

ОБЩАЯ ПРОГРАММА
доклинического изучения безопасности фармакологических веществ
(исследования проводятся в соответствии со сборником методических документов
«Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» МЗСР
РФ и ФГБУ НЦЭСМП. Редакция 2012 года)

Исследования производятся в лабораториях лекарственной токсикологии и фармакологии мутагенеза ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Институт включен в список организаций, уполномоченных Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития МЗ РФ для проведения исследований по доклинической оценке безопасности новых фармакологических средств.

Регулирующие стандарты

Основным документом, определяющим порядок и дизайн исследования в соответствии с требованиями МЗСР РФ, являются «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств» («Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», М., 2012, часть первая).

При организации исследования руководствуются следующими нормативными документами:

- Федеральный закон № 61-ФЗ от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств»;
- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 26 августа 2010 г. № 750н «Об утверждении Правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и формы заключения комиссии экспертов»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»;
- Национальный стандарт РФ ГОСТ 33044 – 2014 от 01 августа 2015 г. «Принципы надлежащей лабораторной практики»;
- Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)", утвержденные главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 29 августа 2014 №51, зарегистрировано Министерством юстиции Российской Федерации от 31 октября 2014 года, регистрационный N 34547;
- Guide for the care and use of laboratory animals/ National Academy press; Washington, D.C., 2011;
- Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. –Washington, D.C. 1996;
- Principles on Good Laboratory Practice. OECD № ENV/MC/CHEM (98)17, 1997

Оценка безопасности новых лекарственных средств является необходимым этапом их доклинической разработки и включает:

- А. Исследование общей токсичности (острая и хроническая токсичность).
- Б. Исследования специфической токсичности:
 - алергизирующие свойства;
 - иммунотоксическое действие;
 - репродуктивная токсичность;
 - мутагенность (генотоксичность).

Исследование общей токсичности (острая и хроническая токсичность).

1. Острая токсичность (ориентировочная продолжительность эксперимента: 3 месяца).

Цель исследования - В ходе работы определяются переносимые, токсические и летальные дозы исследуемого лекарственного средства (ЛС), сроки развития интоксикации и гибели животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины при однократном введении ЛС при двух путях введения, один из которых должен соответствовать планируемому для использования в клинике.

Схема исследований - самцы и самки двух видов животных (мыши и крысы), два пути введения, наблюдение за выживаемостью и состоянием животных в течение 14 дней после введения исследуемого ЛС, с параллельной регистрацией потребления корма и воды, динамики массы животных.

Предполагаемый расход животных по 60 самцов и самок мышей и крыс. Всего 120 мышей и 120 крыс.

Подробная схема эксперимента приведена в сборнике методических документов «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» МЗСР РФ и ФГБУ НЦЭСМП. Редакция 2012 года.

Основной результат - определение переносимых и летальных доз, в частности LD₅₀, описание патоморфологической картины у павших животных. При возможности определение причин гибели животных в остром эксперименте.

2. Хроническая токсичность (продолжительность: от 3 до 10 месяцев в зависимости от продолжительности планируемого клинического использования)

Цель исследования - характеристика токсических эффектов исследуемого ЛС при его повторном введении, выявление органов-мишеней токсических воздействий, оценка обратимости выявленных токсических эффектов.

Схема исследования - два - три уровня доз (в диапазоне от ED₅₀ до 1/2 LD₅₀), не менее двух видов самцов и самок животных (крысы и кролики), путь введения соответствует планируемому в клинике.

Предполагаемый расход животных 48 б/п крыс и 36 кроликов породы Шиншилла, самцы и самки 1:1.

Основной результат - всесторонняя характеристика возможного токсического действия исследуемого ЛС при его хроническом введении, прогностические сведения о возможных побочных эффектах в клинике. Основные регистрируемые параметры представлены в таблице 1 (Приложение А).

Исследования специфической токсичности

Аллергизирующие свойства (ориентировочная продолжительность эксперимента: 4 месяца).

Цель исследования - выявление способности вызывать аллергический эффект, в основе которого лежат различные иммунопатологические механизмы.

Схема исследования

1. Оценка общей анафилактической активности
2. Реакция активной кожной анафилаксии
3. Реакция воспаления на конкавалин А
4. Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

В экспериментах используются самцы морские свинки-альбиносы – 90 голов, мыши самцы линии СВА – 30 голов. Обработка животных исследуемым ЛС осуществляется по стандартным схемам иммунизации, исследуемое ЛС используется в двух уровнях доз.

Подробная схема эксперимента приведена в сборнике методических документов «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» МЗСР РФ и ФГБУ НЦЭСМП. Редакция 2012 года.

Иммунотоксическое действие (ориентировочная продолжительность эксперимента: 4 месяца).

Цель исследования - выявить возможные некомпенсированные нарушения в структуре и функции иммунной системы, приводящие к снижению резистентности.

Схема исследования

1. Определение массы и клеточности органов иммунной системы.
2. Определение титра антител в реакции гемоагглютинации.
3. Исследование фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.
4. Определение активности нейтрофилов в хемилюминесцентном тесте.
5. Оценка влияния на гиперчувствительность замедленного типа.

В экспериментах используются мыши самцы линии СВА – 30 голов, С57В1/6 – 30 голов, мыши-гибриды первого поколения СВА х С57В1/6 – 120 голов. Обработка животных исследуемым ЛС осуществляется по стандартным схемам иммунизации. Исследуемое ЛС вводится в течение 14 дней в двух уровнях доз.

Подробная схема эксперимента приведена в сборнике методических документов «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» МЗСР РФ и ФГБУ НЦЭСМП. Редакция 2012 года.

Исследование репродуктивной токсичности (ориентировочная продолжительность эксперимента: 4 месяца).

Цель исследования - выявление возможного отрицательного действия на генеративную функцию, оценка эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития.

Схема исследования

1. Изучение влияния на генеративную функцию: выявляет возможное отрицательное действие на стадии прогенеза и нарушения полового поведения;
2. Изучение эмбрио- и фетотоксического действия (антенатальный период): выявляет аномалии развития эмбриона и эмбриональную смертность
3. Изучение постнатального развития: выявляет нарушения эмбриогенеза, проявляющиеся только в постнатальном периоде жизни (оценка поведения, обучаемости, памяти).

Исследуемое ЛС используется в двух уровнях доз, путь введения соответствует клиническому. Всего в эксперименте используется 60 самцов и 200 самок крыс. Подробная схема эксперимента приведена в сборнике методических документов «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» МЗСР РФ и ФГБУ НЦЭСМП. Редакция 2012 года.

Исследование мутагенной активности и потенциальной канцерогенной активности (ориентировочная продолжительность эксперимента: 3 месяца).

Цель исследования - оценка способности исследуемого вещества повреждать структуры наследственности.

Схема исследования

1. Учет генных мутаций (тест Эймса на микроорганизмах)
2. Метод учета хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей.
3. Учет повреждений ДНК в клетках разных органов мышей.

При учете генных мутаций в тесте Эймса исследуемое ЛС используется в пяти разведениях, при оценке используются штаммы *S.typhimurium* TA98, TA100, TA1535 и TA1537 и на комбинации штаммов *E.coli* pKM101 и *uvrA*, в вариантах с метаболической активацией S9 и без таковой.

Учет хромосомных повреждений осуществляется в клетках костного мозга самцов и самок мышей (всего 25 животных), учет повреждений ДНК в клетках костного мозга, печени, почек и селезенки (всего 35 животных) при использовании исследуемого ЛС в двух уровнях доз и его введении путем, соответствующем клиническому.

Подробная схема эксперимента приведена в сборнике методических документов «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» МЗСР РФ и ФГБУ НЦЭСМП. Редакция 2012 года.

Примечание:

1. Исследование рекомендуется начинать с определения острой токсичности и мутагенности. Данные о средне-летальных дозах, полученные в этом исследовании, в совокупности со сведениями о средне-эффективных дозах, выявленных при изучении специфической фармакологической активности, позволят максимально надежно определить дозы (уровни доз) используемые при изучении хронической токсичности и специфических видов токсичности. Сведения о мутагенности позволят принять или отвергнуть перспективу дальнейшего изучения исследуемого ЛС.
2. К началу исследования необходимо иметь достаточное количество лекарственной формы, в которой будет регистрироваться исследуемое ЛС.
3. Программы (протоколы) доклинических исследований по каждому виду вышепоименованных исследований, предваряющие экспериментальное исследование, составляются при участии ответственных разработчиков. К моменту составления этих программ разработчик должен располагать следующими сведениями:
 - наименование исследуемого ЛС;
 - номер серии, дату производства и срок годности исследуемого ЛС;
 - состав готовой лекарственной формы;
 - условия хранения;
 - растворимость и растворители;
 - рН растворов;
 - методы проверки подлинности;
 - сведения об упаковке и маркировке;
 - краткое описание фармакологического действия, с указанием эффективных доз для разных видов лабораторных животных при соответствующих путях введения;
 - планируемая длительность введения и пути введения в клинику.

Приложение А

Таблица 1 - Перечень основных регистрируемых параметров при изучении хронической токсичности

Рекомендуемые исследования	Рекомендуемые тесты и показатели
1. Интегральные показатели	Внешний вид, поведение, симптомы интоксикации, масса тела (еженедельно), суточное потребление корма и воды (еженедельно)
2. Гематологические исследования	Содержание в периферической крови эритроцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, лейкоцитарная формула, гемоглобин, гематокрит, коагулограмма, резистентность эритроцитов.
3. Биохимические исследования	<p>В сыворотке крови: общий белок, белковые фракции, общий холестерин, общие липиды, глюкоза триглицериды, активность основных ферментов, имеющих диагностическое значение (ЩФ, АЛТ, АСТ, ЛДГ и др.)</p> <p>В моче: концентрация мочевины, креатинина, глюкозы, белка.</p>
4. Физиологические исследования	<p>Частота сердечных сокращений, параметры ЭКГ во втором отведении.</p> <p>Диурез, рН, относительная плотность мочи, мочевого осадок</p> <p>Ритм и глубина дыхания.</p> <p>Поведение в тесте «открытое поле»</p>
5. Патоморфологические исследования	<p>Вскрытие, макроскопическое описание картины органов и тканей, места введения, определение относительной массы органов, гистологические исследования головного мозга, сердца, печени, почек, легких, селезенки, тимуса, надпочечников, желудка, кишечника, мочевого пузыря, поджелудочной железы, щитовидной железы, лимфоузлов, костного мозга, семенников, яичников и других тканей и органов.</p> <p>Местно-раздражающее действие.</p>