在配体结合分析中采用单孔分析方法的回顾性研究

李　帅[1]，梅　妮[1]，张皖晋[1]，李　刚[1]，吴　浩[1]，陈桂良[1]，魏春敏[2]，王　莹[3]
（1. 上海药品审评核查中心，上海 201210；2. 国家药品监督管理局药品审评中心，北京 100022；
3. 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心，北京 100044）

摘要：该研究回顾性分析了 8 个配体结合分析项目（5 个验证项目和 3 个样品分析项目）。这些项目涉及 3 个不同的分析平台［ELISA、单分子免疫阵列（Simoa）和电化学发光免疫分析技术（MSD）］和 3 种不同的分子类型（单克隆抗体、蛋白类生物标志物和中和抗体药物），对这些项目数据分别采用单孔分析和复孔分析的方式进行检测。分析结果显示，在孔间变异较小（<5%）的情况下，单孔分析和复孔分析方式所得结果之间存在良好的相关性，并且计算得到的主要药动学参数（AUC 和 c_{max}）之间没有显著性差异，可以将单孔分析替代复孔分析应用于上述分析平台。

关键词：单孔分析；复孔分析；配体结合分析；生物样品分析
中图分类号：R917　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255（2023）09-1360-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.09.012

A Retrospective Study on the Application of Singlicate Analysis Method in Ligand Binding Assays

LI Shuai[1], MEI Ni[1], ZHANG Wanjin[1], LI Gang[1], WU Hao[1], CHEN Guiliang[1], WEI Chunmin[2], WANG Ying[3]
(*1. Shanghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Shanghai 201210; 2. Center for Drug Evaluation, NMPA, Beijing 100022; 3. Center for Food and Drug Inspection of NMPA, Beijing 100044*)

ABSTRACT: This study aimed to retrospectively analyze eight ligand binding assay projects, including five validations and three sample analyses . These projects involved three analysis platforms［ELISA, single molecule array（Simoa）, and meso scale discovery（MSD）］and three distinct molecular types（monoclonal antibodies, protein biomarkers, and neutralizing antibodies）. The data from above projects were respectively analyzed by singlicate- and replicate-based analysis. The analysis results revealed a strong correlation between singlicate- and duplicate-based analysis when the inter well variability was below 5%. Additionally, there were no significant differences in the calculation results of the key pharmacokinetic parameters（AUC and c_{max}）between singlicate- and duplicate-based analysis. Thus, the result suggest that singlicate-base analysis can be a viable alternative to duplicate-based analysis on the aforementioned analysis platforms.

Key Words: singlicate-based analysis; replicate-based analysis; ligand binding analysis; bioanalysis

大分子药物的生物样品分析通常采用配体结合分析（ligand binding analysis，LBA）法。复孔分析时每个样品至少重复分析 2 次（2 个孔），根据每个孔的响应变量平均值（或由此确定的浓度平均值）确定计算样品浓度[1]。这是 LBA 方法的标准操作[2]，目的是降低分析的变异性。与复孔分析相对应，单孔分析是每个样品仅分析 1 次，根据单个孔的响应变量计算样品浓度。随着分析仪器技术水平的进步和试剂质量的提升，特别是自动化应用的展开，LBA 法的精密度得到显著提升，单孔分析也开始被用于注册研究。单孔分析可缩短分析研究的时间，减少对劳动力、耗材、贵重化合物、试剂和溶

收稿日期：2023-05-04
作者简介：李　帅（1983—），男，药品审评员，从事药品审评、核查以及监管科学研究工作。
E-mail：lishuai@smda.sh.cn

剂的需求，从而降低研究成本，有可能在不影响安全性和有效性评价的情况下更快地为患者提供新药[3]。LBA 法是否也可以像 LC-MS 法一样采用单孔分析，是目前行业内非常关注的问题。

近年来，已有多个行业组织或研究机构开展了 LBA 法单孔分析与复孔分析的对比研究，结果表明采用单孔分析并不显著影响毒物代谢动力学（toxicokinetics，TK）和（或）药代动力学（pharmacokinetics，PK）的关键参数，以及抗药抗体（anti-drug antibodies，ADA）的临界值和灵敏度。2014 年，全球生物分析联盟协调团队（Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team，GBCHT）认为以 LC-MS 法检测小分子药物时可采用单孔分析，不必采用复孔分析方式。随着 LBA 法精密度的提升，采用单孔分析有可能替代 LBA 法传统的复孔分析方式[4]。2020 年 1 月，欧洲生物分析论坛（European Bioanalysis Forum，EBF）开展的研究结果表明，单孔分析对分析平台、物种、基质、分子类型及 TK/PK 参数均不产生影响。随着生物分析监管数据和经验的积累，LBA 法单孔分析方式可能会成为标准，将不再要求方法开发的比较研究[5]。2020 年 6 月，国际药物开发创新与质量联合会（the International Consortium for Innovation and Quality in Pharmaceutical Development，IQ）的转化与吸收、分布、代谢与排泄（ADME）科学领导小组开展的研究结果表明，单孔分析和复孔分析的数据集间有良好的一致性。当方法验证不精确和（或）不准确时，应当采用复孔分析；当复孔分析的变异系数（CV）小于 15%时，单孔分析可作为 LBA 法的默认方式[6]。英国葛兰素史克公司已成功提交了 5 个化合物申请，均采用单孔分析，药品监管机构并未提出异议[2]。JIANG 等[7]通过 Gyrolab 平台采用单孔分析进行临床 PK 研究，结果表明单孔分析符合规定的分析验证标准，并成功用于临床样品分析。STANTA 等[8]在 Gryolab 平台上评估了采用单孔分析进行的 ADA 研究，并建议将单孔分析作为所 LBA 法的默认方式。

2022 年 5 月，ICH 发布的技术指南《M10：生物分析方法验证及样品分析》（定稿版）[9]中接受了单孔分析方式。样品分析方法验证章节中描述，当使用 LBA 法时，每个试验样品可使用单孔或多孔的方式进行分析。ICH M10 为单孔分析的应用提供了支持建议。2023 年 1 月 1 日，国家药品监督管理局决定适用 ICH M10 指导原则，申请人需按照 ICH M10 指导原则的要求开展研究；自 2023 年 7 月 29 日起开始的相关研究（以生物样品分析原始记录时间点为准），均适用 ICH M10 指导原则[10]。

虽然 ICH M10 接受了单孔分析方式，但并未明确在何种条件下可以应用单孔分析以及单孔分析的可接受标准。本研究通过收集既往项目数据，对比单孔分析与复孔分析获得的数据，以期为单孔分析的应用提供一定的参考依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源

上海方达生物技术有限公司、上海熙华检测技术服务股份有限公司、上海药明康德新药开发有限公司提供了 5 个项目的验证数据和 3 个样品分析数据。

1.2 药动学参数计算及统计分析

采用 Phoenix WinNonlin 8.3 软件计算药动学参数。采用 MedCalc 20.022 软件的 Bland Altman 方法对复孔与单孔数据进行一致性分析。

1.3 项目基本信息

5 个验证项目和 3 个样品分析项目的基本信息如表 1 所示。

2 结果

2.1 校正标样的一致性

应用复孔响应值拟合标准曲线，并分别计算校正标样的复孔浓度、单孔 1 浓度和单孔 2 浓度，复孔浓度与单孔浓度的一致性比较结果如表 2 所示。结果表明，校正标样的复孔浓度、单孔 1 和单孔 2 浓度之间有良好的相关性（r>0.999）和一致性（P>0.05）。

2.2 质控样品的一致性

应用复孔响应值拟合标准曲线，并分别计算质控样品的复孔浓度、单孔 1 浓度和单孔 2 浓度，复

表 1　项目基本信息

Tab.1　Basic Information of the Projects

项目编号	分析平台	分子类型	研究类型	分析方法	孔间CV均值[1)]/%
验证项目 1	ELISA	中和抗体药物	PK	夹心法	2.92
验证项目 2	ELISA	单克隆抗体	PK	夹心法	2.64
验证项目 3	单分子免疫阵列(Simoa)	蛋白类生物标志物	药效学(PD)	夹心法	5.03
验证项目 4	ELISA	单克隆抗体	PK	靶点+抗表型抗体	1.87
验证项目 5	电化学发光免疫分析技术(MSD)	单克隆抗体	PK	夹心法	1.00
样品分析项目 1	ELISA	中和抗体药物	PK	夹心法	1.13
样品分析项目 2	ELISA	单克隆抗体	PK	靶点+抗表型抗体	1.47
样品分析项目 3	ELISA	单克隆抗体	PK	靶点+抗表型抗体	2.12

注：[1)] 孔间变异指的是单孔 1 与单孔 2 测得数据间的变异。

表 2　校正标样的一致性

Tab.2　Consistency of the Calibration Standard Samples

项目编号	样本数 (N)	相关系数		一致性检验 P 值	
		复孔与单孔 1	复孔与单孔2	复孔与单孔1	复孔与单孔 2
验证项目 1	54	0.999 7	0.999 7	0.429 9	0.446 0
验证项目 2	47	0.999 9	0.999 9	0.962 5	0.776 3
验证项目 3	48	0.999 5	0.999 0	0.529 8	0.687 1
验证项目 4	48	0.999 8	0.999 8	0.063 9	0.063 7
验证项目 5	48	0.999 9	0.999 9	0.647 7	0.433 7

表 3　质控样品的一致性

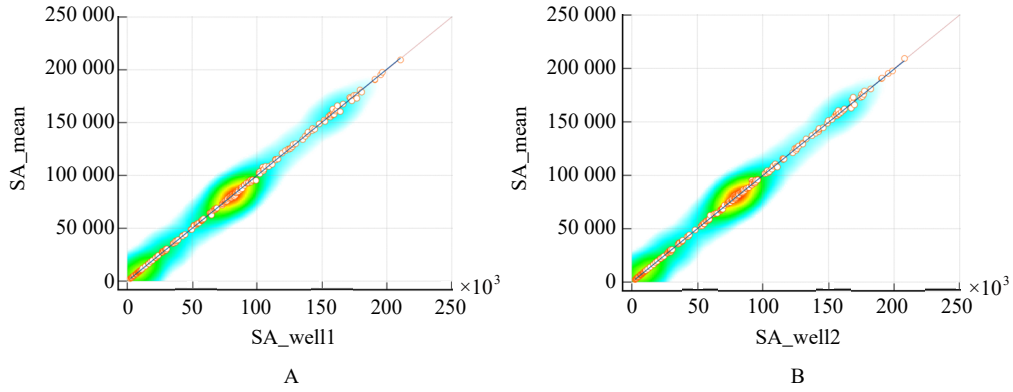
Tab.3　Consistency of the Quality Control Samples

项目编号	样本数 (N)	相关系数		一致性检验 P 值	
		复孔与单孔 1	复孔与单孔 2	复孔与单孔 1	复孔与单孔 2
验证项目 1	90	0.999 3	0.999 3	0.901 5	0.903 3
验证项目 2	47	0.999 9	0.999 9	0.323 7	0.323 8
验证项目 3	48	0.999 5	0.999 0	0.433 2	0.872 7
验证项目 4	48	0.999 8	0.999 8	0.536 0	0.834 8
验证项目 5	48	0.999 9	0.999 9	0.024 8	0.002 4
样品分析项目 1	213	0.999 8	0.999 8	0.980 9	0.980 9
样品分析项目 2	2 138	0.999 7	0.999 7	0.007 8	0.007 8
样品分析项目 3	3 167	0.999 6	0.999 6	0.334 2	0.333 4

孔浓度与单孔浓度的一致性比较结果如表 3 所示。以样品分析项目 1 和 2 为例，质控样品的复孔浓度分别与单孔 1 浓度和单孔 2 浓度的相关性和一致性分析结果如图 1 ～ 4 所示。结果表明，质控样品的复孔浓度、单孔 1 和单孔 2 浓度之间有良好的相关性 (r>0.999)，除验证项目 5 和样品分析项目 2 以外，其他批次结果间一致性良好。

2.3　主要药动学参数对比

分别以复孔浓度、单孔 1 浓度和单孔 2 浓度计算 3 个样品分析项目的药动学参数，对比单孔分析

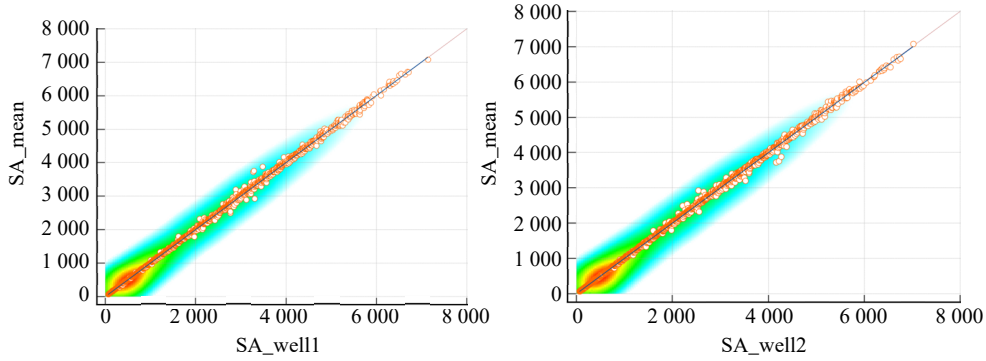


A—复孔的平均浓度与单孔 1 浓度；B—复孔的平均浓度与单孔 2 浓度。

注：曲线上小圆圈外的浅蓝色、绿色、黄色和红色区域表示样品数量的热力图，冷色调表示数量较少，暖色调表示数量越多（下图同）。

图 1　样品分析项目 1 复孔浓度与单孔浓度的相关性

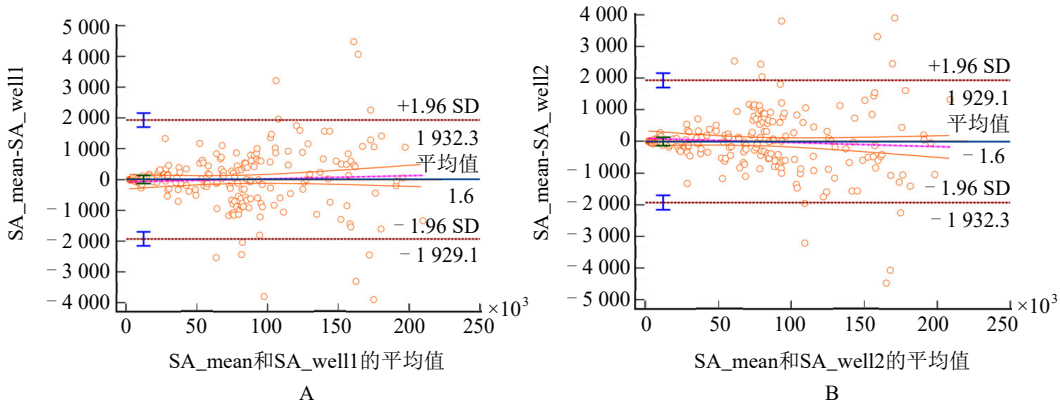
Fig.1　Correlation between Mean Concentration of the Duplicate Wells and Concentration of the Single Well in Sample Analysis Project 1



A—复孔的平均浓度与单孔 1 浓度；B—复孔的平均浓度与单孔 2 浓度。

图 2 样品分析项目 2 复孔浓度与单孔浓度的相关性

Fig.2 Correlation between Mean Concentration of the Duplicate Wells and Concentration of the Single Well in Sample Analysis Project 2



A—复孔浓度与单孔 1 浓度的 Bland-Altman 图（Y 轴为差值，X 轴为平均值）；B—复孔浓度与单孔 2 浓度的 Bland-Altman 图。

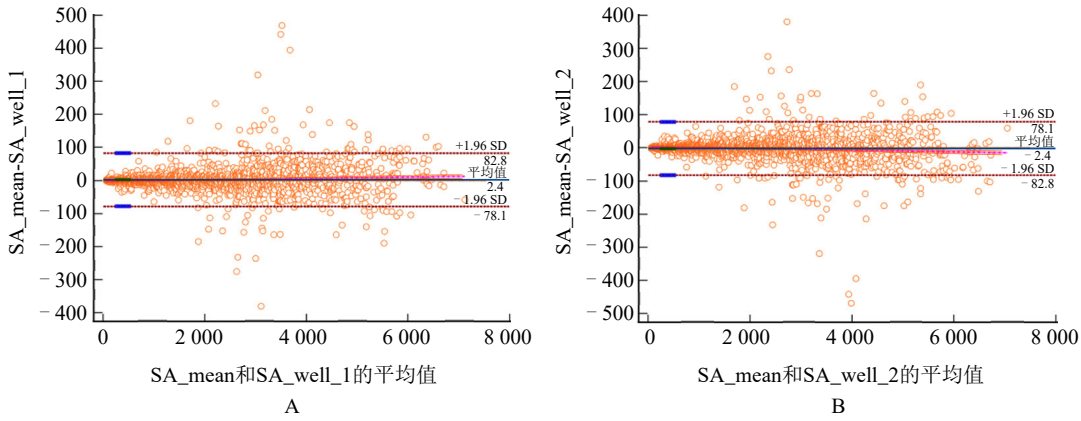
图 3 样品分析项目 1 复孔浓度与单孔浓度的一致性对比

Fig.3 Consistency Comparison between Mean Concentration of the Duplicate Wells and Concentration of the Single Well in Sample Analysis Project 1

与复孔分析所得的主要药动学参数（c_{max}、$AUC_{0\to t}$ 和 $AUC_{0\to\infty}$）是否具有统计学差异。结果（表 4 ～ 6）表明，分别以未知样品的复孔浓度、单孔 1 和单孔 2 浓度计算出的药动学参数无统计学差异。

3 讨论

本研究对收集的 5 个验证项目和 3 个样品分析项目的数据进行了分析。首先对比了校正标样采用复孔分析与单孔分析方式时的一致性，结果表明复孔浓度与单孔浓度具有一致性，进而支持下一步复孔与单孔质控样品的对比研究。从复孔与单孔质控样品的对比研究结果可见，5 个验证项目和 3 个样品分析项目的复孔浓度与单孔浓度有很好的相关性，除验证项目 5 和样品分析项目 2 中质控样品的一致性分析结果出现统计学差异（P<0.05）外，其他项目复孔分析与单孔分析所得浓度结果显示具有一致性。推测原因主要与验证项目 5 和样品分析项目 2 的两孔间浓度呈单调增减的趋势相关：验证项目 5 中单孔 1 与单孔 2 浓度的差值多为正值，且随着浓度的升高，差值也呈上升的趋势，得到的差值平均值为 0.202 6，95％置信区间并未覆盖 0 点



A—复孔浓度与单孔 1 浓度的 Bland-Altman 图（Y 轴为差值，X 轴为平均值）；B—复孔浓度与单孔 2 浓度的 Bland-Altman 图。

图 4　样品分析项目 2 复孔浓度与单孔浓度的一致性对比

Fig.4　Consistency Comparison between Mean Concentration of the Duplicate Wells and Concentration of the Single Well in Sample Analysis Project 2

表 4　样品分析项目 1 的主要药动学参数对比结果 [1)]

Tab.4　Comparison Results of the Main Pharmacokinetic Parameters in Sample Analysis Project 1

给药剂量/mg	数据类别	药动学参数								
		c_{max}			$AUC_{0\to t}$			$AUC_{0\to\infty}$		
		单孔 1	单孔 2	复孔均值	单孔 1	单孔 2	复孔均值	单孔 1	单孔 2	复孔均值
30	均值	9.53×10^3	9.41×10^3	9.47×10^3	2.29×10^6	2.28×10^6	2.28×10^6	4.48×10^6	4.09×10^6	4.48×10^6
	SD	1.62×10^3	1.43×10^3	1.53×10^3	3.26×10^5	3.22×10^5	3.24×10^5	6.67×10^5	8.33×10^5	6.34×10^5
	CV/%	17.0	15.2	16.1	14.2	14.1	14.2	14.9	20.4	14.1
	*P*值		0.995 3			0.999 8			0.755 5	
	N		3			3			3	
100	均值	3.32×10^4	3.32×10^4	3.32×10^4	7.17×10^6	7.24×10^6	7.21×10^6	1.31×10^7	1.32×10^7	1.32×10^7
	SD	5.09×10^3	4.83×10^3	4.95×10^3	1.67×10^6	1.67×10^6	1.67×10^6	3.32×10^6	3.37×10^6	3.35×10^6
	CV/%	15.3	14.5	14.9	23.3	23.1	23.2	25.4	25.5	25.4
	P		1.000 0			0.998 7			0.998 2	
	N		3			3			3	
300	均值	1.01×10^5	1.01×10^5	1.00×10^5	1.39×10^7	1.38×10^7	1.39×10^7	2.55×10^7	2.60×10^7	2.58×10^7
	SD	9.19×10^3	1.05×10^4	9.91×10^3	1.67×10^6	1.72×10^6	1.69×10^6	4.12×10^6	4.31×10^6	4.19×10^6
	CV/%	9.1	10.4	9.9	12.0	12.4	12.2	16.1	16.6	16.3
	P		0.998 3			0.997 8			0.983 5	
	N		5			5			5	
600	均值	1.77×10^5	1.78×10^5	1.77×10^5	1.36×10^7	1.37×10^7	1.36×10^7	5.44×10^7	5.54×10^7	5.43×10^7
	SD	2.28×10^4	2.15×10^4	2.22×10^4	1.59×10^6	1.73×10^6	1.66×10^6	1.61×10^7	1.72×10^7	1.61×10^7
	CV/%	12.9	12.1	12.5	11.7	12.6	12.1	29.5	31.0	29.7
	P		0.999 4			0.994 1			0.991 3	
	N		6			6			6	

注：[1)]“均值”和“SD”行在“c_{max}”列下的单位为 ng/mL，在“$AUC_{0\to t}$”“$AUC_{0\to\infty}$”列下的单位为 ng·mL^{-1}·h。

(0.054 1 ～ 0.351 2)，因此得到“具有显著统计学差异”的结论。验证项目 5 的单孔 1 与单孔 2 浓度的一致性对比如图 5 所示。样品分析项目 2 中单孔 1 与单孔 2 浓度的差值多为负值，且随着浓度的升高，差值也呈上升的趋势，得到的差值平均值为 -4.727，95% 置信区间也未覆盖 0 点（-8.209 ～ -1.245），因此也得到“具有显著统计学差异”的结论。虽然样品分析项目 2 的一致性分析表明复孔分析与单孔分析方式具有统计学显著性差异，但由于孔间 CV 均值很小（1.47%），对主要药动学参数

表 5 样品分析项目 2 的药动学参数对比结果 [1)]

Tab.5 Comparison Results of the Main Pharmacokinetic Parameters in Sample Analysis Project 2

数据类别	药动学参数								
	c_{max}			$AUC_{0\to t}$			$AUC_{0\to\infty}$		
	单孔 1	单孔 2	复孔均值	单孔 1	单孔 2	复孔均值	单孔 1	单孔 2	复孔均值
均值	4.33×10^3	4.34×10^3	4.33×10^3	2.43×10^6	2.44×10^6	2.43×10^6	2.63×10^6	2.64×10^6	2.64×10^6
SD	1.14×10^3	1.15×10^3	1.14×10^3	8.26×10^5	8.31×10^5	8.28×10^5	9.60×10^5	9.67×10^5	9.63×10^5
CV/%	26.3	26.4	26.4	34	34.1	34	36.4	36.6	36.5
P		0.989 9			0.996 7			0.996 3	
N		164			164			160	

注：1)“均值”和“SD”行在“c_{max}”列下的单位为 ng/mL，在“$AUC_{0\to t}$”“$AUC_{0\to\infty}$”列下的单位为 ng·mL^{-1}·h。

表 6 样品分析项目 3 的药动学参数对比结果 [1)]

Tab.6 Comparison Results of the Main Pharmacokinetic Parameters in Sample Analysis Project 3

数据类别	药动学参数								
	c_{max}			$AUC_{0\to t}$			$AUC_{0\to\infty}$		
	单孔 1	单孔 2	复孔均值	单孔 1	单孔 2	复孔均值	单孔 1	单孔 2	复孔均值
均值	1.30×10^4	1.30×10^4	1.30×10^4	1.54×10^7	1.54×10^7	1.54×10^7	1.62×10^7	1.61×10^7	1.61×10^7
SD	4.84×10^3	4.88×10^3	4.85×10^3	4.81×10^6	4.82×10^6	4.82×10^6	5.22×10^6	5.21×10^6	5.22×10^6
CV/%	37.1	37.5	37.3	31.2	31.3	31.2	32.3	32.3	32.3
P		0.998 3			0.998 2			0.997 6	
N		167			167			167	

注：1)“均值”和“SD”行在“c_{max}”列下的单位为 ng/mL，在“$AUC_{0\to t}$”“$AUC_{0\to\infty}$”列下的单位为 ng·mL^{-1}·h。

的计算影响较小，最终仍得出无统计学差异的结论（P>0.05）。

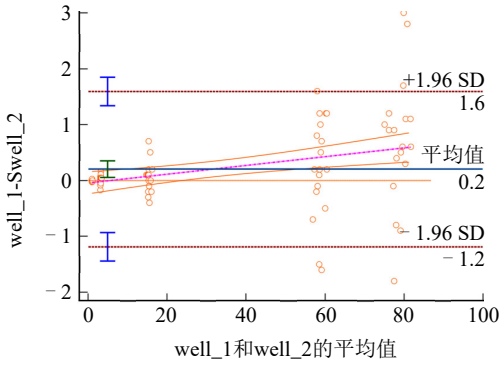


图 5 验证项目 5 中单孔 1 浓度与单孔 2 浓度的一致性对比

Fig.5 Consistency Comparison between Concentration of the Single Well 1 and Concentration of the Single Well 2 in Validation Project 5

有文献[11]报道在样品分析期间质控样品和校正标样的检测应采用复孔分析方式，以保证分析方法的精密度和可接受范围，因此本研究中数据分析均采用复孔响应值来拟合标准曲线，并用以计算质控样品和未知样品中的药物浓度。此次收集的项目的孔间 CV 均值最大为 5.03%，因此推测：当孔间 CV 值较小（如 5%）时，采用单孔响应值拟合标准曲线与采用复孔响应值拟合标准曲线计算得到的样品浓度无显著性差异，但当孔间 CV 值较大时，采用单孔响应值拟合的标准曲线来计算样品浓度，则要关注批间变异情况，在方法开发和验证时应充分考虑。当单孔分析与复孔分析所得结果的差异较大时，说明孔间 CV 值较大，应关注 LBA 法中仪器、分析物、试剂耗材、移液管、自动化以及试验操作的影响，通过标准化分析操作来达到降低孔间变异的目的，消除影响后再应用单孔分析。

本研究所收集的项目多为 ELISA 分析平台，结果表明单孔分析可以代替复孔分析应用于 ELISA 分析平台。其他分析平台如 MSD 和 Simoa 的结果也支持了相同的结论。但收集的项目数据有限，可在后续的研究进一步积累数据并验证单孔分析的可行性。

总体上，本研究的结论支持在孔间 CV 值较小（如 5%）的情况下，ELISA、MSD 和 Simoa 分析

平台可以采用单孔分析替代复孔分析。这个结论与文献[12]的报道一致，与受试者间变异相比，孔间变异（分析变异）对药动学参数计算的影响非常小。

致谢：上海方达生物技术有限公司、上海熙华检测技术服务股份有限公司和上海药明康德新药开发有限公司提供的项目数据用于本次回顾性研究。复旦大学附属中山医院李雪宁主任、复旦大学附属华山医院张菁教授对本次研究给予指导。

参考文献：

[1] The Ministry of Health, Labour and Welfare. Guideline on bioanalytical method (ligand binding assay) validation in pharmaceutical development [EB/OL]. (2014-05-30) [2023-05-04]. http://www. nihs. go. jp/drug/BMV/260530_LBA-GL_E. pdf.

[2] YE Z, TU J, MIDDE K, *et al*. Singlicate analysis: should this be the default for biomarker measurements using ligand-binding assays? [J]. *Bioanalysis*, 2018, **10**(12): 909-912.

[3] CLARK T H, YATES P D, CHUNYK A G, *et al*. Feasibility of singlet analysis for ligand binding assays: a retrospective examination of data generated using the Gyrolab platform [J]. *AAPS J*, 2016, **18**(5): 1300-1308.

[4] DUDAL S, BALTRUKONIS D, CRISINO R, *et al*. Assay formats: recommendation for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team [J]. *AAPS J*, 2014, **16**(2): 194-205.

[5] BARFIELD M, GOODMAN J, HOOD J, *et al*. European Bioanalysis Forum recommendation on singlicate analysis for ligand binding assays: time for a new mindset [J]. *Bioanalysis*, 2020, **12**(5): 273-284.

[6] PILLUTLA R, GOROVITS B, GLEASON C, *et al*. Recommendations for singlet-based approach in ligand binding assays: an IQ Consortium perspective [J]. *Bioanalysis*, 2020, **12**(12): 823-834.

[7] JIANG H, KOZHICH A, CUMMINGS J, *et al*. Singlicate ligand binding assay using an automated microfluidic system: a clinical case study [J]. *AAPS J*, 2017, **19**(5): 1461-1468.

[8] STANTA J L, CRAIG H, SMITH C, *et al*. Comparing singlet and duplicate immunogenicity assay in human plasma for pembrolizumab using Gyrolab® [J]. *Bioanalysis*, 2021, **13**(11): 891-900.

[9] ICH Expert Working Group. Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10 [EB/OL]. (2022-05-24) [2023-05-04]. https://database. ich. org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524. pdf.

[10] 国家药品监督管理局. 关于适用《Q3D(R2): 元素杂质》《M10：生物分析方法验证及样品分析》国际人用药品注册技术协调会指导原则的公告(2023年第16号) [EB/OL]. (2023-01-19) [2023-05-04]. https://www. nmpa. gov. cn/yaopin/ypggtg/20230129162900169. html.

[11] DUDAL S, BALTRUKONIS D, CRISINO R, *et al*. Assay formats: recommendation for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team [J]. *AAPS J*, 2014, **16**(2): 194-205.

[12] DONALDSON D, PURUSHOTHAMA S, DAVID E, *et al*. Well-developed ligand-binding assays demonstrate robust performance using singlet analysis [J]. *Bioanalysis*, 2019, **11**(22): 2075-2086.