

· 研究进展 ·

抗体偶联药物临床前安全性评价考虑要点

王欣, 耿兴超, 刘丽, 文海若, 霍艳* (中国食品药品检定研究院, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176)

摘要: 抗体偶联药物 (Antibody Drug Conjugate, ADC), 是通过连接子将高细胞毒性化合物连接到靶向肿瘤抗原的抗体上, 利用抗体靶向识别将化合物递呈至肿瘤细胞表面, 杀死肿瘤细胞。ADC 药物同时具有抗体和化学药物属性, 是将两者的优势结合, 极大地提高了药物安全有效性。ADC 药物结构复杂, 在抗原识别表位、连接位点、连接子以及小分子药物各组分均存在特异性, 所以在开展安全性评价研究时有一定的特殊性。本文将从动物种属选择、一般毒性研究、毒代动力学研究、组织交叉反应、免疫原性检测、安全药理研究、遗传毒性研究等方面, 阐述 ADC 药物临床前安全性评价的考虑要点和研究策略。

关键词: 抗体偶联药 (ADC); 临床前; 安全性评价; 体内试验

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)11-1515-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.11.011

On Preclinical Safety Evaluation of Antibody Drug Conjugate

Wang Xin, Geng Xingchao, Liu Li, Wen Hairuo, Huo Yan* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing Key Lab for Pre-clinical Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China)

Abstract: Antibody drug conjugate (ADC) is produced by coupling high cytotoxic chemical with monoclonal antibody (mAb) through a linker. By being conjugated with antibody targeting to the tumor antigen, the chemical is delivered to the surface of tumor cells, and kills the tumor cells. ADCs possess the properties and advantages of both monoclonal antibodies and chemical drugs, and their safety and effectiveness are improved greatly. Due to the complex structure, specificities in antigen recognition epitopes, linking sites, linkers, and small molecular chemicals, the safety evaluation studies of ADCs have some special considerations. In this paper, the main considerations and research strategies of preclinical safety evaluation of ADCs are introduced from the following aspects, including animal species selection, general toxicity study, toxicokinetic study, tissue cross reaction, immunogenicity test, safety pharmacology, genotoxicity study, and so on.

Keywords: antibody drug conjugate (ADC); preclinical; safety evaluation; *in vivo* test

抗体偶联药物 (Antibody-Drug Conjugate, ADC) 是通过连接子 (Linker) 将活性小分子化合物偶联至单克隆抗体上而产生的。目前研发的大

多数 ADC 药物临床上主要用于抗肿瘤治疗, 将高细胞毒性化合物连接至靶向肿瘤抗原的抗体上, 借此递呈至肿瘤细胞表面, 杀伤肿瘤细胞^[1]。基

基金项目: 十二五国家科技重大专项“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(编号 2015ZX09501007-004)

作者简介: 王欣, 副研究员; 研究方向: 生物药临床前安全性评价研究; Tel: (010) 67876252; E-mail: wangxin-26@nifdc.org.cn

通信作者: 霍艳, 研究员; 研究方向: 药物临床前安全性评价研究; Tel: (010) 67876252; E-mail: yanhuo@nifdc.org.cn

于ADC结构比较复杂,在抗原识别表位、连接位点、连接子以及小分子药物等各组分均存在特异性,既不同于单抗类生物药,又不同于化学药。所以,需要根据ADC结构特点和预期的体内生物学过程,遵循case-by-case原则,开展临床前安全性评价研究^[1-3]。

本文将从动物种属选择、一般毒性研究、毒代动力学研究、组织交叉反应、免疫原性检测、安全药理研究、遗传毒性研究等方面,并结合笔者在ADC新药安全性评价研究中的实践经验,以及多年从事生物药安全性评价研究的工作经验,阐述ADC药物临床前安全性评价的考虑要点和研究策略^[4]。希望对业界同行在开展同类型研究时提供借鉴。

1 动物种属选择

ADC药物的结构组成同时具有单抗和化学药物双重属性。根据其体内作用机制,在选择安全性评价研究用动物时,原则上应与生物药相似,即该动物模型上存在受体或抗原表位,ADC能够与靶点结合并产生药效活性;但同时还要兼顾小分子药物研究的实验动物种属特异性,适时适当开展啮齿类动物实验,比如短期毒性研究^[5]。一些情况下,也可以使用单一动物种属进行安全性评价研究。比如:1)药物在某一种属体内的生物活性已被充分研究和认识;2)两种属动物的短期给药毒性研究结果具有较好一致性;3)通过结合力、生物学活性、组织交叉反应等试验方法判断只有一种动物是相关动物种属。当受试ADC药物无相关动物种属时,也可以考虑使用替代分子或者替代模型进行研究。替代分子的生产过程和质量标准,应与人用ADC药物标准一致。合成替代分子的单抗部分可以直接结合于动物受体,但抗体结构域的改变可能会影响药物代谢和毒性特点。因此,使用替代分子获得的试验结果是否能够辅助预测毒性仍需要进行充分评估。

2 一般毒性研究

根据我国《药物单次给药毒性研究技术指导原则》^[6]和《药物重复给药毒性研究技术指导原则》^[7]的要求,并针对受试ADC药物特点和试验目的,设计和开展试验研究。研究中,将ADC药物作为一个整体进行研究,根据其结构组成及ADC体内代谢情况,考虑是否有必要对各组分开单独的试验研究。通常情况下,ADC的抗体部分不是全新单抗,所以不需要对裸抗进行单独研究。已有数据证

实,ADC毒性主要来自小分子,若小分子药物为上市药或者可获得较全面的毒性信息,则不必开展单独研究;若小分子药物为全新的、研究不充分时,则需要开展单独试验对小分子或连接子进行研究(在啮齿类动物中进行),并伴随开展毒代检测和组织病理学检查。可以在ADC毒性试验中设置小分子给药组,给予最大耐受量并伴随进行毒代和组织病理学检查,以对比小分子药物与ADC之间的毒副反应差异以及探讨毒性作用物质基础。是否需要对接子进行研究,取决于连接子的循环浓度、化学性质、裂解后的体内生物活性,以及游离连接子在终产品中浓度等因素。若终产品中游离浓度很低,则不必开展单独研究。一般情况下,不需要对接子进行单独的毒性研究。由于ADC中抗体的半衰期较长,所以在单次给药毒性研究中,需要适当延长恢复期时间;并且,为了观察小分子药物毒副反应及可逆性,需要增加毒代、临床病理、组织病理检查等较多指标。重复给药研究试验周期一般不超过3个月^[1-7]。

3 毒代动力学研究

毒代动力学研究也是药物安全性评价研究的一部分,在不影响安全性评价试验的情况下建议结合于一般毒性研究中。啮齿类动物要设置专门的卫星组动物采血,非啮齿类动物因血容量大可以直接使用毒性实验动物采血。ADC药物毒代动力学研究是为了获得药物体内暴露相关参数,比如C_{max}和AUC等,需要测定完整ADC、总抗体、小分子的血药浓度及暴露量,这些数据可以帮助解释毒理学研究结果以及在首次临床试验(First-in-human, FIH)中帮助选择剂量。检测方法包括配体结合试验、LC-MS/MS、电化学发光法等。建议在对毒代样本分析时,伴随进行抗药抗体(Anti-drug Antibody, ADA)检测,以便更好地解释毒代数据^[8-10]。

4 安全药理研究

参考ICH S9和ICH S6(R1)指导原则^[11-12]要求,认为对抗肿瘤生物药进行安全性评价研究时,不需要做单独的安全药理试验,可以将检测指标比如呼吸系统、心血管系统、中枢神经系统等,结合于单次给药或者重复给药毒性研究中,在给药期和恢复期间选择恰当时间点观察测定。当ADC中小分子部分是全新结构化合物时,要求对小分子化合物开展体外hERG试验研究。

5 免疫原性试验

免疫原性是指能够刺激机体形成特异抗体或致敏淋巴细胞的能力。ADC药物中因含有抗体结构,所以进入体内一般都会产生免疫原性。在安全性评价研究中,通常将免疫原性测定结合于重复给药毒性研究,在给药期和恢复期间选择不同时间点采血分离血清测定。免疫原性评估通常采用多层检测的策略(Multi-Tiered Testing Approach),包括抗药抗体(Anti-drug Antibody, ADA)筛选和确证、抗体滴度测定、中和抗体检测、抗体亚型分析。经过对血清样本分析,若筛选和确证其中存在抗药抗体,则可依据研究目的考虑是否进行更深的研究,比如抗体滴度、抗体反应阳性率、中和抗体等。目前,有多种方法可进行ADA检测,包括酶联免疫法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、生物薄膜干涉法(BLI)、表面等离子体共振(SPR)和电化学发光法(ECL)等。需要注意的是,当ADC血药浓度较高时会干扰ADA测定。由于不同种属产生抗药抗体的免疫机制不同,在安全性评价动物实验中检测到ADA并不代表人用药后会产生ADA。临床前ADA测定结果可以辅助解释毒性试验和毒代研究结果。ADA结果分析,通常应与药理学变化、药代/毒代参数改变,以及补体活化等结合,进行综合分析。并且,还应注意免疫复合物形成和沉积相关的病理改变^[13-16]。

6 组织交叉反应

组织交叉反应试验(Tissue Cross Reaction, TCR)是体外检测单抗或抗体样生物制品与组织上的抗原决定部位结合的试验,目的是确认受试物能与药效靶器官结合,和检测受试物是否会与非靶器官结合等情况,以预测药物进入体内的毒性靶位和帮助选择安全性评价研究用实验动物。TCR试验结果对于受试物开展非临床研究有一定的借鉴意义和作用。ADC结构中含有抗体结构,所以也需要开展TCR试验研究。通常采用免疫组织化学技术对一系列人和动物的冰冻组织切片进行染色,然后进行显微检查测定^[11,17-19]。

目前,国内外同行以及监管部门,对TCR试验结果的可信性和参考价值说法众多,随着TCR试验开展增多,该方法的局限性也更多暴露出来。比如,受试物不是好的免疫组化反应物,TCR研究技术上有时不可行;组织结合本身并不意味着体内生

物学活性,结合部位如为不接触抗体部位,认为不相关;TCR研究对毒性试验动物种属选择参考价值有限;当人组织发现交叉反应,在选择的动物组织进行评价可提供临床前毒性的补充信息时,不建议使用全套动物组织进行TCR研究。ICH S9 Q&A指出^[20],因TCR试验结果价值有限,ADC临床前研究中可以不做TCR检测。但是,各国新药研发水平不同,申报审批要求也存在差异。我国食品药品监督管理局药品审评中心于2008年发布《人用单克隆抗体质量控制技术指导原则》^[21]指出:(1)当相同或相关抗原决定簇在人非预定的细胞或靶组织表达时,可观察到抗体与它们结合。非靶组织结合可能具有严重后果,特别是使用药理活性抗体或细胞毒性免疫结合物时。因此,一般在I期临床试验前应经过用人组织或细胞进行交叉反应性或非靶组织结合的实验室检测。(2)当有适当模型时,单克隆抗体与非靶人组织的交叉反应性应在动物种属进行一次综合的体内试验。试验结果,特别是对具有溶细胞性的免疫结合物或具有抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC)活性的抗体,通常要求进行更广泛的临床前试验,包括用1种以上动物超剂量及重复剂量进行动物试验。设计临床试验时应考虑对非靶组织的定位。原国家食品药品监督管理总局2015年发布《生物类似药研发与评价技术指导原则(试行)》^[22],其中与TCR研究有关的规定:

(1)比对原则:每一阶段的每一个比对试验研究,均应与参照药同时进行,并设立相似性的评价方法和标准;(2)一致性原则:方法和技术首先考虑与参照药一致,对采用其他敏感技术和方法,应评估其适应性和可靠性。

综上所述,笔者认为要根据受试物的研发情况、研发阶段、结构组成等因素,考虑是否需要做TCR研究。一般情况下,对于抗体和小分子化合物都是已获得批准,并且毒性信息充分的ADC药物,不需要进行TCR试验研究。当单克隆抗体连接连接子和/或小分子后,其结构域会发生改变,抗体的靶向性可能会受影响。可以考虑通过TCR试验,对结合和未结合小分子的抗体进行比对研究,以考察ADC的靶向性^[23]。

7 遗传毒性研究

通常认为ADC潜在的遗传毒性主要来自于小分

子药物, 抗体和ADC本身不需要进行标准的体外遗传毒性检测。如果已有数据可充分提示ADC中的小分子药物为明确的非遗传毒性化合物或对其作用机制有充分认识的遗传毒性化合物, 则无需做遗传毒性研究; 如该小分子化合物是新型化合物或作用机制不明确, 则需要开展全面遗传毒性评价^[1-5,24]。相关遗传毒性研究应基于ADC的理化性质(包括稳定性、活性)和体内剪切机制(包括降解小分子化合物、小分子连接子、游离连接子)等特征来确定需要对ADC中哪些组分开展试验。遗传毒性研究方案可参考2018年最新颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》^[25]。

8 其他安全性研究

开展ADC药物的其他安全性评价研究时, 比如生殖和发育毒性、致癌性、制剂安全性等, 可以参考国内外生物药和抗肿瘤药的相关指导原则进行。

9 结语

在开展新药安全性评价研究时, 要根据药物作用机制设计和开展试验, 选择适宜的实验动物, 设定合理的试验剂量, 检测恰当的生理指标, 以充分暴露并评估药物的安全性^[26]。ADC药物安全性评价也要遵循这些原则进行。

参考文献:

- [1] Roberts SA, Andrews PA, Blanset D, et al. Considerations for the Nonclinical Safety Evaluation of Antibody Drug Conjugates for Oncology [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2013, 67 (3): 382-391.
- [2] Lansita J A, Burke J M, Apgar J F, et al. An Introduction to the Regulatory and Nonclinical Aspects of the Nonclinical Development of Antibody Drug Conjugates[J]. Pharm Res, 2015, 32 (11): 3584-3592.
- [3] Hinrichs M J M, Dixit R. Antibody Drug Conjugates: Nonclinical Safety Considerations[J]. AAPS, 2015, 17 (5): 1055-1064.
- [4] 抗体偶联药物质量控制和临床前评价专家共识[J]. 中国药事, 2018, 32 (7): 991-1004.
- [5] Blaich G, Baumann A, Kronenberg S, et al. Non-clinical Safety Evaluation of Biotherapeutics - Challenges, Opportunities and New Insights[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2016, 80S: S1-14.
- [6] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 药物单次给药毒性研究技术指导原则 [EB/OL]. [2018-09-01]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=189>.
- [7] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 药物重复给药毒性研究技术指导原则 [EB/OL]. [2018-09-05]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=192>.
- [8] Kraynov E, Kamath A V, Walles M, et al. Current Approaches for Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Characterization of Antibody-Drug Conjugates: An Industry White Paper[J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44 (5): 617-23.
- [9] Kamath AV, Lyer S. Preclinical Pharmacokinetic Considerations for the Development of Antibody Drug Conjugates[J]. Pharm Res, 2015, 32 (11): 3470-79.
- [10] Jenkins R, Duggan JX, Aubry AF, et al. Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics[J]. AAPS J, 2015, 1 (17): 1-16.
- [11] OECD. Guidance ICH S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals [EB/OL]. [2018-09-05]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S9/Step4/S9_Step4_Guideline.pdf.
- [12] OECD. Guidance ICH S6 (R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals [EB/OL]. [2018-09-05]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf.
- [13] Hock MB, Thudium KE, Carrasco-Triguero M, et al. Immunogenicity of Antibody Drug Conjugates: Bioanalytical Methods and Monitoring Strategy for a Novel Therapeutic Modality [J]. AAPS, 2015, 17 (1): 335-343.
- [14] Kaur S, Xu K, Saad OM, et al. Bioanalytical Assay Strategies for the Development of Antibody-drug Conjugate Biotherapeutics[J]. Bioanalysis, 2013, 5 (2): 201-26.
- [15] Myler H, Rangan VS, Wang J, et al. An Integrated Multiplatform Bioanalytical Strategy for Antibody-drug Conjugates: A Novel Case Study[J]. Bioanalysis, 2015, 7 (13): 1569-82.
- [16] Gouty D, Cai CC, Cai XY, et al. Recommendations for the Development and Validation of Neutralizing Antibody Assays in Support of Biosimilar Assessment[J]. AAPS J, 2017, 20 (1): 25.

- [17] 余珊珊, 王海学, 胡晓敏, 等. 组织交叉反应试验在非临床安全性评价中的应用及案例分析 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25 (6): 634-638.
- [18] 吕建军, 张硕, 林志, 等. 单克隆抗体及基于抗体类药物组织交叉反应研究现状及关注点[J]. 药物分析杂志, 2015, 35 (12): 2061-2069.
- [19] Wang RE, Liu T, Wang Y, et al. An Immunosuppressive Antibody Drug Conjugate[J]. J Am Chem Soc, 2015, 137 (9): 3229-32.
- [20] OECD. Guidance ICH S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals Question and Answers: Current Step 4 Version [EB/OL]. [2018-09-05]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S9/S9IWG_Document_Step4_QAs_2018_0409.pdf.
- [21] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 人用单克隆抗体质量控制技术指导原则 [EB/OL]. [2018-09-05]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=39>.
- [22] 国家食品药品监督管理总局. 生物类似药研发与评价技术指导原则 (试行) [EB/OL]. (2015-02-28) [2018-09-05]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1616/115104.html>.
- [23] Girault D, Trouvin JH, Blachier-Poisson C, et al. Biosimilars: from Technical to Pharmacoeconomic Considerations[J]. Therapie, 2015, 70 (1): 47-55.
- [24] 朱明月, 郭靖, 郝晨洲, 等. 抗体药物偶联物的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2017, 27 (6): 490-497.
- [25] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则[EB/OL]. [2018-09-05]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=298>.
- [26] 黄瑛, 霍艳, 王欣, 等. 新型抗体类药物的临床前安全性评价策略和案例 [J]. 药物评价研究, 2018, 41 (1): 35-40.

(收稿日期 2018年9月11日 编辑 王雅雯)