

【 审评规范 】

FDA的“使用组织病理学及其相关方法支持生物标志物鉴定应考虑的问题”指导原则介绍

萧惠来

国家食品药品监督管理总局 药品审评中心, 北京 100038

摘要: FDA于2016年5月公布了“使用组织病理学及其相关方法支持生物标志物鉴定应考虑的问题”指导原则。该指导原则概述了组织病理学非临床生物标志物的特点,详述了这种非临床生物标志物鉴定中使用组织病理学方法的科学标准。本文介绍该指导原则的主要内容,期望对我国这方面的研究和监管有所帮助。

关键词: 美国食品药品监督管理局; 非临床生物标志物; 组织病理学; 鉴定; 方法学; 指导原则

中图分类号: R954 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)01-0005-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.01.002

Introduction of FDA's Considerations for Use of Histopathology and Its Associated Methodologies to Support Biomarker Qualification Guidance for Industry

XIAO Hui-lai

Center for Drug Evaluation, China Food and Drug Administration, Beijing 100038, China

Abstract: FDA issued *Considerations for Use of Histopathology and Its Associated Methodologies to Support Biomarker Qualification Guidance for Industry* in May 2016. The guideline outlined the characteristics of nonclinical biomarker of histopathology, and explained the scientific standards for the use of histopathological methods in the nonclinical biomarker qualification. This paper introduces the main contents of the guideline, and it is expected to be helpful to the research and supervision in our country.

Key words: FDA; nonclinical biomarker; histopathology; qualification; methodology; guideline

生物标志物是正常生物过程、致病过程或对治疗干预生物反应的指标,可客观地测定和评价其特征^[1]。生物标志物的发现、特点、鉴定和使用是提高药物开发效率和成功率的重要手段^[2]。如果生物标志物通过鉴定,用分析方法有效的测定生物标志物可在药物开发和管理决策中获得具体而可解释的意义(如生理、毒理、药理、临床)。企业可在上市前的药物开发期间,在鉴定的使用背景下,使用生物标志物。生物标志物使用背景是指对药物开发中生物标志物的使用方式、使用说明和使用目的的全面而明确的描述。

特有的组织病理学发现与临床症状或一些临床化学参数之间往往有密切的相关性。因此,非临

床生物标志物鉴定研究使用组织病理学,可确定生物标志物和形态学变化的相关性和时间关系。其中包括^[3]:①确定生物标志物水平和形态学变化严重性之间可能的定量关系;②探索生物标志物释放和消除动力学以及相关的组织形态学;③确定生物标志物的正常变异范围和任何相关的形态学结果;④确定使用生物标志物的潜在混杂因素。特别是在确证性非临床生物标志物鉴定研究中,组织病理学可作为参考或实际标准。这与传统的组织病理学用于非临床安全性评价研究不同。后者是针对特定药物的危害特性而且其组织病理学评估是帮助识别药物作用。

美国食品药品监督管理局(FDA)于2016年5月

收稿日期: 2016-10-12

作者简介: 萧惠来,男,教授,主要从事药品审评工作。E-mail: penglai8051@aliyun.com

公布了“使用组织病理学及其相关方法支持生物标志物鉴定应考虑的问题”指导原则^[3]。该指导原则讨论了在非临床生物标志物鉴定研究中产生组织病理学数据时应考虑的问题，并且概述了生物标志物特点和鉴定的科学标准，旨在帮助把组织病理学用作参考或实际标准进行药物非临床生物标志物鉴定的研究者。而我国目前尚无这类指导原则。本文介绍该指导原则的主要内容，希望对我国这方面的研究工作和监管有益。

1 确立生物标志物的性能特征

这部分主要介绍生物标志物的敏感性、生物标志物的特异性、分析灵敏度和分析特异性。

1.1 生物标志物检测的方法学

生物标志物检测以数种不同的方法为依据（如，生化测量法、生理器官功能测试或从分子到解剖水平的结构特征成像）。生物标志物检测方法可提供以生物标志物与组织病理学参考或实际标准比较为基础的测量法，故这种测量方法对显示生物标志物的特征至关重要。因此，应很好地描述该检测系统的特点^[4]。

如，用于测量生化生物标志物的检测应具有科学严谨的分析灵敏度和分析特异性。检测灵敏度差或被生物样品或基质中的其他物质抑制，可能因没有检测到生物标志物水平的初始变化而导致假阴性结果。特异性较差的检测不能辨别出非靶标器官损害或可能与样品中的非特异性物质发生交叉反应。因此，生物标志物检测应可靠和可重复地发现生物标志物水平的变化（增加或减少）或没有变化。任何测出的生物标志物水平变化的解释，最终都应包括通过对组织病理学的比较，评估变化是否具有生物学意义。

以生化测量法为依据的生物标志物检测所考虑的问题也适用于以其他方法为依据的生物标志物检测，如成像技术（正电子发射断层扫描、磁共振成像、放射学）。组织病理学作为参考标准或实际标准可提供评价生物标志物评估的相同变量的另一种独立方法。

1.2 生物标志物的生物学性能

1.2.1 性能特征 任何生物标志物 100%特异或 100%敏感是完全不可能的。建议的生物标志物使用背景决定其可用于支持鉴定的特有性能特征。旨在确定敏感性、特异性和可重复性的生物标志物的研究，应与建议的使用背景相关联。参考或实际标准

（如组织病理学）可提供评价用生物标志物评估的相同参数的独立方法。

1.2.2 生物标志物的敏感性和时间相关性 与分析的灵敏度不同，生物标志物的敏感性与下列因素相关：①识别形态学作用的概率；②可引起在生物标志物水平可识别的形态学变化的阈值；③从形态学作用之前或之后，直到可检测出在生物标志物水平变化的时间间隔。

生物标志物的敏感性是在变化存在时，生物标志物显示特异的形态变化的概率。如果生物标志物 100%敏感，那么在为检测设计的特异的形态变化存在时，它将永远不会是阴性的。生物标志物水平的初始变化和组织病理学变化开始之间的时间关系定义为生物标志物的敏感性。这种时间关系的准确特点对生物标志物敏感性的最优化很重要。

在生物标志物鉴定研究中生物标志物测量的时间和频率，应考虑形态变化与生物标志物时间关系的明确解释。在设计生物标志物鉴定研究的采样和（或）分析的时间过程时，应了解和考虑某种因素（如，机械的、化学的、天然疾病）引起组织的形态变化的时间段和机制。

当生物标志物使用的背景采用光学显微镜（光镜）和苏木精 - 伊红染色（HE 染色）组织病理学方法时，在鉴定研究中应首选这种方法的组织病理学评价。对于治疗引起的动物组织病理学变化，生物标志物水平的变化和检测到的形态变化（用光镜和 HE 染色观察到的）之间的时间关系，通常可以采用下列语句（可用适当的支持数据说明）之一描述：生物标志物水平的初始变化先于形态学改变出现；生物标志物水平的初始变化大约与形态发生变化同时出现；生物标志物水平的最初变化只出现在形态变化发生之后。

同样，当在逆转或恢复过程中，形态和生物标志物的变化之间有关联时，形态变化可能在生物标志物水平变化之前、同时或之后出现。有时形态学变化的恢复可能与生物标志物水平的变化无关。

生物标志物的假阴性结果（当形态学作用不伴有预期的生物标志物变化时）有数个潜在的原因。其中包括：①分析灵敏度低；②其他蛋白质或物质干扰检测；③不同的生理或病理条件下，生物标志物的表达不一致；④生物标志物变化的潜伏期较形态学变化长；⑤形态学作用由生物标志物测量之外的机制所致；⑥样品处理不当；⑦采样不足。

组织病理学敏感性取决于组织病理学检查方法。生物标志物敏感性的初步评价使用光镜是可取的。特殊的方法(如,电子显微镜、免疫组织化学)可能有益于研究用光镜和HE染色检测不敏感的组织病理学变化相关的生物标志物水平低或早期的变化。

生物标志物鉴定研究应评估生物标志物变化的大小与形态改变程度之间的定量关系。对于这些研究,至关重要是获得最终的生物标志物测定,尽可能接近相关组织的采集时间(至少在同一天),避免这两个参数的时间分离

1.2.3 生物标志物的特异性 生物标志物的特异性是指准确确定在相关组织没有发生形态变化的概率。有100%特异性的生物标志物不会产生假阳性。当没有形态变化时,特异性也可以被看作是基线值很低或很稳定。高度特异的生物标志物将没有源于不受影响或非靶组织的信号。合适的支持数据有助于确定生物标志物的特异性。

候选的生物标志物的特异性对评价可能有挑战性,特别是当已知多种亚型有不同的组织分布时。如,肾损伤分子-1有对肝和肾特异的亚型^[5];肌钙蛋白有对心肌和骨骼肌特异的亚型^[6]。在这些情况下,重要的是要检查组织学和生物标志物亚型在多种组织类型中的表达,以确保候选的生物标志物对相关组织有特异性。

生物标志物信号假阳性有数种原因。从目前的实例来看,包括分析特异性低;从非靶组织释放生物标记物或在生理和病理两种条件下,生物标志物都有表达。

如前所述,任何生物标志物100%特异或100%敏感几乎都不可能。建议的生物标志物的使用背景定义为生物标志物敏感性和特异性之间适当的平衡。有时单一的生物标志物并不能满足特定的使用背景,因此可以考虑使用多个生物标志物。FDA建议在确证性生物标志物鉴定设计期间,同FDA讨论多个生物标志物的使用,以确保FDA所关注的问题都得到解决。

1.2.4 可逆性/分辨率 设计生理或病理过程恢复或停止的研究,应该描述生物标志物变化逆转和组织病理学改变的停止或恢复之间的时间关系。然而,要注意的是生物标志物变化的逆转可能与组织病理学变化的停止或恢复不相关。如,在药物引起损害的背景下,生物标志物水平的逆转可能是生物

标志物从损害部位释放和(或)随后从身体降解或消除所致,而不是组织病理学变化的停止或恢复。因此,合理地解释生物标志物和组织病理学变化是复杂的,应考虑所有的数据。

1.2.5 替代试验模型 非临床生物标志物鉴定使用健康动物的替代方法是使用人类疾病的动物模型。这些动物模型可能有益于在对药理学、生理学或物理学干预的反应中,评价候选生物标志物的变化。

2 确证性生物标志物研究的具体组织病理学方法问题

确证性生物标志物鉴定研究,一般在提出的使用背景的许多早期问题和检测细化后进行。组织病理学的重点(如,重要的组织、特异的病变和病变的主要特点)应在计划和开始确证性研究之前确定。下面讨论的题目是确证性研究时应考虑和解决的关键所在,以便提供令人信服的研究结果。

2.1 确证性研究的总体设计

第一步通常需要用避免搜索偏见的方式进行系统的文献综述^[7-10]。文献综述可用于设计鉴定研究和支撑鉴定工作。

设计确证性研究的重要因素是讨论导致和包括组织病理学评价的所有步骤的前瞻性书面方案。尸检的所有方面都应清楚地描述,包括时间、标本和组织处理、固定、样品保存、运送(如果相关)和标本玻片制备与评价。应考虑的一些要点在下面各小节中讨论。

2.2 把确证性研究偏倚降到最低的标本玻片检查程序

病理学家应该自由地进行任何研究结果的盲法评估,特别是有标准规范时^[11-12]。Burkhardt等^[13]概述的建议,提供了使用盲法评价的标准,考虑到显示特点变化的治疗组和时间过程、测定方法的设计和鉴定的评分系统以及确定背景变化的阈值。

对用于支持确证性研究的探索性研究,使用毒理病理学协会提出的程序,采用分层分析方法可能是合适的^[14]。在该分层方法的第一层可以是治疗组和对照标本的非盲法比较,以便识别不易察觉的发现(如自发发现的发生率和严重程度增加)并制定评分标准。第一层分析之后,病理学家可以进行任何组或所有组(如合适)的有针对性的盲法评价。这可识别不明显的治疗相关的结果,可持续区分在对照组出现的结果。病理学同行评议(有针对性的、对研究不知情的、另外的病理学家的盲法)也有助

于将偏倚减少到最低^[15]。最后, 招募病理学工作组可能有益。

确证性研究的目的是测试生物标志物是否准确地反映组织病理学, 以便支持提出的使用背景。主观看法可影响标本玻片评价的任何一步, 从而阻碍研究目的的实现。当评价的组织病理学变化(在许多生物标志物鉴定研究中最重要组织变化水平)不明显或稀少时, 偏倚的风险更大。在确证性研究方案中应前瞻性规定标本玻片检查程序, 包括尽量减少偏倚的步骤。在确证性研究中, FDA 特别建议读片者评价组织切片时, 要对治疗条件、采样时间、新生物标志物的结果和任何对照的生物标志物结果采用盲法。

平行对照组动物的标本玻片可用于建立背景形态和帮助区分不明显的组织病理学变化和正常变化。这种背景组织形态正常变化的评估对确定辨认治疗相关病变的阈值和了解某些背景组织形态变化是否与生物标志物值的变化相关是很重要的。可制备足够数量的对照组动物的外加标本玻片, 以便允许正常变化和背景病变的评估。当获得外加计划的组织样品切片不可行时, 在药物非临床研究中可包括外加对照组动物。就统计学目的来讲, 最好是来自这些外加标本玻片的数据不包括在鉴定研究的最终数据集中。应在科学计划中规定并在方案中反映全部同行评议的评估计划以及解决读片者或审评者之间分歧的计划。

2.3 采集样品的时间

提出的生物标志物使用背景和特定研究的具体目的, 将决定组织样品采集的时间。重要的是要确定生物标志物测量的变异和变异的可能原因。采集样品时间可能是变异性的的重要因素。因此, 具体的采集时间(处理后的研究天数和小时数)应仔细选择, 并且其理论依据也应包括在方案中, 以利于数据和重现性的解释。

2.4 对照

确证性研究的目的是前瞻性评价与组织形态学相关的生物标志物的性能。应充分严谨地设计确证性研究, 以便允许治疗组和对照组做合理的比较, 并允许对组织学材料无偏见的评估。为了减少可能的分析和生物体的假阴性和假阳性结果, 应使用平行的阳性和阴性对照组, 控制环境因素, 以便确定或比较生物标志物的敏感性(特异性)并确保反应物或方法合适。

应在方案中描述平行对照组确认及其使用它们的理由。适当的历史(外部)对照数据可用于确定数据集中可能的分析和生物体的离群值。但是, 应在方案中推理地和前瞻性地详细描述采用这类历史数据的决定。历史对照数据应该是最接近的, 并且仅包含使用类似对照试验药物和(或)条件的研究^[16]。

2.5 固定

在研究方案中应描述固定程序。固定时间和持续时间的变化可能造成数据的变化, 从而掩盖真实的生物标志物-组织形态关系的变化。应避免组织固定的延迟和变化并应注意偏离方案。为了避免试验偏倚, 实验动物应随机安排尸检。

2.6 切片数和取样部位(尸检时)

收集组织的解剖部位和收集的样品数量可影响结果及其解释。根据既定目的, 在方案中应提供收集组织切片数量和取样部位的理由。在确定收集和分析的切片数量时, 资料提交者应考虑到如果取样数量不足, 很有可能漏掉细微或稀少的病变。每个取样部位的描述应足以使各实验室可重复。应在方案中描述取样的组织或器官(如, 哪个肺叶)和组织内的方位(如, 左、右、前、后、上、下)。如果获得连续或分步骤的组织切片, 应在方案中描述, 识别和报告器官或组织内病变精确部位的程序。

2.7 染色

在建议使用背景条件下评估组织学标本玻片, 一般是较合适的。如, 大多数安全评估研究使用光镜和 HE 染色切片。应提供所使用的每一种染色的依据。如果在实验室根据先前建立的程序实施染色方法, 这种资料可作为附录或以引用的方式纳入方案。非标准的染色方法和评分系统应在方案中很好地记述或引用。FDA 鼓励所有样品都采用自动化或标准化的染色技术, 包括阳性和阴性对照组。

2.8 特殊方法

在某些情况下(如, 确定形态过程、细胞类型或部位), 可能对更具体的信息或额外的支持数据有科学要求, 以达到研究目的。在这些情况下, 特殊的方法可能是必要的, 以便评估特殊靶的形态, 支持既定的假设。这些方法包括, 但不限于下列方法: 体视学、组织化学、免疫组织化学、原位杂交和电子显微镜。应提供使用特殊方法的理由, 应在方案中很好地记述或引用所使用的方法。

3 组织病理学评价的其他考虑

其他因素可影响标本玻片评价的结果。这部分

讨论研究方案中应考虑和解决的某些问题。

3.1 数字病理学和切片共享

应根据公认的毒理病理学协会^[17]和数字病理学协会(DPA)的既定指导原则,共享和检查数字切片。

3.2 专业词汇

专业词汇应详述事先决定的变化类型和程度分类标准。术语插图对减少歧义有很大益处。

对于良好定义的形态状况,结合相关病变的数据输入是合适的(如,大鼠慢性进行性肾病)。然而,为便于统计分析,结合术语不应掩盖利于数据公正分析和与生物标志物相关性的个体特点。

3.3 过滤

诊断病理学的常规是说明作为背景的某些病变,而在结果中不报告(过滤)。而且不同的病理学家还可以使用定义背景变化的不同阈值,因此影响整体的解释。

FDA建议,如果背景变化为生物标志物的正常变异,应显示生成的数据(如,报告所有病变以及相关的生物标志物值,单独的过滤)。另一种选择是全面地记录认为是伴随的背景病变的类型和程度。应该在科学计划或方案中说明,描述和记录背景病变的方法。

3.4 其他因素

其他因素,如诊断漂移(diagnostic drift)和时序偏差(chronological bias)也是很重要的考虑,在方案中应包括控制这些因素的方法。

3.4.1 诊断漂移 诊断漂移的定义是在单项研究内病变名称和严重性分级的渐进变化。前后矛盾的根源可能是诊断漂移对治疗相关的病变/变化或无效应水平的测定有负面影响^[18]。

3.4.2 时序偏差 时序偏差的定义是分级系统的演化过程,从而可阐释、理解和推广更特异和敏感的分级标准。在病理学家获得经验时,可运用演化系统细微差别,解释组织切片^[19]。这也是前后矛盾的根源,可能是对治疗相关的病变/变化或无效应水平的测定有负面影响。

4 结语

FDA的“使用组织病理学及其相关方法支持生物标志物鉴定应考虑的问题”指导原则主要概述了组织病理学非临床生物标志物的敏感性和特异性的特点及其影响因素,特别详述了对这种非临床生物标志物鉴定中使用组织病理学方法的具体要求,

包括对常规光学显微镜方法的标本玻片检查程序、样品采集时间、对照、组织固定、切片数和取样部位以及切片染色等的要求,并且强调要在鉴定开始之前的鉴定研究设计方案中预先提出这些要求,以保证鉴定的科学性和可靠性。

FDA该指导原则对我国组织病理学非临床生物标志物的研究、发现和应用及其监管有很好的参考价值。这种生物标志物在我国新药研发中的应用对我国新药非临床研究必将有促进作用。

参考文献

- [1] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69(3): 89-95.
- [2] FDA. Critical Path Initiative [EB/OL]. (2015-10-23)[2016-09-05]. <http://www.fda.gov/science-research/specialtopics/criticalpathinitiative/default.htm>.
- [3] FDA. Considerations for Use of Histopathology and Its Associated Methodologies to Support Biomarker Qualification Guidance for Industry [EB/OL]. (2016-05-13)[2016-09-05]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM285297.pdf>.
- [4] FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [EB/OL]. (2013-09-12)[2016-09-05]. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>.
- [5] Bailly V, Zhang Z, Meier W, et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion molecule involved in renal regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(42): 39739-39748.
- [6] Wei B, Jin J P. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 505(2): 144-154.
- [7] Mignini L E, Khan K S. Methodological quality of systematic reviews of animal studies: a survey of reviews of basic research [J]. *BMC Med Res Methodol*, 2006, 6: 10.
- [8] Piper R D, Cook D J, Bone R C, et al. Introducing Critical Appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis [J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(12): 2059-2070.
- [9] Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, et al. Reviewing Animal Trials Systematically (RATS) Group. Where is the evidence that animal research benefits humans?[J]. *BMJ*, 2004, 328(7): 514-517.
- [10] Roberts I, Kwan I, Evans P, et al. Does animal

- experimentation inform human health care? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation [J]. *BMJ*, 2002, 324(7335): 474-476.
- [11] Holland T, Holland C. Unbiased histological examinations in toxicological experiments (or, the informed leading the blinded examination) [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39: 711-714.
- [12] Holland T, Holland C. Analysis of unbiased histopathology data from rodent toxicity studies (or, are these groups different enough to ascribe it to treatment?) [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39: 568-575.
- [13] Burkhardt J E, Pandher K, Solter P F, et al. Recommendations for the evaluation of pathology data in nonclinical safety biomarker qualification studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39(7): 1129-1137.
- [14] Crissman J W, Goodman D G, Hildebrandt P K, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(1): 126-131.
- [15] Morton D, Sellers R S, Barale-Thomas E, et al. Recommendations for pathology peer review [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38(7): 1118-1127.
- [16] Keenan C, Elmore S, Francke-Carroll S, et al. Best Practices for use of historical control data of proliferative rodent lesions [J]. *Toxicol Pathol*, 2009, 37(5): 679-693.
- [17] Tuomari D L, Kemp R K, Sellers R, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper pathology image data: compliance with 21CFR Parts 58 and 11 [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(3): 450-455.
- [18] Crissman J W, Goodman D G, Hildebrandt P K, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(1): 126-131.
- [19] Kondylis F I, Moriarty R P, Bostwick D, et al. Prostate cancer grade assignment: the effect of chronological, interpretive and translation bias [J]. *J Urol*, 2003, 170(4 Pt 1): 1189-1193.