

# Использование приматов в доклинических исследованиях препаратов моноклональных антител

М.Н. Макарова\*, В.Г. Макаров

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Россия

\* E-mail: [makarova.mn@doclinika.ru](mailto:makarova.mn@doclinika.ru)

**Резюме.** Появление новых биотехнологических препаратов, в том числе препаратов моноклональных антител (МАт), потребовало пересмотра стратегии доклинической разработки. Для адекватного прогнозирования рисков для человека доклинические исследования эффективности и безопасности биотехнологических препаратов *in vivo* должны проводиться на релевантных видах лабораторных животных. Релевантным видом для препаратов МАт являются лабораторные животные, у которых препарат проявляет фармакологическую активность благодаря экспрессии необходимого эпитопа, и для тканей которых можно продемонстрировать аналогичный профиль перекрестной реактивности по сравнению с тканями человека. Для препаратов МАт наиболее часто единственный релевантный вид — это разные виды нечеловекообразных приматов (НЧП). Если нет альтернатив (гомологичные белки, генетически модифицированные животные), должны быть приняты все меры к сокращению числа животных, задействованных в доклинических исследованиях в соответствии с принципом «трех R». Единой стратегии проведения доклинических исследований *in vivo* для биотехнологических препаратов не существует. При планировании исследований всегда следует применять научный подход с учетом всех доступных данных. Хотя НЧП нужны для получения информации, необходимой для оценки риска для многих МАт, биологические особенности МАт, такие как высокая специфичность, предсказуемые метаболические пути и низкая токсичность, также дают возможность свести к минимуму количество используемых НЧП в изучении безопасности и при этом повысить эффективность разработки препаратов МАт. Программу доклинических исследований нетоксичных МАт можно адаптировать путем сокращения количества исследований токсичности при многократном введении, снижения количества исследуемых доз, а также сокращения количества животных в группах отсроченного наблюдения. Если грызуны также являются фармакологически релевантным видом, использование НЧП может быть сокращено. В статье рассматриваются примеры программ доклинических исследований препаратов МАт и возможные стратегии, призванные минимизировать количество НЧП в эксперименте и в то же время получить достаточно информации, необходимой для максимально полной оценки рисков для человека.

**Ключевые слова:** нечеловекообразные приматы, терапевтические моноклональные антитела, доклинические исследования, токсичность

**Для цитирования:** Макарова М.Н., Макаров В.Г. Использование приматов в доклинических исследованиях препаратов моноклональных антител. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2023; 2. 4–27. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-02-01>.

Review article

## Non-human primates in preclinical development of monoclonal antibodies

M.N. Makarova\*, V.G. Makarov

Research and manufacturing company “Home of Pharmacy”, Leningrad oblast, Russia

\* E-mail: [makarova.mn@doclinika.ru](mailto:makarova.mn@doclinika.ru)

**Abstract.** The emergence of new biopharmaceuticals, including therapeutic monoclonal antibodies (MABs), required a revision of the preclinical development strategy. To provide human risk assessment data, preclinical *in vivo* efficacy and safety studies of biotechnology-derived pharmaceuticals should be conducted in pharmacologically relevant species. A relevant species is one in which the test material is pharmacologically active due to the expression of the epitope and is one which demonstrate a similar tissue cross-reactivity profile as for human tissues. Often, the only relevant species for preclinical safety assessment of therapeutic MABs are non-human primates (NHPs). If there are no other alternatives (ho-

© Макарова М.Н., Макаров В.Г., 2023

mologous proteins, genetically modified animals), all measures should be taken to reduce the number of animals involved in preclinical studies in accordance with the 3Rs principle. There is not a single solution for therapeutic MABs preclinical development program. When planning research, a scientifically-based approach should always be applied, taking into account all available data. While NHPs are currently necessary to provide risk assessment data for many therapeutic MABs, the very characteristics of MABs biology such as high target specificity, predictable metabolic pathways, and low toxicity, also provide opportunities to minimize the use of NHPs in safety testing and to increase the efficiency of MABs development. The opportunities to adapt development program for MAB at low risk of toxicity include reducing the number of chronic studies, dose groups and recovery group animals. If rodents are also a pharmacologically relevant species, the use of NSPs may be reduced. The paper discusses examples of preclinical programs for therapeutic MABs and possible strategies aimed to minimize the number of NHPs during preclinical safety studies without compromising human safety.

**Keywords:** non-human primates, therapeutic monoclonal antibodies, preclinical studies, toxicity

**For citation:** Makarova M.N., Makarov V.G. Non-human primates in preclinical development of monoclonal antibodies. *Laboratory Animals for Science*. 2023; 2. 4–27. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-02-01>.

## Моноклональные антитела

Появление препаратов моноклональных антител (МАт) стало настоящим прорывом в современной фармакологии и фактически изменило саму концепцию лечения многих заболеваний: произошел переход от неспецифической к направленной (таргетной) терапии. Высокая специфичность и аффинность препаратов МАт к молекуле-мишени или антигену обеспечивает высокую терапевтическую эффективность с минимумом побочных эффектов. С появлением этого класса препаратов стало возможно успешно лечить многие заболевания, в первую очередь онкологические и аутоиммунные.

Начало бурного развития создания терапевтических МАт приходится на 80-е годы прошлого века. Первый препарат МАт — Orthoclone OKT3, внедренный в клиническую практику в 1986 г., МАт мыши, предназначался для подавления иммунного ответа при трансплантации. В следующие 10-летия усилия были направлены на разработку методов и создание антител, обладающих меньшими антигенными свойствами, — химерных и гуманизированных. В химерных антителах (в названии используется суффикс «ксимаб») 33% структуры происходит от мыши, константная часть мышиных антител замещена соответствующей константной областью иммуноглобулина человека, а в гуманизированных антителах (в названии используется суффикс «зумаб») до 90% структуры состоит из человеческого иммуноглобулина, только антигенсвязывающий сайт в вариательной области (область, определяющая комплементарность) представляет мышиную последовательность. Появление новых технологий, создание различных линий трансгенных мышей, экспрессирующих человеческие вариательные домены, позволило разработать полностью человеческие антитела (в названии используется суффикс «умаб»). Как гуманизированные, так и полностью человеческие антитела обладают значительно меньшим иммуногенным потенциалом и проявляют свойства, сходные с эн-

догенными иммуноглобулинами (Ig) класса G человека [1, 2].

Антитела представляют собой гликопротеины, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов, которые продуцируются В-клетками для идентификации и нейтрализации чужеродных организмов или антигенов. Иммуноглобулины состоят из двух тяжелых и двух легких цепей, класс иммуноглобулина определяется тем, какой тип тяжелой цепи он содержит [1, 2]. Терапевтические МАт обычно представляют собой IgG. Тяжелые и легкие части состоят из вариательных и константных участков. Аминокислотные последовательности вариательных участков разных антител значительно различаются. Вариательные области каждой тяжелой и легкой цепи образуют антигенсвязывающий сайт (Fab), два константных домена — кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина (Fc) — концевая часть молекулы иммуноглобулина, определяющая эффекторную функцию путем взаимодействия с Fc-рецептором на поверхности клетки. Кроме того, благодаря наличию Fc-фрагмента, IgG способны связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который осуществляет плацентарный транспорт IgG от матери к плоду у человека и приматов [1].

Этот рецептор также играет роль в реутилизации IgG во взрослом организме, так как принимает участие в эндоцитозе IgG. Связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) способствует увеличению периода полувыведения МАт. Эффективность связывания IgG и FcRn строго зависит от уровня pH. Аффинность FcRn к IgG в 100 раз выше при pH 6,0, чем 7,1. Это позволяет IgG избежать обычной для большинства растворимых белков деградации в кислой среде лизосомы. Интернализированный IgG рециклирует с FcRn обратно к плазматической мембране и таким образом избегает разрушения. После попадания в pH-нейтральную среду внеклеточного пространства комплекс IgG — FcRn диссоциирует и IgG возвращается в кровеносное русло. Этот механизм может

объяснить большую продолжительность периода полураспада IgG по сравнению с антителами других изотипов [3].

Эффекторная функция МАт осуществляется за счет механизма антителозависимой цитотоксичности (antibody-dependent cytotoxicity, ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (complement-dependent cytotoxicity, CDC). ADCC и CDC преимущественно запускаются МАт изотипов IgG1 и IgG3, при этом МАт других изотипов демонстрируют значительно сниженную эффекторную функцию. ADCC, приводящая к гибели клетки-мишени, реализуется посредством взаимодействия МАт с рецепторами Fcγ, которые экспрессируются на иммунных эффекторных клетках. CDC запускается связыванием белка системы комплемента C1q с антителом, что приводит к высвобождению анафилатоксинов, образованию мембрано-атакующего комплекса, активации рецепторов C1q на эффекторных клетках и в результате — к гибели клетки-мишени. В зависимости от терапевтической цели запуск эффекторной функции может быть как желательным, так и нежелательным [1].

Возрастающее значение лекарственных препаратов МАт очевидно, поскольку терапия с использованием МАт постепенно становится преобладающим методом лечения различных заболеваний. Во всем мире не менее 570 терапевтических МАт было изучено в клинических испытаниях коммерческими компаниями, из них 79 одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (US FDA) и в настоящее время используется в клинической практике, в том числе 30 препаратов МАт для лечения онкологических заболеваний. В последние 10-летия терапевтические антитела стали преобладающим классом новых разрабатываемых лекарств и самыми продаваемыми препаратами на фармацевтическом рынке. В 2018 г. 8 из 10 самых продаваемых лекарств в мире были биологическими препаратами. В 2018 г. на мировом рынке терапевтические МАт оценивались примерно в 115,2 млрд долларов США и, как ожидается, к 2025 г. принесут доход в размере 300 млрд долларов США [4].

Новые технологические достижения сделали разработку методов лечения с использованием МАт более быстрой и эффективной. Технологии развиваются в том числе и в направлении создания биспецифических антител. В антителе присутствует 2 антигенсвязывающих домена (Fab или scFv), что позволяет одному антителу одновременно связывать разные антигены. Биспецифические антитела могут быть сконструированы так, чтобы иметь новые функции, которые невозможно реализовать просто путем смешивания двух исходных антител. Первым одобренным биспецифическим антителом в Европе в 2009 г. стал катумаксомаб. Катумаксомаб предна-

значался для лечения солидных опухолей у пациентов со злокачественным асцитом. Однако этот препарат был снят с производства в 2017 г. по коммерческим причинам. В настоящее время 2 биспецифических антитела получили одобрение FDA США: блинатумомаб для лечения острого лимфобластного лейкоза и эмицизумаб — гемофилии А. На сегодняшний день в клинических испытаниях находится более 85 биспецифических антител, более 80% из которых планируется использовать в терапии рака. Концепции и платформы, лежащие в основе разработки биспецифических антител, продолжают быстро развиваться, создавая множество новых возможностей для крупных терапевтических прорывов [4].

### **Доклинические исследования препаратов МАт. Релевантность видов лабораторных животных**

Очевидно, такое бурное развитие нового класса препаратов потребовало тщательного пересмотра стратегий доклинической разработки в плане оценки как эффективности, так безопасности МАт.

Во многом активный пересмотр имеющихся рекомендаций по доклинической оценке биотехнологических препаратов был инициирован катастрофическим исходом клинических испытаний препарата TGN1412 (анти-CD28-антитело, суперагонист) на здоровых добровольцах. Результаты модельных опытов на грызунах свидетельствовали, что суперагонисты CD28 могли быть эффективными средствами лечения воспалительных аутоиммунных заболеваний [5], а гуманизированное антитело (TGN1412) будет иметь аналогичный потенциал для терапии в клинической практике [6].

В марте 2006 г. в госпитале Норвик Парк (Лондон, Великобритания) во время проведения клинического исследования I фазы препарата TGN1412 у 6 мужчин, получивших активный компонент, быстро развилась полиорганная недостаточность, 2 других участника, которые принимали плацебо, не пострадали. Это было первое исследование на человеке препарата TGN1412 компании TeGenero Immuno Therapeutics [7].

В ходе доклинических исследований безопасность TGN1412 изучали на 4 видах животных — мышах, крысах, собаках и обезьянах. В исследовании безопасности TGN1412 на яванских макаках препарат в дозе до 50 мг/кг хорошо переносился и не имел признаков токсичности или системной иммунной реакции. Однако при введении людям всего лишь 1/500 дозы, которая была установлена как безопасная для животных, препарат приводил к катастрофическим последствиям — развитию системного воспалительного

иммунного ответа (так называемый цитокиновый шторм) [8, 9]. Последующий анализ состава препарата TGN1412, использованного в клиническом исследовании, показал, что он соответствовал спецификации и не содержал провоспалительных примесей [10].

Как выяснилось позднее, причина того, что в доклинических исследованиях не был установлен риск развития цитокинового шторма, — различия в экспрессии CD28 между видами. В противоположность человеку CD28 не экспрессируется на CD4+ эффекторных Т-клетках памяти у всех видов животных, использованных в доклинических исследованиях, таким образом, CD28 не может быть стимулирован введением TGN1412. По этой причине было невозможно на основании доклинических данных предсказать развитие цитокинового шторма у людей [9].

Впоследствии выяснилось также, что в результате особенностей проведения исследований *in vitro* не была корректно установлена эффективная доза, а добровольцы фактически получили почти максимальную иммуностимулирующую дозу. После инцидента с TGN1412 были разработаны новые процедуры исследований *in vitro* для оценки МАТ [9–11].

Данный инцидент показал, насколько критично корректное проведение доклинических исследований и важно использовать тест-системы (*in vitro* и *in vivo*), достаточно чувствительные к эффектам препарата, чтобы прогнозировать риски для человека при применении биотехнологических препаратов.

Отдельное внимание в современных международных руководствах WHO<sup>1</sup>, ICH<sup>2</sup>, а также в Решении ЕЭК № 89<sup>3</sup> уделяется необходимости проведения доклинических исследований на релевантном виде животных. Согласно руководствам, релевантным видом для МАТ являются лабораторные животные, на которых препарат проявляет фармакологическую активность благодаря экспрессии необходимого эпитопа, и для тканей которых можно продемонстрировать профиль перекрестной реактивности, аналогичный таковому у человека.

Таким образом, для определения релевантности вида недостаточно одного исследования: необходимо рассмотреть ряд факторов.

Вопрос о том, какие виды релевантны, сложен. Например, связывание МАТ с его мишенью при нормальных уровнях экспрессии в ткани не обязательно означает, что данный вид является релевантным или чувствительным к фармакологическим эффектам препарата. Показано, что 10% МАТ, которые обладали

перекрестной реактивностью у видов НЧП, обладали фармакологической эффективностью у НЧП менее 10%. Можно определить вид как релевантный, если МАТ являются фармакологически активными у данных животных. В идеале мишень должна модулироваться так же, как таковая у человека, и для полной оценки релевантности вида может потребоваться исследование активации соответствующих сигнальных путей или эффекторной функции [12].

Поиск релевантного вида целесообразно начать с межвидового сравнения гомологии аминокислотной последовательности мишени, что может быть проведено путем анализа баз данных. Далее следует проводить исследование *in vitro*, направленные на качественное и количественное межвидовое сравнение аффинности связывания с мишенью, рецепторного связывания и кинетических параметров. Рекомендовано также изучить фармакологическую активность. Функциональная активность может быть изучена с использованием видоспецифичных клеточных тест-систем и/или с помощью фармакологических и токсикологических исследований *in vivo*. Изучение видовых различий, касающихся связывания с мишенью и функциональной активности, важно для обоснования предполагаемых режимов дозирования. Необходимо получить доказательства того, что модель достаточна чувствительна для выявления потенциально возможных нежелательных эффектов. Когда мишень экспрессируется на очень низких уровнях у здоровых животных (например, воспалительные цитокины или опухолевые антигены), изучения аффинности связывания и активности в клеточных системах может быть достаточно для выбора видов<sup>4</sup>.

Межвидовые различия в аффинности к мишени, характере экспрессии, механизме действия, фармакологической активности и иммуногенности могут снизить трансляционную ценность доклинических исследований. Глубокое понимание различий между видами с самого начала разработки препарата необходимо для грамотного планирования исследований с использованием релевантных видов и последующей интерпретации результатов. Использование «неподходящих» видов может дать некорректные результаты и задержать начало клинических исследований из-за предоставления информации, которая может ввести в заблуждение с научной точки зрения или не иметь никакой ценности при оценке риска для человека.

<sup>1</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Technical Report Series N. 987.

<sup>2</sup> ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals Step 5, 2011.

<sup>3</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>4</sup> WHO Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, Annex 4, TRS N. 987. 2014.



Одним из подходов, который может быть использован для подбора релевантного вида, является перекрестная тканевая реактивность (ПТР). Исследования ПТР представляют собой изучение связывания исследуемого препарата с тканями в тестах *in vitro* с использованием иммуногистохимических методик. Данные тесты позволяют охарактеризовать связывание препаратов МАт и препаратов модифицированных антител с антигенными детерминантами в тканях<sup>5</sup>.

Исследования данного типа необходимы для идентификации как ожидаемого, таргетного связывания в тканях человека, так и непредусмотренного, нетаргетного и нежелательного связывания биопрепаратов в тканях, но при этом специфического, то есть опосредованного CDR-участком антитела, так называемой перекрестной реактивности, или кросс-реактивности. В ходе такого исследования могут быть выявлены новые мишени и сайты связывания в тканях, ранее неизвестные как содержащие искомым антиген [13].

Изначально исследование ПТР использовали для поиска потенциальных органов-мишеней при определении токсичности в доклинических и клинических исследованиях. Однако по мере накопления данных стало понятно, что корреляция не столь однозначна: яркое окрашивание не всегда связано с какими-либо эффектами *in vivo* в этом органе или ткани. По разным причинам связывание антител с антигенами в тканях *ex vivo* может отличаться от истинного, существующего *in vivo* [13].

Как уточняется в Решении № 89 ЕЭК<sup>5</sup>, само по себе связывание препарата с тканями не является показателем возможного проявления его биологической активности *in vivo*. Кроме того, связывание исследуемого препарата с участками, которые обычно являются недоступными для него в условиях *in vivo* (то есть с цитоплазмой), как правило, не имеет клинического значения. Именно поэтому результаты исследований следует интерпретировать, учитывая всю полученную информацию, включая фармакологические данные и сведения по оценке безопасности препарата.

Несмотря на определенные ограничения, сравнительное исследование ПТР может быть использовано при выборе релевантного вида животных для доклинических исследований. В случае если общий характер окрашивания тканей, типов клеток и субклеточной локализации антигена сопоставим или близок у изучаемого вида животных к человеческому, то именно он может быть предпочтителен для выбора как релевантного в доклинических исследованиях [13].

Следует учитывать, что такой подход не является основным, и его результаты должны

рассматриваться в комплексе с другими данными.

Поскольку МАт направлены на эндогенные белки человека, они могут не связываться или нейтрализовать фармакологические действия аналогичной мишени у лабораторных животных. Для многих МАт единственным фармакологически значимым видом являются НЧП и, следовательно, в доклинических исследованиях может быть использован только один вид. Наиболее часто используемыми видами в доклинических исследованиях являются яванская макака и макака-резус. Между тем за последние 10-летия по мере развития иммунологических препаратов для этих и других видов НЧП получено достаточно большое количество данных, свидетельствующих о наличии множества видоспецифичных особенностей морфологии и функционирования клеток иммунной системы, что необходимо учитывать при выборе релевантного вида для проведения исследований.

Существенные отличия между видами на молекулярном уровне неминуемо влияют на оценку фармакодинамических и токсических эффектов МАт. Например, в то время как CD16 человека (рецептор Fcγ типа III) взаимодействует с IgG1 и IgG3, CD16 макаки вместо этого взаимодействует с IgG1 и IgG2 [14]. Кроме того, CD16 отсутствует в гранулоцитах макаки [14, 15]. Эти различия, вероятно, искажали бы оценку терапевтических антител, которые действуют через этот рецептор Fcγ.

Кроме того, известно много случаев, когда клоны антител связываются с различными типами клеток у разных видов. Например, известно, что экспрессия маркеров гранулоцитов и моноцитов у людей существенно отличается от экспрессии у НЧП. Антитело к CD33 человека (AC104.3E3) позиционировалось как перекрестно-реактивное с макаками-резусами и яванскими макаками, но в двух исследовательских лабораториях показано, что у этих видов антитело хорошо окрашивает гранулоциты, в то время как у человека оно окрашивает моноциты и классические дендритные клетки [16].

Рецептор Fcγ CD16 обнаружен на гранулоцитах у людей и черных мангабеев, но не у макак или павианов, что необходимо учитывать при выборе вида животных в исследованиях терапевтических МАт, которые могут связываться, передавать сигналы и опосредовать интернализацию через этот рецептор. Еще одним примером является CD56, который экспрессируется на моноцитах макак, но является маркером NK-клеток у людей. Таким образом, необходимым этапом в определении релевантного вида является установление того, что используемый клон реактивен по отно-

<sup>5</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

шению к интересующей клеточной популяции, этот вывод можно сделать либо посредством обзора, основываясь на данных литературы, либо посредством экспериментальной проверки [16].

В 2022 г. опубликованы результаты обширного скринингового исследования. С целью расширить базу данных о перекрестной реактивности приматов был проведен анализ реактивности 332 МАт в крови человека и четырех следующих видах НЧП: макака-резус (*Macaca mulatta*), яванская макака (*Macaca fascicularis*), африканская зеленая мартышка (*Chlorocebus aethiops*) и оливково-желтый бабуин (гибрид *Papio hamadryas anubis* × *Papio hamadryas cynocephalus*). В пяти популяциях иммунных клеток в крови человека и четырех видов приматов протестировано 332 антитела. На основании полученных данных был создан полный каталог перекрестной реактивности, который включает специфичность к типу клеток. Авторы использовали этот каталог для создания больших масс-цитометрических универсальных панелей межвидового фенотипирования и передачи сигналов для человека, а также для трех видов лабораторных животных, наиболее близких человеку: макак-резусов, яванских макак, африканских зеленых мартышек и еще одного вида животных, наиболее широко используемого при разработке лекарственных препаратов, — мышей С57BL/6. Панели антител и полученные данные доступны онлайн в качестве ресурса, позволяющего проводить будущие исследования, сравнивающие иммунные реакции у разных видов при оценке терапевтических средств [16].

Наиболее примечательные примеры межвидовых отличий, выявленные в ходе данной работы, приведены ниже.

Ранее [14, 15] было показано, что у макак CD33 присутствует на гранулоцитах, а CD16 находится только на моноцитах и дендритных клетках в отличие от человека. Африканские зеленые мартышки имеют тот же паттерн распределения, что и макаки, хотя и с более слабым окрашиванием CD33. Другое заметное отличие состоит в том, что CD172g [сигнальный регуляторный белок (SIRP) g, также известный как SIRPb2] экспрессируется на CD11b+ моноцитах и гранулоцитах, но не на Т-клетках у всех исследованных видов НЧП. Напротив, у человека этот маркер экспрессируется на Т-клетках, некоторых В-клетках и в некоторой степени на гранулоцитах [16].

Другим примечательным примером обнаруженных различий является наличие окрашивания CD2 не только на Т-клетках, но и на В-клетках макак-резусов, яванских макак, африканских зеленых мартышек и в некоторой степени бабуинов. CD2 участвует в адгезии, костимуляции, распознавании антигена и, возможно, дифференцировке. У мышей практически все циркулирующие В-клетки

и В-клетки костного мозга экспрессируют CD2. CD2+ В-клеток в материале, полученном от человека, в данном исследовании не выявили. Таким образом, экспрессия CD2 В-клеток, по-видимому, снижалась по мере эволюции, причем наиболее высокая экспрессия установлена у более древних видов (мышей), умеренная экспрессия — у макак и африканской зеленой мартышки, меньшая экспрессия — у бабуинов и практически отсутствует у человека. Интересно, что лиганд CD2 не является консервативным между видами: CD2 исключительно связывает CD48 у мышей и крыс, в то время как у людей он сильно связывает CD58 и слабо — CD48, который также коэкспрессируется с CD58 [16].

Известно, что у макак более высокая частота периферических CD4 + CD8 + двойных положительных Т-клеток, чем у людей, при этом частота увеличивается с возрастом. Медиана частоты составляет 5,3% у резусов, 1,4% у яванских макак и менее 0,2% у зеленых мартышек, мыши и человека [16].

Все эти факты еще раз свидетельствуют о необходимости анализа имеющейся информации на этапе планирования доклинического исследования. Учитывая возрастающий объем данных, на основании анализа литературы уже могут быть получены достаточные четкие ответы о том, какой вид (или виды) может использоваться для доклинического изучения нового терапевтического МАт, и есть ли такие виды в принципе. Во многих случаях для исследований МАт релевантными видами оказываются НЧП.

Для оценки возможности использования НЧП как релевантных видов в исследованиях МАт можно применить следующий алгоритм [12].

#### 1. Оценка экспрессии:

- если мишень экспрессируется в нормальных тканях НЧП, то рассматривается вопрос об его использовании в доклинических исследованиях;
- если мишень не экспрессируется в нормальных тканях НЧП, его не используют.

#### 2. Оценка фармакологической активности:

- если МАт обладает специфической активностью у НЧП, далее можно установить, обладает ли препарат фармакологической активностью у грызунов, в случае положительного ответа грызуны могут быть использованы в доклинических исследованиях. Применение грызунов может снизить количество НЧП, необходимых для проведения доклинических исследований;
- если МАт не обладает специфической активностью у НЧП, его не используют.

Применение такого алгоритма и научно обоснованный подход к формированию программы доклинической разработки МАт смогут позволить сократить количество НЧП

для исследования. Это особенно актуально сейчас, когда понятно, что количество использованных НЧП, вероятно, еще больше возрастет в результате расширения спектра препаратов терапевтических МАТ для лечения хронических заболеваний. Кроме того, выводы, которые были сделаны после неудачных исследований TGN1412, а также недоверие и/или существенные ограничения других подходов, таких как тестирование гомологичных белков или использование трансгенных животных, потенциально могут привести к увеличению количества НЧП [12].

## Приматы в научных исследованиях

Современное использование НЧП в биомедицинских исследованиях берет свое начало в работах Пастера, изучавшего вирус бешенства, и при исследовании других вирусов — оспы и коревой оспы в конце 1800-х годов. В то время эксперименты на приматах проводила лишь небольшая группа ученых, работающих независимо. Использование приматов в научных целях приобрело более глобальный характер в начале XX века [17].

Первый центр по разведению приматов для медико-биологических целей был создан в СССР в 1923 г. в Сухуми под руководством профессора Б.А. Лапина. Из-за изменившейся политической ситуации в 1992 г. центр переместился на площадку недалеко от Адлера. Ныне Институт медицинской приматологии РАНН остается одним из крупнейших в мире центров исследования нечеловеческих приматов. В США первый центр по изучению приматов, основанный психологом Робертом Йерксом, появился во Флориде в 1930 г. [17].

В первой половине прошлого века НЧП активно использовались в основном в вирусологических исследованиях. В период 1960–1980 гг. создавались и расширялись центры по разведению и изучению приматов во всем мире. К 1972 г. в мире насчитывалось 40 исследовательских центров, занимающихся биологией НЧП, и еще 1800 учреждений, использующих НЧП в исследованиях [17].

В начале XXI века произошло картирование геномов шимпанзе (2005) [18] и макак-резусов (2007) [19]. Все это открыло новые перспективы в генетических исследованиях и в разработках биотехнологических препаратов, но при этом по этическим и экономическим причинам использование НЧП в научных целях сократилось.

Шимпанзе представляют собой наиболее близкородственный человеку вид, у этих животных с людьми почти на 99% общий геном. Филогенетическая линия, с которой связано происхождение современного человека (*Homo sapiens*), отделилась от таковой шимпанзе 5–7 млн лет назад. Тесное генетическое

родство шимпанзе с человеком делает этот вид приматов единственной моделью для изучения некоторых заболеваний человека, например, вызванных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-1), вирусом гепатита В (HBV). Однако как этические, так и финансовые проблемы препятствуют широкому использованию шимпанзе в качестве моделей животных в биомедицинских исследованиях, и большинство стран прекратило их использование для научных целей [20].

Ясно, что несмотря на все препятствия (увеличение затрат, ужесточение государственного регулирования, общественные протесты против использования животных в научных исследованиях), использование НЧП в исследованиях продолжается. Внимание должно быть сосредоточено на улучшении и обеспечении здоровья и качества животных, а также на разработке моделей с использованием НЧП, которые лучше удовлетворяют потребностям биомедицинских исследований [20].

В медико-биологических исследованиях среди НЧП наиболее часто используют обезьян Старого Света — представителей рода макак: макаки-резусы (*M. mulatta*), длиннохвостые макаки, или яванские макаки (*M. fascicularis*) [20].

Макаки-резусы (*Macaca mulatta*) являются основной моделью для исследований в области инфекционных заболеваний, репродуктивной биологии, поведения, неврологии и иммунологии, а в последнее время использовались в исследованиях ВИЧ, включая разработку вакцин [20].

За макакой-резусом по частоте использования в качестве лабораторного животного следует ее родственный вид макак *fascicularis* — длиннохвостая макака (*M. fascicularis*), также известная как макака-крабоед, или яванская макака. Длиннохвостые макаки меньше по размеру, их легче и экономичнее содержать, чем макак-резусов. Небольшой размер, более низкая стоимость, доступность, меньшая агрессивность (следовательно, простота в обращении), близкое генетическое родство с макаками-резусами и несезонный характер размножения обеспечивают преимущества разведения этого вида и использования в качестве моделей по сравнению с макаками-резусами [20]. Эти два таксона имеют примерно 93% генома, общего с человеческим [20].

Три дополнительных вида макак используются тоже, хотя и гораздо реже, чем макаки-резусы и длиннохвостые макаки, в биомедицинских исследованиях: свинохвостые макаки (*M. nemestrina*) и в меньшей степени индийские макаки, или макаки-боннет (*M. radiata*) и японские макаки (*M. fuscata*) [20].

Африканские бабуины представляют собой альтернативную модель для исследования СПИДа, но менее широко используются в биомедицинских исследованиях, чем макаки [20].

Все чаще в биомедицинских исследованиях начинают использовать африканских зеленых мартышек (род *Chlorocebus*). Обезьяны рода *Chlorocebus*, иногда называемые верветками, подразделяются на 5 или 6 различных видов [20].

Четыре вида приматов *Platyrrhine* Нового Света также применяются в качестве моделей животных: обыкновенная игрунка (*Callithrix jacchus*), эдипов тамарин, или эдипова игрунка (*Sanguinus oedipus*), ночные обезьяны (вид *Aotus*) и обыкновенная беличья обезьяна (*Saimiri sciureus*). Все четыре этих вида приматов привлекательны для биомедицинских исследований из-за более низкой стоимости, простоты обращения и разведения. Однако виды Нового Света более отдаленно связаны с людьми и, следовательно, с меньшей вероятностью могут служить оптимальными животными моделями для изучения многих, особенно инфекционных, болезней человека. С другой стороны, они являются предпочтительными моделями для изучения болезней с низкой видовой специфичностью, таких как бактериальные и паразитарные инфекции [20].

### Типы исследований препаратов МАТ с использованием НЧП

МАТ обладают высокой специфичностью в отношении связывания и нейтрализации предполагаемых молекул-мишеней. МАТ, вводимые системно, становятся частью пула белков плазмы (иммуноглобулинов). Они катаболизируются до небольших пептидов и аминокислот, которые повторно используются организмом и как таковые не должны образовывать токсичных метаболитов. Поэтому нецелевая токсичность МАТ встречается редко и любые наблюдаемые эффекты обычно непосредственно связаны с фармакологией молекулы. Для многих МАТ единственным фармакологически значимым видом являются НЧП и, следовательно, в доклинических исследованиях безопасности может быть использован только один вид. Например, препараты адалимумаб, бевацизумаб, канакинумаб, цертолизумаб пегол, деносумаб, голимумаб, инфликсимаб, омализумаб, ранибизумаб и устекинумаб связываются со своими растворимыми мишенями и нейтрализуют их только у человека и НЧП или как в случае экулизумаба — только у людей [21].

Хотя использование НЧП необходимо для получения данных о безопасности для многих МАТ, биологические свойства МАТ, такие

как высокая специфичность к мишеням, предсказуемые пути метаболизма, отсутствие фармакологически активных метаболитов, низкая токсичность, также дают возможность свести к минимуму использование НЧП в исследованиях безопасности, позволяют применить более гибкий подход, чем в случае с малыми молекулами, и повысить эффективность разработки МАТ.

Основные исследования безопасности для препаратов МАТ следующие [12].

*In vitro/ex vivo* (до начала клинических исследований):

- исследования безопасности, например, оценка влияния на выброс цитокинов (цитокиновый шторм);
- исследования аффинности и фармакологической активности;
- иммуногистохимические исследования на тканях человека и животных (перекрестная реактивность).

*In vivo* (до начала клинических исследований):

- фармакодинамический и фармакокинетический профили;
- краткосрочные (до 1 мес) исследования токсичности, включающие оценку фармакологической безопасности.

*In vivo* (начало клинических исследований — First in human):

- длительное (до 6 мес) исследование токсичности.

*In vivo* (2 фаза клинических исследований):

- исследования репродуктивной и онтогенетической токсичности.

НЧП не следует использовать в доклинических исследованиях «по умолчанию» с предположением, что они являются наиболее релевантными видами. При планировании исследований токсичности всегда следует применять научный подход с учетом всех доступных данных, включая использование грызунов. Если грызуны являются фармакологически релевантным видом, использование количества НЧП может быть сокращено. При наличии более одного релевантного вида следует избегать одновременного применения двух видов в соответствии с рекомендациями<sup>6-8</sup>. В этом случае используют только один вид для хронических токсикологических исследований, если субхронические исследования (например, 1 мес) показывают сопоставимый профиль токсичности. Таким образом, существует возможность использования грызунов в долгосрочных токсикологических исследованиях.

Если можно использовать грызунов для исследований репродуктивной токсичности, следует сократить использование НЧП. Это

<sup>6</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Technical Report Series N. 987.

<sup>7</sup> ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals Step 5, 2011.

<sup>8</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».



согласуется с рекомендациями ICHS5(R3)<sup>10</sup>, в которых говорится, если можно показать с помощью фармакокинетических, фармакологических и токсикологических данных, что выбранный вид является подходящей моделью для человека, одного вида может быть достаточно.

Не существует единой рекомендованной схемы проведения доклинических исследований МАТ, во всех случаях должно быть предоставлено четкое обоснование программы разработки и использования НЧП. Когда НЧП являются релевантным видом с точки зрения фармакологии, исследования должны быть разработаны таким образом, чтобы предоставить необходимую информацию о безопасности с использованием минимального количества животных. Хотя трудно предписать «типичную» программу доклинической разработки МАТ, существуют общие принципы, которые можно применять. Стратегия разработки зависит от популяции пациентов, предполагаемого режима дозирования, риска токсичности, результатов более ранних исследований *in vivo*, от уровня знаний о мишени и эффекте.

### Гомологичные молекулы

Для больших молекул иногда шимпанзе или бабуины являются единственными фармакологически релевантными видами. Однако эти виды очень редко используются или их вообще не применяют для исследований безопасности при разработке лекарственных препаратов по этическим и юридическим причинам. В таких случаях необходимо разработать альтернативные стратегии оценки безопасности (например, использование суррогатных молекул или трансгенных животных).

Суррогатная молекула представляет собой гомологичную молекулу (белок крыс для использования на крысах) или в случае МАТ — антитело, которое обладает перекрестной реактивностью у лабораторных животных, фармакологически имитируя исходную молекулу. Хотя само лекарство-кандидат не тестируется (что является лимитирующим фактором при интерпретации результатов), можно оценить эффекты фармакологической активности и потенциальную перекрестную реактивность. Это не простой подход: производство и характеристика суррогатной молекулы являются дорогостоящими и трудоемкими. Использование суррогатных молекул и трансгенных моделей также может быть необходимо, когда не идентифицированы фармакологически релевантные виды [12].

Применение гомологичных белков не только грызунов, но и НЧП имеет важные последствия для использования НЧП. По данным

зарубежных ученых, гомологичные белки грызунов доступны примерно для 30% МАТ, производятся еще для 13% и используются для предоставления данных о безопасности для 25% МАТ, находящихся в разработке. Компании-разработчики МАТ готовы развивать более широкое использование гомологичных белков в случае, если регулирующие органы будут поддерживать применение гомологов для замены исследований на НЧП. Нормативное признание использования гомологов более вероятно, если нет релевантных видов для тестирования клинической молекулы (например, инфликсимаб, эфализумаб). Наиболее часто применяются мышинные гомологичные белки. Более широкое использование этих подходов может сократить количество НЧП в исследовании и в тех случаях, когда высокая иммуногенность препятствует получению адекватных данных. Однако из-за некоторых научных и практических ограничений использования гомологичных белков, таких как длительное время, необходимое для их создания и определения характеристики, экономические соображения, применение мышинных гомологичных белков при разработке МАТ дискутабельно [12].

Использование белков, гомологичных НЧП, менее распространено [22]. Однако основным ограничением применения гомологичных белков, белков грызунов или НЧП, является то, что их клиническая молекула не тестируется. Преимущества использования грызунов могут стать стимулом для применения гомолога, если он фармакологически сравним с клинической молекулой. Однако использование гомолога НЧП не дает этих преимуществ и влечет за собой дополнительные ограничения исследований на НЧП в целом (например, время, стоимость).

Генетически модифицированные грызуны также использовались для получения данных о безопасности для некоторых МАТ (например, фармакодинамика/фармакокинетика, исследования токсичности при однократном и многократном введении) [23–25].

Существует множество моделей: полные нокауты используются для оценки эффекта отсутствия мишени, условные нокауты, когда мишень удаляется, либо на более позднем этапе развития, либо постнатально, могут быть более репрезентативными для действия препарата, а генетическая модификация с включением гена человека может позволить проводить исследования на клинической молекулой. Эти модели можно использовать для прогнозирования доз при клинических испытаниях, исследованиях репродуктивной токсичности [12].

Новые поколения МАТ являются сложными конструкциями, и это, вероятно, создаст

<sup>9</sup> ICH S5 (R3) Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals. Step 4 Version. 18 February 2020.

дополнительные проблемы для оценки безопасности в доклинических исследованиях. С клинической точки зрения инженерия антител обладает практически неограниченным потенциалом, поскольку как переменные, так и константные области могут быть адаптированы для повышения специфичности, эффективности и аффинности связывания для повышения терапевтической эффективности. Однако изучение тонких различий в доклинических условиях, вероятно, будет сложным и необходимо продемонстрировать релевантность даже близкородственных видов, прежде чем приступать к полному набору исследований токсичности на животных [12].

### Доклиническая оценка безопасности МАТ с использованием НЧП

Использование НЧП допустимо только в том случае, если это необходимо для оценки рисков человека и нет других альтернативных методов<sup>10</sup>.

В литературе обсуждается вопрос о необходимости использования НЧП для доклинической оценки безопасности лекарственных препаратов. В отношении препаратов МАТ почти все нежелательные явления в высокой степени предсказуемы, поскольку они либо опосредованы фармакологическими свойствами МАТ, которые могут усилиться при увеличении дозы и экспозиции, либо вызываться иммунными реакциями на МАТ. Существует точка зрения, что результаты исследований *in silico* и *in vitro*, а также данные, полученные на генетически модифицированных грызунах, могут прогнозировать большинство нежелательных явлений при применении МАТ, что делает излишним использование НЧП для рутинной токсикологической оценки. Кроме того, иммуногенность гуманизированных/человеческих МАТ для НЧП во многих случаях делает оценку безопасности малоинформативной [26, 27].

Действительно, для стандартных МАТ на основе IgG к мишеням, фармакологические эффекты и профиль безопасности которых уже хорошо изучены у животных и человека (например, биоаналоги МАТ к растворимым цитокинам TNF, IL-6, IL-17 или МАТ к CD20, разрушающие В-клетки), обширные программы доклинических исследований на НЧП вряд ли дадут какую-либо дополнительную информацию для оценки риска для человека. В этих случаях целесообразно использовать оптимизированные доклинические программы

по оценке безопасности (меньше не только исследований, но и дозовых групп, а следовательно, и животных), тем самым снижая количество НЧП. В частности, для доклинической оценки биоаналогичных МАТ рекомендовано использовать пошаговый подход, если биоаналогичность доказана на этапах сравнения физико-химических и биологических характеристик *in vitro*, исследования *in vivo* могут не понадобиться<sup>11-13</sup>.

Однако для МАТ к новым мишеням, а также для новых структур МАТ (например, би-/три-функциональных МАТ), фармакология которых в значительной степени неизвестна и, следовательно, непредсказуема, оценка безопасности у НЧП (при условии, что релевантность вида была четко продемонстрирована) может быть критически важной. Для оценки трансляционной ценности исследований с использованием НЧП на конкретных примерах из практики компаний-разработчиков препаратов МАТ был проведен анализ существующих подходов к оценке безопасности МАТ, в которых исследования безопасности у НЧП оказали критическое влияние на клиническую разработку. Были рассмотрены новые МАТ, специфичные для новых мишеней, в том числе мультитаргетные. Фармакология этих молекул/мишеней ранее не была хорошо охарактеризована, поэтому потенциальные побочные эффекты были менее предсказуемы. Анализ показал, что исследования на НЧП играют важную роль в оценке риска для человека, связанного с применением новых МАТ [28].

Например, на основе антител был синтезирован мультитаргетный препарат, направленный против семейства рецепторов иммунной системы, некоторые из которых активируют, а некоторые ингибируют иммунные функции в различных типах клеток. Препарат разрабатывался для лечения аутоиммунных заболеваний. Установлены различия в экспрессии, распределении и функциях рецепторов-мишеней у грызунов и приматов (включая человека). НЧП рассматривались как наиболее релевантный вид. Несколько серий-кандидатов препарата было протестировано на клетках человека *in vitro* для оценки влияния на выброс цитокинов, активацию тромбоцитов и систему комплемента. Кроме того, проведены исследования на мышах *in vivo* (с учетом всех ограничений интерпретации результатов). Несмотря на прогнозируемые благоприятные профили безопасности по результатам исследований *in vitro* с клетками человека, у мышей наблюдались разнообраз-

<sup>10</sup> EU Directive 2010/63/EU Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

<sup>11</sup> WHO Guidelines on evaluation of similar Biotherapeutic Products (SBPs), Annex 2, TRS No 977, 1 January 2010.

<sup>12</sup> Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010). 2012.

<sup>13</sup> Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1).

ные реакции, зависящие от линии, включая анафилактические. На основании проведенных исследований для оценки безопасности при использовании НЧП были выбраны три основных лекарственных кандидата, модифицированных для снижения нежелательных эффектов, но обладающих разной степенью эффективности. Поскольку препараты могли давать иммунотоксические эффекты, проведено пилотное исследование на НЧП с эскалацией дозы на небольшом количестве приматов. Наименее эффективный кандидат тестировался первым (начиная с низких уровней доз), а последующие, более сильнодействующие кандидаты, тестировались только после того, как была подтверждена безопасность предыдущего кандидата [28].

После первой дозы наименее эффективный кандидат не оказал побочного действия, в то время как второй (более эффективный) вызывал образование гематом, без других клинических проявлений. Однако последний и наиболее сильнодействующий кандидат вызывал тяжелые анафилактические реакции, гематомы появились у всех животных после первой дозы. Несмотря на различные клинические признаки, все три варианта препарата индуцировали высокие уровни С-реактивного белка и амилоида А в сыворотке крови. Изменения в активации комплемента были незначительными или отсутствовали, а уровень интерлейкина-6 в сыворотке увеличивался незначительно. Вполне вероятно, что препараты активировали клетки Купфера и макрофаги печени, вызывая реакцию острой фазы. Впоследствии исследования показали, что третий кандидат стимулирует высвобождение фактора активации тромбоцитов из клеток крови человека *in vitro*, из чего заключили, что побочные эффекты, наблюдаемые у обезьян, могут отмечаться и у людей [28].

Таким образом, на этом примере в исследованиях *in vitro* с клетками человека не ожидалось ни реакции острой фазы, ни активации тромбоцитов, ни угрожающих жизни анафилактических реакций. Эксперименты на мышах не обладали трансляционной ценностью, так как даже самые безопасные кандидаты, которые имели хорошие профили безопасности для человека *in vitro* и не вызывали клинических симптомов у НЧП, тем не менее провоцировали анафилактические реакции у мышей. Ответ острой фазы у НЧП наблюдался при низких дозах даже наименее сильнодействующего кандидата, а это значит, что очень трудно избежать таких эффектов у людей. Такие провоспалительные реакции были бы неприемлемы у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и уже активированной иммунной системой. Поскольку пределы безопасности были сочтены неприемлемыми, всех кандидатов исключили из разработки еще до проведения клинических испытаний [28].

Этот и другие примеры [28] показывают, что для МАТ, особенно для новых, проведение исследований на НЧП остается необходимым этапом разработки препаратов и оценки их безопасности.

К. Chapman и соавт. [12] приводят варианты программ исследований для оценки безопасности различных МАТ. Все указанные ими примеры призваны показать, как на основании тщательного анализа имеющихся данных и обдуманного научно обоснованного подхода к доклинической оценке МАТ можно минимизировать или вообще исключить использование НЧП и при этом получить достаточно надежную информацию для прогнозирования рисков для человека. Несколько таких примеров приведены ниже.

*Пример 1* [12]. Разрабатывается МАТ (IgG1), нацеленное на опухолевый антиген, целевая популяция включает женщин детородного возраста. Предполагается хроническое внутривенное введение. Получены данные, что препарат эффективен против ряда солидных опухолей *in vitro* и в моделях ксенотрансплантатов. Опухолевой антиген не экспрессируется в нормальной ткани, отсутствует специфическая или неспецифическая перекрестная реактивность с какой-либо нормальной тканью человека или животного. В исследованиях *in vitro* показано, что механизм действия МАТ — антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC).

Изучение безопасности этого МАТ должно включать оценку потенциальной токсичности, возникающей в результате не только связывания с мишенью, но и активации ADCC. Однако отсутствие экспрессии в нормальных тканях (в отличие от ткани опухоли) лабораторных животных, продемонстрированное с помощью иммуногистохимического исследования, означает, что невозможно найти релевантный вид, на котором можно изучать безопасность. Известно, что клинические исследования уже зарегистрированных МАТ для определенных онкологических показаний проводились без данных о токсичности *in vivo* (например, алемтузумаб). Такой подход возможен, поскольку информация о безопасности может быть предоставлена с использованием данных исследований цитотоксичности *in vitro* и долгосрочных (например, продолжительностью более 1 мес) результатов, касающихся безопасности, полученных в фармакологической модели ксенотрансплантатов.

Если есть дополнительная потребность в данных о безопасности *in vivo*, 2-недельного исследования токсичности только на грызунах должно быть достаточно, чтобы выяснить, дает ли данный препарат токсические эффекты, обусловленные воздействием на другие мишени (нецелевая токсичность), и/или существует подобное действие, обусловленное составом препарата. Однако, исходя из опыта приме-

нения других МАт типа IgG1, такие эффекты маловероятны.

Поскольку популяция пациентов включает женщин детородного возраста, возникает вопрос о проведении исследований репродуктивной токсичности. Отсутствие экспрессии у животных делает проведение такого рода исследований на любых видах неинформативным, вместо этого при оценке риска для репродуктивной системы следует использовать информацию о мишени в сочетании с отсутствием экспрессии в нормальных тканях человека. Кроме того, учитывая, что данный МАт будет применяться для лечения жизнеугрожающего состояния, польза от его использования будет превышать возможные риски, также препарат, возможно, будет назначаться в комбинации с цитостатиками. Таким образом, проведение исследований репродуктивной токсичности на животных нецелесообразно.

*Пример 2* [12]. МАт (IgG1), которое связывает антиген, экспрессируемый на клеточной поверхности, разрабатывается для лечения онкологического заболевания, МАт будет вводиться внутривенно. МАт связывается с антигеном человека и НЧП, но является сильно иммуногенным (например, вызывает выработку нейтрализующих антител, которые снижают количество циркулирующих активных МАт) у НЧП. Доступен мышинный гомологичный белок.

В этом примере НЧП являются релевантными животными для краткосрочных исследований токсичности продолжительностью до 1 мес, если с помощью фармакокинетических и/или фармакодинамических биомаркеров будет показано, что животные подвергались воздействию активного вещества. Поскольку выраженная иммуногенность МАт у НЧП препятствует проведению длительных исследований токсичности, 1-месячного исследования достаточно для инициации клинических исследований. Первое клиническое исследование предоставит информацию об эффективности и безопасности. Для детализации вопросов безопасности, возникающих при длительном клиническом применении, могут потребоваться дополнительные доклинические исследования (например, продолжительностью 3 или 6 мес). Учитывая вероятность того, что высокая иммуногенность у НЧП препятствует проведению долгосрочных исследований, так как экспозиция МАт будет снижаться, можно рассмотреть возможность использования мышинного гомологичного белка. Следует отметить, что бывают случаи, когда МАт грызунов также являются иммуногенными. Исследования репродуктивной токсичности могут не потребоваться в зависимости от показаний, вероятности комбинированной терапии с цитотоксическими препаратами.

*Пример 3* [12]. Разрабатывается МАт изотипа IgG4 для лечения остеоартрита. Режим дозирования хронический с подкожным введением. МАт нацелено на недавно выявленный антиген, который экспрессируется на клеточной поверхности хондроцитов хрящевой ткани больных остеоартритом. В миокарде здоровых людей наблюдается специфическая перекрестная реактивность, это предполагает, что препарат может оказывать негативное влияние на сердце. Фармакологическая активность клинической молекулы была продемонстрирована на НЧП, но не на крысах, то есть НЧП являются релевантным видом для исследования безопасности. Однако, поскольку мишень экспрессируется в миокарде человека, в дополнение к сравнению аффинности мишени и фармакологической эффективности у разных видов важно продемонстрировать, что этот паттерн экспрессии существует и у НЧП. Хотя кардиотоксичность МАт встречается редко, она представляет собой наибольший потенциальный риск для этого МАт, а для решения такой проблемы потребуются специальные исследования безопасности, не в последнюю очередь потому, что это будет важным фактором при принятии решений относительно дальнейшей разработки МАт.

Хотя связывание было продемонстрировано в исследованиях перекрестной реактивности тканей, это необязательно означает активность *in vivo*. Первоначально исследования *in vitro* осуществляют на миоцитах человека и НЧП; при этом следует проводить исследования *ex vivo* на изолированном сердце, чтобы обосновать выбор диапазона доз для исследований *in vivo*. Эти результаты в сочетании с исследованиями перекрестной реактивности тканей позволяют установить, является ли связывание мишени в миокарде НЧП сопоставимым с таковым у человека и, следовательно, будут ли НЧП релевантным видом для оценки риска кардиотоксичности. Если да, то исследования по установлению диапазона доз у НЧП (один самец и одна самка в группе, три уровня доз) с последующим патоморфологическим анализом достаточно для получения информации о любых изменениях в миокарде, определения доз при дальнейших исследованиях токсичности. Исследования фармакологической безопасности (электрокардиография, измерение артериального давления) целесообразно включить в исследования токсичности при многократном введении.

В этом примере, если сердечно-сосудистые эффекты не наблюдаются, доклиническая программа оценки безопасности будет продолжена с использованием дизайна исследования, который сводит к минимуму количество НЧП. Программа должна основываться на предполагаемой продолжительности клинического исследования и должна учитывать принципы «3Rs».



Так, если в первых клинических исследованиях будут участвовать женщины, находящиеся в постменопаузе, это отсрочит проведение исследований репродуктивной токсичности. Это особенно актуально, так как остеоартрит, как правило, является возрастным заболеванием. При переносе исследований репродуктивной токсичности на более поздний этап программы разработки эти исследования будут проводиться только тогда, когда соберется достаточно информации, указывающей на эффективность и безопасность МАт, что позволит избежать ненужного использования животных. Для этого примера нет данных о репродуктивных эффектах МАт, доступного гомолога нет. Поэтому перед регистрацией скорее всего потребуются исследования репродуктивной токсичности на НЧП. Тем не менее использование приматов может быть сведено к минимуму за счет «усиленного» дизайна исследования репродуктивной токсичности (ePPND) (см. раздел «Репродуктивная и онтогенетическая токсичность»).

В РФ также создаются оригинальные биотехнологические препараты МАт. Отечественные разработчики, как и их западные коллеги, нацелены на проведение максимально оптимизированных и в то же время информативных доклинических исследований. Так, при разработке компанией АО «Р-Фарм» нового препарата МАт был применен оптимизированный дизайн доклинического исследования, позволивший сократить количество НЧП и получить надежные и достаточные для инициации клинических исследований результаты. Компанией АО «Р-Фарм» создан оригинальный препарат RPH-104 — высокоактивный ингибитор ИЛ-1 $\beta$ -опосредованного сигнального пути, который планируется использовать для лечения ИЛ-1 $\beta$ -опосредованных заболеваний, таких как подагра, болезнь Бехчета, средиземноморская семейная лихорадка и др. RPH-104 представляет собой гетеродимерный гибридный белок, в котором одна часть состоит из внеклеточного домена человека ИЛ1-R1 и Fc-фрагмента IgG1 человека. Вторая часть гетеродимера состоит из части ИЛ1-РАСР человека и второй версии Fc-фрагмента IgG1 человека. Доказано, что RPH-104 является высокоактивным ингибитором ИЛ-1 $\beta$ -опосредованного сигнального пути, аффинность связывания препарата с ИЛ-1 $\beta$  выше, чем с ИЛ-1RA и ИЛ-1 $\alpha$ . Связывание RPH-104 с Fc-рецепторами ниже по сравнению с контролем — IgG1 человека, что свидетельствует о малой вероятности возникновения реакций цитотоксичности. В результате проведения дополнительных экспериментов показано, что ADCC и CDC для RPH-104 незначительны и обнаруживаются только при использовании препарата в очень высокой концентрации. Данные исследования перекрестной тканевой реактивности, а также ре-

зультаты сравнительного анализа последовательности аминокислот ИЛ-1R1 и ИЛ-1РАСР человека в составе молекулы RPH-104 с гомологичными последовательностями этих белков других видов животных (мышь, крыса, шимпанзе, игрунка обыкновенная, яванская макака, макака-резус) подтвердили возможность использования яванских макаков как релевантного вида в доклинических исследованиях. Результаты проведенного анализа были подтверждены в экспериментах по исследованию связывания RPH-104 с ИЛ-1 $\beta$  разных видов методом поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что предпочтительной мишенью для препарата является ИЛ-1 $\beta$  человека и макаки [29].

Фармакологическая активность препарата в условиях *in vivo* не изучалась, так как релевантным видом являются яванские макаки, однако модели подагрического артрита, средиземноморской семейной лихорадки, болезни Бехчета у этого вида животных не разработаны. Предположение об эффективности препарата RPH-104 у пациентов с острым приступом подагры основывается на сходстве в механизме действия RPH-104 и препарата канакинумаб (Иларис<sup>®</sup>), а также доступных данных о доклинических исследованиях эффективности канакинумаба [29].

Исследование токсикокинетики и биодоступности препарата RPH-104 проводили при однократном и многократном 4-недельном введении яванским макакам. До начала клинических исследований RPH-104 были проведены исследования токсичности при однократном и многократном введении. В исследовании 4-недельной токсичности RPH-104 с 4-недельным периодом восстановления использовали 16 самцов и 16 самок яванских макаков, которым RPH-104 вводили в дозах 5, 50 и 100 мг/кг подкожно 1 раз в неделю. В качестве контроля использовали буферный раствор. По результатам была определена высшая нетоксическая доза RPH-104 при 4-недельном введении яванским макакам, которая составляет 100 мг/кг. На основании результатов доклинического исследования RPH-104 получено разрешение на клиническое исследование первой фазы на здоровых добровольцах, которое было успешно завершено. Следующим этапом является проведение исследования 26-недельной токсичности RPH-104 на яванских макаках, поскольку в клинической практике предполагается длительная терапия [29].

### **Возможности реализации принципа «3Rs» в исследованиях на НЧП**

Для многих МАт НЧП являются единственным релевантным видом, пригодным для проведения исследований фармакодинамики и безопасности.

В случае использования НЧП в доклинических исследованиях необходимо применять все имеющиеся возможности для сокращения количества животных в соответствии с принципом «трех R» (сократить/оптимизировать/заменить «reduce/refine/replace») <sup>14</sup>.

Программа доклинических исследований, необходимая для обоснования возможности проведения клинических исследований, обычно включает исследования фармакодинамики, токсичности при однократном и многократном введении, фармакокинетики, токсикокинетики, генотоксичности, репродуктивной токсичности, иммуногенности. Для биотехнологических препаратов необходимы исследования иммуногенности.

Использование НЧП в исследованиях фармакодинамики МАт целесообразно только в том случае, если подтверждена релевантность вида, а также существует валидная модель заболевания. Если оба условия соблюдены, то дизайн исследования должен быть продуман и обоснован таким образом, чтобы минимизировать количество животных. Это может быть достигнуто за счет снижения дозовых групп (учитывая известные особенности фармакокинетики и фармакодинамики МАт), включения в исследование дополнительных конечных точек по оценке фармакологической безопасности, иммуногенности, фармакокинетики и др. Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшего выбора и обоснования дизайна и диапазона доз в исследованиях токсичности.

Что касается исследования токсичности при однократном введении (острой токсичности), они не всегда целесообразны при изучении МАт, так как ввиду высокой специфичности препаратов в большинстве случаев они обладают низкой токсичностью, а для выявления эффекта «нецелевой» токсичности, если таковая вообще имеется, необходимо применение больших количеств препарата, что не всегда возможно и необходимо. Как указано в руководстве ВОЗ <sup>15</sup>, исследования токсичности при однократном введении следует проводить только в тех случаях, когда ожидается значительная токсичность и необходима информация для выбора доз для исследований с многократным введением.

Классические исследования фармакокинетики с изучением распределения в органах и тканях для препаратов МАт обычно не проводятся. Метаболизм не изучается, так как предполагается, что препараты, полученные биотехнологическим путем, метаболизируются до аминокислот и пептидов <sup>14, 15</sup>. Соответственно метаболизм понятен, а образования ток-

сичных метаболитов, требующих отдельного изучения, как в ряде случаев с малыми молекулами, не происходит. Исследования фармакокинетики/токсикокинетики для оценки уровня системной экспозиции, скорости выведения целесообразно включать при изучении токсичности на НЧП.

Дизайн исследования токсичности при многократном введении может быть оптимизирован на основании уже имеющихся данных, полученных при изучении фармакологической активности и/или, учитывая результаты проведенных *in vitro* экспериментов, а также данные литературы о сходных молекулах.

В целом проведение исследований токсичности можно разделить на два основных этапа [12].

*Этап 1.* Поиск диапазона доз и 1-месячное исследование токсичности (для обоснования дозы в клинических исследованиях фазы I).

*Этап 2.* Комбинация исследований токсичности при многократном введении (3, 6, 9 и/или 12 мес) для поддержки клинических исследований II и III фаз.

Таким образом, можно проводить до 4 исследований токсичности: например, 1-месячное исследование для поддержки I фазы клинических исследований; 3-месячное — II фазы, 6-месячное — III фазы, и в зависимости от продолжительности дозирования для регистрации может потребоваться 12-месячное исследование.

Ниже приведен общий план исследования с использованием НЧП для изучения токсичности продолжительностью 1 мес и более.

---

#### *Пример дизайна 1 (всего 48 животных).*

Основные группы

(в каждой 4 самца и 4 самки):

- 1-я — препарат МАт (низкая доза);
- 2-я — препарат МАт (промежуточная доза);
- 3-я — препарат МАт (высокая доза);
- 4-я (контрольная).

Группы отсроченного наблюдения

(в каждой ≤2 самца и ≤2 самки):

- 1а — препарат МАт (низкая доза);
  - 2а — препарат МАт (промежуточная доза);
  - 3а — препарат МАт (высокая доза);
  - 4а (контрольная).
- 

В программе испытаний, состоящей из 3 исследований с группами отсроченного наблюдения, может быть задействовано до 144 животных (48 особей на одно исследование). Многие компании обычно проводят 3 исследования для поддержки клинических испытаний и ис-

<sup>14</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 №89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>15</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Technical Report Series N. 987.

пользуют в среднем 100–120 НЧП для каждого МАт (исключая исследования репродуктивной токсичности) [12].

При наличии доказательств, что препарат МАт имеет низкий риск токсичности (например, препарат из хорошо охарактеризованного класса, отсутствие токсических эффектов при высоких дозах в ранних исследованиях), целесообразно использовать оптимизированную программу, в которой число НЧП сокращено вдвое за счет уменьшения количества длительных исследований, дозовых групп и животных групп отсроченного наблюдения. Количество животных в экспериментах может быть также снижено путем сокращенной программы репродуктивной токсичности.

Стратегия выбора дозы для исследования токсичности МАт отличается от таковой для малых молекул, поскольку любые побочные эффекты обычно связаны с мишенью и обусловлены усиленным прямым фармакологическим действием МАт, а не нецелевой токсичностью. Как правило, уровни дозы следует выбирать таким образом, чтобы они охватывали диапазон между уровнем, при котором отсутствуют побочные эффекты (NOAEL) — прогнозируемым клиническим эквивалентом дозы, и дозой, явно токсичной. Высокая доза либо кратна предполагаемой клинической, либо является максимально допустимой (лимитирующим фактором может быть допустимый объем введения) [12].

Для МАт, токсичность которых не является фармакологически опосредованной, на уровне NOAEL может наблюдаться 100% насыщение целевого рецептора и соответственно эта доза будет эквивалентна или выше предполагаемой клинической. Высокая доза для оценки токсических эффектов должна превышать уровень дозы насыщения и обеспечивать высокий уровень циркулирующих в крови несвязанных МАт. Учитывая особенность кинетики минимальной и максимальной дозы, вопрос о научной ценности исследования безопасности промежуточной дозы для МАт остается спорным [12]. Таким образом, при наличии обоснования могут быть изучены два уровня доз.

---

*Пример дизайна 2 (всего 30 животных).*

Основные группы

(в каждой 3 самца и 3 самки):

- 1-я — препарат МАт (низкая доза);
- 2-я — препарат МАт (высокая доза);
- 3-я (контрольная).

Группы отсроченного наблюдения

(в каждой  $\leq 2$  самца и  $\leq 2$  самки):

- 1а — препарат МАт (низкая доза);
  - 2а — препарат МАт (высокая доза);
  - 3а (контрольная).
- 

---

*Пример дизайна 3 (всего 32 животных).*

Основные группы

(в каждой 3 самца и 3 самки):

- 1-я — препарат МАт (низкая доза);
- 2-я — препарат МАт (промежуточная доза);
- 3-я — препарат МАт (высокая доза);
- 4-я (контрольная).

Группы отсроченного наблюдения

(в каждой  $\leq 2$  самца и  $\leq 2$  самки):

- 3а — препарат МАт (высокая доза);
  - 4а (контрольная).
- 

---

*Пример дизайна 4 (всего 26 животных).*

Основные группы

(в каждой 3 самца и 3 самки):

- 1-я — препарат МАт (низкая доза);
- 2-я — препарат МАт (высокая доза);
- 3-я (контрольная).

Группы отсроченного наблюдения

(в каждой  $\leq 2$  самца и  $\leq 2$  самки):

- 2а — препарат МАт (высокая доза);
  - 3а — (контрольная).
- 

Также для оптимизации токсикологических исследований на НЧП может быть сокращено количество экспериментов до одного длительностью 1 мес и одного дополнительного. Заблаговременное планирование исследований, необходимых для поддержки клинических испытаний, может помочь сократить количество доклинических исследований токсичности без ущерба для безопасности человека. Необходимо учитывать целевую популяцию пациентов, а также предполагаемый режим дозирования. Для некоторых МАт 1-месячного исследования токсичности и еще одного эксперимента может быть достаточно для предоставления информации с целью получения разрешения на регистрацию.

Исследование в течение 6 мес описано в руководстве ICHS6(R1)<sup>16</sup> как обычно достаточное для оценки токсических эффектов при длительном применении биотехнологических препаратов, включая МАт. Однако, как показывает опыт зарубежных коллег [12], иногда регулирующие органы запрашивают результаты более длительных исследований, хотя причина этого неясна. Продолжительность токсикологических исследований в течение 6 мес научно обоснована на основании специфических метаболических, фармакокинетических и токсикологических характеристик белков с большой молекулярной массой и подтверждается ретроспективным обзором биотехнологических фармацевтических препаратов. В редких случаях может потребоваться более продолжительное исследование, например, если в 6-месячном исследовании

---

<sup>16</sup> ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals Step 5, 2011.

обнаруживаются совершенно новые токсические эффекты, которые не наблюдались в исследованиях меньшей продолжительности. Однако для всех МАт образование связывающих/нейтрализующих МАт антител может ограничивать применение более длительных экспериментов, это следует учитывать при рассмотрении необходимости расширенных исследований.

Существуют также возможности сократить численность использования НЧП, когда токсические эффекты не известны, например, изучение влияния на новую мишень. Накопленная информация о токсичности из ранних исследований может быть использована для обоснования решений о сокращении использования приматов в более поздних экспериментах. Например, начальное (2-недельное или месячное) исследование может быть проведено с тремя уровнями доз, чтобы оценить, является ли использование всех трех доз целесообразным в долгосрочных исследованиях токсичности.

Дополнительная возможность снижения количества НЧП — уменьшение численности групп отсроченного наблюдения. В исследовании токсичности МАт включают эти группы для оценки наличия связывающих МАт антител, обратимости выявленных нежелательных эффектов и для определения возможных отсроченных токсических эффектов. В тех случаях, когда вопрос о наличии связывающих антител понятен и в ранних исследованиях не было выявлено токсического действия, необходимость использования дополнительных животных для отсроченного наблюдения сомнительна. Там, где это необходимо, следует рассмотреть возможность использования только одного животного для оценки отсроченных эффектов в группе с высокой дозой и одного в контрольной группе. Если существует риск отсроченной токсичности или необходимо выяснить, обратимы ли выявленные нежелательные эффекты, следует рассмотреть вопрос о включении дополнительных животных для отсроченного наблюдения только в группу высокой дозы.

Для биоаналогичных препаратов рекомендовано применение пошагового подхода. При получении достаточных доказательств биоаналогичности на этапах оценки физико-химических и биологических свойств *in vitro* исследования *in vivo* могут не потребоваться<sup>17-19</sup>.

Исследования генотоксичности для биотехнологических препаратов обычно не проводят,

так как не предполагается их взаимодействие с ДНК или другим хромосомным материалом<sup>17, 20</sup>.

Вопрос о необходимости исследований канцерогенности для биотехнологических препаратов должен рассматриваться с учетом многих факторов, таких как механизм действия препарата, целевая популяция пациентов, продолжительность применения. Как правило, для биотехнологических лекарственных препаратов стандартные тесты на канцерогенность с использованием биологических систем неприемлемы<sup>17</sup>.

Необходимость исследований иммуногенности и подходы к исследованиям репродуктивной токсичности МАт на НЧП рассмотрены ниже.

## Иммуногенность

Поскольку большинство биофармацевтических препаратов представляют собой белки, специфичные для человека, многие препараты МАт являются иммуногенными у животных.

В результате введения чужеродного белка в организме могут вырабатываться связывающие и/или нейтрализующие антитела (антилекарственные антитела). Это может существенно изменять фармакокинетические и фармакодинамические параметры и повлиять на выводы об эффективности и безопасности. Антилекарственные антитела могут формироваться у любых видов, но в целом иммунный ответ на человеческий белок реже наблюдается у НЧП, чем у грызунов, из-за большего генетического сходства между людьми и НЧП по сравнению с грызунами [21].

Иммуногенность, которая может быть обнаружена у НЧП, необязательно предсказывает иммуногенность у людей, но исследования иммуногенности должны включаться в исследования опыты на НЧП, чтобы корректно интерпретировать данные и определить дальнейшую стратегию доклинической разработки. Последствия развития иммунного ответа на терапевтические белки могут быть различными — от преходящего выявления антител, не сопровождающегося какими-либо значимыми клиническими явлениями, до тяжелых, угрожающих жизни состояний. Прогностическая значимость доклинических исследований по оценке иммуногенности на животных считается низкой. Проведение доклинических исследований, направленных на прогнозирование

<sup>17</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>18</sup> Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010). 2012.

<sup>19</sup> Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1).

<sup>20</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Technical Report Series N. 987.



вание иммуногенности у человека, обычно не требуется<sup>21</sup>.

Когда происходит формирование антилекарственных антител (связывающих/нейтрализующих), это снижает воздействие препарата и не дает возможность корректно оценить безопасность. Одна из стратегий решения этой проблемы — увеличение частоты дозирования и/или уровня дозы, чтобы преодолеть иммунный ответ. Использование этой стратегии может привести к устойчивой и достаточной для выявления эффектов экспозиции препарата [21].

Возможность образования антилекарственных антител необходимо учитывать при планировании и проведении исследований репродуктивной токсичности. При развитии иммуногенности также может быть применена стратегия по увеличению частоты дозирования и/или уровня дозы, что обеспечит достаточное воздействие в критические периоды развития. Однако иммунный ответ на препарат, предназначенный для человека, может иметь неблагоприятные последствия для животных, такие как формирование иммунных комплексов в тканях, аутоиммунитет или гиперчувствительность [30]. Другим последствием наличия антилекарственных антител у животных является то, что образующиеся антитела, вероятно, проникают через плаценту, если они относятся к подтипу иммуноглобулина класса G (IgG). Если эти антитела связываются с эндогенным человеческим белком, они могут привести к неблагоприятным последствиям для плода, которые могут иметь или не иметь отношение к прогнозированию эффектов у человека [31].

Антитела транспортируются через плаценту, а иммунные комплексы, по-видимому, нет, а вместо этого задерживаются в плаценте [32]. Это может иметь значение для оценки уровня экспозиции на материнский организм и плод, если при анализе для обнаружения препарата МАТ не детектируется различие между свободными МАТ и МАТ, связанными с антителами.

Таким образом, адекватная оценка иммуногенности МАТ при проведении доклинических исследований критически необходима для корректного планирования исследований и интерпретации результатов.

### Репродуктивная и онтогенетическая токсичность

Исследования онтогенетической токсичности на НЧП допускается проводить только в случае, если они являются единственным релевантным видом животных<sup>21</sup>.

В большинстве случаев в исследованиях репродуктивной токсичности МАТ используются яванские макаки [33].

### Фертильность

Провести оценку влияния МАТ на фертильность у НЧП в рамках отдельного исследования практически невозможно. Из-за низкой частоты наступления беременности, например, у наиболее часто используемых в исследованиях репродуктивной токсичности яванских макак, животным не вводят препарат до или сразу после спаривания. Животных обычно отбирают в исследование репродуктивной токсичности с помощью ультразвукового исследования на 18–20-й дни беременности, поэтому при имплантации или на самых ранних стадиях эмбриогенеза дозирование отсутствует [33].

Проведение исследований со спариванием нецелесообразно. Оценка потенциального влияния препарата на фертильность самцов и самок может быть проведена в рамках исследований токсичности с многократным введением длительностью не менее 3 мес. Оценивают влияние препарата на репродуктивную систему животных (например, массу органов и гистопатологические изменения). В ходе исследования могут быть изучены дополнительные параметры (периодичность менструального цикла, число сперматозоидов, морфология и/или подвижность сперматозоидов, уровень половых гормонов)<sup>21</sup>.

### Влияние на эмбриофетальное и постнатальное развитие

Для дальнейшего изучения влияния на репродуктивную функцию может быть использовано несколько дизайнов исследования на НЧП с учетом предполагаемого клинического применения и ожидаемых фармакологических эффектов.

Оценка репродуктивной токсичности лекарственных препаратов включает следующие этапы: (i) фертильность и раннее эмбриональное развитие (FEED), (ii) пре- и постнатальное развитие (PPND, включая материнскую функцию) и (iii) эмбриофетальное развитие (EFD)<sup>22</sup>. Это традиционный «сегментный» подход к изучению репродуктивной токсичности, который долгое время используется для тестирования низкомолекулярных препаратов.

Однако данный подход не всегда применим к биотехнологическим лекарственным препаратам. Поскольку для многих препаратов МАТ единственным релевантным видом являются НЧП как по этическим, так и по финансовым причинам, важно использовать минимальное количество животных для адекватной оценки влияния на эмбриофетальное развитие, исход беременности и постнатальное развитие.

<sup>21</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3.11.26 №89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>22</sup> ICH S5 (R3) Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals. Step 4 Version. 18 February 2020.

Фактическую стратегию тестирования должны определять предполагаемое клиническое применение, лекарственная форма, способ введения, при этом необходимо учитывать любые существующие данные о токсичности, фармакодинамике, кинетике и проанализировать эффекты, сходных по структуре/активности соединений [33].

НЧП имеют фоновую частоту врожденных дефектов менее 1% [34], беременность в большинстве случаев одноплодная, соответственно могут быть обнаружены только те события, которые происходят с высокой частотой и непосредственно связаны с фармакологией изучаемого препарата. Таким образом, исследование репродуктивной токсичности на НЧП не связаны только с оценкой риска в традиционном смысле, но скорее нацелены на уточнение характеристик фармакологического эффекта [31].

Трудность использования яванских макаков для оценки дефектов развития заключается еще и в том, что у этих животных высокий уровень самопроизвольных аборт [35]. Поэтому при включении в исследование 12–16 животных обычно только 10–12 плодов в группе могут быть подвергнуты морфологическому исследованию [33].

При планировании исследований репродуктивной токсичности МАТ на НЧП следует учитывать особенности транспорта иммуноглобулинов через плаценту от матери к плоду. Белки с высокой молекулярной массой (более 5000 Да) не проникают через плацентарный барьер за счет простой диффузии. В случае МАТ с высокой молекулярной массой (достигающей 150 000 Да) существует специфический транспортный механизм<sup>23</sup>. Плацентарный транспорт антител у человека и НЧП является активным процессом, который требует наличия у антитела Fc-домена, транспорт осуществляется посредством плацентарных FcRn-рецепторов [36].

Наличие специального рецептора (FcRn) для переноса IgG из материнского молока через эпителий кишечника в кровь было впервые установлено на крысах [37]. Исследования подтвердили существование подобного рецептора у человека и НЧП. Неонатальный Fc-рецептор у человека обнаружен в плаценте, где он обеспечивает транспорт IgG матери в кровеносное русло плода [38]. У грызунов в отличие от НЧП и человека IgG проникают через желточный мешок благодаря транспорту с участием FcRn, в связи с этим экспозиция может возникать на относительно ранних сроках беременности по сравнению с НЧП и человеком.

У НЧП и человека трансплацентарная передача IgG в период органогенеза невысока, она начинает увеличиваться в начале II триместра беременности, достигая максимума в конце III триместра. Проведение стандартных исследований эмбриофетальной токсичности на НЧП, получающих препарат с ранних сроков беременности и до 50-го дня гестации, не имеет большого значения при оценке непосредственного влияния на развитие эмбриона и плода в период органогенеза. В то же время такие исследования могут позволить оценить не прямое влияние на эмбриофетальное развитие в результате экспозиции препарата в организме матери<sup>24</sup>.

Некоторые классы антител (например, IgA) или фрагменты антител, лишённые Fc-домена, не транспортируются через плаценту. Однако большинство МАТ, разработанных для терапевтических целей, представляют собой IgG и, в частности, IgG1, содержат Fc-домен. При этом не все изотипы IgG транспортируются через плаценту одинаково. Эффективность плацентарного транспорта IgG у человека зависит от подкласса и, как было показано [39], снижается в следующем порядке IgG1>IgG4>IgG3>IgG2.

Разные патогены приводят к формированию IgG различных изотипов. Предполагается, что IgG-антитела, обнаруженные в крови плода, имеют материнское происхождение, поскольку синтез собственных IgG до рождения у плода ограничен, а также терапевтические антитела, содержащие немодифицированный Fc-фрагмент, транспортируются через плаценту таким же образом, как и естественно приобретенные антитела [21].

Как указывается в Решении ЕЭК №89<sup>23</sup>, целесообразно проведение отдельных исследований на этапах, охватывающих эмбриофетальное (EFD) и/или пренатальное/постнатальное развитие [ППНР (PPND)]. Возможны и другие дизайны исследования при условии их обоснования, особенно при наличии опасений относительно того, что нежелательное влияние на эмбриофетальное развитие или смерть плода во время беременности могут быть вызваны самим механизмом действия исследуемого лекарственного препарата.

Эмбриональный период — это период формирования основных органов. Он длится от 20-го до 50-го дня беременности у макака [40, 41]. I триместр у макака продолжается от 0-го до 55-го дня беременности [40].

Эмбриональный период — это время роста с быстрым делением клеток, морфогенеза и дифференцировки, включающий формирование физиологических процессов. Последовательность и сроки органогенеза очень

<sup>23</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 №89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>24</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Technical Report Series N. 987.

схожи у человека и макак [40, 41]. Хотя эмбриональный период наиболее чувствителен к тератогенным эффектам низкомолекулярных препаратов или химических веществ, которые могут легко проникать через плаценту в период основного органогенеза, эмбрион приматов в некоторой степени защищен от прямого неблагоприятного воздействия МАТ, так как эти большие молекулы не проникают через плаценту в значительной степени в течение эмбрионального периода [31].

Фетальный период начинается в конце органогенеза (7-я неделя у макак) и характеризуется закрытием твердого неба. В раннем фетальном периоде в скелете появляются первичные очаги окостенения, происходит сдвиг эритропоза из печени в селезенку, начинается мочеобразование. За этим начальным периодом следует период быстрого окостенения скелета и половой дифференциации. У макак развитие некоторых систем органов происходит быстрее по сравнению с человеком [31].

Воздействие фармацевтических препаратов на плод во время фетального периода с меньшей вероятностью вызовет тератогенный эффект, чем во время эмбрионального. Однако для МАТ воздействие на зародыш во время фетального периода может быть значительным, поэтому необходимо учитывать потенциальное влияние на развитие плода. Таким образом, для МАТ важно, чтобы дозирование в исследованиях на НЧП продолжалось в фетальный период, если предполагается назначение препарата беременным женщинам [31].

Переход от фетального к постнатальному периоду связан с передачей функции газообмена от плаценты к легким и изменениями в сердечно-сосудистой системе. Иммунная система выходит из-под влияния материнского организма. После рождения макаки развиваются быстрее, чем люди, при этом 1 год макаки примерно эквивалентен 4 годам у человека, исходя из роста скелета и полового созревания [42].

Поскольку обезьяны развиваются в фетальном и постнатальном периодах более быстрыми темпами, чем люди, сочетание воздействия во время внутриутробного периода и постнатально в течение 6 мес эквивалентно таковому у ребенка в течение 2 лет после рождения. Однако в доклинических исследованиях для МАТ с длительным периодом полувыведения дозирование у детенышей макак в постнатальном периоде может не иметь существенного значения для имитации воздействия на ребенка в первые годы жизни [31].

### Базовое исследование EFD

Когда НЧП являются единственным релевантным видом, необходимо обдумать, как можно спланировать исследование, чтобы с исполь-

зованием минимального числа животных получить максимум информации. Подход, состоящий в адаптации дизайнов исследований на грызунах, для НЧП нецелесообразен [31]. Если предварительный анализ имеющейся информации свидетельствует, что исследование на НЧП не даст ценной информации для клинического использования, нет достаточных оснований к проведению этого исследования.

Традиционное исследование EFD, как описано ICH S5(R3)<sup>25</sup>, требует введения препарата от имплантации до закрытия твердого неба. Из-за низкой частоты наступления беременности у НЧП, животным обычно проводят ультразвуковое исследование и отбирают особи на 18–20-й дни беременности. Затем введение препарата продолжается до конца органогенеза (до 50-го дня беременности) [33].

Важнейшими конечными точками в традиционном исследовании EFD являются оценка жизнеспособности плода, рост плода (путем оценки массы плода при кесаревом сечении) и морфологическая оценка плода для выявления пороков развития и аномалий. Базовый дизайн исследования на макаках включает введение МАТ с 20-го по 50-й день беременности (период основного органогенеза/фетальный период), при этом плод извлекают для патоморфологического исследования на 100-й день беременности (65 дней до родов). 100-й день беременности выбран на основании того факта, что к этому времени плод достаточно развит для адекватной анатомической оценки [31, 33].

В базовом дизайне исследования EFD на макаках до извлечения плода путем кесарева сечения (100-й день) в течение 50 дней препарат не вводится. Однако у матери все еще может быть значительный уровень антител в сыворотке ко времени кесарева сечения, поскольку МАТ имеют длительный период полувыведения. Хотя воздействие на плод МАТ будет менее существенным по сравнению с воздействием на материнский организм, плод все же может подвергаться действию фармакологически значимого уровня МАТ, особенно если препарат вводили матери в дозе, превышающей фармакологически эффективную [31].

### Расширенное исследование EFD

В фетальный период системы органов продолжают расти и созревать. Для иммуномодулирующих МАТ рекомендовано продлевать период дозирования [43, 44].

Неясно, подвергается ли эмбрион воздействию материнских антител до имплантации и в ранний периимплантационный период. Спустя несколько недель беременности воздействие материнских иммуноглобулинов на эмбрион и плод во время органогенеза

<sup>25</sup> ICH S5 (R3) Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals. Step 4 Version. 18 February 2020.

ограничено, но уже может быть измерено. Плацентарный перенос IgG начинается на низком уровне с ранних сроков беременности. У приматов после такого ограниченного воздействия в I триместре транспорт иммуноглобулинов к плоду увеличивается в течение беременности, достигая максимума в III триместре [33, 45, 46].

Таким образом, существует опасность, что МАт может неблагоприятно воздействовать на те системы органов, которые все еще находятся на критических стадиях формирования, например, иммунная система или МАт могут оказывать влияние на функциональное созревание всех основных систем органов. Таким образом, воздействие только на органогенез в традиционном исследовании EFD не подходит для целей моделирования действия МАт. Следовательно, для обеспечения значимого воздействия на плод, но без увеличения продолжительности исследования, можно период дозирования продлить с 20-го до 100-го дня беременности с кесаревым сечением на 100-й день. Дополнительным вариантом для оптимизации исследования EFD является отсрочка кесарева сечения до 140-го или 150-го дня беременности с введением препарата до кесарева сечения. В течение дополнительных 40 или 50 дней введения препарата матери воздействие на плод также будет увеличиваться, так что к 140-му или 150-му дню беременности оно приблизится к воздействию на материнский организм. Ограничением всех исследований EFD является то, что функциональные последствия влияния на плод невозможно оценить, и могут быть проведены только морфологические исследования [31].

### Исследование пре- и постнатального развития (PPND) у НЧП

В исследованиях PPND на грызунах введение препарата начинают в начале органогенеза, но в исследованиях на НЧП не всегда необходимо осуществлять дозирование в начале органогенеза. В проведенных исследованиях PPND на НЧП биотехнологических препаратов, которые уже зарегистрированы для медицинского применения, введение проводили с 20-го по 120-й день беременности. Обоснование скорее всего основано на предполагаемом клиническом применении, фармакологический свойства препарата и общей цели исследования [31].

Если проводятся отдельные исследования EFD и PPND на НЧП, а введение препарата в исследовании EFD было с 20-го по 50-й день беременности, то дозирование в последующем исследовании PPND потенциально может начинаться после 50-го дня беременности, если в исследовании EFD не наблюдалось связанных с препаратом эффектов [31].

Преимущество отсрочки введения препарата в исследовании PPND до 50-го дня беременности заключается в том, что это позволяет исключать случаи аборт на ранних сроках, требует меньшее количество беременных самок, чтобы получить нужное количество детенышей, по сравнению с началом введения на 20-й день беременности. Было показано, что у 138 самок яванских макаков, которым введение дозы препарата было начато на 70-й день беременности, частота пренатальных потерь была ниже 10% по сравнению с 20% или более, когда введение началось на 20-й день беременности [43].

Большинство биофармацевтических МАт долго циркулируют в крови, так что МАт обнаруживаются в крови матери в периоды от нескольких дней до недель после прекращения введения. Это также может привести к секреции МАт в грудное молоко, даже если прием препарата прекращается до родов. Послеродовой период у НЧП является критическим периодом для формирования связи между матерью и детенышем. Поскольку процедура введения может оказывать негативное влияние на формирование этой связи, введение препарата должно прекращаться до родов, если нет особых оснований полагать, что биофармацевтический препарат может иметь эффекты, влияющие на процесс лактации [31].

### Дизайн расширенного (усиленного) исследования PPND–ePPND

Если необходимы исследования репродуктивной токсичности и не существует потенциальных альтернатив НЧП (например, исследование гомологичного белка на грызунах), целесообразно использовать подход, заключающийся в объединении исследований.

Различия в паттерне воздействия препаратов МАт на плод по сравнению с малыми молекулами привели к необходимости разработки альтернативных дизайнов. Например, репродуктивную токсичность препарата МАт к фактору некроза опухоли (TNF) голимумаб [47] изучали, используя адаптированный «сегментный» подход, при этом в первом исследовании яванские макаки подвергались воздействию МАт с 20-го по 50-й день беременности, а во втором (влияние на пери- и постнатальное развитие) — с 50-го дня беременности и до 33-го дня вскармливания. Это не точное воспроизведение дизайна, рекомендованного для тестирования малых молекул на грызунах, поскольку дизайн исследования PPND на грызунах предполагает воздействие на протяжении всей беременности, включая органогенез. Аналогичный режим воздействия для исследования PPND на макаках включал бы период от 20-го дня беременности и на протяжении всего периода вскармливания [33].

На примере голимумаба в исследовании EFD было включено в одну группу 12–14 яван-



ских макак и в другую еще 12 обезьян в пери- и постнатальную фазу исследования. В исследовании EFD не было выявлено влияния на течение беременности, а при кесаревом сечении на 100–103-й день беременности морфологических аномалий у плодов не наблюдалось. Основной целью эксперимента по изучению влияния на пери- и постнатальное развитие в данном случае была не оценка морфологических эффектов, а определение влияния внутриутробного и постнатального воздействия голимумаба на популяции Т- и В-клеток и иммунный ответ у новорожденных [47].

Учитывая успех экспериментов с голимумабом, которые показали, что воздействие на протяжении всей беременности не влияет на созревание ключевого органа-мишени (иммунной системы) у новорожденных, был разработан усовершенствованный дизайн, предусматривающий введение МАТ одной группе животных на протяжении всей беременности, начиная с 20-го дня, рождение детенышей естественным путем, а затем оценку жизнеспособности, роста и морфологии детенышей после рождения. Созревание ключевых органов-мишеней затем оценивается у детенышей с использованием функциональных конечных точек *in vivo* и терминальных морфологических/гистологических конечных точек. Таким образом, вместо проведения отдельных исследований EFD и PPND, которые требуют введения МАТ двум группам беременных самок, необходимую информацию можно получить с помощью комбинации методов в рамках расширенного исследования PPND (ePPND). При помощи ультразвукового исследования можно оценить жизнеспособность и рост плода в определенные моменты во время беременности, а затем провести подробный осмотр детеныша после рождения, включая базовые морфометрические измерения длины конечностей, окружности головы и грудной клетки. Это может быть дополнено количественными показателями роста детенышей в постнатальный период, а также подробным обследованием скелета рентгенологическими методами [33].

Такой обобщенный план объединил определение влияния биотехнологического препарата не только на эмбриофетальное развитие (EFD), но и на пре- и постнатальное (PPND), такая работа исторически проводилась в 2 отдельных этапа. Кроме того, эта стратегия включает конечные точки для оценки фертильности в токсикологических исследованиях с многократным введением и предусматривает уменьшение количества групп в исследованиях пре- и постнатального развития (PPND) [12].

Исследование ePPND объединяет практически все компоненты исследований EFD и PPND, за исключением морфологического изучения плода, которое является важным компонентом исследований EFD на грызунах, поскольку они часто поедают нежизнеспособные плоды, что приводит к потере важной информации [31]. НЧП лишены данной поведенческой особенности, поэтому информация о потенциальной тератогенности не теряется, если изучение плода исключаются из исследований репродуктивной токсичности на НЧП. Единственная потенциальная информация, которая может быть утеряна, — это задержка развития плода во время беременности, которая уже не наблюдается при рождении. Однако незначительная задержка развития, возникающая внутриутробно, но не приводящая к аномалиям у новорожденных, вряд ли будет иметь клиническое значение [31].

Данный подход, предложенный в 2009 г. [33], включен как один из рекомендуемых для проведения исследований репродуктивной токсичности в актуальные регуляторные документы<sup>26–28</sup>.

Так, в Решении ЕЭК № 89<sup>27</sup> указано на целесообразность проведения одного тщательно спланированного исследования на НЧП, которое предусматривает введение лекарственного препарата самкам с 20-го дня беременности и до рождения потомства [усиленное ППНР (ePPND)]. Указывается, что включать группы животных, которым проводят кесарево сечение, нецелесообразно, при этом необходимо проводить оценку исходов беременностей, завершившихся естественными родами. В рамках указанного исследования необходимо оценить жизнеспособность потомства, внешние пороки развития, аномалии развития скелета (например, с помощью рентгенографии), а также морфологию внутренних органов и тканей при вскрытии животных. Проведение ультразвукового исследования эффективно для контроля протекания беременности, однако такой метод малоинформативен при обнаружении пороков развития потомства. Оценка возможных пороков развития осуществляется в период послеродового наблюдения.

Если препарат является фармакологически активным только у НЧП, и механизм его действия позволяет сделать теоретическое заключение относительно его влияния на эмбриофетальное развитие, то участникам клинического исследования должна быть предоставлена информация о возможном существовании таких последствий. При этом проведение исследования онтогенетической токсичности на НЧП не требуется<sup>27</sup>.

<sup>26</sup> ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals Step 5, 2011.

<sup>27</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>28</sup> WHO Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, Annex 4, TRS N. 987. 2014.

## Заключение

Появление биотехнологических препаратов, в том числе препаратов МАт, потребовало внедрения изменений в существующие подходы к доклинической разработке препаратов.

Отдельное внимание в актуальных международных руководствах WHO [(Annex 4, TRS No 987), ICH (ICH guideline S6 (R1)), а также в Решении ЕЭК № 89 уделяется необходимости проведения доклинических исследований на релевантном виде животных. Глубокое понимание различий между видами с самого начала разработки препарата необходимо для грамотного планирования исследований и последующей интерпретации результатов. Использование «неподходящих» видов может дать некорректные результаты и не иметь никакой ценности при оценке риска для человека.

Релевантным видом для исследований препаратов МАт является вид лабораторных животных, на котором препарат проявляет фармакологическую активность благодаря экспрессии необходимого эпитопа, и для тканей которых можно продемонстрировать аналогичный профиль перекрестной реактивности по сравнению с тканями человека

Для многих МАт единственным релевантным видом являются НЧП и, следовательно, в доклинических исследованиях может быть использован только один вид. Наиболее часто такими видами являются яванская макака и макака-резус. Если проведение экспериментов на НЧП необходимо, следует применять все имеющиеся возможности для сокращения количества животных в соответствии с принципом «трех R».

Единой стратегии проведения доклинических исследования *in vivo* для биотехнологических препаратов не существует. При планировании исследований токсичности всегда следует применять научный подход с учетом всех доступных данных, включая рассмотрение возможности использования грызунов. Если грызуны также являются фармакологически релевантным видом, количество использованных НЧП может быть сокращено. Стратегия разработки зависит от популяции пациентов, предполагаемого режима дозирования, лекарственной формы, а также должна формироваться с учетом данных, касающихся мишени, характера взаимодействия МАт с мишенью и анализа эффектов, сходных по структуре/активности соединений.

Хотя использование НЧП часто необходимо для получения информации о безопасности для многих МАт, биологические свойства МАт, такие как высокая специфичность к мишеням, предсказуемые пути метаболизма, отсутствие фармакологически активных метаболитов, низкая токсичность, также дают возможность свести к минимуму использование НЧП в исследованиях безопасности, позволяют использовать

более гибкий подход, чем в случае с малыми молекулами, тем самым повышая эффективность разработки МАт.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Buss N.A., Henderson S.J. et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012. Vol. 12. N. 5. P. 615–622. DOI: 10.1016/j.coph.2012.08.001.
2. Suzuki M., Kato C. et al. Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies // *J. Toxicol. Pathol.* 2015. Vol. 28. N. 3. P. 133–139. DOI: 10.1293/tox.2015-0031.
3. Goebel N.A., Babbey C.M. et al. Neonatal Fc receptor mediates internalization of Fc in transfected human endothelial cells // *Mol. Biol. Cell.* 2008. Vol. 19. N. 12. P. 5490–5505. DOI: 10.1091/mbc.e07-02-0101.
4. Lu R.M., Hwang Y.C. et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases // *J. Biomed. Sci.* 2020. Vol. 27. N. 1. P. 1. DOI: 10.1186/s12929-019-0592-z.
5. Beyersdorf N., Hanke T. et al. CD28 superagonists put a break on autoimmunity by preferentially activating CD4+CD25+ regulatory T cells // *Autoimmun. Rev.* 2006. Vol. 5. N. 1. P. 40–45. DOI: 10.1016/j.autrev.2005.06.001.
6. Elflein K., Rodriguez-Palmero M. et al. Rapid recovery from T lymphopenia by CD28 superagonist therapy // *Blood.* 2003. Vol. 102. N. 5. P. 1764–1770. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3586.
7. Goodyear M. Learning from the TGN1412 trial // *Bmj.* 2006. Vol. 332. N. 7543. P. 677–678. DOI: 10.1136/bmj.38797.635012.47.
8. Suntharalingam G., Perry M.R. et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412 // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 355. N. 10. P. 1018–1028. DOI: 10.1056/NEJMoa063842.
9. Eastwood D., Findlay L. et al. Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells // *Br. J. Pharmacol.* 2010. Vol. 161. N. 3. P. 512–526. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00922.x.
10. Stebbings R., Findlay L. et al. “Cytokine storm” in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179. N. 5. P. 3325–3331. DOI: 10.4049/jimmunol.179.5.3325.
11. Stebbings R., Poole S. et al. Safety of biologics, lessons learnt from TGN1412 // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009. Vol. 20. N. 6. P. 673–677. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.10.002.
12. Chapman K., Pullen N. et al. Preclinical development of monoclonal antibodies: considerations for the use of non-human primates // *MAbs.* 2009. Vol. 1. N. 5. P. 505–516. DOI: 10.4161/mabs.1.5.9676.
13. Остроухова Т. Ю., Иванов В.А. и др. Исследование кросс-реактивности терапевтических препаратов на основе моноклональных антител на тканях человека: основные подходы и методические приемы // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2016. Т. 16. С. 237–244. [Ostrouhova T.U., Ivanov V.A. et al. Issledovanie kross-reaktivnosti tera-

- pevticheskikh preparatov ns osnove monoklonalnyh antitel na tkanyh cheloveka: osnovnye podhody i metodicheskie priemi // Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie. 2016. Vol. 16. P. 237–244. (In Russ.).
14. Rogers K.A., Scinicariello F. et al. IgG Fc receptor III homologues in nonhuman primate species: genetic characterization and ligand interactions // *J. Immunol.* 2006. Vol. 177. N. 6. P. 3848–3856. DOI: 10.4049/jimmunol.177.6.3848.
  15. Rogers K.A., Scinicariello F. et al. Identification and characterization of macaque CD89 (immunoglobulin A Fc receptor) // *Immunology.* 2004. Vol. 113. N. 2. P. 178–186. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01949.x.
  16. Bjornson-Hooper Z.B., Fragiadakis G.K. et al. A Comprehensive Atlas of Immunological Differences Between Humans, Mice, and Non-Human Primates // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 867015. DOI: 10.3389/fimmu.2022.867015.
  17. Johnsen D.O., Johnson D.K., Whitney R.A. History of the Use of Nonhuman Primates in Biomedical Research // *Nonhuman Primates in Biomedical Research. Volume 1: Biology and Management, 2nd Ed.* Academic Press, 2012. P. 1–33.
  18. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome // *Nature.* 2005. Vol. 437. N. 7055. P. 69–87. DOI: 10.1038/nature04072.
  19. Gibbs R.A., Rogers J. et al. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome // *Science.* 2007. Vol. 316. N. 5822. P. 222–234. DOI: 10.1126/science.1139247.
  20. Smith D.G. Taxonomy of Nonhuman Primates Used in Biomedical Research // *Nonhuman Primates in Biomedical Research. Volume 1: Biology and Management, 2nd Ed.* Academic Press, 2012. P. 57–85.
  21. Martin P.L., Bugelski P.J. Concordance of preclinical and clinical pharmacology and toxicology of monoclonal antibodies and fusion proteins: soluble targets // *Br.J. Pharmacol.* 2012. Vol. 166. N. 3. P. 806–822. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01812.x.
  22. Bussiere J.L., Martin P. et al. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals // *Int.J. Toxicol.* 2009. Vol. 28. N. 3. P. 230–253. DOI: 10.1177/1091581809337262.
  23. Podolin P. L., Webb E.F. et al. Inhibition of contact sensitivity in human CD4+ transgenic mice by human CD4-specific monoclonal antibodies: CD4+ T-cell depletion is not required // *Immunology.* 2000. Vol. 99. N. 2. P. 287–295. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00946.x.
  24. Sharma A., Davis C.B. et al. Comparative pharmacodynamics of keliximab and clenoliximab in transgenic mice bearing human CD4 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. Vol. 293. N. 1. P. 33–41.
  25. Herzyk D.J., Gore E.R. et al. Immunomodulatory effects of anti-CD4 antibody in host resistance against infections and tumors in human CD4 transgenic mice // *Infect. Immun.* 2001. Vol. 69. N. 2. P. 1032–1043. DOI: 10.1128/iai.69.2.1032-1043.2001.
  26. van Meer P.J., Kooijman M. et al. Immunogenicity of mAbs in non-human primates during nonclinical safety assessment // *MAbs.* 2013. Vol. 5. N. 5. P. 810–816. DOI: 10.4161/mabs.25234.
  27. van Meer P.J., Kooijman M. et al. The value of non-human primates in the development of monoclonal antibodies // *Nat. Biotechnol.* 2013. Vol. 31. N. 10. P. 882–883. DOI: 10.1038/nbt.2709.
  28. Brennan F.R., Cavagnaro J. et al. Safety testing of monoclonal antibodies in non-human primates: Case studies highlighting their impact on human risk assessment // *MAbs.* 2018. Vol. 10. N. 1. P. 1–17. DOI: 10.1080/19420862.2017.1389364.
  29. Самсонов М.Ю., Дмитриева А.А. и др. Специфика теории и практики доклинических исследований биотехнологических лекарственных средств // *Российский медицинский журнал.* 2018. Т. 24. №6. С. 324–331. [Samsonov M.U., Dmitrieva A.A. et al. Spetsifika teorii i praktiki doklinicheskikh issledovaniy biotekhnologicheskikh lekarstvennyh sredstv // *Rossiskii medicinskii zhurnal.* 2018. Vol. 24. N. 6. P. 324–331. (In Russ.).]
  30. Descotes J., Vial T. Assessment of autoimmunity and hypersensitivity // *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals.* Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2008. P. 467–497.
  31. Martin P.L., Weinbauer G.F. Developmental toxicity testing of biopharmaceuticals in nonhuman primates: previous experience and future directions // *Int.J. Toxicol.* 2010. Vol. 29. N. 6. P. 552–568. DOI: 10.1177/1091581810378896.
  32. Simister N.E. Human placental Fc receptors and the trapping of immune complexes // *Vaccine.* 1998. Vol. 16. N. 14–15. P. 1451–1455. DOI: 10.1016/s0264-410x(98)00107-8.
  33. Stewart J. Developmental toxicity testing of monoclonal antibodies: an enhanced pre- and postnatal study design option // *Reprod. Toxicol.* 2009. Vol. 28. N. 2. P. 220–225. DOI: 10.1016/j.reprotox.2009.04.002.
  34. Peterson P.E., Short J.J. et al. Frequency of spontaneous congenital defects in rhesus and cynomolgus macaques // *J.Med. Primatol.* 1997. Vol. 26. N. 5. P. 267–275. DOI: 10.1111/j.1600-0684.1997.tb00222.x.
  35. Hendrie T.A., Peterson P. E. et al. Frequency of prenatal loss in a macaque breeding colony // *Am.J. Primatol.* 1996. Vol. 40. N. 1. P. 41–53. DOI: 10.1002/(sici)1098-2345(1996)40:1<41::Aid-ajp3>3.0.Co;2-0.
  36. Roopenian D.C., Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age // *Nat.Rev. Immunol.* 2007. Vol. 7. N. 9. P. 715–725. DOI: 10.1038/nri2155.
  37. Jones E.A., Waldmann T.A. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat // *Gut.* 1971. Vol. 12. N. 10. P. 855–856.
  38. Story C.M., Mikulska J.E. et al. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus // *J.Exp. Med.* 1994. Vol. 180. N. 6. P. 2377–2381. DOI: 10.1084/jem.180.6.2377.
  39. Malek A., Sager R. et al. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy // *Am.J. Reprod. Immunol.* 1996. Vol. 36. N. 5. P. 248–255. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1996.tb00172.x.
  40. Hendrickx A.G., Peterson P. E., Makori N. M. The nonhuman primate as model of developmental immunotoxicity // *Developmental Immunotoxicity.* Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. P. 117–136.
  41. Buse E. Development of the immune system in the cynomolgus monkey: the appropriate model in human

- targeted toxicology? // *J. Immunotoxicol.* 2005. Vol. 2. N. 4. P. 211–216. DOI: 10.1080/15476910500362937.
42. Chellman G.J., Bussiere J.L. et al. Developmental and reproductive toxicology studies in nonhuman primates // *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2009. Vol. 86. N. 6. P. 446–462. DOI: 10.1002/bdrb.20216.
43. Weinbauer G.F., Frings W., Fuchs A.N.M., Osterburg I. Reproductive/developmental toxicity assessment of biopharmaceuticals in nonhuman primates // *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals*. Hoboken, NJ: JohnWiley&Sons, Inc, 2008. P. 379–397.
44. Henck J.W., Hilbish K.G. et al. Reproductive toxicity testing of therapeutic biotechnology agents // *Teratology*. 1996. Vol. 53. N. 3. P. 185–195. DOI: 10.1002/(sici)1096-9926(199603)53:3<185::Aid-tera6>3.0.Co;2-3.
45. Fujimoto K., Terao K. et al. The placental transfer of IgG in the cynomolgus monkey // *Jpn.J. Med. Sci. Biol.* 1983. Vol. 36. N. 3. P. 171–176. DOI: 10.7883/yoken1952.36.171.
46. Malek A., Sager R. et al. Maternal-fetal transport of immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy // *Am.J. Reprod. Immunol.* 1994. Vol. 32. N. 1. P. 8–14. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1994.tb00873.x.
47. Martin P.L., Oneda S. et al. Effects of an anti-TNF-alpha monoclonal antibody, administered throughout pregnancy and lactation, on the development of the macaque immune system // *Am.J. Reprod. Immunol.* 2007. Vol. 58. N. 2. P. 138–149. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2007.00499.x.

### Информация об авторах

**М.Н. Макарова**, доктор медицинских наук, директор, makarova.mn@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

**В.Г. Макаров**, доктор медицинских наук, научный руководитель, <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,  
188663, Россия, Ленинградская обл.,  
Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский,  
ул. Заводская, д. 3, к. 245.

### Information about the authors

**M.N. Makarova**, MD, Director, makarova.mn@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

**V.G. Makarov**, MD, Scientific director, <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Research and manufacturing company  
“Home of Pharmacy”,  
188663, Russia, Leningrad oblast,  
Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy t.s.,  
Zavodskaya st. 3–245.

### Вклад авторов в написание статьи

**М.Н. Макарова** — анализ данных научной литературы, написание и редактирование текста рукописи.

**В.Г. Макаров** — критический пересмотр текста и одобрение окончательного варианта рукописи для публикации.

### Сведения о конфликте интересов

В.Г. Макаров является главным редактором журнала «Лабораторные животные для научных исследований». М.Н. Макарова является членом редакционной коллегии журнала «Лабораторные животные для научных исследований».

### Authors contribution

**M.N. Makarova** — analysis of scientific literature data, writing and editing of the text of the manuscript.

**V.G. Makarov** — critical review and approval of the final version of the manuscript for publication.

### Conflict of interest

**V.G. Makarov** is the Editor-in-Chief of *Laboratory animals for science*. **M.N. Makarova** is a member of the editorial board of *Laboratory animals for science*.

Дата поступления рукописи  
в редакцию: 16.01.2023

Дата рецензии статьи: 22.03.2023

Дата принятия статьи к публикации: 12.04.2023

Received: 16.01.2023

Reviewed: 22.03.2023

Accepted for publication: 12.04.2023