



国家药品监督管理局药品审评中心

CENTER FOR DRUG EVALUATION, NMPA
CENTRE FOR DRUG EVALUATION, NMPA

此页面上的内容需要较新版本的 Adobe Flash Player。



当前位置：新闻中心>>工作动态>>通知公告>>新闻正文

国家药监局药审中心关于发布《药物免疫原性研究技术指导原则》的通告（2021年第25号）

发布日期：20210329

为进一步规范和指导药物免疫原性研究，为工业界、研究者及监管机构提供技术参考，在国家药品监督管理局的部署下，药审中心组织制定了《药物免疫原性研究技术指导原则》（见附件）。根据《国家药监局综合司关于印发药品技术指导原则发布程序的通知》（药监综药管〔2020〕9号）要求，经国家药品监督管理局审查同意，现予发布，自发布之日起施行。

特此通告。

国家药品监督管理局药品审评中心

2021年3月5日

附件 1：

药物免疫原性研究技术指导原则.pdf

Copyright © 国家药品监督管理局药品审评中心 All Right Reserved.

地址：中国 北京市朝阳区建国路128号 邮编：100022

总机：8610-68585566 传真：8610-68584189 备案序号：京ICP备09013725号

药物免疫原性研究技术指导原则

目 录

一、概述.....	1
二、免疫原性研究内容	2
三、抗药抗体检测	4
（一）试验设计考虑	4
（二）方法学开发与验证	7
（三）试验内容.....	7
四、附录.....	14
（一）免疫原性多层级检测策略示意图	14
（二）抗药抗体检测方法的开发与验证	15
（三）体外细胞因子释放试验	27

一、概述

本指导原则中，药物的免疫原性是指药物和/或其代谢物诱发对自身或相关蛋白的免疫应答或免疫相关事件的能力。免疫反应的影响广泛，从无临床意义抗药抗体的暂时出现，到严重危及生命。不必要或非预期的免疫反应可能导致中和药物的生物学活性，或与对应的内源性蛋白产生交叉免疫反应，也可能导致过敏反应和细胞因子释放综合征等不良事件的发生，对患者的安全和药物的有效性均有重要影响。

对于大多数药物，不良免疫反应一般由体液免疫机制介导的免疫应答所致，因此抗药抗体一直是定义该类药物免疫原性的主要标准。但近年来随着免疫调节类药物在重大疾病中更加广泛的应用，细胞免疫机制介导的不良免疫反应也应得到重视。药物的免疫原性受到多种因素的影响，患者自身和药物相关因素均可能影响药物的免疫原性。患者和疾病相关因素包括患者的免疫状态和免疫能力、遗传因素、预存抗体、给药途径、剂量和频率等。药物相关因素包括产品来源、结构、聚合物的形成、糖基化、聚乙二醇化、杂质、处方、包装和储存等。药物开发的全生命周期中应始终关注免疫原性研究，基于药物作用机制，产品相关因素，以及拟用适应证等因素预测免疫原性风险，基于免疫原性风险设计相应的研究进行风险识别。在药物的开发中，一方面应尽量选择免疫原性潜在风险较小的候选药物，另一方面应探索如何减少

和控制免疫原性的不良影响。

本指导原则适用于治疗性蛋白质、多肽及其衍生物，以及含有此类组分的药物，例如抗体偶联药物。其他具有潜在免疫原性风险的药物也可参考本指导原则。

二、免疫原性研究内容

免疫原性研究主要聚焦在抗药抗体的检测和表征上，通常应获得抗药抗体的发生率、滴度、存续时间和中和能力数据。有些情况下，需要对抗药抗体进一步表征，如同种型和亚型或者与相关内源性蛋白的交叉反应性。应始终考察抗药抗体生成与药代/药效动力学、疗效、以及安全性之间的相关性。免疫原性风险识别中，细胞介导的免疫反应也很重要，应在适用的情况下考虑对其进行评估。如果观察到临床相关的免疫反应，应对其潜在机制进行研究，并确定关键的影响因素。这些研究有助于控制和缓解策略的制定和实施，包括修改产品处方和筛查高风险患者人群。

治疗性蛋白药物通常具有种属差异，基于动物免疫原性研究结果预测人体免疫原性具有局限性。但是，在非临床研究中进行免疫原性评价仍然具有一定意义。免疫原性相关反应可导致非临床研究结果复杂化并难以解释，免疫原性数据有助于安全性数据的整体分析，因此免疫原性研究始终是治疗性蛋白药物非临床安全性研究证据链的重要组成部分。应考虑将新技术（新兴的生物信息学、体外和体内模型）用于

开发过程中。对于细胞因子释放综合征、自身免疫反应等免疫相关不良反应，应在药物的开发早期进行风险评估。对于具有潜在风险的药物，除了在常规的动物体内毒性试验中进行细胞因子相关检测外，应进行体外细胞因子释放试验（具体试验方法见[附录三](#)）。当治疗性蛋白药物对应的内源蛋白具有不可替代的生理功能时，应充分评估潜在自身免疫反应介导的安全性风险。通常基于对内源性蛋白生理功能的已有认知，安全性风险是可以预估的，因此不必为了确定这些安全性风险而专门进行动物试验。但是，如果缺乏足够认知，并且理论上提示存在安全性风险，则应考虑对治疗性蛋白药物（或针对动物的替代分子）进行动物免疫试验，以便于了解不良免疫反应的潜在影响。

生物类似药开发时需要进行免疫原性比较试验，生物类似药和参照药应采用同样的分析模式和采样计划。分析方法最好能同时检测生物类似药和参照药的抗药抗体，至少应尽可能检测到生物类似药的所有抗药抗体。无论采用单一分析方法还是两套分析方法，均应进行相应的交叉验证，以期获得对生物类似药和参照药同样的检测性能。通常，应对抗药抗体生成和性质进行检测，并应评估和解释对临床有效性和安全性指标的潜在影响。

当生产工艺变更需要临床试验支持时，免疫原性的研究应与药代动力学、安全性和有效性试验相结合，应优先开展

变更前后药物的头对头试验。

免疫原性研究涉及多学科及不同研发阶段，免疫原性相关数据往往分散在上市申请的多个部分。建议对免疫原性研究结果进行综合概述，并将其放于 CTD2.7.2.4 特殊研究中，总结应简明扼要，并包含详细研究报告的链接。

三、抗药抗体检测

制定与预期治疗计划相关的综合分析策略对于阐明免疫原性数据的临床相关性至关重要。考虑到与临床安全性和疗效的相关性，免疫原性研究通常集中在对抗药抗体的检测和表征研究上。抗药抗体检测需要进行谨慎且前瞻性的设计和计划，包括分析方法的选择和开发、合适的采样点、充足的采样体积、样本采集的流程及储存方法、以及数据分析选用的统计学方法。

（一）试验设计考虑

1.检测策略

抗药抗体的检测通常应采用多层级分析方法，首先对所有样本进行筛选试验，之后对疑似抗体阳性样本的特异性进行确证试验，对已确证抗体阳性的样本进行滴度试验，以及对抗体中和活性进行检测。其中在已确证抗体阳性的样本中，有时还应考虑对抗体同种型、亚型和结合表位进行检测。免疫原性多层级检测决策树参见[附录一](#)。

在多层级的分析方法中，筛选试验又称结合抗体试验，

用于检测与药物结合的抗体；确证试验用于确定药物结合抗体的特异性；滴度试验用于检测抗药抗体产生的强度；中和抗体是指能够干扰药物与其靶点相互作用的抗药抗体，中和活性试验评估抗药抗体对药物的中和能力/程度。抗药抗体滴度、持续周期、以及中和活性检测信息对于判断抗药抗体对药代动力学、药效动力学、安全性和有效性的影响非常重要。在非临床免疫原性研究中，通常根据非临床药效动力学、药代动力学和安全性的研究结果，以及药物的潜在免疫原性风险确定是否需要进行除抗药抗体发生率以外的研究。

其他分析试验，如抗体同种型、亚型、抗原表位鉴定以及与内源性靶点或其他产品的交叉反应性的评价也具有重要作用。初步的筛选试验应尽可能检测到所有相关的免疫球蛋白（Ig）同种型抗体，但筛选试验无需进一步确定同种型抗体。在某些情况下，应建立可区分同种型抗体的分析方法。例如，对于过敏性反应风险较高或观察到过敏性反应的药物，则需要进行抗原特异性的 IgE 检测。对于粘膜途径给药，通常涉及到 IgA 抗体。有时需考虑对抗体亚型进行检测，例如，凝血因子VIII所致的免疫反应可能涉及到 IgG4 抗体。在有些情况下，可能需要进行与其他蛋白交叉反应的试验，如检测抗药抗体与相应的内源性蛋白的交叉反应性。例如，当治疗性蛋白药物在体内具有一个高同源性的蛋白家族，为了解抗药抗体是否影响蛋白家族中其它蛋白时，通常需要评估抗药

抗体的交叉反应性。

对于多结构域治疗性蛋白药物，如聚乙二醇化蛋白、多特异性抗体，建议针对整个治疗性蛋白药物进行初步筛选试验和确证试验，基于风险或产品特征，对确证为阳性的样本进一步开展域特异性评价。

2.分析方法的选择

抗药抗体检测可以采用不同的方法和仪器，包含但不限于：直接法、桥联法和均相结合法。每种分析方法均有优点和不足，包括检测速度、灵敏度、选择性、方法的响应范围、检测不同免疫球蛋白的能力、检测快速解离出的抗体的能力（如 IgM，在免疫反应的早期出现），以及试剂的可获得性。所有的分析方法都应该考虑其检测快速解离出的抗体的能力。如果无法检测到此类免疫反应早期出现的抗体，易造成真正阳性的抗体样本未被检出的情况。在分析中也要重点考虑表位的暴露情况，如果表位与固相载体或者其他报告试剂（如荧光染料、酶或生物素）结合，将导致抗原的构象变化，这将掩盖、暴露、改变或破坏与治疗性蛋白药物相关的抗体的结合位点，从而影响最后的检测结果。

3.试剂的选择

用于抗药抗体检测的有些试剂可以是标准化的或从商业来源获得。然而，特定方法可能需要特定试剂，包括阳性对照抗体、阴性对照和系统适用性对照。应根据检测方法选

择合适的试剂，以最小化非特异性信号并维持足够的灵敏度。阳性对照抗体和阴性对照的选择见附录二。

（二）方法学开发与验证

方法学验证的程度主要取决于药物的开发阶段以及潜在的免疫原性风险。对于大多数药物，在药物开发的早期阶段（如非临床、临床 I 期和 II 期研究阶段），应重点考察临界值、灵敏度（包括药物耐受性），选择性和精密度，而弱化稳健性、重现性和稳定性的考察。对于高风险药物，可能需要在临床研究前进行全面验证。对于关键性临床试验和上市后研究，一般需要进行全面的方法学验证。药物开发全生命周期中，有可能根据研究需要进行检测方法参数的调整，在此情况下，应合理追加相关的补充验证内容；对于生物类似药，免疫原性是可比性研究的一部分，在方法学验证中需要增加可比性验证内容。此外，对于某些技术平台，需增加对其他参数的验证，如采用表面等离子共振平台时，需验证表面再生稳定性、芯片基线标准、标记试剂的效能及稳定性等。具体的验证方法参见附录二。

（三）试验内容

1. 筛选试验

筛选试验是抗药抗体检测的第一步，该分析方法需具有足够的灵敏度以能检测出样本中低、高亲和力的各种类型抗药抗体。为确保真实样本的检出率，筛选试验应具有一定的

假阳性率（通常为 5%），但需规避出现假阴性。

方法建立时应尽可能选择与待测样本相同或相近的自然样本群。应根据需求对所选择的方法进行优化。样本（通常是血清或血浆）中可能含有影响检测的成分，可导致产生假阳性或假阴性结果，和/或对抗体含量产生错误评估。例如补体成分或补体受体、甘露糖结合蛋白、Fc 受体、可溶性的靶分子及类风湿因子。应采用经确证合理的方法以减少基质效应的潜在影响。

此外，待测样本中的残留药物可能与抗药抗体结合，从而使检测到的抗体含量降低。这种干扰带来的影响取决于分析模式和抗体的特性。可通过多种经验证的方法规避或解决，如酸解离、通过固相吸附除去过量的药物、延长孵育时间、以及稀释样本等方法。在某些情况下，可通过调整给药间隔和采样时间来降低残留药物的干扰。但该方法必须不能对抗体的检测或患者的治疗产生明显影响。通常，应证明分析方法的药物耐受水平超过待测样本中药物的浓度（一般为药物谷浓度）。

2. 确证试验

确证试验是为了排除筛选试验中的假阳性样本。筛选试验中检测为阳性的样本，需进一步通过确证试验证明抗药抗体的特异性。

确证试验应与筛选试验具有可比的灵敏度，但需要注意

两个试验的假阳性率不同，且确证试验应有更高的特异性，并至少具有与筛选试验相当的选择性，以识别假阳性样本。通常，采用结合竞争抑制法进行检测，即在样本中加入过量的药物，随后同时检测加入药物和未加入药物样本的信号值，若样本中含有抗药抗体，游离的药物将竞争结合抗药抗体，从而造成检出的信号值下降。确证试验的方法和平台可与筛选试验相同，也可不同。方法灵敏度需采用质量单位，并使用系统适用性质控进行确认，当筛选试验和确证试验采用不同方法和平台时，应具有相似的灵敏度。

若选择竞争性抑制方法，则建议使用未给予药物的受试者样本，加入抑制剂（通常是受试药物）后，所产生信号的数据来确定临界值。用于测定临界值的药物的竞争浓度应与将用于样本检测的浓度一致。这种方法可能不适用于在未给药受试者中存在预存抗体的情况，此时建议从临界值的评估中找出疑似阳性结果并予以剔除。当没有本底水平的阴性对照样本时，应采用滴度的改变或正交方法对筛选试验中呈阳性的样本进行确认。对于确证为阳性的样本，在某些情况下，需要对其特异性进行检测，应考虑开发并验证针对样本中杂质诱导产生抗体的检测方法，以区分抗体的结合是针对药物相关成分还是工艺相关成分（如宿主细胞蛋白）。

3.滴度试验

滴度定义为样本检测值高于临界值时的最大稀释倍数。

滴度检测常与筛选试验使用相同的平台。一般采用连续稀释方法或通过量效曲线的线性部分外推来确定滴度。

通常，滴度临界值沿用筛选临界值。在某些情况下，也应考虑采用与筛选试验不同的临界值。例如，当筛选临界值落在阳性滴度曲线的低平台区时，应建立滴度试验临界值。如无特殊情况，通常采用 0.1% 的假阳性率确定滴度临界值。当存在预存抗药抗体时，则应根据给药后样本中滴度的提升判断经治疗后样本中抗药抗体的升高。

4. 中和活性试验

中和活性是指抗药抗体具有抑制药物生物学活性的能力。中和抗体可以通过阻断产品到达其靶标或干扰受体/配体结合，从而干扰药物的体内活性。

中和活性试验的分析模式选择需要考虑多种因素，包括但不限于药物本身的作用机制、检测方法与体内真实情况的相关性、方法本身的选择性、生物基质的干扰程度、灵敏度和稳健程度等。检测方法与药物体内作用机制的相关性为首要考虑因素。通常采用基于细胞的中和活性检测方法。但是，当药物在体内的作用机制与细胞关系较小，例如体液中游离靶点的拮抗反应、酶反应等，或者由于生物基质干扰等因素，细胞学方法的变异程度、定量范围、灵敏度等难以满足方法学验证和样本分析的需要时，可能需采用基于非细胞的试验方法（配体结合分析、酶反应等）。在某些特殊情况下，结合

高度灵敏的药效动力学和/或药代动力学数据可以判断抗药抗体对临床药效的影响，这些试验和指标有可能代替中和抗体试验，这些数据的可替代性应与监管机构进行沟通交流。

基于细胞的中和活性检测方法通常在药物活性测定方法的基础上进行开发，这些方法的形式和测定终点因产品而异。中和活性检测方法开发时，应考察基质效应、药物浓度、配体浓度等，并验证临界值、精密度、选择性、灵敏度等。中和活性分析方法一般不具有很好的药物耐受性，因此应在采样时间点设计上予以考虑。此外，还应该针对不同分析模式的特殊性，考察方法的稳健程度，例如细胞代次等。

通常，基于细胞的中和活性检测方法采用特定浓度的阳性抗体及特定浓度的药物。因此，应对药物的浓度进行筛选，使其产生的细胞效应对中和作用足够灵敏。如果药物的浓度在量效曲线的下半部分，可能没有足够的动态范围响应以显示中和效果。如果在接近量效曲线的平台浓度下进行试验，对于中和抗体含量低的样本，可能检测不出阳性结果。因此，建议选择量效曲线线性范围内的药物浓度进行中和活性试验。

样本基质可干扰中和活性试验，尤其在基于细胞的检测中，基质组分可能增强或抑制药物的活性。例如，患有特定疾病受试者的血清中可能含有高水平的细胞因子，这些因子可能激活细胞，使其对原有刺激因子或药物的应答增强，从

而影响中和抗体的检测。因此，应了解这些试验中的基质影响并选择可以被药物特异性激活的细胞系，还可通过特异性抗体抑制或耗竭干扰因子。

中和活性试验需采用未给药受试者的样本，通过试验变异性来确定临界值。如果对筛选和确证试验中检测为阳性的样本进行中和活性检测，通常采用 1% 的假阳性率。当使用中和活性进行筛选时，应采用 5% 的假阳性率。如果样本变异程度导致中和抗体活性难以评估，可考虑其他方法，或开发能使变异性降低并获得更准确临界值的方法。

中和活性试验通常采用固定临界值，基于药物作用机制可采用信号抑制或刺激百分比来表示；亦可采用浮动临界值。

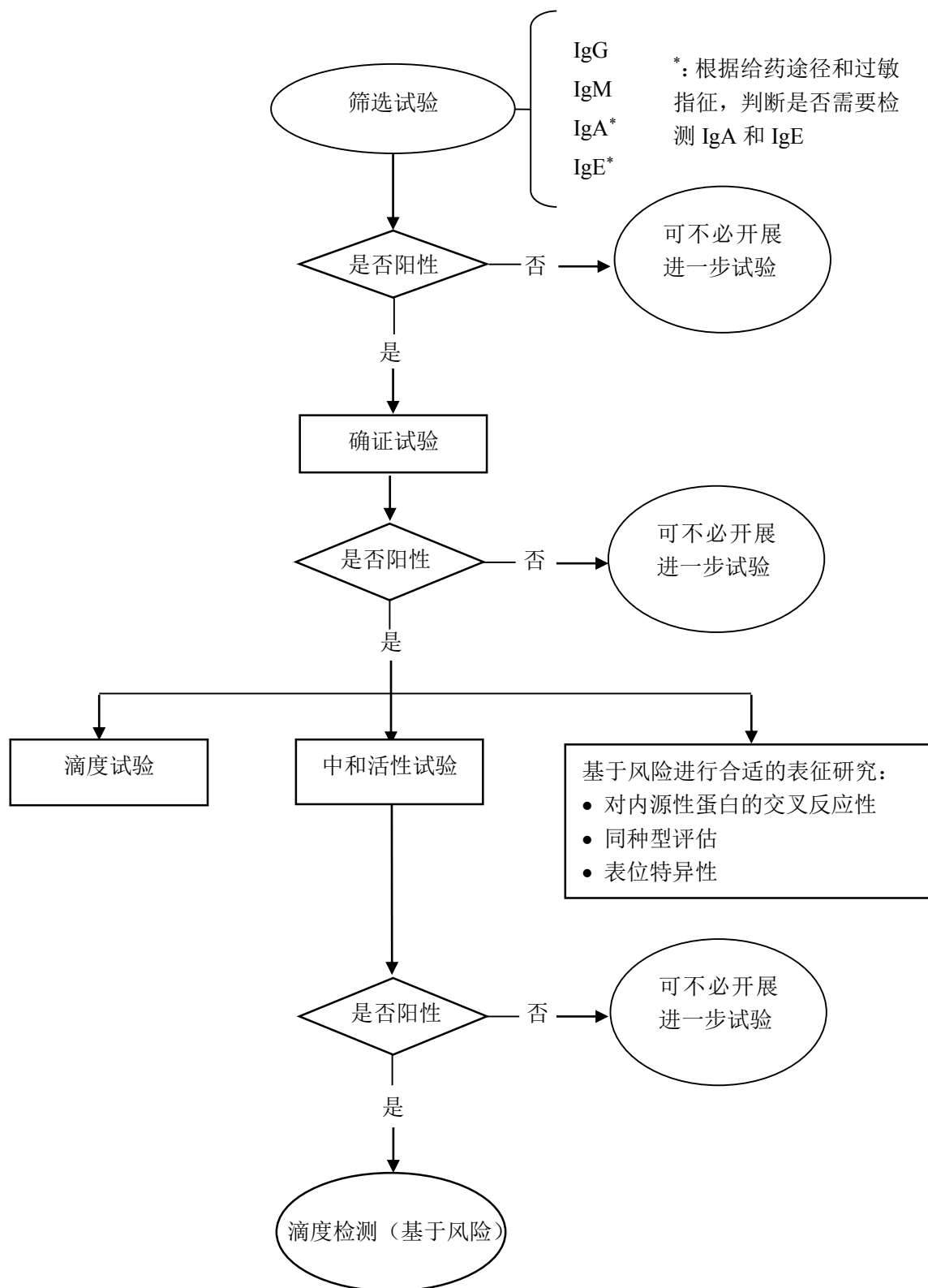
中和活性试验一般仅对抗药抗体阳性样本进行检测，通常不需要确证研究。由于生物活性检测具有一定的复杂性，某些情况下，需要进一步确定受试者是否产生了真正的中和抗体，应考虑以下方面：（1）不相关的抑制分子可能引起中和活性，从而难以确认中和活性是由中和抗体还是其他抑制分子导致。若担心存在非特异性抑制，应考虑进行竞争试验。

（2）除了药物，细胞系可能对多种刺激产生应答。在这种情况下，可在药物存在时检测中和抗体，此时中和抗体应答会被特异性阻断，而其它刺激引起的应答不会被阻断。（3）基质含有的可溶性受体或内源性药物类似物可能导致错误结果。在这种情况下，直接进行基质样本的检测或封闭基质因

子（若已知）有助于了解试验结果。（4）还应考虑样本中是否存在药物，特别是半衰期较长的药物。

四、附录

(一) 免疫原性多层次检测策略示意图



（二）抗药抗体检测方法的开发与验证

1. 阳性对照抗体

作为评估方法学性能的关键试剂，阳性对照抗体直接影响检测方法的灵敏度。理想状况下，阳性对照抗体应能够反映药物在受试个体中的免疫应答情况。因此，选择合适的阳性对照抗体对抗药抗体检测方法学的开发和验证至关重要。

阳性对照抗体可通过免疫动物或从商业公司购买获得。一般选择免疫动物制备多克隆抗体作为阳性对照抗体。对于临床研究，如可获得人的抗药抗体，则可考虑优先采用。如对于治疗性单克隆抗体，应特别考虑阳性对照抗体的代表性，建议首先根据抗体的结构类型（如嵌合、人源化或全人源）评估其在受试动物或人体中可能产生的抗体所针对的结构域或抗原表位，然后选择合适的免疫原针对性地制备阳性对照抗体。作为备选，有时也可选用单个或多个单抗的组合作为阳性对照抗体。如面临无法制备阳性对照抗体的特殊情况，可以考虑采用替代手段，但需阐明采用替代手段的科学性和合理性。当检测模式为桥连法时（如对于单抗类药物），阳性对照抗体理论上无种属限制和免疫球蛋白亚型限制，但应注意IgG4亚型不适用。

阳性对照抗体一经确定，即可用于评价灵敏度、选择性、特异性、重现性等方法学特性。在方法开发和验证过程中，应采用阳性对照抗体制备高、中、低不同浓度的质控或系统

适用性对照。中浓度质控有利于在方法学验证过程中评估方法学的精密度，考察在较宽的抗药抗体浓度范围内方法学表现是否可被接受。对于常规的抗药抗体检测，监测系统适用性可只用高、低浓度质控样品。建议高浓度阳性对照选择没有钩状效应的信号曲线高端对应的浓度，或者模拟样本中预期最高浓度水平。中浓度阳性对照应选择标准曲线中段浓度点。建议采用统计的方式确定低浓度阳性对照样品的浓度，一般以1%的分析批拒绝率来进行计算。对于非临床研究，可根据灵敏度确定试验的标准曲线，采用1.5~2倍阴性对照或1.5~2倍筛选临界值仪器响应值或其转换值对应的浓度作为低浓度阳性对照样品。

2. 阴性对照

为评价非特异性本底水平，方法学验证和样本检测中均需设置阴性对照。阴性对照为来自至少10例代表性未给药个体基质的混合物。由于分析前的变量可能对阴性对照的检测结果带来影响，应尽可能模拟待测样本的基质特点，如基质种类（一般为血清或血浆）、种属、性别、年龄和疾病背景等，并采用与待测样本相同的预处理方式，如相同的抗凝剂、采样体积、相似的制备方法和相同的储存条件等。如在方法开发和早期验证试验阶段暂时无法获得符合上述条件的基质，可以采用健康个体的基质。当获得与待测样本相同的未给药群体的基质时，应对临界值、灵敏度和选择性等重要方法学

参数进行确认。此外，应对基质中可能含有的预存抗体、可发生结合的蛋白、可溶性受体等因素进行评估。

阴性对照样本的信号值应当低于但接近于筛选临界值，并且能够代表临界值确定试验中个体样本的信号波动情况，如阴性对照的信号值远低于个体样本信号的均值，则不能用于监测方法的适用性。

3. 临界值

临界值是将样本定义为阳性或阴性结果的响应水平。建立合适的临界值可使产生假阴性结果的风险最小化。

临界值可能受多种干扰物或基质成分的影响，应在方法开发早期考虑这些因素。由于来源于不同目标人群和疾病状态的样本中含有的引起背景信号发生变化的因素各有不同，可能需要分别制定不同的临界值。

如果可行，应采用未经治疗的受试者的样本通过重复试验对检测的变异程度进行考察，并基于统计学方法对临界值进行计算。在计算临界值时应考虑统计确定的离群值和真实阳性样本的影响，并提供剔除任何数据点的理由和用于确定离群值的判断方法。

3.1 筛选临界值

筛选临界值用于初步判定待测样本为阴性或潜在阳性。筛选临界值的确定应基于多个空白个体基质的响应值，从科学（如生物统计学）的角度进行综合考虑。用于计算筛选临

界值的空白个体基质的来源应尽量来自给药前的受试者或动物，如选择来源于其它群体的空白个体基质应进行合理性论证。通常，非临床研究应选择不少于 15 个，临床研究应选择不少于 50 个空白个体基质。临床前研究中至少对分析人员、日期两个实验变量进行考察，临床研究中，根据实际情况可能还需要对更多变量，例如仪器、固相载体等进行考察，分析时各样本均设置复孔。

非临床研究中，筛选临界值应基于至少 2 名分析员在至少 3 天进行的 3 个分析批的响应值（或基于阴性对照校正后的数值）进行统计分析获得；临床研究中，应考察至少 2 名分析员在至少 3 天进行的 6 个分析批。筛选临界值的一种计算方法是采用空白个体 95% 百分位数的单侧 90% 置信区间下限得到。计算临界值的统计方法取决于数据的分布，例如，正态分布的 95% 的百分位数可通过个体均值加上 1.645 倍的标准差计算；也可用其他方法计算 95% 的百分位数值，例如，使用中位数及中位数的绝对偏差代替均值与标准差，应说明计算方法选择的依据。不同批次间，阴性对照样本的平均信号值可能是恒定的，也可能在不同的分析批、孔板或分析人员之间变化。当这之间的平均值不同，但平均值的方差恒定时，可以运用一种标准化因子来计算并用于检测中。这种方式获得的临界值称为浮动临界值，是最常用的临界值类型。对于正态分布数据，当均值为常数时，可以在试验验证过程

中建立一个临界值，即固定临界值，该临界值可直接用于研究中。通常不鼓励采用固定临界值，因为它无法对研究中阴性对照可能的变化进行监测。当平均值和方差均不同时，可能需要为每个分析批、孔板或分析人员计算临界值，即动态临界值。然而，这种方法通常不实用，因为这需要包含更多的阴性对照样本。如果数据显示需要使用动态临界值时，应考虑进一步开发试验方法，而不是使用动态临界值。

3.2 确证临界值

由于筛选临界值通常允许至少5%的假阳性率，因此经筛选试验判定为“疑似阳性”的样本可能是非特异性的，需进一步通过确证试验考察对药物的特异性，并基于确证临界值（以百分比抑制率表示）确定是否为阳性。在确证临界值确定试验中，通常将某一特定浓度的受试药物加入空白个体基质，通过加入药物的空白个体基质复孔信号值与未加药物空白个体基质复孔信号值计算信号抑制率。在剔除离群值后，可选择信号抑制率的99%百分位数的80%~90%单侧置信区间的下限（即允许1%假阳性）作为确证临界值。建议确证临界值确定试验与筛选临界值确定试验在同一个分析批或分析板上进行。对空白基质数量、考察变量和复孔检测的要求与筛选临界值确定试验相同。当确证试验所采用的方法或平台不同时，确证临界值应在独立的分析批中参考上述方法进行构建。

4.灵敏度

方法灵敏度是指阳性对照样品检测结果持续为阳性或读数等同于该检测方法临界值的最低浓度。为了在抗药抗体水平达到对药代动力学、药效动力学、安全性或有效性产生影响之前被检测到，分析方法应具有足够灵敏度。值得注意的是，方法灵敏度是通过阳性对照抗体建立的，可能无法完全代表特定受试者体内的抗药抗体应答情况。阳性对照抗体通常为高亲和力抗体，该抗体可能高估灵敏度。因此，方法灵敏度并不是为了确定受试者体内抗药抗体的绝对量，而是为了更全面地理解检测方法的性能。由于灵敏度可能受样本中残留药物的影响，因此考察在预期药物浓度下的灵敏度是非常重要的。

4.1 方法灵敏度

灵敏度可通过多种方法计算。通常在混合空白生物基质中按照不高于 2~3 倍的梯度稀释阳性对照样品（应采用经亲和层析纯化后的多抗或单抗）至系列（至少 5 个）已知浓度，然后确定或计算灵敏度，一种方法是在至少满足一个浓度的响应值低于筛选/确证临界值的情况下，高于筛选/确证临界值的最低浓度即为方法灵敏度；另一种方法是采用横跨筛选/确证临界值的两个点进行截距法计算；还可以对各浓度的响应值和浓度进行曲线拟合，根据筛选/确证临界值计算的阳性对照抗体浓度即为方法灵敏度。

建议以阳性对照抗体的加样浓度乘以最小稀释倍数后进行灵敏度的报告。如果采用了一个以上阳性对照抗体，建议分别报告灵敏度。对于非临床研究，方法灵敏度一般需达到 250~500 ng/mL；对于临床研究，在筛选和确证试验中，IgG 和 IgM 型抗药抗体的检测灵敏度一般应达到 100 ng/mL。在某些特定情况下，基于风险评估和以往的数据，灵敏度大于上述推荐值也是可以接受的；有文献报道，低至 100 ng/mL 的抗药抗体水平也可能导致临床反应，此时可考虑更低的灵敏度。IgE 型抗药抗体的检测灵敏度需达到几百 pg/mL 或几 ng/mL 级别。对于中和活性试验的检测可能无法达到该灵敏度水平。方法灵敏度高度依赖于所采用的阳性对照抗体，不一定能直接反映待测样本中的最低检出水平；但灵敏度提供了分析方法的性能指标，有助于在开发阶段选择最优的抗药抗体检测方法。

4.2 药物耐受水平

生物样本中可能含有高浓度的游离受试药物，可以与捕获试剂/检测试剂竞争结合抗药抗体，进而干扰抗药抗体检测导致假阴性结果。因此，在方法学早期开发过程中，应评估游离受试药物对方法学的干扰，即药物耐受水平，并在方法学验证中进行考察。

药物耐受水平需要结合待测样本中的药物浓度进行考察。一般使用混合空白基质稀释受试药物至合适系列浓度，

用该系列稀释样本与不同浓度阳性对照抗体混合后进行检测，应至少包含低浓度阳性对照抗体或者 100ng/mL 浓度的阳性对照抗体，非临床研究中可适度考察更高浓度（250~500ng/mL）的阳性对照抗体。响应值高于筛选临界值所对应的最高受试药物浓度即为该浓度阳性对照抗体能够耐受的最大药物浓度，也可以使用横跨筛选临界值的两个点进行截距法计算，得到该浓度阳性对照抗体能够耐受的最大药物浓度。

值得注意的是，药物耐受水平数据仅代表某特定浓度的阳性对照抗体样品对药物的耐受特性，由于阳性对照抗体样品与待测样本中抗药抗体的亲和力存在差异，可能与待测样本中抗药抗体的药物耐受性水平有所不同。

在方法开发时，需对可能影响药物耐受性的选择性、靶点的性质及阳性对照类型进行考察。如对于不耐酸的抗体或可溶性靶点，酸解离可能并不适用。可通过采集受试者体内药物浓度达到谷浓度时的样本来尽量降低药物的干扰。

5. 精密度

待测样本的检测通常是在不同的分析时间、分析批（板）、分析仪器及分析员之间进行的，因此分析方法应满足相应的精密度要求，并分别考察筛选试验精密度、确证试验精密度和滴度试验精密度。

临床、非临床对精密度的考察类似，但临床研究中的批

间精密度考察会纳入更多变量与分析批数量。对于筛选和确证试验，建议在不同的时间、由不同的分析人员、使用相同的仪器或平台和相同的数据模型评估批间精密度。临床研究中通过至少 6 个分析批进行批间精密度评估，非临床研究至少需要 3 个分析批。批内精密度一般来源于含至少 6 套独立配制的系统适用性对照样品的分析批数据，通过系统适用性样品（阴性对照、低浓度阳性对照、中浓度阳性对照、高浓度阳性对照以及确证试验的免疫耗竭对照）的变异系数（%CV）来呈现，其中阳性对照样品需要采用与分析方法相同的数据转换方式来计算，不宜高于 20%。批间精密度通过所有可报告的验证分析批系统适用性样品（阴性对照、低浓度阳性对照、中浓度阳性对照、高浓度阳性对照以及确证试验的免疫耗竭对照）的变异系数（%CV）来呈现，其中阳性对照样品需要采用与分析方法相同的数据转换方式来计算，不宜高于 20%；若高于 20%需要优化分析方法或提供合理性说明；对于阴性对照样品或高变异度的细胞学试验，其接受标准可适度放宽。对于滴度试验，批内精密度建议通过含有至少 3 套独立配制的滴度阳性对照样品进行评估，批间精密度建议通过至少 3 个分析批至少 9 套滴度阳性对照样品进行评估。

6.特异性

特异性是指某种方法对于某一目标分析物的专属检测能力，特异性较低可能导致假阳性结果。所开发的分析方法应能够特异性地检测抗药抗体，而非单抗药物、可溶性靶点、非特异性内源性抗体或方法中使用的抗体试剂。类似地，对于类风湿因子高发的人群，应证明类风湿因子不会干扰分析方法或该方法能够区分出类风湿因子和特定抗体。如果抗药抗体可与宿主细胞蛋白或其他产品相关杂质发生交叉反应，可能需要对这些反应的特异性进行评估。应根据非临床与临床试验不同阶段的具体情况考察方法特异性。考察指标包括但不限于血清中的因子（如类风湿因子）、脂质、血红蛋白、预存抗体和/或合并用药等对方法的干扰作用。应采用添加或未添加药物或其相关物质的阴性对照样品和低浓度阳性对照样品进行特异性考察。

7.选择性

选择性是指分析方法能够在样本中存在其他成分的情况下检出特异性针对该药物的抗药抗体的能力。待测基质中往往含有大量的不同大小和不同电荷的蛋白质，可能对抗药抗体的检测造成干扰。如未对分析方法的选择性进行验证易造成非特异性信号，从而导致无法正常检出阳性样本。

通常需要对待测样本进行稀释处理以获得较为理想的抗药抗体检测能力。最小稀释倍数有多种定义，包括：产生

最高信噪比的样本稀释倍数，产生最接近稀释液的信号的样本稀释倍数，以及导致最高信号变量比的样本稀释倍数，可使用上述定义中的任何一种，但是为了有效计算方法的灵敏度，最小稀释倍数应该考虑待测样本的最终稀释程度，通常为 1:5 至 1:100（即 1/5 到 1/100）。建议最小稀释倍数不要超过 1:100，因为过高的最小稀释倍数可能导致假阴性结果。在某些情况下，如采用了更高的最小稀释倍数，应充分考虑其对检测灵敏度的影响以及产品的免疫原性风险。建议通过一定数量的未给药受试者样本来确定最小稀释倍数。最小稀释倍数的确定通常需要连续稀释不含药的抗药抗体阴性样本，以及通过将已知浓度的阳性对照抗体经系列稀释后加入基质配制至高、中、低浓度，与使用稀释液配制的相同浓度的阳性对照抗体进行对比。最小稀释倍数应使用适当数量的个体血清样本来计算，样本的数量取决于个体样本的变异性等多种因素；一般推荐至少采用 10 个样本。

方法学验证时，筛选试验、确证试验中采用至少 10 个空白个体基质在空白水平、低浓度阳性对照水平考察选择性，确保至少 80% 个体的选择性考察结果符合方法学验证的预期接受标准。有些情况下，需考察溶血或高脂对样本检测的影响。

8. 钩状效应

钩状效应是指由于存在高浓度的特异性的被分析物或

者抗体，出现信号值减少，从而可能导致假阴性信号。非临床研究和临床研究中，应考察是否出现钩状效应。一般，通过在混合基质中加入阳性对照抗体进行一系列稀释的方法来进行评估。

9.其他验证内容

在某些特定条件下尚需对试验的重现性、稳健性、稳定性进行验证。

9.1 重现性

如果在研究期间样本由两个或多个独立实验室进行检测，重现性是重要的考量因素，应保证不同实验室产生的数据具有可比性。应在实验室之间建立可比较的方法性能，包括临界值，灵敏度，药物耐受性，精密度等。

9.2 稳健性和稳定性

方法稳健性表明了检测方法在正常使用期间的可靠性，应不受方法中微小调整及仪器性能的影响。生物学分析方法的复杂性使其特别容易受到检测条件变化的影响，因此评估和优化细胞传代数、孵育时间和培养基成分等参数至关重要。应该在开发阶段检测方法稳健性，如果分析中特定步骤中的微小变化影响结果，则应该采取预防措施来控制该步骤。

样品稳定性有时也需要进行验证。由于考察受试者样本的稳定性通常是不可行的，因此建议保存受试者样本的方式与保存阳性抗体的方式一致。可通过对受试者的样本适当分

装来减少冻融循环。评估短期稳定性的研究，包括冻融循环和阳性对照样品在冰箱中和室温条件下的稳定性，是有意义的。

（三）体外细胞因子释放试验

细胞因子释放综合征为免疫细胞过度活化，促炎性因子快速释放而导致的一组临床综合症，是免疫调节类药物普遍的不良反应。对于免疫调节类药物，完整的非临床评价需要整合所有可用的体内和体外试验数据。除了在常规的动物体内毒性试验中进行细胞因子相关检测外，还应进行体外细胞因子释放试验。采用人全血或人外周血单个核细胞体外评价细胞活化和细胞因子的释放，可在一定程度上弥补因种属差异导致的动物模型无法完全模拟人体免疫激发过程的缺陷。当体内试验结果为阴性时，体外试验阳性结果可以提示潜在临床安全风险。建议基于细胞因子释放机制设计合适的体外细胞因子释放试验。通常应考虑采用液相和固相两种孵育系统。如果药物直接靶向免疫细胞，可采用外周血单个核细胞进行试验。如果机制可能与 **FcγRs** 结合相关，则更适合在包含表达 **FcγRs** 的细胞的全血中进行试验。如果靶抗原仅在疾病状态表达，或者机制涉及在全血或外周血单个核细胞中不存在的细胞类型，可以考虑在检测系统中引入肿瘤细胞、成纤维细胞、内皮细胞等细胞系或原代细胞。体外细胞因子释放试验应设置阳性对照和阴性对照，阳性对照应采用在测试

体系中细胞因子释放明显的已知药物，应优先考虑与受试药物细胞因子释放的预期机制类似者。细胞因子的检测项目应与受试药物临床安全性考虑密切相关，一般情况下，观察指标包括但不限于 IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 。