

NEKLINIČNO PREVERJANJE VARNOSTI ZDRAVIL, NAMENJENIH PEDIATRIČNI POPULACIJI

NON-CLINICAL SAFETY TESTING OF MEDICINES INTENDED FOR THE PAEDIATRIC POPULATION

AVTORJA / AUTHORS:

Igor Klinc, mag. farm.¹

prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.²

¹ Javni lekarniški zavod Mariborske lekarnice Maribor,
OE Galenski laboratorij,
Minaškova ulica 6, 2000 Maribor

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko kemijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: marija.sollner@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

V pediatriji zdravniki pogosto uporabljajo zdravila, ki prvotno niso imela dovoljenja za uporabo pri pediatrični populaciji. Pri tem seveda upoštevajo pomembne razlike med lastnostmi otrok v primerjavi z odraslimi. Tovrstno eksperimentiranje je imelo v preteklosti tudi nekaj tragičnih dogodkov. S spremembo zakonodaje v Evropski uniji se je leta 2007 uveljavila zahteva pri registraciji zdravil, da je treba med razvojem za zdravila pripraviti načrt pediatričnih preiskav. Zaradi tega je najprej nastala smernica Evropske agencije za zdravila, ki obravnava izvajanje nekliničnih raziskav z uporabo juvenilnih živali za zdravila, namenjena pediatrični populaciji. Pred kratkim je stopila v veljavo nova harmonizirana smernica S11, ki jo je pripravil Mednarodni svet za harmonizacijo (ICH). V tem prispevku povzemamo vsebino smernic S11 in pomen preskušanja zdravil za pediatrično populacijo.

KLJUČNE BESEDE:

neklinično preskušanje na juvenilnih živalih, registracija zdravil za pediatrično populacijo, smernica ICH S11

ABSTRACT

In the treatment of paediatric population, doctors are often prescribing medicines which were not registered for children. With such prescribing they take into account the differences in characteristics between adults and children. Such experimenting had some tragic consequences in history. With the change of the regulation within the European Union in the field of a new medicine registration procedure, it's since the year 2007 mandatory to prepare a paediatric investigation plan during the medicine development. Based on that the European medicines agency prepared Guidelines on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications. Just recently a new harmonized guideline S11 was adopted, which was prepared by The International Council for Harmonisation. This paper summarizes the content of the S11 guidelines and the importance of drug testing for the paediatric population.

KEY WORDS:

guideline ICH S11, nonclinical juvenile animal testing, paediatric medicines registration

1 UVOD

V farmaciji že dolgo poznamo dejstvo, da otroci niso pomanjšani odrasli, zato je v luči tega zelo pomemben pristop k preverjanju varnosti zdravil, namenjenih pediatrični populaciji. Že pred več kot 100 leti je dr. Abraham Jacobi, znan tudi kot oče ameriške pediatrije, prepoznal pomembnost in nujnost prilagajanja farmakoterapije starosti. Zapisal je tudi, da pediatrija ni obravnava pomanjšanih moških in žensk in uporaba manjših odmerkov pri enaki bolezni v manjših telesih, ampak ima svoje neodvisne razsežnosti in obzorja (1).

Z razvojem zdravil za vedno nova in nova indikacijska področja imajo zdravniki vedno več možnosti zdravljenja bolezni. Kljub temu so tisti, ki zdravijo pediatrično populacijo, dandanes v težkem položaju. Ne le, da imajo na voljo več zdravil za zdravljenje večjega števila bolezni kot kadar koli prej, zdravila postajajo vse kompleksnejša. Pomembna posledica tega je tudi večji potencial pojavljanja neželenih učinkov (2).

Pojavlanje neželenih učinkov je težavno že pri odraslih, v pediatriji – še posebej pri nedonošenčkih – pa je ta težava veliko večja zaradi številnih dejavnikov. Veliko zdravil ima popolnoma drugačne farmakokinetične značilnosti pri otrocih v primerjavi z odraslimi na vseh ravneh farmakokinetike (absorpcija, distribucija, metabolizem in eliminacija) (2), kar je posledica anatomskih, fizioloških in razvojnih razlik med otroki in odraslimi (3). Adherenca pri otrocih je močno odvisna od formulacije zdravila, njegovega okusa, videza in načina uporabe, prav tako pa tudi od dejavnikov s strani staršev ali skrbnikov (njihovo lastno prepričanje glede zdravil in dojemanje razmerja med tveganjem in koristjo). Pomembno je tudi dejstvo, da številna zdravila, ki jih uporabljamo v pediatrični populaciji, za tovrstno zdravljenje niso pridobila dovoljenja za promet. Prav tako je za večino zdravil na trgu opravljeno formalno preskušanje glede varnosti pri odraslih. Le malo zdravil na trgu pa je takšnih, ki so posebej registrirana za uporabo pri otrocih (2).

Še pred nekaj desetletji so za več kot 70 % zdravil, ki so jih uporabljali v pediatriji in ki so bila na voljo globalno, manjkali podatki o uporabi v pediatriji in navodilih za uporabo teh zdravil (3). V norveški raziskavi uporabe neregistriranih zdravil za uporabo pri otrocih oz. uporabe zdravil izven registriranih indikacij (*off-label*) je več kot 90 % zdravljenih otrok prejelo tovrstna zdravila (4). Tudi ameriška Agencija za hrano in zdravila (*Food and Drug Administra-*

tion, FDA) navaja podobno, da je bilo v preteklosti le približno 20 % zdravil registriranih za uporabo pri otrocih. Razloge za to pripisujejo različnim dejavnikom, kot so:

- ekonomski, pri čemer so farmacevtska podjetja v otroški populaciji videla le manjše finančne koristi, kar kaže vrsta zdravil, ki so bila v večji meri registrirana tudi za uporabo pri otrocih, predvsem nekateri antibiotiki in zdravila za lajšanje težav s kašljem in prehladom;
- potreba po zagotovitvi pogojev, ki so prijazni otrokom v širšem pomenu besede, kar zajema vse, od ustrezne opreme in postopkov, prilagojenih otrokom, do ustreznih strokovnjakov s področja pediatrije, ki znajo postopati tudi ob otrokovem občutku strahu;
- postopki odvzemanja bioloških vzorcev, kot sta kri in urin, so zelo preprosti pri odrasli populaciji, vendar lahko predstavljajo težavo pri otrocih;
- etične ovire, ki jih pri odraslih premostimo s preprostimi izjavami, pri otrocih pa je to zapleteno, saj na primer otroci, starejši od sedem let, v nekaterih državah lahko kljub predhodnemu soglasju staršev sami odločajo o svojem sodelovanju, tako da to sprejmejo ali zavrnejo (5).

2 POTREBA PO RAZVOJU VARNIH ZDRAVIL ZA OTROKE

Pogost pristop pri uporabi zdravil pri otrocih, ki niso registrirana za to populacijsko skupino, je uporaba podatkov, pridobljenih na odrasli populaciji, in prilagoditev odmerka glede na telesno maso otroka. Z večletnim eksperimentiranjem so zdravniki pridobili znanje, kako uporabljati številna zdravila, registrirana za uporabo pri odraslih, varno in učinkovito tudi pri otrocih. Vendar je takšen pristop z metodo poskusov in napak privedel do tragedije, ki je opozorila, da izkušnje z varnostjo zdravila pri odraslih niso nujno zanesljiv kazalnik, kako se bodo na zdravilo odzvali otroci. Takšen primer je bil v petdesetih letih prejšnjega stoletja z uporabo protimikrobne učinkovine kloramfenikol, ki so jo široko uporabljali pri odraslih za zdravljenje okužb, rezistentnih na penicilin. Veliko novorojenčkov je umrlo zaradi uporabe kloramfenikola, ker njihova jetra niso bila dovolj razvita, da bi presnovila to zdravilno učinkovino (5). Primer tragedije uporabe zdravila pri otrocih brez predhodnega preverjanja varnosti je tudi uporaba eliksirja s sulfanilamidom, ki je kot topilo vseboval etilen glikol. Posledica je bila smrt kar 107 otrok (6). K sreči se je zlasti zadnji dve de-



setletji okrepil razvoj zdravil za uporabo v pediatriji kot posledica spremembe v zakonodaji v Združenih državah Amerike (ZDA) in Evropski uniji (EU) (3). Sprejem evropske Uredbe št. 1901/2006 o zdravilih za pediatrično uporabo, ki je stopila v veljavo januarja 2007, je sprožil masovni premik v razvoju zdravil znotraj EU. Ta uredba določa, da morajo farmacevtska podjetja Pediatričnemu odboru (*Paediatric Committee*, PDCO) pri Evropski agenciji za zdravila (EMA) obvezno posredovati načrt pediatričnih preiskav (*Pediatric investigational plan*, PIP) ob koncu prve stopnje preskušanja novega zdravila pri odraslih (7). Tako trenutno potekajo preiskave vseh pogojno odobrenih cepiv proti koronavirusu, ki se bodo predvideno zaključile sredi leta 2024 (8). Zahteve po preskušanju zdravil na pediatrični populaciji pa ni uvedla le EU, ampak velja podobno tudi na primer v ZDA, kjer je na stopnji razvoja zdravila treba pripraviti pediatrični varnostni načrt (*Pediatric safety plan*, PSP) (9).

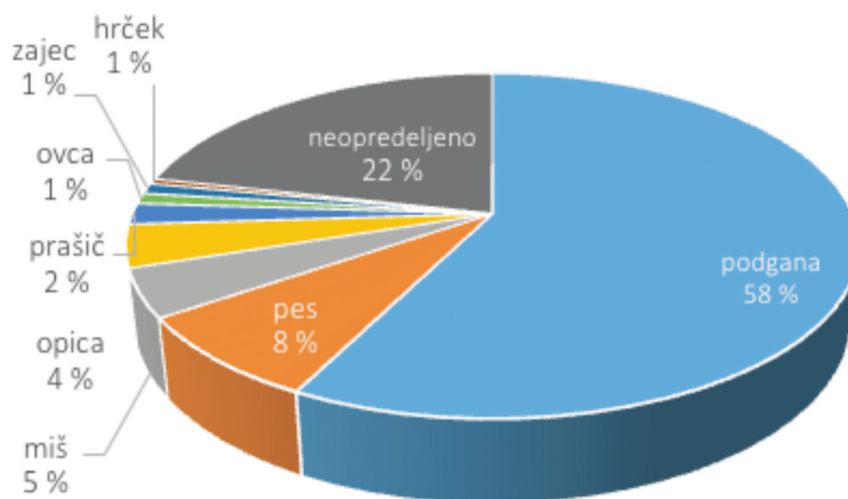
Načrt pediatričnih preiskav vsebuje oris razvoja zdravila in opredeljuje načrtovanje in terminsko izvedbo nekliničnih in kliničnih raziskav, ki so nujni za predložitev k vlogi za pridobitev dovoljenja za promet za pediatrično uporabo. Načrt pregleda Pediatrični odbor, ki ga lahko odobri ali zavrne (10). Pediatrični odbor sestavljajo strokovnjaki s kompetencami v razvoju in ocenjevanju vseh vidikov zdravil za uporabo v pediatrični populaciji (11).

PIP ni treba vložiti v vseh primerih in je pri določenih zdravilih možna opustitev. To velja za zdravila, pri katerih ni znanih indikacij pri otrocih oz. ko se predvidena uporaba zdravila ne nanaša na otroško populacijo (na primer Parkinsonova

bolezen). Opustitev mora biti odobrena pred oddajo vloge za dovoljenje za promet z zdravilom. V nekaterih drugih primerih pa obstaja preveliko varnostno tveganje za preskušanje zdravila pri otrocih (ali podskupini otrok) do zaključka predkliničnih raziskav ali raziskav pri odraslih ali specifični podskupini otrok. V teh primerih se lahko raziskave na pediatrični populaciji odložijo do potrditve, da je izvajanje raziskav varno in etično tudi pri otrocih ali specifični starostni podskupini (3).

PDCO je v letu 2008 objavil seznam opustitev, ki so ga nato revidirali v letih 2009 in 2010, na katerem so zdravila, ki so oproščena obveznega posredovanja PIP. Seznam je vseboval 42 zdravil za zdravljenje bolezni (25 od teh je bilo namenjenih zdravljenju rakavih bolezni), ki se ne pojavljajo pri otrocih. Vendar so pediatri, onkologi in starši poudarili, da so nekatera zdravila neupravičeno na tem seznamu. Kot enega od primerov na seznamu opustitev so navedli zdravilno učinkovino krizotinib, ki je registrirana za zdravljenje na ALK (anaplastična limfomska kinaza) pozitivnega raka na pljučih, ki se ne pojavlja pri otrocih (12). Za to učinkovino je PDCO najprej podelil oprostitev za vse starostne skupine, nato pa je EMA leta 2019 objavila novo odločitev, da se podeli oprostitev izvedbe PIP le za starostno skupino do 12 mesecev (zdravljenje anaplastičnega velikoceličnega limfoma in vnetnega miofibroblastnega tumorja), za starostno skupino od 12 mesecev do 18 let pa ne (13).

Dokazovanje varnosti uporabe zdravila oziroma zdravilne učinkovine v pediatrični populaciji vključuje tudi preskušanje na juvenilnih živalih (*juvenile animals*). V letih 2007 do 2017



Slika 1: Grafična predstavitev deležev vrst živali, ki jih uporabljajo za preskušanje na juvenilnih živalih (14).

Figure 1: Graphic representation of the proportions of animal species used for testing on juvenile animals (14).

je bilo na podlagi podatkov o odločitvah evropskih PIP kar 227 zdravil z opravljenim preskušanjem na juvenilnih živalih različnih živalskih vrst, in sicer na podganah (57,5 %), psih (8 %), miših (4,5 %), opicah (4 %), prašičih (2 %), ovcah (1 %), zajcih (1 %), hrčkah (0,5 %) in vrstah, ki niso bile posebej opredeljene (21,5 %) (slika 1). Prav tako so bile te raziskave izvedene za zdravila, namenjena zelo različnim terapevtskim skupinam. Najpogostejše so bile učinkovine s področij zdravljenja infekcijskih bolezni (15 %), endokrinologije (13,5 %), onkologije (13 %), nevrologije (11 %) in srčno-žilnih bolezni (10 %) (14).

Navedeni podatki kažejo stanje nekliničnega preverjanja varnosti zdravil v pediatrični populaciji v času nastajanja težko pričakovane harmonizirane smernice ICH 11 o nekliničnem preskušanju varnosti kot podpori razvoju zdravil, namenjenih pediatrični populaciji (*Guideline S11 on non-clinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals*).

Smernico S11 so prvič objavili na spletni strani EMA 1. 4. 2020, v veljavo pa je stopila 26. 9. 2020. V splošnem velja, da so v tej smernici predlagani standardi za pogoje, pod katerimi je preskušanje na juvenilnih živalih koristno in nujno za podporo izvedbe kliničnih raziskav na pediatrični populaciji. Prav tako so v smernici navedene usmeritve glede načrtovanja raziskav. Implementacija te smernice prinaša lažji razvoj zdravil in večjo zanesljivost znanstvenih podatkov ob hkratnem zmanjšanju odvečne uporabe živali (15).

ICH (*The International Council for Harmonisation*) ne samo v tej smernici, ampak v vseh objavljenih smernicah nekliničnega preskušanja varnosti poudarja princip 3R. Ta princip se nanaša na živali, ki se uporabljajo v nekliničnih preskušanjih varnosti zdravil, in pomeni zmanjšati število testnih živali (**Reduce**), izboljšati metode, da povzročajo manj bolečin (**Refine**), in zamenjati preskušanja na živalih z drugimi metodami, kot so metode *in silico* in metode *in vitro* na celičnih kulturah (**Replace**) (15).

Preskušanje varnosti zdravila vključuje veliko število živali za izvedbo vseh raziskav. Samo v Veliki Britaniji so v letu 2020 za namene preskušanja varnosti zdravil za uporabo v humani medicini potrebovali 193.000 živali. Kar 67 % preskušanj na psih in 76 % na primatih so opravili z namenom zadostiti regulatornim zahtevam, od katerih največji delež predstavlja preverjanje varnosti zdravil (16).

Podatki kažejo, da 90 % zdravil, ki so uspešno prestala preskušanja na živalih, ne prestane kliničnih preskušanj zaradi varnostnih tveganj in ker v kliničnih raziskav ne potrdijo učinkovitosti (17).

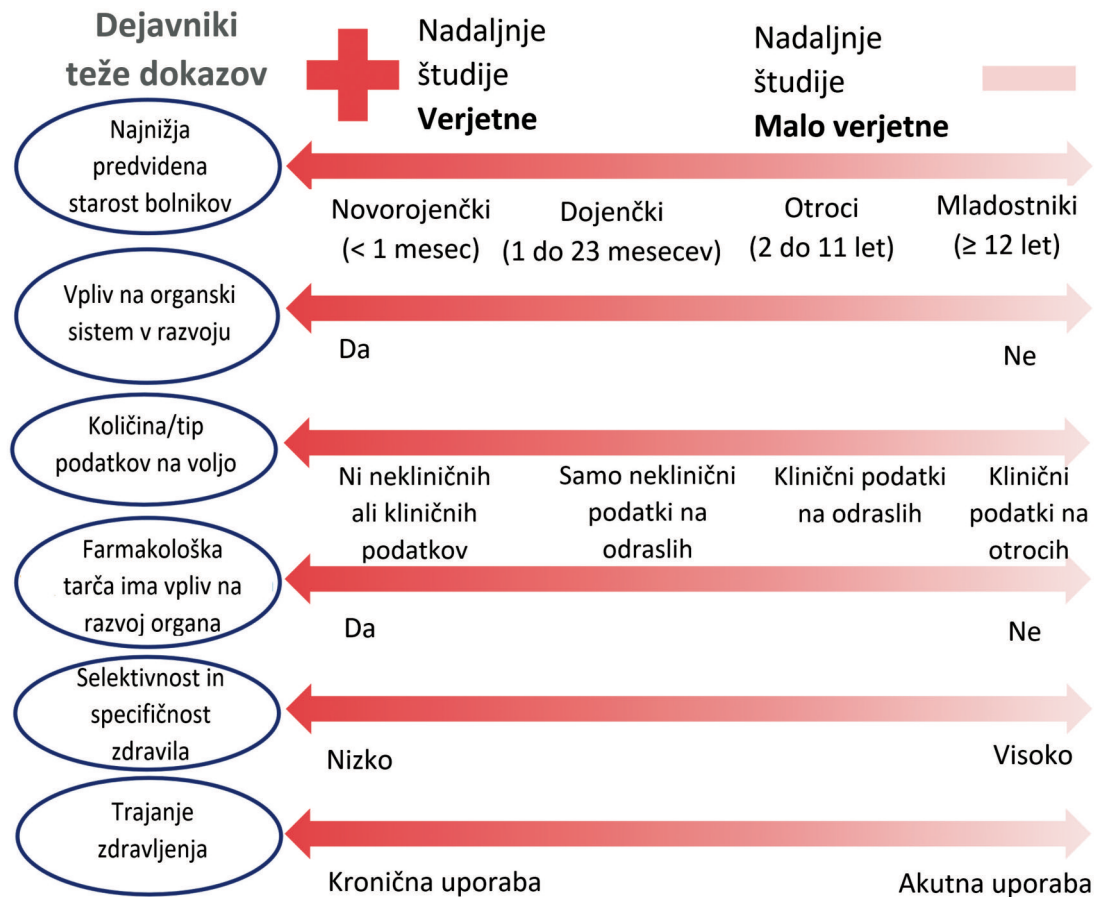
Smernica S11 pa ne prinaša popolne novosti na področju preskušanj zdravil na juvenilnih živalih, ampak je to področje

v EU do neke mere urejala že smernica Odbora za zdravila v humani medicini (*Comitee for Human Medicinal products*, CHMP) pri EMA z naslovom *Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications* (smernica glede potrebe za neklinična preskušanja zdravil na juvenilnih živalih za indikacije pri pediatrični populaciji), ki je stopila v veljavo 1. 8. 2008 (18). EU pri tem ni bila nobena posebnost, saj so tudi nekatere druge države sprejele nacionalne smernice glede preskušanja zdravil na juvenilnih živalih. V ZDA so takšne smernice sprejeli že pred EU – v letu 2006, na Japonskem pa pozneje – v letu 2012 (9).

Kot navaja smernica S11, lahko nezrelost organskih sistemov in zorenje teh sistemov vpliva na farmakokinetiko, farmakodinamiko in/ali ima netarčne učinke pri uporabi zdravil, kar potencialno vodi v razlike v profilu varnosti in/ali učinkovitosti med pediatrično populacijo in odraslimi. Glede odločanja o tem, ali je potrebno dodatno neklinično preskušanje za uporabo zdravila v pediatrični populaciji, je treba upoštevati pristop teže dokazov (*weight of evidence*, WoE). V luči tega pristopa ima največji vpliv na odločitev o tem, ali so dodatne neklinične raziskave nujne, najnižja predvidena starost bolnikov in učinek zdravila na organske sisteme v razvoju, medtem ko za druge dejavnike velja enaka stopnja pomembnosti (slika 2). S kliničnim razvojem zdravila se lahko na podlagi vseh razpoložljivih podatkov v določenem trenutku naredijo prilagoditve WoE. Rezultat ovrednotenja teže dokazov pa je lahko različen za različne aplikacije enakega zdravila, odvisno od najnižje starosti ciljne pediatrične populacije, terapevtske indikacije in trajanja zdravljenja (15).

3 KLINIČNE INFORMACIJE IN NJIHOV POMEN PRI ODLOČANJU O IZVAJANJU DODATNIH NEKLINIČNIH RAZISKAV NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Ko se odloča o tem, ali so dodatne neklinične raziskave nujne, je najprej treba razmisliti o že obstoječih kliničnih podatkih, ki se nanašajo na predvideno ciljno populacijo, iz drugih pediatričnih subpopulacij, če so na voljo, in podatkih o izpostavljenosti odraslih. Tudi trajanje zdravljenja je pomemben dejavnik odločanja, ali so nujna dodatna neklinična preskušanja. Daljše trajanje zdravljenja (na pri-



Slika 2: Ključni dejavniki teže dokazov, ki jih je treba upoštevati pri odločanju, ali so neklinične raziskave nujne (15).

Figure 2: Key data weighting factors to consider when deciding whether non-clinical studies are necessary (15).

mer tri mesece, šest mesecev, kronično intermitentno zdravljenje) poveča izpostavljenost otroka med razvojno občutljivim časovnim oknom, kar poveča verjetnost izvajanja dodatnih nekliničnih raziskav v primerjavi s krajšim trajanjem zdravljenja, ki manj verjetno vpliva na vidike razvoja, kot je rast. Če je na voljo dovolj podatkov o klinični varnosti zdravila in je strategija zmanjšanja tveganja v pediatrični populaciji ustrezna, ni treba izvajati dodatnih nekliničnih raziskav. Prav tako z izvajanjem nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih (NŠJŽ) ne potrjujemo toksičnosti na določene tarčne organe, za katere se ne pričakujejo razlike v občutljivosti glede toksičnosti v primerjavi z odraslo populacijo (15).

Če so na voljo podatki o klinični uporabi zdravila pri odraslih in se le-to ne uporablja v času otrokovega občutljivega razvoja organov, neklinične raziskave na juvenilnih živalih niso pomembne za začetek kratkotrajnih (1–3 dni) farmakokinetičnih raziskav v pediatrični populaciji (15, 19).

3.1 FARMAKOLOŠKE LASTNOSTI IN NJIHOV POMEN PRI ODLOČANJU O IZVAJANJU DODATNIH NEKLINIČNIH RAZISKAV NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Za pojav neželenih učinkov so odgovorne primarne ali sekundarne farmakološke lastnosti, kar je lahko zadržek glede uporabe v pediatrični populaciji, če se ti neželeni učinki kažejo na sistemih/organih v razvoju ali so organi v razvoju občutljivejši v primerjavi z dozorelimi organi. Če imajo znani farmakološki učinki zdravila potencial za vpliv na razvoj pri predvideni ciljni populaciji ali pa vpliv farmakološkega delovanja na razvoj ni znan oz. ga ni mogoče predvideti v razumnem obsegu, so nujne dodatne neklinične raziskave na juvenilnih živalih. Izvajanje le-teh ne prinaša koristi, ko na podlagi obstoječih farmakoloških podatkov identifi-

ramo določeno nevarnost, razen v primeru podrobnejšega razumevanja povezave odmerka-odziv ali razlike v občutljivosti med odraslimi in juvenilnimi živalmi (15).

3.2 FARMAKOKINETIČNI PODATKI IN NJIHOV POMEN PRI ODLOČANJU O IZVAJANJU DODATNIH NEKLINIČNIH RAZISKAV NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Novorojenčki in dojenčki imajo lahko bistveno drugačne lastnosti absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije (ADME) učinkovine v primerjavi z odraslimi. Avtorja Hannah Katharine Batchelor in John Francis Marriott sta te razlike nazorno povzela in jih predstavljamo v preglednici 1 (20). Kljub razlikam neklinične raziskave na juvenilnih živalih niso informativne za predvidevanje starostno pogojenih razlik v ADME. Za te primere so uporabna tudi modelirna in simulacijska orodja ter klinična farmakologija (15).

4 NEKLINIČNI PODATKI O VARNOSTI

Velik razlog za skrb predstavljajo morebitni podatki o toksičnosti, ugotovljeni pri raziskavah na odraslih živalih, za organe, ki so pri ciljni populaciji še v razvoju, zlasti če se neželeni učinki pojavljajo v primerljivi izpostavljenosti, kot je predvidena izpostavljenost v klinični uporabi. Zelo pomemben vir podatkov predstavljajo raziskave reproduktivne toksičnosti, predvsem pre- in postnatalne raziskave razvojne toksičnosti (*enhanced pre- and postnatal development toxicity study*, [e]PPND), če je bil potomec izpostavljen učinkovini. Ti podatki se vrednotijo s podatki splošne toksičnosti pri odločanju o izvedbi morebitnih dodatnih nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih. Informacija o tem, da je nastal neželeni učinek pri potomcu samice, izpostavljene zdravilni učinkovini, še ni razlog za izvedbo tovrstne raziskave (15).

Preglednica 1: Povzetek razlik v lastnostih ADME med pediatrično in odraslo populacijo (20).

Table 1: Summary of differences in ADME characteristics between paediatric and adult population (20).

	Razvojna sprememba	Posledica v farmakokinetiki
Absorpcija	↓ prehod črevesja	↓ C_{max} in ↓AUC
	↓ želodčni pH	↑ C_{max} za šibke kisline
		↓ C_{max} za šibke baze
	↓ koncentracija žolča v črevesju	↓ C_{max} in ↓AUC
Distribucija	sestava telesa	↔ V_d (novorojenčki imajo relativno zmanjšano količino maščobe, medtem ko imajo dojenčki relativno večjo količino maščobe v primerjavi z odraslimi; novorojenčki imajo relativno več vode v zunajceličnem prostoru v primerjavi s predšolskimi otroki)
	↓ plazemski proteini	↑ proste frakcije učinkovine v plazmi, ↑ V_d
Metabolizem	večja relativna velikost jeter	↑ jetrni očistek učinkovine
	razvoj jetrnih encimov	↔ metabolizem učinkovine v jetrih
	bakterijska kolonizacija črevesja	↑ C_{max} in ↑AUC
Eliminacija	večja relativna velikost ledvic	↑ ledvični očistek pri dojenčkih in predšolskih otrocih
	razvoj tubulnih transporterjev	↔ ledvični očistek učinkovine

C_{max} – največja koncentracija učinkovine v plazmi, AUC – površina pod krivuljo, V_d – volumen porazdelitve



4.1 UPORABA IN REZULTAT VREDNOTENJA TEŽE DOKAZOV

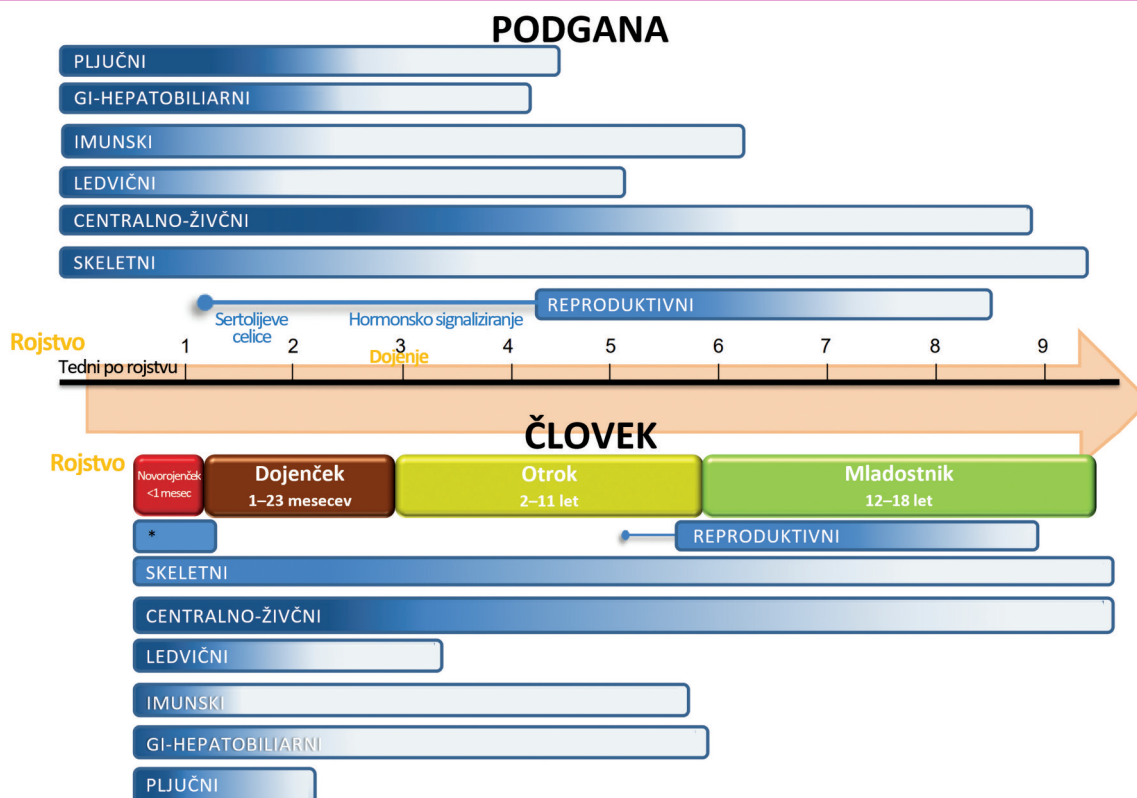
S pristopom teže dokazov ugotavljamo, ali so nujna dodatna neklinična preskušanja, s poudarkom na dejavnikih, ki so najpomembnejši za dopolnitev klinične ocene tveganja. Če ugotovimo potrebo po dodatnem preskušanju, ni nujno, da to pomeni izvedbo neklinične raziskave na juvenilnih živalih, ampak je lahko tudi raziskava *in vitro*, *ex vivo* ipd. V primeru neklinične raziskave na juvenilnih živalih cilje te raziskave uskladimo z rezultati vrednotenja teže dokazov, upoštevaje ciljno populacijsko skupino (15).

4.2 ZASNOVA NEKLINIČNE RAZISKAVE NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Pri načrtovanju neklinične raziskave na juvenilnih živalih je med drugim zelo pomembno poznavanje relativne ravni zrelosti in delovanja na stopnji razvoja med vrstami živali,

kar je ključno tudi pri translaciji ugotovitev nekliničnega preskušanja na starostne kategorije pri človeku. Primerjava razvoja med vrstami je lahko zelo zahtevna in ni enaka za vse organske sisteme. Slika 3 prikazuje razvojne razlike posameznih organskih sistemov med podgano in človekom v odvisnosti od starosti (15).

Pred začetkom izvajanja neklinične raziskave na juvenilnih živalih je priporočeno izvesti raziskavo ugotavljanja odmerka (*dose range finding study*, DRF) na manjši skupini juvenilnih živali za ugotavljanje tolerance v odvisnosti od izpostavljenosti in starosti. To je še posebej priporočljivo v primeru načrtovanja glavne raziskave, če se bo raziskava izvajala v času dojenja, in sicer v izogib nepričakovani smrtnosti ali pretirani toksičnosti. Z raziskavo ugotavljanja odmerka lahko ugotovimo tudi razlike v izpostavljenosti med starostnimi obdobji, na podlagi česar nato prilagodimo režim odmerjanja. Poleg tega se lahko pokaže tudi netoleranca na odmere, prilagojen na pričakovano izpostavljenost v predvideni ciljni populaciji. To lahko povzroči izvedbo dodatne prilagojene preiskovalne neklinične raziskave na ju-



Slika 3: Prikaz razvojnih razlik posameznih organskih sistemov med podgano in človekom v odvisnosti od starosti (prirejeno po (15)).

Figure 3: Demonstration of developmental differences of individual organ systems between rat and human depending on age (adapted from (15)).

venilnih živalih za nadaljnje opredeljevanje občutljivega starostnega okna in/ali razumevanje morebitnega mehanizma toksičnosti (15).

4.3 IZBIRA ŽIVALI ZA IZVEDBO NEKLINIČNE RAZISKAVE NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Če rezultat vrednotenja teže dokazov pomeni izvedbo neklinične raziskave na juvenilnih živalih, je običajno zadostna izvedba na eni vrsti živali, ki naj bi bila enaka uporabljeni v raziskavi s ponovitvami odmerkov, prednostno pa naj bi to bil glodavec. Izvedba na dveh vrstah je v primeru prve uporabe zdravila v pediatrični populaciji ali če obstaja več specifičnih razlogov za vpliv na postnatalni razvoj. Pri izbiri ustrezne vrste živali je treba upoštevati več dejavnikov (15):

- razumevanje razvoja farmakološke ali toksikološke tarče (npr. receptor) pri živali v primerjavi s ciljno pediatrično populacijo;
- prednostno izbrati vrsto živali, na kateri so bile izvedene raziskave s ponovljenimi odmerki, kar omogoča primerjavo med toksičnostjo in izpostavljenostjo med juvenilno in odraslo živaljo;
- toksikološke tarčne organe;
- podobnost s človeškimi lastnostmi ADME;
- tehnično in praktično izvedljivost.

Za biološka zdravila pogosto velja, da so nečloveški primati največkrat edina ustreza vrsta za izvajanje toksikoloških raziskav. Te vrste pa so z vidika znanstvenih in praktičnih razlogov zelo zahtevne za izvedbo nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih, zlasti v času dojenja (npr. hranjenje, transport in bivanje matere z mladičkom) (15).

Starost živali, ki jih vključujemo v neklinične raziskave na juvenilnih živalih, mora ustrezati razvojni stopnji najmlajše predvidene ciljne pediatrične populacije in je odvisna od primerjave razvojnega obdobja organa oz. organskega sistema, na katerem se kažejo toksikološki učinki. Vsi organi med živalskimi vrstami se ne razvijajo sorazmerno enako hitro v primerjavi s človekom, zato starost živali določimo glede na razvojno stopnjo kritičnega organa ali posebej ranljiv sistem v razvoju najmlajše ciljne pediatrične populacije (15).

Pomembna razlika med izvedbo neklinične raziskave na juvenilnih živalih in raziskave na odraslih živalih je tudi v trajanju, saj se zaradi razlike med juvenilnimi živalmi in človekom v trajanju razvoja posameznega organa v vseh primerih ne upošteva priporočilo smernice M3. Če je zdravilo namenjeno uporabi v času adolescence, običajno uporabijo

glodavce kot primeren živalski model za dajanje zdravila do odraslosti. Nečloveški primati za te namene niso primerni, saj traja od rojstva do odraslosti več let, poleg tega pa je med njimi velika interindividualna razlika med začetkom pubertete in razvoja do odraslosti (15).

Izbrani režim odmerjanja mora biti takšen, da z njim dosežemo in ohranjamo ustrezno izpostavljenost med kritičnimi razvojnimi obdobji. To pomeni, da režim odmerjanja pri juvenilnih živalih običajno ni enak režimu v klinični uporabi. Če se zdravilo v klinični uporabi odmerja enkrat tedensko, je lahko primernejše pogostejše odmerjanje v neklinični raziskavi na juvenilnih živalih. Ravno obratno pa velja v primerih morebitne akumulacije učinkovine v juvenilni živali, ko je treba interval odmerjanja povečati (15).

5 VREDNOTENJE UČINKOV PO PRENEHANJU DAJANJA ZDRAVILNE UČINKOVINE

Vključitev obdobja vrednotenja po prenehanju dajanja zdravilne učinkovine juvenilnim živalim se v splošnem priporoča iz dveh razlogov, ker s tem ugotovimo, ali (15):

- so opaženi učinki reverzibilni, persistentni ali progresivni, in ali
 - se kateri učinki pojavijo pozneje v razvojni dobi kot posledica izpostavljenosti v zgodnji dobi življenja.
- Pri tem je pomembno, da je obdobje opazovanja po prenehanju dajanja zdravila zadostno, da omogoča izzvenenje učinka, pri čemer je treba upoštevati eliminacijo učinkovine. Ni pa treba čakati na popolno izzvenenje; dovolj je, da dokažemo trend k izboljšanju ob hkratni znanstveni oceni, da se bo trend nadaljeval k popolnemu prenehanju toksičnega učinka. Podobno velja za nereverzibilni učinek, ki ga ni treba dokazovati z neklinično raziskavo na juvenilnih živalih, če je učinek dobro opisan in dokazan v raziskavah na odraslih živalih (15).

Nekateri toksični učinki so takšne narave, da jih lahko zznano le po določeni stopnji zrelosti opazovane živali. Sem sodijo npr. učinki na učenje in spomin, ki jih lahko vrednotimo le pri živalih ustrezne zrelosti, ko so bile v vseh kritičnih časovnih oknih razvoja obremenjene z zdravilom, ki ga do obdobja ustrezne zrelosti niso prejemale. Tovrsten pristop je primeren za glodavce, medtem ko je za neglodavce manj primeren zaradi daljšega razvojnega obdobja, velike variabilnosti med osebki ter manjše količine in ne tako dobro uveljavljenih ocenjevalnih metod za prepoznavanje zapoznelega ali spremenjenega razvoja (15).



6 NAČIN APLIKACIJE IN FORMULACIJA

Tako kot pri drugih toksikoloških raziskavah je tudi pri nekliničnih raziskavah na juvenilnih živalih priporočljivo, da uporabimo enak način aplikacije zdravila, kot bo v klinični praksi (če je izvedljivo), pri čemer je ključnega pomena doseganje zadostne systemske izpostavljenosti. V primeru težav pri praktični izvedbi takšnega načina aplikacije je seveda treba razmisliti o drugih načinih aplikacije (peroralni način aplikacije pri podgani za dermalni pripravek). Z odraščanjem živali lahko med izvedbo raziskave tudi spremenimo način aplikacije (ko je izvedljivo, iz subkutane aplikacije preidemo na intravensko) (15).

Optimalna izvedba toksikoloških raziskav je s končno formulacijo zdravila, kar še posebej velja za zdravila za peroralno aplikacijo, saj je pri teh zdravilih običajno velika razlika v sestavi v primerjavi z zdravilom za odraslo populacijo (npr. sirup v primerjavi s kapsulo), hkrati je treba preveriti varnost zdravila z vsemi pomožnimi snovmi. Pomembna razlika med zdravili za pediatrično populacijo in odrasle je običajno pri tekočih pripravkih, saj je za prvo navedena pogosto nižja koncentracija zdravilne učinkovine, kar pomeni večji volumen, ki ga je treba aplicirati preizkusnim živalim. To lahko povzroči napolnitev želodca z zdravilom, kar lahko vodi v zmanjšan vnos hrane in posledično do pomanjkanja določenih hranil oz. prehranjenosti, kar lahko zamaskira toksični učinek zdravila ali pa daje lažno pozitiven rezultat (21).

6.1 IZBIRA ODMERKA

Pri izbiri odmerka je pomembno, da za neželene učinke dosežemo razmerje odmerka-učinek ter določimo odmerek, pri katerem ni opaziti neželenih učinkov (*no observed adverse effect level*, NOAEL) pri juvenilnih živalih. Raziskavo izvajamo z več odmerki, od katerih najvišji odmerek ne sme biti tako visok, da povzroča znake izrazite toksičnosti (npr. motnje v razvoju in rasti, kar oteži vrednotenje). Eden od odmerkov mora biti primerljiv z odmerkom v klinični uporabi (če je izvedljivo). Določitev odmerkov mora do določene mere sovpadati tudi z odmerki, uporabljenimi pri odraslih živalih, zaradi možnosti primerjave učinkov med juvenilnimi in odraslimi živalmi (15).

Z rastjo in razvojem živali se lahko pomembno spremenijo lastnosti ADME, kar posledično vpliva na izpostavljenost živali zdravilu, zato je treba odmerek prilagoditi, da se ohr-

nja razmeroma konsistentna izpostavljenost in klinična ustreznost. Običajno se odmerek ne spremeni več kot enkrat (15).

7 KONČNE TOČKE

V splošnem mora vsaka neklinična raziskava na juvenilnih živalih vsebovati osnovne končne točke (*core endpoints*), navedene v smernici S11, ki so: smrtnost in klinična opažanja, rast, uživanje/vnos hrane, spolni razvoj, klinična patologija, anatomsko patologija in toksikokinetika. Poleg teh lahko vključimo tudi dodatne končne točke, zlasti v primerih nadaljnjih raziskav, ko ugotovimo toksične učinke pri izvedbi raziskave z osnovnimi končnimi točkami, vendar praviloma nikoli ne vključimo vseh navedenih dodatnih končnih točk (15).

Dodatne končne točke, ki jih raziskava lahko vključuje, so druge končne točke rasti, ki niso bile spremljane med osnovnimi končnimi točkami, ocena kosti, klinična patologija dodatnih parametrov, ki niso vključeni pod osnovno končno točko, anatomsko patologija dodatnih parametrov, ki niso vključeni pod osnovno končno točko, preiskave oči, ocena osrednjega živčnega sistema, ocena reproduktivne funkcije, ocena funkcije imunskega sistema (15).

8 ZDRAVILA, NAMENJENA IZKLJUČNO PEDIATRIČNI POPULACIJI ALI UPORABLJENA NAJPREJ V PEDIATRIJI

Pred izvedbo kakršne koli klinične raziskave na pediatrični populaciji je treba zdravilo preizkusiti na zdravih odraslih prostovoljcih. To najprej vključuje raziskavo toksičnosti pri ponovljenih odmerkih na glodavcih in neglodavcih, kot tudi raziskave varnostne farmakologije in genetske toksičnosti. Raziskave, ki jih izvedemo pred prvo uporabo pri človeku, so lahko standardne toksikološke raziskave s ponovljenimi odmerki na dveh vrstah živali, lahko pa izvedemo eno od teh ali obe na juvenilnih živalih, ki pa naj bi vključevali dodatne končne točke. Ta pristop lahko skrajša čas do uporabe zdravila v pediatrični populaciji, saj lahko zdravilo uvedemo že po prvem dajanju zdravila odraslim (15).

V določenih primerih lahko poteka razvoj zdravila za pediatrično populacijo tudi brez predhodnega preskušanja na odraslih prostovoljcih. To velja npr. v primeru varnostnega tveganja, če bi izpostavljenost takšnemu zdravilu predstavljala tveganje za te prostovoljce, ali v primerih, ko gre za zdravljenje življenje ogrožajočih stanj (15).

9 VREDNOTENJE PODATKOV

Vse pridobljene podatke, tako podatke preverjanja toksičnosti na odraslih kot tudi juvenilnih živalih, je treba gledati kot celoto in jih med seboj primerjati. Posebej je treba ovrednotiti relevantne spremembe med ugotovitvami na odraslih in juvenilnih živalih, prav tako pa tudi izrazite razlike v občutljivosti med njimi. Celotna interpretacija ugotovitev obsega tip, resnost in reverzibilnost učinkov, starost živali in izpostavljenost/odmerke, pri katerih so se pojavili učinki, vse to pa je treba interpretirati v luči uporabe pri pediatrični populaciji (15). Takšen pristop bi lahko opisali tudi kot holističen pristop obravnave podatkov.

Kar nekaj dejavnikov pa otežuje vrednotenje podatkov na tak način. Tako se lahko, odvisno od končnih točk in vrednotenih parametrov, razlikuje moč posamezne raziskave. Prav tako v vsaki raziskavi ni mogoče določiti krivulje odmerka-odziv. Če se pojavi neželeni učinek, se ta ne pojavi pri vseh živalih, prav tako pa vedno ni mogoče določiti subpopulacije glede na raven občutljivosti (21).

10 SKLEP

Razvoj zdravila in preverjanje toksičnih vplivov na pediatrično populacijo pred dajanjem zdravila na trg je zelo pomemben preskok in napredek k varni uporabi zdravil, ki sicer prvotno niso namenjena pediatrični populaciji, a iz historičnih izkušenj zdravljenja otrok hitro ugotovimo, da se takšna zdravila pogosto uporabljajo tudi v pediatriji. V preteklosti so imeli zdravniki bistveno manj podatkov o varnosti uporabe nekaterih zdravil pri otrocih in so bili odvisni od podatkov v literaturi, izkušenj drugih kolegov, metodologije pretvorb odmerkov za odrasle na pediatrično populacijo in lastnega znanja ter izkušenj. Tovrstno ekspe-

rimentiranje je v nekaterih primerih privedlo celo do najhujših možnih izidov zdravljenja. S sprejetjem zakonodajne obveze v EU, da je treba za vsa zdravila, razen opravičenih izjem, izdelati in poslati v pregled načrt pediatričnih preiskav, so za zdravila, registrirana po datumu začetka izvajanja Uredbe 1901/2006, na voljo tudi podatki o varnosti oz. toksičnih učinkih pri otrocih. Tovrstno preverjanje zahteva posebne vrste preiskav, ki pogosto zaradi primerljivosti vpliva na obdobje razvoja in odraščanja vključujejo tudi juvenilne živali. Da bi te živali uporabljali le takrat, ko je to treba in ko to pripomore k razrešitvi vprašanj oz. pomislekov glede varnosti, je Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini pri EMA tudi na podlagi Uredbe 1901/2006 sprejel smernice glede potreb za neklinična preskušanja zdravil za indikacije pri pediatrični populaciji na juvenilnih živalih. V bolj razširjeni in nadgrajeni obliki pa je ICH ob koncu leta 2020 sprejel novo smernico S11, ki podrobneje opisuje izvajanje nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih, poudarja celovit pristop vrednotenja podatkov, pri katerem je teža dokazov poglobitnega pomena, ter poudarja pomen 3R. Zagotovo je bil to zelo težko pričakovan dokument, ki harmonizira izvajanje tovrstnih preskušanj, odgovarja na številna prej neodgovorjena vprašanja, predvsem pa zagotavlja varno uporabo zdravil za pediatrično populacijo.

11 LITERATURA

1. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Development pharmacology-drug disposition, action and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003; 349: 1157–62. doi: 10.1056/NEJMra035092.
2. Albert Ferro. Paediatric prescribing: why children are not small adults. *British Journal of Clinical Pharmacology* 351–353. 2014. DOI: 10.1111/bcp.12540.
3. Faqi A. S. Juvenile Testing to Support Clinical Trials in Pediatric Population. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development, Second Edition*. 2017. Elsevier Inc.
4. Teigen A, Wang S., Thuy Truong B. et al. Off-label and unlicensed medicines to hospitalised children in Norway. *J Pharm Pharmacol*. 2017; 69(4): 432–438. doi: 10.1111/jphp.12581.
5. U. S. FOOD & DRUG Administration. Drug Research and Children [INTERNET]. 2016 Apr 05 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-information-consumers/drug-research-and-children>.
6. Jong GW. *Unlicensed and off-label drug use in children. Thesis, Erasmus University Rotterdam*. 2002.
7. European Union. Regulation (EC) no. 1902/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 amending Regulation 1901/2006 on medicinal products for pediatric use. *Official J Eur Union* L378/20 2006a, 1–2.

8. European medicines agency. COVID-19 vaccines: authorised [INTERNET]. [cited 2021 Oct 4]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorized>.
9. Baldrick P. The evolution of juvenile animal testing for small and large molecules. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 67(2): 125–35. doi: 10.1016/j.yrtph.2013.07.009.
10. Carleer J, Karres J. Juvenile animal studies and pediatric drug development: a European regulatory perspective. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2011; 92: 254–60. doi: 10.1002/bdrb.20310.
11. Zisowsky J, Krause A, Dingemanse J. Drug development for pediatric populations: regulatory aspects. *Pharmaceutics* 2010; 2(4): 364–88. doi: 10.3390/pharmaceutics2040364.
12. Gilles V, Patricia B, Chris C., Andrew P Will the revised class waiver list make it [INTERNET]? *The Lancet Oncology*. Volume 16, ISSUE 9, e425–e426, 2015 Sep 1 [cited 2020 Oct 4]. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(15\)00233-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(15)00233-8/fulltext).
13. European medicines agency. European Medicines Agency decision (P/0399/2019) [INTERNET]. 2019 Dec 4 [cited: 2020 Oct 10]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p/0399/2019-ema-decision-4-december-2019-agreement-paediatric-investigation-plan-granting-deferral-granting_en.pdf.
14. Baldrick P. Juvenile Animal Testing: Assessing Need and Use in the Drug Product Label. *Ther Innov Regul Sci* 2018; 52(5): 641–648. doi: 10.1177/2168479017750129.
15. European medicines agency. ICH guideline S11 on nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals – Step 5 [INTERNET]. 2020 Sep 26 [cited 2020 Oct 5]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-guideline-s11-nonclinical-safety-testing-support-development-paediatric-pharmaceuticals-step-5>.
16. GOV.UK. Annual Statistics of Scientific Procedures on Living [INTERNET]. 2021 Jul 15 [cited 2022 Jun 05]. Available from: <https://www.gov.uk/government/statistics/statistics-of-scientific-procedures-on-living-animals-great-britain-2020/annual-statistics-of-scientific-procedures-on-living-animals-great-britain-2020>.
17. Humane society international. UK animal experiment statistics indicate reluctance to embrace modern tools to advance British labs into the 21st century [INTERNET]. 2019 Jul 18 [cited: 2020 Oct 15]. Available from: <https://www.hsi.org/news-media/uk-animal-experiment-statistics-2018/>.
18. Comitee for human medicinal products. Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications. Ref. EMEA/CHMP/SWP/169215/2005 [INTERNET]. 2008 Aug 01 [cited 2020 Oct 20]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-need-non-clinical-testing-juvenile-animals-pharmaceuticals-paediatric-indications_en.pdf.
19. European medicines agency. ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals – Step 5 (EMA/CPMP/ICH/286/1995) [INTERNET]. EMA; 2009 Dec [cited 2020 Oct 20]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m3r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorisation_en.pdf.
20. Batchelor HK, Marriott JF. Paediatric pharmacokinetics: key considerations. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 79(3): 395–404. doi: 10.1111/bcp.12267.
21. Lodola A., Stadler J. *Pharmaceutical toxicology in practice: a guide for non-clinical development*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2011.