ГРУППА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИНСТИТУТОВ

Институт экспериментальной фармакологии

НПО «Дом фармации»

Санкт-Петербургский институт фармации

Оптимальные подходы к изучению токсичности инновационных лекарственных средств

Селезнева Арина Игоревна

2015 год

Цель

Максимальная информативность
Минимальная стоимость
Достоверность полученных результатов
Эффективная оценка безопасности Инновационных Лекарственных средств
Минимальное количество животных - принцип 3R
Рациональное использование новейших методов
Соответствие Российским и международным Регламентирующим Стандартам

Виды Инновационных Лекарственных средств (ИЛС)

1. Новая субстанция;
2. Новая фиксированная комбинация (уже известных и/или новых субстанций);
3. Известная субстанция в новой лекарственной форме, с применением новых технологий производства, улучшающих биодоступность, стабильность и пр. (Липосомальные ЛФ, наносомальные ЛС, итд);
4. Известная субстанция, предполагающая другой путь введения;
5. Известная субстанция + вспомогательные вещества, не имеющие разрешения к медицинскому применению;

---

1 – Федеральный Закон от 12 апреля 2010 года N **61-ФЗ** «Об обращении лекарственных средств»;
2 - Innovative drug development approaches. Final report from the EMEA/CHMP-Think-Tank group on innovative drug development. EMEA, 2007;
3 – www.fda.com;
4 – А.С. Колбин, А.Б. Иванюк. Роль инновационных лекарственных препаратов в системе здравоохранения // Детская медицина Северо-Запада. 2011. Т.2, № 1. С. 16-20

Основные регламентирующие стандарты

1. Федеральный Закон от 12 апреля 2010 года N **61-ФЗ** «Об обращении лекарственных средств»;
2. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (утв. и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. № 544-ст);
3. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»;
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н., Бунатян Н.Д. и др. М., ЗАО «Гриф и К», 2012;
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях;
6. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, D.C. 1996;
7. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH);
8. OECD протоколы по тестированию химических веществ в токсикологических исследованиях.

Цель и Объем исследований безопасности Инновационных ЛС

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, 2012:

«Конечной целью доклинических токсикологических исследований является получение данных, достаточных для определения возможности и риска проведения клинических испытаний ЛС».

1. **Острая токсичность**
2. **Подострая (субхроническая) токсичность**
3. **Хроническая токсичность**
4. **Репродуктивная токсичность**
5. **Иммунотоксичность**
6. **Аллергизующие свойства**
7. **Мутагенность**
8. **Канцерогенность**
9. **Дополнительные токсикологические исследования**

Задачи оптимизации исследований токсичности Инновационных ЛС

- Выбор оптимального метода исследования
- Использование методов in vitro токсикологии как скрининговых
- Выбор доз и шага доз
- Выбор метода анализа данных с учетом прогноза ожидаемых результатов
- Выбор вида и пола животных
- Использование оптимального количества животных

Выбор оптимального метода исследования

Острая токсичность

- Острая токсичность в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н., 2012	
OECD №	
402	Острая кожная токсичность
403	Острая ингаляционная токсичность
404	Острое кожное раздражение
405	Острое глазное раздражение
420	Острая токсичность при внутрижелудочном введении, метод фиксированных доз
423	Острая токсичность при внутрижелудочном введении, кластерный метод
425	Острая токсичность при внутрижелудочном введении, метод «доза-ответ»
436	Острая ингаляционная токсичность, кластерный метод

1 - www.doclinika.ru

2 - Авдеева О.И. Доклад на Конгрессе «Человек и Лекарство» 2014 Гармонизация исследований по проведению острой токсичности в соответствии с российскими и зарубежными требованиям

Выбор оптимального метода исследования

Субхроническая и хроническая токсичность

- Исследование хронической токсичности (1, 3, 6, 9 или 12 мес.), кумулятивное действие на половозрелых особях в соответствии с Руководством ...под ред. Миронова А.Н, 2012;

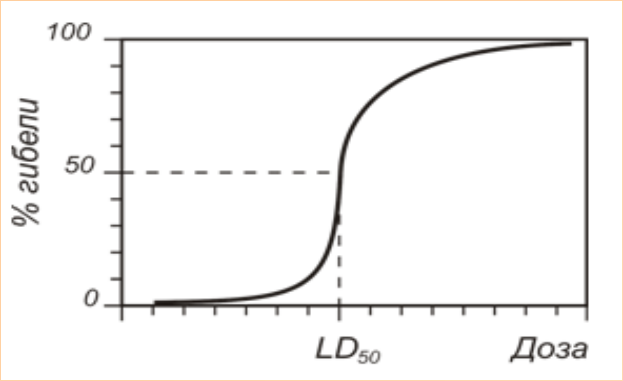
- Исследование хронической токсичности фармакологических веществ на кроликах с оценкой местно-раздражающего действия, в соответствии с Руководством..., 2012;

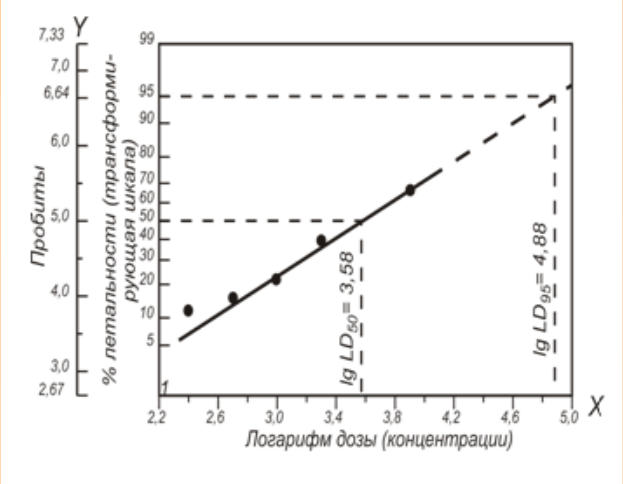
407	Хроническая 28 дневная токсичность при внутрижелудочном введении грызунам
408	Хроническая 90 дневная токсичность при внутрижелудочном введении грызунам
409	Хроническая 90 дневная токсичность при внутрижелудочном введении **не грызунам**
410	Хроническая токсичность при **накожном** нанесении в течении 21/28 дней
411	Субхроническая токсичность при **накожном** нанесении: 90-дневное исследование
412	Субхроническая токсичность при **ингаляционном** введении: 28-дневное исследование
413	Субхроническая токсичность при **ингаляционном** введении: 90 дневное исследование
418	Отсроченная нейротоксичность фосфорорганических веществ после острой токсичности
419	Отсроченная нейротоксичность при 28 дневном введении фосфорорганических соединений
452	Исследование хронической токсичности 12 мес.
453	Комбинированное исследование хронической токсичности и **канцерогенности**

Выбор метода анализа данных с учетом ожидаемых результатов

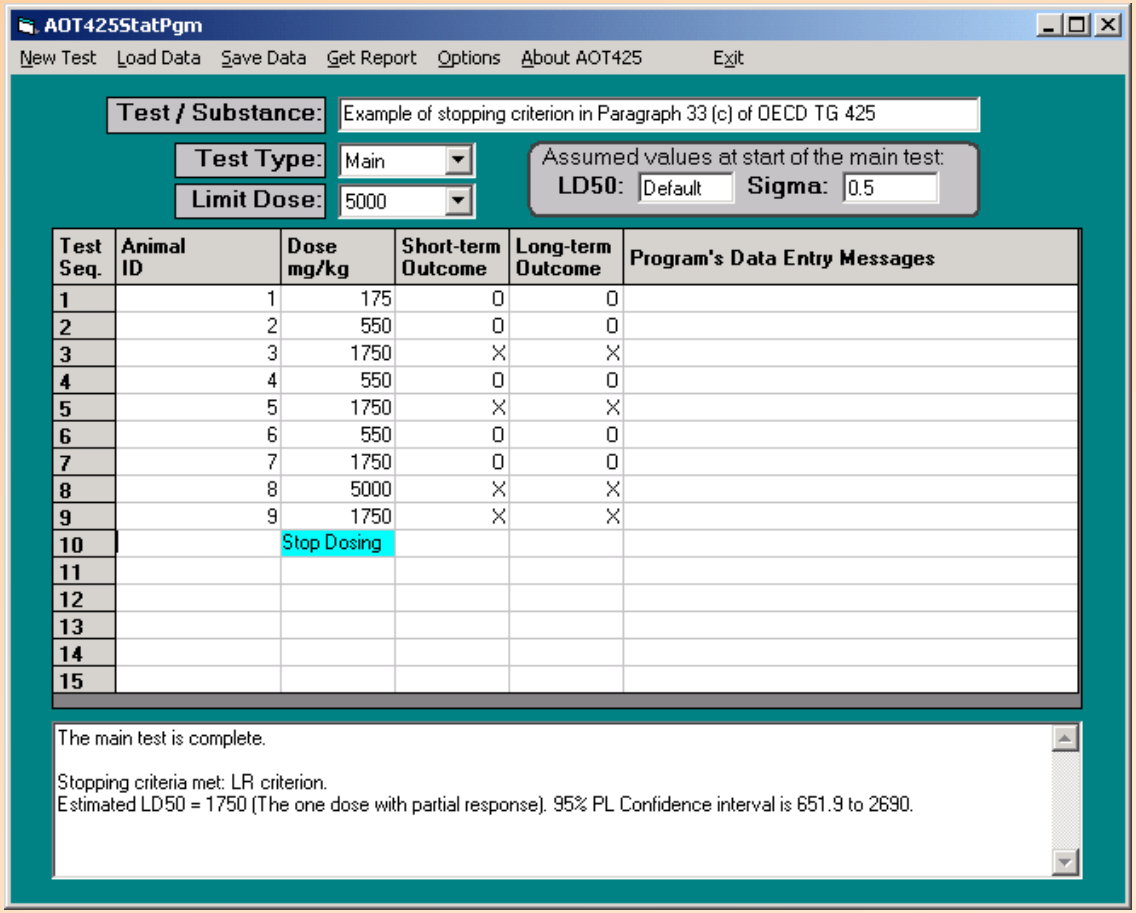
Оценка зависимости «Доза-эффект» при изучении токсичности

Пробит-метод*





Метод максимального правдоподобия (OECD 425)**



---

* - Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. 2007. Т. 7, № 3-4. С. 2090-2120;

** - Dixon W.J. (1991) Design and Analysis of Quantal Dose-Response Experiments (with Emphasis on Staircase Designs). Dixon Statistical Associates, Los Angeles CA, USA.

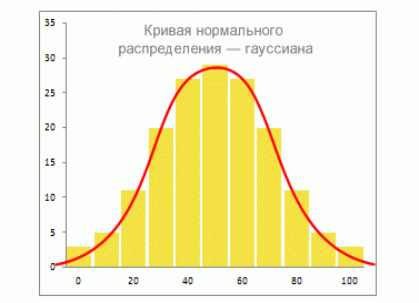
Выбор метода анализа данных с учетом ожидаемых результатов

Алгоритм выбора статистического критерия для анализа количественных данных

Данные подчиняются **нормальному закону** распределения				Данные **не** подчиняются нормальному закону распределения			
Независимые		Связанные		Независимые		Связанные	
Число сравниваемых групп							
2	3 и более	2	3 и более	2	3 и более	2	3 более
t- критерий для независимых выборок	Однофакторный дисперсионный анализ	t- критерий для повторных выборок	Дисперсионный анализ для повторных наблюдений	Критерий Манн-Уитни	Критерий Краскела-Уоллиса	Критерий Вилкоксона	Критерий Фридмана

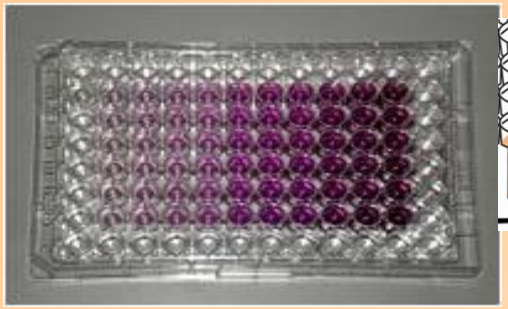
Алгоритм выбора статистического критерия для анализа *номинальных* данных

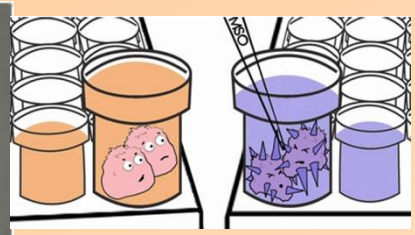
Независимые		Связанные	
Число групп сравнения			
2	3 и более	2	3 и более
Критерий хи-квадрат Пирсона, точный критерий Фишера, критерий хи-квадрат с поправкой Йейтса	Критерий хи-квадрат Пирсона, критерий хи-квадрат с поправкой на правдоподобие	Критерий Мак-Нимара	Критерий Q Кокрена



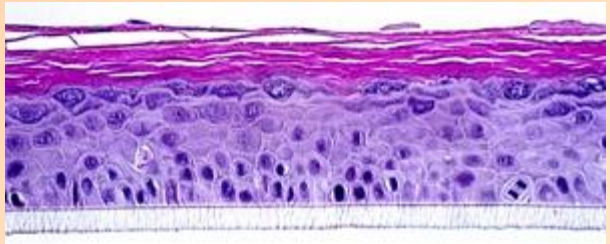
Использование методов in vitro в качестве скрининга

1) Микротетразолиевый тест (МТТ-тест) на культурах клеток MCF-7, MG-63 и U-2 OS
(оценка жизнеспособности клеток)





2) OECD 439 - In Vitro раздражение кожи: метод оценки реконструкции эпидермиса человека

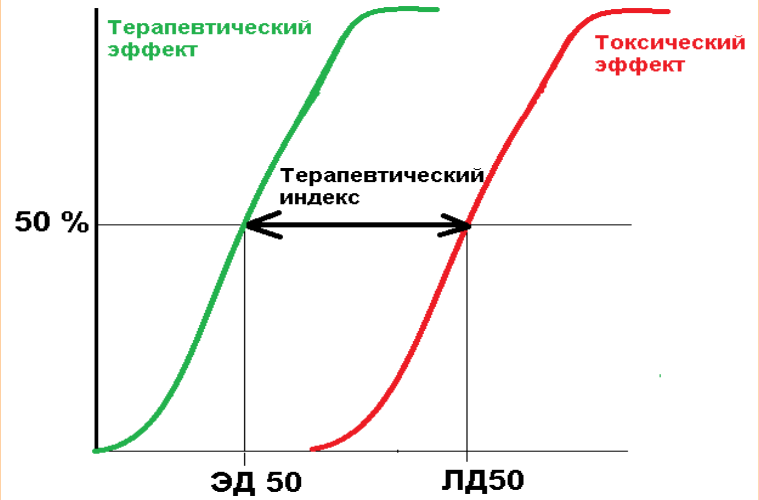


4) ICCVAM-2006 Раздражающее действие на ХАО куриного эмбриона (HET-CAM-тест)

•Эффективный скрининг цитотоксичности и раздражающего действия;
• Соответствие Директиве 2010/63/EU и Руководству …, 2012

3)OECD 203 - острая токсичность на zebrafish (*Danio rerio*)**; OECD 204 - долговременная токсичность 14-дней**

Выбор доз и шага доз



Изучение фармакологических свойств

Фармакологически активная доза (PAD*)

Острая токсичность

Субхроническая токсичность

Хроническая токсичность

ЛД50

Установление класса токсичности

МПД

ДБНЭ

ДБНОЭ (NOAEL*)

Прогноз безопасности инновационного ЛС, обеспечение безопасности людей-добровольцев на I фазе КИ – определение ЭДЧ (HED*) = ДБНОЭ (NOAEL*) / КП. Определение МРНД (MRSD*) = ЭДЧ (HED*) / КБ (SF*)

* - Соответствие терминологии Рекомендациям ICH и FDA

Выбор стартовых доз для острой токсичности

Есть данные о токсичности

Стартовая доза

1, 2

≈ЛД50/ коэффициент прогрессии дозы (OECD 425) или предельные дозы 2000 или 5000 мг/кг

Вычисление предположительной ЛД50 по методу максимального правдоподобия (программа AOT425StatPgm)

3

≈ЛД0
≈ЛД16
≈ЛД50
≈ЛД84
≈ЛД100

Вычисление ЛД50 методом Пробит-анализа

4

Выбор доз из фиксированных: 5, 50, 300, 2000, 5000 мг/кг (OECD 420)

Присвоение класса токсичности согласно GHS без вычисления ЛД50

Присвоение класса токсичности согласно любой классификации

1 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Главный тест.
2 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Тест предела
3 – Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова, 2012
4 - OECD 420 Fixed Dose Procedure

Выбор доз при наличии данных о токсчиности

	ЛД 50 в/ж для крыс			
Ацетилсалициловая кислота	**200 мг/кг** (Cayman Chemical Company, 1996)	**1124 мг/кг** (VHG Labs, Inc, 2013)	**1480 мг/кг** (Bayer inc., 2013)	**1500 мг/кг** (Sigma-Aldrich, 2014)
Метформин	**1000 мг/кг** (Cayman Chemical Company, 2014)	**1000 мг/кг** (Sanofi-aventis Canada Inc., 2014)	**2000 мг/кг** (Greenstone LLC, 2012)	**1000 мг/кг** (Sigma-Aldrich, 2014)
Эналаприла малеат	**2000 мг/кг** (Mercke, Sharp and Dohme, 2008)	**2973 мг/кг** (Fluka, 2013)	-	-

Выбор стартовых доз для острой токсичности

Нет данных о токсичности

Стартовая доза **= 175 мг/кг** [1]

Стартовая доза **= 2000 или 5000 мг/кг** [2,3]

Стартовая доза **= 300 мг/кг** [3]

Вычисление предположительной ЛД50 и ДИ по методу максимального правдоподобия (AOT425StatPgm)

Присвоение класса токсичности согласно любой классификации:

- **Hodge & Sterner**. Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore: 1975. P. 427
- **К.К.Сидоров.** Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии: справочник. М.: Медицина, 1977. 240 с
- **ГОСТ 12.1.007-76.** Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности
- **GHS**

Подбор стартовых доз в пилотном исследовании

Главное исследование в выбранных дозах и присвоение класса токсичности согласно GHS без вычисления ЛД50

Классификация GHS[4]:

	ЛД50 в/ж, мг/кг
Категория 1	До 5
Категория 2	До 50
Категория 3	До 300
Категория 4	До 2000
Категория 5	До 5000

1 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Главный тест.
2 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Тест предела
3 – OECD 420 Fixed Dose Procedure
4 -Globally Harmonised System of classification and labelling of chemicals (GHS). Fifth revised edition. United Nations. New York and Geneva. 2013. P.530

Выбор шага доз: OECD 425

Коэффициент прогрессии Дозы = antilog 1/ предполагаемый угол наклона

Наклон = 1	2	3	4	5	6	7	8
		37.5			37.5		
				44			41
						47	
	55		55		55		55
						65	
				69			73
		81			82		
			99			91	97
				109	120		
						126	129
175	175	175	175	175	175	175	175
						240	230
				275	260		
			310			340	310
		375			375		
				440			410
						470	
	550		550		550		550
						650	
				690			730
		810			820		
			990			910	970
				1090	1200		
						1260	1290
1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
						2400	2300
				2750	2600		
			3100				3100
					3750	3400	
							4100
5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

Выбор доз и шага доз для субхронической и хронической токсичности

Шаг в 2-4 раза | **Шаг в 2-4 раза**

Минимальная доза

- Не должна вызывать гибель животных;
- Не должна вызывать токсические эффекты. [1,2,3].

Промежуточная доза

- Должна позволить оценить уменьшение токсических проявлений со снижением дозы .

Максимальная доза

- Может вызывать гибель части животных;
- Может вызывать токсические эффекты [1].
- Не должна вызывать гибель животных;
- Может вызывать токсические эффекты [2,3].

1000 мг/кг [2,3].

Выбор дозы обусловлен данными

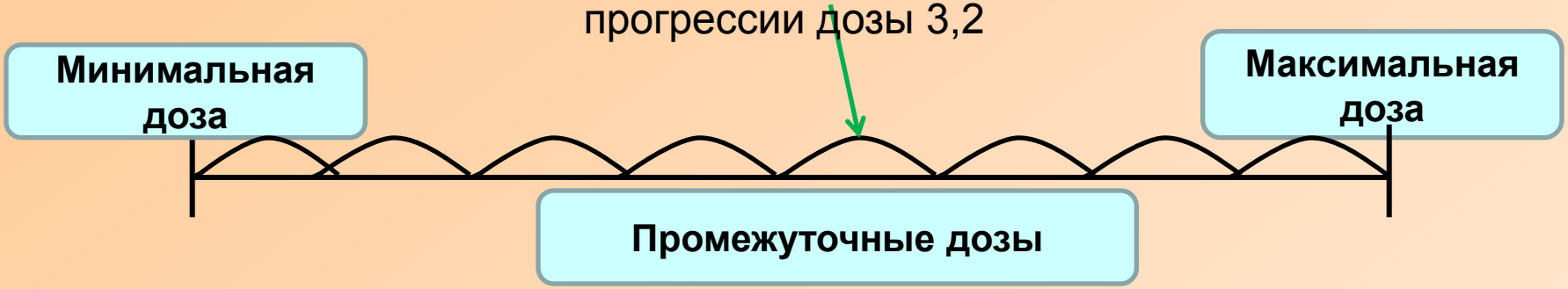
1. Фармакологически активная доза;
2. ≈ ТД согласно ИМП.

1. МПД и/или ЛД10, класс токсичности;
2. ≈ ВТД согласно ИМП;
3. Вид инновационного ЛС.

1 - Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, 2012
2 - OECD 407;
3 - OECD 408.

Выбор доз и шага доз для субхронической и хронической токсичности

Шаг вниз от максимальной дозы по логарифмической шкале или уменьшение дозы на коэффициент прогрессии дозы 3,2



Корректировка максимальной и промежуточной доз в зависимости от длительности введения

Длительность введения препарата у человека	Длительность введения фармакологического вещества животным
Однократный прием	5 - 7 дней
2 – 6 дней	14 дней
7 – 14 дней	1 месяц
15 – 30 дней	2 – 4 месяца
1 – 6 месяцев	6 - 2 месяцев

Выбор вида животных

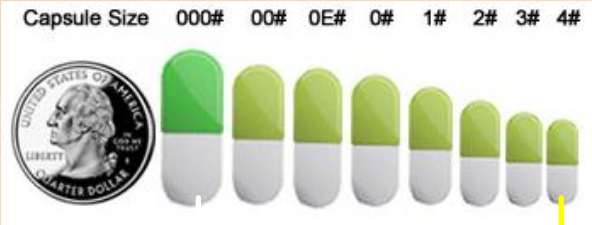
Использование <u>двух</u> видов животных

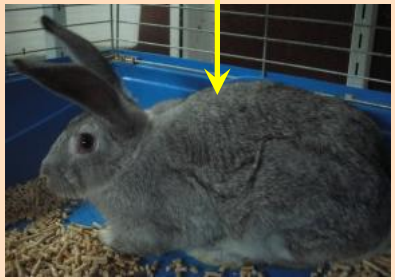
Грызуны

Не грызуны

Следует использовать <u>наиболее подходящие виды</u> животных

- С позиций специфической чувствительности вида к ЛС, отличия от человека в метаболизме, анатомии и селективности связывания с белками и др.;
- С точки зрения испытания **новых лекарственных форм:**





Орально-диспергируемая форма

Выбор пола животных

Острая токсичность

Только самки или наиболее чувствительный пол [OECD 420, 425]

Самцы и самки [Руководство…,2012]

Субхроническая и хроническая токсичность

Самцы и самки [OECD 407, 408, Руководство…,2012]

- Предпочтительно исследование инновационных ЛС на животных обоего пола;
- Необходимо учитывать доступные данные о чувствительности полов к данной группе ЛС;
- Необходимо учитывать вид инновационного ЛС и проект ИМП.

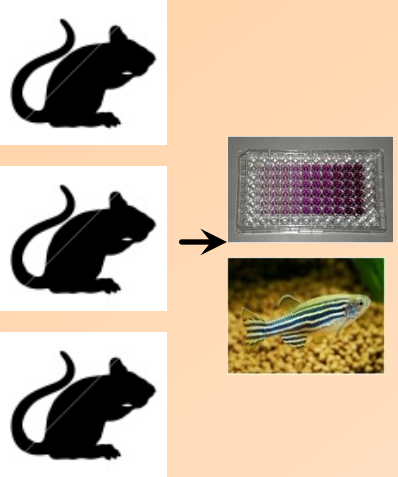
Количество животных

- Replacement
- Reduction
- Refinement

- Замена
- Уменьшение
- Усовершенствование

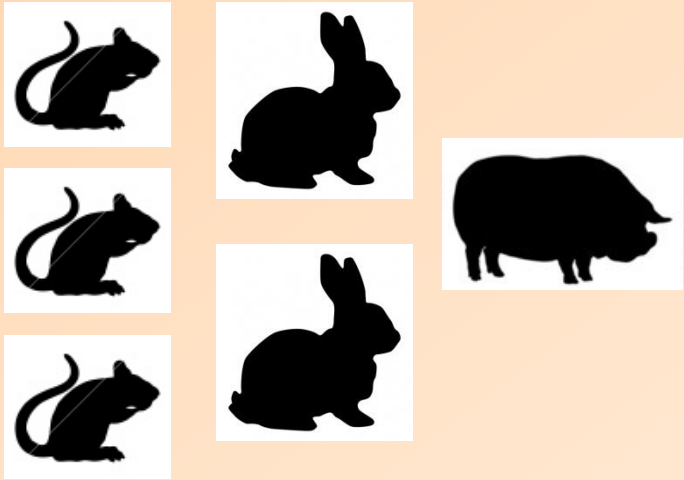
Замена

Замена экспериментов на животных на альтернативные методы: изолированные органы, zebrafish, КИТы. Использование неинвазивных методов диагностики, микроканюль для прижизненного отбора проб биологических жидкостей и т д.



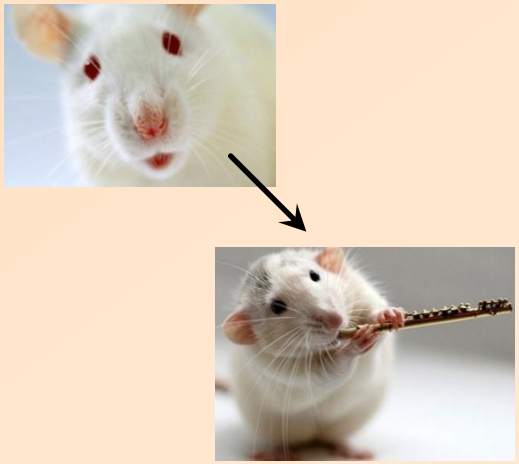
Уменьшение

Уменьшение количества животных в исследовании (OECD, выбор вида), разработки новых стандартных протоколов с пилотными исследованиями, обзор литературных баз по ЛС и грамотному планированию исследования.



Усовершенствование

Разработка внутренних документов по содержанию, разведению и оценке благосостояния животных, обнаружению и устранению боли и дистресса животных, тренингу животных. Обучение персонала.



Директива 2010/63/EU

Выводы

Выбор оптимального метода исследования

Оптимальный выбор доз и шага доз

Выбор метода анализа данных с учетом прогноза ожидаемых результатов

Эффективная оценка безопасности Инновационных Лекарственных средств

Выбор подходящего вида и пола животных

Использование оптимального количества животных

Использование методов in vitro токсикологии как скрининговых

Благодарю за содействие в научной и экспериментальной работе и поддержку

Проф., д.м.н. Валерию Геннадьевичу Макарову,
Д.м.н. Марине Николаевне Макаровой,
к.фарм.н. Ольге Ильиничне Авдеевой,
к.б.н. Кириллу Леонидовичу Крышеню,
Игорю Евгеньевичу Макаренко,
к.б.н. Елене Васильевне Шекуновой
и всему нашему дружному коллективу.

Спасибо за внимание.

Объем исследований безопасности инновационных ЛС

	Общая токсичность	Специфическая токсичность
Химическое соединение	Острая токсичность, цитотоксичность	Канцерогенность
Фармацевтическая субстанция	Разработка ГЛФ	
ГЛФ	Острая и хроническая токсичность	Репродуктивная токсичность Аллергенность Иммунотоксичность Мутагенность

Выбор стартовых доз для острой токсичности

Нет данных о токсичности

Стартовая доза = 175 мг/кг [1]

Вычисление предположительной ЛД50 и ДИ по методу максимального правдоподобия (AOT425StatPgm)

Присвоение класса токсичности согласно любой классификации

Стартовая доза = 2000 или 5000 мг/кг [2,3]

Стартовая доза = 300 мг/кг [3]

Подбор стартовых доз в пилотном исследовании

Главное исследование в выбранных дозах и присвоение класса токсичности согласно GHS без вычисления ЛД50

Классификация GHS [5]:

	ЛД50 в/ж, мг/кг
Категория 1	До 5
Категория 2	До 50
Категория 3	До 300
Категория 4	До 2000
Категория 5	До 5000

Есть данные о токсичности

Стартовая доза ≈ ЛД50

1, 2, 3

4

≈ЛД0
≈ЛД16
≈ЛД50
≈ЛД84
≈ЛД100

Вычисление ЛД50 методом Пробит-анализа

Присвоение класса токсичности согласно любой классификации

1 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Главный тест.
2 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Тест предела
3 – OECD 420 Fixed Dose Procedure
4 - Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова, 2012
5 - Globally Harmonised System of classification and labelling of chemicals (GHS). Fifth revised edition. United Nations. New York and Geneva. 2013. P.530

Выбор стартовых доз для острой токсичности

Есть данные о токсичности

Стартовая доза

1, 2

≈ЛД50/ коэффициент прогрессии дозы (OECD 425) или предельные дозы 2000 или 5000 мг/кг

Вычисление предположительной ЛД50 и ДИ по методу максимального правдоподобия (AOT425StatPgm)

3

≈ЛД0
≈ЛД16
≈ЛД50
≈ЛД84
≈ЛД100

Вычисление ЛД50 методом Пробит-анализа

4

Выбор доз из фиксированных: 5, 50, 300, 2000, 5000 мг/кг (OECD 420)

Присвоение класса токсичности согласно GHS без вычисления ЛД50

Присвоение класса токсичности согласно любой классификации

1 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Главный тест.
2 - OECD 425 Up-and-Down-Procedure. Тест предела
3 – Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова, 2012
4 - OECD 420 Fixed Dose Procedure