

指导原则编号

【	ZH	】	G	P	T	3	-	1
---	----	---	---	---	---	---	---	---

# 药物非临床依赖性研究 技术指导原则

二〇〇七年九月

# 目 录

一、概述 .....	1
二、基本原则 .....	2
(一) 实验管理 .....	2
(二) 具体问题具体分析 .....	2
(三) 整体性 .....	2
(四) 试验设计 .....	2
三、基本内容 .....	2
(一) 适用范围 .....	2
(二) 受试物 .....	3
1、中药、天然药物 .....	3
2、化学药物 .....	3
(三) 试验系统 .....	4
1、选择试验系统的依据 .....	4
2、实验动物 .....	4
3、离体试验系统 .....	4
(四) 给药剂量 .....	4
(五) 给药途径 .....	5
(六) 对照组 .....	5
(七) 试验要求 .....	5
1、神经药理学试验 .....	5
2、躯体依赖性试验 .....	6

3、精神依赖性试验 .....	7
4、体外依赖性试验 .....	8
(八) 依赖性研究项目的选择 .....	9
(九) 依赖性研究的阶段性 .....	9
(十) 结果分析与评价 .....	9
四、参考文献 .....	10
五、附录 .....	11
(一) 躯体依赖性试验 .....	11
1、小鼠跳跃试验 ( 催促戒断试验 ) .....	11
2、大鼠体重减轻试验 ( 自然或催促戒断试验 ) .....	11
3、大鼠替代试验 ( 替代试验、交叉躯体依赖性试验 ) .....	12
4、大鼠攻击试验 ( 自然或催促戒断试验 ) .....	13
5、戒断症状的记分评定 ( 自然或催促戒断试验 ) .....	14
(二) 精神依赖性试验 .....	14
1、自身给药试验 .....	14
2、大鼠药物辨别试验 .....	16
3、条件位置偏爱试验 .....	16

# 药物非临床依赖性研究技术指导原则

## 一、概述

药物依赖性是指药物长期与机体相互作用，使机体在生理机能、生化过程和/或形态学发生特异性、代偿性和适应性改变的特性，停止用药可导致机体的不适和/或心理上的渴求。依赖性可分为躯体依赖性和精神依赖性。躯体依赖性主要是机体对长期使用依赖性药物所产生的一种适应状态，包括耐受性和停药后的戒断症状。精神依赖性是指药物对中枢神经系统作用所产生的一种特殊的精神效应，表现为对药物的强烈渴求和强迫性觅药行为。依赖性倾向可以在动物或人体的药物研究过程中反映出来。

躯体依赖与精神依赖可能同时存在，也可能有分离，如兴奋剂通常表现为精神依赖，躯体戒断症状并不明显。

耐受性和敏感性（敏化）是中枢神经系统适应性改变的两种不同表现形式。耐受性是指反复使用某种药物以后，机体对药物的敏感性降低，需增大剂量才能产生原有的效应。与耐受性相反，敏化是指在反复使用药物以后，机体对药物的敏感性提高，药物的效应增强。成瘾药物敏化现象表现为行为反应和自主性觅药动机增强。

目前已知可产生依赖性的化合物主要有阿片类、可卡因、苯丙胺类、大麻类、苯二氮卓类和巴比妥类及某些甾体激素类等。

本指导原则的目的，是为在药物研发过程中进行动物潜在依赖性研究时提供技术指导。非临床药物依赖性研究可为临床提供药物依赖性倾向的信息，获得的非临床试验数据有利于指导临床研究和合理用

药，警示滥用倾向。

本技术指导原则适用于中药、天然药物和化学药等新药的依赖性研究。

## 二、基本原则

### （一）实验管理

依赖性研究是药物非临床安全性研究的一部分，根据《中华人民共和国药品管理法》，必须执行“药物非临床研究质量管理规范”。

### （二）具体问题具体分析

中药、天然药物和化学药等的情况复杂，本文所提及的内容不可能涵盖所有中药、天然药物和化学药依赖性试验的全部内容，依赖性研究应遵循“具体问题具体分析”的原则。

### （三）整体性

药物的研发是一个连续的、渐进的系统工程，依赖性试验是药物开发的一个有机组成部分。依赖性研究应结合该受试物的药理学、药动学、药效学、一般药理学及毒理学试验结果综合分析评价。

### （四）试验设计

试验设计应符合随机、对照、盲法和可重复性的原则。

## 三、基本内容

### （一）适用范围

- 1、与已知具有潜在依赖性化合物结构相似的新的化合物；
- 2、作用于中枢神经系统，产生明显的镇痛、镇静、催眠及兴奋作用的药物；

- 3、复方中含有已知较强依赖性成分的药物；
- 4、直接或间接作用于中枢阿片受体、大麻受体、多巴胺受体、去甲肾上腺素受体、5-羟色胺受体、N-胆碱受体、 $\gamma$ -氨基丁酸受体、苯二氮卓受体等受体的药物；
- 5、已知代谢物中有依赖性成份；
- 6、拟用于戒毒的药物；
- 7、原认为不具依赖性，而在临床研究或临床应用中发现有依赖性倾向的药物。

## （二）受试物

### 1、中药、天然药物

依赖性试验拟用受试物应能充分代表拟临床试验受试物或拟上市药品，因此该受试物应采用制备工艺稳定、符合临床试用质量标准规定的样品，并附有研制单位的自检报告。一般采用中试样品，并注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等。如不采用中试样品，应有充分的理由。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明批号、规格及生产厂家。

### 2、化学药物

依赖性试验的受试物应采用制备工艺稳定、符合临床试用质量标准规定的样品，并注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，并附有研制单位的自检报告。所用辅料、溶媒等应标明批号、规格和生产厂家，并符合试验要求。

### （三）试验系统

#### 1、选择试验系统的依据

为了获得科学有效的依赖性信息，应选择最适合的动物模型或其他试验系统。选择试验系统的因素包括试验系统的药效学反应，如敏感性、特异性和重现性；受试物的背景资料，如药效学、药代动力学等特点；试验动物的种属、品系、性别和年龄等。如果选择特殊的试验系统，应说明原因。

#### 2、实验动物

常用实验动物包括小鼠、大鼠、猴等，一般情况下选用雄性动物，必要时增加雌性动物。通常选用大、小鼠，对于高度怀疑具有致依赖性潜能的药物，而啮齿类动物试验结果为阴性，则应选择灵长类动物。动物应符合国家有关规定的等级要求。

#### 3、离体试验系统

离体试验系统可用于支持性研究（如研究药物的活性特点和作用机理）。常用离体试验系统主要包括：离体器官、组织、细胞、亚细胞器、受体、离子通道和酶等。

### （四）给药剂量

依赖性研究应在一个较宽的剂量范围内进行，可根据不同的试验方法和目的选择不同的给药剂量。一般采用主要药效  $ED_{50}$  的倍数递增或最小有效剂量的倍数递增，同时结合药物的溶解性、毒性及对运动功能、学习能力和记忆能力的影响来设计剂量。每个试验至少应设三个剂量组。

## （五）给药途径

原则上给药途径应和临床一致，尽可能增加静脉给药途径。由于模型的选择或者考虑到以后可能的非临床滥用的不同给药途径，也可考虑增加其他给药途径。

## （六）对照组

应设立阳性对照和溶媒对照组，如受试物需采用特殊的溶媒溶解，还应增设空白对照。如果受试物为较纯的单一化合物，与其母核结构类似的化合物具有明显的依赖性，则还应选择此化合物为阳性对照药。

## （七）试验要求

药物依赖性研究一般包括神经药理学试验、躯体依赖性试验和精神依赖性试验三部分内容。

### 1、神经药理学试验

如有早期的体外依赖性试验，所获阳性试验结果还应通过体内研究来进一步确认（除 1.1 的情况外）。可利用神经药理学方法，对行为学效应和神经递质进行测定，初步判断受试物有无依赖性倾向，这些内容可通过药效学试验、一般药理学试验或毒理学试验进行观察，具体方法不再列出。

1. 1 一般情况下，充分揭示药物的药理特性之后，还需要进行进一步潜在躯体依赖性和精神依赖性的研究。同时出现下述三种情况除外：

（1）在有效浓度范围内，药物与依赖性相关的分子靶点无相互

作用，或者虽然观察到药物与相关靶点的结合，但这种结合不会引起相应的功能变化。

(2) 体内研究结果未显示出潜在依赖性。

(3) 未发现此药物具有可能与依赖有关的新的作用机制。

1. 2 当潜在依赖性的类别和程度已经从体外试验中充分暴露出来(例如一个完全  $\mu$  受体激动剂)，就不需再进行进一步的研究。

1. 3 如果发现此药物有可能与依赖有关的新的作用机制，则需要作进一步的研究。

## 2、躯体依赖性试验

各种有依赖潜力的药物产生躯体依赖症状不同，没有理想的反映躯体依赖性的单一指标，所以需要多种指标来综合评价。生理指标可采用体重、体温、呼吸、摄食量等；在行为学试验中，可采用反映运动功能、学习能力、记忆能力和动机行为改变的指标。指标选择的标准为：适宜在给药前、给药期间和给药后进行动态观察，从而有利于描述机体产生的耐受及敏化的程度、特征及发展过程。

### 2. 1 方法

评价药物躯体依赖性的一般试验方法有三种：自然戒断试验、催促戒断试验、替代试验。无论是自然戒断还是催促戒断，动物都会出现一系列程度不同的表现，但不是所有戒断症状在一个受试动物身上都能出现。由于每种方法观察的指标都不相同，可结合药效学、一般药理学表现选择适当的方法。结合我国的具体情况，可以采用：

#### 小鼠自然戒断试验

小鼠催促戒断试验

大鼠自然戒断试验

大鼠催促戒断试验

大鼠替代试验

小鼠替代试验

猴自然戒断试验

猴催促戒断试验

也可采用其他的方法，但需加以说明。

## 2. 2 戒断反应观察主要注意事项

a. 给药剂量、频率和周期应该使动物产生神经适应性反应。

b. 戒断反应的观察应该有足够时间和频度，并且注意给药前后的自身比较。

c. 自然戒断和催促戒断两种方式都需进行，但可在不同动物模型上进行。

d. 尽可能采用仪器检测的客观指标。

e. 有依赖性的药物在戒断后往往表现出反跳现象（急性药理学作用相反的症状），在选择观察指标时加以注意。

## 3、精神依赖性试验

具有精神依赖性的药物能促使用药者周期性或连续性地出现感受欣快效应的用药渴求，但这是一种主观体验，只能间接用药物所导致的动物行为改变来反映。常选用的方法有：自身给药试验、药物辨别试验、条件性位置偏爱试验、行为敏化试验。

### 3. 1 方法

猴自身给药试验

大鼠自身给药试验

大鼠条件性位置偏爱试验

小鼠条件性位置偏爱试验

大鼠药物辨别试验

小鼠行为敏化试验

大鼠行为敏化试验

也可采用其他的方法，但需加以说明。

### 3. 2 精神依赖性研究主要注意事项：

c. 在自身给药试验中需要注意药物毒副作用相关的无应答期（动物表现出觅药行为之前的一段时间）、增加剂量的时间点和替代的程序。

d. 自身给药试验中，尽可能结合躯体依赖性试验结果，设计合适的剂量，并至少变换三次剂量。

e. 在条件性位置偏爱实验中应使用平衡的实验设计，避免动物天然倾向性影响。

## 4、体外依赖性试验

### （八）依赖性研究项目的选择

为了获得足够的药物依赖性信息，药物依赖性研究内容的选择需要参考药效学、一般药理学及其他毒理学试验结果，同时至少应进行躯体依赖性试验（自然戒断和催促戒断）和一项精神依赖性试验。有

强烈精神活性并拟用于改变精神神经活动的药物，应有灵长类动物试验数据。

### （九）依赖性研究的阶段性

#### 1、对于可能存在依赖性的单一化合物：

体内神经药理学研究应该在 I 期临床试验前完成。在早期非临床或临床研究中观察到的安全性信息可以为进一步非临床依赖性研究提供参考。更进一步的躯体依赖性和精神依赖性试验观察应在 II 期临床试验开始前完成。必要时需进行体外试验和依赖性的机理探讨。

#### 2、对于中药有效部位或中药复方制剂：

中药有效部位或中药复方制剂成份复杂，作用靶点多，体外试验结果参考意义有限。体内神经药理学研究结果对于判断是否具有依赖性有一定的意义，但其结果的评价往往有较大的难度和局限。体内依赖性试验应作为中药有效部位或中药复方制剂依赖性考察的主要方法。

对于需进行药物依赖性研究的中药有效部位或中药复方制剂，应在 II 期临床开始前提供全面的体内依赖性试验的相关数据。

### （十）结果分析与评价

在对所得到的非临床试验数据进行分析与评价时，一般应从以下几方面进行考虑：

1、统计学差异与生物学差异的问题。统计学差异可判断受试物对考察的试验结果是否存在影响，但由于样本数的限制，有时可能掩盖真正的生物学差异，故样本数应足够充分，同时，还应注意对每个

样本试验结果进行分析。对于统计学上的差异，还应结合动物的正常反应加以分析。

2、阳性药的选择。尽可能选择结构相似和/或作用机理相似的合适阳性药。

3、对动物异常行为出现的时间、持续时间及作用强度的观察。

4、所选择的动物是否合适，模型是否可靠。

5、分析所选择指标的灵敏性、特异性和可靠性。

6、对具体试验结果进行评估及整体评估。

7、比较产生依赖性的剂量与有效剂量、中毒剂量的关系。

8、分析是否存在耐受性，及耐受与依赖的关系。

9、根据药物拟定的适应症、有效性，综合分析继续进行临床研究的可行性。

总之，在对药物潜在依赖性风险评估中，应充分利用所有的非临床研究数据，并结合药理学、毒理学和临床研究信息，进行科学客观的分析和综合评价，以判断是否具有潜在依赖性。

#### 四、参考文献

药物依赖性试验，新药（西药）临床前研究指导原则汇编（药理学、药理学、毒理学）。中华人民共和国卫生部药政局，1993: 219-221

药物依赖性试验，徐叔云主编，药理实验方法学，第三版，人民卫生出版社。北京，2002: 251-258

Guideline on the Non-Clinical Investigation of Dependence Potential of Medicinal Products. EMEA, 2006

## 五、附录

### (一) 躯体依赖性试验

#### 1、小鼠跳跃试验（催促戒断试验）

(1)原理：短期内重复大剂量给药，然后注射阿片受体拮抗剂，如受试物属于阿片类药物，则动物发生跳跃反应，跳跃次数可反应依赖性程度。

(2)动物：健康小鼠。

(3)实验步骤：药物剂量常按递增法，有时也配合采用恒量法，给药总量可按镇痛  $ED_{50}$  的倍数计算。连续给药数天（根据药物镇痛作用的强弱确定给药时间），末次药后 2h（以吗啡为例）腹腔注射纳络酮，观察 30min 内的跳跃动物数及跳跃次数，还可观察 1h 内的小鼠体重减轻程度。

#### 2、大鼠体重减轻试验（自然或催促戒断试验）

(1)原理：阿片类药物的戒断症状出现后，大鼠体重减轻，但非阿片类镇痛药和镇静催眠药则无明显作用。阿片类戒断后大鼠体重急剧下降，以戒断后 24-48h 最明显，是考察阿片类身体依赖性的较好指标。

(2)动物：健康大鼠。

(3)实验步骤：自然戒断试验每天早、晚相同时间测定大鼠体重，每次测重后按体重给药，每天 2 次，连续给药数周。剂量根据  $LD_{50}$  和  $ED_{50}$  及给药途径制定。末次给药后每隔一定时间测量体重 1 次，比较停药后不同时间的体重变化。（按体重给药，每天 2-3 次，连续给

药 4 周。剂量根据  $LD_{50}$  和  $ED_{50}$  及给药途径制定。原则低剂量应高于药效学有效剂量，高剂量应尽可能高，但不能出现毒性反应。末次药后每天测量体重 2-3 次（与给药次数相同），计算平均值，比较停药前后不同时间的体重变化。催促戒断试验以剂量递增法给药，连续给药 1 周，末次药后 2h 注射拮抗剂，在 2h 内每隔 30min 测量体重 1 次，比较体重下降百分率。也可同时观察大鼠给药后行为变化和体温及自发活动的变化情况，并以第 1 次给药至反复给药 1 周内为重要。

(4) 结果评价：如戒断后大鼠体重急剧下降，则反应受试药具有身体依赖性。

### 3、大鼠替代试验（替代试验、交叉躯体依赖性试验）

(1) 原理：阿片类药物都有基本相同的药理作用，给动物阿片类药物并使之产生身体依赖性后停药，代之以受试药，观察动物是否发生戒断症状。

(2) 动物：健康大鼠。

(3) 实验步骤：掺食法连续给以吗啡使动物产生身体依赖性，5 天后以生理盐水、吗啡或不同剂量受试药代替，每 8h 给药 1 次，连续 6 次。替代前（基础值）及替代后每隔 4h 测定体重 1 次，计算各组大鼠的体重变化，比较替代药物组和吗啡依赖组之间的差异。

(4) 结果评价：按等效镇痛  $ED_{50}$  的倍数计，比较达到同样替代程度的受试药的剂量和吗啡的剂量，可以确定受试药物的身体依赖性潜力的强弱程度。对体内代谢迅速、皮下给药不易形成依赖性的药物，用掺食法诱发依赖性可以获得较明确的结果。

#### 4、大鼠攻击试验（自然或催促戒断试验）

(1)原理：大鼠对阿片类药物形成依赖性后停药或用拮抗剂催促，可发生戒断症状，易与同笼大鼠发生相互攻击（一般停药后 72h 最明显，24h 时极不明显；具有间断性的特点，可连续几小时甚至几天）。

(2)动物：健康大鼠。

(3)实验步骤：按递增剂量给药，连续数天，如有依赖性，则停药后大鼠出现体重减轻、摇体、眼睑下垂及扭体等戒断症状；此时如将大鼠同居一笼，则出现嘶叫、对阵和相互攻击现象，甚至受伤致死。一般于停药后第 3 天进行试验（将动物同居一笼），观察 1h，记录对阵时程和嘶叫，以及攻击和互咬次数。

(4)结果评价：本试验可反应吗啡成瘾后脑内多巴胺能神经系统的功能。停药后戒断症状是多巴胺功能亢进的表现，多巴胺受体激动剂可增强攻击反应。所以注意排除药物对多巴胺功能的干扰所产生的假阳性或假阴性。

#### 5、戒断症状的记分评定（自然或催促戒断试验）

(1)原理：动物长期获得阿片类药物后，其中枢神经系统能产生一种适应状态，停药或注射拮抗剂后机体出现一系列生理干扰现象即戒断症状。对这些戒断症状的轻重程度进行综合评分即可判断药物的身体依赖性潜力。

(2)动物：常用大鼠和猴。其中阿片类药物在猴上的依赖性表现与人较接近，戒断症状比较明显且易于观察。

(3) 实验步骤：按剂量递增法并配合恒量法给药，也可用拮抗剂纳络酮催促戒断。自然戒断或催促戒断后观察一系列戒断症状，根据戒断症状的严重程度和持续时间进行综合评分。

(4) 结果评价：

戒断症状的综合评分目前尚无统一标准，可对戒断症状进行全面综合评分，也可对其中主要戒断症状进行综合评分。猴戒断症状可分为轻、中、重、极重 4 个等级，每一等级的评分可根据症状种类的多少和出现的频率定分，但不能大于级差分值。

依赖性潜力的大小可依据等效依赖性剂量来判断，即产生近似依赖状态的剂量来判定，也可按相同的等效镇痛  $ED_{50}$  的倍数剂量来比较。

本方法同时也可进行替代试验。可在自然或催促戒断试验中观察。

## 附录（二）精神依赖性试验

### 1、自身给药试验

(1) 原理：药物的精神依赖性可产生对该药的渴求，对觅药行为和用药行为具有强化效应。本试验模拟人的行为，通过压杆方式来获得药物，反映药物的强化效应，可信度较高且可进行定量比较。

(2) 动物：常用大鼠和猴。

(3) 实验步骤：

动物麻醉后无菌条件下行静脉插管并用马甲背心固定，连接弹簧保护套及转轴，弹簧套内硅胶管与插管相连，转轴使动物在笼内能

自由活动，转轴另一端与恒速注射泵及储药系统相连。术后常规抗感染，恢复 4-7 天后进行踏板训练，使动物形成稳定的自身给药行为。试验过程中注意保持套管畅通。如药物具有强化效应，动物经过短期训练后产生稳定的自身给药行为，能自动踩压踏板接通注药装置将药物注入体内。

#### (4) 结果评价:

通过观察是否形成自身给药行为来判断药物是否具有强化效应；由于动物个体差异较大，建议将每只动物自身给药前后踏板次数变化的百分率进行组间统计。

本试验中也可同时进行替代试验。

通过更换受试药的剂量，比较它们在等效  $ED_{50}$  倍数剂量条件下的踏板次数或比较产生类似踏板模式的药物剂量，即可反映受试药的精神依赖性的强度。

本试验设计适用于静脉给药，实验中应注意药物稳定性和配药时间的关系。如受试药为口服给药，则不需进行手术，而仅将每次踏板的反应变为给一次口服制剂即可。

## 2、大鼠药物辨别试验

(1) 原理：依赖性药物使人产生的情绪效应如欣快、满足感等，属于主观性效应。具有主观性效应的药物可以控制动物的行为反应，使之产生辨别行为效应。本试验可准确判断受试药是否属于阿片类药物，以及产生精神依赖性潜力大小。

(2) 动物：常用大鼠。

### (3) 实验步骤:

利用辨别试验箱和训练程序训练动物正确压杆, 然后通过辨别训练训练动物产生稳定准确地辨别吗啡和生理盐水的能力。最后进行替代试验, 以不同剂量吗啡和受试药进行替代, 观察压杆正确率与剂量之间的关系, 做出剂量-效应曲线, 求得药物辨别刺激的半数有效剂量 ( $ED_{50}$ , 值越小精神依赖性潜力越大)。

### (4) 结果评价:

药物辨别刺激  $ED_{50}$  值越小反映精神依赖性潜力越大; 如替代药物不产生训练药物反应, 则说明该药不属于吗啡类药物。本试验不适用于阿片类拮抗剂。由于药物辨别刺激并非完全基于药物滥用产生, 因此在评价药物精神依赖性潜力方面不如自身给药试验可信, 但在药物主观效应强度的定量比较方面有其优越性。由于动物训练周期较长 (一般 3-4 个月), 试验中要注意耐受性的产生。

## 3、条件位置偏爱试验

(1) 原理: 根据巴甫洛夫的条件反射学说, 如果把奖赏刺激与某个特定的非奖赏性条件刺激如某特定环境反复练习之后, 后者便可获得奖赏特性。反复几次将动物给药后放在一个特定的环境中, 如药物具有奖赏效应, 则特定环境就会具有了奖赏效应的特性, 动物在不给药的情况下依然有对此特定环境的偏爱。

(2) 动物: 常用雄性大鼠或小鼠。

### (3) 实验步骤:

试验装置为黑、白两个互通的盒子, 中间有可活动的隔板隔开。

动物每天上午、下午（或隔天）分别给受试药和生理盐水各一次，给生理盐水后将动物放入一侧盒子，给药后动物放入另一侧盒子，每次在盒中停留 30-40min，连续训练 5 天。第 6 天在固定时间不给药的情况下将动物放在黑、白盒之间的活动台上，同时用隔板将黑、白盒半隔开。以动物爬到盒底的瞬间开始计时，记录 15min 内动物分别在两盒内停留的时间。

#### (4) 结果评价:

如果动物在一侧盒子内停留时间显著延长，则表明其对伴药盒产生位置偏爱，该受试药具有偏爱效应。以吗啡为阳性对照药，比较它们在等效  $ED_{50}$  倍数剂量条件下的偏爱效应，或比较产生相似位置偏爱效应的药物剂量，即可反映该受试药的精神依赖性潜力的强度。本试验的准确性取决于训练次数和每天训练的时间。训练次数越多，条件联系越牢固；时间过短则条件联系不牢固，时间过长则离散度增大。