

# 非临床研究中大分子生物分析方法验证报告审核方法

王丽, 王勇\*, 杨昌雄 (益诺思生物技术南通有限公司, 南通 226133)

**摘要** 目的: 掌握大分子生物分析方法验证报告审核的方法和原则, 确保验证报告的科学性、合规性和完整性。方法: 将完整的生物分析方法验证报告和原始记录拆分为原始记录、数据及数据处理、验证报告, 分别对三部分进行全面系统性审核, 最后将审核的结果进行分析和汇总。结果与结论: 通过系统性的审核, 熟练掌握审核的方法和要点, 提高大分子生物分析方法验证报告的审核效率, 提升报告质量, 满足机构SOPs和国内外法律法规的要求, 推进客户药物研发和申报进程。

**关键词:** 大分子; 生物分析方法验证报告; 药物非临床研究; 审核; 数据

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)04-0399-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.04.005

## Audit Method for Validation Report for Macromolecule Bioanalytical Method in Nonclinical Laboratory Studies

Wang Li, Wang Yong\*, Yang Changxiong (Innostar Bio-tech Nantong Co., Ltd., Nantong 226133, China)

**Abstract Objective:** To master the methods and principles of report audit of macromolecule bioanalytical method validation in order to ensure scientificity, compliance and integrity of the validation report. **Methods:** The complete validation report of bioanalytical method and the original records were divided into three parts: original records, data and data processing and validation report. After the three parts had been comprehensively and systematically reviewed, the audit results were analyzed and summarized. **Results and Conclusion:** Through systematic audit, the audit methods and the key points are mastered and the audit efficiency and quality of the validation report for macromolecule bioanalytical method are improved so as to meet the requirements of SOPs, domestic and foreign laws and regulations and promote the proceeding of drug R&D and application.

**Keywords:** macromolecule; validation report for bioanalytical method; nonclinical laboratory study; audit; data

随着生物技术的发展, 生物大分子药物因其分子量大、靶点作用明确、易在体内降解等优点成为最有发展前景的领域之一, 此类药物的研究也随之变得越来越重要<sup>[1]</sup>。药物非临床研究机构紧随时代发展趋势, 有些机构甚至设立独立

的大分子分析部门。为了定量测定生物基质(如全血、血清、血浆、尿)中的生物大分子(蛋白质、DNA、大分子药物和代谢产物等)药物浓度, 且测量的目标浓度通常非常低, 常低于纳克每毫升的浓度范围, 有些高效药物甚至达到皮克

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设(编号 BM2021002)

作者简介: 王丽 Tel: (0513) 80180668; E-mail: lwang-1@innostar.cn

通信作者: 王勇 Tel: (0513) 80180210; E-mail: ywang@innostar.cn

每毫升的水平<sup>[2-3]</sup>，所以，生物分析作为药物非临床机构中重要且严格的一环应得到高度重视。那么，质量保证（Quality Assurance, QA）人员需要从哪些方面来审核大分子生物分析方法学验证报告及原始数据，确保其符合机构标准操作规程（Standard Operating Procedures, SOPs）和方案的要求，满足药物非临床质量管理规范、生物分析方法学验证指导原则等国内外法律法规的要求，为药物非临床研究机构提供科学、严谨、高质量的大分子生物分析方法学验证报告，推进客户药物研发和申报进程。带着这样目的和想法探讨QA人员审核全面验证的大分子生物分析方法学验证报告和原始记录的方法和思路，为更有效率、更高质量地审核报告提供帮助。

## 1 研究内容

一份完整的验证报告，首先需要有一份完整的验证方案，而往往方案的内容是否全面、操作是否可行直接影响验证的实施。所以，QA需要对验证的方案进行细致的审核。大分子生物分析一般采用的是配体结合的方法，根据指导原则的要求，配体结合完整验证项目包括特异性、选择性、标准曲线、定量范围、准确度、精密度、稀释线性、平行性和样品稳定性等<sup>[3-6]</sup>。在仔细阅读指导原则的基础上，将方案中验证项目的要求与指导原则的要求进行一一核对。例如，在看标准曲线时，先看设立标准曲线的方式，因大分子标准曲线的响应和浓度之间的关系通常是由四参数、五参数或其他合理的模型进行拟合，标准曲线至少是由6个浓度水平的校正标样建立的，包括定量下限（Lower Limit of Quantitation, LLOQ）和定量上限（Upper Limit of Quantitation, ULOQ），加上一个空白样品。空白样品不参与校准曲线参数的计算。可以使用浓度低于LLOQ和高于ULOQ的锚定点校正样品来改善曲线的拟合。接下来看标准曲线的操作要求，指导原则上规定应在不同天内评估至少6个独立批次的校准曲线，以考察批与批之间的差异。最后看标准曲线的接受标准，指导原则上规定，每个校正标样回算浓度的准确度和精密度满足：LLOQ和ULOQ水平的校正标样准确度和精密度在标示值的 $\pm 25\%$ 范围内，其他浓度水平的校正标样准确度和精密度在标示值的 $\pm 20\%$ 范围内。在不包括锚定点验证样品的情况下，应至少有75%，且至少6个浓度水平的校

正样品（包括LLOQ和ULOQ）符合上述标准。锚定点校正样品因超出标准曲线的定量范围不需要满足上述标准<sup>[3-6]</sup>。所以，方案需满足指导原则的要求，列出验证的内容、操作和接受标准。当然，方案的接受标准可以根据试验的具体情况不得低于指导原则的要求。类似的，其他验证项目参考标准曲线的要求与指导原则进行核对。

当收到一份完整的生物分析验证报告和原始记录后，其验证项目较多、持续时间较长（长期稳定性的验证可能会持续6个月，甚至更长），所产生的原始记录和数据会很多。首先，可以将收到的验证报告和原始数据根据资料产生的先后顺序分成三个方面：原始记录、数据及数据处理、总结报告；接着，根据数据产生的先后顺序，分别对原始记录、数据及数据处理、总结报告进行单独的系统性审核；最后，将三方面的审核结果进行分析和汇总，及时将审核结果汇报给验证负责人以便沟通整改。由于三方面数据来源不一样，审核的方法和思路各异，接下来详细描述每一方面具体的审核思路。

### 1.1 原始记录及相关审核

原始记录主要包括：a) 验证用到的标准品、验证所需试剂、空白基质等的接收、分装（若有）、分发、配制（使用）、处置记录；b) 根据验证项目和验证方法进行验证操作所产生的记录。

#### 1.1.1 标准品审核

标准品用于标准曲线和质控样品的配制，每个分析批都包含一套独立的标准曲线和质控样品，所以，验证的每个分析批都会用到标准品。使用的频率之高，产生的原始数据也较多，因此以标准品为例进行审核，其他试剂和空白基质的审核方法可以参考标准品的审核，就不在此赘述。标准品的审核方法：a) 标准品接收记录。标准品接收记录需与质检报告（Certificates of Analyses, CoA）副本或同等证明性文件一致，CoA上至少包括名称、批号、数量、来源、质量（包括纯度）、储存条件和有效期/复检期等信息<sup>[4,7]</sup>；b) 标准品分装记录。有时，为了操作和使用的方便，将接收到的整批标准品进行分装。分装操作需有记录，记录上应体现分装的数量和分装流水号，分装记录上标准品储存条件和有效期等信息应与分装前一致，每次存取使用需有相应记录；c) 标准品分发记录。根据验证

项目的计划,在进行验证操作之前,按需领取标准品。在审核标准品分发数量与分发日期和时间时,需与相应的验证操作记录联系起来审核;d)标准品的配制记录。根据验证方案和分析方法的要求,需将标准品配制成目标浓度的储备液。审核储备液配制记录时,检查标准品使用是否正确、称量使用的天平是否校准合格、称量的计算公式是否与方法一致等。为方便验证操作,必要时,将储备液分装后使用。储备液记录可按照分装、分发、配制(使用)、处置的过程进行审核,审核方法参考标准品从分装到处置的流程;e)标准品处置记录。记录

上剩余的标准品数量是否准确,处置的方式是否与SOPs的要求一致。标准品审核流程详见图1。

总之,标准品、试剂、空白基质等均可按照其接收、分装、分发、配制、处置先后流程进行审核。值得注意的是,当试剂或标准品配制后,需重新定义其批号和有效期,必要时需有验证数据或相应SOPs来支持其有效期。在审核过程中,要注意批号、有效期前后的一致性,使用的数量前后匹配,时间逻辑连贯,有任何疑惑的地方可及时与相关操作人员或验证负责人沟通。

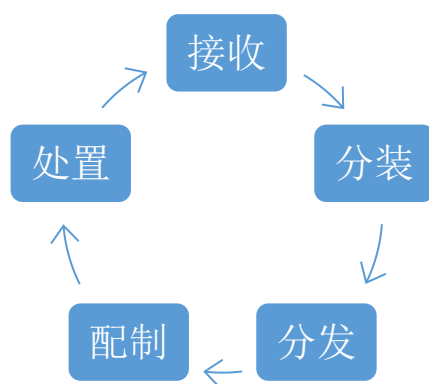


图1 标准品审核流程

### 1.1.2 验证记录审核

标准品、试剂、空白基质的原始记录审核完成后,接下来审核验证操作记录。根据指导原则的要求,大分子生物分析方法验证一般采用配体结合方法,该法最常使用的是微孔板,1个微孔板通常为1个分析批。每个微孔板包含1套独立的标准曲线和质控样品,以校准板间差异。所有样品均复孔测定。1个分析批包括1个空白样品、至少6个浓度水平的校正样品和至少3个水平的质控样品(低、中和高)各2套,以及待验证样品。空白样品不纳入标准曲线参数的计算中。质控样品分散在分析批中,且能够覆盖所有试验样品,以确保整个分析批的准确度和精密度符合要求<sup>[3-5]</sup>。审核验证记录时,首先,审核分析批使用的标准品、质控样品、试剂、空白基质等批号、有效期等信息与上述的原始记录是否一致,使用的数量是否符合验证的要求;其次,审核标准曲线和质控样品的浓度是否与方法一致,配制的份数是否与方法要求一致,样品的配制是否与验证目的一致;再次,审核试验的操作步骤、加样的先后顺序、加样的量及温育的时间

是否与方法一致,使用的仪器是否在校正有效期内;最后,将所有批次审核之后,再次确认验证的项目是否全面,是否满足方案的要求。

### 1.2 数据及数据处理的审核

根据方案要求及上述试验操作,仪器会自动产生相应批次的原始数据。首先需要看数据是否完整,产生的多批次数据是否覆盖方案要求的所有验证项目,是否有遗漏验证项目的情况,特别对于新手来说,会有遗漏可能性,这就属于数据的完整性出了问题。接下来看每个分析批标准曲线是否符合接受标准,对于每个分析批,除锚定点外,标准曲线须有75%以上的校正标样(至少6个)回算浓度在标示值的 $\pm 20%$ (LLOQ和ULOQ为 $\pm 25%$ )范围内。如果设置超过6个校正标样,且其中1个标样不符合接受标准,则应拒绝该校正标样,应剔除该校正标样后对标准曲线进行重新评估并再次进行回归分析。如果校正标样的LLOQ不符合要求被拒绝,则此分析批新的定量下限为标准曲线可接受的次低浓度的校正标样。如果校正标样的ULOQ不符合要求被拒绝,则该分析批新的定量上



限为标准曲线可接受的次高浓度的校正标样。修订后的LLOQ和ULOQ校正标样将保持原来的接受标准（即 $\leq 20\%$ ）。修订后的标准曲线校正范围必须涵盖所有质控样品（低、中、高）。超出修订后标准曲线校正范围的试验样品应重新进行分析<sup>[8]</sup>。按照上述要求，对每个分析批的标准曲线进行审核。然后，再看质控样品是否满足接受标准。每块板至少67%的质控样品应符合准确度在 $\pm 20\%$ 范围以内，精密度不超过20%的标准，且每一浓度水平的质控样品中至少50%符合上述标准<sup>[3-6]</sup>。标准曲线和质控样品符合接受标准的分析批，该批的验证样品产生的数据才可用于分析。大分子生物分析方法学验证因分析批多，涉及较多的数据计算和统计，QA应重点关注这些数据的处理过程<sup>[9]</sup>。一般情况下，使用验证过的Excel对数据进行处理。首先，QA需审核录入Excel的原始数据是否正确。原始数据的正确性是数据处理的前提。有些机构原始数据输入Excel后，先由部门内部对输入的数据进行检查，而后递交至QA，QA在时间允许的情况下对数据进行反复审核<sup>[10]</sup>。其次，审核数据处理过程是否与方案和方法一致，包括公式的使用、公式中的源数据和数据结果的保留方式等，并做好相应的记录。数据和数据处理的审核不是很难，就是数据量大、公式多，需要仔细耐心地把这些数据以及数据处理过程与原始数据和方案要求的处理过程一一核对。数据和数据的处理对整个验证的结果至关重要，所以QA要认真、仔细地核对，避免出错并保留审核的记录。

### 1.3 验证报告的审核

验证报告是通过提供明确的结果和易于理解的表格，以及简短的文字来解释验证方法和程序，真实完整地记录验证的过程<sup>[2]</sup>。原始记录和数据与数据处理审核后，验证报告的审核就容易多了。验证报告的内容一般包括：验证结果概要、所用分析方法的细节、摘要叙述分析步骤（分析物、内标、样品预处理、提取和分析）、对照标准品（来源、批号、分析证书、稳定性和储存条件）、校正标样和质控样品（基质、抗凝剂、预处理、制备日期和储存条件）、分析批的接受标准、分析批（所有分析批列表，包括校正范围、响应函数、回算浓度、准确度；所有接受分析批的质控样品结果列表；储备液、工作液、质控在所用储存条件下的稳定性数

据；选择性、定量下限、残留、基质效应和稀释考察数据）、方法验证中得到的意外结果和采取措施的理由、对方法或对SOPs的偏离<sup>[3]</sup>。将验证报告中的信息与审核后的原始记录、数据、方案及方法进行一一核对。当发现不一致时，需及时做好记录并进行确认。

上述三方面审核结束后，质量保证部门（Quality Assurance Unit, QAU）对审核发现进行汇总并形成完整的审核记录和审核报告。QAU审核是确保验证报告正确地描述所采用的方法和准确反映原始资料。书写审核报告时，需真实体现审核结果中与方案、方法、SOPs、原始记录和数据不一致的方面，不能以任何方式对原始资料进行解释<sup>[11]</sup>。将审核报告通过邮件发送给验证负责人，并抄送给机构负责人<sup>[12-14]</sup>。若是存在问题的报告，验证负责人需在规定的时限内进行整改，整改后需由QA进行确认直到所有回复均关闭。验证负责人需将检查中发现的问题全部进行整改后，将检查记录及报告与QA再次确认无问题后，可以签发验证报告，并及时归档。原始记录体现验证的操作过程，操作的正确与否决定后面数据是否可用，而数据和数据的处理是验证报告的关键。这三方面紧密联系，对每一个方面都需要进行系统性的审核，确保整个验证的完整性和合规性。当然验证还会涉及到人员的资质、操作的环境、设备设施的校准、计算机系统和电子数据的管理等方面，这些可以在验证现场检查或基于设施的检查时进行。

## 2 结语

随着药物技术的不断发展，大分子药物因其自身优点越来越受到欢迎。如何准确测量出血液中或组织内药物的浓度，是新药研发中至关重要的环节。严谨、高质量的验证过程为大分子药物体内代谢的检测提供了科学依据，QA规范、细致、严谨和科学的审核过程，为提供高质量的大分子生物分析验证报告保驾护航。

### 参考文献：

- [1] 宋媛媛, 石远凯. 生物大分子药物定量检测研究现状[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(17): 2004-2007.
- [2] 李文魁, 张杰, 谢励诚. 液相色谱-质谱(LC-MS)生物分析手册: 最佳实践、实验方案及相关法规[M]. 北

- 京：科学出版社，2017：3.
- [3] 中华人民共和国药典：四部[S]. 2020：466-471.
- [4] Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [S]. 2018.
- [5] European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation[S]. 2012.
- [6] 张双庆，范玉明. 大分子生物药物生物分析方法验证——解读欧洲药品管理局指导原则[J]. 国外医药抗生素分册，2012，33（5）：199-203.
- [7] OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 19, Advisory Document of the Working Group on Good Laboratory Practice on the Management, Characterisation and Use of Test Items [S]. 2018.
- [8] ICH. ICH协调指导原则：生物样品分析方法学验证M10（草案）[S]. 2019.
- [9] 雷博婷，程峰，岑小波. 浅析GLP环境中QA对方法学验证的检查[C]//中国毒理学会毒理研究质量保证专业委员会，中国药学会药物安全评价研究专业委员会，中国药理学会安全药理专业委员会，等. 2017年（第七届）全国药物毒理学年会论文集，2017.
- [10] 宗英，张晓芳，陆国才，等. 质量保证在长期毒性试验原始资料查核中的关注点[J]. 中国新药杂志，2011，20（20）：1946-1948.
- [11] 张海艇，刘姝，刘兆平. GLP试验总结报告书稽查（Study Audit）要点[J]. 毒理学杂志，2007，21（4）：290-291.
- [12] 国家食品药品监督管理总局. 总局令第34号 药物非临床研究质量管理规范[S]. 2017.
- [13] Food and Drug Administration. 21 CFR Part 58: Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies [S]. 2005.
- [14] OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (As Revised in 1997) [S]. 1998.

（收稿日期 2021年11月10日 编辑 邹宇玲）