кг/день) призводила до статистично значимого збільшення рівня білка SMN в мозку та чотириголових м'язах. Максимальне збільшення рівня білка SMN (приблизно у 1,5–2 рази у порівнянні з контролем) було виявлене при застосуванні найбільшої дози. В чотириголових м'язах рівень білка SMN, індукований за допомогою рисдипламу у дозі 10 мг/кг, досягнув такого у гетерозиготних мишей як позитивного контролю.

Для оцінки ефекту рисдипламу у мишей SMN Δ 7, групи мишей SMN Δ 7 отримували наповнювач або рисдиплам, починаючи з 3 дня після народження до закінчення дослідження (220 день після народження) [звіт № 1093133].

Гетерозиготні миші одного виводку, носії однієї копії мишачого алеля SMN1 без демонстрації СМА-пов'язаного фенотипу, були позитивним контролем. Дозування мишам здійснювалось в період з 3 до 23 дня після народження з частотою один раз на день шляхом інтраперитонеальної ін'єкції, а з 24 дня через шлунковий зонд. Миші SMN Δ 7, яким вводили рисдиплам, оцінювались на предмет виживання, маси тіла, некрозу дистальних тканин, впливу на нейром'язеві зв'язки і м'язову діяльність (установочний рефлекс).

Лікування рисдипламом суттєво подовжувало виживання тварин при застосуванні усіх доз у порівнянні з тваринами, яким вводили наповнювач в довгостроковому дослідженні [звіт № 1093133]. Статистично значиме подовження медіани часу виживання вже спостерігалось в групі низького дозування (26 днів проти 10,5 дня в групі тварин, яким застосовували наповнювач). Вплив рисдипламу на подовження медіани часу виживання збільшувався із застосованою дозою, при цьому найвища доза продемонструвала суттєве збільшення виживаності у порівнянні з мишами, яким застосовували наповнювач, із медіаною часу виживання більше 6 місяців. Лікування рисдипламом призводило до покращення приросту маси тіла на 67%, 82% і 91% на 140 день після народження в групах середнього, середнього/високого і високого дозування у порівнянні з гетерозиготним контролем [звіт № 1066984].

Тварини в групі низького дозування продемонстрували лише незначне одужання у порівнянні з мишами SMN Δ 7, яким

*Державний центр
Д.В. - Микола Д.В.*

застосовували наповнювач. Не спостерігалось статистично достовірних відмінностей між групою найвищою дозування і гетерозиготними мишами одного виводку як контролю стосовно максимальної маси тіла, дня досягнення максимальної маси тіла і площі під кривою «маса тіла-час» в період з 3 до 220 дня після народження [звіт № 1093133]. Покращення приросту маси тіла залежав від дози.

У мишей SMN Δ 7, яким застосовували наповнювач, спостерігалась суттєва втрата везикулярного переносника глутамату 1 (vGluT1) пропріоцептивної аферентації мотонейронів поперекових сегментів 3–5 (L3–5), втрата мотонейронів поперекового сегмента 4 (L4), денервація нейром'язових синапсів в найдовшому м'язі спини і атрофія довгого розгинача пальців. Лікування ридипламом спасло мишей SMN Δ 7 від спостережуваних фенотипів. Покращення залежало від дози і максимальна ефективність була досягнута при застосуванні середньої дози (3–220 днів після народження). Кількість ущільнень vGluT1 на рівні L3–5 і кількість аксонів вентрального корінця спинномозкового нерва на рівні L4 в групах середнього, середнього-високого і високого дозування лише незначно, хоча статистично достовірно, відрізнялась від такої в контролі гетерозиготних мишей одного виводку. В найдовшому м'язі спини спостерігалась виражена денервація на 14 день після народження у контрольних мишей SMN Δ 7, у той час як у мишей, яким застосовували ридиплам, спостерігався повний рівень іннервації, порівняльний з контролем гетерозиготних мишей одного виводку (оцінка виконувалась на 220 день після народження). Маса довгого розгинача пальців повернулась в норму в групах середнього-високого та високого дозування у порівнянні з контролем гетерозиготних мишей одного виводку. У тварин в групі середнього дозування спостерігалась суттєво менша маса довгого розгинача пальців, що співпадає з меншою масою тіла, спостережуваною в цій групі.

Залежне від дози покращення моторної функції (установочний рефлекс до 16 дня після народження) спостерігалось після застосування ридипламу мишам SMN Δ 7. У той час як гетерозиготні миші одного виводку змогли перегортатися на 9 день після народження, ні миші SMN Δ 7, яким застосовували наповнювач, ні миші, які отримували ридиплам, не змогли це зробити у цьому віці. Однак, на 16 день після народження, тобто менше ніж через 2 тижні після дозування, в усіх групах дозування, включаючи групу застосування наповнювача, спостерігалось залежне від дози покращення здатності перегортатися. Групи середнього-високого та високого дозування ридипламу не відрізнялися від контролю

Тереза Вірше
Prof. - Анастасія Т.В.

	<p>гетерозиготних мишей одного виводку, у той час як у тварин в групі застосування лише наповнювача або низької та середньої доз ридипламу покращення було менш вираженим.</p> <p>Лікування ридипламом перешкоджало некрозу хвоста, що визначалося шляхом оцінки довжини хвоста. Хоча середня довжина хвоста була більшою у всіх групах, які отримували ридиплам, ніж у мишей SMNΔ7, яким застосовували наповнювач, суттєве покращення спостерігалось лише при застосуванні середніх, середніх-високих та високих доз. Протягом усього дослідження середня довжина хвоста в групах середньої-високої і високої доз ридипламу була порівнянна з такою в контролі гетерозиготних мишей одного виводку.</p> <p>Подібним чином, ридиплам зменшував некроз тканин навколо очей, що визначалось за допомогою напівкількісної шкали оцінки. Хоча в групах застосування середніх-високих та високих доз спостерігалось помітне зменшення некрозу, в цих групах лікування був виявлений залишковий некроз. Тяжкість спостережуваного некрозу не змінювалась з часом в цих групах дозування.</p>
2) вторинна фармакодинаміка	<p>Вторинна фармакодинаміка вивчалась з урахуванням наступних аспектів, які вважались важливими для ридипламу:</p> <ul style="list-style-type: none"> - «Специфічний» вторинний вплив ридипламу на певну кількість альтернативних мішеней сплайсингу, окрім SMN2; - «Класичний» вторинний вплив на рецептори, ферменти або канали. <p><u>Вторинні цілі сплайсингу</u></p> <p>Для оцінки потенційної ненаправленої дії на вторинні ділянки сплайсингу та будь-які їх транскрипти був проведений комплексний транскриптомний аналіз з охопленням сайтів границі сплайсингу на культивованих фібробластах пацієнтів із SMA 1 типу [Звіт №. 1066987]. Фокусом цього дослідження також була ідентифікація потенційних вторинних ефектів ридипламу через зміну сплайсингу інших генів. З цією метою фібробласти пацієнтів із SMA 1 типу оброблялись ридипламом, був виконаний аналіз РНК-секвенування і були застосовані специфічні алгоритми для загальної оцінки явищ сплайсингу в фібробластах, оброблених ридипламом. Для кожного проаналізованого явища сплайсингу обчислювалось нормалізоване число зчитувань мРНК, що підтримувало будь-який варіант, і співвідношення (та кратність зміни логарифму [$\Delta\log FC$]) порівнювались з відповідними значеннями в контрольних зразках (оброблених DMSO). Значення 0 відповідає ідентичним співвідношенням між двома варіантами в контрольних та оброблених зразках.</p> <p>Загальні результати: ридиплам коригує дисфункціональний сплайсинг гена SMN2 людини in vitro із кількісним включенням</p>

Тереза Віршич
Доктор-Масюк Т.В.

	<p>ексона 7 і створенням повнорозмірної мРНК. Окремо від SMN2 лише кілька генів, включаючи FOXM1, STRN3 і SLC25A17 були ідентифіковані як альтернативно сплайсовані.</p> <p>Для ідентифікації вторинних фармакологічних ефектів модифікатора сплайсингу SMN2 (рисдиплам і RO6885247) вибрані тканини селезінки, шкіри, сітківки і судинної оболонки/пігментного епітелію сітківки яванських макак аналізувались за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією, специфічної для чотирьох вторинних мішеней сплайсингу (APLP2, FOXM1, MADD, STRN3) [звіт № 1067982]. Пов'язані із сполукою зміни альтернативного сплайсингу були більш вираженими для рисдипламу, ніж для RO6885247 в умовах цього дослідження. Окрім того, аналіз сплайсингу із аналізом обраного маркера свідчить лише про незначний вплив на ці маркери в сітківці та судинній оболонці/пігментному епітелію сітківки яванських макак у порівнянні з ефектами, що спостерігались в селезінці та шкірі.</p> <p>Дослідження з подібним дизайном та результатами було виконане у щурів [звіт № 1068196].</p> <p><u>Взаємодії між рецептором, ферментом і каналом</u></p> <p>Рисдиплам і метаболіт M1 вивчалися на предмет ненаправленої дії (включаючи мішені, які вважались важливими для вивчення аддиктивного потенціалу) <i>in vitro</i> в концентрації для однократного тесту 10 мМ в аналізі радіолігандного зв'язування та ферментативному аналізі, вивчаючи 101 різну ділянку зв'язування або ферментативні мішені (радіолігандне зв'язування: 69 ділянок у людини і 13 у щурів; 19 ділянок ферментів у людини) [звіт № 1087510]. В цих дослідженнях і рисдиплам і M1 інгібували COX1 та COX2 (IC₅₀ ~ 2 мкМ) та ацетилхолінестеразу (IC₅₀ ~ 0,6 мкМ). Рисдиплам також інгібував гістамінові рецептори H3 та мускаринові рецептори M1 із значеннями K_i 1 та 5 мкМ відповідно. Не було встановлено, чи ці сполуки були агоністами або антагоністами в цих ділянках. Рисдиплам інгібував δ-опіїдний рецептор на 62% при первинному скринінгу, при цьому при повторному аналізі було виявлено лише 35% інгібування при 10 мкМ. Це може бути пов'язаним з обмеженнями розчинності сполуки в найвищій випробовуваній концентрації. Концентрація IC₅₀ не розраховувалась, однак вважалась > 3 мкМ на підставі найнижчої досягнутої концентрації в аналізі стабільності/розчинності.</p>
3) фармакологія безпеки	<p>Повний набір досліджень фармакології безпеки <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> не продемонстрував будь-яких доказів щодо будь-яких ефектів рисдипламу на функції серцево-судинної системи, ЦНС або респіраторної системи.</p>

Терешко Віктор

Доктор - медик М.В.

	<p>В оцінених за допомогою телеметричного обладнання мавп (3 самців + 3 самок), які отримали однократну дозу рисдипламу, найвища випробовувана доза (7,5 мг/кг) не спричинила зміни тиску в лівому шлуночку або параметрів системного артеріального тиску, ЧСС, інтервалів ЕКГ та температури тіла. Доза без видимого ефекту (NOEL) в цьому дослідженні вважалась щонайменше на рівні 7,5 мг/кг, із загальною концентрацією в плазмі крові (C_{max}) 894 ± 236 нг/мл (середня \pm стандартне відхилення; $n=6$) [звіт № 1062902].</p> <p>Рисдиплам не спричиняв суттєвого зниження вихідного струму K^+ в концентраціях до найвищої випробовуваної концентрації 5 мкМ на основі його розчинності в випробовуваному буфері. Ці результати свідчать, що рисдиплам не повинен блокувати реполяризуючий струм через канали $hERG K^+$ in vivo в вільних кардіальних концентраціях до 5 мкМ, які еквівалентні вільній концентрації в плазмі ~ 2000 нг/мл (що відповідає 18000 нг/мл загальної концентрації в плазмі крові у людини) [Звіти № 1064272, 1075143].</p> <p>Вплив рисдипламу на функцію центральної нервової системи (ЦНС) вивчався у самців щурів лінії Вістар за допомогою модифікованого тесту Ірвіна. Однократний пероральний прийом рисдипламу в найвищій випробовуваній дозі (10 мг/кг) не впливав на загальну поведінку, моторну активність чи координацію, сенсорні/моторні рефлексії чи температуру тіла. Тому NOEL вважається рівною або більшою 10 мг/кг [Звіт №1064342].</p> <p>Респіраторна функція після однократного перорального прийому рисдипламу вивчалась за допомогою загальною плетизмографії у самців щурів лінії Вістар в умовах вільної поведінки [Звіт №1064343]. Застосування рисдипламу в найвищій випробовуваній дозі (9 мг/кг) не впливало на респіраторну функцію. В контексті цього дослідження NOEL для респіраторної функції вважається рівною або більшою 9 мг/кг.</p>
4) фармакодинамічні взаємодії	Дослідження фармакодинамічної взаємодії між лікарськими засобами не проводились.
3. Фармакокінетика:	
1) аналітичні методики та звіти щодо їх валідації	Концентрація рисдипламу (RO7034067) та його метаболіту M1 в зразках плазми та тканин різних видів тварин протягом доклінічних досліджень (миші, кролики, щури, яванські макаки) та в зразках досліджень in vitro (включаючи матрикс людини) визначалась кількісно за допомогою рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS/MS). Методи LC-MS/MS ґрунтувались на екстрагуванні преципітації білка, хроматографічному розділенні оборотної фази і мас-спектрометричному детектуванні в режимі контролю

Експертна оцінка

Д-р М. В. Мисюк

	<p>селективних реакцій позитивних іонів. В залежності від вимог дослідження методи були пошуковими, кваліфікованими або валідованими відповідно до поточних регуляторних керівництв [EMA 2011, FDA 2001]. Звіти про валідацію наведені у Модулі 4.2.2.1.</p>
2) всмоктування	<p>Всмоктування – загальний фармакокінетичний профіль <u>Проникність in vitro</u> Рисдиплам і М1 є молекулами з високою проникністю. Проникність рисдипламу і М1 в лініях LLC-PK1 становить 350 нм/с і 310 нм/с відповідно, в клітинах MDCKII – 318 нм/с і 522 нм/с відповідно. Рисдиплам не є субстратом білка 1 множинної лікарської резистентності у людини (MDR1) і максимум слабким субстратом білка резистентності раку молочної залози людини (BCRP). М1 є слабким або хорошим субстратом MDR1 людини і слабким субстратом BCRP людини [Звіти № 1066927, 1087637, 1090180, 1081903].</p> <p>Фармакокінетика рисдипламу оцінювалась після внутрішньовенного, перорального або інтраперитонеального введення у тих самих видів/ліній у подібному віці, як і в токсикологічних чи фармакологічних дослідженнях (в усіх дослідженнях на дорослих тваринах використовувались самці, для виводку статі не встановлювали):</p> <ul style="list-style-type: none"> - щури лінії Вістар віком 4, 12 та 21 день після народження і дорослі [Звіти № 1064408, 1064409]; - віком 10 днів після народження миші дикого типу або гетерозиготні миші FVB з колонії delta7 [Звіт №1063287]; - дорослі голландські кролики [Звіт №1078251] (новозеландські кролики використовувались в дослідженнях репродуктивної токсичності); - дорослі яванські макаки [Звіт №1064410]. <p>Після внутрішньовенного введення період напіввиведення був коротким, кліренс був низьким і об'єм розподілу рисдипламу був помірним у щурів та мавп. Після перорального прийому біодоступність була від помірної до високої в обох видів. Період напіввиведення був довшим і t_{max} відстроченим у молодого виводку (щури віком 4 і 12 днів після народження) у порівнянні із щурами старшого віку.</p>
3) розподіл	<p><u>In vitro зв'язування з білками плазми крові і розподіл в еритроцитах</u> Зв'язування рисдипламу і його основного метаболіту М1 з білками плазми крові є помірним (вільна фракція 7–11%) без суттєвих відмінностей між видами у дорослих [Звіт №1066030 (рисдиплам), Звіт №1084838 (М1)].</p> <p>Для вільної фракції рисдипламу була показана сильна залежність від віку у щурів із значно більшою фракцією та високою міжіндивідуальною варіабельністю у нестатевозрілих</p>

Тереза Вірнік

Доктор Тарасюк Т.В.

щурів (до 90% в плазмі щурів віком 4 дні після народження – із високою варіабельністю – у порівнянні з 16% у дорослих) [Звіти № 1068283, 1074560]. Залежність від віку була менш помітною у мишей (вільна фракція 27% у мишей віком 11 днів після народження проти 12% у дорослих) [Звіт №1068283] і мавп (вільна фракція 25% у мавп віком 10 днів після народження проти 14% у тих самих мавп віком 6 місяців, n=3) [Звіт №1090306].

На відміну від нестатевозрілих тварин, ридиплам продемонстрував подібне зв'язування з білками плазми у людини від народження до дорослого віку. Дослідження *in vitro* у дітей проводились із застосуванням плазми крові людини із пуповинної крові, новонароджених та дітей (особи не із СМА та пацієнти із СМА 1, 2 і 3 типу) [Звіт №1077760].

В плазмі людини ридиплам зв'язується з альбуміном сироватки крові без будь-якого зв'язування з альфа-1 кислим глікопротеїном [Звіт №1066030].

Дослідження *in vitro* показали, що не відбувалось вираженого розподілу ридипламу в еритроцити у людини, щурів і мавп, з *in vitro* розподілом у плазмі крові на рівні 1,3, 0,9 і 1, відповідно [Звіт №1066030].

Зв'язування меланіну *in vitro*

Зв'язування меланіну ридипламом *in vitro* оцінювалось у випробовуваній концентрації від 1 до 10 мкМ із використанням меланіну сепії звичайної (*Sepia officinalis*). Зв'язування з меланіном було дуже сильним із середнім значенням незв'язаної фракції менше 0,1% при 1 мкМ і близько 0,2% при 10 мкМ [Звіт №1066867].

Дослідження розподілу в тканинах *in vitro* (печінкове захоплення)

Печінкове захоплення ридипламу *in vitro* не було чутливим до інгібітору поліпептиду-переносника органічних аніонів (ОАТР) рифаміцину SV (100 мкМ) [Звіт №1098464]. Тому ридиплам не вважається субстратом ОАТР людини. Вірогідно, що на печінкове захоплення переважно впливає пасивна дифузія, що співпадає з високою пасивною проникністю (>300 нм/сек).

Дослідження розподілу в тканинах *in vivo* (немічений матеріал)

Розподіл в тканинах і елімінація після однократного або повторного перорального прийому або інтраперитонеального щоденного введення неміченого ридипламу оцінювалися як первинна або вторинна кінцеві точки в різних фармакокінетичних (ФК), фармакодинамічних і токсикологічних дослідженнях на мишачих моделях СМА, альбіносах і пігментованих щурах і мавпах.

Терешко Віктор
Директор - Інститут Д.В.

Розподіл в ЦНС

Рисдиплам добре проникає в ЦНС, із тенденцією до дещо меншої концентрації в мозку у порівнянні з концентрацією в плазмі у мишей та мавп, що співпадає з властивостями субстрату MDR1 і BCRP у мишей [Звіти № 1081903, 1087637].

Рівень лікарського засобу знизився паралельно в плазмі, мозку та спинномозковій рідині в усіх видів і не виявлявся в довгострокових дослідженнях після періоду відмивання, що підтверджує відсутність кумуляції в тканинах [Звіти № 1063584, 1065114].

Розподіл в м'язах

Рисдиплам добре проникає в тканини м'язів із концентрацією в тканинах подібною до такої в плазмі крові у мишей, щурів і мавп. Рівень препарату швидко і паралельно знижувався в плазмі та м'язах щурів після завершення лікування [Звіти № 1063288, 1065261, 1067462].

Розподіл в інших органах, що уражаються при СМА

В дослідженні розподілу в тканинах у мишей [Звіт №1065261], концентрація рисдипламу в м'язах, мозку, серці і гортані була порівняльною із загальною концентрацією в плазмі із різницею менше ніж в 2 рази між двома тваринами через 7 днів щоденного застосування. Концентрація рисдипламу в кістковому мозку та селезінці продемонструвала високу міжіндивідуальну варіабельність, а співвідношення концентрації рисдипламу в тканині селезінки/плазмі було >2 . Співвідношення в тканині/плазмі було вищим в нирках (10), печінці та дванадцятипалій кишці (33 для обох органів). У двох інших тварин, яких умертвили через 6 тижнів після отримання останньої дози, концентрація рисдипламу в м'язах, мозку, серці, дванадцятипалій кишці, селезінці, яечках та гортані була менше 1 нг/г (нижче 1 нг/мл для плазми крові та спинномозкової рідини) і близько 4 нг/г в печінці та нирках.

Розподіл в очах

У щурів-альбіносів співвідношення концентрацій рисдипламу в тканинах різних субструктур ока та в плазмі крові було рівним або меншим одиниці. У пігментованих щурів та мавп розподіл рисдипламу в меланінвмісних частинах ока (судинна оболонка ока і пігментний епітелій сітківки, райдужка, склера) був суттєво більшим ніж в непігментованих структурах ока (сітківка, кристалик, склоподібне тіло) або в інших частинах тіла (м'язи, мозок, спинномозкова рідина), що співпадає із спостережуваним зв'язуванням меланіну *in vitro*. Після періоду без лікування концентрації рисдипламу все ще були суттєво високими в очах, особливо в меланінвмісних частинах у пігментованих щурів та мавп, хоча чітко знижались після завершення лікування, що

Терешко Віктор

В.В. Терешко

	<p>таким чином свідчить про помітну елімінацію [Звіти № 1063584, 1064057, 1065261, 1067462].</p> <p><u>Дослідження розподілу в тканинах in vivo (QWBA)</u></p> <p>Розподіл в тканинах після однократного перорального введення (5 мг/кг) і однократного внутрішньовенного введення (2 мг/кг) ¹⁴C-рисдипламу самцям-альбіносам і частково пігментованим щурам вивчався за допомогою кількісної авторадіографії всього тіла [Звіт №1065260]. Тканинами, в яких була виявлена найвища концентрація протягом усього періоду дослідження (168 годин), були навколоушна залоза, залоза крайньої плоті, позаорбітальна слюзна залоза, інтраорбітальна слюзна залоза, наднирники (кіркова та мозкова речовина), слинні залози, мейбомієва залоза, бульбоуретральна залоза і щитоподібна залоза. Тканини, які мали невелику експозицію радіоактивності, включали мозок (співвідношення мозок:плазма крові = 1), спинний мозок, білий жир, шерсть і кристалик ока. У пігментованих щурів вищий рівень радіоактивності вимірювався в пігментованій шкірі порівняно з непігментованою шкірою. Високий рівень радіоактивності асоціювався з увеальним трактом/сітківкою у частково пігментованих щурів, однак рівень був низьким у щурів-альбіносів.</p> <p><u>Проникнення через плаценту (QWBA)</u></p> <p>Проникнення через плаценту аналізувалось шляхом вивчення рівня радіоактивності у вагітних самок щурів після однократного перорального введення ¹⁴C-рисдипламу. Радіоактивність проникала через плацентарний бар'єр, при цьому радіоактивний рівень був присутнім в кількісно вимірюваних рівнях у плода (і в окремих тканинах плода) через 30 хвилин та до 24 годин після введення. Рівень радіоактивності був меншим межі кількісного визначення у плода через 72 години [Звіт №1084364].</p>
4) метаболізм	<p><u>Метаболізм рисдипламу in vitro</u></p> <p><u>Метаболізм в гепатоцитах людини і мікросомах печінки</u></p> <p>Рисдиплам був відносно метаболічно стабільним при інкубуванні з мікросомами та гепатоцитами печінки людини, при цьому відповідно $\geq 89\%$ і $\geq 98\%$ вихідного лікарського засобу залишалося у незміненому вигляді після інкубації. Основною ділянкою біотрансформації був компонент піперазину. N-гідроксиметаболіт M1 був виявлений в мікросомах печінки і зразках гепатоцитів усіх видів. Усі інші метаболіти утворились в мікросомах печінки і гепатоцитах щонайменше 3 видів. Додаткові суттєві метаболіти не спостерігались після інкубування з мікросомами та гепатоцитами інших видів [Звіт №1062728].</p> <p><u>Метаболізм за допомогою рекомбінантно експресованих ферментів людини</u></p>

Тереза Борсесі
Dr. Teresa Borsesi

Інкубування неміченого і ^{14}C -рисдипламу із рекомбінантними ферментами СУР і FMO людини показало, що рисдиплам може метаболізуватись за допомогою як FMO1, так і FMO3, а також СУР 1A1, 2J2, 3A4 і 3A7. Множинні продукти окисного метаболізму утворювались у результаті дії кожного ферменту, при цьому ферменти FMO сприяють шляху N-окислення для утворення M1. M1 утворюється у результаті дії таких ферментів як FMO1 так і FMO3, а також СУР 1A1, 2J2 і 3A [Звіти № 1062728, 1066973, 1092235].

Дослідження хімічного інгібування в мікросомах печінки, нирок і кишечника людини

При мікросомальних інкубаціях метаболізм рисдипламу (10 мкМ) був найінтенсивнішим в печінці (24%), далі в нирках (9%) та кишечнику (2%). Таким чином метаболізм може відбуватись в печінці, нирках і кишечнику і при цьому очікується, що печінка є основним органом метаболічного кліренсу.

Дослідження хімічного інгібування продемонстрували, що ферменти FMO і СУР3A були основними ферментами, які здійснюють метаболізм рисдипламу [Звіти № 1066973, 1092235].

Вивчення залежності від віку власного кліренсу in vitro

Популяція зразків мікросом печінки людини від 39 окремих донорів, включаючи дітей, використовувалась для безпосереднього вивчення потенціальної вікової різниці у власному кліренсі. Збільшення інтенсивності метаболізму рисдипламу спостерігалось між віковими групами 0–6 місяців, 6 місяців–2 роки і 2–6 років [Звіт №1089229].

Ковалентне зв'язування

Ковалентне зв'язування рисдипламу вивчалось за допомогою ^{14}C -міченого рисдипламу в мікросомах печінки людини [Звіт №1066482]. Показник ковалентного зв'язування рисдипламу знаходився в низькому діапазоні (вихідне скориговане значення 59 пмоль/мг зменшилось до 20 пмоль/мг в присутності глутатіону).

Метаболізм M1 in vitro

Метаболіт M1 може метаболізуватися далі під впливом багатьох ферментів СУР і FMO, включаючи СУР 1A1, 2C8, 2C19, 2J2, 3A4 і FMO 1 та 3. З них СУР2J2, СУР3A4, FMO1 і FMO3 є найбільш активними [Звіт №1092235].

Метаболізм in vivo

Метаболізм in vivo у щурів та мавп

Пошукова ідентифікація метаболіту в плазмі крові щурів (дорослі та нестатевозрілі) та мавп після перорального введення неміченого рисдипламу свідчить про те, що вихідний препарат був основною циркулюючою речовиною, представляючи більше 84% в обох видів. M1, M6 і M7 були виявлені в плазмі крові мавп

Сергієв Віктор
Сергієв Микола М.В.

	<p>і M2, M3, M4 та M5 були виявлені у вигляді циркулюючих компонентів в слідовому рівні в обох видів [Звіт №1062728].</p> <p>Подальше характеризування метаболіту проводилось після введення ^{14}C-рисдипламу інтактним щурам та щурам з канюльованою жовчною протокою (BDC) [Звіт №1068338]. Найбільш поширеною асоційованою з препаратом речовиною в плазмі крові, фекаліях та сечі був незмінений лікарський засіб. Найбільш поширеним циркулюючим метаболітом був M1, представляючи 4% асоційованої з препаратом речовини в плазмі через 1 годину після перорального введення. В екскрементах незмінений вихідний лікарський засіб складав 50% перорально прийнятої дози, у той час як M5 був найбільш поширеним метаболітом, ідентифікованим в фекаліях та сечі.</p> <p>У щурів BDC після внутрішньовенного введення 19% дози виводилось із жовчю, а незмінений лікарський засіб склав 0,8% дози. В сечі були виявлені метаболіти, які утворились в результаті біотрансформації фрагментів піперазину та імідазопіридазину та кон'югації сульфатів. Жоден окремий метаболіт в сечі не становив більше 2% від дози. Результати у BDC після перорального введення були дуже подібними [Звіт №1068338].</p>
5) виведення	<p>Виведення після однократного перорального або внутрішньовенного введення ^{14}C-рисдипламу щурам вивчалось в двох окремих дослідженнях [Звіти № 1065260, 1068338]. Більшість сумарної введеної радіоактивності виводилась з фекаліями, при цьому з сечею виводилась набагато менша кількість. Після внутрішньовенного введення щурам BDC 19% дози виводилось з жовчю.</p> <p>Після введення неміченого рисдипламу щурам (внутрішньовенно або перорально) або яванським макакам (перорально) максимум 2,4% (щури) або менше 1% дози (мавпи), відповідно, виводилось в незміненому вигляді з сечею [Звіти №1065261, 1068338].</p> <p>Екскреція в молоко оцінювалась вивченням рівня радіоактивності в молоці та плазмі крові лактуючих самок щурів-альбіносів (дозування приблизно через 10 днів після пологів) після однократного перорального прийому ^{14}C-рисдипламу. Середнє співвідношення концентрації в молоці по відношенню до плазми становило від 1,2 до 3,5 із невеликою міжіндивідуальною варіабельністю. Період напіввиведення радіоактивності в молоці та плазмі крові становив 14 годин та 8 годин, відповідно [Звіт №1084368].</p>
б) фармакокінетичні взаємодії (доклінічні)	<p><u>Потенціал щодо впливу інших лікарських засобів на фармакокінетику рисдипламу</u></p>

Терешко Віктор
В. В. Мисюра

	<p>Висока проникність ридипламу свідчить про низький ризик впливу інших препаратів на ридиплам внаслідок лікарської взаємодії, обумовленої транспортерами.</p> <p><u>Потенціал щодо впливу ридипламу та М1 на фармакокінетику інших лікарських засобів</u></p> <p><i>Інгібіція (оборотна і TDI) та індукція CYP</i></p> <p>Ридиплам та його основний метаболіт М1 не інгібували (оборотна інгібіція або інгібіція, залежна від часу [TDI]) будь-який з випробовуваних ферментів CYP (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 і 2D6), за винятком CYP3A4.</p> <p>Ридиплам та його основний метаболіт М1 не індукували будь-який з випробовуваних ферментів CYP (1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 і 3A4) [Звіти № 1064537, 1069486, 1077033, 1090549, 1090966].</p> <p><i>Інгібіція транспортерів лікарських засобів</i></p> <p>Ридиплам і М1 не інгібували будь-які білки-транспортери лікарських засобів, що вивчались in vitro [Звіти № 1066927, 1067280, 1074124, 1081903, 1087637] за винятком наступного:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ридиплам є інгібітором OCT2, MATE1 та MATE2-K in vitro; - М1 є інгібітором BCRP та MATE1 in vitro. <p>На підставі системної та місцевої концентрацій ридипламу та М1 єдиними очікуваними клінічно значимими ризиками взаємодії з іншими лікарськими засобами через вплив на транспортери пов'язані з інгібіцією ридипламом MATE1 та MATE2-K.</p> <p>Таким чином, на підставі даних, отриманих in vitro, не можна виключити потенціалу щодо взаємодії ридипламу або М1 при одночасному застосуванні з іншими лікарськими засобами, які є субстратами або інгібіторами CYP3A4 або субстратами ниркових транспортерів MATE1 та MATE2-K.</p>
7) інші фармакокінетичні дослідження	<p>Фармакокінетичний профіль ридипламу вивчався після багатократного перорального введення протягом 10 днів (0,25 мг/кг/день) у самок яванських макак. Протягом періоду дозування не спостерігалось залежного від часу кліренсу. Експозиція збільшувалась лише незначно при коефіцієнті накопичення до 2,5 [Звіт №1059567].</p> <p><u>Фармакокінетика/токсикокінетика/метаболізм у нестатевозрілих щурів</u></p> <p>Фармакокінетичний профіль ридипламу вивчався у щурів до і після відлучення від грудного годування, починаючи з 4 дня після народження і порівнювався з таким у дорослих в фармакокінетичних та токсикологічних дослідженнях однократної дози. Загальна експозиція ридипламу збільшилася релевантно (з 4 по 14 день після народження), вірогідно через накопичення у результаті більш повільного виведення ($t_{1/2}$ 15 і 20 годин в 4 і 12 дні після народження), і після цього зменшувалась</p>

Терешка Віктор
Доктор-Томасов Т.В.

на 31 день після народження до загальної AUC, подібної до такої, що спостерігалась на 4 день після народження.

Загальна експозиція на 31 день після народження співпадала з експозицією у інших дорослих щурів. У потомства на 4 та 12 день після народження ризидиплам також продемонстрував відстрочений t_{max} (7 годин) у порівнянні з щурами на 31 день після народження та дорослими щурами (3 години) [Звіти № 1063098, 1064408, 1065114, 1066709, 1088815].

Вільна фракція в плазмі крові щурів сильно залежала від віку і характеризувалась високою міжіндивідуальною варіабельністю.

Пошукова ідентифікація метаболіту в плазмі крові щурів продемонструвала, що метаболічний профіль суттєво не відрізнявся у нестатевозрілих щурів (вивчався один окремо взятий момент часу) у порівнянні з дорослими щурами. Відсоток вихідної молекули в зразках плазми крові був дещо меншим у нестатевозрілих щурів на 10 день після народження (88%) у порівнянні з дорослими щурами (>98%) [Звіт №1062728]. В 4-тижневому дослідженні ювенільної токсичності співвідношення M1 до вихідного лікарського засобу становило 32% на 4 день після народження, 19% – на 12 день після народження і 24% – на 31 день після народження [Звіт №1088815].

Експозиція людини після перорального прийому ризидипламу була прогнозована за допомогою фармакокінетичної моделі, оснований на фізіології (PBPK) із використанням програмного забезпечення Gastro Plus версії 8.6 [Звіт №1066664]. На підставі отриманих *in vitro* та *in vivo* доклінічних даних було прогнозовано, що ризидиплам буде добре всмоктуватись у людини (>90%), демонструвати досить повільний метаболізм ($t_{1/2}$ в плазмі крові в діапазоні 10–70 годин) із значним розподілом в тканинах (V_{ss} в діапазоні від 2,56 до 5,32 л·кг⁻¹). Очікувалось, що фармакокінетичний профіль буде лінійним у людини, оскільки нелінійні процеси не були ідентифіковані.

З метою прогнозування ефективної дози у людини для ризидипламу була застосована фармакокінетично-фармакодинамічна модель, розроблена раніше для молекули аналогічного хімічного класу з таким самим механізмом дії (RO6885247). Дана модель була валідована на основі даних, отриманих у здорових добровольців та пацієнтів із СМА. В цій моделі вважалось, що лише незв'язаний (вільний) лікарський засіб в плазмі крові є фармакологічно активним. Цей фармакологічно активний лікарський засіб збільшував рівні повнорозмірної мРНК SMN2 в тканинах, що призвело до збільшення рівня білка SMN у відповідних тканинах.

Параметр моделі EC₅₀ описує концентрацію, яка забезпечує половину максимального збільшення рівня повнорозмірної мРНК SMN2 *in vivo*. *In vitro* експериментально визначена EC₅₀

Тереза Вірсс
Доктор-хімік Т.В.

	для ридипламу була в діапазоні від 2,53 до 11,5 нг/мл [Звіт №1066984], відповідно до спостережень в цільній крові людини та фібробластах людини.
4. Токсикологія:	
1) токсичність у разі одноразового введення	Спеціальні дослідження вивчення токсичності у разі одноразового введення не проводились. Відповідно до ІСН МЗ(Р2) ознаки токсичності після одноразового введення оцінювались під час досліджень токсичності у разі повторних введень, зокрема в дослідженнях короткострокової тривалості лікування та високих доз.
2) токсичність у разі повторних введень	<p>Була виконана комплексна програма токсикологічних досліджень у разі повторних введень з метою оцінки профілю безпеки ридипламу. В усіх дослідженнях ридиплам вводився через шлунковий зонд, тобто подібно до планованого клінічного шляху введення. Подібно до форми випуску для людини, ридиплам давався у вигляді орального розчину, стабілізованого аскорбіновою кислотою, в усіх дослідженнях на тваринах.</p> <p>Були виконані наступні дослідження.</p> <p><u>Небазові дослідження</u></p> <p><i>Звіт №1061416: RO7021707 і RO7034067: 14-денне базове токсикологічне дослідження перорального (через зонд) введення у щурів з наступним 14-денним періодом без лікування.</i></p> <p>Вид/лінія: щури/Вістар Ганновер CrI:WI (Han).</p> <p>Дози: 0; 0,75; 2,5; 7,5 мг/кг/день один раз на день.</p> <p>Тривалість дозування: 2 тижні з наступним відновленням протягом 2 тижнів.</p> <p>Результати, що варті уваги:</p> <p>У дозі 7,5 мг/кг/день: у самців знижений приріст маси тіла на 19% і зменшення споживання їжі; мінімально підвищений апоптоз у криптах дванадцятипалої кишки, тонкої кишки, клубової кишки у самок.</p> <p>Аналіз експресії генів виявив сплайсінг транскриптів генів MADD, STRN3, APLP2 в селезінці, дванадцятипалій кишці та яечках.</p> <p>Не спостерігалось клінічних ознак, знахідок при оцінюванні офтальмоскопії, клінічної патології, маси органів, макропатології, а також знахідок після періоду відновлення. Транскрипти генів SMN1 і FOXM1 залишились незмінними.</p> <p>Рівень відсутності спостережуваних небажаних ефектів (NOAEL) для RO7021707 був ідентифікований як 30 мг/кг/день; для RO7034067 (ридиплам) був ідентифікований на рівні 7,5 мг/кг/день.</p> <p><i>Звіт №1061651: RO7021707 та RO7034067: дослідження токсичності максимальної переносимої дози з наступним 2-тижневим пероральним введенням (зонд) у мавп.</i></p> <p>Вид/лінія: макаки яванські.</p>

Тереза Вікенті
Dr. Teresa V. P.

Резюме та висновки: RO7021707 і RO7034067 (рисдиплам) застосовувались щоденно одній парі яванських макак для кожної випробовуваної речовини з метою вивчення максимальної переносимої дози. RO7021707 застосовувався в дозі 1,5, 5, 12 і 24 мг/кг/день протягом п'яти днів поспіль для кожного рівня дози, а RO7034067 подібним чином вивчався в дозі 1, 3, 10 і 20 мг/кг/день. RO7034067 перевищив максимальну толерантність при 20 мг/кг/день і для обох тварин було застосовано евтаназію передчасно після введення двох доз через надмірні клінічні ознаки та втрату ваги. Ефекти випробовуваної речовини також включали клінічні патологічні зміни і гістопатологічні зміни шкіри/підшкірної клітковини, повік, язика, шлунково-кишкового тракту, гортані і яєчок. RO7021707 переносився в усіх випробовуваних дозах.

Рисдиплам випробовувався в наступній фазі застосування в фіксованій дозі, в якій дози 0, 0,75, 1,5, 3 і 6 мг/кг/день застосовувались протягом 2 тижнів і переносились добре. При застосуванні дози 6 мг/кг/день спостерігались пов'язані з випробовуваною речовиною гістопатологічні зміни мінімальної тяжкості з боку шкіри/підшкірної клітковини, повік і порожньої кишки. Мікроскопічні ефекти не спостерігались при застосуванні дози 3 мг/кг/день, яка асоціювалась з показниками системної експозиції (AUC_{0-24h}) і C_{max} на 14 день у самців/самок відповідно 3130/6720 (нг•год)/мл і 378/604 нг/мл. Тому вважалось, що дози до 6 мг/кг/день вірогідно будуть мати добру переносимість в наступних дослідженнях у разі повторних введень.

Звіт №1073193: RO7034067: дослідження токсичності та токсикокінетики при 7-денному підборі діапазону доз у 001178-W (дикого типу) RasH2 мишей.

Вид/лінія: миші/RasH2

Дози: 0; 10; 20 (група 5); 30; 100 мг/кг/день.

Тривалість дозування: 7 днів, один раз на день, із наступним 14 денним відновленням.

Самці та самки RasH2 (дикого типу) мишей початково були розділені на чотири групи. Через знахідки в групах дозування 30 і 100 мг/кг/день 10 тварин із токсичністю/стать/групу були переведені в групу 5. Дозування в групі 5 було розпочате через 8 днів після початку в групах 1-4.

Результати, що варті уваги:

≥ 30 мг/кг/день: з дня 4 (у дозі 100 мг/кг/день) і дня 5 (у дозі 30 мг/кг/день) і в подальшому наступні клінічні спостереження: згорблений зовнішній вигляд, гіпоактивність, пілоерекція, атаксія, косоокість, холодне на дотик тіло, зелені виділення із статевих органів, несформований кал і/або груба шерсть, що корелювали зі зменшенням споживання їжі та втратою маси тіла.

*Тереза Вірніш
Дж.А. - масаж Т.В.*

Тварини в групах доз 100 і 30 мг/кг/день були убиті в дні 4 і 5, відповідно.

Клінічними патологічними ефектами були помітне зниження абсолютного числа ретикулоцитів без помітного зменшення маси еритроцитів, що свідчило про зменшення еритропоезу. Усі інші гематологічні та клінічні біохімічні зміни вважалися результатом стресу, зневоднення, і/або зменшення споживання їжі або маси тіла.

У тварин, які отримували ризидиплам в дозі ≤ 20 мг/кг/день, не спостерігалось зв'язаних з ризидипламом клінічних спостережень або змін маси тіла або споживання їжі. В жодній групі не спостерігалось пов'язаних з ризидипламом макроскопічних змін або змін маси органів.

В умовах цього дослідження максимальна переносима доза становила 20 мг/кг/день. Ця доза відповідала рівню експозиції (самці/самки на 7 день) C_{\max} 1760/1480 мкг/мл і AUC_{0-24h} 20000/22500 мкг•год/мл.

Базові дослідження

Звіт №1063584: RO7034067: 39-тижневе дослідження токсичності перорального введення (через зонд) в мавп із періодом без лікування протягом 22 тижнів.

Вид/лінія: Мавпи/яванські; початковий вік: 24–26 місяців.

Тривалість дозування: 39 тижнів.

Тривалість періоду після дозування: 22 тижні.

Добова доза (мг/кг): 0 (контроль); 1,5; 3; 7,5/5 (тварини в групі високої дози отримували 7,5 мг/кг/день в період з 1 по 12 день. Після періоду без лікування в дні 13–25 дозування відновили в дозі 5 мг/кг/день, починаючи з 26 дня).

Висновок: введення ризидипламу яванським мавпам протягом 39 тижнів асоціювалось в основному з клінічними ознаками з боку шкіри тварин, яким вводили дозу 7,5/5 мг/кг/день, що корелювало з мікроскопічними змінами без несприятливого ефекту у вигляді епідермальної гіперплазії. Окрім того, пов'язані з дозою у частоті та тяжкості функціональні (за результатами елетроретинограми [ЕРГ]) і морфологічні (злаякісна дегенерація сітківки) зміни в очах спостерігались у тварин, яким вводили дозу 3 або 7,5/5 мг/кг/день. Викликаний потенціал зорового нерва у відповідь на спалах підтримувався, що свідчить про неушкоджену проекцію аксонів гангліонарних клітин сітківки в таламус і кору головного мозку у тварин, які отримували високу дозу, незважаючи на дисфункцію сітківки, що спостерігалась за результатами ЕРГ і sdOCT. Тимус (без несприятливого ефекту) самок, яким вводили дозу 7,5/5 мг/кг/день, також був ідентифікований як мішень пов'язаних з випробовуваною речовиною гістопатологічних змін (атрофія тимусу, що

Александр Вісник
Dr. A. - Мисленко Т. В.

супроводжувалась зменшенням розміру тимусу і відносної маси).

В кінці 22-тижневого періоду відновлення дегенерація сітківки в області від середини до периферичної області сітківки була присутньою в очах самців та самок, які раніше отримували дозу 7,5/5 мг/кг/день, що свідчить про те, що під час періоду відновлення не було нормалізації пов'язаних з випробовуваною речовиною змін в очах. Однак вакуолізація внутрішнього ядерного шару вже не спостерігалась і амплітуди ЕРГ збільшились до кінця фази відновлення. Не спостерігалось пов'язаних з випробовуваною речовиною змін шкіри (включаючи шкіру повік) і тимусу тварин, яким раніше вводили дозу 7,5/5 мг/кг/день, що свідчить про повну оборотність пов'язаних з випробовуваною речовиною змін в цих тканинах.

NOAEL вважався на рівні 1,5 мг/кг/день, що відповідає системній експозиції ризидипламу 414/396 нг/мл (C_{max}) і 1870/2060 нг•год/мл (AUC_{0-24}) під час тижня 39 фази дозування у самців/самок.

Звіт №1064057: RO7034067: 4-тижневе дослідження токсичності перорального (через зонд) введення у щурів із 4-тижневим періодом без лікування.

Вид/лінія: щури/Вістар Ганновер Crl:WI (Han); початковий вік: 7 тижнів.

Тривалість дозування: 4 тижні.

Тривалість періоду після дозування: 4 тижні.

Дози: 0 (наповнювач), 1, 3 або 9 мг/кг/день один раз на день. Чотири додаткові групи отримували аналогічне дозування, і для них проводилась оцінка токсикокінетики.

10 самців були додатково включені в основну групу дозування 3 мг/кг/день для визначення рівня ризидипламу в плазмі крові, очах, мозку і шкірі.

Висновок: щоденне пероральне введення (через зонд) ризидипламу щурам Crl:WI (Han) у дозі 1, 3 і 9 мг/кг/день протягом щонайменше 4 тижнів загалом добре переносилось. При застосуванні дози 9 мг/кг/день спостерігалось зниження приросту маси тіла у обох статей, гістологічні зміни (без несприятливого ефекту) в тимусі, яєчках та шлунково-кишковому тракту, і виражене збільшення кількості мікроядерних еритроцитів в кістковому мозку. В умовах даного дослідження NOAEL вважався на рівні 3 мг/кг/день, при якому C_{max} і $AUC_{(0-24h)}$ на 28 день становили 584/684 нг/мл і 5450/5890 (нг•год)/мл для самців/самок, відповідно.

Звіт №1066289: RO7034067: дослідження токсичності 2-тижневого перорального (через зонд) застосування у мавп із 2-тижневим періодом без лікування.

Вид/лінія: Мавпи/яванські; початковий вік: 26–32 місяця.

*Тереза Віршич
Директор-Маскен Н.В.*

Тривалість дозування: 2 тижні.

Тривалість періоду після дозування: 2 тижні.

Дози: 0 (наповнювач), 2, 4 або 6 мг/кг/день один раз на день.

Висновок: введення ризидипламу яванським макакам у дозі 2, 4 або 6 мг/кг/день протягом 2 тижнів в основному асоціювалось із клінічними знахідками з боку шкіри в дозі 6 мг/кг/день, які корелювали із несприятливими мікроскопічними знахідками, такими як паракератоз, запалення, ерозії/виразки та гіперплазія епідермісу. Окрім того, мішенями пов'язаних із випробовуваною речовиною гістопатологічних змін також були гортань у дозі 4 або 6 мг/кг/день (несприятливі у дозі 6 мг/кг/день), тимус у дозі 6 мг/кг/день (без несприятливого впливу) і яєчка у дозі 6 мг/кг/день (несприятливий вплив); наявність пов'язаних із випробовуваною речовиною знахідок в яєчках у самців при застосуванні дози 4 мг/кг/день і їх оборотність неможливо оцінити через статеву незрілість. Анатомічні знахідки з боку шкіри, гортані і тимусу показали повну оборотність. В умовах даного дослідження показник NOAEL вважався на рівні 2 мг/кг/день, що відповідає системній експозиції RO7034067 345 нг/мл (C_{max}) і 2550 нг•год/мл (AUC_{0-24}) на 14 день поєднано для обох статей.

Звіт №1067365: дослідження токсичності 26-тижневого перорального застосування (через зонд) RO7034067 у щурів-альбіносів із наступним 8-тижневим періодом відновлення.

Вид/лінія: щури/Вістар Ганновер Crl:WI (Han); початковий вік: 7 тижнів

Дози: 1, 3, 7,5 мг/кг/день один раз на день.

Тривалість дозування: 26 тижнів.

Тривалість періоду після дозування: 8 тижнів.

Висновок: найвища доза 7,5 мг/кг/день призводила до передчасної смерті, несприятливих клінічних ознак і меншого середнього приросту маси тіла через мікроскопічні зміни в кишковому тракті та кістковому мозку. Пов'язані із застосуванням ризидипламу несприятливі мікроскопічні зміни були виявлені в яєчках при дозі ≥ 3 мг/кг/день, і в придатку яєчка одного самця при дозі 7,5 мг/кг/день. Пов'язані із застосуванням випробовуваної речовини ефекти (без несприятливого впливу) спостерігались в епітелії шлунково-кишкового тракту (в обох статей у дозі 7,5 мг/кг/день, лише самці у дозі 3 мг/кг/день), твердому піднебінні (в обох статей у дозі 7,5 мг/кг/день), підшлунковій залозі (самки у дозі ≥ 3 мг/кг/день і самці у дозі ≥ 1 мг/кг/день) і молочних залозах (лише самці у дозі 7,5 мг/кг/день); в тимусі (в обох статей у дозі 7,5 мг/кг/день), в статевих шляхах у самок в дозі ≥ 3 мг/кг/день; а також в наднирниках (в обох статей у дозі ≥ 1 мг/кг/день). Після 8-тижневого періоду відновлення зміни повністю зникли, за винятком наявності

Терешко Віктор

Директор - Максим Д.В.

пігментації кори наднирників ліпофусцином/цереїдом і змін в яєчках у дозі ≥ 1 мг/кг/день і в дозі 7,5 мг/кг/день, відповідно, для яких спостерігалось часткове відновлення. На основі знахідок в яєчках показник NOAEL був на рівні 1 мг/кг/день у самців, із асоційованою експозицією (день 182) C_{max} : 203 нг/мл і AUC_{0-24} : 2200 год•нг/мл. У самок був встановлений показник NOAEL на рівні 3 мг/кг/день (день 182: C_{max} : 768 нг/мл, AUC_{0-24} : 8830 год•нг/мл) на основі клінічних ефектів і смертності при застосуванні дози 7,5 мг/кг/день. Спостерігали деякі випадки ранньої смерті у дозі 7,5 мг/кг/день із гематологічними змінами та змінами з боку шлунково-кишкового тракту, що свідчать про те, що висока доза перевищує максимальну переносиму дозу (MTD).

Звіт №1067962: дослідження ретинопатії при 26-тижневому пероральному застосуванні (через зонд) RO7034067 і RO6885247 у пігментованих щурів.

Вид/лінія: щури/коричневі норвезькі; початковий вік: 8,5 тижнів.

Дози: 0 (референтна речовина);

- RO7034067 (рисдиплам) – 7,5/5 мг/кг/день (дозування 7,5 мг/кг/день було припинене на 47/46 день дослідження через тяжкі клінічні ознаки, а після періоду без лікування дозування було відновлене на 53/52 день дослідження в дозі 5 мг/кг/день);
- RO6885247 – 18 мг/кг/день.

Тривалість дозування: 26 тижнів.

Висновок: щоденне пероральне застосування рисдипламу щурам протягом періоду до 26 тижнів в дозах 7,5/5 мг/кг/день або RO6885247 в дозі 18 мг/кг/день протягом періоду до 26 тижнів не призвело до будь-яких ознак ретинопатії на основі результатів офтальмологічного огляду, ЕРГ, sd-OCT або гістопатологічного обстеження, при цьому рівноважний стан в судинній оболонці і сітківці був досягнутий до 13 тижня або раніше. Виявилось, що спостереження каламутного склоподібного тіла в області сітківки в очах тварин, які отримували випробовувану речовину, співпадали із знахідками в скловидному тілі при оптичній когерентній томографії.

Суттєва системна токсичність спостерігалась при застосуванні обох випробовуваних речовин. Застосування рисдипламу призводило до ранньої смерті через зменшення насиченості клітинами кісткового мозку у поєднанні із знахідками з боку кишечника; у тварин із запланованим умертвлінням спостерігалось зниження маси тіла і споживання їжі, зменшення маси еритроцитів, а також пігментація кори наднирників ліпофусцином/цереїдом на 26 тижні. Введення RO6885247 призводило до ранніх смертей через фосфоліпідоз легень; у тварин із запланованим умертвлінням спостерігалось зниження

Тереза Віршець

Доктор Вікторія В.В.

маси тіла і споживання їжі, зменшення маси еритроцитів, а також кератопатія на 13, 19 і 26 тижнях.

Звіт №1077199: RO7034067: дослідження токсичності та токсикокінетики у разі повторних введень при 4-тижневому пероральному застосуванні (через зонд) та пошуку діапазону доз RO7034067 у 001178-W RasH2 мишей (дикого типу).

Вид/лінія: миші/ RasH2 (001178-W [дикого типу], CByB6F1-Tg[HRAS]2Jic); початковий вік: 8 тижнів.

Дози (мг/кг/день): 0 (контроль); 3; 9; 20/16 (дозування було призупинене в дні 17–19 через надмірні ефекти дози 20 мг/кг/день, а потім відновлене на 20 день в дозі 16 мг/кг/день і продовжувалось протягом 14 днів).

Тривалість дозування: 28 днів.

Висновок: пов'язані із застосуванням випробовуваної речовини клінічні зміни спостерігались при дозі 20 мг/кг/день, наряду із зниженням маси тіла та споживання їжі. Клінічні спостереження у цих тварин включали згорблену позу, гіпоактивну поведінку, косоокість, пілоерекцію та/або нерегулярне дихання. Пов'язані із застосуванням випробовуваної речовини мікроскопічні зміни спостерігались в шлунково-кишковому тракті та в кістковому мозку (дегенерація епітелію слизової оболонки кишечника і зменшення насиченості клітинами кісткового мозку в грудині та стегні). Клінічні патологічні зміни при застосуванні дози 20 мг/кг/день ймовірно корелюють з мікроскопічними змінами в кишечнику та кістковому мозку. Подібні зміни не спостерігались у тварин, які вижили та отримували дозу 16 мг/кг/день, яка вважалась NOAEL. Це свідчить не лише про стрімке зростання співвідношення доза-токсичність, а також і про повне відновлення тварин, яким раніше вводили дозу 20 мг/кг/день. Цей рівень дозування асоціювався з системною експозицією (день 29 фази дозування) і відповідав показникам C_{max} і AUC 1350/1230 нг/мл і 21200/15100 нг•год/мл RO7034067, відповідно, у самців/самок і 277/314 нг/мл і 2550/3210 нг•год/мл RO7112063 (M1), відповідно, у самців/самок.

Звіт №1076595: RO7034067: попереднє дослідження токсичності максимальної переносимої пероральної дози (через зонд) RO7034067 у кроликів.

Вид/лінія: новозеландські білі кролики.

Дози: 0 (референтна речовина); 3; 8; 16 мг/кг/день.

Тривалість дозування: 8 днів.

Результати, що варті уваги: Не спостерігалось жодних пов'язаних із застосуванням ризидипламу ефектів на клінічний стан або проявів макропатології. Однак спостерігалось виражене зменшення споживання їжі при дозі 16 мг/кг/день і залежна від дози втрата ваги при застосуванні усіх рівнів дози (зниження на

*Терешко Віктор
Директор Інституту Т. В.*

	<p>2,6%, 4,6% і 6,5% при застосуванні доз 3, 8 і 16 мг/кг/день протягом дослідження, відповідно), які не вважалися несприятливими через їх низьку величину.</p> <p>Висновок: в умовах даного дослідження максимальна переносима доза ризидипламу є близькою до 16 мг/кг і вважається перевищенням у вагітних самок кроликів при тривалішому дозуванні. Ця доза забезпечує середню загальну C_{max} 7270 нг/мл і середню загальну AUC_{0-24h} 71300 год•нг/мл для ризидипламу і 172 нг/мл і 1530 год•нг/мл, відповідно, для М1 після повторного дозування.</p>
<p>3) генотоксичність: in vitro</p>	<p>Проба Еймса, виконана в умовах належної виробничої практики (GLP) із застосуванням очищеної серії ризидипламу, що представляє комерційний спосіб синтезу, продемонструвала відсутність мутагенності для бактерій [Звіт №1063901]. За даними експерименту, який проводився із застосуванням відповідного розчинника (аскорбінова кислота/тіосульфатний буфер) і випробовуваної речовини належної чистоти, можна зробити висновок, що ні власне ризидиплам, ні жоден з його метаболітів, утворених за допомогою системи метаболічної активації, не є мутагенними в пробі Еймса.</p> <p>Ризидиплам збільшував частоту виявлення мікроядер в клітинах мишачої лімфоми L5178Y в найменшій спостережуваній ефективній концентрації близько 10 мкг/мл [Звіт №1063026]. Максимальний ефект спостерігався після витримки протягом 24 годин з періодом відновлення 24 години в концентрації 20 мкг/мл і асоціювався з вираженою цитотоксичністю.</p> <p>Для характеризувати ефектів, що спостерігались in vitro, з більшою ретельністю, на клітинних лініях були виконані подальші механістичні дослідження [Звіт №1066849]. Дослідження виконувались на лімфобластній клітинній лінії ТК6 людини і в мишачій клітинній лінії лімфоми L5178Y. Отримані результати, зокрема в ТК6 клітинах людини, виключають прямий ДНК-реактивний, кластогенний механізм дії в концентраціях, сумісних з виживаністю клітини, і вказують на опосередкований не націлений на ДНК механізм (можливо анеугенний) індукції ризидипламом мікроядер в культивованих клітинах ссавців.</p>
<p>in vivo (включаючи додаткову оцінку з токсикокінетики)</p>	<p>В двох комбінованих дослідженнях безпосередніх ефектів препарату методами ДНК-комет та молекулярної нанотехнології (MNT) у щурів при застосуванні низьких доз до 1,5 мг/кг [Звіт №1059949] і доз до 25 мг/кг [Звіт №1063368], тканини печінки та порожньої кишки аналізувались на присутність розриву ниток ДНК методом ДНК-комет додатково до MNT із застосуванням кісткового мозку. Неможливо виявити розрив ниток ДНК при дозуванні, яке чітко асоціювалось із збільшенням числа мікроядерних еритроцитів. Застосування найвищої дози 25 мг/кг</p>

Терешко Віктор
Директор

	<p>тричі протягом 48 годин призводило до збільшення числа еритроцитів, які містять мікроядра, що асоціювалось з ознаками токсичності для кісткового мозку (зменшення співвідношення поліхромні еритроцити/нормохромні еритроцити), однак при застосуванні доз 6 і 12,5 мг/кг/день збільшення частоти мікроядер не асоціювалось з ознаками токсичності. В дозі 3 мг/кг/день не спостерігався вплив на частоту мікроядерних поліхромних еритроцитів.</p> <p>Окрім того, дослідження мікроядер були об'єднані з 4-тижневим дослідженням токсичності у щурів [Звіт №1064057] і 13-тижневим дослідженням токсичності у нестатевозрілих щурів [Звіт №1065114]. В цих дослідженнях риздиклам збільшував частоту мікроядерних поліхромних еритроцитів сублінійно, залежно від дози, при цьому доза 3 мг/кг/день була критичною дозою, при якій слабкий ефект починав спостерігатись в 4-тижневому дослідженні у самок і в 13-тижневому дослідженні ювенільної токсичності, в яких збільшення частоти мікроядерних поліхромних еритроцитів спостерігалось при дозі 7,5 мг/кг/день.</p> <p>В комплексному статистичному підході [Звіт №1069153] на основі даних щодо мікроядер в окремих тварин з досліджень молекулярної нанотехнології були побудовані графіки по відношенню до AUC_{0-24} і проаналізовані за допомогою програмного забезпечення PROAST із орієнтовною дозою (BMD) та ступенем критичного ефекту (CES) 50%. Загальна найнижча (найбільш консервативна) орієнтовна доза для індукції риздикламом мікроядер в поліхромних еритроцитах щурів становила 4570 нг*год/мл (AUC_{0-24h}) і 438 нг/мл (C_{max}). Ці значення були отримані в 4-тижневому дослідженні у дорослих щурів і в дослідженні безпосередніх ефектів препарату у дорослих самців щурів, відповідно.</p> <p>Найбільш консервативним 90% нижнім довірчим інтервалом орієнтовної дози (так званий BMDL) вважається 2915 нг*год/мл (AUC_{0-24h}) і 236 нг/мл (C_{max}). Обидва значення були розраховані з даних, отриманих в дослідженні безпосередніх ефектів препарату у дорослих самців щурів.</p>
4) канцерогенність:	
довгострокові дослідження	<p>Для оцінки канцерогенного потенціалу було виконане 26-тижневе дослідження канцерогенного потенціалу риздикламу [Звіт №1081793]. Самкам і самцям мишей RasH2 вводили контрольний розчинник; контрольну воду; або 1, 3 або 9 мг/кг/дозу риздикламу через оральний зонд один раз на день протягом 26 тижнів. У тварин, яким вводили до 9 мг/кг/день, не спостерігались пов'язаних із випробовуваною речовиною клінічних спостережень, порушень приросту маси тіла або споживання їжі, відмінностей у виживаності, гематологічних</p>

Тереза Віршич
Доктор - Максим Н. В.

	показниках, частоті злякисних новоутворень, частоті макроскопічних змін або частоті чи тяжкості мікроскопічних змін. Таким чином, NOEL становить 9 мг/кг/день. Ця доза відповідає середнім значенням C_{max} і AUC 1230 нг/мл і 15600 нг•год/мл, відповідно, у самців та 1150 нг/мл і 11800 нг•год/мл, відповідно, у самок в день 179 фази дозування.
короткострокові дослідження або дослідження середньої тривалості	-
додаткові дослідження	-
5) репродуктивна токсичність та токсичний вплив на розвиток потомства:	
вплив на фертильність і ранній ембріональний розвиток	Оцінка фертильності включена в дослідження токсичності у нестатевозрілих щурів.
ембріотоксичність	<p>Рисдиплам вивчався на предмет впливу на ембріофетальний розвиток у щурів та кроликів. Дослідження з пошуку діапазону доз в обох видів проводились для вибору рівня дози для подальших основних досліджень.</p> <p>В дослідженні з пошуку діапазону доз та впливу на ембріофетальний розвиток [Звіт №1080127] рисдиплам вводився вагітним самкам щурів Вістар Ганновер (CrI:WI[Han]) один раз на день шляхом орального зонда в період з 6 до 17 дня гестації в дозі 1, 3 і 7,5 мг/кг/день. При застосуванні дози 7,5 мг/кг/день спостерігалась незначна токсична дія на материнський організм, що характеризувалась зниженням приросту маси тіла (-13%) і зниженням споживання їжі (-18%). При застосуванні цієї дози також зменшувалась маса плода (-18%). При застосуванні менших доз несприятливі ефекти не спостерігались.</p> <p>В основному дослідженні впливу на ембріофетальний розвиток [Звіт №1084123], рисдиплам вводився вагітним самкам щурів Вістар Ганновер (CrI:WI[Han]) один раз на день шляхом орального зонду в період з 6 до 17 дня гестації в дозах 1, 3 і 7,5 мг/кг/день і призводив до незначної токсичної дії на материнський організм (без несприятливого впливу), що характеризувалась зниженням приросту маси тіла (-14%) і зниженням споживання їжі (-12% порівняно з контролем) в дозі 7,5 мг/кг/день. Затримка розвитку плода, що підтверджено меншою вагою плода (-15% порівняно з контролем) і незначна різниця в окостенінні скелета, спостерігалась при застосуванні дози 7,5 мг/кг/день. Не було виявлено ознак ембріофетальної смерті або порушення будови або структури плода (тератогенність). NOAEL для ембріофетальної токсичності для рисдипламу був 3 мг/кг/день, що відповідає C_{max} 319 нг/мл і AUC_{0-24h} 4630 нг•год/мл на 15 день гестації.</p> <p>В дослідженні з пошуку діапазону доз та впливу на ембріофетальний розвиток [Звіт №1080126] введення</p>

Тереза Вітні

Доктор - Анна Ві. В.

	<p>рисдипламу вагітним самкам новозеландських білих кроликів один раз на день через оральний зонд в період 6–19 днів гестації в дозі 12 мг/кг/день призводило до токсичної дії на материнський організм, що характеризується зниженням споживання їжі (-37%) і зменшенням маси тіла (середня вага -7% на 20 день гестації) або зниженням приросту маси тіла. При застосуванні цієї дози також спостерігалось збільшення ембріофетальної летальності. Чіткої токсичної дії на материнський організм не спостерігалось при застосуванні нижчих доз 3 і 6 мг/кг/день. Збільшення частоти плодів з вадами спостерігались в усіх групах застосування рисдипламу.</p> <p>В основному дослідженні впливу на ембріофетальний розвиток [Звіт №1084122] рисдиплам вводився вагітним самкам новозеландських білих кроликів в період з 6 по 19 день гестації в дозах 1, 4 і 12 мг/кг/день. Тяжка токсична дія на материнський організм спостерігалась при застосуванні дози 12 мг/кг/день, яка характеризувалась передчасним перериванням у 3 самок після тривалого періоду незначного або відсутнього споживання їжі (2 після абортів), зниженням споживання їжі (-28%) і втратою ваги (в середньому -120 г протягом періоду дозування у порівнянні з приростом ваги на 210 г в контрольних тварин). Також спостерігалось виражене збільшення частоти пізньої резорбції при застосуванні цієї дози. Впливу на масу плода не було. У 4 плодів (4%) з 4 приплодів (22%) була виявлена гідроцефалія при застосуванні дози 12 мг/кг/день. Зв'язок між частотою гідроцефалії і рисдипламом не можна не приймати до уваги, хоча при застосуванні цієї дози спостерігалась виражена токсична дія на материнський організм. Також при застосуванні дози 12 мг/кг/день спостерігалось збільшення частоти плодів з відсутніми додатковими дольками легень та маленьким жовчним міхуром. На підставі цих результатів NOAEL для токсичної дії на материнський організм та ембріофетальний розвиток становив 4 мг/кг/день (для рисдипламу: C_{max} 1500 нг/мл, AUC_{0-24h} 7990 нг•год/мл на 15 день гестації).</p>
<p>пренатальна і постнатальна токсичність</p>	<p>Вплив рисдипламу на пре- і постнатальний розвиток (PPND), включаючи розвиток ооцитів у самок, вивчався у щурів.</p> <p>В дослідженні з пошуку діапазону доз та впливу на пре- і постнатальний розвиток [Звіт №1085603] рисдиплам вводився один раз на день шляхом орального зонду самкам щурів Вістар Ганновер (Crl:WI[Han]) з 6 дня гестації по 6 день після пологів у дозі 1, 3 і 7,5 мг/кг/день. Для дози 7,5 мг/кг/день 3 із 6 самок було здійснено евтаназію на 23/24 день гестації через важкі пологи (дистоція) і одній самці евтаназію було здійснено на 1 день після пологів після повної втрати приплоду. Спостерігалось пов'язане з дозою збільшення тривалості періоду гестації при застосуванні препарату в дозі ≥ 3 мг/кг/день. Індекс живонародження при</p>

Терешко Віктор
Директор - Інститут Т. В.

	<p>застосуванні дози ≥ 3 мг/кг/день був менше ніж в контрольній групі, хоча кількість шрамів в місці імплантації була подібною в усіх групах.</p> <p>Розмір живого потомства при народженні при застосуванні дози ≤ 3 мг/кг/день і тривалість гестації та індекс живонародження при застосуванні дози 1 мг/кг/день були порівняльними з такими в контрольній групі. Усі живі дитинчата були зовні нормальними при народженні. Не було клінічно значимих пов'язаних з ризиком спостережень у дитинчат при застосуванні будь-якої дози. Вживаність дитинчат і середній приріст маси тіла в двох приплодах, що вижили, при застосуванні дози 7,5 мг/кг/день були помітно нижчими, ніж в контролі. При плановому розтині у самиць було відзначено темне забарвлення надниркових залоз при застосуванні дози ≥ 3 мг/кг/день. Не було клінічно значимих пов'язаних з ризиком спостережень у самок, що вижили до запланованої евтаназії; ризиком не впливав на масу тіла та споживання їжі самок під час гестації і лактації. NOAEL за результатами цього дослідження, розрахований як 3 мг/кг/день, можливо асоціюється з подовженням тривалості періоду гестації.</p> <p>В основному дослідженні впливу на пре- і постнатальний розвиток [Звіт №1088289], ризиком вводився вагітним самкам щурів Вістар Ганновер Crl:WI (Han) з 6 дня після коїтусу по 20 день лактації у дозах 0,75, 1,5 і 3 мг/кг/день. При застосуванні усіх доз не спостерігалось токсичної дії на материнський організм. Середня тривалість періоду гестації була дещо подовженою при застосуванні в дозі 3 мг/кг/день, однак усі самки знаходились в діапазоні показників паралельного контролю. Це співпадає з попереднім пошуковим дослідженням дози при застосуванні тієї ж дози.</p> <p>Не спостерігалось несприятливого впливу на вживаність, ріст і функціональну (поведінкову або репродуктивну) характеристику потомства. Не було впливу на репродуктивну функцію потомства F1 самців і самок. Не було відмічено несприятливого впливу на кількість первинних фолікулів яєчників та гістопатологію яєчників у самок F1. NOAEL для впливу на материнський організм генерації F0 або потомство вважався на рівні 3 мг/кг/день (AUC_{0-24} 4230 нг*год/мл), найвищої випробовуваної дози в цьому дослідженні.</p>
дослідження, при яких препарат вводиться потомству (нестатевозрілим тваринам) та/або оцінюється віддалена дія	Цілями 4-тижневого дослідження з пошуку діапазону доз [Звіт №1063098] було надати попередню оцінку ефектам ризиком і визначити його потенційну токсичність при щоденному пероральному застосуванні через зонд протягом 4 тижнів у щурів лінії Вістар з постнатального дня 4 або протягом 2 тижнів з дня 22.

Тереза Вішняк
Dr. T. Wisniewska

Доза: 0; 2,5; 5; 10 мг/кг/день. Через смертність при застосуванні доз 5 і 10 мг/кг/дозу в дослідження була додана додаткова група дитинчат із дозуванням по 3,75 мг/кг/дозу з метою оцінки потенційної токсичності та впливу ризидипламу на дитинчат протягом дозування в період до відлучення. Оскільки смерті також виникали при дозуванні 3,75 мг/кг/день, дозування 1, 3 і 9 мг/кг/день додатковим тваринам також здійснювалось з 22 по 36 постнатальний день з метою оцінити вплив на виживаність тварин в період після відлучення.

Результати, що варті уваги:

- $\geq 3,75$ мг/кг/день:

Смертність: 8,3%, 50% і 100% основного дослідження дитинчат при застосуванні доз 3,75, 5 і 10 мг/кг/день, відповідно.

Клінічні ознаки: зниження апетиту, тремор, холод на дотик, худорлявість, слабкість, зневоднення, порожній шлунок, здуття живота і/або блідість шкіри. Птоз, виступаючий хребетний стовп, аномальна хода або розтягнення живота лише при дозуванні 3,5 мг/кг/день.

Втрата маси тіла / менший приріст маси тіла починаючи з 6 постнатального дня. Менше споживання їжі (після відлучення) в дозі 3,75 мг/кг/день.

Зміни в гематологічних параметрах при дозуванні 3,75 і 5 мг/кг/день свідчать про повну мієлосупресію усіх клітинних ростків.

- 10 мг/кг/день:

Мікроскопічні зміни (окремі дитинчата): некроз криптальних клітин кишечника і крововилив у стравохід, шлунок і мозок.

NOAEL: 2,5 мг/кг/день для введення на 4–31 постнатальний день; 9 мг/кг/день (після відлучення, 22–36 постнатальний день).

Експозиція ризидипламу стосовно AUC_{0-24h} при застосуванні доз 2,5 і 3,75 мг/кг/день була 0,7- або 0,5-кратною на 4 постнатальний день у порівнянні з 31 постнатальним днем, відповідно. На підставі обмежених отриманих даних експозиція стосовно AUC_{0-24h} загалом зростала вдвічі в період з 22 по 36 постнатальний день у самок при застосуванні доз 1 і 3 мг/кг/день після повторного дозування.

Оскільки в дослідженні з пошуку діапазону доз у щурів спостерігалась значна відмінність в переносимості між фазами до і після відлучення, базові дослідження токсичності у нестатевозрілих щурів проводились в двох частинах, до відлучення і після відлучення. Дослідження до відлучення початково проводилось лише із застосуванням двох доз (1 і 2,5 мг/кг/день) та не виявило NOAEL. Тому було виконане друге дослідження застосування трьох доз (0,75; 1,5 і 2,5 мг/кг/день) на 4–31 постнатальний день.

Александр Вільямс
Dr. Alexander W. V.

В першому 4-тижневому дослідженні у нестатевозрілих щурів до відлучення [Звіт №1066709] застосування найвищої дози 2,5 мг/кг/день призвело до зменшення споживання їжі і меншого приросту маси тіла, що корелювало із зниженим ростом довгих кісток і відстроченим відділенням крайньої плоти у самців. У самців спостерігалась оборотна дегенерація сперматогенного епітелію при застосуванні дози ≥ 1 мг/кг/день. На підставі мікроскопічних змін яєчок при застосуванні дози 1 і 2,5 мг/кг/день не спостерігалось дози NOAEL у самців. NOAEL у самок становив 2,5 мг/кг/день.

В другому 4-тижневому дослідженні токсичності [Звіт №1088815], щоденне пероральне введення ризидипламу нестатевозрілим щурам з 4 по 31 пренатальний день призвело до зниження приросту маси тіла, зменшення довжини кісток і затримки статевого дозрівання самців при застосуванні дози $\geq 1,5$ мг/кг/день та зниження споживання їжі лише у самців при застосуванні дози 2,5 мг/кг/день. У самців спостерігалось пов'язане з ризидипламом оборотне мінімальне зменшення числа лімфоцитів при застосуванні дози 2,5 мг/кг/день, зменшення маси яєчок і придатків яєчка при застосуванні дози $\geq 1,5$ мг/кг/день, що персистували протягом 8-тижневого періоду без введення лікарського засобу, а також оборотні несприятливі дегенеративні мікроскопічні зміни в яєчках при застосуванні дози 2,5 мг/кг/день.

На основі зниження маси тіла більше ніж на 10% і присутність мікроскопічних змін в яєчках при застосуванні дози 2,5 мг/кг/день було зроблено загальний висновок, що доза 1,5 мг/кг/день є NOAEL. Це відповідає середньому AUC_{0-24h} на рівні 1570 нг•год/мл для самців і 1880 нг•год/мл для самок для ризидипламу на 31 постанатальний день.

В 13-тижневому дослідженні токсичності [Звіт №1065114] ризидиплам при щоденному пероральному введенні через зонд нестатевозрілим щурам у дозі 1, 3, або 7,5 мг/кг/день з 22 по 112 постанатальний день спричиняв мікроскопічні зміни в кишечнику самців і самок та репродуктивних органах самців у дозі 7,5 мг/кг/день.

Ці зміни були повністю оборотними за винятком змін в яєчках, де мікроскопічні зміни були лише частково оборотними. Окрім того, відмічався вплив на чисельність сперматозоїдів, їх рухливість та морфологію в кінці періоду спарювання у дозі 7,5 мг/кг/день. Також спостерігались ознаки пов'язаної з ризидипламом генотоксичної активності у самців та самок при застосуванні в дозі 7,5 мг/кг/день. Показник NOAEL вважався на рівні 3 мг/кг/день (AUC 7160 і 7830 год•нг/мл, і C_{max} 759 і 725 нг/мл; самці та самки, відповідно).

Александр Вершин

В. В. Мисюк

6) місцева переносимість	Рисдиплам є лікарським засобом для перорального прийому. Оцінка місцевої шлунково-кишкової переносимості була частиною дослідження повторних введень.
7) додаткові дослідження токсичності:	
антигенність (утворення антитіл)	-
імунотоксичність	Кінцеві точки з охарактеризування типу імунних клітин та їх функції у відповідь на лікування рисдипламом були інтегровані в дослідження токсичності у разі повторних введень у нестатевозрілих щурів.
дослідження механізмів дії	<p>Рисдиплам є низькомолекулярним модифікатором сплайсингу SMN2 для перорального застосування, розробленим для лікування СМА. Рисдиплам модулює сплайсинг SMN2 з метою змістити баланс із виключення екзона 7 на включення екзона 7 в транскрипт мРНК, збільшуючи таким чином експресію повнорозмірного білка SMN з гена SMN2 в дозозалежний спосіб. Вважається, що отримане в результаті цього збільшення функціонального білка SMN компенсує дефіцит цього білка у пацієнтів із СМА. Великі зусилля були докладені під час розробки рисдипламу з метою збільшити специфічність рисдипламу, зокрема стосовно взаємодії з альтернативним сплайсингом SMN2 у порівнянні зі сплайсингом інших альтернативних мРНК. Дослідження безпеки у тварин та дослідження механізму дії, проведені під час розробки рисдипламу, дозволили ідентифікувати вторинні мішені рисдипламу стосовно сплайсингу і оцінити їх значення та вплив на безпеку у людини.</p> <p>Як частина міжвидової оцінки безпеки чотири модифікатори сплайсингу SMN2, включаючи рисдиплам, вивчались <i>in vitro</i> на предмет співвідношення концентрація-ефект на маркери РНК (варіанти транскриптів FOXM1B/C) щодо фармакології вторинного сплайсингу в індукованих плюрипотентних стовбурових клітинах (iPSC) у людини та яванських макак [Звіт №1067264]. Усі чотири сполуки також вивчались на предмет їх впливу на прогресію клітинного циклу. Після застосування випробовуваних речовин протягом 24 годин від 0,64 нМ до ~10 мкМ усі компоненти, окрім RO7112063 (метаболіт рисдипламу), продемонстрували залежну від концентрації пригнічуючу регуляцію варіантів транскрипту FOXM1B/C в клітинах людини та мавп. RO6885241 і рисдиплам були найбільш сильнодіючими сполуками, що впливають на рівень експресії FOXM1B/C. В індукованих плюрипотентних стовбурових клітинах пацієнтів людини RO6885241 і рисдиплам індукували термінацію клітинного циклу в S-фазі залежним від концентрації шляхом.</p>
лікарська залежність	-

Терешко Віктор
Dr. A. Masak S. B.

токсичність метаболітів	<p>RO7112063 є основним циркулюючим метаболітом (M1) ридипламу у людини, що складає більше 10% (діапазон: 10–40%) вихідного лікарського засобу в рівноважному стані. Експозиція M1 у людини визначена в усіх токсикологічних дослідженнях (токсичність у разі повторних введень, ювенільна токсичність, генотоксичність, канцерогенність, репродуктивна токсичність) у відповідних NOAEL.</p>
токсичність домішок	<p>Основні дослідження токсичності ридипламу були проведені із застосуванням серій, вироблених шляхом синтезу згідно реєстраційного досьє. Специфікації для домішок (окремі та загалом) відповідають ICH Q3A(R2). Жодні з домішок у відповідних реєстраційних серіях не перевищують рівень кваліфікації, зазначений в ICH Q3A. Таким чином, жодні окремі домішки не перевищували рівень токсикологічної кваліфікації ($\geq 0,15\%$) і тому не є необхідним проводити специфічні додаткові дослідження токсичності щодо домішок.</p> <p>Була виконана токсикологічна оцінка допоміжних речовин у складі форми лікарської форми для перорального застосування (Ro703-4067/F12) у дітей [Звіт №1077240]. Ro703-4067/F12 представляє низьку дозу 0,25 мг/мл ридипламу, яка планується до застосування у новонароджених, немовлят та дітей молодшого віку.</p> <p>Загалом, на підставі наявних даних, заплановане застосування оральних лікарських форм Ro703-4067/F12 і Ro703-4067/F13 вважається прийнятним з токсикологічного погляду, навіть за найгірших сценаріїв для запланованого застосування в усіх вікових групах (тобто найвища доза 0,21 мг/кг із застосуванням низького дозування 0,25 мг/мл до обмежуючого дозу об'єму 5 мл).</p> <p>Особливий ризик для немовлят через вміст бензоату натрію (ризик жовтяниці і пов'язані наслідки) вважається дуже низьким і прийнятним на підставі дуже низької дози бензоату натрію за пропонуванних умов використання.</p> <p>Слід враховувати загальну кількість проносних допоміжних речовин в оральній лікарській формі Ro703-4067/F12 (два поліюли, ізомальт 801, D-маніт і ПЕГ) разом з іншими проносними речовинами з інших потенційних джерел. Тим не менше, потенційний проносний ефект можна клінічно відстежувати і, як правило, він не вважається заборону для застосування Ro703-4067/F12.</p> <p>Ro703-4067/F12 несе ризик непереносимості деяких цукрів (зокрема, непереносимості фруктози людиною, спадкова непереносимість фруктози) і, отже, має містити попередження, оскільки є імовірність його використання трохи вище передбачуваного порогу 5 мг маніту/кг/день у пацієнтів з непереносимістю фруктози людиною.</p>

Державний лікарський
Доктор Максим Ю.В.

інше

Фототоксичність

Потенціал ридипламу спричиняти фототоксичність вивчався в тесті зв'язування нейтрального червоного клітинами 3Т3 в концентрації до 9000 нг/мл [Звіт № 1063018]. Випробовувана речовина не відповідає критеріям позитивного результату тесту в випробовуваній концентрації із найвищою концентрацією, обмеженою розчинністю. Тому потенціал ридипламу спричиняти фототоксичність вважається низьким. Спектр УФ абсорбції основного метаболіту М1 у людини вважається ідентичним спектру ридипламу. Таким чином, М1 не вивчався на предмет фототоксичності через те, що не очікується зміна ризику фототоксичності у результаті експозиції М1 у людини у порівнянні власне з ридипламом.

Не очікується впливу можливої УФ абсорбції на токсичність ридипламу для сітківки через те, що сітківка не піддається впливу хвилям з довжиною менше ~400 нм. Не очікується фототоксичного потенціалу ридипламу при видимому діапазоні вище 400 нм.

Токсичність для очей in vitro (клітинні культури RPE)

Ридиплам і RO6885247 вивчались на лінії пігментних епітеліальних клітин людини (ARPE19) на предмет функціонального порушення [Звіти № 1066985, 1066986]. Обробка клітин протягом 24 годин і довше призводила до збільшення лізосомальних мас в нецитотоксичних концентраціях (із максимальними ефектами при 3,13 і 6,25 мг/мл), що свідчить про порушення функції лізосом, у той час як рівень фагоцитозу та оксидативного стресу в клітинах ARPE19 залишився незмінним в цей момент часу. Також спостерігалось накопичення аутофагосом, залучених в усунення пошкоджених органел, яке було показано для обох сполук через 48 годин введення. Залишається невідомим, яким чином ці короткострокові зміни in vitro пов'язані з відстроченою токсичністю для сітківки, яка спостерігалась механістично in vivo.

Оцінка локальних лімфатичних вузлів

У мишей була виконана оцінка локальних лімфатичних вузлів з метою проаналізувати подразнення шкіри (еритему) і сенсibilізацію після нашкірної (на вуха) або оральної індукційної експозиції [Звіт №1087553]. Не було описано сенсibilізації або подразнення при застосуванні ридипламу після трансдермального впливу найвищої дози, що представляє клінічну форму випуску для людини при 1-5-кратних дозуваннях, або за допомогою шлункового зонда для дози, що представляє очікувану терапевтичну експозицію у людини протягом 3 днів поспіль та/чи з наступним пероральним або дермальним застосуванням.

Тереза Вірша
Dr. - Марина М. В.

5. Висновки щодо доклінічного вивчення

Були поглиблено вивчені доклінічна фармакологія, фармакокінетика і профіль безпеки ридипламу.

Фармакологічна активність ридипламу стосовно модифікації сплайсингу екзона 7 SMN2 збільшення рівня білка SMN була продемонстрована в різноманітних системах *in vitro* та *ex vivo*. Цей ефект в подальшому був підтверджений в мишачих моделях СМА. Збільшення рівня білка SMN супроводжувалось значною ефективністю при мишачій моделі СМА-подібного SMN Δ 7 захворювання 1 типу.

Ридиплам має виражену специфічність щодо сплайсингу екзона 7 SMN2, однак також діє на ряд вторинних мішеней сплайсингу, які всі мають одну і ту ж ділянку сплайсингу 5'. Найбільш значимими вторинними цілями сплайсингу для ридипламу при відповідній експозиції були STRN3, FOXM1, MADD, APLP2 і SLC25A17 мРНК, з яких FOXM1 і MADD були ідентифіковані як вірогідні причини спостережуваної токсичності через їх роль в клітинному циклі та апоптозі.

Відповідні взаємодії рецепторів були виявлені для ридипламу і його основного метаболіту М1 лише для COX1 і COX2 та для ацетилхолінестерази. Ці взаємодії не асоціювались із будь-якими знахідками з боку можливих органів-мішеней в токсикологічних дослідженнях *in vivo*. Однак не можна виключити зв'язок інгібування COX1/COX2 із затримкою пологів, що спостерігалась в дослідженнях пренатального і постнатального розвитку у щурів при експозиції, що вдвічі перевищує клінічну експозицію.

Ридиплам вільно розподіляється з крові в ЦНС та різноманітні периферичні тканини у тварин, включаючи м'язи. У відповідності до фармакокінетичних властивостей ридипламу спостерігалось паралельне залежне від дози збільшення рівня білка SMN в ЦНС і м'язовій тканині в двох мишачих моделях СМА після застосування ридипламу.

На відміну від нестатевозрілих тварин, ридиплам продемонстрував подібне зв'язування білка в зразках плазми крові людей різного віку від народження до дорослого віку (особи без СМА та пацієнти із СМА 1, 2, і 3 типу). Отже, не очікуються суттєві відмінності у переносимості через пов'язану з віком зміну зв'язування з білком плазми крові у дітей із СМА.

Не відмічалось клінічно значимої лікарської взаємодії у вигляді впливу інших препаратів на ридиплам. На підставі досліджень *in vitro* не можна виключити потенційний вплив ридипламу на одночасно застосовувані лікарські засоби, які є субстратами ниркових транспортерів MATE1 і MATE2-K.

Загалом токсикологічні знахідки можна згрупувати на дві окремі категорії в залежності від тривалості лікування ридипламом, необхідної для індукції цих ефектів:

Тереза Вірссі

Доктор Іванов Т. В.

	<p>- дегенерація сітківки, яка виникає після тривалого застосування і механізм якої повністю не зрозумілий;</p> <p>- небажані ефекти, пов'язані з вторинними мішенями сплайсингу, що виникають при гострому/підгострому дозуванні і включають ефекти з боку органів із швидким клітинним метаболізмом і тератогенні ефекти (індукція мікроядер в клітинних лініях мишей <i>in vitro</i> і в еритроцитах кісток у щурів; зміни в епітелії і власній пластинці шлунково-кишкового тракту та епітелії екзокринної частини підшлункової залози у мишей, щурів і/чи мавп; паракератоз/гіперплазія/дегенерація шкіри і епітелію гортані із супутнім запаленням у мавп; дегенерація гоноцитів в яєчках мавп та щурів; гематологічні зміни (еритроцити та лейкоцити) із патогістологічними змінами в кістковому мозку і/чи тимусі у мишей, щурів та мавп). Вплив ризидипламу на гоноцити самців узгоджується із змінами, що спостерігались у мавп при застосуванні інших модифікаторів сплайсингу SMN2, і тому може бути описаний як можливий клас-специфічний ефект.</p> <p>Ризидиплам не має мутагенної дії в бактеріальних тестах і не було ознак первинного пошкодження ДНК <i>in vivo</i> після застосування ризидипламу. Дані, отримані в механістичних дослідженнях, надають чітке підтвердження опосередкованого механізму індукції мікроядер <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> із впливом на клітинний цикл та апоптоз.</p> <p>Не були отримані підтвердження онкогенного впливу ризидипламу.</p> <p>Дослідження із застосуванням міченого радіоактивним ізотопом ризидипламу у вагітних і лактуючих самок щурів свідчать про те, що ризидиплам може проникати через плацентарний бар'єр у вагітних жінок і може екскретуватись в молоко у жінок, які годують груддю.</p> <p>Повний пакет досліджень фармакології безпеки <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> не продемонстрував наявності будь-яких ефектів ризидипламу на функції серцево-судинної системи, ЦНС або респіраторної системи.</p>
--	---

Заявник (власник реєстраційного посвідчення)

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд

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

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

Тереза Віршич
Доктор Каталіна Рохас