

• 综述 •

GLP 体系下体外替代技术的质量保证要点

刘晓萌^{1,2#}, 郭 隽^{2#}, 耿兴超², 谢 寅², 孙建宁^{1*}

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 中国食品药品检定研究院, 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176

摘要: 随着动物福利指导原则的提出, 大量替代方法逐步应用于药物非临床安全性评价领域。然而, 我国在药物非临床研究质量管理规范 (GLP) 中, 体外替代技术的发展仍处于起步阶段。从人员、实验设施、标准操作规程、质量保证体系、电子数据管理等方面, 阐述在 GLP 体系下如何规范替代方法, 严格控制可能影响实验结果准确性的各种主观因素, 降低实验误差, 确保实验结果的真实性, 以推动替代技术在药物非临床安全性评价中的应用。

关键词: 药物安全评价; 体外毒性; 体外替代技术; 药物非临床研究质量管理规范 (GLP)

中图分类号: R **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2015) 02-0204-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.019

Key points of quality assurance for alternative techniques *in vitro* under GLPLIU Xiao-meng^{1,2}, GUO Jun², GENG Xing-chao², XIE Yin², SUN Jian-ning^{1*}

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

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

Abstract: As *Animal Welfare Guideline* proposed, a large number of alternative methods have been applied in the non-clinical areas of drug safety evaluation. This paper describes the formation and the status quo of alternative techniques *in vitro* in China's non-clinical studies on drug law quality management standards from the views on staff, experimental facilities, standard operating procedures, quality assurance system, electronic data management. Under the GLP system, how to regulate the alternative methods and to strict the control of various subjective and objective factors that may affect the accuracy of the results, reduce experimental error, ensure the authenticity of the results are elaborated in order to promote the alternative techniques in non-clinical applications in drug safety evaluation.

Key words: drug safety evaluation; *in vitro* toxicity; alternative techniques *in vitro*; GLP

1959 年, 英国动物学家 Russell 和微生物学家 Burch 在其著作《人道实验技术原理》中首次提出了 3R 理论^[1], 即以替代 (replacement)、减少 (reduction)、优化 (refinement) 为原则。1976 年, Hughes 提出动物福利的概念, 即人类应当合理、人道的使用动物, 以确保为人类做出贡献的动物享有最基本的权利^[2]。1986 年, 欧盟实施的动物福利指导原则 (*Animal Welfare Guideline* 86/609/EC) 以及

3R 原则的提出, 促进了替代法 (Alternatives Method) 的发展。毒理学替代法的应用, 减少了动物数量、缩短实验周期并降低实验成本, 满足了日益增长的动物权益保护以及科学进步社会经济发展的需要^[3,4]。替代法的范畴涵盖测试方法, 即动物实验的减少与优化; 以及非测试方法, 及数据或同类化合物的参比等。

近年来, 国外毒理学替代法研究发展迅速, 已

收稿日期: 2014-12-30

作者简介: 刘晓萌 (1981—), 女, 助理研究员, 研究方向为药物安全性评价质量保证。Tel: (010)67872233-8202 E-mail: liuxm@nifdc.org.cn

郭 隽 (1979—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为药物安全性评价研究。Tel: (010)67872233-8201 E-mail: guojun@nifdc.org.cn

*通信作者 孙建宁, 研究员, 研究方向为中药药理学。

#共同第一作者

经涵盖多种毒性终点, 研究手段也从一般的细胞、组织培养延伸到基因组学和代谢组学。且许多替代法已通过有关权威机构的验证被欧盟、美国和经济与合作发展组织(OECD)推广应用^[4-7]。随着对替代方法的不断深入研究, 大量体外替代方法已应用于药物非临床安全性评价领域, 如应用来自胚胎或人类组织的多能干细胞、永生化细胞系或微团组织技术、低等物种如斑马鱼替代啮齿类动物等^[1,4,8], 从而重现细胞在体内的生理结构及功能, 观察药物对与体内接近的模型形态与功能的影响, 分析体外细胞早期反应预测或研究体内毒性反应的相关机理。体外替代技术在我国药物非临床安全性评价领域的应用仍处于起步阶段, 为了尽可能避免和降低试验中的各种误差, 提高生物实验的质量, 确保替代技术规范应用及推广, 本文对药物非临床研究质量管理规范(GLP)体系下开展替代法实验的质量保证要点进行讨论。

1 综合管理

1.1 实施要点

在开展实验过程中, 实施要点需与体内研究保持一致。实验人员须如实填写操作记录及获得的数据, 在发生偏离或异常情况时, 需记录并进行解释说明^[4]。实验的实施需要在质量保证部门(Quality Assurance Unit, QAU)监督下进行, QAU对正式实验的实施内容进行检查(包括操作过程、实验记录和研究数据), 并对违反规定的操作提出指责。总结报告中除包含对实验方案中实施项目实际操作过程的表述和总结外, 还应包含预实验和正式实验的数据结果及结论、偏离实验方案或可能影响研究可靠性的意外情况。总结报告书草案完成后提交QAU和机构负责人(facilities manager, FM)审核, 专题负责人(study director, SD)根据审核意见对报告书草案加以修改, 多方确认后形成总结报告书^[9-10]。

1.2 人员管理

从业人员的资质需要认定, 在考核其教育及工作背景后, 对其进行培训考核后方可开展相关工作, 良好的培训考核制度不仅能保障实验的顺利进行, 同时也利于结果的判定及统计。体外实验的判定有许多主观影响因素, 在保证结果的真实性条件下, 为了保证数据结果的准确性, 在结果判定阶段, 对于关键性数据需要复核后方可得出结论^[11]。

1.3 归档管理

研究工作结束后应将实验方案、原始资料等按

标准操作规程(SOP)的要求整理后交资料档案室, 并按SOP的要求编号归档。需要注意的是, 供试品的相关资料随项目归档, 阳性药的相关资料、使用情况也应当定期归档, 以保证评价研究的可溯性。资料档案室应有专人负责, 并且按照SOP的要求进行管理。电子数据与其他原始资料一并存档管理。

2 设施与设备

2.1 设施的管理

应保证细胞房(无菌实验室)混合气体的浓度, 检查过滤器的洁净度, 监测空气压力, 定期检查上述仪表的数值。为了保证无菌实验室的洁净度、细胞培养环境的洁净, 应当制定出入无菌实验室的SOP, 包括着装、消毒等相应要求。进行出入登记, 便于对进出人员的管理, 以保证环境洁净度及实验可靠性。对于斑马鱼等特殊模型, 需要保证其养殖环境的光照、温度、湿度, 对其水质定期检测, 并做详细记录以便追溯。

2.2 仪器设备的检定与校准

对于直接影响实验数据、实验结果的辅助性仪器, 如天平、温度计、冰箱、生物安全柜、CO₂培养箱及移液器等仪器设备应按照SOP规定定期检定或校准。属于国家强制检定目录内的仪器设备(CO₂培养箱、压力表等), 应当定期外部送检或者内部校验; 未在国家强制检定目录内的仪器(移液器等)应当定期或在每次使用前进行校验以确保其性能状态, 并做好详细的校准、维护保养记录^[12]。

仪器设备的SOP中应规定使用方法、技术指标以及校验周期和校验方式, 并根据GLP要求进行详细的使用、校验记录以及维护保养记录。

2.3 仪器设备的确认及维护

一般具有复杂功能、且用户可自行设置参数的、用于数据产生、测量、评估、处理和(或)储存的仪器设备, 如细胞因子检测的流式细胞仪、荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪等, 要求在测定和日常使用过程中需要一定的质量控制措施以保证结果的可靠性以及判断仪器的稳定性, 同时还需要进行仪器验证(Equipment Qualification, EQ), 即安装确认(IQ)、操作确认(OQ), 以及性能确认(PQ)^[12]。所采用的自动化软件应当通过国家权威部门的认证, 并配备适当的安保、追踪检查程序。超净工作台或生物安全柜是无菌操作中必不可少的设施, 应当定期(至少1年1次)进行洁净度检查, 包括粒子数和落下菌检测, 制定定期/不定期的清扫/消毒

的要求。显微镜、体视显微镜、放大镜等设施需要进行定期维护保养,并做好维护保养记录。

3 实验体系

3.1 细胞株、菌株、品系管理

引进细胞株(菌株)时应有名称、来源、日期以及引进后的保存条件等相关内容的记录。为确认菌株在引进过程中其特性是否丢失或改变,必须对引进细胞株(菌株)进行基因型及生物学特性鉴定。对筛选合格的细胞株(菌株)进行扩增,分装后置于液氮(超低温冰箱)中保存,并做好详细登记,内容应包括其来源、冻存日期、保存条件、取用记录、扩增记录等。若细胞株(菌株)在使用中出现异常,则需重新分离、鉴定。对斑马鱼等实验模型,需要对其品系做出准确标识,对其繁育过程需要系统记录,以保证品系纯正可靠。如实验操作为原代培养,则需要确保每一批次的原代细胞(胚胎)一致性,应在 SOP 中规定细胞获取时机,操作最佳时间等信息^[13]。

3.2 供试品及试剂管理

供试品由供试品保管室设专人负责管理,其出入库、使用、剩余、留样数量以及剩余供试品的处理等均应有详细记录。供试品配制一般按照现用现配的原则,并于配制后规定时间内用于检测;否则应有供试品配制后稳定性的分析结果说明。若无菌实验显示供试品有细菌污染,则需采取相应措施除菌之后再用于检测。对于普通试剂应注意标识,清晰准确标注配制信息,如配制日期、有效期、保存条件、配制人等。对于培养基、血清、生长因子、细胞因子等试剂,应定期考察供应商资质,不宜频繁更换试剂品牌,以确保实验体系一致性。

3.3 阳性剂管理

加强阳性剂管理,为了保证实验人员及试剂的使用安全,阳性剂应当由专人管理,并采取双人双锁的保管形式,以保证阳性剂使用可控。购买阳性剂后,应当为其建立一系列的档案,该档案中包含如下信息:名称(中英文)、批号、纯度/含量、生产日期、校期、保存条件等,还应当包含出入库记录:出入库时间、领用人、领用量等。阳性剂的标签上应当有特殊标识以表明该试剂为阳性剂,同时包含名称、批号、校期等必要的信息。应当有相应的受试物及阳性剂废弃的 SOP,尤其是阳性剂的废弃,应当有相应的控制。

3.4 背景数据采集

收集连续一段时期内、采用同一种方法、在同样条件(如 S9 活化或非活化)下完成的 N 次实验而获得的阴性对照值/阳性对照值,进行总平均值、标准差的统计计算,参考实验本身特点,选定数据可信区间,得到本实验室条件下阴性对照值/阳性对照值的变动范围。

4 结语

体外替代技术的快速发展,大量体外替代方法被应用于药物非临床安全性评价领域,OECD 等组织已推出相应的指导原则。然而,目前我国新药安全性评价领域体外替代技术的发展仍处于起步阶段,关于体外替代方法相关的指导原则十分有限。在各 GLP 机构,体外替代方法的应用通常被列为非 GLP 研究,未遵循 GLP 原则,这种现状不利于替代法的规范化管理,无法避免和减少试验中的误差,因而无法提高国际间安全性评价实验数据的相互利用率。

鉴于此种情况,应尽快制定体外替代方法相应的指导原则,在 GLP 机构采用体外替代方法时,应严格控制各种可能影响实验的决定因素,尽可能降低系统误差(测量均值与真值之间的差别)、避免偶然误差(实验过程中各种随机因素共同造成)、杜绝过失误差(实验者不负责任造成),建立一套适合替代法应用的质量保证体系。在开展实验时严格遵循 GLP 原则及法规要求,强化实验人员的自觉质量控制意识,确保质量保证部门的质量监督力度。实验方案需经过专题负责人、质量保证负责人、机构负责人及委托方等 4 方认可的前提下实施,并受到质量保证部门的监督和检查。实验步骤需要在有洁净度保障、仪器设备及器械经过校验、校准的条件下实施。实验记录需要规范化,对于每一个步骤需有详细记录,做到有源可溯、有证可查、有据可依。唯有如此,才能在 GLP 体系下实施体外替代方法,确保获取完整、真实、可靠的研究数据,以推动体外替代技术的长期发展。

参考文献

- [1] 彭双清,郝卫东,伍一军.毒理学替代法[M].北京:军事医学科学出版社,2009.
- [2] 翁顺太,郑立锋,郑忠东,等.实验动物福利的基本内容[J].海峡预防医学杂志,2009,15(6):98-99.
- [3] 张瑞霞,林海霞,汤纳平,等.药物超敏反应安全评价体外替代方法的研究进展[J].中国新药杂志,2012,21(13):1494-1497.

- [4] 贺争鸣, 李冠民, 邢瑞昌. 3R 理论的形成、发展及在生命科学研究中的应用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(2): 122-124.
- [5] Yadav N K, Shukla P, Omer A, *et al.* Alternative methods in toxicology: CFU assays application, limitation and future prospective [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2015(13): 1-12.
- [6] Halle W. The registry of cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD₅₀) and to reduce animal testing [J]. *Altern Lab Anim*, 2003, 31: 89-198.
- [7] Balls M, Amco V P, Bremer S, *et al.* The principles of evidence validence of test methods and testing strategies [J]. *Altern Lab Anim*, 2006, 34: 603-620.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2007.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 药物非临床研究质量管理规范 [S]. 2003.
- [10] 郭巧珍, 吴纯启, 马华智, 等. 遗传毒性实验的质量保证与现场检查 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(11): 937-939.
- [11] 吴建辉, 闫 晗, 苏 欣, 等. GLP 人员的岗位职责与各类人员的培训 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 458.
- [12] 郭 隽, 刘晓萌, 耿兴超, 等. 新药生殖发育毒性安全性评价的仪器确认要点 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(5): 437-440.
- [13] 胡燕平, 宋 捷, 张 旻, 等. GLP 体制下细菌回复突变试验的实施 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(2): 102-104.