

细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究 技术指导原则

二〇〇六年十一月

目 录

一、概述.....	2
二、有效性研究.....	3
（一）体外试验.....	3
（二）体内试验.....	4
（三）药代动力学	7
三、安全性研究.....	7
（一）急性毒性试验	8
（二）长期毒性试验	8
（三）一般药理学试验	10
（四）局部刺激性试验	10
（五）遗传毒性、生殖毒性和致癌性试验	10
（六）毒代动力学	10
四、非临床研究结果向临床试验的过渡	11
（一）关于临床试验起始剂量	11
（二）关于临床适应症	11
五、结语.....	12
六、注释.....	12
七、参考文献.....	13

八、著者.....	14
-----------	----

一、概述

细胞毒类抗肿瘤药物是指能够直接杀伤肿瘤细胞或抑制肿瘤细胞生长、增殖的一类化疗药物，作用机制包括抑制肿瘤细胞核酸或蛋白质的合成、干扰大分子物质代谢、干扰微管系统、抑制拓扑异构酶等。

细胞毒类抗肿瘤药物是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一。此类药物在杀灭或抑制肿瘤细胞的同时，也会对机体的正常细胞（尤其是代谢旺盛的细胞）产生影响，通常在药效剂量下就会导致病人出现不良反应。此类药物的上述特点决定了其非临床研究与其他药物相比，具有一定的特殊性。

本指导原则仅代表目前对细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究的一般性认识，旨在为细胞毒类抗肿瘤药物的非临床研究提供技术指导和参考。由于指导原则不可能涵盖细胞毒类抗肿瘤药物开发中的所有情况，所以具体药物的非临床研究应在本指导原则的基础上，根据药物的自身特点制订研究方案。

本指导原则主要适用于创新性细胞毒类抗肿瘤化学药物（见注释1），内容重点阐述细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究的特殊性，凡与既往颁布指导原则内容重复的部分，文中不再赘述，请参照有关指导原则执行。

二、有效性研究

细胞毒类抗肿瘤药物有效性研究的目的是探索受试物的作用机制、作用强度以及对不同类型肿瘤的敏感性等，为安全性评价以及临床试验中给药方案、瘤种的选择等提供参考信息。

由于研究方法的局限性，目前细胞毒类抗肿瘤药物有效性研究的结果并不能准确地预测受试物的临床疗效。注册申请人应充分意识到细胞毒类抗肿瘤药物有效性研究的不确定性，及其为药物研发带来的风险。在有效性试验中应重视探索药物的作用机制，使模型尽可能模拟临床肿瘤病人的实际情况，以降低开发风险。

（一）体外试验

体外试验主要用于筛选候选化合物，初步了解受试物的作用机制、敏感肿瘤类型和作用强度，为随后进行的体内试验提供参考。

作用机制研究（如药物作用靶点、细胞周期特异性等）对于预测受试物的有效性和安全性，完善非临床和临床试验的设计具有重要意义，此部分研究应伴随开发进程不断深入。对于创新性药物，必要的作用机制研究资料应在申请临床试验时提交。

在体外培养的不同人肿瘤细胞系中加入不同浓度的受试物，采用磺酰罗丹明染色法（SRB法）、四氮唑盐还原法（MTT法）、集落形成法、台盼兰染色法等方法进行检测，计算受试物的半数抑制浓度（ IC_{50} ），并与阳性对照药进行比较，以初步预测受试物的作用强度和对不同类型肿瘤细胞的敏感性。应根据受试物的结构特点、理化性质

和作用机制确定体外试验采用的研究方法。例如，以线粒体为作用靶点的受试物不宜采用四氮唑盐还原法。

在选择肿瘤细胞系时应考虑到细胞的生长和增殖速率。除非有充分证据证明受试物仅作用于特定的人体细胞靶点，一般应至少选用 12 种人癌细胞系进行试验。试验还应考察受试物对耐药肿瘤细胞系和正常人源细胞的作用和影响。受试物与细胞共培养的时间一般为 48~72 小时，贴壁细胞需先贴壁 24 小时后再给药。试验应设阳性和阴性对照组，阳性对照为化学结构类似，具有相同或类似作用机制的抗肿瘤药物，阴性对照为溶媒对照。试验至少应重复一次。

（二）体内试验

体内试验用于进一步考察受试物对特定类型肿瘤细胞的杀伤或抑制作用，探索受试物产生药效作用的给药剂量、途径、频率和周期等。

体内试验通常采用动物肿瘤移植模型和人癌异体移植模型。由于动物肿瘤移植模型与临床疗效之间的相关性不强，仅可用于候选化合物的初步筛选。通常情况下，以人癌异体移植模型试验结果来评价细胞毒类抗肿瘤药物的有效性。

1、模型建立

人癌异体移植模型试验通常在无胸腺鼠或联合免疫缺陷小鼠体内移植人癌细胞系，观察受试物对肿瘤生长的抑制作用。移植肿瘤的选择主要参考体外试验结果、细胞系的生物学特点等因素。原则上，

应尽量选用多种人癌异体移植瘤模型；移植的人癌细胞系在组织学、基因表达特点、耐药性等方面应与人体肿瘤尽量接近。

细胞毒类抗肿瘤药物临床前体内试验一般至少应选用 3~4 种人癌异体移植瘤模型，试验至少应重复一次。人癌细胞系移植成瘤后，应传 2~3 代后再用于体内抗肿瘤试验。为了保持移植瘤的生物学特性和遗传特性，移植瘤体内传代应少于 15~20 代。

2、试验设计

肿瘤移植部位主要在皮下，也包括原位和腹腔等。通常待移植肿瘤生长至少达 100mm³后，再将动物随机分组给药。一般包括高、中、低 3 个剂量的给药组、阳性对照组和阴性对照组。每组至少 6 只动物。给药组受试物剂量的选择应体现出量效关系，高剂量不宜超过受试物的最大耐受量（见注释 2）。应根据受试物的药动学特点和毒性反应等确定给药频率和周期；给药途径尽量与推荐临床用药的途径相同。阳性对照药一般需满足以下条件：（1）与受试物结构类似，作用机制相同或相近；（2）对移植肿瘤敏感；（3）临床广泛应用且疗效确切。阳性对照药的给药方案应体现出最佳治疗作用，其剂量一般不宜超过最大耐受量。阴性对照组给予相应的溶剂或辅料。

3、检测指标

推荐使用测量瘤径的方法，动态观察受试物的抗肿瘤效应。肿瘤直径的测量次数根据移植瘤的生长情况而定，一般为每周 2~3 次。在试验中还应观测与药物安全性有关的指标，如动物体重增长和死亡率，将治疗组的数据与阳性对照组进行比较，对于判断受试物的安全

性和开发前景具有重要意义。试验中应记录检测指标的变化与给药时间的关系，以便了解受试物的作用特点，减少单次记录试验结果可能引起的误差。体内抗肿瘤试验结果中应尽可能附有相应的照片。

免疫缺陷小鼠皮下移植的肿瘤很少发生转移，多数死于原发肿瘤。而临床肿瘤病人大多死于肿瘤转移，动物和临床肿瘤病人的死亡原因不同。因此，对于人癌异体移植试验，生命延长率并不是理想的观测指标。

4、评价标准

对于体内试验结果的评价应综合考虑受试物的作用机制、模型的临床相关性、每一种模型的具体试验结果以及受试物与阳性对照药试验结果的比较。

针对人癌异体移植瘤模型，推荐采用相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)$ （见注释 3）作为试验评价指标。原则上，评价标准为： $T/C(\%) > 40\%$ 为无效； $T/C(\%) \leq 40\%$ ，并经统计学处理 $P < 0.05$ 为有效。在体内有效性试验采用的全部人癌异体移植瘤模型中，一般至少应有 3 种达到有效标准，才提示受试物有必要进入临床试验。

在评价时还应特别关注受试物与阳性对照药试验结果的比较。在毒性相当（在有效性研究中主要表现为动物死亡率和体重下降相当）的情况下，对治疗组和阳性对照组肿瘤增殖率的比较也是评价受试物是否有必要进入临床试验的重要指标之一。

（三）药代动力学

有效剂量下的药代动力学行为是阐明药物有效性的基础之一。测定受试物发挥药效时的暴露量（见注释 4），与毒代动力学数据比较，有助于判断受试物的安全范围；与人体药动学参数进行比较，有助于在临床试验早期预测受试物的有效性和进一步调整临床试验的给药方案，因此应在临床前测定受试物发挥药效时原型或活性代谢产物的暴露量。应着重关注受试物在毒性靶器官和肿瘤组织中的分布。

对于细胞毒类抗肿瘤药物的特殊给药体系（如脂质体、乳剂等），其药动学研究的重点在于与普通制剂或已上市特殊给药体系的比较，包括药动学参数和药物组织分布的比较。如果受试物设计为肿瘤靶向制剂，应测定模型动物肿瘤组织中的药物浓度，以初步提示是否达到肿瘤靶向的设计目的。应关注药动学行为差异可能导致的毒性反应的不同，并进行必要的安全性研究。

三、安全性研究

细胞毒类抗肿瘤药物的毒性易发生于代谢旺盛的组织，通常毒性作用大，安全范围小，具有蓄积性和延迟性，因此与其他化学药物相比，其安全性研究具有一定的灵活性和特殊性。

细胞毒类抗肿瘤药物非临床安全性研究的目的主要包括：（1）估算 I 期临床试验的起始剂量；（2）预测受试物的毒性靶器官或靶组织；（3）预测受试物毒性反应的性质、程度和可逆性；（4）为临床试验

方案的制订提供参考。

本指导原则中非临床安全性研究的各项要求的提出，很大程度上是基于目前肿瘤病人缺少有效临床治疗手段，预期生存期较短。但事实上，不同类型肿瘤的临床治疗现状并不完全一致。因此在对具体的药物进行安全性研究时，应考虑到临床拟定适应症和用药人群的特点，不能简单套用。

（一）急性毒性试验

细胞毒类抗肿瘤药物急性毒性试验的主要目的是考察受试物的毒性作用，了解其毒性靶器官，并测定其最大耐受量。试验应分别采用啮齿类和非啮齿类动物进行，给药途径尽可能与临床拟用的给药途径相同，恢复期至少为14天。经结构改造获得的化合物或特殊给药体系应进行与母体化合物或原剂型对比的急性毒性试验。

建议在急性毒性试验中进行毒代动力学研究。

（二）长期毒性试验

细胞毒类抗肿瘤药物长期毒性试验的主要目的在于估算Ⅰ期临床试验的起始剂量，预测受试物的毒性靶器官、毒性的性质、程度、剂量反应关系和可逆性。与其他药物比较，细胞毒类抗肿瘤药物的长期毒性试验更关注受试物的最大耐受量。

细胞毒类抗肿瘤药物长期毒性试验的设计应充分考虑到受试物自身的特点。应根据受试物不同的生物学特点选择合适的试验动物，

试验一般分别采用啮齿类和非啮齿类动物进行。试验一般至少设立高、中、低三个剂量给药组和一个溶媒（或辅料）对照组。经结构改造获得的化合物或特殊给药体系应考虑增加母体化合物或原剂型对照组。试验给药剂量应统一按体表面积表示。高剂量应充分暴露受试物的毒性反应，并尽量寻找到受试物的最大耐受量；低剂量应可引起动物出现较轻的毒性反应。给药途径和给药方式（例如静脉滴注和静脉注射等）应尽量与临床拟定的用法一致。由于细胞毒类抗肿瘤药物可能具有蓄积或延迟毒性，长期毒性试验的恢复期一般不应短于 28 天。

在细胞毒类抗肿瘤药物的开发过程中，推荐选择用不同给药期限的长期毒性试验来分别支持不同阶段的临床试验，以降低开发风险。也可以在临床前完成支持药物上市的长期毒性试验。

通常，注册申请人应在临床试验前完成啮齿类和非啮齿类动物连续给药至少 2 个给药循环或 4 周的重复给药试验。虽然申请人在临床 I/II 期试验中常常会探索不同的给药方案，但原则上，支持受试物进行 I/II 期临床试验的长期毒性试验的给药期限不应短于临床试验周期，给药间隔不能长于临床试验中的最短给药间隔。在 III 期临床试验前，申请人应完成给药期限通常为 6~8 个给药循环或 6 个月的重复给药毒性试验，试验的给药频率应尽量与拟定的 III 期临床试验用药频率相同。

除常规观测指标外，长期毒性试验应根据受试物特点、文献报道和同类药物已知的临床不良反应（如骨髓毒性、神经毒性、胃肠道毒

性、心脏毒性等)，设计具有针对性的观测指标或进行进一步的研究。

（三）一般药理学试验

一般药理学试验主要是研究受试物在治疗范围内或治疗范围以上剂量时，对生理功能的潜在不良影响。细胞毒类抗肿瘤药物需在临床试验前完成一般药理学试验。

（四）局部刺激性试验

细胞毒类抗肿瘤药物可能直接对用药局部产生毒性作用，应在I期临床试验前完成临床拟用途径的局部刺激性试验。此项试验可单独进行，也可结合长期毒性试验进行。

（五）遗传毒性、生殖毒性和致癌性试验

由于细胞毒类抗肿瘤药物通常首先在没有其他治疗手段的受试者中进行临床试验，因此遗传毒性试验并不一定在临床前完成。

细胞毒类抗肿瘤药物的作用机制决定了其很可能具有生殖毒性，鉴于其主要用于晚期肿瘤病人，因此可不进行生殖毒性试验。

由于临床用药人群的预期生存期较短，细胞毒类抗肿瘤药物通常也不需要致瘤性试验。

（六）毒代动力学

毒代动力学结果既可以描述实验动物的暴露量与给药剂量、暴露时间和毒理学结果之间的关系，也可用于估算受试物的安全范围，为

I期临床耐受性试验设计提供参考。细胞毒类抗肿瘤药物应在长期毒性试验中进行毒代动力学研究。

四、非临床研究向临床试验的过渡

药物非临床研究的最终目的是预测受试物的临床有效性和安全性，判断其能否进入临床试验，并为临床试验的设计和临床合理用药提供参考。细胞毒类抗肿瘤药物应尤其关注以下两点：

（一）关于临床试验起始剂量

如前所述，细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究的目的是估算安全的 I 期临床试验起始剂量。长期毒性试验中测得的受试物的最大耐受量（按体表面积计算）是估算 I 期临床试验起始剂量的重要因素之一。通常 I 期临床试验起始剂量不应高于啮齿类动物最大耐受量的 1/10 和非啮齿类动物最大耐受量的 1/6。在估算 I 期临床试验起始剂量时，还应同时考虑到动物和人体之间生理、生化以及药代动力学等方面的差异。

（二）关于临床试验瘤种

细胞毒类抗肿瘤药物需要通过 II 期临床试验中的瘤种筛选，最终确定拟开发的临床适应症。非临床有效性研究结果是 II 期临床试验筛选瘤种的依据之一。

药物研发目的不同（如针对某一适应症筛选化合物、针对某一化

合物筛选适应症、已上市药物结构修饰等)会影响非临床研究方案的设计。不同的研究方案可能会为 II 期临床试验瘤种的筛选提供不同的支持信息。需在对 I 期临床试验研究结果、受试物的作用机制、同类药物的临床适应症、非临床有效性研究结果等进行综合评价的基础上,确定 II 期临床试验拟筛选的瘤种。

五、结语

细胞毒类抗肿瘤药物的特点决定了其非临床研究具有一定的特殊性和灵活性。在此类药物非临床研究的过程中,注册申请人应充分意识到药物的开发风险(尤其是有效性风险)。并在充分认识药物适应症和自身特点的基础上,遵循“以科学为基础,具体问题具体分析”的原则,有序开展研发工作。

六、注释

1、创新性细胞毒类抗肿瘤药物:本文中创新性细胞毒类抗肿瘤药物不包括已在国外进入 III 期临床试验的药物。

2、最大耐受量(Maximal tolerance dose, MTD):不引起受试动物死亡的最高给药剂量。

3、相对肿瘤增殖率 T/C (%):针对每一种人癌异体移植瘤模型的抗肿瘤活性评价指标。计算公式如下: $T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} * 100\%$ 。
(T_{RTV} : 治疗组 RTV ; C_{RTV} : 阴性对照组 RTV)。

肿瘤体积(tumor volume,TV)的计算公式为: $V = 1/2 \times a \times b^2$ 。其中

a和b分别表示长和宽。根据测量的结果计算出相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV), 计算公式为: $RTV = V_t / V_0$ 。其中 V_0 为分笼给药时(即 d_0)测量所得肿瘤体积, V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。

4、药物暴露量: 通常用药代动力学参数进行描述, 反映动物局部或全身负载的受试物和/或其代谢产物。最常用的参数包括药时曲线下面积 (AUC) 和/或达峰浓度 (C_{max})。特殊情况下, 其他参数可能更适用。

七、参考文献

1. Beverly A. Teicher *etal.* Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval (Second Edition). Human Press, 2004.
2. Theodora Voskoglou-Nomikos, *etal.* Clinical Predictive Value of the *in Vitro* Cell Line, Human Xenograft, and Mouse Allograft Preclinical Cancer Models. Clinical Cancer Research (2003), 9, 4227–4239.
3. JI Johnson, *etal.* Relationships between drug activity in NCI preclinical *in vitro* and *in vivo* models and early clinical trials British Journal of Cancer, 2001, 84: 1424–1431.
4. L.R. Kelland. “Of mice and men”: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. European Journal of Cancer (2004), 40: 827–836.
5. Willem Den Otter, *etal.* Testing Therapeutic Potency of Anticancer

Drugs in Animal Studies: A Commentary. Regulatory Toxicology and Pharmacology(2002), 35, 266-272.

6. P. Colombo, *etal.* Toxicological testing of cytotoxic drugs. International Journal of Oncology(2001), 19: 1021-1028.
7. EMEA Note for Guidance on the Preclinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products. 1998
8. Joseph J. DeGeorge, *etal.* Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. Cancer Chemother Pharmacol(1998), 41: 173-185.
9. Japanese Administrative Notification. Q& A on the Toxicology Studies for Clinical Studies and NDA of Anti-Cancer Agents. 2004
10. 韩锐、孙燕. 新世纪癌的化学预防与药物治疗. 人民军医出版社, 2005.

八、著者

《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》课题研究组

