

Звіт про доклінічні дослідження

1. Назва лікарського засобу (за наявності - номер реєстраційного посвідчення):	Літфуло (Litfulo)
1) тип лікарського засобу, за яким проводилася або планується реєстрація	Лікарський засіб за повним досьє (автономне досьє), нова діюча речовина
2) проведені дослідження	так ні якщо ні, обґрунтувати
2. Фармакологія:	
1) первинна фармакодинаміка	<p>1. Фармакодинаміка <i>in vitro</i></p> <p>1.1. Активність і селективність виділеного ферменту Інгібіторну активність ритлечитинібу щодо 4 ізоформ янус-кінази (JAK) визначали за допомогою аналізу зміни рухливості Каліпера (дослідження PF-06651600_19May14_184021). Ритлечитиніб був потужним інгібітором JAK3 з коефіцієнтом селективності більше за 293 порівняно з JAK1, JAK2 і TYK2 згідно зі значеннями $IC_{50} > 9710$, $> 10\ 000$, $33,1$ і $> 10\ 000$ нМ для JAK1, JAK2, JAK3 і TYK2 відповідно за умови додавання 1 мМ АТФ. Селективність ритлечитинібу щодо кіному також оцінювали за допомогою панелі з 305 кіназ на панелі Invitrogen, де кожному кіназу тестували в присутності концентрації АТФ, близької до значення K_m (дослідження PF-06651600_21May14_151236). Застосування ритлечитинібу в концентрації 1 мМ інгібує JAK3 і кінази родини ТЕС з високим ступенем селективності в кіномі людини.</p> <p>Циркулюючий метаболіт, PF-07034562 (M2), також оцінювали на активність щодо JAK1, JAK2, JAK3 та кіназ родини TYK2 і ТЕС (дослідження PF-06651600_28Jan21_123643). Ритлечитиніб не виявив потужного інгібування щодо JAK1 (> 9890 нМ), ані щодо JAK2, JAK3, TYK2, VMX, BTK, ITK, ТЕС і ТХК ($> 10\ 000$ нМ) при 1 мМ концентрації АТФ, а тому вважався фармакологічно неактивним.</p> <p>1.2. Кінетика ковалентної модифікації JAK3 та інших кіназ за допомогою ритлечитинібу Кінетику ковалентної інактивації JAK3 ритлечитинібом (через зв'язування ритлечитинібу з Cys909), а також панелі інших кіназ (BTK, BLK, VMX, ITK, ТЕС, ТХК, SLK, FGR та FLT3) вивчали в дослідженнях кінетики інгібування ферментів (дослідження PF-06651600_19May14_184157). Тільки деякі з випробуваних альтернативних кіназ, що мають цистеїн у положенні Н10 в АТФ-зв'язувальній кишені, а саме JAK3(Cys909) і кінази родини ТЕС, піддавалися ковалентній інактивації ритлечитинібом. Кінази, які містили цистеїн в АТФ-зв'язувальній кишені в іншому місці, лише слабо інгібувалися ритлечитинібом, і не було виявлено жодних ковалентних модифікацій. Загальна активність ритлечитинібу визначається співвідношенням k_{inact}/K_i для 3 кіназ (VMX, ITK і ТХК) і показує, що селективність ритлечитинібу щодо JAK3 кінетично зумовлена оптимізацією загального процесу інактивації. Порівняно швидкий перебіг етапу інактивації відповідно до k_{inact} відображає сприятливу орієнтацію акриламідної групи ритлечитинібу з тіловою групою JAK3 Cys909 у</p>

нековалентному комплексі кіназа-інгібітор, попри відносно слабку константу дисоціації ($K_i \geq 6300$ нМ) цього комплексу.

Профіль інгібування кінази після щоденного введення 50 мг ритлечитинібу оцінювали в людини на основі параметрів k_{inact} і K_i *in vitro*, популяційної змодельованої фармакокінетики ритлечитинібу за осередкової алопеції у стаціонарному стані (PMAR-1157) і швидкості оновлення ферменту, якщо такі дані були доступні для JAK3 (3,5 год, Telliez et al, 2016), ВТК (12 год, Saffran et al, 1994) і ІТК (1,8 год, Harling et al, 2013). Профіль інгібування JAK3, ВТК і ІТК змінюється протягом дня і не є повним, майже нічим не відрізняється від варіабельного інгібування, що спостерігається під час застосування звичайних оборотних інгібіторів JAK (Dowty et al, 2014).

1.3. Реакція ритлечитинібу з альбуміном сироватки людини

Ритлечитиніб продемонстрував низьку схильність до реакції з альбуміном сироватки людини (HSA) без утворення аддукта, що піддається виявленню, після 3 год інкубації при температурі 37 °С з 300 мкМ HSA і 320 мкМ ритлечитинібом. За тих самих умов, але після 22 год інкубації було виявлено лише незначне утворення аддукта (дослідження PF-06651600_09Sep14_101033).

1.4. Активність у МКПК і CD34+ клітинах-попередниках людини

Ритлечитиніб інгібував JAK1/JAK3-залежний pSTAT5 через інтерлейкін (IL)-15 з IC_{50} 51,7 нМ, JAK1/ТҮК2-залежний pSTAT3 через ІФН α і IL-10 з IC_{50} 12 100 і > 60 000 нМ відповідно, а також JAK1/JAK2/ТҮК2-залежний pSTAT3 через IL-27 з IC_{50} 17 800 нМ у лімфоцитах, отриманих за допомогою проточної цитометрії з мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) людини (дослідження PF-06651600_19May14_184605). У CD34⁺ клітинах-попередниках ритлечитиніб не інгібував еритропоетин (ЕПО)-залежний pSTAT5 під час випробування в концентраціях до 20 000 нМ.

1.5. Активність у клітинах цільної крові людини

У лімфоцитах, отриманих за допомогою проточної цитометрії з цільної крові людини, ритлечитиніб інгібував JAK1/3-залежні pSTAT5 і pSTAT3 через IL-15 і IL-21 відповідно зі значеннями IC_{50} 198 і 362 нМ відповідно (дослідження PF-06651600_19May14_184417). Ритлечитиніб не інгібував JAK1/ТҮК2-залежний pSTAT3 через ІФН α і IL-10 або JAK1/JAK2/ТҮК2-залежний pSTAT3 через IL-27 у CD3⁺ лімфоцитах або моноцитах (значення IC_{50} > 60 000 нМ), JAK2/ТҮК2-залежний pSTAT3 через IL-23 і pSTAT4 через IL-12, JAK1/JAK2-залежний pSTAT1 через ІФН γ , JAK1/JAK2/ТҮК2-залежний pSTAT1 або pSTAT3 через IL-6, або ЕПО-залежний pSTAT5 у лімфоцитах, моноцитах або CD34⁺ клітинах-попередниках, відповідно до значень IC_{50} > 20 000 нМ.

Крім того, активність ритлечитинібу *in vitro* визначали щодо сигнальних шляхів JAK у цільній крові шурів і собак для оцінювання трансляції інгібування JAK3 ритлечитинібом у видів тварин, які використовувалися в доклінічних дослідженнях фармакології та токсичності (дослідження PF-06651600_28Sep20_102317). Активність препарату в цільній крові продемонструвала, що відносна ефективність інгібування передачі сигналів цитокінів була подібною в людини, шура та собаки стосовно передачі сигналів IL-15 і IL-21.

1.6. Індуковане ЛПС вироблення цитокінів у моноцитах і макрофагах людини

У первинних макрофагах людини селективне інгібування JAK3 ритлецитинібом зберігало функцію IL-10 у моделі *in vitro* стимульованих ліпополісахаридом (ЛПС) макрофагів, які походять із моноцитів людини, водночас селективне інгібування JAK1 за допомогою PF-02384554 та інгібування JAK1/JAK2/JAK3 за допомогою тофацитинібу блокувало функцію IL-10 у цій моделі (дослідження PF-06651600_19May14_185220). У відповідь на ЛПС у макрофагах спостерігали підвищення рівнів IL-1 β , IL-6 і фактора некрозу пухлини- α (ФНП α) з підвищенням концентрації селективних до JAK1 інгібіторів або інгібіторів JAK1/JAK3, водночас за тих самих умов експерименту на ці рівні прозапальних цитокінів не впливало селективне інгібування JAK3 при застосуванні ритлецитинібу. Важливо зазначити, що додавання нейтралізуючих антитіл до IL-10 до культур з ритлецитинібом, або PF-02384554, або тофацитинібом призвело до значущого підвищення рівнів вироблення IL-1 β , IL-6 і ФНП α у всіх випадках, демонструючи залежність IL-10 від інгібування вироблення цих цитокінів у відповідь на ЛПС.

1.7. Передача сигналів ФНП і IL-1 β в макрофагах людини, примованих IL-27

Селективне інгібування JAK3 за допомогою ритлецитинібу не призвело до інгібування функції IL-27 у стимульованих ФНП α та IL-1 β макрофагах людини до 20 мкМ, тоді як селективне інгібування JAK1 за допомогою PF-02384554 інгібувало функцію IL-27 у стимульованих ФНП α та IL-1 β макрофагах людини за 10 та 20 мкМ (дослідження PF-06651600_19May14_185307). IL-27 послаблював транскрипцію IL-8, індуковану ФНП α і IL-1 β , при цьому підвищуючи рівень мРНК SOCS1, а попереднє оброблення макрофагів людини IL-27 індукувало як утворення мРНК PD-L1, так і його поверхневу експресію після стимуляції ФНП α . На послаблення IL-27 транскрипту IL-8 або індукцію транскрипту SOCS1, транскрипту PD-L1 або поверхневу експресію PD-L1 не впливало селективне інгібування JAK3 ритлецитинібом, але його дія змінювалася на протилежну під час селективного інгібування JAK1. Ці дані свідчать про передачу сигналів IL-27 за участю JAK1/JAK2 або в комбінації з TYK2 і незалежно від JAK3.

1.8. Диференціація Th1, Th17 і В-клітин людини

Ритлецитиніб ефективно інгібував вироблення ІФН γ і IL-17A у клітинах Th1 і Th17 відповідно та блокував вироблення IgG у CD19⁺ В-клітинах, стимульованих IL-21 і лігандом CD40 (дослідження PF-06651600_27May14_044630).

1.9. Опосередковане BCR і TCR підвищення експресії та функціональна активність CD69 та у МКПК та CD8⁺ Т-клітинах людини

Було продемонстровано, що перехресне зв'язування BCR ініціює внутрішньоклітинний каскад передачі сигналів, що сприяє підвищенню експресії CD69 у В-клітинах (Kurosaki, 2011), яка залежить від ВТК, члена родини TEC, інгібованого PF-06651600. Аналогічним чином, активація TCR призводить до підвищення експресії CD69 в Т-клітинах (Ziegler et al, 1994). Отже, клітинну активність ритлецитинібу щодо ВТК і ІТК (обидві кінази є членами родини TEC), важливих кіназ у шляхах передачі сигналів BCR і TCR, досліджували за допомогою вимірювання підвищення рівня експресії CD69 у виділених лейкоцитах людини через перехресне зв'язування BCR і TCR. Ритлецитиніб пригнічував індуковане BCR і TCR підвищення експресії CD69 зі значеннями IC₅₀ 344 і 380 нМ відповідно, що

вказує на те, що ритлечитиніб інгібує ВТК і ІТК у клітинних умовах (дослідження PF-06651600_12Mar18_023747).

1.10. Функціональна активність НК і CD8+ Т-клітин людини

Вплив ритлечитинібу на функціональну цитолітичну активність субпопуляцій НК і CD8+ Т-клітин після активації МКПК людини *in vitro* оцінювали в аналізі, що вимірює залежну від активації модуляцію цитотоксичного гранулярного білка CD107a щодо клітинної мембрани, а також в аналізі, що вимірює внутрішньоклітинне накопичення ІФНγ (дослідження PF-06651600_12Mar18_011358). Оброблення МКПК ритлечитинібом у різних концентраціях перед стимуляцією пригнічувало поверхневу модуляцію CD107a в НК і CD8+ Т-клітинах зі значеннями IC₅₀ 509 і 210 нМ відповідно. Внутрішньоклітинна продукція ФНПγ інгібувалася зі значенням IC₅₀ 188 нМ в обох типах клітин. Ці показники для НК і CD8+ Т-клітин є ІТК-залежними.

1.11. Фосфорилування STAT, індуковане ІЛ-4, ІЛ-13, ІК-22 та ІК-31, у клітинних аналізах

Інгібіторний ефект ритлечитинібу оцінювали на різних типах клітин, які були стимульовані цитокінами, залежними від кіназ родини JAK (дослідження PF-06700841_13Apr16_090414). ІЛ-4 ініціює передачу сигналів через один із двох різних рецепторних комплексів: JAK1/JAK3-залежний рецептор I типу, що експресується на гемопоетичних клітинах, або JAK1/JAK2/ГҮК2-залежний (JAK3-незалежний) рецептор II типу, що експресується переважно на негемопоетичних клітинах (Wills-Karp and Finkelman, 2008). Активація рецепторів I або II типу призводить до фосфорилування STAT6. У Т-і В-клітинах цільної крові людини ритлечитиніб інгібував ІЛ-4-індукований pSTAT6 зі значеннями IC₅₀ 226 і 1000 нМ відповідно. У клітинах лінії ТНР-1, моноцитарної клітинної лінії людини, після попереднього оброблення ІФНγ ритлечитиніб інгібував pSTAT3, індукований ІЛ-31, шляхом передачі сигналів, опосередкованої JAK1/JAK2, з IC₅₀ 4400 нМ. В інших оцінюваних клітинах — лінії НТ-29, первинних кератиноцитах і первинних епітеліальних клітинах кишечника — ритлечитиніб не інгібував індукований ІЛ-4 або ІЛ-13 pSTAT6 шляхом передачі сигналів через JAK1/JAK2/ГҮК2, або індукований ІЛ-22 pSTAT3 шляхом передачі сигналів через JAK1/ГҮК2 відповідно до значень IC₅₀ > 20 000 нМ.

1.12. Ступінь зв'язування кіназ родин JAK3 і ТЕС у лізаті МКПК людини

Ступінь зв'язування кіназ родин JAK3 і ТЕС ритлечитинібом кількісно вимірювали в лізаті МКПК людини. Ритлечитиніб досяг ОС₅₀ при концентрації 73 нМ щодо JAK3 і від 58 до 176 нМ щодо членів родини кіназ ТЕС; це дає змогу припустити, що PF-06651600 має подібну ковалентно-зв'язувальну активність щодо JAK3 та членів родини кіназ ТЕС у культурах клітин у цих експериментальних умовах (дослідження PF-06651600_12Mar18_023828).

1.13. Гомологія послідовностей каталітичних доменів кіназ родин JAK3 і ТЕС

Було проведено порівняння білкових послідовностей JAK3 і кіназ родини ТЕС людини (включно з ТХК, ІТК, ВМХ і ВТК) з відповідними ортологічними послідовностями собак і щурів (Telliez JB, 2018). Домен кінази JAK3 продемонстрував 94 % ідентичності між людиною та собакою та 87 % ідентичності між людиною та щуром. Домени кіназ ВТК і ВМХ продемонстрували 99 % і 95 % ідентичності між людиною та собакою

відповідно, і 98 % і 94 % ідентичності між людиною та щуром відповідно. Домени кіназ ІТК і ТЕС продемонстрували 96 % ідентичності між людиною та собакою та 97 % ідентичності між людиною та щуром. Домен кінази ТХК продемонстрував 89 % ідентичності між людиною та собакою та 87 % ідентичності між людиною та щуром. Такі високі рівні збереження амінокислотних послідовностей для JAK3 і кінази родини ТЕС між людиною, собакою та щуром дають змогу припустити, що зв'язувальні властивості будуть висококонсервативними в різних видів організмів.

1.14. Передача сигналів ТПО та ІЛ-6 в клітинах-попередниках мегакаріоцитів

У клітинах-попередниках мегакаріоцитів людини тромбopoетин (ТПО)-індукований pSTAT5 та ІЛ-6-індукований pSTAT3, два JAK-залежні шляхи, які, як було продемонстровано, відіграють важливу роль у тромбopoезі (Kaser, et al 2001), не інгібувалися ритлечитинібом (значення $IC_{50} > 20\ 000$ нМ) (дослідження CP-690550_11Sep19_094745). Крім того, ритлечитиніб не пригнічував ріст CD34+ клітин-попередників, які диференціюються в клітини-попередники мегакаріоцитів за участю ІЛ-6 ($IC_{50} > 20\ 000$ нМ). Клінічна значущість цієї інформації невідома.

1.15. Кліренс ТПО тромбоцитами людини

Ритлечитиніб продемонстрував мінімальну активність щодо кліренсу ТПО тромбоцитами людини, опосередкованого зв'язуванням рецептора MPL з JAK2 (Drachman et al, 1995), зі значенням $IC_{50} > 20\ 000$ нМ (дослідження CP-690550_29May19_033455). Щодо інгібування активності кінази JAK2, відсутність інгібування опосередкованого тромбоцитами кліренсу ТПО корелює зі значенням IC_{50} ритлечитинібу $> 10\ 000$ нМ (дослідження PF-06651600_19May14_184021). Показово, що потужніші інгібітори JAK2, які оцінювалися в цьому експерименті (барицитиніб і тофацитиніб), продемонстрували вплив на кліренс не більш як 10 %; це дає змогу припустити, що 90 % кліренсу ТПО, що відбувається у спосіб інтерналізації тромбоцитами, не залежить від інгібування JAK2.

2. Фармакодинаміка *in vivo*

Фармакологічну активність ритлечитинібу *in vivo* оцінювали на моделях ад'ювант-індукованого артриту (AIA), запальних захворювань кишечника (ЗЗК), експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) й вогнищевої алопеції (ВА) у тварин. Ці моделі забезпечили розуміння механізмів дії щодо окремих аспектів процесів запальних та аутоімунних захворювань; однак застосовність до клінічної ефективності в людини залишається незрозумілою.

2.1. Ефективність у моделі ад'ювант-індукованого артриту в щурів

Модель AIA в щурів забезпечує надійні засоби оцінювання протизапальної ефективності потенційних терапевтичних засобів, про що свідчить інгібування кінази родини JAK тофацитинібом, інгібітором JAK1/3, що призводить до сповільнення прогресування захворювання та патологічних змін у цій моделі (LaBranche, 2012). Профіль фармакокінетики (ФК)/фармакодинаміки (ФД) ритлечитинібу було встановлено в щурів, що раніше не отримували препарат, для оцінювання доз щодо терапевтичної ефективності в моделі AIA в щурів (дослідження PF-06651600_30Jun14_090652). Фармакокінетику та цільові модуляторні ефекти ритлечитинібу відстежували протягом 24 годин після перорального введення в дозах 6, 15 або 80 мг/кг. Усі дози ритлечитинібу інгібували

утворення pSTAT3 в діапазоні від > 80 % до 100 % у стимульованій ІЛ-21 цільній крові щурів за пікових концентрацій у плазмі крові.

Ефективність ритлецитинібу, яку оцінювали в терапевтичному режимі дозування за результатами трьох незалежних досліджень у дозах 3, 10 або 30 мг/кг, продемонструвала, що пероральне застосування один раз на добу призводило до значущого зменшення об'єму ураженої лапи в групах, які отримували дози 10 і 3 мг/кг. Порівняння ефективності ритлецитинібу при АІА в щурів для введення один або два рази на добу продемонструвало, що C_{av} є кращим фармакокінетичним предиктором протизапальної відповіді відповідно до EC_{av50} , яка була аналогічною для дозування один і два рази на добу.

2.2. Ефективність у моделях мишей хімічно-індукованого запального захворювання кишечника

Ефективність зменшення симптомів коліту оцінювали у двох широко застосовуваних хімічно-індукованих (за допомогою натрієвої солі сульфату декстрану (DSS) і тринітробензолсульфонові кислоти (TNBS)) моделях ЗЗК у мишей, де ритлецитиніб профілактично вводили перорально в різних дозах 2 р./добу (дослідження PF-06651600_05Jun14_181316). Порівняно з більш високими дозами, доза ритлецитинібу 10 мг/кг 2 р./добу сприяла зменшенню зниження маси тіла, активності захворювання, гістопатологічних параметрів тяжкості запалення в товстому кишечнику та експресії генів біомаркерів товстого кишечника. ІГХ аналіз продемонстрував зниження рівнів pSTAT3 та pSTAT5 у товстому кишечнику мишей, які отримували ритлецитиніб у дозах 10 та (або) 30 мг/кг. Аналізи цільової модуляції, проведені в зразках цільної крові під час цих досліджень, додатково підтвердили відповідний механізму дії ефект, за допомогою якого ритлецитиніб продемонстрував ефективність, селективно інгібуючи JAK3; усі дози ритлецитинібу знижували рівень pSTAT за умови стимуляції цитокінами зі спільним гамма-ланцюгом ІЛ-15 та ІЛ-21, не впливаючи водночас на фосфорилування STAT під час стимуляції ІЛ-10 чи ІЛ-27, що, як вважають, чинять захисну дію при ЗЗК.

У мишачій переносній моделі коліту ритлецитиніб, що вводився перорально в дозах 20 мг/кг і 60 мг/кг, продемонстрував поліпшення стану мишей в дні 27–31 без зміни маси тіла, маси/довжини товстого кишечника або гістопатологічних змін у товстому кишечнику (дослідження PF-0665100_15Jul14_100542). Експресія генів імунної або бар'єрної функції у зразках тканини товстої кишки тварин, яким вводили ритлецитиніб у дозі 60 мг/кг, продемонструвала підвищення експресії cd127, cldn10, prf1, il2 і klrk1 та зниження експресії foxp3, у той час як у групі, якій вводили препарат у дозі 20 мг/кг, спостерігали зниження експресії ltf, fizz1, il1b і foxp3. Жодної різниці в кількості клітин у мезентеріальних лімфатичних вузлах не спостерігали, але кількість регуляторних Т-клітин (CD4+Foxp3+) зменшувалася при введенні обох доз.

2.3. Ефективність в експериментальній моделі автоімунного енцефаломієліту в мишей

Модель розсіяного склерозу на мишах, ЕАЕ, широко використовується для оцінювання потенційних терапевтичних засобів через велику подібність із захворюванням людини. Клінічні ознаки охоплюють параліч, який корелює з мікроскопічними осередками запалення та демієлінізації ЦНС, спричиненими мієлін-специфічними CD4⁺ Т-клітинами. Ритлецитиніб, який вводили профілактично щоденно в дозах 20 і 60 мг/кг/дозу протягом 28 днів, ефективно затримував початок ЕАЕ та зменшував тяжкість

	<p>захворювання в дозозалежний спосіб, що вимірювалось за допомогою середніх максимальних показників (MMS), середніх клінічних показників, відсотка частоти виявлення ЕАЕ, медіанного дня початку захворювання, середньої зміни маси тіла наприкінці захворювання та параметрів патогістологічного дослідження спинного мозку на предмет нейрозапалення, нейродегенерації та демієлінізації (дослідження PF-06651600_20Oct15_085612). Ритлецитиніб, який вводили в терапевтичних дозах 30 і 100 мг/кг/дозу протягом 14 днів від дня початку ЕАЕ, продемонстрував стійку ефективність у зниженні тяжкості захворювання. Імуногістохімічний аналіз продемонстрував відповідний механізму дії ефект ритлецитинібу, який засвідчив зниження pSTAT1, pSTAT3 і pSTAT5 у спинному мозку мишей, які отримували ритлецитиніб.</p> <p>2.4. Ефективність лікування вогнищевої алопеції у мишачій моделі Системне введення ритлецитинібу в дозі 30 мг/кг через осмотичний насос ALZET мишам лінії C3H/HeJ зі шкірним трансплантатом упродовж 4 тижнів запобігало розвитку ВА, а у випадку введення дози упродовж 12 тижнів сприяло його зворотному розвитку АА (Dai et al, 2021). Вимірювання, проведені через 4 тижні лікування, продемонстрували зменшення запалення шкіри, спричиненого ВА, і зниження частоти та відсоткового вмісту CD8⁺ T_{EM}, а також NKG2D⁺CD8⁺ Т-клітин у дренаюючих лімфатичних вузлах шкіри (SDLN) (первинних місцях розвитку Т-клітин). Вимірювання, проведені після закінчення 12-тижневого курсу лікування мишей з алопецією, продемонстрували стійке відростання шерсті та значуще зниження абсолютної кількості та (або) частоти виявлення CD8⁺ T_{EM}, CD8⁺NKG2D⁺ Т-лімфоцитів, ІФНγ-продукуючих CD8⁺ Т-клітин у SDLN порівняно з контрольною групою. Після місцевого застосування протягом 12 тижнів ритлецитиніб стійко відновив ріст шерсті та суттєво зменшив кількість спричинених ВА інфільтратів CD8⁺, а також помітно знизив частоту інфільтратів CD45⁺ і CD8⁺ Т-ефекторів у шкірі. У сукупності ці дані демонструють, що блокада ритлецитинібом γс-цитокінової сигналізації або сигналізації, опосередкованої ТЕС-кіназою, пригнічує проліферацію та функцію Т-клітин, а також зменшує інфільтрацію ними шкіри, що призводить до зворотного розвитку ВА.</p>
2) вторинна фармакодинаміка	<p>1. Скринінг щодо профілю зв'язування лігандів <i>in vitro</i> (дослідження 100009194) Ритлецитиніб оцінювали на предмет позацільової фармакологічної активності щодо панелі рецепторів, іонних каналів, транспортерів і ферментів за допомогою скринінгу щодо широкого профілю лігандів Сереп у концентрації 10 мкМ. У цій концентрації ритлецитиніб не виявив активності в жодному з проведених аналізів (активність визначалась відповіддю > 50 % від максимальної інгібіторної відповіді), за винятком кінази Abl (IC₅₀ = 2800 нМ, кінази EGFR (IC₅₀ = 2200 нМ) і кінази VEGFR2 (IC₅₀ = 1300 нМ).</p> <p>2. Функціональний клітинний аналіз фосфорилування VEGFR2 (дослідження PF-06651600-00-0010 pVEGFR_6-1-2013) Функціональне подальше дослідження за допомогою клітинного аналізу фосфорилування VEGFR2 у клітинах лінії PAE-KDR не виявило інгібування у концентраціях ритлецитинібу до 30 мкМ.</p> <p>3. Скринінговий аналіз Z'-LYTE® на наявність Abl-кінази (дослідження 4647.31278)</p>

	<p>У подальшому дослідженні активність ритлецитинібу щодо Abl-кінази визначали за допомогою скринінгового аналізу Z'-LYTE® Screening Assay у присутності 1 мМ АТФ. Завдяки активності кінази Abl у присутності 1 мМ АТФ IC₅₀ для ритлецитинібу становила > 30 мкМ.</p> <p>4. Активність PF-06651600 в аналізі панелі селективності кіназ (дослідження PF-06651600_21May14_151236)</p> <p>Було проведено скринінг ритлецитинібу стосовно різноманітної групи протеїнкіназ із метою визначення селективності щодо інших кіназ. Активність ритлецитинібу щодо кіназ (304) у межах Invitrogen SelectScreen® Kinase Profiling Service визначали за допомогою комбінації скринінгового аналізу Z'-LYTE® (262; дослідження 4647_31278) та аналізу LanthaScreen® (52) (10 кіназних конструктів було випробувано в обох аналізах Z'-LYTE та LanthaScreen), де кожну кіназу випробовували за наявності концентрації АТФ, близької до значення K_m, або за концентрації 1 мМ АТФ. Панель кіназ було вибрано так, щоб різні родини кіназ були представлені у філогенетичному дереві кіному.</p> <p>За використання 1 мкМ ритлецитинібу тільки 12 кіназ, окрім JAK3, інгібувалися більш ніж на 50 %. Ці кінази, а також деякі інші були вибрані для визначення IC₅₀.</p> <p>Найнижчу IC₅₀, що спостерігалася за K_m для АТФ, було отримано для кінази VMX за 29 нМ, що забезпечує 83,8-кратне переважаєння селективності порівняно з IC₅₀ JAK3, яка дорівнювала 0,346 нМ та була вирахована за аналогічних умов (PF-06651600_19MAY14_184021).</p> <p>Кінази, відмінні від JAK3, які найбільш схильні до інгібування ритлецитинібом, належать до родини TEC (VMX, BTK, ITK, TEC і TXK), кожна з яких належить до групи з 11 кіназ у кіномі, які мають CYS у каталітичному домені в тому самому положенні, що й CYS 909 у JAK3. IC₅₀ для 5 TEC-кіназ становили 194, 592, 606, 608 і 8510 нМ для TXK, TEC, VMX, BTK і ITK відповідно, що відображає коефіцієнти селективності порівняно з JAK3 (IC₅₀ = 33,1 нМ за 1 мМ АТФ [PF-06651600_19MAY14_184021]), які становлять 5,9x, 17,9x, 18,2x, 18,3x і 257x відповідно.</p> <p>Коефіцієнти селективності для решти 5 CYS-вмісних кіназ становили 601x для BLK, 761x для HER4 і > 1511x для EGFR, HER2 і MAP2K7 на основі IC₅₀ 19 900 нМ, 25 200 нМ і > 50 000 нМ відповідно. Детальніша характеристика інгібування CYS-вмісних кіназ представлена в PF-06651600_19MAY14_184157.</p> <p>Ритлецитиніб є потужним інгібітором JAK3 з коефіцієнтом селективності > 300x щодо JAK1, JAK2 і TYK2 зі значеннями IC₅₀ 33,1 нМ для JAK3 і > 9710 нМ для JAK1 і > 10 000 нМ для JAK2 і TYK2 за 1 мМ АТФ. Ритлецитиніб також тестували зі значеннями K_m для АТФ до кожного ферменту з IC₅₀ 1640 нМ, 1510 нМ, 0,346 нМ і 3780 нМ для JAK1, JAK2, JAK3 і TYK2 відповідно.</p>
3) фармакологія безпеки	<p>1. Нейрофункціональне оцінювання й оцінювання легеневої функції в самців щурів (дослідження 14GR139)</p> <p>Ритлецитиніб вводили одноразово перорально самцям щурів через шлунковий зонд (6 особин/групу дозування) у дозі 0 (0,5 % метилцелюлози), 75, 175 або 400 мг/кг. Об'єм дози становив 10 мл/кг.</p>

Нейрофункціональне оцінювання проводили на 24 тваринах (6 щурів/групу дозування), воно охоплювало функціональне обстеження, оцінювання температури тіла та кількісне 30-хвилинне оцінювання рухової активності, та здійснювалося приблизно через 1 год після введення дози, на підставі T_{max} через 1 год, отриманого в 14-денному пошуковому дослідженні токсичності в самців щурів (13MA039). Оцінювання легеневої функції проводили в окремій групі з 24 (6 щурів/групу дозування) тварин, які отримували ті самі дози. Дихальний об'єм, частоту дихання та хвилинний об'єм оцінювали за допомогою плетизмографії всього тіла протягом 240 хвилин після введення дози препарату. Дані про дихальну функцію усереднювалися за 12 послідовними часовими інтервалами після введення дози тривалістю 20 хвилин.

Не було виявлено впливу ритлечитинібу на середню силу захоплення передньою лапою, температуру тіла та рухову активність.

Статистично значуще збільшення середньої частоти дихання реєстрували через 240 хвилин після введення дози порівняно з контрольним розчинником; однак очевидно, що вища середня частота дихання в цій єдиній часовій точці була результатом для окремої тварини з хибним значенням (206,3 дихання/хв) порівняно з іншими тваринами у групі, що отримували дозу 400 мг/кг (86,7–146,7 дихання/хв). Крім того, протягом усього дослідження не було зареєстровано жодних інших відмінностей у частоті дихання, а загальна дихальна функція, виміряна за хвилинним об'ємом, не змінювалася; отже, вища середня частота дихання через 240 хвилин після введення дози не була пов'язана з ритлечитинібом.

Пероральне введення ритлечитинібу в дозах 75, 175 або 400 мг/кг не вплинуло на оцінку нейрофункціонального стану та легеневої функції.

2. Вплив на струм у калієвих каналах hERG, стабільно експресованих у клітинах лінії CHO (дослідження 14GR206)

Під час цього скринінгового оцінювання стану серцево-судинної системи *in vitro*, що не відповідало вимогам належної лабораторної практики (НЛП), ритлечитиніб випробовували в лінії клітин яєчника китайського хом'яка (CHO), що стабільно експресують калієвий канал, кодований трансфікованим геном hERG. Метод планарного «patch-clamp» (локальної фіксації потенціалу клітинної мембрани) застосовували для реєстрації струмів у каналах hERG із використанням автоматизованої платформи Qpatch. Розчини 1, 3, 10 і 30 мкМ ритлечитинібу готували в 100 % ДМСО з 30 мМ маточного розчину. На кожній клітині тестували до 4 різних концентрацій, кожен вплив тривав 5 хвилин або доти, доки не спостерігали стійких ефектів у рівноважному стані. Цизаприд (3 нМ, 10 нМ, 30 нМ і 100 нМ) застосовували в якості позитивного контролю. Було отримано значення IC_{50} , яке становить 58,0 нМ; це вказує на те, що тест-система з клітин лінії CHO демонструє відповідну чутливість до цього блокатора hERG.

Ритлечитиніб пригнічував амплітуду hERG на -0,2, 2,2, 5,0 та 12,9 % за концентрацій 1, 3, 10 та 30 мкМ відповідно з $IC_{50} > 30$ мкМ (8560 нг/мл). IC_{50} для інгібування струму hERG під дією ритлечитинібу становить > 30 мкМ.

3. Вплив на клоновані калієві канали hERG, експресовані в ембріональних клітинах нирок людини (дослідження 180319.QNJ)

У цьому дослідженні впливу на серцево-судинну систему *in vitro*, що відповідало вимогам НЛП, вплив ритлецитинібу на струм у каналах hERG оцінювали за температури, наближеної до фізіологічної (від 33 °C до 35 °C), у клітинах лінії HEK293, стабільно трансфікованих кДНК hERG. Оцінювали концентрації ритлецитинібу 30, 100 та 300 мкМ. Кожну концентрацію випробовували в 3 клітинах. В якості позитивного контролю використовували 60 М терфенадин.

Середнє значення інгібування hERG ритлецитинібом за концентрації 30 мкМ (2,7 %) не було статистично значущим ($p < 0,05$) порівняно з середніми значеннями контрольного розчинника (2,4 %). Середнє інгібування hERG ритлецитинібом за концентрацій 100 і 300 мкМ (16,5 % і 31,0 % для 100 і 300 мкМ відповідно) було статистично значущим порівняно зі значеннями контрольного розчинника. Позитивний контроль інгібував струм у калієвих каналах hERG на 78,8 %, що підтверджує чутливість тест-системи до інгібування hERG.

IC_{50} для інгібіторної дії ритлецитинібу на струм у калієвих каналах hERG становила > 300 мкМ.

4. Оцінювання стану серцево-судинної системи в самців щурів (дослідження 13LJ074)

Під час цього оцінювання стану серцево-судинної системи, яке не відповідало вимогам НЛП, ритлецитиніб вводили перорально через шлунковий зонд ненаркотизованим самцям щурів із телеметричним приладом лінії Wistar Han (8 особин/групу), один раз на добу протягом 3 днів у дозах 0 (0,5 % метилцелюлоза (мас./об.), доведена до рН 3 за допомогою 1 N HCl) або 125 мг/кг за експериментальною схемою в паралельних групах із повторним введенням для оцінювання впливу на ЧСС, систолічний, діастолічний та середній АТ, температуру тіла й активність. Об'єм дози становив 10 мл/кг.

Частоту серцевих скорочень, систолічний, діастолічний і середній АТ, температуру тіла та активність (визначену за рівнем телеметричного сигналу) реєстрували впродовж приблизно 24 години після введення препарату щоденно, починаючи з вихідного рівня (день -1) та продовжуючи в дні 1-3 введення дози. Необроблені дані збирали щохвилини, а потім розбивали на часові інтервали 0-2, 2-4, 4-8, 8-12, 12-16, 16-20 і 20-24 години. Статистичний аналіз порівнював ефекти ритлецитинібу (125 мг/кг) і розчинника в кожному часовому інтервалі за допомогою тесту ANCOVA. Зразки крові забирали у тварин сателітної групи (3 особини/групу дозування) через 1, 3, 7 і 24 год після введення дози в дні 1 і 3 для ФК аналізу.

У день 1 пероральне введення ритлецитинібу в дозі 125 мг/кг спричинило пов'язане з випробуванням препаратом підвищення систолічного, діастолічного і середнього АТ (+5,0, +4,4 та +4,7 мм рт. ст. відповідно) через 2-4 години після введення порівняно з розчинником; вплив на безпосередньо вимірний і середній АТ зберігався меншою мірою (приблизно +2 мм рт. ст.) через 4-20 годин після введення дози в день 1. Значення C_{max} після введення 125 мг/кг у день 1 становило 13 000 нг/мл, а значення T_{max} становило 1 годину після введення дози. На день 3 систолічний АТ був нижчим, ніж у разі введення розчинника (від -3,1 до -4,2 мм рт. ст.) через 4-20 годин після введення дози, а середній АТ був нижчим, ніж у разі введення розчинника (від -1,6 до -3,6 мм рт. ст.) через 0-16 годин після введення дози. На день 3 температура тіла була нижчою,

ніж у разі введення розчинника ($-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) протягом 0–2 годин після введення дози. Значення C_{max} при введенні препарату в дозі 125 мг/кг на день 3 становило 13 600 нг/мл, а значення T_{max} становило 1,67 години після введення дози.

Отже, пероральне застосування ритлечитинібу в дозі 125 мг/кг призводило до підвищення систолічного, діастолічного й середнього АТ в день 1 і до зниження температури, систолічного та середнього АТ в день 3 порівняно з контрольною групою, підбраною за часом.

5. Оцінювання стану серцево-судинної системи в ненаркотизованих собаках породи бігль з телеметричним приладом (дослідження 14GR078)

Під час цього оцінювання стану серцево-судинної системи, що не відповідало вимогам НЛП, ритлечитиніб вводили перорально через шлунковий зонд ненаркотизованим незафіксованим собакам породи бігль із телеметричним приладом (4 самці) у дозах 6 і 20 мг/кг для оцінювання впливу препарату на систолічний, діастолічний і середній АТ, систолічний тиск у лівому шлуночку, кінцевий діастолічний тиск у ЛШ, ЛШ + dP/dt макс, ЧСС, ЧД, інтервали PR, QRS, QT-I, QTc-I та активність.

Під час фази дослідження стану серцево-судинної системи тварини отримували одноразово протягом 2 днів поспіль пероральну дозу або розчинника (0,5 % метилцелюлози (мас./об.) в очищеній воді, рН якої було доведено до 3 за допомогою 1 Н HCl), або ритлечитинібу за схемою підвищення дози. Дані телеметрії стану серцево-судинної системи були отримані для кожної тварини, починаючи приблизно за 1 годину до введення дози і через 22 години після введення дози в дні 1, 2, 3 і 5 в кожній групі лікування.

Зразки плазми крові для визначення концентрації ритлечитинібу отримували перед введенням дози та приблизно через 4 години після введення дози в дні введення препарату під час фази дослідження серцево-судинної системи. Після завершення фази дослідження серцево-судинної системи всім тваринам вводили одноразово перорально ритлечитиніб у дозі 20 мг/кг для виявлення фармакокінетичного профілю.

Значення для кожної кінцевої точки телеметрії скоротили до середніх значень що 15 хвилин, а потім розподілили на періоди часу 0,5–3,5, 5–12, 12,25–18 і 18,25–22 години після введення дози (за винятком часу проведення процедур упродовж життя та періодів між циклами освітлення). Значення, отримані для ритлечитинібу (6 і 20 мг/кг), порівнювали з розчинником у кожен період часу за допомогою тесту ANOVA.

Пов'язане з ритлечитинібом стійке зниження ЧСС в дні 1 і 2 (від -4 до -7 уд./хв) і транзиторне зниження ЧСС в день 3 (від -11 до -12 уд./хв) спостерігали для доз 6 і 20 мг/кг, разом зі збільшенням інтервалу RR (від $+37$ до $+144$ мсек), яке відповідало зниженню ЧСС. Пов'язане з ритлечитинібом стійке зниження систолічного (від -4 до -7 мм рт. ст) і середнього (від -3 до -5 мм рт. ст) АТ в дні 2 і 3, а також зниження діастолічного АТ (від -3 до -4 мм рт. ст.), що було транзиторним у день 1 і стійким у дні 2 і 3, спостерігали під час введення дози 20 мг/кг. Попри те що ці зміни були незначними за величиною, вони вважалися пов'язаними з ритлечитинібом.

Крім того, в день 2 при введенні препарату в дозі 20 мг/кг спостерігали невелике стійке зниження кінцевого діастолічного тиску (від -3 до -4 мм рт. ст.), пов'язане з ритлечитинібом, а при введенні препарату в дозах 6 і 20 мг/кг у дні 1, 2 і 3 спостерігали подовження інтервалу QT-I; ці ефекти вважалися такими, що виникли внаслідок зниження ЧСС. У разі коригування QT-I за ЧСС (QTc-I) змін, пов'язаних із ритлечитинібом, не спостерігали. На день 5 усі показники повернулися до показників рівня контрольного розчинника.

Середня концентрація ритлечитинібу в плазмі крові через 4 години після введення дози препарату підвищувалася зі збільшенням дози у фазі дослідження серцево-судинної системи. Концентрація через 4 години після введення дози 20 мг/кг під час фармакокінетичної фази (1420 нг/мл) була порівнюваною з середньою концентрацією в той самий момент часу під час фази дослідження серцево-судинної системи (1590 нг/мл). Середні значення C_{max} і AUC_{24} для дози 20 мг/кг становили 8650 нг/мл і 24 700 нг • год/мл відповідно, а значення T_{max} становило 1,5 год після введення дози.

Отже, пероральне введення ритлечитинібу в дозах 6 і 20 мг/кг спричиняло пов'язане з досліджуванним препаратом зниження ЧСС із відповідним збільшенням інтервалу RR-I і збільшенням інтервалу QT-I, які виникли внаслідок зниження ЧСС, без змін інтервалу QT-I у разі коригування за ЧСС. Ритлечитиніб у дозі 20 мг/кг також сприяв зниженню систолічного, діастолічного та середнього АТ, а також невеликому зниженню кінцевого діастолічного тиску в ЛШ.

6. Оцінювання дії перорального PF-06651600 на серцево-судинну систему в собак породи бігль із телеметричним приладом (дослідження 14GR140)

Під час цього оцінювання стану серцево-судинної системи, що відповідає вимогам НЛП, ритлечитиніб вводили перорально через шлунковий зонд ненаркотизованим, незафіксованим собакам породи бігль із телеметричним приладом (3 самці) у дозах 3, 15 або 45 мг/кг у перехресному дослідженні для оцінювання впливу на систолічний, діастолічний і середній АТ, систолічний тиск у лівому шлуночку, кінцевий діастолічний тиск у ЛШ, ЛШ + dP/dt макс, ЧСС, ЧД, інтервали PR, QRS, QT-I, QTc-I та активність.

Під час фази дослідження серцево-судинної системи тваринам одноразово вводили пероральну дозу або розчинника, або ритлечитинібу в перехресному дослідженні. Дані телеметрії серцево-судинної системи були отримані від кожної тварини, починаючи приблизно з 1 години до введення дози та через 24 години після введення дози. Зразки плазми для визначення концентрації ритлечитинібу отримували перед введенням дози та приблизно через 4 години після введення дози під час фази дослідження серцево-судинної системи.

Після завершення фази дослідження серцево-судинної системи всі тварини отримували одноразово пероральну дозу ритлечитинібу 45 мг/кг для виявлення фармакокінетичного профілю. Значення для кожної кінцевої телеметричної точки скоротили до середніх щохвилинних значень, а потім розподілили на періоди часу 0,5–3,5, 4,5–9 і 9,75–22 години після введення дози (за винятком часу проведення процедур упродовж життя та періодів між циклами освітлення). Значення, отримані після застосування

	<p>ритлецитинібу в дозі 3, 15 або 45 мг/кг, порівнювали з розчинником у кожен період за допомогою тесту ANOVA.</p> <p>За жодним параметром, оцінюваним при введенні препарату в дозі 3 або 15 мг/кг, не було виявлено пов'язаних із ритлецитинібом ефектів. Пов'язане з ритлецитинібом підвищення ЧСС (+15 уд/хв) при введенні препарату в дозі 45 мг/кг реєструвалося протягом 0,5–3,5 години після введення препарату. У цей самий період спостерігали зниження інтервалу QT-I (-11 мс), яке розцінювали як вторинне відносно збільшення ЧСС. У разі коригування інтервалу QT-I за ЧСС (QTc) явних змін, пов'язаних із ритлецитинібом, не спостерігали. Не було виявлено жодних пов'язаних із ритлецитинібом змін будь-яких інших параметрів, оцінюваних за дози 45 мг/кг.</p> <p>Середні концентрації ритлецитинібу в плазмі крові через 4 години після введення дози під час фази дослідження серцево-судинної системи становили 187, 1570 та 5830 нг/мл для груп, які отримували дози 3, 15 та 45 мг/кг відповідно. У фармакокінетичній фазі дослідження (45 мг/кг) середнє значення T_{max} становило 1,7 години після введення дози, а середнє значення C_{max} становило 12 800 нг/мл. Середня концентрація через 4 години після введення дози під час фармакокінетичної фази становила 7710 нг/мл, що було зіставним із концентрацією, досягнутою під час фази дослідження серцево-судинної системи (5830 нг/мл).</p> <p>Отже, пероральне введення ритлецитинібу в дозах 3 і 15 мг/кг не спричиняло жодних пов'язаних із ритлецитинібом змін у жодному оцінюваному параметрі. Ритлецитиніб у дозі 45 мг/кг спричиняв підвищення ЧСС і зменшення внаслідок цього інтервалу QT-I; інших змін, пов'язаних із ритлецитинібом при введенні препарату в дозі 45 мг/кг не спостерігалось.</p>
4) фармакодинамічні взаємодії	Фармакодинамічні дослідження взаємодії з ритлецитинібом також не проводилися.
3. Фармакокінетика:	
1) аналітичні методики та звіти щодо їх валідації	<p>Методи рідинної хроматографії — мас-спектрометрії (PX-МС)/МС застосовували для визначення концентрацій ритлецитинібу та M2 у дослідженнях ADME <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>. На підтримку біоаналізу ритлецитинібу в токсикокінетичних дослідженнях, які відповідали вимогам НЛП, та M2 у ФК-дослідженні введення повторних доз щурам ці методи були валідовані (ритлецитиніб) або кваліфіковані (M2) в діапазоні концентрацій від 1 до 1000 нг/мл (ритлецитиніб: 180747VSMB_PGC, 140248VSMB_PGC_R3, 150207VSMB_PGC_R2 і 140251VSMB_PGC_R2; M2: 202346MQSMB_PGC). Ритлецитиніб продемонстрував стабільність у плазмі крові мишей, щурів, кроликів і собак упродовж 24 годин на крижаній бані та під жовтим світлом, щонайменше 67 днів за температури -70 °C і щонайменше 5 циклів «заморожування/розморожування». Довгострокову стабільність M2 не визначали.</p>
2) всмоктування	<p>1. Всмоктування <i>in vitro</i></p> <p>Було продемонстровано, що в клітинах лінії MDCK, трансфікованих MDR1, ритлецитиніб (0,3, 1 і 3 мкМ) є субстратом для MDR1 на основі більш високого потоку в напрямку В-А порівняно з напрямком А-В (коефіцієнт ефлюксу В-А/А-В > 40). Однак коли активність MDR1</p>

	<p>інгібувалася PCS833, ритлецитиніб демонстрував трансцелюлярну проникність $> 7 \times 10^{-6}$ см/с (дослідження PF-06651600_15Jul19_063458).</p> <p>Було продемонстровано, що в клітинах лінії MDCK, трансфікованих BCRP, ритлецитиніб (0,5 і 2 мкМ) є субстратом BCRP на підставі коефіцієнта ефлюксу В-А/А-В ≥ 10, який нормалізується в присутності інгібітора BCRP Ko143 (дослідження 18PFIZP1R1S1).</p> <p>2. Фармакокінетичні показники при одноразовому введенні Після одноразового внутрішньовенного введення ритлецитинібу (3, 0,71 або 1 мг/кг) середні значення CL, V_{ss} та $t_{1/2}$ становили приблизно 45 мл/хв/кг, 0,8 л/кг та 1 год відповідно в мишей (дослідження PF-06651600_23Sep14_145444), 69 мл/хв/кг, 1,4 л/кг і 0,3 год відповідно в щурів (дослідження PF-06651600_11Jun14_152020), і 13 мл/хв/кг, 1,1 л/кг і 1 год відповідно в собак (дослідження PF-06651600_22May14_132012).</p> <p>Ритлецитиніб швидко всмоктувався в мишей, щурів і собак після одноразового перорального введення в дозі 3 або 30 мг/кг, при цьому T_{max} досягався через $\leq 0,5$ год. Пероральна біодоступність ритлецитинібу становила 61 % у мишей, 85 % у щурів і > 100 % у собак.</p> <p>3. Фармакокінетичні показники при багаторазовому введенні Фармакокінетику ритлецитинібу та його циркулюючого метаболіту M2, виявленого в людей, оцінювали в самців і самиць щурів після 7-денного щоденного введення ритлецитинібу в дозі 200 мг/кг/добу (дослідження JAK3-117-РК). Для ритлецитинібу і M2 не було зареєстровано відмінностей, які були би пов'язані зі статтю.</p> <p>4. Токсикокінетичні показники при багаторазовому введенні Токсикокінетику багаторазового введення препарату оцінювали під час кількох досліджень пероральної токсичності повторних доз, які відповідали вимогам НЛП, у мишей, щурів, кроликів і собак. Середні значення C_{max} та AUC_{24} ритлецитинібу збільшувалися при підвищенні дози приблизно пропорційно до дози або трохи більше за пропорційну величину в усіх діапазонах оцінюваних доз у всіх видів досліджуваних тварин. У разі застосовності не було виявлено відмінностей, які були би пов'язані зі статтю, і практично не спостерігалось накопичення ритлецитинібу протягом усього періоду введення дози.</p> <p>5. Всмоктування в людини У клінічному дослідженні В7981011 абсолютна біодоступність ритлецитинібу (200 мг) становила приблизно 64 % при застосуванні препарату в формі розчину. Розрахункова фракція поглинання ($F_a \cdot F_g$) становила 0,89. Попри те, що ритлецитиніб визначався як субстрат для P-gp і BCRP, їхній вплив на доступність ритлецитинібу в кишечнику вважався незначущим, з огляду на розрахункове високе всмоктування в дослідженні балансу мас, а також те, що нормалізована за дозою C_{max} була незмінною для доз від 5 до 800 мг (дослідження В7981001).</p>
3) розподіл	<p>1. Зв'язування з білками плазми крові та розділення клітин крові Зв'язування ритлецитинібу та M2 з білками плазми визначали за допомогою рівноважного діалізу в плазмі крові мишей, щурів, кроликів, собак, мавп і людей. Ступінь зв'язування ритлецитинібу був однаковим у щурів, собак, мавп і людей, водночас у мишей і кроликів зв'язування відрізнялося. M2 мінімально зв'язувався з білками плазми у всіх видів організмів зі значенням фракції незв'язаного препарату 0,95 у плазмі крові людини або не зв'язувався з білками плазми крові в представників інших</p>

видів. З огляду на видові відмінності у зв'язуванні з білками плазми крові, граничні значення експозиції розраховували за допомогою концентрацій незв'язаної вільної форми препарату.

На основі спостережень за тривалою термінальною загальною радіоактивністю $t_{1/2}$ у плазмі крові щурів (дослідження 15 647) і людини (дослідження В7981011) більш детально було вивчено природу зв'язування ритлецитинібу з білками плазми крові. Подальше профілювання зв'язування [^{14}C]ритлецитинібу (5 мкМ) з основними циркулюючими білками плазми продемонструвало, що ритлецитиніб першочергово зв'язується з HSA та незначною мірою з тромбоцитами плазми, α 1-кислим глікопротеїном, ліпопротеїнами високої щільності (ЛПВЩ), фібриногеном і γ -глобулінами (дослідження PF-06651600_12Apr21_103503). Вибіркове зв'язування з сироватковим альбуміном людини (HSA) можна пояснити реактивністю ритлецитинібу з вільним цистеїном у положенні 34 HSA. Фактично, HSA становить найбільший циркулюючий пул антиоксидантних тіолів у плазмі (до 700 мкМ), за ним ідуть цистеїн (30–50 мкМ) і глутатіон (~5 мкМ) (Oettl & Stauber, 2007).

Розрахунок фракції зв'язаного з HSA ритлецитинібу в людини за результатами дослідження В7981011 можна зробити за допомогою екстраполяції нахилу кінцевої частини кривої залежності загальної кількості в мБк від часу повернення до часової точки 0 (4,678 мБк/мл), перетворення на нКі (1 нКі/37 000 мБк) та множення на загальний (3000 мл) та інтерстиціальний (11 000 мл) об'єми плазми (тобто загальний об'єм плазми в організмі, у якому визначають HSA, — 14 000 мл) і поділити на введену дозу [^{14}C]ритлецитинібу (289,67 нКі) (що на виході становить ~0,6 % від дози, зв'язаної переважно з альбуміном. Цей розрахунковий низький рівень зв'язування ритлецитинібу з альбуміном відповідає максимальному виміряному 2%-му зв'язуванню після інкубації високої концентрації ритлецитинібу (320 мкМ) з 300 мкМ рекомбінантного HSA протягом 22 год.

Специфічне зв'язування цистеїну 34 альбуміну ритлецитинібом не є чимось неочікуваним з огляду на його передбачувану реакцію із цистеїном 909 в АТФ-зв'язувальній кишені JAK3. Однак очікується, що невибіркове зв'язування з біологічними білками не матиме суттєвого значення з огляду на: (1) незначне зв'язування з іншими основними циркулюючими білками плазми (дослідження PF-06651600_12Apr21_103503); (2) високий ступінь відновлення (98,4 %) у гепатоцитах після 4-годинної інкубації [^{14}C]ритлецитинібу *in vitro* (дослідження PF 06651600_13Jun14_085839); та (3) хороше відновлення (86 %) у дослідженні балансу мас у людей (дослідження PF-06651600_06Apr20_085448). Крім того, ці результати узгоджуються з очікуваною низькою ймовірністю виникнення реакцій гіперчутливості на ритлецитиніб, що ґрунтується на результатах моделі алергії у мишей.

Розподіл ритлецитинібу і M2 між еритроцитами та плазмою крові визначали в цільній крові мишей, щурів, кроликів, собак і людини; результати вказували на деякі міжвидові відмінності в розподілі між плазмою крові та клітинами крові.

2. Розподіл у тканинах щурів

Розподіл [^{14}C]ритлецитинібу в тканинах вивчали за допомогою кількісної авторадіографії всього тіла (QWBA) у самців щурів лінії Long-Evans (пігментованих) (дослідження 15647). Після одноразового перорального

	<p>введення 10 мг/кг (200 мкКі/кг) розподіл радіоактивності був екстенсивним і швидким. У більшості тканин (за винятком головного та спинного мозку, кісток, білої жирової тканини, тимуса, яєчок і носових раковин) співвідношення AUC_t тканини та плазми крові становило > 1,0. Найбільші значення C_{max} (T_{max} = 0,25 або 0,5 год для більшості тканин) спостерігали в серці, нирках, стінці шлунка, щитоподібній залозі, легенях, печінці та меланіновмісних тканинах: оці, увеальному тракці та надниркових залозах.</p> <p>Радіоактивність [¹⁴C]ритлецитинібу мала обмежене розповсюдження через гематоенцефалічний бар'єр у ненавколошлуночкові тканини ЦНС (співвідношення AUC головний мозок:плазма ~0,05), без ознак накопичення активності [¹⁴C]-ритлецитинібу або його метаболітів. Ці результати свідчать про те, що ритлецитиніб є субстратом P-gp і BCRP.</p> <p>У більшості тканин виведення радіоактивності [¹⁴C]ритлецитинібу було завершено через 332 або 672 години після введення дози, за винятком надниркових залоз, аорти, крові (у камерах серця), ока, серця, кришталика, печінки, легенів, нирок, селезінки та увеального тракту. Спостерігали спорідненість до меланіну ока та меланіну покривних тканин; однак оборотне зв'язування з меланіном є звичайним явищем для ліпофільних амінів або основних сполук і не має токсикологічного значення (Leblanc et al, 1998). Це підтверджується також відсутністю фототоксичності очей або шкірних покривів після перорального введення ритлецитинібу щурам.</p> <p>3. Розподіл у головному мозку та профілювання метаболітів у собак Було проведено пошукове дослідження токсичності в собак, під час якого вивчали розподіл ритлецитинібу та профілі метаболітів у різних ділянках головного мозку після 3-денного введення препарату в дозі 40 мг/кг/добу (дослідження 17GR131). Приблизно через 1 год після введення останньої дози препарату та після його перфузії по всьому організму середні концентрації ритлецитинібу у верхньому ядрі оливи (1080 нг/г), кохлеарному ядрі (1190 нг/г) та гіпокампі (1320–1350 нг/г) були однаковими, що вказує на відсутність диференційованого розподілу ритлецитинібу в головному мозку. Середня концентрація препарату в плазмі крові через 1 годину після введення дози становила 11 300 нг/мл, що свідчить про обмежений розподіл препарату в головному мозку (~10 %); ця знахідка відповідає результатам, отриманим у щурів, а також вказує на те, що ритлецитиніб є субстратом для P-gp і BCRP. Профілювання метаболітів у цих зразках продемонструвало, що, крім ритлецитинібу, M2 переважав серед метаболітів (дослідження PF-06651600_14Mar18_092809).</p>
4) метаболізм	<p>1. Метаболізм <i>in vitro</i> Профілювання метаболітів ритлецитинібу <i>in vitro</i> у мікросомах печінки та гепатоцитах щурів, собак і людини продемонструвало, що первинні метаболічні шляхи відповідали окисненню за допомогою CYP і кон'югації, пов'язаній із глутатіоном. Різні метаболіти представлені кон'югатами з глутатіоном, N-ацетил-цистеїном, цистеїн-гліцином і цистеїном, а також кількома метаболітами одиночного гідроксилування. Під час інкубації з ритлецитинібом і глутатіоном у фосфатному буфері також утворювалися аддукти глутатіону, що вказує на внутрішню, неферментативну реактивність. Унікальних для людини метаболітів виявлено не було. [¹⁴C]Ритлецитиніб продемонстрував високий ступінь відновлення (98,4 %) під час інкубації протягом 4 годин з гепатоцитами людини <i>in vitro</i>. Ці результати вказують на обмежену неспецифічну реактивність з білковими</p>

нуклеофілами, що узгоджується з отриманими результатами аналізу профілю зв'язування білків (дослідження PF-06651600_13Jun14_085839).

Профілювання метаболітів ритлецитинібу *in vitro* на печінковій фракції шурів S9, здійснене в межах тесту на мутагенність у бактерій, виявило ритлецитиніб, а також основний циркулюючий метаболіт M2 і другорядний метаболіт M4 (дослідження PF-06651600_09Aug21_111222).

2. Фенотипування CYP і GST

Дослідження фенотипування CYP людини *in vitro* продемонстрували, що окислення CYP є основним шляхом кліренсу ритлецитинібу (розрахункова загальна частота для CYP f_m 0,47), з CYP3A4/5 (f_m 0,29) як основною ізоформою та додатковою наявністю CYP1A2 (f_m 0,068), CYP2C8 (f_m 0,091) і CYP2C9 (f_m 0,016) (дослідження PF-06651600_08Apr21_011706).

Кон'югація з глутатіоном відповідала за утворення M2 і подальших другорядних метаболітів (Cys/GSH/GST f_m 0,24).

Хоча CYP3A4 була переважною ізоформою, що відповідає за окислативний метаболізм ритлецитинібу *in vitro*, у разі сумісного введення з ітраконазолом спостерігали незначне збільшення експозиції ритлецитинібу (відношення C_{max} 1,03; коефіцієнт AUC_{inf} 1,15), що визначає незначну роль CYP3A (< 25 %) у метаболізмі ритлецитинібу (дослідження B7981023).

Дослідження фенотипування реакцій з рекомбінантним людським GST (rhGST) продемонструвало, що в метаболізмі ритлецитинібу беруть участь численні цитозольні (GST A1/3, M1/3/5, P1, S1, T2, Z1) і мікросомальні (MGST1/2/3) ізоформи (дослідження PF-06651600_26Feb19_033226).

Оцінювання клінічних генотипів у пацієнтів досліджень, вперше проведених у людини (FH), продемонструвало, що варіації генотипів GST P1, M1 і T1 не чинять значущого впливу на значення C_{max} і AUC ритлецитинібу порівняно з пацієнтами, які мають відповідні гени дикого типу (дослідження B7981001 і PF-06651600_16Oct19_073830).

3. Метаболізм *in vivo*

Профілювання метаболітів ритлецитинібу *in vivo* у мишей, шурів, собак і людей продемонструвало подібну картину кон'югації глутатіону та окислативного метаболізму (дослідження PF-06651600_13Jun14_085839 і PF-06651600_13Dec17_040703). Ритлецитиніб був найбільш поширеною циркулюючою речовиною, водночас унікальних для людини метаболітів виявлено не було. У зразках плазми крові людини доказів хіральної інверсії не виявлено.

Профілювання метаболітів плазми крові, отримане в ході дослідження балансу мас тіла людини для однієї дози [^{14}C]ритлецитинібу (дослідження PF-06651600_06Apr20_085448), продемонструвало, що ритлецитиніб є найпоширенішою циркулюючою речовиною (~30 % від загальної кількості речовин, пов'язаних із препаратом), а M2 (цистеїновий кон'югат) є основним циркулюючим метаболітом із поширеністю ~17 %. Кількість інших метаболітів, виявлених у плазмі крові людини, була незначною або малою (< 10 %). Усі метаболіти, ідентифіковані в організмі людини: (1) свідчили про окислення CYP і кон'югацію, з глутатіоном; (2) були більш полярними, ніж ритлецитиніб; і (3) переважно виводилися з сечею.

Профілювання метаболітів на кроликах вважалося недоцільним, оскільки результати досліджень токсичності в шурів і кроликів були однаковими, а

	<p>основний метаболіт людини M2 був достатньо представлений у щурів. Крім того, очікується, що ритлецитиніб не буде застосовуватися під час вагітності в людини.</p> <p>4. Співвідношення основних метаболітів у щурів і людини в рівноважному стані</p> <p>7-денне фармакокінетичне дослідження з багаторазовим введенням препарату проводили в самців і самиць щурів із використанням відповідної дози, визначеної як рівень відсутності несприятливого впливу (NOAEL) під час 6-місячного дослідження хронічної токсичності на щурах (200 мг/кг/добу; дослідження 20070067). Для кількісного визначення концентрації ритлецитинібу та M2 у плазмі крові використовували валідований і кваліфікований методи РХ-МС/МС відповідно. У цьому дослідженні для ритлецитинібу та основного метаболіту M2 визначали значення C_{max} та AUC_{24} у стаціонарному стані, що використовувалися для оцінювання охоплення експозиції M2 у дослідженнях токсичності ритлецитинібу в щурів порівняно з такими в людей. У сукупності доклінічну безпечність ритлецитинібу та його основного метаболіту M2 людини (співвідношення AUC_{24} між щурами та людьми > 1) у належний спосіб оцінювали в основних дослідженнях хронічної токсичності, канцерогенності та ембріофетального розвитку в щурів відповідно до рекомендацій ICH R3(M2) (2009). Крім того, оскільки профілі метаболітів були подібними між видами тварин, у яких проводили доклінічні дослідження (миша, щур і собака), і людиною, безпечність інших другорядних метаболітів у належний спосіб оцінювали в загальній доклінічній програмі оцінки токсичності.</p>
5) виведення	<p>1. Виведення в мишей, щурів і собак</p> <p>Після внутрішньовенного введення пацюкам ритлецитинібу < 1 % препарату виводилося в незміненому вигляді з сечею та жовчю. Виведення незміненого ритлецитинібу з сечею в собак було настільки ж низьким — 3 %. Ці дані свідчать про обмежене виведення вихідної сполуки через нирки або жовчовивідні шляхи (дослідження PF-06651600_11Jun14_152020 і PF-06651600_22May14_132012).</p> <p>Попередній аналіз, проведений після перорального введення препарату мишам, щурам і собакам, продемонстрував, що M1 (сульфоксид M3), M2 (кон'югат цистеїну) і M3 (кон'югат N-ацетилцистеїну) були основними метаболітами, виявленими в сечі або жовчі (дослідження PF-06651600_13Jun14_085839 і PF-06651600_13Dec17_040703).</p> <p>2. Лактація в щурів</p> <p>Здатність ритлецитинібу проникати в молоко вивчали у самиць щурів у період лактації після одноразового перорального введення препарату в дозі 30 мг/кг. Концентрація ритлецитинібу в молоці була вищою, ніж у плазмі крові, і визначалася в обох середовищах протягом 8 годин. Співвідношення AUC_t молока до плазми крові становило 2,2. Профіль виведення ритлецитинібу з молоком відповідав профілю виведення з плазмою крові (дослідження 8448335).</p> <p>3. Виділення в людини</p> <p>Після перорального застосування [^{14}C]ритлецитинібу в людини в дозі 200 мг загальне відновлення радіоактивності становило 86 %, з них 66 % — із сечею і 20 % — із випорожненнями (дослідження PF-06651600_06Apr20_085448). Ритлецитиніб був основним представником пов'язаних із препаратом речовин у плазмі крові, проте в пулі сечі</p>

	<p>переважали його метаболіти включно з М2. Усі ідентифіковані споріднені з препаратом речовини, містилися у випорожненнях у кількості менше 1 % кожен, що вказує на те, що виділення з жовчю або випорожненнями не є основним шляхом виведення ритлецитинібу або його метаболітів. Виділення з сечею окисних і кон'югованих метаболітів було основним шляхом виведення радіоактивності після введення [¹⁴C]ритлецитинібу. Розрахований показник кліренсу пасивної ниркової фільтрації ритлецитинібу становив 6450 мл/год або 108 мл/хв ($f_u \cdot \text{швидкість гломерулярної фільтрації} = 0,86 - 7500 \text{ мл/год}$), що вказує на сумарну реабсорбцію. Нирковий кліренс неактивного метаболіту М2 був трохи нижчим за розрахункове значення кліренсу пасивної ниркової фільтрації, що вказує на чисту реабсорбцію.</p> <p>4. Вивчення розподілу в людини</p> <p>Загальне відновлення радіоактивності екскрементів після одноразового введення [¹⁴C]ритлецитинібу становило приблизно 86 %. Ступінь абсорбції при пероральному застосуванні становив 89 %, а виміряна біодоступність при пероральному застосуванні — приблизно 64 %. Ритлецитиніб продемонстрував об'єм розподілу 1,0 л/кг, що відповідає його характеристикам слабкої основи/нейтральності. Загальний системний кліренс із крові становив приблизно 6,2 мл/хв/кг (кліренс із плазми — 9,9 мл/хв/кг), причому більша частина кліренсу ритлецитинібу здійснювалася за допомогою метаболізму в спосіб СYP-опосередкованого окиснення ($f_m 0,47$) та кон'югації з глутатіоном (Cys/GSH/GST $f_m 0,24$). Хоча частка СYP3A4 у загальному кліренсі <i>in vitro</i> оцінювалася приблизно у 29 %, результати клінічних досліджень взаємодії лікарських засобів (ВЛЗ) з ітраконазолом продемонстрували, що кліренс СYP3A становить < 25 %. Нирковий кліренс ритлецитинібу становить приблизно 4 % від загального кліренсу. Більшість метаболітів ритлецитинібу виявляли в сечі, зокрема основний метаболіт М2, меншу ж кількість виявляли у випорожненнях.</p>
б) фармакокінетичні взаємодії (доклінічні)	<p>Оцінювали відносний ризик ВЛЗ <i>in vitro</i>, пов'язаний з оборотним інгібуванням, залежним від часу інгібуванням (ЗВІ) та індукцією основних метаболізуючих ферментів. Ризик розвитку <i>in vitro</i> ВЛЗ, пов'язаної з інгібуванням деяких транспортерів ефлюксу та захоплення в шлунково-кишковому тракті, печінці та нирках, оцінювали згідно з настановами Управління з контролю харчових продуктів і лікарських засобів США (FDA) 2020 року та Європейського агентства лікарських засобів (ЕМА) 2012 року щодо ВЛЗ.</p> <p>Оцінка ризику ВЛЗ ґрунтувалася на значенні C_{\max} незв'язаного ритлецитинібу в стаціонарному стані, що дорівнювало 1,1 мкМ (318 нг/мл), у разі введення максимальної клінічної дози 50 мг один раз в день пацієнтам з ОА (дослідження PMAR-1157). Теоретичну концентрацію в кишечнику ($[I]_{\text{gut}}$) оцінювали в 0,2 мг/мл або 0,70 мМ (50 мг/250 мл). Теоретичну концентрацію в кровообігу до потрапляння в печінку оцінювали у 8 мкМ, за умови, що абсорбована фракція = 0,89 (дослідження В7981011), константа швидкості абсорбції = 0,132 хв⁻¹ (дослідження PMAR-1157), а кровообіг у печінці — 1620 мл/хв.</p> <p>Для основного метаболіту М2 C_{\max} становила 1,5 мкМ після введення максимальної клінічної дози ритлецитинібу 200 мг один раз на добу здоровим пацієнтам (дослідження В7981054). На основі співвідношення C_{\max} ритлецитинібу/М2, що дорівнює 2,6 для дозування 200 мг один раз на добу, і C_{\max} ритлецитинібу, що дорівнює 344 нг/мл для дозування 50 мг</p>

один раз на добу (PMAR-1157), оцінювання розрахункового ризику ВЛЗ для М2 виконували на основі значення C_{max} незв'язаного препарату в стаціонарному стані, що дорівнює 0,31 мкМ.

1) СYP-опосередковані взаємодії

1.1. Інгібування СYP

1.1.1. Інгібування СYP ритлецитинібом

У мікосомах печінки людини (МПЛ) ритлецитиніб (від 0,1 до 100 мкМ) не продемонстрував оборотного інгібування активності СYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 або 3A4/5 (з мідазоламом і ніфедипіном як субстратом СYP3A4/5); усі значення IC_{50} були > 100 мкМ ($[I]_u/IC_{50} < 0,011$). Оборотно інгібування СYP3A4/5 (тестостероном в якості субстрату СYP3A4/5) спостерігали при $IC_{50} = 90$ мкМ ($[I]_u/IC_{50} = 0,012$) (дослідження ХТ135092).

Початкові дослідження ЗВІ для ритлецитинібу (від 0,1 до 100 мкМ) в МПЛ продемонстрували відсутність інгібування основних ферментів СYP без НАДФН. У присутності НАДФН ритлецитиніб спричиняв порівняно слабе, залежне від часу інгібування СYP21A2 (IC_{50} , 65 мкМ) і СYP3A4/5 (IC_{50} , 11–14 мкМ).

Подальше дослідження потенціалу ЗВІ ритлецитинібу (від 3 до 200 мкМ для СYP3A; від 30 до 600 мкМ для СYP1A2) проводили в МПЛ (з НАДФН і без нього) із застосуванням прототипічних субстратів (мідазолам для СYP3A та фенацетин для СYP1A2 (дослідження PF-06651600_14Feb14_121415 та PF-06651600_04Feb20_123341)).

За відсутності НАДФН ритлецитиніб не виявляв залежного від часу інгібування СYP3A та 1A2. У присутності НАДФН ритлецитиніб спричиняв залежне від часу інгібування СYP3A та 1A2 в усіх випробуваних концентраціях. Не вдалося визначити розрахункові кінетичні параметри K_I та k_{inact} для СYP3A, оскільки інгібування не було насиченим у діапазоні випробуваних концентрацій. Комбінований нахил k_{inact}/K_I становив $0,871 \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мкмоль}^{-1}$. Розрахункові показники K_I і k_{inact} для СYP1A2 становили 327 мкМ і $0,0917 \text{ хв}^{-1}$ відповідно, на основі чого було розраховане співвідношення k_{inact}/K_I , яке дорівнювало $0,280 \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мкмоль}^{-1}$.

1.1.2. Інгібування М2 СYP

М2 в МПЛ (до 96,5 або 100 мкМ) не демонстрував оборотного інгібування активності СYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 або 3A4/5; усі значення IC_{50} становили $\geq 96,5$ мкМ ($[I]_u/IC_{50} \leq 0,003$). Початкові дослідження ЗВІ для М2 (для концентрацій до 96,5 або 100 мкМ) у МПЛ продемонстрували відсутність інгібування всіх основних ферментів СYP за допомогою НАДФН (дослідження PF-07034562_18Feb21_111635).

1.2. Індукція СYP

1.2.1. Індукція СYP ритлецитинібом

Індукцію СYP1A2, 2B6 і 3A4 ритлецитинібом (від 0,5 до 100 μM) оцінювали в кріоконсервованих гепатоцитах людини, отриманих від 3 донорів, та порівнювали з індукцією за допомогою позитивних контролів — омепразолу, фенобарбіталу й рифампіну — та негативного контролю — флумазенілу (дослідження ХТ133107). Ритлецитиніб спричиняв > 2 -кратну індукцію рівнів мРНК СYP3A4 за концентрації ≥ 5 мкМ без відповідної індукції ферментативної активності СYP3A4. З урахуванням змін мРНК в 1 із 3 партій гепатоцитів із

вимірюваним E_{max}/EC_{50} (EC_{50} , 9,74 мкМ; E_{max} , 5,02) коефіцієнт відносної індукції (RIS) було визначено як 0,51. Ритлецитиніб спричиняв > 2-кратну індукцію рівнів мРНК CYP2B6 і ферментативну активність за 50–100 мкМ. RIS було визначено як таку, що дорівнює 0,31, за допомогою змін мРНК в 1 із 3 партій гепатоцитів із вимірюваним E_{max}/EC_{50} (EC_{50} , 13,9 мкМ; E_{max} , 4,27). Ритлецитиніб не спричиняв індукції активності CYP1A2.

Щоб охопити потенціал індукції мРНК CYP2C і CYP1A2 (дослідження PF-06651600_28Aug20_022301), було проведено більш масштабне оцінювання індукції CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19 і 3A4 ритлецитинібом (від 0,3 до 100 мкМ) Профілі індукції CYP3A4 ритлецитинібом були аналогічні результатам дослідження XT133107. Оброблення гепатоцитів людини ритлецитинібом призвело до > 2-кратної індукції мРНК CYP1A2 при концентрації від 3 до 6 мкМ залежно від партії клітин, при цьому максимальну індукцію спостерігали при 19,5-кратної концентрації. Лінійні нахили варіювалися від 0,187- до 0,276-кратного збільшення/мкМ. Ритлецитиніб спричиняв > 2-кратну індукцію мРНК CYP2C8, CYP2C9 і CYP2C19 за концентрацій ≥ 3 мкМ у всіх 3 партіях гепатоцитів людини. У разі застосовності RIS ритлецитинібу для CYP1A2 і 2C9 у цьому експерименті *in vitro* становив 0,10 і 0,15 відповідно.

1.2.2. Індукція M2 CYP

Індукцію CYP1A2, CYP2B6 і CYP3A4 за допомогою M2 (від 0,3 до 250 мкМ) оцінювали у 3 партіях кріоконсервованих гепатоцитів людини й порівнювали з індукцією за допомогою позитивних контролів — омепразолу, фенобарбіталу та рифампіну. M2 не індукував активність ферментів CYP1A2, CYP2B6 і CYP3A4 або мРНК у жодній досліджуваній партії гепатоцитів або концентрації (дослідження PF-06651600_30Sep20_090107).

1.2.3. Клінічні результати оцінки інгібування та індукції CYP і клінічна стратегія щодо ВЛЗ

У клінічному дослідженні B7981017 одночасне введення ритлецитинібу підвищувало значення AUC_{inf} та C_{max} субстрату CYP3A4/5 мідазоламу в 2,7 раза та 1,8 раза відповідно, водночас ритлецитиніб не впливав на експозицію субстрату CYP2B6 ефавірензу. Ці дані свідчать про помірну ВЛЗ із субстратами CYP3A4 внаслідок сумарного інгібування, а також про відсутність клінічно значущої індукції CYP2B6 ритлецитинібом.

У клінічному дослідженні B7981054 одночасне введення ритлецитинібу підвищувало значення AUC_{inf} і C_{max} субстрату CYP1A2 кофеїну в 2,7 раза й 1,1 раза відповідно. Ці дані свідчать про помірне сумарне інгібування CYP1A2 ритлецитинібом.

У клінічному дослідженні B7981069 одночасне введення ритлецитинібу не вплинуло на експозицію субстрату CYP2C9 толбутаміду, що свідчить про відсутність індукції CYP2C.

Застосування перевіреної фізіологічно обґрунтованої фармакокінетичної (PBPK) моделі для ритлецитинібу було розроблено для успішного прогнозування CYP-опосередкованої лікарської взаємодії, спричиненої ритлецитинібом (дослідження PF-06651600_01Apr21_032218).

2) Взаємодії, опосередковані UGT, GST і SULT

2.1. Інгібування UGT ритлецитинібом

Потенціал ритлецитинібу (від 1 до 100 мкМ) інгібувати основні ферменти UGT було досліджено в МПЛ з додаванням і без додавання 2 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (дослідження PF-06651600_19Aug14_135124). За відсутності БСА ритлецитиніб не інгібував UGT1A6, UGT1A9 і UGT2B7 ($IC_{50} > 100$ мкМ); водночас значення IC_{50} для інгібування UGT1A1 і UGT1A4 становили 54 і 81 мкМ відповідно. У присутності БСА ритлецитиніб не інгібував UGT1A1, UGT1A6, UGT1A9 та UGT2B7 ($IC_{50} > 100$ мкМ), водночас значення IC_{50} для UGT1A4 становило 97 мкМ. Ці результати свідчать про низький ризик розвитку UGT-опосередкованої ВЛЗ при введенні клінічної дози 50 мг 1 раз на добу (C_{max} 1,1 мкМ; [I], $u/IC_{50} \leq 0,011$).

2.2. Інгібування M2 UGT

Потенціал M2 (0,967–96,7 мкМ) інгібувати основні ферменти UGT оцінювали *in vitro* в МПЛ з додаванням 2 % БСА і без нього. У випробуваних концентраціях M2 не інгібував ферменти UGT1A1, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7 і 2B7 зі значеннями $IC_{50} > 96,5$ мкМ([I], $u/IC_{50} \leq 0,003$) (дослідження PF-07034562_09Mar21_034526).

2.3. Інгібування SULT ритлецитинібом

Потенціал ритлецитинібу (від 0,1 до 100 мкМ) інгібувати SULT1E1, 1A1 і 2A1 оцінювали *in vitro* в цитозолі клітин печінки людини. Ритлецитиніб не інгібував жоден з основних ферментів SULT зі значеннями $IC_{50} > 100$ мкМ ([I], $u/IC_{50} \leq 0,011$) (дослідження PF-06651600_06May19_111809).

2.4. Інгібування GST ритлецитинібом

Здатність ритлецитинібу інгібувати *in vitro* (300 мкМ) кон'югацію 1-хлор-2,4-динітробензолу (ХДНБ) з глутатіоном оцінювали для гGSTA1, A2, A3, A4, K1, M1, M2, M3, M4, M5, O1, P1, S1, Z1, MGST1, MGST2 із попередньою інкубацією з інгібітором впродовж 30 хвилин та без неї. Жодного значущого впливу ритлецитинібу на ХДНБ не спостерігали для жодної з глутатіон-S-трансфераз (GST) ні в умовах конкурентного зв'язування, ні залежно від часу інгібування (дослідження PF-06651600_14Nov19_094951).

2.5. Клінічні результати інгібування UGT, сульфатування та GST

Ритлецитиніб метаболізується за допомогою широкого спектра GST, що вказує на низький рівень речовини, яка може бути об'єктом ВЛЗ у межах GST-метаболізму. Профілювання генотипів GST підтвердило, що функціональні варіанти в GST P1 (*B, *C) і нульові генотипи в GST M1 і T1 не продемонстрували значущої різниці AUC порівняно з GST P1*A, M1 або T1 дикого типу. Тому дослідження ВЛЗ зі специфічними інгібіторами або індукторами GST не проводилися.

У клінічних дослідженнях B7981018 (ритлецитиніб у дозі 200 мг) та B7981035 (ритлецитиніб у дозі 50 мг) спостерігалися зміни в експозиції етинілестрадіолу та левоноргестрелу після одночасного застосування з ритлецитинібом, а саме зміни значень AUC_{inf} або $C_{max} \leq 20$ %. Ці результати дають деяке уявлення про можливість взаємодії клінічно значущих доз ритлецитинібу з пероральними контрацептивами, що мають кілька механізмів кліренсу (UGT1A1, SULT1E1 та CYP3A) (Zhang et al, 2018).

3) Взаємодія з транспортерами

	<p>Ритлецитиніб і М2 оцінювали <i>in vitro</i> як субстрат та (або) інгібітор основних ефлюкських, печінкових і ниркових транспортерів у трансфікованих клітинах лінії НЕК293 або везикулах.</p> <p>3.1. Ритлецитиніб Було продемонстровано, що ритлецитиніб є субстратом як для Р-гр, так і для BCRP. Однак вплив ефлюксу зі шлунково-кишкового тракту на пероральну абсорбцію вважається мінімальним, з огляду на те, що в клінічному дослідженні В7981011 абсорбція оцінювалася на рівні 89 %. Крім того, нормалізована за дозою C_{max} ритлецитинібу не залежала від дози в діапазоні від 5 до 800 мг (дослідження В7981001), що вказує на відсутність доказів значущого впливу кишкових транспортерів на всмоктування. Ритлецитиніб не був субстратом для OATP1B1 або OATP1B3. Ритлецитиніб не інгібував Р-гр або BSEP, але різною мірою інгібував BCRP, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1 і MATE2K.</p> <p>3.2. М2 М2 не інгібував OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 і MATE2K, але інгібував BCRP, Р-гр, OATP1B1, OATP1B3 і OCT1 більшою мірою, ніж ритлецитиніб.</p> <p>3.3. Клінічні результати взаємодії ритлецитинібу з транспортерами Клінічне дослідження В7981024 продемонструвало, що ритлецитиніб (або М2) не чинить клінічно значущого впливу на експозицію розувастатину (маркерний субстрат BCRP/OATP1B1/1B3/OAT1/3; Hua et al, 2012; Kalliokoski & Niemi, 2009; Wiebe et al, 2020; Windass et al, 2007). Однак у клінічному дослідженні В7981025 ритлецитиніб (та (або) М2) збільшував експозицію суматриптану (маркерний субстрат OCT1; Matthaеi et al, 2016).</p> <p>Клінічний профіль взаємодії транспортерів і ритлецитинібу оцінювали за допомогою перехресної взаємодії традиційних клінічних субстратів та ендогенних біомаркерів. Оцінювання ендогенних біомаркерів, яке дедалі частіше успішно використовується в клініці для оцінювання ВЛЗ (Chu et al, 2018), не виявило впливу ритлецитинібу (або М2) на кліренс N¹-метилнікотинаміду або креатиніну (біомаркери OCT2/MATE; Luo et al, 2018; Miyake et al, 2021), копропорфірину I (біомаркер OATP1B1/1B3; Kunze et al, 2018; Shen et al, 2018) або піридоксинової кислоти (біомаркер OAT1/3; Shen et al, 2019). Ці результати дослідження біомаркерів вказують на те, що клінічно значущої ВЛЗ між ритлецитинібом (або М2) і субстратами цих транспортерів (OCT2, MATE1/MATE2K, OATP1B1/1B3 і OAT1/3) не очікується.</p> <p>Відсутність впливу на копропорфірин I (захоплення в печінці за допомогою OATP1B1/1B3) та піридоксинову кислоту (екскреція нирками за допомогою OAT3) відповідала відсутності клінічно значущої ВЛЗ з розувастатином (вплив на абсорбцію за допомогою BCRP, захоплення в печінці за допомогою OATP1B1/1B3 і виведення через нирки за допомогою OAT1/3). Зміни, що спостерігаються при застосуванні ізобутирилкарнітину (виведення з гепатоцитів за допомогою OCT1), відповідали результатам клінічного дослідження ВЛЗ із суматриптаном (захоплення в печінці за допомогою OCT1; Kim et al, 2017; Luo et al, 2020).</p>
7) інші фармакокінетичні дослідження	Жодних інших фармакокінетичних досліджень ритлецитинібу або М2 не проводилося.

4. Токсикологія:	
1) токсичність у разі одноразового введення	<p>1. Токсикокінетичне дослідження на самцях щурів (дослідження 13MA012) Ритлецитиніб (у формі вільної основи) вводили перорально через шлунковий зонд самцям щурів лінії Wistar Han (3 особини/групу; вік 6–8 тижнів) у разових дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в деіонізованій воді, рН якої було доведено до 3 за допомогою 1 N HCl), 250, 500 або 1000 мг/кг. За тваринами спостерігали з метою виявлення клінічних ознак перед введенням дози та приблизно щогодини протягом 7 год після введення дози, а також протягом 24 год після введення дози. Зразки крові для токсикокінетичного (ТК) аналізу забирали приблизно через 1, 3, 7 і 24 години після введення дози препарату. Клінічних ознак, які були би пов'язані з ритлецитинібом, не спостерігали. Системна експозиція, яку оцінювали за середніми значеннями C_{max} і AUC_{24}, збільшувалася з підвищенням дози. При введенні дози 1000 мг/кг значення C_{max} і AUC_{24} становили 37 500 нг/мл і 336 000 нг • год/мл відповідно. Одноразове пероральне введення ритлецитинібу в дозі 1000 мг/кг через шлунковий зонд добре переносилося, оскільки не спостерігали жодних проявів клінічних симптомів.</p> <p>2. Токсикокінетика в самців щурів (дослідження 14MA133) Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) у 0,5%-му (мас./об.) розчиннику (метилцелюлоза) вводили перорально через шлунковий зонд самцям щурів лінії Wistar Han (3 особини/групу; віком від 6 до 8 тижнів) як одноразові дози 25, 75 або 200 мг/кг. За тваринами спостерігали з метою виявлення клінічних ознак перед введенням дози та приблизно через 1, 3, 7 і 24 години після введення дози. Зразки крові для ТК аналізу забирали приблизно через 1, 3, 7 і 24 години після введення дози. Клінічних ознак, які були би пов'язані з ритлецитинібом, не спостерігали. Системна експозиція, яку оцінювали за середніми значеннями C_{max} і AUC_{24}, збільшувалася з підвищенням дози. Для найвищої дози 200 мг/кг значення C_{max} та AUC_{24} становили 29 700 нг/мл і 122 000 нг • год/мл відповідно.</p> <p>3. Пошукове дослідження токсичності на собаках (дослідження 13LJ078) Ритлецитиніб (у формі вільної основи) у 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в деіонізованій воді, рН якої було доведено до 3 за допомогою 1 N HCl, вводили перорально через шлунковий зонд самцям і самицям собак породи бігль (по 1 особині кожної статі на групу; вік > 8 місяців) одноразово в дозах 20, 90 або 300 мг/кг. За тваринами спостерігали на предмет проявів клінічних ознак і реєстрували масу тіла через 24 години після введення дози. Зразки крові для ТК аналізу забирали приблизно через 0,5, 1, 3, 7 і 24 години після введення дози препарату. Ритлецитиніб переносився добре у разі введення впродовж 1 доби собакам породи бігль доз до 300 мг/кг включно; єдиними клінічними ознаками, пов'язаними з ритлецитинібом, були блювання та частково заплющені очі. У самців блювання, пов'язане з ритлецитинібом, виникало при застосуванні всіх доз препарату, причому найбільший ступінь тяжкості (легкий) спостерігався в разі введення дози 300 мг/кг, тоді як у самиць блювання (легкого або помірного ступеня тяжкості) було зареєстровано тільки в разі введення дози 300 мг/кг. У разі введення дози 300 мг/кг в особин обох статей спостерігали часткове заплющування очей (мінімальне). Системна експозиція, яку оцінювали за значеннями C_{max} та AUC, збільшувалася з підвищенням дози, збільшення значень AUC перевищувало пропорційне дозі для доз до 300 мг/кг,</p>

	<p>причому не було зареєстровано значущих відмінностей, які були би пов'язані зі статтю. За максимальної дози 300 мг/кг значення C_{\max} та AUC_{24} становили 46 800 нг/мл і 462 000 нг • год/мл відповідно.</p> <p>4. Токсикокінетика препарату в капсулах із модифікованим вивільненням у собак (дослідження 16GR208)</p> <p>Ритлещитиніб (65 мг активної речовини) вводили перорально в капсулах із модифікованим вивільненням (у формі тозилатної солі) собакам породи бігль (по 3 особини кожної статі; вік приблизно 1–4 роки) одноразово. За тваринами спостерігали з метою виявлення клінічних ознак перед введенням дози та через 1, 2, 4, 8, 12 і 18 годин після введення дози препарату. Зразки крові для ТК аналізу забирали через 1, 2, 4, 8, 12, 18 і 24 години після введення дози препарату. Одноразова доза 65 мг ритлещитинібу (активної речовини) в капсулах із модифікованим вивільненням для перорального застосування переносилася добре собаками породи бігль. Водянисті випорожнення, зумовлені застосуванням ритлещитинібу, спостерігалися тільки в 1 самця в день 1. Профілі концентрації препарату в плазмі крові були порівняно однаковими в самців і самиць собак, за винятком одного самця; цей факт, можливо, пов'язаний із коротшим часом транзиту через шлунково-кишковий тракт, що зумовило виділення залишків капсули з випорожненнями. Середні значення C_{\max} у самців і самиць собак становили 460 і 685 нг/мл відповідно, а значення AUC_{24} становили 3790 і 6120 нг • год/мл відповідно.</p>
2) токсичність у разі повторних введень	<p>1. 14-денне пошукове дослідження токсичності на щурах (дослідження 13MA039)</p> <p>Ритлещитиніб (у формі вільної основи) вводили перорально через шлунковий зонд самцям щурів лінії Wistar Han (по 5 особин на групу; вік 6–8 тижнів) один раз на добу протягом 14 днів у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в деіонізованій воді, рН якої було доведено до 3 за допомогою 1 Н НСІ), 125, 300 або 500 мг/кг/добу. Параметри дослідження та кінцеві точки оцінювали за клінічними ознаками, масою тіла, споживанням корму, параметрами клінічного та біохімічного аналізів крові, ТК, масою органів, результатами макроскопічних і мікроскопічних досліджень.</p> <p>Клінічні ознаки, пов'язані із застосуванням ритлещитинібу, обмежувалися худорлявістю в однієї тварини, яка отримувала 500 мг/кг/добу з дня 7 по день 13 і втратила приблизно 6 % маси тіла за період з дня 1 до дня 7, але набрала масу тіла приблизно на 7 % за наступні 7 днів і досягла норми в день 14.</p> <p>Зниження середньої маси тіла, пов'язане з ритлещитинібом, з дня 1 по день 7, зареєстроване у тварин, які отримували препарат у дозі 500 мг/кг/добу, було здебільшого пов'язане зі зменшенням маси тіла у 2 тварин (13,2 г та 9,9 г), що призвело до зниження середньої маси тіла (0,92 та 0,91 від середніх показників контрольної групи в дні 7 та 14 відповідно). Середній приріст маси тіла в разі введення дози 500 мг/кг/добу становив 0,43 від контрольних значень упродовж усього періоду дослідження (з дня 1 по день 14). Середнє споживання корму в разі введення дози 500 мг/кг/добу було нижчим (у 0,88 раза за середнє значення) протягом перших 7 днів дослідження та аналогічним контрольним значенням протягом останніх 7 днів дослідження. Зниження маси тіла, приросту маси тіла та споживання корму, що спостерігали в</p>

	<p>групі, яка отримувала препарат у дозі 500 мг/кг/добу, було незначним і не обмежувало дозу.</p> <p>Пов'язана з ритлецитинібом нижча (порівняно із середнім значенням контрольної групи) середня кількість лейкоцитів (у 0,65–0,82 раза), лімфоцитів (у 0,51–0,56 раза) та еозинофілів (у 0,13–0,32 раза), а також вища середня кількість нейтрофілів (1,49–2,62 раза) була зареєстрована у випадку введення дози ≥ 125 мг/кг/добу за відсутності дозозалежної відповіді. Очікувалося, що зниження кількості лейкоцитів і лімфоцитів призведе до фармакологічної дії, пов'язаної з інгібуванням JAK3/TEC. Зумовлене ритлецитинібом зниження середнього рівня глобулінів (у 0,89–0,90 раза), реєструвалося в разі введення дози ≥ 300 мг/кг/добу. Середнє співвідношення альбуміну до глобулінів становило від 1,08 до 1,13 і було розцінене як таке, що виникло внаслідок зниження рівня глобулінів при введенні препарату в дозах 300 і 500 мг/кг/добу відповідно.</p> <p>При введенні дози ≥ 125 мг/кг/добу спостерігали пов'язане з ритлецитинібом дозозалежне зниження середньої маси тимуса (0,33–0,09 від контрольних середніх значень) і селезінки (0,86–0,57 від контрольних середніх значень) з аналогічним зниженням співвідношення маси органа до маси тіла і маси органа до маси головного мозку для всіх доз. Згідно з даними мікроскопічного дослідження, нижчі маси тимуса та селезінки відповідали зменшенню клітинності лімфоїдної тканини. Зменшення кількості червоної пульпи в селезінці також, імовірно, сприяло зниженню маси селезінки в разі введення дози 500 мг/кг/добу. Зниження маси тимуса та селезінки мало очікуваний ефект інгібування JAK3/TEC.</p> <p>Макроскопічні дані, пов'язані з фармакологією ритлецитинібу, охоплювали невеликий розмір тимуса в разі введення дози ≥ 125 мг/кг/добу та невеликий розмір селезінки в разі введення дози ≥ 300 мг/кг/добу. Згідно з даними мікроскопічного дослідження, результати відповідали зменшенню клітинності лімфоїдної тканини, а також зниженню маси тимуса та селезінки.</p> <p>Мікроскопічні дані, пов'язані з ритлецитинібом, охоплювали пов'язане із фармакологічним засобом зниження клітинності тимуса, селезінки, мезентеріальних лімфатичних вузлів і лімфоїдної тканини, пов'язаної зі слизовою оболонкою кишечника (GALT). Крім того, зниження клітинності кісткового мозку спостерігали в разі введення дози ≥ 300 мг/кг/добу, а вакуолізацію гепатоцитів і зменшення червоної пульпи селезінки спостерігали в разі введення дози 500 мг/кг/добу.</p> <p>Зниження клітинності тимуса було пов'язане з впливом ритлецитинібу на всіх тварин при введенні дози ≥ 125 мг/кг/добу. Тяжкість варіювалася від легкої до вираженої в разі введення дози 125 мг/кг/добу, від помірної до тяжкої при введенні дози 300 мг/кг/добу та рівномірно тяжкого ступеня з виснаженням майже всіх лімфоцитів і втратою чіткої коркової архітектури тимуса при введенні дози 500 мг/кг/добу. Ці виявлені порушення пояснюють зниження маси тимуса та виявлення під час розтину невеликих розмірів тимуса при введенні дози ≥ 125 мг/кг/добу.</p> <p>У селезінці тварин, яким вводили препарат у дозі 500 мг/кг/добу, спостерігали легке або помірне зниження клітинності білої пульпи (зниження клітинності лімфоїдної тканини) і зменшення червоної пульпи. Помірне зниження клітинності лімфоїдної тканини білої пульпи в селезінці спостерігали в 1 шура, якому вводили препарат у дозі 125 мг/кг/добу, але</p>
--	---

	<p>не спостерігали в жодного з щурів, яким вводили препарат у дозі 300 мг/кг/добу. Випадковою знахідкою було зниження клітинності селезінки в разі введення дози 125 мг/кг/добу, оскільки в жодній з решти тварин, які отримували дозу 125 або 300 мг/кг/добу, не було виявлено мікроскопічних змін у селезінці.</p> <p>Зменшення кількості лімфоцитів (зниження кількості лімфоцитів у корковому шарі) у мезентеріальному лімфатичному вузлі, пов'язане із застосуванням ритлечитинібу, було оцінене як зменшення легкого або помірного ступеня у всіх щурів, які отримували дозу 500 мг/кг/добу. Помірне зниження кількості лімфоцитів спостерігали в лімфатичному вузлі 1 щура в разі введення дози 125 мг/кг/добу та не спостерігали в жодній тварини в разі введення дози 300 мг/кг/добу. Зниження кількості лімфоцитів у мезентеріальному лімфатичному вузлі в 1 щура в разі введення дози 125 мг/кг/добу розцінювали як випадкову знахідку, пов'язану з індивідуальними відмінностями та (або) відмінностями в збиранні зразків.</p> <p>Варіації під час збирання зразків GALT ускладнювали оцінювання клітинності лімфоїдної тканини, тому зниження клітинності реєстрували як наявність або відсутність (норма). Зниження клітинності в GALT у 3 щурів в разі введення дози 500 мг/кг/добу було пов'язане із застосуванням ритлечитинібу. Зниження клітинності в 1 щура в разі введення дози 125 мг/кг/добу й 1 щура в разі введення дози 300 мг/кг/добу пояснювалося варіабельністю вибірки, і тільки результати, отримані в разі введення дози 500 мг/кг/добу, були чітко пов'язані з введенням ритлечитинібу.</p> <p>У 3 щурів, яким вводили препарат у дозі 300 мг/кг/добу, і 4 щурів, яким вводили 500 мг/кг/добу, спостерігалось мінімальне зниження клітинності (зниження клітинності всіх типів) кісткового мозку, пов'язане з ритлечитинібом. Зниження клітинності кісткового мозку характеризувалося збільшенням розширених судинних просторів, що призвело до зменшення кількості гемопоетичної тканини. Спостерігали всі лінії гемопоетичних клітин, дозрівання яких було визнано нормальним. Ці мінімальні результати відповідали показникам клінічного аналізу крові: більшій кількості нейтрофілів і відсутності впливу ритлечитинібу на показники еритроцитів.</p> <p>У печінці 3 щурів, яким вводили препарат у дозі 500 мг/кг/добу, спостерігали дифузну вакуолізацію цитоплазми гепатоцитів від мінімального до легкого ступеня тяжкості (вакуолізація гепатоцитів), яку розцінювали як підвищений вміст глікогену. Водночас у контрольних препаратах типової печінки забарвлення реактивом Шиффа було мінімальним, у цитоплазмі гепатоцитів щурів із вакуолізацією забарвлення реактивом Шиффа було вираженим, а під час оброблення діастазою воно зникало. Це гістохімічне фарбування підтвердило, що гепатоцелюлярна вакуолізація була спричинена підвищенням кількості глікогену. Жодних мікроскопічних ознак дегенерації, некрозу або запалення виявлено не було. При введенні максимальної дози 500 мг/кг/добу не реєструвалося жодних макроскопічних або мікроскопічних змін у ділянці колінного суглоба (зокрема з боку стегнової/великогомілкової кістки).</p> <p>Системна експозиція, яку оцінювали за середніми значеннями C_{max} і AUC_{24}, збільшувалася з підвищенням дози. У разі введення максимальної дози</p>
--	---

500 мг/кг/добу значення C_{max} і AUC_{24} становили 45 700 нг/мл і 308 000 нг • год/мл відповідно.

Отже, пероральне застосування ритлецитинібу один раз на добу протягом 14 днів продемонструвало переносимість у всіх досліджуваних дозах. Результати, пов'язані з очікуваною фармакологічною дією інгібітора JAK3/TEC (Leonard & Spolski, 2005; Leonard et al, 2019), проявлялися в разі введення дози ≥ 125 мг/кг/добу й охоплювали зниження рівня циркулюючих лейкоцитів і лімфоцитів, зниження рівня глобулінів, зниження маси селезінки та тимуса, зниження клітинності тимуса порівняно з контролем і зниження клітинності лімфоцитів у білій пульпі селезінки, корковому шарі мезентеріальних лімфатичних вузлів і GALT. Результати, явно не пов'язані з інгібуванням JAK3/TEC, охоплювали зниження рівня циркулюючих еозинофілів і підвищення рівня нейтрофілів при введенні дози ≥ 125 мг/кг/добу, мінімальне зниження клітинності кісткового мозку при введенні дози ≥ 300 мг/кг/добу, а також цитоплазматичну вакуолізацію (підвищення рівня глікогену) в гепатоцитах і зниження клітинності червоної пульпи селезінки при введенні дози 500 мг/кг/добу.

Література

Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gc family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity* 2019;50:832-50.

Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005;5:688-98.

2. 8-тижневе оцінювання токсичності та утворення мікроядер у щурів (дослідження 14GR132)

Ритлецитиніб (у формі малонатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу щурам лінії Wistar Han (по 10 особин кожної статі на групу; вік 9 тижнів) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в очищеній воді), 75 або 175 мг/кг/добу протягом 8 тижнів і 400 мг/кг/добу протягом 31 дня. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Зразки крові забирали в окремої сателітної групи тварин (по 3 особини кожної статі на групу дозування) в дні 1, 32 і 53 через 1, 3, 7 і 24 години після введення дози препарату для оцінювання ТК. Для оцінювання індукції утворення мікроядер на день 4 дослідження периферичну кров забирали в групі, що охоплювала по 5 тварин кожної статі з основного дослідження на дозу. Розтин тварин із груп, які отримували 0, 75 і 175 мг/кг/добу, проводили на день 57.

Досліджувані параметри та оцінювані кінцеві точки охоплювали клінічні ознаки, масу тіла, споживання корму, результати офтальмологічних досліджень, клініко-лабораторні параметри (клінічний і біохімічний аналіз крові й аналіз сечі), ТК, масу органів, а також результати макроскопічних і мікроскопічних досліджень.

Висока доза 400 мг/кг/добу була оцінена як непереносима. Три (3) тварини були вибірково піддані евтаназії на дні 10, 14 або 28 у зв'язку з ослабленням організму, зумовленим введенням ритлецитинібу (зниження маси тіла й погіршення клінічного стану, зокрема поява грубої шерсті, згорбленої пози, зниження тургору шкіри, зниження активності, поява червоних плям на шкірі та випадіння шерсті), а розтин решти тварин, які

вижили і яким вводили препарат у дозі 400 мг/кг/добу, був проведений на день 32. Показники клінічного аналізу крові оцінювали перед розтином.

Середні значення еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту були дещо нижчими в самців порівняно із середніми значеннями тварин контрольної групи; однак усі індивідуальні значення знаходилися в межах вихідних референтних діапазонів. Середній об'єм тромбоцитів, ширина розподілу еритроцитів і кількість ретикулоцитів були вищими за контрольні значення та корелювали з морфологічними спостереженнями, зумовленими застосуванням ритлечитинібу: виражений пойкилоцитоз (неоднорідність розміру та форми еритроцитів), ексцентроцити та пікноцити в мазках крові. Також реструвалися вищі середні значення нейтрофілів і моноцитів, нижчі середні значення лімфоцитів у самців і нижчі середні значення еозинофілів порівняно з контрольними значеннями, як показано нижче.

Відмінності показників клінічного аналізу крові, пов'язані із застосуванням ритлечитинібу (середні контрольні значення та відношення до контрольних середніх значень в день 32^a) у тварин, які отримували препарат у дозі 400 мг/кг/добу

Параметр	Самці		Самиці	
	0	400	0	400
Доза (мг/кг/добу)	0	400	0	400
Еритроцити (10 ⁶ /мкл)	8,6	0,92x	8,0	—
Гемоглобін (г/дл)	16	0,94x	15	—
Гематокрит (%)	48	0,96x	46	—
Ширина розподілу еритроцитів за об'ємом (%)	12	1,34x	10	1,41x
Ретикулоцити (10 ³ /мкл)	218	1,21x	209	1,38x
Середній об'єм тромбоцитів (fL)	8,2	1,32x	8,9	—
Нейтрофіли (10 ³ /мкл)	0,92	2,5x	0,49	3,7x
Лімфоцити (10 ³ /мкл)	3,9	0,68x	2,8	—
Моноцити (10 ³ /мкл)	0,14	1,56x	0,081	1,81x
Еозинофіли (10 ³ /мкл)	0,073	0,18x	0,046	0,35x

«—» — не пов'язано з ритлечитинібом.

Окремі референтні діапазони, згадані в тексті: Еритроцити 6,62–9,32 • 10⁶/мкл; гемоглобін 12,8–17,0 г/дл; гематокрит 37,6–50,3 %.

a. Наведено контрольні середні значення за день 57 і співвідношення результатів, пов'язаних із ритлечитинібом, на день 32 відносно контрольних середніх значень на день 57.

Підвищення кількості нейтрофілів і моноцитів з одночасним зниженням кількості лімфоцитів та еозинофілів вказувало на вторинну реакцію тварин на стрес; однак зниження кількості лімфоцитів та еозинофілів — очікуваний фармакологічний ефект, який спостерігався в разі введення нижчих доз, а фармакологічна дія ритлечитинібу (інгібування JAK3/TEC)

	<p>могла сприяти зміні кількості лімфоцитів та еозинофілів (Leonard & Spolski, 2005; Leonard et al, 2019).</p> <p>Результати мікроскопічних досліджень, пов'язані з введенням ритлечитинібу в дозі 400 мг/кг/добу, охоплювали зниження клітинності тимуса, селезінки, мезентеріальних лімфатичних вузлів і пахвинно-стегнових лімфатичних вузлів і відповідали передбачуваним фармакологічним механізмам (Leonard & Spolski, 2005; Ma et al, 2006). У всіх тварин, які отримували препарат у дозі 400 мг/кг/добу, спостерігалось сильне зниження клітинності лімфоцитів у тимусі, що характеризується невеликими ділянками функціонування тимуса, втратою майже всіх лімфоцитів із тимуса та відсутністю відмінностей між корковою та мозковою речовинами, що супроводжувалося невеликим розміром тимуса та спостерігалось макроскопічно у 2 самиць. Зменшення клітинності білої пульпи селезінки (особливо в маргінальній зоні) від легкого до вираженого ступеня та зниження клітинності мезентеріальних лімфатичних вузлів від легкого до вираженого ступеня, яке характеризувалося невеликою кількістю фолікулів, меншою кількістю фолікулів та (або) меншою кількістю лімфоцитів у паракортикальних ділянках і мозковій речовині, послідовно спостерігалось при введенні дози 400 мг/кг/добу.</p> <p>Інші результати мікроскопічних досліджень, пов'язані з ритлечитинібом, охоплювали зниження клітинності кісткового мозку від мінімального до важкого ступеня з виснаженням, що спричиняє виражене або тяжке зниження клітинності; мінімальне запалення слизової оболонки шлунково-кишкового тракту; зниження інцидентності еозинофільних інфільтратів у легенях; центрилобулярну гіпертрофію гепатоцитів у самиць; гепатоцелюлярну вакуолізацію в самців; а також вакуолізацію кори надниркових залоз в 1 самця.</p> <p>У 3 самиць, яким було проведено евтаназію до дня 32, та 1 самця спостерігалось виражене або тяжке зниження клітинності кісткового мозку (всі гемопоетичні лінії), пов'язане з ритлечитинібом; водночас у решти тварин, які отримували препарат у дозі 400 мг/кг/добу, клітинність не знижувалась або була мінімальною чи слабкою. Зниження клітинності кісткового мозку могло сприяти зниженню показників еритроцитів, лімфоцитів та еозинофілів.</p> <p>Пов'язане з ритлечитинібом мінімальне осередкове або мультифокальне запалення шлунково-кишкового тракту (шлунок, дванадцятипала кишка, тонка кишка, клубова та сліпа кишка), зазвичай пов'язане з присутністю нейтрофілів у шарі слизової оболонки, спостерігалось в кількох самиць та 1 самця в разі введення дози 400 мг/кг/добу. Дві самиці із запаленням шлунково-кишкового тракту були піддані евтаназії до дня 32, а 1 самець і 2 самиці були піддані евтаназії в день 32. Причина такого запалення була незрозумілою.</p> <p>У легенях тварин, які отримували препарат у дозі 400 мг/кг/добу, не спостерігалось еозинофільних інфільтратів, водночас еозинофіли спостерігалися в більшості тварин контрольної групи та були звичайною випадковою знахідкою в щурів у контрольній групі (McInnes, 2012). Відсутність еозинофілів була пов'язана із застосуванням ритлечитинібу.</p> <p>Мінімальна вакуолізація кори надниркових залоз (<i>zona fasciculata</i> та <i>zona reticularis</i>), спричинена дією ритлечитинібу, спостерігалася в 1 самця, який отримував дозу 400 мг/кг/добу. Цей результат був пов'язаний із</p>
--	--

застосуванням ритлецитинібу, оскільки аналогічні результати спостерігалися в самців, які отримували препарат у дозі 75 і 175 мг/кг/добу.

Зниження вмісту ліпідів в адипоцитах (іноді називається атрофією адипоцитів), що оточують мезентеріальні лімфатичні вузли, пов'язане із застосуванням ритлецитинібу, спостерігалось в 4 самиць при введенні дози 400 мг/кг/добу та було найпомітнішим у 3 самиць, яким був проведений розтин до дня 32 зі значущим зниженням маси тіла та несприятливими клінічними ознаками. Зниження рівня ліпідів вважали вторинним відносно зменшення приросту маси тіла та мобілізації ліпідів і не було безпосередньо пов'язане з інгібуванням JAK3/TEC.

Мінімальна перипортальна цитоплазматична вакуолізація гепатоцитів, пов'язана із застосуванням ритлецитинібу, спостерігалась в печінці у 2 з 10 самців, які отримували дозу 400 мг/кг/добу. Мінімальна центрилобулярна гіпертрофія гепатоцитів, пов'язана із застосуванням ритлецитинібу, спостерігалась в печінці у 6 з 10 самиць при введенні препарату в дозі 400 мг/кг/добу.

За результатами клінічного аналізу крові, макроскопічних і мікроскопічних досліджень не було встановлено конкретної причини зниження приросту маси тіла й появи несприятливих клінічних ознак у тварин, які отримували ритлецитиніб у дозі 400 мг/кг/добу. При введенні препарату в дозі 75 або 175 мг/кг/добу не було виявлено жодних побічних ефектів, зумовлених застосуванням ритлецитинібу.

Результати, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу, що узгоджуються з передбачуваним інгібуванням JAK3/TEC, охоплювали: зниження кількості циркулюючих лейкоцитів (0,44–0,59 від контрольних значень), лімфоцитів (0,25–0,50 від контрольних значень), моноцитів (0,65–0,89 від контрольних значень), еозинофілів (0,26–0,48 від контрольних значень) і базофілів (0,0–0,11 від контрольних значень) при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу; нижчу середню масу тимуса (0,31–0,47 від контрольних значень) і нижчу середню масу селезінки (0,73–0,81 від контрольних значень) при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу; невеликий розмір тимуса за результатами розтину в самиць, які отримували препарат у дозі 75 і 175 мг/кг/добу, і у самців, які отримували препарат у дозі 175 мг/кг/добу; а також зниження клітинності тимуса, селезінки та мезентеріальних лімфатичних вузлів при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу. Жоден із цих результатів, що спостерігалися в разі введення препарату в дозі 75 або 175 мг/кг/добу, не був визнаний несприятливим, оскільки не спостерігалось пов'язаних із ритлецитинібом клінічних ознак або результатів мікроскопічного дослідження, які б свідчили про збільшення частоти інфекцій або клінічно значущу імуносупресію.

Додаткові клініко-лабораторні параметри, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу, що не є побічною реакцією та явно не пов'язані з інгібуванням JAK3/TEC, охоплювали мікроскопічні аномалії еритроцитів (пойкілоцитоз, наявність ексцентроцитів і пікноцитів), що дають змогу припустити окисне ушкодження мембран еритроцитів (Stockham & Scott, 2002) в особин обох статей при введенні препарату в дозі 175 мг/кг/добу; вищу ширину розподілу еритроцитів і ретикулоцитів (1,20–1,22 від контрольних значень) в особин обох статей при введенні препарату в дозі 175 мг/кг/добу, що відповідало легкій регенеративній реакції еритроцитів на їхнє ушкодження; вищий середній об'єм тромбоцитів (1,11–1,28 від

контрольних значень) у самців при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу; нижчий середній рівень калію в сироватці крові (0,87–0,91 від контрольних значень) в особин обох статей при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу; нижчий середній рівень холестерину в сироватці крові у самців (в 0,78–0,79 від контрольних значень) при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу; і більший об'єм сечі (1,4–2,5 від контрольних значень) в особин обох статей при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу. Зниження абсолютної та відносної маси надниркових залоз, пов'язане із застосуванням ритлечитинібу, спостерігалось в самців при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу (0,72–0,95 від контрольних значень) і в самиць при введенні препарату в дозі 175 мг/кг/добу (0,84–0,89 від контрольних значень).

Інші пов'язані із застосуванням ритлечитинібу результати мікроскопічних досліджень, що не були оцінені як побічна реакція, охоплювали мінімальне зниження клітинності кісткового мозку (всі гемопоетичні лінії) і мінімальну вакуолізацію кори надниркових залоз у самців при введенні препарату в дозах 75 і 175 мг/кг/добу. При введенні препарату в дозах ≥ 75 мг/кг/добу не реєструвалося жодних макроскопічних або мікроскопічних змін у ділянці колінного суглоба (зокрема з боку стегнової/великогомілкової кістки).

Жоден із результатів досліджень, пов'язаних із ритлечитинібом, не був визнаний несприятливим з огляду на їхній мінімальний характер, відсутність відмінностей у показниках еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту (відносно пойкилоцитозу, ексцентроцитів, пікноцитів, ширини розподілу еритроцитів і ретикулоцитів), відсутність мікроскопічної дегенерації, некрозу або запалення у тканинах; та відсутність пов'язаних із ритлечитинібом клінічних ознак, які б указували на токсичність.

Тимчасове зниження середньої маси тіла, пов'язане із застосуванням ритлечитинібу, у самців, які отримували препарат у дозах 75 і 175 мг/кг/добу, супроводжувалося зниженням споживання корму; однак, оскільки ефект був короточасним, він не спричиняв побічних ефектів.

Ритлечитиніб не стимулював утворення мікроядер у ретикулоцитах периферичної крові самців і са миць тварин через 4 дні після введення препарату в дозі 75, 175 або 400 мг/кг/добу.

Системна експозиція, яку оцінювали за середніми значеннями C_{\max} і AUC_{24} , як правило, відповідала дозі (C_{\max}) або дещо перевищувала значення, пропорційні дозі (AUC_{24}), у діапазоні дозування від 75 до 175 мг/кг/добу в дні 1 і 53. Системна експозиція в день 53 (або день 32 при введенні препарату в дозі 400 мг/кг/добу) і в день 1 була аналогічною для всіх доз. Загалом відмінностей рівней експозиції, пов'язаних зі статтю, не спостерігалось. Середнє значення T_{\max} спостерігалось через 1 год після введення препарату в усіх дозах в обидва дні дослідження.

Отже, після перорального введення ритлечитинібу через шлунковий зонд один раз на добу дозу 175 мг/кг/добу було ідентифіковано як NOAEL на основі несприятливих клінічних ознак і зниження маси тіла, спостережуваної в разі введення дози 400 мг/кг/добу в цьому 56-денному дослідженні токсичності на щурах; відповідне значення C_{\max} на день 53 становило 24 200 нг/мл, а значення AUC_{24} — 79 300 нг • год/мл.

Література

Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gc family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity* 2019;50:832-50.

Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005;5:688-98.

Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006;24:657-79.

McInnes EF. Wistar and Sprague-Dawley rats. In: McInnes EF, ed. *Background lesions in laboratory animals: a color atlas (1st Edition)*: Saunders Elsevier;2012:17-36.

Stockham SL, Scott MA. Erythrocytes. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Ames, IA: Iowa State Press: 2002;103-4;131-2.

3. 6-місячне дослідження токсичності з 3-місячним періодом відновлення (дослідження 20070067)

Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу щурам лінії Wistar Han (віком приблизно 7 тижнів на початку дослідження; по 20 особин кожної статі на групу отримували дози 0 (розчинник) та 200 мг/кг/добу, по 15 особин кожної статі на групу отримували 50 та 100 мг/кг/добу) протягом 182 або 183 днів у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози), 50, 100 або 200 мг/кг/добу, з подальшим 3-місячним періодом відновлення для вибірки, до якої було включено по 5 щурів кожної статі з контрольної групи та групи, що отримувала дозу 200 мг/кг/добу. Розтин тварин проводили наприкінці фази дозування (дні 183/184) або фази відновлення (день 273).

Досліджувані параметри та оцінювані кінцеві точки охоплювали клінічні ознаки, масу тіла, споживання корму, результати офтальмологічних досліджень, клініко-лабораторні параметри (клінічний і біохімічний аналіз крові, глутатіон, аналіз сечі), ТК (по 3 щури/стать/дозу/момент часу в дні 91 і 176), масу органів, а також результати макроскопічних і мікроскопічних досліджень.

Побічних реакцій, пов'язаних із застосуванням ритлецитинібу, не реєструвалося для жодного з параметрів або жодної з кінцевих точок, що оцінювалися для будь-якої дози.

Ефекти, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу, що не є несприятливими, спостерігалися переважно в лімфоїдних органах (тимус, селезінка, мезентеріальні та пахвинні лімфатичні вузли) у поєднанні зі зниженням кількості циркулюючих лімфоцитів у крові.

Результати дослідження лімфоїдних органів, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу, охоплювали зниження середньої маси тимуса (0,61–0,16 від контрольних значень) у тварин, які отримували дозу ≥ 50 мг/кг/добу, що корелювало з невеликим розміром тимуса в самців, які отримували дозу ≥ 50 мг/кг/добу, і самиць, які отримували дозу ≥ 100 мг/кг/добу, і зниженням лімфоїдної клітинності від мінімального до важкого ступеня у тварин, які отримували дозу ≥ 50 мг/кг/добу; зниження середньої маси селезінки (0,89–0,78 від контрольних значень) у самців, які отримували дозу ≥ 50 мг/кг/добу, і самиць, які отримували дозу ≥ 100 мг/кг/добу, що корелювало зі зниженням лімфоїдної клітинності у тварин, які отримували

дозу ≥ 50 мг/кг/добу; мінімальне або помірне зниження лімфоїдної клітинності в мезентеріальних лімфатичних вузлах у тварин, які отримували 200 мг/кг/добу, а також мінімальне або легке зниження лімфоїдної клітинності в пахвинних лімфатичних вузлах у самиць, які отримували 200 мг/кг/добу. Зміни в лімфоїдних органах відповідали передбачуваному фармакологічному ефекту ритлечитинібу як інгібітора JAK3/TEC (Ma et al, 2006; Leonard et al, 2019), і повністю поверталися до норми після 3-місячної фази відновлення.

Згідно з даними мікроскопічного дослідження, лімфоїдні зміни корелювали зі зниженням рівня лімфоцитів у крові (0,86–0,37 від контрольних значень), які повністю поверталися до норми після фази відновлення. Зважаючи на відсутність результатів макроскопічних або мікроскопічних досліджень, що вказують на загострення інфекцій або клінічно значущу імуносупресію, результати досліджень лімфоїдних органів були визнані такими, що не є несприятливими.

Мінімальне зниження клітинності в кістковому мозку (грудина), пов'язане із застосуванням ритлечитинібу, було зареєстровано у тварин, які отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, але не спричинило побічних ефектів з огляду на мінімальний характер цього явища та відсутність несприятливих результатів мікроскопічного дослідження, пов'язаних із ритлечитинібом, які б указували на токсичність для кісткового мозку. Повне відновлення реєструвалося після закінчення фази відновлення.

У самців, які отримували препарат у дозі ≥ 50 мг/кг/добу, та в самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 100 мг/кг/добу, спостерігалось пов'язане з ритлечитинібом накопичення гіалінових крапель в епітеліальних клітинах ниркових каналців після закінчення фази введення препарату, але воно повністю минало після тримісячної фази відновлення. Гіалінові краплі мали різний розмір і були трохи більш еозинофільними в самців порівняно з краплями від еозинофільного або коричневатого забарвлення в самиць. У самців і самиць морфологічні характеристики та розташування крапель дещо різнилися. У самців накопичення гіалінових крапель реєструвалося переважно в цитоплазмі епітеліальних клітин проксимальних каналців кори, у меншій кількості вони були присутні в цитоплазмі клітин проксимальних каналців зовнішнього шару мозкової речовини. Однак у самиць краплі майже повністю обмежувалися цитоплазмою епітеліальних клітин проксимальних каналців зовнішнього шару мозкової речовини.

Було проведено спеціальне гістохімічне фарбування зразків, отриманих від 2 самців та 1 самиці з контрольної групи й 2 самців і 2 самиць з групи, яка отримувала препарат у дозі 200 мг/кг/добу. За характеристиками забарвлення та морфології гіалінові краплі в зовнішньому шарі мозкової речовини (як у самців, так і в самиць) вказували на ліпофусцин, а краплі в корковій речовині (тільки в самців) — на альфа₂μ-глобулін. Як правило, у проксимальному епітелії ниркових каналців у здорових щурів можна спостерігати низький рівень накопичення крапель гіаліну, кількість яких збільшується з віком і може збільшуватися під дією різних ксенобіотиків (Brunk & Terman, 2002), подібна картина спостерігалася і в щурів із паралельної контрольної групи; однак введення ритлечитинібу спричиняло збільшення частоти виявлення та тяжкості цих фонових змін у нирках, як показано в таблиці нижче.

Частота виявлення і тяжкість мікроскопічних порушень у нирках, пов'язаних із застосуванням ритлечитинібу, в групах — фаза введення препарату

	Самці (мг/кг/добу)				Самиці (мг/кг/добу)			
	0	50	100	200	0	50	100	200
Кількість досліджених	15	15	15	14	15	15	15	14
Нирка, акумуляція, гіалінові краплі: епітеліальні, трубчасті								
Мінімальний	4	12	13	5	1	1	7	10
Легкий	0	2	1	9	0	0	0	2

Вважається, що накопичення ліпофусцину в цитоплазмі проксимального епітелію каналців має обмежену функціональну або клінічну значущість для нирок або такої значущості взагалі не виявляється (Hard, 2008). У просвітах каналців не було виявлено циліндрів, ознак некрозу або запальної реакції. Цитоплазматичні гіалінові краплі, виявлені в самців щурів у проксимальному каналцевому епітелії коркового шару як у контрольній групі, так і в групі, що отримувала ритлечитиніб, відповідають альфа₂μ-глобуліну. Через низький ступінь тяжкості, відсутність тубулярних або гломерулярних патологічних змін, відсутність несприятливих клініко-лабораторних параметрів/клінічних результатів, які б корелювали з морфологічними змінами, накопичення гіалінових крапель у ниркових каналцях не було оцінене як побічна реакція.

Додаткові ефекти ритлечитинібу на лейкоцити порівняно з контрольною групою реєструвалися при введенні всіх доз, для всіх статей і в усіх часових точках під час фази введення препарату і полягали в зниженні кількості лейкоцитів (у 0,82–0,55 раза), моноцитів (у 0,89–0,76 раза), еозинофілів (у 0,92–0,41 раза) і базофілів (у 0,71–0,43 раза), а також у підвищенні кількості нейтрофілів (у 1,78–1,02 раза). Наприкінці фази відновлення реєструвалося повне повернення до норми. Відмінності щодо лейкоцитів порівняно з контрольною групою не були оцінені як побічна реакція, оскільки не було виявлено клінічно значущої імуносупресії відповідно до клінічних ознак та виявлених відхилень від норми результатів макро- і мікроскопічних досліджень.

Додаткові результати клінічного аналізу крові, пов'язані із застосуванням ритлечитинібу, були зареєстровані у тварин, які отримували ритлечитиніб, порівняно з контрольною групою, та охоплювали більш низьку (у 0,96–0,90 раза) масу еритроцитів на день 90/91 у самців і самиць, що отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, на день 183/184 у самців, що отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, та самиць, що отримували препарат у дозі ≥ 100 мг/кг/добу; вищу (в 1,27–1,13 раза) середню величину об'єму еритроцитів і ширину розподілу еритроцитів в обох часових точках під час фази введення препарату 200 мг/кг/добу в самців і самиць; мінімальну вищу (в 1,21–1,12 раза) абсолютна кількість ретикулоцитів на день 90/91 у самців, що отримували препарат у дозі ≥ 100 мг/кг/добу, та в самиць, що отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу; а також (на день 90/91) пойкилоцитоз від 1+ до 2+ та гіпохромазія у 3 самців та пойкилоцитоз 1+ у 3 самиць, що отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу. У мазках крові, взятих у дні 183/184 і 273, не спостерігалось ні пойкилоцитозу, ні гіпохромазії. Специфічна пойкилоцитозна морфологія переважала над ексцентроцитарною і пікноцитарною морфологією. Наприкінці фази відновлення реєструвалося повне повернення до норми.

Пов'язаний з ритлецитинібом вищий (в 1,31–1,11 раза) середній об'єм тромбоцитів порівняно із середнім значенням контрольної групи спостерігали на день 90/91 у самців, що отримували препарат у дозі 100 і 200 мг/кг/добу, і в самиць, що отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, а також на день 183/184 у самців, що отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу. Відповідного впливу ритлецитинібу на кількість тромбоцитів не спостерігалось, а повне повернення до норми було зареєстровано наприкінці фази відновлення. Вищі значення середнього об'єму тромбоцитів не були оцінені як побічна реакція, оскільки їхня величина була невеликою, кількість тромбоцитів не зменшувалася, а під час клінічного спостереження та макроскопічних або мікроскопічних досліджень не було виявлено жодних ознак дисфункції тромбоцитів. Мінімально більший середній об'єм тромбоцитів у поєднанні з виникненням пойкилоцитозу еритроцитів і вищою кількістю ретикулоцитів на день 90/91, але не на день 183/184, узгоджується з мінімально підвищеним виснаженням еритроцитів, спричиненим окисним ушкодженням, з відповідною регенеративною реакцією еритроїдної лінії та підвищеним виробленням тромбоцитів, пов'язаним із фізіологічним підвищенням еритропоєтину (Stohlawetz et al, 2000).

Результати клінічного біохімічного аналізу, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу, охоплювали зниження (в 0,72–0,92 раза) показників АСТ і калію (в 0,82–0,93 раза) в дні 90/91 і 183/184 в самців і самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 50 мг/кг/добу, порівняно з тваринами з контрольної групи. Наприкінці фази відновлення реєструвалося повне повернення до норми. Зниження рівнів АСТ не були оцінені як побічна реакція, оскільки зміни були незначними, а полярність відмінностей не відповідала результатам мікроскопічного дослідження. Знижені значення калію не були оцінені як побічна реакція, оскільки величина середніх відмінностей порівняно з контрольною групою була незначною, і, за результатами біохімічних, макроскопічних або мікроскопічних досліджень, не виникало жодних побічних реакцій, які були би пов'язані з ритлецитинібом.

Додаткові біохімічні дані, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу, в обидві часові точки охоплювали нижчий рівень тригліцеридів (0,54–0,89 від контрольних значень) у тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 100 мг/кг/добу, та нижчий рівень глюкози (0,83–0,92 від контрольних значень) у самиць, яким вводили препарат у дозі ≥ 50 мг/кг/добу, і самців, яким вводили препарат у дозі 200 мг/кг/добу. Вплив на тригліцериди та глюкозу не був оцінений як побічна реакція, оскільки не було виявлено відповідних побічних реакцій за результатами клінічного спостереження, клініко-лабораторними параметрами, результатами макроскопічних або мікроскопічних досліджень, а також доказів негативного впливу на здоров'я тварин.

Зміни в аналізах сечі, спричинені застосуванням ритлецитинібу, полягали в підвищенні рівня білка у сечі (2+) у самців, які отримували препарат у дозі ≥ 50 мг/кг/добу на день 90/91; однак на день 183/184 частота випадків цього явища знизилася. Наприкінці 3-місячної фази відновлення білок у сечі на рівні 2+ все ще виявлявся в групі, що отримувала препарат у дозі 200 мг/кг/добу. Оскільки частота випадків виявлення білка в сечі на рівні 2+ знизилася за період з дня 90/91 до дня 183/184, а ступінь протеїнурії не збільшився, а навпаки, зменшився в деяких тварин, та не було відповідних несприятливих клініко-лабораторних змін, клінічних ознак або результатів

мікроскопічних досліджень, які б указували на пошкодження нирок, цей результат не вважали побічною реакцією.

Зниження середнього приросту маси тіла, пов'язане із застосуванням ритлечитинібу, у самців і самиць, які отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, призвело до того, що наприкінці фази введення препарату їхня абсолютна маса тіла відносилася до маси тіла тварин в контрольній групі як 0,9. Абсолютна маса тіла самців, які отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, наприкінці фази відновлення була зіставною з такою в контрольній групі; проте абсолютна маса тіла самиць, які отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, відносилася до маси тіла тварин в контрольній групі як 0,9. Вплив на масу тіла не був оцінений як побічна реакція через низьку величину. У разі введення максимальної дози 200 мг/кг/добу не було зареєстровано жодних макроскопічних або мікроскопічних змін у стегновій/великогомілковій кістках.

Системна експозиція, оцінювана за середнім значенням C_{max} та середнім значенням AUC_{24} , збільшувалася приблизно пропорційно до збільшення дози в дні 91 та 176. Не було виявлено різниці в системній експозиції між днями 91 і 176, а також відмінностей у системній експозиції між групами дозування за статевою ознакою.

Отже, пероральне застосування ритлечитинібу в щурів один раз на добу упродовж щонайменше 182 днів у дозах 50, 100 або 200 мг/кг/добу призводило до реакції переважно з боку лімфоїдних органів (тимус, селезінка, мезентеріальні та пахвинні лімфатичні вузли), що не була оцінена як побічна, та супроводжувалося зниженням кількості циркулюючих лімфоцитів у крові. Ці результати відповідали передбачуваному інгібуванню JAK3/TEC і повністю поверталися до норми через 3 місяці фази відновлення. Додаткові оборотні зміни, пов'язані із застосуванням ритлечитинібу, не оцінені як побічна реакція, охоплювали мікроскопічні зміни в кістковому мозку (грудина) та нирках, а також виявлення пойкилоцитозу еритроцитів і підвищення кількості ретикулоцитів. За результатами обстежень, що не були оцінені як побічна реакція, показник NOAEL становив 200 мг/кг/добу та був найвищою випробуваною дозою; відповідне середнє значення C_{max} становило 25 100 нг/мл, а AUC_{24} — 80 100 нг • год/мл.

Література

Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biol and Med* 2002;33(5):611-19.

Hard GC. Some aids to histological recognition of hyaline droplet nephropathy in ninety- day toxicity studies. *Toxicol Pathol* 2008;36:1014-17.

Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gc family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity* 2019;50:832-50.

Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006;24:657-79.

Stohlawetz PJ, Dzirlo L, Hergovich N, et al. Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood* 2000;95(9):2983-89.

4. 15-денне пошукове дослідження токсичності на собаках (дослідження 13LJ111)

Ритлецитиніб (у формі вільної основи) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу собакам породи бігль (по 1 або 2 особини кожної статі на групу; вік > 8 місяців) у дозі 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у деіонізованій воді, рН 3), 15, 45 або 75 мг/кг/добу упродовж 15 днів, включно з днем розтину (день 15). Об'єм дози становив 5 мл/кг.

Здійснювали моніторинг клінічних ознак і маси тіла. Дані щодо стану серцево-судинної системи збирали методом зовнішньої телеметрії за допомогою фіксувального корсета (JET) у тварин із контрольної групи та групи, яка отримувала дозу 45 мг/кг/добу, до початку введення дози, а також у дні 2, 8 і 12 приблизно за 2 години до введення дози та через 22 години після введення дози. Зразки плазми крові для визначення концентрації ритлецитинібу отримували через 6 годин після введення препарату в дні дослідження серцево-судинної системи за допомогою технології JET. Показники клінічного та біохімічного аналізу крові визначали до початку введення препарату та після його закінчення. Концентрації ритлецитинібу в плазмі крові вимірювали в дні проведення JET через 6 годин після введення дози. Дані для отримання повного ТК-профілю збирали у всіх тварин у дні 1 і 14 в часових точках 0, 1, 3, 7 і 24 години після введення препарату. На день 15 по 1 собаці кожної статі з кожної групи дозування піддали розтину; отримані тканини досліджували макро- та мікроскопічно.

Єдині клінічні ознаки, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу, в цьому дослідженні реєструвалися з боку ШКТ, зокрема м'які/водянисті випорожнення (від мінімального до легкого ступеня) в разі введення дози ≥ 45 мг/кг/добу. Блювання (мінімального ступеня) спостерігалося в групах, які отримували препарат у дозах 0, 15 і 75 мг/кг/добу, що могло бути не пов'язаним із застосуванням ритлецитинібу, оскільки в самиці собаки з контрольної групи на день 4 дослідження також спостерігалося блювання.

Зниження кількості циркулюючих лімфоцитів порівняно з вихідним рівнем, пов'язане із застосуванням ритлецитинібу та не пов'язане з дозою, реєструвалося для всіх доз на день 15 (у 0,75, 0,89–0,96 і 0,64–0,75 раза для доз 15, 45 і 75 мг/кг/добу відповідно). Зниження кількості циркулюючих лімфоцитів було фармакологічно пов'язане з мікроскопічними спостереженнями зниження клітинності в селезінці та тимусі.

При введенні дози ≥ 45 мг/кг/добу в тимусі та селезінці тварин були виявлені мікроскопічні зміни. Зниження лімфоїдної клітинності коркової речовини в тимусі (від легкого до помірного ступеня в разі введення дози 45 мг/кг/добу; помірного ступеня в разі введення дози 75 мг/кг/добу) корелювало з макроскопічними знахідками, які свідчили про малий розмір тимуса. Мінімальне зниження лімфоїдної клітинності білої пульпи в селезінці спостерігалося в разі введення дози ≥ 45 мг/кг/добу. Макроскопічних або мікроскопічних змін у великогомілковій кістці не було виявлено в разі введення максимальної дози 75 мг/кг/добу.

Вплив на лімфоїдні тканини та циркулюючі лімфоцити свідчив про фармакологічне інгібування передачі сигналів через JAK3 ритлецитинібом (Leonard & Spolski, 2005; Ma et al, 2006; Leonard et al, 2019).

При введенні препарату в дозі 45 мг/кг/добу реєстрували пов'язане з ритлецитинібом зниження середнього, систолічного та діастолічного АТ (від -6 до -25 мм рт. ст.) і зниження ЧСС (від -10 до -18 уд./хв) із вторинним збільшенням інтервалу PR (від +5 до +7 мс). Жодного впливу на QRS, QT, QTc або активність не спостерігалось.

Концентрація препарату в плазмі крові через 6 год після введення в дні 2, 8 і 12 становила 1040, 1150 і 1300 нг/мл відповідно. Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} та AUC, демонструє приблизно лінійну залежність експозиції від дози. Відмінностей за статевою ознакою не спостерігалось. Системна експозиція в дні 1 і 14 не відрізнялася. Значення C_{max} та AUC₂₄ препарату в об'єднаній групі особин обох статей на день 14 становили 21 400 нг/мл і 64 000 нг • год/мл відповідно.

Отже, зроблено висновок про переносимість перорального застосування ритлецитинібу собаками породи бігль аж до максимальної дози 75 мг/кг/добу в щоденному режимі протягом 15 днів. Реєструвалося пов'язане із застосуванням ритлецитинібу зниження артеріального тиску і ЧСС, зменшення кількості лімфоїдних клітин у селезінці та тимусі для дози ≥ 45 мг/кг/добу, а також зниження кількості циркулюючих лімфоцитів для всіх доз. Вплив на лімфоїдні тканини та циркулюючі лімфоцити свідчив про фармакологічне пригнічення передачі сигналів через JAK3 ритлецитинібом.

Література

Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005;5:688-98.

Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gc family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity* 2019;50:832-50.

Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006;24:657-79.

5. 8-тижневе дослідження токсичності на собаках (дослідження 14GR135)

Ритлецитиніб (у формі малонатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу собакам породи бігль (по 3 особини кожної статі на групу; вік > 8 місяців) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в очищеній воді) 5, 15 або 45 мг/кг/добу протягом 8 тижнів. Об'єм дози становив 5 мл/кг. На день 57 здійснювали розтин тварин.

Досліджувані параметри та оцінювані кінцеві точки охоплювали клінічні ознаки, масу тіла, якісне споживання корму, результати офтальмологічних досліджень, електрокардіограми, клініко-лабораторні параметри (показники клінічного й біохімічного аналізу крові, коагулограми, аналізу сечі), масу органів, а також результати макроскопічних і мікроскопічних досліджень. Зразки крові для імунофенотипування забирали перед дослідженням і в день 57. Зразки крові для ТК аналізу забирали в дні 1 і 54 через 1, 3, 7 і 24 години після введення дози препарату.

Пов'язані із застосуванням ритлецитинібу ефекти, що не були оцінені як побічні, спостерігалися з боку кінцевих точок клінічного аналізу крові, імунофенотипування, мікроскопічних, серцево-судинних і клінічних кінцевих точок.

Пов'язане з ритлецитинібом і, як правило, дозозалежне зниження кількості циркулюючих лімфоцитів (0,50–0,87 від вихідного рівня), загальної кількості Т-клітин (0,20–0,73 від вихідного рівня), Т-хелперів (0,18–0,63 від вихідного рівня), цитотоксичних Т-клітин (0,23–0,65 від вихідного рівня) і НК (0,07–0,69 від вихідного рівня) спостерігалися в разі введення дози ≥ 5 мг/кг/добу, а зниження кількості В-клітин (0,47–0,61 від вихідного рівня) відбувалося в разі введення дози 45 мг/кг/добу.

У разі введення дози ≥ 15 мг/кг/добу зниження лімфоїдної клітинності, пов'язане із застосуванням ритлецитинібу, реєструвалося в тимусі (від легкого до важкого ступеня) та мезентеріальних лімфатичних вузлах (від мінімального до помірного ступеня) та відповідало впливу на циркулюючі лімфоцити, Т-клітини, НК та В-клітини. Цей вплив відповідав передбачуваному фармакологічному інгібуванню JAK3/TEC (Leonard & Spolski, 2005; Leonard et al, 2019; Erickson et al, 2017) і не був оцінений як побічна реакція за відсутності потенційних вторинних ефектів імуномодуляторної дії, наприклад інфекцій.

У групі дози 45 мг/кг/добу в 1 самиці реєструвалося пов'язане із застосуванням ритлецитинібу зниження клітинності всіх гемопоетичних ліній у кістковому мозку. Зниження клітинності кісткового мозку не було несприятливим, оскільки не супроводжувалося зменшенням кількості циркулюючих еритроцитів, нейтрофілів, моноцитів або тромбоцитів.

У разі введення дози ≥ 5 мг/кг/добу реєструвалося збільшення інцидентності та (або) вираженості вакуолізації кори надниркових залоз у *zona glomerulosa* порівняно з контрольною групою. Вакуолізація *zona glomerulosa* не була оцінена як побічна реакція, оскільки не супроводжувалася атрофією, дегенерацією, некрозом або запаленням, не була пов'язана з електролітними порушеннями або змінами показників аналізу сечі та була звичайною фоною зміною в собак породи бігль (Sato et al, 2012).

У разі порівнянні показників до та після введення дози препарату пов'язане із застосуванням ритлецитинібу підвищення ЧСС і вторинне до цього зниження інтервалів PR і QT на день 53, що не були оцінені як побічні реакції, відбувалося в групі дозування 45 мг/кг/добу. Ці зміни не були оцінені як побічні реакції, оскільки в серці та судинній системі не було відповідних мікроскопічних змін.

Пов'язане з ритлецитинібом збільшення інцидентності та частоти (кількість днів) виникнення блювання в разі введення дози ≥ 5 мг/кг/добу (залежний від дози), а також слизових і забарвлених у червоний колір випорожнень у самців в разі введення дози 45 мг/кг/добу порівняно з контрольною групою. З огляду на відсутність зв'язку з іншими кінцевими точками дослідження, зокрема масою тіла, споживанням корму, клініко-лабораторними параметрами або мікроскопічними змінами в шлунково-кишковому тракті, спостережувані зміни випорожнень і блювання не були оцінені як побічні реакції. Макроскопічних і мікроскопічних змін у великогомілковій кістці за будь-якої дози виявлено не було.

У цьому дослідженні у всіх тварин із усіх груп дозування мікроскопічно досліджували зрізи стовбура мозку (довгастого мозку), що включають ядро оливи, а аксональна дистрофія, зареєстрована в 9-місячних дослідженнях, не була очевидною.

Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} та AUC_{24} у дні 1 та 54, збільшувалася залежно від дози пропорційно до C_{max} та дещо більше, ніж пропорційно до дози, для AUC_{24} . Загалом відмінностей рівней експозиції, пов'язаних зі статтю, не спостерігалось. Середнє значення T_{max} у дні 1 та 54 реєструвалося через 1–1,3 години після введення препарату. Системна експозиція в дні 1 і 54 була аналогічною.

На підставі відсутності побічних реакцій на препарат у найвищій дозі, випробуваній у 8-тижневому дослідженні токсичності на собаках, доза 45 мг/кг/добу визначалася як NOAEL з C_{max} 14 600 нг/мл і AUC_{24} 53 800 нг • год/мл.

Література

Erickson RI, Schutt LK, Tarrant JM, et al. Bruton's tyrosine kinase small molecule inhibitors induce a distinct pancreatic toxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2017;360(1):226-38.

Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gc family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity* 2019;50:832-50.

Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005;5:688-98.

Sato J, Doi T, Wako Y et al. Histopathology of incidental findings in beagles used in toxicity studies. *J Toxicol Pathol* 2012;25(1):103-34.

6. 9-місячне дослідження токсичності з 3-місячним періодом відновлення на собаках (дослідження 20070068)

Вибір дози для цього дослідження був заснований на результатах 8-тижневого основного дослідження токсичності, в якому NOAEL становила 45 мг/кг/добу, але спричиняла ефекти, які потенційно могли посилюватися зі збільшенням тривалості застосування.

Ритлцитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу собакам породи бігль (по 4 або 6 особин кожної статі на групу; вік 11–12 місяців) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в деіонізованій воді зі зворотним осмосом), 5, 20 або 40 мг/кг/добу впродовж 273 днів із подальшою 3-місячною фазою відновлення без введення дози із залученням по 2 тварини кожної статі до контрольної групи та групи, яка отримувала препарат у дозі 40 мг/кг/добу. Об'єм дози становив 1 мл/кг. Розтин тварин проводили наприкінці фази дозування (по 4 особини кожної статі на групу дозування; дні 274/275) і фази відновлення (по 2 тварини кожної статі в групах дозування 0 і 40 мг/кг/добу; день 365).

Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали клінічні ознаки, масу тіла, приріст маси тіла, споживання корму, результати офтальмологічних досліджень, електрокардіографії, клініко-лабораторні параметри (показники клінічного й біохімічного аналізу крові, коагулограми, аналізу сечі), імунофенотипування, ТК, масу органів, а також результати макроскопічних і мікроскопічних досліджень.

Тестування акустичного стовбурового викликаного потенціалу (BAEP) було проведене в день 85 фази відновлення для вивчення потенційних функціональних ефектів, які могли бути пов'язані з аксональною дистрофією, виявленою мікроскопічно у тварин у фазі введення препарату. Було проведено трансмісійне електронне мікроскопічне дослідження

верхнього ядра оливи (SON) і кохлеарного ядра із залишків стовбура мозку обраних тварин для подальшого вивчення результатів дослідження SON у фазах дозування та відновлення.

Побічні ефекти, пов'язані з ритлецитинібом, охоплювали двосторонню аксональну дистрофію в стовбурі мозку у тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу, і побічну реакцію у формі надмірної імуносупресії, про що свідчив розвиток системної інфекції шкіри, яка потребувала лікування ветеринаром, у тварин у фазі відновлення, які отримували препарат у дозі 40 мг/кг/добу. Аксональна дистрофія, виявлена методом світлової мікроскопії, супроводжувалася втратою слуху від легкого до тяжкого ступеня та деформацією хвиль у тесті ВАЕР у 2 самців у фазі відновлення, які отримували препарат у дозі 40 мг/кг/добу.

Дозозалежне збільшення інцидентності та (або) тяжкості (від мінімального до помірного ступеня) аксональної дистрофії (набряк; сфероїди), пов'язане із застосуванням ритлецитинібу й оцінене як побічна реакція, спостерігалася в ядрі оливи стовбура мозку в самців і самиць собак, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу. Аксональна дистрофія характеризувалася наявністю еозинофільних структур від округлої до овоїдної форми із зернистою або склоподібною текстурою в центрі (сфероїди). У більшості собак із такою знахідкою ядро було уражене з двох сторін. Для порівняння, в 1 собаки з контрольної групи кількість сфероїдів у цій анатомічній ділянці була мінімальною, що відповідає опублікованим даним про те, що аксональні сфероїди можуть спостерігатися як вікова зміна в цій та інших ділянках ЦНС собак (Pardo et al, 2020; Borrás et al, 1999; Slayter et al, 1998; Suzuki & Suu, 1978).

Ядра оливи мають як моторні, так і слухові проєкції, і хоча в цьому дослідженні не було зареєстровано клінічних ознак, що могли б вказувати на функціональний дефіцит, пов'язаний з ураженням, тестування слухової системи не проводили ні до дослідження, ні під час фази введення препарату. Наприкінці 3-місячної фази відновлення в 1 самця та 2 самиць спостерігалася осередкова, мінімальна, одностороння аксональна дистрофія в ділянці верхнього ядра оливи, а тестування ВАЕР, проведене на всіх тваринах, виявило втрату слуху тяжкого чи легкого ступеня та деформацію хвиль в обох самців, яким вводили 40 мг/кг/добу, що свідчить про часткове відновлення. Отже, аксональна дистрофія є пов'язаним із застосуванням ритлецитинібу загостренням фонового захворювання і водночас побічною реакцією через збільшення інцидентності та (або) тяжкості захворювання зі збільшенням дози, здебільшого двостороннього характеру ураження, а також функціональних показників у тварин у фазі відновлення, які підтверджують порушення з боку органа слуху.

Трансмійсна електронна мікроскопія, проведена на зразках SON і кохлеарного ядра, узятих в окремих собак під час фаз введення препарату і відновлення, продемонструвала пов'язане з ритлецитинібом збільшення аксосоматичного ущільнення, яке часто виявлялося в SON — у 2 із 2 собак наприкінці фази введення препарату після введення препарату в дозі 40 мг/кг/добу, — але не було виявлено в SON собаки з контрольної групи, обраного для обстеження (1 з 1). У цих збільшених структурах містилися широко розставлені мітохондрії, пухкі клубки лінійних ниток діаметром близько 10 нм, які були витлумачені як нейрофіламенти, і погано розмежовані немембранні овальні або сферичні структури, що мали помірну електронну щільність, були поодинокими або такими, що зливаються одна з одною, з гомогенним внутрішнім виглядом без

подальшої видимої внутрішньої організації. Синапси між цими збільшеними ділянками ущільнення та тілами сусідніх нейронів були морфологічно інтактними. Збільшення аксосоматичного ущільнення не спостерігалось в 3 із 3 собак, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу й обстежували наприкінці 3-місячної фази відновлення. У ЦНС собак, яким вводили ритлечитиніб, у кінці фази дозування або у фазі відновлення не було виявлено жодних ультраструктурних змін, а синапси до тіл нейронів були морфологічно інтактними.

У 2 самців і 1 самиці, які отримували препарат у дозі 40 мг/кг/добу, спостерігалось пов'язане із застосуванням ритлечитинібу почервоніння шкіри та осередкові струпи/папули, які характеризувалися осередковим, хронічним активним запаленням, від легкого до вираженого ступеня, представленого макрофагами, мононуклеарними клітинами та гранулоцитами, які часто виявлялися у волосяних фолікулах, а також акантозом і гіперкератозом у розташованих вище шарах епітелію. У 2 уражених самців реєструвалося осередкове запалення помірного або вираженого ступеня, а в уражених волосяних фолікулах виявлялися базофільні паразитарні структури (імовірно, кліщі роду *Demodex*). Аналогічна картина ураження волосяних фолікулів спостерігалася і в ураженої самиці, проте інтенсивність запалення була меншою і кліщів не спостерігалось. В ураженої самиці також спостерігалось незначне збільшення кількості лейкоцитів (1,95 від вихідного рівня), що здебільшого зумовлено збільшенням кількості нейтрофілів (2,62 від вихідного рівня) і збільшенням фібриногену (2,48 від вихідного рівня) в день 274, що, на думку спеціалістів, пов'язано із осередковим запаленням у цьому місці. Ці зміни в шкірі були пов'язані з пригніченням імунітету через зниження кількості лімфоцитів.

Після припинення введення препарату приблизно на 15-й день фази відновлення клінічні прояви з боку шкірних покривів прогресували за ступенем тяжкості та охоплювали генералізоване почервоніння шкіри, стоншення шерстяного покриву, лущення або жирність шкіри, міжпальцеві кісти (IDC) та вушні інфекції, які потребували втручання ветеринара із застосуванням як протипаразитарних засобів, так і антибактеріальних препаратів широкого спектра дії. Хоча мікроскопічні прояви з боку шкіри у тварин наприкінці фази введення препарату не вважаються побічними реакціями через невеликий, локалізований прояв на той момент, системний прояв, який розвинувся з боку шкіри в собак у фазі відновлення, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу, вказує на надмірну імуносупресію, тому надмірна імуносупресія та пов'язаний з нею клінічний стан шкіри вважаються побічними реакціями. Шкірні висипання минули в кінці періоду відновлення, про що свідчить відсутність макроскопічних або мікроскопічних ознак інфекції.

Мікроскопічні зміни, що не є побічними реакціями, пов'язані із застосуванням ритлечитинібу, охоплювали зниження лімфоїдної клітинності в тимусі, селезінці, GALT, мезентеріальних і підколінних лімфатичних вузлах у тварин, які отримували препарат у дозі ≥ 5 мг/кг/добу; зниження клітинності кісткового мозку (грудини) у тварин, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу; і невеликі осередки локалізованого хронічного запалення змішаного складу в легенях у тварин, які отримували препарат у дозі 40 мг/кг/добу.

Мінімальне або помірне зниження клітинності лімфоїдної тканини відбулося у корковому шарі тимуса та коркових ділянках мезентеріальних і

підколінних лімфатичних вузлів у самців та (або) самиць собак, які отримували препарат у дозі ≥ 5 мг/кг/добу. Кортикальний шар тимуса був зменшений у розмірі та клітинності в уражених собак з мінімальним впливом на мозковий шар. В уражених лімфатичних вузлах кортикальні фолікули були меншими, ніж у контрольних групах, а паракортикальна ділянка була стоншеною. Мінімальне або легке зниження клітинності лімфоїдної тканини спостерігалось також у фолікулах білої пульпи селезінки та GALT у самців за всіх доз та в самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу. Ці дані корелювали зі зменшенням абсолютної та відносної (співвідношення маси органа до маси тіла або головного мозку) маси селезінки в самців і самиць, які отримували препарат у дозі 40 мг/кг/добу, а також зі зменшенням кількості циркулюючих лімфоцитів. Зниження лімфоїдної клітинності в лімфоїдних органах пов'язане з фармакологією ритлечитинібу та не є побічною реакцією, оскільки воно не супроводжувалося несприятливими клініко-лабораторними параметрами або несприятливими макроскопічними чи мікроскопічними змінами, які вказували б на системне ушкодження тканин або інфекцію.

У кістковому мозку (грудина) у 2 самців у кожній групі, які отримували дози 20 і 40 мг/кг/добу, спостерігалось пов'язане із застосуванням ритлечитинібу мінімальне зниження клітинності (всіх типів), яке не було оцінене як побічна реакція. Були наявні всі елементи кісткового мозку, ознак некрозу або крововиливу не спостерігалось. Ця зміна не є побічною реакцією з огляду на її мінімальну величину, а також через те, що не було виявлено жодних несприятливих клініко-лабораторних параметрів, макроскопічних або мікроскопічних змін, які б свідчили про токсичне ураження кісткового мозку (наприклад, крововиливів або системної інфекції/запалення).

У легенях в одного самця та однієї самиці собаки, яким вводили дозу 40 мг/кг на добу, спостерігалися пов'язані із застосуванням ритлечитинібу осередки мінімального або слабкого хронічного запалення змішаного клітинного складу, що не були оцінені як побічна реакція. Ця мікроскопічна картина характеризувалася наявністю запальних інфільтратів змішаного клітинного складу в альвеолярних просвітах і стінках, які склалися з макрофагів, мононуклеарних клітин і нейтрофілів, які чергувалися з багатоосередковими ділянками потовщення альвеолярних стінок. Ці ураження відповідали макроскопічному виявленню аномальних осередків у легенях в обох собак. Ця знахідка в легенях пов'язана із застосуванням ритлечитинібу, але сама по собі не є побічною реакцією через невелику площу ураженої тканини, мінімальний або легкий ступінь тяжкості та відсутність супутніх клінічних ознак.

Наприкінці фази відновлення у тканинах-мішенях тварин не було виявлено жодних мікроскопічних змін, пов'язаних із застосуванням ритлечитинібу, що вказує на повну оборотність інших ефектів, пов'язаних із застосуванням ритлечитинібу, виявлених під час фази введення препарату. Середня абсолютна і відносна (маса органа по відношенню до маси тіла або головного мозку) маса селезінки залишалася зниженою наприкінці фази відновлення тільки в самців; однак це було значною мірою зумовлено нижчими значеннями в одного самця, тож можна сказати, що маса селезінки частково повернулася до норми наприкінці 3-місячної фази відновлення.

У фазі введення препарату спостерігалось пов'язане із застосуванням ритлечитинібу дозозалежне зниження рівня лімфоцитів, базофілів та еозинофілів, що не було оцінене як побічна реакція. Зниження циркулюючих лімфоцитів (0,41–0,65 від вихідного рівня в самців, 0,33–0,62 від вихідного рівня в самиць), яке спостерігали в дні 87 і 274 введення всіх доз, корелювало зі зменшенням маси селезінки та зниженням лімфоїдної клітинності в лімфоїдних органах у деяких групах. Зниження кількості базофілів спостерігалось в самців, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу (в 0,54–0,75 від вихідного рівня), і в самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 5 мг/кг/добу (0,42–0,85 від вихідного рівня). Зниження кількості еозинофілів (0,47–0,6 від вихідного рівня) також спостерігалось тільки в самців у дні 87 і 274 за введення всіх доз. Зниження рівня лімфоцитів пов'язане з фармакологією ритлечитинібу. Зміни в кількості лімфоцитів, базофілів та еозинофілів не були оцінені як побічна реакція через незначну величину та відсутність мікроскопічних або макроскопічних ознак системної інфекції.

Спостерігалось пов'язане з ритлечитинібом, не оцінене як побічна реакція, незалежне від дози збільшення середньої кількості лейкоцитів, нейтрофілів і моноцитів. Збільшення кількості лейкоцитів (1,11–1,15 від вихідного рівня в самців, 1,33–1,49 від вихідного рівня в самиць) було зумовлене переважно збільшенням кількості нейтрофілів (1,46–1,47 від вихідного рівня в самців, 1,46–2,0 від вихідного рівня в самиць), що спостерігалось в самців, які отримували препарат у дозі 40 мг/кг/добу, та самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу в дні 87 та (або) 274. Збільшення кількості лейкоцитів і нейтрофілів не прогресувало з часом і зазвичай було подібним у дні 87 і 274 для самців і самиць. Збільшення кількості моноцитів також спостерігалось в дні 87 та (або) 274 в самців (1,21–1,26 від вихідного рівня) і самиць (1,42–1,73 від вихідного рівня), яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу. Ці зміни в кількості лейкоцитів, нейтрофілів і моноцитів не були оцінені як побічна реакція через незначну величину та відсутність мікроскопічних або макроскопічних ознак системної інфекції.

У самців і самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу, спостерігалось пов'язане з ритлечитинібом, не оцінене як побічна реакція дозозалежне зниження рівня еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту, а також ретикулоцитів у самців і самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 5 мг/кг/добу, в дні 87 та (або) 274. Величина зниження числа еритроцитів (0,78–0,92 від вихідного рівня в самців, 0,83–0,91 від вихідного рівня в самиць), гемоглобіну (0,72–0,89 від вихідного рівня в самців, 0,78–0,84 від вихідного рівня в самиць), гематокриту (0,77–0,91 від вихідного рівня в самців, 0,84–0,89 від вихідного рівня в самиць) та ретикулоцитів (0,36–0,76 від вихідного рівня в самців, 0,68–0,80 від вихідного рівня в самиць) була незначною. Середні значення еритроцитів, гемоглобіну, гематокриту та ретикулоцитів у групах, як правило, були однаковими в дні 87 і 274.

Дозозалежне збільшення числа тромбоцитів, пов'язане з ритлечитинібом (1,18–1,34 відносно вихідного рівня в самців, 1,15–1,42 відносно вихідного рівня в самиць), спостерігалось в дні 87 та 274 у самців та (або) самиць, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу, а збільшення рівня фібриногену спостерігалось в разі введення дози 40 мг/кг/добу (1,43–1,78 відносно вихідного рівня в самців, 1,51–1,76 відносно вихідного рівня в самиць). Ці зміни показників еритроцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів і фібриногену не були оцінені як побічна реакція через незначну величину та

відсутність несприятливих макроскопічних або мікроскопічних змін, пов'язаних із гематологічною дисфункцією або системною інфекцією.

Пов'язане із застосуванням ритлечитинібу зниження середніх значень лімфоцитів, базофілів, еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту, а також збільшення середніх значень кількості моноцитів, тромбоцитів і рівня фібриногену, яке спостерігали наприкінці фази введення препарату, зберігалось на день 309 (35-й день фази відновлення), хоча величина та напрямок зміни вказували на часткове відновлення на день 309.

Середня кількість лейкоцитів була знижена в самців на день 309 порівняно з вихідними значеннями (0,75 від вихідного рівня), що пов'язано з подальшим зниженням кількості лімфоцитів на день 309. Наприкінці фази відновлення (день 365) середня кількість лімфоцитів залишалася зниженою порівняно з вихідним рівнем у самців (0,79 відносно вихідного рівня) і самиць (0,67 відносно вихідного рівня) із тенденцією до збільшення порівняно з такими в дні дослідження 87, 274 і 309, що вказує на часткове відновлення. Решта відмінностей у кінцевих точках, які охоплюють показники клінічного аналізу крові, що спостерігалися під час фази введення препарату, минули наприкінці фази відновлення.

Пов'язане з ритлечитинібом зниження рівня альбуміну (0,76–0,91 відносно вихідного рівня в самців, 0,82–0,91 відносно вихідного рівня в самиць) і збільшення рівня глобуліну (1,43 відносно вихідного рівня в самців, 1,29 відносно вихідного рівня в самиць) спостерігалось у тварин, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу, і збігалось зі зниженням альбуміно-глобулінового співвідношення (А/Г) (у самців 0,53–0,87 відносно вихідного рівня, у самиць 0,63–0,88 відносно вихідного рівня).

Незалежне від дози зниження рівня фосфору, пов'язане із застосуванням ритлечитинібу, спостерігалось в дні 87 і 274 у самців, яким вводили препарат у дозах ≥ 5 мг/кг/добу (0,70–0,86 відносно вихідного рівня), і в дні 274 у самиць, яким вводили препарат у дозах ≥ 20 мг/кг/добу (0,59–0,66 відносно вихідного рівня).

Зниження загального холестерину, що не залежало від дози ритлечитинібу, також спостерігалось в самців, яким вводили ≥ 5 мг/кг/добу (0,64–0,80 відносно вихідного рівня), і в самиць, яким вводили 40 мг/кг/добу (0,62–0,63 відносно вихідного рівня), у дні 87 і 274.

У собак, яким в день 274 вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу, спостерігалось пов'язане з ритлечитинібом зниження рівнів креатиніну (у самців — 0,71 відносно вихідного рівня, у самиць — 0,83 відносно вихідного рівня). Ці дані були оцінені як такі, що не є побічною реакцією, на підставі незначної величини зміни кожного параметра, а також відсутності супутніх несприятливих макроскопічних або мікроскопічних проявів, наприклад системної інфекції.

Наприкінці фази відновлення (день 365) середній рівень глобуліну залишався підвищеним, а А/Г знижувалося в самців порівняно з вихідними значеннями, хоча величина зміни глобуліну була меншою, ніж спостерігалася в день 309, що вказує на тенденцію до відновлення. До кінця фази відновлення рівень альбуміну повернувся до початкового рівня. Стійкі зміни рівня глобулінів та А/Г у фазі відновлення розглядаються як такі, що пов'язані з клінічними ознаками запалення шкіри, які спостерігалися в цих тварин починаючи з фази відновлення і які минули на

момент проведення розтину в фазі відновлення. Обидві кінцеві точки повернулися до діапазону вихідного рівня в самиць собак до дня 365, і, отже, ці зміни частково повернулися до норми наприкінці фази відновлення. Всі інші відмінності у біохімічних параметрах, що спостерігалися під час фази введення препарату порівняно з вихідним рівнем, зникли наприкінці фази відновлення.

Супутнє пов'язане з ритлецитинібом зниження загальної кількості Т-клітин, Т-хелперів, цитотоксичних Т-клітин та НК, що не було оцінене як побічна реакція, спостерігалось в усіх групах дозування у дні 87 та 274, при цьому зниження кількості В-клітин спостерігалось лише в день 274. Зменшення кількості НК повністю повернулося до вихідних значень у більшості тварин на день 309 або на день 365 фази відновлення, при цьому для загальної кількості Т-клітин, Т-хелперів, цитотоксичних Т-клітин і В-клітин спостерігалось тільки часткове відновлення.

Такі прояви в лімфоїдних органах, лімфоцитах і субпопуляціях лімфоцитів були очікуваними з огляду на фармакологію ритлецитинібу і не були оцінені як побічні реакції, оскільки у фазі введення препарату не було виявлено супутніх системних інфекцій.

Пов'язане з ритлецитинібом зниження маси тіла та (або) зниження приросту маси тіла спостерігалися в самців і самиць, яким вводили препарат у дозах 20 і 40 мг/кг/добу протягом 9-місячної фази введення препарату, але не були оцінені як побічна реакція через загалом незначну величину з дня 1 до дня 273 (0,95 відносно контрольних показників). Приріст маси тіла повертався до норми під час фази відновлення. Пов'язане із застосуванням ритлецитинібу зниження споживання їжі (0,5 відносно контрольних показників), що не було оцінене як побічна реакція, спостерігалось в самців, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу протягом тижня 1 фази відновлення; до кінця фази відновлення параметр повернувся до 0,9 відносно контрольних показників.

У тварин, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу, порівняно з тваринами, яким вводили контрольний розчинник, під час фази введення препарату спостерігалось збільшення частоти випадків м'яких випорожнень, що свідчить про погіршення.

Незалежно від дози, з боку великогомілкової кістки не було зареєстровано ні макроскопічних, ані мікроскопічних змін, а в стегново-великогомілковому з'єднанні в межах колінного суглоба (зокрема, з боку дистальної частини стегнової кістки та проксимальної частини великогомілкової кістки) не було зареєстровано жодних макроскопічних змін. Жодних ефектів, пов'язаних із застосуванням ритлецитинібу, на ЕКТ виявлено не було.

Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} та AUC_{24} , збільшувалася приблизно пропорційно підвищенню дози у дні 94 та 273. Не було виявлено відмінностей у системній експозиції між днями 94 і 273, а також відмінностей у системній експозиції між групами дозування за статевою ознакою.

Отже, пероральне введення ритлецитинібу собакам породи бігль призводило до розвитку аксональної дистрофії у стовбурі головного мозку в самців і самиць, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу, що була оцінена як побічна реакція, та до надмірної імуносупресії з системною

інфекцією у фазі відновлення у тварин, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу, що також була оцінена як побічна реакція. Виявлення змін у стовбурі головного мозку супроводжувалося втратою слуху та деформацією хвиль у тесті ВАЕР у самців у фазі відновлення, які отримували препарат у дозі 40 мг/кг/добу. Ультраструктурно аксональна дистрофія у стовбурі головного мозку відповідала збільшенню аксосоматичних ущільнень, чого не спостерігалось наприкінці фази відновлення. До кінця фази відновлення запалення шкіри повністю відновилося, тоді як аксональна дистрофія відновилася частково. На підставі цих результатів за NOAEL було прийнято найнижчу випробувану дозу, що становила 5 мг/кг/добу; відповідне середнє значення C_{\max} дорівнювало 1360 нг/мл, а значення AUC_{24} — 4900 нг • год/мл.

Література

Borras D, Ferrer I, Pumarola M. Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol* 1999;36:202-11.

Pardo ID, Otis D, Ritenour HN, et al. Spontaneous axonal dystrophy in the brain and spinal cord in naive beagle dogs. *Toxicol Pathol* 2020;48(5):694-701.

Slayter MV, Summers BA, Meade RP, et al. Axonal spheroids in the cochlear nucleus of normal beagle dogs. *Vet Pathol* 1998;35:150-3.

Suzuki Y, Suu S. Spheroids (axonal dystrophy) in the central nervous system of the dog I. light microscopic observations. *Jap J Vet Sci* 1978;40:325-34.

7. 9-місячне дослідження токсичності на собаках із 6-місячним періодом відновлення (дослідження 20099163)

Друге 9-місячне дослідження на собаках проводилося з метою підтвердження повторюваності даних щодо аксональної дистрофії, виявленої в першому 9-місячному дослідженні токсичності на собаках, подальшої характеристики аксональної дистрофії, оцінювання динаміки, можливості моніторингу функціональних змін з боку органа слуху та їхньої чутливості до C_{\max} та AUC_{24} , оцінювання зворотного розвитку після 6-місячної фази відновлення та можливого уточнення NOAEL порівняно з першим дослідженням. Чутливість до C_{\max} та AUC_{24} оцінювали за допомогою введення проміжної дози 20 мг/кг/добу за схемою 20 мг/кг 1 раз на добу або двічі на добу по 10 мг/кг.

Ритлечитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд собакам породи бігль (по 4 або 7 особин кожної статі на групу; вік тварин — 9 місяців) у дозах 0 (розчинник; 0, 5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, деіонізованій методом зворотного осмосу), 10, 20 (1 раз на добу), 20 (по 10 мг/кг 2 рази на добу, з інтервалом 6 годин) або 40 мг/кг/добу один раз на добу протягом 273 днів із подальшою 6-місячною фазою відновлення у вибірці, що нараховувала по 3 тварини кожної статі в контрольній групі та в групах дозування 20 (1 раз на добу) і 40 мг/кг/добу. Потенційний вплив значення C_{\max} на зміни з боку ЦНС оцінювали в групах дозування 2 рази на добу та 1 раз на добу в дозі 20 мг/кг/добу. Об'єм дози становив 1 мл/кг. Розтин тварин проводили наприкінці фази дозування (дні 274/275) або фази відновлення (дні 469/470).

Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали клінічні ознаки, масу тіла, приріст маси тіла, споживання корму, клініко-лабораторні параметри (показники клінічного та біохімічного аналізу

крові, коагулограми, аналізу сечі), імунофенотипування, ТК, масу органів, а також результати макроскопічних і мікроскопічних досліджень. Тестування слуху (ВАЕР-тест) проводилося у 8 окремих часових точках (2 обстеження до початку застосування препарату, 4 обстеження після початку застосування препарату (місяці 2, 4, 7 та 9) та 2 обстеження під час фази відновлення (місяці 3 та 6).

Експертне патоморфологічне оцінювання підвибірки мікропрепаратів на склі (тканин нервової системи), отриманих від собак, розтин яких виконували у фазі застосування препарату (по 4 особини кожної статі на групу з 1 контрольної групи та 4 груп, що отримували ритлечитиніб), проводилося в сліпому режимі експертом-нейропатологом. Крім того, була проведена широка оцінка фонові частоти випадків аксональної дистрофії в контрольних собак з інших досліджень (приблизно такого ж віку, як і собаки в цьому дослідженні), щоб краще прояснити частоту випадків аксональної дистрофії в ростральному відділі черв'яка мозочка — ділянці ЦНС, яка зазвичай не оцінюється в дослідженнях токсичності, і в якій в цьому дослідженні аксональна дистрофія спостерігалася при всіх дозах.

Побічні ефекти, пов'язані з ритлечитинібом, охоплювали аксональну дистрофію в ЦНС і ПНС у тварин, яким вводили препарат у дозах ≥ 20 мг/кг/добу, і у вегетативних нервах надниркових залоз у тварин, яким вводили препарат у дозі 20 мг/кг/добу (20 мг/кг 1 раз на добу), порушення слухового порогу та деформація хвилі в ВАЕР-тесті, пов'язане з аксональною дистрофією в групі дозування 40 мг/кг/добу, а також зниження насичення лімфоїдної тканини клітинами (лімфоїдної клітинності) у тварин, які отримували дози ≥ 20 мг/кг/добу, що призводило до надмірної імуносупресії, зважаючи на наявність ознак шкірної інфекції (*Demodex spp*, папіломавірус і міжпальцеві кісти).

Аксональна дистрофія реєструвалася в стовбурі головного мозку (латеральне SON, латеральні пучки волокон слухової петлі/вентральні ядра) та в білій речовині рострального відділу черв'яка мозочка у тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу. Мінімальна або помірна, незалежна від дози, аксональна дистрофія (сфероїди) також була наявна в мозочку (ростромедіальна поверхня черв'яка) тварин, які отримували препарат у дозі 10 мг/кг/добу. У зв'язку з тим, що фонові частота цих явищ була невідомою, оскільки ця анатомічна ділянка головного мозку (ростральний відділ черв'яка мозочка) і його зрізи зазвичай не відбираються в дослідженнях токсичності, які проводяться в регуляторних цілях, ретельна оцінка за допомогою світлової мікроскопії була проведена на відповідних зрізах головного мозку 95 контрольних собак відповідного віку або старших, які не були пов'язані з цим дослідженням. Мікроскопічно в ростральному відділі черв'яка мозочка у 25 % собак контрольної групи було виявлено від 1 до 5 сфероїдів, причому кількість сфероїдів збільшувалася з віком.

Отже, ізолювана аксональна дистрофія, що спостерігалася в ростральному відділі черв'яка мозочка у тварин, які отримували 10 мг/кг/добу, була оцінена не як побічна реакція, а скоріше як локалізоване, пов'язане із застосуванням ритлечитинібу загострення мимовільних вікових змін, без супутніх морфологічних ефектів, які би вказували на несприятливість явища, такі як аксональна дегенерація, аксонофагія, некроз нейронів або запалення/гліоз, без функціональних змін за результатами ВАЕР-тесту та

без пов'язаних із ритлецитинібом рухових ефектів (тобто впливу на поставу, ходу, координацію рухів).

Крім того, аксональна дистрофія як побічна реакція спостерігалася в таких тканинах: сідничний нерв і гілки блукаючого нерва, що іннервують численні вісцеральні органи, м'язово-кишкові та підслизові нервові сплетення шлунково-кишкового тракту, піхви та сечового міхура у тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу; вегетативні нерви, що іннервують надниркові залози, у тварин, яким вводили препарат у дозі 20 мг/кг/добу (20 мг/кг 1 раз на добу); також спостерігалася посилення аксональної дистрофії в спинному мозку (білій та сірій речовині) у тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу. Ураження стовбура головного мозку було підтверджено за допомогою оцінювання окремих гістологічних препаратів в сліпому режимі експертом-нейропатологом; таке ураження виявлялося через 7 та (або) 9 місяців введення препарату в 1 самця та 1 самиці, які отримували 40 мг/кг/добу та супроводжувалося порушеннями слухового порогу та деформацією хвиль у ВАЕР-тесті, а саме: одностороннє помірне підвищення слухового порогу (до 58 дБ); помірне одностороннє порушення слуху, яке унеможливило оброблення слухового стимулу інтенсивністю менше 46 дБ; значущу асиметрію слуху; специфічну втрату чіткості та амплітуди хвиль IV і V у ВАЕР-тесті, що відображало цілісність слухового оброблення приблизно на рівні латерального ядра верхньої оливи та латеральної слухової петлі.

У всіх випадках пов'язана з ритлецитинібом аксональна дистрофія, що спостерігалася в нервовій системі, та результати ВАЕР-тесту повністю повернулися до норми у всіх собак, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу, за винятком 1 самиці, якій вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу та щодо якої було зроблено висновок про майже повне відновлення (зменшення як інцидентності, так і тяжкості порівняно з часовою точкою завершення введення препарату) через наявність лише мінімальної аксональної дистрофії (сфероїди), що обмежувалася ростральним відділом черв'яка мозочка та не вважалася побічною реакцією.

Пов'язані з ритлецитинібом явища в лімфоїдних органах охоплювали мінімальне або помірне зниження клітинності лімфоїдної тканини в тимусі у тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу (принаймні 10 мг/кг 2 рази на добу), а також у селезінці, підколінних лімфатичних вузлах, мезентеріальних лімфатичних вузлах та GALT у самців і самиць, яким вводили препарат у дозі ≥ 10 мг/кг/добу; а також мінімальне зниження клітинності всіх типів клітин у кістковому мозку в самців, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу (принаймні 10 мг/кг 2 рази на добу), і в самиць, які отримували 40 мг/кг/добу. Зниження лімфоїдної клітинності корелювало зі зниженням кількості лімфоцитів, загальної кількості Т-клітин, Т-хелперів, цитотоксичних Т-клітин і НК, що не було оцінено як побічна реакція у тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 10 мг/кг/добу. Зниження лімфоїдної клітинності було пов'язане з фармакологією ритлецитинібу та було оцінене як побічна реакція з боку тимуса, селезінки, підколінних і мезентеріальних лімфатичних вузлів, а також GALT у тварин, які отримували препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу, з огляду на дані про надмірну імуносупресію (шкірні інфекції) в цих групах.

Несприятливі клінічні ознаки запалення шкіри охоплювали генералізоване почервоніння шкіри, стоншення шерсті, шкірні папули та IDC. У тварин, яким вводили препарат у дозі ≥ 20 мг/кг/добу, спостерігали помірну або

виражену гіперплазію епідермісу з внутрішньоядерними вірусними включеннями, що вказувало на ймовірність інфікування вірусом папіломи, а в 1 самця, якому вводили препарат у дозі 20 мг/кг/добу, було виявлено помірне, локально поширене запалення волосяних фолікулів, що містило кілька внутрішньофолікулярних паразитів, подібних до *Demodex* (що корелювало зі шкірним вузликом). Помірне нейтрофільне запалення шкіри без ознак збудника інфекції (що корелювало з міжпальцевими кістами) спостерігалось в 1 самиці, яка отримувала препарат у дозі 20 мг/кг/добу.

Усі пов'язані з ритлецитинібом зміни в лімфоїдних тканинах повністю піддалися зворотному розвитку. Клінічні шкірні прояви повністю піддалися зворотному розвитку в тварин, яким вводили препарат у дозі 20 мг/кг/добу, і частково піддалися зворотному розвитку в тварин, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу, про що свідчило зменшення уражених ділянок тонкої шерсті та почервоніння шкіри. Під час фази відновлення у тварин, яким вводили препарат у дозі 20 мг/кг/добу, не спостерігали IDC; однак у тварин, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу, наприкінці фази відновлення в деяких випадках IDC досі зберігалися. Зниження загальної кількості Т-клітин, Т-хелперів, цитотоксичних Т-клітин та НК свідчило про повне відновлення в усіх тварин, яким вводили препарат у дозах 20 мг/кг/добу та 40 мг/кг/добу.

Явища, пов'язані зі зниженням кількості лімфоцитів, були також виявлені в легенях і являли собою змішаноклітинні інфільтрати мінімального або легкого ступеня в самців при дозах ≥ 10 мг/кг/добу та самиць при дозах ≥ 20 мг/кг/добу, які характеризувалися запальними змішаноклітинними інфільтратами в альвеолярних проміжках і відповідали макроскопічному виявленню блідих осередків у легенях самця, що отримував дозу 40 мг/кг/добу. Виявлені осередки в легенях повністю минули і не були оцінені як побічна реакція через незначну тяжкість і відсутність супутніх клінічних проявів.

Інші пов'язані з ритлецитинібом явища, що не були оцінені як побічні реакції, охоплювали зменшення кількості еозинофілів, базофілів, еритроцитів, гемоглобіну, гематокриту, ретикулоцитів, альбуміну, фосфору, креатиніну, кальцію, холестерину та А/Г, а також збільшення кількості нейтрофілів, моноцитів, лейкоцитів, ширини розподілу еритроцитів, фібриногену та глобулінів, як описано нижче. Ці зміни не вважались побічними реакціями через відсутність макроскопічних та (або) мікроскопічних ознак дисфункції або системної інфекції, а також через незначну величину змін.

Зниження кількості еозинофілів спостерігалось в самців (0,41–0,90 відносно вихідного рівня) та самиць (0,32–0,94 відносно вихідного рівня) при застосуванні доз ≥ 20 мг/кг/добу в дні 80 та 274, а також у самиць на в день 14 при застосуванні доз ≥ 20 мг/кг/добу (0,39 відносно вихідного рівня) та в дні 80 та 274 при застосуванні доз ≥ 10 мг/кг/добу (0,36–0,72 відносно вихідного рівня). Зниження кількості базофілів спостерігалось в самців при застосуванні доз ≥ 20 мг/кг/добу (10 мг/кг 2 рази на добу) (0,29–0,40 відносно вихідного рівня) в день 274 та в самиць при застосуванні доз ≥ 10 мг/кг/добу (0,29–0,60 відносно вихідного рівня) в дні 80 та 274.

Пов'язане з ритлецитинібом зниження еритроцитарних параметрів (кількість еритроцитів, гемоглобін, гематокрит) реєструвалося в самців при

застосуванні доз ≥ 20 мг/кг/добу (10 мг/кг 2 рази на добу) та в самиць при застосуванні доз ≥ 20 мг/кг/добу в дні 80 та 274, а також зниження кількості ретикулоцитів у тварин обох статей при застосуванні доз ≥ 10 мг/кг/добу в дні 14, 80 та 274. Зниження еритроцитарних параметрів давало в результаті мінімальне збільшення ширини розподілу еритроцитів у самиць при застосуванні препарату в дозах ≥ 20 мг/кг/добу в день 274.

Ступінь зниження кількості еритроцитів (0,79–0,89 відносно вихідного рівня), гемоглобіну (0,79–0,89 відносно вихідного рівня), гематокриту (0,80–0,86 відносно вихідного рівня) та кількості ретикулоцитів (0,29–0,80 відносно вихідного рівня) був невеликим і загалом подібним в дні 80 та 274 у самців і самиць. Фібриноген був підвищений (1,20–1,90 відносно вихідного рівня) у самиць при застосуванні препарату в дозах ≥ 10 мг/кг/добу в дні 80 та 274.

У всіх тварин, які отримували ритлечитиніб, на день 274 спостерігалось пов'язане із застосуванням ритлечитинібу зниження рівня альбуміну (0,79–0,89 відносно вихідного рівня) та підвищення рівня глобулінів (1,08–1,43 відносно вихідного рівня), що призводило до зниження А/Г (0,55–0,88 відносно вихідного рівня). Зниження рівня креатиніну (0,78–0,88 відносно вихідного рівня), зареєстроване в день 80 у тварин обох статей при застосуванні препарату в дозах ≥ 20 мг/кг/добу, зберігалось в самиць в день 274. Рівень фосфору знижувався (0,63–0,89 відносно вихідного рівня) в тварин обох статей при застосуванні препарату в дозах ≥ 10 мг/кг/добу в день 14 і зберігався лише в самців при застосуванні препарату в дозах 40 мг/кг/добу в день 80, а також в день 274 у самців при застосуванні препарату в дозах ≥ 20 мг/кг/добу і в самиць при застосуванні препарату в дозі 40 мг/кг/добу. Також спостерігалось зниження рівня кальцію (0,88–0,93 відносно вихідного рівня) у самців при застосування препарату в дозі 40 мг/кг/добу в день 80 та при застосування препарату в дозі ≥ 20 мг/кг/добу в день 274, а також у самиць при застосування препарату в дозі 40 мг/кг/добу лише в день 274. У тварин обох статей спостерігалось мінімальне зниження рівня холестерину (0,6–0,8 відносно вихідного рівня) при застосування препарату в дозах ≥ 10 мг/кг/добу в дні 14, 80 та 274; ці зміни не залежали від дози та зберігалися (особливо в самиць) протягом усього дослідження.

Усі клініко-лабораторні показники поверталися до норми після 6-місячної фази відновлення.

Пов'язані з ритлечитинібом, незалежні від дози зменшення маси тіла та (або) зниження приросту маси тіла, що не були оцінені як побічні реакції, спостерігалися в самців і самиць, які отримували препарат в дозах ≥ 10 мг/кг/добу під час фази введення препарату. Зменшення маси тіла та (або) зниження приросту маси тіла призводили до зниження середньогрупової абсолютної маси тіла в 0,90 раза в самців та 0,89 раза в самиць і корелювали зі зменшенням споживання їжі та вищою інцидентністю худорлявості (зменшення маси тіла) у самиць, які отримували препарат в дозах ≥ 20 мг/кг/добу.

Пов'язане з ритлечитинібом незалежне від дози зниження споживання корму, що не було оцінене як побічна реакція, спостерігалось в самців, які отримували препарат в дозах ≥ 20 мг/кг/добу (в середньому 0,89–0,91 від контрольних значень), і в самиць, які отримували препарат в дозах ≥ 10 мг/кг/добу, протягом фази введення препарату. У самиць зниження споживання корму спостерігалось протягом першого тижня введення

	<p>препарату, а спорадичні випадки низького споживання корму спостерігалися переважно протягом перших 2 місяців дослідження. У деяких тварин реєструвалася необхідність додаткового годування через зниження споживання корму та (або) його кореляція зі зниженням маси тіла та (або) погіршенням стану організму.</p> <p>Виявлені порушення з боку маси тіла та споживання корму не вважалися побічними реакціями через порівняно невелику зміну маси тіла протягом 9-місячної фази введення препарату та відновлення стану організму та (або) маси тіла після додаткового годування та продовження введення препарату. Приріст маси тіла та споживання корму повністю відновлювалися в самців і самиць при застосуванні препарату в дозах ≥ 20 мг/кг/добу (20 мг/кг 1 раз на добу) протягом фази відновлення. Макроскопічних або мікроскопічних змін у великогомілкової кістці не було виявлено за жодної дози.</p> <p>Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} та AUC_{24}, зростала зі збільшенням дози приблизно пропорційно до дози в дні 1, 91 та 273. Загалом відмінностей у системній експозиції, пов'язаних зі статтю, не спостерігалось. Виявилось, що немає різниці в системній експозиції між режимами дозування 20 мг/кг/добу (1 раз на добу) або 20 мг/кг/добу (по 10 мг/кг 2 рази на добу). З огляду на середні загальні (самці + самиці) значення AUC_{24}, між днями 1 і 91 та 1 і 273 накопичення було незначним або взагалі не відбувалося.</p> <p>Таким чином, введення ритлецитинібу собакам щоденно через шлунковий зонд у дозах 10, 20 (1 раз на добу), 20 (10 2 рази на добу) та 40 мг/кг/добу протягом щонайменше 273 днів призводило до оціненої як побічна реакція надмірної імуносупресії та виявлення аксональної дистрофії при застосування препарату в дозах ≥ 20 мг/кг/добу (незалежно від принципу дозування — 2 рази на добу або 1 раз на добу), а також до оцінених як побічні реакції порушень слухового порогу та деформації хвиль у ВАЕР-тесті, що супроводжувалися аксональною дистрофією при застосування препарату в дозі 40 мг/кг/добу. Повне відновлення всіх показників спостерігалось при застосуванні препарату в дозах ≥ 20 мг/кг/добу (1 раз на добу), за винятком часткового відновлення клінічних показників з боку шкіри при застосуванні препарату в дозі 40 мг/кг/добу та майже повного відновлення мінімальної аксональної дистрофії, обмеженої ростральним відділом черв'яка мозочка, у 1 самиці, яка отримувала дозу 40 мг/кг/добу. NOAEL становила 10 мг/кг/добу, що відповідало середнім значенням C_{max} та AUC_{24} 2330 нг/мл та 9680 нг • год/мл відповідно на день 273.</p>
3) генотоксичність: <i>in vitro</i>	<p>1. Тест на зворотну мутацію бактерій (дослідження WIL-655100) Чотири штами <i>Salmonella typhimurium</i> (TA1537, TA98, TA100 і TA1535) і один штам <i>Escherichia coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> рКМ101) використовували в якості тест-об'єктів для оцінювання мутагенної активності ритлецитинібу в тесті на зворотні мутації в мікосомах ссавців <i>in vitro</i>. Ритлецитиніб (у формі малонатної солі) готували як маточний розчин у ДМСО із цільовою концентрацією 50 мг/мл для кожного тесту. Тест на мутагенність проводили в трьох повторностях для кожної концентрації з використанням системи активації метаболізму фракції S9 печінки шурів, індукованої Ароклором™ 1254, і без неї, із застосуванням методу внесення в чашки.</p> <p>Досліджуваний продукт був мутагенним, якщо середня кількість ревертантних колоній на чашці залежала від дози та в ≥ 2 (ТА 98, ТА 100</p>

	<p>або WP2 <i>uvrA</i> pKM101) або ≥ 3 (штами TA 1535 або TA 1537) рази перевищувала паралельний контроль (розчинник).</p> <p>У початковому аналізі ритлецитиніб тестували при концентраціях 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 і 5000 мкг/чашку. У цьому тесті скринінг генетичних маркерів для штаму TA1535 був неприйнятним, і результати для цього штаму не враховували. Крім того, на контрольних чашках зі штамом WP2 <i>uvrA</i> pKM101 з метаболічною активацією та без неї (7,5 % [об./об.] суміш S9) фонового росту виявлено не було, тому цей штам було визнано неприйнятним і результати для нього не враховували.</p> <p>Для цих штамів початковий тест провели повторно в тих же концентраціях. Преципітатів не спостерігали для жодного штаму незалежно від метаболічної активації. Цитотоксичність (тобто зменшення середньої кількості ревертантних колоній та (або) фонового росту) спостерігали за концентрації 5000 мкг/чашку для штаму TA1537 з метаболічною активацією та TA1535 з метаболічною активацією та без неї. Для штаму TA1537 без метаболічної активації спостерігали зменшення середньої кількості ревертантних колоній на > 50 % при концентрації 25 мкг/чашку. Однак, оскільки це зменшення не було дозозалежним, воно не відображає справжнього цитотоксичного ефекту.</p> <p>У підтверджувальному аналізі ритлецитиніб тестували в концентраціях 100, 250, 500, 1000, 2500 і 5000 мкг/чашку. Преципітатів не спостерігали для жодного штаму незалежно від метаболічної активації. Цитотоксичність спостерігали при концентраціях ≥ 2500 мкг/чашку для штаму TA100 з метаболічною активацією та без неї, а також при концентрації 5000 мкг/чашку для штаму TA1537, TA98 і TA1535 з метаболічною активацією та без неї.</p> <p>Крім того, дещо знижений фоновий ріст спостерігався при концентрації 2500 мкг/чашку для штаму TA98 без метаболічної активації та штаму TA1535 з метаболічною активацією. Зменшення середньої кількості ревертантних колоній на > 50 % спостерігали для штаму TA1537 при концентраціях 250, 500 і 2500 мкг/чашку без метаболічної активації та при концентрації 250 мкг/чашку з метаболічною активацією, а також для штаму TA1535 при концентрації 250 мкг/чашку з метаболічною активацією. Однак, оскільки ці зниження не були дозозалежними, вони не відображають справжнього цитотоксичного ефекту.</p> <p>У кожному прийнятному аналізі критерії негативної відповіді виконувалися для всіх тест-штамів з метаболічною активацією і без неї. Середня кількість ревертантних колоній була зіставною з діапазонами значень у контрольних групах за архівними даними за всіх концентрацій для всіх тест-штамів із метаболічною активацією і без неї, за зазначеним нижче винятком.</p> <p>У разі повторного початкового тесту середня кількість ревертантних колоній в позитивних контролях для WP2 <i>uvrA</i> pKM101 з метаболічною активацією і без неї була вищою, ніж у діапазоні значень у контрольних групах з архівних матеріалів. Оскільки виявлена реакція задовольняла критерії позитивної відповіді, вона є прийнятною і не впливає на якість або цілісність дослідження. Дані щодо контрольної групи (розчинник) та позитивних контролів продемонстрували валідність і чутливість цієї тест-</p>
--	--

системи для виявлення хімічних мутагенів із метаболічною активацією та без неї.

Отже, ці дані підтверджують висновок про те, що ритлецитиніб не виявляє мутагенної активності щодо штамів *Salmonella* TA1537, TA98, TA100 і TA1535 та штаму *E. coli* WP2 *uvrA* рKM101, як із метаболічною активацією, так і без неї, в умовах цього аналізу.

2. Аналіз утворення мікроядер *in vitro* у клітинах лінії ТК6 (дослідження WIL-655099)

Ритлецитиніб оцінювали на предмет здатності індукувати утворення мікроядер у клітинах лінії ТК6 під час 4-годинної та 27-годинної інкубації з екзогенною системою метаболічної активації або без неї. Ритлецитиніб (у формі малонатної солі) готували як маточний розчин у ДМСО з концентрацією 28,5 мг/мл. Культури клітин лінії ТК6 обробляли ритлецитинібом, позитивним контролем або контрольним розчинником у присутності мікросомальної фракції S9 печінки шурів, індукованої Aroclor™ 1254, або без неї. Концентрація ДМСО в культуральному середовищі становила 1 % (об./об.).

Цільові концентрації ритлецитинібу становили 59,6, 73,6, 91,0, 112, 139, 171, 205, 242 і 285 мкг/мл для 4-годинного оброблення з метаболічною активацією і без неї та 48,3, 53,7, 59,6, 66,3, 73,6, 81,8, 91,0, 101, 112, 125, 139, 154 і 171 мкг/мл для 27-годинного оброблення без метаболічної активації. У разі 4-годинного оброблення з метаболічною активацією і без нього цитотоксичність і преципітати не спостерігалися. Тому для оцінювання клітин на утворення мікроядер були обрані 3 найвищі концентрації — 205, 242 та 285 мкг/мл (до 1 мМ). Концентрації, обрані для оцінювання утворення мікроядер за 27-годинної обробки без метаболічної активації, базувалися на цитотоксичності (% цитотоксичності): 48,3 мкг/мл (17 %), 66,3 мкг/мл (22 %) і 125 мкг/мл (51 %). Ці культури разом із розчинником і позитивним контролем в одній концентрації для кожної умови оброблення були проаналізовані на наявність мікроядер. Утворення мікроядер оцінювали на 2000 клітин для кожної концентрації.

Статистично значуще збільшення відсотка мікроядерних клітин спостерігалось за концентрації 125 мкг/мл у разі 27-годинного оброблення без метаболічної активації. Це збільшення було значущим для тенденції, виявленої за допомогою тесту Кокрана — Армітажа. Жодних інших статистично значущих збільшень відсотка мікроядерних клітин серед культур, оброблених ритлецитинібом, та в одночасно проаналізованому контролі, за жодних умов дослідження не спостерігалось. Відсоток мікроядерних клітин у культурах розчинника та позитивного контролю був порівняним з архівними контрольними даними за описаним нижче винятком. Відповідь у позитивному контролі в разі 27-годинного оброблення без метаболічної активації була нижчою, ніж за відповідними даними архівної контрольної вибірки. Оскільки відповідь була статистично достовірно вищою, ніж в одночасному контролі з розчинником, і відповідала критеріям позитивної відповіді, результат є прийнятним. Отже, для ритлецитинібу було отримано позитивний результат щодо індукції мікроядер у клітинах лінії ТК6 за 27-годинного оброблення без метаболічної активації; негативний результат було отримано щодо індукції мікроядер у клітинах лінії ТК6 за 4-годинного оброблення з метаболічною активацією та без неї в умовах цієї тест-системи.

3. Подальше дослідження механізмів дії відповідно до результатів тесту на утворення мікроядер *in vitro* (дослідження 13GTX10)

Спочатку ритлецитиніб аналізували за допомогою тесту Еймса на мутагенність *Biolum*, тесту на утворення мікроядер у клітинах лінії CHO *in vitro* та в межах пошукового аналізу на утворення мікроядер у клітинах лінії TK6 *in vitro*. Ритлецитиніб не індукував мутацій штамів *Salmonella typhimurium* TA98Lux і TA100Lux у разі тестування в дозі до 5 мг/чашку, еквівалентній дозі в тесті Еймса, з метаболічною активацією або без неї. В аналізі на утворення мікроядер у клітинах лінії CHO *in vitro* індукція утворення мікроядер спостерігалася в умовах 24-годинного безпосереднього оброблення. Індукція була підтверджена в аналізі утворення мікроядер у клітинах лінії TK6 *in vitro* в разі 27-годинного безпосереднього оброблення при концентраціях ритлецитинібу від 352 до 482 мкМ.

Щоб розрізнити анеугенні та кластогенні механізми індукції утворення мікроядер у клітинах лінії TK6, було проведено FISH-аналіз із панцентромерним ДНК-зондом на культивованих клітинах у процесі аналізу утворення мікроядер *in vitro* у клітинах лінії TK6 при концентраціях ритлецитинібу 391 і 482 мкМ. Результати аналізу FISH були непереконливими (мікроядра утворювалися як за анеугенним, так і за кластогенним механізмом), оскільки аналіз був ускладнений наявністю апоптотичних клітин. Ранні апоптотичні клітини можуть нагадувати мікроядерні клітини, що може ускладнити точне визначення мікроядерних клітин (Ronen & Heddle, 1984; Meintieres et al, 2001). Дві дози, використані для FISH-аналізу, потрапляють у цей діапазон концентрацій, що дає змогу припустити, що апоптоз міг ускладнити FISH-аналіз через зниження якості сигналу та помилкову ідентифікацію апоптотичних тіл як мікроядер без сигналу від центромер.

Щоб визначити, чи був апоптоз причиною непереконливих результатів FISH-аналізу, було проведено вестерн-блот-аналіз розщепленої каспази 3 та розщепленої полі(АДФ-рибозо)полімерази (PARP) (24-годинний прямий) із використанням клітин лінії TK6, оброблених 338–480 мкМ ритлецитинібом. Вестерн-блот аналіз розщепленої каспази 3 та розщепленої PARP дав позитивні результати для обох кінцевих точок у діапазоні доз 346–480 мкМ, що вказує на індукцію апоптозу при цих концентраціях.

Для кращого розуміння механізму індукції мікроядерного апоптозу в клітинах лінії TK6 було проведено аналіз хромосомних аберацій *in vitro* (27-годинний прямий аналіз) та оцінку анеуплоїдії Н3 (27-годинний прямий аналіз). В аналізі хромосомних аберацій ритлецитиніб тестували в діапазоні концентрацій 90,8–736 мкМ та аналізували на хромосомні аберації в концентраціях 182, 344 і 609 мкМ. Не було виявлено статистично значущого збільшення частоти структурних хромосомних аберацій за умови 27-годинного прямого оброблення. Ритлецитиніб не є кластогеном за цих умов дослідження.

Під час оцінювання на анеуплоїдію Н3 ритлецитиніб тестували й аналізували на предмет індукції анеуплоїдії у діапазоні концентрацій 90,8–736 мкМ. Дозозалежне збільшення гіподиплоїдії та гіпердиплоїдії спостерігалася за доз ≥ 416 мкМ. Дозозалежне збільшення поліплоїдії спостерігалася за доз ≥ 378 мкМ. Найбільше збільшення поліплоїдії спостерігалася за цитотоксичних концентрацій 553–736 мкМ.

	<p>Відсутність структурних хромосомних аберацій і збільшення гіподиплоїдії, гіперплоїдії та поліплоїдії вказують на анеугенність як механізм індукції утворення мікроядер, що спостерігається під час аналізу утворення мікроядер у клітинах лінії ТК6.</p> <p>Анеугенність є результатом нереактивної генотоксичної взаємодії ДНК між досліджуваним зразком і одним або декількома компонентами клітинного поділу, як-от веретено поділу. Оскільки для порушення апаратного забезпечення клітинного поділу зазвичай потрібно кілька етапів, вважається, що такі генотоксичні взаємодії є пороговими, причому низькі дози, нижчі за порогові, як очікується, не спричинять генотоксичної події (Elhajouji et al, 1995; Parry et al, 1996).</p> <p>Отже, механізм індукції утворення мікроядер <i>in vitro</i> в клітинах лінії ТК6, інкубованих із ритлецитинібом, полягає в анеугенності. Через цей механізм дії ефект є пороговим, і концентрації нижче порогового рівня не мають спричинити пошкодження хромосом.</p> <p>Література Elhajouji A, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M. Indications for a threshold of chemically- induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. Environ Mol Mutagen 1995;26:292-304.</p> <p>Meintieres S, Biola A, Pallardy M, et al. Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. Mutagenesis 2001;16(3):243-50.</p> <p>Parry JM, Parry EM, Bourner R, et al. The detection and evaluation of aneugenic chemicals. Mutat Res 1996;353(1-2):11-46.</p> <p>Ronen A, Heddle JA. Site-specific induction of nuclear anomalies (apoptotic bodies and micronuclei) by carcinogens in mice. Breast Cancer Res Treat 1984;44(4):1536-40.</p>
<p><i>in vivo</i> (включаючи додаткову оцінку з токсикокінетики)</p>	<p>1. Оцінювання частоти утворення мікроядер у щурів (дослідження 14GR132) Кластогенність/анеугенність ритлецитинібу оцінювали в межах 8-тижневого дослідження токсичності, в якому щурам лінії Wistar Han (вік 9 тижнів) вводили один раз на добу перорально через шлунковий зонд дози розчинника (0,5 % (мас./об.) метилцелюлози) або ритлецитинібу (малонатної солі) у дозах 75 і 175 мг/кг/добу протягом 8 тижнів або 400 мг/кг/добу протягом 31 дня. Об'єм дози становив 10 мл/кг.</p> <p>Периферичну кров відбирали на день 4 у перших 5 тварин кожної статі, що вижили, з груп дозування 0, 75, 175 і 400 мг/кг/добу для оцінювання індукції утворення мікроядер. Потім периферичну кров переносили в антикоагулянт/розчинник, фіксували та фарбували. Співвідношення ретикулоцитів (RET) та мікроядерних ретикулоцитів (MNRET) оцінювали за допомогою проточної цитофлуориметрії. У проточному цитофлуориметрі реєстрували «події» RET, нормохромні еритроцити (NCE), MNRET і мікроядерні нормохромні еритроцити (MNNCE) (1 «подія» = 1 клітина), поки не було підраховано приблизно 20 000 загальних подій ретикулоцитарних клітин (RET і MNRET) і не було обчислено кількість RET, MNRET, NCE і MNNCE. На основі цих чисел було отримано співвідношення ретикулоцитів до NCE (% RET), % MNRET та % MNNCE.</p>

	<p>Критерії позитивної відповіді охоплюють статистично значуще ($p \leq 0,05$) і пов'язане з дозою підвищення частки % MNRET у групах, які отримували ритлецитиніб, порівняно з одночасно обстеженою контрольною групою тієї ж статі.</p> <p>Не було виявлено статистично значущих відмінностей у пов'язаному з ритлецитинібом середньому значенні % МНВРТ порівняно з контрольною групою. Не було виявлено статистично значущих відмінностей у кількості ретикулоцитів з мікроядрами порівняно з контрольним розчинником. Ці відповіді є прийнятними, оскільки, як і очікувалося, вони відповідали критеріям позитивних відповідей.</p> <p>Отже, пероральне введення 3 доз ритлецитинібу — 0, 75, 175 або 400 мг/кг/добу — через шлунковий зонд не індукувало утворення мікроядер у ретикулоцитах периферичної крові самців і самиць щурів.</p>
4) канцерогенність:	
довгострокові дослідження	<p>1. 6-місячне дослідження канцерогенності на мишах (дослідження 8400625)</p> <p>Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу гемізіготним трансгенним мишам із трансгенним геном <i>rasH2</i> (tg/wt) (по 25 особин кожної статі на групу; вік від 8 до 9 тижнів) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, деіонізованій методом зворотного осмосу), 30, 100 або 300 мг/кг/добу протягом 26 тижнів з метою оцінювання канцерогенного потенціалу. Іншій групі мишей (по 15 особин кожної статі) вводили 75 мг/кг N-метил-N-нітросечовини (MNU) за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції в день 1 в якості позитивного контролю в аналогічний спосіб. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Розтин тварин, що вижили, проводили в день 183.</p> <p>Оцінювання канцерогенного потенціалу ґрунтувалося на смертності, клінічних спостереженнях (зокрема масометричні спостереження), масі тіла, кількісному споживанні корму, а також виявлених макроскопічних та мікроскопічних відхиленнях. Експозицію оцінювали в день 28 в окремій групі мишей дикого типу <i>rasH2</i> (wt/wt) (по 12 або 15 особин кожної статі на групу).</p> <p>Дози та дизайн дослідження були обрані відповідно до рекомендацій ICH (M3[R2], S1A, S1B, і S1C[R2]) на основі результатів 2-тижневого дослідження переносимості в мишей лінії C57BL/6NTac, в якому доза 1000 мг/кг була непереносимою й призвела до вимушеної евтаназії тварин цієї групи на 1-й день, а також на основі 1-місячного дослідження діапазону доз у мишей дикого типу <i>rasH2</i>, у якому спостерігалися залежні від дози, слабо виражені, не віднесені до категорії побічних, реакції з боку імунної системи та печінки, а також за погодженням з Виконавчим комітетом з оцінювання канцерогенності Управління з контролю за продуктами і ліками США (FDA) FDA Executive Carcinogenicity Assessment Committee (Module 1.6.3: 17 Apr 2019 SPA Response-Mouse Carcinogenicity Study; Reference ID 4420722).</p> <p>Кількість тварин обох статей, що вижили, у всіх групах була достатньою для оцінювання потенційних канцерогенних ефектів. Не було виявлено жодних новоутворень, пов'язаних із ритлецитинібом, або його впливу на виживаність.</p>

У групах позитивного контролю рівень канцерогенезу й вища смертність відповідали очікуваному ефекту N-нітросо-N-метилсечовини на розвиток новоутворень у мишей rasH2. Новоутворення охоплювали злоякісну лімфому, плоскоклітинну папілому або плоскоклітинну карциному в незалозистих клітинах шлунку; плоскоклітинну папілому або гемангіосаркому в шкірі/підшкірній клітковині; карциному молочної залози; а також карциному кісток. Виникнення цих новоутворень у групі позитивного контролю підтвердило наявність трансгена rasH2 у досліджуваних тварин.

У пахвинних лімфатичних вузлах і печінці спостерігалися пов'язані з ритлецитинібом зміни на мікроскопічному рівні, що не мали неопластичного характеру й не були оцінені як побічні реакції (таблиця нижче). У пахвинних лімфатичних вузлах самців, які отримували дози препарату ≥ 100 мг/кг/добу, та самиць, які отримували дози препарату ≥ 30 мг/кг/добу, спостерігалася зниження лімфоїдної клітинності (мінімальне), а в печінці самців і самиць, які отримували дози ≥ 30 мг/кг/добу, спостерігалася нижча інцидентність спонтанного змішаноклітинного інфільтрату (мінімальна) порівняно з групою контролю (розчинник). Усі інші виявлені мікроскопічні відхилення від норми також були спонтанними та (або) випадковими, оскільки вони виникали з низькою частотою, були рандомізовано розподілені між групами (зокрема паралельні контрольні групи) та (або) їх тяжкість відповідала очікуваній для гемізіготних трансгенних трансгенних мишей rasH2 (tg/wt); отже, вони не були пов'язані з ритлецитинібом.

Загальна частота і тяжкість виявлених пов'язаних із ритлецитинібом мікроскопічних відхилент від норми, що не мали неопластичного характеру

Доза (мг/кг/добу)	Самці				Самиці			
	0	30	100	300	0	30	100	300
Лімфатичні вузли, пахвинні								
Кількість досліджених	24	20	23	19	23	21	22	24
Знижена клітинність, лімфоїдна, мінімальна	0	0	2	7	0	1	4	6
Порушення з боку печінки								
Кількість досліджених	25	25	25	25	25	25	25	25
Інфільтрат, змішаноклітинний, мінімальний	13	8	4	3	24	12	12	7

Зниження лімфоїдної клітинності лімфоїдної тканини є відомим фармакологічним ефектом інгібування JAK3/TEC (Ma et al, 2006), і, коли це спостерігалася, зміни були мінімальної тяжкості, без значного порушення архітектури органів і без ознак імуносупресії/опортуністичної інфекції; отже, ці зміни не вважалися побічними реакціями.

Спонтанний змішаноклітинний інфільтрат у печінці, аналогічний зниженню клітинності лімфоїдних органів, був пов'язаний з імуномодуляторною фармакологією ритлецитинібу (Ma et al, 2006), і не вважався побічною реакцією через мінімальний характер і відсутність ознак опортуністичної інфекції.

Пов'язана з ритлецитинібом зміна середньої маси тіла (0,64 від середнього значення в контрольній групі) з дня 1 до дня 182 в самиць, які отримували препарат у дозі 300 мг/кг/добу, була пов'язана зі зниженням середнього споживання корму через певні проміжки часу. Ці ефекти не вважалися побічними реакціями через низьку вираженість.

Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} та AUC_{24} , була подібною в самців і самиць із диким типом *rasH2* (wt/wt) незалежно від дози та зростає приблизно пропорційно до дози на добу 28.

Отже, зважаючи на відсутність канцерогенних ефектів після введення 30, 100 або 300 мг/кг/добу ритлецитинібу один раз на добу протягом 26 тижнів самцям і самицям гемізиготних трансгенних мишей із трансгенним геном *rasH2* (tg/wt), NOAEL становила 300 мг/кг/добу із середніми значеннями C_{max} і AUC_{24} 20 000 нг/мл і 55 100 нг • год/мл відповідно на добу 28.

Спостерігалось пов'язане з ритлецитинібом і не віднесене до категорії побічних реакцій зниження лімфоїдної клітинності в пахвинних лімфатичних вузлах, що не мало неопластичного характеру, та менша частота виявлення спонтанних змішаноклітинних інфільтратів у печінці.

Література

FDA Executive Carcinogenicity Assessment Committee (Module 1.6.3: 17 Apr 2019 SPA Response-Mouse Carcinogenicity Study; Reference ID 4420722).

ICH M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. 12 Jan 2009.

ICH S1A. Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. 07 Jan 1996.

ICH S1B. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. 03 Jan 1998.

ICH S1C(R2). Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. 10 Jan 2008.

Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006;24:657-79.

2. 104-тижневе дослідження канцерогенності на щурах (дослідження 8384525)

Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу щурам лінії Wistar Han (по 60 особин кожної статі на дозу; вік 6–7 тижнів) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, очищеній методом зворотного осмосу), 10, 30 або 100 мг/кг/добу впродовж 104 тижнів. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Після 104 тижнів застосування препарату проводили розтин усіх тварин, що вижили.

Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали смертність, клінічні спостереження (зокрема масометричні спостереження), масу тіла, споживання корму та патологоанатомічні зміни. Зразки крові забирали в окремій сателітній групі щурів (по 5 особин

кожної статі на групу) на добу в день 179/180 (тиждень 26) через 1, 3, 7 і 24 години після введення дози препарату для оцінювання ТК.

Дози та дизайн дослідження були обрані на основі результатів попереднього 6-місячного дослідження токсичності перорального введення препарату через шлунковий зонд відповідно до рекомендацій ICH (M3[R2], S1A, S1B, and S1C[R2]), та за погодженням з Виконавчим комітетом з оцінювання канцерогенності FDA FDA Executive Carcinogenicity Assessment Committee (Module 1.6.3:04 April 2018 SPA Response-Rat Carcinogenicity Study; Reference ID 4243962). Висока доза 100 мг/кг/добу була обрана на основі даних про імуносупресію та зниження маси тіла в самців і самиць при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу в 6-місячному дослідженні токсичності. Інтервали між введеннями проміжних і низьких доз (30 і 10 мг/кг/добу відповідно) вираховували залежно від системної експозиції.

Не спостерігалось пов'язаних із ритлецитинібом летальних випадків або негативного впливу на виживаність. Доброякісні новоутворення, пов'язані з ритлецитинібом, були виявлені в тимусі та щитоподібній залозі при застосуванні препарату в дозі 100 мг/кг/добу.

Щодо тимуса, вища частота виявлення доброякісних і загальної кількості (сума доброякісних і злоякісних) тимом спостерігалася в самиць, які отримували 100 мг/кг/добу; частота виявлення корелювала з вищою частотою макроскопічних спостережень (аномальна форма, великі розміри й об'ємні утворення в тимусі) у цій групі. Загальна частота виявлення тимом (сума випадків доброякісної та злоякісної) продемонструвала статистично значущу дозозалежну тенденцію ($p < 0,005$ для поширених пухлин). Вища частота виявлення і тяжкість гіперплазії тимуса також спостерігалася в самиць, які отримували препарат у дозі 100 мг/кг/добу. Не було виявлено пов'язаного з ритлецитинібом впливу на частоту виникнення злоякісної тимоми (див. таблицю нижче).

Частота виявлення доброякісної та злоякісної тимоми та гіперплазії тимуса

	Самці					Самиці				
	Тенденція					Тенденція				
Доза (мг/кг/добу)	(1,2; 3,4)	0	10	30	100	(1,2; 3,4)	0	10	30	100
Кількість досліджених		56	58	52	53		58	57	58	56
Доброякісна тимома										
Є		2	5	3	7		8	7	14	16 ^a
Частота виявлення (%)		3,6	8,6	5,8	13,2		13,8	12,3	24,1	28,6
р-значення за методом Пето	0,0303	НЗ	0,2069	0,4466	0,0458	0,0130	НЗ	0,6958	0,0759	0,0348
Злоякісна тимома										
Є		0	0	0	1		0	0	1	2
Частота виявлення (%)		0,0	0,0	0,0	1,9		0,0	0,0	1,7	3,6

р-значення за методом Пето	0,2288	НЗ	1,0000	1,0000	0,4576	0,0595	НЗ	1,0000	0,4935	0,2541
Доброякісна тимомма + злюякісна тимомма										
Є		2	5	3	8		8	7	15	18 ^a
Частота виявлення (%)		3,6	8,6	5,8	15,1		13,8	12,3	25,9	32,1
р-значення за методом Пето	0,0121	НЗ	0,2069	0,4466	0,0229	0,0033*	НЗ	0,6958	0,0490	0,0138
Гіперплазія										
Легкий		0	0	0	0		2	1	1	1
Помірний		0	0	0	0		1	3	2	2
Виражений		0	0	0	0		1	0	0	4
Загальна частота		0	0	0	0		4	4	3	7
* Тенденція інтерпретується в статистичному звіті як статистично значуща (менше ніж $p = 0,005$ для поширених пухлин). а Пов'язані з ритлцитинібом.										
Доброякісні тимомми, пов'язані з ритлцитинібом, як правило, характеризувалися поодинокими, різного розміру вузловими ділянками з експансивним характером росту, що склалися з неопластичних епітеліальних клітин, змішаних з великою кількістю лімфоцитів, які порушували архітектуру та стискали сусідній тимус, але не проникали в капсулу або прилеглу жирову клітковину.										
Гіперплазія тимуса, як правило, характеризувалася осередковими або мультифокальними вузловими ділянками, збільшеними внаслідок збільшення кількості та різних комбінацій епітеліальних клітин і лімфоцитів, які не стискали прилеглу тканину, що призводило до вищого співвідношення товщини коркової та мозкової тканини порівняно з неуразженими часточками (Tomonari et al, 2019).										
У самиць, які отримували дозу ≥ 30 мг/кг/добу, спостерігалася вища інцидентність доброякісних і загалом (сумарно доброякісних і злюякісних) тимом порівняно з паралельною контрольною групою. Хоча частота їх виявлення при застосуванні препарату в дозі 100 мг/кг/добу була пов'язана з ритлцитинібом, оскільки сумарна частота перевищувала 30 % (32,1 %), зв'язок із ритлцитинібом при застосуванні препарату в дозі 30 мг/кг/добу був невизначеним. Хоча вища сумарна частота виявлення при застосуванні препарату в дозі 30 мг/кг/добу (25,9 %) перевищувала показники паралельної контрольної групи (13,8 %), архівні дані з контрольних груп з дослідницької установи (11,9 %) й опубліковані літературні дані (до 18 % для доброякісних пухлин), (Taylor & Mowat, 2020), не спостерігалася одночасного підвищення частоти гіперплазії тимуса, а р-значення для попарних порівнянь порівняно з контролем було не менше 0,01 (для поширених пухлин). Це свідчить про те, що не можна повністю виключати випадкове підвищення частоти виявлення цієї поширеної пухлини в самиць щурів лінії Wistar Han у цій групі дозування.										
Частота виявлення доброякісних тимом і всіх (сума доброякісних і злюякісних) тимом також була, очевидно, вищою (порівняно з контрольними групами тієї ж статі, архівними даними з дослідницької										

установи щодо результатів у контрольних групах та (або) опублікованими літературними даними (Taylor & Mowat, 2020) у самців, які отримували препарат у дозі 100 мг/кг/добу. Це підвищення інцидентності не мало статистичної значущості та не свідчило про посилення гіперплазії тимуса; отже, інцидентність тимоми в самців, які отримували дозу 100 мг/кг/добу, була випадковою та не була пов'язана із застосуванням ритлецитинібу.

Тимома — це пухлина з епітеліальних клітин вилочкової залози, які взаємодіють з тимусними лімфоцитами, що розвиваються, і підтримують їхні хоумінг, дозрівання та проліферацію, тому вважається, що проліферативні зміни епітелію пов'язані з віковими змінами лімфоїдних клітин і подальшим порушенням епітеліальної та лімфоїдної взаємодії (Willard-Mack et al, 2019).

Хоча точний патогенез і механізм підвищення частоти виникнення тимом в самиць щурів лінії Wistar Han під впливом ритлецитинібу не визначений, це, імовірно, пов'язано з негенотоксичним механізмом, оскільки ритлецитиніб не є генотоксичним. Розвиток тимоми, пов'язаний із ритлецитинібом, у самиць щурів лінії Wistar Han у дослідженні канцерогенності у щурів був розцінений як частково пов'язаний з імуносупресивною фармакологією ритлецитинібу. Це зумовлено тим, що ритлецитиніб пригнічує передачу сигналів через JAK/STAT у тимусі, про що свідчить зниження лімфоїдної клітинності тимуса та (або) зменшення кількості циркулюючих лімфоцитів у дослідженнях токсичності повторних доз препарату в щурів.

Немає даних, отриманих у результаті досліджень нокаутних мишей, які б свідчили про те, що пригнічення сигналізації через JAK/STAT саме по собі сприяє проліферації епітеліальних клітин тимуса або пухлинних клітин, що походять із лімфоцитів. Розвитку тимоми сприяли й інші фактори, насамперед задокументована штамоспецифічна схильність самиць щурів лінії Wistar Han до спонтанного розвитку тимоми в похилому віці, порівняно з іншими широко використовуваними штамми, такими як шури лінії Sprague-Dawley. Дані паралельної контрольної групи, архівної бази даних установи, отриманих з контрольних груп, та літературні публікації вказують на те, що самиці щурів лінії Wistar Han схильні до розвитку доброякісної тимоми, яка є поширеною спонтанною пухлиною. На додаток до високої частоти розвитку спонтанної тимоми в самиць щурів лінії Wistar Han, про яку повідомляють Iwata et al, 2013, інші публікації підкреслюють високу спонтанну частоту виникнення тимоми в самиць щурів лінії Wistar Han, які не отримували лікування (Blankenship et al, 2016; Tomonari et al, 2019; Taylor & Mowat, 2020).

Із боку щитоподібної залози в самців, які отримували 100 мг/кг/добу ритлецитинібу, спостерігалася статистично значуща вища інцидентність лише для фолікулярноклітинної аденоми (32,2 %) і загалом фолікулярноклітинних пухлин (35,6 %, об'єднані випадки фолікулярноклітинної аденоми та карциноми) порівняно з контрольною групою (11,7 % як для аденоми окремо, так і для об'єднаних випадків аденоми та карциноми), яка виходила за верхню межу діапазону в 15,3 %, опублікованого для доброякісних пухлин (Taylor & Mowat, 2020) й архівних даних компанії Covance щодо контрольних груп (до 21,8 %), і корелювали з підвищеною частотою макроскопічних знахідок (збільшена щитоподібна залоза й об'ємні утворення в щитоподібній залозі). Частота виявлення фолікулярної карциноми щитоподібної залози в самців, які отримували препарат у дозі 100 мг/кг/добу, не була статистично значущою

та знаходилася в межах опублікованих даних та архівних даних компанії Covance щодо контрольних груп, а отже, не була пов'язана з ритлецитинібом. Хоча інцидентність фолікулярноклітинної гіперплазії не мала чіткої залежності від дози, збільшення тяжкості фолікулярної гіперплазії в самців, які отримували препарат у дозі 100 мг/кг/добу, було пов'язане із застосуванням ритлецитинібу через одночасну наявність у цій групі фолікулярноклітинних аденом, пов'язаних із ритлецитинібом.										
Частота виявлення фолікулярноклітинної аденоми, карциноми та гіперплазії щитоподібної залози										
		Самці					Самиці			
	Тенденція					Тенденція				
Доза (мг/кг/добу)	(1,2; 3,4)	0	10	30	100	(1,2; 3,4)	0	10	30	100
Кількість досліджених		60	60	60	59		60	60	60	60
Аденома										
Є		7	12	13	19 ^a		2	4	4	6
Частота виявлення (%)		11,7	20,0	21,7	32,2		3,3	6,7	6,7	10,0
р-значення за методом Пето	0,0042*	НЗ	0,0997	0,0684	0,0027	0,0761	НЗ	0,4094	0,3498	0,1542
Карцинома										
Є		2	1	1	4		0	1	2	0
Частота виявлення (%)		3,3	1,7	1,7	6,8		0	1,7	3,3	0
р-значення за методом Пето	0,0675	НЗ	0,8527	0,8654	0,2630	0,6326	НЗ	0,5357	0,2532	1,0000
Аденома + карцинома										
Є		7	13	14	21 ^a		2	5	6	6
Частота виявлення (%)		11,7	21,7	23,3	35,6		3,3	8,3	10,0	10,0
р-значення за методом Пето	0,0013*	НЗ	0,0593	0,0438	0,0008	0,1313	НЗ	0,2821	0,1398	0,1542
Гіперплазія										
Мінімальний		2	2	2	3		1	2	3	1
Легкий		5	8	3	3		0	1	1	2
Помірний		0	1	3	2		1	1	1	0
Виражений		0	0	0	1		0	0	0	0
Загальна частота		7	11	8	9		2	4	5	3
<p>* Тенденція інтерпретується в статистичному звіті як статистично значуща (менше ніж $p = 0,005$ для поширених пухлин).</p> <p>а Пов'язані з ритлецитинібом.</p> <p>Частота виявлення фолікулярних пухлин (до 10 %) у самиць, які отримували будь-яку дозу ритлецитинібу, була в межах діапазону архівних даних з контрольних груп у дослідницькій установі та (або) повідомлень у літературі (Taylor & Mowat, 2020), а статистично значущої тенденції, пов'язаної з дозою, виявлено не було. Частота виявлення фолікулярної аденоми щитоподібної залози у щурів лінії Wistar з контрольних груп у 104-тижневих дослідженнях канцерогенності за архівними даними компанії Covance становила 12,1 % (діапазон 4,0–21,8 %) для самців і 4,5 % (діапазон 2,0–8,0 %) для самиць, а сумарна частота виникнення фолікулярної аденоми та фолікулярної карциноми становила 15,0 % (діапазон 8,0–23,6 %) для самців і 5,4 % (діапазон 3,3–10,0 %) для самиць.</p>										

Фолікулярна аденома щитоподібної залози також є поширеною спонтанною пухлиною в щурів, причому існують відмінності залежно від лінії та пов'язаної зі статтю схильності. Спонтанна частота була вищою в самців щурів, ніж у самиць. Лінія Wistar Han також має вищу спонтанну частоту виникнення, ніж лінія Sprague-Dawley (Isobe et al, 2016; Taylor & Mowat, 2020), що узгоджується з відносною схильністю до цього типу пухлин у тварин лінії Wistar Han. Точний механізм пов'язаного з ритлецитинібом підвищення ступеня тяжкості гіперплазії та фолікулярної аденоми при застосуванні препарату в дозі 100 мг/кг/добу невідомий.

У лімфоїдних тканинах (тимус, селезінка та мезентеріальні лімфатичні вузли), печінці та нирках були виявлені пов'язані з ритлецитинібом мікроскопічні зміни, що не мали неопластичного характеру.

У лімфоїдних тканинах вища частота виникнення та (або) ступінь зниження клітинності лімфоцитів (від мінімальної до помірної у селезінці та мезентеріальних лімфатичних вузлах і від мінімальної до вираженої у тимусі) спостерігалася в особин обох статей, які отримували препарат у дозі 100 мг/кг/добу. Зниження клітинності лімфоцитів у лімфоїдних тканинах є відомим фармакологічним ефектом інгібування JAK/TEC (Ma et al, 2006) і не було пов'язане з ознаками імуносупресії або опортуністичної інфекції, а отже, не вважалось побічною реакцією.

З боку печінки в самиць, які отримували дози препарату ≥ 30 мг/кг/добу ритлецитинібу, спостерігалось пов'язане з ритлецитинібом збільшення кількості багатоядерних гепатоцитів порівняно з контролем, із дозозалежним збільшенням інцидентності та ступеня тяжкості (мінімальний або легкий). Багатоядерні гепатоцити, як правило, вважаються адаптивною реакцією, а не ознакою потенційної канцерогенності (Cattley et al, 2018; McInnes, 2012). Багатоядерні гепатоцити можуть спонтанно виникати в старих щурів (Thoolen et al, 2010); отже, підвищена вираженість цих ознак у самиць, які отримували препарат у дозах ≥ 30 мг/кг/добу, була проявом пов'язаного з ритлецитинібом загострення цих фонових явищ, і не вважалась побічною реакцією.

Пов'язане з ритлецитинібом зниження інцидентності та тяжкості фонових мононуклеарних клітинних інфільтратів у печінці у тварин обох статей, які отримували 100 мг/кг/добу, було вторинним відносно імуномодуляторного фармакологічного впливу ритлецитинібу на лімфоїдні клітини та не вважалось побічною реакцією.

У нирках у клітинах каналців у тварин обох статей, які отримували 100 мг/кг/добу ритлецитинібу, спостерігалось пов'язане з ритлецитинібом підвищення інцидентності та ступеня вираженості (помірний) пігментації порівняно з контролем, що не вважалось побічною реакцією. Збільшення пігменту в клітинах каналців не вважалось побічною реакцією через його низьку вираженість і відсутність пов'язаного з ним запалення, некрозу або дегенерації каналцевого епітелію.

Вища інцидентність худорлявості спостерігалася в самиць за всіх доз порівняно з контрольними самицями, і часто реєструвалася напередодні ранньої евтаназії окремих тварин і загалом корелювала зі зниженням маси тіла в самиць у разі введення препарату в дозі 100 мг/кг/добу.

Зниження середньої маси тіла, пов'язане із застосуванням ритлецитинібу, спостерігалось в самців і самиць, яким вводили препарат у дозі 100 мг/кг/добу, починаючи з дня 64 для самців (0,95 від контрольних значень) і дня 22 для самиць (0,96 від контрольних значень). Величина відмінностей повільно зростала протягом дослідження. На момент закінчення дослідження середня маса тіла також була достовірно нижчою в самців, які отримували препарат у дозі 30 мг/кг/добу (0,92 від контрольних значень), та в самиць, які отримували препарат у дозі 10 або 30 мг/кг/добу (0,90 від контрольних значень і 0,95 від контрольних значень відповідно). Вплив на середню масу тіла не був негативним, оскільки тварини продовжували набирати вагу, і не супроводжувався клінічними ознаками виснаження або впливом на виживаність.

Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} та AUC_{24} , була подібною в самців і самиць у всіх групах дозування. Середня системна експозиція зростала зі збільшенням дози приблизно пропорційно дозі на день 179/180 (тиждень 26). T_{max} реєструвався через 1 годину після застосування дози в усіх групах дозування.

Отже, серед щурів-самців і самиць лінії Crl:WI(Han), які отримували ритлецитиніб у дозах 0, 10, 30 або 100 мг/кг/добу щодня за допомогою перорального застосування через шлунковий зонд протягом 104 тижнів, у разі застосування препарату в дозі 100 мг/кг/добу виникали доброякісні тимомми в самиць і доброякісні фолікулярні аденоми щитоподібної залози в самців; цій дозі відповідали середні значення C_{max} у плазмі крові 19 300 нг/мл і AUC_{24} 47 000 нг • год/мл на тижні 26.

Література

Blankenship B, Eighmy JJ, Hoffmann G, et al. Findings in historical control Harlan RCCHan™: WIST rats from 104-week oral gavage studies. *Toxicol Pathol* 2016;44(7)(10):947-61.

Cattley RC, Popp JA, Vonderfecht SL. Liver, gallbladder and exocrine pancreas. In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C, eds. *Toxicologic pathology: nonclinical safety assessment*. 2nd ed. CRC Press;2018:451-514.

FDA Executive Carcinogenicity Assessment Committee. 04 Apr 2018 SPA Response-rat carcinogenicity study. Reference ID 4243962.

ICH M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. 12 Jan 2009.

ICH S1A. Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. 07 Jan 1996.

ICH S1B. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. 03 Jan 1998.

ICH S1C(R2). Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. 10 Jan 2008.

Isobe K, Mukaratirwa S, Petterino C, et al. Historical control background incidence of spontaneous thyroid and parathyroid glands lesions of rats and

	<p>CD-1 mice used in 104- week carcinogenicity studies. J Toxicol Pathol 2016;201-6.</p> <p>Iwata H, Weber K, Gaehle S, et al. Spontaneous thymoma observed in Wistar Han rats. In: 29th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology;31 Jan-1 Feb 2013; Ibaraki, Japan:39.</p> <p>Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. Annu Rev Immunol 2006;24:657-79.</p> <p>McInnes EF. Wistar and Sprague-Dawley rats. In: McInnes EF, ed. Background lesions in laboratory animals: a color atlas (1st Edition): Saunders Elsevier;2012:17-36.</p> <p>Taylor I, Mowat V. Comparison of longevity and common tumor profiles between Sprague- Dawley and Han Wistar rats. J Toxicol Pathol 2020;33:189–96.</p> <p>Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol 2010;38:5S-81S.</p> <p>Tomonari Y, Sato J, Kurotaki T, et al. Thymomas and associated hyperplastic lesions in Wistar Hannover rats. Toxicol Pathol 2019;47(2):129-37.</p> <p>Willard-Mack C, Elmore S, Hall W, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse hematology system. Toxicol Pathol 2019;47(6):665–783.</p>
короткострокові дослідження або дослідження середньої тривалості	<p>1. Дослідження 2-тижневої переносимості та токсикокінетики (ТК) на мишах (дослідження 8390402)</p> <p>Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили самцям і самицям мишей лінії C57BL/6NTac (по 12 особин кожної статі на групу; вік від 6 до 7 тижнів) перорально через шлунковий зонд один раз на добу протягом 14 днів у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, очищеній методом зворотного осмосу), 30, 100, 300 або 1000 мг/кг/добу. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Проводили розтин і макроскопічне дослідження тварин, які були знайдені мертвими, або тварин у передсмертному стані, підданих евтаназії. Тварин, що вижили, піддавали евтаназії без розтину.</p> <p>Дози підбирали з метою визначення максимальної переносимої дози (МПД) та з метою допомоги у виборі дози для 1-місячного дослідження токсичності з визначенням діапазону доз на мишах лінії gasH2 (wt/wt). Оцінка токсичності базувалася на клінічних спостереженнях, масі тіла, прирості маси тіла та кількісному споживанні корму. Зразки крові забирали для аналізу ТК.</p> <p>Смерть наставала на 1-й день після введення 1000 мг/кг ритлецитинібу. Евтаназія 9 з 24 тварин через 4 години після введення дози була проведена після спостереження ознак вмирання: примружені очі, гіпоактивність, лежаче положення і холод на дотик (по всьому тілу) в період 1–3 години після введення дози. Решту тварин у цій групі піддавали евтаназії та розтину після відбору зразків крові для аналізу ТК. Макроскопічна оцінка</p>

змін, пов'язаних із ритлецитинібом, охоплювала дослідження знебарвлених (темно-червоних) зрізів селезінки від 3 самців і 2 самиць.

Додаткові випадки смерті сталися у 2 самиць, які отримували препарат у дозі 300 мг/кг/добу (знайдені мертвими на день 7 або 8), та 1 самиці, яка отримувала 100 мг/кг/добу (піддана евтаназії на день 8 після втрати 13 % маси тіла між 1-м і 8-м днями та клінічних спостережень, як-от згорблена постава, атаксія, гіпоактивність та обмежене функціонування лівої задньої лапи через 4 години після введення дози).

Причини смерті цих тварин не встановлені через брак клініко-лабораторних параметрів і мікроскопічного дослідження, але, ймовірно, вони були пов'язані з ритлецитинібом, з огляду на клінічні спостереження, які відповідають спостереженням за тваринами в передсмертному стані, що отримували препарат у дозі 1000 мг/кг/добу, відсутність доказів інших явних причин, як-от нещасний випадок у разі введення препарату, а також відсутність летальних випадків у контрольній групі або в групі тварин, які отримували препарат у дозі 30 мг/кг/добу.

Не було зафіксовано жодних клінічних симптомів, пов'язаних із ритлецитинібом, у самців, які отримували препарат у дозі ≤ 300 мг/кг/добу, або в самиць, які отримували препарат у дозі 30 або 300 мг/кг/добу. У тварин, яким вводили препарат у дозі ≤ 300 мг/кг/добу, не спостерігалось пов'язаних із ритлецитинібом змін середньої маси тіла, приросту маси тіла або споживання корму.

Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} і AUC_{24} , була подібною в тварин обох статей у всіх групах доз і зростала зі збільшенням дози більш ніж пропорційно до дози в дні 1 та 14. Системна експозиція зменшувалася за багаторазового введення, зважаючи на середні значення AUC_{24} . Середній коефіцієнт накопичення (AUC_{24} , день 14 : день 1) зменшувався зі збільшенням дози (0,79, 0,60 та 0,45 після доз 30, 100 та 300 мг/кг/добу відповідно).

2. 1-місячне дослідження з визначенням діапазону доз на мишах (дослідження 8392586)

Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд самцям і самицям мишей лінії rasH2 (дикий тип; wt/wt) (по 10 особин кожної статі на групу; вік від 8 до 9 тижнів) перорально через шлунковий зонд один раз на добу в дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, очищеній методом зворотного осмосу), 75, 225 або 450 мг/кг/добу протягом 28 днів. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Проводили розтин і макроскопічне оцінювання тварин, які були знайдені мертвими, або тварин у передсмертному стані, підданих евтаназії. Тварин, що вижили, розтинали на 29-й день і реєстрували масу органів.

Дози обирали на основі результатів 2-тижневого пошукового дослідження переносимості та ТК на мишах. Ступінь зв'язку результатів 2-тижневого дослідження з експериментальним препаратом був невизначеним; отже, дози для цього дослідження становили 75, 225 та 450 мг/кг/добу. Очікувалося, що висока доза в цьому дослідженні буде на рівні або поблизу МПД, а 2 нижчі дози мали забезпечити оцінювання залежності «доза — відповідь».

Оцінка токсичності базувалася на клінічних спостереженнях за смертністю, масою тіла, споживанням корму та патологоанатомічними знахідками. ТК

оцінювали в окремій групі з 9 або 12 особин кожної статі на групу. Не було виявлено пов'язаної з ритлецитинібом смертності або побічних ефектів за жодним параметром або кінцевою точкою, що оцінювалися при застосуванні препарату в будь-якій дозі.

Ефекти, не віднесені до категорії несприятливих, пов'язані з ритлецитинібом, спостерігалися в лімфоїдних органах (тимус, селезінка, мезентеріальні та пахвинні лімфатичні вузли) і печінці.

У лімфоїдних тканинах (тимус, селезінка, мезентеріальні та пахвинні лімфатичні вузли) спостерігалось зниження клітинності лімфоїдної тканини від мінімального до помірного ступеня тяжкості (що корелює з мінімально нижчою абсолютною кількістю лімфоцитів (0,40 від контрольних значень) у самців, які отримували препарат у дозі 450 мг/кг/добу, та окремих самиць, які отримували препарат у дозах ≥ 225 мг/кг/добу), а також зменшення маси селезінки (в 0,64–0,75 раза) і тимуса (в 0,66–0,94 раза) у самців, які отримували препарат у дозах ≥ 225 мг/кг/добу, і самиць, які отримували препарат у дозах ≥ 75 мг/кг/добу. Зниження клітинності лімфоїдної тканини є відомим фармакологічним ефектом інгібування JAK (Ma et al, 2006). Не спостерігалось значного порушення архітектури органів і клінічних ознак пригнічення імунітету/опортуністичної інфекції, отже, ці зміни не вважалися побічними реакціями.

У печінці спостерігалось зниження частоти виявлення спонтанних мінімальних моноклеарних клітинних інфільтратів у всіх групах, які отримували ритлецитиніб, порівняно з контрольною групою. Цей поширений спонтанний феномен спостерігався у більшості контрольних тварин, але у тварин, які отримували препарат у дозі 75 мг/кг/добу, його частота була нижчою, а у тварин, які отримували препарат у дозах ≥ 225 мг/кг/добу, цей феномен майже не реєструвався. Ця зміна, пов'язана з ритлецитинібом, була аналогічною зниженню клітинності лімфоїдних органів і пов'язана з його імуномодуляторною фармакологією (Ma et al, 2006; Leonard et al, 2019; Erickson et al, 2017), і не вважалася побічною реакцією, оскільки не спостерігалось дегенерації печінки або ознак опортуністичної інфекції.

Пов'язане з ритлецитинібом зниження кількості лейкоцитів (0,49 від середнього значення в контрольній групі), абсолютної кількості еозинофілів (0,33 від середнього значення в контрольній групі) та лімфоцитів (0,40 від середнього значення в контрольній групі) спостерігалось при застосуванні препарату в дозі 450 мг/кг/добу в самців, а зниження абсолютної кількості лімфоцитів (0,44 від середнього значення в контрольній групі) спостерігалось в окремих самиць при застосуванні препарату в дозах ≥ 225 мг/кг/добу. Ці ефекти відповідали очікуваній фармакологічній активності ритлецитинібу (Ma et al, 2006; Leonard et al, 2019; Erickson et al, 2017) і корелювали зі зменшенням маси лімфоїдних органів і зниженням клітинності лімфоїдних органів, а також не вважалися побічними реакціями, оскільки не було клінічних або посмертних доказів імуносупресії/опортуністичної інфекції.

Додаткові ефекти при застосуванні препарату в дозі 450 мг/кг/добу, які не вважалися побічними реакціями, охоплювали зниження кількості ретикулоцитів у самців (0,75 відносно середніх контрольних значень), зниження середньої величини об'єму еритроцитів у тварин обох статей (0,95–0,97 відносно середніх контрольних значень), а також підвищення

	<p>рівня глюкози (1,3 відносно середніх контрольних значень) і зниження рівня натрію (0,98 відносно середніх контрольних значень) у самців. Хоча механізм цих змін не був визначений, ці реакції не вважалися побічними через їхню незначну вираженість.</p> <p>Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} та AUC_{24}, була подібною в самців і самиць у всіх групах дозування. Середня системна експозиція зростала зі збільшенням дози в день 28.</p> <p>Отже, щоденне пероральне введення ритлечитинібу через шлунковий зонд у дозах ≤ 450 мг/кг/добу мишам лінії gasH2 (wt/wt) протягом 28 днів переносилося добре. Ефекти, не віднесені до побічних, що відповідають фармакології ритлечитинібу, спостерігалися в показниках клінічного аналізу крові, з боку лімфоїдних органів і печінки. NOAEL становила 450 мг/кг/добу, середні значення C_{max} і AUC_{24} в день 28 становили 32 400 нг/мл та 105 000 нг • год/мл відповідно.</p> <p>Література Erickson RI, Schutt LK, Tarrant JM, et al. Bruton's tyrosine kinase small molecule inhibitors induce a distinct pancreatic toxicity in rats. J Pharmacol Exp Ther 2017;360(1):226-38.</p> <p>Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gc family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. Immunity 2019;50:832-50.</p> <p>Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. Annu Rev Immunol 2006;24:657-79.</p>
додаткові дослідження	
5) репродуктивна токсичність і токсичний вплив на розвиток потомства:	
вплив на фертильність і ранній ембріональний розвиток	<p>Фертильність і ранній ембріональний розвиток до імплантації у щурів (дослідження 00655209) Ритлечитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу щурам лінії Wistar Han (по 20 особин на групу дозування; вік 10–11 тижнів) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в деіонізованій зворотним осмосом воді), 20, 60 або 200 мг/кг/добу. Самцям вводили дозу за 28 днів до спаровування (перша фаза розмноження), за 84 дні до спаровування (друга фаза розмноження) і щодня протягом щонайменше 15 тижнів. Самицям вводили препарат за 14 днів до спаровування, під час спаровування та щоденно до дня вагітності (ДВ) 7. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Усі фази розмноження відбувалися між тваринами, які отримували препарат, і тваринами, які не отримували препарат. Розтин самиць з ознаками спаровування проводили на ДВ 14. Самців, які отримували препарат, піддавали евтаназії в день 116/117 дослідження.</p> <p>Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали клінічні ознаки, масу тіла, приріст маси тіла, споживання корму, естральні цикли, репродуктивні показники, внутрішньоутробну виживаність, результати макроскопічного розтину, сперматогенні кінцеві точки та масу органів (лише для самців). Репродуктивні показники оцінювали для обох</p>

статей за допомогою спаровування тварин, які отримували ритлецитиніб, з тваринами, які не отримували препарат, протилежної статі. ТК оцінювали на основі серійних зразків, відібраних у 3 самців із кожної групи в день 62. На день 12 введення дози відбирали зразки в 3 шурів кожної статі на групу приблизно через 1 години після введення дози для визначення концентрацій у плазмі крові.

Побічні реакції, пов'язані з ритлецитинібом, — зниження середньої маси тіла та приросту маси тіла, — спостерігалися в самців при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу протягом усього періоду введення препарату. Середня маса тіла у самців, які отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, була статистично значуще нижчою (0,89–0,94 від середніх значень у контрольній групі), ніж у контрольній групі, починаючи з дня 39 і до моменту евтаназії. Нижчий середній приріст маси тіла в самців, які отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу, спостерігався після початку застосування препарату (дні 0–4; 0,78 від середнього значення в контрольній групі), протягом першого періоду до спаровування (дні 0–27; 0,84 від середнього значення в контрольній групі), другого періоду до спаровування (дні 0–83; 0,74 від середнього значення в контрольній групі) та під час оцінювання всього періоду застосування препарату (дні 0–116; 0,73 від середнього значення в контрольній групі); відмінності були статистично значущими в дні 0–83 та 0–116.

Нижчий середній приріст маси тіла, пов'язаний з ритлецитинібом, не віднесений до категорії побічних реакцій, спостерігався після початку застосування дози до другого періоду спаровування (дні 0–83; 0,85 від середнього значення в контрольній групі) у самців у дозі 60 мг/кг/добу; ці відмінності не були оцінені як побічна реакція, оскільки не було виявлено впливу на середню абсолютну масу тіла.

Не було виявлено пов'язаного з ритлецитинібом впливу на репродуктивні показники (спаровування, фертильність або копуляцію), коли самців, які отримували ритлецитиніб, спаровували із самицями, які не отримували ритлецитиніб.

У разі застосування дози 200 мг/кг/добу спостерігалось пов'язане з ритлецитинібом підвищення середньої передімплантаційної втрати, що призводило до зменшення середньої кількості місць імплантації та життєздатних ембріонів. У першій фазі розмноження середня частка передімплантаційних втрат у виводку становила 2,0 %, 4,8 %, 2,9 % та 20,2 % на виводок в контрольній групі та в групах 20, 60 та 200 мг/кг/добу відповідно, порівняно з максимальним середнім значенням у контрольних групах відповідно до архівних матеріалів лабораторії Charles River Ashland, яке становило 13,9 % на виводок.

Середня кількість місць імплантації (14,7 та 11,2 на виводок у контрольній групі та групі 200 мг/кг/добу відповідно), а згодом і середня кількість життєздатних ембріонів (13,9 та 10,6 на виводок у контрольній групі та групі 200 мг/кг/добу відповідно), була нижчою, ніж у контрольній групі. Хоча відмінності були статистично значущими, загальна кількість уражених самців була мінімальною, а самиці, спаровані із самцями, які дали кілька виводків, мали високу варіабельність за кількістю місць імплантації (наприклад, самець 1608 був спарований із самицями 1800 і 1626, які мали 3 і 14 місць імплантації відповідно, а самець 1603 був

	<p>спарований із самицями 1797 і 1643, які мали 1 і 15 місць імплантації відповідно).</p> <p>Тому була проведена друга фаза розмноження зі спаровуванням додаткових 20 самиць, які не отримували препарат, із самцями в контрольній групі та групі дозування 200 мг/кг/добу. Результати другої фази розмноження (84 дні введення препарату для самців) підтверджують вищу середню частку приплоду з передімплантаційними втратами при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу. Середня частка передімплантаційних втрат становила 5,2 % і 27,1 % на виводок у контрольній групі та групі 200 мг/кг/добу відповідно, порівняно з максимальним середнім значенням у контрольних групах в архівних матеріалах лабораторії Charles River Ashland, що становило 13,9 % на виводок. Відповідно до вищого відсотка передімплантаційних втрат при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу, середня кількість місць імплантації (13,2 та 8,6 на виводок у контрольній групі та групі дозування 200 мг/кг/добу відповідно), а згодом і середня кількість життєздатних ембріонів (12,3 та 8,4 на виводок у контрольній групі та групі дозування 200 мг/кг/добу відповідно) порівняно з максимальними середніми значеннями в контрольних групах в архівних матеріалах лабораторії Charles River Ashland, що становили 13,3 та 12,5 на виводок відповідно. Хоча середня кількість життєздатних ембріонів була нижчою, середня частка життєздатних ембріонів на виводок у групі дозування 200 мг/кг була статистично значуще вищою, ніж у контрольній групі; ця різниця була зумовлена нижчою середньою часткою постімплантаційної втрати й не була пов'язана з ритлецитинібом.</p> <p>Більша кількість самців зазнала впливу препарату (7 самців спарувалися із самицями, передімплантаційні втрати в яких становили потім $\geq 40\%$), причому одні й ті самі самці не обов'язково зазнавали впливу в обох спаровуваннях; отже, збільшення передімплантаційної втрати при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу було пов'язано з ритлецитинібом побічною реакцією з боку фертильності в самців. Не було виявлено впливу на постімплантаційну виживаність при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу порівняно з контролем.</p> <p>Не було виявлено пов'язаного з ритлецитинібом впливу на сперматогенез (середню кількість сперматозоїдів у яєчках та хвостовому відділі придатка яєчка, а також швидкість вироблення, рухливість і морфологію сперматозоїдів) через 115 або 116 днів після початку введення препарату при застосуванні препарату в будь-якій дозі.</p> <p>Не було виявлено пов'язаного з ритлецитинібом впливу на масу тіла самиць або впливу на репродуктивну функцію (спаровування, фертильність або зачаття) чи ранній ембріональний розвиток (місця імплантації та внутрішньоутробну виживаність), коли самиць, які отримували ритлецитиніб, спаровували із самцями, які не отримували ритлецитиніб.</p> <p>Середні естральні цикли були довшими в самиць, які отримували препарат у дозі 200 мг/кг/добу (1,14 від контрольних значень), через більшу кількість самиць у цій групі з відхиленням від норми естральних циклів. Зважаючи на відсутність впливу на спаровування, фертильність або зачаття, ця різниця не була не віднесена до категорії побічних реакцій.</p> <p>Системна експозиція, оцінювана за показниками C_{\max} і AUC_{24}, зростала зі збільшенням дози приблизно пропорційно дозі в день 62 для самців. T_{\max}</p>
--	--

	<p>вперше реєструвався через 1 годину після застосування дози в усіх групах дозування. Середні концентрації в плазмі крові були подібними (у межах 2-кратних) для самців і самиць на дванадцятий день застосування в усіх групах доз через 1 годину після застосування і збільшувалися в дозозалежний спосіб. C_{max} для самців при застосуванні препарату в дозі 60 мг/кг/добу в день 62 становила 10 800 нг/мл, а значення AUC_{24} — 22 000 нг • год/мл. Середня концентрація для самиць при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу в день 12 застосування становила 33 500 нг/мл.</p> <p>Отже, NOAEL для системної токсичності в самців становила 60 мг/кг/добу, з огляду на зниження середньої маси тіла та нижчий середній приріст маси тіла при застосуванні препарату в дозі 200 мг/кг/добу, що були розцінені як побічні реакції. NOAEL для фертильності самців становила 60 мг/кг/добу, з огляду на вищі передімплантаційні втрати, виявлені в самиць, що не отримували препарат, спарованих із самцями, які отримували ритлечитиніб у дозі 200 мг/кг/добу. NOAEL для системної токсичності в самиць, фертильності та раннього ембріонального розвитку становила 200 мг/кг/добу, з огляду на відсутність побічних реакцій у самиць, які отримували ритлечитиніб.</p>
ембріотоксичність	<p>1. Дослідження ембріофетального розвитку в щурів з підбору діапазону доз (дослідження 20069224)</p> <p>Ритлечитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу вагітним самицям щурів лінії Wistar Han із відомим терміном вагітності (по 6 особини на групу; вік 10–11 тижнів) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, деіонізованій методом зворотного осмосу), 75, 175 або 325 мг/кг/добу в період ДВ 6–17 з подальшим розтином у ДВ 21. Об'єм дози становив 10 мл/кг.</p> <p>Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали життєздатність, клінічні спостереження за вагітними самицями, масу тіла вагітних самиць і зміни маси тіла, споживання корму вагітними самицями, результати макроскопічного дослідження вагітних самиць, масу вагітної матки, дослідження яєчників і вмісту матки, а також життєздатність, стать, масу тіла та зовнішню морфологію плоду.</p> <p>Не було виявлено пов'язаної з ритлечитинібом смертності, клінічних ознак або впливу на масу тіла вагітної самиці, споживання корму або будь-які макроскопічні знахідки. Не було виявлено жодного пов'язаного з ритлечитинібом впливу на виживаність ембріона та плода, а також жодних відхилень від норми під час зовнішнього огляду плода. У разі застосування ритлечитинібу в дозах 75 або 175 мг/кг/добу не було виявлено жодного пов'язаного з ритлечитинібом впливу на жоден із параметрів із боку яєчників або матки.</p> <p>Єдиним ефектом, пов'язаним із ритлечитинібом, було зниження середньої маси тіла плода при застосуванні препарату в дозі 325 мг/кг/добу (0,81 від середнього значення в контрольній групі) з відповідними змінами середнього приросту маси тіла вагітної самиці в періоді після отримання препарату між ДВ 18 і ДВ 21 (0,71 від середнього значення в контрольній групі) і зниженням середньої маси вагітної матки (0,75 від середнього значення в контрольній групі).</p>

Отже, це дослідження надало достатню інформацію для визначення доз для проведення остаточного дослідження ембріофетального розвитку щурів у разі перорального введення препарату через шлунковий зонд.

2. Дослідження ембріофетального розвитку в щурів (дослідження 20075271)

Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу вагітним самицям щурів лінії Wistar Han із відомим терміном вагітності (по 22 особини на групу; вік 9–10 тижнів) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, деіонізованій методом зворотного осмосу), 75, 175 або 325 мг/кг/добу в період ДВ 6–17 з подальшим розтином у ДВ 21. Об'єм дози становив 10 мл/кг.

Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали виживаність вагітних самиць, клінічні спостереження за вагітними самицями, масу тіла вагітних самиць, споживання корму вагітними самицями, результати макроскопічного дослідження вагітних самиць, масу вагітної матки, дослідження яєчників і вмісту матки, а також життєздатність, стать, масу тіла та зовнішню, вісцеральну та скелетну морфологію плода. Зразки крові для визначення концентрації ритлецитинібу відбирали в окремих групах тварин (3 або 5 особин/групу) через 1, 3, 7 і 24 години після введення дози у ДВ 17.

Не було виявлено пов'язаної з ритлецитинібом смертності, клінічних ознак, макроскопічних спостережень або впливу на виживаність ембріона чи плода, а також не було виявлено жодних відхилень під час зовнішнього огляду або обстеженні органів.

Побічні реакції на ритлецитиніб у вагітних самиць полягали в зниженні середньої маси тіла, приросту маси тіла та споживання корму вагітними самицями при застосуванні препарату в дозі 325 мг/кг/добу.

У разі застосування дози 325 мг/кг/добу середній приріст маси тіла материнських особин був нижчим за середній показник контрольної групи в інтервалі ДВ 6–18 (0,81 від контрольних показників) та в кожному табличному інтервалі між ДВ 6–12 (0,57–0,65 від контрольних показників), а також в інтервалі ДВ 15–18 (0,87 від контрольних показників). Ці відмінності в середньому прирості маси тіла вагітних самиць при застосуванні препарату в дозі 325 мг/кг/добу були статистично значущими порівняно з контролем для інтервалів ДВ 6–9, ДВ 9–12 та ДВ 6–18.

Після фази введення препарату нижчий середній приріст маси тіла материнських особин також виявлявся в інтервалі ДВ 18–21 (0,94 від контрольних показників). Загалом, середній приріст маси тіла материнських особин у групі застосування дози 325 мг/кг/добу залишався нижчим за середній показник у контрольній групі в інтервалі ДВ 6–21 (0,85 від контрольних показників). Середнє споживання корму вагітними самицями було нижчим для інтервалів ДВ 6–18 (0,87 від контрольних показників) та ДВ 6–21 (0,90 від контрольних показників).

Побічний токсичний вплив на розвиток потомства, пов'язаний із ритлецитинібом, полягав у зниженні середньої маси тіла плода (0,94 та 0,81 від контрольних показників відповідно, при застосуванні препарату в дозах 175 та 325 мг/кг/добу) та вищій частоті виявлення скелетних вад і варіацій розвитку при застосуванні препарату в дозах 175 та 325 мг/кг/добу. Нижча середня маса тіла плода при застосуванні препарату

в дозі 325 мг/кг/добу призвела до зниження середньої маси вагітної матки (0,86 від контрольних значень) і більшої інцидентності затримки окостеніння скелета за такої дози.

Зареєстровані скелетні вади розвитку при застосуванні препарату в дозі 175 мг/кг/добу — 1 плід із розгалуженими ребрами та грудним напівхребцем. Зареєстровані скелетні вади розвитку при застосуванні препарату в дозі 325 мг/кг/добу — 1 плід зі зрощеним грудним відділом, 1 плід із розгалуженими ребрами та 1 плід зі зрощеними ребрами, зрощеним поперековим відділом, зрощеними грудними дугами та додатковим хребцем.

Зміни з боку скелета, що спостерігалися за доз 175 та 325 мг/кг/добу, склалися з більшої інцидентності в дитинчат і плодів незрощених фаланг передніх лап, незрощених плеснових кісток задніх кінцівок, вузлуватих ребер, хвилястих ребер і незрощених грудних ребер. Зміни з боку скелета, зареєстровані лише при застосуванні препарату в дозі 325 мг/кг/добу, склалися з більшої інцидентності в дитинчат і плодів незрощених п'ясткових кісток передніх лап, деформованих ребер, коротких ребер, неповністю окостенілих грудинних кісток, деформованих шийних дуг, роздвоєний центр в одному або декількох поперекових хребцях, деформовані дуги в одному або декількох грудних хребцях, роздвоєний центр в одному або декількох грудних хребцях, одностороннє окостеніння центра в одному або декількох грудних хребцях. Затримки в окостенінні скелета виникали при застосуванні препарату в дозах, за яких реєструвалося зниження середньої маси тіла плода, і були вторинними відносно затримки росту.

Системна експозиція, оцінювана за показниками C_{\max} і AUC_{24} , зростала зі збільшенням дози для вагітних самиць щурів на ДВ 17. Збільшення значень як C_{\max} , так і AUC_{24} було майже пропорційним до введеної дози. T_{\max} реєструвався через 1 годину після введення препарату.

Отже, NOAEL для вагітної самиці становила 175 мг/кг/добу (C_{\max} 20 500 нг/мл; AUC_{24} 79 000 нг • год/мл), з огляду на зниження середньої маси тіла, приросту маси тіла та споживання корму при застосуванні препарату в дозі 325 мг/кг/добу. NOAEL для внутрішньоутробного розвитку становила 75 мг/кг/добу (C_{\max} 11 600 нг/мл; AUC_{24} 25 300 нг • год/мл), з огляду на зниження середньої маси тіла плода та вищу частоту виявлення скелетних вад розвитку та варіацій при застосуванні препарату в дозах 175 та 325 мг/кг/добу.

3. Дослідження ембріофетального розвитку в кроликів із визначенням діапазону доз (дослідження 20069228)

Ритлещитиніб ((у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу вагітним самицям новозеландських кроликів із відомим терміном вагітності (по 6 особин на групу; вік 5 місяців) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, деіонізованій методом зворотного осмосу), 10, 75, 175 або 325 мг/кг/добу у період ДВ 7–19. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Усіх тварин піддавали розтину на ДВ 29.

Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали життєздатність, клінічні спостереження за вагітними самицями, масу тіла вагітних самиць і зміни маси тіла, споживання корму вагітними самицями, результати макроскопічного дослідження вагітних самиць, масу вагітної

матки, дослідження яєчників і вмісту матки, а також життєздатність, стать, масу тіла та зовнішню морфологію плоду.

Жоден із кроликів у групах дозування 175 і 325 мг/кг/добу не дожив до планової евтаназії через смерть або евтаназії за показаннями через надмірну токсичність (клінічні ознаки, втрата маси тіла та (або) зниження споживання корму вагітною самицею). У групі застосування дози 325 мг/кг/добу 1 кролик був знайдений мертвим, а решта 5 тварин були піддані евтаназії після введення 2 або 3 доз. У групі застосування дози 175 мг/кг/добу 1 кролик був знайдений мертвим, а решта тварин були піддані евтаназії після введення від 8 до 13 доз.

Клінічні ознаки, що передували смерті або евтаназії за показаннями, охоплювали зниження активності, патологічні дихальні шуми, ослаблений стан і розлади випорожнення. У групі застосування дози 325 мг/кг/добу реєструвалося зниження маси тіла вагітних самиць на 0,01 кг в інтервалі ДВ 8–9 і зниження середнього споживання корму в групі в 0,67 раза і 0,13 раза від середнього значення в контрольній групі для інтервалів ДВ 7–8 і ДВ 8–9 відповідно. У разі застосування препарату в дозі 175 мг/кг/добу маса тіла вагітних самиць становила 0,93 від середнього значення в контрольній групі на ДВ 20, а споживання корму вагітними самицями — 0,09–0,78 від середнього значення в контрольній групі в інтервалі ДВ 7–20.

У кроликів, яким вводили ритлецитиніб у дозі 10 або 75 мг/кг/добу, не було виявлено клінічних ознак або впливу ритлецитинібу на масу тіла вагітної самиці, приріст маси тіла вагітної самиці або споживання нею корму, а також жодного впливу на макроскопічні параметри вагітних самиць.

У групі дозування 75 мг/кг/добу спостерігалася вища інцидентність пізньої загибелі плода (пізня резорбція (2,2/виводок проти 0/виводок у контрольній групі) та смерть плода (0,2/виводок проти 0/виводок у контрольній групі)) і нижча середня маса тіла плода (0,93 від середнього значення контрольної групи). Вища частота пізньої загибелі плода призвела до вищих постімплантаційних втрат (25,12 % проти 8,08 % у контрольній групі) та нижчої середньої кількості живих плодів (7,8/виводок проти 10,2/виводок у контрольному виводку). Внаслідок вищих постімплантаційних втрат і нижчої середньої маси тіла плодів, середня маса вагітної матки була нижчою (0,81 від середніх контрольних значень). Не було виявлено жодного впливу на ріст або життєздатність плода при застосуванні препарату в дозі 10 мг/кг/добу, а також жодних зовнішніх аномалій плода при застосуванні препарату в дозі 10 або 75 мг/кг/добу.

Отже, це дослідження надало достатню інформацію для визначення доз для проведення остаточного дослідження ембріофетального розвитку кроликів у разі перорального введення препарату через шлунковий зонд.

4. Дослідження ембріофетального розвитку на кроликах (дослідження 20075272)

Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили перорально через шлунковий зонд один раз на добу вагітним самицям новозеландських кроликів із відомим терміном вагітності (по 20 особин на групу; вік 4–5 місяців) у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, деіонізованій методом зворотного осмосу), 5, 25 або 75 мг/кг/добу в період ДВ 7–19 з подальшим розтином у ДВ 29. Об'єм дози становив 10 мл/кг.

Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали виживаність вагітних самиць, клінічні спостереження за вагітними самицями, масу тіла вагітних самиць і зміни маси тіла, споживання корму вагітними самицями, результати макроскопічного дослідження вагітних самиць, масу вагітної матки, дослідження яєчників і вмісту матки, а також життєздатність, стать, масу тіла та зовнішню, вісцеральну та скелетну морфологію плода. Зразки крові для оцінювання ТК відбирали в окремих груп тварин (по 3 або 5 особин на групу) через 1, 3, 7 і 24 години після введення на ДВ 19.

Не було виявлено пов'язаної з ритлецитинібом материнської токсичності, що підтверджується відсутністю летальних випадків, клінічних ознак або макроскопічних змін, а також впливу на середню масу тіла вагітних самиць, середній приріст маси тіла вагітних самиць або середнє споживання корму вагітними самицями при застосуванні препарату в будь-яких дозах.

Постімплантаційні втрати були вищими в групі, що отримувала дозу 75 мг/кг/добу (13,08 % порівняно з 8,25 % у контрольній групі), через те, що 10 самиць мали виводок з 1 або більше пізніми резорбціями порівняно з 3 самицями з такими результатами в групі, що отримувала розчинник (0,59 раза порівняно з 0,18 раза в контрольній групі). Середня кількість пізніх резорбцій у групі дозування 75 мг/кг/добу була статистично значущою порівняно із середнім показником у контрольній групі, попри більшу середню кількість пізніх резорбцій, зареєстровану в контрольній групі, яка отримувала розчинник, а саме в самиці 6119 (11 пізніх резорбцій із 14 імплантацій). Вища частота виявлення постімплантаційних втрат при застосуванні препарату в дозі 75 мг/кг/добу була пов'язана з ритлецитинібом, але не вважалася побічною реакцією, оскільки не впливала на середній розмір живого приплоду.

Токсичний вплив на розвиток потомства, пов'язаний із ритлецитинібом, полягав у статистично значущому зниженні середньої маси тіла плода (0,88 від середнього значення в контрольній групі) та більшій інцидентності вісцеральних (3 плоди з неправильним розташуванням правої або лівої нирки) і скелетних вад розвитку (1 плід з надлишковою грудною кісткою (7 наявних), 1 плід з відсутньою дугою 13-го грудного хребця на додаток до зрощених центрів (від 13-го грудного до 1-го поперекового) та ще один плід зі зрощеними центрами грудних хребців (9-й та 10-й)) і змін із боку скелета у групі застосування препарату в дозі 75 мг/кг/добу.

Зміни з боку скелета, пов'язані із застосуванням ритлецитинібу у дозі 75 мг/кг/добу, охоплювали затримку окостеніння (пальців, лобка, черепа, грудних хребців і грудних кісток), вторинну відносно затримки росту, та зміни розвитку скелетних структур (черепа та хребців). Затримки в окостенінні скелета охоплювали неокостенілі фаланги передніх лап, неокостенілі п'ясткові кістки передніх лап, неокостенілі лобкові кістки, мінімальне розширення заднього тім'ячка, неокостенілі грудні кістки та однобічно окостенілі грудні центри. Частота виявлення неокостенілих п'ясткових кісток у дитинчат при застосуванні препарату в дозі 75 мг/кг/добу (88,2 %) була статистично значущою порівняно з контрольною групою. Зміни в структурі скелета склалися з більш високої інцидентності в дитинчат і плодів однієї або декількох ізольованих ділянок окостеніння в тім'яних кістках, невеликої дуги в одному або декількох грудних хребцях та деформованого центру в одному або декількох грудних

	<p>хребцях у групі, що отримувала дозу 75 мг/кг/добу, порівняно з контрольною групою.</p> <p>Зниження середньої маси вагітної матки при застосуванні препарату в дозі 75 мг/кг/добу (0,83 від середнього значення в контрольній групі) було вторинним відносно нижчої середньої маси тіла плода.</p> <p>Системна експозиція, оцінювана за середніми значеннями C_{max} і AUC_{24}, зростала зі збільшенням дози для вагітних самоць кроликів на ДВ 19. Збільшення значень як C_{max}, так і AUC_{24} було майже пропорційним до введеної дози. T_{max} реєструвався через 1 год після введення препарату.</p> <p>Отже, з огляду на відсутність побічних реакцій, NOAEL для материнської особини становила 75 мг/кг/добу (C_{max} 51 400 нг/мл; AUC_{24} 202 000 нг • год/мл), що було найвищою досліджуваною дозою. NOAEL для внутрішньоутробного розвитку становила 25 мг/кг/добу (C_{max} 15 400 нг/мл; AUC_{24} 45 600 нг • год/мл), з огляду на зниження середньої маси тіла плода та вищу інцидентність вісцеральних і скелетних вад розвитку, а також змін із боку скелета при застосуванні препарату в дозі 75 мг/кг/добу.</p>
<p>пренатальна й постнатальна токсичність</p>	<p>Дослідження пре- та постнатального розвитку, зокрема репродуктивної функції, на щурах (дослідження 00655232)</p> <p>Ритлечитиніб вводили перорально через шлунковий зонд вагітним самицям щурів лінії Wistar Han із відомим терміном вагітності (по 22 особини на групу; вік 10–11 тижнів) один раз на добу в дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози в деіонізованій зворотним осмосом воді), 25, 75 або 175 мг/кг/добу з ДВ 6 по день лактації (ДЛ) 20. Об'єм дози становив 10 мл/кг. Окремі групи тварин для дослідження ТК (по 5 самоць на дозу) отримували дозу один раз на добу протягом ДВ 6–17, при цьому серійні зразки крові відбирали для аналізу в ДВ 17.</p> <p>Параметри дослідження та кінцеві точки, що оцінювалися, охоплювали клінічні ознаки поколінь F0 і F1, масу тіла, приріст маси тіла, споживання корму в F0, розродження F0, життєздатність і виживаність виводку F1, етапи розвитку F1, результати нейроповедінкового оцінювання, естральні цикли та репродуктивні показники F1, ТК F0, макроскопічні дані F0 і F1 і внутрішньоутробна виживаність F2. Усіх тварин F0 і F1, що вижили, було піддано евтаназії на ДЛ 21 і день постнатального періоду (ПНД) 21 відповідно.</p> <p>Не було виявлено жодного пов'язаного з ритлечитинібом впливу на виживаність, клінічні ознаки, масу тіла або приріст маси тіла (під час вагітності або лактації), споживання корму (під час вагітності), тривалість вагітності, процес розродження або макроскопічні дані особин покоління F0.</p> <p>Побічні реакції, пов'язані з ритлечитинібом, у формі зниження середньої постнатальної виживаності, маси тіла та приросту маси тіла, спостерігалися в період перед відлученням від матері в потомства F1 при застосуванні препарату в дозі 175 мг/кг/добу.</p> <p>Пов'язане з ритлечитинібом зниження постнатальної виживаності у групі дозування 175 мг/кг/добу спостерігалось в період ПНД 1–4 (93,7 % порівняно з 99,6 % у контрольній групі) та ПНД 4–7 (96,5 % порівняно з</p>

<p>99,4 % у контрольній групі), без впливу на виживаність потомства F1 після ПНД 7.</p> <p>Пов'язане з ритлецитинібом зниження маси тіла потомства F1 спостерігалось при застосуванні препарату в дозах ≥ 75 мг/кг/добу та було оцінене як побічна реакція при застосуванні препарату в дозі 175 мг/кг/добу. У разі застосування дози 175 мг/кг/добу середня маса тіла дитинчат F1 при народженні (ПНД 1) становила 0,82 та 0,80 від показників контрольної групи відповідно, а нижчий середній приріст маси тіла спостерігався протягом усього періоду перед відлученням від матері (ПНД 1–21), що призвело до того, що середня абсолютна маса тіла самців і самиць становила до 0,76 та 0,74 від показників контрольної групи відповідно, протягом періоду перед відлученням від матері. Нижчий середній приріст маси тіла порівняно з контрольною групою зберігався і в період після відлучення від матері, що призвело до того, що середня абсолютна маса тіла самців і самиць покоління F1 при застосуванні препарату в дозі 175 мг/кг/добу становила до 0,80 від показників контрольної групи в самців і 0,78 від показників контрольної групи в самиць у період після відлучення.</p> <p>Оцінена як побічна реакція затримка статевого дозрівання, пов'язана із застосуванням ритлецитинібу, що полягала у підвищенні середнього віку досягнення баланопрепуціальної сепарації (47,4 дня порівняно з 43,8 дня в контрольній групі) та вагінальної прохідності (37,8 дня порівняно з 34,0 дня в контрольній групі), реєструвалася в самців і самиць відповідно при застосуванні препарату в дозі 175 мг/кг/добу та корелювала з несприятливими ефектами, що спостерігалися з боку маси тіла.</p> <p>Несприятливий вплив ритлецитинібу на репродуктивну функцію самиць F1 спостерігався при застосуванні препарату в дозі 175 мг/кг/добу з огляду на нижчу середню кількість жовтих тіл на одну статевозрілу самицю (12,6 на одну статевозрілу самицю порівняно з 14,2 у контрольній групі), що призводило до нижчої середньої кількості місць імплантації (11,0 на одну статевозрілу самицю порівняно з 13,3 у контрольній групі) та життєздатних ембріонів на одну статевозрілу самицю (10,5 на одну статевозрілу самицю порівняно з 12,5 у контрольній групі).</p> <p>Не було виявлено жодного пов'язаного з ритлецитинібом впливу на будь-які інші кінцеві точки, що оцінювалися в дослідженні, зокрема тривалість вагітності та процес розродження F0, виживаність покоління F1 після відлучення від матері, нейроповедінку F1 (реакція здригання, рухова активність або навчання та пам'ять), репродуктивні показники F1 і внутрішньоутробну виживаність ембріонів F2.</p> <p>Рівень системної експозиції, що визначається за середніми значеннями C_{\max} і AUC_{24}, зі збільшенням дози збільшувався приблизно пропорційно дозі на ДВ 17. T_{\max} реєструвався через 1 годину після введення дози препарату в усіх групах дозування в ДВ 17.</p> <p>Отже, зважаючи на пов'язане з ритлецитинібом зниження виживаності потомства F1 до відлучення від матері, зниження маси тіла F1, вплив на статеве дозрівання та зниження середньої кількості жовтих тіл у самиць F1 при застосування препарату в дозі 175 мг/кг/добу, доза 75 мг/кг/добу визнана NOAEL щодо токсичного впливу на розвиток потомства F1. З огляду на відсутність побічних реакцій на ритлецитиніб у тварин покоління F0, доза 175 мг/кг/добу була визнана NOAEL щодо токсичності</p>

	<p>ритлецитинібу для вагітних самиць F0 у разі перорального введення вагітним щурам лінії Wistar Han із відомим терміном вагітності. Для дози 175 мг/кг/добу середні значення AUC₂₄ і C_{max} становили 65 700 нг • год/мл та 24 100 нг/мл відповідно.</p>
<p>дослідження, при яких препарат уводиться потомству (нестатевозрілим тваринам) та/або оцінюється віддалена дія</p>	<p>1. Дослідження ювенільної токсичності в щурів з визначенням діапазону доз (дослідження 00655268) PF-06651600 в розчиннику (0,5 % (мас./об.) метилцелюлози, 4000 сПз, у воді, деіонізованій методом зворотного осмосу) вводили перорально через шлунковий зонд 3 групам по 8 нестатевозрілих щурів-самців і самиць лінії Wistar Han [CrI: WI(Han)], один раз на добу в період ПНД 10–24. Дози становили 50, 100 та 200 мг/кг/добу в об'ємі 10 мл/кг. Паралельна контрольна група, що складалася з 8 самців і самиць, отримувала розчинник у тому ж об'ємі дози, тим самим способом і за тією самою схемою. У цьому дослідженні оцінювали такі параметри та кінцеві точки: клінічні ознаки, масу тіла, приріст маси тіла та результати макроскопічного дослідження після розтину.</p> <p>Не було виявлено жодного пов'язаного з PF-06651600 впливу на виживаність. Клінічних симптомів, пов'язаних з PF-06651600, не спостерігалось для жодної дози. Дозозалежне зниження приросту маси тіла реєструвалося для всіх доз, що призводило до того, що середня маса тіла у ПНД 25 у самців становила 0,95, 0,88 і 0,86 від контрольної групи, а середня маса тіла в ПНД 25 у самиць становила 0,95, 0,89 та 0,84 від контрольної групи при застосуванні препарату в дозах 50, 100 та 200 мг/кг/добу відповідно.</p> <p>У самців і самиць не було виявлено макроскопічних змін, пов'язаних з PF-06651600, при застосуванні препарату в будь-яких дозах. Це дослідження надало достатню інформацію для визначення доз для проведення остаточного дослідження ювенільної токсичності перорального застосування препарату через шлунковий зонд у щурів лінії Wistar Han [CrI: WI(Han)].</p> <p>2. Дослідження ювенільної токсичності в щурів із 2-місячним періодом відновлення (дослідження 00655269) PF-06651600 у розчиннику (0,5 % [мас./об.] метилцелюлози в деіонізованій воді) вводили перорально через шлунковий зонд 3 групам нестатевозрілих щурів-самців і самиць лінії Wistar Han [CrI: WI(Han)] (по 20 особин кожної статі на групу) один раз на добу в період ПНД 10–60 (тварини з групи дослідження токсичності). Дози становили 25, 50 та 100 мг/кг/добу в об'ємі 10 мл/кг. Паралельній контрольній групі вводили препарат тим же шляхом і за тією ж схемою. По 10 щурів кожної статі на групу були призначені для розтину на етапі введення препарату (ПНД 61) і 10 особин кожної статі на групу були призначені для розтину в період відновлення (ПНД 120). Тваринам, в яких у період відновлення проводили нейроповедінкове оцінювання (по 20 щурів кожної статі в контрольній групі та групі 100 мг/кг/добу), вводили аналогічну схему, що й тваринам із групи дослідження токсикокінетики; нейроповедінкове оцінювання в період відновлення не було виправданим, з огляду на результати фази введення препарату, і тварини з групи нейроповедінкового оцінювання були піддані евтаназії у період ПНД 98–102. Тваринам із групи дослідження токсикокінетики (по 24 щури кожної статі на групу в групах 25, 50 і 100 мг/кг/добу та по 6 щурів кожної статі в контрольній групі) вводили</p>

	<p>препарат за схемою, аналогічною тваринам з групи вивчення токсичності. Токсикокінетичні оцінювання проводили у ПНД 10 та ПНД 60.</p> <p>У цьому дослідженні оцінювалися такі параметри та кінцеві точки: смертність, клінічні ознаки, маса тіла, приріст маси тіла, споживання корму, етапи репродуктивного розвитку, нейроповедінка, клініко-лабораторні параметри, токсикокінетичні параметри, макроскопічні дані, довжина стегнової кістки, маса тимуса та результати мікроскопічного дослідження.</p> <p>Не було виявлено жодного впливу на виживаність, клінічні ознаки, етапи розвитку (у самиць), нейроповедінку, макроскопічні дані та довжину стегнової кістки (у самиць), який був би пов'язаний з PF-06651600.</p> <p>У самців (зокрема тих, яким проводили нейроповедінкове оцінювання), які отримували 100 мг/кг/добу PF-06651600, під час фази введення препарату спостерігалися розцінені як побічні реакції зниження середнього приросту маси тіла та відповідне зниження середнього споживання корму, що призводило до зниження середньої маси тіла, які становили відповідно 0,87 та 0,89 від значень контрольної групи (в період ПНД 49–60). Під час фази відновлення (ПНД 61–119) було продемонстровано часткове відновлення маси тіла при застосуванні препарату в дозі 100 мг/кг/добу (0,89 від контрольних значень на ПНД 119).</p> <p>Середній вік досягнення баланопрепуціальної сепарації в самців, які отримували 100 мг/кг/добу, наставав пізніше на 2,5 дня порівняно з контрольною групою; це вважалось вторинним відносно зменшення середньої маси тіла.</p> <p>Відмінності (тобто скорочення) у середній довжині стегнової кістки були виявлені в самців, які отримували 100 мг/кг/добу, під час розтину у фазі введення препарату та фазі відновлення без будь-яких корелюючих макроскопічних спостережень або мікроскопічних даних. Вплив на довжину стегнової кістки вважався вторинним відносно зниження середньої маси тіла.</p> <p>В ПНД 61 у самців і самиць зі всіх груп дозування спостерігалось пов'язане з PF-06651600, не віднесене до категорії побічних реакцій, зниження загальної кількості лейкоцитів (0,79–0,51 від значень контрольної групи), що пояснювалось зниженням кількості лімфоцитів (0,74–0,47 від значень контрольної групи) та еозинофілів (за винятком 1 самця, який отримував дозу 100 мг/кг/добу; 0,40–0,20 від значень контрольної групи). Ці зміни повністю минули наприкінці періоду відновлення у ПНД 120.</p> <p>Пов'язане з PF-06651600, не віднесене до категорії побічних реакцій, зниження середньої маси тимуса спостерігалось під час первинного розтину в самців (0,57–0,83 від значень контрольної групи) та самиць (0,56–0,82 від значень контрольної групи), які отримували 25, 50 та 100 мг/кг/добу, та зберігалось в самців, які отримували 100 мг/кг/добу, меншою мірою (0,80 від значень контрольної групи) до розтину у фазі відновлення. Мінімальне зниження лімфоїдної клітинності, пов'язане з PF-06651600, було виявлено на мікроскопічному рівні у 1 самця та 2 самиць у групах дозування 100 мг/кг/добу, що корелювало зі зменшенням маси</p>
--	--

	<p>тимуса лише при застосуванні цієї дози. Зменшення маси тимуса супроводжувалося меншою кількістю лімфоцитів.</p> <p>Згідно з якісним аналізом даних, експозиція в самців і самиць була подібною у всіх групах доз (за оцінкою C_{max} і AUC_{24}). Системна експозиція зростала зі збільшенням дози в усіх діапазонах доз, досліджених у ПНД 10 і 60. З огляду на середні значення AUC_{24}, зменшення експозиції спостерігалось між ПНД 60 і 10. З огляду на побічні реакції з боку маси тіла, приросту маси тіла та споживання корму з вторинним впливом на досягнення баланопрепуціальної сепарації та довжину стегнової кістки в самців у разі застосування дози 100 мг/кг/добу доза 50 мг/кг/добу була визначена як рівень відсутності несприятливого впливу (NOAEL) щодо ювенільної токсичності PF-06651600 у разі перорального введення через шлунковий зонд самцям щурів лінії Crl:WI(Han), починаючи з ПНД 10. Доза 50 мг/кг/добу відповідала середнім значенням AUC_{24} 14 600 та 12 300 нг • год/мл та C_{max} 3090 та 6420 нг/мл у ПНД 10 та 60 відповідно.</p> <p>З огляду на відсутність побічних ефектів у самиць доза 100 мг/кг/добу була визначена як NOAEL щодо ювенільної токсичності PF-06651600 у разі перорального введення через шлунковий зонд, починаючи з ПНД 10. Доза 100 мг/кг/добу відповідала середнім значенням AUC_{24} 40 100 та 27 700 нг • год/мл і C_{max} 12 700 та 14 300 нг/мл у ПНД 10 та 60 відповідно.</p>
б) місцева переносимість	Дослідження місцевої переносимості для перорального способу введення не застосовуються.
7) додаткові дослідження токсичності:	
антигенність (утворення антитіл)	Дослідження антигенності для перорального способу введення не застосовуються.
Імунотоксичність	<p>Модель алергії у мишей (дослідження 14GR446)</p> <p>Ритлецитиніб — низькомолекулярний ковалентний інгібітор ферменту JAK3. Препарати, які ковалентно модифікують білки, можуть мати підвищений ризик розвитку реакцій гіперчутливості. Модель алергії у мишей (МAM) була розроблена в якості інструмента прогнозування реакцій гіперчутливості до лікарських засобів (Whritenour et al, 2014). Методологія базується на модифікації аналізу проліферації лімфатичних вузлів (Weaver et al, 2005), де клітинність дренажних лімфатичних вузлів визначається методом проточної цитометрії після щоденної підшкірної ін'єкції сполуки протягом 3 днів поспіль. Виявляється, є клінічна кореляція між препаратами, застосування яких супроводжується реакціями гіперчутливості, і позитивною відповіддю в МAM (Whritenour et al, 2014). Першою метою цього дослідження було оцінити потенціал ритлецитинібу щодо розвитку реакцій гіперчутливості.</p> <p>Оскільки JAK3/TEC бере участь у передачі сигналів цитокінів та подальшому розвитку імунної відповіді, імуномодуляторні ефекти ритлецитинібу можуть послабити розвиток імунної відповіді на ритлецитиніб і зменшити ймовірність виникнення реакцій гіперчутливості. Тому другою метою цього дослідження було тестування ритлецитинібу в модифікованій МAM, в якому ритлецитиніб вводиться одночасно з офлоксацином (відомо, що він викликає позитивну відповідь у МAM і реакції гіперчутливості у людини). Ці дані, імовірно, допоможуть</p>

визначити, чи можуть імуномодуляторні ефекти ритлецитинібу пригнічувати відповідь на офлоксацин.

У частині дослідження МАМ 200 мкл сполуки на ін'єкцію вводили підшкірно в потилицю самицям мишей лінії C57BL/6 (5 особин на групу дозування) один раз на добу протягом 3 днів поспіль у дозах 1, 10 або 100 мг/кг/добу. Амоксицилін (100 мг/кг/добу) та 10 % ДМСО були позитивним і негативним контролями відповідно. На день 6 мишей піддавали евтаназії, а дренажні плечові лімфатичні вузли забирали, обробляли до отримання суспензії одиничних клітин і визначали клітинність лімфатичних вузлів методом проточної цитофлуориметрії для кожної тварини. Для кожної групи, що отримувала лікарський засіб, дані представлені у вигляді середньої загальної кількості клітин лімфатичних вузлів та індексу стимуляції (SI; розраховується як середнє значення середньої загальної кількості клітин лімфатичних вузлів для кожної групи, що отримувала лікарський засіб/контрольної групи, що отримувала розчинник). $SI \geq 2,5$ був позитивною відповіддю.

У модифікованій частині МАМ дози ритлецитинібу були підібрані таким чином, щоб забезпечити діапазон покриття JAK3 цитокінів зі спільним гамма-ланцюгом на основі інгібування передачі сигналів через IL-15 pSTAT5 у цільній крові. Оцінки експозиції для мишей були визначені на основі дослідження фармакокінетики однократного введення мишам із припущенням про пропорційність дозі. При дозах 1, 10 та 100 мг/кг/добу розрахункові добові інгібіторні концентрації C_{av} , а саме IC_{13} , IC_{60} та IC_{94} відповідно, розраховували, використовуючи таке рівняння: $IC_{xx} = 100 * C_{av} / (IC_{50} + C_{av})$ (Dowty et al, 2014). Самицям мишей лінії C57BL/6 (по 5 особин на групу дозування) вводили ритлецитиніб, циклоспорин (відомий імуносупресивний препарат як позитивний контроль) або розчинник один раз на добу перорально через шлунковий зонд у дні 1–5. Протягом 120 хвилин мишам вводили офлоксацин або розчинник за допомогою підшкірної (п/ш) ін'єкції в дні 1–3. Метилцелюлозу (0,5 % [мас./об.]) використовували як розчинник для контролю ритлецитинібу, а суміш 6,6 % кремофора EL і 3,4 % етанолу — як розчинник для контролю циклоспорину. На день 6 мишей піддавали евтаназії та проводили експериментальні процедури й аналіз даних.

У МАМ середня загальна кількість клітин лімфатичних вузлів у мишей, яким вводили ритлецитиніб у дозах 1, 10 або 100 мг/кг підшкірно, була подібною до тієї, що спостерігалася в групі контролю розчинником, зі значеннями SI 1,3, 0,9 та 1,1 відповідно. Миші, яким вводили амоксицилін в якості позитивного контролю, мали вищу середню загальну кількість клітин у лімфатичних вузлах (порівняно з групою контролю розчинником) зі значенням SI 4,2.

У модифікованій моделі МАМ введення 10 або 100 мг/кг ритлецитинібу (перорально) та офлоксацину (підшкірно) призводило до зниження середньої загальної кількості клітин лімфатичних вузлів (SI = 1,0 і 1,2 для 10 і 100 мг/кг ритлецитинібу відповідно) порівняно з мишами, яким вводили 0,5 % (мас./об.) метилцелюлозний розчинник (перорально) та офлоксацин (п/ш) (SI = 2,2). Введення імуносупресивної сполуки циклоспорину (перорально) та офлоксацину (підшкірно) призвело до зниження середньої загальної кількості клітин лімфатичних вузлів (SI = 0,9) порівняно з мишами, яким вводили кремофорно-етанольний розчин (перорально) та офлоксацин (п/ш) (SI = 4,8).

	<p>Отже, ритлецитиніб (п/ш) не давав позитивної відповіді в МАМ у дозах до 100 мг/кг. У модифікованій МАМ ритлецитиніб у дозі ≥ 10 мг/кг (перорально) знижував відповіді, отримані при застосуванні офлоксацину. Результати дослідження МАМ свідчать про низький потенціал ритлецитинібу спричиняти реакції гіперчутливості, а результати модифікованого дослідження МАМ свідчать про те, що в разі їхнього виникнення ритлецитиніб, згідно з імуномодуляторною дією, послаблює розвиток реакцій гіперчутливості.</p> <p>Література</p> <p>Dowty ME, Lin T, Wang L, et al. Lack of differentiation of Janus kinase inhibitors in rheumatoid arthritis based on Janus kinase pharmacology and clinically meaningful concentrations. Ann Rheum Dis 2014;73 (Suppl2).</p> <p>Weaver JL, Chapdelaine JM, Descotes J, et al. Evaluation of a lymph node proliferation assay for its ability to detect pharmaceuticals with potential to cause immune- mediated drug reactions. J Immunotoxicol 2005;2:11-20.</p> <p>Whritenour J, Cole S, Zhu X, Li D, Kawabata TT. Development and partial validation of a mouse model for predicting drug hypersensitivity reactions. J Immunotoxicol 2014;11:141-7.</p>
дослідження механізмів дії	<p>1. 3-денне дослідження токсикокінетики на самицях собак породи бігль (дослідження 17GR131)</p> <p>Мета цього дослідження — оцінити концентрації ритлецитинібу в плазмі крові та тканинах головного мозку (SON, кохлеарне ядро та гіпокамп) після перорального введення через шлунковий зонд собакам породи бігль.</p> <p>Ритлецитиніб (у формі тозилатної солі) вводили самицям собак породи бігль (4 особини на групу; 2–3 роки) перорально через шлунковий зонд у дозах 0 (розчинник; 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози) або 40 мг/кг/добу один раз на добу протягом 3 днів для визначення концентрацій у плазмі крові та тканинах головного мозку. Об'єм дози становив 10 мл/кг.</p> <p>Проводився моніторинг клінічних спостережень. Зразки крові забирали для вимірювання концентрації ритлецитинібу приблизно через 1 годину після отримання дози на день 3 застосування. Зразки SON (ліве та праве об'єднані), кохлеарних ядер (ліве та праве об'єднані) та гіпокампу (лівий та правий окремо) відбирали під час розтину на день 3 одразу після перфузії всього тіла (приблизно через 1 годину після введення дози). Тіла тварин утилізували після розтину.</p> <p>Клінічних спостережень, пов'язаних із застосуванням ритлецитинібу, не було. Не було виявлено кількісно вимірюваних концентрацій ритлецитинібу в зразках плазми або головного мозку, відібраних і проаналізованих у контрольній групі тварин (нижче межі кількісного визначення = $< 2,5$ нг/мл для плазми; $< 15,0$ нг/г для тканини головного мозку). Вимірювані концентрації ритлецитинібу спостерігалися в плазмі крові та тканинах головного мозку у всіх тварин, яким вводили препарат у дозі 40 мг/кг/добу. Середні концентрації в плазмі крові (11 300 нг/мл) були вищими, ніж середні концентрації в головному мозку (1080, 1090 і 1340 нг/г для SON, кохлеарного ядра та гіпокампу відповідно).</p> <p>2. Пошукове дослідження: профілювання експресії генів у вибраних ділянках стовбура мозку в контрольних собак, яким не вводили препарат (дослідження 19GR142)</p>

Метою цього дослідження було визначення відносної експресії мРНК обраних кіназ і генів оксидативного стресу в різних ділянках тканини головного мозку здорових самців собак породи бігль, що не отримували препарат, для перевірки гіпотези про те, що відмінності в експресії генів у цих шляхах сприяють наявності або відсутності аксональної дистрофії в SON порівняно з кохлеарним ядром або гіпокампом. SON було обране тому, що саме на цю ділянку впливав ритлечитиніб у 9-місячних дослідженнях у собак. Кохлеарне ядро було обрано як тканина порівняння, оскільки анатомічне розташування та зв'язок зі слуховим шляхом були подібними до SON. Гіпокамп був обраний як референтна тканина для SON через їхні чіткі відмінності в анатомічних і функціональних областях головного мозку. Вибрані гени охоплювали представників родини JAK і TEC, набір інших кіназ, які, можливо, неселективно інгібуються ритлечитинібом, а також кілька генів, пов'язаних з оксидативним стресом і реакціями антиоксидантного захисту.

Нейроанатомічні тканини головного мозку (SON, кохлеарне ядро, гіпокамп) були зібрані у 3 контрольних самців собак породи бігль (віком приблизно 4 роки) і оброблені за допомогою гомогенізації та центрифугування для виділення РНК, яку потім очистили за допомогою колонок QIAGEN RNEasy® Mini для очищення РНК. Зразки РНК розводили водою, що не містила нуклеаз, до кінцевої концентрації 100 нг/мкл, а потім 1000 нг РНК з кожного зразка конвертували в кДНК. Зразки аналізували методами кількісної полімеразної ланцюгової реакції (кПЛР) та секвенування РНК.

Шляхи оксидативного стресу й антиоксидантного захисту профілювали за допомогою комерційно доступної панелі попередньо розроблених аналізів кПЛР для собак. Кожен ПЛР чип містив гени, орієнтовані на певний шлях, п'ять ендогенних контрольних генів, панель патентованих контролів для перевірки забруднення геномної ДНК, а також контролі для синтезу першого ланцюга й ефективності ПЛР у реальному часі.

Значення порогових значень циклу були зібрані й нормалізовані за найменш варіабельного ендогенного контрольного гена в наборі даних (60S кислий рибосомний білок P1, *Rplp1*), як визначено алгоритмом у програмному забезпеченні для аналізу, і відносна експресія визначалася за допомогою методу порівняльного порогового значення циклу (Livak & Schmittgen, 2001).

Експресію мРНК вибіркового кіназ собак визначали за допомогою 96-лункових планшетів TaqMan® Array, попередньо завантажених комерційними ліофілізованими праймерами для ПЛР та зондами TaqMan®. Тисячу нг РНК з кожного зразка конвертували в кДНК за допомогою набору Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Зразки кДНК розводили водою, що не містить нуклеаз, і додавали 10 нг кДНК в кожен реакційну лунку планшета TaqMan® Array разом з універсальним майстер-міксом для ПЛР TaqMan® Universal PCR Master Mix та AmpErase™; загальний об'єм реакції становив 20 мкл. Відносну експресію визначали за допомогою порівняльного C_t методу з використанням ендогенного контрольного гена (циклофілін В, *Ppib*) (Livak & Schmittgen, 2001).

Аліквоти заморожених зразків РНК конвертували в бібліотеки кДНК і секвенували за 51 основою, парний кінець, із циклом індексції 8 основ для загальної кількості 25 мільйонів зчитувань на зразок. Дані обробляли за

допомогою програми Genedata Expressionist® Refiner Genome. Зчитування були обрізані та вирівняні з геномом собаки (*Canis lupus familiaris*, Cfa3) за допомогою Spliced Transcripts Alignments to a Reference (STAR). Дані були нормалізовані за фрагментами на кілобазу транскрипту на мільйон картованих зчитувань (FPKM).

Під час аналізу генів, залучених до оксидативного стресу, за допомогою кПЛР, було виявлено порівняно невелику кількість генів, які статистично відрізняються в кохлеарному ядрі порівняно з SON; однак жоден із цих генів не досяг статистичної значущості щодо даних РНК-секвенування під час контролю на хибне виявлення. Відносно низька експресія (FPKM $\leq 1,0$) деяких із цих генів у поєднанні з порівняно невеликими відмінностями в експресії дає змогу припустити, що гени, ідентифіковані за допомогою ПЛР, є хибнопозитивним результатом.

Вища експресія альбуміну (у 76,4 раза) та арахідонат-12-ліпоксигенази (у 5,4 раза) і нижча експресія цитохрому b-245, бета-поліпептиду (у – 1,7 раза), глутатіонпероксидази 2 (у –4,3 раза), реакції оксидативного стресу 1 (у –2 рази), пероксиредоксину 6 (у –2.5 раза), селенопротеїн Р (у 2,7 раза) і сиртуїну 2 (в 1,8 раза) були виявлені в гіпокампі відносно SON, і кожен із цих генів також статистично відрізнявся в даних РНК-секвенування під час контролю на хибне виявлення.

Невеликі відносні відмінності та відсутність глобальних відмінностей в експресії генів у ядрі слухового нерва порівняно з SON загалом не підтверджують гіпотезу про те, що відмінності в експресії мРНК генів оксидативного стресу пояснюють наявність аксональної дистрофії в SON, але не в кохлеарному ядрі. Відмінності в експресії генів як за кількістю генів, так і за відносною експресією, як правило, були більшими у разі порівняння SON і гіпокампу, ніж SON і кохлеарного ядра. Цей результат був очікуваним, оскільки SON і кохлеарне ядро більш схожі за анатомічним розташуванням і функціями, ніж SON і гіпокамп.

Дані кПЛР та секвенування РНК не виявили значущих відмінностей в експресії JAK3, інших кіназ JAK та TEC або панелі потенційних нецільових сайтів зв'язування кіназ. Крім того, експресія JAK3 в головному мозку собак породи бігль виражена на дуже низькому базальному рівні, близькому до межі виявлення за допомогою секвенування РНК (FPKM $\geq 0,2$). Низький рівень експресії в поєднанні з відсутністю диференційованої експресії в кохлеарному ядрі та гіпокампі порівняно з SON не підтверджують гіпотезу про те, що пригнічення JAK3/TEC сприяє наявності аксональної дистрофії в SON у собак породи бігль.

Отже, порівняльне профілювання експресії генів у SON, ядрі мозочка та гіпокампу не підтвердило гіпотезу про те, що вроджені відмінності в експресії генів оксидативного стресу в здорових собак сприяли виникненню аксональної дистрофії, пов'язаної з ритлецитинібом, у SON, але не в кохлеарному ядрі або гіпокампі. Крім того, не було виявлено статистично значущих відмінностей в експресії JAK3 або інших споріднених кіназ у різних ділянках. Нарешті, низький вміст мРНК JAK3 і відсутність диференційованої експресії в цих ділянках головного мозку не підтвердили гіпотезу про те, що відмінності в експресії JAK3 (тобто цільовій фармакології) пояснюють наявність аксональної дистрофії в SON, але не в кохлеарному ядрі або гіпокампі.

Література

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C[T])$ method. *Methods* 2001;25:402-08.

3. Ідентифікація нецільових сайтів зв'язування ритлецитинібу в гомогенатах тканини головного мозку здорових собак (дослідження 19GR193)

Це дослідження було проведено для створення гіпотез щодо механізму дії у зв'язку з виявленою аксональною дистрофією в ЦНС та ПНС у собак після хронічного введення ритлецитинібу в 9-місячних дослідженнях токсичності за високих доз/експозицій. Метою цього дослідження було виявлення потенційних мішеней, які зв'язують ритлецитинібу у гомогенатах тканин головного мозку собак породи бігль (зразки гіпокампу та рострального відділу черв'яка мозочка) за допомогою хемопротеомного методу, що базується на клік-хімії. PF-06789402, алкіновмісний аналог ритлецитинібу, використовували для виявлення потенційних нецільових сайтів зв'язування ритлецитинібу за допомогою кількісного протеомного підходу.

Контрольні собаки породи бігль (віком 18–21 місяць) були піддані евтаназії, а їхній головний мозок був вилучений. Зразки нервової тканини з гіпокампу (n = 5) та рострального відділу черв'яка мозочка (n = 3) відбирали, заморожували рідким азотом, подрібнювали та лізували ультразвуком у фосфатному буферному розчині з 10 мМ хлоридом магнію та інгібіторами протеази/фосфатази. Розчинні гомогенати отримували центрифугуванням, а концентрацію білка вимірювали методом ВСА (аналіз на біцинхонінову кислоту). Після попереднього оброблення ДМСО або 10 мкМ ритлецитинібом гомогенати тканин інкубували з 1 мкМ PF-06789402, після чого застосовували методи клік-хімії та афінної адсорбції на гранулах стрептавідину. До зразків, попередньо оброблених ДМСО та ритлецитинібом, додавали легкі (L) та важкі (H) масові мітки, після чого проводили мас-спектрометричний аналіз. Білки, які мали співвідношення $L/H \geq 2$ ($\log_2 L/H \geq 1$) і були статистично значущими (одновибірковий t-тест, скориговане значення $p \leq 0,05$), вважалися потенційними нецільовими сайтами зв'язування ритлецитинібу.

Білки, які є потенційними нецільовими сайтами зв'язування ритлецитинібу, наведені для гіпокампу та черв'яка мозочка.

Потенційне зв'язування нецільових сайтів у гомогенатах гіпокампу здорових собак породи бігль

Білок	Унікальні пептиди ^a	Збіги пептидних спектрів ^b	$\log_2 (L/H)$	Скориговане р-значення	N ^c
BTK	18	46	4,32	2,79E-06	4/5
DOCK10	1	7	4,32	0,000194	3/5
BMX	1	6	4,32	0,009458	2/5
PRKCG	9	37	1,18	0,003774	5/5
MAPK10	13	83	1,16	0,004796	5/5

a. Кількість унікальних пептидів, виявлених для кожного білка при мас-спектрометричному аналізі.

b. Кількість мас-спектрів, що збігаються зі спектрами отриманих з білків пептидів.

c. Кількість зразків, у яких було виявлено білок/загальна кількість оцінених зразків.

Потенційне зв'язування нецільових сайтів у гомогенатах рострального відділу черв'яка мозочка здорових собак породи бігль					
Блок	Унікальні пептиди^а	Збіги пептидних спектрів^б	Log₂ (L/H)	Скориговане р-значення	N^в
ВТК	15	35	4,32	7,25E-05	3/3
ВМХ	8	18	4,32	7,25E-05	3/3
DOCK10	1	2	4,32	0,002523	2/3
MAP2K7	8	11	4,32	0,002523	2/3
F13A1	3	6	1,66	0,005456	3/3
PRKCG	16	64	1,42	0,01389	3/3
PRKCA	5	39	1,26	0,005456	3/3
MAPK10	6	35	1,21	0,008606	3/3
PRKCB	2	26	0,99	0,027215	3/3

а. Кількість унікальних пептидів, виявлених для кожного білка при мас-спектрометричному аналізі.
б. Кількість мас-спектрів, що збігаються з отриманими з білків пептидами.
в. Кількість зразків, у яких було виявлено білок/загальна кількість досліджених зразків.

Поширені контамінанти в протеомних експериментах, такі як кератини, були виключені з аналізу. Всі потенційні нецільові сайти зв'язування, виявлені в гіпокампі, також були ідентифіковані в ростральному відділі черв'яка мозочка собак. ВТК, DOCK10 і ВМХ продемонстрували високе співвідношення L/H, а саме 20 (log₂(L/H) 4,32), що свідчить про високу афінність зв'язування з ритлецитинібом. Серед білків, які були ідентифіковані тільки в ростральному відділі черв'яка мозочка, MAP2K7 продемонстрував високе співвідношення L/H, а саме 20 (log₂(L/H) 4,32), що свідчить про високу афінність зв'язування. Як у гіпокампі, так і в черв'яку мозочка білки з низьким співвідношенням L/H зв'язуються з ритлецитинібом порівняно слабо.

JAK3 не було виявлено, що свідчить про те, що JAK3 не пов'язана з виявленою аксональною дистрофією в собак. Хоча ВТК і ВМХ (2 кінази родини TEC) були ідентифіковані як потенційні нецільові сайти зв'язування; малоймовірно, що вони пов'язані з результатами 9-місячних досліджень токсичності на собаках, оскільки профіль токсичності органівмішеної відрізняється між інгібіторами TEC і ритлецитинібом (Imbruvica®, 2020). Токсичності щодо підшлункової залози, яка зазвичай спостерігається при застосуванні інгібіторів білку TEC, не було, і навпаки, аксональна дистрофія не спостерігалася при застосуванні ібрутинібу, ковалентного кіназного препарату, який інгібує TEC-кінази, зокрема ВТК і ВМХ (Bhaskaran et al, 2018; Erickson et al, 2017).

Також були ідентифіковані DOCK10 та MAP2K7. Повідомлялося, що DOCK10, фактор обміну Rho-гуаніну, бере участь у морфогенезі дендритних шипів (Jaudon et al, 2015); однак у літературі немає даних, які б свідчили про те, що DOCK10 безпосередньо залучений до аксональної дистрофії. MAP2K7, одна з 11 кіназ, яка має залишок цистеїну в тому ж положенні, що і Cys909 в JAK3, була ідентифікована як потенційний нецільовий сайт зв'язування в ростральному відділі черв'яка мозочка собаки, але не в гіпокампі. Примітно, що аксональна дистрофія спостерігалася в ростральному відділі черв'яка мозочка собаки, але не в гіпокампі. Описано, що MAP2K7 відіграє регуляторну роль у подовженні та міграції аксонів у головному мозку мишей (Yamasaki et al, 2011), а миші з нокаутним геном MAP2K7 демонструють аксональну нейропатію у спинному мозку мишей (Yamasaki et al, 2017).

Таким чином, DOCK10 та MAP2K7 демонстрували високі співвідношення L/H у хіміопротеомних експериментах, що свідчить про високу афінність

зв'язування з ритлецитинібом, і були ідентифіковані як потенційні нецільові білки-зв'язувачі в ЦНС собак.

Література

Bhaskaran M, Cornwell PD, Sorden SD, et al. Pancreatic effects of a Bruton's tyrosine kinase small-molecule inhibitor in rats are strain-dependent. *Toxicol Pathol* 2018;46(4):460-72.

Erickson RI, Schutt LK, Tarrant JM, et al. Bruton's tyrosine kinase small molecule inhibitors induce a distinct pancreatic toxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2017;360(1):226-38.

Imbruvica® (ibrutinib). United States Prescribing Information. Pharmacyclics LLC. 2020.

Jaudon F, Raynaud F, Wehrle R, et al. The RhoGEF DOCK10 is essential for dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell* 2015;26(11):2112-27.

Yamasaki T, Deki-Arima N, Kaneko A, et al. Age-dependent motor dysfunction due to neuron-specific disruption of stress-activated protein kinase MKK7. *Science* 2017;7(1):7348.

Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, et al. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *Am J Transplant* 2011;31(46):16872-83.

4. Порівняння афінності зв'язування ритлецитинібу з MAP2K7 людини, собаки та щура в клітинних лініях із гіперекспресією (дослідження 19GR372)

У гомогенатах головного мозку собак (19GR193) було виявлено MAP2K7 в якості потенційного нецільового сайту зв'язування ритлецитинібу. Це дослідження було проведено для визначення афінності зв'язування ритлецитинібу з MAP2K7 собаки, людини та щура в клітинах лінії НЕК 293F, що гіперекспресують відповідні білки, за допомогою аналізу на основі флуоресценції в гелі. Ця робота була виконана для того, щоб дослідити, чи відрізняється афінність зв'язування ритлецитинібу з MAP2K7 у видів тварин, залучених до доклінічних досліджень токсичності, від афінності зв'язування з MAP2K7 у людини.

Клітини лінії НЕК293F, трансфіковані MAP2K7 собаки, людини або щура в плазміді pcDNA3.1+/C-(K)-, лізували у фосфатному буферному розчині з 10 мМ сульфатом магнію та інгібіторами протеази/фосфатази за допомогою ультразвуку. Концентрацію білка в лізатах вимірювали методом ВСА. Лізати коригували за допомогою вихідного лізату клітин 293F для забезпечення подібних рівнів MAP2K7 людини, собаки та щура за концентрації білка 3 мг/мл.

Після інкубації з ДМСО або ритлецитинібом в концентраціях від 0,12 до 30 мкМ лізати клітин (n = 6) інкубували з 1 мкМ PF-06789402 (аналог ритлецитинібу, що містить алкін), після чого методом клік-хімії досліджували реакцію з TAMRA-азид-біотином і виконували флуоресцентний аналіз в гелі. Оскільки і ритлецитиніб, і PF-06789402 зв'язуються з одним і тим же залишком цистеїну в MAP2K7 і модифікують його, залучення MAP2K7 під дією ритлецитинібу не дасть змоги алкіновому зонду PF-06789402 мітити кіназу, що призведе до втрати

	<p>флуоресцентних сигналів. Дані були апроксимовані для отримання значень OC_{50}.</p> <p>Значення OC_{50} для MAP2K7 під впливом ритлецитинібу в клітинному лізаті 293F із гіперекспресією</p> <table border="1" data-bbox="491 302 1460 474"> <thead> <tr> <th>MAP2K7</th> <th>OC_{50} (M)</th> <th>LogOC_{50} (M)</th> <th>Стандартна похибка (LogOC_{50}) (M)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Людина</td> <td>14,26⁶</td> <td>-4,846</td> <td>0,220</td> </tr> <tr> <td>Собака</td> <td>7,454⁶</td> <td>-5,128</td> <td>0,118</td> </tr> <tr> <td>Щур</td> <td>11,13⁶</td> <td>-4,953</td> <td>0,100</td> </tr> </tbody> </table> <p>а. Кількість повторностей.</p> <p>Отже, афінність зв'язування MAP2K7 людини, собаки та щура ритлецитинібом у системах з гіперекспресією 293F мала значення OC_{50} від 7 до 14 мкМ, а різниця в афінності зв'язування між видами становила приблизно 2 рази.</p> <p>5. Експресія DOCK10 у мозочку людини, щурів, собак і мишей (дослідження 21GR164)</p> <p>DOCK10 було ідентифіковано як потенційний нецільовий сайт зв'язування ритлецитинібу в гомогенатах головного мозку собак (дослідження 19GR193), тому це дослідження було проведено для визначення рівнів експресії DOCK10 у мозочку людини, собак, щурів і мишей.</p> <p>Зразки секвенування за даними зовнішнього та внутрішнього секвенування РНК були кількісно оцінені порівняно з відповідними виду організмів транскриптомами, отриманими з Ensembl версії 104, і результати були збережені у внутрішніх базах даних. Дані з доступних внутрішніх баз даних були отримані та проаналізовані для порівняння профілів експресії DOCK10 у людини та релевантних видів тварин, залучених до доклінічних досліджень. Перед аналізом профілю експресії гена дані з набору даних кожного виду були підготовлені, щоб забезпечити можливість прямого міжвидового порівняння у всіх тканинах з наявними даними.</p> <p>Односторонній дисперсійний аналіз (р-значення < 0,001, Df = 4, F-значення = 24,17) на основі log₁₀ трансформованих значень ТРМ експресії DOCK10 між людиною та видами тварин, залученими до доклінічних досліджень, продемонстрував значущі відмінності. Крім того, всі попарні ретроспективні порівняння Даннета також були значущими (р-значення < 0,001), що свідчить про значні відмінності в експресії DOCK10 в мозочку між людиною і всіма досліджуваними видами тварин, залученими до доклінічних досліджень.</p> <p>Отже, експресія DOCK10 в мозочку собаки, щура та миші достовірно відрізняється та перевищує експресію в мозочку людини.</p>	MAP2K7	OC_{50} (M)	Log OC_{50} (M)	Стандартна похибка (Log OC_{50}) (M)	Людина	14,26 ⁶	-4,846	0,220	Собака	7,454 ⁶	-5,128	0,118	Щур	11,13 ⁶	-4,953	0,100
MAP2K7	OC_{50} (M)	Log OC_{50} (M)	Стандартна похибка (Log OC_{50}) (M)														
Людина	14,26 ⁶	-4,846	0,220														
Собака	7,454 ⁶	-5,128	0,118														
Щур	11,13 ⁶	-4,953	0,100														
лікарська залежність	<p>Дослідження залежності від ритлецитинібу не проводилися, оскільки сукупні дані не вказують на потенційний ризик зловживання (ICH M3(R2), 2009). До первинного механізму дії не залучені відомі шляхи зловживання. Крім того, оцінка вторинної фармакологічної активності не виявила жодного зв'язування та (або) функціональної активності з рецепторами, транспортерами або іонними каналами, пов'язаними з потенційним зловживанням, зокрема тими, що пов'язані з дофаміновою, серотоніною, гамма-аміномасляною, опіоїдною, канабіною, глутаматною та аденозиновою передачею сигналів.</p>																

	<p>Було продемонстровано, що ритлечитиніб є субстратом як для MDR1, так і для BCRP, тому очікується, що його розподіл у нервовій системі у людей та видів тварин, залучених до доклінічних досліджень, буде обмеженим порівняно з концентраціями в плазмі крові. У дослідженні розподілу в тканинах щурів співвідношення AUC [¹⁴C] ритлечитинібу в головному мозку до аналогічного показника плазми крові становило приблизно 0,05, що вказує на мінімальний розподіл речовин, пов'язаних із ритлечитинібом, у головному мозку.</p> <p>Не було виявлено жодних ефектів у батареї функціональних спостережень або кількісної оцінки опорно-рухового апарату в щурів, жодного впливу на телеметричні показники активності в дослідженнях серцево-судинної системи щурів і собак, а також жодних клінічних ознак, які б указували на вплив на ЦНС, у дослідженнях токсичності в щурів та собак.</p> <p>Функціональні ефекти ритлечитинібу на ЦНС охоплювали зміни в результатах ВАЕР після 7 місяців повторного введення у собак, що було пов'язано з фізичними змінами в аксональній структурі (набряк аксонів) і не вказує на ризик зловживання або залежності.</p> <p>Література ICH M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. 12 Jan 2009.</p>
токсичність метаболітів	<p>Окремі дослідження токсичності метаболітів ритлечитинібу не проводилися.</p> <p>PF-07034562 (M2) був ідентифікований як основний циркулюючий метаболіт у людини, і безпечність цього метаболіту була оцінена в належний спосіб відповідно до ICH M3(R2), 2009.</p> <ul style="list-style-type: none"> • M2 — метаболіт фази 2 (кон'югат цистеїну), який, як правило, не спричиняє токсикологічного занепокоєння (ICH M3[R2]). • Для M2 не виявлено параметрів первинної фармакології, оскільки він не інгібує JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 або кінази родини TEC. • Розподіл у ЦНС був обмеженим (співвідношення AUC у головному мозку та плазмі < 0,1), а період напіввиведення був коротким, що свідчить про відсутність накопичення M2 або інших споріднених із препаратом речовин, у головному мозку. • Продемонстровано достатнє охоплення експозиції у щурів порівняно з людьми (співвідношення значень AUC₂₄ > 1). • Прогнозується, що M2 є немутагенним на основі оцінювання потенціалу мутагенності <i>in silico</i> з використанням 2 взаємодоповнювальних методологій <i>in silico</i>, експертної системи на основі правил та статистичної системи (Derek Nexus v6.1.0, Knowledge Base version 2020 1.0 і Sarah Nexus v3.1.0 model 2020.1). <p>Література ICH M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. 12 Jan 2009.</p>

токсичність домішок	<p>13-тижневе кваліфікаційне дослідження домішок на щурах (дослідження 8413430)</p> <p>Кваліфікація 11 домішок (PF-06715298, PF-07013233, PF-06763172, PF-06877242, PF-07246596, PF-07103942, PF-06837196, PF-06763318, PF-07202428, PF-06757444, PF-07239023), присутніх у серіях ритлецитинібу, була оцінена в дослідженні <i>in vivo</i>, проведеному в щурів відповідно до вимог НЛП. Ритлецитиніб окремо вводили один раз на добу перорально через шлунковий зонд самцям і самицям щурів лінії Wistar Han (по 10 особин кожної статі на групу; вік від 8 до 9 тижнів) у дозі 200 мг/кг/добу протягом 13 тижнів. Аналогічній групі щурів (по 10 особин кожної статі) вводили 200 мг/кг/добу ритлецитинібу в суміші із загальним вмістом домішок 4,37 %. Контрольній групі щурів (по 10 особин кожної статі) вводили розчинник — 0,5 % (мас./об.) метилцелюлози у воді, оброблений методом зворотного осмосу. Об'єм дози становив 10 мл/кг.</p> <p>Оцінювані параметри дослідження охоплювали клінічні спостереження, масу тіла, споживання корму, офтальмологічні обстеження та клініко-лабораторні параметри (показники клінічного аналізу крові, коагулограми, біохімічного аналізу крові, аналізу сечі). Зразки крові забирали в щурів (по 3 особини кожної статі на групу на часову точку) в день 91 для оцінювання ТК. На день 92 проводили повний розтин, зважували відібрані органи, а також відбирали повний набір тканин і досліджували їх для мікроскопічного оцінювання.</p> <p>Після введення ритлецитинібу з домішками або без них не було виявлено жодних побічних реакцій, і в обох групах виявлені реакції були загалом подібними за характером і величиною.</p> <p>Єдиною зміною, пов'язаною з ритлецитинібом, яка мала більшу величину у тварин, яким вводили ритлецитиніб з домішками, був приріст маси тіла. Приріст маси тіла у самців і самиць, які отримували ритлецитиніб з домішками, становив 0,72 і 0,73 від значень контрольної групи відповідно, порівняно з 0,83 і 0,91 від значень контрольної групи для самців і самиць відповідно, які отримували ритлецитиніб без домішок. Зниження приросту маси тіла не було пов'язане з будь-якими відхиленнями від норми в клінічних спостереженнях або інших клінічних даних, що свідчили б про погіршення переносимості; отже, цей вплив на приріст маси тіла не вважався побічною реакцією.</p> <p>Інші пов'язані з ритлецитинібом явища, що спостерігалися у тварин, яким вводили ритлецитиніб без домішок, за характером, інцидентністю, величиною та (або) тяжкістю були подібними до тих, що спостерігалися у тварин, яким вводили лише ритлецитиніб, і охоплювали вплив на показники клінічного та біохімічного аналізу крові, а також мікроскопічні зміни в лімфоїдних тканинах, печінці, нирках, придатках яєчок і передміхуровій залозі. У тварин, яким вводили ритлецитиніб окремо або з домішками, спостерігалось пов'язане із застосуванням ритлецитинібу зниження клітинності лімфоїдної тканини в тимусі, селезінці, а також у мезентеріальних і пахвинних лімфатичних вузлах.</p> <p>Показники клінічного аналізу крові ефекти, пов'язані з ритлецитинібом, охоплювали підвищення середньої величини об'єму еритроцитів (в 1,03 – 1,05 раза; за винятком самиць, які отримували ритлецитиніб без домішок), середнього рівня гемоглобіну (в 1,03–1,06 раза) та ширини розподілу еритроцитів (в 1,14–1,22 раза); а також пойкилоцитоз (наявність ексцентроцитів) і нижча кількість лейкоцитів (у 0,44–0,53 раза) внаслідок</p>
---------------------	--

нижчої кількості лімфоцитів (у 0,34–0,41 раза), моноцитів (у 0,46–0,62 раза; лише в самців) та еозинофілів (у 0,21–0,50 раза). Точного механізму змін показників еритроцитів не було виявлено, але вони могли бути пов'язані з пойкилоцитозом, що спостерігався в обох групах, які отримували ритлецитиніб із домішками або без домішок, через наявність ексцентроцитів (від мінімальних до виражених). Зниження кількості лейкоцитів було пов'язане зі зниженням клітинності лімфоцитів, що реєструвалося мікроскопічно в різних лімфоїдних тканинах (тимус, селезінка, пахвинні та мезентеріальні лімфатичні вузли). Зміни показників клінічного аналізу крові не вважалися побічними реакціями через їхню незначну величину та (або) відсутність доказів клінічно значущої імуносупресії на основі клінічних спостережень та макроскопічних і мікроскопічних даних.

Зміни з боку біохімічного аналізу крові, пов'язані з ритлецитинібом, охоплювали зниження концентрації загального білка (в 0,94 раза), альбуміну (в 0,93 раза) і кальцію (в 0,96 раза) та підвищення АЛТ (в 1,2 раза) у самиць; зниження концентрації хлоридів (в 0,97–0,98 раза) у самців; і зниження концентрації калію (в 0,81–0,85 раза) у тварин обох статей. Нижчий рівень кальцію, імовірно, був зумовлений нижчим рівнем альбуміну. Механізм інших змін із боку біохімічного аналізу крові не був ідентифікований. Жодна зі змін із боку біохімічного аналізу крові не вважалася побічною реакцією через незначну величину та відсутність мікроскопічних даних, які би корелювали з такими змінами.

Зміни з боку аналізу сечі, пов'язані з ритлецитинібом, обмежувалися підвищенням інцидентності або вираженості виділення білка із сечею в самців, які отримували ритлецитиніб із домішками або без домішок. Зміни з боку аналізу сечі не були віднесені до категорії побічних реакцій через незначну величину та відсутність побічних реакцій з боку клініко-хімічних або мікроскопічних змін у нирках, які би корелювали із зазначеними змінами.

Пов'язане із застосуванням ритлецитинібу зниження клітинності лімфоїдної тканини в тимусі (від помірного до важкого ступеня) та селезінці (від мінімального до помірного) корелювало зі зменшенням середньої маси тимуса (в 0,22–0,36 раза) та селезінки (в 0,75–0,91 раза) та макроскопічним спостереженням зменшення тимуса у кількох самиць, які отримували ритлецитиніб з домішками, порівняно з контролем. Також було виявлено зниження лімфоїдної клітинності (від мінімального до помірного ступеня) в мезентеріальних і пахвинних лімфатичних вузлах. Мініміально знижена клітинність гемопоетичних клітин (усіх клітинних ліній) у кістковому мозку груднини була виявлена у тварин, які отримували ритлецитиніб із домішками або без них.

Зниження клітинності лімфоїдної тканини в тимусі, селезінці, мезентеріальних і пахвинних лімфатичних вузлах та (або) зниження клітинності кісткового мозку не вважалось побічною реакцією, оскільки не було виявлено жодних пов'язаних із ритлецитинібом клінічних проявів побічних реакцій (тобто не було доказів імуносупресії, що призводила до підвищення інцидентності летальних випадків або передсмертного стану), а також не було доказів погіршення загального стану здоров'я тварин, які отримували ритлецитиніб з домішками або без них. Відхилення від норми клініко-лабораторних параметрів, не віднесених до категорії побічних

реакцій, корелюють із результатами досліджень лімфоїдних органів, зокрема зниження рівня циркулюючих лімфоцитів і лейкоцитів.

У нирках тварин, які отримували ритлечитиніб із домішками або без них, спостерігалось збільшення порівняно з контролем інцидентності та тяжкості (від мінімальної до легкої) накопичення гіалінових крапель (у клітинах проксимальних каналців кори в самців і клітини каналців зовнішньої смужки мозкового шару в самців і самиць), що не вважалося побічною реакцією на підставі відсутності інших патологічних змін у нирках, як-от тубулярна дистрофія або некроз, а також відсутності будь-яких мікроскопічних змін клубочків. Гістохімічне забарвлення та морфологічні характеристики крапель свідчили про наявність у їхньому складі лізосомального ліпофусцину та альфа2μ-глобуліну. Краплі в зовнішній смузі були схожими на лізосоми, що містять ліпофусцин (Greaves, 2012). Утворення ліпофусцину, пігменту «старіння», збільшується з віком і не має функціонального або клінічного значення для нирок. Накопичення альфа2μ-глобуліну в проксимальних епітеліальних клітинах каналців є видоспецифічною характеристикою щурів, яка реєструвалася лише в самців щурів та узгоджувалася з посиленням нормального накопичення (альфа2μ-глобуліну (Greaves, 2012).

У печінці та нирках самців і самиць, а також у придатку яєчка та передміхуровій залозі самців спостерігалася нижча частота виявлення спонтанних мінімальних моноклеарних клітинних інфільтратів у тварин, які отримували ритлечитиніб із домішками та без них, порівняно з тваринами, яким вводили препарат порівняння; таке зниження частоти виявлення було пов'язане з ритлечитинібом.

Зниження клітинності лімфоїдної тканини в різних лімфоїдних органах, зниження клітинності всіх гемопоетичних ліній у кістковому мозку груднини та зниження інцидентності спонтанних моноклеарних інфільтратів у нирках, печінці, придатках яєчок і простаті узгоджувалися з відомими фармакологічними ефектами інгібування JAK3/TEC (Ma et al, 2006).

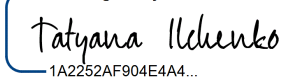
Системна експозиція, оцінена за показниками C_{max} і AUC_{24} , була подібною в самців і самиць у всіх групах дозування. Середня системна експозиція була подібною (у межах 2 разів) при застосуванні еквівалентних пероральних доз ритлечитинібу як окремого препарату або з домішками. Середнє значення T_{max} реєструвалося через 1 год після застосування для обох груп дозування.

Отже, після введення ритлечитинібу з домішками або без них не було виявлено жодних побічних реакцій; виявлені реакції мали подібну природу, частоту випадків, масштаб та (або) ступінь тяжкості в обох групах. NOAEL становила 200 мг/кг/добу для препарату з домішками або без них, що відповідало значенням C_{max} і AUC_{24} ритлечитинібу 22 500 нг/мл і 67 300 нг • год/мл відповідно, а для ритлечитинібу з домішками значення C_{max} і AUC_{24} становили 30 500 нг/мл і 85 800 нг•год/мл відповідно в день 91 фази введення препарату.

Література

Greaves P. Urinary tract. In: histopathology of preclinical toxicity studies: interpretation and relevance in drug safety evaluation. 4th Ed. Academic Press; 2012:537-614.

	Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. <i>Annu Rev Immunol</i> 2006;24:657-79.
інше	Інші дослідження не проводилися.
5. Висновки щодо доклінічного вивчення	<p>Ритлечитиніб — це ковалентний, необоротний інгібітор JAK3 з пероральною біодоступністю та високою селективністю щодо JAK1, JAK2 і TYK2. Ритлечитиніб також необоротно інгібує кінази родини TEC із селективністю щодо ширшого кіному людини. Циркулюючий метаболіт M2 не інгібує JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, BMX, BTK, ITK, TEC і TXK і тому є фармакологічно неактивним. У клітинах, де JAK-кінази передають сигнали попарно, ритлечитиніб селективно інгібує передачу сигналів цитокінів через спільний γ ланцюг (також відомий як CD132), який асоційований з JAK3. Ритлечитиніб проявляє функціональну селективність щодо всіх інших сигнальних пар JAK, які не пов'язані з JAK3. Крім того, ритлечитиніб пригнічує цитолітичну функцію CD8⁺ Т-клітин і НК, опосередковану механізмами, залежними від JAK3 та членів родини TEC-кіназ, зокрема передачу сигналів, опосередковану ITK. Отже, очікується, що лікування ритлечитинібом пригнічуватиме шляхи розвитку процесу запалення, опосередковані JAK3-залежними цитокінами або шляхи, залежні від родини TEC.</p> <p>У фармакологічних дослідженнях безпечності препарату <i>in vivo</i> у щурів і собак спостерігалися незначні та непостійні зміни ЧСС та АТ, що не корелюють з T_{max}. Потенційна здатність ритлечитинібу спричиняти подовження інтервалу QT у людини вважається низькою, оскільки значення IC_{50} в аналізі інгібування каналів hERG клітин лінії HEK спостерігалося за експозиції, яка щонайменше в 273 рази перевищує C_{max} незв'язаного препарату після застосування дози 50 мг у людини. Аналіз залежності QTc від концентрації препарату ($CQTc$) на основі даних дослідження B7981001 додатково підтвердив висновок про те, що потенціал подовження QT у ритлечитинібу є низьким. Нахил лінії регресії був невеликим, так що верхня межа 90%-го ДІ для скоригованої за плацебо зміни QTcF від вихідного рівня ($\Delta\Delta QTcF$) становила менше 10 мс у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій, із супратерапевтичною концентрацією включно.</p> <p>Фармакокінетика перорального застосування ритлечитинібу в мишей, щурів і собак свідчить про його швидку абсорбцію та добру біодоступність. Системна експозиція ритлечитинібу зростала з підвищенням дози в основних токсикологічних дослідженнях у щурів, кроликів і собак. Відмінностей, пов'язаних зі статтю, або кумуляції при застосуванні препарату не спостерігалося. Зв'язування ритлечитинібу з білками плазми крові було від низького до помірного рівня, але демонструвало певну варіабельність у різних видів організмів. Після введення шурам дози [¹⁴C]ритлечитинібу радіоактивність широко розподілялася по всьому організму з найвищими концентраціями в увеальному тракту, нирках, крові та легенях. Співвідношення AUC [¹⁴C]ритлечитинібу в головному мозку до аналогічного показника в плазмі крові становило < 0,05, що свідчить про обмежений розподіл у головному мозку і те, що ця сполука є субстратом для MDR1/BCRP. Профілювання метаболітів <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> продемонструвало, що основними механізмами кліренсу ритлечитинібу є кон'югація з глутатіоном та окислення, опосередковане CYP, причому основною ізоформою, що сприяє цьому, є CYP3A4, хоча жоден із цих шляхів не забезпечує $\geq 25\%$ кліренсу.</p>

	<p>Ритлецитиніб був основною сполукою, що циркулювала в плазмі крові людини, з одним ідентифікованим основним неактивним метаболітом, М2. Унікальних метаболітів у людини порівняно з профілями метаболітів у мишей, щурів та собак не було виявлено, а достатнє охоплення М2 було продемонстровано в опорних дослідженнях у щурів. Отже, немає потреби в проведенні додаткових досліджень токсичності для М2. Ритлецитиніб продемонстрував низький ризик інгібування та індукції основних ферментів СYP та UGT, за винятком клінічно значущого залежного від часу інгібування СYP1A2 та СYP3A. Ритлецитиніб продемонстрував низький потенціал клінічно значущої взаємодії з ШКТ, печінковими та нирковими транспортерами, за винятком інгібування OСТ1.</p> <p>Ритлецитиніб оцінювали в дослідженнях токсичності одно- та багаторазового введення щурам та собакам. Вік щурів і собак, залучених до досліджень хронічної токсичності, є зіставним із віком людей віком від 12 років і дає змогу оцінити безпечність застосування препарату в людей віком від 12 років. Вік щурів у дослідженні ювенільної токсичності відповідає віковому діапазону людини приблизно від 3 місяців до підліткового віку.</p> <p>Органи-мішені та основні зміни після введення ритлецитинібу охоплюють смертність у щурів і кроликів, ЦНС та ПНС у собак, імунну та гемолімфопоетичну системи в щурів і собак, що відповідає відомій фармакологічній активності інгібування кіназ JAK та TEC, тимус і щитоподібну залозу в щурів (доброякісні тимоми/аденоми та гіперплазія), а також вплив на фертильність самців без впливу на сперматогенез у щурів, ембріональний розвиток у щурів і кроликів та пре-/постнатальний розвиток у щурів. Інші зміни охоплюють незначний і непослідовний вплив на серцево-судинну систему в щурів і собак, вплив на нирки і печінку в щурів, надниркові залози в щурів і собак, а також блювання та порушення випорожнення в собак.</p> <p>Видоспецифічне (лише для собак) явище аксональної дистрофії, що спостерігалось лише в дослідженнях хронічної токсичності у разі багатократного введення, піддавалося моніторингу (за допомогою ВАЕР-тесту) та було оборотним. Це явище не супроводжувалося ознаками дегенеративного процесу або впливу на мієлінізацію чи синапси. Аксональна дистрофія вважалася побічною реакцією лише тоді, коли супроводжувалася оборотними функціональними слуховими порушеннями (за даними ВАЕР-тесту). Аксональна дистрофія не спостерігалася в дослідженнях хронічної токсичності та канцерогенності в щурів (від 6 місяців до 2 років) або мишей (6 місяців). У дослідженні ювенільної токсичності в щурів не було виявлено пов'язаного з ритлецитинібом впливу на нервову систему або скелет. У межах програми клінічних досліджень ретельно оцінювалася значущість аксональної дистрофії для людини.</p>
Заявник (власник реєстраційного посвідчення)	<p>DocuSigned by:  1A2252AF904E4A4...</p> <p>(підпис) Тетяна ІЛЬЧЕНКО</p> <p>(П. І. Б.)</p>