

附件：生物活性测定方法设计、建立及验证指导原则公示稿（第一次）

## 生物活性测定方法设计、建立及验证指导原则

生物活性测定方法是利用生物受试体，包括整体动物、离体组织、器官、类器官细胞和微生物等，通过观察药物对这些受试体的影响来评估药物生物活性的一类方法。此类测定方法的研究对象多为生物制品、生化药品或中药等。本指导原则基于科学和风险管理理念，为生物活性测定方法的设计、建立、验证等过程提供原则性要求，主要包括分析目标概况（analytical target profile, ATP），方法的设计、建立、验证以及持续监测和改进等全生命周期管理的相关内容。

### 1. 分析目标概况

建立生物活性测定方法首先要了解影响产品生物活性的关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)，如工艺、安全性、有效性、稳定性等，结合预期用途，确定生物活性测定方法的接受标准。该标准是测定方法建立的基础，包含单个或多个质量属性的测定要求，可采用适当的方法性能特性及相关性能标准来描述，如专属性/选择性、精密度、准确度、范围及耐用性等，根据分析方法的预期目的和所选特定技术，性能特性及相关性能标准有所差异。方法应用要求有助于分析方法的持续监测和改进，确保现行的、修订的或新的分析方法始终适用于预期用途，是方法生命周期管理的依据。

ATP 包含的基本内容有：① 方法的预期用途，如用于测定生物效价、生物鉴别和生物限度等。② 与待分析产品的关键质量属性相关的信息和方法的检测原理。③ 需报告的方法特性，特别是性能特性，如准确度、精密度、专属性 和可报告范围，及其相应的接受标准和理论依据等。对具有多种生物活性的产品，其每一种关键生物活性应当分别进行研究，根据多种活性与临床疗效相关的程度确定权重系数，并设定标准。

### 2. 生物活性测定方法的设计

生物活性测定可用于原液/原料药和制剂的放行检测、稳定性评价、标准物质和其他关键试剂的验证、中间体和制剂处方的控制、产品杂质和降解产物的控制、生产工艺变更支持等。对于每种不同预期用途，其分析方法的专属性（特异性）、准确度、精密度和耐用性的要求是不同的。必要时可开发一种或多种生物活性测定方法，对各

28 阶段产品或终产品进行质量控制。对于方法适用性的判断要建立在科学性和统计学的  
29 基础上，同时也需考虑可操作性和经济实用性。

## 30 **2.1 生物活性测定方法分类**

31 生物活性测定方法根据不同的实验系统可分为体内测定和体外测定。

### 32 **2.1.1 体内生物活性测定方法**

33 体内生物活性测定是指用实验动物来测定产品生物学反应的检测方法，一般通过  
34 将一系列标准物质和样品的稀释液给予实验动物体内，并建立药物浓度-剂量反应关  
35 系来估算生物活性。

### 36 **2.1.2 体外生物活性测定方法**

37 体外生物活性测定方法是指采用离体组织、器官、类器官、细胞和微生物等评估  
38 产品的生物活性。

39 离体组织、器官生物活性测定是将人类或动物的组织、器官等在实验室中培养，  
40 通过考察其对样品的反应来估算生物活性。通常适用于样品对离体组织、器官等有明  
41 显活性，且量效关系显著的情况。涉及来自动物的活体组织或器官的生物活性测定需  
42 要类似于体内测定的过程。而细胞生物活性测定则是利用体外培养的细胞对样品的反  
43 应性来评估产品的生物活性。这些细胞可以是来源于肿瘤的细胞系，也可是转染受体  
44 的细胞系等。

## 45 **2.2 生物活性测定方法的选择**

46 生物活性方法的选择应按预先设定的 ATP，采用先进的、敏感的方法进行相关研  
47 究。首先考虑与产品临床适应症或药理机制相关的生物活性测定方法，如采用其他技  
48 术和方法应提供依据。

49 原则上，应尽可能减少体内测定法的使用。当体外活性与体内活性相关联时，体  
50 外测定可以替代体内试验。当体外试验不能很好的模拟体内实验，或存在很大差异时，  
51 仍需要用体内方法评估产品的生物活性。采用动物试验应遵循 3R 原则和相似性原则、  
52 选择性原则、易获得原则。

53 定量生物活性测定方法应选择背景较低，信噪比高的反应系统，以得到较好的可  
54 重复剂量反应曲线。如不能满足上述条件，可考虑生物限度方法。

## 55 **2.3 实验设计的考虑要点**

56 在生物活性测定方法设计、建立和验证过程中，需考虑相应的产品属性，选择适  
57 当的实验模型和统计方法开展研究，以对测定方法的性能特性进行评价，例如在可报  
58 告范围内的专属性、准确度和精密度（包括校准模型、范围上限和/或下限）和耐用性。  
59 采用风险评估和先验知识，以识别可能影响方法性能的方法参数，从而提高方法的成  
60 功率，减少试验结果偏差的风险。风险评估通常在测定方法早期阶段进行。

61 不同的生物活性测定方法可采用不同的实验设计类型。选择统计模型首先需要考  
62 虑的是评估试验的响应模式。模型的选择可以取决于分析测定数据类型，如定量或定  
63 性。如采用生物效价测定法，应按照生物检定统计法（通则 1431）的要求进行实验设  
64 计；根据样品测定结果的变异性确定样品生物效价范围和可信限或置信区间。如采用  
65 生物限值测定法（或生物鉴定），实验设计可考虑设样品组、阴性对照组或阳性对照  
66 组，测定方法采用体内测定法时，应考虑设模型对照组。

67 在生物测定方法开发建立阶段，实验设计类型可多样化，一般包括单因素设计(one  
68 factor at a time, OFAT) 和多因素设计（design of experiments, DOE）的筛选设计（如：  
69 响应曲面设计、析因设计等），其目的是找出方法的最佳实验条件。在此阶段要使得  
70 方法的准确度尽可能达到最佳(偏倚达到最小)；在保证准确度的基础上，提高精密度，  
71 从而保证方法能更好地满足其预期用途的要求。而在方法验证阶段，所采用的实验设  
72 计，主要是选择混合效应模型的析因设计(正交或/和嵌套)。

73 在进行单因素或多因素实验和/或建模时，应探索已确定的测定方法参数的范围和  
74 相互作用。拟定生物活性测定方法控制策略，包括相关分析方法参数的设定值和/或  
75 范围。

### 76 2.3.1 试验系选择

77 试验系的选择与药物作用、实验原理和观察指标密切相关。具体试验系的选择详  
78 见 3.2 试验系的选择。

### 79 2.3.2 标准物质的选择

80 标准物质的制备、标定和保存等过程应符合国家标准物质制备和标定的相关要  
81 求。标准物质的选择应考虑如下几个方面。

82 （1）原料的选择是制备标准物质的关键。标准物质的选择原则上应可溯源，选  
83 择已证明足够稳定且适合临床试验的一个批次或多个批次，或用一个具有代表性的原  
84 料批次作为标准物质，并应经全面的质量确证。

85 (2) 标准物质原则上应与产品同质。一般选择含组分及配比与产品（如原料/原  
86 液或制剂）所含组分和配比相似，即产品与标准物质在化学组成和/或生物效应方面应  
87 是同质的。

88 (3) 通常首批新建标准物质的标定需要超出常规检测的次数，且一般要求至少 3  
89 个实验室进行协作标定，以确保新标准物质效价测量准确性。

90 (4) 更换生物活性标准物质时，应进行标准物质原批次与替换批次的相关性研  
91 究，并对替换批次标准物质活性和含量进行标定，保证赋值的可溯源性。

92 (5) 应选择适当贮存条件以保证标准物质足够稳定，即标准物质的保存条件在  
93 其有效期内必须能够确保其生物活性。一般生物活性标准物质的储存条件应比相应的  
94 药物原料和成品更加严格，因此标准物质储存条件与药物原料和成品可能不同。例如  
95 生物制品参考品往往采用-70℃条件下进行保存。对新建标准物质应进行稳定性考察  
96 或质量监测，并进行趋势分析。需开展不同温度（如-20℃、4℃、25℃）等条件下的  
97 加速稳定性研究，用于评估标准物质的降解速率，以及描述其稳定性特征。

98 为了保证标准物质的稳定性，其配方与成品也可能不同（例如，冻干配方中加入  
99 特定的稳定剂）。应考虑不同标准物质生物活性反应一致性。如在临床前研究阶段与  
100 临床研究阶段，标准物质的配方可能不同，有必要验证其生物活性反应一致性。

### 101 2.3.3 样本代表性和样本量

102 在生物活性测定方法开发阶段，为了评价生物活性模型的专属性、准确度和耐用  
103 性。样品通常可采用实验室研发和中试规模产品，以提供足够的变异度，也可采用经  
104 酸碱破坏、高温、光照等影响因素处置的试验样品。建立生物活性定量分析校正模型  
105 所需的样本数量取决于样本基质的复杂性和/或基质对目标分析物信号的干扰，因此复  
106 杂的样本基质通常需要更多样本。足够的样本数有助于识别生物活性测定方法的变异  
107 度。

### 108 2.3.4 试验条件的优化

109 生物活性测定试验条件的优化目的是获得最佳检测方法，以便进行生物效价、生  
110 物限值计算时具有较好的准确度、精确度和耐用性。

111 优化试验通过控制实验变化因素的条件和水平得到相对可控的结果，利用统计学  
112 手段来确定可靠和稳定的实验变化因素。试验条件的优化一般有两种研究方法：单因  
113 素设计和多因素设计，前者通过逐一研究各因素而确定理想的实验条件，后者通过同

114 时对多因素研究而确定理想的实验条件。通常使用多因素实验设计可更有效的进行试  
115 验条件的优化。相较于 OFAT, DOE 通常所需的实验量较少,且有助于深入了解生物  
116 活性测定性能因素间的相互作用,通常包括风险分析、筛选、响应优化、确认等步骤。  
117 详见 3.4.1 实验参数的确定。

118 生物活性多因素模型的选择应基于测定方法要求和所选的测定技术。模型开发之  
119 前,基于先验知识,确定模型的性能因素,包括基础模型假设和期望的模型适用范围。  
120 初始风险评估有助于了解物料和工艺中可能影响模型性能的潜在变异来源,因此应在  
121 模型校正过程中予以考虑。常规分析通常应包括使用离群值判断对每次测定的适用性  
122 进行监测。如果确认测试或离群值判断未能满足预定义标准,或数据趋势表明模型、  
123 工艺或被测物料存在潜在不可接受的性能,则需考虑对模型重新进行评估。

### 124 2.3.5 统计分析方法的考虑

125 生物活性测定方法应采用适宜的统计模型对相应数据分析做出判断,包括进行数  
126 据转换和/或数据加权,以及建立试验系和样品的适用性标准。该数据分析应包括可用  
127 于异常检测和全模型拟合的设计因素,还应包括用于选择数据子集的计划。一般生物  
128 效价模型应考虑:

129 (1) 选择适当的统计模型。

130 在选择最合适的统计模型时需要考虑以下问题。首先,该模型应该适合测定终点  
131 类型---连续,计数或二分法。其次,该模型应该包括测定设计的结构。对于任何非完  
132 全随机设计,模型中应有用于影响试验系的因素。如细胞法的板内区组,动物设施内  
133 饲养笼的位置,给药时间等。第三个考虑适用于连续节点,涉及是否使用回归模型或  
134 均值模型(方差模型拟合分析适合于各样品的各稀释水平的单独的平均测试),以及  
135 适当的误差项。均值模型可能是适合的,因为它不对浓度-响应曲线进行假设。

136 (2) 假设

137 在不进行平行统计模型假设的情况下,将所选统计模型与数据进行拟合,然后再  
138 评估残差的分布,具体检查残差是否偏离正态和常数方差。根据需要转换数据,或者  
139 选择一个权重方案。尽可能使用来源于独立检测的实验数据,主要目的是解决测定中  
140 的正态偏离和浓度范围内的反应常数方差。转换和评估残差的分布可以交替进行。

141 (3) 离群值的判断和剔除

142 在同一剂量组内的各个反应值中,如果出现特大或特小反应值时,最终导致残差

143 不可用，在此情况下应进行离群值检验，以确定其是否应被剔除。离群值的检验方法  
144 很多，可参照生物检定统计法（通则 1431）异常值剔除和缺项补足相关内容进行。应  
145 该建立用于离群值检验的策略，包括建立离群值可接受的范围。

146 离群值检验需对每次测定的适当性进行监测。如果确认测试或离群值判断未能满  
147 足预定义标准，或数据趋势表明模型、工艺或被测物料存在潜在不可接受的性能，则  
148 需考虑对模型重新进行评估。

#### 149 (4) 模型建立和维护

150 模型假设应借助各种适宜的生物统计工具进行判断。常采用的统计学工具包括：  
151 残差检验，用于确定数据的未建模特征（例如， $x$ -残差或  $F$ -概率）。根据离群值检验，  
152 用于确定数据是否在模型构建的范围内。可采用经验证的软件包进行模型预测。

### 153 2.3.6 可靠性测验（适用性评价）

154 为确保生物活性测定方法的可靠性，应进行测定方法可靠性测验。可靠性测验要  
155 求在实验所用的剂量范围内，剂量或对数剂量的反应（或反应的函数）符合特定模型  
156 要求，且标准品与供试品的线性满足计算原理的要求，即满足系统适用性和样品适用  
157 性要求，方可按有关公式计算供试品的效价和可信限。系统适用性参数可根据实验设  
158 计和统计模型选择，检测系统适用性的两个常用的方法是模型拟合优度和精密度。包  
159 括预先指定的接受标准，根据这些标准来评估一项测定（或可能包含多项测定）的有  
160 效性。系统适用性评价参数及其范围的设定，可以根据经验或通过参数变化对效能影  
161 响的模拟实验确定。

162 样品适用性检测，是使用预先设定的标准评价样品测试效价的可靠性，通常采用  
163 相似性评价方法。相似性评价可采用差异性 or 等效性检验统计分析方法，等效性可接  
164 受范围或限值应视具体情况制定。应在生物活性测定方法开发和验证之前建立系统和  
165 样品适用性标准。在早期开发阶段，适用性标准可根据生物活性测定经验的积累不断  
166 调整。

167 可靠性测验可参照生物检定统计法（通则 1431）有关模型项下可靠性测验进行。

### 168 2.3.7 耐用性

169 生物活性测定方法的耐用性用于衡量正常使用期间满足预期性能标准的能力。耐  
170 用性通过有意改变分析方法参数来测试，如样品制备液、细胞代次、浓度、培养时间、  
171 药物浓度、关键试剂的稳定性等。在耐用性研究期间，先验知识和风险评估可为研究

172 参数的选择提供参考。应研究那些在使用期间可能影响分析方法性能的参数。耐用性  
173 评价通常是在方法开发期间进行的。对于固有参数变异性较高的生物活性测定方法，  
174 在耐用性研究期间可能需要研究更宽的参数范围。

### 175 **3. 生物活性测定方法的建立**

176 生物活性测定方法通常会涉及生物受试体的使用，因此有别于理化分析方法，通  
177 常具有更大的变异性，且其测定结果很大程度上依赖于所采用的具体方法。因此，在  
178 生物活性测定方法的建立过程中需进行全面考量。

#### 179 **3.1 实验变异的控制**

180 由于生物活性测定方法通常具有高变异性的特点，因此应尽可能采用适宜的实验  
181 设计来减小生物变异对实验结果的影响。在方法建立时，可根据其具体特点采用不同  
182 的方式控制生物变异大小，尽量识别或控制变异的来源：整体或离体组织、器官实验  
183 因涉及实验动物，应使用符合国家标准相关要求的实验动物，来源背景清楚，饲养环  
184 境（温湿度、光照、微生物等）、饲料、水源、运输等条件必须可控、稳定、且可标  
185 准化。饲养环境的记录和检测结果的历史数据可用于分析干扰试验结果的影响因素；  
186 基于细胞水平的实验则应选择来源确定，且标准化的细胞株。

187 根据不同的测定方法采用合适的试验设计类型也有助于控制实验变异，如浓度与  
188 响应符合量反应平行线测定模型时，实验设计类型可选择采用随机设计、随机区组设  
189 计、交叉设计、拉丁方设计等。对影响实验误差的条件和因素，在实验设计时应尽可  
190 能进行因级限制，将选择的因级随机分配至各剂量组。

#### 191 **3.2 试验系的选择**

##### 192 **3.2.1 基于体内、离体组织和器官的生物活性测定方法**

193 此类方法所用的试验系为大多涉及实验动物的使用，其结果往往与临床效应更贴  
194 近。试验系的选择与实验原理和制定指标密切相关，应选择背景资料清楚、影响因素  
195 少、检测指标灵敏和成本低廉的试验系统。应尽可能研究各种因素对试验系的影响，  
196 采取必要的措施对影响因素进行控制。整体动物实验尽可能使用小鼠和大鼠等易于获  
197 取，成本较低的实验动物，并说明其种属、品系、性别和年龄。体外实验则选择灵敏  
198 度高、稳定性好的离体组织、器官。离体组织、器官一般应来源于至少 3 个供体。

##### 199 **3.2.2 基于细胞的生物活性测定方法**

200 基于细胞的生物活性测定方法建立时首先要选择适宜的细胞系。细胞系既可来源  
201 于肿瘤组织，也可为因子依赖型的永生化细胞系，经修饰转染特定受体的细胞系或可  
202 连续传代的非转染细胞系。药物作用于细胞后产生的反应包括细胞增殖、细胞杀伤、  
203 抗病毒活性、细胞分化、细胞因子/介质分泌及酶激活等。一般应尽可能根据药物的作  
204 用机制来建立活性检测方法，且确保选择的细胞系在连续传代后的一定代次内测定结  
205 果应相当。此外，基于细胞内信号转导机制的快速反应目前也被广泛用于活性方法的  
206 开发，如第二信使、蛋白激酶的激活或报告基因的表达等。许多用于生物活性测定的  
207 细胞系可表达多种细胞因子和生长因子的受体，因此需特别关注所建立的活性检测方  
208 法的专属性。

209 在许多基于细胞的生物活性测定试验中，以下因素可能会影响生物活性的测定结  
210 果：细胞类型（贴壁或者不贴壁）；细胞复苏；细胞接种密度和融合度（贴壁细胞）；  
211 细胞培养器皿；细胞生长和检测培养基；培养用血清（来源、热灭活、 $\gamma$ 射线辐照）；  
212 细胞培养条件（温度、 $\text{CO}_2$ 、湿度、复苏后培养代数）；细胞收获的试剂和方法（贴  
213 壁细胞分离的方法）；细胞分类；细胞计数；细胞状态鉴定（生长速率、活力、产量）；  
214 细胞传代次数和传代时间；细胞系的稳定性（遗传性、受体、标记物、基因表达水平）；  
215 饥饿和刺激步骤。以上所列因素并未涵盖所有需考量的因素，在生物活性测定方法建  
216 立过程中需根据具体情况鉴别影响结果的关键因素，并制定控制策略。

### 217 3.3 实验剂量

218 建立生物活性测定方法时，应关注样品和标准物质的量效关系，并按要求进行合  
219 理的剂量设计，使不同剂量之间的生物效应有显著差异。高剂量不应使生物活性反应  
220 达到极限，低剂量应与阴性对照组有较为明显的区别。限值剂量应以产生稳定的生物  
221 效应为宜；但在方法学研究时，应采用多剂量试验，充分说明标准中设定限值剂量的  
222 依据。

### 223 3.4 方法建立程序

#### 224 3.4.1 实验参数的确定

225 通常生物活性测定方法属于多因素模型。应考虑各个因素和潜在变量对于直接测  
226 量变量的影响。对于变异较大的生物活性检测方法，耐用的多因素分析方法的建立对  
227 于生物活性测定方法尤为重要。对于生物活性测定方法建立和检测性能优化而言，DOE



228 是一种非常高效的统计策略，可有助于获得满足要求的测定系统。具体步骤如下：

229 **风险分析：**首先要对可能影响生物反应的测定因素进行系统检查和风险评估，采  
230 用因果图或鱼骨图等生物分析流程图有助于将实验影响因素可视化。以流程图作为指  
231 导，实验室可鉴别出可能影响检测性能的各种因素，如缓冲液 pH、培养温度、培养  
232 时间等。同时，可根据实验经验及科学判断来确定进一步需要评估的关键因素。可采  
233 用失效模式及影响分析判断哪些因素需要优先考虑，还需识别因素间潜在的相互作  
234 用。

235 **筛选：**一旦从风险分析中确定出潜在的关键因素，实验室可通过初步的筛选实验  
236 来探究所需控制的影响因素。常用析因设计和部分析因设计进行筛选实验。可选择专  
237 业的软件完成筛选设计和数据分析。

238 **响应优化：**筛选设计常用于发现重要的影响因素，而这些因素可采用响应优化设  
239 计进一步进行研究。响应优化设计，如中心复合设计可用于确定达到预期响应时测定  
240 因素的最佳组合条件。从响应优化中获到的信息可视作一个响应面，用来建立检测性  
241 能的可接受范围，并将其纳入生物活性测定方法中。在进行此步骤的实验设计时需注  
242 意，并不是所有的因素和随机因素水平均需包含在内。此外，考虑试验可能会受到随  
243 机因素的影响，因此可利用区组设计避免此类因素的干扰。

244 **确认：**可采用各因素的最佳组合条件进行多次独立试验来进行最终的确认。对于  
245 已进行充分研究的检测方法，可直接过渡到验证。是否进行进一步的确认或验证取决  
246 于整个研究过程中数据的积累程度。

### 247 3.4.2 标准物质和样品的稀释策略

248 试验中可通过不同稀释方式获得标准物质溶液和样品溶液。一种方式是系列稀释  
249 法，该稀释方法中每个稀释度均由上一级浓度溶液逐级稀释而来；另一种方式是每一  
250 浓度均分别独立制备。这两种稀释方式均能获得相同的标示浓度，但产生的误差大小  
251 不同。系列稀释法受稀释过程中的误差传递影响，稀释早期产生的误差将导致相关的、  
252 非独立的检测结果。多通道移液器的使用可能也会导致具有相关性的结果。而独立稀  
253 释法能帮助减轻源于稀释误差的偏倚。

### 254 3.4.3 方法建立中的数据分析

255 在生物活性测定方法建立时，对量效关系曲线特征的拟合，应找出样品浓度与指  
256 标测定值的最佳拟合曲线。将试验测定结果进行列表作图，以剂量为横坐标，以指标

257 测定值为纵坐标，分析量效关系曲线的特征。必要时，可以对剂量进行转换，如对数  
258 浓度；或者对指标测定值进行计算，如对数测定值。

259 分析指标测定值出现显著差异的剂量范围可以通过方差分析或其他适用的统计  
260 方法，比较不同剂量之间的测定值之间是否存在显著差异，找出与相邻剂量的测定值  
261 存在显著差异的剂量。

262 分析指标测定值的误差来源的统计特征可以通过方差分析或其他统计方法获得。  
263 判断不同剂量之间的测定值是否存在方差齐性，在最佳拟合曲线下理论值与测定值差  
264 值是否符合正态分布，以更好了解测定值的误差来源。

## 265 4. 生物活性测定方法的验证

266 方法验证需在方法建立完成后方可进行。在验证研究之前，应拟定验证方案，方  
267 案应包含分析方法的预期目的、待验证的指标特性和相关标准的信息，验证中获得具  
268 有统计学意义的结果是达到可接受标准的验收准则。此外，验证方案亦需包括验证结  
269 果达不到其目标验收准则时的处理措施。

### 270 4.1 验证方案

271 验证方案应包括验证设计、验证指标、合理的可接受标准和数据分析计划等，同  
272 时还应对不满足可接受标准时需采取的措施加以规定。

273 验证设计主要涉及样品的选择（包括样品的数量和类型）、实验变异来源及重复  
274 策略等。应采用具有代表性的样品进行验证试验，验证过程中需综合考量试验内和试  
275 验间变异的来源，使用的重复策略应尽量反映影响效价测定结果的实验因素。

276 由于生物活性测定方法各具特点，因此需视具体方法拟订具体的验证指标，并根  
277 据测定方法特点和验证目的来确定各验证指标的可接受标准。同时还应分别建立试验  
278 有效性的可接受标准（系统适用性要求）和样品结果有效性的可接受标准（样品适用  
279 性要求），这些标准可根据方法开发的情况制定，但最终需根据验证的数据进行修正  
280 并在验证完成前确定。

281 验证方案中应列出明确的数据分析计划以对验证结果进行分析，包括对验证指标  
282 结果的绘图和统计学分析，以及判断它们是否符合可接受标准等。

283 生物活性测定方法验证方案中还需规定所需的样本量和验证次数。样本量是指使  
284 用同一样品进行方法验证的独立重复实验次数。其目的是获得有足够把握度的方法性  
285 能参数，以确保所得方法性能参数满足其预期用途的结论是可靠的。对于试验变异较

286 大的生物活性检测方法，确定并使用合适的验证次数是方法验证中需要考虑的重要内  
287 容。如果所用的验证实验次数过少，会导致检验效能下降，得到的方法性能参数不稳  
288 健，最终导致所得方法满足预期用途的结论具有较大风险。方法验证所需的样本量及  
289 验证所需独立重复的实验次数，应根据方法的变异大小和设计方案确定。

## 290 4.2 各验证指标的验证策略

291 生物活性测定方法常见的验证指标包括专属性、相对准确度、精密度、线性和范  
292 围，后四个指标的验证通常可进行合并设计，具体参见生物制品生物活性/效价测定方  
293 法验证指导原则（指导原则 9401）。

### 294 4.2.1 专属性

295 生物活性测定方法的专属性与产品成分密切相关，对有明确功能主治药物的活性  
296 测定方法，当采用确定的检测方法测定时应表现确定的阳性结果。对于含有复杂基质  
297 的产品或中间产物，专属性指标可证明其活性不受基质成分和产品相关组分的干扰。  
298 专属性的测定方法是采用平行稀释标准样本，同时加入和不加入潜在的干扰物质进行  
299 回收率试验。如计算的效价符合期望值，则认为专属性满足要求。相对于化学药品分  
300 析方法的专属性而言，生物活性测定法的专属性除考虑杂质、降解产物等对测定结果  
301 的干扰外，更应着重区分具有相关生物活性成分的能力。

### 302 4.2.2 相对准确度

303 准确度体现该方法测得值与标示值的接近程度，表示为 $(\text{测得值}/\text{真实值})\times 100\%$ 。  
304 在生物效价的测定中，相对准确度是反映相对效价实测值与相对效价已知值之间关系  
305 的一个指标。在相对效价的生物活性测定法中，最常见确定相对准确度的途径是采用  
306 标准物质或已知效价样品的系列稀释来确定其效价的方式。相对准确度采用每个效价  
307 水平点的相对偏倚和各效价水平相对偏倚的趋势来进行评价。

308 样品浓度或剂量的设置应结合方法的预期用途(质量标准的范围)来确定，对于生  
309 物效价测定至少设置 5 个等剂距的浓度水平，其中，中间 3 个浓度分别是质量标准  
310 规定的上/下限、以及目标值所对应的浓度。

### 311 4.2.3 精密度考察

312 应进行重复性、中间精密度、重现性考察。生物效价测定方法的精密度一般采用  
313 几何标准偏差或几何变异系数表示。

314 重复性：在相同条件下，由同一个分析人员测定所得结果的精密度。至少用 3 批样品、  
315 每批 3 次或同批样品进行 6 次测定试验后对结果进行评价。

316 中间精密度：考察实验室内部条件改变（如不同人员、不同仪器、不同工作日、关键  
317 试剂和实验时间）对测定结果的影响，至少应对同实验室改变人员进行考察。

318 重现性：生物活性测定试验结果必须在 3 家以上实验室能够重现。

#### 319 4.2.4 线性

320 线性通常系指与相对准确度相关的稀释线性，是在设计的范围内，评估测得的生  
321 物效价与真实值或参考值之间的线性关系。

#### 322 4.2.5 范围

323 生物活性测定法的测定范围是指在实验操作的相对准确度和精密度满足要求的  
324 前提下，所测定的生物效价的高低限值之间的范围。该范围通常由稀释度线性研究得  
325 出，应至少完全涵盖产品质量标准所涉及的效价范围。为了检测产品的稳定性或为了  
326 尽量减少过高/过低效价的样品在实验中必要的稀释/浓缩，在进行方法验证研究时，  
327 应适当扩大验证范围。

#### 328 4.3 验证结果的记录

329 验证结果应记录在验证报告中。验证报告可包含预验证的实验结果、正式验证的  
330 原始数据、中间结果及最终报告结果及结论等。若验证结果均符合可接受标准，从验  
331 证报告即可得出测定方法适用于其检测目的的结论；反之，当验证结果与验证方案规  
332 定的可接受标准有偏差时，应对验证失败的原因进行分析，并提出失败后的纠正措施，  
333 如优化方法的实验条件或视情况修正可接受标准等。

### 334 5. 生物活性测定方法的持续确认和维护

335 经验证后开始常规使用的生物活性测定方法，仍需对其性能进行持续监控。常用  
336 的监控方法如统计过程控制（statistical process control, SPC）图法，可对适宜的参数  
337 如标准品的剂量反应曲线和质控品的效价测定值等进行持续监控，以识别测定方法早  
338 期的波动或漂移，若在 SPC 图中观察到任何变化趋势，即应对产生该趋势变化的原因  
339 进行调查。

340 将生物活性测定方法转移至不同实验室时，应进行部分或全部性能特性的再验  
341 证，也可采用代表性样品进行比较分析。

## 342 6. 生物活性测定方法的变更

343 生物活性测定方法在整个产品生命周期内均有可能发生变更，可能涉及现有方法  
344 的修订或新技术的完全替代。引起变更的常见原因包括：工艺变更、关键试剂变更、  
345 试验系优化、根据持续确认和维护引起的变更等。方法性能特性和产品质量属性的重  
346 大变更可能导致对 ATP 的重新评价和/或建立新的方法。如新方法的原理发生改变，  
347 应按照生物活性开发和验证程序进行，并全面验证，同时考虑对代表性样品和标准物  
348 质进行对比分析和/或证明变更后优于或等同于变更前的分析方法。

---

起草单位：中国食品药品检定研究院、山西省药品检验技术研究所、上海市食品药品检验研  
究院、湖北省药品监督检验研究院

联系电话：010-53851631

## 生物活性测定方法设计、建立及验证指导原则起草说明

### 一、起草背景

生物活性测定方法是利用生物受试体，包括整体生物、离体组织或器官、细胞和微生物等，通过观察药物对这些受试体的影响来评估药物生物活性的一类方法。该方法可用于测定供试品的效价、生物活性或杂质引起的毒性，是药品研发和上市后有效性(活性)和安全性(毒性)评估中重要的分析方法。由于生物活性测定法依赖于生物受试体，具有影响因素多和生物变异度大的特点，不同于理化分析方法，有必要制定涉及生物活性测定方法全生命周期的方法设计、方法建立、验证和持续监控维护等多个环节的指导原则。

### 二、起草过程

本指导原则草案的起草经过广泛的文献标准规范调研、行业应用分析，邀请行业知名专家学者、药品生产企业等研讨交流，为药典生物活性测定方法标准制订提供实践指导。

### 三、主要起草内容

本指导原则主要依据 ICH Q2 (R2)、ICH Q14、USP 1220、USP 1032 及 USP 1033 等指导原则和各国药典相关章节，结合实际工作情况起草，定位于药品（生物制品、生化药、中药）生物活性测定方法通用性技术要求，旨在规范、指导和推动生物活性测定方法设计、建立及验证的应用，并突出了生物活性测定方法生命周期的概念以及采取科学合理的方式和质量风险管理的重要性。草案分为 6 个板块，分别为：1. 分析目标概况；2. 生物活性测定方法的设计；3. 生物活性测定方法的建立；4. 生物活性测定方法的验证；5. 生物活性测定方法的持续确认和持续维护及再验证；6. 生物活性测定方法的变更。