

国际人用药品注册技术协调会

ICH 三方协调指导原则

人用药物免疫毒性研究指导原则

S8

2005年9月15日

ICH 现行第四阶段版本

按照 ICH 进程，本指导原则由相应的 ICH 专家工作组制定，已递交管理部门征求意见。在 ICH 进程第四阶段，最终草案被推荐给欧盟、日本和美国的监管机构采纳。

ICH 三方协调指导原则

在 2005 年 9 月 15 日召开的 ICH 指导委员会会议上 ICH 进程进入第四阶段，本指导原则被推荐给 ICH 三方监管机构采纳。

目录

| | |
|-----------------------------------|----|
| 1. 前言 | 3 |
| 1.1 目的 | 3 |
| 1.2 背景 | 3 |
| 1.3 适用范围 | 4 |
| 1.4 概述 | 4 |
| 2. 指导原则 | 4 |
| 2.1 评价潜在免疫毒性时应考虑的因素 | 4 |
| 2.1.1 常规毒性研究 | 5 |
| 2.1.2 药理性质 | 6 |
| 2.1.3 目标用药人群 | 6 |
| 2.1.4 结构相似性 | 6 |
| 2.1.5 药物处置 | 6 |
| 2.1.6 在临床试验或临床使用中观察到的指征 | 6 |
| 2.2 证据权重分析 | 6 |
| 3. 附加的免疫毒性研究的选择和设计 | 6 |
| 3.1 目的 | 6 |
| 3.1 试验方法的选择 | 7 |
| 3.2 研究设计 | 7 |
| 3.3 对附加的免疫毒性研究和进一步研究的必要性的评价 | 7 |
| 3.4 与临床研究相关的免疫毒性试验的时间安排 | 8 |
| 4. 参考文献 | 8 |
| 图 1: 推荐的免疫毒性评价的流程图 | 9 |
| 附录: 免疫毒性评价方法 | 10 |

人用药物免疫毒性研究

1. 前言

1.1 目的

本指导原则的目的在于提供（1）关于鉴别具有潜在免疫毒性的化合物的非临床试验方法的建议和（2）关于免疫毒性试验证据权重决策方法的指导。本指导原则中免疫毒性是指非预期的免疫抑制或免疫增强，不包括药物引起的过敏反应和自身免疫。

1.2 背景

人用药物对免疫系统潜在的不良反应的评估应包含在规范的药物开发中。免疫系统毒性包括多种不良反应，这些不良反应包括对免疫应答的抑制或增强。免疫应答抑制能够导致宿主对病原体或肿瘤细胞的抵抗力下降。免疫应答增强能够放大自身免疫性疾病或超敏反应。药物或药物-蛋白加合物也可能被机体识别为异物从而激发抗药反应，后续的药物暴露能够导致超敏（过敏性）反应。过去，大量科学研究、方法开发和验证性工作致力于评价候选化合物潜在的免疫抑制或接触致敏作用。目前尚无标准的试验方法用于检测由人用药物引起的呼吸系统或全身性的变应原性（抗原性）或药物特异性的自身免疫反应；也尚无任何地区要求检测上述终点。皮肤过敏性试验方法无区域性分歧。

免疫抑制或增强可能与以下两类截然不同的药物有关：1）对于以调节免疫功能（如抑制器官移植排斥反应）为治疗目的的药物，免疫抑制作用可能是其药效学作用的放大。

2）对于不以影响免疫功能为治疗目的的药物，其免疫毒性可能是因为引起免疫细胞的坏死或凋亡，或药物与靶组织和非靶免疫细胞共有的细胞受体反应。

用于治疗癌症的抗细胞增殖药物是一类可以引起非预期免疫抑制的药物。在这类情形下，非临床研究中发现的毒性反应可以相当程度地预测此类药物的人体免疫毒性。也就是说，此类药物的风险评价可能不需要通过特定的试验来确定免疫毒性，因为此类药物的靶组织通常为快速分裂的细胞，如骨髓来源的免疫系统祖细胞。因此，此类药物对免疫功能的不良影响可以通过其药理学活性进行预测，通常在非临床研究中能够被准确地评价。对于其它类型的不以抑制免疫反应为治

疗目的的化合物，放大的药效学作用和非靶作用之间的差异相对模糊。例如，有些抗炎症化合物对某些固有免疫功能有影响，但并不一定影响适应性免疫反应。

1.3 适用范围

本指导原则旨在为人用药物的免疫毒性非临床试验提供建议。其内容仅限于非预期的免疫抑制和免疫增强，不包括过敏反应或药物特异性自身免疫。

本指导原则适用于拟用于人的新药，以及已上市药品申请新适应症或者基于当前说明书申请产品变更,该变更可能引起未知和相关的免疫毒性。另外，本指导原则可能也适用于在临床试验期间或上市后使用过程中观察到免疫毒性症状的药物。本指导原则不适用于 ICH S6 指导原则中涉及的生物技术药物和其它生物制品。

现有的关于致敏和超敏反应的指导原则依然有效，不受本文件的影响。本指导原则不涉及对每一项免疫毒性试验的具体指导，一般的方法学指导可参见附录。

1.4 概述

本指导原则的基本原则：

1) 对于所有新的人用药物，均应评价其是否具有潜在的免疫毒性。

2) 研究方法包括常规毒性研究（STS）以及适当的附加免疫毒性研究。应通过对相关因素（见 2.1 部分）的证据权重分析来决定是否需要进行附加免疫毒性研究。

下文将按照流程图（图 1）中推荐的免疫毒性评价决策过程对本指导原则进行介绍。关于试验方法的更详细介绍见附录。

2. 指导原则

2.1 评价潜在免疫毒性时应考虑的因素

提示需进行附加免疫毒性研究的考虑因素包括：（1）常规毒性研究结果；（2）药物的药理性质；（3）目标用药人群；（4）与已知免疫调节剂的结构相似性；（5）药物的体内处置；（6）临床信息。

潜在免疫毒性的初步评价信息来自常规毒性研究，啮齿类和非啮齿类动物的早期短周期和更长周期重复给药试验的研究结果均应考虑。应进行评价的指标和组织病理学报告的详细信息见附录。

2.1.1 常规毒性研究

应通过评价常规毒性研究数据来发现药物潜在免疫毒性指征。这些应当被考虑的指征包括：

1) 血液学变化，如白细胞减少/增多、粒细胞减少/增多或淋巴细胞减少/增多；

2) 免疫器官重量和/或组织学改变（如胸腺、脾脏、淋巴结和/或骨髓的改变）；

3) 血清球蛋白水平的改变，在缺少如对肝脏或肾脏影响等合理解释的情况下，可能提示血清免疫球蛋白发生改变；

4) 感染发生率升高；

5) 肿瘤发生率的升高，在缺少如遗传毒性、激素作用或肝酶诱导等合理解释的情况下，可能被视为免疫抑制的表现。

上述指标的改变能够反映出免疫系统受到抑制或作用增强。免疫抑制通常表现为免疫指标数值的降低，而免疫增强通常表现为免疫指标数值的提高。但这些关系并不是绝对的，某些情况下可能相反。

与评价其它器官系统的毒性风险类似，对免疫毒性的评价应包括如下内容：

改变的统计学意义和生物学意义；

影响的严重程度；

剂量/暴露量关系；

超过临床拟用剂量的安全系数；

给药周期；

受到影响的动物种属和评价指标的数量；

可能继发于其它影响因素（如应激，见附录 1.4 部分）的改变；

可能的靶细胞和/或作用机制；

引起免疫相关指标改变的剂量与其它毒性剂量的关系；

影响的可逆性。

2.1.2 药理性质

如果受试物的药理性质提示其可能影响免疫功能（如抗炎药物），应考虑进行附加的免疫毒性研究。在采用证据权重法决策是否需要进行附加的免疫毒性研究时，从非临床药理学研究中获得的关于化合物对免疫系统的影响信息可作为证据。

2.1.3 目标用药人群

如果大部分目标用药人群因疾病状态或因同步治疗而处于免疫功能低下状态，则可能需要进行附加的免疫毒性研究。

2.1.4 结构相似性

与已知免疫抑制剂结构类似的化合物应考虑进行附加的免疫毒性研究。

2.1.5 药物处置

如果化合物和/或其代谢产物在免疫细胞中持续保持较高浓度，应考虑进行附加的免疫毒性研究。

2.1.6 在临床试验或临床使用中观察到的指征

当临床研究结果提示药物对患者有免疫毒性作用时，应进行附加的非临床免疫毒性研究。

2.2 证据权重分析

应基于上述所有考虑因素获得的信息进行证据权重分析，以确定是否存在免疫毒性方面的担忧。当上述单一因素具有足够的证据强度时，应进行附加的免疫毒性研究。当两个或多个因素提示有潜在免疫毒性时，即使单一因素证据并不充分，也同样有必要进行附加研究。如果未进行附加免疫毒性研究，申请人应阐述理由。

3. 附加的免疫毒性研究的选择和设计

3.1 目的

当确实存在担忧时，应进行附加的免疫毒性研究以验证化合物潜在的免疫毒性。这些研究也有助于确定受影响的细胞类型、影响的可逆性和作用机制。此类信息也有助于进一步了解药物的潜在风险，也可能有助于临床试验中生物

标志物的选择。

3.1 试验方法的选择

如果证据权重分析提示有必要进行附加的免疫毒性研究，有多种试验方法可供选择。如果常规毒性研究提示存在免疫毒性，应根据观察到的免疫学改变的性质和化合物类别相关的担忧决定采用何种适用的附加免疫毒性试验方法。推荐进行免疫功能研究，如 T 细胞依赖性抗体反应试验（T-cell dependent antibody response, TDAR）。如果常规毒性研究中受影响的细胞类型已知不参与 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（见附录）。当靶细胞不明确时，推荐进行免疫功能试验，如 TDAR 试验。

另外，白细胞的免疫表型检测（非功能性试验）可用于鉴别受影响的细胞亚群，并可提供有用的临床生物标志物。

3.2 研究设计

对药物诱导的免疫毒性进行评估时，普遍接受的试验设计是在啮齿动物中开展连续 28 天给药研究。也有人提出在免疫毒性研究中使用非啮齿类动物。如果在常规毒性研究中发现对免疫系统的不良影响，在附加的免疫毒性研究中，动物种属、品系、剂量、给药期限和给药途径应尽可能与常规毒性研究一致。研究通常应使用两种性别的动物（非人灵长类动物除外），使用单一性别的动物时应有合理依据。高剂量应高于未见不良反应剂量（no observed adverse effect level, NOAEL），但低于引起应激反应的剂量（见附录 1.4 部分）。推荐设计多个给药剂量，以确定剂量-反应关系和未见免疫毒性剂量。

3.3 对附加的免疫毒性研究和进一步研究的必要性的评价

应对附加的免疫毒性研究结果进行评价，以确定是否有足够的证据可合理确定受试物的免疫毒性风险。

1. 附加研究可能显示未发现免疫毒性风险，无需进行进一步研究。

2. 附加研究可能显示存在免疫毒性风险，但无法提供充足的数据进行合理的风险-获益决策。在这种情况下，进一步的试验可能有助于为风险-获益决策提供充分的信息。

3. 如果总体风险-获益分析提示免疫毒性的风险是可以接受的和/或能够通过风险控制计划（见 ICH E2E 指导原则）予以控制，则可能无需进行进一步的动物试验。

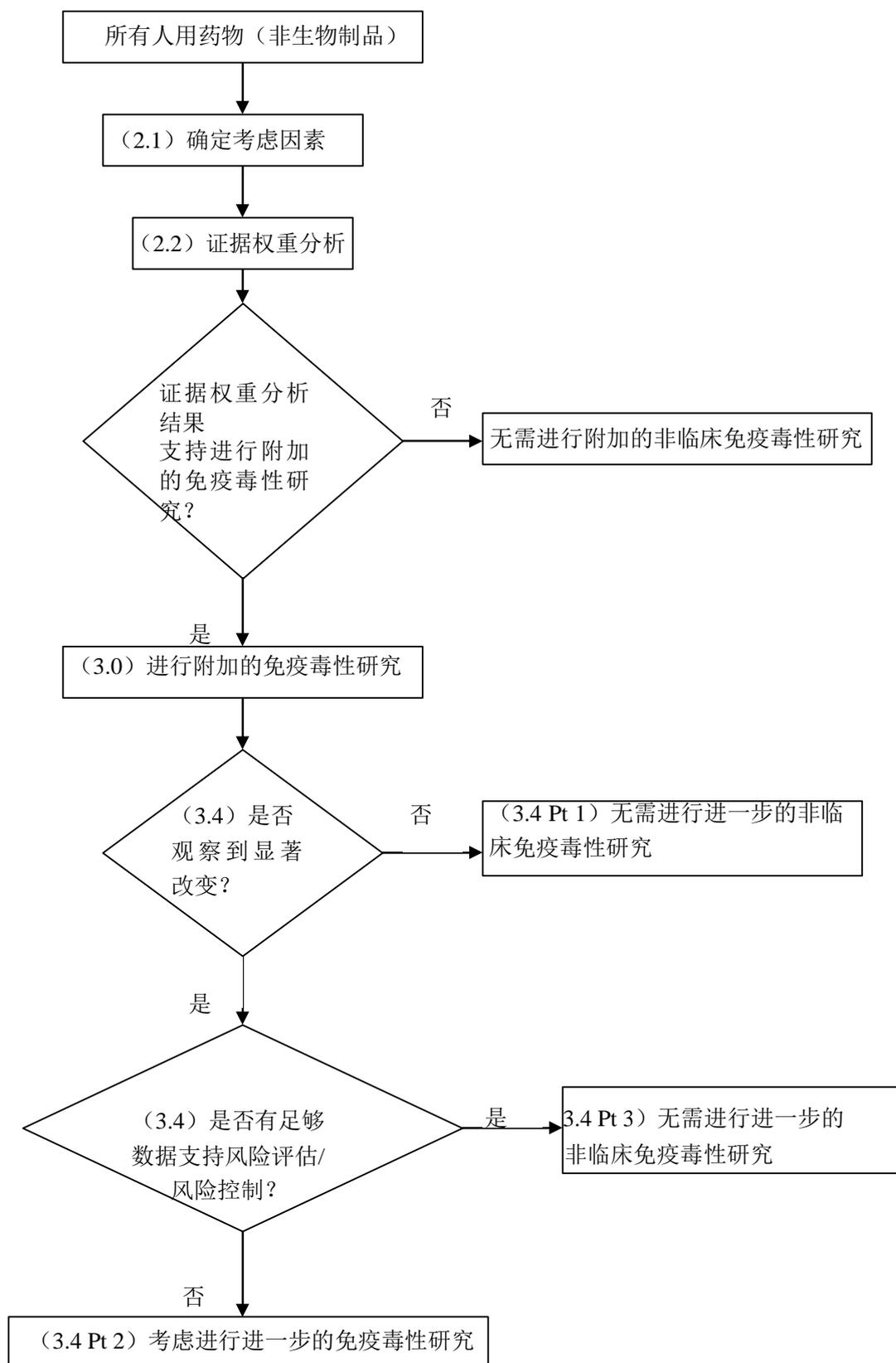
3.4 与临床研究相关的免疫毒性试验的时间安排

如果证据权重分析显示需要进行附加的免疫毒性研究，这些研究应在受试物应用于大规模人群（通常为III期临床试验）之前完成。适当时可以为临床试验提供用于检测免疫系统的指标。附加的免疫毒性研究的时间安排取决于受试物作用的性质以及如果附加的免疫毒性试验出现阳性结果而需要开展的临床试验类型。如果目标用药人群是免疫功能低下的患者，免疫毒性研究可以在药物开发的早期进行。

4. 参考文献

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline (S6) “Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals”
2. ICH Harmonised Tripartite Guideline (E2E) “Pharmacovigilance Planning”

图 1：推荐的免疫毒性评价的流程图



附录：免疫毒性评价方法

1. 常规毒性研究

为发现免疫毒性指征，在常规毒性试验中需评价下表中所列的指标。这些指标（除血液学和临床生化外）以及获取样本和评价组织切片的方法详见专业毒性病理学会的相关文件。

| 指标 | 具体内容 |
|-------|---|
| 血液学 | 白细胞总数和绝对白细胞分类计数 |
| 临床生化 | 球蛋白水平 ¹ 和白蛋白/球蛋白比值 |
| 大体病理学 | 淋巴器官/组织 |
| 器官重量 | 胸腺、脾脏（可选：淋巴结） |
| 组织学 | 胸腺、脾脏、引流淋巴结和至少一个额外的淋巴结、骨髓 ² 、Peyer's结 ³ 、支气管相关的淋巴组织 ⁴ 和鼻相关的淋巴组织 ⁴ |

¹ 当出现无法解释的球蛋白水平变化时，需检测免疫球蛋白。

² 无法解释的外周血细胞变化或组织病理学发现可能提示对骨髓细胞进行评价。

³ 仅限于经口给药。

⁴ 仅限于吸入剂或鼻腔给药。

1.1 血液学和临床生化

推荐将白细胞总数和绝对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，应考虑到其它因素的影响（如肝毒性、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。虽然血清免疫球蛋白并不是免疫抑制的敏感指标，但在特定情况下，免疫球蛋白水平检测有助于更好地了解药物的靶细胞或作用机制。

1.2 大体病理学和器官重量

剖检时应评价所有淋巴组织的大体病理学改变。但啮齿类动物的 Peyer's 结由于很小而难以进行大体评价。应记录脾脏和胸腺的重量。为尽量减少犬和猴脾脏重量的误差，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改变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。经口给药时这些淋巴组织包括 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。申请人应根据经验自行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。

在记录淋巴组织的改变和报告给药相关的改变时，推荐对淋巴组织不同区域的改变进行半定量描述。

1.4 应激相关改变的解释

在常规毒性研究中，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改变（如放大的药效学作用）。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它介质引起。通常观察到的应激相关的免疫学改变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改变，以及脾脏、淋巴结的细胞构成的改变。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学证据。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可归因于应激所致。上述指标的单独改变并不能充分证明出现应激相关的免疫毒性。有充分证据说明出现的免疫学改变与应激相关时，才可以不进行附加的免疫毒性研究。

2. 附加的免疫毒性研究

2.1 试验特点和试验验证

一般而言，应选择已广泛使用且已证明对已知免疫抑制剂有足够的敏感性和特异性的免疫毒性试验方法。然而某些情况下，所选择的试验方法可能尚未完成充分验证和/或尚未被广泛使用。在这些情况下，需要提供使用该方法的科学性和机制性方面的依据，如果有可能，试验中需设置合适的阳性对照。

在不同试验室进行的每项免疫毒性试验，其结果都可能存在差异。在大部分情况下，这些变化并不影响该试验方法对免疫毒性的评价能力。然而，为了保证

试验操作的正确和熟练，试验中应对一些常规的方法学验证参数进行考察。这些参数包括批内和批间精密度、不同技术人员操作之间的精密度、检测限、定量线性范围和样品的稳定性。另外，还应确认试验方法对已知免疫抑制剂的敏感性。建议每个实验室在检测受试物的同时设立阳性对照或定期对阳性对照进行检测，以证明试验操作的准确性（灵长类动物试验除外）。对于免疫表型分析，如果试验方法经过了适当的验证，可能没有必要对每个研究设置阳性对照。

免疫毒性研究应尽量执行 GLP 规范，但有一些试验（如下所述）可能不能完全执行 GLP 规范。

2.2 T 细胞依赖性抗体反应（TDAR）

TDAR 试验应采用公认的 T 细胞依赖性抗原，如可以引起强抗体反应的绵羊红细胞（SRBC）或钥孔戚血蓝蛋白（KLH）。应证明所选择的试验评价指标对于所选择的试验和动物种属是最适合的。

免疫用抗原不应与未获得验证的佐剂一同使用。铝佐剂仅被接受用于非人灵长类动物试验。TDAR 反应具有动物品系依赖性，在小鼠表现得更为明显。在远交系大鼠中，即使同一组的动物也可能存在较大差异。近交系大鼠可用于提供充分的暴露量数据以便与常规毒性试验中采用的品系进行桥接。

可采用 ELISA 或其它免疫学方法测定抗体。与抗体形成细胞反应相比，该方法的优点之一在于试验中能够连续采集样品。在猴试验中，由于动物间抗体响应力学存在高度变异，连续采集血样非常重要。对于这些试验，数据可采用不同取样点抗体响应之和（如曲线下面积）表示。

如果在 ELISA 试验中使用绵羊红细胞，酶标板上包被的捕获抗原的制备非常重要。整体固定的红细胞或细胞膜制品可以作为 SRBC 的捕获抗原。ELISA 试验结果可用浓度或滴度表示，但不推荐以吸光度表示。

2.3 免疫表型分析

免疫表型分析指采用抗体进行白细胞亚型的鉴定和/或白细胞亚型的计数。免疫表型试验通常采用流式细胞术或免疫组织化学方法。

流式细胞术用于特定细胞群计数时不属于功能性检测。然而，流式细胞术可用来测定淋巴细胞的抗原特异性免疫应答。外周血细胞流式分析数据能够与临床试验中外周血白细胞分析数据进行桥接。推荐采用淋巴细胞亚型的绝对数

量和百分比对给药相关的变化进行评价。

与流式细胞术相比，免疫组化的优点之一在于，如果常规毒性试验中发现免疫毒性指征，可对相关组织进行回顾性分析。另外，能够观察到淋巴组织中某一特定区域的细胞类型的改变。某些动物种属中的一些淋巴细胞标志物对甲醛固定敏感，只能在采用特定固定剂或速冻固定的组织中检测到。免疫组化方法难以对淋巴细胞数量和染色强度进行定量。

当采用免疫表型研究表征或鉴别特定白细胞群的变化时，应根据观察到的变化选择待评价免疫器官和/或外周血。免疫表型研究易于结合常规重复给药毒性研究进行，在给药期和恢复期均可以检测免疫表型的变化。

2.4 自然杀伤细胞（NK）活性检测

如果免疫表型分析显示自然杀伤（NK）细胞数量发生变化，或常规毒性试验发现病毒感染率升高，或基于其它一些原因，可进行自然杀伤细胞活性试验。通常，NK 细胞试验采用已经给予受试物的动物组织（如脾脏）或血样进行离体试验。将制备的效应细胞与⁵¹Cr 标记的靶细胞共同培养。如果经过充分验证，也可以使用非放射性标记的新试验方法。对于每一个试验，应考察不同的效应细胞/靶细胞比，以获得足够多的细胞毒性作用浓度，并绘制曲线。

2.5 宿主抵抗力研究

宿主抵抗力研究是在对小鼠或大鼠给予不同剂量的受试物后，再用不同浓度的病原体（细菌、真菌、病毒、寄生虫）或肿瘤细胞进行攻击。通过比较溶媒对照组和受试物组的病原体感染情况或肿瘤负荷情况，判断受试物是否能改变宿主的抵抗力。已经建立了多种病原体模型用于评价宿主抵抗力，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目前使用 B16F10 黑色素瘤和 PYB6 肉瘤细胞系。

宿主抵抗力试验可以提供宿主对特定类型的病原体或肿瘤细胞敏感性方面的信息，也能够对风险管理计划产生影响。另外，此类试验对鉴别和确定受试物所影响的细胞类型有重要作用。宿主抵抗力试验涉及到受试物对固有免疫机制的影响，而目前尚无测试固有免疫的方法。在进行宿主抵抗力试验的过程中，研究者应仔细考虑受试物对病原体或肿瘤细胞的生长和致病性的影响是直接作用还是间接作用（非免疫介导的）。例如，能抑制特定肿瘤细胞增殖的受试物

可表现为提高宿主抵抗力。此时推荐进行体外试验考察受试物对病原体的直接作用。

2.6 巨噬细胞/中性粒细胞功能

一些种属的巨噬细胞和中性粒细胞功能体外试验（吞噬作用、氧化爆发、趋化作用和溶细胞活性）已有报道。这些试验可用于评价在体外暴露于受试物或来自给药动物（离体试验）的巨噬细胞/中性粒细胞的功能，还可以在体外研究受试物的暴露量。体内试验也可用于评价受试物对网状内皮细胞吞噬放射性标记靶细胞或荧光标记靶细胞能力的影响。

2.7 测定细胞免疫的试验

与测定抗体应答不同，目前测定细胞免疫的试验方法尚未充分建立。一些通过抗原致敏的体内试验，其试验终点为药物调节激发反应的能力。有报道采用小鼠或大鼠进行蛋白接种和激发的迟发型过敏（DTH）反应。已开发出接触性致敏剂诱导的小鼠模型，但尚未经充分的验证或广泛使用。采用病毒、肿瘤细胞系或异体移植物作为激发抗原，小鼠可以产生细胞毒性 T 细胞反应。也有猴 DTH 反应的报道，但这些反应在猴中很难稳定地重现。另外，应该确保 DTH 反应不被误认为是抗体和补体介导的 III 型变态反应（Arthus 反应）。