

犬和猴单次给药毒性试验终末处置的考虑

蒋婀娜, 郑智勇, 胡建廷, 贾玉萍, 张岱州, 陈 凯*

山东省药学科学院 山东省化学药物重点实验室, 山东 济南 250101

摘要: 随着中国药品监管体系与国际接轨, 国际人用药品注册技术协调会(ICH)指导原则在中国相继转化实施。在非临床安全性评价研究阶段, 开展单次给药毒性试验研究, 所使用的大动物犬和猴是否在试验结束时必须处死, 在充分考虑试验的合规性时, 更要从动物福利与伦理, 试验的科学性、必要性及利益平衡进行综合评估。在保证试验能够获得预期的信息达到试验目的同时, 能够保障动物生存权利。

关键词: 非临床研究; 单次给药毒性试验; 终末处置; 动物福利与伦理; 国际人用药品注册技术协调会

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2020)10-2147-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.040

Considerations for end disposal of acute toxicity studies in dogs and monkeys

JIANG Ena, ZHENG Zhiyong, HU Jianting, JIA Yuping, ZHANG Daizhou, CHEN Kai

Shandong Academy of pharmaceutical Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drugs, Jinan 250101, China

Abstract: With China's drug regulatory system in line with international standards, the ICH guiding principles have been transformed and implemented in China. In the non-clinical safety evaluation research phase, when conducting an acute toxicity studies, whether the large animal dogs and monkeys used must be sacrificed at the test bundle. When fully considering the compliance of the studies, we must also start with comprehensive evaluation of welfare and ethics, scientificity, necessity and balanced interests. While ensuring that the test can obtain the expected information to achieve the purpose of the test, the right to survival of the animal can be guaranteed.

Key words: non-clinical laboratory studies; acute toxicity studies; end disposal; animal welfare and ethics; ICH

药品注册申请人为了满足药品注册申报要求, 委托药物非临床研究机构(Good Laboratory Practice, GLP)根据法律、法规及参考相关指导原则, 结合药物特点进行相关非临床安全性评价研究。由国家市场监督管理总局发布, 于2020年7月1日起施行的《药品注册管理办法》, 不再明确列出中药、化学药和生物制品等药品的细化分类和相应的申报资料要求, 由国家药品监督管理局根据注册药品的产品特性、创新程度和审评管理需要组织制定, 并向社会公布。但目前至少在创新药注册申请时, 通常均开展了单次给药毒性试验。

1 法规、政策等对单次给药毒性试验的要求

目前在国内进行药品注册申请, 开展的单次给药毒性试验, 基本以遵循原国家食品药品监督管理局于2014年5月颁布的《药物单次给药毒性研究

技术指导原则》为主导。但自2017年中国国家药品监督管理局成为国际人用药品注册技术协调会(International Council for Harmonization, ICH)正式成员, 2018年当选为ICH管理委员会成员, 意味着中国的药品监管体系已经开始融入国际社会认可的监管体系中了。国家局ICH办公室成立以来, 积极推进指导原则与国际标准接轨, 推动ICH指导原则在中国的转化实施^[1]。自2019年7月19日国家药品监督管理局药品审评中心发布“关于对部分ICH三级指导原则转化实施建议公开征求意见的通知”以来, GLP机构在开展试验时, 对ICH指导原则遵从性不言而喻。

1.1 国内法规、政策等相关要求

基于《药物单次给药毒性研究技术指导原则》及现有的科学知识, 药物非临床研究质量管理规

收稿日期: 2020-02-02

第一作者: 蒋婀娜(1981—), 女, 硕士, 从事药物非临床安全性评价研究。Tel: 15866636462 E-mail: jiangen@sdapsglp.cn

*通信作者: 陈 凯, 男, 硕士, 从事药物非临床安全性评价研究。Tel: 18006360766 E-mail: kaichen@sdapsglp.cn

范(GLP)机构在进行单次给药毒性试验时均采用整体动物进行体内研究,犬、猴是常用的非啮齿类及非人灵长类大动物。虽然急性毒性的充分信息也可从其他来源获得^[3-4],但这些信息应是从执行《药物非临床研究质量管理规范》的试验中获得。大动物单次给药毒性试验常用方法有近似致死量法、最大给药量法、最大耐受量法等,均不以获取最小的致死剂量即以死亡作为终点指标。但指导原则要求“所有的试验动物应进行大体解剖”。

1.2 国际法规、政策等相关要求

ICH M3(R2)中描述,急性毒性信息也可以从适当的剂量递增试验或常规毒性试验种属确定最大耐受量(Maximum Tolerated Dose, MTD)的短期剂量范围试验中获得^[5-6]。当急性毒性信息可以从其他试验中获得时,不推荐再进行单独的单次给药试验。评估急性毒性的试验不应以死亡作为终点指标,除非是为支持临床开发试验及探索性临床试验而开展的扩展的单次给药毒性试验,需按指导原则要求,在药后第2天及药后第14天进行尸检和组织病理学检查。在美国,扩展的单次给药毒性试验可替代2周毒性试验用以支持单次给药临床试验^[4]。

美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的药物评价与研究中心(Center for Drug Evaluation and Research, CDER),于1996年8月26日在《联邦公报》(61FR 4934)发布的药物单次给药急性毒性试验的行业指南,虽在文中明确注出此指南不约束FDA或行业,仅为制定当时对该试验的思考,但至今仍为国内制定相关指导原则及开展单次给药毒性试验提供参考。在该指南中第三项中描述了,急性毒性试验的目标通常可以使用较少量的啮齿类动物来实现,如果非啮齿类动物适用于进行试验研究,则可考虑减少使用动物;第四项观察项下描述,应该对所有动物进行大体尸检,包括濒死、发现死亡或在14 d处死的动物。

2 目前犬和猴在单次给药毒性试验中的终末处置

目前,在参照指导原则^[2]进行试验设计时,为了符合“所有的试验动物应进行大体解剖”的要求,通常在试验结束均对犬、猴进行大体解剖,以便了解可能的毒性靶器官。如此设计,虽能够最大程度的遵从指导原则要求,但却使此类试验累积使用较多数量的大动物。纵观ICH M3(R2)中描述,除了扩展的单次给药毒性试验,并无明确要求单次给药毒

性试验结束,动物必须以解剖作为终末处置方式,尤其对于使用的大动物。FDA CDER中心于1996年发布的上述行业指南,虽然在第四项描述应对所有动物进行大体尸检,但是否包括所有14 d观察结束存活的非啮齿类动物(试验目的以提供数据支持人临床的单剂量安全性/药动学研究除外,指南中对此有明确要求),值得考虑。

3 犬和猴在单次给药毒性试验中终末处置的考虑

随着对动物福利及伦理认知与要求的日益加强,大动物犬和猴在试验中使用逐渐增多,单次给药毒性试验结束,建议结合试验的科学性、必要性及利益平衡等综合考虑,不能以处死进行大体解剖作为大动物终末处置的必须方式。

3.1 动物福利与伦理

随着国际化进程的加快,动物福利与伦理已不仅是一种认识和口号,尤其对实验动物,作为科学研究的支撑,我国在实验动物福利立法、标准化、行政管理等方面,借鉴欧美经验,得到了显著发展。于2018年9月1日正式实施的国家新标准《实验动物福利伦理审查指南》,是我国实验动物福利伦理科技和管理领域的一件里程碑的事件^[7]。标准中明确了审查机构、审查原则、审查内容、审查程序及规则。2017年9月1日起实行的《药物非临床研究质量管理规范》明确要求,在开展动物试验研究的GLP机构,实验动物的使用应当关注动物福利,遵循“减少、替代和优化”的原则,试验方案实施前应当获得动物伦理委员会批准。新标准在动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)审查的必要性原则中规定,任何伤害性的实验项目应有充分的科学意义和必须实施的理由为前提,禁止无意义滥养、滥杀实验动物,禁止无意义的重复性试验;在动物使用中规定,在不影响实验结果判定的情况下,死亡(安死术除外)不应作为动物实验计划终点。此外,我国在专利适格性判断中开始考虑动物福利问题,如《专利法》第5条规定,违反社会公德的发明创造不予授予专利,同时动物品种不能被授予专利;《专利审查指南》规定了可能导致动物痛苦而对人或动物的医疗没有实质性益处的改变动物遗传同一性的方法等的发明创造是违反社会公德的,不能被授予专利^[8]。

3.2 科学性、必要性及利益平衡

目前,在开展单次给药毒性试验中,常使用的大动物包括犬及猴,并且在药后观察结束时,均对动物剖检进行大体肉眼观察。尤其在使用非人灵

长类动物时,伦理问题及科学问题是需要正视的。正因为缺乏非人灵长类动物研究在科学上必要性的评估,2016年美国国会和国立卫生研究院(National Institutes of Health,NIH)决定审查有关非人灵长类动物研究的政策^[9]。当然,并非所有大动物单次给药毒性试验动物一律不剖检,因为进行动物试验的目的就是为了获得必要的科学的试验数据。如果动物有明显的症状且无法排除是药物所致,或药物的结构确认存在特定或潜在的毒性靶器官,或者专题负责人从科学的角度认为必须解剖动物才能获得确切结果,实现预期的试验目的,经IACUC批准,可以剖检。但对于剖检的动物,不论肉眼检查是否有可见的病变,都建议进行组织病理学检查,尤其是对照组和高剂量组动物,此观点除了从ICH M3(R2)扩展的单次给药毒性试验得到启示,FDA对GLP常见问题的答复中也有明确解答,如果用于急性毒性研究的动物要进行尸检,有必要保留其器官进行研究^[10]。对剖检动物进行组织病理学检查,也可同步积累研究机构的背景数据。用于单次给药毒性试验的动物,最终是否进行剖检,专题负责人应从科学性、必要性及利益平衡角度进行综合判断。

3.3 保障满足试验目的及申报要求的措施

开展试验就是为了获得试验结果,满足试验目的,最终符合药物注册申报要求。通过合规评估,考虑到动物福利与伦理,遵从了科学性及必要性,兼顾了利益平衡后,更多有利于试验的保障是需要进一步考虑的。

3.3.1 加强动物的详细临床观察 从给药后至恢复期结束,合适频率及指标详细的有效临床症状观察,对判断受试物引起动物的毒性反应及其可逆程度,是最为直接的方式。在进行详细临床观察时,除了关注观察的频率及症状的详细程度,必要时可对症状进行合理的分级,从而可提供更多有效的信息。

3.3.2 增加检测指标 单次给药毒性试验的设计,应该在对受试物认知的基础上,遵循“具体问题具体分析”的原则^[2]。在一些情况下,为获得更为全面的急性毒性信息,可设计观察更多的指标,如血液学指标、血清生化学指标、组织病理学检查等,以更好地确定毒性靶器官或剂量反应关系^[2-4]。单次给药毒性试验对动物剖检不是最终目的,也不是唯一获得毒性信息的措施。根据受试物的特点,通过参考类似物的毒性信息,比对实验室相同或类似受试

物毒理背景资料,增加特异性的检测指标,可以对阐明受试物的毒性作用提供有效的支撑。

3.3.3 积累评价结果的背景数据 随着GLP的不断发展,实验室各类背景数据的积累与运用已成为评价研究的有力支撑。目前运用较多的背景数据为临检指标、自发性病变、动物体质量增长、摄食量等。作为研究的评价结果,亦可以适应症或药物为类别考虑,进行回顾性评估与整合,积累形成以评价结果为分类的背景数据,可为后续相似或类似的研究提供有效的比对与参考。

3.3.4 加强从业人员的培训 术业有专攻,不同岗位有不同的知识层次要求,切实有效的人员培训,是影响GLP机构评价质量的关键因素之一^[11]。专题负责人知识的沉淀、更新与认知迭代,试验人员GLP意识的提高、操作的规范与精准,无一不体现了培训的必要性。

3.3.5 推进国际实验动物评估和认可委员会(AAALCA)认证 AAALAC作为一个独立的非政府组织,其认证工作有力地推进了实验动物的使用、管理与福利的规范化,其认证体系已被国际公认^[12-13],为了保证和推动动物实验的质量,FDA和欧共体强力推荐在有AAALAC认证的实验室开展动物实验。至2020年1月29日,全世界已有47个国家的1000多个组织、机构和公司获得了AAALAC认证,中国大陆有79家机构(以单独的申请主体计)。通过AAALAC认证,不仅体现了高标准、责任担当以及对动物福利的承诺,其终将成为提高实验的科学性与合法性、促进试验研究与国际接轨和互认必不可少的关键环节。

3.3.6 加强IACUC审批及审批后的监督 在AAALAC认证体系中,IACUC不仅负责动物使用计划的审查和批准,还负责对动物使用进行日常监督和定期检查^[14-15]。就国家实验动物生产/使用许可证管理体系而言,IACUC兼具实验动物管理委员会和实验动物伦理委员会的双重职能^[13,15]。如果动物使用计划的审查与批准是保障动物福利的前提,那么审批后的监督则是保障动物福利落实的关键。研究计划中动物的试验终点是否合理或人道;在决定动物尤其是大动物最终处置时,专题负责人是否兼顾了研究的科学性与动物福利的符合度,只有良好的评鉴与监督才能发挥其既有职能。

3.3.7 与监管机构协商,做出科学判断 在开展单次给药毒性试验时,如果基于动物非死亡终点对试验结果的影响存有疑虑,与监管机构及时沟通与协

商,更有利于做出科学判断,并为后续类似研究提供支撑。除了主动与监管机构沟通,也可与委托方沟通其在与审评机构相关沟通会议中,审评人员针对此内容的相关建议。在资源许可范围内,FDA鼓励召开有助于药品审评以及解决药品相关科学问题的会议。相信随着与国际标准的不断接轨,与监管机构沟通协商机制会更加完善。

伴随着ICH指导原则的相继落地实施,在单次给药毒性试验中,充分考虑研究的科学性、动物福利与伦理,对于大动物不以处死进行大体解剖作为必须的最终处置方式,任重道远,值得大家共同探讨与践行。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局药品审评中心. 2018年度药品审评报告 [EB/OL]. (2019-07-02) [2020-01-02]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=viewInfoCommon&id=314886>.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 药物单次给药毒性研究技术指导原则 [S]. 2014.
- [3] CHMP, EMA. Questions and answers on the withdrawal of the "Note for guidance on single dose toxicity" [EB/OL]. (2010-06-24) [2020-01-02]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-withdrawal-note-guidance-single-dose-toxicity_en.pdf.
- [4] ICH M3(R2). Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals [EB/OL]. (2009-06-11) [2020-01-02]. [http://zy.yaozh.com/sda/M3\(R2\).pdf](http://zy.yaozh.com/sda/M3(R2).pdf)
- [5] Robinson S, Delongas J L, Donald E, et al. A European pharmaceutical company initiative challenging the regulatory requirement for acute toxicity studies in pharmaceutical drug development [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2008, 50(3): 345-352.
- [6] Kathryn Chapman, NC3Rs; Sally Robinson, AstraZeneca. Challenging the regulatory requirement for acute toxicity studies in the development of new medicines [J/OL]. AWorkshopReport. https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Workshop_reports/Challenging%20the%20regulatory%20requirement%20for%20acute%20toxicity%20studies%20in%20the%20development%20of%20new%20medicines.pdf.
- [7] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 135-137.
- [8] 刘媛. 专利适格性判断中动物福利问题研究 [J]. 大连理工大学学报: 社会科学版, 2018, 39(1): 87-92.
- [9] 雷瑞鹏, 邱仁宗. 非人灵长类动物实验的伦理问题 [J]. 科学与社会, 2018, 2: 74-88.
- [10] FDA, 1981 Questions & Answers - Good Laboratory Practice Regulations [EB/OL]. (2017-11-11) [2020-01-02]. <http://wayback.archive-it.org/7993/20170111215809/http%3A/www.fda.gov/ICECI/Inspections/NonclinicalLaboratoriesInspectedunderGoodLaboratoryPractices/ucm072738.htm>
- [11] 蒋婀娜, 贾玉萍, 陈凯, 等. 浅谈药物GLP机构的人员培训 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(4): 510-512.
- [12] 项宗尚, 蔡永明, 王海荣, 等. 国际实验动物评估与认证的程序及意义 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 44-48.
- [13] 闵凡贵, 张钰, 李文德, 等. IACUC在AAALAC体系中的作用与运行实践 [J]. 实验动物科学, 2017, 6(34): 49-54.
- [14] 许虎峰, 刘云波, 李学勇, 等. 医院实验动物管理与使用委员会的筹建与运作 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(1): 46-49, 54.
- [15] 杨果杰, 郑振辉, 前岛一淑, 等. 动物实验管理委员会的职责 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(增刊): 110-113.