

doi:10. 11751/ISSN. 1002 – 1280. 2022. 12. 09

兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验 技术指导原则简述

李 丹,董义春,苏富琴,徐 倩,杨大伟,刘艳华,汪 霞,梁先明*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022 – 08 – 29 [文献标识码]A [文章编号]1002 – 1280 (2022) 12 – 0069 – 06 [中图分类号]S851. 66

[摘 要] 血药浓度法生物等效性试验是兽药生物等效性研究的重要方法。为科学规范兽用化学药品生物等效性研究,保障兽药安全、有效、质量可控,在已发布实施的《兽用化学药品生物等效性试验指导原则》基础上,农业农村部兽药评审中心参考相关最新技术指导原则,结合国内兽药研究现状,修订发布了《兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验技术指导原则》。本文针对该指导原则的适用范围、试验设计的内容进行阐述,旨在加强企业或相关临床试验机构对此指导原则的理解,对生物等效性试验的有效开展提供指导与帮助。

[关键词] 药代动力学;血药浓度法;生物等效性;兽药

Overview of Guideline of Bioequivalence: Blood Level Bioequivalence Study for Veterinary Pharmaceutical Products

LI Dan, DONG Yi – chun, SU Fu – qin, XU Qian, YANG Da – wei, LIU Yan – hua,
WANG Xia, LIANG Xian – ming*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, CHINA)

Corresponding author: LIANG Xian – ming, E – mail:lxm990@163. com

Abstract: Blood level bioequivalence study is one of the key method in veterinary medicine comparison test. In order to scientifically standardize the research on bioequivalence of veterinary chemicals and ensure the safety, effectiveness and quality control of veterinary drugs, the Veterinary Drug Evaluation Center of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs referred to relevant latest technical guidelines and combined with the research status of veterinary drugs in China on the basis of the published and implemented Guidelines on Bioequivalence Test of Veterinary Chemical Drugs. The Technical Guidelines for bioequivalence Test of Veterinary Chemicals by blood drug concentration method were revised and published. In this paper, the scope of application of the guidelines

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项“兽药评审技术规范研究”(GY202023)

作者简介: 李 丹,硕士,副研究员,从事兽药注册评审评价方向研究。

通讯作者: 梁先明。E – mail:lxm990@163. com

and the content of trial design were described, aiming to strengthen the understanding of the guidelines by enterprises or relevant clinical trial institutions, and to provide guidance and help for the effective development of bioequivalence tests.

Key words: pharmacokinetics; blood drug concentration method; bioequivalence; veterinary pharmaceutical drug

生物等效性(Bioequivalence, BE)指含有相同活性物质的两种产品药学等效或药剂学可替代,在相同条件下以相同摩尔剂量给药,活性成分的吸收程度和速度无显著差异。生物等效性研究的临床意义在于确定药品的可处方性和药品之间的可互换性。为科学规范兽用化学药品生物等效性研究,保障兽药安全、有效、质量可控,2009 年农业部第 1247 号公告发布《兽药化学药品生物等效性试验指导原则》^[1],EMA 于 2022 年 1 月 28 日实施最新的兽药生物等效性(血药法)指导原则,为紧跟国际评审发展脚步,守住“研好药、产好药、用好药”的关键一环,我中心紧紧把握指导原则的“科学性、前瞻性和可操作性”原则,结合国内兽药研究现状组织修订发布《兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验技术指导原则》,并于 2023 年 1 月 1 日执行。该指导原则主要修订了生物等效判定标准、细化了生物样品的定量分析方法验证、增加了生物等效性试验评审中常见问题(如半片给药、呕吐剔除等)的技术要求。另外,由于该指导原则仅适用于新兽药注册,因此参比制剂限定为原研制剂这一种情形。再者,该指导原则配套了试验报告撰写要求,对研发和评审的可参考性更强。该指导原则由概述、试验设计、试验报告及附录四个部分组成,本文重点针对兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验的适用范围、试验设计涉及的分析方法、普通制剂的生物等效性评价、内服缓控释制剂、复方制剂等内容进行简单阐述,旨在加强研发单位或相关临床试验机构对此指导原则的理解,并对生物等效性试验的有效开展提供指导和帮助。

1 适用范围

本指导原则的适用范围仅限于兽用化学药品注册,兽用中药根据产品的具体情况可酌情参考本指导原则。本指导原则不包含难以取血的物种(如

蜂、蚕),血药浓度无法代表作用部位药物浓度的情形(如局部给药发挥局部作用的制剂、乳房注入剂、子宫注入剂、静脉特殊给药系统靶位点释放药物),微生物发酵产品,治疗用蛋白或多肽,预混剂,药效学终点的生物等效性试验,临床终点的生物等效性试验。

下列产品可豁免血药浓度法生物等效性试验:静脉、皮下或肌肉注射给药的水性溶液;内服溶液或其他溶解的剂型;内服不吸收的产品(如抗酸剂,透视介质);挥发性吸入麻醉溶液。

2 试验设计

2.1 分析方法 合适、可靠的分析方法是血药浓度法生物等效性研究的关键。全血、血浆、血清等生物样品具有取样量少,药物浓度低,内源性物质(如无机盐、脂质、蛋白质、代谢物以及其他药物)干扰多,个体差异大等特点。因此,必须根据被测物的结构、性质、浓度范围和样品介质等具体情况,建立适宜的生物样品定量分析方法,并对方法进行验证,相关要求参见配套发布的《生物样本定量分析方法验证指导原则》。方法验证项目包括:选择性、残留、定量下限、标准曲线、准确度、精密度、稀释可靠性、基质效应和稳定性。在分析方法验证后,应根据已验证的分析方法处理试验样品、质控样品和校正标样,以保证分析批被接受。值得研发单位和相关临床试验机构特别注意的是,新版指导原则正式实施后对生物等效性试验最主要的变化是明确了对分析批的具体要求。分析批的操作和处理是注册申报资料中的重点审查内容,在此简要阐述具体试验过程中分析批的六个关注点:(1)一个分析批应该包括空白样品和零浓度样品,包括至少 6 个浓度水平的校正标样,至少 3 个浓度水平质控样品(低、中、高浓度双重样品,或至少试验样品总数的 5%,两者中取数目更多者),以及被分析的试验样

品。(2)所有样品(校正标样、质控和试验样品)应按照它们将被分析的顺序,在同一样品批中被处理和提取。一个分析批包括的样品应在同一时间,由同一分析者使用相同的试剂相继处理,保持条件的一致性,而且质控样品应该分散到整个批中,以此保证整个分析批的准确度和精密度。同时,应该注意,对于生物等效性试验,建议一个受试动物的全部样品在同一分析批中分析,减少结果的变异。(3)在分析试验计划或标准操作规程中,应执行下列接受标准:校正标样测定回收浓度一般应在标示值的 $\pm 15\%$ 范围内,定量下限应在 $\pm 20\%$ 范围内,不少于6个校正标样,至少75%标样应符合这些标准。质控样品的准确度和精密度应该在标示值的 $\pm 15\%$ 范围内,至少67%质控样品,且每一浓度水平至少50%样品符合这一标准。另外,在同时测定几个分析物的情况下,对每个分析物都要有一条标准曲线。如果一个分析批对于一个分析物可以接受,而对于另一个分析物不能接受,则接受的分析物数据可以被使用,对被拒绝的分析物应该重新提取和分析。如果使用多重校正标样,其中仅一个定量下限或定量上限标样不合格,则校正范围不变。在此需要特别指出的是,所有接受的分析批,每个浓度质控样品的平均准确度和精密度均应该列表,并在分析报告中给出。如果总平均准确度和精密度超过15%,则需要进行额外的考察,并说明该偏差的理由。(4)在试验样品分析开始前,如果已知或预期试验样品中的分析物浓度范围窄,则推荐缩窄标准曲线范围,调整质控样品浓度,或者适当加入质控样品新的浓度,以充分反映试验样品的浓度。如果看起来很多试验样品的分析物浓度高于定量上限,在可能的情况下,应该延伸标准曲线的范围,加入额外浓度的质控样品或改变其浓度,至少2个质控样品浓度应该落在试验样品的浓度范围内。如果标准曲线范围被改变,则生物分析方法应被重新验证(部分验证),以确认响应函数并保证准确度和精密度。(5)应该在试验计划或标准操作规程中预先确定重新分析试验样品的理由以及选择报告值的标准,而且在试验报告中应该提供重新分析的样品

数目以及所占样品总数的比例。特别指出的是,给药前样品阳性结果或者由于药动学原因进行重新分析的情况下,资料中应该提供重新分析样品的身份、初始值、重新分析的理由、重新分析获得值、最终接受值以及接受理由。在仪器故障的情况下,如果已经在方法验证时证明了重新进样的重现性和进样器内稳定性,则可以将已经处理的样品重新进样。但对于拒绝的分析批,则需要重新处理样品。(6)在标准操作规程中应描述色谱的积分以及重新积分。任何对该标准操作规程的偏离都应在分析报告中讨论。实验室应该记录色谱积分参数,在重新积分的情况下,记录原始和最终的积分数据。

2.2 普通制剂的生物等效性评价

2.2.1 试验设计 生物等效性研究一般按自身交叉对照的方法设计。首选 2×2 交叉设计,根据受试制剂的个数还可分别采用 3×3 交叉、 4×4 交叉或部分交叉等设计。其他设计,如序贯设计、四处处理双周期设计(受试制剂/受试制剂、参比制剂/参比制剂、受试制剂/参比制剂和参比制剂/受试制剂)或多周期设计在某些情形下也是合适的,但应根据药物特点进行试验设计。

2.2.2 试验制剂 参比制剂和受试制剂含量的差别不能超过5%。应按产品标示的而不是检验的浓度或含量给药,给药量不得按检验的结果做校正。生物等效性数据及其衍生参数也不应按参比制剂和受试制剂含量的差别做校正。

2.2.3 动物 采用参比制剂标签规定的靶动物。每种靶动物均需单独进行生物等效性试验。

2.2.4 给药方案

2.2.4.1 单次/多次给药 大多数情况,采用单次给药。在下列情况下,可进行多次给药的生物等效性研究:药物作用取决于血中被测物的稳态浓度,活性成分是非线性和/或时间依赖性动力学,生物利用度个体差异大,吸收程度相差不大但吸收速度相差大,单次给药后被测物浓度过低、分析方法不能准确测得,治疗指数小,吸收延长或推迟,吸收速度小于消除速度,控、缓释制剂,分析方法的灵敏度不够、不能定量测得峰浓度后3个消除半衰期以后

的浓度等。

2.2.4.2 给药剂量 一般,没有证明线性动力学的受试制剂应采用参比制剂批准的剂量,剂量是标签的标示量,而不是实测值,受试制剂和参比制剂的剂量应相同。若参比制剂同一靶动物中批准了多个给药剂量,则应选用批准的最高剂量。如果能够证明参比制剂在标签标示范围内药动学特征(PK)呈线性,也可采用标签低剂量。为达到有效的可测药物浓度,安全指数大且 PK 呈线性的药物,也可选用比批准剂量高 2~3 倍的剂量,但需提供剂量选择支持数据和靶动物的耐受性数据。

2.2.4.3 给药途径 受试制剂和参比制剂应采用相同的给药途径和给药部位。

2.2.4.4 饲喂和禁食 所有种属动物,饲喂应符合动物福利。犬猫及非反刍动物用的内服普通制剂,应进行禁食的生物等效性试验,除非参比制剂标签中明确标示仅用于饲喂后动物。对要求与饲料一起给药的兽药,动物应先行饲喂。对饲喂可能影响吸收的兽药,受试动物应禁食。对于某些药物如肠溶制剂或内服缓释制剂,由文献或预试验得知饲喂条件下药物的生物利用度有较大变化时,必须同时在饲喂和禁食条件下证明生物等效性。

2.2.5 采样 采样点数一般应兼顾吸收相、分布相和消除相,在各时相及达峰时间前后应有足够的采样点。采样方案应该在预计的 T_{max} 附近设立密集的采样点,以便对 C_{max} 进行可靠估计,避免 C_{max} 成为浓度-时间曲线上的第一个点。给药前应先采集空白血样。采样应持续到活性成分的 3~5 个半衰期之后或 C_{max} 的 $\frac{1}{20} \sim \frac{1}{10}$ 之后,以满足 $\frac{AU C_{0-t}}{AU C_{0-\infty}}$ 大于 80% 的要求。对数线性回归分析消除相时,至少要选择 3 个采样点,以准确估计 K_e 和 $AUC_{0-\infty}$ 。

具有线性动力学产品,应选择合适的给药方案(剂量、给药间隔时间、给药次数)以获得稳态浓度。要测定连续的 3 个峰浓度(C_{max})或谷浓度(C_{trough}),或者通过在一个给药间隔内收集大约 10 份样品(包括刚好在下次给药之前采集的样品)以证明达稳态。达稳态后,应由末次给药的药-时曲线计算

AUC 和需关注的药动学参数。对于受昼夜节律影响的药物,应连续 24 h 取样。

对于内源性物质,采样方案应该能够对每个受试动物在每个周期表征内源性基线。通常从 2~3 个给药前样品中测得基线。在其他情况下,可能需要给药前 1~2 d 周期性采样,以获得时辰节律造成的内源性基线波动。

2.2.6 检测物质 一般原则:母体化合物的 C_{max} 通常对检测产品间吸收速率的差异比代谢物的 C_{max} 更敏感,因此,评价生物等效性应该基于母体化合物的浓度。

非活性前药:即使是非活性前药,也推荐证明母体化合物的生物等效性,不必测量活性代谢物。但是某些前药可能血浆浓度很低,并且快速清除,导致难于证明母体化合物的生物等效性。在此情形下,可以接受用主要活性代谢物来证明生物等效性。

使用代谢物替代活性母体化合物:只有在例外情况下,才会考虑以一个代谢物代替活性母体化合物。当使用代谢物替代活性母体化合物时,申请人应提交任何可得到的数据,以支持代谢物的暴露能反映母体化合物吸收,且证明该代谢物的生成在治疗剂量下不饱和。

对映异构体:一般可以接受使用非手性生物分析方法评价生物等效性。但是当满足以下全部条件或未知时,则应该测定单一对映体:对映异构体的药动学有差异;对映异构体的药效学差异显著;对映异构体的暴露(AUC)比值在不同吸收速率下发生变化。

如果一个对映体是药理活性的,另一个是非活性的,或对活性的贡献很小,则用活性对映体就足以证明生物等效性。

内源性物质:对于内源性药物的生物等效性试验,可以考虑超治疗剂量给药。

2.2.7 药动学参数计算 一般用非房室数学模型分析方法来估算药代动力学参数。在生物等效性研究中,其主要测量参数 C_{max} 和 t_{max} 均以实测值表示。 AUC_{0-t} 以梯形法计算,故受数据处理程序影响

不大。

在测定单剂量给药后的生物等效性试验中,应当测定受试制剂和参比制剂的 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 、 C_{max} 和 t_{max} 等参数。

在稳态下测定普通制剂生物等效性的试验中,提供受试制剂和参比制剂的 3 次谷浓度数据 (C_{trough}), 达稳态后的 AUC_{τ} 、 $C_{max,ss}$ 、 C_{trough} 、 $t_{max,ss}$ 、DF 等参数。

2.2.8 等效判断标准 在单剂量给药测定生物等效性的试验中,参比制剂和受试制剂 C_{max} 和 AUC 几何均值比的 90% 置信区间应该落在可接受范围 80.00% ~ 120.00% (AUC 未做对数转换) 或 80.00% ~ 125.00% (AUC 做过对数转换) 范围内。为了落在接受范围内,下限舍入后保留两位小数应 $\geq 80.00\%$, 上限舍入后保留两位小数应 $\leq 125.00\%$ 。

$AUC_{0 \rightarrow t}$ 至少应覆盖 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 的 80%, 如果覆盖小于 80% 的受试动物超过总数的 20%, 则需要讨论该试验的有效性。

2.2.9 数据处理与统计分析

2.2.9.1 数据表达 BE 研究必须提供所有个体浓度测定数据和药代动力学参数,并提供汇总数据。如所有受试动物各个时间点受试制剂和参比制剂的药物浓度测定数据、每一时间点的平均浓度 (Mean) 及其标准差 (SD), 提供每个受试动物的浓度-时间曲线 (C-T 曲线)、平均 C-T 曲线以及 C-T 曲线各个时间点的标准差。对于需进行统计分析的药代动力学参数,应提交对受试制剂和参比制剂比值的点估计及 90% 置信区间。对于单次给药研究,应报告每周期每只动物的 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 占 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 的百分比。不能随意剔除任何数据。脱落动物的数据一般不可用其他数据替代。

2.2.9.2 分析中数据剔除 应该尽量避免剔除数据,否则,可评价的受试动物数量会减少,剔除数据后试验效力会下降。试验方案中应有剔除标准,如内服制剂存在呕吐风险,因呕吐导致丢失的部分或全部给药剂量,因此,试验方案中预先设定与呕吐有关的数据剔除标准。此外,试验中可选择在动物呕吐后重复给药,其标准也应在试验方案中预先说

明。对此的例外是,由于受试动物未按规定给药,或者清洗期不够,此时可以质疑该试验的有效性。从统计分析中剔除的受试动物样本仍然需要测定,并列结果。

2.2.9.3 统计分析 评价生物等效性的最合适方法是双单侧 t 检验法和 $(1-2\alpha)\%$ 置信区间法。该法可用于各参数如 AUC、 C_{max} , 包括做自然对数转换或未做自然对数转换的数据。

AUC 是 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 与 $AUC_{t \rightarrow \infty}$ 之和。 $AUC_{t \rightarrow \infty}$ 是最后一次采样到无穷时间药-时曲线下面积,按 $AUC_{t \rightarrow \infty} = C_t / \lambda_z$ 计算。

$AUC_{0 \rightarrow t}$ 采用线性曲边梯形法计算。如果采样时间落在消除相,则需考虑用对数曲边梯形法或其他方法。

AUC、 C_{max} 和 t_{max} 一般用实测值而不用理论值。AUC 和 C_{max} 应经对数转换后用多因素方差分析法 (ANOVA) 进行显著性检验,然后再用双单侧 t 检验法和 90% 可信区间法判断兽药的生物等效性。

$AUC_{0 \rightarrow \tau}$ 是评价多次给药生物等效性的主要参数,平均稳态浓度 (C_{ss}) 是另一评价吸收程度的重要指标。

测定 $C_{max,ss}$ 和 $t_{max,ss}$, 还要测定药物浓度在 $C_{max,ss}$ 和 $C_{min,ss}$ 之间的波动范围 (DF), 也可用于评价多次给药的生物等效性,但要结合临床做具体分析。

3 内服缓、控释制剂

缓、控释制剂改变了药物释放和吸收的过程,这些制剂的生物等效性试验与普通制剂有所不同。一般要求同时进行单次给药和多次给药研究,必要时还应考虑饲喂的影响。

3.1 单次给药 试验设计基本同普通制剂。生物等效性评价标准同普通制剂。若以缓、控释制剂为参比制剂, AUC、 C_{max} 、 t_{max} 均符合生物等效性统计学要求的,可认定两制剂于单次给药条件下是生物等效的。若以普通制剂为参比制剂, AUC 符合生物等效性的一般要求但 C_{max} 明显降低、 t_{max} 明显延迟,则说明该制剂具有缓释或控释动力学特征。

3.2 多次给药 等效性评价一般同缓、控释制剂

的单次给药,但 C_{trough} 是需要考虑的重要参数。当以普通制剂为参比制剂时,对于波动系数的评价,应结合缓、控释制剂本身的特点做具体分析。

另外,对于不同的缓、控释剂型,还应根据剂型的特殊性进行试验设计,增加相应考察指标,以体现剂型的特点。

4 复方制剂

一个组分的体内行为不可能完全代表其它组分的体内行为,故原则上应证实每一个主要有效成分的生物等效性。试验设计时应尽量兼顾各个成分的特点。

5 结 语

综上所述,新修订的《兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验技术指导原则》是在农业部公告第 1247 号发布的《兽用化学药品生物等效性试验指导原则》基础上,结合国内外兽药研究现状修订的,其基本原则与 WHO^[2-3]、VICH GL52^[4]、FDA^[5]、EMA^[6]、CFDA^[7] 的相同,该指导原则的发布实施将为进一步规范我国兽药生物等效性研究试验提供技术指导,对兽药行业水平的整体提升也将起到积极地促进作用。

参考文献:

[1] 农业部公告第 1247 号. 兽用化学药品生物等效性试验指导

原则[S].
Announcement No. 1247 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Guidelines for bioequivalence testing of veterinary chemical products[S].
[2] WHO Working Document Multisource (Generic) Pharmaceutical Products; Guidelines on Registration Requirements to Establish Interchangeability[EB/OL]. 2005.
[3] 闫 方,王玉珠,杨进波. 世界卫生组织基于生物药剂学分类系统的生物等效性豁免最新进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2020,36(24) :4054 – 4064.
Yan Fang,Wang Yuzhu,Yang Jinbo. World Health Organization’s latest progress in biowaivers based on biopharmaceutics classification system[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2020,36(24) :4054 – 4064.
[4] GL – 52; Bioequivalence; blood level bioequivalence study for veterinary pharmaceutical products [EB/OL]. 2016.
[5] FDA Guidance for Industry’. “Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations” [EB/OL]. 2016.
[6] EMA;Guideline on the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products[EB/OL]. 2022
[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版第四部 [S]. 9011 药物制剂人体生物利用度和生物等效性指导原则. Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of China 2020 IV[S]. 9011 Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products.

(编 辑:侯向辉)