

附件 1

药物安全药理学研究技术指导原则

一、概述

安全药理学 (Safety Pharmacology) 主要是研究药物在治疗范围内或治疗范围以上的剂量时, 潜在的不期望出现的对生理功能的不良影响, 即观察药物对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统的影响。根据需要进行追加和/或补充的安全药理学研究。

追加的安全药理学研究 (Follow-up Safety Pharmacology Studies): 根据药物的药理作用、化学结构, 预期可能出现的不良反应。如果对已有的动物和/或临床试验结果产生怀疑, 可能影响人的安全性时, 应进行追加的安全药理学研究, 即对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统进行深入的研究。

补充的安全药理学研究 (Supplemental Safety Pharmacology Studies): 评价药物对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统以外的器官功能的影响, 包括对泌尿系统、自主神经系统、胃肠道系统和其他器官组织的研究。

安全药理学研究目的包括以下几个方面: 确定药物可能关系到人安全性的非期望药理作用; 评价药物在毒理学和/或临床研究中观察到的药物不良反应和/或病理生理作用; 研究所观察到的和/或推测的药物不良反应机制。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物。

二、基本原则

（一）试验方法

应根据药物的特点和临床使用的目的，合理地进行试验设计。选用适当的经验证的方法，包括科学而有效的新技术和新方法。某些安全药理学研究可根据药效反应的模型、药代动力学的特征、实验动物的种属等来选择试验方法。试验可采用体内和/或体外的方法。

（二）研究的阶段性

安全药理学研究贯穿在新药研究全过程中，可分阶段进行。在药物进入临床试验前，应完成对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统影响的核心组合（Core Battery）试验的研究。追加和/或补充的安全药理学研究视具体情况，可在申报临床前或生产前完成。

（三）执行 GLP 的要求

药物的安全性评价研究必须执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）。安全药理学研究原则上须执行 GLP。对一些难以满足 GLP 要求的特殊情况，也要保证适当的试验管理和数据保存。核心组合试验应执行 GLP。追加的或/和补充的安全药理学研究应尽可能地最大限度遵循 GLP 规范。

（四）受试物

中药、天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、

有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较长时，应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等，并符合试验要求。

在药物研发的过程中，若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

三、基本内容

（一）试验设计的基本要求

1. 生物材料

生物材料有以下几种：整体动物，离体器官及组织，体外培养的细胞、细胞片段、细胞器、受体、离子通道和酶等。整体动物常用小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、犬、非人灵长类等。动物选择应与试验方法相匹配，同时还应注意品系、性别及年龄等因素。生物材料选择应注意敏感性、

重现性和可行性，以及与人的相关性等因素。体内研究建议尽量采用清醒动物。如果使用麻醉动物，应注意麻醉药物的选择和麻醉深度的控制。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，并具有实验动物质量合格证明。

2. 样本量

试验组的组数及每组动物数的设定，应以能够科学合理地解释所获得的试验结果，恰当地反映有生物学意义的作用，并符合统计学要求为原则。小动物每组一般不少于 10 只，大动物每组一般不少于 6 只。动物一般雌雄各半。

3. 剂量

体内安全药理学试验要对所观察到的不良反应的剂量反应关系进行研究，如果可能也应对时间效应关系进行研究。一般情况下，安全药理学试验应设计 3 个剂量，产生不良反应的剂量应与动物产生主要药效学的剂量或人拟用的有效剂量进行比较。由于不同种属的动物对药效学反应的敏感性存在种属差异，因此安全药理学试验的剂量应包括或超过主要药效学的有效剂量或治疗范围。如果安全药理学研究中缺乏不良反应的结果，试验的最高剂量应设定为相似给药途径和给药时间的其他毒理试验中产生毒性反应的剂量。体外研究应确定受试物的浓度-效应关系。若无明显效应时，应对浓度选择的范围进行说明。

4. 对照

一般可选用溶媒和/或辅料进行阴性对照。如为了说明受试物的特性与已知药物的异同，也可选用阳性对照药。

5. 给药途径

整体动物试验，首先应考虑与临床拟用途径一致，可以考虑充分暴露的给药途径。对于在动物试验中难以实施的特殊的临床给药途径，可根据受试物的特点选择，并说明理由。

6. 给药次数

一般采用单次给药。但是若主要药效学研究表明该受试物在给药一段时间后才能起效，或者重复给药的非临床研究和/或临床研究结果出现令人关注的安全性问题时，应根据具体情况合理设计给药次数。

7. 观察时间

结合受试物的药效学和药代动力学特性、受试动物、临床研究方案等因素选择观察时间点和观察时间。

(二) 主要研究内容

1. 核心组合试验：安全药理学的核心组合试验的目的是研究受试物对重要生命功能的影响。中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统通常作为重要器官系统考虑，也就是核心组合试验要研究的内容。根据科学合理的原则，在某些情况下，可增加或减少部分试验内容，但应说明理由。

1.1 中枢神经系统

定性和定量评价给药后动物的运动功能、行为改变、协调功能、感觉/运动反射和体温的变化等，以确定药物对中枢神经系统的影响。可进行动物的功能组合试验。

1.2 心血管系统

测定给药前后血压（包括收缩压、舒张压和平均压等）、心电图（包括 QT 间期、PR 间期、QRS 波等）和心率等的变化。建议采用清醒动物进行心血管系统指标的测定（如遥测技术等）。

如药物从适应症、药理作用或化学结构上属于易于引起人类 QT 间期延长类的化合物，例如：抗精神病类药物、抗组织胺类药物、抗心律失常类药物和氟喹诺酮类药物等，应进行深入的试验研究，观察药物对 QT 间期的影响。对 QT 的研究见相关指导原则。

1.3 呼吸系统

测定给药前后动物的各种呼吸功能指标的变化，如呼吸频率、潮气量、呼吸深度等。

2. 追加和/或补充的安全药理学试验

当核心组合试验、临床试验、流行病学、体内外试验以及文献报道提示药物存在潜在的与人体安全性有关的不良反应时，应进行追加和/或补充的安全药理学研究。追加的安全药理学试验是除了核心组合试验外，反映受试物对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统的深入研究。追加的安全药理学试验根据已有的信息，具体情况具体分析选择追加的试验内容。补充的安全药理学试验是，出于对安全性的关注，在核心组合试验或重复给药毒性试验中未观察泌尿/肾脏系统、自主神经系统、胃肠系统等相关功能时，需要进行的研究。

2.1 追加的安全药理学试验

中枢神经系统：对行为、学习记忆、神经生化、视觉、听觉和/或电生理等指标的检测。

心血管系统：对心输出量、心肌收缩作用、血管阻力等指标的检测。

呼吸系统：对气道阻力、肺动脉压力、血气分析等指标的检测。

2.2 补充的安全药理学试验

泌尿/肾脏系统：观察药物对肾功能的影响，如对尿量、比重、渗透压、pH、电解质平衡、蛋白质、细胞和血生化（如尿素、肌酐、蛋白质）等指标的检测。

自主神经系统：观察药物对自主神经系统的影响，如与自主神经系统有关受体的结合，体内或体外对激动剂或拮抗剂的功能反应，对自主神经的直接刺激作用和对心血管反应、压力反射和心率等指标的检测。

胃肠系统：观察药物对胃肠系统的影响，如胃液分泌量和 pH、胃肠损伤、胆汁分泌、胃排空时间、体内转运时间、体外回肠收缩等指标的测定。

2.3 其他研究

在其他相关研究中，尚未研究药物对下列器官系统的作用但怀疑有影响的可能性时，如潜在的药物依赖性、骨骼肌、免疫和内分泌功能等的影响，则应考虑药物对这方面的作用，并作出相应的评价。

四、结果分析与评价

根据详细的试验记录，选用合适的统计方法，对数据进行定性和定量分析。应结合药效、毒理、药代以及其他研究资料进行综合评价，为临床研究设计提出建议。

五、参考文献

1. ICH. ICH Guidance for Industry ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. 2001.
2. ICH. ICH Guidance for Industry ICH S7B: Safety Pharmacology Studies for assessing the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by Human Pharmaceuticals. 2005.
3. 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物一般药理研究学技术研究技术指导原则, 2005.
4. 国家食品药品监督管理局. 化学药物一般药理研究学技术研究技术指导原则, 2004.

附件 2

药物单次给药毒性研究技术指导原则

一、概述

急性毒性（Acute toxicity）是指药物在单次或 24 小时内多次给予后一定时间内所产生的毒性反应^[1,2]。狭义的单次给药毒性研究（Single dose toxicity study）是考察单次给予受试物后所产生的急性毒性反应^[2]。本指导原则所指为广义的单次给药毒性研究，可采用单次或 24 小时内多次给药的方式获得药物急性毒性信息。

拟用于人体的药物通常需要进行单次给药毒性试验（见注释 1）。单次给药毒性试验对初步阐明药物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义。单次给药毒性试验所获得的信息对重复给药毒性试验的剂量设计和某些药物临床试验起始剂量的选择具有重要参考价值，并能提供一些与人类药物过量所致急性中毒相关的信息^[1]。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物。

二、基本原则

（一）试验管理

用于支持药品注册的单次给药毒性试验必须执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）。

（二）具体问题具体分析

单次给药毒性试验的设计，应该在对受试物认知的基础上，遵循“具体问题具体分析”的原则。

对于化学药，应根据受试物的结构特点、理化性质、同类化合物情况、适应症和用药人群特点、试验目的等选择合适的试验方法，设计适宜的试验方案，并结合其他药理毒理研究信息对试验结果进行全面的评价。

对于中药和天然药物，还应考虑到其与化学药的不同特点，试验时应根据各自不同的情况进行针对性设计。

（三）随机、对照、重复

单次给药毒性试验应符合动物试验的一般基本原则，即随机、对照和重复。

三、基本内容

（一）受试物

中药、天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较长时，应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等，并符合试验要求。

在药物研发的过程中，若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

（二）实验动物^[1、3、4]

1. 种属：不同种属的动物各有其特点，对同一受试物的反应可能会有所不同。从充分暴露受试物毒性的角度考虑，采用不同种属的动物进行试验可获得较为充分的安全性信息。因此，对于化学药，单次给药毒性试验应采用至少两种哺乳动物进行试验，一般应选用一种啮齿类动物和一种非啮齿类动物。若未采用非啮齿类动物进行试验，应阐明其合理性。对于中药、天然药物，根据具体情况，可选择啮齿类和/或非啮齿类动物进行试验[参见附录（二）]。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，并具有实验动物质量合格证明。

2. 性别：通常采用两种性别的动物进行试验，雌雄各半。若采用单性别动物进行试验，应阐明其合理性。

3. 年龄：通常采用健康成年动物进行试验。如果受试物拟用于或可能用于儿童，必要时应采用幼年动物进行试验。

4. 动物数：应根据动物种属和研究目的确定所需的动物数。动物数应符合试验方法及结果分析评价的需要。

5. 体重：试验中的每批动物初始给药时的体重差异不宜过大，啮齿类动物初始给药时体重不应超过或低于平均体重的 20%。

（三）给药途径

给药途径不同，受试物的吸收速度、吸收率和暴露量会有所不同。通常情况下给药途径应至少包括临床拟用途径。如不采用临床拟用途径，应说明理由。

（四）试验方法与给药剂量^[1、3、4]

单次给药毒性试验的重点在于观察动物出现的毒性反应。单次给药毒性试验的试验方法较多，常用的试验方法有近似致死量法、最大给药量法、最大耐受量法、固定剂量法、上下法（序贯法）、累积剂量法（金字塔法）、半数致死量法等。应根据受试物的特点选择合适的方法，根据不同的试验方法选择合适的剂量（注释 2）。

原则上，给药剂量应包括从未见毒性反应的剂量到出现严重毒性反应的剂量，或达到最大给药量。

不同动物和给药途径下的最大给药容量可参考相关文献及根据实际情况来确定。

根据所选择的试验方法，必要时应设置空白和/或溶媒（辅料）对照组。

考虑到胃内容物会影响受试物的给药容量，而啮齿类动物禁食时间的长短会影响到受试物的肠道内吸收和药物代谢酶活性，从而影响毒性的暴露。因此，动物经口给药前一般应进行一段时间的禁食，不禁水。

（五）观察时间与指标^[1、3、4、5]

给药后，一般连续观察至少 14 天，观察的间隔和频率应适当，以便能观察到毒性反应的出现时间及恢复时间、动物死亡时间等。如果毒性反应出现较慢或恢复较慢，应适当延长观察时间。

观察指标包括临床症状（如动物外观、行为、饮食、对刺激的反应、分泌物、排泄物等）、死亡情况（死亡时间、濒死前反应等）、体重变化（给药前、观察期结束时各称重一次，观察期间可多次称重，动物死亡或濒死时应称重）等。记录所有的死亡情况，出现的症状以及症状的起始时间、严重程度、持续时间，体重变化等。

所有的试验动物应进行大体解剖。试验过程中因濒死而安乐死的动物、死亡动物应及时进行大体解剖，其他动物在观察期结束后安乐死并进行大体解剖。当组织器官出现体积、颜色、质地等改变时，应进行组织病理学检查。

在一些情况下，为获得更为全面的急性毒性信息，可设计多个剂量组，观察更多的指标，如血液学指标、血液生化学指标、组织病理学检查等，以更好地确定毒性靶器官或剂量反应关系^[2、5]。

四、结果分析与评价

(一) 根据所观察到的各种反应出现的时间、持续时间及严重程度等, 分析各种反应在不同剂量时的发生率、严重程度。对观察结果进行归纳分析, 判断每种反应的剂量—反应及时间—反应关系。

(二) 判断出现的各种反应可能涉及的组织、器官或系统[参考附录(一)]等。

(三) 根据大体解剖中肉眼可见的病变和组织病理学检查的结果, 初步判断可能的毒性靶器官。应出具完整的组织病理学检查报告, 检查报告应详细描述, 尤其是有异常变化的组织。对于有异常变化者, 应附有相应的组织病理学照片。

(四) 说明所使用的计算方法和统计学方法, 必要时提供所选用方法合理性的依据。

(五) 根据各种反应在不同剂量下出现的时间、发生率、剂量-反应关系、不同种属动物及实验室的历史背景数据、病理学检查结果以及同类药物的特点, 判断所出现的反应与药物的相关性。判断受试物引起的毒性反应性质、严重程度、可恢复性以及安全范围; 根据毒性可能涉及的部位, 综合大体解剖和组织病理学检查的结果, 初步判断毒性靶器官。

单次给药毒性试验的结果可作为后续毒理试验剂量选择的参考, 也可提示一些后续毒性试验需要重点观察的指标。

五、名词解释

最大给药量 (Maximal feasible dose, MFD): 指动物单次或 24 小时内多次 (2~3 次) 给药所采用的最大给药剂量。

最大耐受量 (Maximal tolerance dose, MTD): 是指动物能够耐受的而不引起动物死亡的最高剂量。

半数致死量 (Median lethal dose, LD₅₀): 预期引起 50% 动物死亡的剂量, 该值是经统计学处理所推算出的结果。

六、参考文献

1. CDER, FDA. Guidance for industry: single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals (Final).1996.
2. CHMP, EMA. Questions and answers on the withdrawal of the “Note for guidance on single dose toxicity”.2010.
3. Cordier A. Single dose toxicity: Industry perspectives. In: P.F. D’Arcy and D.W.G. Harron edited, Proceedings of the First International Conference on Harmonization. Brussels: 1991,189-191.
4. Outcome - Single dose toxicity. In: P.F. D’Arcy and D.W.G. Harron edited, Proceedings of the First International Conference on Harmonization. Brussels: 1991, 184.
5. ICH M3(R2) .Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals.2009.

6. BlazkaME, Hayes A W. Acute toxicity and eye irritancy. In: Hayes A W edited, Principles and methods of toxicology. Fifth edition, 2007:1132-1150.

七、注释

注释 1: 急性毒性的充分信息也可从其他来源获得^[2, 5], 需要说明的是, 这些信息应是从执行《药物非临床研究质量管理规范》(GLP) 的试验中获得。

注释 2: 试验方法不同, 所采用的给药剂量不同。可参考相关的文献进行试验设计。但应注意, 由于中药、天然药物的预期临床用药剂量通常较大, 因此单次给药毒性试验方法中所规定的剂量限度(如上下法中的 2000mg/kg 或 5000mg/kg 的剂量限度)仅适用于化学药, 中药、天然药物的剂量设计应综合考虑多方面因素进行确定。

由于大多数中药、天然药物的急性毒性可能相对较低, 中药、天然药物常常采用最大给药量(或最大耐受量法)进行急性毒性研究。

八、附录

(一) 一般观察与指征^[6]

以下列出了一些常见的观察指征及其可能涉及的组织、器官和系统。单次给药毒性试验中, 可能需要对该表格中列出的全部或部分指征进行观察。该表格仅作为结果分析评价的参考, 其他科学、合理的分析均是可以接受的。

观察		指征	可能涉及的组织、器官或系统
I. 鼻孔呼吸阻塞, 呼吸频率和深度改变, 体表颜色改变	A	呼吸困难: 呼吸困难或费力, 喘息, 通常呼吸频率减慢	
		1. 腹式呼吸: 膈膜呼吸, 吸气时膈膜向腹部偏移	CNS 呼吸中枢, 肋间肌麻痹, 胆碱能神经麻痹
		2. 喘息: 吸气很困难, 伴随有喘息声	CNS 呼吸中枢, 肺水肿, 呼吸道分泌物蓄积, 胆碱能功能增强
	B	呼吸暂停: 用力呼吸后出现短暂的呼吸停止	CNS 呼吸中枢, 肺心功能不全
	C	紫绀: 尾部、口和足垫呈现青紫色	肺心功能不全, 肺水肿
	D	呼吸急促: 呼吸快而浅	呼吸中枢刺激, 肺心功能不全
E	鼻分泌物: 红色或无色	肺水肿, 出血	
II. 运动功能: 运动频率和特征的改变	A	自发活动、探究、梳理、运动增加或减少	躯体运动, CNS
	B	嗜睡: 动物嗜睡, 但可被针刺唤醒而恢复正常活动	CNS 睡眠中枢
	C	正位反射(翻正反射)消失: 动物体处于异常体位时所产生的恢复正常体位的反射消失	CNS, 感觉, 神经肌肉
	D	麻痹: 正位反射和疼痛反应消失	CNS, 感觉
	E	僵住: 保持原姿势不变	CNS, 感觉, 神经肌肉, 自主神经
	F	共济失调: 动物行走时无法控制和协调运动, 但无痉挛、局部麻痹、轻瘫或僵直	CNS, 感觉, 自主神经
	G	异常运动: 痉挛, 足尖步态, 踏步, 忙碌, 低伏	CNS, 感觉, 神经肌肉
	H	俯卧: 不移动, 腹部贴地	CNS, 感觉, 神经肌肉
	I	震颤: 包括四肢和全身的颤抖和震颤	神经肌肉, CNS
	J	肌束震颤: 包括背部、肩部、后肢和足趾肌肉的运动	神经肌肉, CNS, 自主神经
III. 惊厥(癫痫发作): 随意肌明显的自主收缩或痉挛性收缩	A	阵挛性惊厥: 肌肉收缩和松弛交替性痉挛	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	B	强直性惊厥: 肌肉持续性收缩, 后肢僵硬性伸展	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	C	强直性-阵挛性惊厥: 两种惊厥类型交替出现	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	D	窒息性惊厥: 通常是阵挛性惊厥并伴有喘息和紫绀	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	E	角弓反张: 背部弓起、头向背部抬起的强直性痉挛	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经

观察		指征	可能涉及的组织、器官或系统
IV. 反射	A	角膜性眼睑闭合反射: 接触角膜导致眼睑闭合	感觉, 神经肌肉
	B	基本条件反射: 轻轻敲击耳内表面, 引起外耳抽搐	感觉, 神经肌肉
	C	正位反射: 翻正反射的能力	CNS, 感觉, 神经肌肉
	D	牵张反射: 后肢被牵拉至从某一表面边缘掉下时缩回的能力	感觉, 神经肌肉
	E	对光反射: 瞳孔反射; 见光瞳孔收缩	感觉, 神经肌肉, 自主神经
	F	惊跳反射: 对外部刺激(如触摸、噪声)的反应	感觉, 神经肌肉
V. 眼检指征	A	流泪: 眼泪过多, 泪液清澈或有色	自主神经
	B	缩瞳: 无论有无光线, 瞳孔缩小	自主神经
	C	散瞳: 无论有无光线, 瞳孔扩大	自主神经
	D	眼球突出: 眼眶内眼球异常突出	自主神经
	E	上睑下垂: 上睑下垂, 针刺后不能恢复正常	自主神经
	F	血泪症: 眼泪呈红色	自主神经, 出血, 感染
	G	瞬膜松弛	自主神经
	H	角膜浑浊, 虹膜炎, 结膜炎	眼睛刺激
VI. 心血管指征	A	心动过缓: 心率减慢	自主神经, 肺心功能不全
	B	心动过速: 心率加快	自主神经, 肺心功能不全
	C	血管舒张: 皮肤、尾、舌、耳、足垫、结膜、阴囊发红, 体热	自主神经、CNS、心输出量增加, 环境温度高
	D	血管收缩: 皮肤苍白, 体凉	自主神经、CNS、心输出量降低, 环境温度低
	E	心律不齐: 心律异常	CNS、自主神经、肺心功能不全, 心肌梗塞
VII. 流涎	A	唾液分泌过多: 口周毛发潮湿	自主神经
VIII. 竖毛	A	毛囊竖毛组织收缩导致毛发蓬乱	自主神经
IX. 痛觉缺失	A	对痛觉刺激(如热板)反应性降低	感觉, CNS
X. 肌张力	A	张力低下: 肌张力全身性降低	自主神经
	B	张力过高: 肌张力全身性增高	自主神经
XI. 胃肠指征			
排便(粪)	A	干硬固体, 干燥, 量少	自主神经, 便秘, 胃肠动力
	B	体液丢失, 水样便	自主神经, 腹泻, 胃肠动力
呕吐	A	呕吐或干呕	感觉, CNS, 自主神经(大鼠无呕吐)
多尿	A	红色尿	肾脏损伤
	B	尿失禁	自主感觉神经
XII. 皮肤	A	水肿: 液体充盈组织所致肿胀	刺激性, 肾功能衰竭, 组织损伤, 长时间静止不动
	B	红斑: 皮肤发红	刺激性, 炎症, 过敏

（二）不同情况的中药、天然药物单次给药毒性试验的要求

由于中药、天然药物的特殊性，在具体进行试验时可参照以下要求进行；如不按以下要求进行，应充分说明理由。

1. 未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效成分及其制剂，新发现的药材及其制剂，新的中药材代用品、药材新的药用部位及其制剂，未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效部位制成的制剂，未在国内上市销售的中药、天然药物注射剂。

以上情况，由于其物质基础较传统中药发生了明显改变，或应用经验较少，一般采用啮齿类和非啮齿类两种动物，全面考察受试物的急性毒性反应情况。如不按以上要求进行，应说明理由。

2. 未在国内上市销售的非注射给药的中药、天然药物复方制剂。

如该复方制剂处方组成符合中医药理论，有一定的临床应用经验，一般情况下，可采用一种动物、按临床拟用途径进行急性毒性反应的观察。

如该复方制剂为天然药物复方制剂，建议采用啮齿类和非啮齿类两种动物，按临床拟用途径进行急性毒性反应的观察；如不按以上要求进行，应阐明其合理性。

如以上制剂处方中含有天然药物、有效成分或化学药品，则应当对上述药用物质进行急性毒性的相互作用研究。

3. 改变国内已上市销售中药、天然药物给药途径（不包括由非注射剂改为注射剂）的制剂。

可仅采用一种动物，比较改变前后两种不同给药途径的急性毒性反应。

4. 改变国内已上市销售药品剂型或改变生产工艺但不改变给药途径的中药、天然药物复方制剂。

如生产工艺的改变会引起物质基础的明显改变，或对药物的吸收、利用可能产生明显影响，建议采用一种动物，按临床拟用途径比较改变前后的急性毒性反应。

5. 增加新的适应症或者功能主治的品种。

如需延长用药周期或增加剂量者，应结合原有毒理学资料及处方组成等情况确定是否还需要进行单次给药毒性试验以及相应的试验内容。

附件 3

药物重复给药毒性试验技术指导原则

一、概述

重复给药毒性试验是描述动物重复接受受试物后的毒性特征，它是非临床安全性评价的重要内容。重复给药毒性试验可以：①预测受试物可能引起的临床不良反应，包括不良反应的性质、程度、量效和时效关系、以及可逆性等；②判断受试物重复给药的毒性靶器官或靶组织；③如果可能，确定未观察到临床不良反应的剂量水平（No Observed Adverse Effect Level, NOAEL）；④推测第一次临床试验（First in Human, FIH）的起始剂量，为后续临床试验提供安全剂量范围；⑤为临床不良反应监测及防治提供参考。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物。

二、基本原则

药物安全性评价试验必须执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP），药物重复给药毒性试验是药物研发体系的有机组成部分，试验设计要重视与其他药理毒理试验设计和研究结果的关联性，要关注同类药物临床使用情况、临床适应症和用药人群、临床用药方案，还要结合受试物理化性质和作用特点，使得重复给药毒性试验结果与其他药理毒理试验研究互为说明、补充或/和印证。

三、基本内容

（一）受试物

中药、天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后

的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较长时，应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等，并符合试验要求。

在药物研发的过程中，若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性试验。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

（二）实验动物

重复给药毒性试验通常采用两种实验动物，一种为啮齿类，另一种为非啮齿类。理想的动物应具有以下特点：①对受试物的代谢与人体相近；②对受试物敏感；③已有大量历史对照数据，来源、品系、遗传背景清楚。在重复给药毒性试验前应采用合适的试验方法对实验动物种属或品系进行选择。通常，啮齿类动物首选大鼠、非啮齿类动物首选Beagle犬，特殊情况下可选用其他种属或品系动物进行重复给药毒性试验，必要时选用疾病模型动物进行试验。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，具有实验动物质量合格证明。

一般选择正常、健康、性成熟动物，同性别体重差异应在平均体重的20%之内。

应根据试验期限和临床拟用人群确定动物年龄，一般大鼠为6~9周龄，Beagle犬6~12月龄，猴3~5岁，动物年龄应尽量接近，应注明开始给药时动物年龄。

每个剂量组动物数，啮齿类一般不少于15只/性别（主试验组10只，恢复组5只），非啮齿类一般不少于5只/性别（主试验组3只，恢复组2只）。

（三）给药方案

1. 给药剂量：重复给药毒性试验原则上至少应设低、中、高 3个剂量组，以及1个溶媒（或辅料）对照组，必要时设立空白对照组和/或阳性对照组；高剂量原则上使动物产生明显的毒性反应，低剂量原则上相当或高于动物药效剂量或临床使用剂量的等效剂量，中剂量应结合毒性作用机制和特点在高剂量和低剂量之间设立，以考察毒性的剂量-反应关系。

2. 给药途径：原则上应与临床拟用途径一致，如不一致则应说明理由。

3. 给药频率：原则上重复给药毒性试验中动物应每天给药，特殊类型的受试物就其毒性特点和临床给药方案等原因，可根据具体药物的特点设计给药频率。

4. 试验期限：建议分阶段进行重复给药毒性试验以支持不同期限的临床试验。试验期限的选定可以根据拟定的临床疗程、适应症、用药人群等进行设计。一般重复给药毒性试验的试验期限与所支持的临床试验及上市申请的关系详见附录（一）。

（四）检测指标

重复给药毒性试验应检测指标详见附录（二）。此外，还应结合受试物的特点及其他试验中已观察到的改变或背景信息（如关于处方组成成分毒性的文献报道等），在不影响正常毒性观察和检测的前提下增加合理的指标。实验动物相关指标的历史背景数据在重复给药毒性试验中具有重要的参考意义。

在结束动物安乐死时进行一次全面检测；当试验期限较长时，应根据受试物的特点及相关信息选择合适的时间点进行阶段性检测；试验期间对濒死或死亡动物应及时采集标本进行检测，分析濒死或死亡的原因；恢复期结束时进行一次全面的检测。

给药前应对动物进行适应性饲养，啮齿类动物应不少于5天，非啮齿类动物不少于2周。在适应性饲养时，对实验动物进行外观体征、行为活动、摄食情况和体重检查，非啮齿类动物至少应进行2次体温、血液学、血液生化学和至少1次心电图检测。

给药期间，根据试验期限的长短和受试物的特点确定检测时间和检测次数。原则上应尽早发现毒性反应，并反映出观测指标或参数变化与试验期限的关系。

给药结束，对主试验组动物进行系统的大体解剖，称重主要脏器并计算脏器系数；进行组织病理学检查并出具完整的病理学检查报告，如发现有异常变化，应附有相应的组织病理学照片。非啮齿类动物对照组和各给药组主要脏器组织均应进行组织病理学检查；啮齿类动物对照组、高剂量组、尸检异常动物应进行详细检查，如高剂量组动物某一组织发生病理改变，需要对其他剂量组动物的相同组织进行组织病理学检查；通常需要制备骨髓涂片，以便当受试物可能对动物造血系统有影响时进行骨髓检查。

给药结束后，继续观察恢复期动物，以了解毒性反应的可逆性和可能出现的迟发毒性；应根据受试物代谢动力学特点、靶器官毒性反应和恢复情况确定恢复期的长短，一般情况下应不少于4周。

（五）伴随毒代动力学

重复给药毒性试验应伴随进行药物毒代动力学试验，具体内容参照相应指导原则。

四、结果分析与评价

重复给药毒性试验的最终目的在于预测人体可能出现的毒性反应。只有通过对试验结果的科学分析和全面评价才能够清楚描述动物的毒性反应，并推断其与人体的相关性。重复给药毒性试验结果的分析与评价是重复给药毒性试验的必要组成部分。

（一）试验结果的分析

分析重复给药毒性试验结果，判断动物是否发生毒性反应及毒性靶器官，描述毒性反应的性质和程度（包括毒性反应的起始时间、程度、变化规律和消除时间），如果有动物死亡应分析死亡原因，确定安全范围，并探讨可能的毒性作用机制。

1. 正确理解试验数据的意义

在对重复给药毒性试验结果进行分析时，应正确理解均值数据和个体数据的意义。啮齿类动物重复给药毒性试验中组均值的意义通常大于个体动物数据的意义，实验室历史背景数据和文献数据可以为结果的分析提供参考；非啮齿类动物单个动物的试验数据往往具有重要的毒理学意义，是试验动物数量较少、个体差异较大的原因。此外，非啮齿类动物试验结果必须与给药前数据、对照组数据和实验室历史背景数据进行多重比较，要考虑文献数据参考价值有局限性。在分析重复给药毒性试验结果时应综合考虑数据的统计学意义和生物学意义，正确利用统计学

假设检验有助于确定试验结果的生物学意义，要考虑具有统计学意义并不一定代表具有生物学意义；在判断生物学意义时要考虑参数变化的剂量-反应关系、其他关联参数的改变、与历史背景数据的比较等因素；分析试验结果时，须对出现的异常数据应判断是否由受试物毒性引起并给予科学解释。

2. 正确判断毒性反应

给药组和对照组之间检测结果的差异可能来源于受试物有关的毒性、动物对药物的适应性改变或正常的生理波动，也可能源于试验操作失误和动物应激。在分析试验结果时，应关注参数变化的剂量-反应关系、组内动物的参数变化幅度和性别差异，同时综合考虑多项毒理学指标的检测结果，分析其中的关联和受试物作用机制，以正确判断药物的毒性反应。单个参数的变化往往并不足以判断化合物是否引起毒性反应，可能需要进一步进行相关的试验。此外，毒代动力学试验可以为毒性反应和毒性靶器官的判断提供重要的参考依据。

（二）动物毒性反应对于临床试验的意义

将重复给药毒性试验结果外推至人体时，不可避免地会涉及到受试物在动物和人体内毒性反应之间的差异。首先，不同物种、同物种不同种属或个体之间对于某一受试物的毒性反应可能存在差异；其次，由于在重复给药毒性试验中通常采用较高的给药剂量，受试物可能在动物体内呈非线性动力学代谢过程，从而导致与人体无关的毒性反应；另外，重复给药毒性试验难以预测一些在人体中发生率较低的毒性反应或仅在小部分人群中出现的特异质反应；同时有些毒性反应目前在动物中难以观察，如头痛、头昏、头晕、皮肤搔痒、视物模糊等。鉴于以上原因，动物重复给药毒性试验的结果不一定完全再现于人体临床试验。如果没有试验或文献依据证明受试物对动物的毒性反应与人体无关，在进行

药物评价时必须首先假设人最为敏感，重复给药毒性试验中动物的毒性反应将会在临床试验中出现。进行深入的作用机制研究将有助于判断动物和人体毒性反应的相关性。

（三）综合评价

重复给药毒性试验是药物非临床安全性研究的有机组成部分，是药物非临床毒理学研究中综合性最强、获得信息最多和对临床指导意义最大的一项毒理学试验。对其结果进行评价时，应结合受试物的药学特点，药效学、药代动力学和其他毒理学的试验结果，以及已取得的临床试验结果，进行综合评价。对于重复给药毒性试验结果的评价最终应落实到受试物的临床不良反应、临床毒性靶器官或靶组织、安全范围、临床需重点检测的指标，以及必要的临床监护或解救措施。

五、参考文献

- 1.化学药物长期毒性试验技术指导原则. 国家药品监督管理局, 2005.3.
- 2.中药、天然药物长期毒性试验技术指导原则. 国家药品监督管理局, 2005.3.
- 3.周宗灿. 毒理学基础. 第二版. 北京医科大学出版社, 2000.
- 4.秦伯益. 新药评价概论. 第二版 人民卫生出版社, 1998.
- 5.Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals , ICH /M3(R2) 2009.6.
- 6.Guideline on repeated dose toxicity, EMA 2010.3.
- 7.Redbook 2000 IV.C, FDA 2003, 2007.

8.Note for guidance on toxicokinetics: The assessment of systemic exposure in toxicity studies, ICH /S3A 2007.

六、注释

（一）试验期限的考虑

试验期限应与拟开展的临床试验期限和上市要求相匹配；通过较短试验期限的毒性试验获得的信息，可以为较长试验期限的毒性试验设计提供给药剂量、给药频率、观察指标等方面的参考；同时，临床试验中获得的信息有助于设计较长试验期限的动物毒性试验方案，降低药物开发的风险。以不同试验期限的重复给药毒性试验支持不同用药期限的临床试验及上市评价时，重复给药毒性试验内容都应完整、规范，结果分析评价强调客观性、注重科学性。

拟试验的临床适应症如有若干项，应按最长疗程的临床适应症来确定重复给药毒性试验的试验期限。

（二）剂量设计的考虑

剂量设计应考虑之前进行的各项试验所评价的终点、受试物的理化性质和生物利用度等；局部给药应保证充分的接触时间。高剂量应出现明显毒性反应，或达到最大给药量（Maximum Feasible Dose, MFD），或系统暴露量达到临床系统暴露量的50倍（基于AUC）。如需要在试验中途改变给药剂量，应说明剂量调整理由，完整记录剂量调整过程。

（三）不同情况中药、天然药物的试验要求

考虑到中药、天然药物各类药物处方来源、立题依据等差别，在具体进行试验时可参照以下要求进行。这些要求仅是一般要求，应遵循新药开发的客观规律，具体试验结合受试物特点考虑需开展的试验，进行个性化的设计。

1. 未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效成分及其制剂，新发现的药材及其制剂，新的中药材代用品、药材新的药用部位及其制剂，未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效部位制成的制剂，未在国内上市销售的中药、天然药物注射剂。以上情况，由于其物质基础较传统中药发生了明显改变，或应用经验较少，为全面考察受试物的重复给药毒性反应情况，应采用啮齿类和非啮齿类两种动物进行重复给药毒性试验。

2. 未在国内上市销售的由中药、天然药物组成的非注射给药的复方制剂可先进行一种动物（啮齿类）的重复给药毒性试验，当发现有明显毒性时，为进一步研究毒性情况，再采用第二种动物（非啮齿类）进行试验。若该类处方中含有毒性药材[见注释（四）]、无法定标准药材或有十八反、十九畏等配伍禁忌时，则应进行两种动物（啮齿类和非啮齿类）的重复给药毒性试验。天然药物组成的非注射给药的复方制剂临床试验前采用啮齿类和非啮齿类两种动物进行重复给药毒性试验。

3. 改变国内已上市销售药品给药途径（不包括由非注射剂改为注射剂）的制剂、不改变给药途径的非注射给药改剂型制剂和改工艺制剂，建议增设一个原给药途径、原剂型或原工艺的高剂量对照组，先进行一种动物（啮齿类）的重复给药毒性试验。如发现与原给药途径、原剂型或原工艺制剂不同的明显毒性反应或更严重的毒性反应，应进行另一种动物（非啮齿类）的重复给药毒性试验。

4. 增加新的适应症或者功能主治的品种如需延长用药期限或增加剂量者，应结合原品种的申报资料及处方组成的情况，确定是否需进行重复给药毒性试验。

（四）中药毒性药材品种

毒性药材：系指收入国务院《医疗用毒性药品管理办法》的中药品种。即：砒石、砒霜、水银、生马钱子、生川乌、生草乌、生白附子、

生附子、生半夏、生南星、生巴豆、斑蝥、青娘虫、红娘虫、生甘遂、生狼毒、生藤黄、生千金子、生天仙子、闹羊花、雪上一枝蒿、红升丹、白降丹、蟾酥、洋金花、红粉、轻粉、雄黄。

另外，凡在近年来发现的有毒性作用的药材（原材料）或在复方中含有明显有毒组分的，均按毒性药材处理。

七、附录

（一）试验期限

支持药物临床试验

最长临床试验期限	重复给药毒性试验的最短期限	
	啮齿类动物	非啮齿类动物
≤2周	2周	2周
2周~6个月	同临床试验	同临床试验
>6个月	6个月	9个月 ^{1、2}

支持药物上市申请

临床拟用期限	啮齿类动物	非啮齿类动物
≤2周	1个月	1个月
2周~1个月	3个月	3个月
1个月~3个月	6个月	6个月
>3个月	6个月	9个月 ^{1、2}

注：

1. 非啮齿类动物不超过6个月期限的试验可接受情况：
当免疫原性或耐受性问题使更长期限的试验难以进行时；

重复、短期用药（即便临床试验期限 6 个月以上）的疾病，如偏头痛、勃起障碍、单纯性疱疹等的反复间歇给药时；

拟用于危及生命的疾病（如进展性疾病、辅助使用的肿瘤化疗药）时。

2. 如果儿童为主要拟用药人群，而已有毒理学或药理学研究结果提示可能发生发育毒性，应考虑在幼年动物上进行长期毒性试验。该试验应采用合适年龄和种系的动物，试验观察指标应针对发育方面的毒性，试验期限犬 12 个月、大鼠 6 个月。12 个月的犬试验期限应涵盖其发育的全过程。这些幼年动物的长期试验可用于替代标准的长期毒性试验和单独的幼年动物试验。

（二）检测指标

项目类别	指标
1.临床观察	外观、体征、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便性状、给药局部反应、死亡情况等。
2.摄食量、体重、眼科检查	
3.体温和心电图检测（非啮齿动物）	
4.血液学检测	红细胞计数、血红蛋白、红细胞容积、平均红细胞容积、平均红细胞血红蛋白、平均红细胞血红蛋白浓度、网织红细胞计数、白细胞计数及其分类、血小板计数、凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间等。
5.血液生化学检测	天门冬氨酸氨基转换酶、丙氨酸氨基转换酶、碱性磷酸酶、肌酸磷酸激酶、尿素氮(尿素)、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、 γ -谷氨酰转移酶、钾离子浓度、氯离子浓度、钠离子浓度。

6.尿液观察和分析		尿液外观、比重、pH值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、潜血、白细胞。
7. 组织病理学检查的脏器组织	(1)需称重并计算脏器系数的器官	脑、心脏、肝脏、肾脏、肾上腺、胸腺、脾脏、睾丸、附睾、卵巢、子宫、甲状腺（含甲状旁腺） ¹ 。
	(2)需进行组织病理学检查的组织或器官	肾上腺、主动脉、骨（股骨）、骨髓（胸骨）、脑（至少3个水平）、盲肠、结肠、子宫和子宫颈、十二指肠、附睾、食管、眼、胆囊（如果有）、哈氏腺（如果有）、心脏、回肠、空肠、肾脏、肝脏、肺脏（附主支气管）、淋巴结（一个与给药途径相关，另一个在较远距离）、乳腺、鼻甲 ² 、卵巢和输卵管、胰腺、垂体、前列腺、直肠、唾液腺、坐骨神经、精囊（如果有）、骨骼肌、皮肤、脊髓（3个部位：颈椎、中段胸椎、腰椎）、脾脏、胃、睾丸、胸腺（或胸腺区域）、甲状腺（含甲状旁腺）、气管、膀胱、阴道、所有大体观察到异常的组织、组织肿块和给药部位。

注：

1. 仅在非啮齿类动物称重。
2. 针对吸入给药的给药制剂。

药物刺激性、过敏性和溶血性 研究技术指导原则

一、概述

刺激性、过敏性、溶血性是指药物制剂经皮肤、粘膜、腔道、血管等非口服途径给药，对用药局部产生的毒性（如刺激性和局部过敏性等）和/或对全身产生的毒性（如全身过敏性和溶血性等），为临床前安全性评价的组成部分。

药物的原形及其代谢物、辅料、有关物质及理化性质（如pH值、渗透压等）均有可能引起刺激性和/或过敏性和/或溶血性的发生，因此药物在临床应用前应研究其制剂在给药部位使用后引起的局部和/或全身毒性，以提示临床应用时可能出现的毒性反应、毒性靶器官、安全范围。

本指导原则适用于中药、天然药物、化学药物。

二、基本原则

（一）试验管理

根据《药品注册管理办法》，药物刺激性、过敏性和溶血性研究必须执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）。

（二）随机、对照、重复

试验设计应遵循随机、对照、重复的原则。

（三）整体性、综合性原则

应根据受试物特点，充分考虑和结合药理学、药效学、其他毒理学及拟临床应用情况等综合评价，体现整体性、综合性的原则。

(四) 具体问题具体分析

应在遵循安全性评价普遍规律的基础上，具体问题具体分析，结合受试物的特点，在阐明其研究方法或技术科学、合理的前提下进行规范性试验，对试验结果进行全面分析评价。

三、基本内容

(一) 受试物和实验动物

1. 受试物

中药、天然药物：受试物应能充分代表临床试验样品或上市药品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，并附有研制单位的自检报告。试验中所用辅料、溶媒等应标明批号、规格和生产单位，并符合试验要求。

在药品研发的过程中，若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

2. 实验动物

动物应符合国家有关规定的等级要求，并具有实验动物质量合格证。动物种属的选择根据观察指标和模型合理性确定，如刺激性试验应选择与人类皮肤、粘膜等反应比较相近的动物，如兔、小型猪等。

（二）刺激性试验

刺激性是指非口服给药制剂给药后对给药部位产生的可逆性炎症反应，若给药部位产生了不可逆性的组织损伤则称为腐蚀性。刺激性试验是观察动物的血管、肌肉、皮肤、粘膜等部位接触受试物后是否引起红肿、充血、渗出、变性或坏死等局部反应。

1. 给药部位

一般应选择与临床给药相似的部位，并观察对可能接触到受试物的周围组织的影响。

2. 给药途径

一般应与临床用药途径一致，否则应加以说明。

3. 对照组

以溶媒和/或赋形剂作为阴性对照，必要时采用已上市制剂作对照。

4. 给药浓度、剂量与体积

可选择几种不同浓度，至少应包括临床拟用最高浓度。如果技术上难以达到临床拟用最高浓度，如皮肤刺激性试验，在给药面积不变的情况下，可通过改变给药频次进行剂量调整，而不应通过增加厚度来达到增加给药量的目的。

设计给药浓度、剂量与体积时，应根据临床用药情况，并考虑受试动物给药部位的解剖和生理特点，保证受试物在给药部位的有效暴露。

5. 给药频率与周期

应根据临床用药情况，一般给药周期最长不超过4周。建议进行恢复期观察，同时评价给药局部及周围组织毒性反应的可逆性。

6. 观察指标

6.1 肉眼观察 应详细描述局部反应，包括红斑、水肿、充血程度及范围，

计分表示。同时观察动物的一般状态、行为、体征等。

6.2 组织病理学检查 应详细描述给药部位的病理变化，并半定量分析、判断。提供相应的组织病理学照片。

7. 试验方法

具体可参考附录中常用方法和相关文献。

8. 统计方法

根据实验模型和试验方法选择合适的统计方法。

(三) 过敏性试验

过敏性又称超敏反应，指机体受同一抗原再刺激后产生的一种表现为组织损伤或生理功能紊乱的特异性免疫反应。过敏性试验是观察动物接触受试物后的全身或局部过敏反应。

1. 试验方法

进行何种过敏性试验应根据药物特点、临床适应症、给药方式、过敏反应发生机制、影响因素等确定。

通常局部给药发挥全身作用的药物（如注射剂和透皮吸收剂等）需考察 I 型过敏反应，如注射剂需进行主动全身过敏试验（Active Systemic Anaphylaxis, ASA）和被动皮肤过敏试验（Passive Cutaneous Anaphylaxis, PCA），透皮吸收剂需进行主动皮肤过敏试验（Active Cutaneous Anaphylaxis, ACA）。吸入途径药物应采用豚鼠吸入诱导和刺激试验。粘膜给药应结合受试物的特点参照经皮给药过敏性试验方法进行。如受试物的化学结构与文献报道产生其他过敏反应的化合物相同或相似者建议考虑采取适当的试验方法以考察其是否能引起其他过敏反应（如光过敏性反应等）。II 和 III 型过敏反应可结合在重复给药毒性试验中观察，如症状、体征、血液系统、免疫系统及相关的病理组织学改变等。

经皮给药制剂（包括透皮剂）应进行 IV 型过敏反应试验，包括豚鼠最大化试验（Guinea-Pig Maximization Test, GPMT）或豚鼠封闭斑贴试验（Buehler Test）或其他合理的试验方法如小鼠局部淋巴结试验（Murine Local Lymph Node Assay, LLNA）等。

2. 剂量设计

建议选择多个剂量，至少应包括临床最高给药浓度。

3. 对照组

应设立阳性对照组和阴性对照组，必要时采用已上市制剂作对照。

4. 统计方法

根据实验模型和试验方法选择合适的统计方法。

（四）溶血性试验

溶血性是指药物制剂引起的溶血和红细胞凝聚等反应。溶血性反应包括免疫性溶血与非免疫性溶血。溶血性试验是观察受试物是否能够引起溶血和红细胞凝聚等。

1. 适用范围

凡是注射剂和可能引起免疫性溶血或非免疫性溶血反应的其他局部用药制剂均应进行溶血性试验。

2. 试验方法

溶血试验包括体外试验和体内试验，常规采用体外试管法评价药物的溶血性，若结果为阳性，应与相同给药途径的上市制剂进行比较研究，必要时进行动物体内试验或结合重复给药毒性试验，应注意观察溶血反应的有关指标（如网织红细胞、红细胞数、胆红素、尿蛋白，肾脏、脾脏、肝脏继发性改变等），如出现溶血时，应进行进一步研究。

（五）光毒性（光刺激性）试验

光敏反应是用药后皮肤对光线产生的不良反应，包括光毒性反应和光过敏反应，均由受试物所含的感光物质引起，产生光敏反应需同时满足以下条件：吸收自然光线（波长范围为 290~700nm），吸收 UV/可见光后产生活性物质，在光暴露组织（如皮肤，眼睛等）有充分的暴露。

光毒性是由光诱导的非免疫性的皮肤对光的反应，是指药物吸收的光能量在皮肤中释放导致皮肤损伤的作用。光毒性反应是光敏反应中最常见的一种反应，其临床表现与晒伤相似，表现为红斑、水肿、皮肤瘙痒和色素沉着，严重者可产生局部坏死、溃烂或表皮脱落。皮肤给药光毒性试验的目的是观察受试物接触皮肤或应用后遇光照射是否有光毒性反应。若受试物的化学结构或某些组成（包括药物和赋形剂）文献报道有光毒性作用，或其化学结构与已知光敏剂相似，或曾有报道其具有或可疑具有光毒性作用，建议进行皮肤给药光毒性试验。

四、结果分析与评价

（一）详细说明实验方法，受试物、试验分组、给药剂量、动物数、用药次数、毒性反应、持续时间、恢复情况及时间、死亡动物数等，对不同剂量（或浓度）下某种反应发生情况及严重程度进行表述，分析毒性反应的量效关系和可能的时效关系及可逆性，判断药物相关性，提供安全范围等。

（二）刺激性试验应重视给药浓度、体积、速度、次数与有效暴露时间对结果的影响。注射剂的给药浓度、速度及次数与药物的血管刺激性密切相关，建议根据受试物的性质、临床用药情况，采用适当的方法，尽最大可能地暴露毒性，如可适当增加浓度，或通过增加给药次数等。过敏试验应注意给药剂量

和给药速度对过敏反应的影响，静脉注射激发应保证足量、一次性快速地将受试物注射入动物体内。经皮给药的受试物应保证在局部的有效暴露浓度和时间。

(三) 重视组织病理学检查，并提供相应的照片。

(四) 由于实验动物模型的局限性，如目前仍无理想的II和III型过敏反应的动物模型；光过敏性动物模型的临床意义尚不明确等，因此一些药物的过敏性临床前评价可采取灵活的方式，建议采用多种方法如BT、小鼠局部淋巴结试验等。

(五) 在溶血性试验中，若出现红细胞凝聚现象，应判定是真凝聚还是假凝聚。若体外出现可疑溶血现象，应采用其他方法进一步试验，以确定或排除受试物的溶血作用。利用分光光度法进行溶血性试验时，应注意离心速度及温度对结果的影响。此外，因不同的注射剂颜色及深浅不同，若其色泽对血红蛋白的最大吸收有干扰，则应注意排除非药物因素。

(六) 结合药物的制剂特点、药理作用其他毒理学试验结果、以及临床信息等综合分析和评价。

五、参考文献

1. FDA Guidance for Industry Skin irritation and sensitization testing of generic transdermal drug products.
2. FDA Guidance for Industry Photosafety testing.
3. FDA Guidance for Industry Immunotoxicology evaluation of investigation new drug.
4. EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.7800 Immunotoxicity.
5. EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.2500 Acute dermal irritation.

6. EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.2600 Skin sensitization.
7. OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No 406, July 1992).
8. EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.2400 Acute eye irritation.
9. EMA Non-clinical local tolerance testing of medicinal products.
10. ISO 10993-10:2002(E) Biological evaluation of medical devices- Part 10- Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity.
11. 日本厚生省日本新药毒性试验指导原则 1989 版.
12. 中华人民共和国卫生部药政局 新药（西药）临床及临床前研究指导原则汇编.
13. 徐叔云 卞如濂 陈修 药理实验方法学.
14. 陈奇 中药药理研究方法学.
15. 皮肤用药的毒性试验和粘膜用药的毒性试验. 中华人民共和国卫生部药政管理局 《中药新药研究指南》1994 年 209, 213.
16. 袁伯俊 王治乔 皮肤用药毒性试验. 《新药临床前安全性评价与实践》北京: 军事医学科学出版社, 1997 年 152.
17. 刘建文 其他毒性试验. 《药理实验方法学》第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002 年 234.
18. Principles and methods of Toxicology. Fourth edition, edited by A. Wallace Hayes, Taylor & Francis, Philadelphia. 2001.
19. EMA; Note for Guidance on Non-clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products.
20. FDA; Guidance for Industry Botanical Drug Products.

21. FDA; Guidance for Industry Labeling Guidance for OTC Topical Drug Products for the Treatment of Vaginal Yeast Infections (Vulvovaginal Candidiasis).

22. FDA; Guidance for Industry Bacterial Vaginosis - Developing Antimicrobial Drugs for Treatment.

23. Preclinical Development Hand Book-Toxicology. Edited by Shayne Cox Gad, Copyright © 2008 by John Wiley & Sons, Inc.

六、附录

本附录收录的试验方法仅供参考。应根据受试物的特点采用国内外公认的科学合理的试验方法，不局限于此附录。

(一) 刺激性试验方法

1. 血管刺激性试验

通常选兔，每组不少于 3 只。设生理盐水和/或溶媒对照，可采用同体左右侧自身对比法。给药部位根据临床拟用途径确定，一般选用耳缘静脉。可设多个给药浓度，至少包括临床最大拟用浓度，给药容积、速率和期限一般根据临床拟用法用量，并根据动物情况进行调整，给药体积不可太低。多次给药时间一般不超过 7 天。

根据受试药物的特点和刺激性反应情况选择观察时间和剖检时间，至少观察 72 小时。应对部分动物进行组织病理学检查。恢复期动物根据受试物的特点和刺激性反应情况，继续观察 14~21 天进行组织病理学检查。根据肉眼观察和组织病理学检查结果综合判断受试物的血管刺激性及刺激性恢复情况。

2. 肌肉刺激性试验

通常选兔，也可选用大鼠。每组不少于 3 只。应设生理盐水对照或/和溶媒对照组，可采用自体左右侧自身对比法。根据受试物的特点和刺激性反应情况选择观察时间，观察期结束时应对部分动物进行组织病理学检查。分别在左右两侧股四头肌内注射给药，观察给药后不同时间的局部反应，如充血、红肿等。给药后 48~72 小时剖检观察注射局部的刺激反应，按表 1 计算相应的反应级，并进行局部组织病理学检查，提供病理照片。

根据表 1 计算肌肉刺激性总反应级，计算平均值，按表 2 判定刺激等级。若各股四头肌反应级的最高与最低之差大于 2，应另取动物重新试验。

表 1 肌肉刺激反应分级标准

刺激反应	反应级
无明显变化	0
轻度充血，范围在 0.5×1.0cm 以下	1
中度充血，范围在 0.5×1.0cm 以上	2
重度充血，伴有肌肉变性	3
出现坏死，有褐色变性	4
出现广泛性坏死	5

表 2 平均分值和等级

平均分	等级
0.0~0.4	无
0.5~1.4	轻微
1.5~2.4	轻度
2.5~3.4	中度
3.5~4.4	重度
4.5 及以上	严重

3. 皮肤刺激性试验

通常选兔、小型猪，否则应阐明合理性。兔每组不低于 4 只。一般应进行相同备皮面积的正常皮肤和破损皮肤局部刺激性试验。

采用自体左右侧自身对比法，将受试物直接涂于备皮处，敷料覆盖固定。贴敷时间至少 4 小时。多次给药皮肤刺激性试验应连续在同一部位给药，每次给药时间相同，给药期限一般不超过 4 周。破损皮肤试验中皮肤破损程度以损伤表皮层为限。

在自然光线或全光谱灯光下肉眼观察皮肤反应。根据受试物的特点和刺激性反应情况选择观察时间。通常单次给药皮肤刺激性试验观察时间点为去除药物后 30~60 分钟，24、48 和 72 小时。多次给药皮肤刺激性试验，为每次去除药物后 1 小时以及每次给药前，以及末次贴敷去除药物后 30~60 分钟，24、48 和 72 小时。

如存在持久性损伤，有必要延长观察期限以评价恢复情况和时间，延长期一般不超过 2 周。对出现中度及中度以上皮肤刺激性的动物应在观察期结束时进行组织病理学检查，并提供病理照片。

单次给药皮肤刺激性试验，计算各组每一时间点皮肤反应积分的平均值，按表 3 进行刺激强度评价。多次给药皮肤刺激性试验，首先计算每一观察时间点各组积分均值，然后计算观察期限内每天每只动物刺激积分均值，按表 4 进行刺激强度评价。

表 3 皮肤刺激反应评分标准

刺激反应	分值
红斑	
无红斑	0
轻度红斑（勉强可见）	1

中度红斑（明显可见）	2
重度红斑	3
紫红色红斑到轻度焦痂形成	4
水 肿	
无水肿	0
轻度水肿（勉强可见）	1
中度水肿（明显隆起）	2
重度水肿（皮肤隆起 1mm，轮廓清楚）	3
严重水肿（皮肤隆起 1mm 以上并有扩大）	4
最高总分值	8

表 4 皮肤刺激强度评价标准

分 值	评 价
0~0.49	无刺激性
0.5~2.99	轻度刺激性
3.0~5.99	中度刺激性
6.0~8.00	重度刺激性

4. 粘膜刺激性试验

4.1 眼刺激性试验

通常选兔，每组不少于 3 只。应设生理盐水对照组，可采用同体左右侧自身对比法。动物眼睛滴入受试物，保证药物充分暴露。给药期限应根据临床拟用方法确定。多次给药时每天给药次数应不少于临床用药频率。

应根据受试物的特点和刺激性反应选择适当的观察时间。通常单次给药为给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时；多次给药眼刺激试验为每天给药前以及最后一次给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时。如存在持久性损伤，有必要延长观察期限，一般不超过 21 天。

一般采用裂隙灯进行眼刺激反应检查，也可根据刺激性反应情况采用其他的合适器械。在整个观察过程中应进行荧光素钠染色检查。每次检查都应记录眼部异常反应，根据表 5 计算分值。根据表 6 判断刺激程度。

表 5 眼刺激反应分值标准

眼刺激反应	分值
角 膜	
无混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见	3
角膜不透明，虹膜无法辨认	4
虹 膜	
正常	0
皱褶明显加深、充血、肿胀，角膜周围轻度充血，瞳孔对光仍有反应	1
出血/肉眼可见坏死/对光无反应（或其中一种）	2
结 膜	
充血（指睑结膜和球结膜）	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
水 肿	
无水肿	0
轻微水肿（含眼睑）	1
明显水肿伴部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑超过半闭合	4
分泌物	
无分泌物	0
少量分泌物	1
分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2
分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3
最大总积分	16

表 6 眼刺激性评价标准

分值	评价
0~3	无刺激性
4~8	轻度刺激性
9~12	中度刺激性
13~16	重度刺激性

4.2 滴鼻剂和吸入剂刺激性试验

可选用兔、豚鼠或大鼠。给药后观察动物全身状况（如呼吸、循环、中枢神经系统）及局部刺激症状（如哮喘、咳嗽、呕吐、窒息等症状）等。单次给药 24 小时后或多次给药停药后 24 小时处死动物，观察呼吸道局部（鼻、喉、气管、支气管）粘膜组织有无充血、红肿等现象，并进行病理组织学检查。

4.3 阴道刺激性试验

通常选用大鼠、兔或犬。给药容积可参考临床拟用情况或不同动物种属的最大给药量。给药频率根据临床应用情况，通常每天 1~2 次，至少 7 天，每次给药与粘膜接触至少 4 小时。观察内容：阴道部位、临床表现（如疼痛症状）和阴道分泌物（如血、粘液）等，给药后动物死亡和剖检结果，局部组织有无充血、水肿等现象，并进行阴道和生殖系统病理组织学检查等。

4.4 直肠刺激性试验

通常选兔或犬。给药容积可参考临床拟用情况或不同动物种属的最大可行量。给药频率根据临床拟用情况，通常每天 1~2 次，至少 7 天，每次给药与粘膜接触至少 2~4 小时，必要时可封闭一定时间。观察内容：包括肛门区域和肛门括约肌，给药后临床表现（如疼痛症状）和粪便（如血、粘液），给药后死亡和剖检结果，局部组织有无充血、水肿等现象，并进行肛周组织的病理组织学检查。

4.5 口腔用药、滴耳剂等刺激性试验

可参照上述试验，给药途径为口腔、外耳道给药，观察对口腔和喉粘膜，以及对外耳道和鼓膜等的影响。口腔用药建议用金黄仓鼠，观察受试物对颊粘膜的刺激性。

5. 皮肤给药光毒性试验

成年白色豚鼠，雌雄各半。每组动物数至少 6 只。应设阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组，至少包括临床用药浓度。

试验前动物备皮涂敷药物。给药 30 分钟后覆盖固定，UV 光源照射（UVA 波长为 320-400nm，如含 UVB，其剂量不得超过 0.1J/cm²）。试验结束后分别于 1、24、48 和 72h 观察皮肤反应，根据表 7 计算评分。单纯涂受试物而未经照射区域未出现皮肤反应，而涂受试物后经照射的区域出现皮肤反应分值之和 ≥ 2 的动物数 ≥ 1 只时，判为受试物具有光毒性。

表 7 皮肤反应的评分标准

红斑和焦痂形成	分值	水肿形成	分值
无红斑	0	无水肿	0
非常轻的红斑，勉强可见	1	非常轻度水肿，勉强可见	1
明显的红斑	2	轻度水肿（边缘清晰）	2
中度至重度的红斑	3	中度水肿（皮肤隆起约 1mm）	3
重度红斑（鲜红色）至轻度焦痂形成（深层损伤）	4	重度水肿（皮肤隆起大于 1mm，并超过涂受试物的区域）	4

（二）过敏性试验方法

1. 主动全身过敏试验（ASA）

通常选用体重为 300~400 克的豚鼠。每组动物数至少 6 只。设阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组，至少包括临床拟用最高剂量或浓度。阴性对照组

给予同体积的溶媒，阳性对照组给予牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质。

选择容易产生抗体的给药途径，如腹腔、静脉或皮下注射，隔日一次，共给药 3 次，给药体积 0.5 ml，末次注射后第 14 天、第 21 天分别快速静脉注射致敏剂量的 2 倍进行攻击。即刻观察动物反应至 30 分钟，包括症状的出现及消失时间，一般应观察 3 小时。致敏期间每日观察动物的症状，首末次致敏和激发当日测定动物体重。按表 9 判断过敏反应发生程度，计算发生率。

表 8 过敏反应症状

0 正常	7 呼吸急促	14 步态不稳
1 不安宁	8 排尿	15 跳跃
2 竖毛	9 排粪	16 喘息
3 发抖	10 流泪	17 痉挛
4 搔鼻	11 呼吸困难	18 旋转
5 喷嚏	12 哮鸣音	19 潮式呼吸
6 咳嗽	13 紫癜	20 死亡

表 9 全身致敏性评价标准

0	-	过敏反应阴性
1~4 症状	+	过敏反应弱阳性
5~10 症状	++	过敏反应阳性
11~19 症状	+++	过敏反应强阳性
20	++++	过敏反应极强阳性

2. 主动皮肤过敏试验 (ACA)

通常选豚鼠。受试物应与临床拟用制剂一致，应为含活性成分和赋形剂或含透皮促进剂的混合制剂。若受试物为膏剂或液体，则一般不稀释；若受试物为固体粉末，则需与适量水或赋形剂混匀，以保证受试物与皮肤的良好接触。

当使用赋形剂时，应考虑其对受试物透皮吸收的影响。应设阳性对照和阴性或赋形剂对照。在致敏接触阶段，应充分保证受试物在皮肤的停留时间（6小时）和接触皮肤的面积。第0、第7和第14天，同样方法给药。末次给药后14天，再次给药激发，给药6小时左右后，观察72小时内皮肤过敏反应情况，并按表10评分，按表11计算发生率。同时应观察动物是否有哮喘、站立不稳或休克等全身过敏反应。

表 10 皮肤过敏反应程度的评分标准

皮肤过敏反应	分值
红斑	
无红斑	0
轻度红斑，勉强可见	1
中度红斑，明显可见	2
重度红斑	3
紫红色红斑到轻度焦痂形成	4
水肿	
无水肿	0
轻度水肿，勉强可见	1
中度水肿，明显可见（边缘高出周围皮肤）	2
重度水肿，皮肤隆起 1mm，轮廓清楚	3
严重水肿，皮肤隆起 1mm 以上或有水泡或破溃	4
最高总分值	8

表 11 皮肤致敏性评价标准

致敏发生率（%）	皮肤致敏性评价
0~10	无致敏性
11~30	轻度致敏性
31~60	中度致敏性
61~80	高度致敏性
81~100	极度致敏性

3. 被动皮肤过敏试验（PCA）

通常选大鼠，可用小鼠，有时根据试验需要用豚鼠，选择动物时应考虑 IgE 的出现时间。每组动物数至少 6 只。应设立阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组，至少包括临床拟用最大剂量或浓度。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质。

选择容易产生抗体的给药方法，如静脉、腹腔或皮下注射等，隔日一次，共给药 3~5 次；末次致敏后第 10~14 天制备致敏血清。激发时动物备皮处皮内注射合适稀释度的致敏血清 0.1mL，24 或 48 小时后，静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原加等量的 0.5%~1% 伊文思兰染料共 1mL。由于不同种属动物接受含 IgE 抗体血清后，至能够应答抗原攻击产生过敏反应的时间不同，需注意激发时间选择的合理性。激发注射 30 分钟后测量皮肤内层的斑点大小，直径大于 5mm 者为阳性。不规则斑点的直径为长径与短径之和的一半，并提供蓝斑照片。

4. 豚鼠 Buehler 试验 (BT) 和最大化试验 (GPMT)

通常选成年豚鼠。受试物组不少于 20 只、对照组不少于 10 只。应设立阴性对照组和阳性对照组。推荐的阳性对照物有巯基苯并噻唑，苯佐卡因，二硝基氯苯，331 环氧树脂等，也可以使用其他的阳性对照物，但轻一中度的致敏剂在加佐剂的试验中至少 30% 和不加佐剂试验中至少 15% 应有反应。

取决于所选择的方法。在 Buehler 试验中，致敏剂量应当足够高，以产生轻微的刺激性的，激发剂量为不产生刺激性的最高剂量。在 GPMT 试验中，致敏剂量应足够高以产生轻一中度的皮肤刺激性且能很好地全身耐受，激发剂量为不产生刺激性的最高剂量。第 0，6~8 和 13~15 天局部给药诱导，第 27~28 天在未给药部位给药 6 小时激发。GMPT 试验采用皮内注射给药，使用或者不

使用佐剂进行诱导，局部诱导 5~8 天后，第 20~22 天给予激发剂量 24 小时，在去除激发剂量 24 和 48 小时后读取结果。两种试验方法均在去除药物 24 和 48 小时后读取结果。如结果难以判定，一周后再次激发。

一般在致敏后 1 和 24 小时及激发后 24 和 48 小时观察皮肤红斑、水肿和其他异常反应，按表 12 进行评分，计算过敏反应发生率。按表 13 判断过敏反应强度。可根据毒性反应情况适当调整观察时间。同时测定开始和结束时的动物体重。

表 12 皮肤反应评分标准

皮肤反应强度	积分
(1) 红斑形成	
无红斑	0
轻微可见红斑	1
中度红斑	2
重度红斑	3
水肿性红斑	4
(2) 水肿形成	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
重度水肿	3
总积分	7

表 13 致敏强度

致敏率	分级	致敏强度
0~8	I	弱致敏
9~28	II	轻度致敏
29~64	III	中度致敏
65~80	IV	强致敏
81~100	V	极强致敏

5. 皮肤光过敏反应试验

皮肤光敏性试验是根据比较对照组和给药组的反应进行评价。阳性结果时应追加试验，如：与已知阳性物质的比较试验及用其他方法（不加佐剂）进行试验，其中非损伤性试验方法有利于光敏性反应评价。另外，光敏性是光毒性和光过敏性两类混合难分的反应。必要时追加光毒性试验。试验动物原则上选健康白色豚鼠，每组不少于5只。应设阳性对照药组、阴性对照组和受试物组。

Adjuvant and Strip 法：皮内注射 FCA、损伤皮肤角质层后涂敷受试物、照射紫外线，以上操作反复5次进行致敏，2周后再次涂敷受试物，照射紫外线激发。

Harber 法：涂敷受试物、照射紫外线，此操作隔日一次共3次致敏。3周后再次涂敷受试物，30分钟后照射紫外线激发。

Horio 法：涂敷20%月桂醇硫酸钠，再涂敷受试物，立即照射紫外线，此操作每日一次共3次致敏。14天后再次涂敷受试物，照射紫外线激发。

Jordan 法：破损皮肤涂敷受试物，1小时后照射紫外线，此操作每周5次，连续3周进行致敏，2周后再涂敷受试物，6小时后照射紫外线，此操作连续2日进行激发。

Maurer 法：涂敷受试物，1小时后照射紫外线及可见光线进行致敏。6周和9周后，各3日连续涂敷受试物，30分钟后照射紫外线进行激发。

Morikawa 法：为 Harber 改良法，涂敷受试物，30分钟后照射紫外线，此操作每周连续5天，共2周进行致敏，致敏2周后，涂敷受试物，30分钟后照射紫外线进行激发。

Vinson 法：涂敷受试物，照射紫外线，每日一次，连续5次致敏，7~10天后，再次涂敷受试物，照射紫外线激发。

药物非临床药代动力学研究技术指导原则

一、概述

非临床药代动力学研究是通过体外和动物体内的研究方法，揭示药物在体内的动态变化规律，获得药物的基本药代动力学参数，阐明药物的吸收、分布、代谢和排泄（Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, 简称 ADME）的过程和特征。

非临床药代动力学研究在新药研究开发的评价过程中起着重要作用。在药物制剂学研究中，非临床药代动力学研究结果是评价药物制剂特性和质量的重要依据。在药效学和毒理学评价中，药代动力学特征可进一步深入阐明药物作用机制，同时也是药效和毒理研究动物选择的依据之一；药物或活性代谢产物浓度数据及其相关药代动力学参数是产生、决定或阐明药效或毒性大小的基础，可提供药物对靶器官效应（药效或毒性）的依据。在临床试验中，非临床药代动力学研究结果能为设计和优化临床试验给药方案提供有关参考信息。

本指导原则是供中药、天然药物和化学药物新药的非临床药代动力学研究的参考。研究者可根据不同药物的特点，参考本指导原则，科学合理地进行试验设计，并对试验结果进行综合评价。

本指导原则的主要内容包括进行药物非临床药代动力学研究的基本原则、试验设计的总体要求、生物样品的测定方法、研究项目（血

药浓度-时间曲线、吸收、分布、排泄、血浆蛋白结合、生物转化、对药物代谢酶活性及转运体的影响)、数据处理与分析、结果与评价等,并对研究中其他一些需要关注的问题进行了分析。附录中描述了生物样品分析和放射性同位素标记技术的相关方法和要求,供研究者参考。

二、基本原则

进行非临床药代动力学研究,要遵循以下基本原则:

- (一) 试验目的明确;
- (二) 试验设计合理;
- (三) 分析方法可靠;
- (四) 所得参数全面,满足评价要求;
- (五) 对试验结果进行综合分析评价;
- (六) 具体问题具体分析。

三、试验设计

(一) 总体要求

1. 受试物

中药、天然药物:受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备,一般应为中试或中试以上规模的样品,否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量(或规格)、保存条件、有效期及配制方法等,并提供质量检验报告。由于中药的特殊性,建议现用现配,否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较

长时,应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。如果由于给药容量或给药方法限制,可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物:受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量(或规格)、保存条件、有效期及配制方法等,并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等,并符合试验要求。

在药物研发的过程中,若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化,应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析,并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

2. 试验动物

一般采用成年和健康的动物。常用动物有小鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬、小型猪和猴等。动物选择的一般原则如下:

2.1 首选动物:在考虑与人体药代动力学性质相关性的前提下,尽可能选择与毒理学和药效学研究相同的动物。

2.2 尽量在动物清醒状态下进行试验,最好从同一动物多次采样获取药代动力学参数。

2.3 创新性药物应选用两种或两种以上的动物,其中一种为啮齿类动物;另一种为非啮齿类动物(如犬、小型猪或猴等)。其他药物,可选用一种动物,建议首选非啮齿类动物。

在动物选择上，建议采用体外模型比较动物与人代谢的种属差异性，包括代谢反应类型的差异和代谢产物种类及量的差异。通过比较，选取与人代谢性质相近的动物进行非临床药代评价；同时尽可能明确药物代谢的研究对象（如：原形药物、原形药物与代谢产物、或几个代谢产物同时作为药代动力学研究观察的对象）。

2.4 经口给药不宜选用兔等食草类动物。

3. 剂量选择

动物体内药代动力学研究应设置至少三个剂量组，低剂量与动物最低有效剂量基本一致，中、高剂量按一定比例增加。不同物种之间可根据体表面积或药物暴露量进行剂量换算。主要考察在所设剂量范围内，药物的体内动力学过程是属于线性还是非线性，以利于解释药效学和毒理学研究中的发现，并为新药的进一步开发和研究提供信息。

4. 给药途径

所用的给药途径和方式，应尽可能与临床用药一致，也要兼顾药效学研究和毒理研究的给药途径。

（二）生物样品的分析方法

生物样品中药物及代谢产物的分析方法包括色谱法、放射性同位素标记法和微生物学方法等。应根据受试物的性质，选择特异性好、灵敏度高的测定方法。色谱法包括高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）和色谱-质谱联用法（如 LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS 方法）。在需要同时测定生物样品中多种化合物的情况下，LC-MS/MS 和 GC-MS/MS 联用法在特异性、灵敏度和分析速度方面有更多的优势。

对于前体药物或有活性（药效学或毒理学活性）代谢产物的药物，以及主要通过代谢从体内消除的药物，建立生物样品分析方法时应考虑测定原形药和主要代谢产物，考察物质平衡（**Mass Balance**），阐明药物在体内的转归。在这方面，放射性同位素标记法和色谱-质谱联用法具有明显优点。

应用放射性同位素标记法测定生物样品可配合色谱法，以保证良好的检测特异性。如某些药物难以用上述的检测方法，可选用其他方法，但要保证其可靠性。

方法学验证（**Validation**）是生物样品分析的基础。所有药代动力学研究结果，都依赖于生物样品分析，只有可靠的方法才能得出可靠的结果。应通过准确度、精密度、特异性、灵敏度、重现性、稳定性等研究，对建立的方法进行验证。制备随行标准曲线并对质控样品进行测定，以确保生物样品分析数据的可靠性。

本指导原则提供了生物样品分析方法的基本要求 [见附录（一）]，研究时可根据药物特点及分析方法的具体类型进行选择。

（三）研究项目

1. 血药浓度-时间曲线

1.1 受试动物数：以血药浓度-时间曲线的每个采样点一般不少于 5 个数据为限计算所需动物数。建议受试动物采用雌雄各半。对于单一性别用药，可选择与临床用药一致的性别。

1.2 采样点：采样点的确定对药代动力学研究结果有重大影响，若采样点过少或选择不当，得到的血药浓度-时间曲线可能与药物在体内的真实情况产生较大差异。给药前需要采血作为空白样品。为获得给药后一个完整的血药浓度-时间曲线，采样时间点的设计应兼顾药物的吸收相、平衡相（峰浓度附近）和消除相。对于吸收快的血管外给药药物，应尽量避免第一个点是峰浓度（ C_{\max} ）；在 C_{\max} 附近需要 3 个时间点，尽可能保证 C_{\max} 的真实性。整个采样时间应持续到 3~5 个半衰期，或持续到血药浓度为 C_{\max} 的 1/10~1/20。为保证最佳采样点，建议在正式试验前进行预试验，然后根据预试验的结果，审核并修正原设计的采样点。同时应注意采血途径和整个试验周期的采血总量不影响动物的正常生理功能和血液动力学，一般不超过动物总血量的 15%~20%。例如，每只大鼠 24 h 内采血总量不宜超过 2 mL。在采血方式上，同时也要兼顾动物福利（Animal welfare）。

1.3 口服给药：一般在给药前应禁食 12 小时以上，以排除食物对药物吸收的影响。另外在试验中应注意根据具体情况统一给药后禁食时间，以避免由此带来的数据波动及食物的影响。

1.4 多次（重复）给药

对于临床需长期给药或有蓄积倾向的药物，应考虑进行多次（重复）给药的药代动力学研究。

多次给药试验时，一般可选用一个剂量（有效剂量）。根据单次给药药代动力学试验结果求得的消除半衰期，并参考药效学数据，确定药物剂量、给药间隔和连续给药的天（次）数。

1.5 血药浓度测定

按照已验证的分析方法，对采集的生物样品进行处理及分析测定，获得各个受试动物的各采样点的血药浓度数据。

生物样品的处理应与分析方法验证中的处理方法一致。

1.6 药代动力学参数

根据试验中测得的各受试动物的血药浓度-时间数据，求得受试物的主要药代动力学参数。静脉注射给药，应提供消除半衰期 ($t_{1/2}$)、表观分布容积 (V_d)、血药浓度-时间曲线下面积 (AUC)、清除率 (CL) 等参数值；血管外给药，除提供上述参数外，还应提供峰浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (T_{max}) 等参数，以反映药物吸收、消除的规律。另外，应提供统计矩参数，如：平均滞留时间 (MRT)、 $AUC_{(0-t)}$ 和 $AUC_{(0-\infty)}$ 等，对于描述药物药代动力学特征也是有意义的。

1.7 应提供的数据

1.7.1 单次给药

各个受试动物的血药浓度-时间数据及曲线和各组平均值、标准差及曲线。

各个受试动物的主要药代动力学参数及各组平均值、标准差。

对受试物单次给药非临床药代动力学的规律和特点进行讨论和评价。

1.7.2 多次（重复）给药

各个受试动物首次给药后的血药浓度-时间数据及曲线和主要药代动力学参数及各组平均值、标准差和曲线。

各个受试动物的 3 次稳态谷浓度数据及各组平均值、标准差。

各个受试动物血药浓度达稳态后末次给药的血药浓度-时间数据和曲线和主要药代动力学参数，及各组平均值、标准差和曲线。

比较首次与末次给药的血药浓度-时间曲线和有关参数。

对受试物多次给药非临床药代动力学的规律和特点进行讨论和评价。

2. 吸收

对于经口给药的新药，进行整体动物试验时应尽可能同时进行血管内给药的试验，提供绝对生物利用度。如有必要，可进行体外细胞试验、在体或离体肠道吸收试验等以阐述药物的吸收特性。

对于其他血管外给药的药物及某些改变剂型的药物，应根据立题目的，提供绝对生物利用度或相对生物利用度。建议采用非啮齿类动物（如：犬或猴等）自身交叉试验设计，用同一受试动物比较生物利用度。

3. 分布

一般选用大鼠或小鼠进行组织分布试验，但必要时也可在非啮齿类动物（如犬）中进行。通常选择一个剂量（一般以有效剂量为宜）给药后，至少测定药物及主要代谢产物在心、肝、脾、肺、肾、胃肠道、生殖腺、脑、体脂、骨骼肌等组织的浓度，以了解药物在体内的主要分布组织和器官。特别注意药物浓度高、蓄积时间长的组织和器官，以及在药效靶组织或毒性靶组织的分布（如对造血系统有影响的药物，应考察在骨髓的分布）。必要时建立和说明血药浓度与靶组织药物浓度的关系。参考血药浓度-时间曲线的变化趋势，选择至少3个时间点分别代表吸收相、平衡相和消除相的药物分布。若某组织的药物或代谢产物浓度较高，应增加观测

点，进一步研究该组织中药物消除的情况。每个时间点，一般应有 6 个动物（雌雄各半）的数据。

以下情况可考虑进行多次给药后特定组织的药物浓度研究：

(1) 药物/代谢产物在组织中的半衰期明显超过其血浆消除半衰期，并超过毒性研究给药间隔的两倍；

(2) 在短期毒性研究、单次给药的分布研究或其他药理学研究中观察到未预料的，而且对安全性评价有重要意义的组织病理学改变；

(3) 定位靶向释放的药物。

进行组织分布试验，必须注意取样的代表性和一致性。

4. 排泄

建议同时提供啮齿类和非啮齿类动物的排泄数据，啮齿类（大鼠、小鼠等）每个性别 3 只动物，非啮齿类（如犬）每个性别 2~3 只动物。根据药物特性，也可选择单一性别动物，但需说明。

4.1 尿和粪的药物排泄：将动物放入代谢笼内，选定一个有效剂量给药后，按一定的时间间隔分段收集尿或粪的全部样品，直至收集到的样品中药物和主要代谢产物低于定量下限或小于给药量的 1%。粪样品收集后按一定比例制成匀浆，记录总重量或体积，取部分尿或粪样品进行药物和主要代谢产物浓度测定或代谢产物谱（Metabolite profile）分析，计算药物和主要代谢产物经此途径排泄的速率及排泄量。每个时间段至少有 5 只动物的试验数据。

4.2 胆汁排泄：一般在动物麻醉下作胆管插管引流，待动物清醒且手术完全恢复后给药，并以合适的时间间隔分段收集胆汁，进行药物和主要代谢产物测定。

4.3 记录药物及主要代谢产物自粪、尿、胆汁排出的速度及总排出量（占总给药量的百分比），提供物质平衡的数据。

5. 与血浆蛋白的结合

一般情况下，只有游离型药物才能通过脂膜向组织扩散，被肾小管滤过或被肝脏代谢，因此药物与蛋白的结合会明显影响药物分布与消除的动力学过程，并降低药物在靶部位的浓度。建议根据药理毒理研究所采用的动物种属，进行动物与人血浆蛋白结合率比较试验，以预测和解释动物与人在药效和毒性反应方面的相关性。

研究药物与血浆蛋白结合可采用多种方法，如平衡透析法、超过滤法、分配平衡法、凝胶过滤法、色谱法等。根据药物的理化性质及试验室条件，可选择使用一种方法进行至少 3 个浓度（包括有效浓度）的血浆蛋白结合试验，每个浓度至少重复试验 3 次，以了解药物与血浆蛋白结合率以及可能存在的浓度依赖性和血浆蛋白结合率的种属差异。

对血浆蛋白结合率高，且安全范围窄的药物，建议开展体外药物竞争结合试验，即选择临床上有可能合并使用的高蛋白结合率药物，考察对所研究药物蛋白结合率的影响。

6. 生物转化

对于创新性的药物，尚需了解在体内的生物转化情况，包括转化类型、主要转化途径及其可能涉及的代谢酶表型。对于新的前体药物，除对其代

谢途径和主要活性代谢产物结构进行研究外，尚应对原形药和活性代谢产物进行系统的药代动力学研究。而对主要在体内以代谢消除为主的药物(原形药排泄<50%)，生物转化研究则可分阶段进行：临床前可先采用色谱方法或放射性同位素标记方法分析和分离可能存在的代谢产物，并用色谱-质谱联用等方法初步推测其结构。如果临床研究提示其在有效性和安全性方面有开发前景，需进一步研究并阐明主要代谢产物的代谢途径、结构及酶催化机制。但当多种迹象提示可能存在有较强活性或毒性的代谢产物时，应尽早开展活性或毒性代谢产物的研究，以确定开展代谢产物动力学试验的必要性。

体内药物生物转化可考虑与血药浓度-时间曲线和排泄试验同时进行，应用这些试验采集的样品进行代谢产物的鉴定及浓度测定。

应尽早考察药效和毒性试验所用的实验动物与人体代谢的差异。这种差异有两种情况，其一是量的差异，动物与人的代谢产物是一致的，但各代谢产物的量不同或所占的比例不同；其二是质的差异，即动物与人的代谢产物是不一致的，这时应考虑这种代谢的种属差异是否会影响到其药效和毒性，并以此作为药效和毒性试验动物选择的依据。建议在早期非临床药代动力学研究时，进行药物体外(如动物和人肝组织匀浆、原代肝细胞、肝 S9、肝微粒体等)代谢试验，以预测动物与人体体内代谢有无差异。

7. 药物代谢酶及转运体研究

药物的有效性及毒性与血药浓度或靶器官浓度密切相关。一定剂量下的血药浓度或靶器官浓度取决于该药物的吸收、分布、代谢及排泄过程(ADME)，而代谢酶和转运体是影响药物体内过程的两大生物体系，是

药物 ADME 的核心机制之一。因此，创新性药物的研究开发应该重点关注药物吸收和主要消除途径的确定、代谢酶和转运体对药物处置相对贡献的描述、基于代谢酶或转运体的药物-药物相互作用的评估等。

体外试验体系是评价药物代谢酶和转运体作用机制的有力手段，应结合体内试验，综合评价药物的处置过程。非临床 ADME 研究应主要采用人源化材料（如：人肝微粒体、肝 S9、原代肝细胞及 P450 重组酶等），鉴定药物是否是代谢酶的底物或抑制剂。P450 同工酶之外的药物代谢酶，如葡萄糖醛酸结合酶、硫酸转移酶等，也应该在适当的情况下进行评估。

对细胞色素 P450 同工酶（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 等）抑制的考察可以通过使用类药性探针底物（Drug-like Probe Substrate）完成。抑制试验应该在酶动力学线性范围进行，即探针底物药物的浓度 $\leq K_m$ （米氏常数），抑制强弱通过 IC_{50} 或 K_i 判断。P450 同工酶抑制试验的思路与方法适用于其他药物代谢酶和转运体的研究评价。药物对 P450 酶的诱导应该重点对人 CYP3A4 以及 CYP1A2、CYP2B6 进行评估。体外诱导试验可运用人肝细胞多次给药后相关 mRNA 表达和/或酶活性的变化进行评估。

具有重要临床意义的外排和摄入转运体主要包括 P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 和 OCT2 等，建议针对这些转运体进行研究。除此之外的其他转运体研究，在必要时也可予以考虑。

创新药物非临床 ADME 研究还应该考虑到代谢酶与转运体之间的相互影响及潜在的相互作用、人特异性代谢产物的评估等。

8. 物质平衡

在临床前和临床早期阶段,特别是毒性剂量和有效治疗剂量范围确定的情况下运用放射性标记化合物,可通过收集动物和人体粪、尿以及胆汁以研究药物的物质平衡。这些研究能够获得化合物的排泄途径和排泄速率等信息,而且有助于代谢产物的性质鉴定,并通过有限的数据比较它们的体内吸收和分布特点。通过体外和动物样品中分离出的代谢产物有时可作为参比品用于临床和非临床的定量研究。同时,组织分布研究和动物胆管插管收集的胆汁能够提供药物的组织分布数据和明确胆汁清除特点。一般应采用放射性同位素标记技术研究物质平衡。有关试验方法的介绍及相关考虑见附录(二)。

考虑到每一个化合物及其代谢产物具有各自的理化特性,在开展不同化合物的同位素标记研究时对试验方法作慎重的调整/修改是很有必要的。

四、数据处理与分析

应有效整合各项试验数据,选择科学合理的数据处理及统计方法。如用计算机处理数据,应注明所用程序的名称、版本和来源,并对其可靠性进行确认。

五、试验结果与评价

对所获取的数据应进行科学和全面的分析与评价,综合论述药物在动物体内的药代动力学特点,包括药物吸收、分布和消除的特点;经尿、粪和胆汁的排泄情况;与血浆蛋白结合的情况;药物在体内蓄积的程度及主

要蓄积的器官或组织；如为创新性的药物，还应阐明其在体内的生物转化、消除过程及物质平衡情况。

在评价的过程中注意进行综合评价，分析药代动力学特点与药物的制剂选择、有效性和安全性的关系，从体外试验和动物体内试验的结果，推测临床药代动力学可能出现的情况，为药物的整体评价和临床研究提供更多有价值的信息。

六、附录

（一）生物样品分析方法的基本要求

1. 基本概念

生物样品分析方法的基本参数包括：（1）准确度，（2）精密度，（3）特异性，（4）灵敏度，（5）重现性，（6）稳定性。现将相关的概念介绍如下：

准确度：在确定的分析条件下，测得值与真实值的接近程度。

精密度：在确定的分析条件下，相同基质中相同浓度样品的一系列测量值的分散程度。

特异性：分析方法测量和区分共存组分中分析物的能力。这些共存组分可能包括代谢产物、杂质、分解产物、基质组分等。

灵敏度：生物样品分析方法的灵敏度主要通过测定定量下限样品的准确度和精密度来表征。

重现性：不同试验室间测定结果的分散程度，以及相同条件下分析方法在间隔一段短时间为测定结果的分散程度。

稳定性：一种分析物在确定条件下，一定时间内在给定基质中的化学稳定性。

标准曲线：试验响应值与分析物浓度间的关系。应采用适当的加权和统计检验，用简单的数学模型来最适当地描述。标准曲线应是连续的和可重现的，应以回归计算结果的百分偏差最小为基础。

提取回收率：分析过程的提取效率，以样品提取和处理过程前后分析物含量百分比表示。

定量范围：包括定量上限（*ULOQ*）和定量下限（*LLOQ*）的浓度范围，在此范围内采用浓度-响应关系能进行可靠的、可重复的定量，其准确度和精密度可以接受。

生物基质：一种生物来源物质，能够以可重复的方式采集和处理。例如全血、血浆、血清、尿、粪、各种组织等。

基质效应：由于样品中存在干扰物质，对响应造成的直接或间接的影响。

分析批：包括待测样品、适当数目的标准样品和质控样品的完整系列。一天内可以完成几个分析批，一个分析批也可以持续几天完成。

标准样品：在生物基质中加入已知量分析物配制的样品，用于建立标准曲线，计算质控样品和未知样品中分析物浓度。

质控样品：即 **QC** 样品，系指在生物基质中加入已知量分析物配制的样品，用于监测生物分析方法的重复性和评价每一分析批中未知样品分析结果的完整性和正确性。

2. 生物样品分析方法的建立和验证

由于生物样品取样量少、药物浓度低、内源性物质（如无机盐、脂质、蛋白质、代谢产物）及个体差异等多种因素影响生物样品测定，所以必须根据待测物的结构、生物基质和预期的浓度范围，建立适宜的生物样品分析方法，并对方法进行验证。

分析方法验证分为全面验证和部分验证两种情况。对于首次建立的生物样品分析方法、新的药物或新增代谢产物定量分析，应进行全面方法验证。在其他情况下可以考虑进行部分方法验证，如生物样品分析方法在试验室间的转移、定量浓度范围改变、生物基质改变、稀少生物基质（动物组织样品）、证实复方给药后分析方法的特异性等。

应考察方法的每一步骤，确定从样品采集到分析测试的全过程中，环境、基质、材料或操作上的可能改变对测定结果的影响。

（1）特异性

必须证明所测定的物质是预期的分析物，内源性物质和其他代谢产物不得干扰样品的测定。对于色谱法至少要考察 6 个不同个体空白生物样品色谱图、空白生物样品外加对照物质色谱图（注明浓度）及用药后的生物样品（注明样品来源基质、用药后的时间）色谱图。对于以软电离质谱为基础的检测方法（LC-MS、LC-MS/MS 等），应注意考察分析过程中的基质效应，如离子抑制等。

（2）标准曲线与定量范围

根据所测定物质的浓度与响应的相关性，用回归分析方法（如用加权最小二乘法）获得标准曲线。标准曲线高低浓度范围为定量范围，在定量范围内浓度测定结果应达到试验要求的精密度和准确度。

用至少 5 个浓度建立标准曲线，应使用与待测样品相同的生物基质，定量范围要能覆盖全部待测浓度，不允许将定量范围外推求算未知样品的浓度。建立标准曲线时应随行空白生物样品，但计算时不包括该点。

(3) 精密度与准确度

要求选择 3 个浓度的质控样品同时进行方法的精密度和准确度考察。低浓度选择在定量下限附近，其浓度在定量下限的 3 倍或 3 倍以内；高浓度接近于标准曲线的上限；中间选一个浓度。每一浓度每批至少测定 5 个样品，为获得批间精密度，应至少 3 个分析批合格。

精密度用质控样品的批内和批间相对标准差 (*RSD*) 表示，相对标准差一般应小于 15%，在定量下限附近相对标准差应小于 20%。

准确度一般应在 85%~115% 范围内，在定量下限附近应在 80%~120% 范围内。

(4) 定量下限

定量下限是标准曲线上的最低浓度点，要求至少能满足测定 3~5 个半衰期时样品中的药物浓度，或 C_{\max} 的 1/10~1/20 时的药物浓度，其准确度应在真实浓度的 80%~120% 范围内，*RSD* 应小于 20%。应由至少 5 个标准样品测试结果证明。

(5) 样品稳定性

根据具体情况，对含药生物样品在室温、冰冻或冻融条件下以及不同存放时间进行稳定性考察，以确定生物样品的存放条件和时间。还应注意储备液的稳定性以及样品处理后的溶液中分析物的稳定性。

(6) 提取回收率

应考察高、中、低 3 个浓度的提取回收率，其结果应精密和可重现。

(7) 稀释可靠性

样品稀释不应影响准确度和精密度。应该通过向基质中加入分析物至高于标准曲线上限浓度，并用空白基质稀释该样品（每个稀释因子至少 5 个测定值），来证明稀释的可靠性。准确度和精密度应在±15%之内。稀释的可靠性应该覆盖试验样品所用的稀释倍数。

(8) 残留

方法开发期间应使残留最小化。方法验证期间应通过检测标准曲线定量上限浓度后测定空白样品来确定其残留，通常残留应不大于定量下限的 20%。生物样品分析期间也应进行残留检测，如在测定高浓度样品后和分析下一个样品之前测定空白样品。

(9) 微生物学分析

上述分析方法验证的很多参数和原则也适用于微生物学分析，但在方法验证中应考虑到它们的一些特殊之处。结果的准确度是关键的因素，如果重复测定能够改善准确度，则应在方法验证和未知样品测定中采用同样的步骤。

(10) 组织分布样品

组织分布样品由于每种组织样本数目少，所以其分析方法只需验证选择性、日内精密度和准确度等。通常选择一两种代表性组织（如肝、肺、肾、大肠等）进行分析方法验证。

3. 生物样品分析方法的应用

应在生物样品分析方法验证完成之后开始测试未知样品。推荐由独立的人员配制不同浓度的标准样品对分析方法进行考核。

每个未知样品一般测定一次，必要时可进行复测。药代动力学比较试验中，来自同一个体的生物样品最好在同一分析批中测定。

每个分析批应建立标准曲线，随行测定高、中、低 3 个浓度的质控样品，每个浓度至少双样本，并应均匀分布在未知样品测试顺序中。当一个分析批中未知样品数目较多时，应增加各浓度质控样品数，使质控样品数大于未知样品总数的 5%。质控样品测定结果的偏差一般应小于 15%，最多允许 1/3 质控样品的结果超限，但不能在同一浓度中出现。如质控样品测定结果不符合上述要求，则该分析批样品测试结果作废。

同一天内进行不同组织样品测试时，用代表性组织作为基质建立标准曲线，但质控样品应采用目标空白组织制备。根据当日标准曲线计算质控样品的浓度，若相对偏差在±15%之内，则可共用一条标准曲线，否则采用与待测组织样品相同的空白组织建立标准曲线。

浓度高于定量上限的样品，应采用相应的空白基质稀释后重新测定。对于浓度低于定量下限的样品，在进行药代动力学分析时，在达到 C_{max} 以前取样的样品应以零值计算，在达到 C_{max} 以后取样的样品应以无法定量（Not detectable, ND）计算，以减小零值对 AUC 计算的影响。

4.分析数据的记录与保存

分析方法的有效性应通过试验证明。在分析报告中，应提供成功完成这些试验工作的相关资料。建立一般性和特殊性标准操作规程，保存完整的试验记录是分析方法有效性的基本要素。生物分析方法建立中产生的数据和 QC 样品测试结果应全部记录并妥善保存，必要时接受检查。

5.需提交的数据与材料

提供给药品注册管理部门的材料应当包括：（1）综合信息；（2）方法建立的数据；（3）在日常样品分析中的基本资料；（4）其他相关信息。

（1）综合信息

项目编号、分析方法编号、分析方法类型、分析方法验证简化的理由，以及相应的项目计划编号、标题等。

（2）方法建立的数据

分析方法的详细描述；该方法所用对照品（被测药物、代谢产物、内标物）的纯度和来源；稳定性试验描述及相关数据；描述测定选择性、准确度、精密度、回收率、定量限、标准曲线的试验并给出获得的主要数据；列出批内、批间精密度和准确度的详细结果。根据实际情况提供代表性的色谱图或质谱图并加以说明。此外，尚需对所建立的方法学在实际分析过程中的优缺点进行评价。

（3）在日常样品分析中的基本资料

所用样品（受试物、代谢产物、内标物）的纯度和来源。样品处理和保存的情况，样品编号、采集日期、运输前的保存、运输情况、分析前的保存。信息应包括日期、时间、样品所处条件，以及任何偏离试验计划的情况。样品分析批的综合信息，包括分析批编号、分析日期、分析方法、分析人员、开始和结束时间、主要设备和材料的变化，以及任何可能偏离分析方法建立时的情况。

用于计算结果的回归方程，分析样品时标准曲线列表，各分析批质控样品测定结果综合列表并计算批内和批间精密度、准确度，各分析批包括的未知样品，浓度计算结果。

在现场考核中,应能提供全部受试物样品测试的色谱图或其他原始数据,包括相应分析批的标准曲线和质控样品的色谱图或其他原始数据。

注明缺失样品的原因,重复测试的结果。应对舍弃任何分析数据和选择所报告的数据说明理由。

(4) 其他相关信息

缩略语列表、参考文献列表、标准操作规程列表。

(二) 应用放射性同位素标记技术进行药物非临床药代动力学研究

新药研发过程中,了解候选药物在人体和用于毒理和药效研究的动物体内的变化情况至关重要。因此,在新药研发不同阶段必须进行各种体内、体外药代试验以阐明候选药物的吸收、分布、代谢和排泄(ADME)等性质。尤其是对于仅在人体存在的代谢产物,或在稳态时体内暴露水平高于所有与药物相关物质总暴露量的10%并远高于任何毒理试验动物种属中的水平的代谢产物,会有药物安全性隐患,需进行代谢产物安全性研究。尽管液质联用技术已大量应用于这些试验,但放射性同位素标记技术仍被广泛使用。低能量放射性同位素(如 ^{14}C 、 ^3H)标记化合物应用于药代动力学研究,因其生物界背景值很低因而检测容易且灵敏、半衰期较长而不需根据放射性半衰期校正试验结果、可定量分析候选药物产生的代谢产物而不需知道它们的结构、产生的非离子化 β -射线能量极低而不需特殊防护,被证明为一种安全有效的特殊技术,其结果简单、明了、可靠,目前在多数情况下尚无别的取代方法。

1.放射性同位素标记药代动力学研究的应用范围

低能量放射性同位素标记技术可用于多方面 ADME 试验中,如:1) 进行原形药和代谢产物总体和分别的药动学研究,确定总体的系统暴露和生物利用度等;2) 考察物质平衡及排除途径;3) 确定血液和排泄物中的代谢产物谱,结合色谱与质谱技术可利于代谢产物鉴定;4) 确定体内清除机制;5) 进行肝细胞、肝微粒体等体外药代动力学试验可获得全面的人和动物(如小鼠、大鼠、兔、犬、猴等)体外代谢产物谱、显示种属差异、帮助毒理研究动物种属的选择;6) 鉴于同一种放射性同位素在不同结构的化合物(如:药物或代谢产物)上产生相同的放射能量,放射性代谢产物可用于同种动物稳态时、其他动物种属及人体中产生的代谢产物的定性定量分析,有助于人体代谢酶的鉴定,早期发现人体高比例代谢产物,并为药物相互作用研究的试验设计提供依据;7) 获得组织分布数据。大鼠给药后不同时间点的整体放射自显影结果还可为临床放射性剂量的计算提供数据。

2.放射性同位素标记方法的选择

小分子化学药物 ADME 研究中常用的低能量放射性同位素为碳-14 (^{14}C) 和氚 (^3H)。 ^{14}C 标记最为常用,其生物界背景低,生物学几乎无同位素效应而影响代谢,极少发生同位素交换,灵敏度较 ^3H 高而容易定量。标记碳-14 化合物时应选择代谢稳定的位点。体内试验除非 ^{14}C 标记非常困难或根本无法标记、给药剂量极低需很高的比活性时才选用 ^3H 标记。 ^3H 标记相对简单并比 ^{14}C 标记化合物比活性高,尤其适合小剂量给药化合物或早期生物转化研究;同样,氚标记化合物时也应选择代谢稳定的位点作为标记位点,不推荐非定位的氚水交换标记方式。

^{14}C 和 ^3H 标记化合物的放化纯度与化学纯度一般均应 $\geq 95\%$ ，并不含有 $>1\%$ 的单一杂质。

3.放射性同位素标记药物的药代动力学试验

放射性化合物药代动力学试验与非标记药物药代动力学试验相似，如剂量、给药途径、受试动物等等。剂量除按常规剂量水平(mg/kg)表示外，还需提供放射性剂量 ($\mu\text{Ci/kg}$)。给药制剂的配制和给药途径一般也应与非标记药代动力学试验相似，特殊情况需说明。为减少实验误差，常采用称重法确定实际给药量。样品收集常包括全血、血浆、尿液、胆汁、粪便、笼具清洗液及组织等样本。血液样本的收集时间点可根据药物的药代动力学参数决定，排泄物一般采样 7~10 天（对于长半衰期的药物，应适当延长采样时间），或采样至排出的放射性量超过给药量的 90%或连续 2 天的排出放射性量小于放射性给药剂量的 1%。进行小动物（如小鼠、大鼠等）物质平衡试验时，如总放射性回收率 $<90\%$ ，应测定尸体残留总放射量，必要时解剖动物，观察药物的主要储留部位和组织。为防止原形药及代谢产物降解，尿液和胆汁收集过程中容器置放于干冰内。样品处理（如液体样品离心去固体杂质、血浆、粪便及组织提取等）和分析（如应用 HPLC 和在线或离线放射性检测仪联用获得放射性代谢产物谱）应密切关注放射性的回收率，一般总回收率应 $\geq 85\%$ 。应根据放射性代谢产物谱研究获得的各代谢产物的血浆暴露量百分比和在排泄物中占给药百分率选择需要鉴定的代谢产物，并使用 HPLC 在线或离线放射性检测仪帮助鉴定工作中对代谢产物的监测。

放射性 ADME 试验报告除包括常规药代动力学研究内容外，还应提供放射性同位素标记药物的标记位置、放化纯度、化学纯度、比活度等以及在给药制剂中的放化稳定性数据。实验结果应提供放射性回收率，代谢产物鉴定需提供质谱和在线或离线放射性检测仪关联数据。

(三) 几个需要关注的问题

1. 关于中药、天然药物药代动力学研究

在中药、天然药物新药研究开发的过程中，通过对活性成分或活性代谢产物非临床药代动力学研究，了解其相关药代动力学参数，可作为阐明药效或毒性产生的基础及了解药效或毒性反应靶器官的依据，并为设计和优化临床试验给药方案提供有关参考信息。

中药活性成分情况较为复杂，有些活性成分较为单一，有些物质基础比较清楚但成分较多，有些活性成分复杂且不清楚。

对于活性成分单一的中药、天然药物，其非临床药代动力学研究与化学药物基本一致。

对于非单一活性成分但物质基础基本清楚的中药、天然药物，其中药效或毒性反应较强、含量较高的成分，一般需要进行药代动力学探索性研究。对于活性成分复杂且物质基础不太清楚的中药、天然药物，应根据对其中部分已知成分文献研究的基础上，重点考虑是否进行有明确毒性成分的非临床药代动力学研究。若有足够证据表明某类结构相似的一类成分中某一个成分的药代动力学属性可以代表该类成分的药代动力学特征，可从同类成分中选择一个代表性成分进行测定。被测成分应根据机体的暴露水平和暴露形式，以及药效作用/安全性相关性等因素来确定。

此外，在进行中药、天然药物非临床药代动力学研究时，应充分考虑中药、天然药物所含化学成分不同于化学合成药物的特点，结合其特点选择适宜的方法开展体内过程或活性代谢产物的研究，为后续研发提供参考。若拟进行的临床试验中涉及到与其他药物（特别是化学药）联合应用，应考虑通过体外、体内试验开展药物相互作用研究。

2.关于药代动力学的体外方法

随着体外生物技术的发展，为深层次地了解和阐明药物的某一性质以及与药效和毒性的相关性，不少药代动力学的体外方法有效地应用于药物代谢和相互作用评价，如体外吸收模型（Caco-2 细胞模型）、体外肝系统研究、体外转运系统等。这些体外方法学在推测人药代动力学参数和特征时，提供了同种属的体外到体内的推测。体外方法学可以通过应用不同辅酶、不同选择性抑制物，不同重组基因纯酶，在试验设计上，可以弥补动物体内方法学的缺陷。人和动物的体外方法学结合动物的体内方法学，在新药研发的临床前阶段，可以较准确和有效地评价药物的吸收、运转、分布、代谢，比如药物代谢产物鉴定、代谢途径鉴定、药物对代谢酶和转运体的抑制和诱导等，为阐明药理和毒理作用机制和设计第一个临床研究剂量和评价潜在性药物代谢性或运转性相互作用提供可靠的参数。药代动力学的体外方法学的应用，在不影响或优化临床前研究信息量的同时，减少了实验动物的使用，使动物伦理学的实施逐渐可行。

对于体外研究发现有明显种属差异的药物，应进一步分析解释。

3.关于动物选择

由于动物药代动力学研究是联系动物研究与人体研究的重要桥梁，动物选择的恰当与否是该研究价值大小的关键。应尽量选择适宜的动物来进

行研究,如口服给药的药物不宜选择食草类动物或与人胃肠道情况差异较大的动物,以免由于吸收的差异造成试验结果不能充分提示临床。对于创新性的药物,可利用体外药代动力学手段预先对动物种属进行筛选,以选择药物动力学特点与人体最接近的动物,提高试验结果的临床预测价值。由此也可为毒性试验选择合适的动物种属提供依据,并对毒性试验与人体的相关性做出判断。

4.关于手性药物

对映异构体具有几乎相同的物理性质(旋光性除外)和化学性质(在手性环境中除外),通常需要特殊的手性技术对它们进行鉴定、表征、分离和测定,但生物系统常常很容易区分它们,并可能导致不同的药代动力学性质(吸收、分布、代谢、排泄),以及药理学、毒理学效应的量或质的区别。

为评价单一对映体或对映体混合物的药代动力学,研究者应在药物开发前期,建立适用于体内样品对映体选择性分析的定量方法,为后期研究对映体之间的相互转化以及各自的吸收、分布、代谢和排泄提供方法学基础。

如果外消旋体已经上市,研究者希望开发单一对映体,则应测定该对映体转化为另一对映体的程度是否显著,以及该对映体单独用药是否与其作为外消旋体组分时的药代动力学性质一致,这对丰富和解释单一对映体研发的立题依据、优化剂量、制定给药方案具有重要的意义。

为监测对映异构体在体内的相互转化和处置,应获得单一对映体在动物体内的药代动力学曲线,并与其后在临床 I 期试验中获得的药代动力学曲线相比较。

药物毒代动力学研究技术指导原则

一、概述

毒代动力学研究目的是获知受试物在毒性试验中不同剂量水平下的全身暴露程度和持续时间，预测受试物在人体暴露时的潜在风险（注释 1）。毒代动力学是非临床毒性试验的重要研究内容之一，其研究重点是解释毒性试验结果和预测人体安全性，而不是简单描述受试物的基本动力学参数特征。

毒代动力学研究在安全性评价中的主要价值体现在：

（一）阐述毒性试验中受试物和/或其代谢物的全身暴露及其与毒性反应的剂量和时间关系；评价受试物和/或其代谢物在不同动物种属、性别、年龄、机体状态（如妊娠状态）的毒性反应；评价非临床毒性研究的动物种属选择和用药方案的合理性。

（二）提高动物毒性试验结果对临床安全性评价的预测价值。依据暴露量来评价受试物蓄积引起的靶部位毒性（如肝脏或肾脏毒性），有助于为后续安全性评价提供量化的安全性信息。

（三）综合药效及其暴露量和毒性及其暴露信息来指导人体试验设计，如起始剂量、安全范围评价等，并根据暴露程度来指导临床安全监测。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物。生物制品的毒代动力学研究可参考本指导原则（注释 2）。

二、基本原则

毒代动力学研究需执行《药物非临床研究质量管理规范》(GLP)(注释3)。

毒代动力学试验通常伴随毒性试验进行,常被称为伴随毒代动力学试验。开展研究时可在所有动物或有代表性的亚组或卫星组动物中进行,以获得相应的毒代动力学数据(注释4)。

三、基本内容

(一) 暴露量评估

毒代动力学试验的基本目的是评估受试物和/或其代谢物的全身暴露量,常通过适当数量的动物和剂量组来开展研究。伴随毒代动力学研究所用动物数量应保证能获得足够的毒代动力学数据。由于毒性试验中通常采用两种性别动物,暴露测定也应包括两种性别的动物。选择单性别动物时应说明理由(注释5)。

暴露评估应考虑以下因素(注释6): 血浆蛋白质结合、组织摄取、受体性质和代谢特征的种属差异、代谢物的药理活性、免疫原性和毒理学作用。在血浆药物浓度相对较低时,特殊的组织或器官也可能会有较高水平的受试物和/或其代谢物。对于血浆蛋白结合率高的化合物,用游离(未结合)浓度来表示暴露更为合适。

暴露评估中需关注血浆或体液中代谢物浓度的情况有: 1) 受试物为“前体化合物”且其转化生成的代谢物为主要活性成分; 2) 受试物可被代谢为一种或多种具有药理或毒理活性代谢物,且代谢物可导致明显的组

织/器官反应；3) 受试物在体内被广泛代谢，毒性试验仅可通过测定血浆或组织中的代谢物浓度来进行暴露评估。

(二) 毒代动力学参数

毒代动力学研究是通过测定合适时间点的样品浓度来计算动力学参数的。暴露程度可用原型化合物和/或其代谢物的血浆（血清或全血）浓度或 AUC 来表示。某些情况下，可选择测定组织中的受试物浓度（见注释 7）。

用于评估的毒代动力学参数通常有： AUC_{0-T} 、 C_{max} 、 $C_{(time)}$ 。某些试验可考虑仅开展毒代动力学的监测或特征的研究（注释 8）。

(三) 给药方案

毒代动力学试验的给药方案设计应完全参照毒性试验研究方案，包括给药剂量、途径、动物种属选择和给药频率、周期等。为达到毒性反应的最大暴露，应评估高剂量水平下受试物和/或其代谢物的暴露程度（注释 9）。

某些情况下，非临床试验中可能会采用与临床拟用药方式不同的给药方式（如不同的给药途径、不同制剂）开展毒性试验，此时应依据暴露量评估全身暴露是否充分。

(四) 样品采集

伴随毒代动力学研究中，样品采集的时间点应尽量达到暴露评价所需的频度，但不可过于频繁，避免干扰毒性试验的正常进行并引起动物过度的生理应激反应。每项研究中的时间点数量应满足暴露评价的要求，时间

点的确定应以早期毒性试验、预试验或剂量探索毒性试验以及在相同动物模型或可以合理外推的其它动物模型上获得的动力学数据为基础。

应该考虑样品是从所有的实验动物采集,还是从具有一定代表性的亚组或卫星组动物采集。通常情况下,在大动物的毒性试验中毒代动力学数据从主研究实验动物收集,而啮齿类动物的毒性试验中毒代动力学数据可从卫星组实验动物收集。

采集血样的前提是受试物在血浆中的暴露量与作用靶点或毒性靶点的受试物浓度存在动态平衡关系,并且受试物容易进入动物和人的全身系统。若血液中受试物暴露量无法反映靶组织或器官的毒性反应时,则可能需要考虑采用尿液、其他体液、靶组织或器官来测定受试物浓度。

(五) 分析方法

毒代动力学的分析方法应基于早期建立的分析物和生物基质(生物体液或组织)的分析方法,且要根据代谢和种属差异而定。分析方法应具有特异性,并且有足够的精确度和精密度,检测限应满足毒代动力学研究时预期的浓度范围。分析物和生物基质分析方法的选择应排除样本中内源性物质可能引起的干扰。

如果分析物是消旋体或对映异构体的混合物,应予以说明。

生物样品分析方法的具体技术要求可参考《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》中的相应内容。

(六) 数据统计与评价

暴露评价的数据需有代表性。由于动力学参数多存在个体差异,且毒代动力学资料多来源于小样本的动物,因此通常难以进行高精度的统计学

处理。统计分析时应注意求算平均值或中位数并评估变异情况。某些情况下，个体动物的数据比经整理、统计分析过的成组数据更为重要。

如果进行了数据转换（如对数转换），应提供理由。

在评估连续给药是否引起体内蓄积时，不仅要观察是否出现蓄积现象，还要结合受试物半衰期长短、受试物暴露对关键代谢酶或转运体的影响等方面进行分析，并注意种属差异。

（七）报告

完整的毒代动力学资料应包括对毒代动力学研究结果的自身评价和对毒性反应的相关解释，并报告分析方法，说明分析中所选生物基质和分析物的理由。毒代动力学的结果分析中，应比较分析受试物和/或其代谢物的药效、毒性、药代和临床拟定用药的暴露量，采用暴露量来评估受试物的安全范围。

四、毒代动力学在不同毒性试验中的应用

毒代动力学研究在不同毒性试验中的内容，如暴露监测和特征描述的频度，可根据研究需要有所增减。不同毒性试验的毒代动力学研究考虑如下：

（一）单次给药毒性试验

单次给药毒性试验的毒代动力学研究结果有助于评价和预测剂型选择和给药后暴露速率和持续时间，也有助于后续研究中选择合适的剂量水平。

（二）重复给药毒性试验

毒代动力学研究内容一般应纳入重复给药毒性试验设计中，它包括首次给药到给药结束全过程的定期暴露监测和特征研究。后续毒性试验所采

用的方案可依据前期试验的毒代研究结果修订或调整。当早期毒性试验出现难以解释的毒性问题时,可能需要延长或缩短对该受试物的毒性监测和特征研究的时间,或修订研究内容。

(三) 遗传毒性试验

当体内遗传毒性试验结果为阴性时,需结合暴露量数据来评估遗传毒性风险,尤其是当体外试验显示为明确的阳性结果或未进行体外哺乳动物细胞试验时。

体内暴露的评估应采用与遗传毒性试验相同的动物种属、品系和给药途径,在最高剂量或其他相关剂量中进行。体内暴露可通过试验中所显示的体内细胞毒性(如微核试验中所检测组织的未成熟红细胞占红细胞总数的比例发生显著变化)或暴露情况(测定血液或血浆中的受试物和/或其代谢物的暴露,或直接测定靶组织中的受试物和/或其代谢物的暴露)来证明。

若体外遗传毒性试验结果为阴性,可采用上述方法或者为其他目的进行的啮类齿动物药代/毒代试验结果,结合体内暴露进行评估。

(四) 生殖毒性试验

生殖毒性毒代动力学研究主要目的在于分析生殖毒性试验的结果,有助于确定生殖毒性试验中不同阶段的不同剂量是否达到了充分暴露。应考虑妊娠期与非妊娠期动物的动力学特征的可能差异。

毒代动力学数据可以来自生殖毒性试验的全部动物,也可以来自部分动物。毒代动力学数据应包括胎仔/幼仔数据,以评价受试物和/或代谢产物能否通过胎盘屏障和/或乳汁分泌。

（五）致癌性试验

1. 剂量探索研究

为获得有助于主研究的毒代动力学资料，剂量探索研究中需适当开展毒代动力学的监测或特征描述，尤其应注意在早期毒性试验中未采用的动物种属、品系以及首次采用的给药途径和方法等情况。

应特别注意掺食给药情况下获得的毒代动力学数据。应根据受试动物和人可能达到的全身暴露量来确定致癌性试验中的合适的最高剂量。致癌性试验所选择剂量产生的全身暴露量应超过人用最大治疗剂量时暴露量的若干倍。

2. 主研究

试验方案、动物种属及品系的选择应尽可能根据已有的药代动力学和毒代动力学资料来考虑。

建议通过监测来确保主研究中的暴露与独立的或特定的剂量探索研究所获得的动力学特征描述相一致。这种动力学监测可在试验中的某些时间点即可，超过6个月的监测通常无必要。

五、参考文献

1. 国家食品药品监督管理局药品注册管理办法，附件2：第四项：（二）说明：第8条，2007.

2. ICH Guideline S3B, Pharmacokinetics: repeated dose tissue distribution studies, 1995.

3. ICH Guideline S3A , Toxicokinetics: A guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies, 1995.

4. OECD Guideline: Toxicokinetics (draft), 2008.

六、注释

注释 1: 通常情况下，受试物的药理作用与作用部位受试物浓度的相关性比与给药剂量的相关性好。同样，受试物的毒性反应与特定毒性靶器官或组织的受试物浓度相关性较好。如果受试物在靶部位是高渗透性的，该部位的受试物浓度应该与血液中的受试物呈动态平衡和一定比率，可以采用测定血浆或血液中受试物浓度来反映靶部位的受试物暴露量。但有时受试物的系统暴露量与毒性反应缺乏很好的相关性，这时应进行慎重分析，一般有两种情况：1) 所选择的分析物不正确，它不是毒性产生的物质基础；2) 全身的系统暴露量与毒性靶器官或器官暴露量之间的变化不平行。此时需测定靶部位的暴露量来评价其毒性或借助于数学模型来揭示全身暴露量与毒性靶器官的暴露量之间的关系，利用这种关系来间接反映全身暴露量与毒性之间的关系。

注释 2： 关于中药的适用性，可参考相关非临床安全性评价的技术指导原则和非临床药代研究技术指导原则，在此不再阐述。生物制品中的大分子治疗用蛋白、抗体等通常需要进行毒代动力学研究，可参考该指导原则。

注释 3: 毒代动力学研究中的动物试验和样品分析工作有的是在非临床研究机构中完成；也有的是在非临床研究机构中完成动物给药和采样，而在生物分析试验室中完成样品分析和数据处理。无论何种情况，毒代动力学研究的样品分析和数据处理工作除需遵守《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》的技术要求外，还需严格遵循 GLP。

注释 4: 毒性试验最好采用伴随的动物暴露量数据来解释毒性反应、种属差异、预测人体毒性等。但是，当毒代动力学研究的样品收集可能会影响毒性试验结果时，需考虑采用卫星组动物研究。

注释 5: 毒性试验中应采用合适的动物数和剂量组数对全身暴露量进行估计。一般情况下，建议受试物的每个剂量组至少每性别 4 只动物。若有证据提示受试物在性别间有明显毒性差异，试验中可选择敏感性别的动物。

注释 6: 为了更好地用“受试物体内暴露”在“给药剂量”与“受试物毒性”之间搭建桥梁，在讨论毒代动力学结果时，应了解：受试物的毒性反应是因其药效作用随剂量升高而产生的，还是来自与药效作用机制不同的其他机制；受试物的毒性反应是来自受试物化合物本身，还是来自其代谢物；血浆蛋白结合与受试物毒性反应的关系；受试物的血药浓度与其在产生毒性反应的脏器中浓度之间的关联性等。

注释 7: 测定组织中受试物暴露量的可能情况有：长半衰期受试物；不完全清除；出现非预期的毒性靶器官等。

注释 8: 监测 (monitor) 是指在给药间期内采血 1~3 时间点，用以估算 $C_{(time)}$ 或 C_{max} ，常在给药开始和结束时取样，单剂量毒性给药试验或较短期的重复给药毒性试验可考虑开展暴露量监测。特征 (profile) 是指在给药间期采血样 4~8 时间点，用以估算 C_{max} 和/或 $C_{(time)}$ 和 AUC。

注释 9: 当毒代动力学数据表明受试物的吸收特性限制了原型受试物化合物和/或代谢物暴露，且无其他剂量限制因素存在时，该化合物能达到最大暴露的最低剂量将被认为是可采用的最高剂量。当增加剂量导致非线性动力学时，应特别注意其与毒性研究中毒性反应的关联性，非线性动力学并不意味着剂量不可以递增，也不意味着不会有新毒性反应出现。

药物 QT 间期延长潜在作用 非临床研究技术指导原则

一、概述

心电图（ECG）中 QT 间期（从 QRS 波群开始到 T 波结束）反映心室去极化和复极化所需的时间。当心室复极化延迟和 QT 间期延长，尤其伴有其他风险因素（如低血钾、结构性心脏病、心动过缓）时，患者发生室性快速心律失常的风险增加，包括尖端扭转型室性心动过速（torsade de pointes, TdP）。

本指导原则主要是关于评价受试物延迟心室复极化潜在作用的非临床研究策略，以及对非临床研究信息的分析和综合风险性评估。QT 间期研究结果可以和其他信息一起，用来阐明药物作用机制，以及对人体的延迟心室复极化和延长 QT 间期的风险评估。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物。

二、基本原则

（一）试验方法

《药物安全药理学研究技术指导原则》中所述的关于研究设计的基本原则和推荐方法，也适用于本指导原则。建议采用体内和体外的方法进行研究。

应基于受试物的药效学、药代动力学、安全性的特点对研究方法设计、风险性证据进行个体化分析。

（二）执行 GLP 的要求

体外试验建议执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）规范，体内试验遵循 GLP，追加研究（Follow-up studies）应在最大可行限度内遵循 GLP。

（三）受试物

中药、天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较长时，应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等，并符合试验要求。

在药物研发的过程中，若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

三、基本内容

(一) 试验设计的基本要求

1. 生物材料

应选择合适的试验体系和动物种属。体外研究可采用离体心肌细胞、培养心肌细胞系或克隆的人离子通道的异种表达体系、离体心脏标本。用于体外研究的组织和细胞标本可来源于不同的实验动物，包括兔、雪貂、豚鼠、犬、猪。当采用原代组织或细胞时，应考虑所用标本的特点及来源，因为离子通道的分布可因组织和细胞类型而不同。

用于整体研究的动物包括犬、猴、猪、兔、雪貂以及豚鼠。

成年大鼠和小鼠复极化的离子机制不同于包括人在内的大动物种属（在成年大鼠、小鼠，复极化的主要离子流是 I_{to} ），因此用这些种属的组织或动物是不合适的。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，并具有实验动物质量合格证明。

2. 样本量

体外试验：体外样本量每组不少于 4 个平行样本，一般 3~5 个组。

体内试验：试验组的组数及每组动物数的设定，应以能够科学合理地分析所获得的试验结果，恰当地反映有生物学意义的作用，并符合统计学

要求为原则。小动物每组一般不少于 10 只，大动物每组一般不少于 6 只，一般雌雄各半。

3.剂量

体外研究中，受试物的浓度应涵盖和超过预期临床最大治疗血药浓度。试验中逐步提高药物浓度直到出现特征性的浓度-反应曲线或达到因受试物理化特性所限的最高浓度。除了受到细胞或组织活性的限制外，理想状态下应有充分的药物暴露时间以获得稳态电生理效应，应注明药物暴露时间的长短。体外研究中应使用合适的阳性对照药，以确认该体外试验系统的敏感性。

体外研究应确定受试物的浓度-效应关系。当体外研究无明显作用时，应对浓度选择的范围进行说明。

整体试验剂量范围应与《药物安全药理学研究技术指导原则》的原则一致。如果可能，剂量范围应包括和超过预期的人暴露水平。当给药剂量可能会因动物的耐受性而受到限制时，如动物出现呕吐、震颤、活动过度等，可采用静脉给药或麻醉动物进行研究。当研究用于评价延迟心室复极化程度与原药及代谢产物浓度关系时，可采用持续静脉滴注的方式控制药物暴露水平。监测受试物及其代谢产物的暴露量有助于解释药物的量效关系或剂量或浓度-反应，也为设计可能追加的试验提供信息。

4.对照

体外离子通道和动作电位时程试验中应采用次最大有效浓度(即药物对通道的抑制率达 70%~80%时的浓度)的阳性对照药说明试验系统的反

应性，并且应用于每项试验。整体试验研究中使用阳性对照药则是为了验证试验系统的敏感性，但不必在每一项试验中都使用阳性对照药。

如受试物在化学结构/药理分类上属于与延长人体 QT 间期或促心律失常有关的药物时，在体内外研究中应与现有同类药物比作用强度。

5. 给药途径

整体动物试验，首先应考虑与临床拟用途径一致，可以考虑充分暴露的给药途径。对于在动物试验中难以实施的特殊的临床给药途径，可根据受试物的特点选择，并说明理由。

6. 观察时间

结合受试物的药效学和药代动力学特性、实验动物、临床试验方案等因素选择观察时间点和持续时间。

(二) 主要研究内容

1. 主要研究

1.1 采用离体动物或人心肌细胞、培养心肌细胞系或克隆的人离子通道的异种表达体系测定离子流。

1.2 测定清醒或麻醉动物的 ECG 参数。

1.3 在离体心脏标本进行动作电位参数测定，或在麻醉动物中进行能体现动作电位时程的特异性电生理参数检测。

1.4 在离体心脏标本或动物进行致心律失常作用测定。

可先进行 1.1、1.2 研究，再进行 1.3、1.4 研究。

综上所述，可采用体内外方法从 4 个不同方面对受试物的 QT 间期作用进行研究，并且相互之间有互补作用。

2. 追加研究

当非临床研究的结果不一致，和/或临床研究结果与非临床研究结果不一致时，可通过回顾性评价和追加研究进行分析。此种情况下，追加的研究结果可能成为综合风险评估的重要组成部分。

追加的研究是为了更深入地了解或提供更多的关于受试物潜在的延迟人心室复极化和延长 QT 间期的作用。这些研究可以提供更多有关作用强度、作用机制、剂量反应曲线的斜率或最大反应幅度的信息。追加的研究可以针对某一特殊问题设计试验，因此各种体外或体内的研究设计都可应用。

在选择和设计追加研究中，以下内容需与已有的非临床和临床信息一并考虑：

- 用离体心脏测量记录动作电位以评价心室肌复极化；
- 在麻醉动物用一些能反映动作电位时程的特殊电生理参数；
- 动物的种类和性别的选择；
- 用代谢诱导剂或抑制剂；
- 用目前已知阳性对照物或参比物；
- 未研究的对其他通道的抑制作用；
- 多时间点测定电生理参数；
- 在清醒动物难以解释的作用，如受试物对心率、自主神经紧张的影响，或受试物的毒性，如震颤、抽搐或呕吐；
- 如药物有蓄积、临床长期使用，需考虑多次给药的观察。

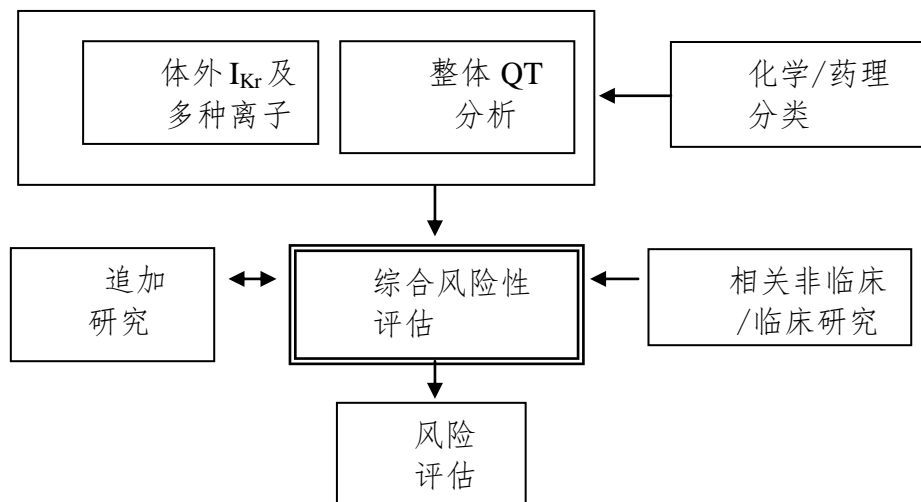
四、结果分析与评价

综合风险评估应该是基于科学的、对受试物个性化的考虑。这种综合风险性评估有益于临床研究设计和其结果的分析。应结合药效学、毒理学、

药代动力学以及其他研究资料进行综合评价,为药物应用于人体的安全性提出建议。

风险评估应考虑受试物是否在化学结构或药理分类上属于可延长人QT间期作用的药物,如某些抗精神病类药物、组胺H₁受体拮抗剂、氟喹诺酮类等。这可能会影响参比物的选择并会纳入综合风险评估中。

对QT间期影响的非临床研究策略如下图



五、参考文献

1.ICH, ICH Guidance for Industry ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, 2001.

2.ICH, ICH Guidance for Industry ICH S7B: Safety Pharmacology Studies for assessing the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by Human Pharmaceuticals, 2005.

3.Liu T, Brown BS, Wu Y, Antzelevitch C, Kowey PR, Yan GX. Blinded validation of the isolated arterially perfused rabbit ventricular wedge in preclinical assessment of drug-induced proarrhythmias, Heart Rhythm 2006; 3: 948-956.

六、附录一试验方法

(一) 体外试验

评价药物对离子电流的影响，主要包括 I_{Kr} 和其他几种参与心肌电活动的重要离子通道。体外 I_{Kr} 试验是采用原代心肌细胞或表达 I_{Kr} 通道蛋白（如由 hERG 编码的蛋白）的细胞系评价药物对离子电流的影响。相关研究方法见参考文献。检测中获得 IC_{50} 的基本参数项目列于表 2。

表 1 致心律失常作用试验检测的心肌离子通道

通道种类	阳性对照（参考）	参考文献
Cav1.2 (L-type)	尼非地平 (Nifedipine)	Shen J et al Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes <i>JPET</i> , 2000; 294:562–70 Zahradnik I, Minarovic, I and Zahradnikova A Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by antidepressant drugs <i>JPET</i> , 2008; 324:977–84
hERG	西沙必利 (Cisapride) 或 特非那定 (Terfenadine)	Helliwell R, <i>Recording hERG potassium currents and assessing the effects of compounds using the whole-cell patch-clamp technique</i> Jonathan D Lippiat (ed), <i>Methods in Molecular Biology, Potassium Channels</i> , 2008; 491: 279–95 Kamiya K et al Molecular determinants of hERG channel block by terfenadine and cisapride <i>J Pharmacol Sci</i> , 2008; 108:301-7 Gintant GA et al Utility of hERG assays as surrogate markers of delayed cardiac repolarization and QT safety <i>Toxicol Pathol</i> , 2006; 34:81-90
Kv1.5	4-氨基吡啶 (4-Aminopyridine, 4-AP)	De Biasi M et al Open channel block of human heart hKv1.5 by the beta-subunit hKv beta 1.2 <i>Am J Physiol</i> 1997 272: H2932-41 Lagrutta A et al Novel, potent inhibitors

		of human Kv1.5 K ⁺ channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current <i>JPET</i> ,2006;317:1054-63
Kv4.3	氟卡尼(又名哌氟酰胺, Flecainide) 或 4-AP	Radicke S et al Effects of MiRP1 and DPP6 β -subunits on the blockade induced by flecainide of KV4.3/KchIP2 channels <i>Br J Pharmacol</i> 2008, 154: 774-86 Fischer F et al Inhibition of cardiac Kv1.5 and Kv4.3 potassium channels by the class Ia anti-arrhythmic ajmaline: mode of action <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol</i> , 2013, online, Jul
KvLQT1/minK	二乙酰醇 293B (Chromanol-293B)	Yang WP et al KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias <i>PNAS</i> , 1997; 94:4017-4021 Seebohm G et al Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine <i>Mol Pharmacol</i> , 2003, 64:70-7
Nav1.5	利多卡因 (Lidocaine)	Wu L et al Role of late sodium current in modulating the proarrhythmic and antiarrhythmic effects of quinidine <i>Heart Rhythm</i> , 2008; 5: 1726-34 McNulty, MM and Hanck, DA State-dependent mibefradil block of Na ⁺ channels <i>Mol Pharmacol</i> , 2004; 66:1652-61
Kir2.1	钡(Barium)或氯喹 (Chloroquine)	Rodriguez-Menchaca AA et al , The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel <i>PNAS</i> , 2008; 105:1364-8 Schram G et al Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents:evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents <i>Cardiovasc Res</i> , 2003, 59: 328-38

观察记录上述所有离子通道的相关试验建议在 GLP 实验室进行

表 2 检测阻断离子通道 IC₅₀ 所需的参数项目

参数项目	IC ₅₀
试验平台	手动膜片钳记录系统
所需浓度	4 种
每一浓度下重复试验例数	n=3
阳性对照	n=2
溶媒对照	1 个浓度, n=3
检测温度	室温 (RT)或生理性温度 (PT)
浓度范围	通过预实验确定
试验方案和报告	GLP 格式
累积曲线	+
分析样品收集	+
PDF 格式的电子文档	+

(二) 整体研究

整体 QT 研究主要是测定心室复极参数, 如 QT 间期。该试验可在安全药理学研究中同时进行, 这样可减少动物和其他资源的使用。

QT 间期和心率是相反的、非线性的关系, 且二者之间的关系在不同的种属和动物甚至同一种属之间都不相同。因此心率改变会影响 QT 间期, 这会干扰对受试物影响心室复极化和 QT 间期的评价。故在 QT 间期分析时, 应采用心率校正 QT 间期 (QTc) 来进行, 常用的有 Bazett 和 Fridericia 法; 心率校正公式的选择须根据试验系统得来的数据加以判断, 如果给药组和对照组心率差异较大, 可能校正公式对于评价 QT 间期延长风险是无

效的，此时可改用心脏起搏器来获得固定的心率。对 QT/RR（心电图中心电图中 R 波与 R 波的距离）关系进行分析可能更合适，包括用公式对个体动物 QT 间期数据进行校正。

在犬或猴等大动物记录 ECG，是安全性评价的基本组成。药物引起 QT 间期显著延长将使致命性心律失常 TdP 发生的风险显著增加，因而 ECG 的 QT 间期被作为预测新化合物引起 TdP 的重要风险因素。鉴于犬、猴和小型猪等大动物在心肌离子通道构成和功能方面与人类具有高度相似性，通常用于整体 QT 分析研究中。整体 QT 分析试验可在麻醉和清醒动物进行，具体方法参见表 3 所列文献。

表 3 整体 QT 研究试验常用动物

动物		参考文献	试验参数
麻醉动物	犬	Ollerstam, A et al Comparison of the QT interval response during sinus and paced rhythm in conscious and anesthetized beagle dogs <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007;56: 131-44 Chiba K, et al In vivo experimental approach for the risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents-induced long QT syndrome <i>Eur J Pharmacol</i> , 2004;486:189-200	ECG 相关参数，包括（形态、心率、节律、P 波电压、R 波电压、T 波电压、PR 间期、RR 间期、QRS 时间、QT 间期、QTc 间期）
	猴	Ishizaka T et al Evaluation of drug-induced QT prolongation in a halothane-anesthetized monkey model: effects of sotalol <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2009;59:86-93	
	猪	Authier S et al Cardiovascular and respiratory safety pharmacology in Göttingen minipigs: Pharmacological characterization <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2011;64:53-9	

遥测动物	犬	Batey AJ, Doe PA A method for QT correction based on beat-to-beat analysis of the QT/RR interval relationship in conscious telemetred beagle dogs <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> ,2002;48: 11-9 Fossa AA Assessing QT prolongation in conscious dogs: validation of a beat-to-beat method <i>Pharmacol Ther</i> , 2008;118:231-8	
	猴	Ando K et al QT PRODACT: In vivo QT assay with a conscious monkey for assessment of the potential for drug-induced QT interval prolongation <i>J Pharmacol Sci</i> ,2005;99: 487-500 Haushalter TM et al The cardiovascular and pharmacokinetic profile of dofetilide in conscious telemetered beagle dogs and cynomolgus monkeys <i>Br J Pharmacology</i> ,2008;154: 1457-64	
	猪	Stubhan et al Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Göttingen Minipig <i>J Pharmacol Toxicological Methods</i> ,2008, 57: 202–11 Kano M et al QT PRODACT: Usability of miniature pigs in safety pharmacology studies: Assessment for drug-induced QT interval prolongation <i>J Pharmacol Sci</i> ,2005, 99:501–11	
麻醉动物	犬	Takahara A et al Effects of mexiletine on the canine model of sparfloxacin-induced long QT syndrome <i>Eur J Pharmacol</i> ,2003,476:115-22 Chiba K et al Proarrhythmic effects of fluoroquinolone antibacterial agents: in vivo effects as physiologic substrate for Torsades <i>Toxicol Appl Pharmacol</i> , 2000, 169:8-16 Kimura K et al Hemodynamic and electrophysiological effects of mitemincin (GM-611), a novel prokinetic agent derived from erythromycin in a halothane-anesthetized canine model <i>J Toxicol Sci</i> , 2007,32:231-9	血流动力学检测，包括MAP、SBP、DBP、HR、ECG、单相动作电位(MAP)等

注：Göttingen minipigs:哥根廷小型猪。上述整体 QT 研究相关试验建议在 GLP 实验室进行

(三) 追加的研究

药物对心肌动作电位（Action potential, AP）的影响：心脏的正常功能依赖于心肌细胞动作电位的产生和传导。药物引起细胞膜离子通道表达或功能异常是其导致心律失常的重要病理生理基础。因此，在离体心脏标本进行动作电位参数测定，是 ICH 推荐的 QT 间期延长药物安全性评价体系中的重要组成之一。常用于动作电位参数测定的动物离体心脏标本及试验方法见表 4，试验中重要的参数项目见表 5。

表 4 记录心肌 AP 的离体心肌标本

动物标本	参考文献
犬蒲肯野纤维	Terrar, DA et al Comparison of guinea-pig ventricular myocytes and dog Purkinje fibres for in vitro assessment of drug-induced delayed repolarization <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 56: 171-85 Lightbown ID et al Towards automation of a valuable preclinical cardiac safety pharmacology assay: Evaluation of the effects of cardiac ion channel blockers on cardiac repolarisation in vitro <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007;56:194-202 Limberis JT et al The effects of plasma proteins on delayed repolarization in vitro with cisapride, risperidone, and D, L-sotalol <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 56:11-7
兔蒲肯野纤维	Himmel HM Suitability of commonly used excipients for electrophysiological in-vitrosafety pharmacology assessment of effects on hERG potassiumcurrent and on rabbit Purkinje fiber action potential <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 56: 145-58 Ducroq J et al Action potential experiments complete hERG assay and QT-interval measurements in cardiac preclinical studies <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 159-70

豚鼠心室肌细胞	<p>Hagiwara T et al A comparative study of the fluoroquinolone antibacterial agents on the action potential duration in guinea pig ventricular myocardia <i>Jpn J Pharmacol</i>, 2001; 87: 231–34</p> <p>Shuba LM et al Action potentials, contraction, and membrane currents in guinea pig ventricular preparations treated with the antispasmodic agent terodiline <i>JPET</i>, 1999; 290:1417-26</p>
豚鼠心室乳头肌	<p>Hayashi S et al QT PRODACT: a multi-site study of in vitro action potential assays on 21 compounds in isolated guinea-pig papillary muscles <i>J PharmacolSci</i>,2005; 99:423-37</p>
Langendorff离体心脏	<p>Milberg P et al Proarrhythmia as a class effect of quinolones: increased dispersion of repolarization and triangulation of action potential predict torsades de pointes <i>J Cardiovasc Electrophysiol</i>, 2007; 18:647-54</p> <p>Clements-Jewery H et al Actions of flecainide on susceptibility to phase-2 ventricular arrhythmias during infarct evolution in rat isolated perfused hearts <i>British J Pharmacol</i>, 2006; 147: 468–75</p> <p>ChengHC and Incardona J Models of torsades de pointes: effects of FPL64176, DPI201106, dofetilide, and chromanol 293B in isolated rabbit and guinea pig hearts <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i>, 2009; 60: 174-84</p>
冠状动脉灌注兔左心室肌楔形标本	<p>ChenX et al Use of arterially perfused rabbit ventricular wedge in predicting arrhythmogenic potentials of drugs <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i>, 2006;54: 261-72</p> <p>Liu T, Brown BS, Wu Y, Antzelevitch C, Kowey PR, Yan GX. Blinded validation of the isolated arterially perfused rabbit ventricular wedge in preclinical assessment of drug-induced proarrhythmias <i>Heart Rhythm</i> 2006; 3: 948-956</p>

上述研究相关试验建议最大可能执行 GLP

表 5 心肌动作电位试验中的重要参数项目

三浓度检测参数项目	测试
测试浓度数	3
检测每一个受试物所需的蒲肯野纤维数或心肌细胞数	4
用于对照品的蒲肯野纤维数或心肌细胞数	4
累积曲线	+
在生理温度 (37 ±1 °C) 下进行试验	+
统计学分析	+
如果系 GLP 实验室, 收集样本的分析	+
报告	+
如果是 GLP 实验室, 要求有质量保证部门(Quality Assurance Unit, QAU)的检查, 包括同步、数据和报告的检查	+

可参考的文献

1. De Clerck F et al, In vivo measurement of QT prolongation, dispersion and arrhythmogenesis: application to the preclinical cardiovascular safety pharmacology of a new chemical entity, *FundamClinPharmacol*, 2002;16:125-40.

2. Sanguinetti MC, Mitcheson JS, Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome, *Trends Pharmacol Sci*,2005;26: 119-24.

3. Lawrence CL et al, Nonclinical proarrhythmia models: Predicting Torsades de Pointes, *J PharmacolToxicol Methods*,2005; 52: 46–59

4. Guth BD, Preclinical cardiovascular risk assessment in modern drug development, *ToxicolSci*, 2007; 97, 4–20.

5. Kettenhofen R, Bohlen H, Preclinical assessment of cardiac toxicity, *Drug Discov Today*, 2008;13:702-7.
6. Sugiyama A Sensitive and reliable proarrhythmia in vivo animal models for predicting drug-induced torsades de pointes in patients with remodelled hearts, *Br J Pharmacol*, 2008;154:1528-37.
7. Valentin JP, Hammond T Safety and secondary pharmacology: Successes, threats, challenges and opportunities, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2008;58: 77–87.
8. Valentin JP et al A framework to assess the translation of safety pharmacology data to humans, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2009;60:152–58
9. Amanfu, RK, Saucerman, JJ, Cardiac models in drug discovery and development: a review, *Crit Rev Biomed Eng*, 2011;39:379-95.
10. Mikhailov D, Traebert M, Lü Q, Whitebread S, Egan W Should cardiosafety be ruled by hERG inhibition? Early testing scenarios and integrated risk assessment, (Bernard Faller and Laszlo Urban ed, *Hit and Lead Profiling- Identification and Optimization of Drug-like Molecules*, 2010; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

非临床安全性评价供试品检测要求的 Q&A

Q1. 在非临床安全性评价中为何需进行供试品检测？

A: 供试品是非临床安全性评价获得可信结果的基础。供试品分析揭示受试品的质量和配制的准确性，为临床前安全评价中发现的问题（如毒性与剂量关系等）提供可靠的科学参考。如果供试品存在问题，安评的结果可能失去了技术评价的价值，甚至可能误导新药的后期开发。鉴于供试品检测对于新药安全性评价具有重要意义，应该在安全性评价试验中进行供试品检测。

在开展非临床安全性评价之前，申请人向评价机构提供合格的供试品，该供试品质量符合已定的质量标准（提供检验报告），其有效期满足试验周期的要求（提供前期的稳定性研究报告）。

合格的供试品在给予动物之前，需要经过运输、保存、配制（混合、溶解或混悬、稀释等）、配制后保存、场内运输等过程，这些过程可能会影响供试品的稳定性。另外，样品配制后也需要分析确认配制的供试品浓度（含量）。

Q2. 非临床安全性评价供试品检测适用范围？

A: 化学药物。生物技术药物建议参考该要求执行，遵从 Case by case 的原则。

Q3. 目前用于非临床安全性评价试验的供试品质量信息提供方面存在的主要问题？

A: 供试品的重要信息缺失，如制剂来源、批号、纯度、浓度、处方组成、稳定性、溶解性、有效期、保存条件，供试品浓度和含量分析的方法学验证资料和配制后供试品质量检测结果等。另外，试验样品制备工艺不成熟，可能导致不同批次的样品质量（含量、纯度、杂质、晶型等）不一致，进而影响安全性评价试验数据的准确、可靠。

Q4. 毒理试验申报资料中应有哪些供试品检测结果、信息？有何格式要求？

A: 毒理试验报告中应该含有

(1) 供试品的基本理化性质检验报告单：包含来源、批号、纯度、浓度、处方组成包括辅料、稳定性、溶解性、有效期、保存条件等信息。

(2) 若供试品需经溶解后（混合、混悬、溶解）给药，应提供供试品在溶剂中的稳定性、均一性（非溶液体系）等检测报告（浓度范围需能覆盖全部毒理试验的浓度范围），以及配制后的供试品浓度分析报告。

(3) 针对检测供试品浓度和含量分析的方法学验证报告。

报告中上述信息应完整，但在格式方面无严格要求。

Q5. 谁提供供试品（原料药）质量检测报告？谁提供配制后的供试品含量分析方法的方法学验证资料？对照品如何要求？赋形剂作为阴性对照的要求？

A: 供试品检测方法的建立和验证，可以由申请人（含生产者）、GLP 试验机构或第三方完成，或由其中的一方完成后转移至另外一方进行检测；由验证方提供供试品检测方法学验证的资料。

配制后的供试品浓度分析方法的方法学验证资料,应由完成配制后的供试品浓度分析检测的 GLP 实验室提供。

必要时对对照品进行分析,对照品的分析要求与供试品相同。如果对照品为上市样品,其基本理化性质等资料可以参照对照品的说明书和/或标签。

如系采用特殊的赋形剂作为阴性对照,应由申请人(含生产者)提供该赋形剂质量检测报告。

Q6. 申请人提供的供试品质量检验报告和 GLP 实验室配制后的供试品检测的关系? 是否应该同时需要(如果必要)?

A: 申请人对供试品的检测是确认其符合拟定的质量标准,能够作为供试品进行毒理学试验,该质量检验报告与供试品同时提供给试验机构,以作为试验机构进行供试品分析的基础。

GLP 实验室开展的供试品分析是确认配制过程对稳定性的影响和配制的结果符合试验方案要求,是在配制后进行的。

质量检验与供试品分析两种检测都需要。

Q7. 如何确保供试品和配制后供试品质量?

A: 影响供试品的质量包括人员、仪器设备、配制后的保存条件、包装、贮存条件等,需保证每个批次的供试品均符合同一质检标准。

在进行正式毒理试验前,需对供试品的配制方法、配制后的保存条件下的稳定性、均一性进行检测和验证。验证通过后在正式试验时需严格按照要求保存和使用(如搅拌一定时间后使用)等,同时对保存条件(温度、是否避光等)进行严格控制。

涉及到供试品分析的各环节都必须遵从 GLP 规范。

Q8. 是否一定需要按 GLP 要求进行供试品和配制后供试品的检测？

A: 供试品（原料药或制剂）的质量检测可由申请人（含生产者）完成，但配制后供试品的检测工作必须在 GLP 条件下进行。

Q9. 为何需要进行供试品与溶剂混合物的稳定性检测？是否每次配制时都应进行供试品浓度分析？

A: 在首次配制前应完成稳定性分析，在前期稳定研究的基础上，对配制过程和配制后可能影响稳定性的因素都应进行研究，如溶媒、浓度、搅拌方法、温度、配制后储存时间等。应在这些研究完成后确定配药的频率，否则可能因质量改变（如含量明显下降或出现大量新杂质等）导致毒性暴露不充分或出现新的毒性。

无需在每次配药时均进行浓度分析。短期给药试验（如 14 天的试验）仅需在首次配制时检测供试品的浓度，但试验中如果伴随有 TK 试验，则 TK 给药当日的供试品也需进行浓度分析。对于长期试验（如 1 个月的试验），一般在首次及末次配制给药时进行供试品浓度分析（如果是每天配制，首末次配制日也是进行 TK 试验的日期）。如果试验周期更长（如 3 个月或长于 3 个月时），除首末次配制外，还需增加供试品浓度的检测次数，以确保供试品在该条件下的稳定性满足使用要求。

如果更换配制溶媒，需要重新进行方法学验证再测定。

Q10. 如果液体供试品是采用高浓度受试品稀释后给药，如何选择分析的浓度（是否每个浓度都分析）？

A: 建议每个配制后的浓度都进行分析。若确定为真溶液，采用系列稀释方法配制，测定低浓度即可。

Q11. 何种溶液制剂（真溶液、混悬液等）需要进行均一性的分析？与固体饲料混合的产品如何进行混合物（含量、稳定性、均一性）的检测？

A: 如果为混悬液则需要进行均一性分析，一般取混合后的液体上、中、下三部分进行分析。

混悬液等需在方法学验证时对配制方法均一性进行检测，后期试验使用验证后的配制方法进行配制。

固体饲料中供试品的含量检测要求如下：

(1) 进行致癌试验饲料中供试品含量测定前须确认已完成该供试品测定的方法学确证，同时需确认饲料中供试品的提取方法，并确保饲料中的其他成分对供试品含量测定无干扰。

(2) 采集饲料取样量一般为 10 g 左右。取样时一般在饲料的中部随机取样。取样后的饲料应按相应的保存条件保存并及时测定，测定结果偏差不得超过 20%。

一般首、末批次的饲料均需进行供试品含量测定，且每 3 个月需增加一次供试品含量测定。

(3) 均一性检测

测定时需同时从饲料的上层、中层及底部各取 10 g 左右饲料，测定供试品在饲料存在状态是否均一。测定结果的准确度介 80%~120%，且 RSD 不超过 20%时方可认为供试品在饲料中的均一性符合要求。

(4) 稳定性检测

根据供试品的稳定性及保存条件，决定稳定性的测定周期。需同时测定饲料刚加工好后的供试品含量及按照饲料保存条件存放一定时间后的供试品含量。从饲料中层取 10 g 左右饲料，根据确定的供试品含量测定

方法检测。结果评价：饲料存放一定时间后的供试品含量与刚加工好的供试品含量偏差不大于 10%。

Q12. 哪些情况下可不进行配制后供试品的检测？

A: (1) 如供试品无需配制直接使用，在供试品的质检报告可提供试验所需的信息（含量、浓度、保存条件、有效期）时，无需进行检测。

(2) 如供试品经过配制才可使用，建议所有的实验都进行配制后的供试品的分析。

Q13. 供试品分析的内容？

A: 包括：

(1) 供试品分析

质检标准的建立，包括含量（浓度）、纯度、保存条件及有效期等。

(2) 配制后供试品分析方法的建立与验证

特异性、灵敏度、精密度与准确度、线性范围、溶液稳定性、均一性（上、中、下三层）等。

(3) 分析指标

稳定性分析：分析配制过程和储存对供试品浓度和含量的影响。

浓度或含量分析：分析配制后的供试品浓度或含量，确认配制的准确性。

均一性分析：对非真溶液体系，开展均一性分析，对混悬液的上、中、下三层进行采样分析。

其他指标：必要时开展纯度等分析。

若无质量标准或无分析方法的供试品，应有详细说明，但只能用于非 GLP 试验。

Q14. 配制后的溶液及混悬液浓度与理论浓度可接受的误差是多少？

A：一般由专题负责人根据供试品的特性及具体毒理试验的要求在试验方案中确定该误差，但大部分实验室及大部分试验采用的范围是：溶液为±10%，混悬液为±15%。