

临床试验中细胞因子定量检测的专家共识(2024 版)

Expert consensus on quantitative analysis of cytokines in clinical trials (2024 version)

吴 妮¹, 孙云娟², 胡建军³,
唐 蕾⁴, 董 菁², 汤晓东⁵,
金 凡³, 王洪允¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医院 临床药理研究中心, 北京 100730; 2. 军科正源(北京) 药物研究有限责任公司, 北京 102206; 3. 徕博科医药研发(上海) 有限公司, 上海 201203; 4. 赛诺菲(中国) 投资有限公司, 北京 100022; 5. 恩凯塞药生物技术公司, 上海 201318)

WU Ni¹, SUN Yun - juan²,
HU Jian - jun³, TANG Lei⁴,
DONG Jing², TANG Xiao - dong⁵,
JIN Fan³, WANG Hong - yun¹

(1. Clinical Pharmacology Research Center, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 2. United - Power Pharma Tech Co. Ltd, Beijing 102206, China; 3. Labcorp Pharma Tech Co. Ltd, Shanghai 201203, China; 4. Sanofi (China) Investment Co. Ltd, Beijing 100022, China; 5. NK CellTech Co. Ltd, Shanghai 201318, China)

基金项目: 北京协和医院中央高水平医院临床科研专项基金资助项目 (2022 - PUMCH - B - 118)

作者简介: 吴妮(1989 -), 女, 主管技师, 主要从事临床试验大分子分析工作

通信作者: 王洪允, 研究员
MP: 18611513192
E - mail: wanghy@pumch.cn

摘要: 细胞因子是多种组织细胞中重要的信号分子, 已成为临床试验中药效评估、安全性监测等不可或缺的检测指标。鉴于当前细胞因子定量检测在临床试验中面临多重问题与挑战的现状, 中国药学会医药生物分析专业委员会组织多位行业专家进行了深入的研讨。本文系统阐述了各类细胞因子定量检测技术的原理及特点, 对检测结果间的差异进行了全面的剖析; 并结合法规文献与实践经验, 就临床试验中细胞因子定量检测的一般原则达成了广泛共识, 涵盖检测平台选择原则、检测方法验证要求、生物样品质量的影响因素等方面, 旨在为此类研究的科学、规范开展提供实用性的参考。

关键词: 细胞因子; 定量检测; 临床试验; 专家共识

DOI: 10. 13699/j. cnki. 1001 - 6821. 2024. 21. 029

中图分类号: R97 **文献标志码:** A

文章编号: 1001 - 6821(2024) 21 - 3211 - 06

Abstract: Cytokines are important signaling molecules in various tissues and cells, and have become indispensable study content for pharmacodynamics evaluation and safety monitoring in clinical trials. In view of the current situation that quantitative analysis of cytokines in clinical trials is facing multiple problems and challenges, the Pharmaceutical Biological analysis Professional Committee of the Chinese Pharmaceutical Association organized experts to conduct in - depth discussions. This article elaborates on the characteristics of quantitative detection techniques systematically, and analyzes the differences between measurements. An expert consensus has been reached on the general principles of quantitative analysis of cytokines in clinical trials, covering the selection of analysis platforms, the requirements of bioanalytical method validation, and the influencing factors on biological samples, aiming to provide reference for the scientific and standardized conduct of such research.

Key words: cytokine; quantitative analysis; clinical trial; expert consensus

细胞因子是一类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的低相对分子质量蛋白或多肽, 目前为止已发现上百种, 主要分为白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子、趋化因子、生长因子等, 是免疫系统中重要的信号分子。随着免疫调节药物、抗肿瘤药物、基因治疗和细胞治疗的高速发展及广泛应用, 细胞因子已成为临床试验中药效评估、安全性监测等不可或缺的检测指标^①。

当前应用于细胞因子检测的技术众多,但由于所使用的标准品和检测试剂不同、检测模式不同、样品采集、处理和存储条件不一致等因素,导致不同体系间的检测结果存在系统差异^[2-3];而各类临床试验由于研究背景和条件不同、对此项指标的结果解读也不尽相同。这些现状可能导致临床试验中所选择的检测平台不适宜、方法验证不完善、检测结果的质量不符合研究需求等问题,影响研究资源、时间和经费的使用效率,也为监管部门对此项指标的评价带来困扰。

因此,为保障此类指标实施的可靠性和规范性,中国药学会医药生物分析专业委员会组织多位行业专家,根据各类检测技术及细胞因子自身的特点,结合法规文献与实践经验,共同探讨并制定本共识,旨在为此类研究的科学规范开展提供参考。

1 细胞因子定量检测技术及特点

目前临床试验中应用于细胞因子定量的检测技术,主要基于配体结合原理,根据检测方式及信号采集模式的不同主要分为酶联免疫吸附分析、化学发光免疫分析、电化学发光免疫分析、流式微球分析、全自动微流控免疫分析、单分子免疫分析和邻位延伸分析等^[1-3]。

1.1 酶联免疫吸附分析

酶联免疫吸附分析是将免疫反应的特异性和酶催化底物反应的高效性、专一性结合起来的一种标记免疫分析技术。酶标免疫复合物催化底物溶液发生显色反应,信号形式为光密度,分析仪器主要为酶标仪。灵敏度可达 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平,可满足表达丰度相对较高的细胞因子检测需求,但线性范围较窄;单次实验仅能完成单个因子的检测。

1.2 化学发光免疫分析

化学发光免疫分析是将免疫反应的特异性和化学发光反应的高灵敏性相结合的一种标记免疫分析技术。带有发光标记物的免疫复合物加入反应液后发生化学反应,产生的能量使反应物进入激发态,然后从激发态回到基态的过程中化学能转变为光能。信号形式为发光强度,分析仪器主要为全自动化学发光免疫分析仪,自动化程度高。灵敏度可达 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平,线性范围较宽;单次实验通常仅能完成单个因子的检测。

1.3 电化学发光免疫分析

电化学发光免疫分析的标记物为三联吡啶钌及其衍生物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$,还原剂为三丙胺(tripropylamine, TPA),通过对电极施加电压启动电化学反应,

发光信号强而稳定、发光时间长、背景干扰低,因此灵敏度高、线性范围宽。信号形式为发光强度,分析仪器为电化学发光分析仪。灵敏度可达 $\text{fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 级别;单次实验最多可同时实现 10 个因子的检测。

1.4 流式微球分析

流式微球分析是以微球作为固相载体进行免疫反应,通过检测微球上免疫复合物的荧光强度进行定量分析;信号形式为荧光强度。通过微球尺寸和荧光标记区分不同因子,可根据实验需求灵活组合,在单次实验中实现多因子检测,节约实验时间及样品用量,便于满足高通量检测需求。目前该类分析平台主要分为 2 种:流式细胞仪平台和 Luminex 平台。灵敏度可达 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平,线性范围宽。

1.5 全自动微流控免疫分析

应用微流控技术的免疫分析平台,具有反应时间短的特点,灵敏度可达 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平,线性范围宽,自动化程度高。目前主要包括 2 个分析平台: Ella 系统和 Gyrolab 系统。Ella 系统以纳米级玻璃反应管为固相载体,嵌入反应板上的微流体通路进行免疫反应;独立流路的设计避免了抗体交叉反应;单次实验最多可同时实现 8 个因子的检测。Gyrolab 系统在微流控光盘(compact disc, CD)上通过离心力和毛细作用进行定量免疫分析;微型化的反应体系仅需要纳升级体积,节约样品和试剂;亲和柱流穿模式减少了非特异性结合;单次实验仅能完成单个因子的检测。

1.6 单分子免疫分析

单分子免疫分析是基于数字化策略、对免疫复合物在单分子水平进行检测的免疫分析技术,灵敏度可达 $\text{fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平,适合低丰度样品如神经疾病相关因子分析。分析平台包括单分子免疫阵列系统(single molecule array, SIMOA)和单分子计数系统(single molecule counting, SMC)。SIMOA 系统通过微反应器单元进行单分子隔离、实现信号放大、提高检测灵敏度;单次实验最多可同时实现 6 个因子的检测。SMC 系统通过将激光聚焦到光学极限尺度范围内、使微米尺度的聚焦光斑范围内的激发光源能量达到一个极高程度,实现单个分子的计数功能;单次实验仅能完成单个因子的检测。

1.7 邻位延伸分析

邻位延伸分析将具有特定核苷酸序列探针的一对抗体与待测物特异性结合,探针通过碱基互补配对后在延伸酶的作用下形成双链模板,利用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase

chain reaction, RT-qPCR) 或二代测序(next generation sequencing, NGS) 进行检测。应用该技术的分析平台如 Olink 系统。通过 DNA 标签区分不同因子,在单次实验中实现多因子检测,节约实验时间及样品用量;灵敏度可达 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平,线性范围宽。

2 细胞因子检测结果间的差异分析

2.1 标准品和检测试剂

细胞因子检测所使用的标准品一般为通过基因重组技术表达的重组蛋白;由于糖基化等修饰、构象、生物学活性等差异导致其与临床样品中内源性的细胞因子可能存在差异,并且不同厂家生产的标准品、检测试剂的结合位点、特异性、亲和力等方面也可能存在一定差异。

因此,细胞因子的检测一般为“相对定量”,而非“绝对定量”;使用不同检测方法、不同标准品和检测试剂时,检测结果间可能存在差异,相同试剂的不同生产批次在方法重现上也可能存在一定差异。

2.2 样品类型、采集处理方式及样品稳定性

样品类型 生物样品中的细胞因子水平会受其基质类型的影响。例如同一个体在同一时间点采集的样品,由于采集容器的不同、获得的样品类型不同(血清与血浆、不同抗凝/促凝剂等),浓度水平可能存在差异;同时,也会由于生理环境的不同、分泌、代谢途径不同导致可测得的丰度不同,例如脑脊液和血液以及尿液之间的浓度水平均会有一定差异。

样品采集及处理方法 样品采集及处理的方法也会影响细胞因子的浓度水平。例如全血样品自采集至分离、冻存过程中,由于细胞因子的体外释放,可导致部分细胞因子水平升高;同时蛋白酶降解可导致其水平降低;变化幅度受所处温度、处理时长等因素影响^[6-7]。对于尿液、脑脊液等蛋白和脂类浓度相对较低的样品,还应关注采集容器的非特异性吸附问题。

样品稳定性(保存温度、时长、冻融循环次数) 不同细胞因子由于蛋白结构不同,在室温、 $2 \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、冻存($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下)环境中的稳定性表现不同;多次冻融循环可能导致检测结果的改变^[8]。

3 临床试验中细胞因子定量检测的一般原则

3.1 明确研究目的

首先,应根据临床试验所处阶段,结合药物作用和疾病机制、临床研究/诊疗指南等相关因素,评价细胞因子检测在研究中所发挥的作用,明确其在所开展临床试验中的研究目的。例如,是否作为主要终点指

标、次要终点指标或探索性指标;是否作为关键数据用于安全性或有效性决策、支持药物给药剂量调整、作为说明书内容用于申报,或作为探索性指标,用于支持药物早期研发、内部决策或概念验证。明确研究目的对检测策略的制定至关重要。

3.2 检测实验室的考量

实验室资质 根据临床试验中细胞因子检测的研究目的和相应的法规要求,当检测结果仅用于临床试验研究时,实验室应具备相关检验检测资质并符合药品监督管理部门的质量管理规范;当检测结果涉及医学判断时,还需具备医学实验室资质^[9-12]。

检测能力 确认实验室是否具备研究所需的检测能力,包括仪器设备、检测指标、基质类别、检测灵敏度、定量范围、方法性能、反馈时效等^[13-14]。

样品运输 结合样品运输温度、运输频率、运输距离、出口手续、海关检疫等因素,评估运输时效与运输成本^[13-14]。

用多个实验室 需认识到实验室间可能存在的系统差异;当来自不同实验室的检测结果将用于汇总分析或比较时,应评估数据间的可比性,建立科学的数据分析方法。

3.3 检测方法的选择

应根据临床研究的目的和该类指标在临床研究中的作用、待测物的种类和数量、在目标群体中的预期浓度水平等,结合各类检测方法的优劣及局限性,综合评估“检测对象、检测通量、灵敏度、精密度、准确度、定量范围、稳健性、检测成本、试剂货期”等因素,选择适宜的检测方法。

例如,进行生物标志物的早期探索性研究时,在灵敏度能满足要求的前提下通常用高通量的检测方法;研究低丰度的细胞因子时,需要用高灵敏度的检测方法;检测结果用于药代动力学/药效学统计分析研究时,应选择精密度和准确度高的可靠检测方法;研究周期较长时,需要关注检测方法的稳健性,以及方法所用的检测试剂供应的持续性和批次间的一致性;同时应综合样品量等因素,考虑检测方法的检测成本。

鉴于检测方法间可能存在的系统差异;当来自不同方法的检测结果将用于汇总分析或比较时,应评估数据间的可比性,建立科学的数据分析方法。

3.4 检测方法的验证

3.4.1 方法验证原则

由于临床试验中细胞因子研究方向的多元性和复杂性,在确定检测方法验证内容时,应遵循药品监

管部门发布的指导原则,参考行业白皮书及相关文献,基于“Context - of - use”的原则,可用全验证或“Fit - for - purpose”的策略^[15-16]。以下总结3种常见情况。

当检测结果用于支持监管决策时,例如用于药物安全性和/或有效性的关键决定,或用于支持药物标签中的剂量说明时,其分析方法应得到充分验证;验证内容和评价标准应符合临床试验监管部门的生物分析方法验证指导原则及参考行业白皮书。

当检测结果用于探索性研究时,应参考生物分析方法验证指导原则并结合具体适用性和研究目的开展必要的方法性能确认或验证,可关注其技术的可行性、方法的平行性、灵敏度、特异性以及可重现性^[17-21]。

当检测结果用于支持/辅助医学判断时,检测实验室需具备医学实验室资质,检测方法的验证需符合医学实验室相关标准^[12]。

3.4.2 方法验证关注点

对于指导原则中尚无明确描述的方法验证过程中的具体问题,本共识结合细胞因子自身特点,综合指导原则、行业白皮书及文献^[17-21],建议如下。

标准品 细胞因子检测所使用的标准品一般为通过基因重组技术表达的重组蛋白,应通过平行性实验考察其与真实样品中的内源性细胞因子在检测体系中的反应差异^[22-23];应通过桥接实验考察标准品批次间的差异。

空白基质 细胞因子作为内源性物质,较难获得与研究样品生物基质相同的空白基质。实验空白基质的来源主要包括:内源性水平低于定量下限的空白基质,使用吸附、水解等方式去除内源性细胞因子的空白基质,异源基质(如动物血清)或者人工配制的溶液(如含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)。当空白基质与临床研究样品的生物基质不同,为替代基质时,应通过平行性实验考察其替代真实基质的可行性^[22-23]。

质控样品 质控样品浓度应代表预期的临床研究样品水平。应优先用与研究样品相同的生物基质,例如使用真实样品或向真实基质中添加标准品;当真实样品中细胞因子的水平较高且无法获得低浓度的真实样本时,低浓度水平质控样品可通过使用替代基质稀释真实样品实现;当质控样品由于客观条件限制(例如真实样品稀缺、浓度水平不适宜、稳定性因素等)而不得不使用替代基质配制时,建议用于支持监管决策的研究中至少用1个由真实基质制备的质控样品。质控样品浓度的标示值有2种方式:①用配制

的理论值;②通过多次检测(不少于3次,可专门进行或于精密度和准确度验证中进行)的平均值定值。第2种方式适用于以真实样品作为质控样品或对真实样品进行添加标准品或稀释配制后,无法得到精确理论值的情况。

精密度和准确度 精密度和准确度验证样品一般包括5个浓度水平:定量下限(lower limit of quantification, LLOQ)、低浓度质控(定量下限的3倍以内)(low concentration quality control, LQC)、中浓度质控(校准曲线定量范围几何平均值附近)(medium concentration quality control, MQC)、高浓度质控(定量上限的75%以上)(high concentration quality control, HQC)以及定量上限(upper limit of quantification, ULOQ);制备方式及标示值定值方式同质控样品。

特异性 可参考抗体或者商品化试剂盒的说明书;当从供应商处不能获得研究所需的特异性信息时,可基于具体情况进行特异性验证。

平行性 平行性是内源性物质检测方法的重要指标,通过对所研究群体中较高浓度水平的真实样品系列稀释进行考察^[22-23]。

选择性 细胞因子作为内源性物质,对检测方法选择性的验证主要有2种方式:向真实基质中添加LLOQ水平和HQC水平的标准品、计算回收率,回收率的计算需考虑到基质的本底水平;在加标方式不适用时,可通过平行性验证的结果评价方法的选择性^[22-23]。

稀释线性和钩状效应 在样品预计的稀释倍数不高于平行性验证中的稀释倍数时,检测方法的稀释线性可基于平行性验证结果进行评价^[22-23]。通过高于定量上限样品的信号值验证是否存在响应抑制现象(钩状效应)。

残留 用流式微球技术、微流控技术等逐个进样的检测平台,应关注平台是否存在残留趋势。考察方法可参考2022版人用药品技术要求国际协调理事会M10 4.2.5,在ULOQ水平的样品之后放置空白样品,空白样品的响应值应低于LLOQ。

稳定性 由于标准品与临床样品中的内源性细胞因子间可能存在的差异,向真实基质中添加标准品的方式不能完全代表真实样品,因此内源性细胞因子的稳定性建议优先用真实样品考察,浓度水平应覆盖临床研究样品的预期范围。由替代基质配制的标准曲线的稳定性也应被考察。文献或其他研究中的稳定性数据可以作为支持数据,但需确保样品类型、前处理、储存条件、检测方法的一致性。

3.4.3 方法转移和交叉验证关注点

在开展全球多区域临床试验(multi-regional clinical trial, MRCT)时,在中国完成的生物分析是全球临床试验的重要组成部分。当涉及国内外多个生物分析实验室的时候,需要做交叉验证才能整合相关分析数据。建议在有可能的情况下,交叉验证应通过测量同一组质控样品与临床试验样品(如适用)来评估。

3.5 生物样品质量的影响因素

由于细胞因子的复杂性和敏感性,许多因素可以影响生物样品中细胞因子的水平。为保障研究结果的可靠性和可重复性,在制订临床试验方案和样品操作手册时,申办者应与检测实验室、临床研究中心充分沟通,确定以下问题。

样品类型 血样(血浆/血清或全血)、分泌物(唾液、泪液)、尿液、脑脊液等。

样品稳定性信息 包括室温稳定性、2~8℃稳定性、冻存稳定性(如-20℃、-70℃)、冻融稳定性等。用于多因子检测的样品,每个因子的稳定性均应关注。

样品状态对检测结果的影响 如高脂、溶血、黄疸等样品。

采集容器 包括品牌、型号、规格、材质、容积、抗凝剂类型等。

采样时间点 结合研究目的、细胞因子的生理学特点与实际条件,制订科学、可行的采样时间点。

样品处理条件 对于需要处理的样品,确定采集后的处理方法、处理时长及时间窗、处理温度、是否避光或添加稳定剂等条件。

样品离心分离 对于需要离心分离的样品,确定采集后多长时间内离心、离心的温度、离心时长范围(以涵盖不同离心机之间的升降速差异)、离心力(单位以“g”表示,以避免使用“ $r \cdot \min^{-1}$ ”时离心机型号引入的差异),确定离心后多长时间内分离,分装数量、分装体积、储存管材质。

样品的储存条件 根据样品的稳定性信息,确定采集或处理后多长时间内放入冰箱储存、储存温度、储存时限、是否避光。

样品的运输 包括样品运输过程的温度控制,以及根据样品稳定性情况制订的运输频率和运输时效等。

样品的管理 样品从采集、处理、储存、运输至使用、处置的全链条应建立相应的管理制度,各环节应清晰、准确、完整地记录。对于偏离事件应醒目标注,

并制订偏离处理方案。

4 讨论

本共识从细胞因子定量检测平台的选择原则、检测方法的验证要求、生物样品质量的影响因素等方面,结合法规文献与实践经验总结制定。对于临床试验中细胞因子的定量检测,应首先明确该指标的研究目的;根据研究目的和相应的法规要求,选择符合检测资质、满足检测需求的实验室,并结合各类检测方法的优劣及局限性,选择适合研究目的的检测方法;检测方法的验证应遵循药品监管部门指导原则,参考行业白皮书及文献,基于“Context-of-use”的原则,可用全验证或“Fit-for-purpose”的策略,根据研究目的确定方法的验证内容;在制订临床试验方案和样品操作手册时,需关注影响生物样品中细胞因子水平的各项因素,确保样品质量。

本共识在起草撰写过程中,遵循广泛求证、广泛参与以及广泛征求意见的原则。本共识仅基于当前的认知提出的建议,将随着科学研究进展及各方反馈不断完善与更新,使其能更好地为药物研发提供参考价值。

参与共识撰写的专家成员名单:

指导专家 王洪允(中国医学科学院北京协和医院)、董菁(军科正源药物研究有限责任公司)、汤晓东(恩凯塞药生物技术公司)、金凡(徕博科医药研发(上海)有限公司)。

执笔人 吴妮(中国医学科学院北京协和医院)、孙云娟(军科正源药物研究有限责任公司)、胡建军(徕博科医药研发(上海)有限公司)、唐蕾(赛诺菲(中国)投资有限公司)。

审阅专家(按姓氏拼音排序) 毕吕存(徕博科医药研发(上海)有限公司)、车津晶(军事医学研究院毒物药物研究所)、方忻平(江苏鼎泰药物研究(集团)股份有限公司)、姜宏梁(华中科技大学)、李敬来(国科卓越(北京)医药科技研究有限公司)、梁文忠(上海药明康德新药开发有限公司)、蒙敏(重庆迪纳利医药科技有限责任公司)、沈晓航(上海熙华检测技术服务股份有限公司)、施婧(上海益诺思生物技术股份有限公司)、汤瑶(中国食品药品检定研究院)、魏敏吉(北京大学临床药理研究所)、叶斌(华辉安健(北京)生物科技有限公司)、张金兰(中国医学科学院药物研究所)、赵芊(中国医学科学院北京协和医院)、郑恒(华中科技大学同济医学院附属同济医院)、钟大放(中国科学院上海药物研究所)。

参考文献:

- [1] LIU C, CHU D, KALANTAR-ZADEH K, et al. Cytokines: From clinical significance to quantification [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(15): 2004433.
- [2] PLATCHEK M, LU Q, TRAN H, et al. Comparative analysis of multiple immunoassays for cytokine profiling in drug discovery [J]. *SLAS Discov*, 2020, 5(10): 1197—1213.
- [3] KNIGHT V, LONG T, MENG Q H, et al. Variability in the laboratory measurement of cytokines [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(10): 1230—1233.
- [4] VALAPERTI A, LI Z, VONOW-EISENBERG M, et al. Diagnostic methods for the measurement of human TNF- α in clinical laboratory [J/OL]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 179: 113010. 2020-05-30 [2024-05-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31816469/>.
- [5] DABITAO D, MARGOLICK J B, LOPEZ J, et al. Multiplex measurement of proinflammatory cytokines in human serum: comparison of the meso scale discovery electrochemiluminescence assay and the cytometric bead array [J]. *J Immunol Methods*, 2011, 372(1—2): 71—77.
- [6] HENNØ L T, STORJORD E, CHRISTIANSEN D, et al. Effect of the anticoagulant, storage time and temperature of blood samples on the concentrations of 27 multiplex assayed cytokines—consequences for defining reference values in healthy humans [J/OL]. *Cytokine*, 2017, 97: 86—95. 2017-09-30 [2024-05-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28595117/>.
- [7] DE JAGER W, BOURCIER K, RIJKERS G T, et al. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays [J/OL]. *BMC Immunol*, 2009, 10: 52. 2009-09-30 [2024-05-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19785746/>.
- [8] SIMPSON S, KAISLASUO J, GULLER S, et al. Thermal stability of cytokines: A review [J/OL]. *Cytokine*, 2020, 125: 154829. 2020-01-30 [2024-05-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31472404/>.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 药物临床试验质量管理规范(2020年第57号) [EB/OL]. 2020-04-26 [2023-10-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/xzhgfxwj/20200426162401243.html>.
- [10] 国家食品药品监督管理局. 药物非临床研究质量管理规范(2017年第34号) [EB/OL]. 2017-07-27 [2023-10-18]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxxgk/fdzdgknr/bgt/art/2023/art_2959b53d3b6a429e866c514a76a790db.html.
- [11] 国家食品药品监督管理局. 药物临床试验生物样本分析实验室管理指南(试行)(国药监注[2011]482号) [EB/OL]. 2011-12-02 [2023-10-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20111202112701644.html>.
- [12] 卫生部. 医疗机构临床实验室管理办法(卫医发[2006]73号) [EB/OL]. 2006-03-06 [2023-10-18]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s3577/200804/d3281df051d44badbd45cf12fe95a28e.shtml>.
- [13] 范华莹, 谢振伟, 王璵珏, 等. 药物临床试验中心实验室的价值与考量 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(9): 814—817.
- [14] 中国抗癌协会中国肿瘤临床试验稽查协作组. 抗肿瘤药物临床试验中心实验室使用专家共识(2019版) [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(9): 1027—1032.
- [15] LEE J W, DEVANARAYAN V, BARRETT Y C, et al. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(2): 312—328.
- [16] C-PATH. Points to consider document: Scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices [EB/OL]. 2019-06-11 [2023-10-18]. <https://c-path.org/wp-content/uploads/2019/06/EvidConsid-WhitePaper-AnalyticalSectionV20190621.pdf>.
- [17] 中华人民共和国药典. 生物样品定量分析方法验证指导原则(2020年版, 四部) [EB/OL]. 2020-07-02 [2023-10-18]. <https://ydz.chp.org.cn/#/item?bookId=4&entryId=5692>.
- [18] FDA. Bioanalytical Method validation guidance for industry [EB/OL]. 2018-05-22 [2023-10-18]. <https://www.fda.gov/media/70858/download>.
- [19] ICH. Bioanalytical method validation and study sample analysis M10 [EB/OL]. 2022-05-24 [2023-10-18]. https://data-base.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf.
- [20] YU C, BASHAW E D. Regulatory perspective of biomarker bioanalysis during drug development [J]. *Bioanalysis*, 2019, 11(7): 607—610.
- [21] OHTSU Y, TANAKA S, IGARASHI H, et al. Analytical method validation for biomarkers as a drug development tool: Points to consider [J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(18): 1379—1389.
- [22] STEVENSON L F, PURUSHOTHAMA S. Parallelism: Considerations for the development, validation and implementation of PK and biomarker ligand-binding assays [J]. *Bioanalysis*, 2014, 6(2): 185—198.
- [23] TU J, BENNETT P. Parallelism experiments to evaluate matrix effects, selectivity and sensitivity in ligand-binding assay method development: Pros and cons [J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(14): 1107—1122. (收稿日期 2024-07-20; 本文编辑 孟海峰)