目 录

[一、概述 1](#_Toc48833477)

[二、免疫原性研究内容 2](#_Toc48833478)

[三、抗药抗体检测 4](#_Toc48833479)

[（一）试验设计考虑 4](#_Toc48833480)

[（二）方法学开发与验证 7](#_Toc48833484)

[（三）试验内容 7](#_Toc48833485)

[四、附录 14](#_Toc48833490)

[（一）免疫原性多层级检测策略示意图 14](#_Toc48833491)

[（二）抗药抗体检测方法的开发与验证 15](#_Toc48833492)

[（三）体外细胞因子释放试验 26](#_Toc48833502)

药物免疫原性研究技术指导原则

# 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，对患者的安全性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。建议在药物开发的全生命周期中始终关注免疫原性研究，应基于药物作用机制，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在临床研发中观察到的免疫原性的不良影响。

本指导原则适用于蛋白质、多肽及其衍生物，以及含有此类组分的药物，例如偶联药物。

# 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，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进行表征，如同种型和IgG亚型或者与相关内源性蛋白的交叉反应。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。这些研究有助于制定和实施控制和缓解策略，包括修改产品处方和筛查高风险患者。

大多数情况下治疗性蛋白药物具有种属差异，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。免疫原性相关的反应可导致非临床研究结果复杂化、并难以解释，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。除了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了解，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，如果缺乏足够的认知，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。

生物类似药需要进行免疫原性比较试验, 生物类似药和参比制剂应采用同样的测定条件和采样计划，需符合现行的所有标准。分析方法最好能同时检测生物类似药和参比制剂的抗药抗体，至少应能检测到针对生物类似药的所有抗药抗体。通常，应对抗药抗体生成和性质（如，交叉反应，靶抗原表位和中和活性）以及抗体滴度进行检测和描述，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，应优先选择变更前后药品的头对头试验。

免疫原性研究涉及多学科，免疫原性相关数据分散在上市申请的多个部分。建议提交免疫原性综合概述，可将其放于CTD2.7.2.4的特殊研究中，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。应在临床试验开展之前选择和/或开发用于评估免疫原性检测方法和检测策略。考虑到与临床安全性和疗效的相关性，对免疫原性的检测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、且前瞻性地设计和计划，以保证临床评价开始之前所有关键程序都准确到位。这包括分析方法的选择、评价、特征分析、合适的采样点（包含能够确定预存抗体的基线样品）、充足的采样体积、样品采集的流程及储存方法、以及分析数据选用的统计学方法。

（一）试验设计考虑

1. 检测策略

抗药抗体的检测通常应采用一种多层级分析方法，首先对所有样品进行筛选试验，其次对疑似抗体阳性样品的特异性进行确证试验，对已确定抗体阳性的样品进行滴度试验，以及通过功能性试验对抗体中和活性进行检测。其中在已确定抗体阳性的样品中，有时还应考虑确定抗体同种型、亚型和结合表位的检测。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，用于检测所有与药物结合的抗体。确证试验用于确定药物结合抗体的特异性。滴度和中和抗体试验用于进一步分析抗药抗体。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，这些信息比抗药抗体阳性率信息更为重要。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表现决定是否需要进行除抗药抗体阳性率以外的研究确证。

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评价也具有重要的作用。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）同型抗体，但筛选试验无需进行同型抗体的进一步确定。在某些情况下，应该建立可区分同型抗体的分析方法。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。因此，根据临床需要，可能需要评估特定的同型或亚型。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质的交叉反应性。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，那么为了了解抗药抗体是否影响蛋白家族中其它蛋白时，往往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、抗体偶联药物和双特异性抗体，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，对确证为阳性的样本进一步进行域特异性评价。

2. 分析方法的选择

对于抗药抗体检测可以采用不同的方法和仪器，包含但不局限于以下这些：直接法，桥联法和均相结合法。每种分析方法均有其优点和不足，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、检测快速游离出的抗体的能力（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游离出的抗体的能力。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品未被检出的情况。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许多试剂可以是标准化的或从商业来源获得，例如，市售试剂。然而，特定方法可能需要其他特定试剂，包括阳性对照抗体、阴性对照和系统适用性对照。在方法设计中需要对所用到的试剂进行合适的选择。根据所选择的检测方法选择合适的检测试剂。通过试剂的选择来最小化非特异性信号并维持足够的灵敏度。阳性对照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。对于大多数治疗性蛋白产品，在药品开发的早期阶段（如非临床、临床I期和II期），主要涉及临界值、灵敏度，选择性和精密度，而弱化稳健性、重复性和稳定性。对于高风险产品，可能需要在临床研究之前就进行全面验证。对于关键性临床试验以及上市后研究，抗药抗体检测方法需进行全面的方法学验证。药物开发全生命周期中，有可能会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，需要增加额外的验证内容。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。所采用的检测方法应该具有较高灵敏度，能够同时检测出样本中各种类型的低亲和力和高亲和力的抗药抗体。该方法应具有一定的假阳性率（通常为5%），以增大真实阳性样本的检出率；但不期望出现假阴性。

方法建立时应尽可能地选择与待测样本相同或相近的自然样本群。所选择的方法应根据需求进行优化。样本（通常是血清或血浆）中含有可能影响检测的成分，可导致假阳性或假阴性结果的产生和/或对抗体含量的错误评估。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。应采用经证实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数量降低。这种干扰分析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、延长孵育时间和/或使用允许充分稀释样本的方法。在某些情况下，可通过调整给药间隔和抗体采样时间来降低残留药物的干扰。但该方法必须不能显著地影响抗体的检测或患者的治疗。在任何情况下，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(一般为药物的谷浓度)。

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，需进一步进行确证试验以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，但需要注意的是，两个试验的假阳性率不同，且确证试验有更高的特异性，并至少具有与筛选试验相当的选择性以识别假阳性样本。通常情况下，确证试验会选择与筛选试验相同的方法与平台，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分子，随后同时检测加入药物分子和未加入药物分子样本的信号值，若样本中含有抗药抗体，游离的药物分子将竞争结合抗药抗体，从而造成检出的信号值下降。也可采用与筛选试验不同的方法与平台进行确证试验，这种情况下，两种方法的灵敏度都需要用质量单位确定，并使用系统适用性对照，确保方法的灵敏度。

若选择竞争性抑制方法，则建议使用抗体阴性、未给予治疗性蛋白的受试者的样本，加入抑制剂（通常是治疗性蛋白）后，所产生的信号的数据来确定临界值。在这种情况下，用于测定临界值的治疗性蛋白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。在这种情况下，建议从临界值的评估中找出疑似阳性结果并予以剔除。在特殊情况下，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，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）。在这种情况下，应开发并验证针对样本中杂质诱导产生抗体的检测方法。

3. 滴度试验

滴度定义为样品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。

通常情况下，沿用筛选临界值作为滴度临界值。但当存在预存抗药抗体时，则应根据给药后滴度的提升判断经治疗后抗药抗体的升高。可使用给药后增强的信号值作为临界值。例如，当使用两倍的稀释倍数进行滴度测定时，可采用高于给药前信号值的两倍滴度作为临界值。如果滴度采用临界值进行滴度曲线回算得到，治疗引起的免疫原性反应应结合方法变异进行确定。

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/配体结合的作用，从而干扰药物的体内活性。

中和活性检测方法的分析模式的选择需要基于多种因素进行考虑，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。对分析模式进行选择时，建议将测定方法与药物体内作用机制的相关性作为首要考虑因素。通常建议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、灵敏度等难以满足中和抗体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或/和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当局沟通交流。

采用基于细胞法的中和活性检测方法，通常是在产品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，应对基质效应、药物浓度、配体浓度等予以考察，并对临界值、精密度、选择性、灵敏度等进行验证。中和活性分析方法一般不具有很好的药物耐受，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治疗性蛋白药物。因此，应对治疗性蛋白药物的浓度进行筛选，使其对细胞的效应对中和作用足够灵敏。如果治疗性蛋白药物的浓度在反应曲线的下半部分，可能没有足够的动态范围响应以达到中和效果。如果试验是在接近剂量-反应曲线的平台浓度下进行，对于中和抗体含量低的样本，可能鉴别不出阳性结果。建议治疗性蛋白药物浓度应在曲线的线性范围下进行中和反应试验。

样品基质可干扰中和反应试验，特别是基质组分，在基于细胞的检测中可能增强或抑制药物的活性。例如，来自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，增加对原有刺激因子或药物的应答，从而掩盖中和抗体的检测。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。

与所有试验一样，中和活性试验需采用来自未给药受试者的样本，通过试验变异性来确定临界值。如果对在筛选和确证试验中检测为阳性的样品进行中和活性测定，通常采用1%的假阳性率。在极少数情况下，当使用中和活性筛选试验时，应使用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的临界值的方法。通常，中和活性试验采用固定临界值，基于药物作用的机制可采用信号抑制或刺激阈值百分比来表示，也可使用浮动临界值。

中和反应试验一般仅对抗原特异性抗药抗体进行检测，通常不需要特异性验证。由于生物活性检测具有一定的复杂性，在某些情况下，为确定受试者是否已经产生了真正的中和抗体，进行特异性确证具有一定作用。应该考虑以下方面：（1）不相关的抑制分子可能引起中和活性，有时并不清楚所观察到的中和活性是由中和抗体或是其他抑制分子导致。对给药前样本进行检测是有意义的。若担心存在非特异性抑制，应进行抗体竞争试验评估中和活性是否确实由抗药抗体引起，而不是由其他抑制性分子导致。（2）除了治疗性蛋白药物，细胞系可能对多种刺激产生应答。在这种情况下，可在治疗性蛋白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，而不会阻断其它刺激引起的应答。（3）基质含有的可溶性受体或内源性药物类似物可能会导致错误结果的产生。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。

四、附录

（一）免疫原性多层级检测策略示意图



（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，选择合适的阳性抗体对抗药抗体检测方法学的开发和验证是非常关键的。

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，则建议优先采用。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，应与监管机构讨论以何种替代手段进行方法学开发和验证。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类限制，但应注意IgG4亚类不适用。

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，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样品，以考察能否满足检测较宽抗药抗体浓度范围的需要。在常规方法学评价与监测时，可只使用高、低浓度质控样本，而不使用中浓度质控样本。应制备低、中、高浓度阳性对照样品，进行系统适用性考察。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。在临床研究中，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。中浓度阳性对照应选择标准曲线中段浓度点。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。

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。阴性对照为来自多个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，但应在获得与待测样本相同的未给药群体的基质后，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上述因素。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，从科学和生物统计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。临床研究中至少对分析人员、日期、仪器、固相载体等进行考察，临床前至少考察两个实验变量，分析时各样本均设置复孔。

在进行筛选临界值计算时，如果采用参数方法，需首先对响应值（或基于阴性对照校正后的数值）进行正态分布评估，若为非正态，应将数据进行对数转换（或其他形式的转换）；然后进行离群值判断，各分析批内的分析离群值和生物离群值不参与计算，将离群值剔除后的所有个体用于筛选临界值的计算。如采用非参数法，无需进行数据正态分布评估和数据转换，但仍需剔除异常值。非临床研究中，筛选临界值的确定应基于在至少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）进行的统计分析结果。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。建议采用空白个体95%百分位数的单侧90%置信区间下限计算筛选临界值。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，如使用中位数及中位数的绝对偏差代替均值与标准差，但应说明计算方法选择的依据。

不同批次间，阴性对照样品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时，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，该临界值可直接用于研究中的检测。这就是所谓的固定临界值。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。这就是动态临界值。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品。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“潜在阳性”的样本可能是非特异性的，需进一步通过确认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，选择信号抑制率的99%分位数的80%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。

4. 灵敏度

方法灵敏度是指阳性对照样本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的灵敏度。值得注意的是，方法灵敏度是通过阳性对照抗体建立的，可能不能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，该抗体可能会使灵敏度被高估。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

确定方法灵敏度通常有两种方法。一种方法是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，在至少满足一个浓度的响应值低于筛选临界值的情况下，高于筛选临界值的最低浓度即为方法灵敏度；另一种方法是使用混合空白生物基质稀释阳性对照样品至系列已知浓度，对各浓度的响应值和浓度进行曲线拟合，根据筛选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的阳性对照抗体，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应至少达到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100 ng/mL也是可以接受的；有文献报道，低至100 ng/mL的抗药抗体水平也会与临床反应相关，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。值得注意的是，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；但方法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样本（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）混合后进行检测。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。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本对药物的耐受特性，由于阳性对照抗体样本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量。如对于不耐酸的抗体或可溶性靶点，酸解离可能并不适用。可通过采集当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和确证试验精密度。

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；非临床至少纳入2个变量，临床至少会纳入4个变量。

批内精密度来源于一个含至少6套独立配制的系统适用性对照样品的分析批数据，其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)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，其不宜高于20%。批间精密度通过所有可报道的验证分析批系统适用性样品(阴性对照、低浓度阳性对照、高浓度阳性对照)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，其不宜高于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。

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因子（如类风湿因子、脂质和血红蛋白等）、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受试物相关物质的高浓度和低浓度阳性对照样本进行特异性考察。所有阴性对照样本响应值或其转换值应小于筛选临界值；80%阳性对照样本响应值或其转换值应不小于筛选临界值且满足精密度要求。

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，从而导致阳性样本无法被正常检出。

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。建议通过对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，或者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，采用至少10个空白个体基质，2个浓度水平的阳性对照样本考察选择性，并设置不添加阳性对照抗体的空白基质对照。要求所有空白基质对照的响应值或其转换值均应小于筛选临界值；至少80%的空白基质配制的阳性对照样本的响应值或其转换值高于筛选临界值且满足精密度要求。

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重复性、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会由两个或多个独立实验室进行检测，重现性则是一个重要的考量因素，并且应保证不同实验室产生的数据的可比性。应在实验室之间建立可比较的方法性能，包括灵敏度，药物耐受性和精密度。

#### 9.2 稳健性和样品稳定性

方法稳健性表明了试验在正常使用期间的可靠性，应不受方法中有意的微小变化及仪器性能的的影响，这些变化是模拟在日常实验室实际操作中可能遇到的情况。例如，温度、孵育时间的变化都会影响测定结果。生物学分析方法的复杂性使其特别容易受到测定条件变化的影响，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包括在验证中。由于考察受试者样本的稳定性通常是不可行的，建议在测试时采用和保留阳性抗体活性方式一致的方式存储受试者样本。建议通过对受试者的样本适当分装来减少冻融循环，因为这些样本的冻融可能影响检测结果。评估短期稳定性的研究，包括相关的冻融循环和阳性对照抗体的冰箱中和室温条件下的稳定性，可能是有用的。

（三）体外细胞因子释放试验

细胞因子释放综合征为靶向免疫细胞过度活化，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。采用人全血细胞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帮助克服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。当体内试验结果阴性时，体外试验结果阳性可以作为潜在临床毒性风险的提示。建议基于细胞因子释放机制进行适合的体外细胞因子释放试验设计。通常应考虑采用液相和固相两种孵育系统。如果直接靶向T细胞的单抗或者靶聚集可能参与细胞因子释放，可仅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的细胞的全血细胞中进行试验，试验中应考虑加入补体。如果靶抗原仅在疾病状态（例如在肿瘤细胞或活化的效应细胞或自发致病性细胞上）表达，或者细胞因子释放机制涉及在全血或者外周血单个核细胞中不存在的细胞类型之间的相互作用，可以考虑在检测系统中引入诸如肿瘤细胞、成纤维细胞、内皮细胞或在活化时过度表达靶标的细胞系或原代细胞。体外细胞因子释放试验应设置阳性对照和阴性对照的分析，阳性对照应为在测试体系中细胞因子释放明显的已知药物，与受试药细胞因子释放的预期机制类似者优选。细胞因子的检测项目应与受试药临床安全性考虑密切相关，一般情况下，无论采用哪种方法，IL-2、IL-8、IL-6、IFN-γ和TNF-α是基本的观察指标。