

ПРИЛОЖЕНИЕ  
к Рекомендации Коллегии  
Евразийской экономической комиссии  
от 20 г. №

**РУКОВОДСТВО**  
**по доклиническому изучению токсичности**  
**при повторном (многократном) введении действующих веществ**  
**лекарственных препаратов для медицинского применения**

I. Общие положения

1. Основная цель исследований токсичности при повторном (многократном) введении состоит в описании токсикологического профиля исследуемого соединения после его повторного (многократного) введения. Это предусматривает определение потенциальных органов-мишеней токсичности и зависимости «экспозиция-ответ», а также может включать потенциальную обратимость токсических эффектов. Указанные сведения являются частью оценки безопасности, обосновывающей проведение клинических исследований с участием человека и включаемой в регистрационное досье лекарственного препарата в целях его регистрации и вывода в обращение.

2. Настоящее Руководство связано с Приложением № 1 к Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, утвержденным Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 и иными документами Евразийской экономической комиссии по

вопросам доклинического (неклинического) изучения лекарственных препаратов. Положения Руководства также распространяются на заявления о получении разрешения на проведение клинических исследований. В отношении содержания животных следует также учитывать положения законодательства государств – членов Евразийского экономического союза по защите животных.

3. Исследования токсичности при повторном (многократном) введении следует проводить в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств, утвержденными Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 (далее – Правила лабораторной практики).

4. В основе дизайна исследования, включая выбор испытуемых видов животных, дозы, путь и частоту введения, должны лежать доступные фармакодинамические, фармакокинетические и токсикологические сведения о лекарственном препарате, а также его предполагаемое клиническое применение. Исследователю следует обосновать выбранный дизайн исследования.

## II. Сфера применения

5. Настоящее Руководство детализирует проведение исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ, предназначенных для медицинского применения. В случае определенных видов действующих веществ, таких как биотехнологические соединения, вакцины и соединения с противоопухолевой активностью, следует применять указания главы 5.3 и 5.4 Правил проведения исследований биологических лекарственных

средств Евразийского экономического союза, утвержденных Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89. Положения настоящего Руководства также учитываются при исследовании токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ растительного происхождения и лекарственных растительных препаратов.

### III. Общие рекомендации по качеству вещества

#### 1. Качество вещества

6. Следует идентифицировать каждую серию действующего вещества, использованную в исследованиях токсичности при повторном (многократном) введении. Следует предоставить физико-химические характеристики и сертифицировать каждую серию действующего вещества, а также указать стабильность материала. Также должна быть известна стабильность действующего вещества для каждой дозировки исследуемой производственной рецептуры (производственного состава).

7. Действующее вещество, используемое в исследованиях токсичности при повторном (многократном) введении, должно иметь, по меньшей мере, схожий профиль или содержание примесей, что и лекарственный препарат, предназначенный для медицинского применения (или лекарственный препарат для клинических исследований). Если примеси лекарственного препарата, предназначенного для коммерческого производства, существенно отличаются от примесей исследуемых серий по качественным или количественным показателям, может потребоваться дальнейшая их

квалификация (в соответствии с правилами по изучению примесей в лекарственных средствах и установлению требований к ним в спецификациях, утверждаемыми Евразийской экономисткой комиссией Комиссией).

## 2. Вспомогательные вещества

8. Следует изучить токсичность и фармакокинетику вспомогательного вещества, впервые используемого в фармацевтических целях в составе изучаемой производственной рецептуры (производственного состава). Для этого следует провести такие же опорные исследования, что и в отношении нового действующего вещества.

9. В определенных случаях могут потребоваться исследования действующего вещества вместе со вспомогательным веществом (веществами), используемым в готовом лекарственном препарате.

## IV. Общие рекомендации по отбору в исследование и содержанию экспериментальных животных

### 1. Вид животных

10. Среди стандартных видов лабораторных животных, используемых в токсикологических испытаниях, выбор вида животных должен основываться на его схожести с человеком по фармакокинетическому профилю, включая биотрансформацию.

11. Следует обеспечить выбор вида животных у которых экспозиция основного метаболита (метаболитов) соответствует (аналогична) экспозиции у человека. Если это недостижимо в исследованиях токсичности с исходным соединением, необходимо

предусмотреть специальные исследования с метаболитом (метаболитами). Если вводимый лекарственный препарат является пролекарством, следует подтвердить его преобразование в действующее вещество у исследуемого вида животных. Во всех возможных случаях выбранный вид животных должен отвечать на первичное фармакодинамическое действие вещества.

12. В определенных случаях, например, если фармакодинамическое действие само по себе приводит к развитию токсических эффектов, может потребоваться проведение исследования на моделях заболевания.

## 2. Пол животных

13. При проведении исследований токсичности при повторном (многократном) введении, следует как правило, использовать одинаковое количество самцов и самок.

## 3. Размер сравниваемых групп

14. Размер экспериментальной группы должен быть достаточным, чтобы провести полноценную научную интерпретацию полученных данных. Вместе с тем, важны этические и практические аспекты.

15. При определении размера группы животных учитывается:  
диапазоны значений изучаемых показателей у используемых видов и линий животных;

достаточность размера экспериментальных групп в случае умерщвления животных на промежуточных этапах, чтобы позволить выполнить набор данных у умерщвляемых животных на

промежуточных этапах без негативного влияния на заключительный статистический анализ;

достаточность размера экспериментальных групп в случае если предусмотрен восстановительный период, чтобы на момент завершения периода введения сохранить часть животных для оценки обратимости токсических изменений по завершении вмешательства.

#### 4. Число видов животных

16. Исследования токсичности при повторном (многократном) введении проводят на двух видах млекопитающих, один из которых должен быть негрызуном. При четком обосновании допускается использовать один вид животных.

#### 5. Содержание животных

17. Содержание животных должно соответствовать требованиям Правил лабораторной практики, а также ветеринарно-санитарным требованиям. Необходимо контролировать условия окружающей среды. На протяжении всего периода исследования необходимо знать качество и состав пищи и воды. Записи об условиях содержания животных необходимо хранить вместе с первичными данными.

#### V. Общие рекомендации по дозам и введению

18. В целях достижения достаточной экспозиции вещества и его метаболитов у животных при выборе режима дозирования и пути введения исследуемого действующего вещества лекарственного препарата необходимо основываться на предлагаемом клиническом

применении этого лекарственного препарата. При планировании исследования необходимо учитывать все доступные сведения о фармакодинамике, фармакокинетике и токсичности исследуемого лекарственного препарата.

## 1. Продолжительность введения

19. Продолжительность исследований токсичности при повторном (многократном введении) зависит от продолжительности предлагаемого терапевтического назначения для человека, она должна соответствовать указаниям, приведенным в руководстве по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов, утверждаемом Евразийской экономической комиссией и руководстве по изучению токсикокинетики и оценка системной экспозиции в токсикологических исследованиях, принимаемом Евразийской экономической комиссией.

## 2. Пути введения

20. Как правило, действующее вещество лекарственного препарата необходимо изучать при том же пути введения, что и путь введения который предполагается при применении этого лекарственного препарата у человека. При наличии фармакологического, фармакокинетического, токсикокинетического и (или) токсикологического обоснования допускается использовать иные пути введения изучаемого действующего вещества лекарственного препарата.

21. Помимо системной токсичности, следует оценить эффекты возникающие в месте введения лекарственного препарата. Если

фактическое место введения лекарственного препарата у животного отличается от места его фактического введения человеку, то следует также оценить эффекты и в предлагаемом для клинического введения месте.

### 3. Частота введения

22. Частоту введения следует определять в индивидуальном порядке, принимая во внимание предлагаемый клинический режим дозирования и токсикологический (фармакокинетический, фармакодинамический) профиль исследуемого соединения. В некоторых случаях целесообразно более частое введение животным, чем предполагается при клиническом применении.

### 4. Дозы

23. Исследование токсичности при повторном (многократном) введении должно предусматривать:

соответствующую контрольную группу (группы). В определенных случаях может потребоваться группа положительного контроля (например, в токсикологических исследованиях с особыми биологическими конечными точками (например, генотоксичность), руководство по оценке и контролю ДНК-реактивных (мутагенных) примесей в лекарственных средствах и установлению границ потенциального канцерогенного риска));

введение низкой дозы, достаточной для проявления фармакодинамического или желаемого терапевтического эффекта, или приводящей к системной экспозиции, сопоставимой с ожидаемой при предлагаемом клиническом применении;

введение высокой дозы, выбранной таким образом, чтобы выявить токсичность для органов-мишеней или иную неспецифическую токсичность, либо введение высокой дозы ограниченной максимально возможным для данного пути введения объемом лекарственного препарата. Во всех случаях, за исключением случаев указанных в руководстве по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов, предельные дозы для исследований острой, субхронической и хронической токсичности, равные 1 000 мг/кг/сут. для грызунов и негрызунов, считаются приемлемыми;

введение промежуточной дозы, например, геометрической средней дозы между высокой и низкой дозами.

В идеале, системная экспозиция лекарственного препарата и (или) его основных метаболитов при высокой дозе должна многократно превышать ожидаемую клиническую системную экспозицию.

24. Введение исследуемого действующего вещества лекарственного препарата путем добавления его в корм или питьевую воду потребует регулярной коррекции его количества в корме и питьевой воде, чтобы компенсировать колебания, обусловленные ростом животных и изменением объема потребления корма.

25. Если во время исследования возникают непредвиденные токсические эффекты или эффекты отсутствуют, может потребоваться коррекция доз.

26. При ингаляционном введении лекарственного препарата следует определить вдыхаемую дозу.

27. В целях недопущения контаминации контрольной группы исследуемым соединением необходимо соблюдать особую осторожность (приложение № 2 к настоящему Руководству).

## VI. Наблюдения

### 1. Исходные и контрольные значения

28. В отношении грызунов и негрызунов необходимо располагать данными «исторического контроля» для изучаемых морфологических, биохимических и физиологических показателей. В случае негрызунов исходные значения необходимо получать от животных, используемых в исследовании.

### 2. Мониторинг во время исследования

29. В ходе проведения исследования необходимо контролировать потребление пищи, общее поведение животных, массу тела, гематологические параметры, клиническую биохимию, анализ мочи и офтальмологию.

30. У негрызунов следует проводить электрокардиографию. Для каждой из групп исследований, перечисленных в пункте 29 следует выбрать релевантные параметры, позволяющие установить профиль токсичности. Параметры определяются в соответствующих временных точках, с учетом фармакодинамических (фармакокинетических) профилей. Помимо заключительных наблюдений, указанные параметры следует отслеживать с частотой, позволяющей оценить изменения в динамике. Выбор методик исследований должен учитывать современное состояние экспериментальных методик, применяемых в медико-биологических науках. В случае использования видов животных с небольшим числом особей в группе (негрызуны), оценке следует подвергать всех животных при всех дозах. В случае использования грызунов специализированные оценки в рамках исследования допускается проводить на подгруппе животных каждой дозовой группы.

31. Оценку параметров, выполняемую во время исследования, следует также проводить в контрольных группах. Изучение (взятие) образцов следует проводить таким образом, чтобы не повлиять на исход и надежность исследования.

32. Следует избегать или облегчать боль и страдание у животных. Критерии принятия решения об умерщвлении животных, испытывающих сильную боль или страдание, и рекомендации о распознавании надвигающейся гибели рассматриваются в документе ОЭСР № 19 (ОЭСР, 2000).

33. Павших или умерщвленных во время проведения исследования животных следует подвергнуть аутопсии и, если выполнимо, микроскопической оценке.

### 3. Токсикокинетика

34. Сведения о системной экспозиции у животных во время исследований токсичности при повторном (многократном) введении незаменимы для интерпретации результатов исследований, планирования последующих исследований и оценки безопасности с участием человека. Подробные рекомендации приведены в руководстве по токсикокинетике и оценке системной экспозиции в токсикологических исследованиях. Следует предусмотреть проведение анализа образцов крови контрольных групп, чтобы убедиться, что не произошла экспозиция вследствие контаминации исследуемым соединением (приложение № 2 к настоящему Руководству).

#### 4. Посмертный мониторинг

35. Посмертное изучение должно быть как можно более полным. Всех животных следует подвергнуть вскрытию. В случае видов животных с использованием небольшого числа особей в группе (негрызуны) необходимо провести гистопатологическое изучение органов и тканей, перечисленных в приложении № 1 к настоящему Руководству, от всех животных из всех дозовых групп. В случае грызунов гистопатологическому изучению следует подвергнуть все органы и ткани, перечисленные в приложении № 1 к настоящему Руководству, из группы высокой дозы и контрольной группы.

36. Изучение групп, получавших меньшие дозы, допускается ограничить органами и тканями, в которых обнаружены макрпатологические изменения на вскрытии. Более того, если гистопатологические изменения обнаружены в группе высокой дозы, в целях установления зависимости «экспозиция-ответ» такие органы и (или) ткани необходимо изучить в группах, получавших меньшие дозы.

37. Необходимо гистопатологически изучить репродуктивные органы животных. В целях обнаружения влияния на сперматогенез информативной является гистологическая оценка яичка и придатков яичка.

38. В зависимости от исследуемого лекарственного препарата может потребоваться более глубокое гистопатологическое изучение материала, полученного от животных. Необходимо приготовить мазок костного мозга, полученного от всех животных, однако его изучение следует осуществлять только при подозрении на изменения в тканях (органах) или периферической крови, обусловленные вмешательством. Полученные мазки подвергают микроскопии и оценивают на клеточный

состав, распределение и морфологию клеток, а также оценивают миелоидно-эритроидное отношение в клетках мазков.

39. В отношении действующих веществ, влияющих на центральную нервную систему, систематизированное гистопатологическое изучение (в дополнение к структурам, перечисленным в приложении № 1 к настоящему Руководству) необходимо проводить в отношении клеток-мишеней или участков центральной нервной системы, напрямую затрагиваемых во время эксперимента если это можно предположить исходя из изучения профиля связывания действующего вещества с рецепторами или других обусловленных действующим веществом фармакодинамических эффектов. Если получены данные, предполагающие специфическую нейротоксичность, следует провести дальнейшее изучение, чтобы определить и оценить вред и его функциональные последствия.

40. В исследованиях, проводимых при ингаляционном пути введения, у всех животных необходимо взвесить легкие и провести гистопатологическое изучение тканей, отобранных при всех уровнях экспозиции для респираторного тракта, и из ассоциированной лимфоидной ткани.

41. Если от соединения ожидаются иммунологические эффекты или есть признаки иммунологической активации или депрессии во время исследования токсичности при многократном введении, необходимо изучить иммунотоксичность соединения.

42. Все ткани от всех животных, включенных в исследование, необходимо законсервировать и приготовить парафиновые образцы сообразно обстоятельствам. Этот материал необходимо архивировать и документировать место архивирования.

## VII. Анализы данных, представление результатов и выводы

43. Отчет об исследовании должен в достаточной степени и надежно отражать все первичные данные и сведения, полученные во время исследования. Результаты исследования необходимо анализировать с помощью современных методов, включая релевантные статистические методы анализа. Результаты необходимо представить в удобной для понимания и анализа форме. Групповые итоговые значения следует представить в форме, отражающей распределение переменной.

44. В отчет об исследовании необходимо включить приложение с указанием индивидуальных значений всех зарегистрированных параметров. На основании результатов исследования необходимо сделать общее заключение в отчете. Интерпретация результатов и составленных заключений должна учитывать результаты статистического анализа данных, но исходить в первую очередь из биологической значимости и правдоподобности полученных результатов.

---

Приложение № 1  
к Руководству по доклиническому  
изучению токсичности  
при повторном (многократном)  
введении действующих веществ  
лекарственных препаратов для  
медицинского применения

**ПЕРЕЧЕНЬ**  
**тканей, подлежащих гистопатологическому изучению**  
**в исследовании токсичности при повторном (многократном)**  
**введении**

Настоящий перечень тканей представляет собой стандартный минимальный перечень, который можно использовать во всех видах исследований токсичности при повторном (многократном) введении и канцерогенности, независимо от пути введения, вида и линии лабораторных животных относящихся к млекопитающим, продолжительности исследования или класса исследуемого действующего вещества лекарственного препарата и включает в себя:

- аорту;
- вилочковую железу;
- влагалище;
- гардерову железу;
- гипофиз;
- глаз;
- головной мозг;
- двенадцатиперстную кишку;

желудок;  
желчный пузырь;  
кожу;  
кость с костным мозгом (для негрызунов – либо ребро, либо  
грудина; для грызунов – бедренная кость с суставным хрящом);  
легкие;  
лимфатический узел (узлы):  
матку;  
молочные железы (только у самок);  
мочевой пузырь;  
надпочечники;  
паращитовидную железу;  
периферические нервы;  
печень;  
пищевод;  
подвздошную кишку;  
поджелудочную железу;  
почки;  
придаток яичка;  
простату;  
семенной пузырек;  
сердце;  
селезенку;  
скелетные мышцы;  
слепую кишку;  
слюнные железы;  
спинной мозг;  
толстый кишечник;

тощую кишку;  
трахею;  
щитовидную железу;  
яички;  
яичники;  
подлежащие ткани в месте введения;  
прочие органы и ткани имеющие макроскопические признаки поражения (патологии);

При планировании исследования рекомендуется учитывать путь введения и включать в указанный стандартный перечень ткани, значимые для такого пути введения. Например, при проведении ингаляционных исследований в перечень тканей следует включить носовую полость и носовые раковины, гортань и трахеобронхиальные лимфатические узлы. Аналогично, в зависимости от вида или линии животных, можно добавить органы и ткани, уникальные или характерные для данного вида или линии животных согласно обстоятельствам. В указанный основной перечень тканей также рекомендуется включать дополнительные ткани, являющиеся мишенями для испытуемого объекта или его класса.

---

## Приложение №2

к Руководству по доклиническому  
изучению токсичности  
при повторном (многократном)  
введении действующих веществ  
лекарственных препаратов для  
медицинского применения

### **УКАЗАНИЯ**

по оценке контаминации контрольной группы животных  
исследуемым действующим веществом

#### I. Общие положения

1. В ходе исследований токсичности при повторном (многократном) введении возможна контаминация (загрязнение) образцов от контрольных животных испытуемым веществом или антителами к испытуемому веществу, которое связано как с контаминацией самих контрольных животных, так и с контаминацией образцов полученных от этих контрольных животных.

2. Контаминация контрольных образцов может быть обусловлена множеством причин, при этом в большинстве случаев источник контаминации сложно установить. В некоторых исследованиях (например, канцерогенности и репродуктивной токсичности) степень контаминации контрольных образцов способна повлиять на релевантность выводов исследования и привести к их аннулированию или необходимости формулировки отрицательного заключения о возможности регистрации лекарственного препарата.

3. Во время токсикологических исследований, независимо от используемого пути введения, величин доз и продолжительности вмешательства, риск контаминации контрольной группы различным

количеством изучаемого действующего вещества достаточно высок. Это связано с тем, что в соответствии с указаниями руководства по изучению токсикокинетики и оценки системного воздействия в токсикологических исследованиях, принимаемом Евразийской экономической комиссией не требуется подвергать анализу образцы, получаемые от контрольных групп. Допускается получить такие образцы, а затем проанализировать их только в случае, если предполагается, что это поможет интерпретации результатов или валидации аналитических методов.

4. Значительная контаминация контрольной группы животных может приводить к аннулированию результатов исследований вследствие их общего низкого качества или недостаточности полученных токсикокинетических данных, не позволяющих провести полноценную интерпретацию безопасности и оценку риска для человека в доклинических исследованиях.

## II. Сфера применения

5. Настоящее приложение содержит указания по количественному определению содержания испытуемого вещества в образцах от контрольных животных из доклинических исследований безопасности, о репортировании данных и оценке влияния какой-либо существенной контаминации на валидность исследований.

6. Настоящее приложение позволяет подтвердить общее качество и валидность доклинических исследований безопасности путем подтверждения, что контрольные животные или образцы не были контаминированы испытуемым объектом, чтобы избежать значительных затруднений при оценке исследований.

### III. Подходы к оценке контаминации контрольной группы животных

#### 1. Необходимость отбора образцов и их анализа в контрольной группе

7. Процедуру отбора образцов в контрольных группах животных и аналитические методики их изучения необходимо включить в программу токсикокинетической оценки, проводимую в процессе доклинических исследований безопасности. Анализ образцов контролей может потребоваться одновременно с таковыми у дозированных животных.

#### 2. Виды исследований

8. Сбор и анализ контрольных образцов необходимо осуществлять во всех опорных исследованиях, предусматривающих проведение токсикокинетической оценки.

9. В исследованиях на негрызунах контрольные образцы следует собирать и анализировать тем же образом, что и активные образцы. В исследованиях на грызунах контрольные образцы следует собирать и анализировать, по меньшей мере, приблизительно в районе  $t_{\max}$  испытуемого вещества.

#### 3. Путь введения

10. Поскольку контаминация контрольных образцов отмечалась в исследованиях с использованием всех путей введения, взятие и анализ контрольных образцов необходимо осуществлять независимо от пути введения.

#### 4. Последствия контаминации контрольных образцов и принимаемые меры

11. Следовые количества контаминирующего вещества ниже предела количественного определения аналитической методики могут считаться незначимыми.

12. Контаминация контрольных образцов *in vivo* может нанести ущерб валидности и (или) достоверности исследования. Контаминация контрольных образцов *ex vivo* может нанести ущерб валидности и (или) достоверности соответствующей токсикокинетической оценки.

13. Решение об аннулировании исследования или соответствующей ему токсикокинетической оценки зависит от нескольких аспектов, подлежащих тщательному анализу, включая степень контаминации и ее влияние на валидность статистического анализа, определение границ безопасности и достоверность экспозиций, установленных у животных, подвергнутых воздействию.

14. Если отмечается существенная контаминация контрольных образцов испытуемым соединением в степени, способной повлиять на валидность исследования, необходимо расследовать и установить источники контаминации. Заявитель обязан прилагать соответствующие усилия по выяснению, произошла ли контаминация *in vivo* или *ex vivo*. Подходы могут включать в себя идентификацию испытуемого вещества в контрольных тканях, идентификацию плазменных метаболитов у контролей и обнаружение антител к испытуемому веществу в случае биотехнологического препарата (но не ограничиваться ими). Необходимо принимать соответствующие корректирующие меры.

15. Если произошла существенная контаминация контрольных образцов испытуемым соединением в исследованиях доклинической

безопасности, об этом необходимо сообщить соответствующим образом. В любом случае частоту, характер и величину контаминации контролей необходимо четко отразить в отчетах об исследованиях и рассмотреть с точки зрения ее влияния на валидность исследования. Независимо от факта обнаружения существенной контаминации контролей, данные от контролей необходимо включать в токсикокинетические данные отчетов об исследовании. Более того, обнаруженные факты необходимо также отметить в письменных резюме и осветить в доклиническом обзоре, в который следует включить обсуждение их релевантности и влияния на валидность исследования, на интерпретацию результатов и на оценку рисков для человека.

---