

# 药物免疫毒性非临床研究技术指导原则

2024 年 1 月

## 目录

一、概述.....	1
二、一般原则.....	1
三、基本内容.....	2
(一) 证据权重分析评价策略.....	2
(二) 免疫毒性非临床评价关注点.....	3
1、免疫抑制.....	3
2、免疫增强.....	5
3、免疫系统发育毒性.....	7
(三) 免疫毒性研究方法的选择.....	8
(四) 免疫毒性非临床研究的时间安排.....	9
四、参考文献.....	10
五、附录.....	11
免疫毒性评价方法.....	11

## 一、概述

免疫系统由免疫器官/组织、免疫细胞以及免疫活性物质组成，包括固有免疫（非特异性免疫）和适应性免疫（特异性免疫）。药物可能影响固有免疫和适应性免疫的一个或多个方面，从而影响免疫系统的平衡，如诱导免疫抑制或免疫增强。免疫系统平衡的失调可引起全身或局部的异常免疫反应，影响机体的免疫应答。因此，评估药物对免疫系统的不良影响是药物安全性评价的重要组成部分。

本指导原则中，药物免疫毒性是指非期望的免疫抑制或增强，包括免疫调节药物放大的药理作用所导致的不良反应。药物免疫毒性非临床研究应充分表征药物对免疫系统的影响，为药物的风险-获益评估提供支持。

本指导原则适用于药物的免疫毒性非临床评价，不包括细胞和基因治疗产品、佐剂疫苗、血液制品。本指导原则旨在为药物免疫毒性非临床研究评价策略和所涉及的试验方法提供一般性的技术指导和参考。

## 二、一般原则

药物免疫毒性非临床研究应采用具体问题具体分析的原则，充分考虑药物本身的特点和临床应用情况等，基于证据权重分析（WoE）的评价策略分阶段逐步开展，并对风险

-获益进行综合评估。

药物免疫毒性非临床安全性研究一般应当在经过药物非临床研究质量管理规范（GLP）认证的机构开展，并遵守 GLP。对于某些采用特殊的病原体、特殊的试验设施（如宿主抵抗力试验等）、特殊指标检测等难以满足 GLP 要求的特殊情况，应尽可能地最大限度遵循 GLP，保证数据的真实、完整、可溯源。

### 三、基本内容

#### （一）证据权重分析评价策略

在药物研究和开发的过程中，需要对其免疫毒性风险进行评估，通常包括：对药物的结构、作用机制、同类药物数据等一般信息进行全面调研；在人和/或动物细胞、组织器官中进行体外或离体试验获得靶向和非靶向免疫效应信息；在相关动物种属中进行体内毒性研究等。一般采用基于 WoE 的风险评估策略，分层开展免疫毒性研究。

对药物潜在免疫毒性风险进行初步评估时，应考虑以下因素：药物的结构、靶点表达模式、药理作用及机制、药物暴露器官或组织、适应症、给药方案、目标用药人群、临床研究信息、同类药物的数据、常规的一般毒理学试验信息（参见附录中 1 部分）等。

若初步评估结果提示药物具有潜在的免疫毒性风险，应进行附加免疫毒性研究；如果不进行附加免疫毒性研究，应提供合理性依据。通常对于具有潜在免疫毒性风险的药物，在采用相关动物种属进行一般毒理学试验时，应根据整合策略尽可能评估免疫器官与相关组织改变、免疫细胞数量和/或功能、免疫活性物质等的改变。

应基于附加免疫毒性研究结果评估开展进一步免疫毒性研究的必要性，如免疫毒性机制研究等。若附加研究提示未发现免疫毒性风险，则不需要开展进一步的研究；若附加研究提示可能存在免疫毒性风险，但无法提供充足的数据进行合理的风险-获益决策，则进一步的研究可能为风险-获益分析提供更充分的信息；如果总体风险-获益分析提示免疫毒性的风险可以接受和/或能够通过临床风险管理计划予以控制，则可能无需开展进一步的研究。

## **（二）免疫毒性非临床评价关注点**

### **1、免疫抑制**

免疫抑制表现为免疫系统的功能下调或免疫监视功能受到干扰。机体的免疫应答作用下调和宿主对病原体的抵抗力下降，可能导致感染发生率升高或罹患肿瘤的风险增加。具有潜在诱导免疫抑制作用的药物一般通过直接抑制或杀伤免疫细胞阻断免疫信号通路，或者通过抑制/激活免疫相关

调节因子等间接作用抑制免疫系统活性。

当药物潜在的免疫抑制来源于药理作用的放大，且药理学试验和/或一般毒理学试验中观察到的效应/反应可以直接预测其在人体的反应时，则不需要附加的免疫毒性研究。当药物的潜在免疫抑制作用特征不明确或已有一般毒理学试验中不能明确免疫系统受影响的特定部分/功能时，应考虑开展附加的免疫毒性研究，评估药物对整体免疫应答功能和/或关键免疫细胞的影响。

免疫抑制可能增加人罹患某些类型肿瘤的风险，具体取决于免疫系统的哪些组分受到抑制以及抑制的程度。免疫抑制引起的肿瘤主要与慢性/潜伏病原体感染失控有关，此外肿瘤免疫监视直接受到干扰也可能导致肿瘤发生风险增加。因此，在评估药物致癌性时应考虑其对免疫系统的影响。现已证实包括啮齿类致癌性试验在内的动物模型在确定免疫抑制导致患者罹患肿瘤风险增加方面的帮助有限。尤其是潜伏的病毒致癌基因、感染因子复发或慢性炎症状态引起的肿瘤风险增加时，显著的种属差异使得临床转化具有挑战性。

通常对于可引起广泛免疫抑制的小分子药物，基于 WoE 评估致癌性风险可能足够。大多数免疫调节的生物制品基于 WoE 进行风险评估也可能足够。这种基于 WoE 的风险评估应包括：药物和药物靶点的相关属性，对免疫细胞亚群的影响，药物促进肿瘤生长和转移的潜力；重点关注与人体的相

关性。应考虑药物对肿瘤免疫监视的关键免疫组分（如 T 细胞、NK 细胞、抗原呈递细胞等）的影响，例如关键免疫细胞群的下调或功能损伤。对于小分子药物，还应包括与药物对免疫系统预期作用不相关的药物特异性毒性（如脱靶作用）的致癌性风险。

对于更具靶向性的免疫系统调节小分子药物，如未产生广泛严重的免疫抑制，则可能需要进行一项或多项啮齿动物致癌性试验。

广泛严重的免疫抑制可能会增加机会性感染风险，可考虑开展宿主抵抗力试验等附加研究以提供更多信息。

## 2、免疫增强

免疫增强表现为机体的免疫应答作用上调。具有增强免疫系统活性的药物，一般通过直接刺激免疫相关信号通路或通过抑制/激活免疫相关调节因子等间接作用激发免疫系统活性，可能引起免疫毒性。例如：细胞因子的过度释放；免疫检查点抑制剂引起的 T 细胞、调节性 T 细胞或抗原递呈细胞等免疫激活导致的非靶器官免疫介导的损伤；基于 Fc 受体的快速清除导致靶细胞迅速耗竭引起广泛免疫激活（伴随或不伴随细胞因子释放）；寡核苷酸激活病原体相关分子模式受体（如 toll 样受体）和/或补体等。对于此类药物进行免疫毒性评估时，应根据作用机制、靶点分子的细胞分布、在

关键细胞（如 T 细胞、DC 细胞）介导直接免疫增强的潜力等相关信息选择合适的检测指标。

由于人和实验动物的免疫系统、免疫应答存在差异，非临床动物种属可能无法充分暴露药物的潜在免疫毒性风险。因此，对于预期可能激活免疫应答（如导致细胞因子过度释放）的药物，在动物体内免疫毒性研究的基础上，通常需要更充分的安全性风险评估和控制。这种情况下，应采用人和/或动物细胞、离体组织器官（如人源免疫细胞）开展相关体外免疫毒性试验。对于可能引起细胞因子释放综合征的药物，应开展细胞因子释放试验，通常采用未被刺激的人源细胞、全血和/或其他基质评估细胞因子过度释放的风险。如果可行，细胞因子释放试验通常应采用固相和液相两种孵育系统进行评价。当药物不直接结合到参与免疫系统激活的表面受体时，通常不需进行细胞因子释放试验。

具有免疫增强毒性风险的药物在拟定临床试验起始剂量时，基于毒理学终点估算的起始剂量可能过高，从而带来较大的临床试验风险。为确保受试者安全，基于最小预期生物学效应剂量（Minimal anticipated biologic effect level, MABEL）或药理学活性剂量（Pharmacologically active dose, PAD）估算起始剂量可能更为合适。

采用 MABEL 或 PAD 拟定起始剂量时，在开始临床试验之前，应获得一系列药理学数据，包括但不限于：利用人



体细胞在体外评估免疫激活、细胞因子释放和配体-受体相互作用，如效应浓度（Effective concentration, EC）或受体占位等；对于潜在引起细胞因子释放综合征的药物，应根据 EC 值预测导致最低药理活性的  $C_{max}$  值。另外，还应考虑采用合适的体内药理/疾病动物模型获得的相关终点数据。对于具有潜在诱导细胞因子过度释放潜能的药物，基于 MABEL 拟定起始剂量可能比 PAD 更为合适，同时应在临床试验期间加强风险监测及控制措施。

除了上述靶向或药理作用相关的免疫激发/免疫增强外，非靶向的免疫刺激可能会激发超敏反应，如由 IgE 介导的 I 型超敏反应、由 IgG/IgM 介导的 II、III 型超敏反应、T 细胞介导的 IV 型超敏反应等。药物也可通过非 IgE 依赖途径诱导肥大细胞脱颗粒，引起类过敏反应。对于全身过敏反应，目前尚无公认的可充分评价这种潜在风险的标准非临床研究方法，但仍可尝试基于作用机制设计科学合理的试验。例如对于药物介导的类过敏反应，补体激活或者肥大细胞/嗜碱性粒细胞激活等体外试验在风险评估中可能是有价值的。可综合各项安全性研究数据，采用 WoE 的方法对超敏反应风险进行评估。

### 3、免疫系统发育毒性

当药物具有潜在免疫毒性风险，可能对正在发育中的免

疫系统产生不良影响，且现有数据不足以为目标用药人群的风险-获益评估提供支持时，应提供附加的数据以评估这种风险。当药物在子代中具有足够暴露时，可在生殖毒性试验（如 PPND 或 ePPND）中对免疫系统发育毒性进行评价。当 PPND/ePPND 试验不能充分暴露免疫发育毒性风险时，则可能需要开展幼龄动物直接给药的毒性研究（具体可参考 ICH S5 和 ICH S11）。拟用于治疗晚期肿瘤患者的药物，一般不需要开展围产期发育毒性试验和幼龄动物试验。

若需开展试验以评价免疫系统发育毒性风险，应采用相关动物种属，并基于不同动物种属免疫系统发育时间的差异，采用合适的给药方案以覆盖预期的发育时期以及入组儿科患者的预期年龄。应科学合理地设置免疫相关终点，可考虑以下指标：整体免疫功能（如 TDAR 试验）；免疫表型分析；NK 细胞活性、巨噬细胞/中性粒细胞功能、T 淋巴细胞功能等。

### **（三）免疫毒性研究方法的选择**

如果证据权重分析提示需要进行附加免疫毒性研究，应根据药物特性、前期免疫学研究结果等因素选择合适的研究方法。通常，可在一般毒理学试验中观察免疫器官与相关组织、免疫细胞数量和/或功能、免疫活性物质等的改变。当靶细胞不明确时，建议进行整体免疫功能性检测，如 TDAR 试

验。当体内毒性试验中受影响的细胞类型不确定是否参与了TDAR，对此类特定受影响细胞类型可能需要进行功能测定试验。

除附录中推荐的研究方法外，附加免疫毒性研究有时需要根据药物作用性质和免疫毒性风险采用其他研究方法。一般应选择已经广泛使用且被证明对已知免疫反应（增强或抑制）有足够敏感性和特异性的免疫毒性研究方法。如采用新的检测方法，应进行合理的方法学验证。

#### **（四）免疫毒性非临床研究的时间安排**

对于创新药物，免疫毒性非临床研究应采用上文所述基于风险、证据权重分析策略分阶段开展。对于经过基于作用机制、用药人群、同类药物信息、一般毒性等因素的WoE评估后需要开展附加免疫毒性研究的药物，建议采用整合策略，尽早在一般毒理学试验中增加免疫相关指标检测，以获得免疫相关风险评价信息。对于免疫增强/激发类药物，在临床试验开展前进行体外细胞因子释放试验等研究有助于临床起始剂量拟定以及设计更为严谨的临床风险管理计划。如果目标用药人群是处于免疫低下状态的患者，免疫毒性研究应在药物开发的早期进行。在临床试验期间，应基于前期研究结果、免疫毒性风险以及临床试验类型，在必要时开展更多的免疫毒性研究，以充分提示药物潜在毒性风险，为临床试验

免疫系统监测指标提供信息。一般应在药物应用于大规模人群（通常为Ⅲ期临床试验）之前，根据评价需求完成充分的附加免疫毒性研究。当附加免疫毒性研究结果为阳性时，若经评估需开展进一步免疫毒性研究，可根据药物作用性质和临床试验类型确定相关研究的时间安排。

#### 四、参考文献

- [1] ICH S8: Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals. 2005.
- [2] CDER, FDA. Nonclinical Evaluation of the Immunotoxic Potential of Pharmaceuticals Guidance for Industry. 2023.
- [3] ICH S1B(R1): Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. 2022.
- [4] ICH S5(R3): Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals. 2020.
- [5] ICH S11: Nonclinical Safety Testing in Support of Development of Paediatric Pharmaceuticals. 2020.
- [6] NMPA. 药物免疫原性研究技术指导原则. 2020.

## 五、附录

### 免疫毒性评价方法

#### 1、一般毒理学试验

对药物潜在免疫毒性进行初步评估时应考虑常规的一般毒理学试验信息。为发现免疫毒性指征，在一般毒理学试验中需评价下表中所列的指标。

指标	特定评价参数
血液学	白细胞总数和白细胞分类计数
血生化	球蛋白水平 <sup>1</sup> 和白蛋白/球蛋白比值
大体病理学	淋巴器官/组织
脏器重量	胸腺、脾脏（可选：淋巴结）
组织病理学	胸腺、脾脏、引流淋巴结和至少一个额外的淋巴结、骨髓 <sup>2</sup> 、Peyer's 结 <sup>3</sup> 、支气管相关的淋巴组织和鼻相关的淋巴组织 <sup>4</sup>

<sup>1</sup> 当出现无法解释的球蛋白水平变化时，需检测免疫球蛋白。

<sup>2</sup> 无法解释的外周血细胞变化或造血相关的组织病理学变化提示可能需要进行骨髓细胞学评价。

<sup>3</sup> 仅限于经口给药。

<sup>4</sup> 仅限于吸入剂或鼻腔给药。

#### 1.1 血液学和血生化

推荐将白细胞总数和白细胞分类计数用于免疫毒性评

价。当评价球蛋白水平的变化时，应考虑到其他因素的影响（如肝肾毒性）。血清球蛋白水平的变化可提示血清免疫球蛋白水平发生变化。在特定情况下，检测免疫球蛋白水平有助于更好地了解药物的靶细胞或作用机制。

## 1.2 大体病理学观察和脏器重量

剖检时应尽可能评价所有淋巴组织的大体病理学变化。但啮齿类动物的 Peyer's 结很小，通常难以进行大体评价。应记录脾脏和胸腺的重量。为尽量减少非啮齿类动物脾脏重量的误差，动物解剖时应放血完全。胸腺随着年龄的增长而萎缩会对获得准确的胸腺重量造成影响。

## 1.3 组织病理学检查

脾脏和胸腺的组织病理学变化应被视为系统免疫毒性的指征。应对引流淋巴组织或接触给药部位（暴露于最高浓度药物）的淋巴组织进行检查。经口给药时包括 Peyer's 结和肠系膜淋巴结；吸入给药时包括支气管相关淋巴组织（BALT）；吸入或鼻腔给药（如果可能）时包括鼻相关淋巴组织（NALT）；经皮、肌肉、皮内、鞘内或皮下给药时包括邻近部位的引流淋巴结。应根据经验选择应进行检查的特定淋巴结和额外的淋巴结。对于静脉给药的药物，脾脏可被视为引流淋巴组织。

在记录淋巴组织的变化和报告药物相关的变化时，推荐对淋巴组织不同区室的变化进行半定量描述。

## 1.4 应激相关改变的解释

在一般毒理学试验中，最大耐受剂量或接近最大耐受剂量能够导致与应激相关的免疫系统的变化（如放大的药理学作用）。这些对免疫系统的作用可能由皮质酮或皮质醇释放增加或其他介质引起。通常观察到的应激相关的免疫学变化包括外周血中性粒细胞增加、淋巴细胞减少、胸腺重量减轻、胸腺皮质细胞减少和相关的组织病理学变化，以及脾脏和淋巴结的细胞构成的变化。此外，还可能观察到肾上腺重量增加和/或肾上腺皮质增生的组织病理学变化。伴有临床症状（如体重减轻和活动减少）的胸腺重量减轻通常也可归因于应激。上述指标的单独改变并不能充分证明为应激相关的免疫毒性。仅在有充分证据说明出现的免疫学变化与应激相关时，才可以不进行附加免疫毒性研究。

## 2、附加免疫毒性研究

应基于证据权重分析的策略，选择合适的方法分层开展附加的免疫毒性非临床研究。

### 2.1 免疫细胞数量和比例检测

对免疫细胞亚型的鉴定和计数即免疫表型分析，通常采用流式细胞术、免疫组织化学(IHC)或免疫荧光(IF)方法。流式细胞术是对全血、外周血单个核细胞(PBMC)或从淋巴组织分离的免疫细胞进行免疫表征的常用检测方法，可对单核细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、NK细胞、DC细胞、

巨噬细胞、中性粒细胞等进行计数，还可检测免疫细胞表面标志物的变化，评估免疫器官如脾脏、胸腺和/或淋巴结 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞或其他亚群的数量及比值。免疫表型分析可整合到常规的一般毒理学试验中或与 TDAR 试验平行进行，但应考虑与 T 细胞依赖性抗原给药相关的免疫表型的样本采集时间点，以避免混杂效应，可设计不同的检测时间点监测其动态变化。

## 2.2 免疫细胞功能和免疫活性物质检测

通常采用体外人源细胞或离体组织等评估药物对各种免疫细胞功能的影响，包括评估细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 活性、NK 细胞活性，抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖的细胞毒性 (CDC)，体外淋巴细胞活性和增殖，巨噬细胞/中性粒细胞功能，血小板功能等。

可考虑在体内、体外多种水平进行免疫活性物质的检测以辅助评估药物的免疫毒性，如检测 IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子的变化等。体外细胞因子释放的具体评价方法可参考《药物免疫原性研究技术指导原则》。

根据具体情况，可考虑检测血清中的 C3/C3a、C4/C4a 等补体水平、免疫球蛋白水平以及其他免疫活性物质（例如趋化因子等）。

## 2.3 免疫系统整体功能性检测



T 细胞依赖性抗体反应 (TDAR) 可评价药物对巨噬细胞/DC 细胞和/或 B 细胞的抗原递呈功能、辅助 T 淋巴细胞激活、B 淋巴细胞抗体产生等一系列 T 细胞依赖抗体反应的整体性影响，是检测免疫抑制作用的重要方法之一，也可用于检测免疫增强作用。可单独开展 TDAR 试验，当合适时也可整合于一般毒理学试验中。可采用酶联免疫吸附试验 (ELISA)、电化学发光分析法 (ECLA) 或其他方法测定血液中的抗体来评价 T 细胞依赖性抗体反应。

宿主抵抗力试验是评价机体对病原体 (细菌、真菌、病毒和寄生虫) 或肿瘤细胞的抵抗能力的方法，可能有助于对免疫抑制类药物的免疫毒性 (固有免疫、适应性免疫和免疫系统内环境稳态) 进行整体评估。常用于宿主抵抗力评价的病原体包括：单核细胞增多性李斯特菌、肺炎链球菌、白色念珠菌、流感病毒、巨细胞病毒、约氏疟原虫和旋毛虫等，小鼠肿瘤宿主抵抗力模型常用 B16F10 黑色素瘤和 PYB6 肉瘤细胞系。