

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.05.09

# 兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验 注册资料技术评审要点及常见问题

孙雷,王亦琳,叶妮,孙红洋,李丹,徐倩,苏富琴

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心),北京 100081)

[收稿日期] 2024-02-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 05-0074-08 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 生物等效性试验作为兽药获批上市的关键试验,其研究过程和技术评审都要遵循特定的法规和指导原则。以药动学参数为终点的血药浓度法生物等效性试验是目前普遍采用的研究方法,适用于药物活性成分吸收进入体循环具有全身作用的剂型(大多数内服剂型和特殊注射剂)。本文根据生物等效性定义、相关法规和指导原则,结合近年来新兽药注册资料,对血药浓度法生物等效性试验资料的技术评审要点及常见问题进行梳理,旨在为新兽药的研发和注册提供参考。

**[关键词]** 兽用化学药品;血药浓度法;生物等效性试验;评审要点;常见问题

## Technology Evaluation Points and Common Problems for Registration Data of Bioequivalence Test of Veterinary Chemical Drugs by Plasma Concentration Method

SUN Lei, WANG Yi-lin, YE Ni, SUN Hong-yang, LI Dan, XU Qian, SU Fu-qin

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

**Abstract:** As a key test for veterinary drug to be approved for marketing, the bioequivalence test should comply with specific regulations and guidelines in its research process and technical evaluation. The bioequivalence test of plasma concentration method with pharmacokinetic parameters as the end point is widely used to the research, which is applicable to the dosage forms (most oral dosage forms and special injections) with systemic effects when the active ingredients of drugs are absorbed into the systemic circulation. According to the definition of bioequivalence, relevant regulations and guiding principles, and in combination with the registration data of veterinary generic drugs in the recent years, this paper sorts out the technology evaluation points and common problems of the blood drug bioequivalence test, aiming to provide reference for the research, development and registration of new veterinary drugs.

**Key words:** veterinary chemical drug; plasma concentration method; bioequivalence test; evaluation points; common problem

生物等效性 (Bioequivalence, BE) 是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<sup>[1]</sup>。我国兽药研发特定剂型的产品可以在药学一致的前提下与原研药进行生物等效性试验, 验证其与原研药是否生物等效, 进而确认其临床可替代性。另外, 在新药开发、新药处方工艺变更或剂型变更的研究过程中, 生物等效性试验也发挥着重要作用。生物等效性试验方法包括体内和体外的方法, 按照研究方法评价效力, 其优先顺序为药代动力学研究 > 药效动力学研究 > 临床研究 > 体外研究<sup>[2]</sup>。以药代动力学参数为终点的血药浓度法生物等效性试验是目前普遍采用的研究方法, 适用于药物活性成分吸收进入体循环具有全身作用的剂型 (大多数内服剂型和特殊注射剂)。

为加强兽药注册管理, 保证兽药安全、有效和质量可控, 根据《兽药管理条例》和《兽药注册办法》等有关规定, 我国农业农村部出台了一系列相关法规和指导原则, 2009 年农业部公告第 1247 号发布了包含《兽用化学药品生物等效性试验指导原则》在内的 15 个兽药试验指导原则<sup>[3]</sup>。2022 年农业农村部兽药评审中心制修订并发布了《兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验技术指导原则》《生物样品定量分析方法验证技术指导原则》《兽用普通内服固体制剂溶出度试验技术指导原则》和《兽用化学药品生物等效试验报告撰写指导原则》, 并于 2023 年 1 月 1 日开始实施, 为规范我国兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验设计、试验实施和试验报告等提供全面的技术指导。

近年来, 我国新兽药申请注册品种日益复杂, 部分申报资料在血药浓度检测方法学验证、试验设计、样品测定、数据处理和结果评价等方面还存在一些问题, 导致提交的试验资料不能支持申报兽药的技术评审和注册要求。本文根据生物等效性定义、相关法规和指导原则, 结合近年来新兽药注册资料, 对血药浓度法生物等效性试验资料的技术评审要点及常见问题进行梳理, 旨在为我国新兽药的

研发和注册提供参考。

## 1 血药浓度检测方法学验证

准确、灵敏、可靠的检测方法是血药浓度法生物等效性试验的关键, 评审时血药浓度检测方法学验证方面的问题相对较多。血浆、血清等生物样品具有取样量少、药物浓度低以及干扰物质多等特点, 因此必须根据药物结构、理化性质、样品基质和预期浓度, 建立适宜的血药浓度检测方法, 并对方法进行充分全面的验证。检测方法大致分为色谱法、质谱法或免疫法等, 以液相色谱法 (LC) 和液相色谱 - 串联质谱法 (LC - MS/MS) 为主。方法验证时应采用与实际生物样品相同的抗凝剂, 验证内容主要包括方法技术参数、稳定性、稀释效应、残留效应和基质效应等, 详见新发布的《生物样品定量分析方法验证技术指导原则》<sup>[4]</sup>。

1.1 方法技术参数 方法技术参数主要包括方法选择性、灵敏度、线性、准确度和精密度等。

方法选择性一般用至少 6 个不同动物空白基质来证明, 比较不同空白基质对待测药物是否存在干扰。

方法灵敏度包括方法检测限 (LOD) 和方法定量限 (LOQ)。方法定量限, 是指能够被可靠定量的样品中分析物的最低浓度, 具有可接受的准确度和精密度。因此, 方法定量限应进行准确度和精密度考察。

血药浓度检测应通过标准曲线法定量, 不应采用单点法定量。标准曲线一般通过加入已知浓度的分析物 (和内标) 到空白基质中, 制备各浓度的基质添加校正标样得到。标准曲线定量下限, 也就是方法的定量限, 是标准曲线的最低点, 应满足实际生物样品检测的需要, 能测定 3 ~ 5 个消除半衰期或  $C_{\max}$  的 1/20 ~ 1/10 之后的药物浓度。线性范围一般用至少 6 个校正浓度水平, 尽量覆盖预期的浓度范围, 不能用定量范围外推的方法求算未知样品的浓度。验证时应至少评价 3 条标准曲线。

方法准确度和精密度一般通过回收率试验获得, 通常在空白基质中添加定量下限以及低、中、高浓度的药物, 低浓度不高于定量下限浓度 3 倍, 中

浓度为标准曲线中部附近浓度,高浓度为标准曲线上限约 75% 处的浓度;每个浓度至少 5 个样品,至少分析 3 批,计算回收率和批内、批间变异系数。回收率均值一般应在添加浓度的  $\pm 15\%$  之内(定量下限应在  $\pm 20\%$  之内)。同时,批内、批间变异系数一般不超过 15% (定量下限不超过 20%)。

这里应特别注意标准曲线的制备方法以及定量限、线性范围和回收率试验添加药物浓度三者间的关系,这也是方法学验证时经常出问题的地方。

**1.2 稳定性** 应根据具体情况,对含药血浆、血清等生物样品在室温、冷冻、冻融等条件下以及不同存放时间进行稳定性考察,以确定生物样品的存放条件和存放时间。另外,还应考察标准储备液和标准工作液稳定性,以及样品处理后进样瓶内溶液中的药物稳定性,以保证检测结果的稳定性和重现性。如果标准储备液和工作液在配制溶剂一致情况下已有文献进行了存放条件和存放时间的考察,可以直接进行引用。这里应特别注意,室温、冷冻、冻融等各条件下进行的稳定性考察时间应不小于实际样品存放时间。

**1.3 稀释效应、残留效应和基质效应** 必要时,还应考察样品稀释效应、仪器残留效应和基质效应。

样品稀释效应可通过向基质中加入分析物至高于定量上限浓度,用空白基质稀释后进行证明,稀释的可靠性应覆盖实际样品所用的稀释倍数。如果样品中待测药物预期最高浓度未超过标准曲线的线性范围,可不进行稀释效应考察。

仪器残留效应可通过注射高浓度样品或校正标样后,再注射空白样品的方法,要求在空白样品中的残留不超过定量下限的 20%。

基质效应是针对液相色谱 - 串联质谱(LC - MS/MS)等质谱法而言,液相色谱法(LC)不需要考察基质效应。考察时一般使用至少 6 批不同空白基质,在低浓度和高浓度情况下,通过基质匹配标准溶液峰面积与纯溶剂标准溶液峰面积比值来进行评价。在实际工作中,也可以将空白基质匹配标准溶液与纯溶剂标准溶液所制得的标准曲线的斜率进行比较,来评价基质效应。基质匹配标准溶液

通常采用空白样品提取液配制,或空白样品前处理吹干后的残余物中溶解标准溶液的方法配制。这里应特别注意基质匹配标准溶液的配制方法。

血药浓度检测方法学验证报告常见问题:(1)缺少血药浓度检测方法学验证报告或验证报告不完整,如缺少必要的稳定性考察等;(2)仪器检测条件不完整,如缺少柱温、进样体积等关键仪器参数,使用液相色谱 - 串联质谱法时只监测一对离子等;(3)不应采用单点法定量,应采用标准曲线法定量;标准曲线一般采用基质添加标准曲线,不是基质匹配标准曲线;(4)方法定量限与标准曲线定量下限、回收率试验最低添加药物浓度相互矛盾,或方法定量限浓度未进行准确度和精密度考察;(5)回收率试验药物添加浓度设计不合理,或只进行一天的回收率试验,无法获得批间的试验数据;(6)样品稳定性考察不充分或不规范,如样本量不够,方法不规范,考察时间与实际样品存放时间不相关等;(7)缺少必要的稀释效应、残留效应或基质效应考察,或考察药物浓度与实际样品中药物浓度不相关、基质匹配标准溶液制备方法错误等;(8)报告中的代表性图谱不清晰,如纵横坐标、离子对、药物浓度无法识别或标注药物浓度与图谱不对应等;(9)原始数据未充分提交,或报告中的数据、标准曲线与原始图谱中的数据、标准曲线不一致等。

## 2 普通制剂生物等效性试验

**2.1 试验制剂** 受试制剂应为中试产品,其处方工艺、生产规模应能代表大生产产品的质量。作为仿制药的标杆,参比制剂具有非常重要的地位,为避免误差传递,参比制剂一般要求为原研产品,并提供其证明的全部资料,说明选择的理由。受试制剂和参比制剂都应提供其剂型、规格、批号、生产厂、有效期和检验报告等材料。值得注意的是,对于改变剂型的产品应该与原研剂型进行比较,不是与国内已上市同剂型仿制药比较。

**2.2 试验动物** 要求采用参比制剂标签规定的靶动物,申请的每种靶动物一般都要单独进行生物等效性试验。为减少与兽药产品间差异无关的变异,通常在健康动物体内进行试验。受试动物个体间

差异应减到最小,若兽药作用与动物性别无关,一般选用一个均质群体内同一性别的健康成年动物,使在品种、品系、年龄、激素水平、营养状态、生产性能等方面保持一致。动物体重应限制在一定范围,使每个个体的给药总剂量基本相同。入选试验动物的数量,按照目前的统计方法,18~24 例可满足大多数药物的要求,也是满足正式试验分析的最少动物数量。有些变异性大的药物,应增加动物数量。除此之外,还应考虑动物的呕吐、死亡等剔除因素,以便获得足够的实验数据。

**2.3 试验设计** 合理的试验设计是试验结果可评价的基本保证。根据动物种类、药物剂型、药动学特点和作用机制等,生物等效性试验设计可分为三种:交叉试验设计、平行试验设计和重复交叉试验设计。大多数药物的吸收和消除存在明显个体差异,个体间差异远大于个体内变异,因此,生物等效性试验一般按自身交叉对照的方法设计,以减少不同试验周期和个体差异对试验结果的影响。通常将受试对象随机分为几组,按一定顺序处理,例如两种制剂的比较,采用双周期交叉设计( $2 \times 2$  交叉设计),即将动物分成两组,一组动物先给受试制剂后给参比制剂,另一组动物先给参比制剂后给受试制剂,见表 1。两顺序间应有足够长的间隔时间,称为清洗期(Wash-out Period),用于消除两制剂间的互相干扰。清洗期一般不应短于活性成分的 7 个消除半衰期,以保证 99.3% 的药物已排出体外。

表 1 两制剂、两序列、两周期交叉设计

Tab 1 Cross design of two preparations, two sequences and two cycles

序列	周期	
	1	2
1	T	R
2	R	T

注:T:受试制剂;R:参比制剂。

对于半衰期长的药物,如泰拉霉素<sup>[5]</sup>,可采用平行试验设计,同时还应有足够长的血样采集时间。对于动物循环血量较少,第二周期很难采血的

动物,如鸡,也可采用平行试验设计。选用平行试验设计时动物数量应该增加,动物间均衡性要求也更高。

对于高变异药物如头孢泊肟酯,或窄治疗指数药物如环孢素,可采用重复交叉试验设计,即将同一制剂重复给予同一受试动物,可分为部分重复交叉(单制剂重复,即三周期,见表 2)或完全重复交叉(两制剂均重复,即四周期,见表 3)。

表 2 两制剂、三序列、三周期重复交叉设计

Tab 2 Repeated cross design of two preparations, three sequences and three cycles

序列	周期		
	1	2	3
1	T	R	R
2	R	T	R
3	R	R	T

注:T:受试制剂;R:参比制剂。

表 3 两制剂、两序列、四周期重复交叉设计

Tab 3 Repeated cross design of two preparations, two sequences and four cycles

序列	周期			
	1	2	3	4
1	T	R	T	R
2	R	T	R	T

注:T:受试制剂;R:参比制剂。

**2.4 给药方案** 单次给药在评价药物释放的速度和程度方面比多次给药稳态药动学的方法更敏感,更易发现制剂释药行为的差异,因此,一般采用单次给药药动学评价生物等效性。给药剂量一般选用参比制剂批准的临床用药剂量,如参比制剂批准了多个给药剂量,一般选用批准的最高剂量。为达到有效可测药物浓度,安全指数大且呈线性药动学的药物,也可选用比批准剂量高 2~3 倍的剂量。对于标签给药范围内药动学特征不呈线性的药物,如存在饱和吸收情况,可优先选用批准的低剂量。片剂如果经过分割检查法证明过刻痕片的含量均匀度,则可接受沿刻痕线分割片剂,但不得再割成

更小的碎片。

受试制剂和参比制剂应采用相同的给药途径和给药部位。所有种属动物,饲喂应符合动物福利,如反刍动物不能禁食。为了将非制剂因素引起的变异最小化,非反刍动物和犬猫用的内服普通制剂,一般应进行禁食生物等效性试验,一般给药前至少禁食 8 小时,给药后禁食 4 小时。

**2.5 血样采集** 根据药物和制剂特点确定血样采集时间点,可查阅相关文献资料或通过预实验进行设计,使得到的药时曲线能充分覆盖吸收相、分布相和消除相,反映制剂的体内血药浓度经时特征。一般建议峰浓度前不少于 3 个采样点,峰浓度附近至少 3 个采样点,消除相不少于 4 个采样点(一般 4~6 个点)。给药前应先采空白血样,采样应持续到活性成分的 3~5 个消除半衰期或  $C_{\max}$  的  $1/20 \sim 1/10$  之后,以满足  $AUC_{0 \rightarrow t} / AUC_{0 \rightarrow \infty}$  大于 80% 的要求。这里应特别注意采样点密集时如何控制采样时间窗。

有的产品由于吸收快,达峰时间较短,采样点设计时未做相应考虑,导致峰浓度前只有一个采样点,个别产品甚至第一个采样点即为峰浓度。有的产品半衰期较长,设计时未考虑其特点,峰浓度后采样点间隔时间太短,采样结束时仍不足 3 个消除半衰期或血药浓度尚未降至峰浓度的  $1/10$ ,导致试验结果不能满足生物等效性评价的需要,以此为基础得到的生物等效结论可靠性也较差。

**2.6 血样检测** 检测血样中的原形药物是评价生物等效性的首选方法,因为原形药物的浓度时间曲线对制剂表现的变化比代谢产物更加灵敏。但是,有的药物本身是无活性的前体药物,在动物体内快速代谢为与药物活性相关的药物,使得血样中原形药物浓度过低,不足以获得足够长时间的药物浓度信息,这时可以用代谢产物的相关数据来评价生物等效性,如犬用头孢泊肟酯片测定血浆中的代谢产物头孢泊肟。

对于激素类、蛋白质多肽等内源性药物,应先确定在血样中的基线值,再从给药后测得的总血药浓度中减去这一基线值,尽最大程度减少非药物因

素的影响,以便尽可能得到来自药物释放的药量。如果药物浓度水平远高于内源性基线值,也可以忽略基线的影响。

生物等效性试验在血样检测时,同一个受试动物的全部样品一般应在同一分析批中分析,以减少结果的变异。一个分析批包括至少 6 个浓度水平的标准曲线校正标样,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。同一分析批的所有样品应在相同条件下同一时间段内进行分析,质控样品应该分散到整个分析批中,且质控结果满足准确度和精密度要求。

**2.7 试验结果与统计分析** 目前,大多数药物的生物等效性结果评价采用平均值生物等效性(ABE)的方法。试验结果应提供受试制剂和参比制剂每个动物每个时间点的血药浓度、每个时间点的平均血药浓度和标准差、每个动物的 C-T 曲线和平均 C-T 曲线。如果用房室模型方法计算药动学参数,采用不同的方法或软件可能有较大差异,因此生物等效性试验通常采用非房室模型分析方法(NCA)来计算药动学参数。目前,采用较多的是美国 Pharsight 公司的 WinNonlin 系列软件。

单剂量给药生物等效性试验中,应提供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。这时应注意对于低于定量限的血药浓度数据,在  $C_{\max}$  之前样品应以零值计算,达到  $C_{\max}$  之后的样品应以无法定量(ND)计算,以减小零值对 AUC 计算的影响。

生物等效性检验时一般以 AUC、 $C_{\max}$  为主, $t_{\max}$  只供参考。AUC 和  $C_{\max}$  在进行等效性检验前一般要作对数转换。当数据有偏倚时经对数转换可校正其对称性。此外,统计中数据对比宜用比值法而不用差值法,通过对数转换,可实现将均值之比置信区间转换为对数形式的均值之差的计算。AUC 和  $C_{\max}$  经对数转换后用多因素方差分析法(ANOVA)进行显著性检验,以判断药物制剂间、动物个体间、周期间和给药顺序间的差异,然后通过双单侧 t 检验及  $(1 - 2\alpha\%)$  置信区间法,得到两种制剂

AUC 或  $C_{max}$  几何均值比值的 90% 置信区间。

随着我国药动学研究水平和制剂研究水平的不断提高,目前已将两种制剂 AUC 或  $C_{max}$  几何均值比值的 90% 置信区间标准均规定为 80.00% ~ 125.00%,而且还特别强调,此置信区间必须保留两位有效数字,不得通过四舍五入的方法使受试制剂生物等效性检验合格,即下限的最低值为 80.00%,上限不得超过 125.00%。如某受试制剂与参比制剂的生物等效性试验结果为 79.97% ~ 113.60%,则应判定为生物不等效。

**2.8 试验报告和相关图谱** 2023 年 1 月 1 日起,血药浓度法生物等效性试验资料应满足新发布的《兽用化学药品生物等效试验报告撰写指导原则》的要求,需提交生物等效性试验报告、生物样品分析报告和血药浓度检测方法学验证报告三个报告,报告的正文内容以数据汇总的表格形式为主,辅以文字说明,这一点不同于以往以文字表述为主的试验报告格式。同时,还对报告建议内容进行了排序:封面、目录、质量保证声明、缩略语对照表、摘要、正文、参考文献和附件等。对于图谱,要求提供

方法学验证和生物样品分析的全部图谱,严格按照进样时间逐批提交图谱。每个图谱中信息包括但不限于以下内容:样品名称、进样日期和时间、待测物、样品浓度(标准曲线或质控样品)、色谱峰保留时间、峰面积、进样时系统的参数设置、是否变更自动积分参数的标记等。

### 3 特定药物生物等效性试验

**3.1 高变异药物** 有些药物由于生物利用度过低、酸不稳定、吸收前的广泛代谢等原因,导致一个或多个药动学参数个体内变异系数大于或等于 30%,称为高变异药物。对于安全性较好、治疗窗较宽的高变异药物,在充分科学论证的基础上,通过部分重复或完全重复交叉设计,根据参比制剂的个体内变异,采用参比制剂标度的平均生物等效性(RSABE)方法进行评价。试验设计和评价标准见表 4,详见《高变异药物生物等效性研究技术指导原则》<sup>[6]</sup>。例如犬用头孢泊肟酯片属于高变异药物,可参照该方法进行生物等效性评价。

表 4 高变异药物及窄治疗指数药物生物等效性试验评价方法及标准

Tab 4 Evaluation methods and standards for bioequivalence test of high variability drugs and narrow therapeutic index drugs

药物种类	高变异药物	窄治疗指数药物
试验设计	部分重复(两制剂、三序列、三周期)或完全重复(两制剂、两序列、四周期)交叉设计	完全重复(两制剂、两序列、四周期)交叉设计
评价对象	AUC 和 $C_{max}$	AUC 和 $C_{max}$
评价标准	① $(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R)^2 - 0.5S_{WR}^2$ 的单侧 95% 置信区间上限 $\leq 0$ ; ② 受试制剂和参比制剂几何均值比的点估计在 80.00% ~ 125.00% 范围内。	① $(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R)^2 - 0.5S_{WR}^2$ 的单侧 95% 置信区间上限 $\leq 0$ ; ② 受试制剂和参比制剂几何均值比的双侧 90% 置信区间在 80.00% ~ 125.00% 范围内; ③ $\sigma_{WT}/\sigma_{WR}$ 双侧 90% 置信区间上限 $\leq 2.5$ 。

T: 受试制剂; R: 参比制剂

**3.2 窄治疗指数药物** 也称窄治疗窗药物,一般是指剂量或血药浓度的微小变化即可能导致治疗失败和/或严重不良反应,进而危及生命,或者导致永久或严重功能丧失的药物。该类物质通常具有以下特点:有效剂量与中毒剂量接近;血药浓度低于有效浓度可能导致治疗失败,高于有效浓度可能

导致严重不良反应;临床应用中,剂量调整幅度通常较小等。因此,生物等效性评价时应采用更严格的等效性判定标准,以保证有效性和安全性。试验设计时采用完全重复交叉设计,以获得受试制剂和参比制剂的个体内变异。试验设计和评价标准见表 4,详见《窄治疗指数药物生物等效性研究技术

指导原则》<sup>[7]</sup>。例如猫用环孢素溶液属于窄治疗指数药物,可参照该方法进行生物等效性评价。

3.3 复方制剂 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,因此,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,例如犬用阿莫西林克拉维酸钾片<sup>[8]</sup>、犬用米尔贝肟吡喹酮片<sup>[9]</sup>等。

3.4 内服缓、控释制剂 内服缓、控释制剂改变了药物释放和吸收过程,其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。单次给药旨在比较受试动物在禁食状态下服用受试制剂与参比制剂的吸收速度和程度,确认受试制剂缓、控释的药动学特征,试验设计和生物等效性评价标准基本同普通制剂。多次给药旨在比较缓、控释受试制剂与相应参比制剂多次连续用药达稳态后药物的吸收程度、稳态血药浓度及其波动情况。目前,这类剂型的产品注册相对较少。已报道的有磷酸川穹嗪缓释制剂在比格犬体内的生物等效性研究<sup>[10]</sup>等。

血药浓度法生物等效性试验报告常见问题:

(1)未按照已备案的试验方案进行试验又未做偏离说明,或未按照已验证的血药浓度检测方法检测实际样品,如前处理过程、色谱柱等发生改变;(2)参比制剂选择不合理,参比制剂和受试制剂信息不全,缺少批号、有效期等信息,缺少检验报告或不是同一批号制剂的检验报告;(3)试验动物不具有代表性,或试验动物的品种、品系、性别、年龄、体重等背景信息不全;(4)未提供试验动物给药剂量确定的依据,未提供每头动物的具体体重及对应的给药量信息,同一动物在两个周期的体重偏差不在正常范围内;(5)交叉试验设计时的清洗期不够,第二周期给药前的样品仍检出较高浓度的药物;(6)采样点设计不合理,未续到 3~5 个消除半衰期或  $C_{\max}$  的  $1/20 \sim 1/10$  之后,导致有效血药浓度的数据偏少,或  $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  小于 80%,造成等效性结果不可靠;(7)对不同动物采样点时间窗及采取的措施未做规定,采集的血样处理、分装、运输等环节的

保存条件和采取的措施未做说明;(8)样品检测时随行质控不完善,未说明每个分析批中质控样品浓度、数量、分布及测定结果是否符合可接受标准;(9)部分血药浓度数据低于方法定量限,导致药动学数据处理结果出现偏差;(10)试验结果只提供平均血药浓度数据和平均 C-T 曲线,未提供每头动物的血药浓度数据和 C-T 曲线;(11)AUC 或  $C_{\max}$  几何均值比值的 90% 置信区间标准目前均是 80.00%~125.00%,有的仍采用以前的评价标准;(12)未提交方法学验证和生物样品分析的全部图谱,或缺少相应分析批的随行标准曲线或质控样品图谱;(13)提供的图谱缺少明确编码,不清楚对应的什么样品,缺少具体进样时间或时间前后矛盾,色谱图有不合理的手动积分等,导致原始数据无法溯源;(14)试验报告中的血药浓度数据、标准曲线与原始图谱中血药浓度数据、标准曲线不一致;(15)对于高变异药物或窄治疗指数药物,仍错误的采用双周期交叉设计及对应的评价方法等。

#### 4 结 语

兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验注册资料的技术评审是在遵循法规和指导原则的基础上,结合药物作用机制、制剂特点、动物生理过程、统计学方法等进行综合评价的一项工作。近年来,我国兽药注册申报品种日益复杂,对技术评审工作要求越来越高,这就需要我们不断研究新的评价方法和要求,以满足新兽药研发和注册的需要。

#### 参考文献:

- [1] 兽用化学药品血药浓度法生物等效性试验技术指导原则,农业农村部兽药评审中心,2022.6.14[S].  
Technical guidelines for bioequivalence testing of veterinary chemical drugs by blood concentration method, Center for Veterinary Drug Evaluation (CVDE) of the Ministry of Agriculture and Rural affairs,2022.6.14.
- [2] 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则,国家药品监督管理局药品审评中心,2016.3[S].  
Technical guidelines for the study of human bioequivalence of chemical generic drugs by pharmacokinetic parameters as endpoint

- evaluation indicators, Drug Evaluation Center of the National Medical Products Administration, 2016. 3[S].
- [3] 《兽用化学药物安全药理学试验指导原则》等 15 个兽药试验指导原则,农业部公告第 1247 号,2009.08.20[S].
- 《Guidelines for safety pharmacology testing of veterinary chemical drugs》15 guidelines for Veterinary Drug Trials, Announcement No. 1247 of the Ministry of Agriculture, 2009.08.20[S].
- [4] 生物样品定量分析方法验证技术指导原则,农业农村部兽药评审中心,2022.06.14[S].
- Technical Guidelines for Validation of Quantitative Analysis Methods for Biological Samples, Center for Veterinary Drug Evaluation (CVDE) of the Ministry of Agriculture and Rural affairs, 2022.06.14[S].
- [5] 张诗旋. 泰拉霉素注射液在猪体内的生物等效性研究[D]. 华南农业大学,2020.
- Zhang S X. Study on the bioequivalence of Tulathromycin Injection in Pigs[D]. South China Agricultural University, 2020
- [6] 高变异药物生物等效性研究技术指导原则,国家药品监督管理局药品审评中心,2018.10[S].
- Technical guidelines for the bioequivalence research of highly variable drugs, Drug Evaluation Center of the National Medical Products Administration, 2018.10[S].
- [7] 窄治疗指数药物生物等效性研究技术指导原则,国家药品监督管理局药品审评中心,2020.12[S].
- Technical guidelines for the bioequivalence research of narrow therapeutic index drugs, Drug Evaluation Center of the National Medical Products Administration, 2020.12[S].
- [8] 闫超群. 犬用阿莫西林克拉维酸钾片生物等效性研究[D], 华南农业大学,2017.
- Yan C Q, Study on the bioequivalence of amoxicillin and potassium clavulanate tablets for dogs [D], South China Agricultural University, 2017.
- [9] 秦琪. 米尔贝肟吡喹酮片在犬体内的生物等效性研究[D]. 扬州大学,2019.
- Qin Q, Study on the bioequivalence of Milbeoxime Pyroquinone Tablets in Dogs[D], 2019
- [10] 肖衍宇,陈志鹏,刘雯等,磷酸川穹嗪缓释制剂在比格犬体内的药动学和生物等效性研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(17):1344-1348.
- Xiao H Y, Chen Z P, Liu W, *et al.* Pharmacokinetic and bioequivalence studies of sustained-release formulations of fluorescein phosphate in beagle dogs[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2011, 46(17):1344-1348.

(编辑:陈希)