



## 雙特異性抗體藥品之非臨床藥毒理試驗規劃策略- 以上市藥品 Blincyto<sup>®</sup> 為例

倪美惠、周家瑋<sup>1</sup>

### 前言

雙特異性抗體(bispecific antibody, BsAb)係指利用基因工程方法製造的重組抗體，此重組抗體通常包含兩種不同的結合域(binding domain)，可分別結合兩種不同的抗原，或是同一抗原的兩種不同的抗原決定位(epitope)<sup>[1]</sup>。雙特異性抗體的形式非常多樣，其構型可以從相對單純到極為複雜，例如可以僅由兩個抗原結合片段連接組成，也可以是帶有附加結構域的大型免疫球蛋白類似分子作結合。雙特異性抗體的研發廠商也依其所宣稱的抗體作用機制，在抗體設計上不斷地推陳出新(圖一)<sup>[2]</sup>。

雙特異性抗體最吸引人的特色在於其集結兩種單株抗體的抗原專一性與結合能力於單一藥品，創造出一種全新的生物活性，此活性是無法藉由併用兩種單一的單株抗體藥品而獲得的。雙特異性抗體與其兩種專一性抗原的結合方式，通常具有時間(temporal)或空間(spatial)上的依存關係(dependency)；亦即可能須要依序(sequentially)或同時(simultaneously)地與兩種抗原結合，始能發揮其特有的活性與功能。

全球針對雙特異性抗體的開發正處於方興未艾的蓬勃發展階段，截至目前，已有 Blincyto<sup>®</sup>、Hemlibra<sup>®</sup>、以及新近甫由美國 FDA 核准之 Rybrevant<sup>™</sup> (amivantamab) 等 3 種雙特異性抗體藥品被核准上市，並且有超過 20 種不同的雙特異性抗體商業研發設計平台，以及近百項研發中藥品正在進行臨床測試<sup>[3]</sup>。本文主要參考美國 FDA 於 2021 年 5 月最新公布的企業研發指引「Guidance for Industry: Bispecific Antibody Development Programs」<sup>[1]</sup>，並利用已上市藥品 Blincyto (blinatumomab)的公開資料<sup>[4, 5]</sup>為例，就雙特異性抗體之非臨床藥毒理試驗規劃策略以及法規考量進行討論。

<sup>1</sup> 財團法人醫藥品查驗中心 新藥科技組



## 美國 FDA 「Guidance for Industry: Bispecific Antibody Development Programs」<sup>[1]</sup>

### 一、背景與適用範圍

治療用單株抗體(therapeutic monoclonal antibodies)自 1986 年問世以來，已成為當今疾病治療的重要療法之一，對於單株抗體的研發，已有明確的法規可依循。相對於單株抗體，新穎的雙特異型或多特異性抗體，通常具有全新的結構與功能，且具可結合兩種或多種抗原的特殊生物活性，因此更須要法規單位擬定相關研發指引提供給業者參考。此指引並不適用於其他多標的之治療法(multitarget therapies)，包括抗體雞尾酒療法(antibody cocktails)、多株抗體(polyclonal antibody)、或單株抗體的合併療法等藥品的研發；然而，此指引內的相關原則，亦可作為其他雙特異性蛋白質藥品或多特異性藥品研發時的參考。

雙特異性抗體的開發通常以明確的科學理論為根基，研發廠商必須能清楚說明如何藉由雙特異性抗體與雙抗原標的之間的緊密結合，而達到治療特定疾病之目的。相較於合併用藥治療(combination therapy)或使用抗體混合治療，雙特異性抗體以單一藥品即可鎖定多種疾病調節分子，因而具有更多可能的臨床優勢。某些雙特異性抗體可以透過將免疫作用細胞(effector cells)引導至特定的目標細胞(target cell)附近，達成免疫細胞重新靶向(redirecting)的效果，或是可藉由結合多重標的以產生協同功效，這些特性皆使得雙特異性抗體的發展充滿潛力。然而，因雙特異性抗體的全新功能或複雜結構，也會形成研發過程中的挑戰，例如引起體內的免疫原性(immunogenicity)。為了解決雙特異性抗體開發時業者可能面臨的問題，此指引特針對此類藥品申請上市核准所須要的資料提供建議。除了提出綜合性考量外，此指引主要亦針對雙特異性抗體研發相關的法規、品質、非臨床以及臨床方面提出法規建議。以下章節主要著重於非臨床試驗的基本原則與要求進行討論。

### 二、綜合性考量

雙特異性抗體的作用機制大致可分為兩大類：

(一) 抗體活性取決於是否能有效橋接兩種目標細胞



目前許多針對癌症治療所開發的雙特異性抗體，包括已上市的 Blincyto<sup>®</sup>，皆屬此類。這一類抗體可透過辨識並結合免疫作用細胞與腫瘤細胞上的特定腫瘤相關抗原 (tumor-associated antigens, TAA) 而將兩種目標細胞橋接起來，使得細胞之間形成近距離接觸的免疫突觸 (immune synapse)，誘發免疫作用細胞對腫瘤細胞的毒殺作用。通常這一類型的雙特異性抗體須要同時與兩個標的結合才能發揮其功效。

## (二) 抗體的作用機制並無涉及兩種目標細胞的橋接

例如結合標的為兩種可溶性的細胞因子，或是可結合同一腫瘤細胞或病毒抗原的兩種抗原決定位的雙特異性抗體皆屬此類。已上市藥品 Hemlibra<sup>®</sup> (emicizumab) 為此類型藥品開發的成功案例，即是透過結合兩個不同的標的蛋白來模擬內生性蛋白質 (即 FVIIIa) 的功能。在這一類別的雙特異性抗體，依據其設計，未必須要同時結合兩個標的才得以發揮功效。

無論研發標的屬於哪一種類別，從事雙特異性抗體開發必須考量幾項重要的藥品屬性，包括：抗體的作用是否須要同時與兩個標的結合？測定每個單臂 (arm) 與其專一性標的之間的親和力以及結合-釋放速率 (on- and off-rate)、以及當抗體與兩個標的結合時，是否具有協同作用 (synergy)？

就法規要求而言，申請雙特異性抗體藥品上市的廠商應提供清楚的科學理論基礎，說明其藥品的研發依據，包括應詳述藥品的作用標的、作用機制、或與類似的單特異性抗體 (monospecific antibody) 藥品相比，在安全性和/或有效性方面能顯現臨床優勢，以支持該項藥品的開發。申請廠商應依其情況，提供臨床或非臨床體內或體外試驗的技術性資料，以支持其論述。

## 三、法規考量

小分子藥品的固定複方處方藥 (fixed-combination drug) 之相關法規並不適用於雙特異性抗體藥品研發。此外，法規單位可能視情況要求廠商提供其開發的雙特異性抗體和相同標的且已核准上市的單特異性藥品的比較資料，以利評估該項藥品的風險及效益。

## 四、非臨床試驗之科學性考量

在非臨床試驗方面，雙特異性抗體開發與針對單一標的之單株抗體藥品類似，通常



也須要進行藥理學和毒理學方面的研究。非臨床試驗項目，包括藥理學試驗、一般及生殖毒理試驗、以及選擇毒理試驗物種的原則，可參考相關法規指引的建議<sup>[7, 8]</sup>。

為幫助規劃適當的毒理試驗，應在非臨床模式中測定雙特異性抗體各個標的蛋白或基因表現情況，並研究抗體與抗原間的專一性(specificity)。針對雙特異性抗體結構中的特定組成元件，應個別考量並釐清其是否具有潛在的安全性問題。然而，除非有特殊疑慮，法規單位不會要求廠商以非臨床試驗進行雙特異性抗體與單特異性藥品之間的安全性比較。

體外及體內的藥理學試驗可有助於說明藥品開發的科學性理由，例如可利用實驗數據說明：(1)與單特異性藥品的療效相比，雙特異性抗體阻斷兩種標的所產生的加乘性效果；(2)同時連結兩種標的可產生單特異性藥品所無法達到的療效；(3)證實雙特異性抗體藥品確實可以引發預期的免疫系統活化的效果；(4)呈現藥品是藉由直接或間接增強免疫系統的活化。上述試驗數據亦可作為首次於人體執行臨床試驗之起始劑量(first-in-human dose)的選擇依據<sup>[9, 10]</sup>。

一般而言，用來支持臨床試驗起始劑量安全性的標準非臨床試驗方法，亦適用於雙特異性抗體藥品<sup>[9]</sup>。對於具有促效特性(agonistic)的雙特異性抗體，建議應考慮採用最低預期生物效應劑量(minimally anticipated biologic effect level; MABEL)為依據，來決定首次臨床試驗的起始劑量<sup>[9, 11]</sup>。關於臨床試驗劑量選擇，建議可與法規單位進行諮詢或討論。

## Blincyto<sup>®</sup> 案例分析

Blincyto<sup>®</sup> (blinatumomab) 由 Amgen 公司所開發，是美國 FDA 核准的第一個雙特異性抗體藥品<sup>[5]</sup>，也是目前全球唯一核准用於癌症治療的雙特異性抗體。Blincyto<sup>®</sup> 目前核准用於急性淋巴性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)治療，藥物動力學分析顯示 blinatumomab 在血清中的半衰期僅 2-3 小時，因此須要藉由連續靜脈輸注的方式給藥，才能達到較為穩定的血中藥物濃度。Blincyto<sup>®</sup> 的單一治療週期包括 28 天的持續靜脈輸注，並視不同的疾病情況安排不同長度的無治療間期，人體最大建議劑量(maximum recommended human dose, MRHD)為 28 mcg/day。

Blinatumomab 源於雙特異性 T 細胞銜接系統(Bispecific T-cell engager, BiTE<sup>®</sup>)



平台發展出的藥品。BiTE<sup>®</sup>為 Amgen 公司旗下領有註冊商標之研發平台，此平台主要係利用抗體的雙特異性，一端針對 T 細胞表面受體 CD3，另一端針對腫瘤相關抗原 TAA，藉由 BiTE 分子同時與雙標的之間的專一性結合，將病人體內內生性 T 細胞導引至腫瘤細胞附近，在 T 細胞與腫瘤細胞之間形成免疫突觸，進而觸發 T 細胞活化以及細胞毒殺作用，造成目標腫瘤細胞的溶解作用(cell lysis)。Blinatumomab 由兩段單鏈變異區片段(single-chain variable fragment, scFv)以及一短胜肽連接子(linker)串聯組合而成(圖二)，為一種 CD3 及 CD19 的雙特異性抗體。CD19 是一種穿膜型醣蛋白，廣泛表現於 B 淋巴球系列細胞表面，由於其主要表現在 B 細胞的特性，因此被應用在 B 細胞惡性腫瘤的治療。截至目前，已有許多以 CD19 作為標的的免疫療法已成功核准用於治療惡性 B 細胞腫瘤，除本文介紹的 Blincyto<sup>®</sup>外，另有以 CD19 為導向的 CAR-T (chimeric antigen receptor T-cell) 療法，包括 Yescarta<sup>®</sup> (axicabtagene ciloleucel) 以及 Kymriah<sup>®</sup> (tisagenlecleucel)等，皆屬於成功開發案例。查驗中心曾於當代醫藥法規月刊發表相關論文討論 CAR-T 療法的開發與法規介紹，可參閱第 94 期相關內容<sup>[12]</sup>。以下則就美國 FDA 及歐盟 EMA 的審查報告內容<sup>[4, 5]</sup>，檢視 Blincyto<sup>®</sup>的非臨床藥毒理試驗項目，並針對雙特異性抗體藥品之非臨床藥毒理試驗規劃進行重點討論。

Blinatumomab 的非臨床試驗項目包括藥理學、藥物動力學、以及毒理學研究。在藥理學試驗部分，廠商執行了一系列體外及體內試驗以說明 blinatumomab 的藥理作用機制，包括以體外細胞試驗證實 blinatumomab 可將 T 細胞重新導向(redirecting)，造成 CD19+細胞的溶解；以及利用體內疾病動物模式，進行 ALL 治療的研究概念驗證(proof-of-concept)。在藥物動力學部分，則利用各種給藥途徑(包括靜脈注射、皮下注射以及腹腔注射)，在小鼠、大鼠、狗、食蟹猴、以及黑猩猩等物種進行單一劑量及重覆劑量的藥物動力學分析。而在毒理學試驗部分，則包括利用黑猩猩、大鼠、狗以及兔子等物種的毒理試驗，其中樞紐性毒理試驗(包括毒物動力學分析)皆在符合優良實驗室操作規範(Good laboratory practice, GLP)的單位執行。因考量藥物物種相關性，blinatumomab 的大多數毒理試驗是另以鼠類替代性抗體(murine surrogate molecule)在小鼠中進行的(詳見後續討論)。

## 一、藥效學試驗

### (一) 體外試驗-親和力、功能性及專一性測試



體外藥效學試驗數據，在此類型藥品開發初期，可以作為首次人體試驗起始劑量的估算依據；此外，亦可作為支持其所宣稱的作用機制以及藥品研發的理論基礎的科學性證據。

從美國 FDA 的審查報告可以得知，為驗證 blinatumomab 的活性，廠商進行之體外細胞試驗，包括其與一系列 CD19+ 人類腫瘤細胞株以及人類 T 細胞之間的結合能力分析，以及觀察其誘發 CD19+ 細胞發生細胞毒性反應(cytotoxicity)的情況。資料顯示 blinatumomab 可分別與 CD19+ 人類腫瘤細胞株(例如 NALM-6 細胞)以及人類 T 細胞之間產生高親和力結合；在功能性測試方面，在有免疫作用細胞(例如初代人類 T 細胞)存在的條件下，blinatumomab 可有效誘發 CD19+ 細胞發生細胞毒性反應；另一方面，blinatumomab 唯有在 CD19+ 細胞存在的情況下，始可有效引發人類 T 細胞的活化(可偵測到 T 細胞活化標誌、細胞激素釋放增加等效應)；倘若先分別以抗 CD3 或抗 CD19 抗體將 T 細胞及 CD19+ 之 NALM-6 細胞預先混合反應(pre-incubation)，則會抑制 blinatumomab 與標的細胞間的結合。上述體外試驗結果皆呈現劑量相關性，並且可說明 blinatumomab 的活性必須依賴 CD19+ 細胞以及 CD3+ 之 T 細胞的存在，而且具有高度專一性。

由體外細胞試驗的結果可知，blinatumomab 重新導向 T 細胞活化並造成目標腫瘤細胞溶解的作用，涉及顆粒酶 B(granzyme B) 及穿孔素(Perforin)的作用。在體外細胞實驗中，會影響 blinatumomab 的藥效活性(potency) 的因素很多，包括免疫作用細胞與腫瘤細胞比例(Effector to target ratio, E:T ratio)、標的細胞 CD19 表現量、免疫作用細胞的活化狀態、甚至於 T 細胞的來源等。一項體外研究顯示，E:T ratio 會影響 blinatumomab 在體外試驗中誘發的細胞毒殺作用的活性，即 blinatumomab 的體外藥效會隨 E:T ratio 增加而增強；根據該項研究結果，可訂出在體外試驗中最適當的 E:T ratio，除了可幫助設定後續試驗的條件之外，亦有利於對藥效進行正確的判讀。

雖然 blinatumomab 的分子構型缺乏 Fc 區段的結構，但若所研發的雙特異性抗體為帶有 Fc 區段的設計，則應分析 Fc 區段的生理功能，包括其與 Fc 受體(Fc receptor, FcR)各分型(如 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa)之間的結合能力，以及是否具有 Fc 介導作用(Fc-mediated effector function)；此外，亦應了解 Fc 與 FcRn(neonatal Fc receptor)之間的結合能力，以及其對抗體藥品在血漿中的半衰期的影響。



## (二) 體內試驗-抗腫瘤活性測試

Blinatumomab 為抗癌用藥。在藥品研發初期，通常須要利用腫瘤動物模式驗證研發候選藥品的抗腫瘤能力、探索劑量相關性以及臨床上的用藥間隔<sup>[8]</sup>。廠商送交 FDA 或 EMA 的體內試驗<sup>[4, 5]</sup>包括利用小鼠血液腫瘤疾病動物模式所進行的多達 8 項 blinatumomab 的抗腫瘤活性分析試驗，用以支持雙特異性抗體作用機轉以及癌症治療概念驗證(proof-of-concept, POC)的理論基礎。

從 EMA 審查報告<sup>[4]</sup>可以得知廠商在研發過程中，利用免疫缺陷鼠 NOD/SCID 建立的疾病動物模式，驗證 blinatumomab 對於不同的 B 細胞惡性腫瘤，包括以 NALM-6、SEMc、Raji、Granta-519 等細胞株所建立之皮下(subcutaneous)或原位(orthotopic)腫瘤異種移植(xenograft)動物模式的抗腫瘤生長能力。考量抗體藥品的物種相關性，此試驗必須在給予藥品之前，事先移植人類的 T 細胞於免疫缺陷鼠體內，作為 blinatumomab 發揮作用的免疫作用細胞來源。藉由體內腫瘤動物模式，廠商除驗證 blinatumomab 的抗腫瘤生長的能力，亦分析劑量-反應相關性(dose-response relationship)，作為臨床劑量、給藥期程與間隔的依據，也分析體內免疫作用細胞與腫瘤細胞比例(即 E:T ratio)對於 blinatumomab 療效之影響。從 EMA 審查報告<sup>[4]</sup>所整理的試驗摘要大致可看出，blinatumomab 在各種模式中可以有效抑制腫瘤生長，或延緩腫瘤形成，以及延長動物的存活期，而且藥效具劑量相關性。審查報告對於體內試驗的 E:T ratio 並未加以評述，然從體外試驗結果可知，blinatumomab 的體外藥效(potency)隨 E:T ratio 增加而增強，而不同腫瘤細胞所表現的抗原標的(此指 CD19)密度，亦可能有所不同，因此在設計體內試驗時，亦須納入考量，始能呈現預期的藥品療效反應。

## (三) 毒理試驗物種選擇

由於 blinatumomab 的功能活性取決於是否能同時與 CD3 及 CD19 雙標的結合，因此，選擇毒理試驗物種時，首先應考量 blinatumomab 是否可以結合試驗動物體內的兩種標的抗原以及標的細胞(此指 T 細胞和 B 細胞)。體外試驗資料顯示，在齧齒類、狗、非人類靈長類如狒狒、食蟹猴、恆河猴、以及黑猩猩等物種中，blinatumomab 僅能與黑猩猩的周邊血單核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)結合，且其結合能力與人類的 PBMC 相當，並可誘發對 B 細胞的毒殺作用，造成 B 細胞耗竭(depletion)。根據上述體外研究數據，黑猩猩是 blinatumomab 的藥理相關物種



(pharmacologically-relevant species) · 是研究 blinatumomab 最合適的動物物種。基於動物福祉考量，廠商於黑猩猩執行的毒理試驗並不會進行犧牲，只會針對臨床症狀及臨床病理學進行評估分析，因此實務上，以黑猩猩作為毒理試驗物種，試驗將嚴重受到限制。為解決缺少合適且可用之藥理學相關物種的問題，廠商的替代性策略是使用額外製備的同源蛋白(homologous protein) · 即 blinatumomab 的鼠類替代性雙特異性抗體(murine surrogate BiTE antibody) muS103new · 並以小鼠(mice)作為毒理試驗及安全性試驗的物種。關於生物製劑的非臨床試驗模式動物的選擇，可參考 ICHS6(R1) 尋求法規上的相關建議<sup>[7]</sup>。

廠商若採用替代用抗體進行非臨床安全性評估，應提出執行此替代性方案的科學性理由，且應針對替代性抗體的藥理活性、作用機制及藥動特性等進行相關體外或體內試驗，以證明其與原始藥品之間具有可比性。

除了使用替代性抗體方法外，ICH6(R1)也建議可以使用表現人類標的蛋白的基因轉殖動物(transgenic animal)作為毒理試驗物種<sup>[7]</sup>。同樣地，若使用基因轉殖動物進行非臨床安全性評估，亦應先以藥理及藥動試驗證明所研發的藥品，在基因轉殖動物體內具有於人體相似的藥理活性。

#### (四) 次級藥效學試驗

研發廠商藉由體外試驗發現，blinatumomab 會增加 T 細胞與血管內皮細胞之間的黏附作用，此可能與增加血管內皮細胞表面的細胞間附著分子如 ICAM-1 和 VCAM-1 等表現有關；值得注意的是，此現象在有無 CD19+ 細胞存在的環境下，皆會發生。進一步研究證據顯示，在有 CD19+ 細胞存在的情況下，blinatumomab 會刺激 T 細胞活化以及 cytokines 或 chemokines 的釋放，其中，TNF $\alpha$ 的釋放可能進一步增強上述細胞黏附分子表現增加的程度。此研究結果恰巧呼應 blinatumomab 在臨床試驗中的觀察發現，當病人在開始接受輸注 blinatumomab 後的前 45 分鐘內，體內 T 細胞有重新分布的情況。

藉由次級藥效學試驗，研發廠商可進一步探討藥品臨床反應的相關作用機轉，釐清其他藥品併用的藥效交互作用，尋找可能的臨床處置方式。由於 blinatumomab 的作用機制可能會造成临床上發生細胞激素釋放症候群(cytokine release syndrome, CRS) · 因此临床上在輸注 blinatumomab 前，會先預防性給予 (premedication)類固醇，以





降低發生 CRS 的風險。廠商經體外細胞實驗發現，若以 dexamethasone 預先處理 PBMC，可有效降低細胞激素的釋放，且不會對於 T 細胞的細胞毒殺作用產生影響。

在抗體藥品研發初期，通常亦須藉由分析正常組織中標的基因表現情況，研判發生脫靶效應(off-target effect)的可能性<sup>[13]</sup>。以雙特異性抗體來說，必須就兩個專一性標的分別探討其在人體正常組織中的分布、在細胞中的存在位置(cellular localization)，以及基因表現程度(包含 mRNA 及蛋白質測定)。若標的基因產物能在正常器官或組織中被偵測到，但僅存在於細胞質，則學理上，因其在體內的存在位置不易被抗體藥品接近，可推測發生脫靶效應的機會較低；反之，若標的蛋白主要存在於細胞膜上，在體內有機會被抗體辨識，則須進一步考量因脫靶效應所衍生的風險，並研擬因應對策。

## 二、安全性藥理試驗

根據 US FDA 審查報告，廠商以本品的鼠類替代性抗體 muS103new，分別以靜脈注射以及連續性腦室內輸注(continuous intracerebroventricular infusion)於小鼠，以進行中樞神經系統功能評估。針對心血管系統功能評估，廠商則以 blinatumomab 於犬隻中進行，此外也在同一項試驗中合併執行呼吸系統功能的觀察。另外，廠商另以 muS103new 在小鼠進行一項呼吸系統功能評估試驗。根據 EMA 審查報告，在上述試驗中，皆未發現 blinatumomab 造成的相關不良影響。

## 三、毒理學試驗

### (一) 一般毒理學-重覆劑量毒性試驗

根據審查報告，blinatumomab 的樞紐性(pivotal)重覆劑量毒理試驗包括在小鼠(BALB/c)以及黑猩猩(Chimpanzee)進行的四項試驗<sup>[4, 5]</sup>。其中，利用 muS103new 在小鼠執行之 13 週重覆劑量給藥加上 4 週恢復期的毒理試驗，為此案例所執行之毒理試驗中給藥時間最長的試驗。基於在小鼠操作的可行性因素，該試驗採用皮下注射途徑，且以每天兩次的給藥頻率給藥，以期達到較高的藥品血中暴露量，此毒理試驗的給藥劑量為 2 及 10 mg/kg/day。該試驗的主要發現包括血液、脾臟、以及淋巴結中淋巴球(包括 B 細胞及 T 細胞)數目降低、在脾臟及淋巴結等淋巴組織中的細胞數(cellularity)減少，以及注射部位皮膚及皮下組織的發炎反應；數據顯示大部分的組織病理變化皆具可恢復性。毒理試驗一般皆以健康動物進行，是否會發生因藥品攻擊腫瘤外標的所產生的相關



毒性(on-target off-tumor toxicities；例如正常組織的損傷，以及/或細胞激素釋放)，通常是非臨床安全性評估的重點項目；此亦牽涉抗體的作用標的在正常組織中的表現量、組織分布情況、以及在細胞中存在位置(如細胞膜或其他胞器)等因素之影響，在抗體研發過程中，通常須藉由體外及體內的非臨床試驗詳加探討，以尋求較佳的療效與安全性之間的平衡<sup>[13]</sup>。

廠商另執行一項以臨床使用途徑(靜脈注射)在小鼠給予 muS103new 連續 4 週加上 4 週恢復期的重覆劑量毒性試驗。根據審查報告所述，該試驗的主要結果與前述 13 週小鼠重覆劑量試驗結果相似，主要反應包括血液及淋巴組織/器官的白血球及淋巴球數目減少，以及出現相應的組織學變化。根據文獻及研發人員的經驗<sup>[13, 14]</sup>，在 blinatumomab 臨床試驗或以 CD3 為標的的雙特異性抗體的動物實驗中，在投予抗體藥品後，初期所出現如急性期反應(acute phase responses)、血液學變化(如暫時性淋巴球數目減少、出現 T 細胞活化及增殖的指標等)、以及暫時性的細胞激素釋放等反應，皆被視為此類型抗體開始發揮作用(與標的結合)的先期指標。

體外試驗結果顯示黑猩猩為 blinatumomab 唯一的藥理相關物種。利用靜脈輸注給予黑猩猩每週一次 0.1 mcg/kg blinatumomab、連續五週，可觀察到動物在輸注藥品當天發生體溫增高、心跳速率加快、血壓下降等藥品相關反應。血液學檢查則觀察到包括 B 細胞(CD19+、CD20+)以及 T 細胞(CD3+/CD4+、CD3+/CD8+)等淋巴球數目較低的情況；免疫分型(immunophenotyping)的結果顯示 T 細胞活化標誌如 CD25、CD69 及 HLA-DR 會隨著 blinatumomab 的投予而表現增加，同時伴隨血漿中的細胞激素(包括 IL-2、IL-6 及 INF $\gamma$ )水平的提升，但基本上上述變化在兩次輸注間即會回復到輸注前的基準水平；整體來說，血液學方面的變化並不顯著。此外，淋巴結活體組織切片並未顯示發生任何病理上的變化，包括 CD3+、CD4+、CD10+、CD19+、CD20+、CD69+ 等細胞族群皆無變化，顯示淋巴結組織中的正常 CD19+ 細胞並不會受到 blinatumomab 的影響。整體來說，動物在此試驗的耐受性良好，其餘指標皆無發生顯著變化。

## (二) 生殖發育毒性試驗

廠商並未提交生育力及早期胚胎發育試驗(Fertility and Early Embryonic Development study)的資料，而在重覆劑量毒性試驗的結果中，亦未發現



blinatumomab 或 muS103new 會導致試驗動物的生殖系統或功能出現相關毒性反應。此外，廠商亦未執行周產期前後發育(Pre- and Postnatal Development)毒性試驗。

由於 blinatumomab 係開發為癌症治療用藥，根據 ICHS9 指引，原則上生物製劑只須提交一項以單一藥理相關物種所執行的胚胎發育毒性試驗資料，即可滿足申請上市許可的要求。根據利用 muS103new 於小鼠所執行的胚胎發育毒性試驗(Embryo-fetal development)結果顯示，鼠類替代性抗體 muS103new 5 mg/kg，並未在小鼠造成胚胎發育毒性、致畸胎性或母體妊娠不良影響，但懷孕母鼠在接受藥品後，淋巴球數量顯著下降，此現象可呼應前述本品的作用機制，然卻也可能造成懷孕母鼠的免疫力低下，增加感染的風險。此外，分析胚胎的血中藥品濃度，發現胚胎亦可能處於暴露在藥理活性濃度(pharmacologically active concentration)下的未知風險中。由於動物試驗結果顯示，前述鼠類替代性抗體會通過胎盤，考量藥品對胚胎可能造成的傷害，因此在藥品仿單中須告知懷孕婦女使用 blinatumomab 對胚胎可能具有潛在的傷害<sup>[4, 5, 6]</sup>。

### (三) 基因毒性及致癌性試驗

根據 ICHS9 以及 ICHS6(R1)之規範，由於 blinatumomab 為癌症治療用的生物製劑，除非有其他特殊考量，一般可免除其基因毒性及致癌性試驗<sup>[7, 8]</sup>。

### (四) 其他毒理學試驗

以 blinatumomab 這類型用於治療癌症的雙特異型抗體而言，其潛在毒性來源包含 on-target on-tumor 或是 on-target off-tumor 效應，皆屬安全性的討論範圍。由於 on-target on-tumor 的毒性與腫瘤抗原的表現情形有關，而由於非臨床安全性試驗通常以健康動物進行，因此如細胞激素釋放之相關的風險分析，主要須仰賴臨床試驗的觀察，才能較有效地掌握潛在的風險。至於 on-target off-tumor 或 off target 等脫靶效應所衍生的安全性問題，通常在研發早期階段，即可先以非臨床試驗加以釐清<sup>[13]</sup>。欲了解雙特異型抗體是否具有非預期的脫靶效應，廠商除了可藉由分析正常組織中標的蛋白的表現狀況，推測發生相關風險的機率(請參考“次級藥效學試驗”段落)，以及透過一般毒理試驗探索在正常動物體內是否有非預期的組織損傷發生的情況，另可利用該抗體進行組織交叉反應(tissue cross-reactivity)分析，了解該抗體於人類正常組織冷凍切片的免疫染色訊號，藉以找出潛在的毒性標的器官或組織。FDA 審查報告中指出，blinatumomab 在一系列的人類正常組織切片中，僅會染到包括 B 細胞及 T 細胞的淋



巴球，其染色主要位於淋巴組織，及其他極少數情境下的其他組織，例如在血管或組織間隙，或正在移行的淋巴球；除此之外，並未發現其他非預期的組織染色，顯示 blinatumomab 對標的抗原的專一性。

抗體藥品的早期研發過程中，通常會針對其在動物體內的免疫原性 (immunogenicity) 進行分析，了解在試驗動物體內是否會產生對抗藥品的抗體 (anti-drug antibody, ADA)，以及 ADA 對藥毒理試驗結果的影響。值得注意的是，抗體藥品在動物體內的免疫原性，並無法作為研判人體發生過敏反應或產生 ADA 的推論依據，但有助於對動物試驗結果做出正確的解讀<sup>[7]</sup>。廠商針對 muS103new 在小鼠的免疫原性進行研究，以 0.05 mg/kg 劑量，於 BALB/c 小鼠以連續每天 i.v. 或 s.c. 給藥 42 天，結果在大部分接受 muS103new 的動物，皆會造成專一性 anti-muS103new 的抗體產生。從實際觀察動物體內 muS103new 的藥理作用 (即包括血中淋巴球數量下降等指標) 與 anti-muS103new 抗體生成的情況可知，anti-muS103new 的抗體對 muS103new 的藥理作用具有中和性。

廠商以兔子執行局部耐受性試驗 (local tolerance)，利用數種非經腸道給藥途徑給予單劑量 blinatumomab，在不同時間點評估於注射部位所引發的發炎反應。局部耐受性試驗的結果，通常可用以推論所觀察到的局部發炎反應是單純來自於局部注射，還是因為製劑成分所產生的刺激性作用。根據 EMA 審查報告，廠商所提供的資料是以較早期的製劑所執行的局部耐受性試驗，結果發現，兔子對於 blinatumomab 的局部耐受性良好，並無發現藥品造成的相關不良反應。

### 雙特異性抗體藥品申請首次人體臨床試驗應提供之非臨床試驗資料

參考上述 Blincyto<sup>®</sup> 案例之技術性資料，以及同類型藥品的相關法規指引<sup>[1,4-11]</sup>，建議研發廠商於申請首次人體臨床試驗時，應提供包含以下之非臨床試驗資料供法規單位審查：

1. 主藥效學試驗：含體外分析以及概念驗證試驗。體外分析須包含抗體雙(多)臂各自對其抗原標的之間的親和力及專一性分析；功能性分析則包括抗體作用機制的探討與驗證。概念驗證試驗通常須以主要宣稱的適應症之疾病動物模式進行體內療效驗證，以作為藥品治療該適應症的支持性證據。



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

2. 次藥效學試驗：應針對藥品的標的抗原於正常組織中的表現進行分析，或直接進行抗體藥品的組織交叉反應分析，以評估潛在的標的外毒性。此外，也可利用相關的藥理試驗說明併用藥物或抗體作用機轉可能對療效或安全性的影響。
3. 安全性藥理試驗：原則上須包括中樞神經、心血管、呼吸等維生系統之核心試驗，視情況可合併於毒理試驗中進行。安全性藥理試驗項目，視藥品的作用機制與藥毒理研究結果，可能須進行額外的研究。
4. 單一/重覆劑量毒理試驗：通常應在藥理相關物種中進行；若無合適物種，建議可利用單一物種觀察抗體的潛在標的外毒性(off-target toxicity)。重覆劑量毒理試驗應模擬臨床使用情境設計，劑量範圍、投藥頻率與給藥期程應能涵蓋臨床使用的範圍，並使用相同的給藥路徑。
5. 基因毒性試驗與致癌性試驗：一般來說，傳統上針對此兩項評估的試驗方法並不適用於此類型的藥品，但仍應視藥品的特性，以證據權重(Weight of Evidence)方法，分析藥品的相關風險。
6. 免疫原性及免疫毒性：可先在毒理試驗中進行初步評估，若有免疫毒性相關疑慮，可能有進行額外免疫毒性試驗之必要。此外，對於具有新穎或特殊結構之雙特異性抗體，尤須留意其所可能引發的免疫原性是否會影響抗體的療效，以及對病人的療效及安全性的潛在影響。
7. 局部耐受性：抗體藥品通常以非經腸道途徑給藥，因此須進行局部耐受性試驗，分析製劑成分在注射部位造成的局部反應。視情況可合併於毒理試驗中進行。
8. 首次人體臨床試驗劑量(first-in-human dose, FIH dose)：須針對首次人體臨床試驗劑量的計算與選擇依據提供合理性說明。FIH dose 的設定通常以安全性為優先考量，應能提供足夠的安全範圍(safety margin)。

## 結語

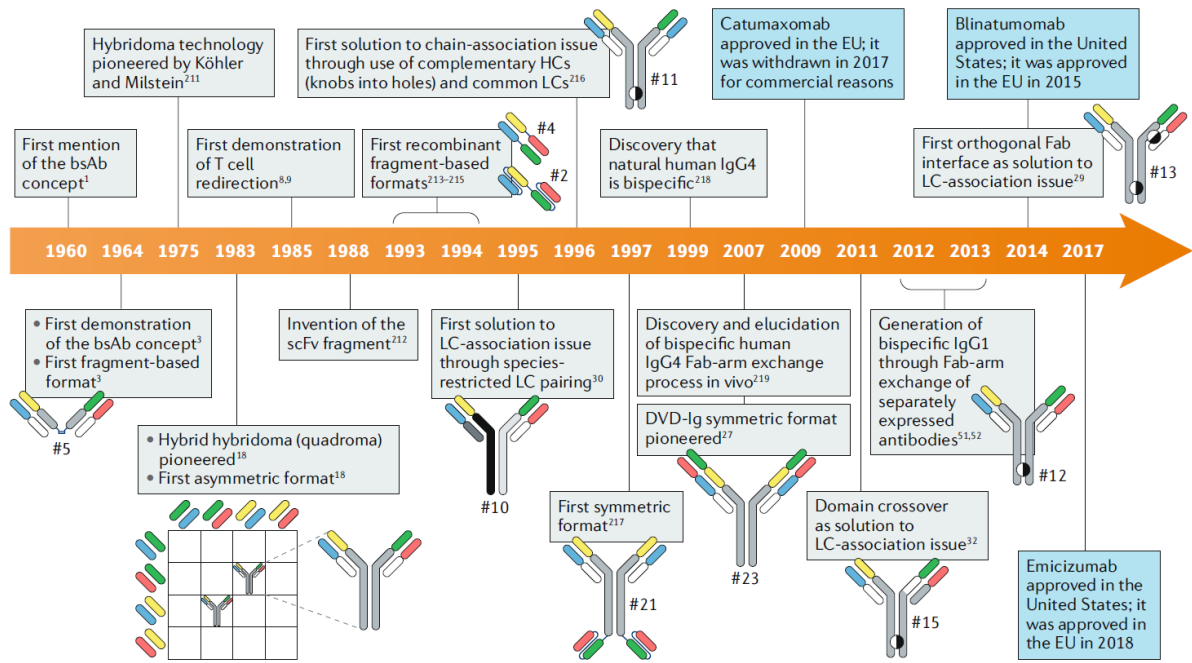
雙特異性抗體雖非新的治療概念，但直至 Blincyto<sup>®</sup>於 2014 年成功於美國以加速核准機制先行上市後，始真正帶動該領域的研發風潮。儘管截至目前只有 Blincyto<sup>®</sup>、Hemlibra<sup>®</sup>以及 Rybrevant<sup>™</sup> 三例成功上市經驗，但後繼的研發浪潮正源源不斷，尤其



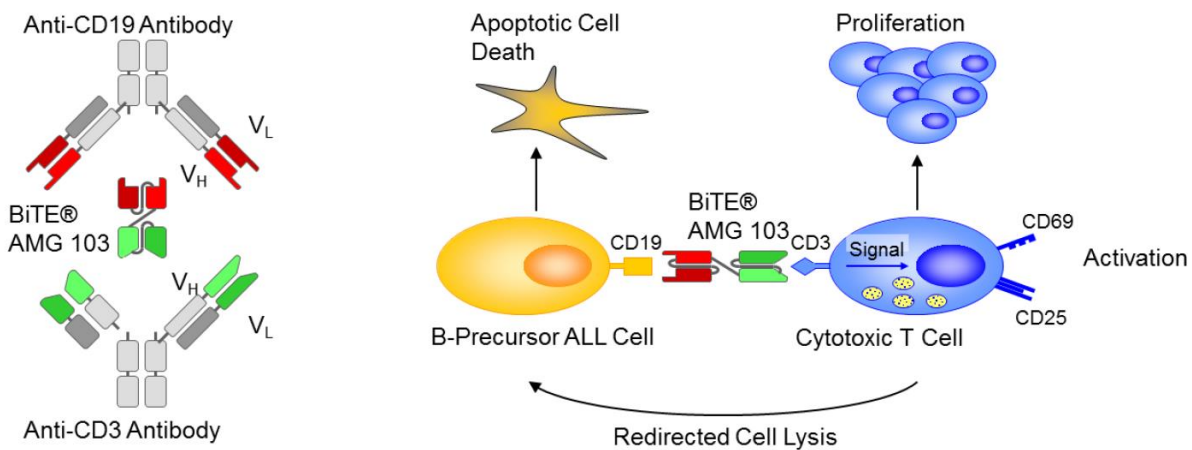
重點大多鎖定癌症治療進行開發。根據市場分析資料<sup>[3]</sup>，時至 2020 年 Q3，約有 106 件雙特異性抗體於各種腫瘤的臨床試驗中進行驗證；其中，案件數量居於領先的名單中，亦不乏知名藥廠的身影，顯示各大藥廠及研發單位積極爭食癌症治療用抗體市場的企圖心。本文藉由美國 FDA 最新頒布的雙特異性抗體研發指引做為開端，佐以 Blnicyto<sup>®</sup>申請美國上市核准的非臨床技術性資料的解析，希望能幫助該領域的研發人員能更加了解法規單位對於雙特異性抗體藥品上市前的科學考量與法規要求，使其研發方向能有更明確可遵循的依據。

總結來說，相較於一般的單株抗體藥品，雙特異性抗體藥品具有更多的標的結合特異性，且通常對藥效與安全性具有關鍵性的影響。以藥毒理的審查觀點，除了一般單株抗體藥品應確認的非臨床試驗項目，尤其須針對雙特異性抗體發揮藥效的作用機制以及功能專一性(functional specificity)加以說明，包括其雙(多)重特異性對抗體活性的影響，又或抗體活性與其個別的特異性之間的依存關係等特性，皆可利用適當的藥理試驗進行闡述；視雙特異性抗體藥品的作用機制，上述特性可能與該藥品的安全性息息相關，此時則更須要徹底瞭解其作用機制及功能專一性。此外，也因為其多重特異性之緣故，在藥理相關物種的選擇上將更為困難，建議在研發過程中，可盡早評估利用替代性抗體進行藥毒理試驗的可行性。另一方面，多重特異性亦意味著抗體在體內的結合標的較一般單株抗體藥品更為多元，除了特定標的外，發生 off-target 或 on-target off-tumor effect (此指癌症治療用抗體)的機會亦可能隨之增加，建議研發廠商在非臨床開發階段即應徹底瞭解作用目標在人體各器官組織的分佈情況，並及早利用 tissue-cross reactivity 試驗找出潛在的非特異性標的組織或器官，為臨床試驗安全性提供更多資訊。要注意的是，具有新穎結構的雙特異性抗體，在體內容易產生免疫原性，除了在動物試驗造成藥動參數的影響，在臨床上，可能更須透過進一步抗藥物抗體(anti-drug antibodies, ADAs)作用部位的分析，釐清 ADA 對於臨床療效與安全性的影響<sup>[1]</sup>。由於雙特異性抗體各異，審查端通常須視其各自的特性逐案考量(case-by-case approach)，本文所提到的審查重點可能無法涵蓋此類藥品的所有面向，建議研發廠商及早與法規單位進行諮詢，相信對於增進藥品開發效率能有所助益。

受限於篇幅，本文並未針對 Blnicyto<sup>®</sup>的設計、生產製造、或其臨床療效及安全性方面尚待改進的部分進行討論；有關雙特異性抗體藥品的未來研發趨勢與相關技術性討論，建議可參考相關文獻或論壇的整理<sup>[2, 13, 15, 16]</sup>。



圖一、雙特异性抗體藥品開發演進示意圖<sup>[2]</sup>



圖二、Blinatumomab 結構示意及作用機制<sup>[4]</sup>

參考文獻

1. FDA. Guidance for Industry: Bispecific Antibody Development Programs. (2021).



台灣藥物法規  
資訊網法規公告



台灣藥品  
臨床試驗資訊



FDA  
TFDA 藥物  
食品安全週報



致力法規科學  
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

2. Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM. et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discov* 18, 585–608 (2019).
3. GlobalData Healthcare. Bispecific antibodies: An immunotherapy class with great potential. (2020). <https://www.pharmaceutical-technology.com/comment/bispecific-antibodies-immunotherapy/>
4. EMA. Blincyto.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/blincyto>
5. FDA. Blincyto: Drug Approval Package.  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/125557Orig1s000TOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/125557Orig1s000TOC.cfm)
6. BLINCYTO® 中文仿單  
<https://info.fda.gov.tw/MLMS/ShowFile.aspx?LicId=60001040&Seq=005&Type=9>
7. ICH S6(R1): Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. (2012).
8. ICH S9: Non-clinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. (2010).
9. FDA. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. (2005).
10. FDA. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. (1997).
11. Saber H, Del Valle P, Ricks T, Leighton J. An FDA oncology analysis of CD3 bispecific constructs and first-in-human dose selection. *Regul Toxicol Pharmacol*. 90:144–152. (2017).
12. 簡文斌：CAR-T 治療產品之非臨床試驗審查考量。當代醫藥法規月刊, 第 94 期. 2018.
13. Kamperschroer C, Shenton J, Lebrec H. et al. Summary of a workshop on preclinical and translational safety assessment of CD3 bispecifics. *J Immunotoxicol* 17, 67-85. (2020).
14. Virginie Nägele V, Andrea Kratzer A, Gerhard Zugmaier G. et al. Changes in clinical laboratory parameters and pharmacodynamic markers in response to





blinatumomab treatment of patients with relapsed/refractory ALL. *Exp Hematol Oncol*. 6: 14. (2017).

15. Garber K. Bispecific antibodies rise again. *Nat Rev Drug Discov* 13, 799–801. (2014).

16. Goebeler ME, Bargou RC. T cell-engaging therapies — BiTEs and beyond. *Nat Rev Clin Oncol* 17, 418–434. (2020).