

• 安全性评价 •

新药生殖发育毒性安全性评价的仪器确认要点

郭 隽, 刘晓萌, 耿兴超, 谢 寅, 李芊芊

中国食品药品检定研究院, 国家药物安全评价检测中心, 北京 100176

摘要: 围绕药品非临床研究质量管理规范 (GLP) 体系下生殖发育毒性评价所使用仪器确认展开讨论, 提供开展仪器确认所需要的关键事项: 根据研究目的, 选取合适种属的实验动物; 动物数量应满足统计学需求; 准确选取实验受试物, 购入标准品或阳性药物; 确定实用性强、干扰因素少的确认方法; 把握实验关键点、排除其他因素对确认的干扰; 建立准确度高可重现性好的评价标准; 根据实验室基本情况以及研究目的, 在标准作业程序 (SOP) 中规定不同仪器确认所需要的周期。现有生殖毒性仪器确认规范性、标准化成为实验室管理的新难点, 需要努力推进其标准化规范化进程。

关键词: 新药评价; 仪器验证; 生殖毒性; 发育毒性

中图分类号: R994.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2014) 05 - 0437 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.05.014

Equipment qualification for evaluation of reproductive and developmental toxicity of new drugs

GUO Jun, LIU Xiao-meng, GENG Xing-chao, XIE Yin, LI Qian-qian

National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: This paper focused on how to successfully carry out equipment qualification of nonclinical reproductive toxicity study on drugs. The following issues are principally argued. Select the appropriate species of laboratory animal; Animal number should meet the statistical requirements; Accurate selection of experimental subjects; Determine the practicability and less interference verification method; Grasp the key points and the exclusion of other factors interference to verify accuracy; A high reproducibility of the evaluation criteria; According to the basic situation of laboratory and research, regulate the cycle of different instrument validation required in SOP. The evaluation system still have some disadvantages, and the reliability of performance has become a new problem of laboratory management.

Key words: evaluation on new drugs; equipment qualification; reproductive toxicity; developmental toxicity

人工操作的生殖发育毒性评价在药物安全性评价中占有重要的比重, 但存在测定方法未能形成标准化、检测结果干扰因素多、客观性不强、结果误差较大等不足, 给新药非临床生殖发育毒性安全性评价的规范化建设带来较大困难。随着我国药品非临床研究质量管理规范 (GLP) 的飞速发展和硬件的改善, 自动化的仪器普及程度的提升, 专业化仪器逐步被引入生殖发育毒性评价体系中, 以便更加客观准确的逐步替代人工评价。传统 3 阶段生殖发育毒性评价中, 除 II 段生殖毒性外, I、III 段实验均需要引入仪器进行参与。在 I 段生殖毒性研究中,

以全自动精子分析仪替代人工技术, 计算出精子运动率。III 段实验中, 则需要穿梭箱、自主活动测试仪、水迷宫等仪器, 以评价子代的学习记忆力^[1-3]。

然而目前我国 GLP 研究机构中对生殖发育毒性所需仪器设备确认的仪器确认 (equipment qualification, EQ) 工作各自为政, 缺乏统一的管理、认证和实验室间质量控制体系, 其规范性与国际先进实验室相比仍存在较大差距。为了证明仪器与预期用途相适应, ISO17025 中规定从事检测工作的实验室应选用适宜的仪器设备并经确认, 特别是设备在投入服务前应该校准或测试, 必要的情况下还应

收稿日期: 2014-07-02

作者简介: 郭 隽 (1979—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为药物安全性评价。Tel: (010)67872233-8201 E-mail: june_guo@163.com

开展核查^[4]。国家药监局在2007年印发的《药物非临床研究质量管理规范认证标准(280条)》中将仪器确认作为检查内容^[5]。本文探讨开展新药生殖发育毒性评价中所使用仪器的规范化建设,为了提升GLP规范性建设水平、进而最终实现与国际GLP生殖发育毒性评价的接轨提供依据。

1 仪器验证的GLP要求

被广泛采纳和应用的仪器验证一般包括设计验证、安装验证(IQ)、操作验证(OQ)和性能验证(PQ)。安装验证一般在新仪器安装或已有仪器搬迁时进行,对于GLP实验室管理的所有仪器基本上都需要进行安装验证。仪器的定期核查又称操作验证,主要是定期验证仪器的关键性能参数指标是否正常运行:仪器是否能按预期或说明书所述运行以及运行效果如何,特别是测试仪器的极限范围,如最高允许速度、最低检测浓度等。性能验证的关注点为实验结果的准确度(偏倚)、稳定性、测试的适用性(灵敏度、测试范围是否满足实际需要、操作或处理过程是否对测试结果有影响)等^[6-8]。

在一般实验室管理中,仪器的安装验证、操作验证往往由仪器供应商在仪器安装时提供,并出具检测报告。部分厂商同时提供性能验证的验证报告。但是在日常使用过程中,往往忽略了对仪器性能验证的管理,仪器安装调试后的3Q(IQ、OQ、PQ)报告被无限期使用。对于部分老旧设备,特别是一些无法联系到供应商的年代久远的进口仪器,其3Q验证更是被长期搁置。

对GLP实验室的要求是所有的仪器验证均应保证在GLP体系下运行,以确保其规范性。专题负责人由机构负责人任命,实验方案需要由机构负责人批准后生效,质量保证部门方案的审定、实验操作、总结报告书的批准全部过程,实验的原始数据的记录以及原始资料的存档均需要按照GLP进行规范化管理^[9]。

1.1 评价体系与评价标准的建立

评价标准是仪器验证中最为重要的环节,标准过于宽松,则可能漏掉仪器的性能故障;评价标准过于严苛,则可能导致正常仪器无法正常应用于GLP实验研究。仪器供应商一般可提供较为完整的安装验证、操作验证方法以及评价标准,但是对于仪器的性能验证标准则较为缺乏或难以标准化。

以全自动精子分析仪为例,对大鼠精子进行动力学检测,根据公式对平均路径速度(average path

velocity, VAP)、运动直线速度(straight line velocity, VSL)、运动曲线速度(curvilinear velocity, VCL)等指标进行人工计算,比较人工计算的结果是否与计算机基本一致,以验证软件显示的浓度、VSL、VCL值等是否准确。

以穿梭箱实验性能验证为例,将大鼠置于穿梭箱,记录遭受电击的次数(被动回避的次数),该值与设定循环次数之差即为主动回避次数。其最终判定标准为通过研究,寻找一只完全学会全部步骤的实验大鼠,让该大鼠在每个穿梭箱进行测试实验,记录遭受电击次数、刺激时间,一一比较不同箱子的记录值,每个箱子比对差异值应小于20%。因此建立一套完善的评价标准体系,除供应商提供完善的背景数据、查阅有关文献外,还需要大量的实验探索,并参照本实验室背景数据,摸索出一套重现性好、规范化程度高的评价标准。

1.2 仪器验证的周期以及仪器验证不合格的处理

仪器的定期检查和特殊维护是GLP实验室认证细则中的重要环节,一般规定为至少每年进行1次。当仪器部件出现影响研究结果的性能改变,则需要维修和更换以确保实验研究的正常进行。关于仪器性能验证的频率,对于安装验证以及操作验证来说一般在仪器安装时进行,性能验证则需要根据仪器使用频率,在标准操作规程(SOP)中规定。在确保仪器性能稳定可靠的前提下,还要考虑节约人力物力等资源的原则。以本中心现有全自动精子分析仪SOP为例,其中规定在正式实验开展前的1年内,需要对其性能进行验证。

2 验证方法

仪器验证方法涉及到动物的选择、动物数量的选择、受试物的选择、研究方法设计、关键点控制等5方面内容。

2.1 动物的选择

根据实验本身特点,选定合适的动物是实验设计首要考虑的问题。选取的原则为,与GLP常规生殖发育毒性研究选取同一种属的动物,如全自动精子分析仪,根据药物生殖毒性指导原则要求,I段生殖毒性研究一般选用大鼠,因此在验证时针对TOX IVOS开发的大鼠精子分析软件,则必须选取大鼠作为研究对象。如果可选多个种属的动物进行研究,则选择容易获取、成本最低的动物。以自主活动监测系统为例,在日常研究中可应用于大鼠、小鼠两种动物,在验证时可根据研究目的,以及实

实验室现有条件, 选择合适种属进行, 不在 b 类 SOP 中做特别规定。

2.2 动物数量的选择

动物数量的选取应满足结果判定时的统计学要求, 根据不同仪器选择不同数量动物。以全自动精子分析仪为例, 对大鼠精子进行浓度及动力学检测, 根据公式对 VSL、VCL 等指标进行人工计算, 比较人工计算的结果是否与计算机基本一致, 以验证软件显示的浓度、VSL、VCL 值等是否准确。

根据供应商提供的背景资料以及其验证原理, 性能验证中选取 1 只动物与选取更多动物相比较, 从统计学上无法证明动物数越多, 其研究结果更为准确, 因此基于动物福利以及动物伦理的考虑, 需要在验证中尽量节约动物。然而动物数仍然是影响验证结果的重要因素, 以自主活动监测系统为例, 动物的行为存在随机性和偶然性, 则需要大量数据以减少系统误差。笔者所在的研究中心在参考文献以及本实验室背景数据后, 进行一系列探索后发现, 该研究的动物数量一般不少于 20 只。

2.3 受试物的选择

根据实验目的, 需要选择是否对验证模型进行给药处理, 或者寻找相应标准物质对仪器进行性能验证。以全自动精子分析仪为例, 分别取 18、35 mol/mL 两个浓度的 accu-beads 进行测定, 每个浓度的标准品取样两次, 分别测定, 并计算其浓度的均值, 与标准值进行比较。该标准物质由仪器供应商提供, 便于对该指标进行客观检测。此外, 可以根据实验目的, 选取阳性受试物, 以自主监测系统为例, 可选择激发自发行为或者抑制自发行为的阳性药物, 更灵敏的反应仪器是否可以准确记录动物自发行为的变化。如氯丙嗪, 可作为一种抑制动物自发行为的阳性药物, 通过仪器记录的给药组与对照组自主活动行为的变化, 更加有效地反映仪器性能。

2.4 研究方法的设计

研究方法的设计是整个验证环节中关键的一环, 直接决定能否得到预期数据。拿穿梭实验来说, 以笔者所在的研究中心自主活动监测系统的性能验证为例, 最初的实验设计中包括以下两个部分: (1) 开机后用手在仪器待测位置晃动 3 次, 查看仪器显示记录的自主活动次数。对照实际晃动次数与仪器记录次数是否一致。(2) 20 只动物在每个时间点均分成 1 轮测定, 每轮 1 只, 依次测定。去除饲料和水瓶, 每盒 1 只, 置于待测位置, 环境适应 5 min,

然后记录各只小鼠在 5 min 内的自发活动次数, 全部实验依次类推进行。

然而在实际操作中发现, 用手在仪器待测位置晃动 3 次后, 查看仪器显示记录的自主活动次数与实际数值偏离较大, 其原因为仪器传感器灵敏度高, 对于人手不可察觉的抖动, 也都记录了其抖动的次数。因此在实验设计中, 需要考虑仪器本身的设计, 排除对验证影响较大的因素, 从而得到客观的验证数据。同时需要考虑动物本身节律, 最好保证动物在同一时间段内进行自主活动检测, 排除昼夜节律或者疲劳等因素对动物的影响。

2.5 关键点控制

以穿梭箱实验的操作验证为例, 需要确认关键控制点和警戒的操作条件并记录, 主要关键点包括电流设置、人员安全、设备运行后的各项输出参数。在研究过程中需要记录实施过程的任何偏差, 内容包括可接受标准的正当性和对操作的影响。完成验证操作并可达验证所需的各项要求; 如未能达到, 应进行记录并执行适当的解决办法, 或者根据具体情况确定其可被接受。

3 结语

通过上述分析, 发现目前我国 GLP 研究机构中对生殖发育毒性所需仪器设备的仪器确认工作还存在很多问题, 需要大家在实际工作中不断总结经验, 共同解决。

3.1 存在的问题

目前我国 GLP 研究机构中对实验过程中的仪器设备确认仍未引起足够的重视, 缺乏统一的管理、认证、室间质量控制体系以及规范性, 关于仪器确认所需要的标准以及标准化方法均十分匮乏, 与国际先进实验室相比存在较大差距。

由于缺乏标准化体系及指导原则, 现有的仪器确认体系, 均基于供应商提供的参考方法以及各实验室探索的方法, 因此造成了确认方法的可重复性较差, 影响了生殖毒性实验室仪器确认推广的进程。由于没有标准化体系可遵循, 对于某些特定仪器, 其确认标准的判定较为困难, 一般依靠实验室的背景数据的积累。然而对于刚刚起步而缺乏背景数据的实验室来讲, 推广这项工作则难度更大。

3.2 解决对策

自动化仪器在新药生殖发育毒性安全性评价中的比例逐步增加, 其性能的可靠性成为实验室管理的新难点, 因此建立健全仪器确认评价体系, 制定

仪器确认的指导原则与行业标准, 仪器生产厂商与各实验室间进行合作共同促成仪器确认流程的规范化。针对不同仪器型号仪器确认中的差别, 应该制定具有宏观性的指导原则, 以消除不同品牌对仪器确认造成的差异。因此, 仪器供应商以及各实验室间应建立良好的合作体系, 共同推动生殖发育毒性实验中的仪器确认工作。推广实验室仪器确认标准化体系及方法, 推动实验室仪器确认方法的规范化, 是下一步努力的目标。

参考文献

- [1] 《药物生殖毒性研究技术指导原则》课题研究组. 药物生殖毒性研究技术指导原则 [S/OL]. (2006-12-09)[2014-06-02]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1616/83445.html>.
- [2] 韩 铁, 吴纯启, 廖明阳. 生殖毒性试验的质量保证 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(12): 941-945.
- [3] 孙祖越. 新药临床前生殖药理毒理学规范性评价体系
- 的建立和应用 [J]. 中国科技成果, 2010, 15: 66-67.
- [4] International Organization for Standardization. ISO/IEC17025: General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories. [EB/OL]. (2005-01-01)[2014-06-02]. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=39883.
- [5] 吕会田. GLP 条件下实验仪器的验证和管理 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 28(3): 457-458.
- [6] 国家食品药品监督管理局. 药物非临床研究质量管理规范认证管理办法 [EB/OL]. (2007-04-06)[2014-06-02]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0058/9357.html>.
- [7] 杨琛懋, 马 璟. 关于 GLP 实验室仪器验证的探讨 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 285.
- [8] 于志瀛, 朱 庆, 王 焱. 浅谈 GLP 实验室仪器设备 SOP 的制定 [J]. 中国药事, 2010, 24(2): 144-146.
- [9] 药物非临床研究质量管理规范 [S/OL]. (2003-08-06)[2014-06-02]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0053/4472.html>.