

讲 座

体外生物诊断试剂申报技术要求

马玉楠

(国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

[关键词] 体外生物诊断试剂; 诊断; 技术要求;

[中图分类号] R95 [文献标识码] C [文章编号] 1003-3734(2003)06-0482-04

体外诊断试剂主要用于疾病的诊断、预防、疗效和预后的判断、治疗药物的监测、健康状况的评价和遗传性疾病的预测,与体内用药不同,体外诊断试剂的质量主要在于敏感性、特异性、准确性和稳定性。

2002 年 9 月 17 日国家食品药品监督管理局(SFDA)颁布了国药监办[2002]324 号文“关于体外诊断试剂实施分类管理的公告”:为进一步加强体外诊断试剂的监督管理,体现体外诊断试剂监督管理的特点以及我国当前体外诊断试剂监督管理的实际状况,理顺关系,依据《中华人民共和国药品管理法》及《医疗器械监督管理条例》的有关规定,对体外诊断试剂的管理进行调整:对体外诊断试剂实行分类管理,将体外生物诊断试剂按药品进行管理,体外化学及生化诊断试剂等其他类别的诊断试剂均按医疗器械进行管理,体内诊断试剂一律按药品管理。规定按药品进行管理的体外生物诊断试剂包括:①血型、组织配型类试剂。②微生物抗原、抗体及核酸检测类试剂。③肿瘤标志物类试剂。④免疫组化与人体组织细胞类试剂。⑤人类基因检测类试剂。⑥生物芯片类。⑦变态反应诊断类试剂。按医疗器械管理的体外试剂包括:①临床基础检验类试剂。②临床化学类试剂。③血气、电解质测定类试剂。④维生素测定类试剂。⑤细胞组织化学染色剂类。⑥自身免疫诊断类试剂。⑦微生物学检验类试剂。

以上分类基本延续了 1999 年 5 月 SFDA 颁布的《新生物制品审批办法》中对体外诊断试剂管理的分类,将免疫学、微生物学、分子生物学等体外诊断试剂,作为生物制品进行管理,即涉及经血传播的病原体诊断、肿瘤标志物、妊娠等的检测,这些产品技术含量较高,生产工艺比较复杂。根据多年来的工作体会,对这部分产品的申报程序和技术要求进行介绍。

1 申报过程

对于有《药品生产企业许可证》的体外生物诊断试剂生产企业,其新产品的申报需通过初审、检定、

受理申报、审评、批准几个步骤,才可获得生产批准文号,产品才能正式生产。

1.1 初审 由各省药品监督管理局负责并通知中国药品生物制品检定所派人一起参加对新申报品种进行现场考察,以保证申报产品的真实性。需要填写现场考核报告,说明每批产品的批量及生产条件,生产记录等是否符合要求。

1.2 检定 由中国药品生物制品检定所承担,实行现场抽样。需生产 3 批产品,抽样量一般为检定量的 3 倍。

1.3 申报 SFDA 注册司受理中心直接收审,形式审查后转药品审评中心进行技术审核。

1.4 技术审评 由药品审评中心承担。

1.5 批准 由药品审评中心技术审核合格后报注册司审核批准,正式发给生产文号和/或新药证书。

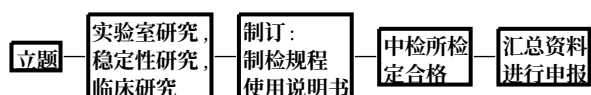
对于没有《药品生产企业许可证》的企业,只能申请产品的新药证书,不能生产,可以将产品的新药证书转让给有许可证的企业进行生产。如果想自己建厂,首先需申请立项建厂,获得《药品生产企业许可证》后可以生产,但在 30 天内必须申请通过 GMP 认证,如果不能通过 GMP 认证,则生产文号将被取消。

2 申报批量的要求

为了考察生产工艺是否稳定,产品质量是否一致,在原《新生物制品审批办法》中特别制定了批量的要求。通过连续生产 3 批产品,考察其批间差异不能太大。研制者在研制初期往往在实验室进行生产,小批量时质量较好,一旦放大生产,质量问题就容易出现。申报新的体外生物诊断试剂批量的要求:酶联免疫诊断试剂,10 000 人份/批;凝集法诊断试剂,10 000 人份/批;胶体金法诊断试剂 3 000 人份/批;PCR 法诊断试剂;5 000 人份/批;其他方法的诊断试剂根据生产工艺、产品的稳定性、市场需求故算量具体制定,一般为 3 000~10 000 人份/批。

3 申报资料项目

申请新药证书及生产的产品申报资料需按照下列十一项进行整理: ①新药证书/生产申请表。②研究工作总结。③产品名称, 选题目的和依据, 国内外有关的研究现状及生产使用情况综述及主要参考文献资料, 专利检索资料。④产品的研制报告: 包括原材料的选择、制造, 生产工艺过程的确定, 成品质控标准的建立, 成品性能评价(灵敏度、特异性、精密度等), 与国内外同类产品进行比较等试验资料。⑤连续生产 3 批产品的原始制造检定纪录复印件, 中检所对这 3 批产品进行检定的报告书。⑥稳定性试验资料: 至少 3 批产品在储存温度条件下保存至效期后两个月的试验资料, 及 37℃保存的试验资料。检测项目应按成品检定标准进行。⑦临床使用考核资料: 选择 3 家以上省级医疗卫生单位用统一的方案进行考核, 提供一份总的临床考核总结报告及各单位的分报告, 附临床考核原始数据。病例数一般不少于 1 000 例, 非常见病可酌减, 但要有统计学意义。⑧制造检定规程草案: 参照现行版《中国生物制品规程》的格式书写。⑨使用说明书: 包括中英文名称, 规格, 前言(原理、用途、特点), 试剂盒组分、操作步骤, 结果判定, 注意事项, 保存条件及有效期, 生产单位名称、地址、电话、邮编等。⑩包装材料及组分标签实物或样稿。⑪《药品生产企业许可证》复印件。生产车间验收文件复印件。总结以上申报过程及申报项目要求, 作为新产品的研制者需经过下列步骤进行研究申报:



4 申报资料的技术要求

根据申报资料项目的要求, 对于资料④产品的研制报告, 不同方法的产品有不同的技术要求, 现将各类典型产品及原材料的技术要求进行总结如下, 供大家参考。

4.1 酶联免疫试剂盒 ①首先要说明反应原理。

②提供原材料的选择及质控要求: 围绕反应原理, 说明主要原材料的来源、研制过程、质控方法等。③提供生产工艺确定的试验资料: 包括酶标板的选择; 包被条件的确定; 封闭条件的确定, 酶标抗体/抗原的制备, 显色条件的确定, 反应时间的选择, 一步法/二步法的选择(二者比较), 加样量的确定, 各种配套液体的配制等等。④说明阴、阳性对照血清的选择, 制备。⑤提供临界值(Cut off)值确定的试验资料。一

般选择大于 400 人份正常人样本进行测定, 求出均值($\bar{x}$)和标准差(SD), 给出全部的结果和分布图, 一般 Cut off = $\bar{x} + 3 \sim 5SD$, 保证 99.9%阴性在 Cut off 值以下, Cut off 值一般与阴、阳性对照联系起来, 每次试验采用 $\bar{x}_{阴} + 系数$ 或 $\bar{x}_{阳} + 系数$, 其中阳性对照均值对试验室条件反应灵敏, 所以其吸收度(A)值控制比较严格。Cut off 值确定以后, 还要对已知的阴、阳性标本进行检测, 验证其正确性。⑥说明质控标准的建立: 一般包括敏感性、特异性、精密度等指标。定性试剂盒: 敏感性质控品一般 10 份左右, 确证为阳性, A 值应包括高、中、低浓度的质控品; 特异性质控品一般 10~20 份左右, 除正常人标本外, 还应有相关疾病, 可能引起交叉反应的样本, 说明 A 值范围; 精密度: 不能是强阳性标本, 以 A 值接近 Cut off 值为宜, 测定 10 次, 变异系数(CV) < 15%。定量试剂盒: 标准品、标准曲线需标化, 要有高、低值质控品。⑦提供与国内外同类产品进行比较的试验资料。

4.2 胶体金试剂 ①首先要说明反应原理。②提供原材料的选择及质控要求(同酶联免疫法试剂盒)。③要对检测线、质控线加以说明。④提供生产工艺确定的试验资料: 包括膜的选择, 说明孔径, 吸水速度; 胶体金颗粒大小的确定; 包被条件的确定; 金标记的条件及质控要求; 各种配套液体的配制; 生产工艺流程图; 生产条件的要求等。⑤说明质控标准的建立: 包括物理形状(外观, 条宽大于 3mm), 灵敏度, 特异性, 显色时间(5~15min), 显色均匀性等。⑥提供干扰试验资料。⑦稳定性研究及研制报告需提供照片。⑧提供与国内外同类产品进行比较的试验资料。

4.3 体外核酸扩增(PCR)试剂盒 PCR 试剂盒是模拟体内 DNA 复制过程, 体外在聚合酶作用下, 进行特定 DNA 片段的复制, 达到检测的目的。申报此类产品的技术要求如下: ①说明病原体靶核酸序列的选择依据。包括靶核酸序列的长度、序列、内切酶图谱及所处基因组位置等特点。选择单个或多个靶序列的理由及靶序列的保守性和特异性。②说明核酸引物和探针的特性。核苷酸碱基数, G+C 百分比, 碱基序列; 制备方法, 纯化方法, 纯度, 260nm 和 280nm 吸收度比值; 引物内部二级结构和末端互补情况, 3'端要避免碱基配对(避免 6 对以上连续碱基配对); 用于捕获和测定目的的连接物。③提供扩增条件确定的试验资料: 包括酶的来源、性质, 扩增时间、温度、循环次数, 核酸模板用量, 终止反应的方法等。对扩增产物应进行测序, 比较其正确性。④

说明扩增体系防污染的措施:应提供使用方法和有效性的数据。⑤说明对标本的要求及 DNA/RNA 的提取方法:提供提取效率的试验资料。⑥提供对扩增产物进行检测的方法学研究资料:目前一般采用荧光法、酶免法、膜杂交法进行检测。⑦说明 3 个对照品的确定及制备:包括强阳性、临界阳性、阴性对照。注意提供灭活的方法。⑧说明临界值及灰区确定的试验依据。⑨说明质控标准的建立:定性试剂盒:检测灵敏度必须明确,并提供特异性、精密度等指标的确定资料。定量试剂盒:要包括标准曲线、高、低值质控品确定的资料。⑩提供与国内外同类产品进行比较的试验资料。

4.4 基因重组抗原 随着科学技术的发展,今天人们已经能够确定和获得许多病原体天然活性蛋白的编码基因,将其插入表达载体,引入宿主细胞后,有效地表达该基因产物,经分离、纯化,成为病原体检测试剂盒的原材料——基因重组抗原。申报此类原材料的技术要求如下:①提供病原体基因序列,说明所选择的抗原片断所处基因组的位置和选择理由。②提供表达载体的资料:包括基因的来源、克隆情况、内切酶图谱,表达载体的构建、结构等及宿主细胞的名称。③提供插入基因的核苷酸序列(及推导的氨基酸序列)分析资料,提供测序的原始结果。④说明表达所采用的方法及表达水平。⑤提供生产过程的试验资料:包括主细胞库和生产细胞库的建立,工程细胞传代稳定性,目的产物提取及纯化工艺研究资料,3 批产品的制检记录。⑥提供终产品的质控标准及检定资料:包括纯度,相对分子质量,免疫活性(抗原性)检测,蛋白质浓度等等。纯度及相对分子质量的测定一般选择 SDS-PAGE 电泳方法(还原条件),要有适宜的 Marker 和扫描结果。纯度一般要求大于 90%。纯度检测上样量要大于 5 μ g。

4.5 单克隆抗体 单克隆抗体作为试剂盒的原材料需提供下列资料:①提供杂交瘤细胞的试验资料。亲本细胞试验应说明骨髓瘤细胞,免疫亲代细胞和免疫原(说明来源、鉴定、免疫剂量、注射方法、部位、次数,测效价的方法和结果)等。细胞融合试验应说明简单的步骤、次数、每次的结果、筛选的方法(ELISA)及结果。克隆化培养试验应说明方法、次数、结果。②对单克隆抗体细胞株的检定资料:包括免疫球蛋白及亚类,亲和力,特异性,交叉反应等。对于双抗体夹心法试剂盒要进行识别位点的分析。③杂交瘤细胞株体外传代 3 个月以上保持稳定分泌抗体的情况。④提供建立原始细胞库,种子细胞库,

生产细胞库的试验资料。⑤提供单克隆抗体制备过程的试验资料:腹水法或细胞培养法、抗体的收集方法、抗体的纯化方法、提供连续生产 3 批的生产制检记录。⑥提供单克隆抗体质控要求及检定结果的试验资料:包括其外观、活性、纯度、蛋白质含量等指标。

4.6 生物芯片试剂盒 根据产品的反应原理可以分为基因芯片和蛋白芯片,基因芯片参照 PCR 试剂盒的申报要求进行,蛋白芯片参照酶免试剂盒的申报要求进行。另外需提供以下技术资料:①载体的选择。②连接物的确定。③工艺过程条件的确定。④生产设备的要求。⑤样品预处理过程的确定。⑥试剂盒中阴、阳性质控品的选择。⑦产品的性能评价。⑧检测设备的要求。⑨成品质控系统的建立。

关于生物芯片的制备工艺:因为影响工艺过程的因素较多,为了保证成品质量的稳定性,建议:①对芯片制备工艺,芯片的选择、芯片的处理(如:氨基化、醛基化)、点样等每一步进行质量控制,建立质量标准。②点样的均匀性、样品的吸附性,包括芯片内各点间、批内不同芯片间、不同批的不同芯片间的点样均匀性和样品的吸附性进行质量控制,建立质量标准。③对芯片内不同样本间的抗干扰能力进行质量控制,建立质量标准。④对点样后的稳定性进行质量控制并建立质量标准。

5 体外生物诊断试剂临床考核的要求

体外生物诊断试剂的临床研究与一般的新药申报不同,因为它没有安全性的问题,所以临床研究不需要事先批准,按照申报资料项目 7,自己选择 3 家以上省级医疗卫生单位用统一的方案进行考核,提供一份总的临床考核总结报告及各单位的分报告,附临床考核原始数据。病例数一般不少于 1 000 例,非常见病可酌减,但要有统计学意义。在临床研究时,要注意以下几个问题:①临床试验的目的必须明确:证明产品的适用范围,及该范围的灵敏度(敏感性)和特异性。②选择 3 家以上省级医疗卫生单位:应是比较权威的三甲医院用统一的方案进行考核,不得在医药生产单位进行,特殊病种可在专科医院进行。③临床考核总结报告及各单位的分报告需附临床考核原始数据:包括日期、姓名、性别、年龄、病例号/门诊号、临床诊断、试验原始数据、试验人员、考核人员、负责人签名等内容。④病例数一般不少于 1 000 例,其中阳性病例应超过三分之一。非常见病病例数可酌减,但要有统计学意义。⑤临床单位必须加盖院级的公章。⑥对不相符的标本一定要追踪、用金标准加以确认,证明检测结果的正确

性。其资料归纳见表 1。

表 1 评价产品试验真实性的资料归纳

试 验	有病(真阳性)	无病(真阴性)	合 计
阳 性	A	B	A + B
阴 性	C	D	C + D
总 数	A + C	B + D	A + B + C + D

灵敏度(真阳性率) = $A / (A + C) \times 100\%$, 特异度(真阴性率) = $D / (B + D) \times 100\%$ 假阳性率 = $B / (B + D) \times 100\%$, 假阴性率 = $C / (A + C) \times 100\%$

6 制检规程及使用说明书的制定

体外生物诊断试剂是一门试验科学,所有研究工作汇总到最后,体现在产品的制检规程的制定及使用说明书的书写上,制检规程是产品质量保证的规范,使用说明书是使操作者得出正确结果的基础,这两份文件也是我们在技术审评通过时,上报批准的重要文件。

制检规程经过 3 个阶段成为正式的国家标准:试行标准、两年后转为正式标准、最后收入《中国生物制品规程》中。

制检规程需参照现行版《中国生物制品规程》的

格式书写,包括以下几个方面:①前言(原理、用途、组成、特点)。②主要原材料的来源、规格及质控要求。③制造过程:包括原材料及试剂盒的每个组分的制造过程和质控要求。④半成品检定。⑤组装。⑥成品检定。⑦保存条件及有效期。⑧生产工艺中一些液体的配制可作为附件附后。

使用说明书的书写要求包括以下几个方面:①前言(原理、用途、特点)。不可扩大应用范围。②试剂盒的组分,规格。③样品要求:种类、采集和保存方法。④适用仪器。⑤操作步骤。⑥结果判定,临界值。⑦注意事项。⑧保存条件及有效期。⑨生产单位名称、地址、电话、传真等。

[作者简介] 马玉楠(1961 -),女,副主任药师。主要从事体外诊断试剂的审评工作。联系电话:(010)68585566。

(收稿日期:2002 - 10 - 27)

编号:N- 0047
中文药名:盐酸莫西沙星
英文药名:moxifloxacin hydrochloride
CAS 登录号:[151096 - 09 - 2]/[186826 - 86 - 8]
用途:治疗成人急性细菌性鼻窦炎、急性细菌性慢性支气管炎的恶化、社区获得性肺炎、无并发症的皮肤/ 皮肤组织感染。
剂型:输液;片剂
剂量:160mg/ 100mL(输液);400mg(片剂)
给药途径:静脉注射;口服
商品名:AVELOX
上市公司:BAYER CORP PHARMACEUTICAL DIV
FDA 批准日期:2001 年 11 月 30 日(输液);1999 年 12 月 10 日(片剂)
上市状态:处方药
专利状态:US - 4990517,2009 年 6 月 30 日到期;US - 5607942,2014 年 3 月 4 日到期;US - 5849752,2016 年 12 月 5 日到期。NCE 排他期限为 2004 年 12 月 10 日;NDF 排他期限为 2004 年 11 月 30 日;I - 329 排他期限为 2004 年 4 月 27 日。德国拜尔公司 1999 年 10 月 29 日在中国申请了“莫西沙星药物制剂”专利,申请号:99813124.5,公开号:1325306,公开日:2001 年 12 月 5 日;德国拜尔公司 2000 年 7 月 25 日在中国申请了“莫西沙星/ 氯化钠制剂”专利,申请号:00811427.7,公开号:1368891,公开日:2002 年 9 月 11 日。
药品行政保护:无
国内开发情况:拜尔医药保健有限公司已获准生产盐酸莫西沙星片(0.4g/ 片,商品名:拜复乐,国药证字

H20020449),SFDA 药品审评中心 2003 年 3 月受理了国内研制开发的盐酸莫西沙星原料药、片剂、胶囊剂和注射剂的注册申请。德国拜尔公司获准进口多种包装规格的盐酸莫西沙星片(进口药品注册证号:H20020390,H20020391),另有一个盐酸莫西沙星片和二个盐酸莫西沙星注射液正在申请进口注册。国内另有数十篇有关盐酸莫西沙星的研究与综述性文章发表。

编号:N- 0048
中文药名:琥珀酸氟伐曲普坦
英文药名:frovatriptan succinate
CAS 登录号:[158747 - 02 - 5]/[158930 - 09 - 7]
用途:治疗急性偏头痛。
剂型:片剂
剂量:2.5mg
给药途径:口服
商品名:FROVA
上市公司:ELAN PHARMA INTERNATIONAL LTD
FDA 批准日期:2001 年 11 月 8 日
上市状态:处方药
专利状态:US - 5464864,2012 年 11 月 7 日到期;US - 5616603,2014 年 4 月 1 日到期;US - 5637611,2014 年 6 月 10 日到期;US - 5827871,2015 年 10 月 27 日到期;US - 5962501,2013 年 12 月 16 日到期。NCE 排他期限为 2006 年 11 月 8 日。
药品行政保护:无
国内开发情况:未见研制报道。