
行业指导原则

治疗性蛋白质制品免疫原性的评估

美国卫生与公众服务部
食品药品监督管理局
药品审评和研究中心 (CDER)
生物制品评价和研究中心 (CBER)

2014年8月
临床/医学

行业指导原则

治疗性蛋白质制品免疫原性的评估

如需副本，请联系：

药品信息处对外信息办公室，WO51, Room 2201

药品评价和研究中心

美国食品药品监督管理局10903 New Hampshire Ave., Silver Spring, MD 20993

电话：301-796-3400；传真：301-847-8714

druginfo@fda.hhs.gov

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

和/或

对外信息、外联和发展办公室

生物制品评价和研究中心

美国食品药品监督管理局

10903 New Hampshire Avenue, WO 71, Room 3128

Silver Spring, MD 20993-0002

电话：800-835-4709或240-402-7800

ocod@fda.hhs.gov <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

美国卫生与公众服务部

食品药品监督管理局

药品审评和研究中心（CDER）

生物制品评价和研究中心（CBER）

2014年8月

临床/医学

目录

I.	引言	1
II.	背景	2
III.	临床后果	3
	A. 有效性后果	3
	B. 安全性后果	3
IV.	关于治疗性蛋白制品临床开发阶段中免疫原性风险缓解的建议	6
V.	影响免疫原性的患者特异性和产品特异性因素	9
	A. 影响免疫原性的患者特异性因素	9
	1. 患者的免疫状态和免疫能力	9
	2. 既往致敏/过敏史	10
	3. 给药途径、剂量和给药频率	10
	4. 遗传状态	11
	5. 对内源性蛋白的免疫耐受状态	11
	B. 影响免疫原性的产品特异性因素	12
	1. 产品来源（外源性或人体）	13
	2. 一级分子结构/翻译后修饰	14
	3. 四级结构：产品聚集体和聚集体测定	15
	4. 糖基化/聚乙二醇化	17
	5. 具有佐剂活性的杂质	18
	6. 治疗性蛋白制品的免疫调节特性	18
	7. 制剂	19
	8. 容器密闭系统考虑	19
	9. 产品保管	21
VI.	结论	22
	参考文献	23
	附录A	31
	1. 过敏反应的诊断	31
	2. 细胞因子释放综合征	32
	3. 非急性免疫应答	33
	4. 治疗性蛋白制品的抗体应答	33
	5. 动物研究的效用	35
	6. 比较性免疫原性研究	36

行业指导原则¹

治疗性蛋白制品免疫原性的评估

本指南代表食品药品监督管理局（FDA）关于这一主题的最新见解。本指南不为任何人建立或赋予任何权利，也不对FDA或公众具有约束力。如果其他方法能够满足适用法律、法规的要求，您可以使用其他方法。如果您希望就一种替代方法进行讨论，请与负责执行本指南的FDA工作人员联系。如果您不能确定相应的FDA工作人员，请拨打本指南标题页所列的相应电话号码。

I. 引言

本指导原则旨在帮助参与人用治疗性蛋白制品开发的生产商和临床研究者。²在本文件中，FDA概述并建议采用基于风险的方法来评价和减轻对治疗性蛋白制品的免疫应答或影响其安全性和有效性的、与治疗性蛋白制品相关的不良免疫相关反应。用于评估和减轻免疫原性的任何给定方法均是具体情况逐案确定的，应考虑到我们所描述的风险评估。鉴于本指导原则的目的，免疫原性被定义为治疗性蛋白制品对自身及相关蛋白产生免疫应答或诱导免疫相关不良临床事件的倾向性。

本指导原则描述了对治疗性蛋白制品的免疫应答的主要临床后果，并提供了关于临床开发阶段中风险缓解的建议。它也描述了可以影响治疗性蛋白制品的免疫原性的产品特定因素和患者特定因素。对于每种因素，向申办者和研究者提供了可以帮助他们降低这些产品产生免疫应答的可能性的建议。附录A提供了关于对治疗性蛋白制品的免疫应答的特定不良后果的诊断和病理生理学的补充信息，以及动物研究用途的简要讨论和比较性免疫原性研究的进行。虽然本指导原则侧重于治疗性蛋白制品，科学原理也可以适用于相关产品和生物实体，例如肽。虽然本指导原则包括用于调节或修饰免疫系统的产品，包括那些具有抗原特异性的产品，但是它不包括旨在诱导特异性免疫应答以防止或治疗疾病或病症（如预防感染疾病的疫苗）或以提高其他治疗性干预的活性的产品。本指导原则不涉及检测法开发，这将包括在单独的指导原则中。³

¹ 参见草案行业指南治疗性蛋白免疫原性检测的检测法开发。最终定稿后，本指南代表FDA目前关于该问题的想法。

² 关于FDA对于公共卫生服务法案（PHS法案）章节351(i)(1)中“生物制品”修订定义中“蛋白（除了任何化学合成多肽）”的类别解释，参见草案指南生物仿制药：关于2009年生物制品价格竞争与创新法案执行情况的问答。最终定稿后，本指南代表FDA目前关于该问题的想法。我们定期更新指南。为了确保您拥有最新版本的指南，检查FDA药物指南网页<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>。

³ 参见草案行业指南治疗性蛋白免疫原性检测的检测法开发。最终定稿后，本指南代表FDA目前关于该问题的想法。

含有非约束性的建议

FDA的指导原则（包括本指导原则在内）不构成有强制力的法律责任。相反，指导原则描述的是FDA当前关于某问题的想法，仅作为建议，除非引用特定的法规或法令要求。FDA指导原则中出现的“应（当）”的词义是指建议或推荐，而非要求。

II. 背景

对治疗性蛋白制品的免疫应答可能为患者安全性和产品有效性带来问题。基于免疫学的不良事件，如过敏反应、细胞因子释放综合征和内源性蛋白介导关键功能的交叉反应性中和（参见附录A.3），已造成申办者终止否则可能是有效治疗性蛋白制品的开发。对治疗性蛋白制品的不良免疫应答也可以中和其生物活性，并导致不良事件，不仅通过抑制治疗性蛋白制品的有效性，而且通过与内源性蛋白配对物产生交叉反应，从而导致其生理功能丧失（例如，治疗性促红细胞生成素中和性抗体也通过中和内源性蛋白引起纯红细胞再生障碍）（Hermeling et al.2004; Rosenberg and Worobec 2004; Rosenberg and Worobec 2005; Koren et al.2008; Murphy 2011）。因为大多数由对治疗性蛋白质制品的免疫应答造成的不良作用似乎是由体液机制介导的，治疗性蛋白制品循环抗体一直是定义这类产品的免疫应答的主要标准。⁴

患者特定因素和产品特定因素均可能影响治疗性蛋白制品的免疫原性。这些因素是免疫原性风险评估的关键要素。理想的情况下，应该在治疗性蛋白制品开发的早期阶段考虑这些因素。章节III包含对治疗性蛋白制品的免疫应答的性质和风险因素以及可以使用的可能缓解策略的详细讨论。

⁴ IgG和IgE抗体应答大多数通常与临床不良事件相关，并且它们的产生一般需要抗原特异性T辅助细胞和B细胞的协作。Murphy, K. (2011). The Humoral Immune Response. Janeway's Immunobiology. New York, Garland Science Publishing. 8th: 367-408.

III. 临床后果

患者用治疗性蛋白制品治疗可能导致具有不同临床相关性的免疫应答，包括从没有明显临床表现的抗体反应到危及生命的和灾难性反应。在治疗性蛋白制品的开发期间，鼓励澄清免疫相关不良事件的特定潜在免疫学机制，因为这些信息可以促进开发帮助减轻免疫相关不良事件风险的策略（参见章节III.B.1-5）。进行风险获益评估所需要的信息范围在不同单个产品中各不相同，这取决于产品来源和特性、所关注的免疫应答、目标疾病指征以及拟定患者人群。

A. 有效性后果

抗体的形成可能会限制用治疗性蛋白制品治疗的患者中产品有效性。中和性抗体可以通过产生有效性的关键特异性靶结构域阻断治疗性蛋白制品的有效性。例如，抗体与治疗性酶的任一摄取或催化结构域结合可能导致产品有效性丧失。有效性丧失是所有产品的共同问题，并且如果该产品是一种救命性治疗产品，需要高度关注。与治疗性蛋白制品的非冗余内源性配对物交叉反应的中和性抗体还可以影响安全性，正如章节III.B中讨论的。中和性抗体及非中和性抗体均可改变产品的药物动力学，通过增强清除率（和由此缩短血清半衰期），或者相反地，通过延长血清半衰期和产品活性。如果存在足够高的滴度，非中和性抗体可能误定位治疗性蛋白制品为荷Fc受体（FcR）细胞，从而降低或消除产品有效性（Brooks et al.1998; Wang et al.2008）。此外，虽然对治疗性蛋白制品的一些抗体应答可能对临床安全性或有效性没有明显的影响，但是它们可能通过抗体应答的表位扩展机制促进中和性抗体的产生（Disis et al.2004; Hintermann et al.2011）。药效学生物标志物在产品活性的抗体介导干扰评估中可能是有用的，虽然与临床反应的相关性通常是确定临床相关性所必需的。

B. 安全性后果

免疫原性的安全性后果可广泛地变化，并且在接受治疗性蛋白制品给药的患者中通常是不可预知的。因此，应可能来源于此类反应的临床事件保持高度怀疑，即使初始风险评估显示免疫原性的风险较低。申请者应提供拟定免疫原性检测模式的原理，基于产品特定问题和患者特定问题。下面的章节描述一些与免疫原性相关的主要安全性问题：

含有非约束性的建议

1. 过敏反应

过敏反应是一种严重的、急性过敏反应，特点是有一定的临床特点。目前FDA接受的定义依赖于临床诊断标准，并且没有指定特定的免疫机制（Sampson et al.2006）（同样参见附录A.1）。从历史上看，过敏反应的定义援引特异性IgE抗体的参与。然而，这样一种机制性定义在治疗性蛋白制品开发和其它临床环境（其中可能并不总是能够识别特定的免疫机制作为不良事件的基础）中可能是有问题的。为了捕获所有关注的潜在不良事件，FDA建议确定符合过敏反应的临床诊断标准的所有病例，无论假定的病理生理学。额外信息，如反应后血清组胺、类胰蛋白酶血清和补体成分的评估或产品特定IgE抗体的检测，可能有助于阐明过敏反应的病理生理学并因此引导控制和缓解策略。

此外，抗药抗体（ADA）单独存在不一定预测过敏反应或其他超敏反应。与临床反应的相关性通常是确定这些抗体的临床相关性所必需的。然而，基本机制的确定仍然受到关注，由于确认IgE参与的过敏反应对反复暴露和用于缓解的潜在治疗选项具有某些预后意义。

2. 细胞因子释放综合征

细胞因子释放综合征是由靶免疫细胞快速释放促炎细胞因子引起的一种综合征（Stebbins et al.2007; Stebbins et al.2013）。虽然细胞因子释放综合征与免疫原性不直接相关，但是细胞因子释放综合征的临床表现与过敏反应和其它免疫相关不良反应的临床表现重叠。区分这种综合征与这些其他类型的不良反应对降低风险可能是有用的。虽然基本机制可能不被充分地理解，但是在某些情况下，该机制似乎涉及活化细胞表面表达受体的交联，其中活化细胞表面表达受体是治疗性蛋白制品的靶标（例如，T细胞上表达的CD28）。应进行侧重于治疗性蛋白制品的作用机制以及动物和体外评价结果的基于风险的评价，以便在临床开发的早期阶段中确定是否需要收集给药前和给药后细胞因子水平。如果发生临床不良事件，此类评价可以提供证据支持细胞因子释放综合征的临床诊断并帮助区分细胞因子释放综合征与其他急性药物反应（例如，过敏反应，参见附录A.2）。

3. “输液反应”

治疗性蛋白质制品可以引起一系列的急性作用，从不适症状到突然、致命性反应，在过去常常被归类为“输液反应”。尽管该术语暗示着一定的时间关系，但是输液反应并没有以其他方式明确定义，可以包括各种临床事件，包括过敏反应和与抗体反应可能不直接相关的其他事件，如细胞因子释放综合征。由于没有意见一致的输注反应定义，某些不良事件（如没有进一步详情的输液反应）的分类是有问题的，因此不推荐。鼓励申办者在可能时使用更多的描述性术语（注意到时间、持续时间以及在治疗性蛋白质制品给药后观察到的特定症状和体征）以及提供可促进缓解策略的机制性研究的数据。

4. 非急性反应

过敏反应、细胞因子释放综合征以及其他急性反应在时间上与治疗性蛋白制品给药相关。。迟发型超敏反应（即，血清病）和继发于免疫复合物形成的免疫应答通常具有亚急性的表现。因此，治疗性蛋白质制品给药和非急性反应之间的关联可能更难以建立，基本机制的评估将很可能需要循环免疫复合物和补体激活的评价。对于对治疗性蛋白制品的正在进行的抗体应答，临床体征可能包括延迟性发热、皮疹、关节痛、肌痛、血尿、蛋白尿、浆膜炎、中枢神经系统并发症和溶血性贫血（Hunley et al.2004; Goto et al.2009）。当怀疑是此类反应时，循环免疫复合物的实验室评估可能有助于明确诊断。实验室评估的必要性和详细信息将取决于个体情况，并应与治疗性蛋白制品的相应审查部门进行讨论。

5. 对内源性蛋白的交叉反应性

ADA可能有严重的后果，如果它与治疗性蛋白制品或相关蛋白交叉反应，并抑制治疗性蛋白制品或相关蛋白的非冗余内源性配对物（Macdougall et al.2012; Seidl et al.2012）。如果内源性蛋白具有冗余生物学功能，抑制治疗性蛋白和内源性蛋白可能不会产生明显的临床综合征，直到系统受到抑制，因为内源性蛋白并非所有的生物学功能均是已知的或完全表征的（Stanley et al.1994; Bukhari et al.2011）。此外，此类抗体的长期后果可能是未知的。对内源性蛋白的交叉反应性的额外潜在后果是由对治疗性蛋白制品（作为内源性细胞表面受体的一种配对物或膜表达内源性细胞因子的一种配对物）的抗体应答造成的。此类抗体会与相应的细胞表面受体或蛋白产生交叉反应性结合，引起细胞因子释放或细胞激活的其他表现。

对于对正常胎儿或新生儿发育至关重要的内源性蛋白的治疗性蛋白制品配对物，此类内源性蛋白的中和，由与内源性配对物交叉反应的治疗性蛋白制品的抗体造成的，有可能对使胎儿或新生儿发育产生不利影响，当这些免疫应答在妊娠或哺乳期间产生或增强时。作为风险评价的一部分，申办者应考虑抗体通过胎盘向胎儿或通过母乳向发育中新生儿的潜在传输。因此，鉴于潜在获益，应重点考虑育龄妇女接受此类治疗性蛋白制品给药后中和性抗体产生的风险。此外，应该在儿科人群的研究中对新生儿期后生长和发育至关重要的内源性蛋白的中和性抗体产生风险进行评价。

含有非约束性的建议

尽管动物研究可以提供关于内源性蛋白（特别是在进化上高度保守的内源性蛋白）抑制的可能后果的有用信息，但是此类研究不被认为可预测人类中对治疗性蛋白制品的免疫应答。此外，母体抗体的胎盘转移的时间和程度差异可能会限制动物研究用于评估对治疗性蛋白制品内源性配对物的交叉反应性抗体的子宫内影响。

IV. 关于治疗性蛋白制品临床开发阶段中免疫原性风险缓解的建议

鉴于可能影响免疫原性的多种因素，风险评估以及控制和缓解策略将取决于单个开发项目，并应在最早阶段和产品开发的各个后续阶段加以考虑。上市前和上市后所需要的免疫原性安全性信息范围将有所不同，这取决于此类免疫应答后果的潜在严重性及其发生的可能性。

在评价免疫应答的临床相关性方面，FDA提出了以下建议：

抗药抗体（ADA）检测法的开发

- 申办者应开发并实施与总体产品开发项目相称的灵敏免疫检测法。⁵ 建议对样品中治疗性蛋白制品水平进行伴随评估，以评估治疗性蛋白制品存在干扰检测法中抗体检测的潜力。

产品特定抗体采样考虑要点

- 应采集用于ADA检测的基线样品，基线后采样频率和持续时间应反映产品的预期使用。在新的长期给药产品的开始和早期使用过程中更频繁的采样是适当的；长期使用后较不频繁的采样可能是适当的。在足够的时间周期内一般应进行重复采样，以确定这些反应是否是持久的、中和性的以及是否与临床后遗症相关。应在治疗性蛋白制品给药前采集用于抗体评估的样品。

⁵ 参见草案行业指南治疗性蛋白免疫原性检测的检测法开发，其中包含有检测法开发的详细信息。最终定稿后，本指南代表FDA目前关于该问题的想法。关于免疫原性检测的适当检测法开发指南也可在ICH行业指南Q2A分析方法验证正文Q2B分析方法验证：方法学中获得。

含有非约束性的建议

- 除了预先规定的采样时间表外，需要由疑似免疫相关不良事件触发的计划外采样来确立ADA的临床相关性。研究结束时样品检测呈阳性抗体的患者的未来采样考虑要点应与治疗性蛋白制品的相应审评部门进行讨论。知情同意应说明研究终止后采样的可能性。
- 建议始终将来自临床试验的血清样品在适当的储存条件下建库用于未来的检测。

给药

- 对于首次应用于人体的试验，如果发生严重不良事件，例如过敏反应，应在可获得即时支持治疗的适当医疗环境中采取保守方法。不同个体患者和给药队列之间交错剂量给药是适当的。试验设计应该包括不同给药队列之间的预先规定剂量递增标准和足够时间间隔，并在适当时包括同一给药队列中不同个体之间的产品药代动力学和药效学，以评估后续剂量给药前或额外个体治疗前的毒性。是否需要此类方法将取决于个体情况。⁶除了首次应用于人体的试验外，可能有表明需要类似保守方法的其他情况，例如，给药途径变更、处方变更和容器密闭系统变更。随着开发的进行，给药策略和安全参数可根据产品和同类其他产品的临床经验进行修改。
- 因为可能很难预测在不同的临床试验情况中产品特定抗体的发生率，后续研究方案中的给药方案应基于风险，并考虑到以下内容：初步试验的数据；对内源性蛋白的交叉反应性的潜力和预期影响；治疗性蛋白产品的中和作用的严重性（例如，救命性治疗产品与辅助治疗产品）；在不同患者人群中影响免疫原性的临床参数；以及拟定安全性监测是否足够（Koren et al.2008）。

⁶参见行业指南健康成年志愿者首次临床试验药物最大推荐起始剂量的估算。

含有非约束性的建议

- 更高剂量的治疗性蛋白制品并没有一致性地战胜高滴度和/或持续或中和性抗体反应，并可能影响安全性，例如，可能会造成免疫复合物介导疾病或导致其他毒性。此剂量递增策略的适当性将取决于特定产品、抗体反应的程度以及疾病指征。确定特定安全性监测评价和停止规则的方案应在实施前剂量递增克服抗体反应产生前开发。

不良事件

- 中和性抗体活性产生或持续抗体滴度存在可能导致有效性丧失或不良反应的风险增加。为安全起见，在某些高风险的情况下（例如，具有非冗余内源性配对物的产品的评估），建议可在临床试验中对抗体进行实时评估。实时评估意味着在采样后、样品建库前和额外给药前尽快对样品进行分析。是否需要此类密集监测将取决于个体情况。
- 如果观察到临床上相关的免疫应答，鼓励申办者研究基本机制，并确定任何重要影响因素。这些研究可以促进潜在控制和缓解战略的开发和采纳，包括产品处方的修改和高风险患者的筛查（参见章节V）。
- 在某些情况下，申办者可能会选择探索术前用药法、脱敏或免疫耐受诱导疗法作为潜在的缓解策略。考虑到与脱敏/免疫耐受诱导疗法相关的风险以及术前用药法掩盖不良事件的早期体征和症状的潜力，此类方法的适当性取决于特定适应症的性质、目标患者人群和开发阶段。

比较性免疫原性研究

- 对于所有的比较性免疫原性研究（例如，比较免疫相关不良事件、抗体发生率、滴度或中和活性与产品生产前和生产后变更的研究），应提供一个强有力的理由并且在可能时预先规定的标准来证明会构成产品安全性不可接受差异的免疫应答发生率或严重程度差异的合理性。⁷ 应采用相同抗体检测法以确保有效比较（参见附录B）。

⁷ 关于拟定生物仿制药产品的信息，参见草案行业指南证明与参照药具有生物相似性的科学考虑要点。最终定稿后，本指南代表FDA目前关于该问题的想法。

上市后安全性监测

- 强大的上市后安全性监测是保证治疗性蛋白制品的安全性和有效性的重要组成部分。由于上市后安全性监测的某些方面具有产品特异性，FDA鼓励申办者咨询适当的FDA审查部门，讨论申办者的拟定上市后安全性监测方法。罕见的但是潜在的严重、安全性风险（例如，免疫相关不良事件）可能无法在批准前临床检测中检测到，因为暴露人群的规模可能不够大，无法评估罕见事件。在某些情况下，这种风险可能需要通过上市后监测或需要研究或临床试验进行评价。

V. 影响免疫原性的患者特异性和产品特异性因素

A. 影响免疫原性的患者特异性因素

与目标患者人群相关的因素可能增加或减少免疫应答的潜力以及与免疫应答相关的风险。因此，从一个患者人群移动到另一个患者人群时建议谨慎，并应当对考虑进行治疗的每个新的患者人群进行新的风险评估。

1. 患者的免疫状态和免疫能力

与具有完整免疫应答的健康志愿者相比，免疫抑制的患者增加对治疗性蛋白制品的免疫应答的风险较低。例如，具有95%免疫能力的癌症患者中产生了粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）产品的中和性抗体；但仅10%免疫受损的癌症患者对GM-CSF产品产生这样的反应（Ragnhammar et al.1994）。免疫抑制剂可减少对治疗性蛋白质制品的免疫应答。因此，杀死抗原-激活淋巴细胞和/或激发调节性T细胞活性的免疫抑制剂，例如甲氨蝶呤，已显示出对联合给药单克隆抗体或其他抗体产品的免疫原性具有重大影响（Baert et al.2003）。与免疫缺陷患者相反，具有活化免疫系统的患者（例如，有某些感染或自身免疫性疾病的患者）可能具有增强反应。免疫应答的产生也可能受到患者年龄的影响，特别是在年龄范围的极限下（LeMaoult et al.1997; PrabhuDas et al.2011; Cuenca et al.2013; Goronzy and Weyand 2013）。在健康志愿者中评价新型疗法的研究中应特别谨慎免疫原性和免疫应答（Li et al.2001; Stebbings et al.2007; Colombel et al.2010; Garcés et al.2013）。

建议

在治疗性蛋白制品的开发过程中，应该提供理由支持适当研究人群的选择，尤其是对于首次应用于人体的研究。联合用药对ADAS的潜在影响应在临床开发的各个阶段加以考虑。

2. 既往致敏/过敏史

既往暴露于治疗性蛋白制品或结构相似蛋白可能导致在基线时预先存在抗体。这对于接受替换产品的患者特别令人关注，如凝血因子或酶替代治疗，这些患者可以具有既往产品的抗体，这可能与类似产品发生交叉反应。

对治疗性蛋白制品的辅料或工艺/产品相关杂质过敏也可能会使患者产生不良临床后果。例如，利用转基因来源生产的产品可能含有过敏性外源蛋白，如牛奶蛋白或鸡卵蛋白。

因为患者病史可能不会捕获所有可以产生预先存在的抗体反应或预测过敏反应的既往暴露，在适当情况下应考虑对预先存在的抗体进行筛查，例如，因子替代疗法中抑制剂或中和性抗体。

建议

建议筛查涉及治疗性蛋白制品的源材料的相关过敏史（例如，用转基因鸡卵与哺乳动物细胞生产），并且应该根据总体风险获益评估考虑给药之前额外临床或实验室检查是否适当。

3. 给药途径、剂量和给药频率

给药途径可以影响致敏的风险。大体上，与肌内和静脉内（IV）途径相比，皮内、皮下和吸入给药途径与免疫原性增加相关。IV途径通常被认为最有可能引起免疫应答。给药途径、剂量和频率联合也可影响免疫原性（Rosenberg and Worobec 2004）。例如，在某些情况下，较低剂量间歇性给药可能比较大剂量不中断给药更容易产生免疫原性。应当指出的是，剂量和频率对ADA产生的影响可能会受到其他因素的影响，如给药途径、产品来源以及影响免疫原性的产品相关因素。

建议

选择适当的给药途径时，应该考虑免疫原性，特别是高风险治疗性免疫制品（例如，非冗余内源性蛋白的治疗性配对物）首次应用于人体给药时。

产品开发过程中给药途径或给药变更可能与免疫原性特征变化相关联，应获得临床安全性数据来支持此类变更。

4. 遗传状态

遗传因素可能调节对治疗性蛋白质制品的免疫应答。特别是，一些人类白细胞抗原（HLA）单倍型可能导致患者对特定产品产生不良抗体应答（Hoffmann et al.2008）。如果适当且可行，HLA定位研究可帮助限定风险增加的患者群体亚组。此外，细胞因子基因的遗传多态性可能上调或下调免疫应答（Donnelly et al.2011）。

建议

在治疗患者亚组失去治疗临床获益或出现严重不良事件的情况下，建议对可调节对治疗性蛋白制品的免疫应答的遗传因素进行评价。例如，对IFN- β 产品产生中和性抗体的患者亚组更可能具有不同的HLA单倍型（Hoffmann et al.2008）。因此，知道具有这种HLA单倍型的患者的高度易感性可以允许防止此类反应的措施或寻求其他的治疗选项。

5. 对内源性蛋白的免疫耐受状态

人类对所有的内源性蛋白并不是同样免疫耐受。因此，对内源性蛋白的免疫耐受稳健性影响内源性蛋白的治疗性蛋白制品配对物可以破坏这种耐受性的难易程度。蛋白特异性T细胞和B细胞的免疫耐受性取决于很多因素，其中突出的是内源性蛋白的丰度：对低丰度内源性蛋白的免疫耐受性较弱，对高丰度内源性蛋白的免疫耐受性较强（Weigle 1980; Goodnow 1992; Haribhai et al.2003）。

人类的免疫系统不完全耐受低丰度的内源性蛋白质，如细胞因子和生长因子，其血清水平可能在纳克（ng）/毫升（mL）至皮克（pg）/mL的范围内。在健康个体中存在细胞因子和生长因子的自身抗体、产生炎性细胞因子抗体以及外源性重组治疗性蛋白制品给药破坏对内源性蛋白的耐受性强调了这一点（Hermeling et al.2004; Rosenberg and Worobec 2004; Rosenberg and Worobec 2005; Koren et al.2008）。

含有非约束性的建议

当人用治疗性蛋白质制品的目的是作为缺失或缺陷型内源性蛋白的替代时，具有赋予蛋白敲除表型的遗传突变的患者，可能对作为外源性蛋白或新抗原的治疗性蛋白制品产生反应，或由于既往暴露于类似的治疗性蛋白或来自其他来源的相关蛋白可能已经被致敏。此类反应可废除替代疗法的有效性。

建议

对于是一种内源性蛋白配对物的治疗性蛋白制品，应该在开始临床试验前对对内源性蛋白的免疫耐受稳健性进行研究，并且此类评价应考虑以下内容作为最显著的风险：如果临床研究是首次应用于人体，如果内源性蛋白具有非冗余生理功能，以及如果已经在自身免疫性疾病的背景下检测到对内源性蛋白的免疫应答。所建议的评价包括：

- 定量或收集关于在稳态以及在可能特别激发其产生的条件下血清中内源性蛋白水平的信息（Weigle 1980）。
- 评估或收集关于在健康个体和患者群体中预先存在的抗体以及自身免疫性疾病中这些抗体的频率和作用的信息（Bonfield et al.2002; Hellmich et al.2002）。
- 评价相关动物研究中免疫原性、免疫细胞活化、炎症反应和细胞因子释放以获得认识和为临床安全性评估提供指导（Koren 2002）（同样参见附录A.5）。
- 在需要因子/酶替代疗法的患者中，对患者组织样品进行的评价，包括检测内源性蛋白或肽（例如，交叉反应性免疫物质（CRIM））以及遗传突变和HLA等位基因评价（如适用），应强烈考虑到更好地预测对替代治疗的免疫应答产生以及评价是否需要耐受诱导缓解策略（Pandey et al.2013）。
- 评估多态性的程度，包括相关的患者人群中单核苷酸多态性（适当时），以确定与治疗性蛋白制品潜在不匹配（Jefferis and Lefranc 2009; Viel et al.2009; Pandey et al.2013）。

B. 影响免疫原性的产品特异性因素

产品特异性因素可能增加或减少免疫应答的潜力以及与免疫应答相关的风险。当对产品特异性因素进行变更时，应考虑免疫原性检测。

1. 产品来源（外源性或人体）

预期对非人体（即，外源性）蛋白会产生免疫应答，并且如前面所解释的，对内源性人体蛋白可能也会产生免疫应答。此外，由天然存在的多态性所引起的、患者的内源性蛋白序列与治疗性蛋白制品序列之间的不匹配性，是对治疗性蛋白制品产生免疫应答的1种风险因素（Viel et al.2009）。然而，开发的快速性、强度（滴度）和反应的持久性可能取决于许多因素，其中包括以下内容：既往和当前的环境暴露以及这种暴露的模式；产品中存在免疫激发因素，如产品聚集体和具有佐剂活性的物质；以及产品的内在免疫调节活性（参见章节V.B.6）。例如，环境暴露于来自皮肤上或在肠道中共生或致病性细菌的细菌蛋白可能诱发产生免疫应答，当此类细菌蛋白（重组或自然衍生的）用作治疗剂时。

对于来源于天然来源的蛋白，不仅对所需治疗蛋白制品而且对产品中潜在存在的其他外源性蛋白组分会产生抗体。此外，此类外源型蛋白可含有与内源性人体蛋白质同源的结构域。外源性蛋白破坏耐受型并诱导对同源人因子产生抗体应答的能力应在临床试验中进行评价。例如，在用牛凝血酶产品治疗的过程中，对产品中偶然存在的牛凝血因子V的免疫应答，导致产生了与人凝血因子V交叉反应的抗体，并导致部分患者出现危及生命的出血（Kessler and Ortel 2009）。

对于单克隆抗体，产品来源是能够影响免疫原性的一种重要因素。虽然与嵌合型、人源化和人单克隆抗体相比，小鼠抗体已经显示强劲激发人体中的免疫应答，但应注意的是，嵌合型、人源化和人单克隆抗体也可以激发高发生率的免疫原性，这取决于给药方案和患者人群（Singh 2011）。事实上，使用噬菌体展示技术开发的一些人抗体可能具有显著的ADA应答。

此外，新型结构形式，包括融合蛋白、双特异性或多特异性抗体（二价或四价的）、单链片段、单结构域抗体以及专门设计的、在恒定区或可变区具有突变的抗体，可激发免疫应答，因为这种新型结构可能会产生新抗原或暴露隐蔽性表位。此外，恒定区中位点特异性突变可能产生新的同种异型，并且使用体外亲和力和成熟工艺可能会导致新的独特型。对与某些抗体产品相关的免疫原性增加的理解将需要ADA应答的更全面特征，如识别靶表位（Singh 2011）。

建议

应评价所有治疗性蛋白制品中偶然产品组分的含量以及涉及对偶然产品组分的免疫应答，包括蛋白组分和非蛋白组分。应对这类工艺和产品相关杂质的潜在免疫应答进行基于风险的评价，检测项目应根据该评价进行设计。对于旨在用于治疗目的的外源性蛋白，应该评价是否存在与内源性人蛋白具有强同源性的分子区域。当存在此类同源性时，应对同源性人蛋白的抗体进行评估，以评估外源性治疗性蛋白的抗体。

当开发检测法来评估新型抗体相关产品的免疫原性时，应在检测法中纳入适当的控制，以确定是针对新表位是否存在ADA应答。

2. 一级分子结构/翻译后修饰

治疗性蛋白制品的一级序列、高阶结构、物种来源和分子量均是可能促进免疫原性产生的重要因素。一级序列分析可以揭示人和动物之间在其他方面相对保守的蛋白中潜在免疫原性序列的差异。在某些情况下，非人表位可激发T细胞帮助或促进表位扩展，从而对保守人序列产生抗体应答（Dalum et al.1997）。根据章V.A.4，需要重点注意的是，人源性治疗性蛋白制品可能激发具有独特HLA单倍型的患者亚组以及内源性蛋白氨基酸序列与治疗性蛋白制品氨基酸序列不同（即使单核苷酸多态性）的患者产生免疫应答。

一级序列的额外高级分析也可能检测到非多态人蛋白中HLA II类结合表位。此类表位可激发和活化调节性T细胞，其强化自身耐受性，或者，与之相对，当对内源性蛋白的免疫耐受不稳健时，能激活T辅助性（Th）细胞（Barbosa and Celis 2007; Tatarewicz et al.2007; De Groot et al.2008; Weber et al.2009）。然而，如果认为适当，应谨慎进行改变一级序列以消除免疫原性Th细胞表位的工程或添加致耐受性T细胞表位，因为这些修饰可能改变关键产品质量属性，例如聚集体、脱酰胺和氧化，从而改变产品的稳定性和免疫原性。因此，此类变更后，应对关键产品属性进行广泛评价和检测。一级序列方面的考虑在融合蛋白的免疫原性评价中是特别重要的，因为对在连接区内形成的新抗原的免疫应答可能被激发（Miller et al.1999），然后可能扩展到该分子的保守片段。由外源性蛋白和内源性蛋白组成的融合蛋白尤其需要特别关注，因为外源性蛋白激发T细胞促进对内源性蛋白伴侣产生抗体应答的能力。同样地，生物工程化蛋白涉及引入在自然界中通常不会发现的序列，并因此可以包含新表位。这些表位具有广泛激发免疫应答的潜力或可能替代地与仅在一个患者亚组中发现的HLA等位基因相互作用以诱导免疫应答（Kimchi-Sarfaty et al.2013）。

含有非约束性的建议

治疗性蛋白制品的化学修饰，如氧化、脱酰胺、醛基修饰和脱亚氨基，可以激发免疫应答，例如，通过修饰一级序列、引起聚集体形成或改变抗原加工和呈递。重要的是，此类变化在生产和储存过程中可以得到很好的控制，但此类变化也可以在体内发生，在体内环境的相对高pH值范围内或在炎性环境中，并导致活性损失以及激发免疫应答。在体内环境的情况下评价治疗性蛋白制品与其靶标的结合情况可以揭示对此类化学修饰的易感性。

(Huang et al.2005; Demeule et al.2006; Makrygiannakis et al.2006)。对治疗性蛋白制品的化学修饰的易感性，从而活性损失或诱导在体内的免疫应答的可能性，应提示考虑细致的蛋白质工程。

建议

应仔细考虑选择一级序列用于开发一般治疗性蛋白制品并特别是内源性蛋白质的治疗性蛋白配对物，鉴于整个人类群体内源性蛋白的潜在多态性。

对融合分子或工程化版本治疗性蛋白制品的ADA应答应利用能够评估对整个分子以及其独特组分的反应性的检测法。针对完整蛋白制品的免疫应答但不与任一单独伴侣蛋白发生反应，可以靶向于融合区中的新表位。

在其发挥作用的体内环境（例如，在炎性环境中或在生理pH值下）中评价治疗性蛋白质制品，可以揭示对导致有效性丧失或诱导免疫应答的修饰（如，聚合体和脱酰胺）的易感性。此类信息可以促进产品工程化，以提高在此类应激条件下产品的稳定性。申办者应该考虑在产品设计和开发早期获得这些信息。

3. 四级结构：产品聚集体和聚集体测定

蛋白聚集体被定义为任何自相关蛋白种类，其中单体被定义为最小的天然存在和/或功能性亚基。聚集体的进一步分类基于5个特征：大小、可逆性/解离、构象、化学修饰和形态 (Narhi et al.2012)。在半个世纪内已确认了范围从二聚体到大小为数百微米的可见颗粒的聚集体 (Narhi et al.2012) 激发对治疗性蛋白制品的免疫应答的潜力 (Gamble 1966)。其中蛋白聚集体可以激发或增强免疫应答的机制包括以下内容：B细胞受体的广泛交联、引起高效B细胞活化 (Dintzis et al.1989; Bachmann et al.1993)；以及增强抗原摄取、加工和呈递；并触发免疫刺激性危险信号 (Seong and Matzinger 2004)。此类机制可能增强生成高亲和力、同种型转换IgG抗体所需的T辅助性细胞招募，以及与产品有效性中和最常相关的抗体应答 (Bachmann and Zinkernagel 1997)。

含有非约束性的建议

蛋白聚集体所诱导的免疫应答的潜在临床后果可能在很大程度上取决于聚集体中天然表位的损失或保存。通过含有天然蛋白的聚集体产生的一些抗体可与单体蛋白以及聚集体结合，具有抑制或中和产物活性的潜力。与此相反，变性/降解蛋白的一些抗体与聚集物质而不是天然蛋白单体独特结合，人体静脉注射免疫球蛋白（IVIG）的早期制剂也是同样的情况（Barandun et al.1962; Ellis and Henney 1969）。对含有降解表位的聚集体的反应已被证明引起过敏反应，但不抑制或中和天然蛋白的活性（Ellis and Henney 1969）。

缺乏关于产生对任何给定治疗性蛋白制品的免疫应答所需要的聚集体类型和数量的关键信息（Marszal and Fowler 2012），尽管有证据表明，与较低分子量的聚集体相比较，较高分子量的聚集体和颗粒更强有力地激发这种反应（Dintzis et al.1989; Bachmann et al.1993; Joubert et al.2012）。对于不同产品和在不同的临床情况下，所形成的聚集体以及有效激发免疫应答的数量也可能不同。此外，使用任何单一方法评估聚集体是不充分的，无法提供蛋白聚集的强有力衡量。例如，单独使用尺寸排阻色谱法可排除检测不能穿过柱预滤器的较高分子量聚集体，但可能是产生免疫应答中最重要物质。此外，已经认识到，在0.1~10微米尺寸范围内的显微镜下可见颗粒有很强的潜力具有免疫原性，但是采用目前使用的技术无法精确地监测（Berkowitz 2006; Roda et al.2009; Gross and Zeppezauer 2010; Mahler and Jiskoot 2012）。这些非常大的聚集体可能含有数千至数百万的蛋白分子，并且可能是同质或异质蛋白（例如，附着于玻璃或金属粒子的蛋白分子）。

建议

对于治疗性蛋白制品的生产商商，尽可能最大限度地减少蛋白质聚集是至关重要的。最大限度地减少聚集体形成的策略应在产品开发过程中尽早制定。这可以通过使用合适的细胞底物、选择最大限度地减少聚集体形成的生产条件、采用最大可能程度去除聚集体的强效纯化方案以及选择最大限度地减少储存过程中聚集的处方（参见章节V.B.7）和容器密闭系统（参见章节V.B.8）来完成。产品有效期考虑与储存过程中产品变性或降解相关的蛋白聚集体任何增加是特别重要的。

含有非约束性的建议

应采用单独或组合增强检测蛋白聚集体的方法来表征产品中不同种类的聚集体。测定聚集的方法在不断地发展和完善。在选择1种或多种适当检测法时，应考虑不断改善和开发这些方法。检测法应得到验证可用于常规批次放行和稳定性评价，并且其中几种应该被用于比较性评估。动物研究可能在确定具有免疫原性潜力的聚集体时是有用的，虽然额外考虑（聚集体的数量和类型、给药途径等）可以确定此类聚集体造成临床风险的程度。

应当在开始时和有效期整个过程中评估治疗性蛋白质制品中存在的显微镜下可见颗粒（2-10微米）的范围和水平。有几种方法当前经确认可用于评价这个尺寸范围内显微镜下可见颗粒的含量（Mahler and Jiskoot 2012）。随着越来越多的方法可用，申办者应该努力表征更小（0.1-2微米）的尺寸范围内颗粒。申办者应当对这些颗粒对治疗性蛋白制品的临床表现的影响进行风险评估，并根据评估结果开发适当的控制和缓解策略。

4. 糖基化/聚乙二醇化

糖基化可能强烈地调节治疗性蛋白制品的免疫原性。虽然外源性糖型如哺乳动物异种糖（Chung et al.2008; Ghaderi et al.2010）、酵母甘露聚糖（Bretthauer and Castellino 1999）或植物糖（Gomord and Faye 2004）可能引发剧烈的先天和后天免疫应答，用保守哺乳动物糖对蛋白进行糖基化修饰普遍提高了产品的溶解性并减少产品的聚集和免疫原性。糖基化通过最大程度减少蛋白质聚集以及通过屏蔽免疫原性蛋白表位接触免疫系统间接改变蛋白的免疫原性（Wei et al.2003; Cole et al.2004）。已经发现治疗性蛋白制品聚乙二醇化通过类似的机制减少其免疫原性（Inada et al.1995; Harris et al.2001），虽然对聚乙二醇（PEG）本身的免疫应答已被确认，造成产品的有效性丧失和不良安全性后果（Liu et al.2011）。抗PEG抗体也被认为是聚乙二醇化产品之间的交叉反应（Garay et al.2012; Schellekens et al.2013）。

建议

对于正常糖基化的蛋白，建议使用细胞底物生产系统和以非免疫原性方式糖基化治疗性蛋白制品的适当生产方法。

对于聚乙二醇化治疗性蛋白质制品，ADA检测法应该能够同时检测抗蛋白蛋白和抗PEG分子抗体。相同的原则可能适用于未PEG化但用其他高分子量实体（例如，羟乙基淀粉）修饰的治疗性蛋白制品的修饰。

5. 具有佐剂活性的杂质

佐剂活性可能因为多种机制而出现，包括在治疗性蛋白制品中存在微生物或宿主细胞相关杂质（Verthelyi and Wang 2010; Rhee et al.2011; Eon-Duval et al.2012; Kwissa et al.2012）。这些先天性免疫应答调节杂质（IIRMI），包括脂多糖、 β 葡聚糖和鞭毛蛋白、高迁移率族蛋白B1（HMGB1）和核酸，通过结合并通过B细胞、树突细胞和其他抗原呈递细胞群上存在的toll样受体或其他模式识别受体传导信号而发挥免疫增强活性（Iwasaki and Medzhitov 2010; Verthelyi and Wang 2010）。该信号提示抗原呈递细胞的成熟和/或用于直接刺激B细胞抗体产生。

建议

最大限度地减少治疗性蛋白质制品中微生物或宿主细胞相关杂质的种类和数量对于生产商是非常重要的。

用于评价所存在的IIRMI的类型的检测法应根据相关细胞底物进行调整。因为即使痕量水平IIRMI可以修饰治疗性蛋白质制品的免疫原性，用于检测IIRMI的检测法应当具有灵敏度来评估可能导致临床相关免疫应答的水平。

如果采用生物标志物检测和比较IIRMI的存在，应根据产品中可能存在的IIRMI对生物标志物进行调整。生物标志物的实例可包括来源于限定细胞群体的细胞因子释放和转录因子活化。

6. 治疗性蛋白制品的免疫调节特性

任何给定的治疗性蛋白制品的免疫调节活性不仅严重影响针对本身的免疫应答，而且严重影响针对其它联合给药治疗性蛋白制品、内源性蛋白或甚至小药物分子的免疫应答，并可能是不可预测的。例如，干扰素- α （Gogas et al.2006; Tovey and Lallemand）、白细胞介素-2（Franzke et al.1999）和GM-CSF（Hamilton 2008）不仅本身具有相当大的免疫原性，而且已知上调对内源性蛋白的免疫应答并诱导临床自身免疫。免疫抑制性治疗性蛋白可以全局下调免疫应答，从而使严重感染的可能性升高。然而，并不是所有的免疫抑制性治疗性蛋白抑制对本身的反应。例如，整合素和TNF单克隆抗体往往具有免疫原性。因此，此类治疗性蛋白制品的免疫原性应凭经验评价。

建议

治疗性蛋白制品的免疫调节特性、其对对本身的免疫应答的影响以及其诱导自身免疫的能力应该从产品开发的最初阶段进行监测（Franzke et al.1999; Gogas et al.2006; Hamilton 2008）。

当治疗性蛋白制品具有免疫抑制性，应避免使用减毒活生物体的疫苗接种。建议在治疗性蛋白制品给药前更新患者的疫苗接种情况，符合当地的医疗水平。

7. 制剂

制剂组分的选择主要根据通过防止由于疏水相互作用而发生变性以及通过防止化学降解（包括截断、氧化和脱酰胺），其在储存过程中保持治疗性蛋白的天然构象的能力（Cleland et al.1993; Shire et al.2004; Wakankar and Borchardt 2006）。制剂中大蛋白辅料，例如人血清白蛋白（HSA），可能对免疫原性产生积极或消极影响。辅料如HSA，虽然因其抑制疏水相互作用的能力添加，但是在未达最佳标准的储存条件下与治疗性蛋白可能发生聚集或形成蛋白加合物（Braun and Alsenz 1997）。聚山梨醇酯，一种非离子洗涤剂，是HSA的最常用替代物。在用于制剂时，应牢记这两种类型辅料（即，HSA和聚山梨醇酯）的稳定性，因为它们也受到修饰（例如，氧化），这可能对治疗性蛋白制品的完整性产生威胁。

制剂也可通过改变容器密闭系统的溶出物的光谱而影响产品的免疫原性。橡胶塞溶出物已显示具有免疫佐剂活性，如动物实验中所示（Mueller et al.2009）。通过含有聚山梨醇酯的制剂，已从容器密闭材料中洗脱出具有免疫活性的有机化合物以及金属，最终导致氧化和聚集增加（Seidl et al.2012）。

建议

应评价辅料防止在储存过程中治疗性蛋白制品变性和降解的潜力。应仔细评价辅料与治疗性蛋白质之间的相互作用，特别是在共聚集或形成蛋白质-辅料加合物方面。

在确立产品的有效期时，应慎重考虑辅料的稳定性。

应进行溶出物和萃取物的彻底分析以评价容器密闭系统材料与治疗性蛋白制品相互作用和修饰治疗性蛋白制品的能力。应当进行风险评估，并应制定适当的控制和风险缓解策略。

8. 容器密闭系统考虑

治疗性蛋白制品与容器密闭系统之间的相互作用可能对产品质量和免疫原性产生不利影响。更可能与治疗性蛋白制品的预充式注射器产生这些相互作用。这些注射器由多个表面和材料组成，在长期时间段内与治疗性蛋白制品相互作用，因此具有改变产品的质量和免疫原性的潜力。以下是与免疫原性相关的其它容器密闭系统考虑：

含有非约束性的建议

- 玻璃和空气界面可使玻璃注射器和小瓶中蛋白变性并引起聚集。
- 玻璃小瓶中已经在较高的pH值下发生脱层，并且在柠檬酸制剂存在下有可能产生蛋白涂布玻璃颗粒，这可增强治疗性蛋白质制品的免疫原性（Fradkin et al.2011）。
- 硅油涂布注射器组件提供了在其上蛋白可以变性和聚集的化学和结构环境。
- 应该进行适当的使用中稳定性研究，以确认保持产品质量和防止降解所需的条件被充分限定。
- 容器密闭系统的浸出物质可能是增强免疫原性的物质的来源，通过化学修饰治疗性蛋白制品或者通过具有直接的免疫佐剂活性，其中包括以下内容：
 - 具有免疫调节活性的有机化合物可能通过含有聚山梨醇酯的制剂从容器密闭材料中洗脱出：当塞子表面没有特氟龙（Teflon）涂层时，在利用聚山梨醇酯配制的产品中发现了参与硫化的浸出有机化合物（Boven et al.2005）。
 - 在含有多种产品的预充式注射器或小瓶中发现了氧化和聚集治疗性蛋白制品或激活金属蛋白酶的金属。例如，从注射器筒中浸出的氧化钨被报告引起蛋白聚集（Bee et al.2009）；以及从小瓶瓶塞中浸出的金属引起治疗性蛋白制品的蛋白水解增加，由于与产品共纯化的金属蛋白酶的活化。

建议

只要有可能，申办者应获得关于用于其产品的容器密闭系统生产中所使用的所有原材料的描述的详细信息。申办者应使用多种分析技术进行全面萃取物和浸出物实验室评估，以评估可与治疗性蛋白制品相互作用和使治疗性蛋白制品降解的容器密闭系统的属性。

因为美国药典注射剂用弹性密封件不能充分表征在实时储存条件下储存容器中溶出物对治疗性蛋白制品的影响，针对每种治疗性蛋白制品，必须对在实时储存条件下在其储存容器中的溶出物进行评价⁸。

针对每种产品，必须在强制降解条件下⁹以及实时储存条件下进行溶出物检测，因为在某些情况下，溶出物的量随时间和在高温下显著增加。应进行产品相容性测试，以评估容器密闭系统材料和所有溶出物对产品质量的影响。

⁸ 21 CFR 600.11(b)和(h)。

⁹ 参见ICH行业指南Q1A(R2)新原料药和新制剂稳定性试验。

9. 产品保管

应在方案中对包装于其预定一级包装容器封闭系统的产品的稳定性进行测试，其中包括适当的使用中条件（例如，光、温度和搅拌）来确定可能会导致产品变性和降解的条件和做法。

鉴于大多数治疗性蛋白质制品暴露于热和光或在机械搅拌的条件下发生降解，为了确保产品的质量，应就产品储存、处理和给药对医疗卫生专业人员和患者进行教育。

安全供应链是至关重要的。适当的温度控制运输和储存对于保护产品质量是极其重要的。例如，由未经授权的供应商在不恰当的条件下储存依泊汀- α 与高水平的聚集体和抗体介导纯红细胞再生障碍相关（Fotiou et al.2009）。

建议

患者教育材料（例如，提供符合21 CFR 201.57和201.80要求的使用说明书的FDA批准患者标签）应明确确定产品的适当存储储存和处理条件。由护理人员合适给出的适当患者指示对于保证产品质量和帮助最大程度地减少在产品储存和处理过程中对产品质量的不利影响是至关重要的。应该确保适当的温度控制运输和储存。

VI. 结论

对治疗性蛋白制品的免疫应答的后果范围可以从没有明显影响到严重不良事件，包括危及生命的并发症（如过敏反应）、救生性或高度有效疗法的效力中和或具有非冗余功能的内源性蛋白的中和。虽然与产品质量属性和患者/方案因素相关的免疫原性风险因素得到理解，但是不能仅仅基于这些因素的表征来预测对治疗性蛋白制品的免疫应答，而应在临床上进行评价。基于风险的方法，如本指导原则中所描绘的，向研究者提供工具来开发新型蛋白疗法，评价生产变更的影响，并评价免疫原性造成严重后果时耐受诱导方案的潜在需要。

参考文献

- Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, et al. (1993). "The influence of antigen organization on B cell responsiveness." *Science* 262(5138): 1448-1451.
- Bachmann, M. F. and R. M. Zinkernagel (1997). "Neutralizing antiviral B cell responses." *Annu Rev Immunol* 15: 235-270.
- Baert, F., M. Noman, et al. (2003). "Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease." *N Engl J Med* 348(7): 601-608.
- Barandun, S., P. Kistler, et al. (1962). "Intravenous administration of human gamma-globulin." *Vox Sang* 7: 157-174.
- Barbosa, M. D. and E. Celis (2007). "Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses." *Drug Discov Today* 12(15-16): 674-681.
- Bee, J. S., S. A. Nelson, et al. (2009). "Precipitation of a monoclonal antibody by soluble tungsten." *J Pharm Sci* 98(9): 3290-3301.
- Bellomi, F., C. Scagnolari, et al. (2003). "Fate of neutralizing and binding antibodies to IFN beta in MS patients treated with IFN beta for 6 years." *J Neurol Sci* 215(1-2): 3-8.
- Berkowitz, S. A. (2006). "Role of analytical ultracentrifugation in assessing the aggregation of protein biopharmaceuticals." *AAPS J* 8(3): E590-605.
- Bonfield, T. L., D. Russell, et al. (2002). "Autoantibodies against granulocyte macrophage colony-stimulating factor are diagnostic for pulmonary alveolar proteinosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* 27(4): 481-486.
- Boven, K., S. Stryker, et al. (2005). "The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes." *Kidney Int* 67(6): 2346-2353.
- Braun, A. and J. Alsenz (1997). "Development and use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of protein aggregates in interferon-alpha (IFN-alpha) formulations." *Pharm Res* 14(10): 1394-1400.
- Bretthauer, R. K. and F. J. Castellino (1999). "Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins." *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 3): 193-200.
- Brooks, D. A., J. J. Hopwood, et al. (1998). "Immune response to enzyme replacement therapy: clinical signs of hypersensitivity reactions and altered enzyme distribution in a high titre rat model." *Biochim Biophys Acta* 1407(2): 163-172.
- Bukhari, N., L. Torres, et al. (2011). "Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system." *J Neurosci* 31(42): 14931-14943.

含有非约束性的建议

- Chung, C. H., B. Mirakhur, et al. (2008). "Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose." *N Engl J Med* 358(11): 1109-1117.
- Cleland, J. L., M. F. Powell, et al. (1993). "The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10(4): 307-377.
- Cole, K. S., J. D. Steckbeck, et al. (2004). "Removal of N-linked glycosylation sites in the V1 region of simian immunodeficiency virus gp120 results in redirection of B-cell responses to V3." *J Virol* 78(3): 1525-1539.
- Colombel, J. F., W. J. Sandborn, et al. (2010). "Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease." *N Engl J Med* 362(15): 1383-1395.
- Cuenca, A. G., J. L. Wynn, et al. (2013). "Role of innate immunity in neonatal infection." *Am J Perinatol* 30(2): 105-112.
- Dalum, I., M. R. Jensen, et al. (1997). "Induction of cross-reactive antibodies against a self protein by immunization with a modified self protein containing a foreign T helper epitope." *Mol Immunol* 34(16-17): 1113-1120.
- De Groot, A. S., L. Moise, et al. (2008). "Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes"." *Blood* 112(8): 3303-3311.
- Demeule, B., R. Gurny, et al. (2006). "Where disease pathogenesis meets protein formulation: renal deposition of immunoglobulin aggregates." *Eur J Pharm Biopharm* 62(2): 121-130.
- Dharnidharka, V. R., C. Takemoto, et al. (1998). "Membranous glomerulonephritis and nephrosis post factor IX infusions in hemophilia B." *Pediatr Nephrol* 12(8): 654-657.
- Dintzis, R. Z., M. Okajima, et al. (1989). "The immunogenicity of soluble haptened polymers is determined by molecular mass and hapten valence." *J Immunol* 143(4): 1239-1244.
- Disis, M. L., V. Goodell, et al. (2004). "Humoral epitope-spreading following immunization with a HER-2/neu peptide based vaccine in cancer patients." *J Clin Immunol* 24(5): 571-578.
- Donnelly, R. P., H. Dickensheets, et al. (2011). "Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection." *Trends Immunol* 32(9): 443-450.
- Duff, E. G. o. P. O. C. T. C. P. G. W. (2006). *Expert Group on Phase One Clinical Trials: Final Report.* G. W. Duff.
- Ellis, E. F. and C. S. Henney (1969). "Adverse reactions following administration of human gamma globulin." *J Allergy* 43(1): 45-54.
- Eon-Duval, A., H. Broly, et al. (2012). "Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach." *Biotechnol Prog* 28(3): 608-622.

含有非约束性的建议

- Findlay, L., D. Eastwood, et al. (2011). "Comparison of novel methods for predicting the risk of pro-inflammatory clinical infusion reactions during monoclonal antibody therapy." *J Immunol Methods* 371(1-2): 134-142.
- Fotiou, F., S. Aravind, et al. (2009). "Impact of illegal trade on the quality of epoetin alfa in Thailand." *Clin Ther* 31(2): 336-346.
- Fradkin, A. H., J. F. Carpenter, et al. (2011). "Glass particles as an adjuvant: a model for adverse immunogenicity of therapeutic proteins." *J Pharm Sci* 100(11): 4953-4964.
- Franzke, A., D. Peest, et al. (1999). "Autoimmunity resulting from cytokine treatment predicts long-term survival in patients with metastatic renal cell cancer." *J Clin Oncol* 17(2): 529-533.
- Gamarra, R. M., S. D. McGraw, et al. (2006). "Serum sickness-like reactions in patients receiving intravenous infliximab." *J Emerg Med* 30(1): 41-44.
- Gamble, C. N. (1966). "The role of soluble aggregates in the primary immune response of mice to human gamma globulin." *Int Arch Allergy Appl Immunol* 30(5): 446-455.
- Garay, R. P., R. El-Gewely, et al. (2012). "Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents." *Expert Opin Drug Deliv* 9(11): 1319-1323.
- Garces, S., J. Demengeot, et al. (2013). "The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis." *Ann Rheum Dis* 72(12): 1947-1955.
- Ghaderi, D., R. E. Taylor, et al. (2010). "Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins." *Nat Biotechnol* 28(8): 863-867.
- Gogas, H., J. Ioannovich, et al. (2006). "Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon." *N Engl J Med* 354(7): 709-718.
- Gomord, V. and L. Faye (2004). "Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants." *Curr Opin Plant Biol* 7(2): 171-181.
- Gonzalez, M. L. and F. J. Waxman (2000). "Glomerular deposition of immune complexes made with IgG2a monoclonal antibodies." *J Immunol* 164(2): 1071-1077.
- Goodnow, C. C. (1992). "Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance." *Annu Rev Immunol* 10: 489-518.
- Goronzy, J. J. and C. M. Weyand (2013). "Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines." *Nat Immunol* 14(5): 428-436.
- Goto, S., H. Goto, et al. (2009). "Serum sickness with an elevated level of human anti-chimeric antibody following treatment with rituximab in a child with chronic immune thrombocytopenic purpura." *Int J Hematol* 89(3): 305-309.

含有非约束性的建议

- Gross, P. C. and M. Zeppezauer (2010). "Infrared spectroscopy for biopharmaceutical protein analysis." *J Pharm Biomed Anal* 53(1): 29-36.
- Hamilton, J. A. (2008). "Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity." *Nat Rev Immunol* 8(7): 533-544.
- Haribhai, D., D. Engle, et al. (2003). "A threshold for central T cell tolerance to an inducible serum protein." *J Immunol* 170(6): 3007-3014.
- Harris, J. M., N. E. Martin, et al. (2001). "Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics." *Clin Pharmacokinet* 40(7): 539-551.
- Hellmich, B., E. Csernok, et al. (2002). "Autoantibodies against granulocyte colony-stimulating factor in Felty's syndrome and neutropenic systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 46(9): 2384-2391.
- Hellwig, K., S. Schimrigk, et al. (2008). "Allergic and nonallergic delayed infusion reactions during natalizumab therapy." *Arch Neurol* 65(5): 656-658.
- Hermeling, S., D. J. Crommelin, et al. (2004). "Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins." *Pharm Res* 21(6): 897-903.
- Hintermann, E., M. Holdener, et al. (2011). "Epitope spreading of the anti-CYP2D6 antibody response in patients with autoimmune hepatitis and in the CYP2D6 mouse model." *J Autoimmun* 37(3): 242-253.
- Hoffmann, S., S. Cepok, et al. (2008). "HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis." *Am J Hum Genet* 83(2): 219-227.
- Hsu, D. H., J. D. Shi, et al. (1999). "A humanized anti-CD3 antibody, HuM291, with low mitogenic activity, mediates complete and reversible T-cell depletion in chimpanzees." *Transplantation* 68(4): 545-554.
- Huang, L., J. Lu, et al. (2005). "In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS." *Anal Chem* 77(5): 1432-1439.
- Hunley, T. E., D. Corzo, et al. (2004). "Nephrotic syndrome complicating alpha-glucosidase replacement therapy for Pompe disease." *Pediatrics* 114(4): e532-535.
- Inada, Y., M. Furukawa, et al. (1995). "Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins." *Trends Biotechnol* 13(3): 86-91.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." *Science* 327(5963): 291-295.
- Jefferis, R. and M. P. Lefranc (2009). "Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity." *MAbs* 1(4): 332-338.

含有非约束性的建议

- Joubert, M. K., M. Hokom, et al. (2012). "Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses." *J Biol Chem* 287(30): 25266-25279.
- Kessler, C. M. and T. L. Ortel (2009). "Recent developments in topical thrombins." *Thromb Haemost* 102(1): 15-24.
- Kimchi-Sarfaty, C., T. Schiller, et al. (2013). "Building better drugs: developing and regulating engineered therapeutic proteins." *Trends Pharmacol Sci* 34(10): 534-548.
- Koren, E. (2002). "From characterization of antibodies to prediction of immunogenicity." *Dev Biol (Basel)* 109: 87-95.
- Koren, E., H. W. Smith, et al. (2008). "Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products." *J Immunol Methods* 333(1- 2): 1-9.
- Kwissa, M., H. I. Nakaya, et al. (2012). "Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates." *Blood* 119(9): 2044-2055.
- Lee, J. K. and P. Vadas (2011). "Anaphylaxis: mechanisms and management." *Clin Exp Allergy* 41(7): 923-938.
- LeMaout, J., P. Szabo, et al. (1997). "Effect of age on humoral immunity, selection of the B-cell repertoire and B-cell development." *Immunol Rev* 160: 115-126.
- Li, J., C. Yang, et al. (2001). "Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin." *Blood* 98(12): 3241-3248.
- Liu, Y., H. Reidler, et al. (2011). "A double antigen bridging immunogenicity ELISA for the detection of antibodies to polyethylene glycol polymers." *J Pharmacol Toxicol Methods* 64(3): 238-245.
- Macdougall, I. C., S. D. Roger, et al. (2012). "Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis-stimulating agents: new insights." *Kidney Int* 81(8): 727-732.
- Mahler, H. C. and W. Jiskoot (2012). *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*.
- Makrygiannakis, D., E. af Klint, et al. (2006). "Citruination is an inflammation-dependent process." *Ann Rheum Dis* 65(9): 1219-1222.
- Marszal, E. and E. Fowler (2012). "Workshop on predictive science of the immunogenicity aspects of particles in biopharmaceutical products." *J Pharm Sci* 101(10): 3555-3559.
- Mendelsohn, N. J., Y. H. Messinger, et al. (2009). "Elimination of antibodies to recombinant enzyme in Pompe's disease." *N Engl J Med* 360(2): 194-195.

含有非约束性的建议

- Messinger, Y. H., N. J. Mendelsohn, et al. (2012). "Successful immune tolerance induction to enzyme replacement therapy in CRIM-negative infantile Pompe disease." *Genet Med* 14(1): 135-142.
- Miller, L. L., E. L. Korn, et al. (1999). "Abrogation of the hematological and biological activities of the interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein PIXY321 by neutralizing anti-PIXY321 antibodies in cancer patients receiving high-dose carboplatin." *Blood* 93(10): 3250-3258.
- Mueller, R., A. Karle, et al. (2009). "Evaluation of the immuno-stimulatory potential of stopper extractables and leachables by using dendritic cells as readout." *J Pharm Sci* 98(10): 3548-3561.
- Murphy, K. (2011). *The Humoral Immune Response*. Janeway's Immunobiology. New York, Garland Science Publishing. 8th: 367-408.
- Narhi, L. O., J. Schmit, et al. (2012). "Classification of protein aggregates." *J Pharm Sci* 101(2): 493-498.
- Norman, D. J., F. Vincenti, et al. (2000). "Phase I trial of HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, in patients receiving renal allografts from living donors." *Transplantation* 70(12): 1707-1712.
- Pandey, G. S., C. Yanover, et al. (2013). "Polymorphisms in the F8 gene and MHC-II variants as risk factors for the development of inhibitory anti-factor VIII antibodies during the treatment of hemophilia a: a computational assessment." *PLoS Comput Biol* 9(5): e1003066.
- Pandey, G. S., C. Yanover, et al. (2013). "Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22- inverted F8 locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A." *Nat Med* 19(10): 1318-1324.
- PrabhuDas, M., B. Adkins, et al. (2011). "Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines." *Nat Immunol* 12(3): 189-194.
- Ragnhammar, P., H. J. Friesen, et al. (1994). "Induction of anti-recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Escherichia coli-derived) antibodies and clinical effects in nonimmunocompromised patients." *Blood* 84(12): 4078-4087.
- Rhee, E. G., J. N. Blattman, et al. (2011). "Multiple innate immune pathways contribute to the immunogenicity of recombinant adenovirus vaccine vectors." *J Virol* 85(1): 315-323.
- Roda, B., A. Zattoni, et al. (2009). "Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends." *Anal Chim Acta* 635(2): 132-143.
- Romer, P. S., S. Berr, et al. (2011). "Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412." *Blood* 118(26): 6772-6782.

含有非约束性的建议

Rosenberg, A. S. and A. Worobec (2004). "A Risk-Based Approach to Immunogenicity Concerns of Therapeutic Protein Products, Part 2: Considering Host-Specific and Product-Specific Factors Impacting Immunogenicity." *BioPharm International*.

Rosenberg, A. S. and A. Worobec (2005). "A Risk-Based Approach to Immunogenicity Concerns of Therapeutic Protein Products, Part 3: Effects of Manufacturing Changes in Immunogenicity and the Utility of Animal Immunogenicity Studies." *BioPharm International*.

Sampson, H. A., A. Munoz-Furlong, et al. (2006). "Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium." *J Allergy Clin Immunol* 117(2): 391-397.

Schellekens, H., W. E. Hennink, et al. (2013). "The immunogenicity of polyethylene glycol: facts and fiction." *Pharm Res* 30(7): 1729-1734.

Seidl, A., O. Hainzl, et al. (2012). "Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity." *Pharm Res* 29(6): 1454-1467.

Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." *Nat Rev Immunol* 4(6): 469-478.

Shire, S. J., Z. Shahrokh, et al. (2004). "Challenges in the development of high protein concentration formulations." *J Pharm Sci* 93(6): 1390-1402.

Simons, F. E. (2010). "Anaphylaxis." *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S161-181.

Singh, S. K. (2011). "Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics." *J Pharm Sci* 100(2): 354-387.

Stanley, E., G. J. Lieschke, et al. (1994). "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor- deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5592-5596.

Stebbing, R., D. Eastwood, et al. (2013). "After TGN1412: recent developments in cytokine release assays." *J Immunotoxicol* 10(1): 75-82.

Stebbing, R., L. Findlay, et al. (2007). "'Cytokine storm' in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics." *J Immunol* 179(5): 3325-3331.

Tatarewicz, S. M., X. Wei, et al. (2007). "Development of a maturing T-cell-mediated immune response in patients with idiopathic Parkinson's disease receiving r-metHuGDNF via continuous intraputaminial infusion." *J Clin Immunol* 27(6): 620-627.

Tovey, M. G. and C. Lallemand (2010). *Adjuvant Activity of Cytokines. Methods in Molecular Biology*. G. Davies, Springer Science.

含有非约束性的建议

Verthelyi, D. and V. Wang (2010). "Trace levels of innate immune response modulating impurities (IIRMI)s synergize to break tolerance to therapeutic proteins." PLoS One 5(12): e15252.

Viel, K. R., A. Ameri, et al. (2009). "Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia." N Engl J Med 360(16): 1618-1627.

Wakankar, A. A. and R. T. Borchardt (2006). "Formulation considerations for proteins susceptible to asparagine deamidation and aspartate isomerization." J Pharm Sci 95(11): 2321- 2336.

Wang, J., J. Lozier, et al. (2008). "Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment." Nat Biotechnol 26(8): 901-908.

Weber, C. A., P. J. Mehta, et al. (2009). "T cell epitope: friend or foe? Immunogenicity of biologics in context." Adv Drug Deliv Rev 61(11): 965-976.

Wei, X., J. M. Decker, et al. (2003). "Antibody neutralization and escape by HIV-1." Nature 422(6929): 307-312.

Weigle, W. O. (1980). "Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalomyelitis." Adv Immunol 30: 159-273.

附录A

1. 过敏反应的诊断

过敏反应的诊断基于以下3个临床标准，其中当这些条件之一被满足时，被认为极有可能是过敏反应（Sampson et al.2006）：

- a. 伴有皮肤、粘膜组织或两者受累的疾病（例如，广义荨麻疹、瘙痒或潮红、肿嘴唇-舌头-悬雍垂）急性发作（几分钟到几小时），**以及以下至少一种**：
 - 呼吸系统损害（如、呼吸困难、喘息、支气管痉挛、喘鸣、呼气流量峰值降低、低氧血症）
 - 血压降低或终末器官功能障碍相关症状（如肌张力低下[崩溃]、晕厥、失禁）
- b. 暴露于患者的可能过敏原后迅速发生以下两项或更多项（几分钟到几小时）：
 - 皮肤-粘膜组织受累（例如，广义荨麻疹、发痒-发红、肿嘴唇-舌头-悬雍垂）
 - 呼吸系统损害（如、呼吸困难、喘息、支气管痉挛、喘鸣、呼气流量峰值降低、低氧血症）
 - 血压降低或相关症状（如肌张力低下[崩溃]、晕厥、失禁）
 - 持久性胃肠道症状（例如，痉挛性腹痛、呕吐）
- c. 暴露于患者的已知过敏原后血压降低（几分钟到几小时）：
 - 婴幼儿和儿童：低收缩压（年龄特异性）或收缩压降低大于30%
 - 成人：收缩压低于90 mm Hg或相对于患者基线降低大于30%

虽然没有任何的临床标准提供100%的敏感性和特异性，可以相信，这些标准可能捕捉到大于95%的过敏性反应病例（Sampson et al.2006）。

用于评价过敏反应的实验室检查：

目前，还没有具有灵敏度和特异性的实验室检查来确认过敏性反应的临床诊断。用于确定针对治疗性蛋白制品的特异性IgE抗体水平、介体释放或嗜碱性粒细胞活化的皮肤测试和体外诊断测试可能对表征基本病理生理学有用，并且可能提供关于潜在缓解策略的深入了解（Simons 2010; Lee and Vadas 2011）。但是，未经验证的测试结果应谨慎解释；并且在产品开发过程中未经验证测试的阳性结果的临床相关性可能是不确定的。

2. 细胞因子释放综合征

细胞表面受体或细胞膜表达细胞因子的特异性单克隆抗体，以及患者中产生的、与细胞表面受体结合的、治疗性蛋白制品抗体，具有增强产品的内在激动剂活性并加剧输液相关毒性的潜力。建议对此类治疗性蛋白制品介导细胞活化（包括人全血或外周血单核细胞中增殖和细胞因子释放）的能力进行体外评估。对于具有诱发细胞因子释放综合征潜力的产品，也可推荐在适用情况下通过传统的计算和较慢输注速率所获得的初始起始剂量（Duff 2006）。C-反应蛋白和细胞因子（例如TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10和IFN- γ ）的给药前和给药后水平，以及某些临床症状和体征，例如体温急剧升高、红斑和低血压，可能作为与细胞因子释放相关的促炎性反应标志物。

动物研究和体外评估的数据均可提供信息来指导具有诱导细胞因子释放潜力的治疗性蛋白制品的开发。虽然动物实验和体外评估的数据可以相互补充，它们一般并不完全预测临床事件或后果。因此，至关重要是，在具有介导受体交联潜力的产品的临床开发中应始终非常谨慎（参见章节III.B.1和III.B.2）。虽然用于毒理学试验的传统动物模型（即，大鼠、小鼠、犬和食蟹猴）很少表现出与淋巴细胞活化和细胞因子释放相关的明显毒性，但是可在常规毒理学研究中对与T细胞活化和细胞因子释放相关的特异性标志物进行测定，只要该药物在测试种属中具有药理学活性。然后，这些数据可能用于预测这些药物在临床中诱导细胞因子释放综合征的潜力或用于评价经修饰减少其T细胞活化水平的第二代药物的活性。例如，可以对药代动力学或一般毒理学研究期间从接受给药动物中获得的血样样品中细胞因子产生进行测定，只要获得的样品量不损害动物的健康或在研究结束时评价毒理学终点的能力。当在动物试验中纳入细胞因子释放的评价时，建议对尽可能广泛并包括IL-2、IL-6、IFN- γ 和TNF- α 的细胞因子组以及指示细胞因子释放综合征的其他相关细胞因子进行测定。在开始前，应就此类拟定动物研究与FDA进行讨论（Hsu et al.1999; Norman et al.2000）。细胞活化（包括人全血或外周血单核细胞中增殖和细胞因子释放）的体外评估是重要的评估工具，可帮助克服在建模某些T细胞亚群中活化刺激方面的动物已知限制（Stebbing et al.2007; Hellwig et al.2008; Findlay et al.2011; Romer et al.2011; Stebbings et al.2013）。应该在这些研究中对细胞受体的产品交联影响进行考虑。体外细胞活化迹象也应理解为表明该产品在临床中具有诱导毒性的潜力，无论动物研究是否得到阴性结果。

3. 非急性免疫应答

就治疗性蛋白制品而言，比较少见III型超敏反应，包括由免疫复合物和T细胞介导的那些超敏反应（在旧文献中为迟发型超敏反应）；诊断需要高度临床怀疑（Dharnidharka et al.1998; Hunley et al.2004; Gamarra et al.2006; Goto et al.2009）。免疫复合物沉积的体征和症状包括发热、皮疹、关节痛、肌肉痛、血尿、蛋白尿、浆膜炎、中枢神经系统并发症和溶血性贫血。由抗体和治疗性蛋白制品组成的免疫复合物是面对高滴度和持久性抗体反应接受耐受诱导治疗（用因子IX和 α 葡萄糖苷酶）的患者产生肾小球肾炎和肾病综合征的原因（Dharnidharka et al.1998; Hunley et al.2004）。已经有具有对单克隆抗体的免疫应答的免疫复合物疾病病例报告（Gamarra et al.2006; Goto et al.2009），并且靶标高水平循环多价抗原的较大剂量单克隆抗体情况可能增加免疫复合物沉积的可能性（Gonzalez and Waxman 2000）。

如果患者出现提示免疫复合物疾病的体征或症状，应该对循环免疫复合物和补体激活进行适当的实验室评估；并应当停止治疗性蛋白制品给药。在某些情况下，在进一步治疗尝试前，开发消除抗体应答的耐受诱导疗法可能是适当的。

4. 治疗性蛋白制品的抗体应答

治疗性蛋白制品抗体被分类为中和性或非中和性。中和性抗体与治疗性蛋白制品的独特功能结构域结合，并阻止它们的活性。例如，治疗性酶抗体可与任何催化部位结合，从而阻断底物催化，或与摄取结构域结合，从而防止酶摄取到细胞中。在罕见的情况下，中和性抗体可作为载体，提高产品的半衰期，并延长其治疗作用。正如本指导原则章节III讨论的，非中和性抗体与治疗性蛋白制品（不是特异性功能性结构域）结合，并可对安全性和有效性表现出一系列影响—治疗性蛋白制品的清除增强或延迟，这可能提示考虑给药变更、过敏反应诱导、通过使治疗性蛋白制品摄取到FcR表达细胞而不是靶细胞导致的产品有效性降低以及表位扩展易化，从而允许出现中和性抗体。然而，它们可能对安全性或有效性没有明显的影响。

在接受因子/酶替代疗法的患者（此类治疗性蛋白制品对其表现为外源性）中，非人类蛋白给药预期会产生中和性抗体。然而，在内源性因子由于基因突变存在缺陷或不存在的条件下，如在血友病A或溶酶体贮积症的情况下，与内源性蛋白交叉反应的治疗性蛋白制品中和性抗体并不总是出现。中和性抗体可在健康个体中对一些正常内源性蛋白产生，因为某些内源性蛋白的免疫耐受并不稳健，并且可以被具有足够激发性的治疗性蛋白同源物所破坏。例如，用血小板生成素（TPO）型蛋白治疗的健康志愿者对治疗剂（其交叉反应性中和内源性TPO）产生的中和性抗体应答增强，从而诱导这些以前的健康个体出现长期血小板减少症状态（Li et al.2001）。因此，应非常谨慎用发挥独特功能的内源性蛋白或低丰度存在的内源性蛋白的治疗性配对物治疗。治疗性蛋白质制品的中和性抗体也可能是灾难性的，当它中和救生性治疗剂（如用于溶酶体贮积症的治疗酶）的有效性时，在此类情

含有非约束性的建议

况下应考虑免疫耐受诱导（Wang et al.2008）。

由对单克隆抗体的免疫应答引起的患者体内单克隆抗体的有效性丧失可能是很大的问题，且临床后果不应该最小化。申办者可以考虑制定在这类患者中的免疫耐受诱导方案。

正如本指导原则章节III.B.5中讨论的，如果内源性蛋白具有冗余生物学功能（例如，I型干扰素），治疗性和内源性蛋白的中和可能不会表现出产生明显的临床综合征。然而，阻断内源性因子的更微妙影响，即使一些功能冗余，可能不明显直到系统受到抑制，因为内源性因子并非所有的生物学功能均是已知的或完全表征的。此外，中和性抗体的长期持续性影响，例如，正如在一小部分具有IFN- β 抗体的患者中已经观察到的（Bellomi et al.2003），将无法从短期随访中获悉，应进行长期研究。一般来说，对于给定的产品，应当收集并评价长期、一年或更多年的免疫原性数据，除非较短的持续时间经科学证明是合理的。然而，根据后果的频率和严重程度，更长期评价可能是必要的。在某些情况下，这些研究可能在上市后进行。关于上市前和上市后所需要的数据范围，应与FDA达成一致意见。

在某些情况下，抗体应答，无法是否有明显的临床效应，应连续随访直到水平恢复至基线或与FDA讨论另一种替代方法。此外，对于在其中治疗性蛋白制品似乎失去有效性的患者，无论疗程的持续时间，重要的是开展评估确定有效性丧失是否是抗体介导的。

对于产生中和性抗体或被认为具有极高风险对救生性治疗性蛋白制品产生中和性抗体的患者（例如，接受酶替代疗法、具有关键酶缺失突变的CRIM-阴性患者），在治疗开始前或治疗开始同时，应考虑预防性情况下的耐受诱导方案（Wang et al.2008; Mendelsohn et al.2009; Messinger et al.2012）。鉴于此类方案的免疫抑制程度，虽然远小于逆转正在进行的抗体应答的治疗方案，应在整个方案持续期间进行仔细的安全性监测。

5. 动物研究的效用

在动物中进行免疫原性评估，以协助解释动物研究结果（例如，毒理学研究），以及后续临床和非临床研究的设计（关于额外信息，参见ICH行业指导原则S6(R1)生物技术药品的临床前安全性评价）。¹⁰它们预测对治疗性蛋白制品的人类免疫应答的能力通常是有限的，但它们可能对描述抗体应答的后果（特别是当一种进化上保守的、非冗余内源性蛋白受到对其治疗性蛋白制品配对物产生的交叉反应性抗体抑制时）有用。当可用时，动物模型（包括超免疫小鼠或基因敲除小鼠）可用于处理内源性蛋白抑制的潜在后果。一个特殊情况是对胚胎或胎儿发育至关重要的、其消除具有胚胎致死性的内源性蛋白。在此类情况下，使用条件型敲除小鼠可能对评估中和性抗体的潜在后果是有用的。与在人类研究中一样，应考虑到抗体通过母乳向发育中新生儿的潜在传输。

与介导生物学独特功能的蛋白相反，动物模型一般不用于预测对治疗性蛋白制品（其是具有冗余生物学功能的内源性蛋白的配对物）的免疫应答的后果。人类蛋白基因编码转基因小鼠、人源化小鼠（即，人类免疫系统免疫缺陷小鼠）和人类疾病的小鼠模型越来越多地被开发，并可在处理多个临床问题（包括免疫原性）时考虑使用。

除了适当的动物研究外，应考虑体外和计算机芯片分析，这可能补充动物研究，以更好地或进一步阐明免疫原性的风险。

¹⁰ ICH行业指南S6(R1)生物技术药品的临床前安全性评价可在<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>获得。

6. 比较性免疫原性研究

在评价生产变更的影响时是否需要临床免疫原性研究以及临床免疫原性研究的范围和时间将取决于多种因素，例如生产变更前和生产变更后产品的分析可比性程度、信息量丰富比较性研究的结果以及生产变更前对产品的免疫应答的发生率和临床后果。例如，如果免疫应答的临床后果是严重的（例如，当产品是具有关键、非冗余生物学功能的内源性蛋白的治疗性配对物或已知激发过敏反应），可能会需要更广泛的免疫原性评估。¹¹

¹¹ 生物仿制药开发项目指南可在草案行业指南证明与参照药具有生物相似性的科学考虑要点。最终定稿后，本指南代表FDA目前关于该问题的想法。