



BE试验生物样本分析的 管理规范 and 常见问题

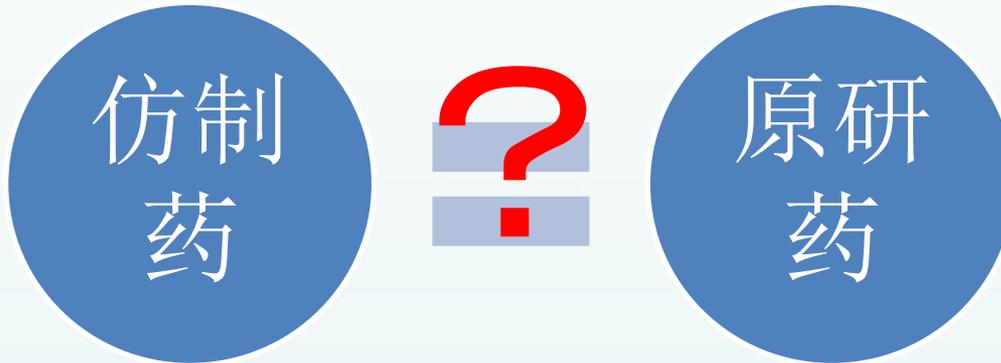
张天谊(Tee), 博士, MBA
方达医药(中国) 总经理

OUTLINE

- 生物等效性 (BE)
- 生物分析在BE中的关键作用
- 生物分析法规和管理规范
- 生物分析常见问题和注意事项

➤ 生物等效性 (BE)

BE: 以药代动力学 (PK) 参数为指标, 比较相同试验条件下的两种制剂, 其活性成分吸收程度和速度有无统计学差异的**临床**试验。



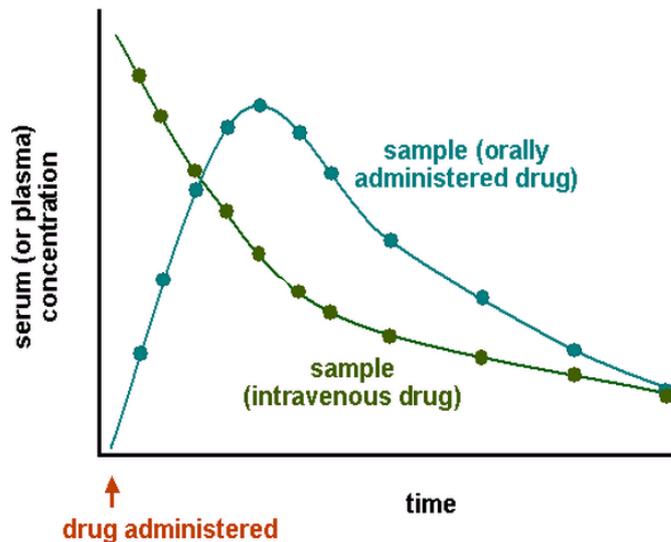
- ❖ 仿制药质量和疗效一致性评价
- ❖ 仿制药必须显示与原研药具有生物等效性

药代动力学 (PK)

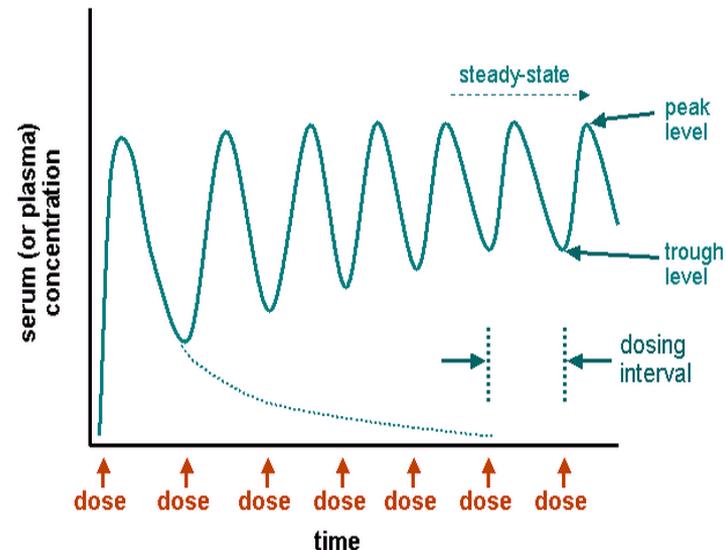
PK: 药物浓度与时间的关系

- 基于生物分析提供的浓度结果
- 构建浓度-时间曲线
- 计算PK参数 (AUC, C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$ 等)
- 剂型, 剂量, 单次给药, 多次给药

serum (or plasma) concentration-time curve



steady-state serum (or plasma) concentration



BE接受标准

国家/地区	AUC 90%置信限	Cmax 90%置信限
中国	80~125%	80~125%
EMA	80~125%	80~125%
美国	80~125%	80~125%

常用PK和统计软件:

WinNonLin

SAS

➤ 生物分析在BE中的关键作用

影响BE成功的关键因素

制剂

临床

生物分析
结果
准确可靠？

生物分析方法

- 药物研究结果如TK/PK和BE试验等，很大程度上依赖于准确、可靠、可重现的生物样本定量分析方法
- **建立高质量的生物分析方法是关键**



生物分析环节

方法开发

- 建立方法条件
- 方法开发考察哪些内容：如何知道方法可以通过验证要求
- 方法开发也要记录

方法验证

- 验证计划
- 验证参数：标准曲线与定量范围，准确度，精密度，特异性，储备液/工作溶液稳定性，生物基质短期和长期储存稳定性，冻融稳定性，室温（或操作条件）稳定性，处理萃取物稳定性，全血稳定性，回收率，残留，基质效应等
- 验证报告

样本分析

- 分析方案
- 分析数据结果与记录
- 分析报告

生物基质种类

- 血浆 (plasma)
- 全血 (blood)
- 血清 (serum)
- 组织 (tissue)
- 尿液 (urine)
- 胆汁 (bile)
- 唾液 (saliva)
- 粪便 (feces)

样本种类

空白试剂 (Reagent)

空白生物基质 (Blank Matrix)

标准曲线 (Calibration standard)

质控样本 (QC)

真实试验样本 (study sample)

空白基质 (BLANK MATRIX)

- 空白基质: 如空白血浆, 全血等
 - 要求分析方法与临床方案一致, 含合适的抗凝剂
- 应不含分析物和内标干扰 ($< 20\%LLOQ$, $< 5\%IS$)
- 用于配制质控样本(QC)和标准曲线等
- 一般从商业途径购买
 - (难点: 国内禁止人血基质商业买卖。Certificate of Analysis?)

质控样本 (QC)

- ◆ 用空白基质配制, 模拟真实样品
- ◆ 用于测试方法准确性, 精密度, 稳定性等

QC样本中应含95%以上生物基质。

- 非生物基质比例(如加入的工作溶液)应不超过5%

QC浓度:

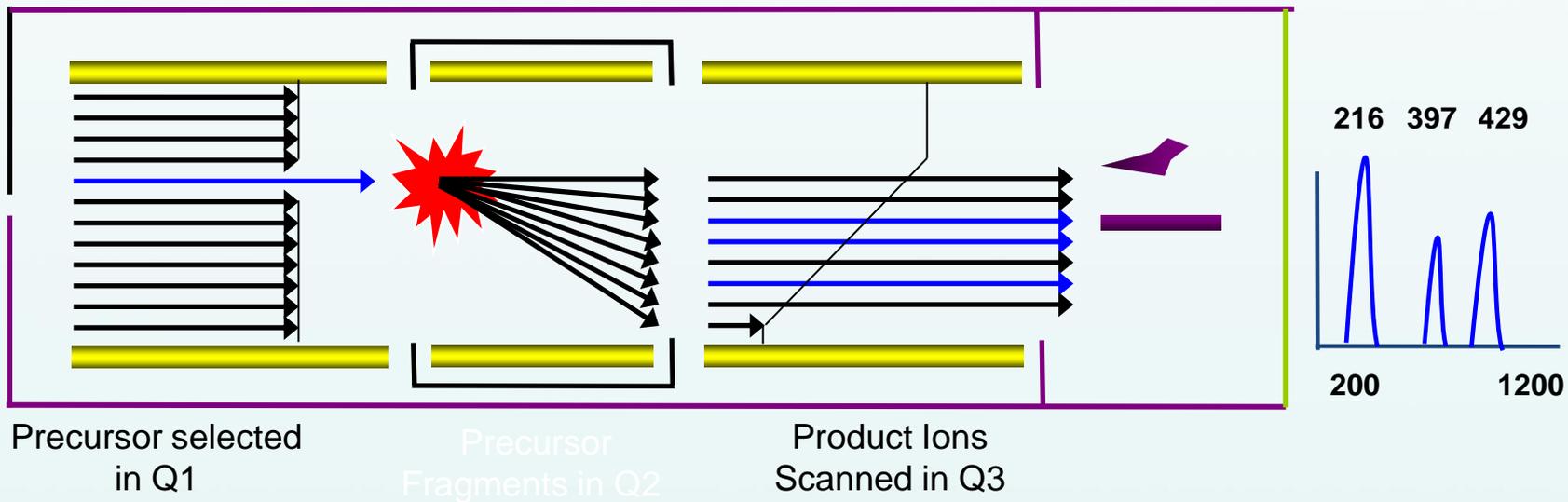
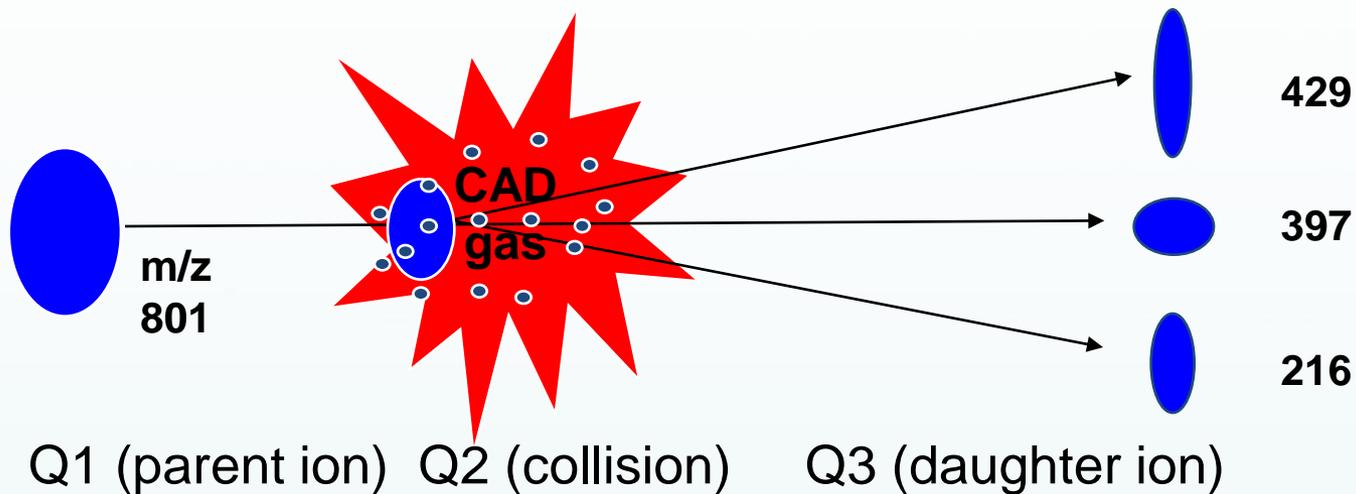
LLOQ (定量下限 Lower Limit of Quantitation)

Low QC (低浓度, $< 3 * \text{LLOQ}$)

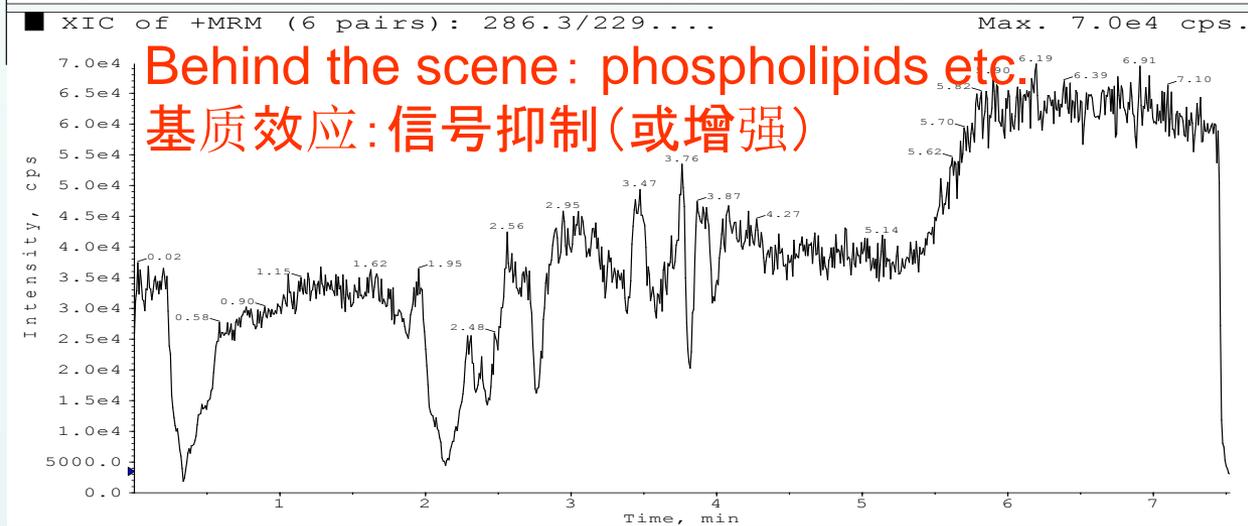
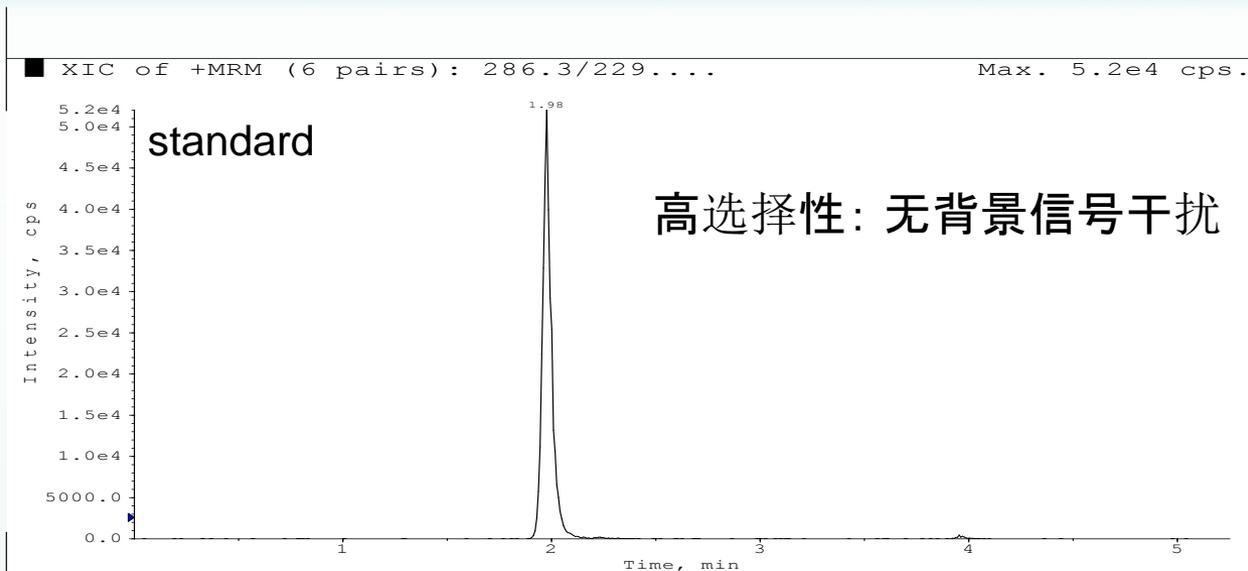
Mid QC (中浓度)

High QC (高浓度, $> 75\% \text{ ULOQ}$)

LC/MS/MS - 高灵敏度/高选择性



基质效应



样本前处理 (EXTRACTION)

Protein Precipitation 蛋白沉淀 (PPT)

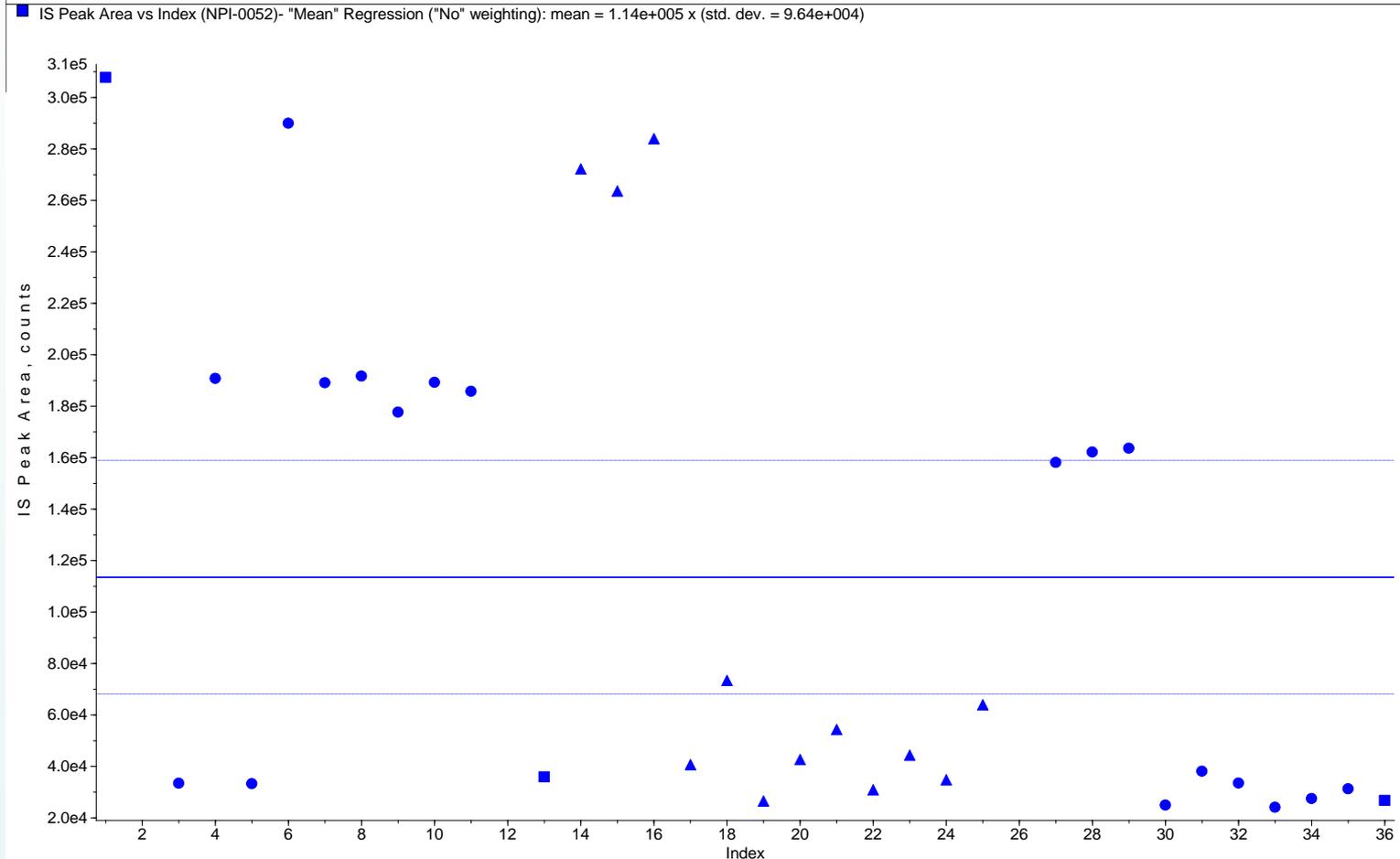
Liquid-Liquid Extraction 液液萃取 (LLE)

Solid-Phase Extraction 固相萃取 (SPE)

样本前处理可以去除生物基质中的蛋白, 磷脂Phospholipids, 脂肪酸/盐/酯, 胆固醇, 和无机盐类等, 降低基质效应影响

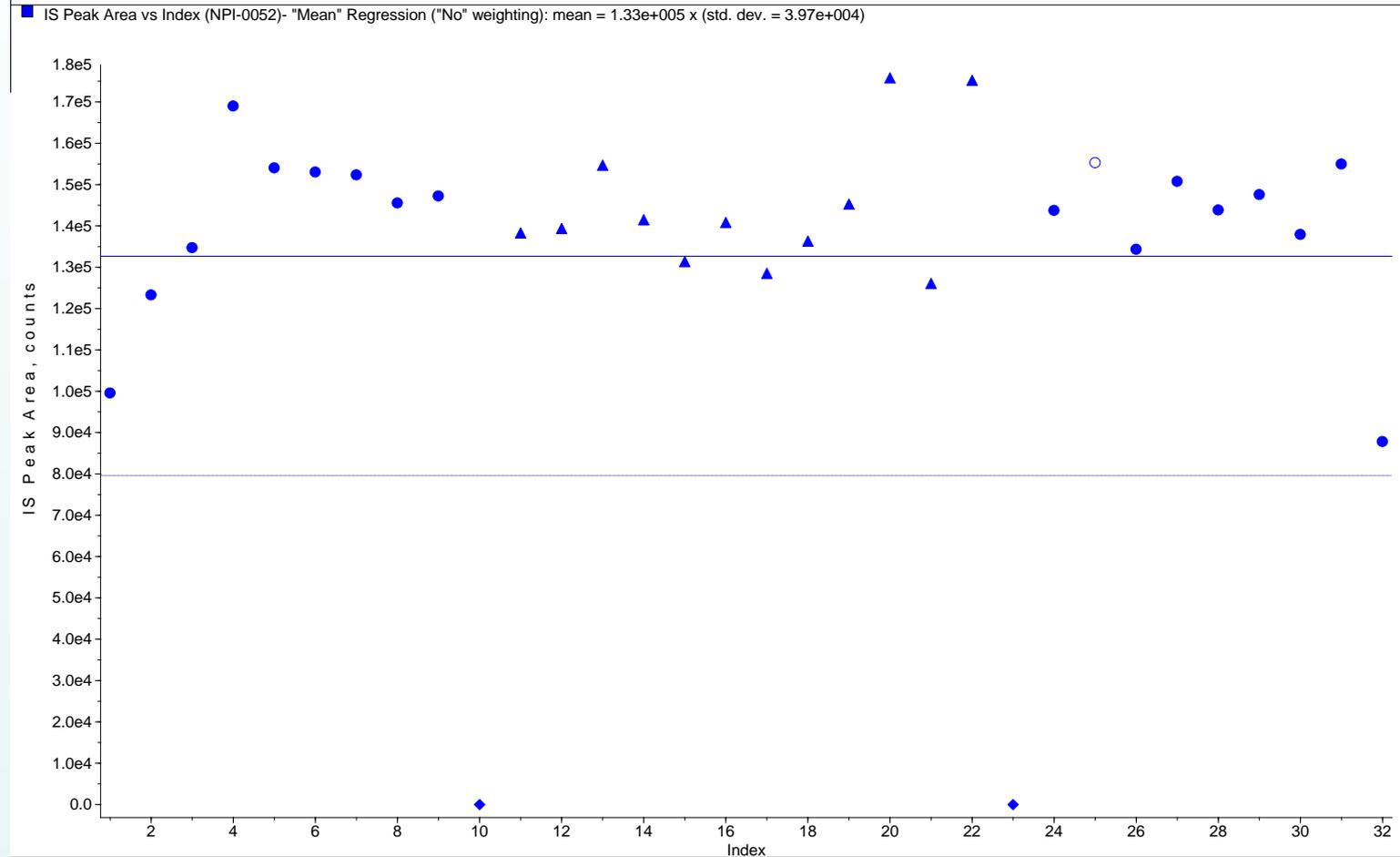
基质效应影响：内标信号变异

IS VARIATIONS WITHIN A TEST BATCH (PROTEIN PRECIPITATION)



SPE 样本处理后: 内标信号更一致

IS RESPONSE MORE CONSISTENT WITHIN A BATCH (SPE)



➤ 生物分析法规 (REGULATION)

GLP (Good Laboratory Practice): 非临床研究质量管理规范

- FDA GLP, 始于1976
- OECD GLP, 始于1978 (基于FDA GLP), 更新与1997
- CFDA GLP, 始于1993, 于2003开始对非临床试验基地进行GLP认证

适用于非临床安全性评价试验 (non-clinical Safety Testing, TK)

- 机构, 人员, 设施, 设备
- 实验方案, 标准操作规范(SOPs).
- 供试品, 对照品, 动物系统
- 原始记录, 报告, 存档管理
- 质量保证部门(QA)

GLP生物分析, 是一种质量标准。不限于非临床TK试验, 还延伸应用于PK和临床试验

实验室资质

- GLP对于生物分析是一种质量标准。很多人将之与GLP证书混淆。
- GLP证书颁发给非临床基地(安评中心, 动物试验基地)。
- GCP证书颁发给临床基地。

第三方独立的生物分析实验室

- CFDA不给独立的生物分析实验室发GLP证书
- CFDA接受独立的生物分析实验室数据。质量达到核查要求 (GLP和GCP标准)
- **FDA不发GLP或GCP证书。着重于项目核查**
- CFDA目前更趋向于FDA做法, 将不依赖证书, 而是注重项目核查
- 第三方的质量管理体系认证如 ISO9001, ISO17025等

➤ 生物分析管理规范 (GUIDANCE)

FDA:

- ◆ Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation (2001)
- ◆ Updated BMV draft, Sep 2013 (received many comments. still pending)

EMA:

- ◆ Guideline on Bioanalytical Method Validation (2012)
- ◆ GCP - Reflection paper on guidance for laboratories that perform the analysis or evaluation of clinical trial samples (2012)

生物分析管理规范

CFDA:

- ◆ 化学药物非临床药代动力学技术指导原则 (2005)
- ◆ 化学药物临床药代动力学技术指导原则 (2005)
- ◆ 化学药物制剂人体生物相对利用度和生物等效性技术指导原则 (2005)
- ◆ 药物临床试验生物样本分析实验室管理指南 (2011试行版)
- ◆ **生物样品定量分析方法验证指导原则 (2015, 药典)**
- ◆ 仿制药质量一致性评价人体生物等效性研究技术指导原则 (2015. 11)
- ◆ 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则 (2016. 3)
- ◆ 第117号《关于开展药物临床试验数据自查工作的公告》, (2015)
- ◆ “药物临床试验数据现场核查要点” (2015)
- ◆ 仿制药质量和疗效一致性评价临床试验数据核查指导原则 (2016. 12 征求意见稿)
- ◆ 仿制药质量和疗效一致性评价研究现场核查指导原则 (2016. 12 征求意见稿)

生物样品定量分析方法验证指导原则（2015 药典）

完全验证

- 一般应对每个物种和每种基质进行完整验证。
- 验证参数:准确度、精密度、选择性、定量下限、标准曲线、稀释可靠性、提取回收率、基质效应、稳定性

部分验证

- 对已验证的方法进行小幅改变，需做部分验证。
- 如：方法转移、改变仪器、校正浓度范围、样品体积，其他基质或物种，改变抗凝剂、样品处理步骤、储存条件等。
- 应报告所有的改变，并对重新验证或部分验证的范围说明理由。

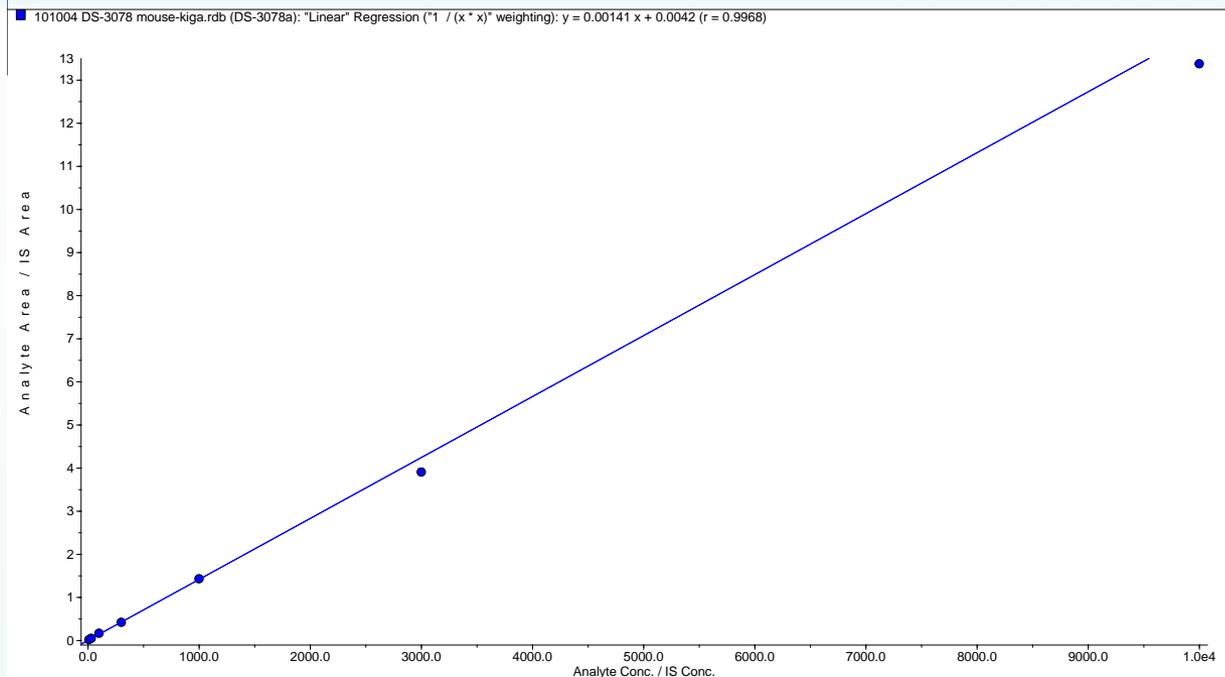
交叉验证

- 同一实验室的不同方法之间或不同实验室的同样方法之间，需要互相比对这些数据时，需要进行交叉验证。
- 如果可能，应在试验样品被分析之前进行交叉验证。
- 同一质控样品或试验样品应被两种分析方法测定并对结果进行比较

◆ 分析物和内标

- ◆ 从可追溯的来源获得标准品。标准品应带有分析证书 (Certificate of Analysis) 包括纯度, 储存条件、失效日期和批号等。
- ◆ LC/MS/MS生物分析要使用内标。
- ◆ 应尽可能使用稳定同位素标记的内标

标准曲线



- 基质应该与目标试验样品基质相同。
- 每种分析物和每一分析批，都应该有一条标准曲线。
- 浓度范围应该足够描述分析物的药代动力学。
- 使用至少 6 个校正浓度水平。
- 在方法验证中，至少应该评价3 条标准曲线（不在同一天制备）。

稳定性

- 稳定性应考察不同储存条件，时间不小于试验样品储存时间
- 必须在每一步骤确保稳定性。
- 用文献报道的数据证明稳定性是不够的。

方法验证报告

验证结果概要
方法描述

分析批接受标准
所以分析批列表
所以接受的分析批结果列表

对验证方案，方法或对标准操作规程的偏离
所有测定及每个计算浓度都必须出现在验证报告中

用已验证的方法

- 需在样品分析开始前证实生物分析方法效能。
- 按照已验证的分析方法处理试验样品以及质控样品和校正标样

分析批要求

- 包括空白样品和零浓度样品，至少6 个浓度水平的校正标样，至少3 个浓度水平质控样品（低、中、高浓度双重样品，或至少试验样品总数的5%），以及被分析的试验样品
- 样品在同一时间处理，即没有时间间隔，由同一分析者相继处理，使用相同的试剂，保持一致的条件。质控样品应该分散到整个批中，以保证整个分析批的准确度和精密度。

BE要求

- 对生物等效性试验，一名受试者的全部样品应在同一分析批中分析

浓度范围

标准曲线浓度范围
要合适
(预BE有帮助)

- 如在样品分析前，已知或预期试验样品中的分析物浓度范围窄，则推荐缩窄标准曲线范围，调整质控样品浓度，或适当加入质控样品新的浓度，以充分反映试验样品的浓度。
- 如果很多试验样品的分析物浓度高于定量上限，在可能的情况下，应该延伸标准曲线的范围，加入额外浓度的质控样品或改变其浓度。

质控

- 至少 2 个质控样品浓度应该落在试验样品的浓度范围内。

重新验证

- 如果标准曲线范围被改变，则生物分析方法应被重新验证

样品的重新分析 (REASSAY)

计划 与报告

- 应在样品分析计划或标准操作规程中预先确定重新分析试验样品的理由以及选择报告值的标准
- 在试验报告中应该提供重新分析的样品数目以及占样品总数的比例

合理 重新分析

- 校正标样或质控样品的准确度或精密度不符合接受标准，导致一个分析批被拒绝；
- 内标的响应与校正标样和质控样品的内标响应差异显著；
- 进样不当或仪器功能异常；
- 测得的浓度高于定量上限，或低于该分析批的定量下限，且该批的最低
- 浓度标样从标准曲线中被拒绝，导致比其他分析批的定量下限高；
- 在给药前样品或安慰剂样品中测得可定量的分析物；
- 色谱不佳

不合理 重新分析

- 对于生物等效性试验，通常不能接受由于药动学理由重新分析试验样品

样品的重新分析报告

由于给药前样品阳性结果或者由于药动学原因进行重新分析的情况下

- 应该提供重新分析样品的身份、初始值、重新分析的理由、重新分析获得值、最终接受值以及接受理由。

在仪器故障的情况下，如果已经在方法验证时证明了重新进样的重现性和进样器内稳定性，则可以将已经处理的样品重新进样。

- 但对于拒绝的分析批，则需要重新处理样品。

再现性检测 (ISR) 和重新分析 (REASSAY) 的区别

ISR (Incurred Sample Reanalysis)

评价分析方法和结果重现性
选取10%的试验样本进行再分析（如总样本数超过1000，超过部分的样本分析5%）。
ISR样本分析结果与原分析结果需在20%误差以内（2/3的ISR样本数需达到这个接受标准）

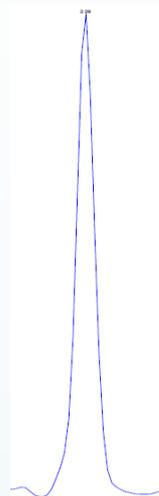
ISR分析结果单独列表。
作为重现性评估，不能取代原始结果
如ISR不通过，需要调查。
方法可能需要改进并重新验证，样品重新分析。

Reassay

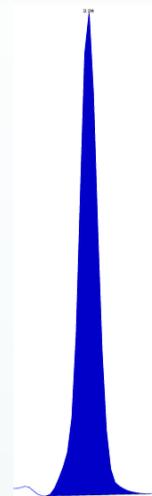
原始分析批失败或其他原因导致结果不能接受，
需要Reassay

前提是没有可接受的原始结果。除非有充分理由，
一般不能随便Reassay

色谱图积分



Chromatogram
(raw output)



Peak Integration

- 使用统一的或至少同一个分析批应使用一致的色谱积分方法
- 不建议或尽量减少对单个样品色谱图改变参数积分
- 在重新积分的情况下，记录原始和最终的积分数据，并在要求时提交

分析报告

附上100%色谱图

失败的分析批；
对分析计划，方法或标准操作规程的偏离；
样品重新分析结果；
试验样品再分析的结果（ISR）。

对照标准品；
校正标样和质控样品的储存条件；
分析批的接受标准，引用特定的试验计划或标准操作规程；
样品踪迹（接收日期和内容，接收时样品状态，储存地点和条件）；
试验样品分析：所有分析批和试验样品列表，包括分析日期和结果；所有分析批的标准曲线结果列表；所有分析批的质控结果列表；

➤ 生物分析常见问题

- 测母药还是代谢物（一般测母药）
- 标准曲线浓度范围不合适
- 国内绝大多数实验室基本上不使用同位素内标
- 空白基质无合法来源和记录
- 样品运输无温度追踪记录。
- 全血稳定性：国内实验室很少做全血稳定性
- 基质效应：溶血相关的基质效应，国内实验室很少考察

生物分析常见问题

- 分析方法所用基质和抗凝剂与临床试验样本不符
- 方法重现性结果不好
- 稳定性数据不能支持试验需要
- 标准品CoA不合规
- 分析方法和临床采集条件脱节
- 样本管理不严格
- 缺乏GLP质量管理体系管理。没有专职QA

真实完整性为重点

- 具备与试验项目相适应实验室检测设备与条件
- 组织架构
- 项目人员培训记录
- 关键实验设备、仪器应有相关维护记录。
- 源计算机和工作站的稽查系统（audit trail）。
- 检测记录的真实完整性：
 - 完整的原始记录；核实记录的完整和原始性。
 - 实验与方案一致，原始数据与总结报告一致。
 - 血药浓度数据与对应标准曲线计算的一致性；
 - CFDA可能现场重新计算用以核查试验数据的真实性。

核查暴露的普遍问题

- 原始记录缺失。
- 分析测试系统无稽查轨迹。
- 隐瞒弃用试验数据。
- 修改调换试验数据。
- 分析测试过程不完整。随意更改且无法追溯；样品序号无法追溯到实际受试者血样点
- 瞒报修改试验数据。检测原始记录本中的记录与稽查轨迹记录不符。
- 方法验证更改系统日期并重复检测
- 样本分析更改系统日期并重复检测……

生物分析注意事项

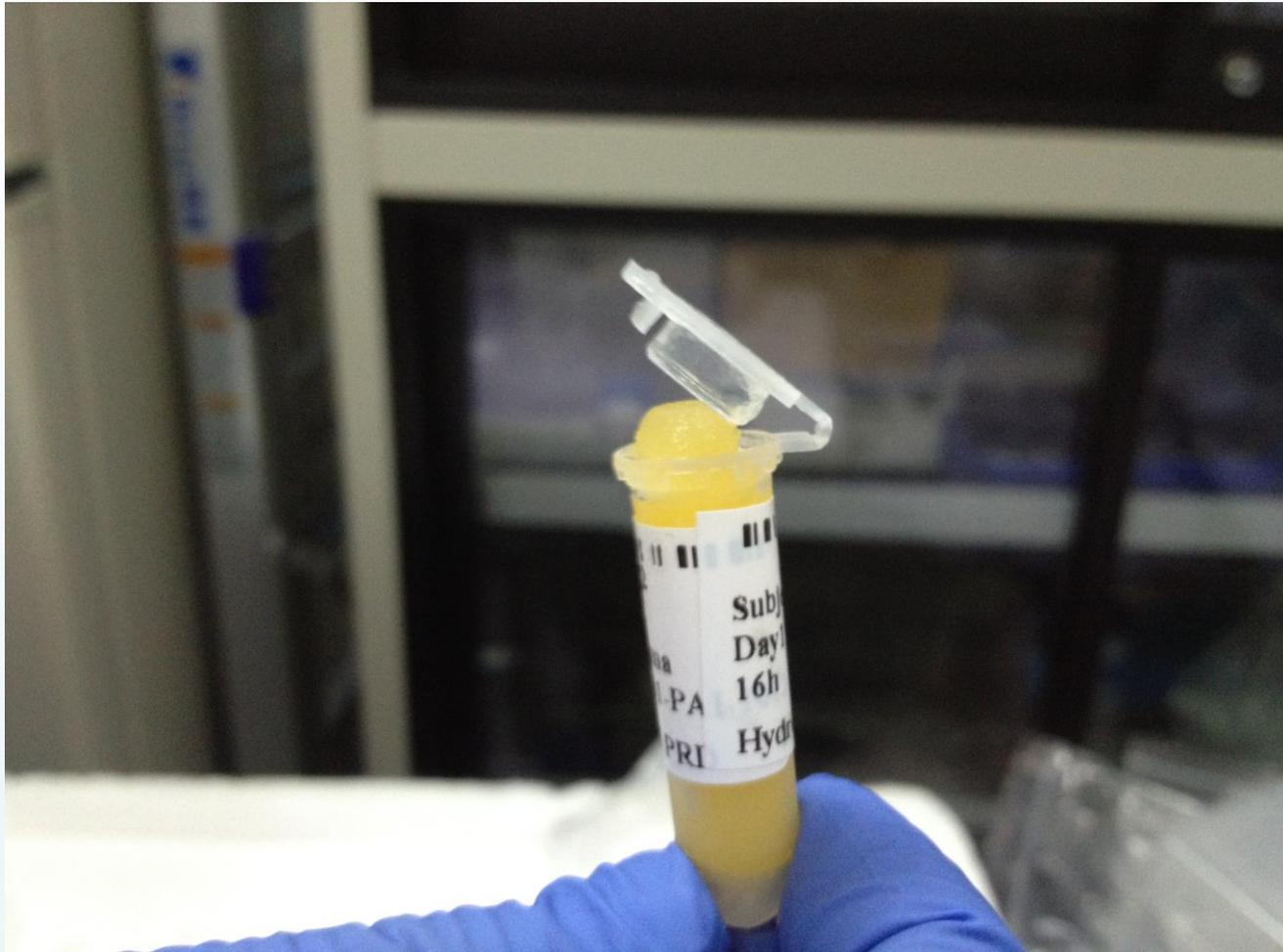
- ✓ 样本分析与方法验证时的表现是否一致
- ✓ 样本中未知代谢物、制剂和基质干扰
- ✓ 样品收集管和保存管质材料是否与方法一致
- ✓ 临床血样收集和处理是否在方法所验证的稳定性范围
- ✓ 来自同一病人的所有生物样本是否在同一批次分析完成
- ✓ 标准曲线和QC浓度及数量。如需要，可视样本浓度范围作相应调整
- ✓ 内标响应在整个Run内是否基本一致
- ✓ 样本分析重现性要求（ISR）
- ✓ 建立足够的稳定性确保所有样品分析结果有效

临床和生物分析关联

临床样本常见问题

- ❑ 采血条件（包括抗凝剂和采血）与分析方法不一致
- ❑ 采集血样没有冰浴。离心机不能控温。时间没有控制
- ❑ 采血和离心地点相隔远，无法保证温度和时间要求
- ❑ 样本标签没有贴好
- ❑ 所用标签和标签笔不合要求
 - ❑ 标签易脱落
 - ❑ 样品冻融时标签笔迹变模糊
- ❑ 溶血现象严重
- ❑ 临床冰箱温度和条件限制

收到样本后：WHAT'S WRONG?



WHAT'S WRONG?





Thank you!