

# 疫苗临床试验抗体分析方法研究技术指导 原则（征求意见稿）

药品审评中心

2020年11月

# 目录

一、前言 .....	4
二、一般原则 .....	5
三、分析方法的建立.....	6
(一) 方法选择的一般考虑 .....	6
(二) 方法建立时关键要素的考虑.....	7
四、抗体分析方法的验证 .....	12
(一) 验证的一般考虑.....	12
(二) 对验证指标的一般要求及建议.....	15
五、制定方法的 SOP.....	20
六、方法的实施.....	20



# 疫苗临床试验抗体分析方法研究技术指导原则

## 一、前言

疫苗研发是一个复杂而漫长的过程。免疫原性是疫苗研发各个阶段（从临床前疫苗候选物的免疫原性评价到临床研究及上市后研究）及疫苗有效性评价时需要关注的重要指标之一。疫苗大多是通过刺激机体产生特异性抗体而发挥其预防作用。因此，抗体分析方法的研究亦是疫苗研发的重要内容之一。在疫苗研发早期就应同步考虑开展抗体分析方法研究，建立能够有效评价免疫原性的分析方法，并对方法进行验证。研发单位可自行建立和验证抗体分析方法，也可委托具有相关资质或质量保证体系的实验室进行。

创新型疫苗研发时，现有的抗体分析方法可能无法适用，需要结合疫苗的特点重新建立新的抗体分析方法。为了指导和规范创新型疫苗的抗体分析方法研究，特制定本指导原则，希望能为建立新的抗体分析方法提供建议。该指导原则中有关方法学验证部分的相关内容同样适用于目前已有的抗体分析方法。

18 本指导原则仅针对疫苗临床试验中抗体分析方法的建  
19 立和验证提出一般要求，细胞免疫分析方法不在讨论范围内。  
20 由于疫苗类药品具有复杂性和多样性的特点，其免疫学分析  
21 方法也多种多样，研发单位可参照本原则的精神和一般要求，  
22 采取具体问题具体分析的方法，确定适宜的研究方案。

23 本指导原则仅代表当前的观点和认识，仅为业界提供参  
24 考，不具有强制性的法律约束力。随着行业的发展和监管经  
25 验的积累，相关要求将不断修订和完善，鼓励各方与药监机  
26 构进行沟通。

## 27 二、一般原则

28 方法研究应遵循“以终为始”的理念，基于方法的预期  
29 目标设计研究方案。抗体分析方法研究是确定该方法的设计  
30 与操作适用于疫苗特异性抗体检测的过程，且是不断发展完  
31 善的。

32 方法验证是对该分析方法的评价，是通过一系列实验室  
33 研究来证明所使用的分析方法的性能参数符合期望的分析  
34 应用要求的过程。疫苗抗体分析方法的验证具体是指证明该

35 方法能在复杂的生物基质（血清或血浆）中稳定、可靠、准  
36 确地检测出疫苗特异性抗体的过程。

37 验证的程度取决于疫苗开发的阶段和分析方法的重要  
38 性。对于临床开发的早期阶段，可选择部分验证指标。对于  
39 应用于关键研究和上市后研究的分析方法则要经过全面验  
40 证。

### 41 三、分析方法的建立

#### 42 （一）方法选择的一般考虑

43 疫苗临床试验中常用的抗体分析方法一般包括：标记免  
44 疫试验、中和试验、沉淀试验、凝集试验以及补体参与的试  
45 验等。免疫原性分析方法的选择应基于所检测抗体的类型及  
46 特点（结合抗体、中和抗体及抗体水平、亲和力等）、对应抗  
47 原物质的特点（颗粒性抗原、可溶性抗原等）和检测的目的  
48 （定性、半定量、定量）等确定。必要时，还需考虑自然感  
49 染和疫苗免疫抗体的差异。

50 对于创新型疫苗，保护效力与免疫原性的相关性尚未确  
51 定，在早期研究中应选择多个免疫原性指标进行探索。在进

52 入临床研究时应至少已建立一种可用于抗体水平初步评估  
53 的分析方法，以利于早期临床试验中疫苗剂量的选择。在注  
54 册临床试验之前还应建立一种用于检测功能性抗体的方法，  
55 并经过验证。

## 56 (二) 方法建立时关键要素的考虑

57 分析方法的建立应具有充分的理论基础，并阐释清楚，  
58 包括但不限于检测抗体针对的免疫原或者表位信息、检测方  
59 法的原理、检测关键原料和过程等内容。若新建方法与同类  
60 疫苗公认评价方法不同，还应考虑方法间的相关性。

61 分析方法的主要原材料、试剂及其使用条件和剂量应经  
62 过选择并最终确认。原材料及试剂应来源清晰、质量可控。  
63 在分析方法建立的过程中，应描述和记录关键材料和试剂，  
64 如果某些试剂为自行制备或对采购的试剂进行了加工处理，  
65 则应详细记录制备或处理过程；此外，建议详细记录检测条  
66 件和关键参数的变更，以及出现的问题及其解决方案，以便  
67 为方法建立和使用过程中的任何变更提供依据。本指导原则  
68 结合疫苗临床血清抗体检测方法的特点重点阐述以下几个

69 方面内容，为方法建立时提供参考。

## 70 **1 标准品**

71 国家生物标准品及生物参考品，系指用于含量或生物制  
72 品效价等测定的标准物质。标准品或参考品的来源应符合国  
73 家有关规定。企业工作标准品或参考品必须经国家标准品或  
74 参考品标化后方可使用。对于尚无国家标准品或参考品的情  
75 况，在方法研究的早期，可用阳性血清或抗体先自行制备阳  
76 性对照品并进行初步标定，应详细记录其制备、标定过程。  
77 该对照品应能确保在疫苗研发及上市阶段的延续性及可追  
78 溯性。

## 79 **2 质控品**

80 质控品即质量控制物质，是一种稳定的物质，一般用于  
81 实验室内质量控制，以保证分析方法的性能可靠。包括阳性  
82 质控品和阴性质控品。应明确质控品的来源、制备过程及调  
83 整过程。

84 阳性质控品可分为定值和非定值两种情况。定值质控  
85 品有分析方法或过程分析的参考值，并指定参考范围；非定

86 值质控品可以在标贴上标示目标浓度 (如: 低、高、中), 但  
87 是没有指定的参考范围。可根据方法研究的不同阶段, 或对  
88 方法精密度和准确性要求的不同, 选择不同的阳性质控品。  
89 在疫苗研发的早期, 可能无法获得来自人体的阳性质控, 也  
90 可以通过免疫动物获得, 但前提是所建立的分析方法对样品  
91 的要求不受动物种属的限制。此外, 单个或混合的单克隆抗  
92 体也可作为阳性质控抗体使用。阳性质控品参考值的确定可  
93 参考标准品标定的相关规定。

94 一般情况下, 阴性质控品应来自受试人群免前血清或  
95 其他健康人群血清样品, 但要注意因为不同人群血清样品本  
96 底的不同对检测可能带来的影响。

### 97 **3 方法非特异性的控制**

98 方法的建立过程应在保证合适的灵敏度的同时, 尽可能  
99 地减少非特异性干扰。从实验器材到原料试剂都可能影响方  
100 法的灵敏度和抗原抗体的特异性结合。因此, 需选择合适的  
101 缓冲液或阻断剂来防止非特异性结合, 对于标记免疫试验,  
102 还应考虑合理的洗涤步骤和时间, 以及洗涤液的成分, 以减

103 少背景信号，同时保持灵敏度。当更换实验器材或原料试剂  
104 时，需要对方法学变更前后进行比对，必要时可能需要重新  
105 优化反应条件或程序。

106 血清样品中成分复杂，基质成分也会产生非特异性干  
107 扰（如游离血红蛋白、脂质、胆红素以及非特异性抗体的存  
108 在，甚至样品的制备处理过程中引入的外来物质），可能增强  
109 或抑制特异性信号的产生，造成假阳性或假阴性结果。因此，  
110 需采用科学的方法，探索确定最佳的最小稀释度，有效地将  
111 基质的干扰控制在可接受的范围内，在满足灵敏度要求基础  
112 上，并保证检测结果的可靠性。

#### 113 **4 cut-off 值的确定**

114 cut-off 值是决定结果阴阳性的依据。确定合适的 cut-  
115 off 值对于准确判定结果有重要意义。cut-off 值确定的原则  
116 是要使其得到的检测结果假阴性和假阳性的发生率最低。根  
117 据方法检测目的和对方法性能指标的要求的不同，可将 cut-  
118 off 值和检出限统筹考虑。

119 用于疫苗临床血清抗体检测的方法，除检测免后血清抗  
120 体水平外，还需检测免前血清抗体情况，以分析人群中抗体  
121 基线情况，并确定合理的免后阳转标准。因此 cut-off 值是  
122 疫苗临床血清抗体检测的方法研究中关注一个重要指标。一  
123 般需要以一定数量的临床试验目标人群阴性血清来确定  
124 cut-off 值。当待测血清的目标人群发生变化时可根据实际情  
125 况进行重新确定或调整 cut-off 值。考虑到对某些传染性疾  
126 病，人群中可能存在较多的隐性感染，导致免前人群已存在  
127 一定水平的抗体。为准确反映人群中抗体本底情况，必要时  
128 也可以考虑使用其它阴性人群的血清来确定 cut-off 值。但  
129 需充分评估界值的调整对免疫原性（如阳转率）评价可能带  
130 来的影响。确定 cut-off 值时，应选择一定数量具有代表性  
131 的血清，一般不少于 100 份，至少进行 3 次重复检测。

132 当 cut-off 值及最低检测限（见下文）确定后，可能会  
133 存在灰区范围，即无法准确判定阳性或阴性的范围。可根据  
134 对检测方法性能（如，灵敏度或特异性）要求程度的不同，  
135 适当调整灰区范围。

## 5 待测样品

疫苗免疫原性分析的待测样品以血清为主。血清样品可按常规方法采集，应注意避免溶血，如方法验证过程中未对溶血样品进行验证，应特别标注溶血样品处理措施。一般在短期内测定的样品可放置于 2-8℃，超过一定时间测定则需低温冻存；应避免反复冻融，如需多次检测，建议少量分装冻存。建议尽量不用抗凝血尤其是肝素抗凝剂。待测样品采集、保存条件等应符合下述方法耐用性验证要求。

## 6 关键性能指标的评估

在分析方法的开发阶段就应关注关键性能指标的评估。根据检测目的和方法特点的不同，抗体分析方法开发过程中需要评估的性能指标有所不同。一般来说，定性方法可能需要关注专属性、检测限，定量和半定量方法可能需要关注专属性、检测限、线性、线性范围、准确度和精密度。

### 四、抗体分析方法的验证

#### （一）验证的一般考虑

任何分析检测的目的都是为了获得稳定、可靠和准确的

153 数据，方法验证在其中起着极为重要的作用。方法验证是指  
154 监控整个方法使用过程的性能特征，以确保方法的有效性和  
155 数据的可靠性。方法验证的结果可以用于判断分析结果的质  
156 量、可靠性和一致性，这是所有质量管理体系不可分割的一  
157 部分。

158 在开始验证前，应根据方法的特点及检测目的的需要，  
159 合理选择的验证指标及标准，制定详细的验证方案。方法验  
160 证需根据验证方案来完成。验证方案应包括验证设计、验证  
161 指标、合理的可接受标准以及不符合可接受标准时可采取的  
162 措施等。新建方法时，应分析对方法影响最大的因素并进行  
163 相关验证。

164 根据情形不同，分析方法的验证包括完整验证、部分验  
165 证和交叉验证。验证的程度和指标参数的考虑应该基于研究  
166 的目的。验证后应能表明优化后的方法适用于样品的检测和  
167 分析。方法验证的原始数据应妥善保存以供检查。

## 168 **1.完整验证**

169 对于创新型疫苗，往往缺少可参考的方法，通常需要建

170 立一种新的分析方法，对于这类方法建议针对所有相关指标  
171 均开展全面而严格的验证。

172 定性抗体分析方法完整验证的性能指标一般应包括专  
173 属性、检测限（灵敏度）、重复性和稳定性；定量或半定量抗  
174 体分析方法完整验证的性能指标一般应包括特异性、检测限  
175 （灵敏度）、线性、线性范围、准确度、精密度和耐用性。

## 176 **2.部分验证和重新验证**

177 对现有已验证方法的任何改变，可根据改变的实质内容，  
178 先评估需要再次验证的相关指标参数，再进行部分验证或重  
179 新验证。方法的改变一般包括：方法在实验室之间的转移；  
180 方法本身的变化（例如，部分关键试剂的变化）；样品处理程  
181 序的变化；仪器和/或软件平台的变化；基质的变化（如从动  
182 物血清到人血清）等。应报告所有的改变，并对重新验证或  
183 部分验证的范围说明理由。

184 除以上基于方法改变进行的部分验证外，为减少方法的  
185 系统“漂移”，尤其对于不经常运行的方法，建议根据需要定  
186 期开展再验证工作。再验证时通常可考虑灵敏度、精密度和

187 准确度等部分指标。

### 188 **3.交叉验证**

189 交叉验证是指应用不同方法从一项或多项试验获得数  
190 据，或者应用同一方法从不同试验地点获得数据，在对这些  
191 数据进行互相比对时，需要选择必需的参数进行分析方法的  
192 交叉验证。如果可能，应在试验样品被分析之前进行交叉验  
193 证，将同一系列质控品或试验样品采用不同方法或者在不同  
194 试验地点分别进行测定，不同方法和不同实验地点的交叉验  
195 证应在方法变异的许可范围内。

#### 196 **（二）对验证指标的一般要求及建议**

197 用于疫苗临床试验的血清样品（尤其是来自关键研究的  
198 样品）抗体检测的方法，应经过严格验证。验证时建议考虑  
199 的相关指标包括检出限、专属性、准确度、精密度、线性、线  
200 性范围、耐用性等。其中，准确度、精密度、线性及线性范  
201 围等指标的验证通常可进行合并设计。

202 相关验证指标的评估，应始于方法开发阶段，且贯穿于  
203 该方法使用的整个期间。针对每个验证指标的评估，均应提  
204 前制定完善可行的方案，包括合理的判断标准等，并做好验

205 证记录。

## 206 **1.方法的检出限（灵敏度）**

207 最低检出限是待检样品中能够被检测到目标抗体的最  
208 低量，有时也称灵敏度。疫苗临床试验中抗体分析方法应有  
209 足够的检测限度，以便准确筛选出部分基线阳性人群。在有  
210 标准品的情况下，可用连续稀释的标准品来确定检出限。在  
211 方法研究早期，也可通过测试连续稀释的阳性对照血清来评  
212 估方法的灵敏度。但如果早期选择的阳性对照血清与实际检  
213 测的临床试验血清样品存在一定差异，早期确定的检出限度  
214 可能不够准确，需要在检测注册临床试验样品前再次验证。

215 方法检测限的评估可以单独进行，也可以作为精确度和  
216 准确度评估的一部分。方法的检出限度应能够满足临床血清  
217 检测的特定要求。

## 218 **2.专属性**

219 方法的专属性是指能够检出目标抗体的能力。专属性较  
220 好的方法应能从复杂的血清成分中准确检测出目标抗体。验  
221 证专属性时可通过对不同稀释度的其它特定非特异性抗体

222 的检出情况，来评估方法的专属性；必要时还需要将阳性质  
223 控血清和阴性质控血清样品分别与相应的抗原成分一起孵  
224 育，通过分析对信号的抑制情况来评估其专属性是否可以满  
225 足检测的需要。

### 226 **3 线性及线性范围**

227 线性一般是指在分析方法的范围内响应信号与待测物  
228 浓度（含量）之间直接成比例关系的能力。线性范围指测定  
229 方法能达到一定准确度、精密度和线性要求时的高低限水平  
230 区间，即最低检测量（LLOQ）和最高检测量（ULOQ）。需  
231 要说明的是，本节中所述线性不同于具体检测中标准曲线的  
232 线性，后者一般指标准物质形成的拟合曲线的线性相关系数。

233 在抗体定量分析方法中，应根据研究样品预期的浓度范  
234 围，确定方法的线性和线性范围。应尽量使用最简单的模型  
235 描述浓度-响应信号关系。

236 验证时一般需要对标准品或已知含量的阳性质控品进  
237 行精确的系列稀释，在定量范围内至少制备 5 个稀释度  
238 （LLOQ，低浓度、中浓度、高浓度、ULOQ）。以响应信号

239 对被分析物的浓度作图，根据图形是否呈线性进行评价。如  
240 果有线性关系，可用适当的统计方法估算试验结果。在某些  
241 情况下为使分析目标和试验样品浓度呈线性关系，可在回归  
242 分析前对测试数据进行数学转换。应提供相关系数、Y 轴上  
243 的截距、回归线的斜率等数据，还应分析实测值与回归线的  
244 偏差（离散性），以助于对线性作出评价。

#### 245 **4.准确度和精密度**

246 准确度是指在一定范围内，检测值与理论值或参考值接  
247 近的程度。一般可以用回收率、相对偏倚或其他适宜指标表  
248 示。一般通过对已知含量的阳性质控品进行测定，比较测定  
249 值和真实值之间的差异来进行准确度验证。根据方法特点，  
250 可采用偏倚评估、回收试验、与参考方法比对等方式进行准  
251 确度的验证。

252 精密度是指同一样品多次测定结果互相接近的程度。与  
253 理化测定方法相比，各种生物学测定方法的变异一般较大。  
254 考察精密度的度量一般是重复性和再现性。前者表示的是几  
255 乎相同的检测条件，称为重复性条件，如同一实验室、相同

256 条件、同一操作人员等，重复性衡量的是检测结果的最小差  
257 异；再现性是在完全不同的条件（再现性条件）下，如不同  
258 实验室、不同条件、不同操作人员，衡量的是检测结果的最  
259 大差异。此外，还应考虑介于中间状态条件的所谓中间精密  
260 度条件，如相同实验室，不同操作人员等。精密度一般以测  
261 定值的标准偏差、变异系数或相应的置信区间来表示。

## 262 **5.方法的耐用性**

263 方法的耐用性是指在正常使用期间方法的可靠性，是条  
264 件发生微小变化时，检测结果不受影响的承受程度。方法的  
265 耐用性可通过测定条件的微小而故意的变化对方法的影响  
266 来进行评估。例如，温度、培养时间或缓冲特性(如 pH 和盐  
267 浓度)的变化都可能影响检测结果。应在方法的早期研究阶段  
268 就关注方法的耐用性，以便及时采用合理的预防措施。

269 分析方法应具有良好的耐用性，验证时考虑的要素可包  
270 括样品采集、处理、存储及冻融的条件变化；检测所用试剂、  
271 设备仪器等的变化；反应的温度、PH 值等条件的变化。根据  
272 具体情况，可针对一个或几个关键的条件进行验证。在每种

273 试验条件下，均需对准确度、精密度或其他指标进行测定。

## 274 **五、制定方法的 SOP**

275 方法建立并完善后，应有详细、规范可操作的《标准操  
276 作规程》(SOP)。SOP 中除一般检测步骤相关内容外，还应  
277 包括对试验样品稀释方法及稀释液、检测结果的处理分析、  
278 需要重复检测的具体情况及其结果处理等内容的明确规定。检  
279 测过程中应严格按照 SOP 实施，对任何违背 SOP 的行为应  
280 有合理科学的解释，并分析对检测结果的影响。应根据方法  
281 再验证情况及时更新 SOP 内容及版本。

## 282 **六、方法的实施**

283 一般情况下，疫苗临床试验血清样品抗体检测结果是支  
284 持疫苗注册申报的重要证据之一。因此，其检测方法的研究  
285 以及试验样品检测过程应符合规范，以保证检测结果稳定、  
286 可靠、可溯源。

287 应首先制定该项目专有的文件资料。根据项目名称进行  
288 统一编号，并在文件资料及实验记录中使用该项目名称和编  
289 号。检测工作开始之前，应根据临床试验方案制订一份详细、

290 清晰的分析工作实施方案，内容一般包括：项目信息、实验  
291 室的信息、人员信息、实验目的及计划、样品信息、设备、  
292 试剂和材料等信息；分析方法及方法学验证；实验过程中重  
293 复检测的相关规定；实验资料的清单及保存地点；处理、报  
294 告实验数据和结果的方法。实验方案应由实验室负责人、项  
295 目负责人、申办者签字同意，并注明日期后生效；不应与委  
296 托合同或临床试验方案相冲突；对已有实验方案的修改，应  
297 书面说明原因，由实验室负责人、项目负责人、申办者签字  
298 同意后生效；针对实验方案或修改后的实验方案，应对参加  
299 相关工作的实验人员进行培训并记录存档。试验过程中，应  
300 进行详细记录，包括样品取出情况（样品量及取出时的温度）、  
301 检测过程、复测情况，剩余样品处理情况以及对检测结果的  
302 初步分析等，以确保整个检测过程规范、检测数据可追溯。

303

304 附录 1.名词解释

305 **标准品：**国家生物标准品系指用国际标准品标定的，或  
306 我国自行研制的用于定量某一制品的效价或毒性的标准物  
307 质（其生物活性效价以 IU 或 U 表示）。

308 **参考品：**国家生物参考品系指用国际参考品标定的，或  
309 我国自行研制的用于微生物定性鉴定或疾病诊断，或用于定  
310 量检测制品的生物效价的参考物质（其生物效价不以 IU 或  
311 U 表示，而以活性单位表示）。

312 **创新型疫苗：**是指境内外均未上市的疫苗，包括无有效  
313 预防手段疾病的疫苗；在已上市疫苗基础上开发的新抗原形  
314 式，如新基因重组疫苗、新核酸疫苗、已上市多糖疫苗基础  
315 上制备的新的结合疫苗等；含新佐剂或新佐剂系统的疫苗；  
316 含新抗原或新抗原形式的多联/多价疫苗。

317

## 参考文献

318

319 1. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. FDA. 2018。

320

<https://www.fda.gov/media/70858/download>.

321

2. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products —Developing and

322

Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. Guidance for

323

Industry. FDA. 2019.

324

<https://www.fda.gov/media/119788/download>.

325

3. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation

326

[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Multi](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multi)

327

[disciplinary/M10/M10EWG\\_Step2\\_DraftGuideline\\_2019\\_0226.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multi-disciplinary/M10/M10EWG_Step2_DraftGuideline_2019_0226.pdf).

328

4. 国家药品监督管理局. 中华人民共和国药典（2020版）

329

<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200702151301219.html>.

330

5. 生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则. CDE. 2005

331

<http://www.hnadr.org.cn/directory/web/WS29/images/1317193739015.pdf>.

332

6. 药物临床试验生物样品分析实验室管理指南（试行）. CFDA. 2011.

333

<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20111202112701644.html>.

334

7. WHO Good practices for pharmaceutical quality control

335

laboratories. WHO. 2010.

336

[https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/Goodprac](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/Goodprac)

337

[.ticesPharmaceuticalQualityControlLaboratoriesTRS957Annex1.pdf](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/GoodpracticesPharmaceuticalQualityControlLaboratoriesTRS957Annex1.pdf)

338

8. Bioanalytical method validation. EMA. 2015.

339

<https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>