

借



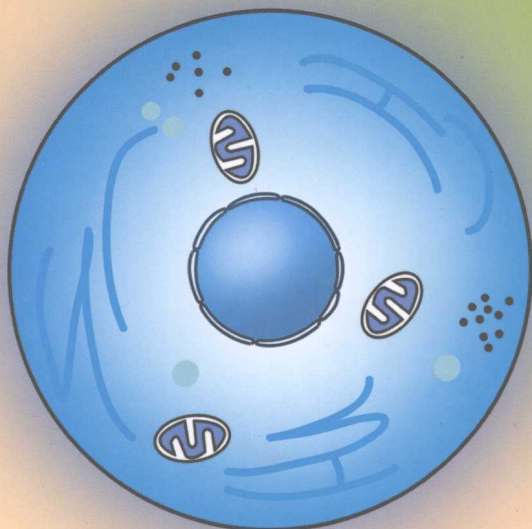
面向21世纪精品课程教材  
应用型本科规划教材

全国高等医药教育规划教材

# 新药临床前评价教程

(药理与毒理学评价部分)

楼宜嘉 编著



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社

面向21世纪精品课程教材  
应用型本科规划教材  
全国高等医药教育规划教材

# 新药临床前评价教程

(药理与毒理学评价部分)

楼宜嘉 编著

浙江大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

新药临床前评价教程. 药理与毒理学评价部分/楼宜嘉  
编著. —杭州: 浙江大学出版社, 2007. 10

ISBN 978-7-308-05573-4

I. 新… II. 楼… III. ①新药—临床药学②新药—临床药学; 药理学—医学院校—教材③新药—临床药学; 毒理学—医学院校—教材 IV. R97

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 148650 号

## 新药临床前评价教程

编 著 楼宜嘉

策划组稿 阮海潮(ruanhc @ 163. com)

责任编辑 阮海潮

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(E-mail: zupress@mail. hz. zj. cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 富阳市育才印刷有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 13.25

字 数 339 千

版 印 次 2007 年 10 月第 1 版 2007 年 10 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-05573-4

定 价 21.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话(0571)88072522

# 前 言

本教材供高等医药院校药学专业及相关学科高年级学生作为专业主干课实验教学使用。全书从新药临床前药理学、毒理学研究内容入手,结合实验课训练,论述新药临床前药效学和毒理学研究的基本理论、基本设计、药理与毒理实验技能,旨在增强药学高级人才知识的系统性,提高他们的动手能力。

我国加入 WTO 后,药物的源头创新已成为新药研究的主流。新药的问世可分为新药发现和新药研究开发两个阶段,新药研究开发尚包括临床前研究和临床研究。无论是临床前研究还是临床研究,都必将经历对药物有效性和安全性的全面评价。因此,将与新药临床前研究相关的药理与毒理学实验技能训练融入本教材,是考虑在新形势下,高级药学人才专业知识结构改善和综合能力培养的需要。

本教材参照国家食品与药品监督管理局颁布的《药品注册管理办法》和《新药申报与技术审评实施指南》要求,并参考《新药评价概论》(秦伯益主编)等专著,阐述新药临床前评价中药理和毒理学研究的基本原则和方法,注重专业知识的系统性、实用性和对学生基本技能与动手能力的培养。

作者所在学科曾于 20 世纪 80 年代,主编全国统编教材《药理学实验》,由人民卫生出版社出版,1996 年发行第二版,内容注重药理学与药物毒理学实验基本技能的培养,适应新药临床前药理和毒理研究教学用。由于编写人员变动很大,已不拟再版。征得原教材主编同意,本教材的部分内容基于上述教材改编,并根据新药临床前评价法规的完善和建立学生合理知识结构的教學需求,作了调整,以适应实际教学的迫切需要。本教材仍包含原编写教师的辛劳与学术贡献,在此,作者谨向曾为编写《药理学实验》教材而努力笔耕的前辈致以敬意。上海交通大学药学院殷明教授、浙江大学药学院周慧君副研究员参加本教材毒理学若干章节的编写工作。

由于编者取舍教材内容的视角可能欠周,教材中不妥之处在所难免,恳请指正。

编者

于浙江大学药学院

2007 年 9 月

# 目 录

第一章 概 论 .....	1
第二章 新药临床前药理学研究 .....	5
第一节 新药发现的药理活性筛选 .....	5
一、细胞水平活性筛选 .....	6
二、器官组织水平筛选 .....	6
第二节 新药评价的药理学研究 .....	7
一、药理学研究实验设计基本知识 .....	7
二、药理实验设计的要点 .....	9
三、实验动物选择 .....	11
四、动物实验模型 .....	13
第三节 药理学实验的基础知识 .....	13
一、药理学实验课程的目的和要求 .....	13
二、实验动物的捉持和给药法 .....	14
实验 1 小鼠的捉持和给药法 .....	14
实验 2 家兔的捉持和给药法 .....	15
附：其他动物的给药法 .....	17
三、实验动物的性别鉴别、编号和处死法 .....	18
四、实验动物给药量的计算 .....	19
五、实验结果的整理和实验报告的撰写 .....	20
六、药效学研究 .....	21
实验 3 药效的感官观察 .....	21
附：几种生理功能的检查方法 .....	22
实验 4 药物的构效关系 .....	22
实验 5 药物的量效关系及 $pD_2$ 值的估算 .....	23
七、药动学研究 .....	25
实验 6 溶液 pH 值对某些药物吸收速率的影响 .....	25
实验 7 药物血浓度半衰期、表现分布容积和清除率的测定 .....	26
实验 8 肝脏匀浆对药物的转化作用 .....	27

实验 9	药酶诱导剂对药物作用的影响	28
实验 10	苯巴比妥对大鼠肝脏微粒体细胞色素 P <sub>450</sub> 含量的影响	29
八、	影响药物作用的因素	30
实验 11	剂型对药物作用的影响	30
实验 12	给药途径对药物作用的影响	31
实验 13	合并用药对药物作用的影响——药物的相互作用	32
实验 14	肝脏功能状态对药物作用的影响	33
实验 15	肾脏功能状态对药物作用的影响	33
实验 16	药物反应的个体差异和常态分布规律	34
第四节	神经系统药理实验	34
一、	传出神经系统药物	34
实验 17	传出神经药物对兔瞳孔的作用	35
实验 18	传出神经药物对离体兔肠的作用	36
实验 19	药物对离体兔主动脉条的作用	37
实验 20	药物对离体豚鼠心房的作用	38
实验 21	肌松药对家兔足趾运动的影响及新斯的明对肌松药的对抗作用	39
实验 22	传出神经药物对猫(或犬)血压的影响	40
二、	局部麻醉药	42
实验 23	普鲁卡因与丁卡因表面麻醉作用的比较	42
实验 24	肾上腺素对普鲁卡因浸润麻醉的增效作用	43
第五节	中枢神经系统药物实验	44
实验 25	乙醚麻醉及麻醉前给药	44
实验 26	镇静催眠药的协同作用和对抗中枢兴奋药作用	46
实验 27	药物对动物自发活动的影响	47
实验 28	药物的抗电惊厥作用	48
实验 29	药物对抗中枢兴奋药惊厥的作用	49
实验 30	氯丙嗪的安定作用	49
实验 31	药物的镇痛作用(热板法)	51
实验 32	药物的镇痛作用(扭体法)	52
实验 33	尼可刹米对抗吗啡的呼吸抑制作用	53
实验 34	尼莫地平对小鼠获得记忆的增强作用	53
第六节	内脏系统药物的药理实验	54
一、	抗高血压药物	54
实验 35	利血平对正常血压大鼠的降压作用	55
实验 36	卡托普利对急性肾型高血压大鼠的降压作用	56
实验 37	药物对离体兔耳血管的作用	57
二、	强心苷类	58
实验 38	强心苷对离体蛙心的作用(斯氏法)	59
实验 39	强心苷对离体蛙心的作用(八木法)	60

实验 40 洋地黄中毒时的心电图变化 .....	61
三、抗心律失常药 .....	61
实验 41 奎尼丁和普萘洛尔对乌头碱诱发大鼠心律失常的保护作用 .....	62
实验 42 利多卡因对氯化钡诱发心律失常的治疗作用 .....	63
实验 43 普萘洛尔对氯仿诱发小鼠心律失常的拮抗作用 .....	64
四、抗心绞痛药和调血脂药 .....	65
实验 44 普萘洛尔提高心肌耐缺氧力作用 .....	65
实验 45 药物对离体家兔(或豚鼠)心脏冠脉流量的影响 .....	66
实验 46 氯贝丁酯的降血脂作用 .....	68
附: 氯贝丁酯对小鼠急性高胆固醇血症的防治作用 .....	68
五、利尿药和脱水药 .....	68
实验 47 利尿药和脱水药对家兔尿量的影响 .....	69
实验 48 氢氯噻嗪对大鼠的利尿作用 .....	69
附: 利尿药的小鼠实验法 .....	70
实验 49 尿液中钠、钾和氯离子的含量测定 .....	71
六、镇咳药、祛痰药和平喘药 .....	73
实验 50 用小鼠氨水喷雾法观察药物的镇咳作用 .....	74
实验 51 用猫喉上神经刺激法观察药物的镇咳作用 .....	75
实验 52 药物的祛痰作用 .....	76
实验 53 远志煎剂对蛙口腔黏膜纤毛运动的影响 .....	77
实验 54 药物的平喘作用 .....	78
实验 55 用气管连环法观察药物对气道平滑肌的作用 .....	79
七、消化系统药物 .....	80
实验 56 药物对胃肠道蠕动的的影响 .....	80
实验 57 药物对实验性胃溃疡的防治作用 .....	81
实验 58 去氢胆酸对大鼠的利胆作用 .....	82
八、止血药与抗凝血药 .....	83
实验 59 药物的体外抗凝血作用 .....	83
实验 60 药物对凝血时间的影响 .....	84
实验 61 药物对凝血酶原激活时间的影响 .....	85
附: 兔脑粉的制备 .....	86
实验 62 药物对纤溶过程的影响 .....	86
附: 兔血浆制备法 .....	87
实验 63 药物对血小板聚集的影响 .....	87
第七节 激素、组胺及有关药物的药理实验 .....	88
一、糖皮质激素类 .....	88
实验 64 糖皮质激素对炎症毛细血管通透性的影响(小鼠耳片法) .....	88
实验 65 糖皮质激素对非甾体抗炎药的抗炎症性渗出作用(大鼠足跖法) .....	89

实验 66 糖皮质激素对肉芽增生的抑制作用 .....	91
二、抗糖尿病药 .....	91
实验 67 胰岛素和格列本脲的降血糖作用 .....	92
附 1: 血糖的邻甲苯胺比色测定法 .....	93
附 2: 大鼠四氧嘧啶性糖尿病的形成法 .....	93
三、组胺与抗组胺药 .....	93
实验 68 组胺对其受体亲和力常数( $pD_2$ )和苯海拉明对组胺拮抗参数 ( $pA_2$ )的测定 .....	94
第八节 治疗药物药理实验 .....	99
一、抗菌药 .....	99
实验 69 药物的体外抗菌实验 .....	100
附: MH 培养基及 MH 培养基琼脂平板的制备法 .....	101
实验 70 药物的体内抗菌实验 .....	102
附 1: 活菌数测定法 .....	103
附 2: 5%胃膜素悬液制备法 .....	103
附 3: 做小鼠体内保护实验时常用病菌的接种量 .....	103
二、抗寄生虫病药 .....	103
实验 71 氯喹对鼠疟的实验治疗 .....	104
附: 吉姆萨(Giemsa)血片染色法 .....	105
三、抗肿瘤药 .....	105
实验 72 氟尿嘧啶对小鼠肉瘤 $S_{180}$ 的实验治疗 .....	106
实验 73 甲氨蝶呤对小鼠肝癌 $H_{22}$ 的实验治疗 .....	108
实验 74 顺氯铂对体外培养肿瘤细胞的影响 .....	109
第九节 影响免疫功能药物的实验 .....	110
实验 75 糖皮质激素对单核巨噬细胞吞噬功能的影响(小鼠碳粒廓清法) .....	111
实验 76 环磷酰胺对小鼠血清抗体形成的影响 .....	112
实验 77 糖皮质激素对迟发型超敏反应的影响 .....	113
实验 78 环磷酰胺对小鼠淋巴细胞转化的影响(形态学计数法) .....	114
第十节 生物检定 .....	116
一、生物检定的应用范围及其特殊问题 .....	116
二、减少生物差异性影响的方法 .....	116
三、效价计算的基本公式 .....	117
实验 79 缩宫素的生物检定 .....	119
附: 用阴道涂片法观察大鼠动情周期的方法 .....	121
第三章 一般药理学评价 .....	122



第四章 新药毒理研究与评价 .....	126
第一节 新药毒理学研究的目的和意义 .....	126
第二节 药物对重要脏器的毒性作用 .....	127
一、肝脏毒性反应 .....	127
二、肾脏毒性反应 .....	128
三、血液毒性反应 .....	129
四、对神经系统的毒性作用 .....	129
五、对免疫系统的毒性作用 .....	130
六、对皮肤的毒性作用 .....	131
第五章 全身给药的毒性试验 .....	134
第一节 新药急性毒性试验 .....	134
一、目的意义 .....	134
二、实验方法 .....	135
实验 80 敌百虫急性 LD <sub>50</sub> 的测定 .....	140
第二节 新药长期毒性试验 .....	142
一、设计与评价的一般原则 .....	142
二、设计与评价的检测项目 .....	144
三、检测指标的时间 .....	144
四、资料整理要求 .....	145
五、结果评价 .....	146
实验 81 苯对于家兔血常规检查项目的影响 .....	146
附：血常规检查法 .....	147
实验 82 四氯化碳对家兔肝功能的影响 .....	149
附：肝功能的丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定法 .....	150
实验 83 氯化汞对家兔肾功能的影响 .....	152
附：肾功能检验方法 .....	152
实验 84 实验动物脏器解剖及组织标本的采集 .....	154
第三节 新药特殊毒性研究 .....	156
一、药物的致突变试验 .....	156
二、生殖毒性试验 .....	160
三、致癌试验 .....	162
附：特殊毒性实验数据的统计分析 .....	164
四、药物的依赖性试验 .....	164
实验 85 鼠伤寒沙门菌营养缺陷型回复突变试验(Ames 试验) .....	168
实验 86 小鼠骨髓细胞微核试验 .....	173
实验 87 大鼠致畸试验 .....	174

第四节 药物的神经系统毒性和感官毒性试验 .....	180
一、新药的神经系统毒性试验 .....	180
二、新药的感官毒性试验 .....	181
第六章 局部用药的毒性试验 .....	182
第一节 皮肤用药(制剂)的毒性试验 .....	182
一、皮肤组织结构 .....	182
二、化学物质对皮肤毒性作用的类型 .....	182
三、皮肤用药(制剂)毒性试验 .....	183
附:皮肤涂抹致癌试验 .....	187
第二节 眼刺激性试验 .....	188
一、眼的组织结构特点 .....	188
二、化学物对眼毒性的作用部位和类型 .....	188
三、眼刺激性试验 .....	189
第三节 肌内注射用药的局部刺激性试验(家兔股四头肌法) .....	190
一、家兔股四头肌的结构特点 .....	190
二、肌内注射液的局部刺激性试验 .....	191
第四节 滴鼻剂和吸入剂的毒性试验 .....	191
一、鼻咽喉的组织结构 .....	191
二、滴鼻剂和吸入剂毒性试验 .....	192
第五节 应用于直肠、阴道制剂的毒性试验 .....	192
一、直肠、阴道的组织结构 .....	192
二、应用于直肠、阴道制剂的毒性试验 .....	193
第七章 制剂的安全限度试验 .....	194
一、热原检查 .....	194
实验 88 注射液的热原试验 .....	195
二、刺激性检查 .....	196
实验 89 注射液的刺激性试验 .....	196
实验 90 眼用制剂的刺激性试验 .....	197
三、过敏性检查 .....	198
实验 91 注射液的过敏性试验 .....	198
四、降压物质检查 .....	198
实验 92 注射液的降压物质试验 .....	199
五、溶血性检查 .....	199
实验 93 注射液的溶血性试验 .....	200
六、异常毒性试验 .....	200
实验 94 青霉素 G 的异常毒性试验 .....	201
参考文献 .....	202

# 第一章

## 概 论

我国加入 WTO 后,药物的源头创新已是大势所趋。不断研制具有我国独立知识产权的新药,是中国医药振兴并走向世界的必由之路。因此,掌握新药研制开发的系统知识及其基本技能,是培养药学及相关专业学生紧迫而又义不容辞的责任。

新药评价大致可分为临床前评价和临床评价两大阶段。临床前评价的任务是发现新药和评选新药,其中药效学与安全性评价是评选新药的重要内容,这些内容都属于药理学和药物毒理学的研究范畴。

按照国家食品与药品监督管理局颁布的《药品注册管理办法》,为申请药品注册而进行的药物临床前研究,包括药物的合成工艺、提取方法、理化性质及纯度、剂型选择、处方筛选、制备工艺、检验方法、质量指标、稳定性、药理、毒理、动物药代动力学等。中药制剂还包括原药材的来源、加工及炮制等;生物制品还包括菌毒种、细胞株、生物组织等起始材料的质量标准、保存条件、遗传稳定性及免疫学的研究等。因此,新药临床前研究的主要内容涉及三个部分:药学、药理学、毒理学。其中,药学评价内容基本包括药物合成研究(合成新药、结构测定、中间试生产、药品供应)和植物化学研究(初步提取、有效成分分析与结构测定、中间试生产、药品供应)、剂型与制剂研究(工艺、中间试生产、生物利用度等)、药物分析(质量标准测定方法、理化性质、稳定性试验、暂定原料规格、质量标准草案等)。药理评价内容包括药效学、药代动力学、必要的药理机制研究等。而毒理学评价则包括药物一般药理学、急性毒性、长期毒性、特殊毒性、依赖性、局部刺激性试验、制剂有害物质限度试验等。严格地讲,新药临床前评价教程应该包括以上各个研究环节,但为适用于实验教学的特殊性,本教材仅从新药的有效性和安全性评价角度出发,涉及药理学和药物毒理学的研究内容。

在申请新药注册的临床前研究资料中,药理毒理研究资料主要包括以下几方面内容:主要药效学试验,一般药理研究试验,急性毒性试验,长期毒性试验,过敏性(局部、全身和光敏毒性)、溶血性和局部(血管、皮肤、黏膜、肌肉等)刺激性等与局部、全身给药相关的特殊安全性试验研究,复方制剂中多种成分药效、毒性、药代动力学相互影响的试验,致突变试验,生殖毒性试验,致癌试验,依赖性试验,动物药代动力学试验,等等。

现以化学药新药为例,简述药物注册分类各类新药临床前药理与毒理学试验项目及技术要求。

### (一) 药物注册分类

以化学药品注册分类为例,可分为以下 6 类:

#### 1. 未在国内上市销售的药品:

- (1) 通过合成或者半合成的方法制得的原料药及其制剂;
- (2) 天然物质中提取或者通过发酵提取的新的有效单体及其制剂;
- (3) 用拆分或者合成等方法制得的已知药物中的光学异构体及其制剂;

- (4) 由已上市销售的多组分药物制备为较少组分的药物;
- (5) 新的复方制剂。
2. 改变给药途径且尚未在国内外上市销售的制剂。
3. 已在国外上市销售但尚未在国内上市销售的药品:
  - (1) 已在国外上市销售的原料药及其制剂;
  - (2) 已在国外上市销售的复方制剂;
  - (3) 改变给药途径并已在外国上市销售的制剂。
4. 改变已上市销售盐类药物的酸根、碱基(或者金属元素),但不改变其药理作用的原料药及其制剂。
5. 改变国内已上市销售药品的剂型,但不改变给药途径的制剂。
6. 已有国家药品标准的原料药或者制剂。

## (二) 药理毒理研究申报资料项目

药理毒理研究申报资料项目列于表 1-1 中。

资料 16: 药理毒理研究资料综述。这是指所申请药物的药理毒理研究(包括药效学、作用机制、一般药理、毒理、药代动力学等)的试验和国内外文献资料的综述。

资料 17: 主要药效学试验资料及文献资料。

资料 18: 一般药理研究的试验资料及文献资料。

资料 19: 急性毒性试验资料及文献资料。

资料 20: 长期毒性试验资料及文献资料。

资料 21: 过敏性(局部、全身和光敏毒性)、溶血性和局部(血管、皮肤、黏膜、肌肉等)刺激性等主要与局部、全身给药相关的特殊安全性试验研究和文献资料。局部用药应当报送该项资料,必要时应当进行局部吸收试验。

资料 22: 复方制剂中多种成分药效、毒性、药代动力学相互影响的试验资料及文献资料。属注册分类 1 中“新的复方制剂”,应当报送资料项目 22。如长期毒性试验显示其毒性不增加,毒性靶器官也未改变,可免报资料项目 27;如其动物药代动力学研究结果显示无重大改变的,可免报资料项目 23~25。

资料 23: 致突变试验资料及文献资料。

资料 24: 生殖毒性试验资料及文献资料。除注册分类 1 以外,对用于育龄人群的药物,应当根据其适应证和新药特点(如避孕药、性激素、性功能障碍治疗药、促精子生成药、致突变试验阳性或者有细胞毒作用的新药)报送相应的生殖毒性研究资料。

资料 25: 致癌试验资料及文献资料。对于是否需做致癌性资料,应根据以下情况确定:如新药结构与已知致癌物质有关、代谢产物与已知致癌物质相似;在长期毒性试验中发现有细胞毒性作用或对某些脏器、组织细胞生长有异常显著促进作用的新药;致突变试验结果为阳性的新药,必须报送致癌性试验资料。

资料 26: 依赖性试验资料及文献资料。作用于中枢神经系统的新药,如镇痛药、中枢抑制药、中枢兴奋药以及人体对其化学结构具有依赖性倾向的新药,应当报送药物依赖性试验资料。

资料 27: 动物药代动力学试验资料及文献资料。速释、缓释、控释制剂应当同时提供与普通制剂比较的单次或者多次给药动物药代动力学研究资料。属注册分类 1 的新药,可以

在重复给药毒性试验过程中进行毒代动力学研究。

表 1-1 申报资料项目表

资料分类	资料项目	注册分类及资料项目要求					
		1	2	3	4	5	6
药理毒理研究资料	16	+	+	+	+	+	+
	17	+	* 2	±	* 4	—	—
	18	+	* 2	±	* 4	—	—
	19	+	* 2	±	* 4	—	—
	20	+	* 2	±	* 4	—	—
	21	* 6	* 6	* 6	* 6	* 6	* 6
	22	* 1	—	—	—	—	—
	23	+	±	±	±	—	—
	24	+	±	±	±	—	—
	25	* 1	—	* 1	* 1	—	—
	26	* 1	—	—	—	—	—
	27	+	* 7	—	+	* 7	—

注：1. “+”：指必须报送的资料；

2. “±”：指可以用文献综述代替试验资料；

3. “—”：指可以免报的资料；

4. “\*”：按照说明的要求报送资料，如\*1，指见说明之第1条。

对表 1-1 所列内容的若干说明：

1. 分类 1 的新药需提供全部的药理毒理研究项目，包括主要药效学试验、一般药理研究、急性毒性、长期毒性、致突变、生殖毒性试验和相应的文献资料。属注册分类 1 中“用拆分或合成等方法制得的已知药物中的光学异构体及其制剂”，应当报送消旋体与单一异构体比较的药效学、药代动力学和毒理学（一般为急性毒性）研究资料或者相关文献资料。在其消旋体安全范围较小、已有相关资料可能提示单一异构体的非预期毒性（与药理作用无关）明显增加时，还应当根据其临床疗程和剂量、适应证，以及用药人群等因素综合考虑，提供单一异构体的重复给药毒性（一般为 3 个月以内）或者其他毒理研究资料（如生殖毒性）。属注册分类 1 中“由已上市销售的多组分药物制备为较少组分的药物”，如其组分中不含有必须做致癌性试验的物质，可以免报资料项目 23~25。新组成的复方、化学药与中药的复方、由动物或其组织、脏器提取的新的多组分生化药，需提供一般药理、急性毒性、长期毒性实验和文献资料。而前两者还应提供复方多组分毒性相互作用的试验和文献资料，若其某些组分药代动力学特征有重大改变，尤其在重要器官或组织的分布、代谢有重大改变时，应结合该成分的特点分析有无必要进行致突变、生殖毒性、致癌试验。如有必要，尚须与单独给药的结果进行比较，如果长期毒性试验未见其毒性增加，毒性靶器官也未改变，则可免做药代动力学研究。如为已上市多组分减为较少组分，仅需提供一般药理、急性与长期毒性文献

资料。

2. 分类 2 的新药需提供全部的上述药理毒理项目文献综述资料,其 17~20 号药理毒理研究,所采用的给药途径应当与临床拟用途径一致。必要时应当提供与原途径比较的药代动力学试验或者相关的毒理研究资料(如局部毒性试验或者重复给药毒性试验)。

3. 属注册分类 3 中“改变给药途径,已在境外上市销售的制剂”,主要应当重视制剂中的辅料对药物吸收或者局部毒性产生的影响,必要时提供其药代动力学试验或者相关毒理研究资料。

4. 属注册分类 4 的新药,应当提供与已上市销售药物比较的药代动力学、主要药效学、一般药理学和急性毒性试验资料,以反映改变前后的差异,必要时还应当提供重复给药毒性和其他药理毒理研究资料。如果改变已上市销售盐类药物的酸根、碱基(或者金属元素)而制成的药物已在境外上市销售,则需提供急性毒性和一般药理试验和文献资料。

5. 可能需特殊处理的几种情况:

(1) 某些与已知具有光敏性化合物(某些抗生素、非甾体抗炎药等),有可能要求提供光敏试验或文献资料。

(2) 人体内的某些物质作为药用,可根据其适应证情况、药理毒理特点、用药剂量大小、期限长短等,要求提供长期毒性等实验和(或)资料。

6. 局部用药除按所属注册分类及项目报送相应资料外,应当报送资料项目 21,必要时应进行局部吸收试验。

7. 速释、缓释、控释制剂应当同时提供与普通制剂比较的单次或者多次给药的动物药代动力学研究资料。

上述药理毒理研究项目与技术,为新药临床前有效性、安全性评价的框架性内容,供新药研究开发设计时参考,但具体品种的特殊情况尚要具体对待。具体研究开发时,应从临床应用安全性、疗效和质量控制角度综合考虑,是否有必要提供相应资料。

## 第二章

# 新药临床前药理学研究

进入新药临床前评价阶段时,通常已经历了新药发现阶段,即对化合物进行了多种活性筛选与评价,多数还进行了构效关系研究,作用机制和初步的急性毒性和(或)致突变研究,被认为可以作为候选药物才进一步进行系统的临床前药理学和药理毒理学评价,因此新药临床前评价广义上还包括为新药发现而进行的药理活性筛选。

### 第一节 新药发现的药理活性筛选

新药临床前评价首先面临的问题,是对层出不穷的候选化合物进行药理活性与毒性的初步筛选,只有活性大而毒性小的化合物才具有进一步研究开发的价值。因此,正确理解新药活性与毒性评价的意义,并选择合适的方法与技术进行新药活性与毒性初筛,也是新药临床前研究的系统知识和最基本方法、手段之一。由于新药候选化合物的活性与毒性筛选,事实上已成为新药早期研究的“瓶颈”,因此加强该方面的知识学习与技能训练,是新药临床前药理与毒理研究前期工作不可缺少的内容之一。

新药活性筛选(drug activity screening)是指对候选的合成化学品、天然来源提取物或纯品,及生物技术产品等先导化合物或者衍生物药理作用的发现。由于在该阶段主要面临的问题是,快速评价某一候选化合物的特定活性,以初步了解其是否具有进一步研究的价值,所以要求方法简单、快速、高效、灵敏、可控;评价指标客观、专一、可量化。根据需要可有基因芯片和蛋白芯片高通量筛选(high-throughput screening)、细胞水平的高通量或高内涵筛选(high-content screening)、组织器官乃至整体动物(如局部神经体液调节、神经精神活动)筛选等。

在创新药物研制中,药理与毒理学研究面临以下三个突出的问题:① 尽可能高度模拟整体生命活动,反映疾病过程动态的靶点发现与确认;② 高效、快速、灵敏、专一的评价系统和评价能力,以满足大量候选化合物活性筛选,解决限制药物研究早期(药物发现)进程的瓶颈;③ 适合创新药物早期研究的供试样品量少,不能满足动物试验的需要。因此,构建满足以上需求的实验手段与技术,细胞层次的高内涵筛选评价系统是最为合适的实验体系。由于其基于活细胞动态生命活动,利用细胞内特殊荧光标记的位置和亮度,结合快速显微成像装置和流式细胞术,可实时检测药物效应动力学等结果。如蛋白磷酸化位置,细胞增生或凋亡,细胞表型(神经突触形成,细胞骨架修饰等),与以往的高通量筛选相比,避免了单靶点“串行”研究模式,很大程度上提高了评价的正确性和代表性。

候选化合物药理活性筛选实验的基本设计,首先考虑量效关系和时效关系问题的确定。一般设对照,包括阴性对照、阳性对照和供试品(高、中、低三个剂量或浓度)共五个组。其中

阴性对照用以消除实验系统误差,而阳性对照则主要用以检验方法的可靠性,避免出现假阳性和假阴性结果。

## 一、细胞水平活性筛选

细胞是能体现生命活动的最小单位,以细胞作为生物测试系统,可以在一定程度上反映候选化合物特定的生理药理活性。尽管有了众多的筛选模式和平台技术,最经典最基本的细胞活性筛选仍然具有重要的地位。细胞实验具有直观、易行、高效、所需样品少的特点,非常适合于新药研究早期候选药物样品多而量少阶段的筛选。

与整体实验相比,来自细胞实验获得的资料尚不能体现机体神经体液调节和反馈性调节作用,许多情况下也不能恰当地体现特定组织的细胞自分泌/旁分泌现象和药物体内处置过程。因此在药理与毒理研究中,细胞水平活性筛选在特定的研究阶段,如药物作用靶点发现与确认上,新药发现及结构优化上,毒性预测上及分子和信号转导等机制研究上具有不可取代的应用价值。

最常用的评价指标是药物对细胞药理活性的半最大效应浓度(concentration for 50% of maximum effect,  $EC_{50}$ ),或生长抑制一半所需浓度(half inhibiting concentration,  $IC_{50}$ )的测定,实验结果所获数值越小,表明被测物质活性越高。也可以获得细胞呈现某项药理活性的百分率为目标。所采用的细胞可用原代培养细胞、细胞株、转基因细胞株等。实验设计步骤可大致如下:

1. 探索浓度范围 主要目的是探索出0%~100%细胞呈现特定药理活性或生长抑制浓度范围;可以查阅文献,了解他人所获结果,这样有利于少走弯路,但文献资料不能代替实验资料,应该获得实测数据。如果无文献资料,一般按对数级别设若干浓度组,以尽可能覆盖0%~100%细胞特定药理作用或生长抑制浓度范围。

2. 确定实验分组 一般设4~5组。首先根据上述0%~100%细胞呈现特定药理活性浓度范围,按照拟设置的组数,确定实验浓度的组距比例,通常的组距比例为1:(0.65~0.85),如浓度范围较大,也可在1:0.5~1:1的比例内设置组距,然后根据组距比例获得各组实际浓度。

3. 正式实验 应该根据不同细胞的生长周期,确定培养时间。通常在细胞呈对数生长期时加入候选药物,一般应先观察时效关系,以明确测试时间点,并在合适的时间获得数据计算 $EC_{50}$ 或 $IC_{50}$ 及其可信限。必要时作量效关系和时效关系图。

## 二、器官组织水平筛选

上述细胞水平的药理活性筛选,具有高效、易行、所需供试样品少的特点,因此广泛用于各种候选药物的早期药理作用发现。但是细胞实验不能体现组织器官特有的协调反应和宏观表现,并缺乏组织器官局部的神经体液和活性物质调节。器官组织水平的筛选可在一定程度上满足上述需要,所需试验药物的量也较少,因此可以用于药物发现阶段特定的药物活性初步评价。如青蛙坐骨神经腓肠肌标本可作为横纹肌松弛药的筛选;离体兔心可评价药物对冠脉流量的影响等,这些将在以下相关内容中予以介绍。



## 第二节 新药评价的药理学研究

新药临床前药理评价内容一般包括下述几个方面：主要药效学研究(如化学药品注册资料 17),即与药品防治作用有关的主要药理作用；一般药理学研究(如化学药品注册资料 18),即在产生主要药效的剂量下,对机体其他生理系统的广泛药理作用；药代动力学研究(如化学药品注册资料 22 及资料 27),即机体对药物的处置过程与规律,包括吸收、分布、生物转化和排泄及其相关的动力学参数。

临床前药理学研究主要是评价候选化合物与防治疾病有关的作用(治疗作用与适应证),并明确其作用强弱、与已知同类药物相比的特点,以及在推荐临床使用剂量下,对机体其他重要系统有何影响。也包括研究机体对药物处置的过程与规律,及其相关的动力学参数,必要时还应对药理机制进行探讨。药理学研究可分为整体实验(*in vivo*)和离体实验(*in vitro*)两大类。前者为临床前药效评价必不可少的方法,后者获得的结果则一般作为辅助资料。

注册分类 1 的新药必须提供主要药效学评价资料,除此以外需提供主要药效学资料的还有:注册分类 4 中如为改变已知盐类药物的酸根、碱基或金属元素而不改变其药理作用者;注册分类 5 中如改变剂量和疗程的新药。

### 一、药理学研究实验设计基本知识

药理学研究的目的是揭示药物具有什么样的作用,为什么有这样的作用等。新药研制的药效试验,应根据注册需要和可能,作出科学的选择,使获得的结果具有治疗疾病的针对性。实验前的调研是必不可少的,包括文献资料的查阅、经验借鉴等。经过开题报告和论证,要明确实验目的是什么,主要方法技术是什么,应该观察哪些指标,收集哪些数据,准备说明什么问题。在考虑达到预期目的的同时,尚需在人力、物力资源和时间上都做好充分安排,周密地进行实验设计。必须本着实事求是的科学精神,在严谨的态度、严密的方法和严格的要求下进行实验研究。实验记录必须真实、规范、完整,能体现其原始性,切忌二次处理。根据实验观察和记录,运用正确的统计分析方法,得出可靠的结论。

要想有效地完成一项药理实验研究,首先必须科学地设计该项实验。依靠合理的实验设计,可以收到事半功倍的效果。由于情况各有不同,一个好的实验设计应根据实验要求灵活掌握,只有尽可能完善的实验设计、正确的实验操作,再配合合理的分析,才能获得可信而理想的结果。因此,从整个研究过程来看,实验设计是中心环节,实验设计虽不能改变事物发展的本质,但一个正确无误的实验设计有助于反映事物发展的内在联系。

药理实验必须遵循自然科学研究中实验设计的三大原则——重复、随机、对照。

#### (一) 重复(Replication)

由于生物个体差异或实验误差,仅根据一次实验或一个样本动物所得的结果,往往很难下结论。在适当的范围内重复次数愈多,数据的代表性愈强,则结果愈可靠,所以药理实验的结果应当能被稳定地重复,即具有可复性。同时在提高或具备足够的实验重复性时,需注意与实验有关的或发生干扰的因素,否则很难达到实验的可复性。