

## 单克隆抗体药物非临床研究及评价的监管考虑

王寅, 戴学栋, 周恒, 尹华静, 付淑军, 尹茂山, 吴爽, 于冰, 孙涛, 王庆利  
(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

**[摘要]** 基于单克隆抗体药物的特点, 结合国内外监管机构发布的技术指导原则和工作实践, 本文针对单克隆抗体药理毒理专业审评中关注的重点内容进行了探讨, 包括受试物质量、相关动物种属选择、免疫原性和免疫毒性评价以及首次人体临床试验起始剂量选择等, 以期申办方和研究者提供参考。

**[关键词]** 单克隆抗体; 非临床研究; 动物种属选择; 免疫毒性

**[中图分类号]** R95      **[文献标志码]** A      **[文章编号]** 1003-3734(2023)01-0016-08

### Regulatory perspective on non-clinical research and evaluation of monoclonal antibody

WANG Yin, DAI Xue-dong, ZHOU Heng, YIN Hua-jing, FU Shu-jun, YIN Mao-shan, WU Shuang, YU Bing, SUN Tao, WANG Qing-li

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

**[Abstract]** Based on the characteristics of monoclonal antibody, this paper discusses the key points in the pharmacology and toxicology review of monoclonal antibody combined with our review practice and the technical guidelines issued by regulatory agencies. Recommendations are given on the quality of test substance, selection of related animal species, evaluation of immunogenicity and immunotoxicity, and selection of initial dose for the first human clinical trial, so as to provide general principles for designing scientifically acceptable non-clinical research programs for the sponsors and researchers.

**[Key words]** monoclonal antibody; non-clinical research; animal species selection; immunotoxicity

在前文中已分析了可能影响单克隆抗体药物(以下简称单抗)有效性和安全性的因素, 包括抗体的结构、靶点特性、药理作用机制、质量控制和临床拟用患者人群等, 并基于这些风险因素, 阐述了对单抗的设计、早期筛选及非临床研究计划的一般考虑<sup>[1]</sup>。受篇幅限制, 该文章仅探讨了体外药理学实验在获益风险评价中的重要价值及审评关注重点。为了系统探讨单抗的非临床研究及评价内容, 本文针对审评中关注的受试物质量、相关动物种属选择、

免疫原性和免疫毒性评价以及首次人体临床试验起始剂量选择等内容进行了探讨, 以期申办方和研究者提供参考。

#### 1 受试物的质量

一些常规研究不能检测到的细微变化(如糖型分布改变)可能会影响其生物学活性并导致临床后果。因此, 非临床安全性试验所用受试物应能够代表临床试验拟用产品的质量。开展临床试验前, 应对关键毒理学试验所用的受试物与临床拟用样品进行质量对比分析, 以确保产品的质量差异(如果存在的话)不会对其临床特性特别是安全性造成不良影响。一般认为药学的质量对比分析比毒理学试验更为敏感, 可以发现常规毒理学试验所不能检测到的细微改变。因此, 若产品的全生命周期中发生了工艺变更, 应首先对变更前后的产品进行质量可比

**[作者简介]** 王寅, 女, 主管药师, 主要从事新药药理毒理专业审评。E-mail: wangyin@cde.org.cn。共同第一作者: 戴学栋, 男, 副主任药师, 主要从事新药药理毒理专业审评。E-mail: daixuedong@cde.org.cn。

**[通讯作者]** 王庆利, 男, 主任药师, 主要从事药理毒理专业审评。E-mail: wangql@cde.org.cn。孙涛, 男, 主任药师, 主要从事药理毒理专业审评。E-mail: sunt@cde.org.cn。

性分析,评估药理学质量差异对安全性和/或有效性的潜在影响。若认为质量差异较大(可能会导致临床不良反应),而已有的毒理学试验数据不能支持临床安全性或者生物学检测不足以评估对临床的影响时,可考虑进行非临床桥接研究或采用代表性样品重新进行相关非临床安全性试验。此外,对于毒理学试验所采用的制剂处方与临床产品不同时(例如某种辅料成分在大剂量下会导致毒性,影响毒理学试验的评价),应对2种制剂处方中单抗的理化特性进行研究,并证明两者在体内具有相似的药理学特征。

## 2 动物种属选择

### 2.1 相关动物的一般考虑

在进行毒理学试验时,最重要的一个环节便是确定相关动物,这不仅关系到毒性风险能否充分暴露,还直接影响到是否可将试验结果外推至人体,这也是审评重点关注的内容之一。单抗是基于靶点在病理机制中的生理功能而开发的一类具有特定药理学作用的药物。相比小分子药物,单抗具有更高的靶点亲和力和特异性,脱靶毒性风险相对较低,安全性风险主要为药理学相关作用。因此,在选择毒理学试验相关动物种属时,首先应采用药理学相关动物种属,并证明所选择的动物模型能够显示并预测靶点调控的不良后果。

支持单抗毒理学试验动物种属选择的主要证据(逐渐递进)包括:①与人靶点序列的同源性比较。②与动物靶蛋白的交叉反应性及相对亲和力比较。③在动物细胞/离体组织中的功能活性及相对效力比较。④在动物体内具有药理学活性。

在选择相关动物时需要关注以下几点:①与人靶点序列同源性高的动物并不一定比同源性低的动物更相关,序列差异引起的构象改变可能会影响抗原表位,导致其与抗体的结合力降低或不结合。②重组表达的靶蛋白与天然靶蛋白的糖基化模式及高级结构可能会有所不同,有可能影响体外的相对亲和力。③在进行体外功能活性比较时,应关注所选择的剂量范围(能够代表临床所能够达到的浓度范围)、基质选择(不同基质的有效剂量可能会明显不同)以及结果解释(剂量依赖性、不同供体间的差异等)。④采用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)技术进行的组织交叉反应(tissue cross reactivity, TCR)试验对指导种属选择的意义有限。但在特定情况下,TCR试验也可用以指导动物种属的选择。

例如:人体组织 TCR 发现了非预期的交叉反应,可选择具有类似组织交叉反应特征(即使不表达靶抗原)开展毒理学试验。⑤提供动物选择依据时,不仅需要提供排除常规动物相关性的证据,还需要提供所选动物合理性的依据,最好能够提供所选动物及人体细胞/组织开展体外药理学活性对比的研究数据,以便于将动物体内试验结果外推至人体时能够得到合适的校正。若有可能,建议在毒理学试验中伴随药效学生物标志物的检测,在证明动物种属选择合理性的同时,还可基于药动学/药效学(pharmacokinetics/pharmacodynamics, PK/PD)信息推算人体剂量范围。

种属间的差异,包括靶点的结构、功能、分布和表达水平的差异以及免疫系统功能的差异,可能会导致抗体在动物中的生物学反应与在人体中表现出质和量的不同。这也导致动物试验预测人体反应时存在很大的不确定性。最典型的例子是 TGN1412(一种靶向 CD28 的单抗),首次人体临床试验中,6例健康受试者在首次用药后出现了严重的危及生命的细胞因子风暴(cytokine release syndrome, CRS),而在采用食蟹猴进行的毒理学试验中并未见该反应<sup>[2]</sup>。后续调查研究发现, TGN1412 在人体中通过激活组织中驻留的表达 CD28 的效应记忆 T 细胞而导致了非预期的 CRS,而在食蟹猴中由于效应记忆 T 细胞并不表达 CD28,因此食蟹猴毒理学试验未能预测到该不良反应<sup>[3]</sup>。此外,毒理学试验通常采用健康动物,靶点的表达水平和免疫微环境与疾病状态有很大不同。因此,即使被认为是相关动物,在将动物实验结果外推至人体时,也应将动物实验预测的不确定性纳入风险评价的考虑中。采用体外人体细胞或离体组织、人源化动物或疾病动物模型进行的试验可获得更多补充性的安全性信息。

### 2.2 仅采用1种相关动物的情形

非临床安全性试验中一般推荐采用2种相关动物种属(1种啮齿类和1种非啮齿类)评估一般毒性,但在以下特定情况下,也可接受在1种相关动物种属中进行的一般毒性评价,包括:①候选药物仅在1个种属中具有药理学活性。②已在2种药理学相关动物种属中进行了短期(不超过1个月)的一般毒性试验,并且毒理学发现基本一致或与产品的药理学作用机制相关。这种情形下,可选择啮齿类动物进行更长期限的毒理学试验,除非有科学依据支持选择非啮齿类动物。例如:人源化抗体或全

人源抗体在啮齿类动物中通常具有较高的免疫原性,长期给药会导致药理学活性降低或丧失,这时应考虑采用非啮齿类动物。

### 2.3 无相关动物的情形

对于无相关动物的情形,目前有3种策略,推荐程度由高至低排列。

**2.3.1 选择可表达人源靶蛋白的转基因动物** 该方法的优点是可直接对候选抗体进行评价,并可将其剂量反应关系外推至人体;缺点是转基因动物中导入的人源蛋白的表达特征(包括表达时序和表达水平)和生理功能与人体内源蛋白相比可能会有所不同(如人 Toll 样受体)。采用转基因动物进行非临床研究前,需对转基因动物进行合理的表征(如进行基因型鉴定等),证明受试抗体在转基因动物中具有药理作用。由于缺乏历史背景数据,在试验中应关注对照组及基线数据的收集,以便更好地解释试验结果。此外,采用转基因动物进行长期试验时还应关注免疫原性的影响。

**2.3.2 采用同源替代抗体** 同源替代抗体是指被选择用来替代候选抗体在动物中进行试验的同源抗体,它和候选抗体是完全不同的分子(至少结合表位不同)。采用同源替代抗体主要是为了识别风险,了解药理学放大作用可能导致的不良反应,不能进行风险的定量评估。如果试验设计和剂量选择合理,可仅设计1个对照组和1个给药组。值得关注的是,并不是所有的同源抗体均可作为同源替代抗体。为最大限度地表征候选抗体的潜在风险,所选择的同源替代抗体应尽可能与候选抗体具有相似的药理学活性,应采用体外试验证明两者具有相似的靶点亲和力、功能活性[包括结晶片段(crystalline fragment, Fc)功能效应],并在动物体内验证其药理学活性/功能,若有可能还应进行药动学对比研究。此外,由于生产工艺、杂质谱、糖基化模式等因素对候选抗体的安全性均有一定的影响,还应对同源替代抗体的关键质量属性和稳定性进行表征。对于最常用的鼠源替代抗体,还应关注所选择的 IgG 亚型的 Fc 功能效应与候选抗体相匹配,如果候选抗体为 IgG1 亚型,鼠源替代抗体应选择 IgG2a 亚型。在无相关动物种属或仅与非人灵长类动物有交叉反应性时,可考虑选择鼠源替代抗体用于评价候选药物的生殖和发育毒性。在后一种情况下,除考虑资源消耗及开发进度外,还应说明选择鼠源替代抗体的科学性依据,并与监管机构达成一致<sup>[4]</sup>。

**2.3.3 仅采用人源细胞或组织开展一系列相关体外试验** 一般不推荐采用该方法,除非该候选药物的适应证为危及生命的疾病或候选药物为具有标准 IgG 结构(未进行修饰或改造)的单抗,且已有针对相同靶点、相同作用机制的同类药物的临床应用经验,药理学相关作用及安全性特征已被充分的表征。虽然基于计算机预测和体外试验数据可对靶点的生物学功能和药物的作用机制有一定了解,但仅依靠体外试验数据不能识别非预期的风险,尤其是在对靶点功能尚未完全清楚的情况下<sup>[5]</sup>。这主要因为:① 体外试验并不能模拟单抗与靶点在体内复杂的相互作用。② 不能评估药物的剂量/暴露量-反应关系。③ 不能评估人体长期暴露风险、生殖及发育毒性风险。此外,除非采用最低预期生物效应水平(MABEL)法,体外试验获得的数据并不足以支持人体首次临床试验起始剂量的计算,而 MABEL 法获得的更为保守的起始剂量可能会导致首次人体临床试验所用时间明显延长。

虽然从转基因或基因敲除动物中获得的靶点生物学功能信息也可用于预测单抗药物的潜在毒性风险,但这些信息可能会过高或过低预测人体风险,因为:① 动物和人体发育过程不同,靶点在发育中的作用可能会有明显不同。② 给予抗体药物后,所有组织中的靶点并不会被完全阻断/激活。

对于直接作用于外源靶点的单抗(如抗病毒中和抗体),可选择1种动物种属进行短期的非临床安全性试验,考虑到人 IgG 半衰期一般为 21 d 左右,推荐给药期限至少 21 d。也可在采用疾病动物模型进行药效学试验时纳入安全性评估终点指标,以提供靶点相关的潜在安全性信息。除动物体内试验以外,推荐采用体外 TCR 试验或人细胞阵列技术评估其潜在脱靶风险。

### 3 免疫原性评价

机体对外源性蛋白物质的免疫应答包括细胞免疫和体液免疫,这涉及抗原递呈细胞对抗原的摄取、处理和递呈,T和B细胞的激活、增殖和分化。由于大多数免疫应答导致的不良反应似乎是由体液免疫机制介导,因此循环抗药抗体(anti-drug antibodies, ADA)一直是定义免疫原性的主要标准<sup>[6]</sup>。产品的特异性因素(如产品的来源、翻译后的修饰、聚合物、糖基化、生产细胞相关杂质、制剂中的辅料、容器密闭系统和保存条件等)、患者人群的相关因素(患者的免疫状态和免疫能力、预存抗体、人类白细胞抗

原基因多态性等)以及给药相关因素(给药途径、给药频率、给药剂量、联合给药等)均对免疫原性有明显的影响。

免疫原性对临床有效性和安全性可能会产生不同程度的影响<sup>[7-8]</sup>。对临床有效性的可能影响包括:①具有中和活性的 ADA 可能会使临床有效性降低甚至丧失。②高滴度的非中和性抗体也可能通过与 FcRs 结合导致结合的药物内吞到细胞内,从而降低或消除产品的有效性。③产生的 ADA 可能会通过增加或降低清除率而导致药物药动学改变(血清半衰期的缩短或延长),进而导致有效性降低或增加。④通过抗体反应的表位扩展机制促进中和抗体的产生,进而影响有效性。免疫原性对临床安全性的影响可能会有很大的不同,包括从无明显的临床表现到危及生命的灾难性反应,ADA 导致的临床不良反应包括:① I 型超敏反应,即 IgE 介导的过敏性反应,但比较罕见<sup>[9]</sup>。② III 型超敏反应(免疫复合物疾病,如血清病和肾小球肾炎),即 ADA 与单抗形成中等偏大的免疫复合物(immune complex, IC)并沉积于局部(常见于肝脏、肾脏,但也可见于脾脏、肺脏、心脏、皮肤和脑)或全身小血管基底膜,通过经典途径激活补体系统,并在中性粒细胞、血小板和嗜碱性粒细胞或肥大细胞等效应细胞的参与下,形成以充血、水肿、局部出血、坏死和中性粒细胞浸润为主的炎症反应和水肿<sup>[10-11]</sup>。③ ADA 与单抗和/或补体形成的中等偏小的循环免疫复合物通过与效应细胞表面的 FcRs 或补体受体(complement receptor, CR)交联,进一步促进抗原递呈、效应细胞激活、靶细胞清除及炎症细胞因子的释放。

已有一系列的体外试验和计算机方法可以预测产品相关因素及杂质对抗潜在免疫原性的影响,这些试验主要聚焦于免疫识别和激活的免疫突触(即 DC 和 T 细胞),包括采用计算机方法预测可能与主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) II 结合序列,单抗和杂质(聚合物、宿主细胞蛋白等)对 DC 细胞成熟和激活的影响,采用 LC-MS 法进行的 MHC 相关肽蛋白质组学(MHC-associated peptide proteomics, MAPPs)试验,评估对初始 T 细胞激活试验等<sup>[12-13]</sup>。但这些用于预测人体免疫原性的方法仍有一定的不足,其价值尚未得到公认。计算机预测和 MAPPs 试验可能会过度预测与 MHC 结合并导致 T 细胞结合的肽。T 细胞激活试验是一种静态系统,并不能完全模拟复杂的体内

环境(体内容易受免疫和疾病状态的影响)。此外这种技术敏感程度不佳,对单抗有反应的 T 细胞数量一般很少,因此目前均采用优化培养方法进行改良,如添加促进 T 细胞生长的细胞因子以增加反应性细胞的数量,进而提高体外试验的预测能力。由于这些试验的预测价值尚未被证明且费用昂贵,因此常规情况下一般不会开展此类试验。但如果认为免疫原性风险增加会导致安全性的担忧,则可以考虑进行这些试验。例如:候选单抗靶向 DC 细胞或巨噬细胞表面可内化的受体、拟用于治疗自身免疫性疾病或靶向的细胞表面受体可能会通过 ADA 介导的交联出现非预期的药理和毒理反应。这些 T 细胞表位数据可以用来设计低免疫原性的分子,帮助筛选候选药物,指导临床试验设计和风险控制。

常规动物免疫原性试验通常不能预测人体对单抗类产品的免疫应答能力,其作用仅限于比较同一产品在不同制剂或不同给药途径下的免疫原性差异,或者预测 ADA 所可能导致的临床后果。在动物毒理学试验中进行免疫原性评估,主要是为了帮助解释动物试验结果而不是预测其在人体中的免疫原性,这些免疫原性结果将有助于后续非临床和临床试验的设计。在以下情况下应在非临床试验中检测 ADA:①存在药效活性改变的证据。②在缺少药效学标志物的情况下,暴露量可见非预期的改变。③存在免疫介导的反应证据,如免疫复合物疾病、血管炎或过敏性反应等。由于在试验观察期完成之前很难预测是否需要进行 ADA 检测,因此一般会在试验过程中采集合适的样本,当认为需要 ADA 数据帮助解释某些试验结果时再进行样本检测。若进行了 ADA 检测,应评估 ADA 的出现与试验结果(包括药效学生物标志物、暴露量和毒性反应)的相关性。若检测到 ADA,并且体内毒性试验中没有药效学生物标志物可以说明药物仍持续具有药理学活性时,应对 ADA 的中和活性进行表征,可以通过离体的生物活性试验或合适的 PK/PD 联合试验间接评估 ADA 的中和活性,也可以直接进行中和抗体活性检测。目前有多种检测方法可用于 ADA 的筛选和确证,包括直接/间接 ELISA 法、ECL 法、RIA 法和 SPR 法等,这些方法各有其优缺点,但无论采用何种方法,均需要进行完整的方法学验证,包括临界值、灵敏度、药物耐受性、特异性、选择性(基质干扰、最小稀释倍数)、精密度和稳健性等。由于缺乏阳性抗体标准品,选择的阳性抗体不同会导致方法的灵敏

度、药物耐受性以及临界值等关键指标不同,因此不能对不同试验间的 ADA 结果进行比较。

由于目前开发的单抗均属于人源化或全人源抗体,因此在动物中很大可能会出现 ADA。需要注意的是,检出 ADA 并不能单独作为提前终止非临床安全性试验或改变给药期限的标准,除非在大多数动物中的药理学和/或毒理学作用被 ADA 完全消除。蛋白类产品在豚鼠过敏性试验中通常呈阳性,不能预测人体过敏反应,因此这类试验对抗体类产品的安全性评价几乎没有价值。

#### 4 免疫毒性评价

单抗一般通过多种免疫调节作用发挥药理学作用,但非期望的药理学相关作用(如药理学的放大作用)、对非靶向的免疫细胞和介质的激活或抑制/清除作用、对免疫靶细胞/信号通路长期或不可逆的激活或抑制作用,均有可能导致免疫毒性<sup>[14]</sup>,例如:细胞和组织损伤、炎症、CRS、肿瘤溶解综合征、感染、癌症、自身免疫疾病和超敏反应等。

对免疫系统的长期抑制会使患者的感染(细菌、病毒、真菌和寄生虫等)和肿瘤形成(如淋巴瘤)风险增加。例如:在长期使用抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 单抗的类风湿关节炎患者中,发现患鼻咽炎、上呼吸道感染、机会性感染和细胞内肉芽肿性感染(如肺结核)的风险增加<sup>[15]</sup>。长期使用 natalizumab [抗迟现抗原(very late appearing antigen-4, VLA-4) 单抗,抑制炎症 T 细胞迁移至脑]的多发性硬化症患者,患进行性多灶性白质脑病(progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) 的风险增加。PML 是一种罕见但具有致命性的脑部疾病,由潜伏的多瘤 JC 病毒重激活所导致。此外,在 efalizumab(一种抗 CD-11a 单抗,可影响淋巴细胞循环)治疗的少数银屑病患者以及 rituximab(可清除 B 细胞)治疗的患者中也可见 PML<sup>[16]</sup>。但在这些抗体的毒理学试验中并未发现以上不良反应,这可能是与动物和人体在免疫系统、宿主抵抗力等方面存在的差异以及毒理学试验中动物数量较少有关。同样,在动物中发现的感染和肿瘤形成风险(如感染/肿瘤类型、严重程度、剂量效应关系等)也不能直接外推至人体。应基于证据权重法,综合考虑预期的或观察到的对免疫监视相关指标的影响,在大规模临床试验中评估人体免疫力降低所可能导致的感染和肿瘤风险,并做好相关风险控制和药物警戒计划。

单抗还可能会通过多种免疫机制介导输液反应,包括过敏反应、类过敏反应和 CRS<sup>[14,17]</sup>。这些反应的症状重叠,但通常可通过其反应的范围、持续时间、严重程度和对治疗的反应来区分。过敏反应由 IgE 介导,一般不在首次输注时出现(需要药物致敏),除非患者预存抗药 IgE 抗体,严重的过敏反应在临床比较罕见<sup>[9]</sup>。类过敏反应是一种非 IgE 介导的过敏反应,与免疫细胞和/或补体激活相关。CRS 在临床一般表现为寒战、恶心、皮疹、肌痛、脸红、血管渗漏、气短和/或低血压<sup>[18]</sup>。CRS 在临床一般反应比较轻微且风险可控,但在某些情况下,全身和局部的细胞因子及相关的炎症、血液动力学反应可造成组织和器官损伤,导致弥散性的血管凝血、器官衰竭甚至死亡。抗 CD3 单抗(如 muromonab)、CD28 超级激动剂(如 TGN1412)、免疫检查点抑制剂(如 ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab 等)、共刺激分子(如 4-1BB, CD40, OX40 等)激动剂对免疫系统的激活作用,均可能会导致 CRS,诱导包括 TNF- $\alpha$ 、干扰素- $\gamma$ (interferon, IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) 等细胞因子的释放。此外, Fc 功能效应所导致的抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 和补体依赖的细胞毒性作用(complement dependent cytotoxicity, CDC) 活性也可能导致靶细胞裂解,进而诱导 CRS,如 rituximab。类过敏反应和 CRS 通常会在首次输注时出现(不需药物致敏),并且具有可重复的剂量依赖关系。ADA 与单抗和/或补体形成的具有免疫激活作用的免疫复合物,通过与效应细胞表面的 FcR 或 CR 交联也可能导致输液反应<sup>[19]</sup>。

单抗的动物毒理学试验中常出现输液反应,这往往会导致研究者和监管机构对其安全性的担忧。通常认为种属特异性因素(如 ADA 与抗体或补体形成的具有免疫激活作用的 IC) 导致的输液反应并不能外推至人体,一般不足以阻止药物的继续开发和上市。因此,在出现输液反应后,应进行广泛的机制研究和尽职调查,结合对受试物质量、结构/类别、作用机制/靶点等方面的科学理解,分析这些反应是由受试物直接的药理学作用导致还是由 ADA 介导的继发免疫反应,按照证据权重法评估临床受试者出现输液反应的风险。美国 FDA 自 2004 至 2016 年批准的 49 个生物制品中,有 15 个产品(31%) 在非临床安全性试验中发现了输液反应,其中 12 个被认为是 ADA 介导的延迟反应,4 个是在首次给药后

出现<sup>[20]</sup>。首次给药后出现的输液反应可能涉及不同的发生机制,包括 IgE 介导的过敏反应(即 I 型超敏反应)和非 IgE 介导的反应(包括免疫激活导致的 CRS、免疫细胞或补体激活导致的类过敏反应)<sup>[20]</sup>。多次给药后出现的输液反应通常是由 ADA 介导,常出现于更长给药期限(>4 周)的毒理学试验中。在确定试验的未见有害作用水平(no observed adverse effect level, NOAEL)或最高非严重毒性剂量(highest non-seriously toxic dose, HNSTD)剂量时,除非基于证据权重分析认为输液反应是由 ADA 介导的继发免疫反应所导致,否则不应将输液反应视为非不良反应。对于首次给药即出现输液反应的单抗,尤其是具有免疫激活作用、有可能引发 CRS 的单抗,需要引起高度的关注。除应基于作用机制在体内试验中前瞻性的设计评估药理学作用的检测指标外,还应开展相应的体外试验(如体外细胞因子释放试验),为评估药理学放大作用导致的毒性风险提供补充性信息。在计算首次临床试验起始剂量时,应采用 MABEL 法,同时考虑已有的体外和体内非临床试验数据。在出现输液反应后,及时(一般在 2~4 h 内)采集血液并检测一些生物学标志物,对于阐明输液反应的发生机制可能会有帮助,包括补体(C3, C3a, C5a, Bb, Sc5b-9 等)、急性期反应蛋白(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, Fibrinogen 和 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP), A-2 巨球蛋白、A-1 酸性糖蛋白、血清淀粉样蛋白 A)、免疫球蛋白(IgG, IgM 和 IgE)、ADA 或循环免疫复合物(CIC)等。此外,对怀疑与 ADA 免疫复合物沉积有关的病变部位进行免疫组化检测,也有助于解释毒性病理机制。当毒理学试验中出现输液反应时,为确保试验继续开展,通常会给予盐酸苯海拉明进行处理。但当出现抽搐、震颤、意识丧失、严重呕吐等严重输液反应体征时,仅给予盐酸苯海拉明可能无法有效控制不良反应,需采用多种组合策略。对于首次给药后的严重输液反应,可采用降低给药速度、分多次给药的方法;对于多次给药后出现的输液反应,可停药一段时间以使机体清除 ADA 形成的免疫复合物,并在恢复给药后降低给药速度。此外,在给药前给予动物盐酸苯海拉明和地塞米松或其他类固醇药物进行预处理也可抑制输液反应。

目前尚无专门针对单抗免疫毒性评价的指导原则,虽然 ICH S8 提供了有关药物免疫毒性的非临床研究的建议,但该指导原则并不适用于大分子生物

制品。在 ICH S6(R1)中也几乎无针对免疫毒性评估的建议,并且指出常规的分层试验方法或标准试验组合并不推荐用于生物制品。美国 FDA 于近期发布了一项有关小分子药物和生物制品潜在免疫毒性的非临床安全性评价指导原则草案。该指导原则对具有免疫抑制或免疫激活潜力的药物非临床评估提供了建议,并对在有免疫系统发育担忧的情况下,需要在围产期发育毒性试验和/或幼龄动物试验中增加额外免疫毒性终点的考虑因素提供了建议。虽然该指导原则并不专门针对单抗类药物,但其建议的一些有关免疫毒性评价的科学逻辑原则仍适用于单抗。结合该指导原则以及抗体药物的特点,对抗体药物的免疫毒性评价策略总结如下:① 免疫毒性的评估应包括对免疫系统的药理学作用和非预期作用(包括药理学放大作用、药理学相关的非预期作用、脱靶作用等)的评估。② 对于具有潜在免疫抑制作用/降低免疫系统活性的药物,可采用 ICH S8 中推荐的一些用于评估免疫抑制的经典试验的改良方法。如不能确定对免疫系统有哪些特定影响,建议进行一项常规的附加试验,如 T 细胞依赖性抗体反应(T-cell-dependent antibody response, TDAR)试验,以评价对一些关键免疫细胞(如抗原递呈细胞、辅助 T 细胞和 B 细胞)功能的影响。如果药物对免疫系统的关键组分(如抗原递呈细胞、NK 细胞、T 细胞和 B 细胞等)有不良影响,应考虑对这些关键组分的功能进行评估。最终应基于证据权重分析方法,将所有的免疫毒理学数据视为一个整体,同时考虑药物的药理学作用机制、目标用药人群、适应证等因素,综合解释免疫毒性试验结果,预测人体临床风险。标准的 2 年致癌性试验并不能评估药物诱导的免疫监视降低导致的癌症风险,尤其是潜伏的病毒癌基因、感染物或慢性炎症重激活导致的肿瘤。应基于证据权重法评估药物及靶点的作用/贡献,包括给药后增加肿瘤生成、增长和代谢的潜力,对负责肿瘤监视的关键细胞(如 NK 细胞、T 细胞或 B 细胞等)数量及功能的影响。③ 对于具有潜在(直接或间接)增强免疫系统活性的药物,建议在临床试验前能够提供以下特殊免疫药理学试验:a. 评估免疫激活和配受体相互作用的体外试验,包括通过评估浓度效应曲线以确定有效浓度(如 EC<sub>20</sub>, EC<sub>50</sub>, EC<sub>80</sub>等)或通过直接或竞争性结合试验确定受体占有率(receptor occupancy, RO)。采用何种试验评估功能活性指标取决于拟用的药理学作用的生物学效

应。b. 一项用于评估 CRS 潜力的体外细胞因子释放试验(cytokine release assay, CRA), 采用非激活的人体细胞, 包括平板结合(或其他可以评估受体交联作用的试验)和可溶性形式, 并需设置合适的阳性和阴性对照。④ 总体上, 尚无可靠预测过敏反应或类过敏反应的非临床模型、尚无可靠预测自身免疫性反应的非临床模型。⑤ 如果担忧免疫系统的发育或功能会受影响, 或者现有数据尚不能表征对目标患者人群的潜在风险, 应考虑在围产期发育毒性试验或幼龄动物毒性试验中增加额外的免疫毒性终点以评估对免疫系统发育的影响。

## 5 首次临床试验及起始剂量的选择

在 TGN1412 事件之后, 欧洲 EMA 发布了一项指导原则“Guideline on Strategies to Identify and Mitigate Risks for First-In-Human Clinical Trials with Investigational Medicinal Products (2007)”, 着重强调了研究探索完整的药理学剂量/浓度-反应曲线关系的重要性, 并提出了基于 MABEL 选择首次人体临床试验最大推荐起始剂量(maximum recommended starting dose, MRSD) 的建议。ICH M3(R2) 中也强调, 在选择起始剂量时, 除要考虑与相关动物体内毒理学试验给药剂量相比有充分的安全界限/范围外, 还要考虑所有相关的生物学/药理学和药动学信息。对于具有免疫激动特性的生物药物, ICH S9 中也建议起始剂量的选择应考虑采用 MABEL 法。美国 FDA 对免疫激活的抗肿瘤药物首次人体临床试验剂量进行了回顾性分析, 发现对于某些抗体产品仅基于毒理学试验的 1/6 HNSTD 或 1/10 NOAEL 计算所得的 MRSD 是不安全的, 尤其是对 Fc 段进行了工程改造导致功能活性增加的抗体, 可能会在更低的剂量(与非工程改造的抗体比较)下出现毒性<sup>[21]</sup>。

MABEL 是指在体外和/或体内实验系统中能够产生药理学活性的最低剂量/浓度。采用 MABEL 法计算 MRSD 时, 最关键的是确定何为“最低”生物学效应。采用不同终点指标的生物学效应计算的 MRSD 会有很大差异, 因此最好能够采用最敏感、最稳健、与临床反应最相关的指标计算。这就需要对所有相关的生物学/药理学、药动学和毒理学信息进行综合考虑, 尤其是要建立完整的剂量/浓度-反应关系曲线。对于单抗药物, 当靶点结合水平或 RO 与功能效应直接相关时, 一般采用 RO 或靶点结合水平作为生物学效应的替代指标用于计算 MABEL。对于不同类型的单抗, RO 与生物学效应的关系有

明显的区别。拮抗型单抗一般需要高水平的 RO(如 >90%) 才能达到最大效应, 而激动型单抗只需要较低的 RO(如 <10%) 就可以达到最大效应。确定用于计算 MABEL 的 RO 值时, 需要根据 RO 与生物学效应的具体关系, 可根据动物体内试验结果以及体外相对亲和力/相对效力的药理学研究数据确定, 一般选择 10% ~ 50% RO 计算 MABEL。对于靶向血液细胞表面靶点的单抗, 可直接采用流式细胞术测定 RO; 但对于靶点仅在组织中表达的单抗, 或靶向可溶性靶点且缺乏直接检测靶点表达水平方法的单抗, 测定 RO 相对较困难, 可根据预测的人体血浆药物浓度和人体中已知的靶点表达水平及周转情况计算 MABEL。但由于获得的数据信息有限, 很多计算数据都是基于假设, 这可能会影响预测结果的稳健性。有些情况下, RO 可能并不是最敏感的指标或者 RO 与生物学效应的关系并不明确, 如主要依靠其 Fc 段发挥功能效应(如 ADCC) 的单抗, 这就需要采用其他药理活性指标(如细胞激活/清除、免疫抑制、下游信号表达等)来计算 MABEL<sup>[22-24]</sup>。如有可能, 可采用一个合适的数学模型(如 PK/PD 模型) 将所有的体外体内药理学试验数据(如与靶点/Fc $\gamma$ Rs 亲和力、功能效应及持续时间、RO、靶点周转速率)、药动学数据整合, 用于预测人体剂量与药理反应的关系, 以计算 MABEL。对于预期出现的急性反应(如 CRS 或快速的细胞清除), 可结合人体拟用剂量下的药物达峰浓度( $C_{max}$ ) 以及体外功能活性试验中药物起效浓度, 综合考虑起始剂量的选择。相反, 对于风险相对较低的分子, 如果靶点的信号通路已经过良好的表征, 并没有急性毒性的担忧, 也可基于同靶点同型对照单抗的已有临床经验采用更高的起始剂量。

## 6 结语

对于非临床安全性试验, 通常需要采用能够代表人体临床试验拟用产品质量的受试物开展试验。若产品在全生命周期中发生了工艺变更, 应采用更为敏感的药学分析方法进行质量可比性分析。只有存在可能会导致有临床意义的药学质量差异或药学对比数据不足以评估对临床的影响时, 才会考虑进行相应的非临床试验, 以评估可能的临床后果。选择毒理学试验的相关动物种属时, 关键是要证明受试物在该动物种属中具有与人体相当的药理学活性, 最为直接的证据是证明受试物在动物体内具有药理学活性, 可在毒理学试验中伴随药效学生物标

志物的检测或功能活性评价,以评价药理学相关的放大作用。体外功能活性对比试验对于评估动物体内试验结果外推至临床的不确定性具有重要的价值,进行临床风险评估时应将这些体外试验结果纳入考量。通常,一般毒理学试验应在2种相关动物种属中开展,当仅采用1种相关动物种属或完全豁免动物体内试验时应提供科学的合理性依据。无相关动物种属时,推荐首选人源化转基因动物,其次才是采用同源替代产品。免疫原性可能会对抗体类产品的有效性和安全性产生不同程度的影响,但由于动物和人体的免疫系统差异,动物体内的免疫原性研究结果并不能外推至人体。动物试验中伴随免疫原性研究主要是为了解释药效、药动学及毒理学试验中发现的异常结果,预测人体免疫原性的临床后果。目前,预测抗体类产品的人体免疫原性仍有一定的挑战,预测的T细胞表位数据可以用来设计低免疫原性的分子。对于具有免疫调节作用的抗体,需要关注潜在的免疫毒性作用。除药理学放大作用外,对非靶向的免疫细胞或免疫介质的激活和抑制/清除作用也可能导致免疫毒性,如感染、肿瘤形成、输液反应以及自身免疫性疾病等。总体上,尚无可靠预测这些免疫毒性的非临床模型,除应基于作用机制在动物体内试验中前瞻性的监测一些药理学标志物外,在出现非预期的免疫毒性后,还应进行广泛的机制研究和回顾性调查,基于证据权重法分析人体出现这种免疫毒性的可能性。对于一些相对可接受、可控制的风险,若能做好相关风险控制和药物警戒计划,可在临床试验中进一步评估。在临床试验过程中,应及时对收集的非临床和临床信息进行再评价,必要时应及时修订临床试验方案、暂停或终止临床试验。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 戴学栋,王寅,周恒,等. 单克隆抗体药物风险因素分析及非临床研究评价的一般考虑[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(18): 1784-1792.
- [2] SUNTHARALINGAM G, PERRY MR, WARD S, et al. Cytokine storm in a phase I trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412 [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(10): 1018-1028.
- [3] EASTWOOD D, FINDLAY L, POOLE S, et al. Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4<sup>+</sup> effector memory T-cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(3): 512-526.
- [4] BUSSIERE JL, MARTIN P, HORNER M, et al. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals [J]. *Int J Toxicol*, 2009, 28(3): 230-253.
- [5] BRENNAN FR, CAVAGNARO J, MCKEEVER K, et al. Safety testing of monoclonal antibodies in non-human Primates: case

- studies highlighting their impact on human risk assessment [J]. *mAbs*, 2018, 10(1): 1-17.
- [6] FDA. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products [S]. 2014.
  - [7] NECHANSKY A, KIRCHEIS R. Immunogenicity of therapeutics: a matter of efficacy and safety [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2010, 5(11): 1067-1079.
  - [8] SMITH A, MANOLI H, JAW S, et al. Unraveling the effect of immunogenicity on the PK/PD, efficacy, and safety of therapeutic proteins [J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 2342187.
  - [9] CHUNG CH, MIRAKHUR B, CHAN E, et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1, 3-galactose [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11): 1109-1117.
  - [10] ROJKO JL, EVANS MG, PRICE SA, et al. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: review and case studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 42(4): 725-764.
  - [11] KRISHNA M, NADLER SG. Immunogenicity to biotherapeutics—the role of anti-drug immune complexes [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 21.
  - [12] GROELL F, JORDAN O, BORCHARD G. *In vitro* models for immunogenicity prediction of therapeutic proteins [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 130: 128-142.
  - [13] GOKEMEIJER J, JAWA V, MITRA-KAUSHIK S. How close are we to profiling immunogenicity risk using *in silico* algorithms and *in vitro* methods?: an industry perspective [J]. *AAPS J*, 2017, 19(6): 1587-1592.
  - [14] BRENNAN FR, MORTON LD, SPINDELDREHER S, et al. Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies [J]. *mAbs*, 2010, 2(3): 233-255.
  - [15] RYCHLY DJ, DIPIRO JT. Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists [J]. *Pharmacotherapy*, 2005, 25(9): 1181-1192.
  - [16] CARSON KR, FOCOSI D, MAJOR EO, et al. Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(8): 816-824.
  - [17] MAGGI E, VULTAGGIO A, MATUCCI A. Acute infusion reactions induced by monoclonal antibody therapy [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2011, 7(1): 55-63.
  - [18] LEE DW, GARDNER R, PORTER DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome [J]. *Blood*, 2014, 124(2): 188-195.
  - [19] VULTAGGIO A, NENCINI F, PRATESI S, et al. Manifestations of antidrug antibodies response: hypersensitivity and infusion reactions [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(12): 946-952.
  - [20] MEASE KM, KIMZEY AL, LANSITA JA. Biomarkers for non-clinical infusion reactions in marketed biotherapeutics and considerations for study design [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2017, 4: 1-15.
  - [21] SABER H, GUDI R, MANNING M, et al. An FDA oncology analysis of immune activating products and first-in-human dose selection [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 81: 448-456.
  - [22] MULLER PY, BRENNAN FR. Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2009, 85(3): 247-258.
  - [23] TIBBITTS J, CAVAGNARO JA, HALLER CA, et al. Practical approaches to dose selection for first-in-human clinical trials with novel biopharmaceuticals [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2010, 58(2): 243-251.
  - [24] MULLER PY, MILTON M, LLOYD P, et al. The minimum anticipated biological effect level (MABEL) for selection of first human dose in clinical trials with monoclonal antibodies [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(6): 722-729.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-10-24