

药物安全性评价中生物标志物验证的研究进展

林 志, 周晓冰, 吕建军, 屈 哲, 霍桂桃, 张 頔, 杨艳伟, 王 雪, 李 波*

中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全性评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘 要: 随着现代分子生物学技术的快速发展, 生物标志物的研究成为临床前药物安全性评价中发展最快的领域。同时, 生物标志物的定义、可使用的验证以及广泛使用的有关问题也逐渐受到关注。就临床前药物安全性评价中相关的生物标志物验证的概念、药品监督管理部门对生物标志物验证的要求、药物临床前安全性评价中已验证的生物标志物、生物标志物验证的过程以及未来面临的问题等进行简要的论述。

关键词: 生物标志物; 药物安全性评价; 分子生物学; 临床前研究

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)06-1070-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.033

Research progress on biomarker validation in drug safety evaluation

LIN Zhi, ZHOU Xiao-bing, LV Jian-jun, QU Zhe, HUO Gui-tao, ZHANG Di, YANG Yan-wei, WANG xue, LI Bo

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

Abstract: With the rapid development of modern molecular biology technology, the biomarker has recently been the fastest developing field in preclinical drug safety evaluation. Simultaneously, some problems about the definition and validation of biomarker, recognition, and wide use are gradually being concerned. In this paper, the definition of biomarker validation in preclinical safety evaluation of drug, related guidelines and regulatory requirements, verified biomarkers in preclinical safety evaluation, process of biomarker validation, and problems faced in the future are discussed briefly.

Key words: biomarker; drug safety evaluation; molecular biology; preclinical research

近几年来随着基因组学、蛋白组学和代谢组学等分子生物技术的飞速发展, 药物研发人员和药品监管机构均对生物标志物在药物临床前安全性评价中的研究给予高度重视。2006年 Bauer 等^[1]代表美国国立卫生研究所(NIH)资助的骨关节炎生物标志物小组提出了 BIPED 生物标志物的分类, 即疾病严重程度标志物、研究性标志物、预后标志物、干预治疗疗效标志物和诊断标志物。诊断标志物的目的是在一般人群中区别不同的状态, 如患病和未患病。疾病严重程度标志物可以帮助已被诊断人群区别疾病的严重程度。一个理想的预后标志物可以从已给的基础情况计算相对风险(RR)和比值比(OR)推测病人的预后情况。因为很多标志物都依赖于正常生物学变异, 所以需要收集个体数据, 包括性别、年龄、疾病的严重程度和治疗过程等。

在生物标志物研发中, 最重要的就是将生物标志物与一个或多个“金标准”进行比较。纵向标志物(预后和有效性)和横向标志物(诊断和疾病严重程度)的发展和评估都会存在一个精心设计的病例对照研究进行验证^[2]。尽管一些生物标志物具有较高的灵敏度和特异性, 但是很多生物标志物并不具备上述两大特征。实际上, 在某个个体中预测疾病时可能需要一组标志物进行分析。在 2014 年药物研发工具资格的指导原则中, 美国食品药品监督管理局(FDA)对生物标志物的阐述为“生物学效应的定量检测, 以提供作用机制和临床有效性之间的信息关联, 可以在既定的科学框架即证据中阐明其生理、毒理、药理或实验结果的临床意义”^[3]。复合生物标志物则是由几个单独的生物标志物组成, 通过组合算法获得一个单独的解釋性判读。

收稿日期: 2016-09-01

基金项目: 国家科技重大专项资助项目(2015ZX09501007)

作者简介: 林 志, 博士, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: linzhi@nicbpb.org.cn

*通信作者 李 波, 研究员, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67876252 E-mail: libo@nicbpb.org.cn

在新药研发过程中,生物标志可以有效地提高研究决策,包括剂量、治疗时间、实验设计、风险/效益比、转化等,最终可促使研发药物成本的降低^[4]。众所周知,仅有小于10%的原研药物可以最终进入市场,完成临床前和临床实验,最后通过药监部门的审批^[5-6]。原研药物失败的关键因素就是缺乏有效性和无法接受的毒性。如果在早期采用生物标志物筛选原研药物,研究者可以早期发现安全性问题,从而提高药物研发的效率并减少投资风险。目前,许多欧美大型制药公司在美国FDA提交新药申请时,已经将药效和毒理生物标志物的研究数据作为临床研究报告的一部分。因此,临床前安全性评价生物标志物的研究,为新药安全性评价带来了希望,也推进了新药研发的进程。

1 生物标志物验证的概念

如果生物标志已经在药物研发过程中得到了广泛的应用,有必要了解其优点及缺点以及共同验证。如果验证的门槛提高,则其他领域的研究者才会在使用这些生物标志物时更加自信。在过去几年里,制药行业已经采用了一个鉴定和验证的过程。FDA直接关于生物标志物验证的监管文件最早可以追溯到2005年的《药物基因组学指导原则》^[7]和2006年的关键路径列表^[2, 8]。在《药物基因组学指导原则》中定义了验证的生物标志物,即“在分析测试体系中进行测量,具有良好的表现特征,并且已经建立了科学框架或证据主体,以阐述生理学、毒理学、药理学或测试结果的临床意义”。该定义中存在两个主要的挑战^[9]:需要起草的证据标准化(evidentiary standards)以支持生物标志物的验证,还有决定生物标志物有效性的测量过程。但是,证据标准化很难转化成可行的指标以帮助监管部门确定生物标志物的有效。过去通常判断生物标志物有效的方法不是以证据标准化为基础,而是在漫长而累人的公开争辩后确定的,所以最终的决定往往是几十年之后,参加争辩的科学家和临床医生均疲惫不堪。即使在这样漫长的过程后,这些被接受的生物标志物应用的关键性问题仍然不能完全解决。因此,过往生物标志物的验证过程只是科学家们在长期争辩过程中形成的一个相对稳定的偏向意见后才使用生物标志物。此外,指导原则还将“有效的生物标志物”分为了两个亚类别,即“已知有效的生物标志物”和“可能有效的生物标志物”。如果生物标志物的有效性被定义为在一定情况下时

有效,则不应该定义其为有效的生物标志物,而只能称作特定情况下可使用的生物标志物。

Campion等^[9]阐述了生物标志物验证的定义,根据文中所述概况而言,验证就是具有广泛无限定的证据标准化的测试过程,在此过程中每一个潜在生物标志物的应用都通过独立的研究和数据集来支持其验证。但是,实际上生物标志物资格认定是一个有限的证据标准化过程,因为只需要有限的数据集判定其是否在特定有限情况下使用的合理性。相对于定义证据的标准化而言,生物标志物鉴定的关键概念就是使用范围(context of use, COU)的确定,这也是生物标志物验证中的基本原则。COU的描述应该包括一般范围、特定生物标志物使用以及定义生物标志物使用时间和如何使用的特定参数^[10-11]。生物标志物验证的过程常常需要好几十年,需要对每一个可能的情况下生物标志物的应用进行检查,因此也需要每一个数据子集来支持它的应用。然而,如果生物标志物的使用有限定时,那么用以支持其使用的数据也需要有特定的设定,因而应该具有设计良好的实验研究。如果一个生物标志物应用范围广泛,则需要确定该生物标志物的3个基本要点,包括明确解决的问题、证据的科学主体以及共同存在的科学共识。这常常能阻止生物标志物的偏移,并能促进其在药物研发中有效地应用。

缩小生物标志物的使用范围有利于该生物标志物被广泛接受及应用。如为了更好地理解药物安全性和有效性的机制,应用生物标志物需要直接的科学证据,即大量的化合物及相关研究用以证实其作用机制。此外,另一个特殊情况就是替代实验中应用相同生物标志物可能需要一个综合证据数据库,涵盖多个化合物以及相关研究,并进行全面的分析以支持其替代已经存在的临床终点。尽管分析的正确性可以通过本身独立的客观指标进行检测,但是生物标志物使用范围却是相对比较主观的。如一个生物标志物特定的使用范围可能需要一个分析范围说明,即在应用时该指标可供使用的特定检测范围,这个规定的范围也可以更好地帮助设计该指标的测量平台。

2 药品监督管理部门对生物标志物验证的要求

生物标志物验证过程是一个独立的挑战,即究竟应该由谁来确定这个生物标志物是有效的。只要生物标志物验证过程是一个持久的公众讨论过程,就会有越来越多的利益相关者参与进来。但是,在

审核支持生物标志物有效的科学性临床证据时,还需要药品监督管理部门确定执行该验证过程的科学家。除了证据标准化以及验证过程两个关键问题外,生物标志物有效性验证的漫长过程还需要一个全面的、多方利益共同体合作形成的团体对所有支持验证的数据结果达成最终的一致。药物基因组学指导原则本身并未强调这些,但是2005年至2008年间FDA通过生物标志物验证试验所获得的经验,促使FDA、欧洲药品管理局(EMA)和日本制药和医疗器械管理局(PMDA)形成了正式的对生物标志物验证过程的监管^[12-14]。

随着时间的推进,验证过程概念的发展已由监管框架内的观点转变为在药物研发中提出新的标志物。这促使公众关于生物标志物验证观点的改变,不再是通过经验丰富的新药申请审查(NDA)后接受新的生物标志物,而是通过药物研发中整合在关键步骤中的证据标准化完成新的生物标志物的验证过程。2016年7月生物标志物资格认证计划网页显示了临床前药物安全性评价中3种完成的生物标志物资格认证^[15]。该网址的列表数据显示,自从2006年开始的生物标志物验证实验,几乎每2年完成一个生物标志物的资格验证审核。该网址并没有提供每一个验证的周期信息,以及计划中正在进行验证的生物标志物的数目。但是,该网址对药物研发工具中的资格认证草案所反映的验证过程进行了概述,正如之前所说该过程是一个漫长的过程。过程的复杂性和繁多步骤反映了生物标志物验证的困难。尽管验证过程是对数据关键点的审核,但是却与寻找鉴定生物标志物的最初目的相违,因为药品审批所需时间都远少于生物标志物验证所需的时间。所以,生物标志物验证很难与关键产品研发计划相结合,也很难由制药企业来引领完成。

2014年1月,FDA颁布了《药物研发工具资格的指导原则(修订版)》,总结了生物标志物资格认证的实验研究过程中所获得的经验^[2]。该指导原则的草案发表以来,一直支持药物研发中进行生物标志物验证的研究。该指导原则也为药物评价研究中心(CDER)和提交药物研发工具(DDTs)人员之间相互交流提供了一个框架。它对应该提交并用以支持某一药物研发工具验证的数据种类提出了详细的解释说明,并创建了一个正式的CDER关于DDT资质认证的数据审查机制。

DDT涵盖多种类型,包括生物标志物、临床结

果评估以及动物模型。该指导原则对DDT验证过程进行了描述,以便促进公众使用这些DDTs。只要满足以下3个条件,研发者可以使用药物研发中设定特定适用范围的已经验证的DDTs。这3个条件包括:1)所有方案和操作流程均遵循该DDT特定设定的适用范围;2)使用DDT的目的是为了验证;3)在进行资格验证时,无与该DDT验证基础相冲突的信息出现。一旦该DDT的资格被确定,CDER核查人员对于在特定COU中的DDT使用无疑议,并且不需要再次确认DDT使用的验证过程。

3 药物临床前安全性评价中已验证的生物标志物

截止2016年7月,FDA已经接受并完成资格认证的生物标志物临床前研究共有3个项目,临床研究1项,提交资格认证草案的临床研究有2项。其中临床前药物安全性评价领域已验证的生物标志物主要涉及药物诱导的肾脏毒性和心脏毒性。

2008年和2010年,FDA和EMA分别接受药物安全性预测联盟(PSTC)和国际生命科学学会健康和环境科学研究所(ILSI/HESI)的申请,共同认可从生蛋白(clusterin)、肾损伤分子-1(Kim-1)、三叶因子-3(TEF-3)、白蛋白(albumin)和肾乳头抗原-1(RPA-1)作为药物肾小管损伤生物标志物以及尿总蛋白(uTP)、 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)、血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(CysC)作为药物肾小球损伤生物标志物,药品注册企业可自愿与传统的肾脏生物标志物一起应用于大鼠毒性试验中^[16]。2010年9月,FDA接受ILSI/HESI和肾毒性工作组(Nephrotoxicity Working Group)的申请,认可从生蛋白、肾乳头抗原(RPA-1)为药物诱导的肾毒性生物标志物^[17-19]。2012年2月,FDA接受O'Brien等人申请,认可血清/血浆中心肌钙蛋白T(cTnT)和肌钙蛋白TI(cTnI)作为药物诱导的心脏毒性生物标志物^[20]。上述生物标志物资格认证的详细材料可从FDA网站获得(<http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/drugdevelopmenttoolsqualificationprogram/ucm284076.htm>)。

4 生物标志物验证的过程

2014年1月FDA《关于药物研发工具资格的指导原则》明确指出生物标志物资格验证过程需要3个阶段^[2]:1)开始阶段;2)咨询和建议阶段;3)资格认定的评审阶段。合适的审查机构人员将参与生物标志物资格验证的整个过程。验证过程的目的就是为了确定是否有足够的数据支持在限定适用

范围下应用生物标志物。CDER 致力于与提交者一起促进生物标志物等 DDT 的发展。如果生物标志物具有特定的使用范围,则关于适用范围(COU)的附加数据应该收集、提交,并进行分析。改变或增加已验证的适用范围时,该生物标志物提交者或该领域其他的研究者应对此变更承担责任。另外,如果越来越多的科学证据不支持使用范围时,那么该生物标志物的资格会被撤回。

在开始阶段,提交者应首先与 CDER 联系,要求提供一个 DDT 的追踪号。一旦 CDER 接受申请后,则在电子数据库中指定相应的 DDT 追踪号并提供给提交者,同时将与意向书(a Letter of intent, LOI)提交相关的其他信息提供给提交者。意向书是一个简洁的文件,旨在向 CDER 提出一个潜在价值的 DDT。意向书包括对 DDT 的简短阐述,其使用范围(COU),以及支持资格验证的理由。接收到意向书后,CDER 将评估意向书,并确定是否开始进行咨询和建议阶段。CDER 的决定是基于该提议的科学价值以及 CDER 执行审查数据的可行性。CDER 将审查和决定通知提交者。

进入第二阶段咨询和建议期,如果资格认证审查组(qualification review team, QRT)接受 DDT 请求,根据资格认证程序建议申请者提交初步简报包(initial briefing package, IBP)。此时,由 CDER 和其他相关中心的专业学科专家组成一个 QRT,对提交材料进行审核,并为 DDT 申请者提供资格认证所需证据的相关建议。完成 IBP 的提交后,QRT 和申请者将对其后可能的议题举行相应的会议,包括申请的目的及 COU,评估可用的数据,确定相关知识中存在的不足,讨论所需的额外数据以支持 DDT 资格认证(如增加新的研究),以及如果存在较少量的新信息支持恰当的 COU 中间值评估时,可能需要讨论采用分步资格鉴定方式。如果在 QRT 评估之后 DDT 研发的目的出现调整,那么咨询和建议阶段将会延长。如果 DDT 目的改变不再适合资格咨询及建议程序时,CDER 或申请者任何一方都可以中止该项资格认证。在会议或与 QRT 的交流中,DDT 申请者也应进行研究工作以获得需要额外补充的数据。为了让 QRT 对特定的 DDT 提供专业建议,QRT 和申请者还有可能举行多次额外的会议。在这些会议上,讨论和建议的重点应该集中在所提议 DDT 的合理性,它的适用范围,最新获得的数据,关于适用范围的疑议以及相关数据,潜在

的研究方法以获取数据,以及现存数据存在的问题。上述讨论均需要在资格认证程序第三阶段审核期之前完成。如果 QRT 审核了所有数据,并且与申请者达成一致意见,确定关键问题已经解决后,该验证过程将进入第三阶段。

第三阶段是对所有资格认证包的材料进行审查。当 QRT 和申请者均同意咨询和建议阶段结束后,申请者将提交一个完整的资格认证包(full qualification package, FQP)。申请应该包含一个完整而详细的有关研究及分析的描述,以便对特定 COU 的 DDT 资格认证提供证据。大多数情况下,申请者将提交研究的原始数据,并提供一个声明承认 DDT 资格认证包的信息将在 FDA 的 DDT 资格认证网址公开。当 CDER 确定 FQP 数据完整可以审查时,资格认证程序进入审查阶段。申请者会接到审查阶段开始的通知。QRT 将审核 FQP 在内部会议中进行讨论,最终给出 QRT 资格认证的推荐。如果审核中仍需对资格认证包中的某些部分进行阐述时,或者需要额外的数据时,QRT 还会与申请者联系。QRT 成员将会为资格认证推荐书准备好学科审核以及复合审核汇总文件。在复杂的或有争议的 DDT 研发项目中,QRT 可能会选择举行公开的讨论。学科审核将提供给参与的 FDA 中心,以便将来进一步讨论。如果审核和决定过程促使 CDER 形成了 DDT 资格认证的推荐书,那么资格认证推荐书的声明将会公布在 FDA 的指导原则网页。尽管申请者提出了特定的 COU,接受资格认证的 COU 最终是由所提交的数据决定的。

5 生物标志物验证未来面临的问题

随着生物标志物研发进入蓬勃发展时期,关于生物标志物的验证等相关问题的研究也就迫在眉睫。从以往经验来看,生物标志物验证已经无法由制药公司独立完成,需要政府药品监督管理部门主导的多方面专业人员共同参与完成,包括监管部门、科研院所以及多家大型制药企业的专业科学家。此外,生物标志物验证面临的另一个挑战就是证据标准化的问题。在提交生物标志物资格审查之前会有一个咨询和建议期。在预提交阶段由 CDER 预评估提交的科学资料,然后进入讨论及建议期,在此期间提交者与 CDER 的专家关于生物标志物验证的证据标准化以及适用范围达成一致。由于缺乏关于适用范围及证据标准化评估的指导原则,这个咨询和建议期对于确定生物标志物验证过程是否

可行非常重要。提交前期以及咨询和建议期涵盖了整个复杂的数据核查期。然而,一旦有关生物标志物鉴定的证据标准化在CDER形成法规后,则不需要进行咨询和建议期^[9]。

直至目前,人们开始意识到只有通过起草证据标准化的指导原则,才能真正加速生物标志物资格认证的提交。提交者如果深刻认识到证据标准化的意义,则会去除生物标志物验证过程的咨询和建议阶段的需要。这也会直接获得监管部门对生物标志物资质提交,从而减少最终鉴定所花费的时间和步骤。总之,随着各国药品监管部门以及药物研发者对生物标志物验证的重视,必将极大地推动临床前药物安全性评价中生物标志物的研究进展。

参考文献

- [1] Bauer D C, Hunter D J, Abramson S B, *et al.* Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(8): 723-727.
- [2] Karsdal M A, Henriksen K, Leeming D J, *et al.* Biochemical markers and the FDA Critical Path: How biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and provide unique and necessary tools for drug development [J]. *Biomarkers*, 2009, 14(3): 181-202.
- [3] FDA. Guidance for Industry. Qualification Process for Drug Development Tools [EB/OL]. (2014-01-06) [2016-08-03]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM230597.pdf>.
- [4] Boekelheide K, Schuppe-Koistinen I. SOT/EUROTOX Debate: Biomarkers from blood and urine will replace traditional histopathological evaluation to determine diverse responses [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 129(2): 249-255.
- [5] Collings F B, Vaidya V S. Novel technologies for the discovery and quantitation of biomarkers of toxicity [J]. *Toxicology*, 2008, 245(3): 167-174.
- [6] Wagner J A, Williams S A, Webster C J. Biomarkers and surrogate end points for fit-for-purpose development and regulatory evaluation of new drugs [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81: 104-107.
- [7] FDA. Guidance for Industry. Pharmacogenomic Data Submissions [EB/OL]. (2005-03-01) [2016-08-03]. www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM126957.pdf.
- [8] FDA. Critical Path Opportunities List [EB/OL]. (2006-03-18) [2016-08-03]. www.fda.gov/downloads/science-research/specialtopics/CriticalPathinitiative/CriticalPathOpportunitiesreports/UCM077258.pdf.
- [9] Champion S, Aubrecht J, Boekelheide K, *et al.* The current status of biomarkers for predicting toxicity [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9(11): 1391-1408.
- [10] Altar C A, Amakye D, Bounos D, *et al.* A prototypical process for creating evidentiary standards for biomarkers and diagnostics [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83(2): 368-371.
- [11] FDA. Guidance for Industry. E16 Biomarkers Related to Drug or Biotechnology Product [EB/OL]. (2011-08-10) [2016-08-03]. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm267449.pdf>.
- [12] Goodsaid F M, Frueh F. Regulatory guidance and validation of toxicologic biomarkers [M]. New York: Taylor & Francis Group, 2006: 187-220.
- [13] Goodsaid F, Frueh F. Process map proposal for the validation of genomic biomarkers [J]. *Pharmacogenomics*, 2006, 7(5): 773-782.
- [14] Goodsaid F M, Frueh F W, Mattes W. Strategic paths for biomarker qualification [J]. *Toxicology*, 2008, 245(3): 219-223.
- [15] FDA. Biomarker Qualification Program [EB/OL]. (2016-09-20) [2016-09-20]. <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugDevelopmentToolsQualificationProgram/ucm284076.htm>.
- [16] Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, *et al.* Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and predictive safety testing consortium [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 455-462.
- [17] Dieterle F, Perentes E, Cordier A, *et al.* Urinary clusterin, cystatin C, β 2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 463-469.
- [18] Ennulat D, Adler S. Recent successes in the identification, development, and qualification of translational biomarkers: the next generation of kidney injury biomarkers [J]. *Toxicologic Pathology*, 2015, 43(1): 62-69.
- [19] Fuchs T C, Hewitt P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity: an overview for applied toxicology [J]. *AAPS*, 2011, 13(4): 615-631.
- [20] Newby L K, Rodriguez I, Finkle J, *et al.* Troponin measurements during drug development-considerations for monitoring and management of potential cardiotoxicity: an educational collaboration among the Cardiac Safety Research Consortium, the Duke Clinical Research Institute, and the US Food and Drug Administration [J]. *Am Heart J*, 2011, 162(1): 64-73.