

药物 QT 间期延长潜在作用非临床研究技术指导原则

二〇一四年五月

药物 QT 间期延长潜在作用 非临床研究技术指导原则

一、概述

心电图（ECG）中 QT 间期（从 QRS 波群开始到 T 波结束）反映心室去极化和复极化所需的时间。当心室复极化延迟和 QT 间期延长，尤其伴有其他风险因素（如低血钾、结构性心脏病、心动过缓）时，患者发生室性快速心律失常的风险增加，包括尖端扭转型室性心动过速（torsade de pointes, TdP）。

本指导原则主要是关于评价受试物延迟心室复极化潜在作用的非临床研究策略，以及对非临床研究信息的分析和综合风险性评估。QT 间期研究结果可以和其他信息一起，用来阐明药物作用机制，以及对人体的延迟心室复极化和延长 QT 间期的风险评估。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物。

二、基本原则

（一）试验方法

《药物安全药理学研究技术指导原则》中所述的关于研究设计的基本原则和推荐方法，也适用于本指导原则。建议采用体内和体外的方法进行研究。

应基于受试物的药效学、药代动力学、安全性的特点对研究方法设计、风险性证据进行个体化分析。

（二）执行 GLP 的要求

体外试验建议执行《药物非临床研究质量管理规范》(GLP)规范,体内试验遵循GLP,追加研究(Follow-up studies)应在最大可行限度内遵循GLP。

(三) 受试物

中药、天然药物:受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备,一般应为中试或中试以上规模的样品,否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量(或规格)、保存条件、有效期及配制方法等,并提供质量检验报告。由于中药的特殊性,建议现用现配,否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较长时,应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。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/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物:受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量(或规格)、保存条件、有效期及配制方法等,并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等,并符合试验要求。

在药物研发的过程中,若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化,应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。
成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

三、基本内容

(一) 试验设计的基本要求

1. 生物材料

应选择合适的试验体系和动物种属。体外研究可采用离体心肌细胞、培养心肌细胞系或克隆的人离子通道的异种表达体系、离体心脏标本。用于体外研究的组织和细胞标本可来源于不同的实验动物，包括兔、雪貂、豚鼠、犬、猪。当采用原代组织或细胞时，应考虑所用标本的特点及来源，因为离子通道的分布可因组织和细胞类型而不同。

用于整体研究的动物包括犬、猴、猪、兔、雪貂以及豚鼠。

成年大鼠和小鼠复极化的离子机制不同于包括人在内的大动物种属（在成年大鼠、小鼠，复极化的主要离子流是 I_{to} ），因此用这些种属的组织或动物是不合适的。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，并具有实验动物质量合格证明。

2. 样本量

体外试验：体外样本量每组不少于 4 个平行样本，一般 3~5 个组。

体内试验：试验组的组数及每组动物数的设定，应以能够科学合理地分析所获得的试验结果，恰当地反映有生物学意义的作用，并符合统计学要求为原则。小动物每组一般不少于 10 只，大动物每组一般不少于 6 只，一般雌雄各半。

3.剂量

体外研究中,受试物的浓度应涵盖和超过预期临床最大治疗血药浓度。试验中逐步提高药物浓度直到出现特征性的浓度-反应曲线或达到因受试物理化特性所限的最高浓度。除了受到细胞或组织活性的限制外,理想状态下应有充分的药物暴露时间以获得稳态电生理效应,应注明药物暴露时间的长短。体外研究中应使用合适的阳性对照药,以确认该体外试验系统的敏感性。

体外研究应确定受试物的浓度-效应关系。当体外研究无明显作用时,应对浓度选择的范围进行说明。

整体试验剂量范围应与《药物安全药理学研究技术指导原则》的原则一致。如果可能,剂量范围应包括和超过预期的人暴露水平。当给药剂量可能会因动物的耐受性而受到限制时,如动物出现呕吐、震颤、活动过度等,可采用静脉给药或麻醉动物进行研究。当研究用于评价延迟心室复极化程度与原药及代谢产物浓度关系时,可采用持续静脉滴注的方式控制药物暴露水平。监测受试物及其代谢产物的暴露量有助于解释药物的量效关系或剂量或浓度-反应,也为设计可能追加的试验提供信息。

4.对照

体外离子通道和动作电位时程试验中应采用次最大有效浓度(即药物对通道的抑制率达70%~80%时的浓度)的阳性对照药说明试验系统的反应性,并且应用于每项试验。整体试验研究中使用阳性对照药则是为了验证试验系统的敏感性,但不必在每一项试验中都使用阳性对照药。

如受试物在化学结构/药理分类上属于与延长人体 QT 间期或促心律失常有关的药物时，在体内外研究中应与现有同类药物比作用强度。

5. 给药途径

整体动物试验，首先应考虑与临床拟用途径一致，可以考虑充分暴露的给药途径。对于在动物试验中难以实施的特殊的临床给药途径，可根据受试物的特点选择，并说明理由。

6. 观察时间

结合受试物的药效学和药代动力学特性、实验动物、临床试验方案等因素选择观察时间点和持续时间。

(二) 主要研究内容

1. 主要研究

1.1 采用离体动物或人心肌细胞、培养心肌细胞系或克隆的人离子通道的异种表达体系测定离子流。

1.2 测定清醒或麻醉动物的 ECG 参数。

1.3 在离体心脏标本进行动作电位参数测定，或在麻醉动物中进行能体现动作电位时程的特异性电生理参数检测。

1.4 在离体心脏标本或动物进行致心律失常作用测定。

可先进行 1.1、1.2 研究，再进行 1.3、1.4 研究。

综上所述，可采用体内外方法从 4 个不同方面对受试物的 QT 间期作用进行研究，并且相互之间有互补作用。

2. 追加研究

当非临床研究的结果不一致，和/或临床研究结果与非临床研究结果不一致时，可通过回顾性评价和追加研究进行分析。此种情况下，追加的研究结果可能成为综合风险评估的重要组成部分。

追加的研究是为了更深入地了解或提供更多的关于受试物潜在的延迟人心室复极化和延长 QT 间期的作用。这些研究可以提供更多有关作用强度、作用机制、剂量反应曲线的斜率或最大反应幅度的信息。追加的研究可以针对某一特殊问题设计试验，因此各种体外或体内的研究设计都可应用。

在选择和设计追加研究中，以下内容需与已有的非临床和临床信息一并考虑：

- 用离体心脏测量记录动作电位以评价心室肌复极化；
- 在麻醉动物用一些能反映动作电位时程的特殊电生理参数；
- 动物的种类和性别的选择；
- 用代谢诱导剂或抑制剂；
- 用目前已知阳性对照物或参比物；
- 未研究的对其他通道的抑制作用；
- 多时间点测定电生理参数；
- 在清醒动物难以解释的作用，如受试物对心率、自主神经紧张的影响，或受试物的毒性，如震颤、抽搐或呕吐；
- 如药物有蓄积、临床长期使用，需考虑多次给药的观察。

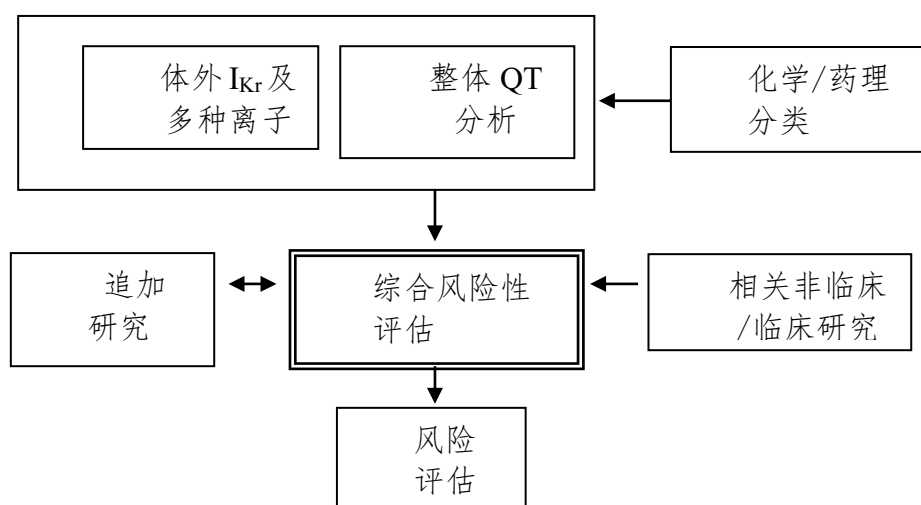
四、结果分析与评价

综合风险评估应该是基于科学的、对受试物个性化的考虑。这种综合风险性评估有益于临床研究设计和其结果的分析。应结合药效学、毒理学、

药代动力学以及其他研究资料进行综合评价,为药物应用于人体的安全性提出建议。

风险评估应考虑受试物是否在化学结构或药理分类上属于可延长人QT间期作用的药物,如某些抗精神病类药物、组胺H₁受体拮抗剂、氟喹诺酮类等。这可能会影响参比物的选择并会纳入综合风险评估中。

对QT间期影响的非临床研究策略如下图



五、参考文献

1.ICH, ICH Guidance for Industry ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, 2001.

2.ICH, ICH Guidance for Industry ICH S7B: Safety Pharmacology Studies for assessing the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by Human Pharmaceuticals, 2005.

3.Liu T, Brown BS, Wu Y, Antzelevitch C, Kowey PR, Yan GX. Blinded validation of the isolated arterially perfused rabbit ventricular wedge in preclinical assessment of drug-induced proarrhythmias, Heart Rhythm 2006; 3: 948-956.

六、附录一试验方法

(一) 体外试验

评价药物对离子电流的影响，主要包括 I_{Kr} 和其他几种参与心肌电活动的重要离子通道。体外 I_{Kr} 试验是采用原代心肌细胞或表达 I_{Kr} 通道蛋白（如由 hERG 编码的蛋白）的细胞系评价药物对离子电流的影响。相关研究方法见参考文献。检测中获得 IC_{50} 的基本参数项目列于表 2。

表 1 致心律失常作用试验检测的心肌离子通道

通道种类	阳性对照（参考）	参考文献
Cav1.2 (L-type)	尼非地平 (Nifedipine)	Shen J et al Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes <i>JPET</i> , 2000; 294:562–70 Zahradnik I, Minarovic, I and Zahradnikova A Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by antidepressant drugs <i>JPET</i> , 2008; 324:977–84
hERG	西沙必利 (Cisapride) 或 特非那定 (Terfenadine)	Helliwell R, <i>Recording hERG potassium currents and assessing the effects of compounds using the whole-cell patch-clamp technique</i> Jonathan D Lippiat (ed), <i>Methods in Molecular Biology, Potassium Channels</i> , 2008; 491: 279–95 Kamiya K et al Molecular determinants of hERG channel block by terfenadine and cisapride <i>J Pharmacol Sci</i> , 2008; 108:301-7 Gintant GA et al Utility of hERG assays as surrogate markers of delayed cardiac repolarization and QT safety <i>Toxicol Pathol</i> , 2006; 34:81-90
Kv1.5	4-氨基吡啶 (4-Aminopyridine, 4-AP)	De Biasi M et al Open channel block of human heart hKv1.5 by the beta-subunit hKv beta 1.2 <i>Am J Physiol</i> 1997 272: H2932-41 Lagrutta A et al Novel, potent inhibitors

		of human Kv1.5 K ⁺ channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current <i>JPET</i> ,2006;317:1054-63
Kv4.3	氟卡尼(又名哌氟酰胺, Flecainide) 或 4-AP	Radicke S et al Effects of MiRP1 and DPP6 β -subunits on the blockade induced by flecainide of KV4.3/KchIP2 channels <i>Br J Pharmacol</i> 2008, 154: 774-86 Fischer F et al Inhibition of cardiac Kv1.5 and Kv4.3 potassium channels by the class Ia anti-arrhythmic ajmaline: mode of action <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol</i> , 2013, online, Jul
KvLQT1/minK	二乙酰醇 293B (Chromanol-293B)	Yang WP et al KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias <i>PNAS</i> , 1997; 94:4017-4021 Seebohm G et al Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine <i>Mol Pharmacol</i> , 2003, 64:70-7
Nav1.5	利多卡因 (Lidocaine)	Wu L et al Role of late sodium current in modulating the proarrhythmic and antiarrhythmic effects of quinidine <i>Heart Rhythm</i> , 2008; 5: 1726-34 McNulty, MM and Hanck, DA State-dependent mibefradil block of Na ⁺ channels <i>Mol Pharmacol</i> , 2004; 66:1652-61
Kir2.1	钡(Barium)或氯喹 (Chloroquine)	Rodriguez-Menchaca AA et al , The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel <i>PNAS</i> , 2008; 105:1364-8 Schram G et al Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents:evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents <i>Cardiovasc Res</i> , 2003, 59: 328-38

观察记录上述所有离子通道的相关试验建议在 GLP 实验室进行

表 2 检测阻断离子通道 IC₅₀ 所需的参数项目

参数项目	IC ₅₀
试验平台	手动膜片钳记录系统
所需浓度	4 种
每一浓度下重复试验例数	n=3
阳性对照	n=2
溶媒对照	1 个浓度, n=3
检测温度	室温 (RT)或生理性温度 (PT)
浓度范围	通过预实验确定
试验方案和报告	GLP 格式
累积曲线	+
分析样品收集	+
PDF 格式的电子文档	+

(二) 整体研究

整体 QT 研究主要是测定心室复极参数, 如 QT 间期。该试验可在安全药理学研究中同时进行, 这样可减少动物和其他资源的使用。

QT 间期和心率是相反的、非线性的关系, 且二者之间的关系在不同的种属和动物甚至同一种属之间都不相同。因此心率改变会影响 QT 间期, 这会干扰对受试物影响心室复极化和 QT 间期的评价。故在 QT 间期分析时, 应采用心率校正 QT 间期 (QTc) 来进行, 常用的有 Bazett 和 Fridericia 法; 心率校正公式的选择须根据试验系统得来的数据加以判断, 如果给药组和对照组心率差异较大, 可能校正公式对于评价 QT 间期延长风险是无

效的，此时可改用心脏起搏器来获得固定的心率。对 QT/RR（心电图中心电图中 R 波与 R 波的距离）关系进行分析可能更合适，包括用公式对个体动物 QT 间期数据进行校正。

在犬或猴等大动物记录 ECG，是安全性评价的基本组成。药物引起 QT 间期显著延长将使致命性心律失常 TdP 发生的风险显著增加，因而 ECG 的 QT 间期被作为预测新化合物引起 TdP 的重要风险因素。鉴于犬、猴和小型猪等大动物在心肌离子通道构成和功能方面与人类具有高度相似性，通常用于整体 QT 分析研究中。整体 QT 分析试验可在麻醉和清醒动物进行，具体方法参见表 3 所列文献。

表 3 整体 QT 研究试验常用动物

动物		参考文献	试验参数
麻醉动物	犬	Ollerstam, A et al Comparison of the QT interval response during sinus and paced rhythm in conscious and anesthetized beagle dogs <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007;56: 131-44 Chiba K, et al In vivo experimental approach for the risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents-induced long QT syndrome <i>Eur J Pharmacol</i> , 2004;486:189-200	ECG 相关参数，包括（形态、心率、节律、P 波电压、R 波电压、T 波电压、PR 间期、RR 间期、QRS 时间、QT 间期、QTc 间期）
	猴	Ishizaka T et al Evaluation of drug-induced QT prolongation in a halothane-anesthetized monkey model: effects of sotalol <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2009;59:86-93	
	猪	Authier S et al Cardiovascular and respiratory safety pharmacology in Göttingen minipigs: Pharmacological characterization <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2011;64:53-9	

遥测动物	犬	Batey AJ, Doe PA A method for QT correction based on beat-to-beat analysis of the QT/RR interval relationship in conscious telemetered beagle dogs <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> ,2002;48: 11-9 Fossa AA Assessing QT prolongation in conscious dogs: validation of a beat-to-beat method <i>Pharmacol Ther</i> , 2008;118:231-8	
	猴	Ando K et al QT PRODACT: In vivo QT assay with a conscious monkey for assessment of the potential for drug-induced QT interval prolongation <i>J Pharmacol Sci</i> ,2005;99: 487-500 Haushalter TM et al The cardiovascular and pharmacokinetic profile of dofetilide in conscious telemetered beagle dogs and cynomolgus monkeys <i>Br J Pharmacology</i> ,2008;154: 1457-64	
	猪	Stubhan et al Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Göttingen Minipig <i>J Pharmacol Toxicological Methods</i> ,2008, 57: 202–11 Kano M et al QT PRODACT: Usability of miniature pigs in safety pharmacology studies: Assessment for drug-induced QT interval prolongation <i>J Pharmacol Sci</i> ,2005, 99:501–11	
麻醉动物	犬	Takahara A et al Effects of mexiletine on the canine model of sparfloxacin-induced long QT syndrome <i>Eur J Pharmacol</i> ,2003,476:115-22 Chiba K et al Proarrhythmic effects of fluoroquinolone antibacterial agents: in vivo effects as physiologic substrate for Torsades <i>Toxicol Appl Pharmacol</i> , 2000, 169:8-16 Kimura K et al Hemodynamic and electrophysiological effects of mitemincal (GM-611), a novel prokinetic agent derived from erythromycin in a halothane-anesthetized canine model <i>J Toxicol Sci</i> , 2007,32:231-9	血流动力学检测, 包括MAP、SBP、DBP、HR、ECG、单相动作电位(MAP)等

注：Göttingen minipigs:哥根廷小型猪。上述整体 QT 研究相关试验建议在 GLP 实验室进行

(三) 追加的研究

药物对心肌动作电位 (Action potential, AP) 的影响：心脏的正常功能依赖于心肌细胞动作电位的产生和传导。药物引起细胞膜离子通道表达或功能异常是其导致心律失常的重要病理生理基础。因此，在离体心脏标本进行动作电位参数测定，是 ICH 推荐的 QT 间期延长药物安全性评价体系中的重要组成之一。常用于动作电位参数测定的动物离体心脏标本及试验方法见表 4，试验中重要的参数项目见表 5。

表 4 记录心肌 AP 的离体心肌标本

动物标本	参考文献
犬蒲肯野纤维	Terrar, DA et al Comparison of guinea-pig ventricular myocytes and dog Purkinje fibres for in vitro assessment of drug-induced delayed repolarization <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 56: 171-85 Lightbown ID et al Towards automation of a valuable preclinical cardiac safety pharmacology assay: Evaluation of the effects of cardiac ion channel blockers on cardiac repolarisation in vitro <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007;56:194-202 Limberis JT et al The effects of plasma proteins on delayed repolarization in vitro with cisapride, risperidone, and D, L-sotalol <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 56:11-7
兔蒲肯野纤维	Himmel HM Suitability of commonly used excipients for electrophysiological in-vitrosafety pharmacology assessment of effects on hERG potassiumcurrent and on rabbit Purkinje fiber action potential <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 56: 145-58 Ducroq J et al Action potential experiments complete hERG assay and QT-interval measurements in cardiac preclinical studies <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i> , 2007; 159-70

豚鼠心室肌细胞	<p>Hagiwara T et al A comparative study of the fluoroquinolone antibacterial agents on the action potential duration in guinea pig ventricular myocardia <i>Jpn J Pharmacol</i>, 2001; 87: 231–34</p> <p>Shuba LM et al Action potentials, contraction, and membrane currents in guinea pig ventricular preparations treated with the antispasmodic agent terodiline <i>JPET</i>, 1999; 290:1417-26</p>
豚鼠心室乳头肌	<p>Hayashi S et al QT PRODACT: a multi-site study of in vitro action potential assays on 21 compounds in isolated guinea-pig papillary muscles <i>J PharmacolSci</i>,2005; 99:423-37</p>
Langendorff离体心脏	<p>Milberg P et al Proarrhythmia as a class effect of quinolones: increased dispersion of repolarization and triangulation of action potential predict torsades de pointes <i>J Cardiovasc Electrophysiol</i>, 2007; 18:647-54</p> <p>Clements-Jewery H et al Actions of flecainide on susceptibility to phase-2 ventricular arrhythmias during infarct evolution in rat isolated perfused hearts <i>British J Pharmacol</i>, 2006; 147: 468–75</p> <p>ChengHC and Incardona J Models of torsades de pointes: effects of FPL64176, DPI201106, dofetilide, and chromanol 293B in isolated rabbit and guinea pig hearts <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i>, 2009; 60: 174-84</p>
冠状动脉灌注兔左心室肌楔形标本	<p>ChenX et al Use of arterially perfused rabbit ventricular wedge in predicting arrhythmogenic potentials of drugs <i>J Pharmacol Toxicol Methods</i>, 2006;54: 261-72</p> <p>Liu T, Brown BS, Wu Y, Antzelevitch C, Kowey PR, Yan GX. Blinded validation of the isolated arterially perfused rabbit ventricular wedge in preclinical assessment of drug-induced proarrhythmias <i>Heart Rhythm</i> 2006; 3: 948-956</p>

上述研究相关试验建议最大可能执行 GLP

表 5 心肌动作电位试验中的重要参数项目

三浓度检测参数项目	测试
测试浓度数	3
检测每一个受试物所需的蒲肯野纤维数或心肌细胞数	4
用于对照品的蒲肯野纤维数或心肌细胞数	4
累积曲线	+
在生理温度 (37°±1° C) 下进行试验	+
统计学分析	+
如果系 GLP 实验室, 收集样本的分析	+
报告	+
如果是 GLP 实验室, 要求有质量保证部门(Quality Assurance Unit, QAU)的检查, 包括同步、数据和报告的检查	+

可参考的文献

1. De Clerck F et al, In vivo measurement of QT prolongation, dispersion and arrhythmogenesis: application to the preclinical cardiovascular safety pharmacology of a new chemical entity, *FundamClinPharmacol*, 2002;16:125-40.

2. Sanguinetti MC, Mitcheson JS, Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome, *Trends Pharmacol Sci*,2005;26: 119-24.

3. Lawrence CL et al, Nonclinical proarrhythmia models: Predicting Torsades de Pointes, *J PharmacolToxicol Methods*,2005; 52: 46–59

4. Guth BD, Preclinical cardiovascular risk assessment in modern drug development, *ToxicolSci*, 2007; 97, 4–20.

5. Kettenhofen R, Bohlen H, Preclinical assessment of cardiac toxicity, *Drug Discov Today*, 2008;13:702-7.
6. Sugiyama A Sensitive and reliable proarrhythmia in vivo animal models for predicting drug-induced torsades de pointes in patients with remodelled hearts, *Br J Pharmacol*, 2008;154:1528-37.
7. Valentin JP, Hammond T Safety and secondary pharmacology: Successes, threats, challenges and opportunities, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2008;58: 77–87.
8. Valentin JP et al A framework to assess the translation of safety pharmacology data to humans, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2009;60:152–58
9. Amanfu, RK , Saucerman, JJ, Cardiac models in drug discovery and development: a review, *Crit Rev Biomed Eng*, 2011;39:379-95.
10. Mikhailov D, Traebert M, Lü Q, Whitebread S, Egan W Should cardiosafety be ruled by hERG inhibition? Early testing scenarios and integrated risk assessment, (Bernard Faller and Laszlo Urban ed, *Hit and Lead Profiling- Identification and Optimization of Drug-like Molecules*, 2010; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.