



安全药理学常用试验设计及 相应统计策略

闫长会

国家北京药物安全评价研究中心
军事医学科学院毒物药物研究所



汇报主要内容

- 安全药理学的研究目的及开展条件
- 中枢神经系统常用试验设计和数据分析
- 心血管、呼吸系统常用试验设计和数据分析
- 安全药理试验与重复给药毒性试验的结合



- 参加本次培训班的期望？
- 希望能够解决哪些问题？
- 安全药理学试验的关键点？

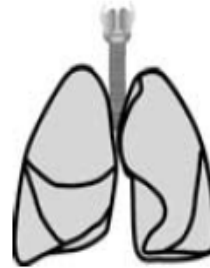


ICH要求的检测指标

Safety Pharmacology 'Core Battery Studies'



- Motor Activity
- Behavior
- Coordination
- Sensory/Motor Reflexes
- Body Temperature



Respiratory

- Respiratory Rate
- Tidal Volume
- O₂ Saturation



Cardiovascular

- BP & Heart Rate
- ECG
- Repolarization (APD)
- hERG (I_{Kr}) assay
- Conduction

药物安全药理学研究策略的转变

试验项目	自发活动 转棒 抓力 热板 胃肠功能试验 心血管系统试验	功能组合试验 自发行为 无创或有创遥测系统
动物数量	大鼠120只 小鼠40 犬/猴24只	大鼠40 犬/猴8只
特点	多个试验的组合 实验周期长 检测指标单一 缺乏系统性	节约成本 提高效率 FDA\CFDA 2014版 指导原则



试验之前应了解的信息

- 供试品（**Test Article**）的基础资料
- 结构类似物或者同类药物的相关文献
- 药代资料、毒代资料
- 一般毒性资料

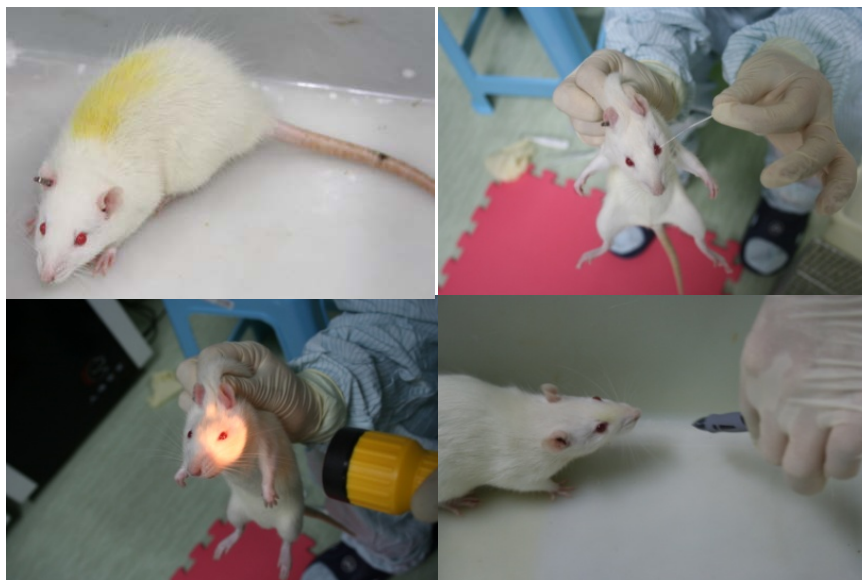


实验方案设计的几个要点

- 试验方法的选择
- 试验开始的时机
- 剂量
- 样本量（每组动物数）
- 对照的选择
- 给药次数
- 观察时间

功能组合试验 (FOB)

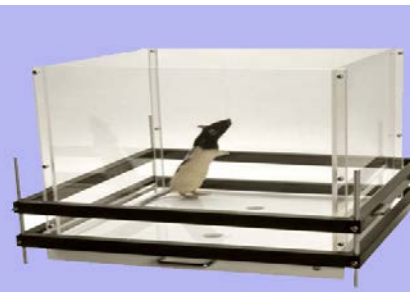
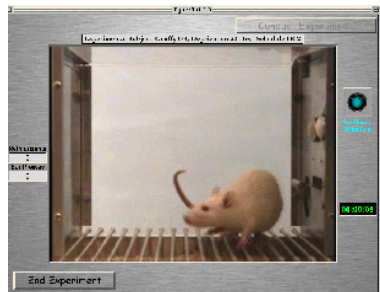
中枢神经系统：定性和定量评价给药后动物的运动功能、行为改变、协调功能、感觉/运动反射和体温的变化等，以确定药物对中枢神经系统的影响。可进行动物的功能组合试验。





中枢神经系统评价策略

- 核心组合试验：神经系统功能组合试验(FOB)、自发行为测试(Locomotor)、抓力测定试验、小鼠睡眠协同试验、协调平衡运动试验等。
- 追加的安全药理学试验：学习记忆的检测。
- 药物依赖性检测：大鼠条件性位置偏爱、大鼠自然戒断、小鼠催促戒断试验等。





中枢神经系统研究的改进

■ 试验项目

神经系统功能组合试验（**FOB**）+ 自发行为

■ 完善大鼠基础值数据库

7-9周，雌、雄性**SD**大鼠

■ **FOB**试验在**GLP**条件下的优化

人员偏差控制、数据的处理、阳性药的验证等

神经系统功能组合试验（FOB）检测指标举例

- **笼内观察:**进食、饮水、睡眠、无运动活动/清醒、绕笼内运动、竖毛、攻击行为、发声、理毛
- **开阔场地观察:**体态、自主活动、步态、异常行为、理毛行为、排尿、排便
- **手持观察:**手指逼近、触摸反应、泪液分泌、皮肤颜色
- **操纵检测:** 瞳孔对光反射、空中反射、前后肢张力
- **测量指标:**体重、直肠温度

所有的操作均按照特定的顺序，对动物影响小的操作在前，动物抓取等操作在后，体温检测最后进行。



FOB试验的实验设计

组别	剂量 (mg/kg)	动物数	
		雌性	雄性
1溶剂对照	0	5	5
2阳性对照	5	5	5
3低剂量组	1	5	5
4中剂量组	3	5	5
5高剂量组	10	5	5

注：检测时间点一般包括给药前和药后30min、1h、2h、6h、24。

FOB试验的评分标准举例

操作方法	观察（操作顺序） （范围；标准值）	评分标准
在开放场地观察 1min	抽搐（19）（0-4； 0）	0:未见抽搐； 1: 1min内一次抽搐； 2: 1min内2-5次抽搐； 3: 1min内6-10次抽搐； 4: 1min内10次以上抽搐。
慢慢向光源靠近	瞳孔直径(47) (0-8; 4)	0: 瞳孔缩小：即使没有直接的光源刺激瞳孔明显缩小； 4: 正常的瞳孔大小； 6: 中度的瞳孔散大：瞳孔散大在光源试验中有阳性反应（收缩）； 8: 明显的瞳孔散大：瞳孔散大在光源试验中没有阳性反应（未见收缩）。
试验过程中	动物死亡（57） （NA）	0:没有发现， 1: 发现

注：能够进行严重程度分级的指标，异常值存在低于正常值的情况，标准值定为4，低于正常值评分的范围是4-0，高于正常值的评分范围为4-8；异常值不存在低于正常值的情况，标准值定为0，高于正常值的评分范围为0-4；不能对严重程度评分的指标如死亡等，定为0（未发现）和1（发现）。



HM6灌胃给药后FOB试验结果表述举例

检测指标	正常值	溶剂对照	阳性药对照	3mg/kg	10mg/kg	30mg/kg
动物进食	0/1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
饮水	0/1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
睡觉	0/1	0/10	5/10*	0/10	2/10	5/10*
无运动活动/清醒	0/1	4/10	4/10	8/10	8/10	5/10
绕笼内运动	0/1	5/10	0/10	2/10	0/10	0/10
竖毛（笼内）	0/1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
攻击同笼动物	0/1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
叫声（笼内）	0/1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
理毛（笼内）	0/1	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10
觉醒，唤醒	4	4.40	2.80**	4.00	3.70**	3.60**
手指逼近	4	4.40	2.20**	4.10	3.40*	3.10**
畏惧	4	4.10	2.30**	3.50	3.30	2.90**
体态	4	4.00	2.60**	4.00	3.80	3.50
自主活动	4	4.00	2.60**	3.90	3.60	3.20**
理毛行为	0	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
排尿	4	3.20	3.00	3.20	3.00	3.80
排便	4	2.60	1.20	3.00	3.00	3.00
呼吸	4	4.00	3.10	3.60	3.80	3.70
震颤	0	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00
惊恐反应	4	4.00	2.80**	3.50	3.80	3.50
心率	0	0.00	0.80	0.40	0.00	0.00
体位被动性	4	4.20	5.70**	4.20	4.60	4.70
僵住症	0	0.00	0.50*	0.00	0.10	0.20
视觉位置感	4	4.00	2.80**	4.00	3.90	3.80
握力	4	4.00	2.60**	4.00	3.70	3.60
耳廓反射	4	4.00	3.80	4.00	4.00	4.00
身体张力	4	3.80	2.10**	3.70	3.30	3.20*
腹部张力	4	3.80	2.00**	4.00	3.50	3.20*



FOB study protocol(1)

A: Home cage measurements

- 1) *Body position*
- 2) *Respiration*
- 3) *Clonic involuntary movement*
- 4) *Tonic involuntary movement*
- 5) *Vocalisation*
- 6) *Palpebral closure*

B: Hand-held observations

- 1) **Reactivity**
- 2) **Handling**
- 3) **Palpebral closure**
- 4) **Lacrimation**
- 5) **Salivation**
- 6) **Piloerection**
- 7) **Other observations**



FOB study protocol(2)

C: Physiological measurements

- 1) rectal temperature
- 2) body weight
- 3) Examine the ' sex

D: Open field activity

- 1) *Number of rearings*
- 2) *Clonic involuntary movement*
- 3) *Tonic involuntary movement*
- 4) *Gait*
- 5) *Movements*
- 6) *Level of arousal or alertness*
- 7) *Occurrence of stereotypical behaviours*
- 8) *Abnormal behaviour*
- 9) *Number of defecations*
- 10) *Number of urinations*



FOB study protocol(3)

E: Stimulus response

- 1) *Approach response*
- 2) *Touch response*
- 3) *Eyelid reflex*
- 4) *Pinna reflex*
- 5) *Sound response*
- 6) *Tail pinch response*
- 7) *Pupillary reflex*
- 8) *Righting reflex*

F: Nervous and muscle measurements

- 1) *Abdominal tone*
- 2) *Limb tone*
- 3) *Grip strength*
- 4) *Loss of traction*
- 5) *Landing foot splay*



Irwin study protocol

A



Group 1 - vehicle



Group 3 - mid dose

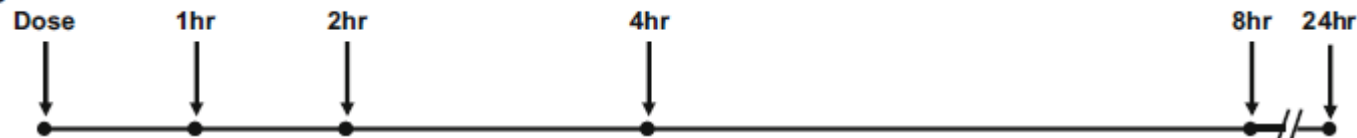


Group 2 - low dose



Group 4 - high dose

B



C

i. HOME CAGE OBSERVATIONS

Posture and unusual behaviors such as convulsion, shivering, vocalization, stimulation or stereotypy.

ii. HANDLING OBSERVATIONS

Ease of removal; handling reactivity, body tone, salivation, lacrimation or piloerection.

iii. OPEN FIELD ACTIVITY

Spontaneous motor activity, rearing, gait abnormalities, stereotypic behavior; irritability, piloerection, catalepsy, urination or defecation.

iv. AUTONOMIC ACTIVITY ASSESSMENT

Touch response, startle response, righting/palpebral/grasping reflexes, tail pinch, thermal nociception, ataxia, body temperature, pupil response.



进行中枢神经试验应注意的细节

- 试验顺序的选择
- 每只动物的操作时间
- 每组动物数量
- 剂量与效应的选择
- 观测时间点的选择
- 动物对环境的适应期
- 笼内环境的稳定



中枢神经试验指标的解读

- “金标” 敏感指标
- “铁标” 假阳性指标
- 指标的联合性
- 难以外推
- 指标的客观性
- 缺陷



中枢神经试验指标的统计分析

- Student's t-test (2 groups)
- ANOVA (SNK)
- the Kruskal–Wallis, Cochran–Mantel–Haenszel
- Bonferroni correction, Kruskal–Wallis, Wilcoxon pairwise tests,



功能观察试验与重复给药毒性 试验的结合

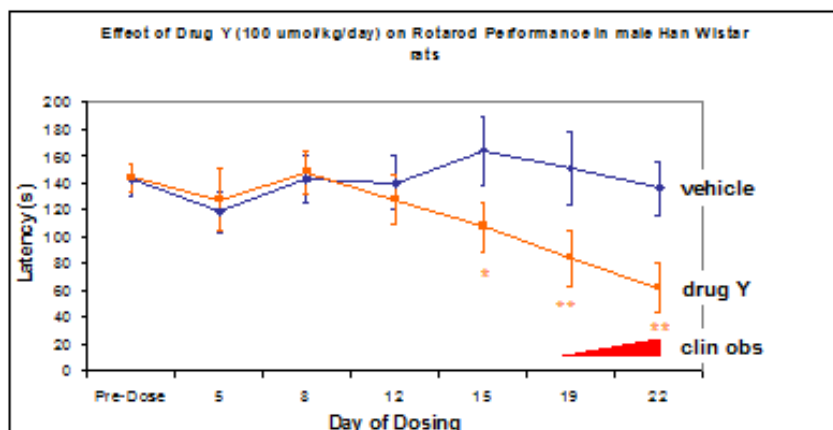
大鼠灌胃ZBH动物临床观察总结表

组别

主要临床症状

- 2 药后约5min给药动物活动轻微减少，至药后30min 基本恢复至对照组水平。药后D05症状消失。
- 3 药后约5-30min活动减少，个别动物出现流涎、侧卧、后肢强直。药后D05大部分动物好转，至药后D08症状基本消失。
- 4 药后约5-30min活动减少，部分动物出现共济失调、侧卧、后肢强直、角弓反张，后出现瞳孔放大症状。药后D05大部分动物好转，至药后D08仅个别动物出现侧卧、后肢强直等。
- 5 D01 -D02药后约5-10min皮肤潮红、竖毛，药后约40min出现活动减少、低肌张力步态、呼吸异常、共济失调、伏地，部分动物鼻腔周围有血性分泌物。D06开始，动物兴奋、攻击同笼动物、跳跃式走路，并逐渐出现抓挠现象。D9症状逐渐消失。

Accelerating rotarod in a repeat-dose toxicology study in rats: early detection of fibrodysplasia



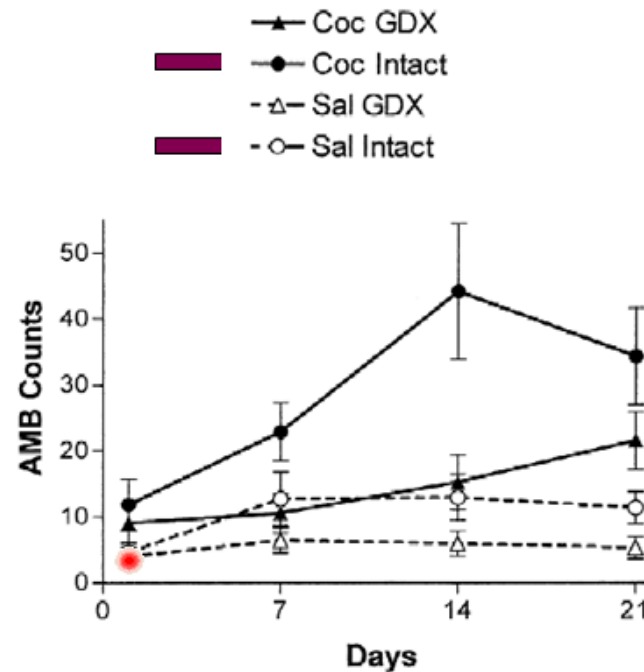
NB:

- No effects on rotarod performance were detected after a single dose;
- The deficit in rotarod performance **preceded** the appearance of adverse signs during standard clinical observations.

Redfern *et al.* (2013) *Toxicology Research* 2: 209-234.

Sensitisation to repeat-dosing

Cocaine

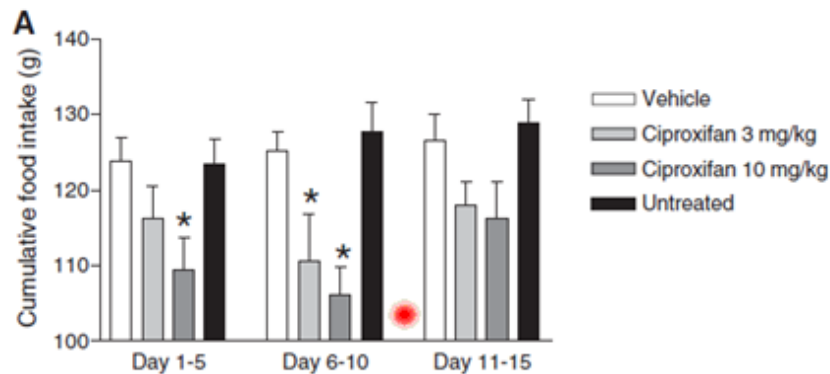


Total ambulatory counts after acute (day 1), sub-acute (day 7), chronic (day 14) and withdrawal cocaine (at 15 mg/kg) vs. saline administration to female Fischer rats (n=6 per group). GDX = gonadectomised

Chin *et al.*, (2002) Endogenous gonadal hormones modulate behavioral and neurochemical responses to acute and chronic cocaine administration *Brain Research* 945, 123-130.

Decreased effect

Tolerance to repeat-dosing



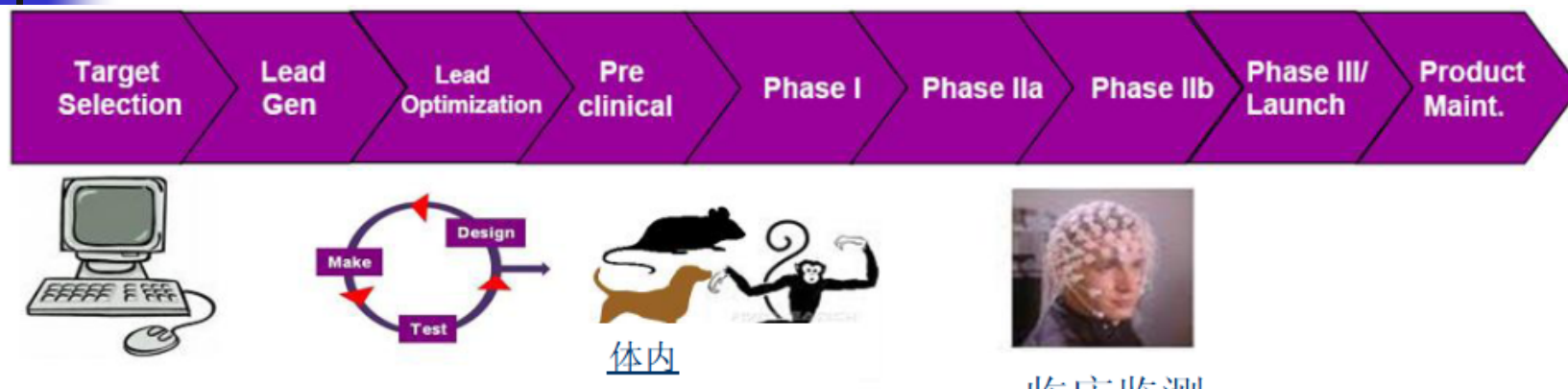
Ciproxifan effects on food intake and locomotor activity diminished with repeat-dosing.

Male Sprague-Dawley rats were dosed with ciproxifan via ip dosing. Ciproxifan is a potent histamine H₃ inverse agonist/antagonist, causes wakefulness and attentiveness in rats. Food consumption was measured every morning before treatment. Spontaneous locomotor activity was assessed 30 minutes after dosing.

FOB与重复给药毒性试验的结合的限制因素

- FOB试验需要多个观测时间点，尤其**24h**检测
- FOB试验采用双盲法进行
- 在毒性试验第一天难以实现（毒代采血）
- 毒性试验最后一天的剖杀
- 毒性试验的环境难以满足**FOB**需求
- 实验前的驯服需求
- 多个操作者之间的差异

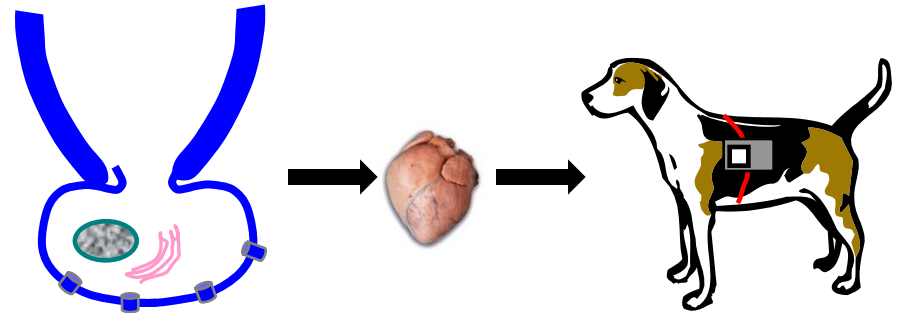
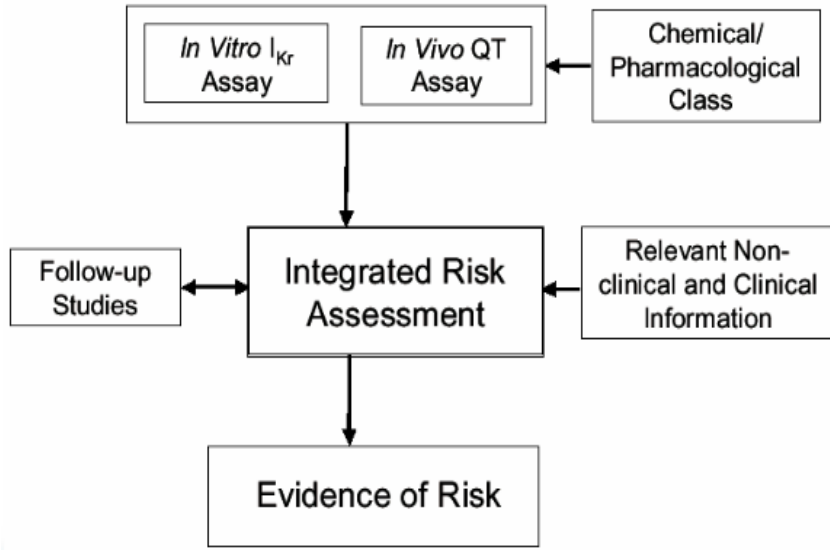
中枢神经系统评价的发展趋势



1. Zebrafish embryos, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)
2. in vitro 2-D and 3-D cellular
3. Safety pharmacology mechanisms: “organs-on-a-chip”.
4. Safety pharmacology in silico modeling

心血管系统评价策略

Non-clinical Testing Strategy



电压钳
电生理学

hERG
Nav1.5
Cav1.2
KvLQT1
Kir2.1
Kv4.3
Kv1.5

体外实验

Pukinje 纤维
细胞
乳突肌
收缩/舒张
离体工作心脏

体内实验

QT 间期
血液动力学

Test system	Number of cpds	Sensitivity %	Specificity %	Predictivity %
hERG	19	82	75	79
Dog QT interval	19	83	86	85
hERG + Dog QT	19	90	88	90

Wallis. BJP (2010);159, 115-121; Gintant . Pharmacology & Therapeutics (2011);129:109-119



植入式清醒动物遥测实验设计

■拉丁方设计

动物编号 给药次序	1	2	3	4	5	6	7	8
1	L	H	C	M	L	H	C	M
2	H	M	L	C	H	M	L	C
3	C	L	M	H	C	L	M	H
4	M	C	H	L	M	C	H	L

- 4 x 4 或双矩形 8 x 4: 4 或 8 只动物中随机分为 4 个处理组
- 一个动物一种处理: 剂量间化合物的洗脱是必要的
- 周期通常为 10 x 药代动力学的消除半衰期
- 剂量间实际趋于 3 到 7 天
- 消除半衰期太长需要 16 或 32 只动物

拉丁方实验设计

TABLE 6.3 A General Design Tier I (Core Battery) Cardiovascular Safety Study

In vivo cardiovascular safety study							
Sample design			Latin square sequencing				
Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Number of animals	Animal ID	Dose order			
1	0 (vehicle)	4	1	0	3	30	300
2	3	4	2	3	300	0	30
3	30	4	3	30	0	300	3
4	300	4	4	300	30	3	0

- Animals instrumented with telemetry device for CV monitoring
- Oral gavage dosing, Latin Square, 1-week recovery following each dose
- Monitoring of unrestrained animal, standard housing, controlled environment, from 2 hours pre-dose through 24 hours post-dose
 - Systolic, Diastolic and Mean Arterial Blood Pressures
 - Heart Rate
 - Quantitative Electrocardiography (RR, PR, QRS, QT, and QTc)
 - Body Temperature
 - ECG Morphology (Qualitative analysis designed intervals)
- Clinical Observations (baseline, selected intervals approximating critical times of exposure, recovery)
- Formulations Analyzed (uniformity, concentration, stability)
- Descriptive and inferential statistics (RANCOVA)
- PK Sampling: Separate group of animals, or independent study phase (PK/PD modeling)

安全药理学研究内容及意义

- 研究药物在治疗范围内或治疗范围以上的剂量时，潜在的不期望出现的对**生理功能**的不良影响。
- 确定药物可能关系到人安全性的非期望药理作用；评价药物在毒理学和/或临床研究所观察到的药物不良反应和/或病理生理作用；研究所观察到的和/或推测的药物**不良反应机制**。
- 为临床第一次用药提供参考数据。





谢 谢!

邮箱: **yanchanghui2002@163.com**

电话: **010-66930750**