



VI Всероссийская конференция  
«Актуальные вопросы доклинических и  
клинических исследований лекарственных средств,  
биомедицинских клеточных продуктов и клинических  
испытаний медицинских изделий»



# Оптимизация программы доклинических исследований в соответствии с принципами 3Rs

Крышень Кирилл Леонидович, к.б.н., с.н.с.  
[kryshen.kl@doclinika.ru](mailto:kryshen.kl@doclinika.ru)

Санкт-Петербург, 2018

**С 6 мая 2017 г. национальные рынки обращения лекарственных средств 5 государств - членов ЕАЭС (Российская Федерация, Республика Беларусь, Кыргызская Республика, Республика Армения, Республика Казахстан) объединились и начали работу в формате единого пространства.**

**В настоящее время Евразийской экономической комиссией по вопросам обеспечения качества ЛС разрабатывается множество регуляторных документов, включая фармакопею, гармонизированных с международными требованиями (документы ВОЗ, FDA, европейского медицинского агентства ЕМА и др.).**

**До 31 декабря 2020 года регистрация лекарственного препарата может осуществляться по национальной процедуре или процедуре ЕАЭС и после 31 декабря 2020 года только по процедуре ЕАЭС.**

**ПРИ ПОДГОТОВКЕ ПРОГРАММЫ ИССЛЕДОВАНИЙ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ  
МЕЖДУНАРОДНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ И ТРЕБОВАНИЯ ЕАЭС**

## **Специфические виды токсичности**

**Иммунотоксичность**

**Аллергизирующие свойства**

**Генотоксичность**

**Канцерогенность**

**Репродуктивная токсичность**

# ИММУНОТОКСИЧНОСТЬ

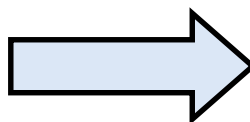
Под **иммунотоксическим действием** традиционно понимают модифицирующее влияние ксенобиотиков и ЛС на иммуногенез, включая иммуносупрессию и гиперстимуляцию иммунитета, способное привести к снижению резистентности организма к инфекции, повышению риска онкологических заболеваний, развитию аутоиммунной патологии и алергизации организма

# РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ

- **Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под редакцией А. Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.**
- **ICH S8 Immunotoxicity Studies for human Pharmaceuticals // U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2006.**
- **Immunotoxicology Evaluation of Investigational new drugs // U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2002.**

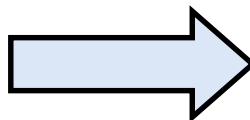
# ОЦЕНКА ИММУНОТОКСИЧНОСТИ СОГЛАСНО РУКОВОДСТВУ ПОД РЕД. МИРОНОВА..2012

**Неспецифический  
ответ**



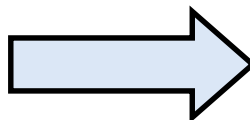
**ФАГОЦИТАРНАЯ  
АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ**

**Клеточный  
иммунный ответ**



**РЕАКЦИЯ  
ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА**

**Гуморальный  
иммунный ответ**



**ОЦЕНКА ТИТРА АНТИТЕЛ**

**В СРЕДНЕМ НА ЭКСПЕРИМЕНТ МЫ ТРАТИМ 180  
ЛИНЕЙНЫХ МЫШЕЙ!!!**

**НАМИ ПРОВЕДЕНО БОЛЕЕ 50 ИССЛЕДОВАНИЙ  
ИММУНОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.**

**ПО НАШИМ ДАННЫМ ТОЛЬКО 5% ЛС ОБЛАДАЮТ  
ВЛИЯНИЕМ НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ**

**ГДЕ ЖЕ СЛЕДОВАНИЕ ПРИНЦИПАМ 3R?**

- **Reduction - меньше животных**
- **Refinement - меньше болезненных процедур**
- **Replacement - альтернативные методы**



# ЧТО ПРЕДЛАГАЕТ НАМ РУКОВОДСТВО ICH S8?

## ОЦЕНКА ИММУНОТОКСИЧНОСТИ В РАМКАХ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ (OECD 407, 28 ДНЕЙ ВВЕДЕНИЯ)

- гематологический анализ крови;
- изменения массовых коэффициентов иммунокомпетентных органов;
- уровень глобулинов крови;
- увеличение случаев инфекционных заболеваний животных;
- частота встречаемости новообразований.

**НЕТ ИЗМЕНЕНИЙ**



**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ НЕ  
ТРЕБУЮТСЯ**

**ЕСТЬ ИЗМЕНЕНИЯ**



**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ**



# АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА

**Реакциями гиперчувствительности необходимо называть специфические нежелательные иммунитет-ассоциированные аллергические реакции, которые приводят к повреждению тканей**

**Невозможно с точностью спрогнозировать аллергические реакции исходя из структуры, молекулярной массы и механизмов действия лекарственной субстанции**

**Лекарственная аллергия может развиваться на любой лекарственный препарат**

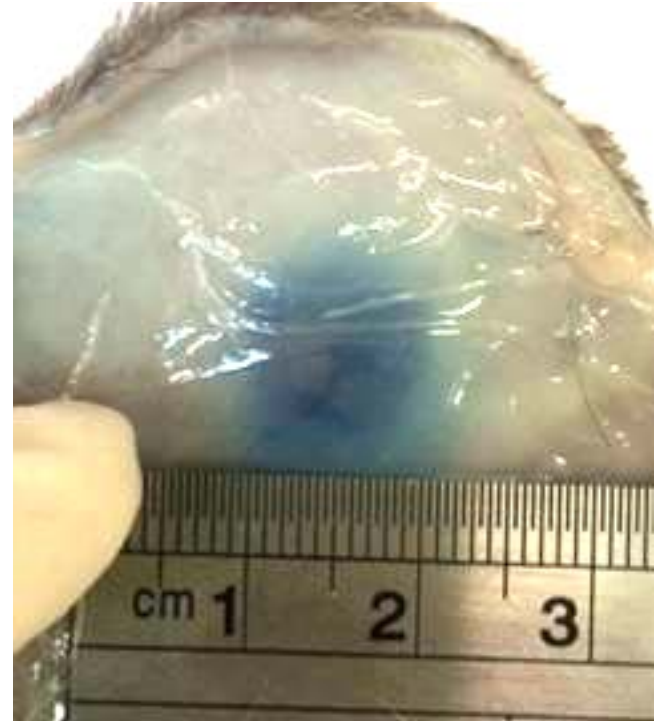
**Можно ли в эксперименте  
корректно оценить риск  
развития аллергических реакций  
на ЛС при применении в  
клинической практике?**

# ШИРОКО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ В РФ

- Реакция анафилактического шока на морских свинках;
- Реакция пассивной кожной анафилаксии;
- Реакция активной кожной анафилаксии



Диаметр пятна <6 мм  
Отрицательная реакция



Диаметр пятна >6 мм  
Положительная реакция

Пример реакции активной кожной анафилаксии

**НА ПРОВЕДЕНИЕ ОДНОГО  
ЭКСПЕРИМЕНТА ТРЕБУЕТСЯ 120-160  
МОРСКИХ СВИНОК**

**ЗА ПОСЛЕДНИЕ 10 ЛЕТ МЫ ПРОВЕЛИ  
БОЛЕЕ 70 ТАКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**

**ИСПОЛЬЗОВАНЫ ТЫСЯЧИ МОРСКИХ  
СВИНОК!!!**



# СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

Тестируемый объект (МНН)	Анафилактический шок	Активная кожная анафилаксия
Действующее вещество >1000 Да		
вакцина для профилактики кори и паротита	0/24	2/24
вакцина полиомиелитная инактивированная	0/24	0/24
вакцина гриппозная инактивированная расщепленная	8/24	8/24
лизаты бактерий	-	33/40
урофоллитропин	-	6/40
гонадотропин хорионический	15/40	13/40
фоллитропин	6/24	19/24
инсулин аспарт	3/24	2/24
инсулин гларгин	2/24	0/24
альфа-1-кислый гликопротеин	6/12	24/24
пэгинтерферон альфа-2а	6/24	3/24
эноксапарин натрия	-	0/40
ванкомицин гидрохлорид	19/24*	-
В сумме	<b>65/244</b>	<b>110/352</b>

**Количество положительных реакций**

**27%**

**31%**

\* - ложноположительный результат. Псевдоаллергическая реакция

Тестируемый объект (МНН)	Анафилактический шок	Активная кожная анафилаксия
Действующее вещество <1000 Да		
убидекаренон	0/12	0/12
бициклол	0/12	0/12
терифлуномид	-	2/20
спарфлоксацин	0/24	0/24
бетагистин	-	2/24
мебеверин	0/40	0/40
урсодезоксихолевая к-та + глицирризиновая к-та	6/24	3/24
рифампицин + изониазид	0/24	0/24
аторвастатин	0/20	0/20
ацетилсалициловая кислота	5/40	19/40
валсартан	-	7/40
аторвастатин + валсартан	-	6/40
нифедипин в комбинации	0/12*	-
ибупрофен	9/40	-
хлорзоксазон	-	9/40
левоцетиризин + монтелукаст	4/20	-
ибупрофен + кофеин	-	0/20
гадопентетовая кислота	0/20	-
В сумме	<b>24/288</b>	<b>48/380</b>

**Количество положительных реакций**

**8%**

**13%**

\* - ложноположительный результат

Лекарственное средство/субстанция/вспомогательные вещества	Чувствительность в тестах на морских свинках	Клинические данные
Альтезин	+	++
Клоксациллин	+++	+
Пенициллин G	+++	+++
Хинин	+++	++
Хлорамин Т	+++	+++
Диизоцианат	+++	+++
Тримеллитик ангидрид	++	++
Салициловая кислота	0	0
Миконазол	0	0
Нафтидрофурил	0	0
Акролеин	0	0
Гентамицин	0	+
Канамицин	0	+
Феназон	0	+
Фенобарбитал	0	+
Соли меди	0	+
Клиохинол	+	0
Пропилгаллат	+++	0
Акрилонитрил	+++	0
Амилацетат	+	0
Анилин	+++	0

- **Результаты собственных исследований демонстрируют ограниченность использования стандартных тестов на морских свинках в связи с высокой вероятностью ложноположительных и ложноотрицательных результатов .**
- **Стандартные тесты оказываются наиболее эффективными при изучении сенсibiliзирующих (антигенных) свойств белковых препаратов с молекулярной массой активного компонента более 1000 Да.**
- **Несовершенство методологии. В частности, способ сенсibilизации (путь введения, курс), используемые дозы и концентрации при сенсibilизации и разрешении реакций, соответственно.**
- **Отрицательные и положительные результаты не следует расценивать как подтверждение потенциального отсутствия или наличия анафилактических реакций в клинической практике.**

*Крышень К.Л., Кательникова А.Е., Мужикян А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. РЕГУЛЯТОРНЫЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ЭТАПЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2018;8(1):44-55*



**ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ  
АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ЛС НА  
СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ НОСИТ ДИСКУССИОННЫЙ  
ХАРАКТЕР**

- Руководство по экспертизе лекарственных средств» т.1, 2013 с. 6-23 не содержит упоминания о необходимости изучения аллергенности.
- Аналогично нет раздела аллергизирующих свойств в ГОСТ 56701-2015.  
**Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств**
- Международные рекомендации (ICH S8, FDA) рассматривают реакции гиперчувствительности только в контексте исследования иммунотоксичности
- **Проведение тестов «активная кожная анафилаксия», «реакции общей анафилаксии», «пассивная кожная анафилаксия» на морских свинках не рекомендуются руководством ICH S8 для доклинической оценки ЛС.**
- Отдельное внимание ICH S8 уделено только реакциям IV замедленного типа (напр. Test No. 406: Skin Sensitisation)

# ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ (МУТАГЕННОСТЬ/КАНЦЕРОГЕННОСТЬ)

**Способность химического вещества вызывать повреждение генетической информации, что может привести к развитию опухолей**

- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под редакцией А. Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
- ICH S2(R1) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use
- Существует порядка 15 различных руководств OECD, посвященных изучению генотоксичности и канцерогенности

# ICH S2(R1)

Руководство ICH S2(R1) предлагает два варианта стандартной батареи тестов:

## Вариант 1:

- Испытание генных мутаций в бактериях;
- Цитогенетический тест хромосомальных повреждений (анализ хромосомных aberrаций *in vitro* или микроядерная проба *in vitro*);
- Тесты генотоксичности *in vivo* (тест «ДНК-комет»).

## Вариант 2:

- Испытание генных мутаций в бактериях;
- Оценка генотоксичности *in vivo* (учет микроядер, тест «ДНК-комет»).

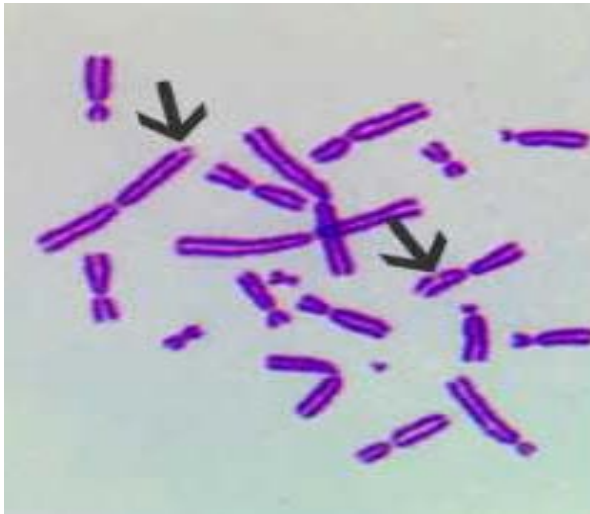
**Используют от 80-100 грызунов на  
каждый тест**

# УЧЕТ МИКРОЯДЕР В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ИЛИ УЧЕТ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ

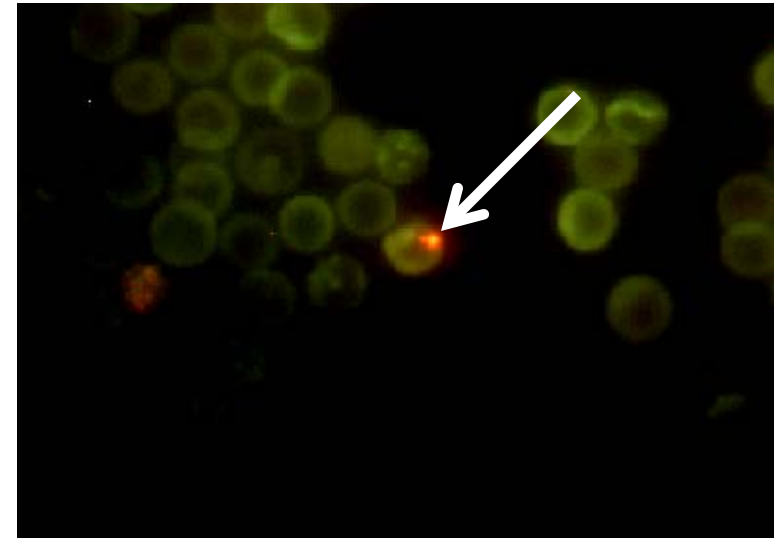
Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической (связанной с хромосомным повреждением) активности

OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

OECD Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test



Разрыв хромосомы

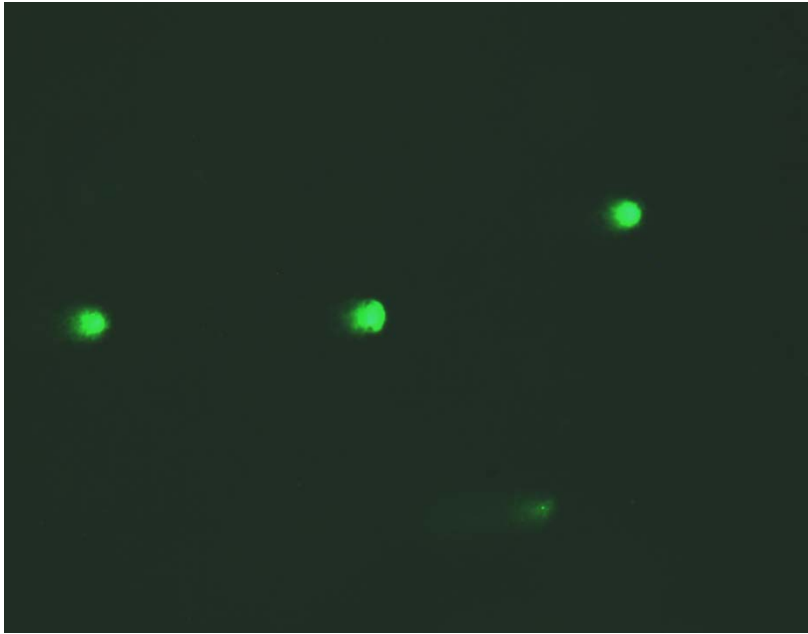


Окраска акридиновым оранжевым.  
Зрелый эритроцит с микроядром

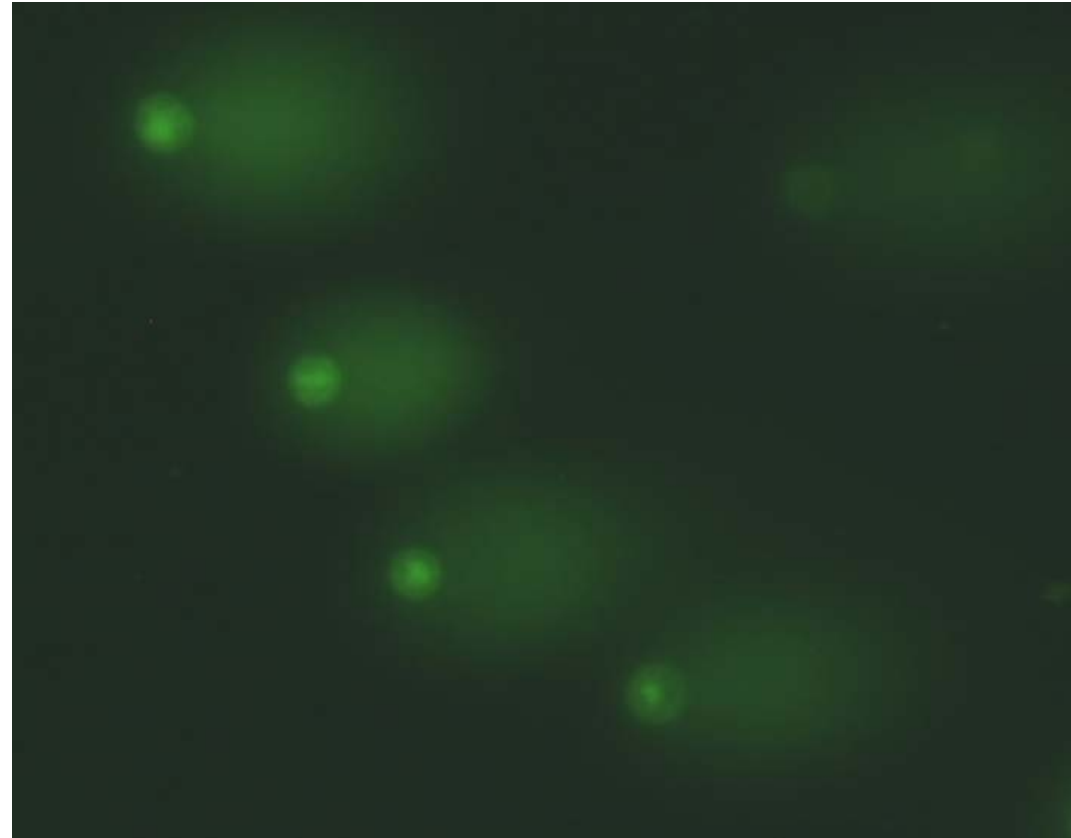
Допускается проводить в рамках изучения хронической токсичности – Забор костного мозга и периферической крови после завершения введения тестируемого объекта в хроническом эксперименте

# ДНК-КОМЕТ ТЕСТ IN VIVO

OECD Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay



**Интактные клетки**



**Этилметансульфонат - мутаген**

Допускается проводить в рамках изучения хронической токсичности – Забор костного мозга, фрагментов печени, почек, селезенки и др. органов-мишеней после завершения введения тестируемого объекта в хроническом эксперименте

# КАНЦЕРОГЕННОСТЬ

**Способность лекарственного средства или субстанции вызывать или содействовать развитию злокачественных новообразований**

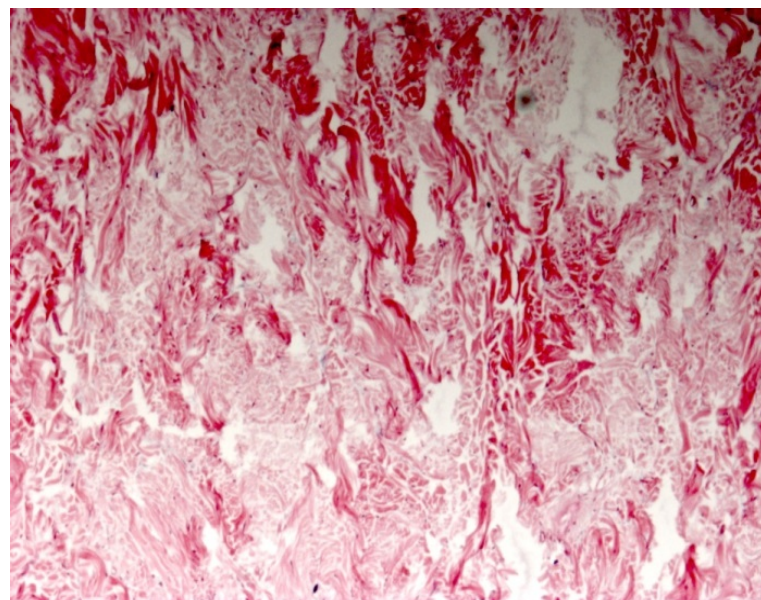
Стандартная схема эксперимента включает в себя длительное введение тестируемого объекта мышам 1,5 года или крысам 2 года.

**В классическом эксперименте используется 400 животных (200♂ и 200♀)**

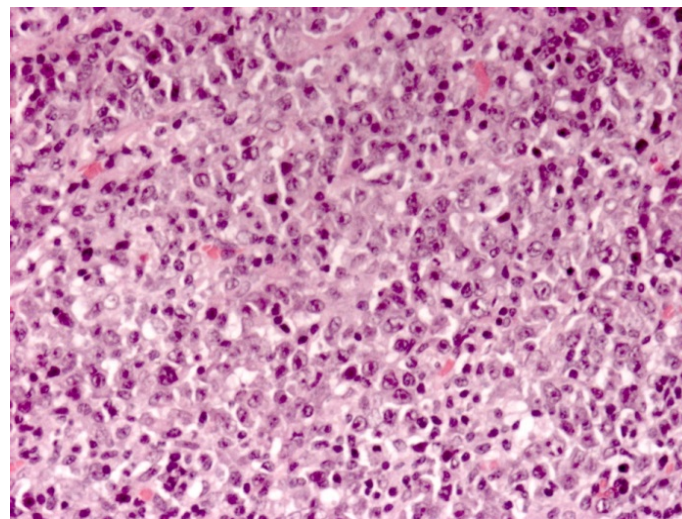
Основной оцениваемый показатель – частота возникновения новообразований.

**Так, в эксперименте на крысах было выявлено более 30 различных спонтанных новообразований у крыс, достигших возраста 2 лет.**

# ПРИМЕР. КРЫСЫ. 2-х годичный эксперимент

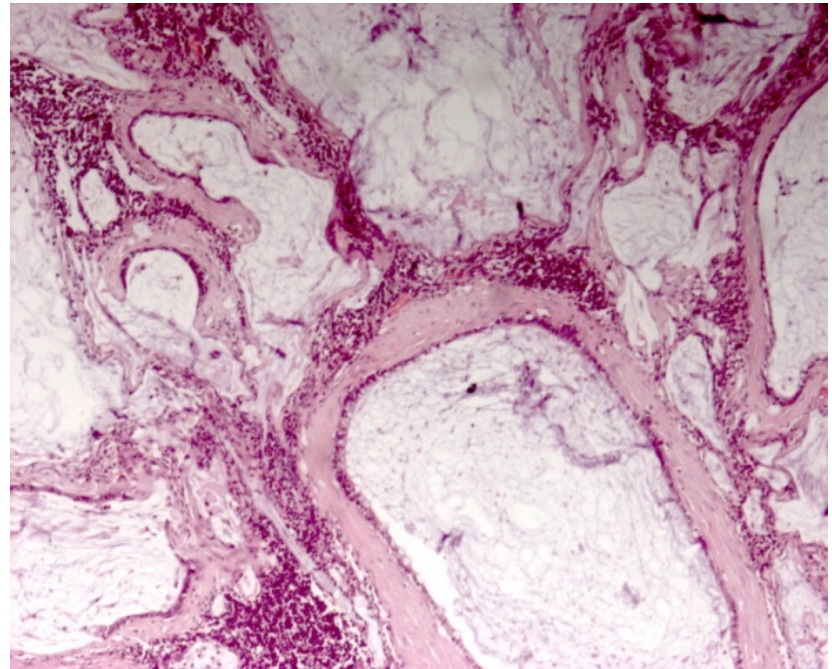


**Фиброма кожи. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 50.**

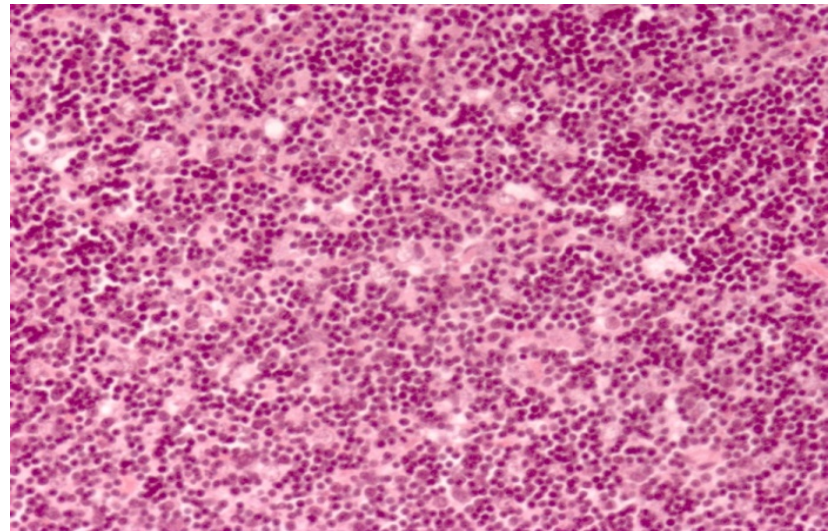


**Неходжкинская лимфома легкого**



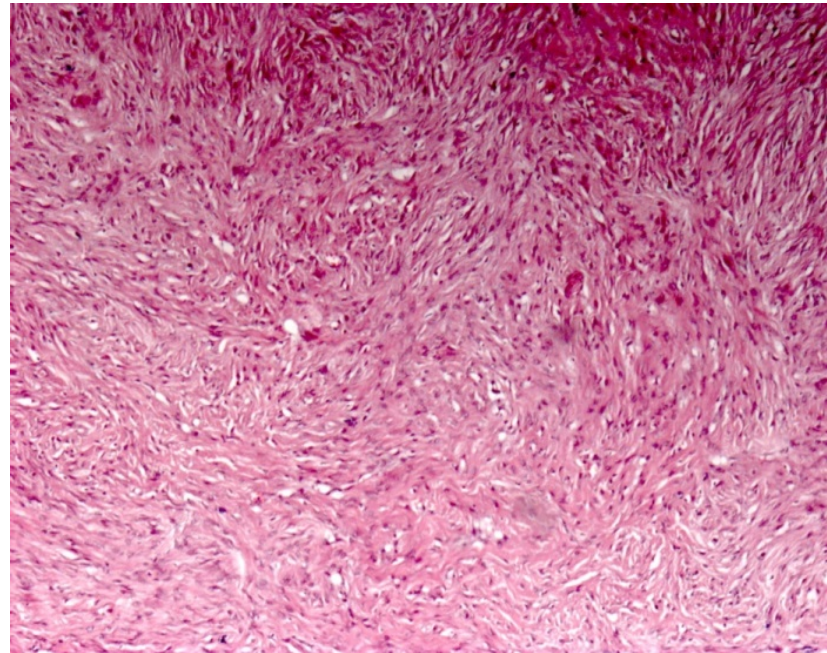


**Муцинозная цистаденома поджелудочной железы**

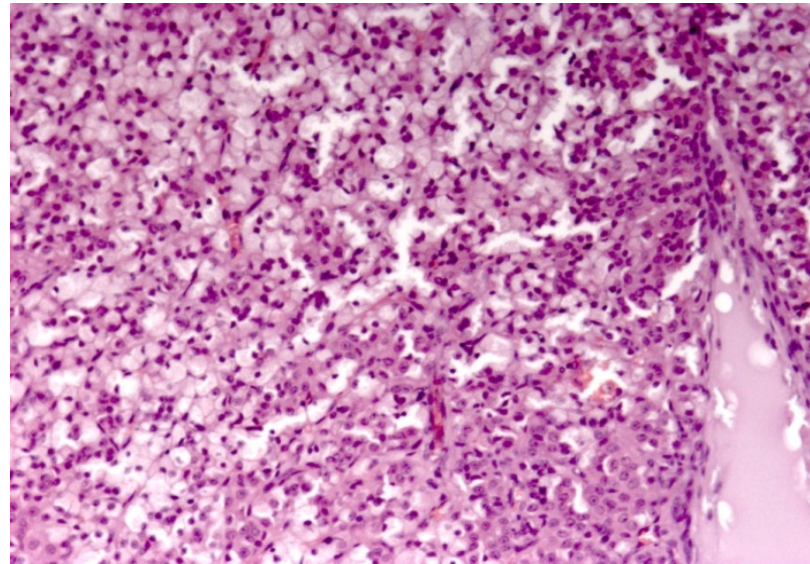


**Тимома**





**ФИБРОМА МЯГКИХ ТКАНЕЙ**



**ЛЕЙДИГОМА МЯГКИХ ТКАНЕЙ**

# РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ

- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под редакцией А. Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
- ICH S1A - S1C Carcinogenicity Studies

**Случаи, требующие изучения канцерогенности в длительных экспериментах, обсуждаются в руководстве ICH S1A и руководстве Миронова, Главе 7. При необходимости проводится во время 3 фазы КИ**

- OECD Test No.451: Carcinogenicity Studies
- **OECD Test No.453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies**

**Допускается проводить в рамках изучения длительной хронической токсичности**

# РЕПРОДУКТИВНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

Влияние на  
генеративную  
функцию самцов и  
самок

Эмбриотоксичность –  
влияние на пре- и  
постнатальное  
развитие эмбрионов





# Оценка функционального состояния органов репродуктивной системы. Способность к оплодотворению и зачатию

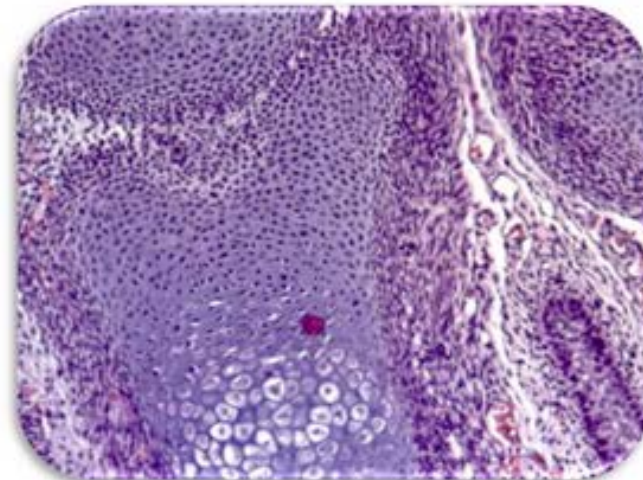
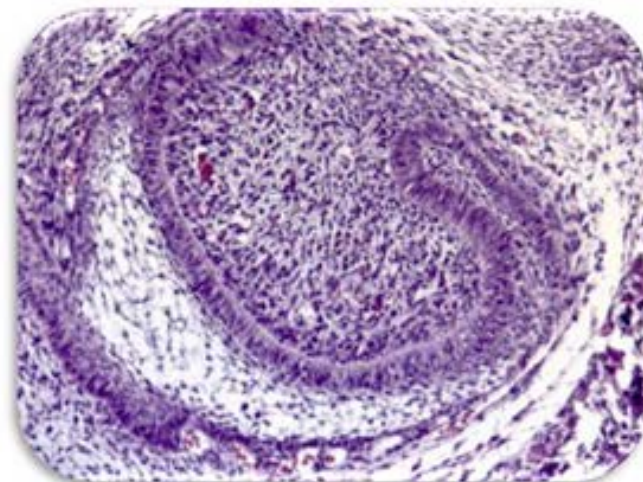


# Пренатальное развитие

Формирование костной ткани у 16-18 дневного плода крысы

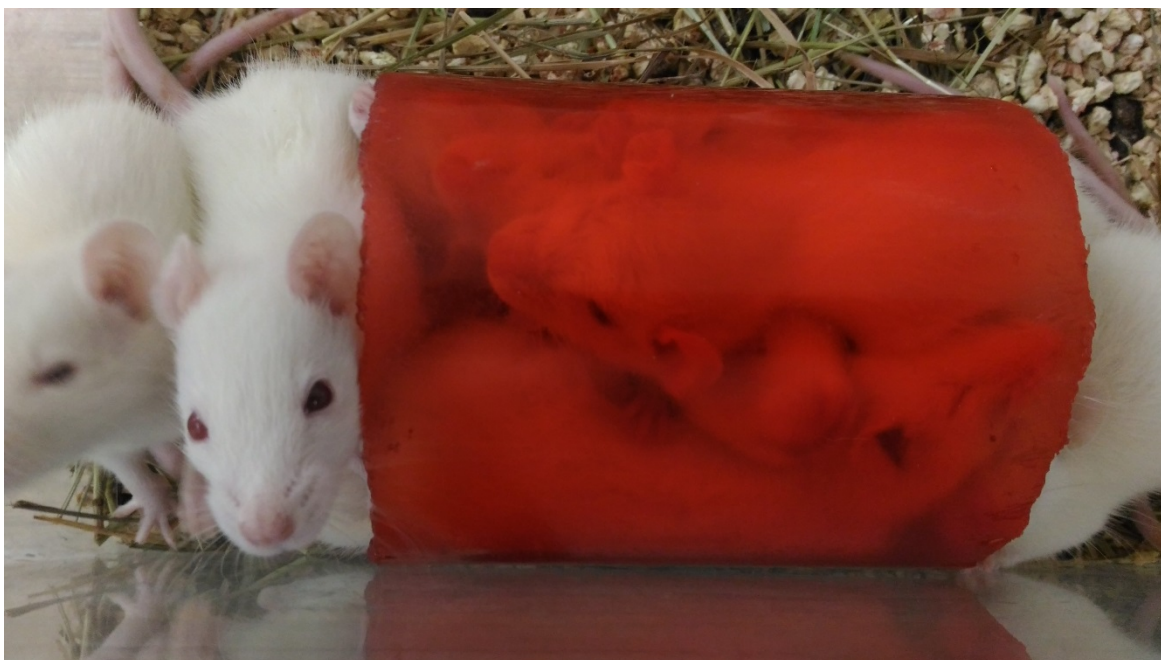


Ализариновый красный





# Наблюдение за потомством. Постнатальное развитие



# РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ

- **Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под редакцией А. Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.**
- **OECD Test No.414: Prenatal Development Toxicity Study**
- **OECD Test No. 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study**
- **Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity**
- **Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test**

**С целью скрининга допускается комбинировать исследования хронической и репродуктивной токсичности. Однако информация, получаемая из такого эксперимента является ограниченной как с точки зрения оценки общетоксических свойств, так и с точки зрения оценки влияния на репродуктивную функцию**



# ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОГРАММЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наименование работ	Количество животных	
Сравнительное изучение хронической токсичности (28 дней + 28 дней отсроченного наблюдения) при подкожном пути введения с оценкой местно-раздражающего действия на крысах	<b>160 (80♂ + 80♀)</b>	
	<b>БЕЗ ОПТИМИЗАЦИИ</b>	<b>ОПТИМИЗАЦИЯ</b>
Аллергизирующие свойства в трех тестах	<b>160 (80♂ + 80♀)</b>	-
Исследование иммунотоксичности в функциональных тестах	<b>180 (90♂ + 90♀)</b>	-
Оценка генотоксичности с прогнозом канцерогенности в рамках изучения хронической токсичности на крысах в двух тестах in vivo – ДНК-комет, хромосомные aberrации или учет микроядер	<b>80 (40♂ + 40♀)</b>	-
<b>ИТОГО:</b>	<b>580 грызунов</b>	<b>160 грызунов</b>

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ**

