

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



Seminarska naloga pri predmetu Farmacevtska administracija
Sklop 2: Legislativa in regulativa na področju zdravil

POSTOPKI PRESKUŠANJA ZDRAVIL

Mentor: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Avtorji: Blaž Ličen

Tadej Kotnik

Mateja Štumberger

Rok Martinčič

Ljubljana, december 2008

KAZALO

KAZALO.....	2
UVOD	3
ANALIZNI POSTOPKI V PRESKUŠANJU ZDRAVIL.....	4
NAMEN	4
REGULATIVA.....	4
PREDKLINIČNO PRESKUŠANJE ZDRAVIL	8
NAMEN	8
REGULATORNA OSNOVA	8
IZVEDBA	9
Farmakologija	9
Farmakokinetika	10
TOKSIKOLOGIJA	12
TOKSIČNOST ENKRATNEGA ODMERKA.....	12
Peroralni odmerek	12
TOKSIČNOST PONAVLJAJOČEGA ODMERKA	13
28 ali 90 dnevna toksičnost.....	13
Kronična toksičnost.....	14
GENOTOKSIČNOST	14
In vitro test za določanje kromosomskih poškodb	14
In vivo test za določanje kromosomskih poškodb	14
In vitro test za določevanje genskih mutacij v bakterijah	14
KANCEROGENOST (RAKOTVORNOST).....	15
TOKSIČEN VPLIV NA SPOSOBNOST RAZMNOŽEVANJA IN RAZVOJA	15
Parametri ugotavljanja toksičnega vpliva na sposobnost razmnoževanja glede na časoven potek razmnoževanja.....	15
LOKALNA TOLERANCA	17
Akutna dermalna toksičnost	17
Akutna očesna toksičnost	17
Ostale študije	17
DRUGE TOKSIKOLOŠKE ŠTUDIJE (če so na voljo).....	17
Toksikologija nečistot.....	17
PRESKUŠANJE GENERIČNIH ZDRAVIL	18
VIRI.....	19

UVOD

Postopki preskušanja zdravil so potrebni za zagotavljanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravila. S tem namenom izvajamo analizno, farmakološko-toksikološko in klinično preskušanje zdravil. Zaradi kompleksnosti in obširnosti področja ne obstaja točno določena pot, ampak zgolj smernice in določene končne zahteve.

ANALIZNI POSTOPKI V PRESKUŠANJU ZDRAVIL

NAMEN

Analizno preskušanje zdravila pomeni farmacevtsko, kemično in biološko preskušanje kakovosti zdravila z načeli in smernicami dobre laboratorijske prakse in v skladu s podatki, ki jih vsebuje dokumentacija za pridobitev dovoljenja za promet oziroma ki so navedeni v specifikacijah zdravila. Mednje spadajo podatki o kakovostni in količinski sestavi, opis načina izdelave, kontrolo kakovosti vhodnih snovi, kontrole kakovosti v procesu izdelave, kontroli kakovosti končnega izdelka, stabilnostne študije, ter ostale podatke, ki so ključni za varovanje javnega zdravja.

REGULATIVA

Glavni organ je Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP), ki ima tudi vlogo uradnega kontrolnega laboratorija na področju Republike Slovenije (RS). Osnovo predstavlja Zakon o zdravilih (UL 31/06). Zakon v 6. členu definira izraze: analiza kakovosti zdravila (1. odstavek), dobra kontrolna praksa (8. odstavek), dobra proizvodna praksa (10. odstavek) in uradni kontrolni laboratorij (70. odstavek). Za analizno preskušanje je pomemben tudi 20. člen, ki predpiše dosledno upoštevanje metod in zahtev Evropske farmakopeje in Slovenskega nacionalnega dodatka k Evropski farmakopeji za izdelavo in kontrolo zdravil, ki so prometu v RS. Če to ni možno, se uporabljajo farmakopeje tretjih držav ali metode, ki jih predlaga proizvajalec. Zakon v 110. členu definira naloge JAZMP, med katerimi je tudi naloga uradnega kontrolnega laboratorija na področju RS. Poglavitni del je III. del Zakona o zdravilih -Preskušanje zdravil. Predvsem 55. člen, ki definira analizno preskušanje zdravil, kot: Analizno preskušanje zdravila pomeni farmacevtsko, kemično in biološko preskušanje kakovosti zdravila z načeli in smernicami dobre laboratorijske prakse in v skladu s podatki, ki jih vsebuje dokumentacija za pridobitev dovoljenja za promet oziroma ki so navedeni v specifikacijah zdravila (1). Načela in smernice dobre laboratorijske prakse urejata Direktiva 2004/9/ES in Direktiva 2004/10/ES. (2) Vsebinsko dokumentacije za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom pa Pravilnik o dovoljenju za promet z zdravilom za uporabo v humani medicini (UL 59/06), ki je v skladu z Direktivo 2001/83/ES. 17. člen določa sestavo modula 3: Kemijski, farmacevtski in biološki podatki za zdravila, ki vsebujejo kemične in/ali biološke zdravilne učinkovine. Ustrežno je nadgrajen z Pravilnikom o načinu in postopku analiznega, farmakološko-toksikološkega in kliničnega preizkušanja zdravil za uporabo v humani medicini (UL 86/08). Slednji je podzakonski akt, ki ureja to področje v RS in je v skladu z Prilogo direktive 2003/63/ES, ki določa način in postopek preskušanja, ter vsebinsko dokumentacije. V njem je navedena oblika in terminologija za izdelavo CTD-ja po smernicah ICH. Analizno preskušanje je v modulu 3: Kemijski, farmacevtski in biološki podatki za zdravila, ki vsebujejo kemične in/ali biološke zdravilne učinkovine in je naslednje strukture:

3.1 Struktura in oblika

Vsebuje splošen pregled modula

3.2 Vsebina: temeljna načela in zahteve

Navedeta se dva glavna sklopa informacij, ki se nanašata na zdravilno(-e) učinkovino(-e) in končni izdelek.

3.2.1 Zdravilna/e učinkovina/e

3.2.1.1 Splošni podatki in podatki o vhodnih snoveh in surovinah

Predložijo se podatki o nomenklaturi (INN, Ph. Eur.), strukturi, stereokemiji, fiz.-kemijske lastnosti.

3.2.1.2 Postopek proizvodnje zdravilne(-ih) učinkovine/učinkovin

Vsebuje opis postopka po smernicah agencije, seznam vseh snovi pri proizvodnji učinkovine, podatki o kakovosti in kontroli le te,

3.2.1.3 Opis lastnosti zdravilne(-ih) učinkovine/učinkovin

Vsebuje sestavo zdravilne(-ih) učinkovine/učinkovin na osnovi fizikalno kemijskih in/ali imunološko kemijskih in/ali bioloških metod, ter podatke o nečistotah.

3.2.1.4 Kontrola zdravilne(-ih) učinkovine/učinkovin

Predložijo se podatki o rednih kontrolah, analizni metodi in validaciji zdravilne učinkovine.

3.2.1.5 Referenčni standardi ali snovi

Opredelijo in opišejo se referenčni standardi iz Evropske farmakopeje. V primeru, da snov ni navedena v Evropski farmakopeji se lahko uporabijo monografije iz drugih nacionalnih farmakopej. Če gre za novo učinkovino proizvajalec sam pripravi standarde in analizne metode za določanje kakovosti in istovetnosti.

3.2.1.6 Vsebnik in sistem zapiranja zdravilne učinkovine

Vsebuje opis vsebnika in sistema(-ov) zapiranja ter njihove specifikacije.

3.2.1.7 Stabilnost zdravilne(-ih) učinkovine/učinkovin

Vsebuje povzetke študij, podrobni rezultati študij stabilnosti, vključno s podatki o analiznih postopkih, uporabljenih za pridobitev podatkov in validacijo teh postopkov .

3.2.2 Končni izdelek

3.2.2.1 Opis in sestava končnega izdelka

Podatki vključujejo opis farmacevtske oblike in sestave z vsemi sestavinami končnega izdelka, njihove količine na enoto in funkcijo sestavin. Barvila morajo biti v skladu z Direktivo Sveta 78/25/EGS in Direktivo Evropskega parlamenta in Sveta 94/36/ES.

3.2.2.2 *Farmacevtski razvoj*

To poglavje obravnava podatke o razvojnih študijah, ki se izvedejo zaradi dokazovanja, da so farmacevtska oblika, formulacija, postopek proizvodnje, sistem zapiranja vsebnika, mikrobiološki parametri in navodila za uporabo primerni za predvideno uporabo. Opredelijo in opišejo se kritični parametri formulacije in parametri postopka proizvodnje, ki lahko vplivajo na ponovljivost serije, obnašanje in kakovost zdravila

3.2.2.3 *Postopek proizvodnje končnega izdelka*

Vsebuje navedbo različnih faz, kontrole in ustreznost meril sprejemljivosti proizvodnje, tako da se lahko oceni ali bi uporabljeni delovni postopki za proizvodnjo farmacevtske oblike lahko povzročili neželjeno spremembo pri sestavinah.

3.2.2.4 *Kontrola pomožnih snovi*

Navede se seznam vseh snovi, potrebnih za proizvodnjo pomožne(-ih) snovi. Opredelijo se kje v postopku se posamezne snovi uporabljajo. Predložijo se podatki o kakovosti in kontroli teh snovi. Navedejo se podatki, ki dokazujejo, da snovi izpolnjujejo standarde, ustrezne za predvideno uporabo.

3.2.2.5 *Kontrola končnega izdelka*

Obsega kontrolo znotraj serije. V času proizvodnje največja dopustna meja odstopanja vsebnosti zdravilne učinkovine v končnem izdelku ne presega 5 %, razen če za to ni ustrezne utemeljitve.

3.2.2.6 *Referenčni standardi ali snovi*

Navedejo se referenčni pripravki in standardi, ki se uporabljajo za preskušanje končnih izdelkov, razen če niso navedeni v oddelku za zdravilno učinkovino.

3.2.2.7 *Vsebnik in zapiranje končnega izdelka*

Predloži se opis vsebnika in sistema(-ov) zapiranja, vključno z opredelitvijo vseh snovi stične ovojnine ter njihovih specifikacij.

3.2.2.8 *Stabilnost končnega izdelka*

Predložijo se podrobni rezultati študij stabilnosti, vključno s podatki o analiznih postopkih, uporabljenih za pridobitev podatkov, ter o validaciji teh postopkov. Predložita se še protokol o stabilnosti, potem ko je zdravilo že dobilo dovoljenje za promet, ter zaveza o spremljanju stabilnosti.(3)

Podrobne smernice glede vsebine so navedene na strani Evropske komisije: http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol3_en.htm in EMEA-e <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/quality.htm>.

Za postopke analiznega preskušanja zdravil so še pomembni naslednji predpisi:

- Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati preskuševalci za analizno preskušanje zdravil in postopek njihovega preverjanja. (UL 43/00), ki določa pogoje, ki jih morajo glede kadrov, prostorov, opreme in vodenja dokumentacije izpolnjevati preskuševalci, ki z analiznim preskušanjem ugotavljajo farmacevtsko-kemično-biološko in mikrobiološko kakovost zdravil ter postopek njihovega preverjanja.(4)

- Pravilnik o določitvi dobre proizvodne prakse(UL 10/05), ki z Direktivo 2003/94/ES določa načela in smernice dobre proizvodne prakse v zvezi z zdravili za uporabo v humani medicini in zdravili za uporabo v humani medicini v preskušanju, ureja načela dobre proizvodne prakse, ki jih morajo pri izdelavi zdravil za uporabo v humani medicini in zdravil za uporabo v humani medicini v preskušanju upoštevati izdelovalci in proizvajalci zdravil.(5)

- Pravilnik o ocenjevanju in o postopkih nadzora skladnosti z načeli dobre laboratorijske prakse (UL 38/00), ki ureja ocenjevanje in postopke nadzora skladnosti ter izmenjave informacij o dobri laboratorijski praksi z namenom, da se zagotovi ustrezno izvajanje nekliničnih preskusov snovi ali pripravkov (varnostnih študij) za ocenjevanje vplivov snovi ali pripravkov na človeka in okolje ter omogoči medsebojno priznavanje preskusnih podatkov z drugimi državami.(6)

- Pravilnik o načelih dobre laboratorijske prakse (UL 38/00 in UL 2/04), predpisuje načela dobre laboratorijske prakse za neklinične preskuse snovi ali pripravkov (varnostne študije), katerih rezultati omogočajo ocenjevanje njihovih vplivov na ljudi in okolje ter se uporabljajo v postopkih za dajanje v promet in uporabo, registracijskih, prijavnih ali sporočilnih postopkih. (7)

PREDKLINIČNO PRESKUŠANJE ZDRAVIL

NAMEN

Neklinično farmakološko-toksikološko preskušanje zdravil izvajamo z namenom ugotavljanja varnosti zdravila. Opredeliti mora farmakodinamske, farmakokinetične in toksikološke lastnosti zdravila, ugotovljene na celičnih kulturah, izoliranih tkivih ter organih in živalih in prek tega predvideti možne učinke na ljudeh.

REGULATORNA OSNOVA

Predklinične (farmakološko-toksikološke) raziskave zdravil za uporabo v humani in medicini se morajo izvajati v skladu z dobro laboratorijsko prakso s priporočili OECD ali EC, v skladu z zahtevami direktive EEC 2377/90 in / ali direktiv 81/852/EEC (1981) in 92/18/EEC (1992) ter v skladu z Zakonom o zdravilih (Ur. list RS, 31/2006) in podzakonskimi akti, ki urejajo to področje v Republiki Sloveniji.

- 50. točka 6. člena Zakona o zdravilih pravi, da je **proizvajalec** pravna ali fizična oseba, ki je **odgovorna** za razvoj, izdelavo, kontrolo kakovosti, opremljanje, označevanje ter **varnost in učinkovitost** zdravila. Torej opredeljuje kdo je dolžan opraviti predklinično preskušanje zdravil.
- 3. točka 23. člena Zakona o zdravilih pravi, da mora vsebovati vloga za pridobitev dovoljenja z zdravilom **neklinični farmakološko-toksikološki del**, ki vsebuje podatke o **farmakodinamičnih** in **farmakokinetičnih** lastnostih zdravila, **toksičnosti** zdravila, vplivu na **reprodukcijske funkcije**, podatke o **embrio-fetalni toksičnosti**, mutagenosti in rakotvornem potencialu, podatke o lokalnem prenašanju, o izločanju in ostale podatke, **potrebne za varovanje javnega zdravja**. Torej v grobem povzema obseg predkliničnega preskušanja zdravil.
- 56. člen Zakona o zdravilih govori o nekliničnem farmakološko-toksikološkem preskušanju. Pravi, da gre za postopek **ugotavljanja varnosti** zdravila in se izvaja v skladu z načeli in smernicami **dobre laboratorijske prakse** in v skladu s podatki, ki jih vsebuje (oz. mora vsebovati) **dokumentacija za pridobitev dovoljenja za promet**. Farmakološko-toksikološke lastnosti zdravila je potrebno opredeliti na laboratorijskih živalih, nato pa predvideti možne učinke na ljudeh.

Pomemben dokument je tudi **Pravilnik o načinu in postopku** analiznega, **farmakološko-toksikološkega** in kliničnega preskušanja zdravil za uporabo v humani medicini. 2. člen tega pravilnika pravi, da sta **način in postopek** analiznega, farmakološko-toksikološkega in kliničnega preskušanja ter **vsebina dokumentacije** o kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravila določeni v **Prilogi Direktive Komisije 2003/63/ES (Priloga 1)** (1, 3).

IZVEDBA

Najbolj smiselno in pa tudi zakonsko predpisano je, da potek farmakološko-toksikoloških študij sledi sestavi modula 4 dokumentacije za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom.

Preskusi morajo pokazati morebitno toksičnost zdravila in farmakološke lastnosti v kakovostni in količinski povezavi do predlagane uporabe pri ljudeh. Rezultati morajo biti zanesljivi ter splošno uporabni (3).

Rezultati nekliničnih študij so tudi nujno potrebni za prehod zdravila v fazo kliničnih študij.

Informacije o absorpciji, distribuciji, metabolizmu in eliminaciji v živalih bi naj omogočale primerjavo človeških in živalskih metabolnih poti. Primerne informacije bi naj bile dosegljive še pred zaključkom faze 1 kliničnih preskušanj (farmakologija na človeku). Preden se začeta druga (terapevtska raziskovanja) in tretja faza (terapevtska potrjevanja), morajo biti dokončno opravljene tudi študije toksičnosti ponavljajočih odmerkov.

Pred kakršnokoli administracijo zdravila na ljudeh morajo biti opravljene študije lokalne tolerance, študije genotoksičnosti (in vitro testi; baterija testov mora biti opravljena pred 2. fazo) in določene študije toksičnega vpliva na sposobnost razmnoževanja (9).

Pri pripravi programa se upošteva naslednje:

- vsi preskusi, ki zahtevajo večkratno dajanje zdravila, se načrtujejo tako, da upoštevajo možno indukcijo protiteles in z njimi povzročeno interferenco;
- upoštevajo se raziskave vplivov na sposobnost razmnoževanja, toksičnosti za zarodek/plod in obporodne toksičnosti, mutagenega potenciala in rakotvornega potenciala. Kadar se potencial pripisuje sestavinam, ki niso zdravilne učinkovine, se študija lahko nadomesti z validacijo njihove odstranitve;
- razišče se toksikologija in farmakokinetika pomožne snovi, ki se prvokrat uporablja na farmacevtskem področju;
- kadar obstaja možnost značilne razgradnje med shranjevanjem zdravila, je treba preučiti toksikologijo razgradnih produktov (3)

Farmakologija

Opravita se 2 farmakološki študiji. V prvi se ustrezno raziščejo in opišejo učinki v zvezi s predlagano terapevtsko uporabo. Če je mogoče se naredi primerjava s snovmi s podobnim terapevtskim delovanjem.

V drugi pa se opravi raziskava možnih neželenih farmakodinamičnih učinkov snovi na fiziološke funkcije (v predvidenem terapevtskem območju in nad njim). Opravi se raziskava vsake sumljive spremembe odzivov, ki so posledica ponavljajočega dajanja snovi. Uporabljajo se priznane in validirane metode, nove metode pa je potrebno opisati tako podrobno, da so ponovljive.

Za farmakodinamično interakcijo zdravila se preskuse na kombinacijah zdravilnih učinkovin lahko spodbuja s farmakološkimi premisami ali z navedbami terapevtskega učinka. V prvem primeru farmakodinamična študija pokaže tiste interakcije, ki bi lahko pokazale pomembnost kombinacije pri terapevtski uporabi. V drugem primeru, kadar se znanstvena utemeljitev za kombinacijo ugotavlja s pomočjo terapevtskih poskusov, raziskava določi vsaj, ali se pričakovani učinki kombinacije lahko pokažejo na živalih, in opravi se vsaj raziskava pomembnosti vseh morebitnih dodatnih učinkov (3)

Sestava poglavja farmakologija (modul 4):

- primarna farmakodinamika
- sekundarna farmakodinamika
- farmakologija varnosti
- farmakodinamične interakcije (1)

Čeprav se zdi sestava jasna, dokument ICH Topic S 7 A - Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals navaja, da termini primarna farmakodinamika, sekundarna farmakodinamika in farmakologija varnosti nimajo mednarodno priznane definicije in da še vedno obstaja potreba po mednarodnih smernicah na tem področju (10).

Farmakokinetika

Farmakokinetika vključuje študijo obnašanja zdravilne učinkovine in njenih presnovkov v organizmu ter študije absorpcije, porazdelitve, presnove (biotransformacije) in izločanja teh snovi.

Potrebna je farmakokinetična raziskava vseh farmakološko aktivnih učinkovin. Pri novih kombinacijah dobro poznanih in raziskanih snovi, farmakokinetične študije niso nujno potrebne, če se njihovo opustitev utemelji s preskusi toksičnosti ter terapevtskimi poskusi.

Podatki o porazdelitvi in izločanju so potrebni v vseh primerih, kjer so taki podatki nujno potrebni za določanje odmerjanja pri ljudeh, ter pri kemoterapevtikih (antibiotikih, itd.) ter snoveh, katerih uporaba je odvisna od njihovih nefarmakodinamičnih učinkov (npr. številne snovi za diagnostične namene, itd.).

Doziranja in načini aplikacije naj bodo povezani z predvidenim načinom klinične uporabe substance. Vsaj en od načinov aplikacije naj zagotavlja tudi preverjanje absorpcije, če je to relevantno pri kasnejši uporabi na ljudeh.

Študije in vitro se lahko izvajajo tudi tako, da se izkoristi uporaba človeške snovi za primerjavo z živalsko snovjo (t.j. vezava na proteine, presnova, interakcije med zdravili) (3)

V farmakokinetičnih študijah se uporabljajo živali, ki se tudi sicer uporabljajo za farmakološko-toksikološke raziskave. Uporaba kakšnih drugih živalskih vrst mora biti utemeljena (8)

Oblikuje se farmakokinetični program, ki omogoča primerjavo med živaljo in človekom ter ekstrapolacijo (3).

Študije morajo vključevati vsaj naslednje preskuse:

- a) absorpcija (frakcija absorbirane učinkovine, kinetika absorpcije)
- b) distribucija v vitalnih organih in tkivih ter odvisnost koncentracije od časa v telesnih tekočinah
- c) razpolovna doba v krvi, plazmi ali serumu
- d) karakterizacija metabolitov v izločkih in če je možno identifikacija glavnih metabolitov
- e) način in časovni potek eliminacije substance in njenih metabolitov
- f) če je biliarna ekskrecija glavna pot eliminacije, je potrebno raziskati morebitno enterohepatično kroženje
- g) kvantitativna predvidevanja o tem, kaj se bo zgodilo z administrirano dozo
- h) raziskati je treba potencialno indukcijo encimov; če se ugotovi, da do indukcije encimov dejansko pride, se mora raziskati njen vpliv na predlagano uporabo produkta (8)

V Evropski skupnosti, ZDA in na Japonskem obstaja splošni dogovor, da je v neklinične študije treba vključiti študije distribucije v tkiva pri enkratnem odmerku. Ni pa nobene obveze po študijah distribucije pri večkratni aplikaciji. Vseeno pa obstajajo situacije, kjer lahko s takšnimi študijami pridobimo pomembne informacije:

1. če razpolovna doba učinkovine/metabolitov v organih oz. tkivih signifikantno presega razpolovno dobo v plazmi in je tudi daljša kot dvakratni dozirni interval v toksikoloških študijah
2. ko je koncentracija učinkovine/metabolitov v cirkulaciji v stacionarnem stanju izrazito večja kot koncentracija pri enkratni aplikaciji
3. ko se pojavijo histopatološke spremembe, ki niso bile predvidene iz kratkotrajnih toksikoloških študij, distribucijskih študij po enkratni aplikaciji in farmakoloških študij
4. če gre za zdravilo s ciljano dostavo zdravilne učinkovine (11)

TOKSIKOLOGIJA

Vse poskusne živali, ki se uporabljajo v različnih toksikoloških študijah, naj bodo iz primernege seva, mladi zdravi odrasli, obeh spolov (kadar se uporablja samo en spol, so to ponavadi samice, ker so bolj občutljive, ne smejo pa biti noseče). Variacija telesne teže poskusnih živali naj bo minimalna in naj ne presega 20% povprečne teže.

Vse poskusne živali, ki bodo sodelovale v poskusu, morajo biti najmanj 5 dni pred začetkom poskusa ločene od ostalih in nadzorovano hranjene.

Zaradi etičnih razlogov se uporablja minimalno število, ki še omogoča primerno statistično obdelavo. (12)

TOKSIČNOST ENKRATNEGA ODMERKA

Toksičnost pri enkratnem odmerku je kakovostna in količinska študija toksičnih reakcij, ki so lahko posledica enkratnega dajanja zdravilne učinkovine ali učinkovin, ki jih vsebuje zdravilo v deležih in fizikalno-kemijskem stanju v katerem so prisotne v obstoječem izdelku. (3)

Pred začetkom testiranja mora testirni laboratorij pridobiti vse dostopne informacije o zdravilni učinkovini (identiteta, kemična struktura, fizikalno kemijske lastnosti, toksikološke študije strukturno podobnih substanc).

Peroralni odmerek

1) *Procedura s fiksnim odmerkom*

- Preliminarna študija

S preliminarno študijo ugotovimo začetni odmerek s katerim bomo začeli študijo toksičnosti enkratnega odmerka. Izbiramo med 5, 50, 300 in 2000 (izjemoma 5000) mg/kg telesne teže poskusne živali. Študijo izvedemo na eni poskusni živali, ki jo po aplikaciji odmerka opazujemo 7 dni (če so znaki toksičnosti še 7 dni).

- Glavna študija

Izberemo po 5 živali vsakega spola (ponavadi podgana), ki jim apliciramo izbran odmerek (le ta ne sme biti tisti, pri katerem živali poginejo). Po preteku 3-4 dni jim apliciramo nov, večji odmerek npr. če začnemo z 5 mg/kg, nato nadaljujemo z 50 mg/kg, 300 mg/kg in na koncu še z 2000 mg/kg.

Študija se konča, ko določena doza povzroči evidentno toksičnost, ko se pojavi smrt ene poskusne živali ali pa ko tudi pri najvišji dozi ni opaziti toksičnih učinkov.

Rezultati: nekropsija in histopatologija poskusne živali, določitev odmerka, ki povzroča pomembno toksičnost, določitev minimalnega letalnega odmerka, določitev najvišjega odmerka, ki ne povzroča pogina, spremljanje telesne teže, narava, resnost in trajanje učinka, čas pojavljanja znakov toksičnosti, njihova reverzibilnost.

2) *Procedura po korakih*

Študija se izvaja po korakih (povprečno 2-4), v enem koraku izberemo 3 živali (ponavadi samice podgane). Izberemo takšen začetni odmerek, ki bo najverjetneje povzročil smrt kakšne izmed njih (5, 50, 300, 2000 mg/kg telesne teže). V odvisnosti od prisotnosti oz. odsotnosti smrtnosti povezane z odmerkom, določimo naslednji korak: - ni potrebno nadaljnje testiranje

- testiranje s tremi dodatnimi živalmi z isto dozo
- testiranje s tremi živalmi z višjo dozo

Rezultati: isti kot pri proceduri s fiksnim odmerkom.

TOKSIČNOST PONAVLJAJOČEGA ODMERKA

Namen preskusov toksičnosti pri ponavljajočih odmerkih je odkrivanje vsakih fizioloških in/ali anatomsko patoloških sprememb, ki jih povzroča ponavljajoče dajanje zdravilne učinkovine ali kombinacije učinkovin, ki jih preučujemo, ter določitev povezave med spremembami in odmerjanjem.

Na splošno je zaželeno, da se izvedeta dva preskusa: en kratkotrajen preskus, ki traja dva do 4 tedne in drugi, ki je dolgotrajen. Trajanje dolgotrajnega preskusa je odvisno od pogojev klinične uporabe. (3)

28 ali 90 dnevna toksičnost

Zdravilna učinkovina se aplicira (per os, dermalno, inhalacije) več skupinam testnim živalim (skupina najmanj 10 testnih živali pri 28 dnevem testiranju oz. skupina najmanj 20 testnih živali pri 90 dnevem testiranju), ponavadi podgan, čeprav se lahko izberejo tudi neglodalci, vsaki skupini določen odmerek vseh 28 ali 90 dni.

Izberemo nizek odmerek (brez toksičnega učinka), srednji odmerek (blagi toksični učinek) ter visoki odmerek (toksični učinek, minimalna smrtnost), ena skupina pa je kontrolna, ki prejme zgolj vehikel za zdravilno učinkovino.

Živali se opazujejo vsak dan in še najmanj 14 dni po končanem preskusu. Obdukcija se izvede na vseh živalih (tistih, ki poginejo med preskusom in žrtvovanih na koncu preskusa).

Paremetri, ki jih spremljamo (dnevno/tedensko):

- klinični znaki (dihanje, motorna aktivnost, konvulzije, refleksi, kardiovaskularni sistem, salivacija, analgezija, tonus mišic, blato, bruhanje, urin, koža,...)
- sprememba telesne teže (vsakodnevno tehtanje)
- poraba hrane in vode
- hematološke analize (eritrociti, hematokrit, hemoglobin, levkociti, krvne ploščice)
- klinično-biokemijske analize (karbohidratni metabolizem, metabolizem proteinov, balans elektrolitov)
- analize urina (specifična teža, pH, proteini, glukoza, ketoni, bilirubin, urobilinogen, epitelne celice, kamni)
- oftalmološke preiskave
- funkcionalni testi (EKG, EEG, prevodnost živčevja, jetra, ledvica)
- patomorfološke preiskave (makroskopsko vse živali, histopatološko pa živali iz skupine, ki so prejemale visoke odmerke ter kontrolno skupino, če pa so ugotovljene poškodbe organov pri visokih odmerkih, pa je potrebno pregledati tudi živali iz skupine, ki so prejemale srednji odmerek) (12)

Kronična toksičnost

Zdravilna učinkovina se aplicira (per os, inhalacija) najmanj 40 testnim živalim (ponavadi podgane, 20 samcev in 20 samic). Vsaka skupina prejme različne odmerke (kot pri testiranju 28 ali 90 dnevne toksičnosti), potrebna je tudi kontrolna skupina.

Glodavci so zdravilni učinkovini izpostavljeni 6-12 mesecev, neglodavci pa 12 mesecev do 2 let.

Spremljamo iste parametre kot pri testiranju 28 ali 90 dnevne toksičnosti. (12)

GENOTOKSIČNOST

Namen študije je pokazati spremembe, ki jih lahko snov povzroči v genetskem materialu posameznikov ali celicah (genske mutacije, poškodbe kromosomov, rekombinacije in spremembe števila kromosomov). Mutagene snovi lahko predstavljajo tveganje za zdravje, ker izpostavljenost mutagenu nosi tveganje sprožitve mutacije zarodne linije, z možnostjo podedovanja nepravilnosti ter tveganje somatskih mutacij, vključno z mutacijami, katerih posledica je rak. (3)

In vitro test za določanje kromosomskih poškodb

Test se izvaja na različnih sesalčjih celicah (fibroblasti kitajskega hrčka, limfociti iz periferne krvi človeka ali drugih sesalcev,...), ki so v ustreznem mediju in inkubirane pri 37 C. Celice so izpostavljene zdravilni učinkovini v ustreznem tekočem vehiklu enkrat brez in drugič z metaboličnim aktivatorjem. Uporabijo se najmanj tri različne koncentracije zdravilne učinkovine (nizka, srednja, visoka). Pri tisti kjer se pojavi citotoksičnost, se naredijo še dodatni testi, tako da se vzamejo koncentracije okrog te koncentracije, ki povzročajo maksimalno, srednjo in najmanjšo toksičnost. Nato se celice obdelajo s kolhicinom, ki zavira delitev celic in pripravi za analizo z mikroskopom, kjer se opazujejo potencialne kromosomske poškodbe. (12)

In vivo test za določanje kromosomskih poškodb

Največ se uporabljajo glodalci (podgane, miši, kitajski hrčki), katerim se po ustrezni poti aplicira zdravilna učinkovina. Preden se žrtvujejo, se jim aplicira kolhicin, ki zavira delitev celic. Tarčni organ za analizo so hematopoetske celice ter mikronuklei v kostnem mozgu ali v eritrocitih iz periferne krvi, iz katerih se izolira kromosom in analizira z mikroskopom.

Zaradi uporabe testnih živali lahko raziskujemo tudi možen vpliv absorpcije, distribucije, metabolizma in ekskrecije na genotoksično aktivnost substance. (12)

In vitro test za določevanje genskih mutacij v bakterijah

Test izvajamo na prokariotskih celicah, ki se od sesalčjih razlikujejo v mnogem npr. prevzem, metabolizem, struktura kromosomov, procesi DNA popravljanja,..., zato ta test ne da direktnih informacij o genotoksičnosti na sesalčje celice.

Test se ne more izvajati na močno baktericidnih učinkovinah (nekateri antibiotiki) in takšnih, ki specifično interferirajo z sesalčjim replikacijskim sistemom.

Test je osnovan na tem, da bakterije z ustreznimi mutacijami ne morejo sintetizirati aminokislin in s tem proteinov, ki jih potrebujejo za preživetje, zato ne zrastejo na primernem gojišču.

Suspenzija bakterijskih celic (*Salmonella typhimurium* sevi, *Escherichia coli* sevi) se zmeša z zdravilno učinkovino (z in brez metaboličnega aktivatorja), nato se bakterije gojijo na primernem gojišču. Po 2-3 dnevih se preštejejo relevantne kolonije in rezultat se primerja s spontano nastalimi kolonijami na kontrolnem gojišču. (12)

KANCEROGENOST (RAKOTVORNOST)

Preskusi za odkrivanje rakotvornih učinkov se običajno zahtevajo:

- za vsako zdravilo, katerega klinična uporaba je predvidena podaljšano obdobje bolnikovega življenja in ga bo prejemal nenehoma ali v ponavljajočih odmerkih v presledkih
- za zdravila pri katerih obstaja skrb zaradi njihovega rakotvornega potenciala npr. zdravila iste skupine ali podobne strukture
- študije za nedvoumno genotoksične spojine niso potrebne, ker se za take spojine predpostavlja, da so kancerogene za vse vrste in pomenijo tveganje za ljudi (3)

Zdravilna učinkovina se aplicira glodalcem ali neglodalcem vseh 7 dni v tednu, večino njihovega življenjskega cikla (podgane 24 mesecev, miši 18-24 mesecev, hrčki 18 mesecev). Poskusne živali se opazujejo dnevno (predvsem razvoj tumorjev), med in po izpostavitvi z zdravilno učinkovino. Zdravilno učinkovino apliciramo v treh različnih dozah (nizka, srednja, visoka). V vsaki skupini mora biti najmanj 100 glodalcev (50 samcev in 50 samic), potrebna je tudi kontrolna skupina. Če med poskusom načrtujemo žrtvovanje živali, mora biti število poskusnih živali ustrezno večje.

Parametri, ki jih opazujemo (na vseh poginulih, žrtvovanih med poskusom, preživelih in na koncu žrtvovanih poskusnih živalih) so telesna teža, poraba hrane in vode, klinični znaki toksičnega delovanja, palpacija oteklin, oftalmoskopija, hermatologija, biokemija, analiza urina, krvni razmaz ter histopatologija organov (12).

TOKSIČEN VPLIV NA SPOSOBNOST RAZMNOŽEVANJA IN RAZVOJA

Z ustreznimi preskusi se opravi raziskava možne prizadetosti sposobnosti razmnoževanja samca ali samice kot tudi škodljivih učinkov na potomce. (3)

Parametri ugotavljanja toksičnega vpliva na sposobnost razmnoževanja glede na časoven potek razmnoževanja

- FERTILNOST:

reproduktivne funkcije odraslih samcev in samic, razvoj in dozorevanje gamet, obnašanje pri parjenju, implantacija (miši, podgane: 3.-5. dan, kunci: 6.-7. dan brejosti)

- EMBRIOTOKSIČNOST IN TERATOGENOST:

reproduktivne funkcije samičk, razvoj embrija, formiranje pomembnih ogranov (miši, podgane: 5.-15. dan, hrčki: 6.-14. dan, kunci: 6.-18. dan), reproduktivne funkcije samičk, razvoj in rast fetusa, razvoj in rast organov

- PERI- IN POST-NATALNI RAZVOJ:

reproduktivne funkcije samičk, prilagoditev mladičev na življenje zunaj maternice, rast in razvoj pred in po odstavitvi, prilagoditev samostojnemu življenju, pridobivanje popolnih spolnih funkcij

Za ugotavljanje toksičnega vplina na posamezno fazo procesa razmnoževanja se uporablja bodisi enogeneracijski ali pa dvogeneracijski test.

Zdravilna učinkovina se v različnih dozah (nizka, srednja, visoka) aplicira več skupinam poskusnih živali, ena skupina je kontrolna.

Poskusne živali so predvsem podgane in miši.

Samcem se zdravilna učinkovina aplicira med rastjo (med 5 in 9 tednom starosti) in vsaj en spermatogeni cikel (56 dni pri miših in 70 dni pri podganah), samicam pa vsaj dva cikla razvoja jajčeca. Živali se nato pariyo. Zdravilna učinkovina se aplicira obema spoloma med paritvijo, po oploditvi in v času po rojstvu pa zgolj samicam. Število brejih samic naj bo okoli 20.

Študije toksičnosti za zarodek/plod je običajno treba izvesti na dveh vrstah sesalcev, od katerih ena ni glodalec. Obporodne in postnatalne študije se izvajajo na najmanj eni živalski vrsti. Kadar je presnova zdravila pri določeni vrsti podobna presnovi pri človeku, je zaželeno, da se ta živalska vrsta vključi. Prav tako je zaželeno, da je ena od živalskih vrst enaka kot pri preskusih toksičnosti pri ponavljajočih odmerkih. (12)

LOKALNA TOLERANCA

Namen študije je preveriti toleranco zdravil (tako zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi) na delih telesa, ki lahko pridejo v stik z zdravilom .

Študije na živalih se lahko nadomestijo z validiranimi preskusi in vitro, pod pogojem, da so rezultati poskusov primerljive kakovosti in uporabnosti za namen vrednotenja varnosti. (3)

Akutna dermalna toksičnost

Za poskus potrebujemo minimalno 3 poskusne živali (kunci), ki jim na obrito področje na hrbtu (približno 6 cm²) enkratno apliciramo 0,5 ml raztopine oziroma 0,5 g prahu, gela ali kreme. Nanos učvrstimo z obližem. Kontrola je drug obrit predel hrbta, na katerega nismo aplicirali zdravila. Po preteku 4 ur ali več ovrednotimo eritem in edem. (12)

Akutna očesna toksičnost

Za poskus potrebujemo minimalno 3 poskusne živali (kunci), ki jim predhodno pregledamo oči. V prostor, ki nastane po odmiku spodnje veke enkratno apliciramo 0,1 ml raztopine oziroma 100 mg prahu, kreme ali gela. Drugo oko je kontrolno. Če je potrebno lahko uporabimo lokalni anestetik (zaradi bolečine). Po 24 urah izperemo in ovrednotimo spremembe na korneji, irisu in konjunktivi. (12)

Ostale študije

Določitev tolerance zdravila na mestu aplikacije in določitev sistemske toksičnosti po večkratni aplikaciji. Ločiti je potrebno mehanistične učinke aplikacije in/ali fizikalno-kemijske učinke od toksikoloških ali farmakodinamskih: lokalna toleranca na očesu, koži na kuncih, lokalna toleranca v rektumu, vagini na kuncih ali psih, testiranje tolerance parenteralnih preparatov na morskih prašičkih, kuncih, psih, testiranje senzitivacijskega potenciala (test na morskih prašičkih in test na lokalnih limfnih vozlih) (12)

DRUGE TOKSIKOLOŠKE ŠTUDIJE (če so na voljo)

Toksikologija nečistot

Nečistote v zdravilu (predvsem tiste, ki izvirajo iz sinteze zdravilne učinkovine in še niso primerno ovrednotene) je potrebno identificirati in kvalificirati tudi s toksikološkimi študijami (toksičnost enkratnega in ponavljajočega odmerka, genotoksičnost, kancerogenost, vpliv na sposobnost razmnoževanja in razvoja,...). Prvi nivo teh študij so »In silico« študije, kjer se uporabljajo posebni računalniški programi, ki so baze ogromnega števila spojin, ki so toksikološko ovrenotene. Na osnovi poznavanja strukture nečistote računalniški program napove ustrezno toksičnost le te. Drugi nivo je in vitro celično testiranje, tretji pa in vivo na poskusnih živalih. (13)

PRESKUŠANJE GENERIČNIH ZDRAVIL

Farmakološko, toksikološko in klinično preskušanje zdravil pri generičnih zdravilih nadomešča bioekvivalenčna študija. V primerjavi z originalnim zdravilom ima lahko generično zdravilo zaradi drugačne sinteze zdravilne učinkovine drugačen profil nečistot, zato je potrebno opraviti tudi določene toksikološke študije o teh nečistotah.

Upoštevajoč populacijo bolnikov in čas terapije, je potrebno opraviti :

- in vitro genotoksične študije (točkasta mutacija, aberacija kromosomov)
- splošne toksikološke študije (ena vrsta poskusnih živali, 14-90 dni)
- in druge primerne specifične toksikološke študije na nečistotah

VIRI

- 1) Zakon o zdravilih (UL 31/06)
- 2) http://ec.europa.eu/enterprise/chemicals/legislation/glp/directives_en.htm
- 3) Direktiva komisije 2003/63/ES, priloga 1 (analizni, farmakološko-toksikološki in klinični standardi ter protokoli za preskušanje zdravil)
- 4) Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati preskuševalci za analizo preskušanje zdravil in postopek njihovega preverjanja. (UL 43/00), 1.člen
- 5) Pravilnik o določitvi dobre proizvodne prakse(UL 10/05), 1. člen
- 6) Pravilnik o ocenjevanju in o postopkih nadzora skladnosti z načeli dobre laboratorijske prakse (UL 38/00), 1. člen
- 7) Pravilnik o načelih dobre laboratorijske prakse (UL 38/00 in UL 2/04), 1. člen
- 8) Pharmacokinetics and metabolic studies in the safety evaluation of new medicinal products in animals (guideline iz EMEA, 1994, 3BS11A)
- 9) ICH Topic M 3 (R1) Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals
- 10) ICH Topic S 7 A - Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals
- 11) ICH Topic S 3 B - Pharmacokinetics: Repeated Dose Tissue Distribution Studies
- 12) <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/testing-methods/annex5/>
- 13) <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/quality.htm>