

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Методические рекомендации

Элективные дисциплины:

- **ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ**
- **ОСНОВЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**
- **НАДЛЕЖАЩИЕ ПРАКТИКИ В ОБРАЩЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

основная профессиональная образовательная программа
высшего образования - программа специалитета

33.05.01 Фармация

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Микросомальные и немикросомальные метаболические превращения

Лекарственные вещества подвергаются в организме человека биотрансформации. В ряде случаев происходит полное превращение вещества в метаболиты, в большинстве случаев лишь частичное. В результате биотрансформации может образоваться не один метаболит, а несколько, например, для аминазина – десятки метаболитов

Микросомальные метаболические превращения

Биотрансформация ЛВ, как правило, осуществляется с помощью ферментов, которые в основном локализуются в печени. Главной окисляющей системой ферментов печени в организме человека является система изоферментов цитохрома Р-450 (СYP-450).

Немикросомальные метаболические превращения

Ряд ЛВ подвергается метаболизму под действием ферментов кишечника, легких, почек, крови и некоторых других тканей. В митохондриях и растворимых фракциях тканевых гомогенатов присутствуют много оксидаз и дегидрогеназ, которые катализируют окисление чужеродных соединений, в частности спиртов и альдегидов. Так окисляются этанол до уксусного альдегида, бензальдегид – до бензойной кислоты.

Путем немикросомальных метаболических превращений происходит восстановление альдегидов и кетонов.

Ферменты микрофлоры кишечника катализируют гидролиз амидов, фталозола и т.д., а также декарбоксилирование аминокислотных препаратов, О- и N-деметилирование, восстановление нитро- и азо- групп и другие процессы. Часть ЛВ метаболизируются в крови под влиянием плазматических эстераз (сульфат атропина, кокаина гидрохлорид).

Некоторые ЛВ могут инактивироваться до поступления в кровь в ЖКТ под действием ферментов пищеварительного сока, в слизистой оболочке кишечника и под действием бактериальной флоры.

I-я и II-я фазы Биотрансформации

I-я фаза - реакции окисления, восстановления, гидролиза.

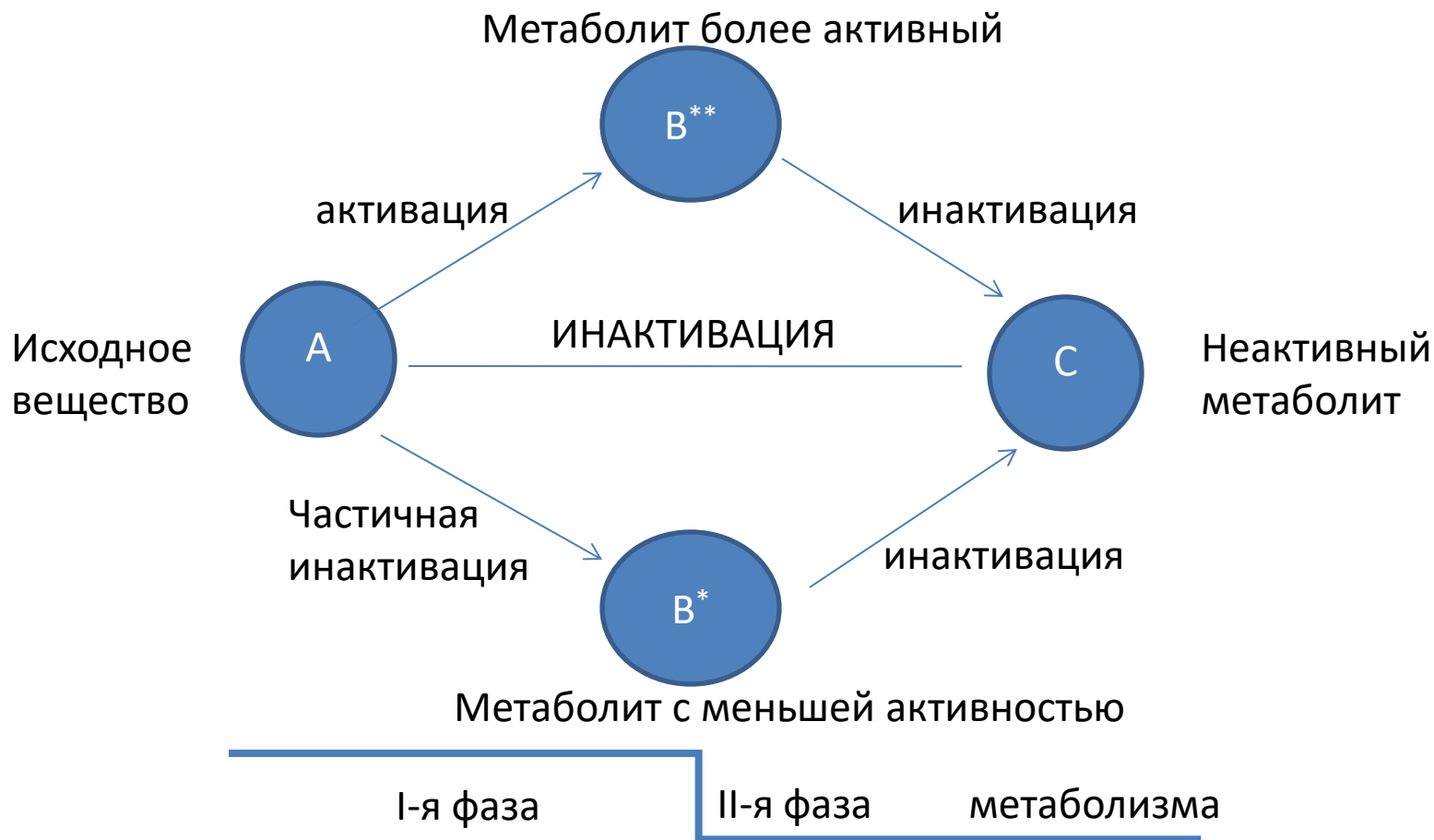
В результате реакций I фазы происходит специфическая перестройка в молекуле субстрата с образованием определенных функциональных групп – оксигрупп, карбоксигруппа, первичных и вторичных аминогрупп.

II-я фаза - реакции синтеза с некоторыми биохимическими компонентами организма, например, глюкуроновой, серной кислотами и др.

Во II-й фазе метаболизма по этим функциональным группам происходит конъюгация с высокополярными кислотными остатками, нормальным остатком глюкуроновой и серной кислоты, некоторых аминокислот и т.д., что приводит к увеличению гидрофильности молекулы и быстрому выведению метаболита из организма.

Активные и неактивные метаболиты – В процессе метаболизма ЛВ в организме могут образовываться фармакологически активные и неактивные метаболиты, которые в конечном счете могут приводить к изменению фармакологического эффекта. Могут повышать, понижать, извращать эффект или не влиять на него.

Схема возможных путей метаболизма лекарственных веществ с физиологической точки зрения (по Вильямсу)



В результате I-й фазы (окисление, восстановление, гидролиз) образуются соединения, обладающие меньшей (B^{*}) или большей (B^{**}) фармакологической активностью по сравнению с исходным веществом (A).

Основные пути биотрансформации токсических веществ и участвующие в этих процессах ферменты

Основной биохимический процесс и ферменты	Химизм реакции
Первая фаза	
Окисление Гидролазы	Гидроксилирование алифатическое и ароматическое
Деметилазы	Деметилирование
Аминооксидазы	Дезаминирование
Алкогольдегидрогеназы	Образование альдегидов
Альдегидоксидазы	Карбоксилирование
N-оксидазы	N-окисление
S-оксидазы	S-окисление
Восстановление	
Альдегидредуктазы	Восстановление альдегидов и кетонов
Нитроредуктазы	- Нитрогруппы; -азогруппы; -N-окисей
Азоредуктазы	-азогруппы

Продолжение таблицы.

Основной биохимический процесс и ферменты	Химизм реакции
Гидролиз	
Эстеразы	Гидролиз сложных эфиров
Амидазы	Гидролиз амидов, атомов галоида
Сульфатазы Глюкоронидазы	Гидролиз конъюгатов
Вторая фаза	
Конъюгация с остатком серной кислоты Сульфотрансферазы	Образование сульфатов
Конъюгация с остатком глюкуроновой кислоты Глюкуронилтрансферазы	Образование эфиров, тиоэфиров или амидов глюкуроновой кислоты
Конъюгация с остатками альфа-аминокислот Глицинацилаза	Амидирование - Глицином - Глутаминовой кислотой, глутатионом

Образование фармакологически активных и токсичных метаболитов

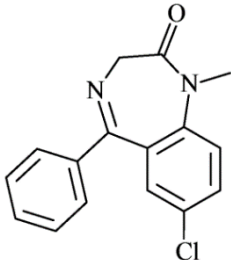
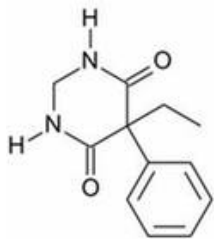
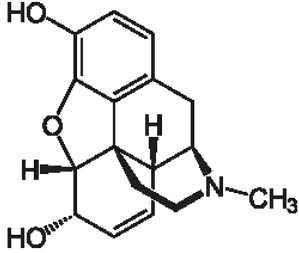
- В ряде случаев в результате биотрансформации токсических веществ в организме могут образовываться **активные и токсичные метаболиты**, а также метаболиты, которые являются лекарствами сами по себе.
- Активные метаболиты образуются только в результате реакций I-й фазы метаболизма. Во II-й фазе метаболизма образуются, как правило, неактивные продукты, которые хорошо выводятся почками.

Таблица. Примеры препаратов, образующих в организме человека активные метаболиты

ПРЕПАРАТ	АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ
Амидопирин	4-аминоантирин
Ацетилсалициловая кислота	Салициловая кислота
Аминазин	N-деметиладельзин, 7-оксиладельзин
Гексобарбитал	N-деметилгексобарбитал
Диазепам	N-деметилдiazepam
Имипрамин	Дезметилимипрамин (дезипрамин)
Карбамазепин	10,11-эпоксид карбамазепина
Клонидин	4-оксиклонидин
Лидокаин	Моноэтилглицина ксилонид
Мефенитоин	Фенилэтилгидантонин
Мефобарбитал	Фенобарбитал
Морфин	Норморфин и др.
Примидон	Фенобарбитал, этилмалондиамид
Хлордiazэпоксид (элениум)	N-диметилхлордiazэпоксид (демоксилам)

Примеры метаболитов, являющихся лекарствами

Исследования метаболизма лекарственных веществ привело к синтезу целого ряда веществ, которые являются активными метаболитами известных лекарственных препаратов:

Оксазепам (тазепам) – N-метилованный 3-оксиметаболит диазепама	
Фенобарбитал является метаболитом известного противосудорожного лекарства – примидона.	
Кодеин частично метаболизируется до морфина и, таким образом, наряду с обезболивающим эффектом, приобретает наркотические свойства	

Токсичные метаболиты

- В последнее время внимание токсикологов привлечено к образованию токсичных метаболитов, в частности, при метаболизме кодеина, фенацетина, хлоралгидрата.
- Примером **летального синтеза** является метаболизм метанола до формальдегида и муравьиной кислоты.
- Приём **сульфаниламидных препаратов** может приводить к кристаллоурии в результате ацетилирования продуктов метаболизма.
- Возможны **аллергические реакции** вплоть до анафилактического шока. В результате метаболизма возникают реакционно способные функциональные группы (спиртовые, фенольные, карбоксильные, NH_2 -группы) и, таким образом, между метаболитами и белковыми молекулами могут образовываться ковалентные связи, появляются антигены, и, как следствие, антитела на вводимое вещество, что и приводит к аллергической реакции.

Продолжение

- **Канцерогенная активность.**

Эпоксиды, которые являются промежуточными продуктами гидроксилирования некоторых ароматических аминов , могут приводить к образованию метаболитов с канцерогенной активностью.

Пример: амидопирин метаболизируется до диметилнитрозамина (канцероген).

- **Токсичный эффект** некоторых веществ с нитрогруппами, например, метронидазол, нитрофурантоин, в значительной степени может быть связан с метаболическим восстановлением NO_2 - группы.

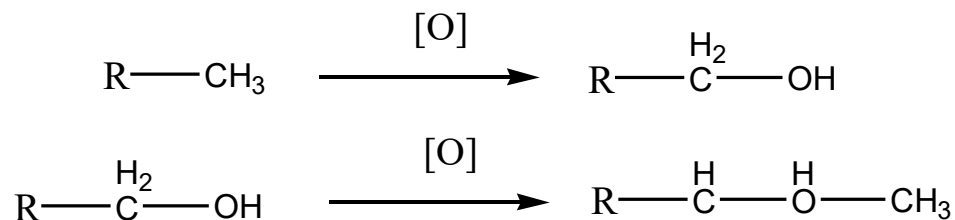
Основные механизмы биотрансформации лекарственных веществ

Реакции I фазы

Реакции окисления

А. Микросомальное окисление.

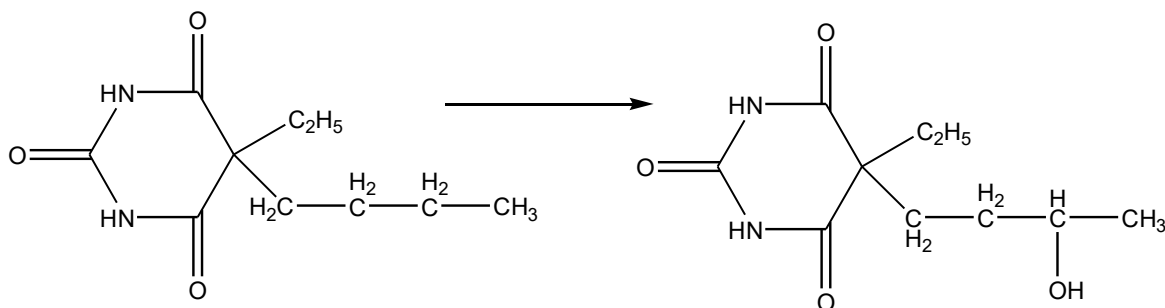
Общим механизмом широкого круга окислительных реакций является гидроксилирование. Для всех этих реакций требуется восстановленный кофермент НАДФН₂ и O₂.



1.1. Гидроксилирование

а) алифатическое

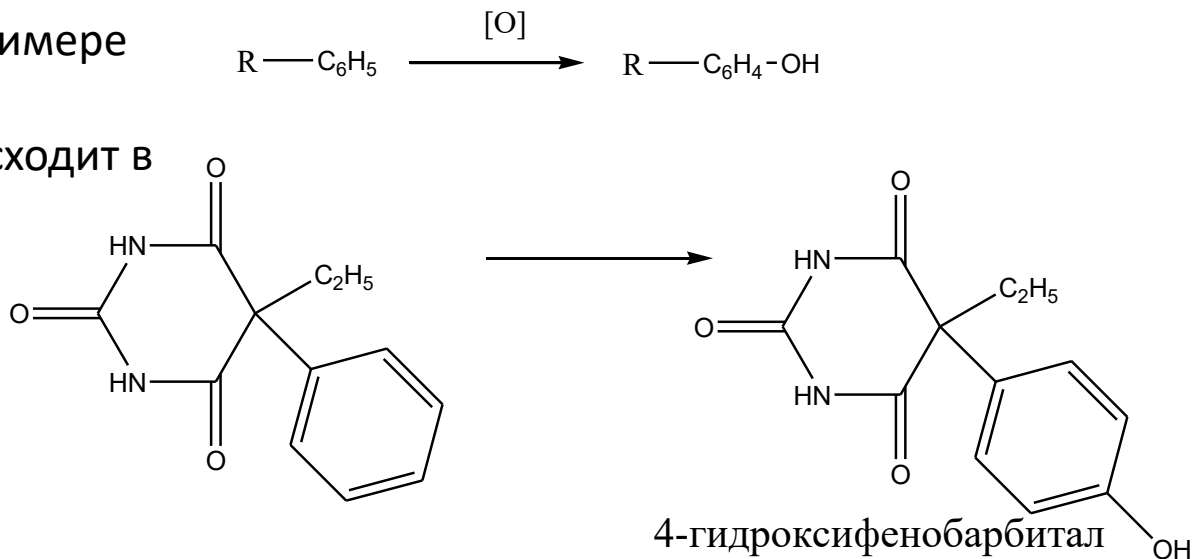
гидроксилирование на примере бутобарбитала. Гидроксилирование происходит в алкильной боковой цепи с образованием спиртов.



б) ароматическое

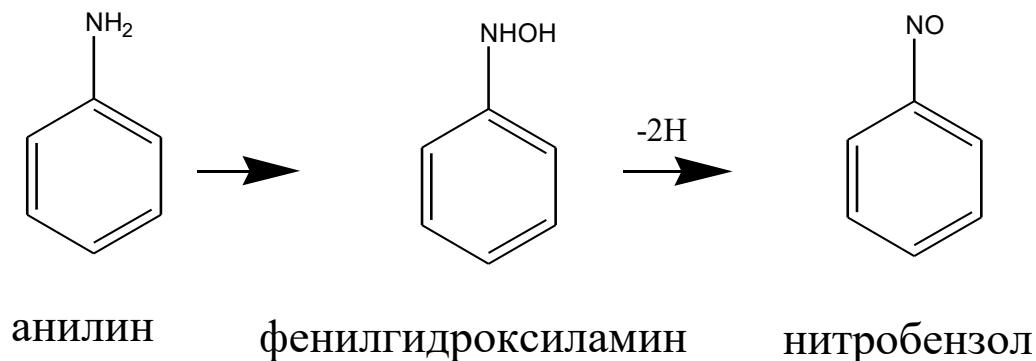
гидроксилирование на примере фенобарбитала.

Гидроксилирование происходит в п-положении фенильного радикала.



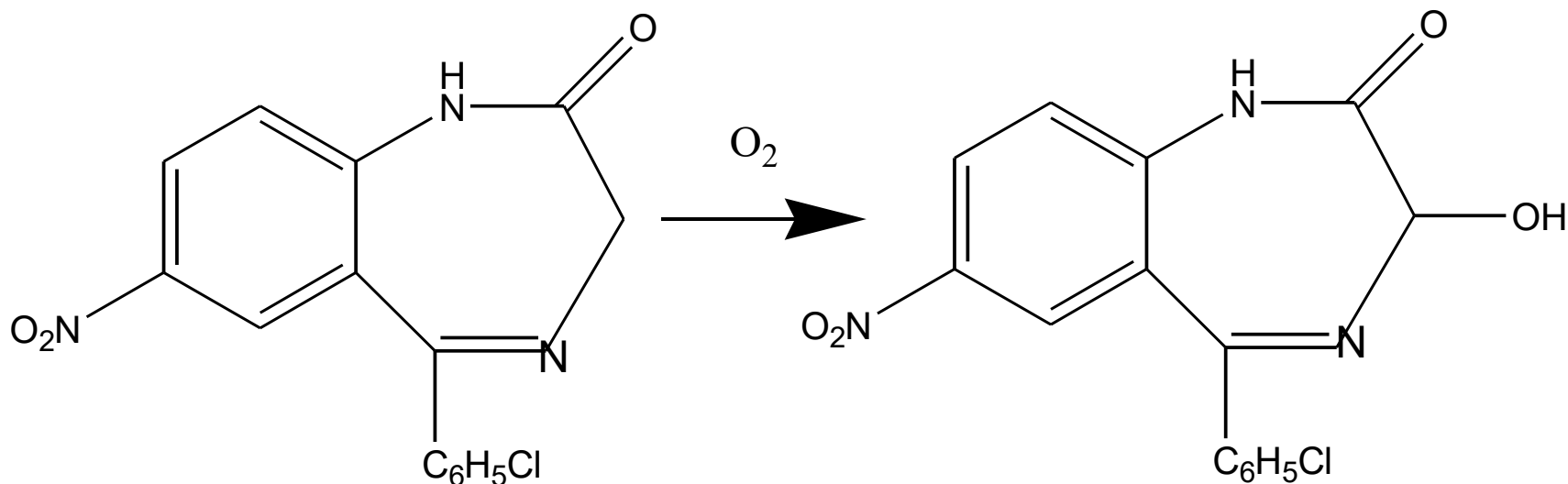
в) N-гидроксилирование (первичные и вторичные амины).

Метаболиты более токсичны по сравнению с исходным соединением.



Продолжение.

У производных 1,4-бензодиазепина (транквилизаторы) гидроксирование может происходить в бензодиазепиновом цикле.



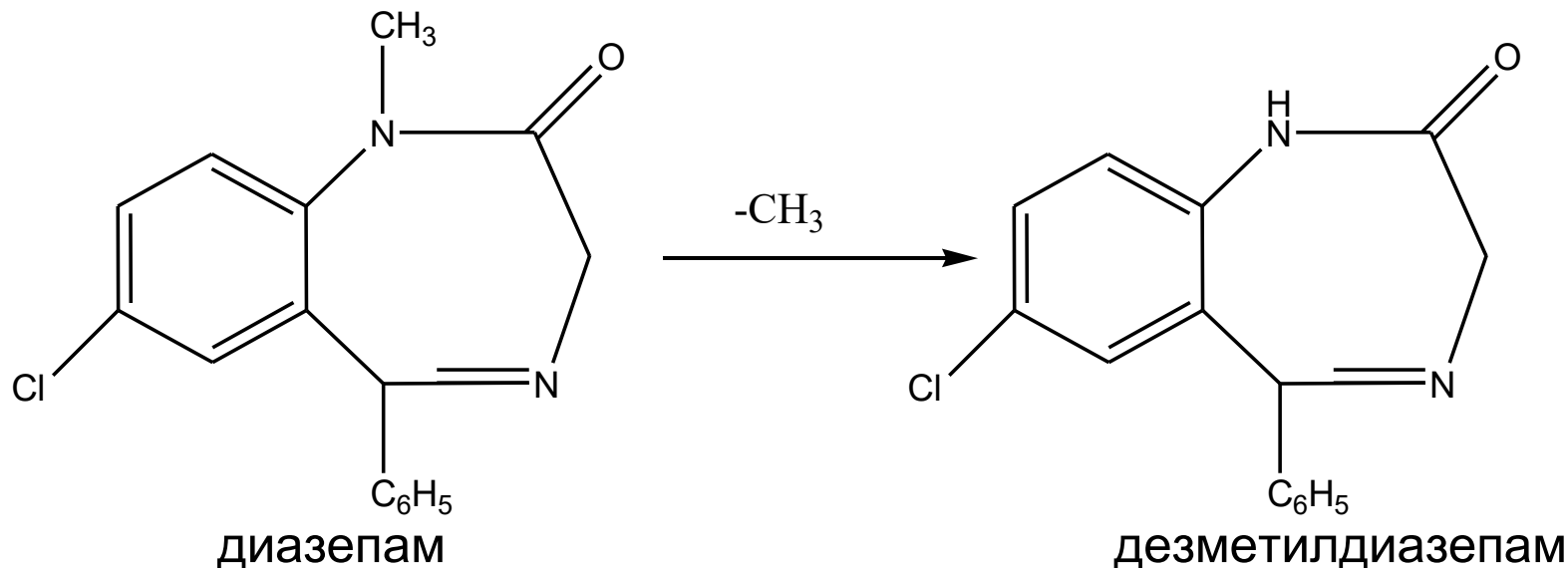
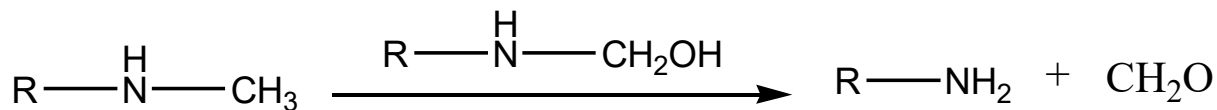
нитразепам

3-гидроксипроизводное нитразепама

1.2. Дезалкилирование

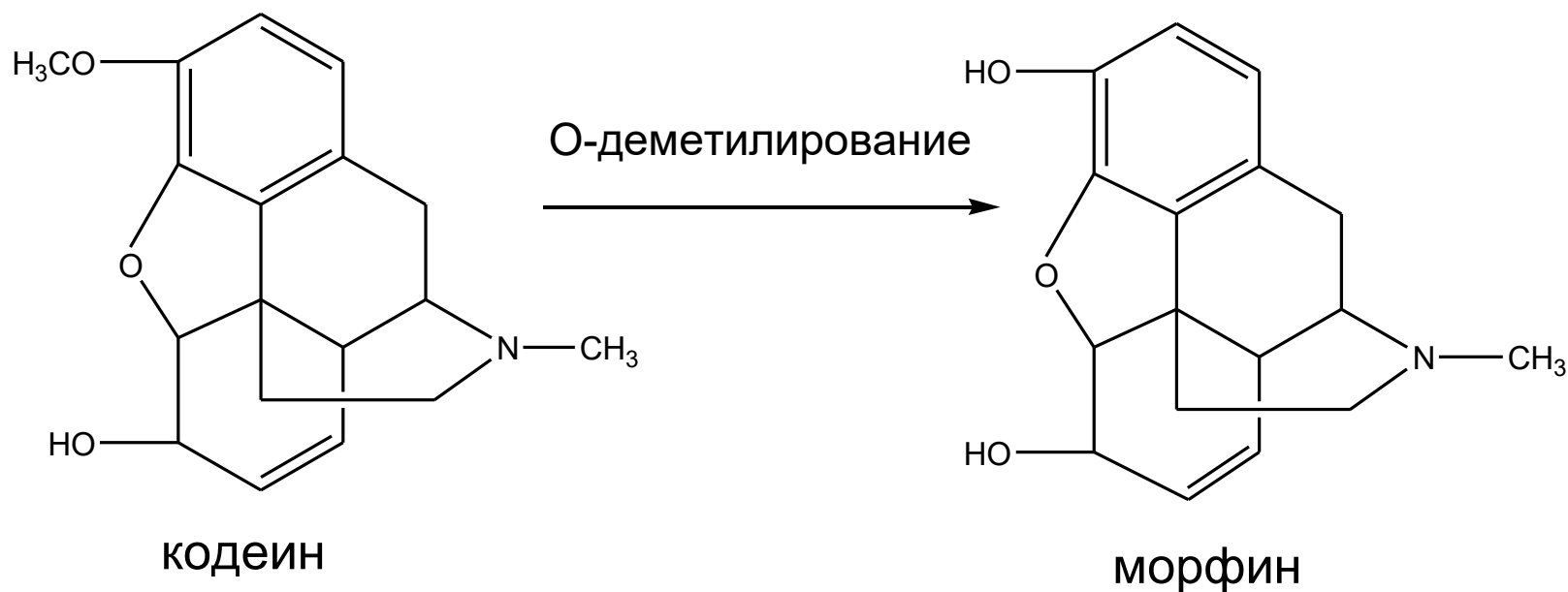
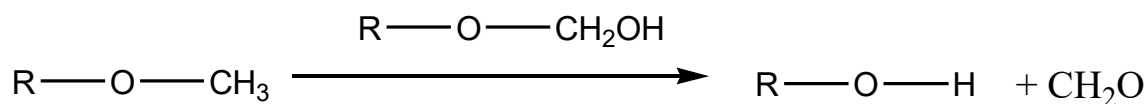
а) N-дезалкилирование (в основном отщепление метильного радикала с образованием формальдегида).

Вторичные или третичные амины подвергаются дезалкилированию с образованием первичных аминов и альдегидов.



Продолжение.

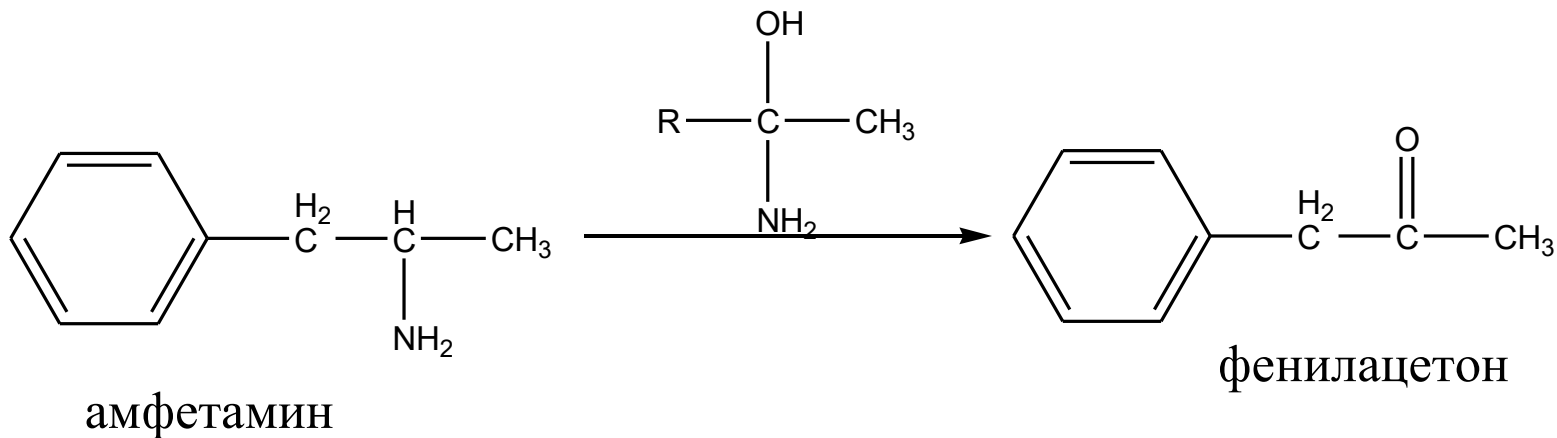
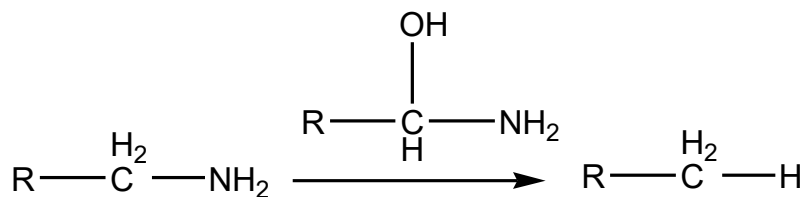
б) *O*-деалкилирование (простые эфиры). Ароматические метиловые и этиловые эфиры подвергаются окислительному расщеплению с образованием соответствующего фенола и формальдегида или ацетальдегида.



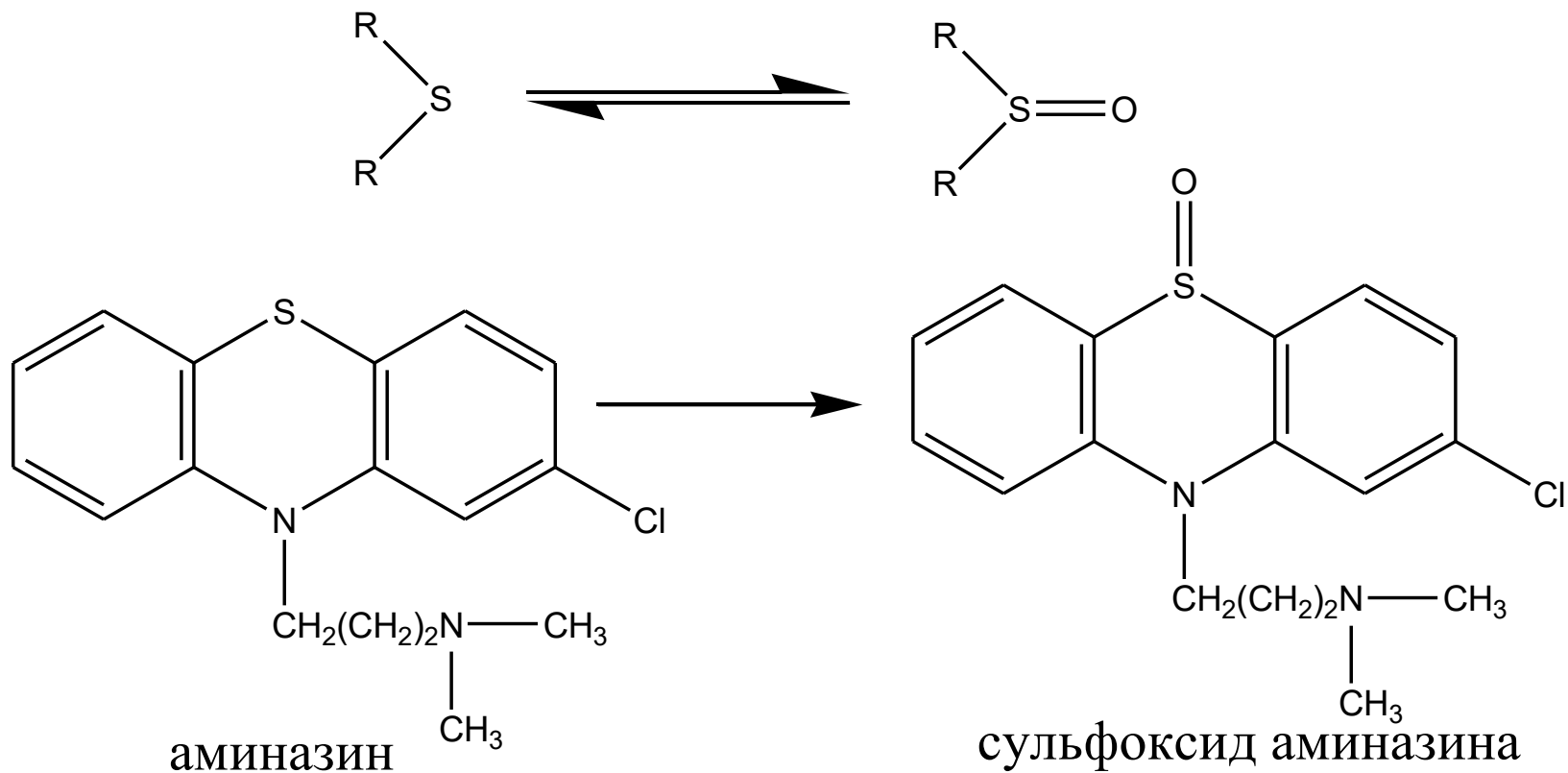
Продолжение.

1.3. Дезаминирование

Реакции под действием микросомальной аминоксигеназы, НАДФН₂ и О₂.
Дезаминирование веществ приводит к полной потере их активности.

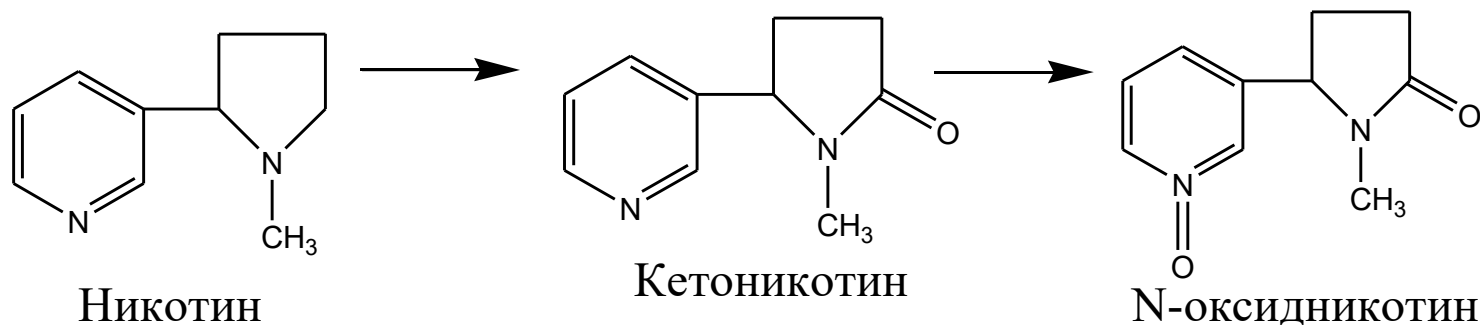
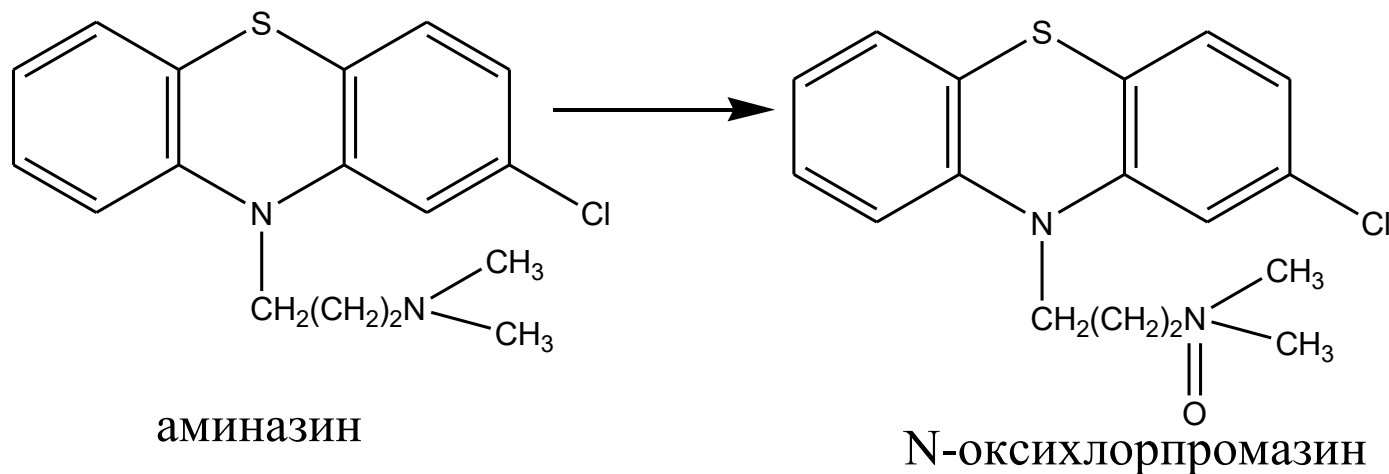


1.4. Сульфоокисление.

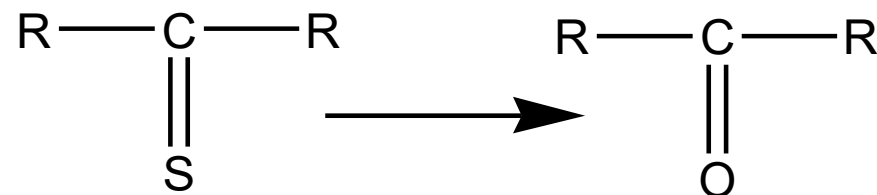


1.5. Образование N-оксидов.

Образование N-оксидов характерно для веществ, содержащих концевую диметиламиногруппу (но не этил-, пропил- или бутиламиногруппу), например, для фенотиазина, дифенилметана. В результате образуются N-оксиды. Например, никотин после окисления пирролидинового цикла образует N-оксиды по пиридиновому ядру молекулы.

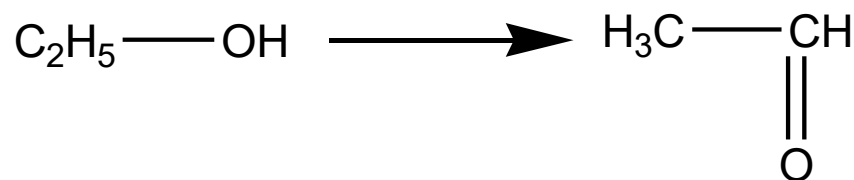


1.6. Десульфирование (удаление атома серы из молекулы органического соединения).



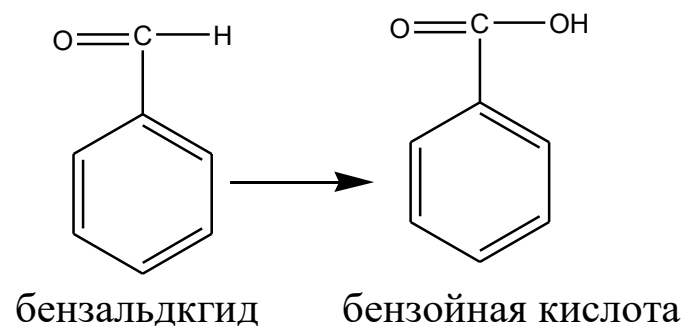
Б. Окисление немикросомальными ферментами

1.7. Окисление спиртов (с помощью алкогольдегидрогеназы)



Полученный в результате окисления этанола уксусный альдегид намного токсичнее этилового спирта.

1.8. Окисление альдегидов.

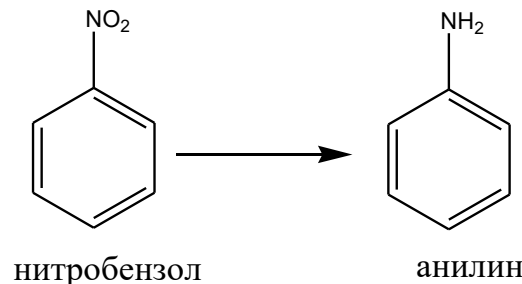
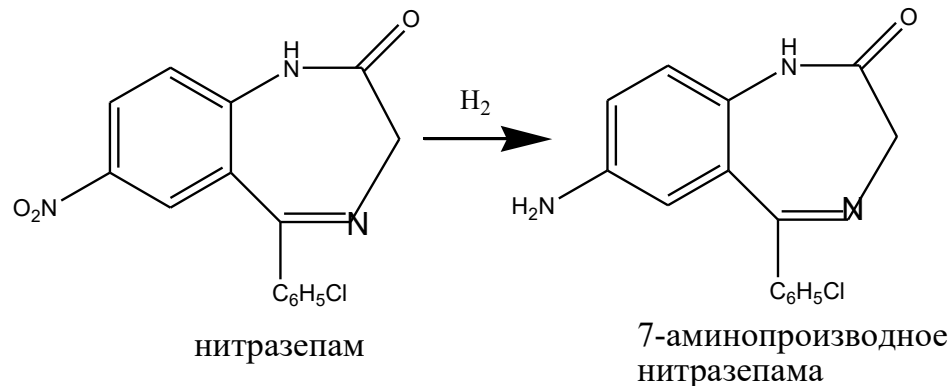


Реакции восстановления

Эндоплазматический ретикулум печени помимо окислительных ферментативных систем содержит ферменты, которые восстанавливают ароматические нитро- и азосоединения и амины.

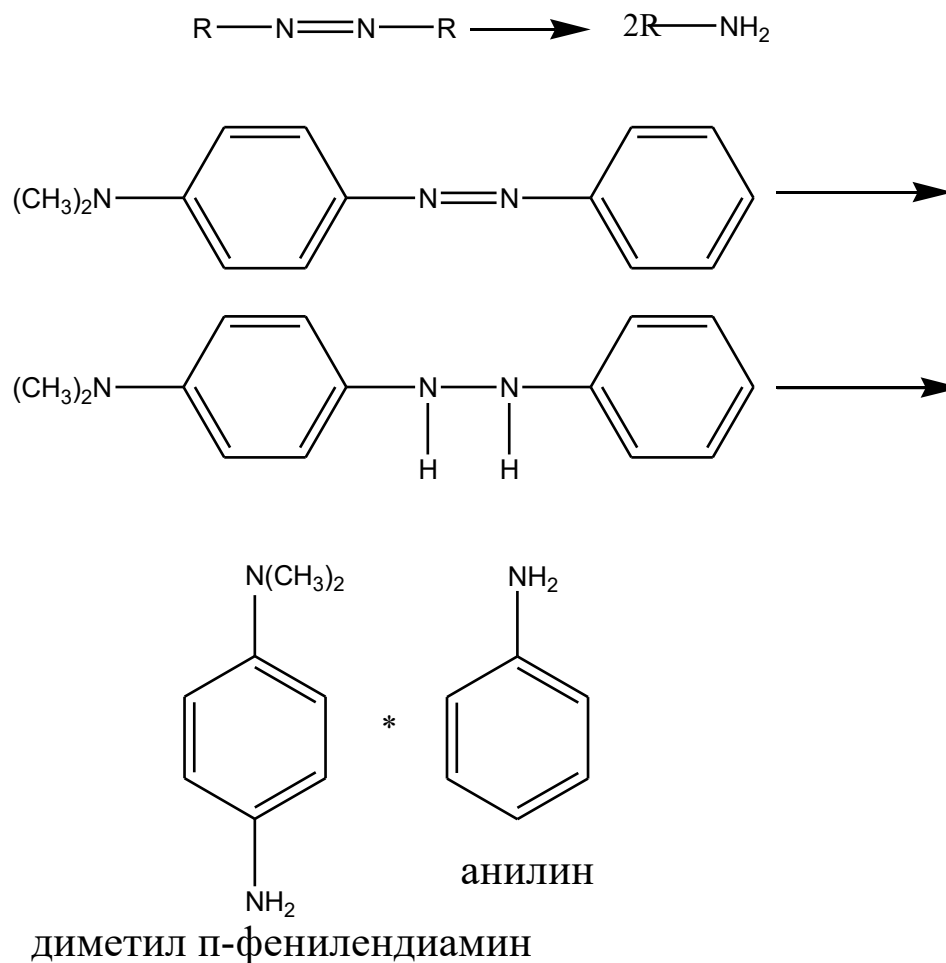
А. Восстановление микросомальными ферментами

2.1. Восстановление нитросоединений (в основном ароматические нитро- и азосоединения в амины).



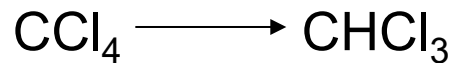
2.2. Восстановление азогруппы первичных аминов.

Азосоединения подвергаются сначала восстановлению в гидразосоединении, а затем восстановительному расщеплению. В результате образуется две молекулы ароматических аминов.



2.3. Восстановительное дегалогенирование (удаление галогена из алифатического или ароматического соединения).

Один из микросомальных ферментов в присутствии НАДФН₂ и O₂ с одновременным восстановлением удаляет галоген из алифатических галогенных соединений. Пример, тетрахлорметан, хлороформ, четыреххлористый углерод.



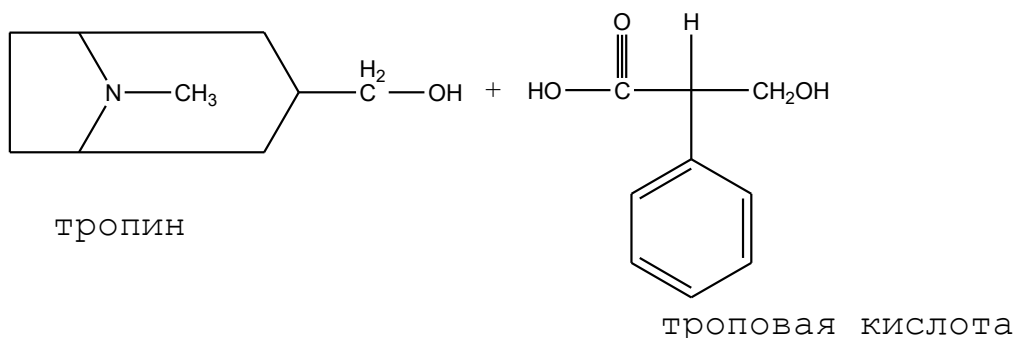
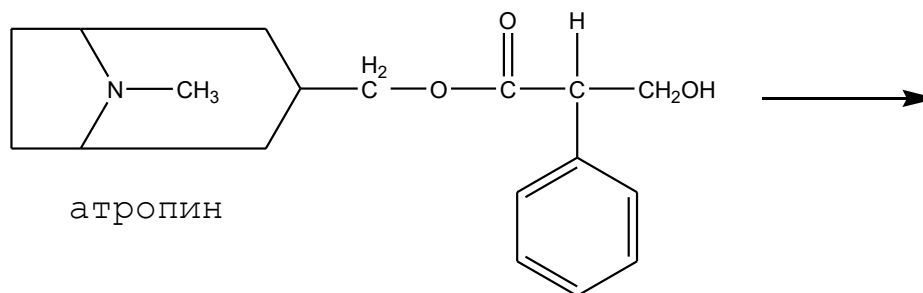
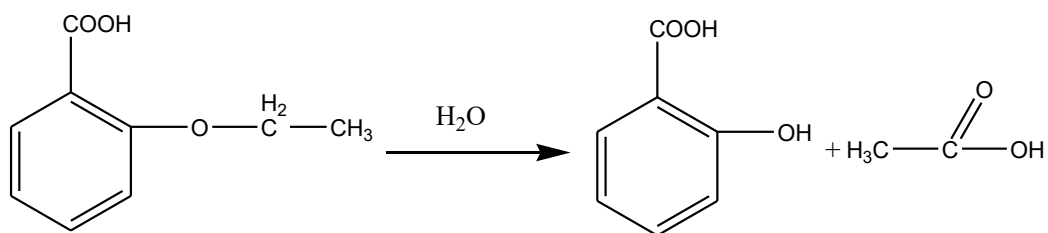
Б. Восстановление немикросомальными ферментами

кетогрупп, карбоксигрупп, карбонильных групп, а также восстановление N-оксидов.

3. Реакции гидролиза

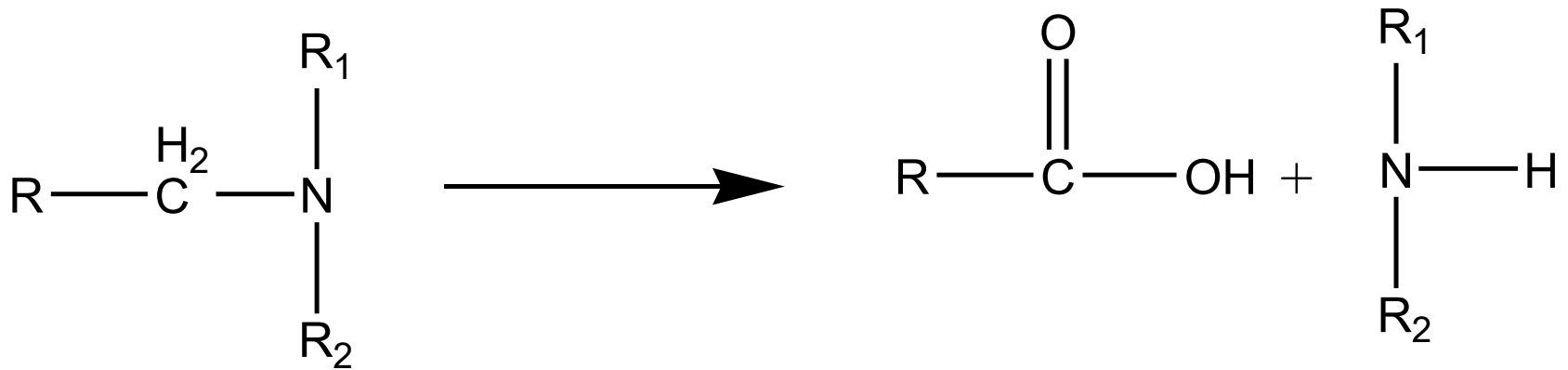
Реакции гидролиза происходят при участии микросомальных и немикросомальных ферментов печени и плазмы крови.

3.1. Гидролиз сложных эфиров на примере кислоты ацетилсалициловой и атропина



3.2. Гидролиз амидов.

Амиды более устойчивы в организме и поэтому медленно подвергаются гидролизу.



Реакции II-й фазы. Конъюгация

Конъюгация представляет собой биосинтез, при котором чужеродные соединения и их метаболиты соединяются с доступными эндогенными субстратами. Образование глюкуронидов происходит в печени, в меньшей степени – в почках, ЖКТ, коже.

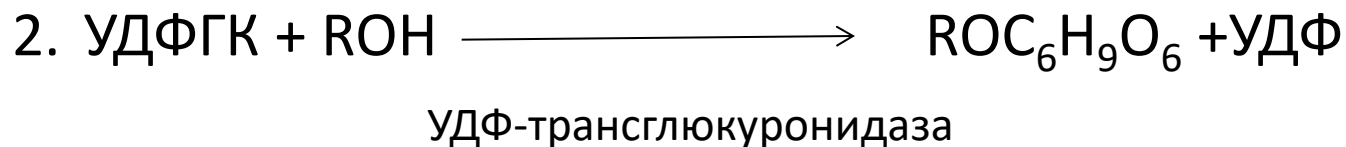
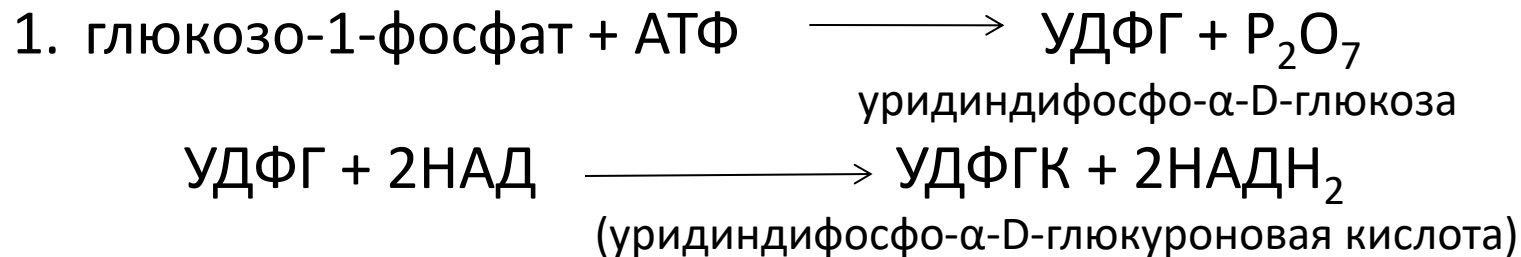
Наибольшее распространение получили следующие реакции **конъюгации**:

1. Глюкуронидная;
2. Сульфатная;
3. С глутатионом;
4. С глутамином;
5. С аминокислотами, например, глицином;
6. Метилирование;
7. Ацетилирование.

1. Глюкуронидная (глюкуроновая) конъюгация

Глюкуронирование (конъюгация) заключается в присоединении к функциональной группе токсического вещества активной формы глюкуроновой кислоты (уридиндифосфо- α -D-глюкуроновая кислота) – УДФГК.

УДФГК образуется в организме путем окисления глюкозного остатка, который входит в состав уридиндифосфоглюкозы. Образование глюкуронидов включает 2 стадии: биосинтез коферментного донора, УДФГК и перенос глюкуронидной части УДФГК на агликон, который осуществляется специальным ферментом - глюкуронилтрансферазой, находящейся в основном в микросомах печени и селезёнке.



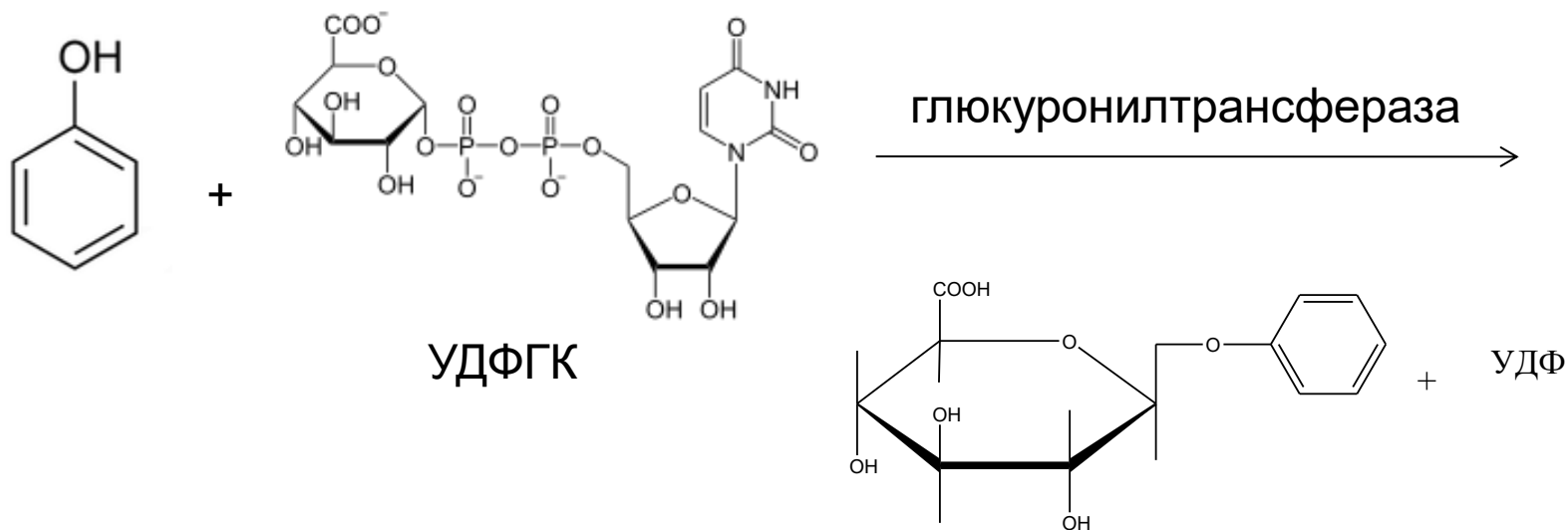
Продолжение.

Важной структурной особенностью глюкуронидов является то, что карбоксильная группа остается свободной и практически полностью ионизируется в плазме крови и моче, что приводит к быстрой экскреции (выведению) глюкуронидов с мочой и дезактивации вещества.

О-глюкурониды

образуются из фенолов, спиртов и карбоновых кислот

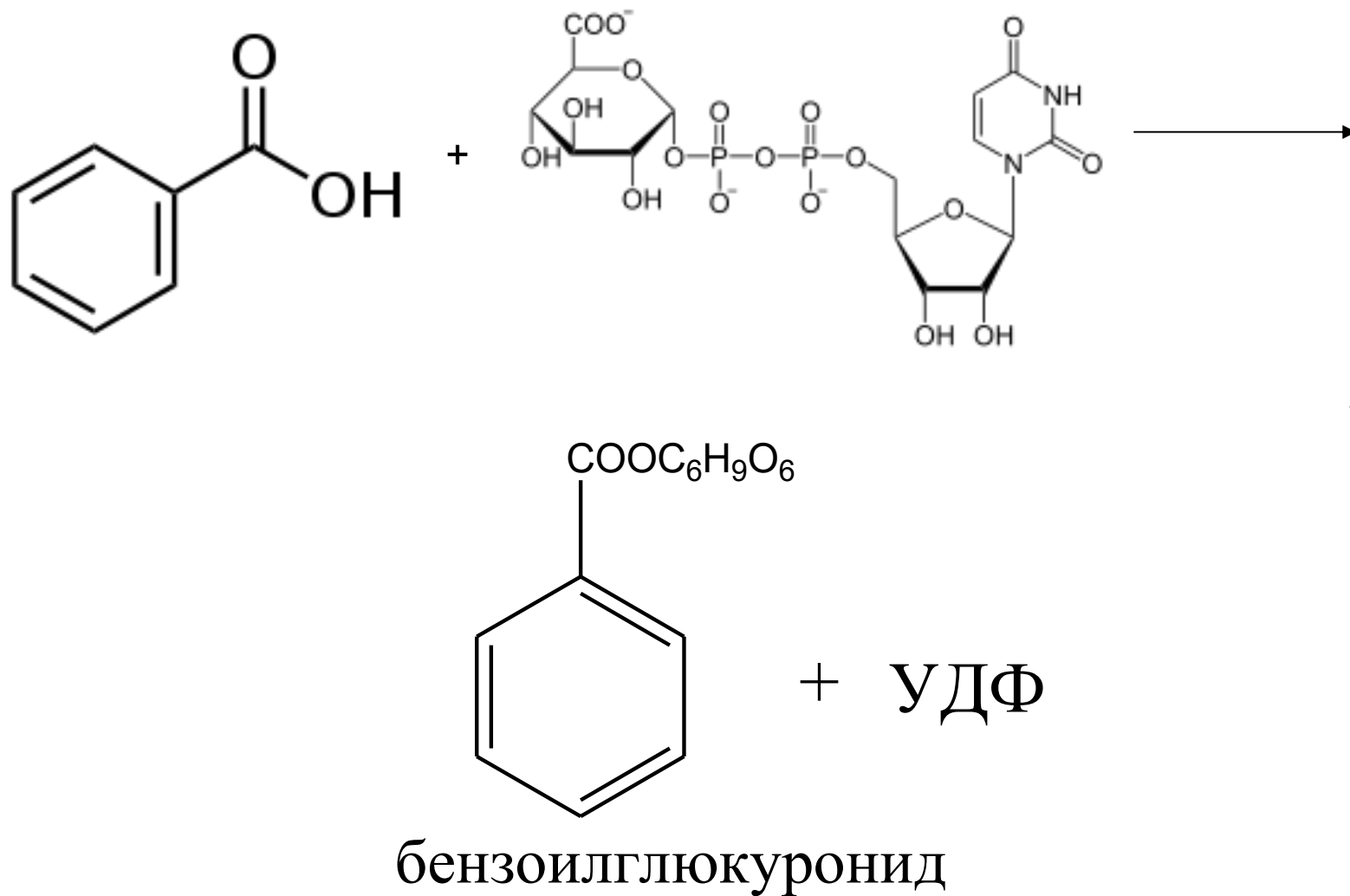
Эфирный тип – из первичных, вторичных и третичных спиртов и фенолов



Продолжение.

О-глюкурониды

Сложноэфирный тип – из карбоновых кислот

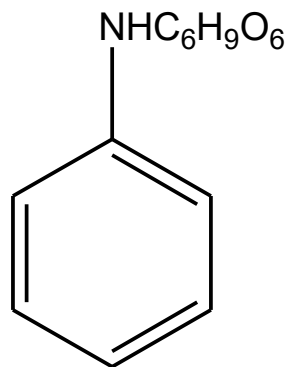


Гидроксиламиновый тип

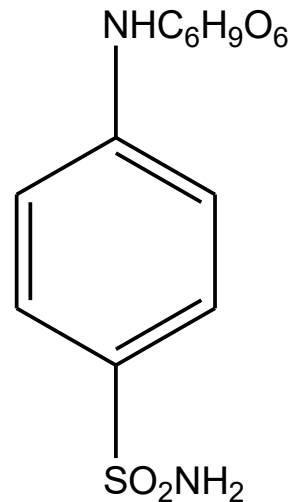
N-глюкурониды

Известно несколько различных типов образования *N*-глюкуронидов: атом азота, к которому присоединяется глюкуронидная часть, может находиться в аминогруппе, сульфамидной группе или в гетероциклическом азотистом соединении.

Примеры



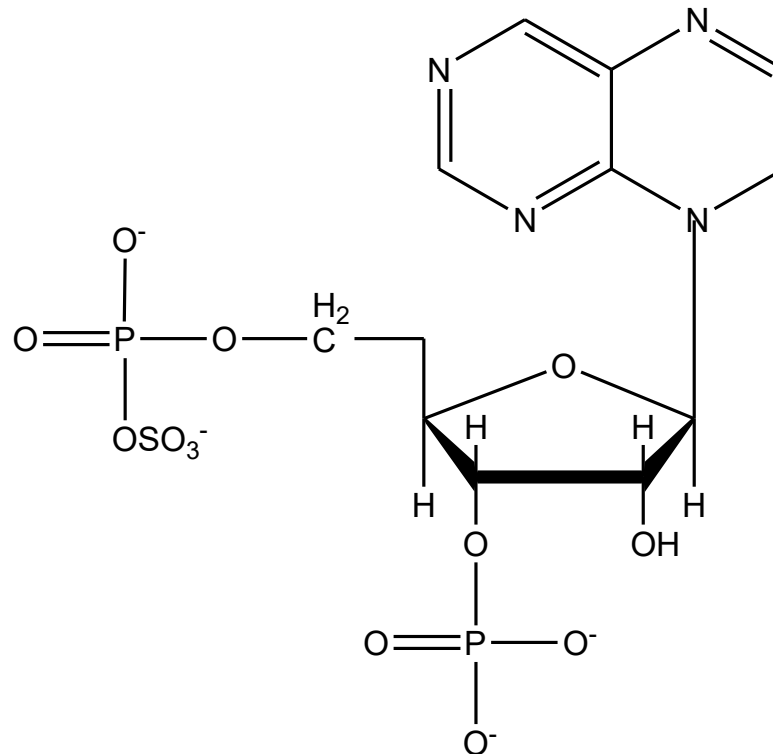
анилинглюкуронид



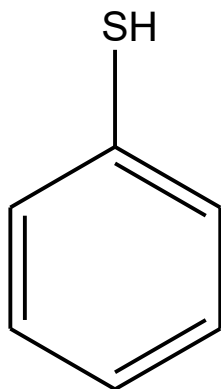
сульфаниламид-
N-глюкуронид

- Серная кислота образуется в организме в результате окисления серы, входящей в состав белков. Прежде чем вступить в реакцию конъюгации серная кислота под действием ферментов активируется.

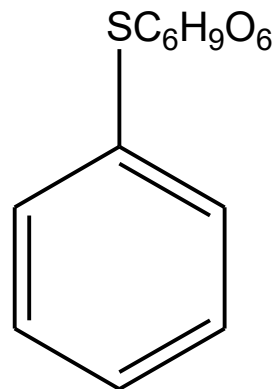
В результате отщепления от АТФ пироглосфорной кислоты и образуется активная форма сульфата – аденозин-3`-фосфат-5`-фосфосульфат (АФФС)



***S*-глюкурониды (для тиоловых соединений)**



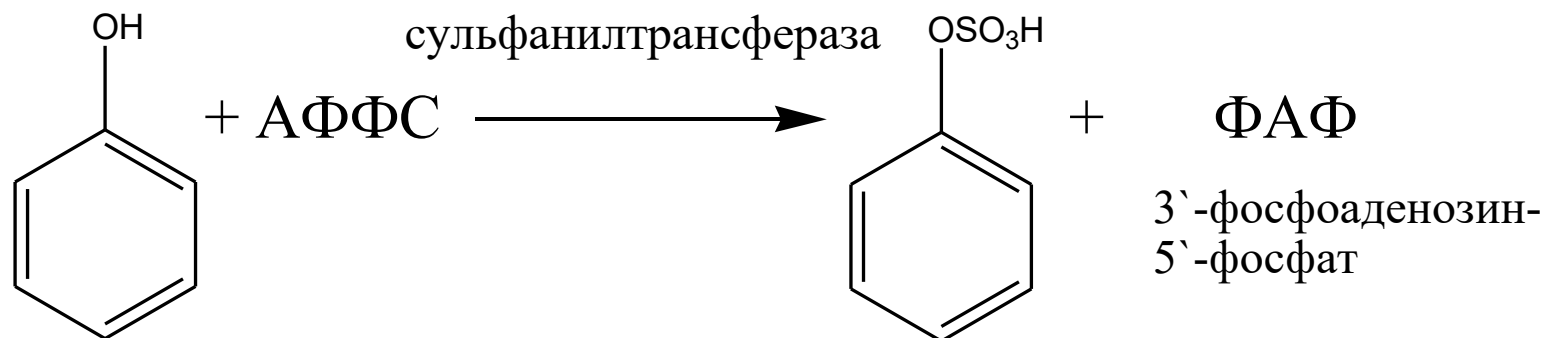
тиофенол



тиофенола глюкуронид

2. Сульфатная конъюгация

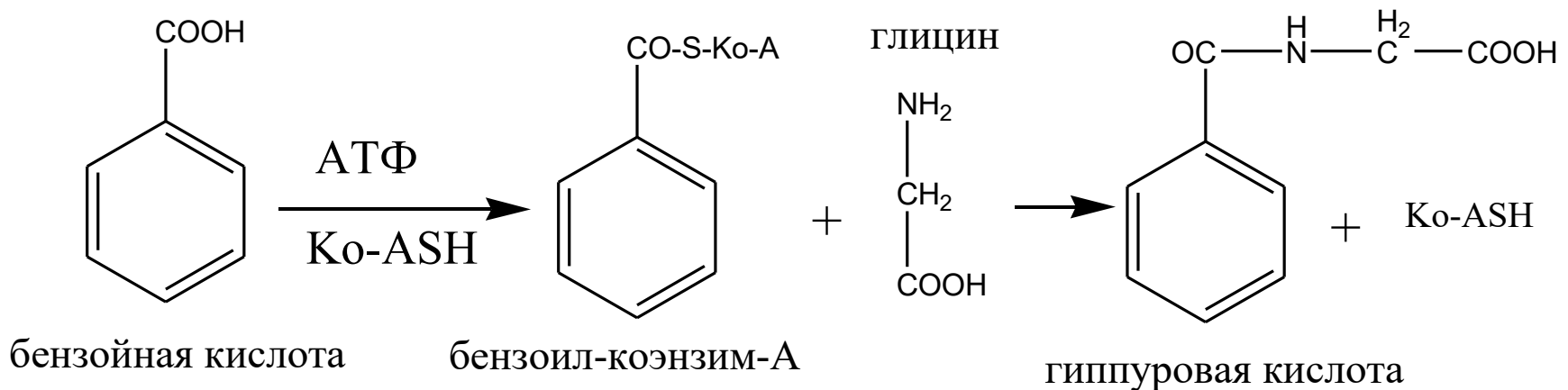
Сульфатная конъюгация относится к наиболее древним и примитивным видам детоксикации и приводит в ряде случаев к образованию нетоксичных метаболитов. В реакции принимает участие активная форма сульфата аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфат (АФФС), от которого и переносится сульфат. Эта реакция протекает в основном в печени, но может быть и в других органах, например, почках, кишечнике, поджелудочная железа и др.



3. Пептидная конъюгация

Конъюгация с глицином и другими аминокислотами характерна для ароматических карбоновых кислот, таких как бензойная кислота и её замещенные производные, гетероциклические карбоновые кислоты.

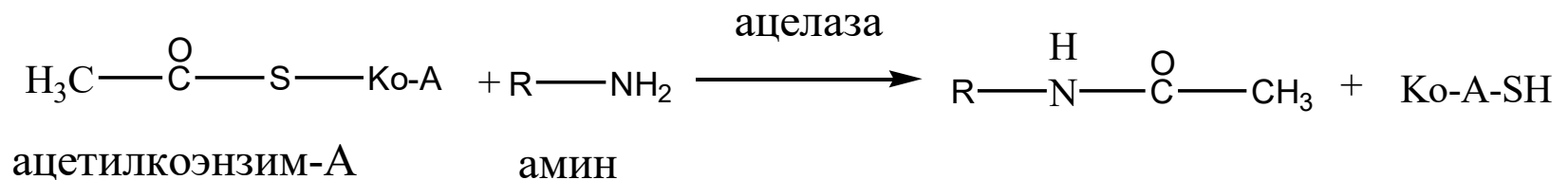
Основной аминокислотой, участвующей в механизме пептидной конъюгации является глицин. Глициновые конъюгаты известны, как «Гиппуровые кислоты». Механизм пептидной конъюгации заключается в образовании коэнзим-А производных карбоновых кислот (активация кислот) в присутствии АТФ.



4. Ацетилирование

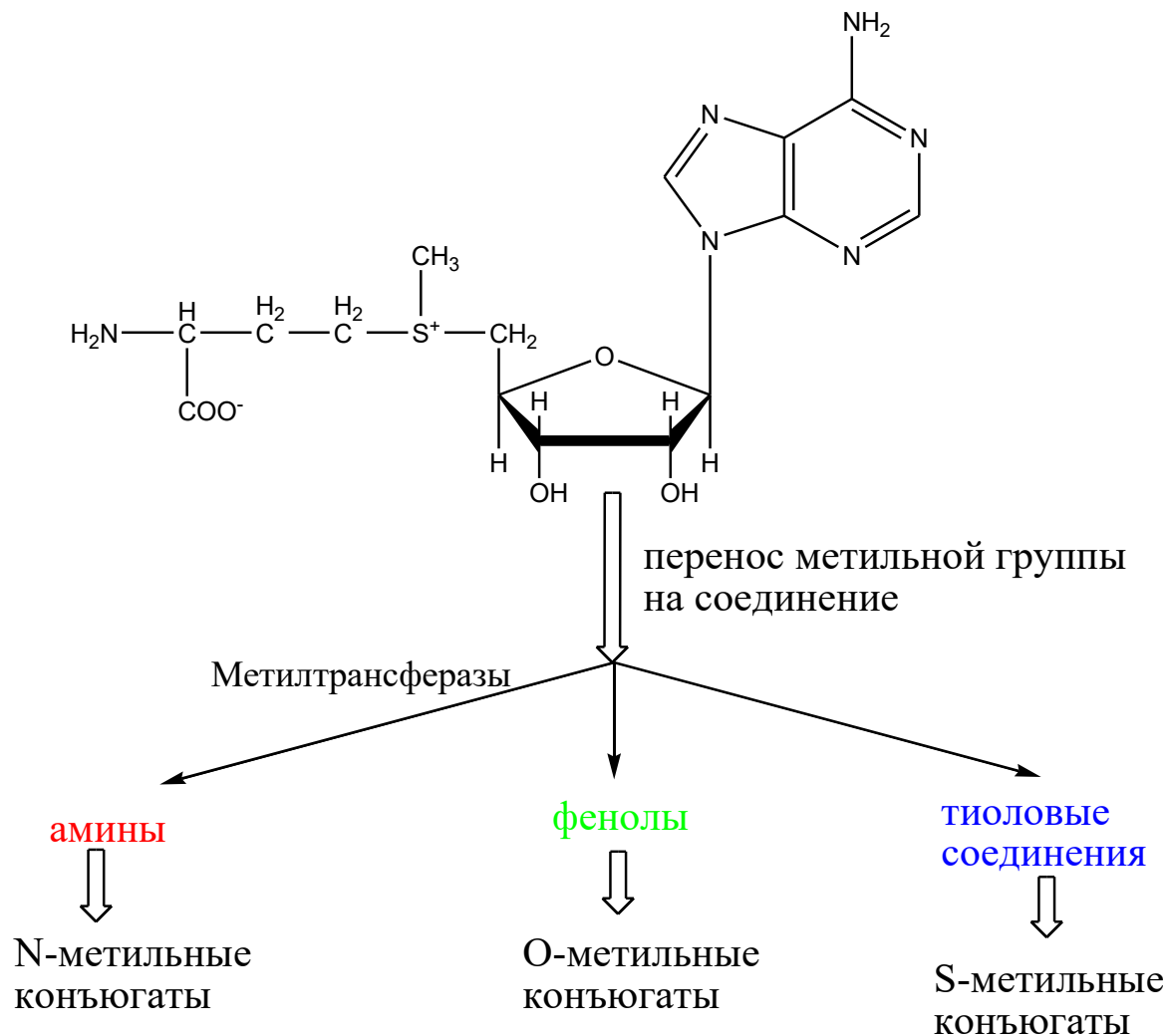
Ацетилирование является основным путем биотрансформации ароматических аминов, сульфаниламидов, гидразидов изоникотиновой кислоты (тубазид, фтивазид), анимлина. Процесс происходит в основном в печени. Полученное производное может вызывать кристаллоурию, накапливаясь в почках.

Кабоновые кислоты и амины ацетируются через промежуточные соединения с коэнзимом-А с образованием амидных конъюгатов.



5. Метилирование

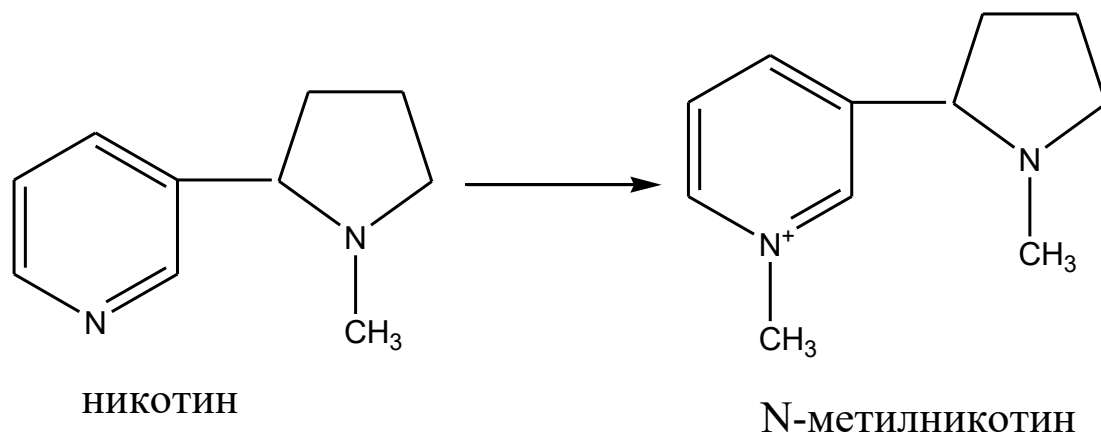
Метилирование заключается в переносе метильной группы от кофермента S-аденозинметионина на амины, фенолы и тиоловые соединения.



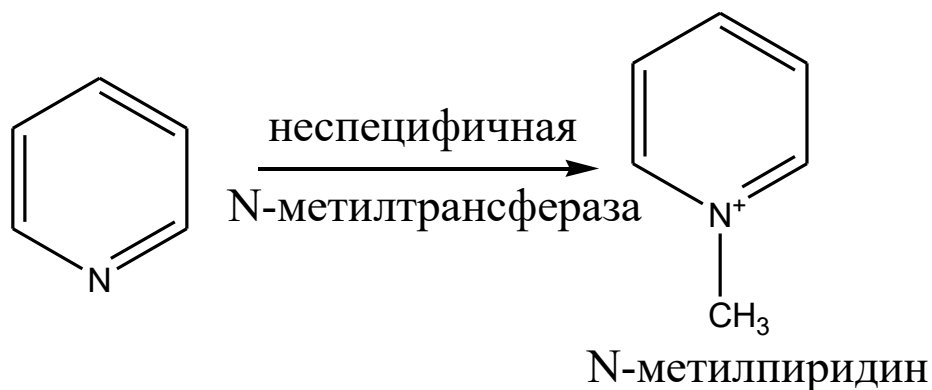
Продолжение. Метилирование

Классификация реакций:

***N*-метилирование,**
***O*-метилирование,**
***S*-метилирование**

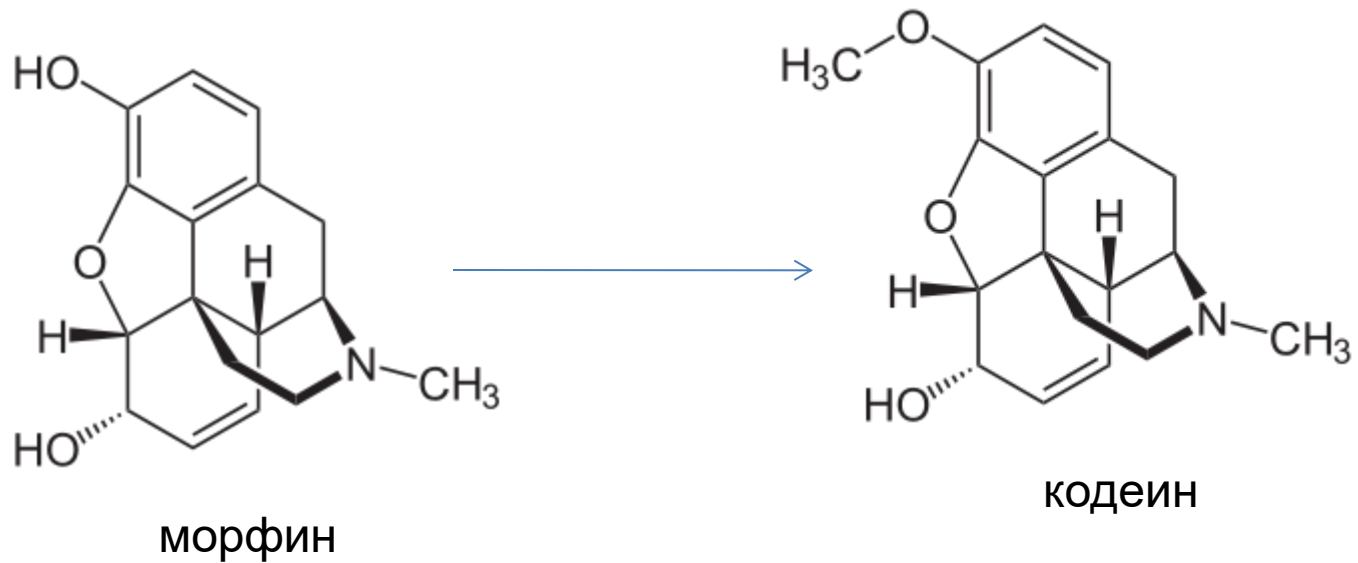


Пример: ***N*-метилирование**



Продолжение. Метилирование

Пример: *O*-метилирование



Факторы, влияющие на метаболизм лекарственных веществ

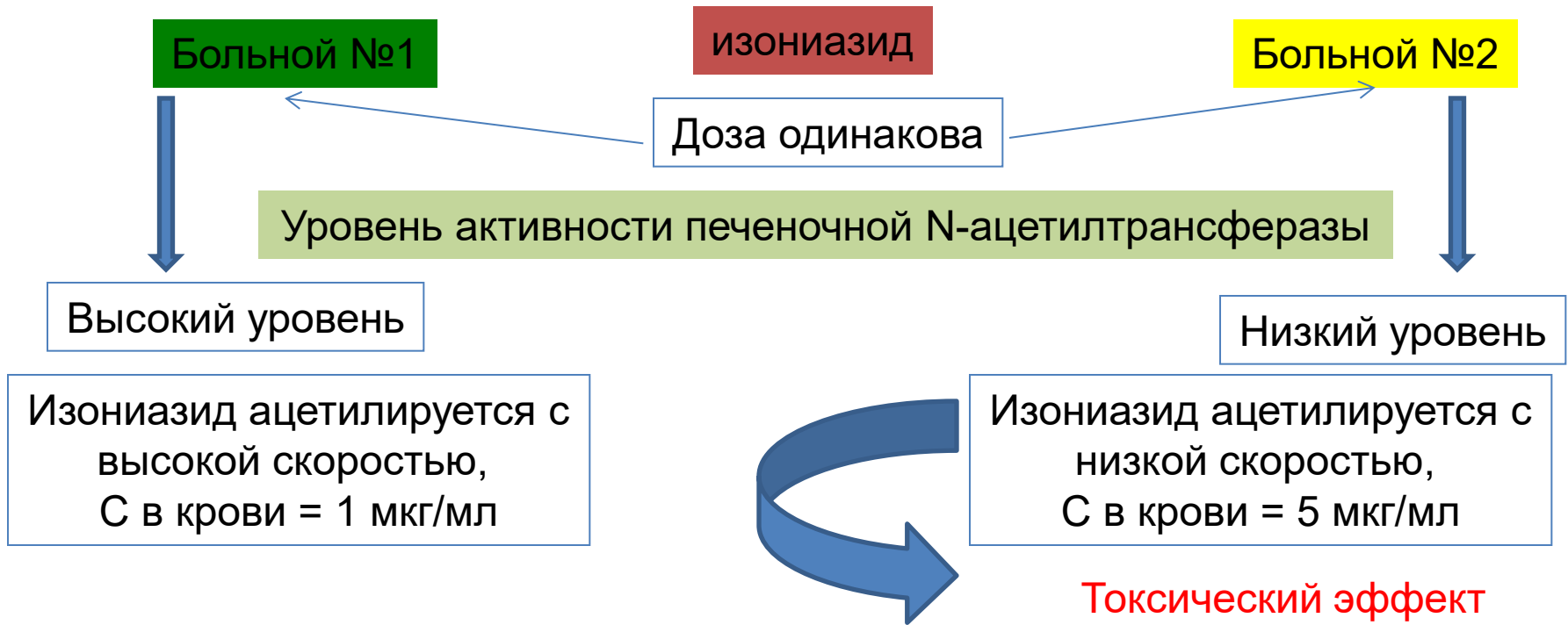
Выделяют ряд факторов, которые способны оказывать влияние на метаболизм (усилить или ускорить метаболические превращения веществ):

- Генетические факторы (межвидовые различия и различия внутри вида);
- Физиологические факторы (возраст, беременность, различные заболевания);
- Факторы, связанные с окружающей средой (стресс, неблагоприятные условия, облучение ионизирующей радиацией, воздействие других чужеродных соединений на организм)

Генетические факторы

- Все химические процессы в организме протекают при участии ферментов. Возможен вариант, что фермент есть, но изменена его форма (изоформа), либо имеется генетический дефект гена, ответственного за синтез данного фермента, в результате чего образуются неактивные молекулы белка, что вызывает отклонения в картине метаболизма.

Пример. Различие в ацетилировании



Пример различий глюкуронидной конъюгации

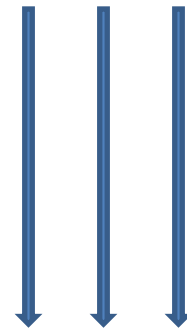
При генетических нарушениях может быть уменьшена глюкуронилтрансферазная активность

в результате



Угнетение образования *глюкуронида билирубина*

Хроническая желтуха



(особенно выражена у новорожденных)

Физиологические факторы. Заболевания

- Заболевания печени — замедление скорости метаболизма ЛВ и повышение чувствительности ко многим ЛВ

Пример: у больных с обтурационной желтухой, гепатитом, циррозом печени нарушено образование глюкуронидных и сульфатных конъюгатов

Почечная недостаточность по разному отражается на метаболизме

Для ряда ЛВ
изменения в скорости
биотрансформации
не наблюдаются



Наблюдаются изменения:
для антипирина, фенацетина
• Увеличение скорости
процессов окисления

При уремии:

- снижена скорость ацетилирования, например, изониазида;
- замедлен гидролиз, например, новокаина, цефалотина;
- снижена скорость восстановления, например, кортизола.

Возраст

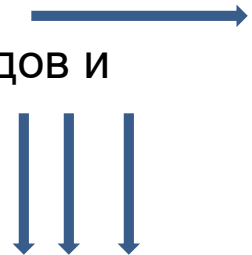
- Детский возраст

Низкая активность микросомальных энзимов печени, участвующих в биотрансформации

У новорожденных

Наблюдается снижение способности образовывать конъюгаты
понижен синтез глюкуронидов и конъюгатов с глицином

Повышается токсичность



Пример: Повышена токсичность, например, к барбитуратам короткого действия, которые выводятся в виде глюкуронидов (в то же время проявляется толерантность к барбитуратам длительного действия, которые выводятся в основном в неизмененном виде).

Продолжение. Возраст

- Пожилой возраст
- Токсичность ряда химических веществ повышается по целому ряду причин, среди которых – замедление метаболических реакций.

Пример: снижен метаболизм дигоксина, что может потенциировать его токсический эффект.

Половые различия

Половые гормоны оказывают влияние на метаболические реакции. Например, у самцов крыс более активны микросомальные ферменты печени, поэтому образование глюкуронидов у них происходит быстрее, чем у самок, в связи с чем детоксикация у самцов также протекает быстрее. Однако имеется ряд веществ при метаболизме которых образуются токсичные конъюгаты. Поскольку у самок скорость метаболизма снижена, то и токсическое действие менее выражено.

У самцов также ускоряются процессы N-деметилования морфина, стрихнина, гексобарбитала.

Беременность

- В конце беременности снижена способность к конъюгации с глюкуроновой кислотой (отрицательное влияние прогестерона и прегнадиона). Происходит угнетение метаболических реакций в связи с наличием веществ специфических для беременности.

Питание и диета

- При недостаточном поступлении пищи в организм возникает дефицит синтеза ферментов, что связано прежде всего с недостатком субстратов для синтеза тех или иных веществ: замедляется скорость окисления и восстановления целого ряда лекарственных веществ. Недостаточность синтеза в этих случаях, в том числе и микросомальных ферментов, отрицательно сказывается на детоксикационной функции организма.

Факторы, связанные с окружающей средой

- **Стресс**

Может происходить
ускорение
микросомального
окисления вследствие
индукции
микросомальных
ферментов

- **Ионизирующая радиация**

Развивается ответная
стрессовая реакция, в
результате которой
образуется НАДН₂ и
НАДФН₂, в результате чего
нарушается
микросомальное
окисление в печени. У
мышей, например,
происходит угнетение
глюкуронидной
конъюгации.

Индукция метаболизирующих ферментов (ускорение метаболизма токсических веществ)

Вещества-индукторы→

некоторые ЛВ (фенобарбитал,
аминопирин, имипрамин,
мепробамат и др.);

пестициды;

вещества табачного дыма;

эндогенные соединения (стероиды);

(всего около 300 веществ)

Фенобарбитал – типичный химический активатор. Ускоряет процессы гидроксилирования многих веществ, деметилирования (например, аминопирин), всстановления азосоединений и другие микросомальные превращения.

Механизм индукции

- В начале под действием индуктора происходит увеличение активности молекул фермента, а затем ускоряется синтез молекул фермента. Индукция метаболизирующих ферментов – процесс обратимый – после прекращения приема индуктора активность ферментов снижается до исходного уровня. Отсюда следует, что возможно резкое увеличение фармакологических (токсических) эффектов.
- Под действием индукторов повышается скорость синтеза ферментов и увеличивается количество микросомальных ферментов, в том числе цитохрома Р450 и НАДФН₂ – цитохром С-редуктазы.

Ингибирование

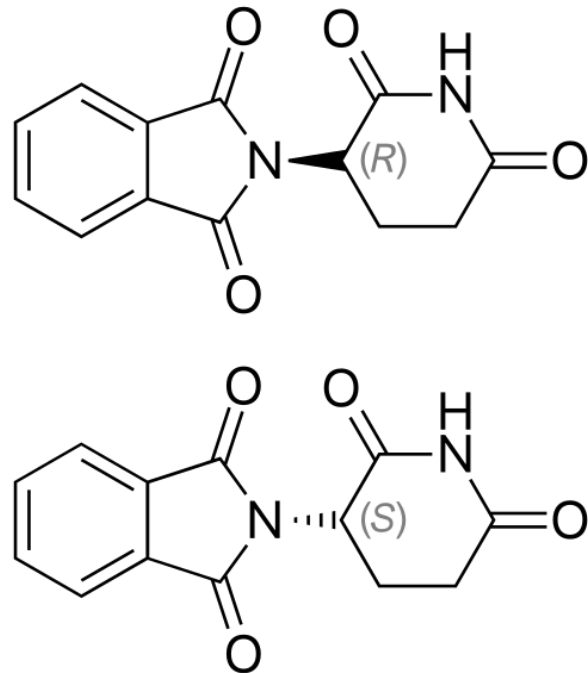
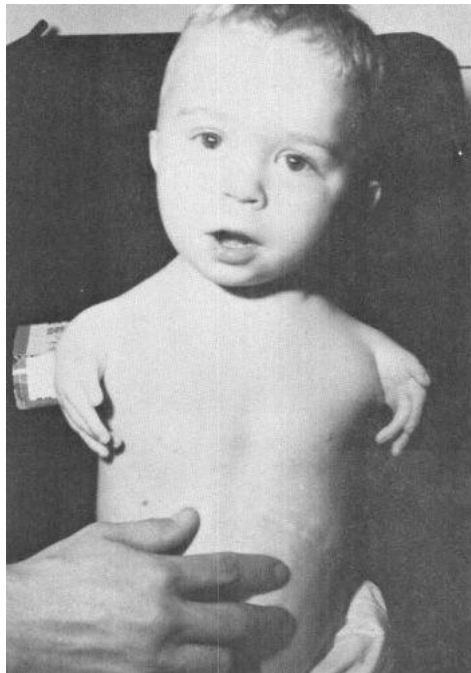
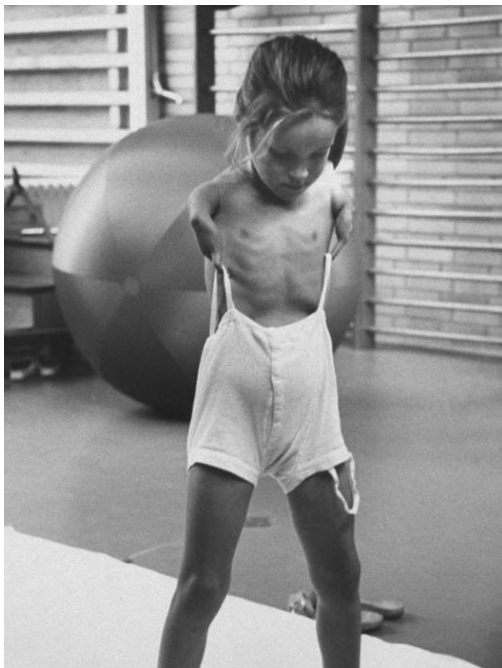
- Ингибиторами являются вещества, которые пролонгируют действие химического агента за счет торможения ферментативных реакций превращения.

Пример: аминозин, введенный за 30 минут до приема барбитуратов пролонгирует действие последних. Таким образом, комбинированный прием двух ЛВ может усиливать или ослаблять их действие.

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предпосылки становления современных подходов ДКИ ?

ТАЛИДОМИДОВАЯ ТРАГЕДИЯ



- с 1956 по 1962 годы родилось от 8000 до 12 000 детей с врождёнными уродствами
- Талидомид поступал в продажу в 46 странах Европы

Предпосылки становления современных подходов ДКИ ?

Инцидент с элексиром сульфаниламида в 1937 году – Погибло 107 пациентов (США)

Отравление препаратом сталинол в 1954 году – Погибло 100 пациентов. (Франция)

Отравление препаратом ацетаминофен в 1997 году – Погибло 88 пациентов. (Гаити)

в 2010 г. в Российской Федерации было собрано 9404 сообщения о неблагоприятных побочных реакциях лекарственных средств, их неэффективности; тяжелые осложнения получили 5 тыс. человек, 79 скончались

По данным эпидемиологических исследований, побочные эффекты лекарственной терапии в США и Канаде выходят на 5–6-е место в структуре смертности (J.Lazarou и соавт., 1998)

Область распространения ДКИ



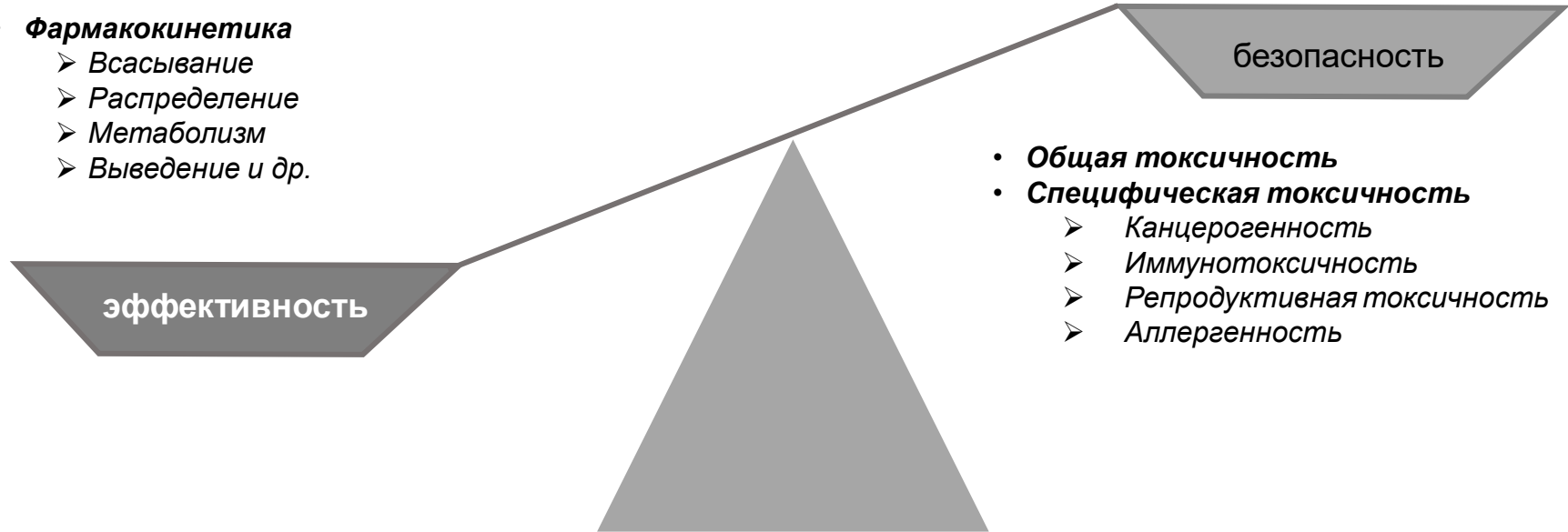
ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- **Фармакодинамика**

- Первичная фармакодинамика
- Вторичная фармакодинамика
- Фармакологическая безопасность

- **Фармакокинетика**

- Всасывание
- Распределение
- Метаболизм
- Выведение и др.



безопасность

эффективность

- **Общая токсичность**

- **Специфическая токсичность**

- Канцерогенность
- Иммуотоксичность
- Репродуктивная токсичность
- Аллергенность

ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ ДКИ

**Характеристика
токсических эффектов**

**Картина
интоксикации**

Органы-мишени

**Зависимость
токсических эффектов
от дозы**

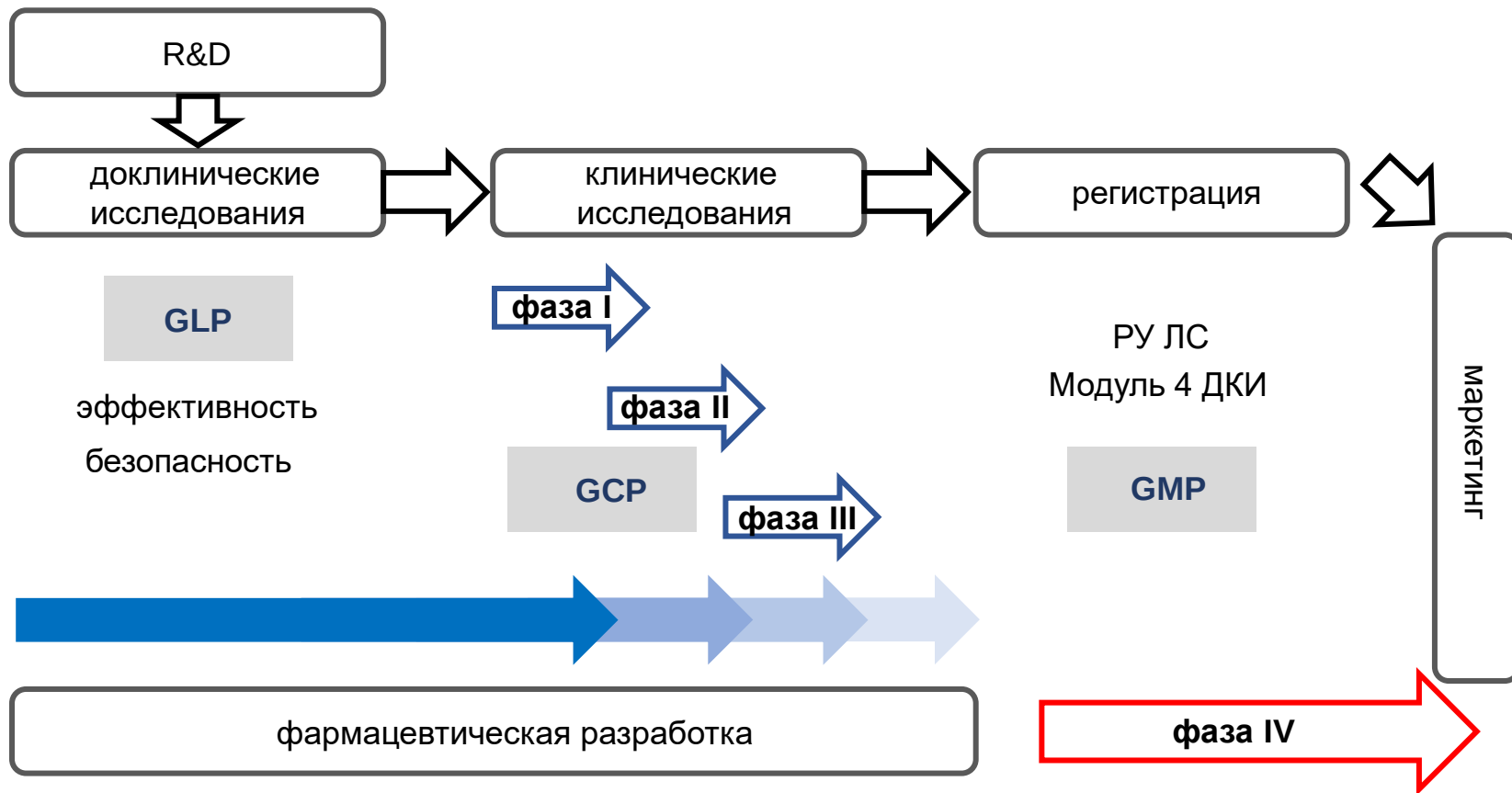
**Полученная информация
используется для**

**Стартовая доза
в клинических
исследованиях**

**Определение
диапазона
доз**

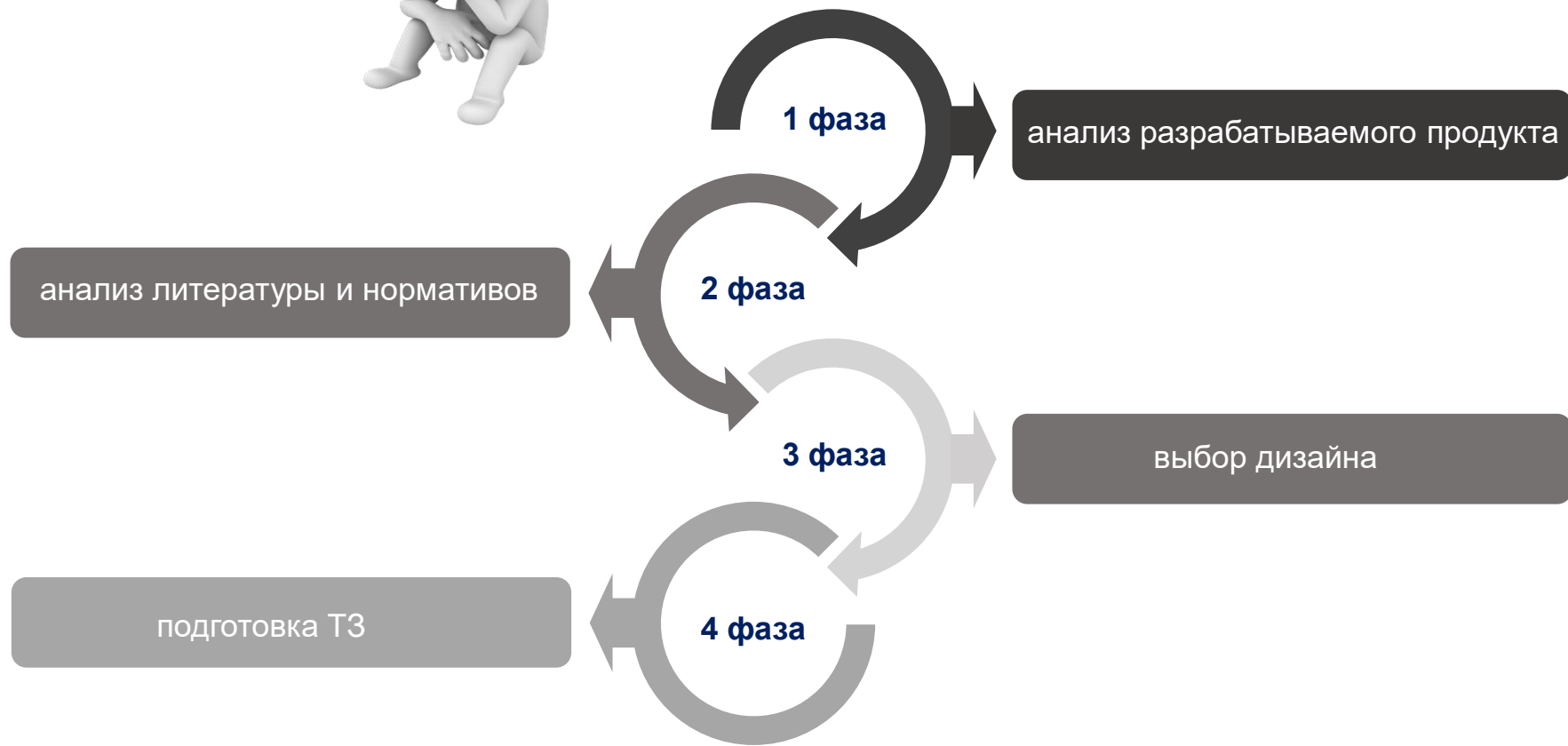
**Прогноз побочных
эффектов**

ДКИ и ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА





С ЧЕГО НАЧАТЬ ?



ФАЗА 1: анализ разрабатываемого продукта

Лекарственное
средство

дженерик

полный дженерик

гибридный

оригинальный
препарат

биологический
препарат

моноклональные антитела

вакцины

БМКП

генотерапевтические ЛС

малые молекулы

Медицинское
изделие

инвазивное МИ

не инвазивное МИ

ФАЗА 2: анализ литературы и нормативов

Национальные
документы

Руководства (под ред. Миронова А.Н., М., ФГБУ «НЦЭМСП»- 2012 г., в 2-х томах)
ГОСТ (93 документа)
СанПин СП 2.2.1.3218-14 по Виварию (2014)

Решения
Евразийского
союза

- Решения евразийской комиссии (О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (с изменениями на 14 июня 2018 года))
- Решения евразийской комиссии Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств и др.

Международные

- ICH (Раздел S и M)
- FDA
- OECD (OECD guidelines)

Публикации /
Научное обоснование

- PubMed
- Научные подходы

ФАЗА 3: выбор дизайна



ФАЗА 4: подготовка ТЗ

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

НА ОСНОВАНИИ ЧЕГО ДЕЛАЕМ

документы, регламентирующие ДКИ
(ГОСТ, Решение Совета ЕЭК, Руководства, Директивы и др.)

ВЫБОР ТЕСТ-СИСТЕМЫ

стандарты, регулирующие обращение с животными
(ГОСТ, Руководства, СанПин и др.)

КАК ДЕЛАЕМ

документы, регламентирующие объем, схему и процедуру проведения
(ГОСТ, Решение Совета ЕЭК, Руководства, Директивы, методы OECD и ICH)

НА ЧЕМ ДЕЛАЕМ

Требования к оборудованию, методикам
(валидация, квалификация, поверка, калибровка, верификация.)

ВИДЫ ДКИ ДЛЯ ОРИГИНАЛЬНОГО ЛС

Исследование
эффективности



Фармакодинамика

➤ Эффективная доза

Фармакокинетика

➤ $T_{1/2}$
➤ C_{max}
➤ T_{max}
➤ AUC

Исследование
безопасности



Общая токсичность

➤ LD_{50}
➤ NOAEL
➤ LOAEL
➤ Терапевтическая широта

Специфическая токсичность

➤ Негативное влияние на иные системы

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Фармакодинамика

- Релевантный вид животных
- Модель отражает реальный патогенез
- Путь введения соответствует клиническому



Фармакокинетика

- Релевантный вид животных
- Три дозы
- Путь введения соответствует клиническому
- Расчет биодоступности
- Распределение



ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ

ОБЩАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

- Два вида животных
- Два пути введения
- АФС



ХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

- ГЛФ
- Два вида животных (один негрызуны)
- Один путь введения
- Три дозы
- Длительность сравнима с КИ
- Оценка МРД
- Фармакологическая безопасность

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

- ГЛФ
- Аллергизирующее действие
- Канцерогенность
- Репродуктивная токсичность
- Генотоксичность
- Иммуотоксичность
- Путь введения соответствует клиническому



ОБЪЁМ ДКИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ КИ (ICH M3(R2), ГОСТ Р 56701-2015) ДЛЯ ОРИГИНАЛЬНОГО ЛС

ДКИ			
Острая токсичность			
Хроническая токсичность			
Фармакокинетика			
Фармакодинамика			
Канцерогенность			
Репродуктивная токс.			
Генотоксичность			
Фармбезопасность			
Обязательно до старта КИ	КИ		
	I ФАЗА	II ФАЗА	III ФАЗА

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ПРИМЕНЕНИИ
(ICH M3R2, ГОСТ Р 56701-2015) ДЛЯ ОРИГИНАЛЬНОГО ЛС

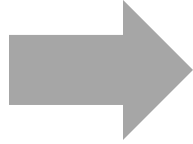
*Продолжительность введения фармакологического вещества
в хроническом токсикологическом исследовании*

Длительность клинических исследований	Минимальная длительность исследований токсичности многократной дозы (грызуны/не грызуны)	
	Фаза I/II	Фаза III
До 2 недель	2 недели /2 недели	1 месяц/1 месяц
До 1 месяца	1 месяц/1 месяц	3 месяца /3 месяца
До 3 месяцев	3 месяца /3 месяца	3 месяца /3 месяца
До 6 месяцев	6 месяцев/6 месяцев*	6 месяцев/6 месяцев*
>6 месяцев	6 месяцев/6 месяцев*	6 месяцев/6 месяцев*

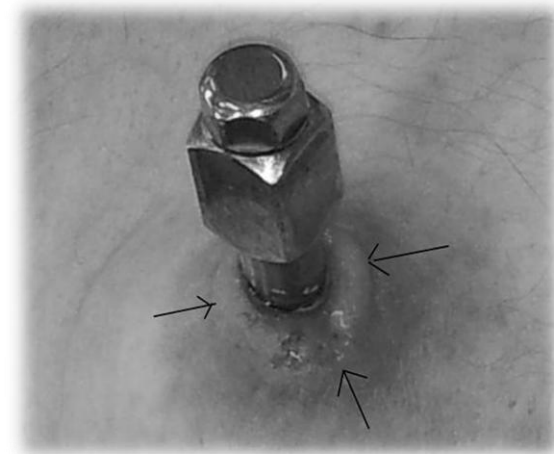
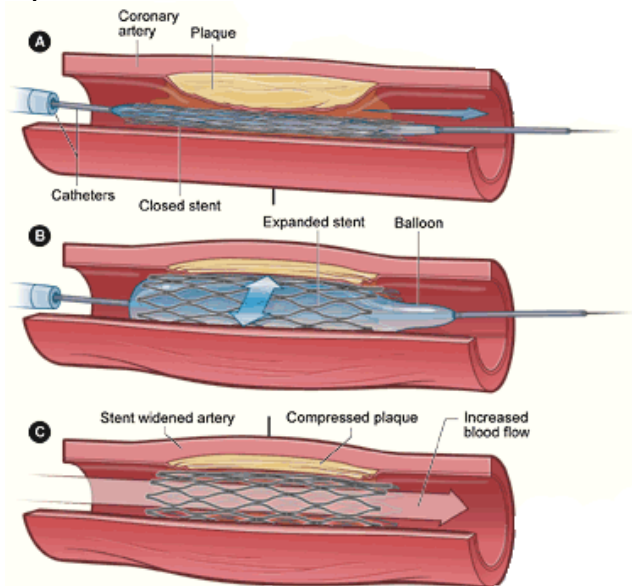
*) Допускается более длительное введение препаратов.

ДКИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

- Инвазивные протезы
- Импланты
- Медицинские повязки
- Пластыри
- Стент
- Медицинский лазер
- Тест системы (ИФА)
- Пробирки для забора биоматериала
- Др.



- ✓ исследование токсичности продуктов деградации
- ✓ испытания на системную токсичность
- ✓ испытания на генотоксичность



ДКИ И GLP

Надлежащая лабораторная практика (GLP) — система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований.

Система является утверждённым национальным стандартом РФ с 1 марта 2010 года — ГОСТ 33044-2014

Главная задача GLP — обеспечить возможность полного прослеживания и восстановления всего хода исследования

По данным реестра КИ РФ (grls.rosminzdrav.ru) и международной базы КИ (clinicaltrials.gov) в России за последние 5 лет приостановлено и досрочно завершено более 230 КИ.

Причины приостановки и досрочного завершения КИ могут явиться неэффективность ЛС, непрогнозируемые тяжелые побочные эффекты, тяжелые токсические реакции.

OECD - Организация экономического сотрудничества и развития - международная экономическая организация развитых стран, признающих принципы представительной демократии и свободной рыночной экономики

В зарубежной практике, страны члены OECD, для получения разрешения на КИ и регистрации ЛС Заявитель обязан предоставить документы в соответствии ДКИ безопасности требованиям GLP, пройти научное Консультирование, существует практика встречи с регулятором (FDA). Только после этого ЛС допускается к исследованию на людях.

ЕврАзЭС - Евразийское экономическое сообщество - международная экономическая организация ряда бывших республик СССР. Была создана для эффективного продвижения её участниками процесса формирования Таможенного союза и Единого экономического пространства.

Основные принципы GLP

➤ Приказ Министерства № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”

персонал

✓ *Квалификация, обучение*

СМК

✓ *Аудит, программа обучения, согласование и проверка*

Помещения

✓ *СанТин, разделение потоков, обеспечение качества*

Оснащенность лаборатории

✓ *Обеспечение выполнения исследования*

Тест-системы

✓ *Обеспечивать достоверность получаемых результатов*

Оборот ЛС

✓ *Надлежащее обращение ЛС внутри ИЦ*

Протокол и отчет исследования

✓ *Соответствие ГОСТ*

СОП

✓ *Описание всех процедур, актуализация, пересмотр, обучение*

Оборудование

✓ *Обеспечивать достоверность получаемых результатов*

В 2012 году в России вышло Распоряжение Правительства о программе реализации принципов GLP ОЭСР. Официальным органом по мониторингу лабораторий и подготовке инспекторов была объявлена Федеральная служба по аккредитации (Росаккредитация)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

**Кафедра фармацевтической и токсикологической химии им.
А.П. Арзамасцева**

Проведение исследования в рамках надлежащей лабораторной практики

Доцент, к.ф.н. Медведев Юрий Владимирович

СТРУКТУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Составление и утверждение
Программы исследования**

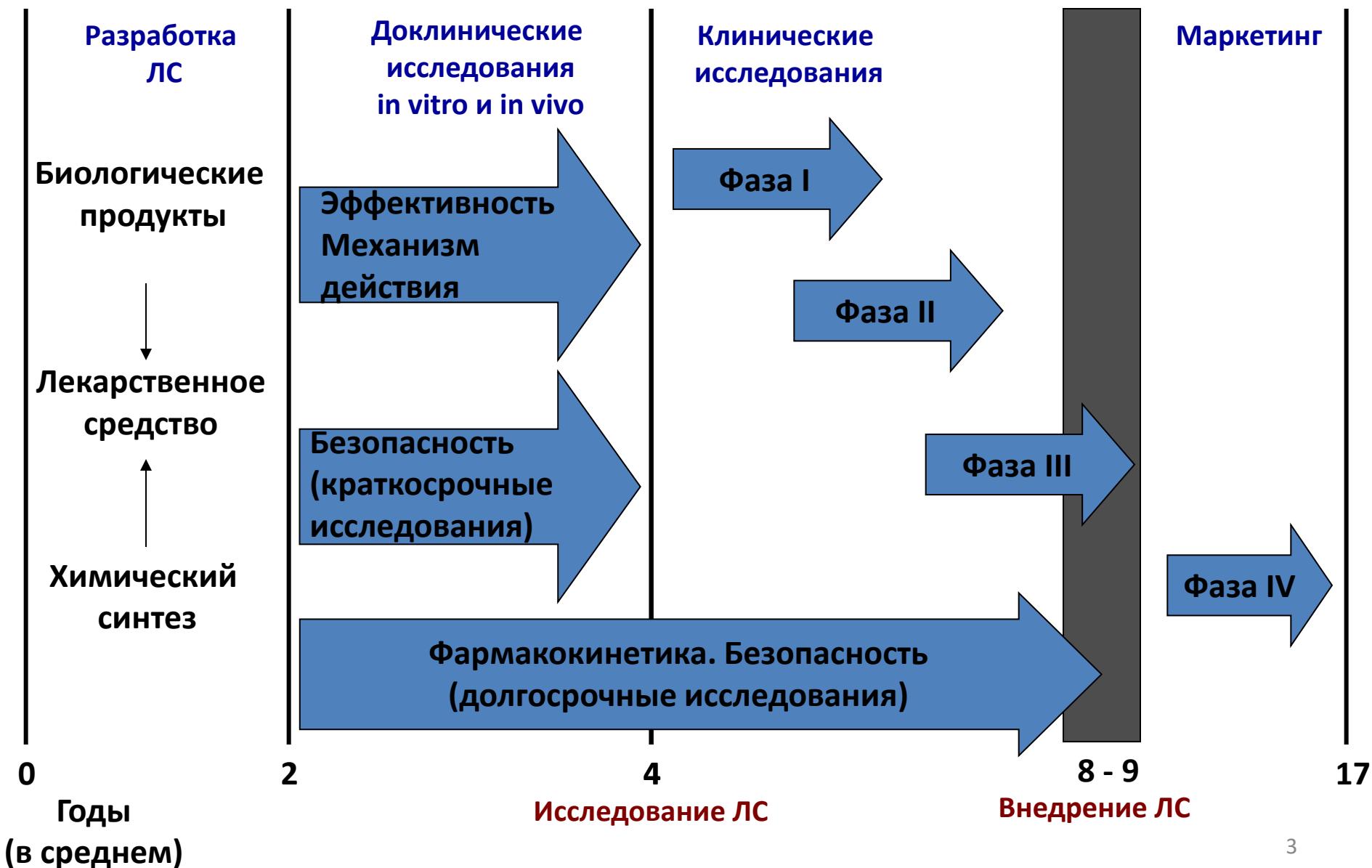
**Составление и подача заявки в биоэтическую комиссию
на использование лабораторных животных**

**Составление и утверждение
Протокола исследования**

Выполнение исследования

**Формирование Отчета по исследованию, его утверждение
и сдача Заказчику**

Этапы создания и система обязательной проверки лекарств для внедрения в медицинскую практику



Общие принципы доклинического изучения безопасности лекарственных средств

Целью доклинических исследований лекарственных средств является получение научными методами оценок и доказательств эффективности и безопасности лекарственных средств. Их выбор, широта и глубина определяются рекомендациями и требованиями государственного органа исполнительной власти в сфере здравоохранения.

Гарантии эффективного и безопасного применения лекарственного средства обеспечивают разработчик-производитель, который должен выполнить действующие требования, и уполномоченный государственный орган, разрешающий новый препарат к применению.

Технология оценки безопасности субстанций и лекарств

Токсикологические исследования обязательны (оригинальные субстанции/препараты):

- для новых фармацевтических субстанций;
- для всех новых лекарственных форм лекарственных средств;
- если лекарственная форма содержит вспомогательные вещества, неразрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из этих веществ исследуют отдельно;
- при комбинации нескольких лекарственных средств в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают токсичность комбинации в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

Токсикологические исследования оригинальных лекарственных средств

Статья 18. Подача и рассмотрение заявления о государственной регистрации лекарственного препарата для медицинского применения

12. При государственной регистрации комбинаций ранее зарегистрированных лекарственных препаратов для медицинского применения допускается включение в состав раздела фармакологической, токсикологической документации и раздела клинической документации вместо отчета разработчика о результатах собственных доклинических исследований лекарственных средств обзора научных работ о результатах доклинических исследований референтных лекарственных препаратов, входящих в состав комбинации лекарственных препаратов, и об отсутствии их взаимодействия в одной лекарственной форме

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЗАКОН №61-ФЗ «ОБ ОБРАЩЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

Технология оценки безопасности субстанций и лекарств

Токсикологические исследования воспроизведенных препаратов проводят в следующих случаях:

- препараты, не имеющие разрешения к медицинскому применению в стране производителя и отличающиеся по составу лекарственной формы от аналогичных зарегистрированных в России;**
- препараты, не отличающиеся по составу лекарственной формы, но содержащие ингредиенты нефармакопейного качества или с изменением состава вспомогательных веществ;**
- препараты, полученные на основе биотехнологии (в любых случаях).**

Токсикологические исследования воспроизведенных препаратов

Статья 18. Подача и рассмотрение заявления о государственной регистрации лекарственного препарата для медицинского применения

10. При государственной регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов для медицинского применения допускается включение в состав раздела фармакологической, токсикологической документации и раздела клинической документации вместо отчета разработчика о результатах собственных доклинических исследований лекарственных средств обзора научных работ о результатах доклинических исследований референтного лекарственного препарата и представление вместо клинических исследований в полном объеме, установленном разделом клинической документации, отчета о результатах исследований биоэквивалентности воспроизведенного лекарственного препарата для медицинского применения.

Токсикологические исследования воспроизведенных препаратов

Не требуется представление отчета о результатах исследований биоэквивалентности воспроизведенного лекарственного препарата для медицинского применения, если регистрируются воспроизведенные лекарственные препараты для медицинского применения, которые:

- 1) предназначены для парентерального (подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутриглазного, внутриполостного, внутрисуставного, внутрикороонарного) введения и представляют собой водные растворы;
- 2) представляют собой растворы для перорального применения;
- 3) произведены в форме порошков или лиофилизатов для приготовления растворов;
- 4) являются газами;
- 5) являются ушными или глазными лекарственными препаратами, произведенными в форме водных растворов;
- 6) предназначены для местного применения и приготовлены в форме водных растворов;
- 7) представляют собой водные растворы для использования в форме ингаляций с помощью небулайзера или в качестве назальных спреев, применяемых с помощью сходных устройств.

Токсикологические исследования

- 1. Изучение общетоксического действия;**
- 2. Изучение специфических видов токсичности (аллергогенности, иммунотоксичности, репротоксичности, канцерогенности).**

Основные задачи токсикологических исследований при оценке общей токсичности

- Выявление органа или системы организма, наиболее чувствительных к изучаемому лекарственному средству(органа-мишени или системы-мишени);**
- Установление дозовой зависимости выявленных эффектов, степени их обратимости и механизмов повреждающего действия;**
- Определение соотношения активности препарата и его токсичности.**

Программа изучения общетоксического действия новых лекарственных средств

**Предварительная оценка
токсических свойств
потенциальных ЛС
ПРОГРАММА «МИНИ-ТОКСИ»
на мелких грызунах**

**Доклиническое изучение
токсических свойств ЛС
в соответствии с
национальными требованиями
и стандартами**

Программа «Мини-Токси»

Общие принципы доклинического изучения безопасности лекарственных средств

Программа «Мини-Токси»

Фармацевтическая субстанция



Лекарственная форма



Проведение исследований по Программе «Мини-Токси» целесообразно начинать на этапе разработки оптимальных лекарственных форм препаратов

- ❖ **Название препарата (соединения), номер серии.**
- ❖ **Химическая или структурная формулы.**
- ❖ **Описание препарата (внешний вид, цвет, запах, растворимость, предельная концентрация в водных или масляных растворах и т.д.**
- ❖ **Состав модели лекарственной формы (качественный и количественный).**
- ❖ **Доказательство стандартности препарата в субстанции и лекарственной формы.**
- ❖ **Условия хранения препарата в субстанции и модели лекарственной формы.**
- ❖ **Устойчивость модели лекарственной формы препарата.**
- ❖ **Содержание активного вещества.**
- ❖ **Режим введения, дозы и путь введения лекарственного средства в субстанции и/или модели лекарственной формы, используемые в терапевтических экспериментах.**
- ❖ **Характеристика, состояние мест введения препарата.**
- ❖ **Предварительное заключение о терапевтической активности препарата в субстанции и/или модели лекарственной формы и его преимущество в данном классе соединений или оригинальность.**

Программа «Мини-Токси» включает изучение токсичности по следующим тестам:

- ❖ Изучение совместимости препарата в модели лекарственной формы с кровью.**
- ❖ Изучение местнотканевых реакций при применении препарата в модели лекарственной формы.**
- ❖ Изучение «острой» токсичности нового лекарственного средства в субстанции и/или модели лекарственной формы.**
- ❖ Определение лимитирующей токсичности нового лекарственного средства в субстанции и/или модели лекарственной формы.**
- ❖ Биологическая стандартизация лекарственного средства в субстанции и модели лекарственной формы по токсичности и пирогенности.**

Программа «Мини-Токси»

Изучение совместимости препарата с кровью

Проводится для препаратов предназначенных для парентерального применения по следующим тестам:

- Оценка гемолитического потенциала препарата в субстанции и модели лекарственной формы;**
- Изучение влияния препарата в субстанции и модели лекарственной формы на свертываемость нестабилизированной венозной крови.**

Программа «Мини-Токси»

Изучение местнотканевых реакций при применении препарата

Основной задачей исследования выявление местнораздражающего действия лекарственного средства в субстанции и/или в модели лекарственной формы.

Препарат предполагается вводить человеку:	Препарат вводится животным:
- внутривенно	- кроликам внутривенно
- внутримышечно	- крысам внутримышечно
- под кожу	- крысам и морским свинкам под кожу
- перорально	- крысам зондом в желудок
- интраназально	-крысам внутрибрюшинно; -кроликам - закапывание в конъюнктивальный мешок
- закапывание в глаза	-закапывание в конъюнктивальный мешок глаза кролика

Программа «Мини-Токси»
Изучение местнотканевых реакций
при применении лекарственного средства

Оценка местнораздражающего действия

- макроскопические патологические местно-тканевые реакции в области введения препарата;
- микроскопические патологические местно-тканевые реакции в области введения препарата.

Сроки забора биоматериала для гистологического исследования

- при однократном применении препарата на 3/5, 10/14, а если нет обратимости эффектов - на 30 сутки после применения лекарственного средства;
- при многократном применении препарата на 1/3, 10/14, а если нет обратимости эффектов - на 30 сутки после последнего применения лекарственного средства.

Программа «Мини-Токси»

Изучение местнотканевых реакций при применении препарата

- ❖ **Образование тромбофлебитов, тромбов при внутривенном применении лекарственного средства;**
- ❖ **Образование абсцессов в мышцах и подкожной клетчатке при внутримышечном и подкожном применении лекарственного средства;**
- ❖ **Ульцерогенное действие при пероральном применении лекарственного средства;**
- ❖ **Развитие асептического «слипчивого» перитонита» при внутрибрюшинном применении лекарственного средства;**
- ❖ **Образование эрозии роговицы, некротическое воспаление конъюнктивы при закапывании лекарственного средства в глаза;**
- ❖ **Эрозивно-некротическое воспаление слизистой полости носа при закапывании лекарственного средства в нос**

***БУДЕТ РАССМАТРИВАТЬСЯ КАК ПРОТИВОПОКАЗАНИЕ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ***

Программа «Мини-Токси»

Изучение «острой» токсичности» лекарственного средства

- ❖ **Цель исследования:** Определить потенциальное токсическое действие нового лекарственного средства в субстанции или в прототипе лекарственной формы при его однократном животным, а также изучить восстановление животных от токсических эффектов исследуемого лекарственного средства.
- ❖ **Задачи исследования.**
 - Определить однократные летальные дозы (LD10, LD16, LD50 и LD84) с целью характеристики количественной токсичности нового лекарственного средства;
 - Провести сравнительный анализ полученных данных по критериям количественной токсичности (LD10, LD16, LD50 и LD84) ;
 - Определить степень опасности лекарственного средства по критериям «широты токсического действия» и «широты смертельного действия»;
 - Определить причину смерти животного от применения исследуемого ЛС.
- ❖ **Животные:**
 - мыши (половозрелые самки или самцы);
 - крысы (половозрелые самки или самцы).
- ❖ **Срок наблюдения за животными: 14 – 30 суток.**

Программа «Мини-Токси»

Изучение «острой» токсичности» лекарственного средства

- ❖ TD – терапевтическая доза;
- ❖ LD10 (МПД) – максимально переносимая доза, которая вызывает гибель 10% животных;
- ❖ LD16 – частично смертельная доза, которая вызывает гибель 16% животных;
- ❖ LD50 – средне смертельная доза, которая вызывает гибель 50% животных;
- ❖ LD84 – летальная доза, которая вызывает гибель 84% животных (близкая к LD100, и условно принятая за абсолютно смертельную дозу);
- ❖ «широта терапевтического действия» - рассчитывается как интервал между TD и LD10;
- ❖ «широта токсического действия» - рассчитывается как интервал между LD10 и LD50;
- ❖ «широта смертельного действия» - рассчитывается как интервал между LD16 и LD84.

Программа «Мини-Токси»

Изучение «острой» токсичности» лекарственного средства

ПРИМЕР

С чего начать, если информация о токсических свойствах лекарственного средства отсутствует.

- Имперический подбор МПД. Исследуются дозы лекарственного средства, отличающиеся на порядок (10, 100, 1000 мг/кг и т.д).***
- Оценивается летальность в течение 1 – 7 суток.***
- Исследуется 5 – 6 последовательных доз лекарственного средства, отличающихся от предыдущей на 50% - 100% (в группе по 1-ой мыши).***

Наименьшая доза, после которой погибло животное, является ориентировочной среднесмертельной.

Программа «Мини-Токси»

Изучение «лимитирующей/субхронической» токсичности ЛС

- ❖ **Цель исследования:** Определить вид токсичности лимитирующий дальнейшее использование лекарственного средства.
- ❖ **Задачей исследования** определение и изучение лимитирующей токсичности лекарственного средства в фармацевтической субстанции или в модели лекарственной формы при рекомендуемом пути введения ЛС человеку.
- **Исследование** проводится на крысах (самцах или самках, по 10 животных на исследуемую дозу).
- **Количество введений** препарата – 5 (препарат вводится ежедневно).
- **Количество исследуемых доз** – не менее 2-х.
- **Лекарственное средство** вводится крысам в дозах, установленных в опытах на мышах при изучении «острой» токсичности», равных LD₁₀ и 1/2LD₁₀, при пересчете через поверхность тела на крыс по методу Freireich.
- ❖ **Срок наблюдения** за животными: 14 – 30 суток.

Программа «Мини-Токси»

Изучение «лимитирующей/субхронической» токсичности ЛС

Критерии оценки (ориентировочный список)

- ❖ **Клиническая картина интоксикации во время введения лекарственного средства и после его отмены.**
- ❖ **Поведенческие реакции животных.**
- ❖ **Комплекс клинико-лабораторных исследований.**
- ❖ **Физиологические исследования (ЭКГ, диурез спонтанный, диурез с нагрузкой).**
- ❖ **Нагрузочные пробы.**
- ❖ **Данные аутопсии.**
- ❖ **Результаты гистологического исследования внутренних органов и тканей животных.**

Программа «Мини-Токси»
Биологическая стандартизация нового ЛС
в субстанции и/или прототипе лекарственной формы

Основной задачей биологической стандартизации является оценка стандартности и проведение контроля качества лекарственных средств в субстанции и в лекарственной форме.

Биологическая стандартизация лекарственных средств проводится по 2-м основным критериям: токсичности и пирогенности

- Биологическая стандартизация по токсичности - определение тест-дозы на мышах;
- Биологическая стандартизация по пирогенности - определение тест-дозы на кроликах (альтернативный метод – LAL-тест);

***Обе тест-дозы вводятся в стандарт на
лекарственное средство - ФСП***

***«Полная программа»
доклинических
токсикологических
исследований***

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

Новые лекарственные средства должны поступать на доклинические токсикологические исследования в окончательно разработанной лекарственной форме, охарактеризованной по программе «Мини-токси»

- ❖ **Название препарата, номер серии.**
- ❖ **Химическая или структурная формулы активного вещества.**
- ❖ **Описание препарата (внешний вид, цвет, запах, растворимость, предельная концентрация в водных или масляных растворах и т.д.)**
- ❖ **Состав лекарственной формы (качественный и количественный).**
- ❖ **Доказательство стандартности препарата по физико-химическим и биологическим параметрам.**
- ❖ **Условия хранения препарата.**
- ❖ **Стабильность препарат в процессе хранения.**
- ❖ **Содержание активного вещества во флаконе.**
- ❖ **Терапевтические режимы введения, дозы и путь введения препарата, используемые в терапевтических экспериментах.**
- ❖ **Данные о терапевтической эффективности препарата в эксперименте.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

**Цель доклинического токсикологического изучения новых
препаратов:**

**исследование их безвредности и прогнозирование токсических
и побочных эффектов у человека при клиническом
применении, передача препарата на I фазу клинических
испытаний.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

Задачи:

- Изучение «острой» токсичности препарата на мелких грызунах и крупных животных;
- Изучение «хронической» токсичности препарата на грызунах и крупных животных;
- Получение данных о побочных эффектах исследуемого препарата, Определение зависимости токсических эффектов от его дозы (доза-эффект);
- Изучение дозолимитирующей токсичности. Получение величины доз, при которых выявляется вид токсичности, лимитирующий дальнейшее использование препарата;
- Определение длительности и отсроченности действия исследуемого препарата. Изучение обратимости его токсических эффектов;
- Определение степени опасности токсического действия препарата;
- Определение стартовой безопасной дозы для человека на I фазу клинического изучения нового лекарственного препарата.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ОСТРАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

- ❖ Основными задачами исследования «острой» токсичности нового препарата являются определение величин токсических доз для разных видов животных и изучение токсического действия на нормальные органы и ткани.
- Исследования проводят на 2 – 3 видах животных (грызуны: мыши, крысы; негрызуны собаки (в исключительных случаях вместо собак возможно использовать 3-й вид грызунов - кроликов);
- Исследования проводят на самцах и самках;
- В исследовании используется несколько путей введения препарата, в том числе, обязательно используется тот путь, который рекомендован для применения у человека;
- Длительность наблюдения за животными составляет 30 – 180 суток.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ОСТРАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

❖ Выбор доз

- Для мышей. Мышам в качестве исходной дозы применяется суммарная доза, установленная в терапевтических экспериментах. Количество исследуемых доз должно быть не менее 5 – 7, при этом, их значение увеличивается или уменьшается в 2 раза по сравнению с предыдущей дозой;
- Крысам и собакам (кроликам) в качестве исходной дозы рекомендуется использовать дозу, равную LD10 (МПД), установленную в экспериментах на мышах, считая, что LD10 для мышей при пересчете на поверхность тела является эквивалентной по количественной токсичности для крыс или собак (кроликов), т.е. соответствует MeLD10 (мышинному эквиваленту). В случае, если расчетная доза оказалась велика и не соответствует MeLD10, используются дозы, равные $1/2\text{MeLD10}$, $1/4\text{MeLD10}$, $1/8\text{MeLD10}$ и т.д. В случае если MeLD10 для крыс или собак (кроликов) оказалась низкой, то ее пропорционально увеличивают;
- Пересчет доз через поверхность тела проводится по методу Freireich.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ОСТРАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

❖ Исследования на грызунах.

- **Исследования проводят на мышах и крысах обоего пола;**
- **Определить однократные летальные дозы (LD10, LD16, LD50 и LD84) с целью характеристики количественной токсичности нового лекарственного препарата;**
- **Провести сравнительный анализ полученных данных по критериям количественной токсичности (LD10, LD16, LD50 и LD84) ;**
- **Определить зависимость токсического действия препарата от вида пола животного;**
- **Определить степень опасности лекарственного средства по критериям «широты токсического действия» и «широты смертельного действия»;**
- **Определить причину смерти животного от применения исследуемого препарата.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ОСТРАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

- ❖ **Исследования на негрызунах (собаках).**
- **Исследования проводят на собаках (в исключительных случаях собак можно заменить кроликами);**
- **Необходимо определить 2 – 4 уровня токсических доз:**
 - ***ЛД (летальная доза)*** – низшая доза препарата, которая обуславливает гибель животного во время введения или в период наблюдения;
 - ***ВТД (МПД, высокая токсическая доза)*** – доза препарата, которая приводит к значительным специфическим лекарственным патологическим отклонениям со стороны гематологических, биохимических, клинических или морфологических показателей;
 - ***НТД (низкая токсическая доза)*** – доза препарата, которая приводит к незначительным специфическим патологическим отклонениям со стороны гематологических, биохимических, клинических или морфологических показателей;
 - ***ВНТД (высокая нетоксическая доза)*** – доза, при введении которой отсутствуют гематологические, биохимические, клинические или морфологические изменения;
- **Определить зависимость токсического действия препарата от пола животного;**
- **Определить причину смерти животного от применения исследуемого препарата.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ОСТРАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

❖ Критерии оценки (ориентировочный список)

- Клиническая картина интоксикации во время введения лекарственного средства и после его отмены;**
- Поведенческие реакции животных;**
- Комплекс клинико-лабораторных исследований;**
- Физиологические исследования (ЭКГ, диурез спонтанный, диурез с нагрузкой);**
- Нагрузочные пробы;**
- Данные аутопсии;**
- Результаты гистологического исследования внутренних органов и тканей животных.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

Изучение «острой» токсичности» лекарственного средства

Протоколы OECD:

№ 402 Acute Dermal Toxicity

№ 403 Acute Inhalation Toxicity

№ 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion

№ 405 Acute Eye Irritation/Corrosion

№ 420 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure

№ 423 Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method

№ 425. Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ОСТРАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

**Данные, полученные при изучении «острой» токсичности препарата, могут
быть использованы в клинике при лечении острых отравлений,
вызванных однократным приемом этих препаратов в высоких дозах.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ХРОНИЧЕСКАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

- ❖ Основными задачами исследования «острой» токсичности нового препарата являются определение уровней токсических доз для разных видов животных и изучение токсического действия на органы и ткани при его многократном применении.
- Исследования проводят на 2-х видах животных (грызуны: крысы; негрызуны: собаки (в исключительных случаях вместо собак возможно использовать 2-ой вид грызунов - кроликов);
- Исследования проводят на самцах и самках;
- В исследовании используют путь введения препарата, который рекомендован для применения у человека;
- Длительность наблюдения за животными составляет 30 – 180 суток.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ХРОНИЧЕСКАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

❖ Выбор доз

- Крысам в качестве исходной разовой дозы рекомендуется использовать дозу препарата, равную LD50, полученную в экспериментах по изучению «острой» токсичности препарата и деленную на количество введений. Последующие дозы препарата пропорционально увеличиваются или уменьшаются;
- Собакам (кроликам) в качестве исходной разовой дозы рекомендуется использовать дозу препарата, равную ВТД, полученную в экспериментах по изучению «острой» токсичности препарата и деленную на количество введений. Последующие дозы препарата пропорционально увеличиваются или уменьшаются.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ХРОНИЧЕСКАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

❖ Длительность введения препарата

Продолжительность введения препарата животным при изучении его «хронической» токсичности зависит от предполагаемой длительности его применения у человека.

Длительность применения препарата у человека	Длительность введения лекарственного средства животным в экспериментах по изучению «хронической» токсичности
Однократное введение	14 дней
2 – 6 дней	14 дней
7 – 14 дней	1 месяц
15 – 30 дней	2 – 4 месяца
1 – 6 месяцев	6 – 12 месяцев

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ХРОНИЧЕСКАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

- ❖ Исследования на грызунах (крысах) и негрызунах (собаках).
- Исследования проводят на собаках или кроликах (в исключительных случаях собак можно заменить кроликами);
- Необходимо определить 2 – 4 уровня токсических доз:
 - *ЛД (летальная доза)* – низшая доза препарата, которая обуславливает гибель животного во время введения или в период наблюдения;
 - *ВТД (МПД, высокая токсическая доза)* – доза препарата, которая приводит к значительным специфическим лекарственным патологическим отклонениям со стороны гематологических, биохимических, клинических или морфологических показателей;
 - *НТД (низкая токсическая доза)* – доза препарата, которая приводит к незначительным специфическим патологическим отклонениям со стороны гематологических, биохимических, клинических или морфологических показателей;
 - *ВНТД (высокая нетоксическая доза)* – доза, при введении которой отсутствуют гематологические, биохимические, клинические или морфологические изменения;
- Определить зависимость токсического действия препарата от вида и пола животного;
- Определить причину смерти животного от применения исследуемого препарата.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ХРОНИЧЕСКАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

❖ Критерии оценки (ориентировочный список)

- Клиническая картина интоксикации во время введения лекарственного средства и после его отмены;**
- Поведенческие реакции животных;**
- Комплекс клинико-лабораторных исследований;**
- Физиологические исследования (ЭКГ, диурез спонтанный, диурез с нагрузкой);**
- Нагрузочные пробы;**
- Данные аутопсии;**
- Результаты гистологического исследования внутренних органов и тканей животных.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

«ХРОНИЧЕСКАЯ» ТОКСИЧНОСТЬ

Протоколы OECD:

№ 407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents

№ 410 Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study

**№ 419 Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day
Repeated Dose Study**

№ 452 Chronic Toxicity Studies

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

ИССЛЕДОВАНИЕ КУМУЛЯТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА

Кумулятивные свойства испытуемого препарата можно оценивать как в экспериментах по изучению его «хронической» токсичности, так и в специальном исследовании: «Изучение кумуляции методом субхронической токсичности по Lim'у с соавт.»

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

исследование кумулятивных свойств препарата

- ❖ Исследование кумуляции в экспериментах по изучению «хронической» токсичности препарата. При сопоставлении данных, полученных в экспериментах по изучению «острой» и «хронической» токсичности препарата определяют 3 показателя кумуляции:
- Коэффициент кумуляции (K_k), представляет собой отношение суммарной LD50 ($LD50_c$) при многократном применении препарата к LD50 при однократном применении препарата ($LD50_1$). Если его величина меньше 1, можно говорить о кумулятивном эффекте и высокой опасности применения препарата при длительном воздействии;
- Степень кумуляции – величина обратная коэффициенту кумуляции, выраженная в процентах;
- Индекс кумуляции (I_k). $I_k = [(LD10_1 - LD10_n) / (n - 1) \times LD10_n] \times 100 \%$; LD10₁ – максимальнопереносимая доза при однократном применении; LD10_n – максимальнопереносимая доза при многократном применении; N – количество введений. Отрицательная величина I_k показывает отсутствие кумулятивных свойств у препарата и свидетельствует об обратимости его токсических эффектов.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

исследование кумулятивных свойств препарата

- ❖ Изучение кумуляции методом субхронической токсичности по Lim'у с соавт. Данный метод позволяет оценить не только кумулятивные свойства препарата, но и привыкание к препарату.

Кумуляция тест «субхронической токсичности» по Lim с соавторами (Arch. Intern. Pharm. Ther, 1961, v.130, p.336-352)	
Дни введения	Доля от ЛД ₅₀
1-4	0,1
5-8	0,15
9-12	0,22
13-16	0,34
17-20	0,50
21-24	0,75
25-28	1,12
Суммарная доза за 24 дня 12,8 ЛД ₅₀ ; Максимальная продолжительность эксперимента 24+4 дня; $K_k = \text{ЛД}_{50} n / \text{ЛД}_{50} 1$; $K_k < 1$ – кумуляция; $K_k > 1$ - привыкание	

***«Полная программа» доклинических
токсикологических исследований
оценка степени опасности исследуемого препарата***

***Критерии опасности «острого» и «хронического» токсического действия
исследуемого лекарственного препарата.***

- **«Широта терапевтического действия»;**
- **«Широта токсического действия»;**
- **«Широта смертельного действия»;**
- **Коэффициент кумуляции;**
- **Индекс кумуляции;**
- **Коэффициент видовой чувствительности**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований

оценка степени опасности исследуемого препарата

Классификация степени токсичности химических веществ (И.В.Бенрезовская) (в соответствии с ГОСТОМ 12.1.007-76)				
Показатели	Классы токсичности и опасности			
	1 чрезвычайно токсичны	2 высоко- токсичны	3 умеренно- токсичны	4 малотоксичны
LD ₅₀ внутрижелудочно, мг/кг	<15	15-150	151-5000	>5000
LD ₅₀ подкожно, мг/кг	≤8	>8-80	>80-2000	>2000
LD ₅₀ внутрибрюшинно, мг/кг	≤4	>4-40	>40-1250	>1250
LD ₅₀ внутривенно, мг/кг	≤2	>2-20	>20-700	>700

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

- ❖ Задачей I фазы клинических испытаний является изучение переносимости нового препарата волонтерами, т.е. здоровыми или, как их еще называют «бессимптомными» добровольцами.
- ❖ Стартовая доза препарата, которую планируют ввести волонтеру не должна быть токсичной, но должна быть достаточной для того, чтобы быстро добиться выполнения одной из основных целей I-фазы клинических испытаний, которая формулируется как **ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ПЕРЕНОСИМОСТИ ПРЕПАРАТА.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

Для каждого препарата должна быть определена наибольшая доза, испытанная на животных, которая не вызывала существенных изменений в состоянии гомеостаза группы подопытных животных в сравнении с контрольной группой. Эта доза может быть названа *ДОЗОЙ БЕЗ НАБЛЮДАЕМОГО ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТА*.

При выборе этой дозы наибольшее значение имеют:

- **Длительность введения препарата животным;**
- **Методы оценки влияния препарата на животных.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

- ❖ При отсутствии отклонений в показателях функционального состояния органов у экспериментальных животных от физиологической нормы при оценке токсичности потенциальных лекарственных средств основным тестом, определяющим влияние препарата на организм, является гистологическое исследование структуры внутренних органов и тканей.
- ❖ Дозы препарата, при введении которых у животных обнаружены незначительные изменения в структуре органа-мишени, носящие обратимый характер и не определяющиеся у животных через определенный срок после прекращения введения препарата, могут быть приняты за **ДОЗЫ БЕЗ НАБЛЮДАЕМОГО ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТА**.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

- ❖ Далее проводится пересчет **ДОЗ БЕЗ НАБЛЮДАЕМОГО ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТА** (мг/кг) для животных, которые были включены в исследование в эквивалентную для человека (мг/кг).
- ❖ После того, как значения эквивалентной дозы для человека были определены исходя из величин **ДОЗ БЕЗ НАБЛЮДАЕМОГО ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТА** для всех изученных видов животных, следует выбрать одну **ЭКВИВАЛЕНТНУЮ ДОЗУ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА** для последующего расчета величины **МАКСИМАЛЬНОЙ РЕКОМЕНДОВАННОЙ НЕТОКСИЧНОЙ ДОЗЫ**.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

- ❖ При отсутствии дополнительной информации, помогающей выбрать самый подходящий вид животных, как правило, исходят из того, самым подходящим видом является самый чувствительный вид животных, поскольку использование **ЭКВИВАЛЕНТНОЙ ДОЗЫ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА** обеспечивает самую безопасную начальную дозу для человека.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

Для обеспечения безопасности волонтеров, принимающих максимальную начальную дозу нового препарата необходимо использовать *КОЭФФИЦИЕНТ БЕЗОПАСНОСТИ (КБ)*.

Основные причины необходимости применения КБ:

- **Возможное наличие повышенной чувствительности к препарату у людей по сравнению с животными;**
- **Трудности в определении некоторых видов токсичности у животных (головная боль, мышечные боли, психические расстройства);**
- **Появление неожиданных видов токсичности;**
- **Значительные межвидовые различия токсичности.**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

Стандартный КОЭФФИЦИЕНТ БЕЗОПАСНОСТИ, которым обычно пользуются, равен 10.

❖ Необходимость увеличения КБ:

- Значительное различие в показателях токсичности препарата у разных видов животных;**
- Неадекватные данные о реакции на дозу (например, малое число доз, широкие интервалы между введениями каждой дозы или большие различия в реакциях животных внутри группы, получающих одну и ту же дозу препарата).**

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

❖ **Возможность уменьшения КБ:**

- **Если препарат принадлежит к хорошо охарактеризованному классу как экспериментально, так и клинически, имеет тот же способ, схему; и длительность применения, одинаковые метаболизм и биодоступность; кроме того , у них должны быть близкие показатели токсичности у животных и переносимости у людей;**
- **Если величина *ДОЗЫ БЕЗ НАБЛЮДАЕМОГО ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТА* была определена на основании исследований хронической токсичности с большей длительностью введения препарата, по сравнению с предполагаемой длительностью применения препарата у здоровых добровольцах.**

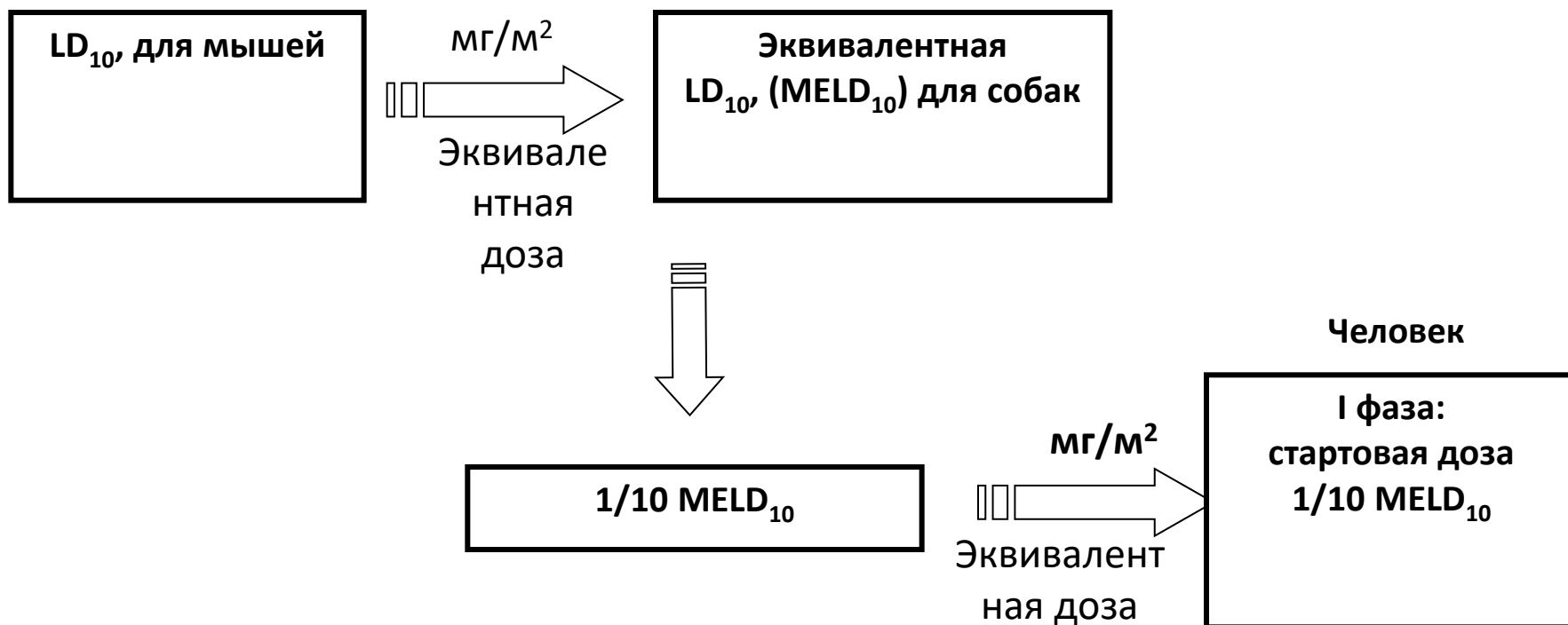
«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

- ❖ После того как была определена **МАКСИМАЛЬНО НЕТОКСИЧНАЯ РЕКОМЕНДОВАННАЯ ДОЗА**, необходимо сравнить ее с **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОЗОЙ**.
- ❖ Если **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОЗА** ниже чем **МАКСИМАЛЬНО НЕТОКСИЧНАЯ РЕКОМЕНДОВАННАЯ ДОЗА**, то целесообразно уменьшить начальную клиническую дозу.
- ❖ Для некоторых фармакологических групп препаратов или биопрепаратов (например, сосудорасширяющих средств, антикоагулянтов) токсические эффекты могут возникнуть за счет фармакологической активности этих препаратов. Это может послужить основанием для уменьшения **МАКСИМАЛЬНО НЕТОКСИЧНОЙ РЕКОМЕНДОВАННОЙ ДОЗЫ**.

«Полная программа» доклинических токсикологических исследований
расчет стартовой безопасной дозы лекарственного средства
для человека на I фазу клинического изучения

РАСЧЕТ СТАРТОВОЙ БЕЗОПАСНОЙ ДОЗЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА НА I
ФАЗУ КЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ

(Grieshaber C.K., Marsoni S.M. Relation of preclinical toxicology to finding in early clinical trials // Cancer Treat. Rep. -1986. –v. 70, -N 1. –p.65)



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ