

生物检定·活性分析

抗体-药物偶联药物(ADC)HS630对大鼠中枢神经系统的安全性评价*

李芊芊¹, 张颖丽¹, 徐学鹏², 王超¹, 淡墨¹, 王欣¹, 霍艳¹, 王海彬², 王三龙^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全性评价研究北京市重点实验室, 北京 100176;

2. 浙江海正药业股份有限公司, 台州 318000)

摘要 目的: 评价注射用重组抗HER2人源化单克隆抗体偶联美登素衍生物DM1(即HS630)对SD大鼠中枢神经系统的影响。方法: 将40只SD大鼠随机分为4组, 分别单次尾静脉注射空白对照品(空白对照组)、6 mg·kg⁻¹ HS630(低剂量组)、20 mg·kg⁻¹ HS630(中剂量组)及40 mg·kg⁻¹ HS630(高剂量组)。实验采用功能观测组合(function observational battery, FOB)实验方法, 分别在给药前和给药后0.5、4、24、48、72、120及168 h观察大鼠运动功能、感觉功能、自主活动等行为。结果: 6 mg·kg⁻¹剂量下, HS630对大鼠中枢神经系统没有影响; 20 mg·kg⁻¹剂量下, 给药后4 h, HS630不同程度降低动物唤醒唤起反应、手指接近反应、触摸头部反应($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、惊恐反应及出现震颤动物数明显多于空白对照组($P<0.05$), 之后时间点该症状逐渐恢复; 40 mg·kg⁻¹剂量下, 给药后4、48、72及120 h均出现不同程度唤醒唤起反应、手指接近反应、触摸头部反应、惊恐反应降低, 且出现震颤动物数明显多于空白对照组($P<0.05$), 随着给药时间的延长, 上述症状逐渐恢复。结论: 本研究结果提示, HS630一定剂量下可能会诱发神经毒性, 但是可逐渐恢复。

关键词: HS630; 抗体-药物偶联(ADC); 人类表皮生长因子受体2; 曲妥珠单抗; 人源化单克隆抗体; 功能观测组合实验; 大鼠; 中枢神经系统

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)07-1189-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.07.13

Safety evaluation of antibody-drug-conjugates (ADC) HS630 on the central nervous system of rats*

LI Qian-qian¹, ZHANG Ying-li¹, XU Xue-peng², WANG Chao¹, DAN Mo¹,
WANG Xin¹, HUO Yan¹, WANG Hai-bin², WANG San-long^{1**}

(1. Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China)

Abstract Objective: To evaluate the effect of recombinant anti-HER2 humanized monoclonal antibody conjugated maytansine derivative DM1 (HS630) on the central nervous system of SD rats. **Methods:** Forty SD

* 重大新药创制”科技重大专项课题: 生物大分子药物特殊评价关键技术研究(No. 2015ZX000-004)

** 通信作者 Tel: 13691095115; E-mail: wangsanlong@nifdc.org.cn

第一作者 李芊芊 Tel: 13810108325; E-mail: lily_lqq@163.com

张颖丽 Tel: 18611387515; E-mail: zhangyl@niepbp.org.cn

rats were randomly divided into four groups: caudal vein injection blank control group (blank control), low dose group ($6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ HS630), middle dose group ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ HS630) and high dose group ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ HS630), respectively. The motor function, sensory function, autonomic activity of the rats were observed before administration and at 0.5 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h and 168 h after administration using the method of functional observational battery (FOB). **Results:** HS630 had no effect on the central nervous system of rats at $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dose. At $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dose and 4 h after the administration, HS630 reduced response of arousal, finger approach, head touch ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and fear. And the number of tremor animals in the high dose group was significantly higher than that of the blank control group ($P < 0.05$). These symptoms gradually recovered at the subsequent time point. At the dose of $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and 4 h, 48 h, 72 h, and 120 h after the administration, HS630 reduced response of arousal, finger approach, head touch and fear. The number of tremor animals in high dose group was significantly higher than that of the blank control group ($P < 0.05$). The symptoms gradually recovered with the prolongation of administration time. **Conclusion:** The results of this study suggested that a certain dose of HS630 can induce neurotoxicity, but the symptoms can gradually recover.

Keywords: HS630; antibody-drug-conjugates (ADC); human epidermal growth factor receptor-2; trastuzumab; humanized monoclonal antibody; functional observational battery (FOB); rats; central nervous system

随着生物技术的发展,抗体-药物偶联(antibody-drug-conjugates, ADC)药物成为抗肿瘤药物研发的新方向。其作用机理是通过单克隆抗体的靶向作用特异性地识别肿瘤细胞表面抗原,然后利用细胞本身内吞作用使化学药物进入肿瘤细胞内发挥作用,杀死肿瘤细胞^[1-2]。

人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)是酪氨酸激酶膜受体,它在健康成年人的表皮组织低水平表达,而大约20%乳腺癌患者HER2呈现过表达^[3]。曲妥珠单抗(trastuzumab)是人源化单克隆抗体,能够与HER2受体表面区域相结合,有效地治疗HER2过表达的乳腺癌和转移性胃或胃食管交界腺癌^[4-5],其作用机制主要是干扰信号传导通路,抑制DNA损伤等^[6-9]。鉴于曲妥珠单抗对HER2过表达的乳腺癌疗效显著,研究者将ADC药物的理念与曲妥珠单抗相结合,研发出一种新型抗体治疗药物。

Trastuzumab emtansine(曲妥珠单抗emtansine, T-DM1)是目前国内外最新的抗乳腺癌ADC药物,其由曲妥珠单抗和细胞毒药物—美登素衍生物(DM1)组成,主要针对HER2过表达的患者。国外临床实验提示,服用T-DM1药物患者的生存率高于服用曲妥珠单抗药物患者的生存率^[10]。但文献报道DM1具有一定的神经毒性^[11],因此临床前评价T-DM1药物中枢神经系统作用是至关重要的。本研究重点探讨了

T-DM1药物(HS630)对中枢神经系统的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40只8~9周龄SPF级Sprague-Dawley大鼠,雌雄各半(雌性,246.3~261.9g;雄性,238.1~282.0g),购自中国食品药品检定研究院实验动物资源中心,实验动物许可证号SCXK(京)2014-0013。PC聚碳酸酯鼠盒饲养,钴⁶⁰放射灭菌鼠全价颗粒饲料和灭菌水,持续供给,不限量自由摄取。饲养室控制温度20~26℃,湿度40%~70%,换气次数每小时8~10次,12h照明。

1.2 供试品及空白对照品

供试品(注射用重组抗HER2人源化单克隆抗体偶联DM1,即HS630,批号20131101)及空白对照品(注射用重组抗HER2人源化单克隆抗体偶联DM1,批号20131102)均由浙江海正药业股份有限公司提供,2~8℃避光保存。

1.3 实验设计

本次供试品临床拟用给药剂量为 $3.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,静脉注射,根据供试品特点和相关指导原则,采用单次尾静脉注射,给药体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药剂量为6、20和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

供试品药代研究显示,SD大鼠单次给药6、20、 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ HS630后,达峰时间 T_{\max} 在0.5h或4h,随后出现1个较慢的消除过程,浓度消除半衰

期 $T_{1/2}$ 分别为 (180.1 ± 52.8)h、(171.1 ± 33.5)h 和 (133.6 ± 32.7)h, 根据该结果, 本次实验设定 FOB 观察时间点为 0.5、4、24、48、72、120 及 168 h。

本研究按体重随机分为 4 组, 每组雌雄各 5 只, 组别包括空白对照组(空白对照品)、低剂量组 (6 mg · kg⁻¹ HS630)、中剂量组 (20 mg · kg⁻¹ HS630) 和高剂量组 (40 mg · kg⁻¹ HS630)。

1.4 检测指标

1.4.1 FOB 实验方法 本次实验采用功能观测组合实验方法 (function observational battery, FOB)^[12], 该方法由 51 个观测指标组成, 包括笼内观察 (12 个指标)、手持观察 (6 个指标)、开放场观察 (22 个指标)、反射评价 (7 个指标)、肌肉力 (4 个指标)。

所有的操作均按照特定的顺序, 对动物影响小的操作在前, 动物抓取等操作在后, 体温检测最后进行。FOB 评分标准分为 3 类: 第 1 类, 该指标为能够进行严重程度分级的指标, 且异常值不存在低于标准值的情况, 标准值定为 0N, 异常情况高于标准值时, 评分范围为 0~4; 第 2 类, 该指标为能够进行严重程度分级的指标, 且异常值存在低于标准值的情况, 此时将

标准值定为 4N, 异常情况低于标准值, 评分的范围设为 0~4, 异常情况高于标准值, 评分范围设为 4~8; 第 3 类: 该指标不是对严重程度评分的指标, 如死亡等, 评分定为 0 (未发现) 和 1 (发现)。

1.4.2 体温测定 采用体温计测量大鼠体温。

1.5 统计学方法

本次实验应用 SPSS (13.0) 统计软件进行数据分析。根据资料的性质选择相应的统计方法。其中, FOB 检测指标采用非参数秩和检验, 体温检测指标采用重复测量方差分析。

2 结果

2.1 笼内观察

给药后 4 h, HS630 高剂量组 (40 mg · kg⁻¹) 姿势和眼睑开合指标与空白对照组有显著统计学差异 ($P < 0.05$), 其中观察结果显示大鼠多呈现蜷缩姿势, 眼睑半关闭状态。给药后 4 h, 其他时间点各剂量组笼内观察各指标与空白对照组没有显著统计学差异。给药前, 给药后 0.5、24、48、72、120 及 168 h 各剂量组笼内观察其他指标与空白对照组没有显著统计学差异。详见表 1。

表 1 HS630 对大鼠中枢神经系统的影响 (笼内观察)

Tab. 1 Effects of HS630 on the central nervous system of rats (in cage)

检测指标 (index)	检测时间 (testing time)/h	标准值 (standard)	空白对照组 (blank control group)	低剂量组 (low dose group)	中剂量组 (middle dose group)	高剂量组 (high dose group)
姿势 (posture)	给药前 (pre-administration)	0.0	0.8	0.1	0.2	1.2
	0.5	0.0	0.5	0.4	0.4	0.5
	4	0.0	0.3	1.2	0.8	1.4*
	24	0.0	1.0	0.3	1.0	1.0
	48	0.0	0.9	1.4	0.6	1.1
	72	0.0	0.9	0.7	1.3	0.3
	120	0.0	1.0	1.0	1.4	1.1
	168	0.0	0.4	0.9	1.0	0.9
眼睑开合 (eye opening)	给药前 (pre-administration)	0.0	0.0	0.0	0.4	0.7
	0.5	0.0	0.0	0.2	0.0	0.7
	4	0.0	0.0	0.5	0.0	2.2*
	24	0.0	0.2	0.0	0.3	0.3
	48	0.0	1.1	1.6	0.6	1.5
	72	0.0	0.0	0.2	1.1	1.0
	120	0.0	0.0	0.0	0.7	1.5
	168	0.0	0.0	1.2	1.6	1.0

注 (note): *, 与空白对照组比较 $P < 0.05$ (compared with blank control group, $P < 0.05$); 表中未列出没有明显变化的指标 (non-significant changes were not listed in the table)

2.2 手持观察

给药前,给药后 0.5、4、24、48、72、120 及 168 h,手持观察各指标,受试物各组大鼠未见明显异常。

2.3 开放场观察

给予 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 受试物,动物开放场观察未见明显症状;给予 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 受试物,在给药后 4 h,动物发现明显降低了唤醒唤起,手指接近,触摸头部,惊恐的反应,并且发现有 8 只动物(8/10 只)出现震颤现象(与空白对照组比较 $P < 0.05$),随着时间点的

延长可逐渐恢复,开放场其他指标未见明显异常;给予 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 受试物,给药后 4、48、72 及 120 h,动物均出现不同程度唤醒唤起反应、手指接近反应、触摸头部反应、惊恐反应降低,给药后 168 h 上述指标均恢复,另外给药后 4 h(7 只/10 只)和 48 h(5 只/10 只),出现震颤动物数明显多于空白对照组,与空白对照组有明显统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),给药后 7 d,该症状恢复,其他指标未见明显异常。详见表 2。

表 2 HS630 对大鼠中枢神经系统的影响(开放场观察)

Tab. 2 Effects of HS630 on the central nervous system of rats(open field)

检测指标 (index)	检测时间 (testing time)/h	标准值 (standard)	空白对照组 (blank control group)	低剂量组 (low dose group)	中剂量组 (middle dose group)	高剂量组 (high dose group)
唤醒、唤起 (arousal)	给药前 (pre-administration)	4	4.0	4.0	4.0	4.0
	0.5	4	3.8	4.0	3.8	3.4
	4	4	3.5	3.4	3.2	3.0
	24	4	4.0	3.6	3.8	3.4
	48	4	4.0	3.6	3.6	3.6
	72	4	3.8	4.0	3.9	3.2
	120	4	4.0	4.0	4.0	3.7
手指接近 (finger approach)	给药前 (pre-administration)	4	4.0	4.0	4.0	4.0
	0.5	4	4.0	4.0	3.8	3.4
	4	4	3.6	3.6	3	2.8
	24	4	3.8	3.4	3.8	3.4
	48	4	3.8	3.8	3.6	3.6
	72	4	4.0	4.0	3.8	3.2*
	120	4	4.0	4.0	4.0	4.0
触摸头部 (head touch)	给药前 (pre-administration)	4	4.0	4.0	4.0	4.0
	0.5	4	3.8	4.0	3.8	3.4
	4	4	3.5	3.4	3.2	3.0
	24	4	4.0	3.6	3.8	3.4
	48	4	4.0	3.6	3.6	3.6
	72	4	3.8	4.0	3.9	3.2
	120	4	3.8	3.8	3.4	2.8*
168	4	3.8	3.8	3.6	3.6	

表 2(续)

检测指标 (index)	检测时间 (testing time)/h	标准值 (standard)	空白对照组 (blank control group)	低剂量组 (low dose group)	中剂量组 (middle dose group)	高剂量组 (high dose group)
惊恐 (fear)	给药前 (pre-administration)	4	4.0	4.0	4.0	4.0
	0.5	4	4.0	4.0	3.8	3.4
	4	4	3.6	3.6	3.0	2.8
	24	4	3.8	3.4	3.8	3.4
	48	4	3.8	3.8	3.6	3.6
	72	4	4.0	4.0	3.8	3.2*
	120	4	4.0	4.0	4.0	3.6
	168	4	4.0	4.0	3.8	3.8
自主活动 (locomotor activity)	给药前 (pre-administration)	4	4.0	4.0	4.0	4.0
	0.5	4	4.0	4.0	3.9	3.7
	4	4	3.8	3.6	3.6	3.2
	24	4	3.8	3.6	3.8	3.4
	48	4	3.9	3.8	3.8	3.5**
	72	4	3.8	3.9	3.7	3.6
	120	4	3.9	4.0	4.0	3.6
	168	4	3.9	3.9	3.7	3.6
震颤 (tremors)	给药前 (pre-administration)	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.5	0	0.0	0.0	0.1	0.0
	4	0	0.3	1.3	1.2*	1.4*
	24	0	0.1	0.5	0.6	0.4
	48	0	0.1	0.2	0.5	0.5**
	72	0	0.3	0.6	0.9	0.2
	120	0	0.1	0.2	0.3	0.3
	168	0	0.1	0.2	0.3	0.3

注 (note): *, 与空白对照组比较 (compared with blank control group), $P < 0.05$, $P < 0.01$; 表中未列出没有明显变化的指标 (non-significant changes were not listed in the table)

2.4 反射评价

给药前, 给药后 0.5、4、24、48、72、120 及 168 h, 反射评价各指标, 受试物各剂量组大鼠没有发现异常现象。

2.5 肌肉力

给药前, 给药后 0.5、4、24、48、72、120 及 168 h,

肌肉力各指标, 受试物各剂量组大鼠没有发现异常现象。

2.6 体温

研究发现, 给药前, 给药后 0.5、4、24、48、72、120 及 168 h, 受试物各剂量组大鼠体温与空白对照组相比, 没有统计学差异 (详见图 1)。

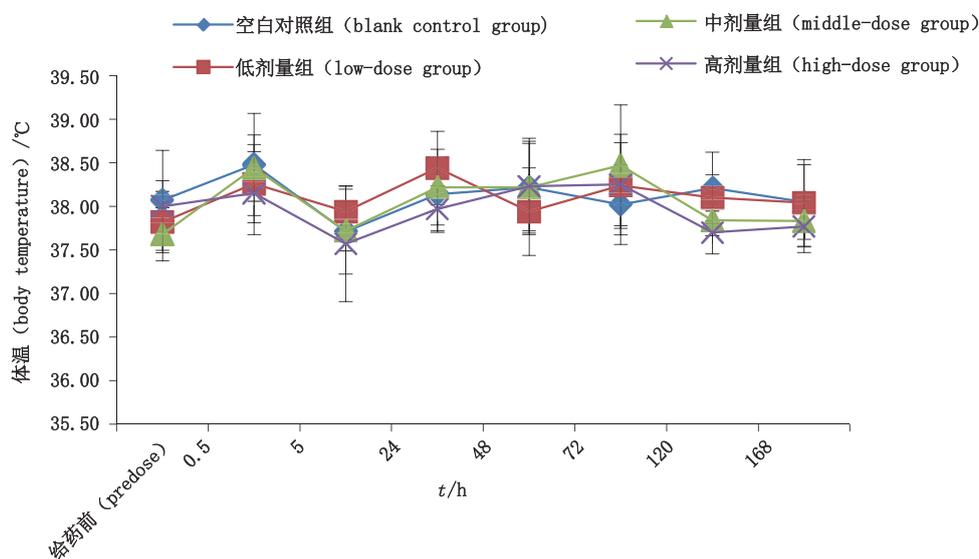


图1 HS630对大鼠体温的影响

Fig. 1 Effects of HS630 on body temperature of rats

2.7 小结

在 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下, HS630 对大鼠中枢神经系统没有影响; 在 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下, 给药后 4 h, HS630 不同程度降低动物唤醒唤起反应、手指接近反应、触摸头部反应 ($P < 0.05$)、惊恐反应, 及引起动物出现明显的震颤现象 ($P < 0.05$), 之后时间点该症状恢复。其他指标没有明显改变, 与空白对照组没有统计学差异。

在 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下, 给药后 4、48、72 及 120 h 均不同程度降低动物唤醒唤起反应、手指接近反应、触摸头部反应、惊恐反应降低, 给药后 7 d 上述指标均恢复, 以及给药后 4 h 和 48 h, 明显引起动物出现震颤现象 ($P < 0.05$), 给药后 7 d, 该症状恢复。其他指标没有明显改变, 与空白对照组没有统计学差异。

3 讨论

美国 FDA ICH7A^[13] 及我国《药物安全药理学研究技术指导原则》^[14] 均提出采用 FOB 方法评价药物的神经毒性。FOB 主要通过行为、神经、自主体征三方面评价受试物对机体的影响。本次实验主要发现受试物 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 在给药后 4 h 出现唤醒唤起, 手指接近, 触摸头部, 惊恐反应降低, 以及在上述 2 个剂量下明显引起动物震颤, 出现该现象的原因, 可能与受试物中连接的小分子细胞毒药物 DM1 相关。文献报道表明, 重复给予美登素能够使小鼠后腿致残, 且降低大鼠自主活动^[11]; 另外临床

研究也显示, DM1 的使用损伤病人的中枢神经系统和外周神经系统^[9]。其次, 与该供试品类似的化合物, 临床前结果提示给予 10 或 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ T-DM1 的猴子 (1~10 倍高于患者暴露范围) 表现出不同程度的轴突退化^[8]。上述症状出现可能与受试物偶联的 DM1 相关, 开发者及临床使用者需密切关注 ADC 药物的稳定性及 DM1 的神经毒性。

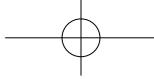
临床前药代毒代结果显示, 受试物单次给药 6、20、60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, T_{max} 为 0.5 h 或者 4 h, 本次实验结果在给药后 4 h, 出现中枢神经系统毒性, 随着时间的延长, 相关症状逐渐消失, 与受试物的 T_{max} 时间点基本吻合。

4 结论

本研究结果提示, HS630 在一定剂量下可能会诱发神经毒性, 但是可逐渐恢复。

参考文献

- [1] ALLEY SC, OKELEY NM, SENTER PD. Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(4): 529
- [2] LAMBERT JM. Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5(5): 543
- [3] DAWOOD S, BROGLIO K, BUZDARAU, *et al.* Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review [J]. *J Clin Oncol*, 2010,



- 28(1):92
- [4] SPECTOR NL, BLACKWELL KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(34): 5838
- [5] BLACKWELL KL, BURSTEIN HJ, STORNILO AM, *et al.* Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive trastuzumab-refractory metastatic breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(7): 1124
- [6] HUDIS CA. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357: 39
- [7] YRDEN Y, SLIWKOWSKI MX. Untangling the ErbB signalling network [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2): 127
- [8] PRESS MF, CORDON-CARDO C, SLAMON DJ. Expression of the HER-2/neu proto oncogene in normal human adult and fetal tissues [J]. *Oncogene*, 1990, 5(7): 953
- [9] ROSS JS, SLOSKOWSKA EA, SYMMANS WF, *et al.* The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine [J]. *Oncologist*, 2009, 14(4): 320
- [10] POON KA, FLAGELLA K, BEYER J, *et al.* Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DM1): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 273(2): 298
- [11] REBERT CS, PRYOR GT, FRICK MS. Effects of vincristine, maytansine, and *cis*-platinum on behavioral and electrophysiological indices of neurotoxicity in the rat [J]. *J Appl Toxicol*, 1984, 4(6): 330
- [12] MOSCARDO E, MAURIN A, DORIGATTI R, *et al.* An optimised methodology for the neurobehavioural assessment in rodents [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007, 56(2): 239
- [13] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7A [S]. 2000
- [14] 药物安全药理学研究技术指导原则 [S]. 2014
Guidance for Safety Pharmacology Studies [S]. 2014
(本文于 2017 年 9 月 12 日收到)