



致力法規科學
守護生命健康
Regulatory Science, Service for Life

免疫活化抗體藥品研發

— 選擇首次人體試驗起始劑量之考量重點

簡文斌¹

前言

近年來伴隨著生物與基因工程製藥技術的進步，及由於小分子藥品進步發展空間有限，生物製劑藥品逐漸成為藥品研發的主流，而單株抗體藥品的發展更是蓬勃。此類藥品治療領域從癌症治療到免疫系統疾病，應用範圍相當廣泛。然而生物製劑藥品因分子量大且結構複雜，尤其藥品的特性及作用機制具有物種專一性，如何由臨床前體外與動物療效、安全性試驗結果，合理地推估首次人體(first in human: FIH)安全起始劑量，一直是醫藥先進國家高度關注與討論的議題。而過去發生的數起事件，其中包括最有名在英國發生的 TGN1412 (CD28 superagonist antibody) 引發細胞激素風暴(cytokine storm)事件，造成六位志願接受抗體的健康受試者全都進入了加護病房；到近期在法國發生的 BIA 10-2474 [fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor] 事件，造成一人死亡、五人住院的悲劇，更加深此方面安全性的考量。綜觀這些歷史事件，雖然藥品在進入臨床試驗前，皆執行了許多臨床前藥理與毒理試驗，為何開發藥廠仍無法由已執行的臨床前療效與安全性數據，精確地推估出安全且合理的首次人體使用劑量或重覆給藥劑量呢？其執行之臨床前試驗是否仍有不足之處或者評估有誤，而造成規劃之臨床試驗無法達到保護受試者安全之目的？

自 2006 年 TGN1412 細胞激素風暴事件發生以後，至今 11 年來，各醫藥先進國家研究人員與法規單位，無不致力於回溯分析該藥品研發的整個過程，包括執行了那些臨床前試驗，及其臨床試驗的設計，以探討此事件發生的可能原因。所獲得的部分結論，除了因為此藥品在當時為新作用機轉外(雖然有相同作用機轉藥品，但都仍在臨床試驗階段)，另外亦認為是抗體藥品的作用機轉若為直接活化免疫系統，其發生非預期不良反應的風險將較其他類的抗體藥品高出許多。後續相關的藥品，包括 CD antigen blockers 藥品(例如:Tositumomab [anti-CD20]、Rituximab [anti-CD20]、Alemtuzumab [anti-CD52])，由於直接與淋巴球上特定 CD 抗原結合，因此即便是人類化之單株抗體，發生輸注反應的比例仍相當地高。此類藥品臨床上常見之非預期不良輸注反應症狀往往不具特異性，亦無法事先預測是否會發生？或哪些的病患較易發生？輸注反應可能發生的部位分布相當廣，症狀從較輕微的體表皮膚疹、打噴嚏，到頭痛、四肢麻、抽筋等中度症狀，最嚴重的症狀可能造成受試者器官損傷甚至死亡，且此類不良反應常在短時間內就可能發生。

¹ 財團法人醫藥品查驗中心新藥科技組



因此臨床試驗通常採用事前預防性給藥(例如：抗組織胺)的方式^[1]。

本文先就 TGN1412 抗體藥品開發過程中所執行之臨床前藥理與毒理試驗資料，探討當年為何無法由已獲得的藥毒理資訊，預防嚴重不良反應的發生。亦引述美國 FDA 審查員於 2016 年所發表的文章，該文整理了 US FDA 資料庫中已進入臨床的抗體藥品，探討以 minimal anticipated biological effect level (MABEL) 概念推估之起始劑量，進入臨床試驗後的合適性，以及那些數據為 MABEL 評估概念之重要因子。另外，亦介紹現今美國、歐盟及日本對於生物製劑藥品，首次人體臨床試驗起始劑量之法規要求。本文最後將整合上述資訊，提出 CDE 藥毒理小組對於此類高風險抗體藥品，以 MABEL 推估安全合理的首次人體起始劑量之審查考量重點，此原則亦適用於非免疫活化作用之抗體藥品。希望藉由本文的說明，有助於國內抗體藥品開發業者決定合理安全的首次人體起始劑量，並遵循抗體藥品首次人體臨床試驗，法規單位對於臨床前藥毒理之要求。

歷史事件的省思 - TGN1412 引發之細胞激素風暴

TGN1412 係由德國 TeGenero 公司開發，為人類化抗 CD28 receptor (簡稱 CD28) 單株抗體(humanized mAb)，其為 CD28 之致效劑(agonist)。然而其作用機轉不同於傳統的抗 CD28 抗體多結合在 CD28 分子上方 CD28 ligand 結合位置，TGN1412 結合在 CD28 分子 C¹D loop 的位置，此結合造成 TGN1412 不需要抗原的協助，就能夠緊抓住 CD28 分子上一個靠近細胞膜，沒有其他分子會作用的區域，預期可以不透過 T-cell receptor，直接活化及促進 regulatory T cells (CD4+CD25+) 的增生。Regulatory CD4+CD25+ T cells 已被證實對於抑制自體免疫疾病的發生扮演重要的角色，因此 TGN1412 被稱為 CD28 的超級促效劑 (superagonist) (圖一)。於首次執行於健康受試者的第一期臨床試驗，以低於動物毒理試驗安全劑量 500 倍的劑量為臨床起始劑量(0.1 mg/kg)，以靜脈輸注方式施打。卻於第一位受試者施打數分鐘後，即開始出現頭痛、腰部肌肉痛等症狀，後來陸續發生低血壓、心跳過速、發燒、淋巴球/單核球減少等症狀，雖於輸注後約 5 小時給予第一劑 corticosteroid，症狀並未立即獲得控制。且在觀察到這些不良反應後仍未停止臨床試驗，繼續納入受試者接受藥品，總計收納六位健康受試者，最終造成受試者發生多重器官衰竭，全部進入加護病房接受治療的悲劇(圖二)。根據英國 Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) 事後推測，TGN1412 可能不僅活化大部份的調節性 T 細胞，同時也活化了所有的 T 細胞，這種情況將會導致細胞釋放出大量的免疫分子，引發細胞素風暴，進而造成休克和多重器官衰竭。

在 TGN1412 之前，TeGenero 公司已使用數個與 TGN1412 類似的 variants 執行數個臨床前試驗，驗證此類超級促效劑的療效與安全性，認為頗具開發潛力。因此 TeGenero 對於開發 TGN1412 用於自體免疫疾病與 B-cell lymphoma 的治療深具信心。檢視



TGN1412 藥品首次人體臨床試驗送審時提供之臨床前藥理與毒理試驗資料^[2]，包括體外 flow cytometry 及 Biacore 分析皆顯示 TGN1412 專一地與 CD28 結合，對於 cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 或其他 inducible co-stimulator 則無反應。比較物種間 T cells 表現之 CD28 與 TGN1412 之結合親和力(binding affinity)，嚙齒類顯著低於與非人靈長類（食蟹猴(cynomolgus monkey)與恆河猴(rhesus monkey)之結合親和力相當)。廠商比較 CD28 C" D loop 位置之胺基酸序列，人類與恆河猴只有一個胺基酸不同；與食蟹猴相比，則六個胺基酸中兩個有差異。此外，CD28 extracellular domain 與負責訊號傳遞的 Fc region 胺基酸序列，在這兩個猴類品系與人類相似度為 100%。然而，嚙齒類與人類胺基酸序列相似程度則相當地低^[3]。在未給予 T-cell receptor 刺激的體外試驗條件下，相較於傳統的抗 CD28 抗體，只有 TGN1412 可快速誘導健康捐贈者 T-cells 的增生。綜合體外試驗結果顯示 TGN1412 能專一地與人類具高相似性的 CD28 胺基酸序列結合，食蟹猴與恆河猴為 TGN1412 執行臨床前療效及安全性試驗較合適的物種(relevance animal species)。

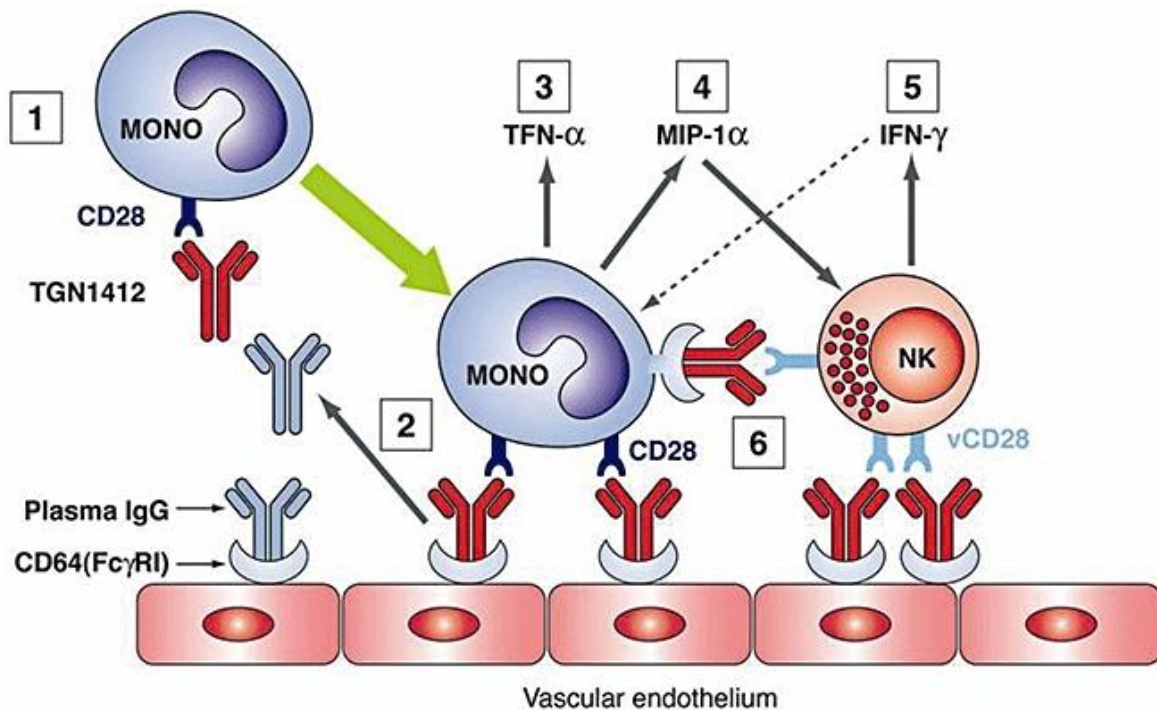
於食蟹猴與恆河猴進行之四週重覆劑量毒理試驗，並同時結合安全性藥理試驗，觀察中樞神經、呼吸以及心血管系統等器官系統，亦同時觀察與測量毒理動力學(toxicokinetic study:TK)相關參數，毒理試驗劑量為 5 到 50 mg/mL，在最高劑量 50 mg/mL 下，未觀察到與藥品相關之明顯不良反應，尤其未觀察到後來在臨床試驗觀察到的過度免疫系統異常與活化現象。中樞神經、呼吸以及心血管系統等主要維持生命器官系統亦未觀察到顯著的影響，因此 NOAEL 訂為 50 mg/kg。此外，廠商再以 rat anti-CD28 antibody: jj316 以及 TGN112 (TGN1412 的 variant)，同樣於合適的物種猴子進行毒理試驗。試驗結果除了在第一次給藥後第 13 天發現 CD4⁺、CD8⁺ 增加，5 mg/kg 劑量組觀察到 IL-2、IL-6、IL-5 增加等與藥理作用相關之反應外，未觀察到如臨床試驗發生之細胞激素釋放(cytokine release syndrome)此類之嚴重不良反應，試驗動物亦未發現有過敏性休克(anaphylactic shock)、發展成免疫疾病或全身性免疫抑制等症狀。廠商再進行 tissue cross-reactivity studies，發現 TGN1412 如預期主要專一地與淋巴細胞或淋巴結結合，證實其作用的專一性。在靈長類的免疫原性(immunogenicity)研究中，實驗動物皆觀察到抗 TGN1412 抗體的產生，此為擬人化抗體可預期的結果。因為廠商執行一系列試驗的結果，支持食蟹猴與恆河猴為合適物種，且猴子和人類對於 CD28 的結合能力具有相似性，因此首次臨床試驗起始劑量，參考猴子四週實驗 NOAEL 50 mg/kg，以 MABEL 概念進行推估，將起始劑量訂為 0.1 mg/kg。當時 TeGenero 公司如何藉由 MABEL 概念，推估出此起始劑量，其細節雖不得而知，然而近期發表的文獻，針對 TGN1412 首次人體起始劑量如何推估所進行的討論，可做為劑量推估參考之依據^[4]。

檢視上述 TGN1412 已執行之臨床前藥理與毒理試驗，深入探討仍有以下數項，可做為今後相關藥品開發者借鏡之處：(1)近期的研究發現食蟹猴和恆河猴其 C" D loop 位



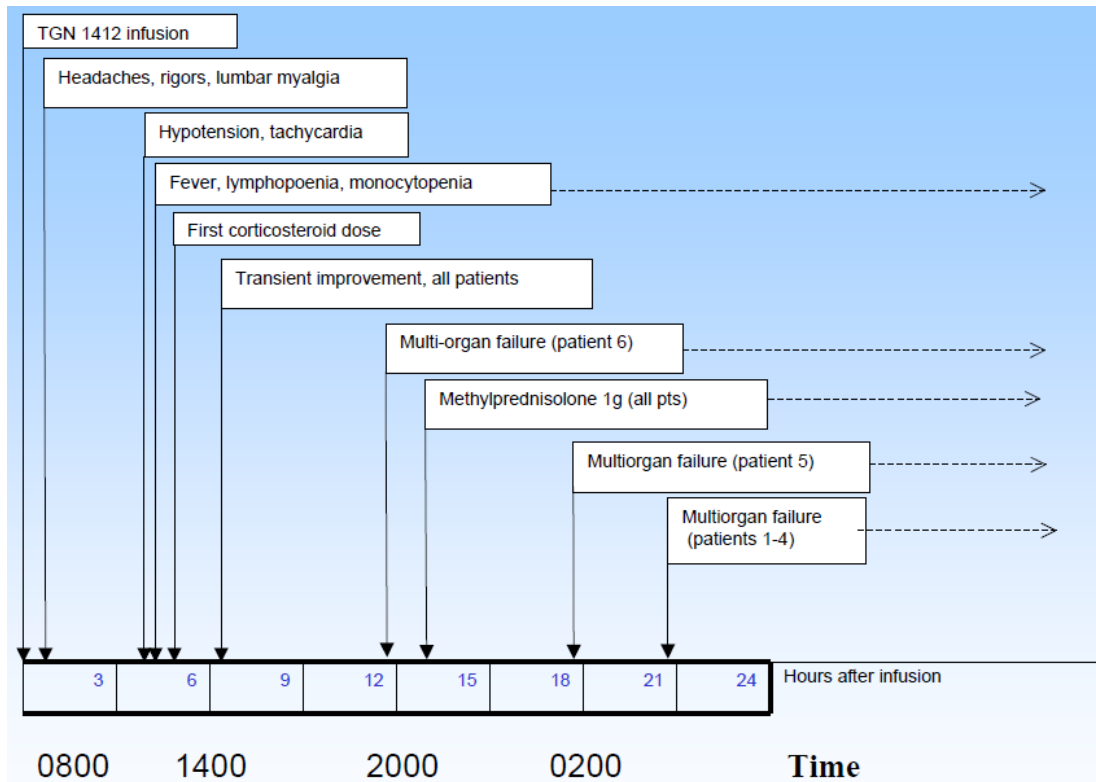
致力法規科學
守護生命健康
Regulatory Science, Service for Life

置胺基酸序列與人類差異最高達 4% (非廠商所述僅差 1 至 2 個胺基酸而已)^[5]；(2)於靈長類動物毒理試驗，觀察到的低量細胞激素釋放現象被忽略，未考慮物種差異可能造成的顯著影響；(3)未儘量以相近且具代表性的人類標的組織或細胞進行體外試驗，未測試過敏性反應；(4)未針對此高風險、新作用機轉藥品，使用更寬的安全倍率來降低首次人體試驗起始劑量；(5)在第一位輸注病患已發生不良反應的當下，仍持續收納受試者，而未立即停止收案且設計適當的措施。



圖一：TGN1412 作用機轉說明^[13]

Hypothesis: (1) TGN1412 binds to CD28⁺ cells, including monocytes, to form a complex. (2) Complex binds to CD64 (FcγRI) on vascular endothelial cells displacing any passively bound plasma immunoglobulin (Ig)G. (3) Cross-linking of monocyte CD28 occurs leading to cell activation and rapid up-regulation of multiple cytokines, including tumour necrosis factor (TNF)-α and macrophage inflammatory protein (MIP)-1α. (4) MIP-1α recruits natural killer (NK) cells. (5) Cross-linking of CD28 on NK cells (known to express a variant form of CD28: vCD28) causes release of other ‘storm’ cytokines including interferon (IFN)-γ, that in turn activate monocytes. (6) Opsonized NK cells could also interact with CD64 on adjacent monocytes to provide a further amplification signal.



圖二：受試者輸注 TGN1412 發生不良反應時序圖^[6]

以回溯性方式探討免疫活化抗體藥品首次人體劑量選擇之合理性

自 TGN1412 事件發生以來，免疫活化抗體相關的藥品開發與研究，便持續地受到關注。近期美國 FDA 審查員 Saber 等人(2016)^[7]自 FDA 檔案資料庫，篩選作用機轉可能造成免疫活化(包括直接或間接作用)之抗腫瘤抗體藥品，且其首次人體起始劑量係以 MABEL 方式計算之臨床試驗申請案件(IND)，以回溯性方式進行此類藥品數據分析。納入的抗體藥品辨識作用標的蛋白包括 PD-1、PD-L1、CD40、GITR、OX40、OX40L、CD33、CD38、CD19、CD137(4-1BB)、c-fms、B7 家族抗原、CTLA-4 等。希望藉由此一系列實際已進入臨床試驗的抗體藥品的資料分析，來探討如何以 MABEL 概念，適當地評估首次人體起始劑量。更而甚者，透過其進入臨床後所呈現之安全性結果，進一步探討如何以不同的 MABEL 推估方法，得到合理的臨床起始劑量。

分析這些案例，發現常用於 MABEL 推估的方法包括：(1) 體外活性數據(*in vitro*)



activity data)：例如直接以 EC₂₀，或者以 Hill equation (公式一)，使用 EC₅₀ 推估出 20% 藥理活性(pharmacologic activity: PA)(20% PA)，做為 FIH 劑量推估；(2)體外結合力數據 (*in vitro* binding data)：以對抗原專一性之解離常數(K_D)，來計算受體結合(receptor occupancy: RO)時之藥品血漿濃度(公式二)，做為 FIH 劑量推估。分析顯示，以 20% RO 之血中濃度作為 FIH 起始劑量是較適合的，劑量提升最高不要超過 80% RO (當年 TGN1412 引起細胞激素風暴時，藥品的血漿濃度達到 90% RO)，上述區間之 RO 結合率在本次抗體藥品分析中，顯示出之臨床安全性是可接受的。常用測量 K_D 的方法包括 flow cytometry、surface plasmon resonance (SPR)、ELISA、kinetic exclusion assay (KinExA)及 cell-based equilibrium binding assay；(3)小鼠異種移植動物模式：以產生最低抗腫瘤活性之劑量數據，再除以合適的安全係數(safety margin)，進行 FIH 劑量的推估；及(4)其他方法：由人體內作用標的蛋白的表現量，以 PK modeling 進行 FIH 劑量推估(此方式之合適性尚未被確定)。這些 MABEL 起始劑量的評估方法，原則上皆有其科學合理性，其中以方法(1)與方法(2)最常被使用。有些廠商在選擇方法(1)或(2)時會以 PK modeling 進行計算。然而方法(1)在不同試驗條件下的變異性較方法(2)為大，除非能將體外活性數據最適化，否則可能造成人體首次起始劑量推估過高；因此僅以體外活性數據做為推估起始劑量之依據並不充足。案例分析顯示自 TGN1412 事件發生後，開發廠商通常會執行體外或體內細胞激素釋放分析(cytokine release assay: CRA)。此外，若有同作用標的蛋白或機轉，且具人體使用經驗之抗體藥品，也可作為起始劑量推估時的參考。以可獲得之各項臨床前藥理與毒理數據(尤其是體外活性與結合力數據)，進行藥品間特性的直接比對，參考其臨床劑量與對應之療效安全性資料，以支持劑量選擇的合理性。綜合這些案例分析顯示，以 MABEL 方式推估所獲得之 FIH 劑量，皆遠低於 ICH M3(R2)或 ICH S9 建議直接以動物毒理試驗 1/10 NOAEL 或 1/10 STD₁₀ 或 1/6 HNSTD (以體表面積為換算單位 [8] [9] [10]) 推估的 FIH 劑量(此推估方式較適用於小分子藥品)。

$$PA = \frac{[C]}{EC_{50} + [C]} \quad (\text{公式一})$$

$$RO = \frac{[C]}{K_D + [C]} \quad (\text{公式二})$$

C is the human plasma concentration of the biopharmaceutical; PA is the pharmacologic activity;

RO is the receptor occupancy; EC₅₀. refers to human values obtained from *in vitro* activity (i.e. notbinding) data;

K_D is the human antigen dissociation constant.



高風險抗體藥品首次人體劑量審查考量重點

綜觀美國^[8]、歐盟^[11]、日本^[12]與ICH^{[9][10]}公告之法規基準，對於生物製劑(biologic product)，尤其是新作用機轉、免疫活化作用等高風險藥品，首次人體劑量推估原則，皆建議以 MABEL 方式進行 FIH 劑量推估。通常先依藥品作用機轉進行體外試驗，驗證理論基礎與作用的專一性，並找尋合適的試驗動物物種(relevance animal)，進行動物體內試驗，最後將獲得之體外與體內藥理、藥物動力學以及毒理試驗結果，運用 PK-PD modeling 以 MABEL 概念推估安全的 FIH 劑量。

依據上述醫藥先進國以及 ICH 有關高風險抗體藥品首次人體劑量選擇的建議，並參考多篇文獻有關此類藥品發生嚴重不良反應的討論，CDE 藥毒理小組認為此類高風險藥品，審查其首次人體劑量的合理性，將著重以下各項的評估：

一、作用專一性評估

- 作用標的蛋白在物種間胺基酸序列(尤其是抗原決定位區域)之相似性與生理功能評估。
- 抗體藥品對於不同物種之作用標的蛋白結合專一性評估(例如：結合親合性、解離常數 $[K_D]$)，探討有無 off-target effects。
- 以具代表性之人類組織進行 *in vitro* 與 *ex vivo* 藥理試驗，探討體外活性數據(例如： EC_{50})。
- 探討是否造成過敏性反應
- 詳細作用機轉(MOA)探討。

二、*In vitro* cytokines release assay 及 *In vitro* tissue cross-reactivity assay。

三、合適動物物種(relevance animal species)之選擇說明。

四、於合適的動物物種執行之體內藥理與藥物動力學試驗。

- 疾病動物模式(找尋支持臨床給藥劑量與設計之理論基礎)。
- ADA (anti-drug antibody) 探討。
- 過敏性反應、*In vivo* cytokines release assay。

五、於合適的動物物種執行之臨床前安全性試驗(樞紐性試驗應符合 GLP 規範)



- 安全性藥理試驗 (可結合一般毒理試驗同時評估)。
- 一般毒理試驗 (單一劑量或重覆劑量) (試驗設計應考量能支持與涵蓋臨床試驗給藥設計、給藥期與藥品暴露之安全性)。
- 免疫原性試驗(immunogenicity)

六、結合上述資訊，以 PK-PD modeling 依 MABEL 概念推估安全與合適的 FIH 劑量。

結論

本篇文章介紹以 MABEL 概念推估合適且安全之首次人體起始劑量，所須執行之科學性試驗項目。建議可依不同藥品類型與作用機轉，進行適當的科學性評估，以選擇合宜的試驗。儘可能蒐集充分的臨床前藥理、藥動與安全性訊息，作為推估起始劑量之依據。此外，對於臨床前觀察到之可能不良反應，皆應深入地探討，以作為臨床試驗設計安全性監測、及處置規劃之重要參考。

對於不同類型之藥品開發，應遵循 ICH M3(R2)、ICH S6(R1)或 ICH S9 之說明，就不同的臨床階段，執行符合法規要求之臨床前療效及安全性試驗。於申請首次於人體執行的臨床試驗時，對於起始劑量的選擇、劑量調升與臨床試驗安全性監測應提供完整的實驗數據，並詳細說明支持其合理性的依據，以利法規單位審查。

參考文獻

1. 吳彥慧。單株抗體藥物及其急性輸注反應--使用單株抗體藥物是否一定需要事前給藥以避免嚴重輸注反應。 *RegMed* 2012, Vol.19: 1-5
2. Attarwala H. TGN1412: From Discovery to Disaster. *Young Pharm.* 2010;2(3): 332-336
3. Thomas Hanke. Lessons from TGN1412. 2006; vol. 368: 1569-1570
4. Maël Lemoine. Animal extrapolation in preclinical studies: An analysis of the tragic case of TGN1412. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical* 2017; 61: 35-45
5. Hansen S, Leslie RG. TGN1412: Scrutinizing preclinical trials of antibody-based medicines. *Nature* 2006;441:282.
6. Ganesh Suntharalingam and Nicki Panoskaltsis. TGN1412: What happened?
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2009/11/WC500010858.pdf



7. Haleh Saber, Ramadevi Gudi, Michael Manning et al., An FDA oncology analysis of immune activating products and first-in-human dose selection. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2016; 81; 448-456.
8. FDA guidance: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in FIH in Adult Healthy Volunteers (2005).
9. ICH M3(R2): Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trial and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (2009).
10. ICH S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals (2009).
11. EMA: Guideline on strategies to identify and mitigate risks for FIH and early clinical trials with investigational (draft 2016).
12. MHLW(Japan): Guidance for Establishing Safety in First-in-Human Studies during Drug Development and its Questions and Answers
13. G P Sandilands, M Wilson, C Huser, et al., Were monocytes responsible for initiating the cytokine storm in the TGN1412 clinical trial tragedy? *Exp Immunol* 2010; 162(3): 516–527. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026555/>