

食蟹猴sc重组人干扰素 β -1a注射液30 d安全性评价

徐德璐^{1,2}, 胡雷^{1,2*}, 兰天龙¹, 钟飞¹, 刘艳菊¹, 周博宇¹

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: **目的** 研究重组人干扰素 β -1a (rhIFN β -1a) 注射液的毒副反应靶器官及其恢复情况, 预测可能引起的临床不良反应, 为临床用药提供参考。**方法** 食蟹猴sc重复给予rhIFN β -1a注射液3.9、13.2、45.0 $\mu\text{g/kg}$, 连续30 d, 每组6只动物, 雌雄各半, 停药后恢复16 d。观察药物对一般体征、饮食、肛温、体质量的影响, 同时进行尿液分析、血液学、血液生化、心电图、眼科检查、骨髓涂片、免疫学指标、免疫原性检查, 在给药结束和恢复结束进行大体剖检并进行组织病理学检查。**结果** 45.0 $\mu\text{g/kg}$ rhIFN β -1a组动物出现一过性肛温升高, 以及活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶时间 (TT) 延长, 血浆纤维蛋白原 (FIB) 浓度降低, 该变化在给药期内能恢复。其余一般指标、心电图、血液生化、尿液生化、骨髓检查、大体解剖、脏器质量及系数、组织学检查、免疫学指标检查未见异常。免疫原性试验可见给药20 d后绝大部分动物开始出现抗体, 给药30 d时所有动物均出现抗体, 各剂量组绝大多数产生结合抗体的动物血清可检测到具有中和rhIFN β -1a注射液活性的抗体, 结合抗体以及中和抗体的滴度均与剂量呈非相关性关系, 具有随给药时间延长抗体强度增强的趋势。**结论** 食蟹猴连续sc重复给予rhIFN β -1a注射液30 d, 无可见有害作用水平 (NOAEL) 为13.2 $\mu\text{g/kg}$, 该剂量为人临床拟用剂量0.135 $\mu\text{g/kg}$ 的97.8倍。rhIFN β -1a注射液对食蟹猴具有一定的免疫原性。

关键词: 重组人干扰素 β -1a; 长期毒性试验; 食蟹猴; 安全性评价

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2019) 08-1537-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.08.009

A 30-days subcutaneous safety evaluation of recombinant human interferon β -1a injection in cynomolgus monkeys

XU Delu^{1,2}, HU Lei^{1,2}, LAN Tianlong¹, ZHONG Fei¹, LIU Yanju¹, ZHOU Boyu¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China

2. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** We conducted a 30-day long-term toxicity test of cynomolgus monkey subcutaneously in order to study the target organs of toxicity and side effects of recombinant human interferon β -1a (rhIFN β -1a) injection and its recovery, predict the possible clinical adverse reactions, and provide reference for clinical medication. **Methods** RhIFN β -1a injection was given subcutaneously for 30 days at doses of 3.9, 13.2 and 45.0 $\mu\text{g/kg}$ for 6 animals in each group, male and female in half. Then there was a 16-day recovery time. We observed the effects of drugs on general signs, diet, rectal temperature and body weight. At the same time, urine analysis, hematology, blood biochemistry, electrocardiogram, ophthalmological examination, bone marrow smears, immunological indicators, immunogenicity were carried out. General anatomy and histopathological examination were performed at the end of administration and recovery. **Results** In the 45.0 $\mu\text{g/kg}$ dosage group, there was a transient increase of anal temperature, prolonged time of APTT and TT, and decreased concentration of FIB, which could be recovered in the period of administration. The other general indexes, electrocardiogram, blood biochemistry, urine biochemistry, bone marrow examination, general anatomy, organ weight and coefficient, histological examination and immunological index were normal. Immunogenicity test showed that most animals began to show antibodies 20 days after administration, and all animals showed antibodies 30 days after administration. Most of the sera of animals producing binding antibodies in each dose group could detect antibodies that neutralize rhIFN β -1a injection.

收稿日期: 2019-01-17

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

第一作者: 徐德璐, 助理研究员, 研究方向为临床前药物安全性评价。

*通信作者: 胡雷, 副研究员, 研究方向为临床前药物安全性评价。E-mail: hul@tjipr.com

The titers of binding antibodies and neutralizing antibodies were independent of the dose and the intensity of antibody had enhanced trend with the prolongation of administration time. **Conclusions** Cynomolgus monkeys were subcutaneously administered rhIFN β -1a injection for 30 consecutive days, and NOAEL was 13.2 $\mu\text{g/kg}$. The dose was 97.8 times that of human clinical dosage of 0.135 $\mu\text{g/kg}$. RhIFN β -1a injection has certain immunogenicity to cynomolgus monkeys.

Key words: recombinant human interferon β -1a; long-term toxicity; cynomolgus monkeys; safety evaluation

多发性硬化症(MS)是一种中枢神经系统的自身免疫性脱髓鞘疾病,好发于青壮年,女性发病率高于男性,其发病原因尚不清楚^[1]。目前,用于改善病情的药物包括干扰素 β (IFN- β)、芬戈莫德、特立氟胺等^[2],其中IFN- β 是获得国际批准的治疗MS的一线药物^[3]。IFN- β 具有抗病毒、抑制细胞生长、免疫调节、抑制和杀伤肿瘤细胞等作用^[4],据报道IFN- β 治疗过程中可出现一些轻微的不良反应用^[5],如注射局部红肿、头疼、肌肉关节疼痛、发热等,但大多数情况下无需减量或停药。IFN- β 通过与白细胞表面的IFN- β 受体结合发挥作用^[6],中和抗体的出现可能影响疗效,但尚无证据表明抗体出现后就可能会完全失效^[7]。IFN- β 在临床上的应用极为广泛^[8],国外相关产品的研发和检测一直处于领先水平,但国内目前尚无自主研发的重组人干扰素IFN- β 药物上市^[9]。为了评价重组人干扰素 β -1a(rhIFN β -1a)的安全性、预测其可能引起的临床不良反应、提供毒副反应的靶器官及其恢复情况、提示临床试验中需重点监测的指标和重复用药的安全剂量范围、为临床用药提供参考,本研究进行了食蟹猴的长期毒性试验的研究。

1 材料

1.1 供试品及主要试剂

1.1.1 供试品 rhIFN β -1a注射液,批号20110604,规格15 mL/支,由浙江海正药业股份有限公司提供。rhIFN β -1a注射液安慰剂(空白溶剂),批号20110501,规格15 mL/支,由浙江海正药业股份有限公司提供。

1.1.2 主要试剂 血液学测定专用试剂试剂及指控全血生产厂商为SIEMENS;凝血功能测定试剂盒生产厂商为美国贝克曼库尔特公司;血液生化测定试剂盒生产厂商为中生北控生物科技股份有限公司生产;流式细胞仪使用试剂生产厂商为美国BD公司;免疫原性使用试剂生产厂商为天津联星生物技术有限公司;非特异性免疫学使用试剂生产厂商为天津联星生物技术有限公司。

1.2 实验动物

食蟹猴,普通级,雌雄各半,年龄3~4岁,由苏

州西山中科实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2007-0005。

1.3 主要仪器

ADVIA2120 血液分析仪(SIEMENS公司); ACL9000 血凝分析仪(美国贝克曼库尔特公司); 7080全自动生化分析仪(日本日立公司); AC9900 电解质分析仪(江苏奥迪康公司); DM LB2 显微镜(德国LEICA); FACSARIA II流式细胞仪(美国BD公司); Varioskan Flash 酶标仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 实验设计

挑选24只食蟹猴,设置溶剂对照组、rhIFN β -1a注射液低、中、高剂量(3.9、13.2、45.0 $\mu\text{g/kg}$)组,每组6只,雌雄各半。给药剂量3.9、13.2、45.0 $\mu\text{g/kg}$ 分别为猴拟用平均每日临床剂量的10.0、34.1、116.3倍,溶剂对照组给予空白溶剂。给药体积为0.3 mL/kg, sc给药,每天给药1次,连续给药30 d。给药结束后各组剖杀4只,留存2只恢复观察16 d后剖杀。

2.2 观察指标

2.2.1 一般情况 观察猴的外观、行为、活动、步态、精神、食量、体质量、大便、肛温、呼吸、瞳孔、皮毛、有无流涎、恶心、呕吐等,注射部位有无出血、水肿、感染等。如有动物死亡,则记录死数,并及时解剖了解死因。

2.2.2 心电图 给药11、21、29 d,猴仰卧固定于工作台上,采用CONTEC8000心电工作站采集心电图,分析心率、P波电压、R波电压、T波电压、P-R间期、QRS时限、Q-T间期、ST段电压共8项指标的变化。

2.2.3 血液学 给药10、20、30 d,取静脉血,血液分析仪检测红细胞计数(RBC)、红细胞容积(HCT)、血红蛋白(HB)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、网织红细胞计数(RET)、白细胞计数(WBC)及其分类(中性粒细胞N、淋巴细胞L、单核细胞M、嗜酸性粒细胞A)、血小板计数(PLT)共13项血液学指标。

2.2.4 血液生化 给药10、20、30 d, 静脉取血, 分离血清, 全自动生化分析仪检测天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)、碱性磷酸酶(ALP)、血清尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总胆固醇(CHOL)、血糖(GLU)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、三酰甘油(TG)、肌酸磷酸激酶(CK)、血清钾离子(K^+)、钠离子(Na^+)、氯离子(Cl^-)。

2.2.5 凝血功能 每只猴于给药10、20、30 d, 静脉取血, 取抗凝血液, 分离血浆, 血凝分析仪检测凝血酶原时间(PT)、部分活化凝血酶原时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白(FIB)共4项凝血指标。

2.2.6 尿液分析 给药11、21、29 d, 取猴的新鲜尿液, 电解质分析仪检测胆红素、尿胆原、酮体、抗坏血酸、尿糖、尿蛋白、隐血、pH、亚硝酸盐、白细胞、尿比重共11项指标。

2.2.7 骨髓检查 给药结束和恢复结束时胸骨取材, 涂片、染色、镜检。

2.2.8 大体解剖检查 末次给药后24 h iv 3%戊巴比妥钠麻醉, 股动脉放血处死16只猴, 其余猴停药观察16 d后同法处死病检。大体观察各脏器有无病变, 对心、肝、脾、肺、肾、脑、肾上腺、甲状腺、胸腺、附睾、睾丸、子宫、卵巢等脏器称质量, 并计算各脏器的脏器系数。

2.2.9 组织学检查 取脑、脊髓、垂体、胸腺、甲状腺、甲状旁腺、食管、唾液腺、胃、小肠和大肠、肝脏、胰腺、肾脏、肾上腺、脾脏、心脏、气管、肺脏、主动脉、睾丸、附睾、子宫、卵巢、乳腺、前列腺、膀胱、坐骨神经、骨髓、淋巴结, 立即固定于福尔马林液中, 常规包埋、切片、染色。观察各剂量组组织器官有无病理变化。

2.2.10 免疫原性 给药10、20、30 d, 采用间接ELISA法检测动物血清中的结合抗体, 体外细胞生物活性测定法检测结合抗体的中和活性; 检测动物血清中抗rhIFN β -1a抗体的产生, 判断抗体有无中

和性^[10]。

2.2.11 非特异性免疫学指标检查 给药10、20、30 d, 静脉取血, 分离血清, 采用流式细胞仪检测CD3、CD4、CD8、CD4/8, ELISA法检测IgA、IgE、IgG。

2.3 统计方法

试验数据均采用SPSS软件(版本9.1)进行统计处理。计量资料采用先检查方差齐性, 根据方差齐性检验的结果再进行组间 t 检验, 计数资料采用 χ^2 或等级指数检验。各组与溶剂对照组进行差异性比较。根据实际情况综合分析供试品对动物各项指标的影响。

3 结果

3.1 一般指标

rhIFN β -1a各剂量组猴的外观、行为活动、精神、大小便、皮毛等无明显变化, 也无恶心、呕吐、活动受限等症状, 注射部位无明显出血、水肿、感染等病变。给药期各剂量组动物食欲食量正常, 体质量增长正常, 与溶剂对照组未见明显差异(表1)。给药第1天及给药后11 d 45.0 μ g/kg组动物体温与溶剂对照组比较有轻微升高, 在给药后24 h内能恢复(表2)。

3.2 血液学指标

给药期各次检查中, 各给药组动物RBC、HCT、HB、MCV、MCH、MCHC、RET、WBC及其分类(中性粒细胞N、淋巴细胞L、单核细胞M、嗜酸性粒细胞A)、PLT等指标, 与溶剂对照组比较未见显著差异(表3)。

3.3 血液生化指标

给药期各次检查中, 各给药组动物AST、ALT、 γ -GT、AKP、BUN、CREA、CHO、GLU、TP、ALB、TBIL、TG、CK、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 等指标, 与溶剂对照组比较未见显著差异(表4)。

3.4 凝血指标

食蟹猴连续sc重复给予重组人干扰素 β -1a注射液, 给药10 d时45.0 μ g/kg剂量组动物APTT、PT

表1 rhIFN β -1a注射液对食蟹猴体质量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of rhIFN β -1a injection on body weight of cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(μ g $\cdot$ kg $^{-1}$)	体质量/kg			
		给药0 d	给药10 d	给药20 d	给药30 d
溶剂对照	0	3.15 $\pm$ 0.41	3.13 $\pm$ 0.28	3.22 $\pm$ 0.34	3.21 $\pm$ 0.30
rhIFN β -1a注射液	3.9	3.12 $\pm$ 0.37	3.22 $\pm$ 0.34	3.27 $\pm$ 0.38	3.24 $\pm$ 0.44
	13.2	3.18 $\pm$ 0.40	3.26 $\pm$ 0.45	3.23 $\pm$ 0.46	3.34 $\pm$ 0.35
	45.0	3.27 $\pm$ 0.38	3.26 $\pm$ 0.38	3.29 $\pm$ 0.37	3.31 $\pm$ 0.37

表2 rhIFN β -1a注射液对食蟹猴体温的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Effect of rhIFN β -1a injection on body temperature of cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	体温/ $^{\circ}\text{C}$				
		给药0 d	给药1 d	给药11 d	给药21 d	给药29 d
溶剂对照	0	38.80 $\pm$ 0.77	38.42 $\pm$ 0.34	38.40 $\pm$ 0.43	38.90 $\pm$ 0.61	38.99 $\pm$ 0.40
rhIFN β -1a注射液	3.9	38.79 $\pm$ 0.85	38.74 $\pm$ 0.37	38.91 $\pm$ 0.48	39.15 $\pm$ 0.60	39.34 $\pm$ 0.84
	13.2	38.76 $\pm$ 0.61	38.34 $\pm$ 0.74	38.67 $\pm$ 0.52	38.69 $\pm$ 0.46	38.94 $\pm$ 0.46
	45.0	38.98 $\pm$ 0.30	39.10 $\pm$ 0.47*	39.38 $\pm$ 0.66*	39.23 $\pm$ 0.27	39.45 $\pm$ 0.32

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs solvent control group表3 rhIFN β -1a注射液给药30 d对食蟹猴血液学主要指标的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Effect of rhIFN β -1a injection for 30 days on main hematological parameters of cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	WBC/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	RBC/ ($\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$)	HB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	HCT/%	MCV/fL	PLT/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	RET/%
溶剂对照	0	12.73 $\pm$ 6.71	5.65 $\pm$ 0.37	132.50 $\pm$ 5.43	43.48 $\pm$ 2.33	76.98 $\pm$ 1.95	573.17 $\pm$ 163.94	0.88 $\pm$ 0.76
rhIFN β -1a注射液	3.9	15.29 $\pm$ 4.94	5.65 $\pm$ 0.30	136.83 $\pm$ 6.43	44.67 $\pm$ 2.59	79.08 $\pm$ 2.56	560.83 $\pm$ 92.53	0.75 $\pm$ 0.38
	13.2	10.85 $\pm$ 1.79	5.54 $\pm$ 0.22	128.33 $\pm$ 5.99	42.73 $\pm$ 1.66	77.18 $\pm$ 2.74	541.83 $\pm$ 128.24	0.63 $\pm$ 0.08
	45.0	13.24 $\pm$ 5.81	5.55 $\pm$ 0.26	130.67 $\pm$ 6.19	43.30 $\pm$ 2.19	78.00 $\pm$ 0.97	587.83 $\pm$ 133.19	0.68 $\pm$ 0.27

表4 rhIFN β -1a注射液给药30 d对食蟹猴血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Effect of rhIFN β -1a injection for 30 days on blood biochemistry parameters of cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	ALP/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	BUN/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Crea/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TP/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	ALB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	GLU/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
溶剂对照	—	37.9 $\pm$ 13.5	69.6 $\pm$ 21.4	323.6 $\pm$ 83.9	7.23 $\pm$ 1.65	94.6 $\pm$ 13.3	83.4 $\pm$ 4.2	43.98 $\pm$ 0.69	3.48 $\pm$ 0.87
rhIFN β -1a注射液	3.9	35.9 $\pm$ 12.9	50.2 $\pm$ 10.6	251.1 $\pm$ 50.0	6.69 $\pm$ 1.21	91.9 $\pm$ 7.2	81.3 $\pm$ 2.2	42.78 $\pm$ 1.75	3.60 $\pm$ 0.45
	13.2	29.0 $\pm$ 7.2	57.1 $\pm$ 9.5	321.6 $\pm$ 77.0	7.75 $\pm$ 1.28	91.2 $\pm$ 12.6	80.1 $\pm$ 2.1	42.23 $\pm$ 2.14	3.22 $\pm$ 0.54
	45.0	36.9 $\pm$ 7.6	59.1 $\pm$ 12.8	292.7 $\pm$ 113.5	7.34 $\pm$ 1.64	94.8 $\pm$ 11.2	84.7 $\pm$ 6.1	42.03 $\pm$ 3.28	3.98 $\pm$ 0.93
组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	CHOL/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TBIL/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TG/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CK/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	γ -GT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	K/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Na/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cl/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
溶剂对照	—	3.34 $\pm$ 0.71	4.64 $\pm$ 1.04	0.52 $\pm$ 0.17	209.9 $\pm$ 98.3	54.0 $\pm$ 24.4	4.5 $\pm$ 0.3	144.5 $\pm$ 3.8	108.4 $\pm$ 1.7
rhIFN β -1a注射液	3.9	3.09 $\pm$ 0.82	4.60 $\pm$ 1.30	0.41 $\pm$ 0.12	157.0 $\pm$ 47.2	42.4 $\pm$ 4.2	4.4 $\pm$ 0.4	140.9 $\pm$ 3.2	108.8 $\pm$ 2.5
	13.2	2.89 $\pm$ 0.59	4.79 $\pm$ 1.37	0.38 $\pm$ 0.07	143.0 $\pm$ 19.5	37.2 $\pm$ 5.3	4.6 $\pm$ 0.5	142.0 $\pm$ 2.0	108.0 $\pm$ 0.4
	45.0	2.87 $\pm$ 0.42	4.67 $\pm$ 1.02	0.56 $\pm$ 0.30	168.5 $\pm$ 53.1	35.5 $\pm$ 13.2	4.6 $\pm$ 0.5	142.8 $\pm$ 3.1	109.1 $\pm$ 1.8

与溶剂对照组比较延长, FIB-C浓度与溶剂对照组比较降低, 以上变化在给药30 d恢复正常(表5)。

3.5 心电图指标

给药期各次检查中, 各给药组动物心率、P波电压、R波电压、T波电压、P-R间期、QRS时限、Q-T间期、ST段电压等指标, 与溶剂对照组比较未见明显差异。

3.6 尿液指标

给药期各次检查中, 各给药组动物尿液中胆红素、尿胆原、酮体、抗坏血酸、尿糖、尿蛋白、隐血、

pH、亚硝酸盐、白细胞、尿比重等指标, 与溶剂对照组比较未见明显差异。

3.7 骨髓检查

各组标本, 粒系百分比正常, 各阶段粒细胞之间比例正常, 各阶段粒细胞形态无异常; 红系百分比正常, 以中晚幼红为主, 形态、比例无明显异常, 成熟红细胞无明显形态异常; 淋巴、单核细胞比例形态正常; 均未见特殊细胞和寄生虫。各给药组与溶剂对照组比较, 未见明显差异。

表5 rhIFN β -1a注射液给药30 d对食蟹猴凝血指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 5 Effect of rhIFN β -1a injection for 30 days on coagulation parameters of cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	10 d				30 d			
		PT/s	APTT/s	TT/s	FIB-C/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB-C/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
溶剂对照	—	10.7 $\pm$ 0.6	24.38 $\pm$ 1.79	15.8 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 1.0	11.1 $\pm$ 0.7	25.12 $\pm$ 2.91	15.9 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.4
rhIFN β -1a	3.9	11.2 $\pm$ 3.5	30.07 $\pm$ 8.24	16.8 $\pm$ 1.0	3.3 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 1.8	24.72 $\pm$ 3.13	16.7 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.3
注射液	13.2	10.2 $\pm$ 1.1	29.72 $\pm$ 5.43	17.0 $\pm$ 1.5	3.2 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 2.1	24.22 $\pm$ 2.84	16.1 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.6
	45.0	11.5 $\pm$ 2.0	33.82 $\pm$ 8.54*	17.5 $\pm$ 1.0**	2.9 $\pm$ 0.3*	10.7 $\pm$ 0.9	23.08 $\pm$ 3.04	15.7 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.6

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs solvent control group

3.8 大体解剖检查

给药结束及恢复结束剖检可见各只动物毛顺, 有光泽, 营养状况良好; 胸、腹膜光滑, 胸、腹腔内未见积液、粘连, 被检脏器形态、颜色、位置等未见肉眼可见的病理改变。给药结束及停药恢复结束各给药组的各脏器的质量及系数与溶剂对照组相比无差异。

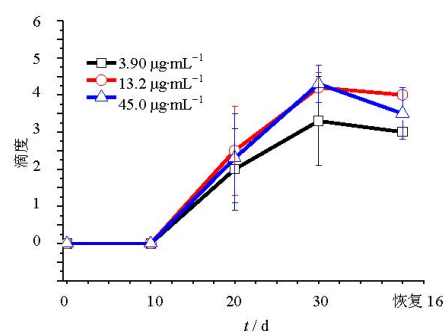
3.9 组织学检查

重复给予 rhIFN β -1a 注射液 30 d, 对食蟹猴的主要脏器脑、脑垂体、眼球、心脏、主动脉、肺、气管、唾液腺、肝、胆囊、胰腺、肾、脾、胸腺、脊髓、坐骨神经、乳腺、子宫、宫颈、卵巢、输卵管、阴道、前列腺、睾丸、附睾、肾上腺、甲状腺、甲状旁腺、较远淋巴结、食管、胃、小肠、大肠、膀胱、皮肤、骨骼肌、给药相关淋巴结、骨髓(胸骨)及股骨等, 组织结构、细胞形态与溶剂对照组比较未发现明显由药物引起的组织病理学改变。停药 16 d 后检查, 上述脏器亦未发现明显延迟毒性反应。

3.10 免疫原性

3.10.1 结合抗体 从给药 20 d 开始, 各给药组绝大多数动物血清均可检测到抗重组人干扰素 β -1a

的结合抗体, 给药 30 d 所有受试动物已全部产生抗体, 且恢复期结束时仍能检测到抗体的产生。血清结合抗体的滴度与剂量呈非相关性关系; 但随给药时间的延长抗体滴度呈增大的趋势, 13.2、45.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组给药 30 d 的平均抗体滴度明显高于各自 20 d 的抗体滴度 ($P < 0.05$) (图 1、表 6)。

图1 食蟹猴sc重复给予rhIFN β -1a后产生结合抗体的滴度 ($\text{Log}_{10}, \bar{x} \pm s$)Fig. 1 Titer of cynomolgus monkeys s.c. repeatedly administrated rhIFN β -1a injection produced binding antibody ($\text{Log}_{10}, \bar{x} \pm s$)表6 食蟹猴sc重复给予rhIFN β -1a注射液产生结合抗体的比例Table 6 Ratio of cynomolgus monkeys s.c. repeatedly administrated rhIFN β -1a injection produced binding antibody

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	产生结合抗体动物数/总动物数				
		给药前	给药 10 d	给药 20 d	给药 30 d	恢复 16 d
溶剂对照	—	0/6	0/6	0/6	0/6	0/2
rhIFN β -1a注射液	3.9	0/6	0/6	5/6	6/6	2/2
	13.2	0/6	0/6	5/6	6/6	2/2
	45.0	0/6	0/6	5/6	6/6	2/2

3.10.2 中和抗体 在给药期和恢复期各剂量组的绝大多数产生结合抗体的动物血清可检测到具有中和 rhIFN β -1a 活性的抗体, 中和抗体滴度与剂量呈非依赖性关系; 但具有随给药时间延长抗体强度

而增强的趋势(表 7、8)。

上述试验结果表明, 食蟹猴皮下重复给予 rhIFN β -1a 注射液 30 d 的毒性试验中, 所有给药组动物血清中均能检测到抗 rhIFN β -1a 结合抗体, 且

表7 食蟹猴sc重复给予rhIFN β -1a注射液后产生中和抗体的比例Table 7 Ratio of cynomolgus monkeys sc repeatedly administrated rhIFN β -1a injection produced neutralizing antibody

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	产生中和抗体动物数/总动物数		
		给药 20 d	给药 30 d	恢复 16 d
溶剂对照	0	0	0	0
rhIFN β -1a 注射液	3.9	4/6	5/6	2/2
	13.2	5/6	6/6	2/2
	45.0	4/6	4/6	2/2

表8 食蟹猴sc重复给予rhIFN β -1a注射液后产生中和抗体的滴度($\bar{x}\pm s$)Table 8 The titer of cynomolgus monkeys s.c. repeatedly administrated rhIFN β -1a injection produced neutralizing antibody ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	滴度		
		给药 20 d	给药 30 d	恢复 16 d
溶剂对照	0	—	—	—
rhIFN β -1a 注射液	3.9	0.89 $\pm$ 1.00	1.67 $\pm$ 0.98	1.39 $\pm$ 0.07
	13.2	1.07 $\pm$ 0.86	2.10 $\pm$ 0.75*	2.60 $\pm$ 0.66*
	45.0	0.84 $\pm$ 0.81	1.76 $\pm$ 1.39	1.86 $\pm$ 0.25

与同剂量给药期的d20比较:* $P<0.05$ * $P<0.05$ vs same dose group on 20 days of dosing

各剂量组绝大部分动物(66.7%~100%)血清所产生的结合抗体具有一定的中和rhIFN β -1a的活性,抗体强度与剂量呈非相关性关系。因此,rhIFN β -1a注射液对食蟹猴具有一定的免疫原性。

3.11 免疫学指标检查

食蟹猴连续皮下重复给予rhIFN β -1a注射液30 d,各个剂量组动物CD3、CD4、CD8、CD4/CD8以及IgA、IgE、IgG与溶剂对照组比较均未发现明显异常。

4 讨论

据FDA文献报道^[11],在同类市售药的猴6个月及大鼠3个月的毒理试验中,除一过性发热外尚未发现其它明显毒性反应。本试验中,45.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组动物出现药后体温一过性升高,在24 h内恢复。给药10 d时45.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组动物APTT、TT时间与溶剂对照组比较延长,FIB浓度与溶剂对照组比较降低,给药30 d时恢复正常。APTT主要反映内源性凝血系统状况,TT主要反映纤维蛋白原转为纤维蛋白的时间,FIB主要反映纤维蛋白原的含量。这三者出现异常提示rhIFN β -1a在用药初期可能有潜在的凝血风险,但需进一步研究确定。其余各项检查未见明显药物毒性反应。这些结果与已有文献报道是一致的。

组织病理学检查中发现,各给药组和溶剂对照

组部分脏器有自发性病变,包括少量或部分动物心、肺、肝、肾、胰腺、颌下腺、前列腺、附睾等间质炎细胞浸润;少量动物局部肺组织出血、肝脏微小肉芽肿形成、灶状肝细胞坏死、肾小管轻度扩张、少量肾小管蛋白管型、甲状腺胸腺异位、卵巢卵泡钙化等。上述变化各给药组与同期溶剂对照组比较无明显差异,根据病变性质及发病情况分析上述改变是动物自发性病变或是胚胎发育异常(甲状腺胸腺异位),而非药物的毒性反应。另外,各给药组和溶剂对照组均见部分动物给药部位皮下及肌间少量或较多炎细胞浸润或纤维瘢痕形成,且这种变化各给药组与溶剂对照组间差别不明显,根据病变特点考虑为给药时机械刺激所致。

干扰素产生的抗体有结合抗体和中和抗体两种。结合抗体是反映其免疫原性的重要指标,而中和抗体能中和抗原本身的生物学活性,降低干扰素药物的疗效^[12]。肝炎、MS患者在使用 α 或 β 干扰素后一般会产生特异性的中和抗体,产生的量与干扰素种类、给药途径、用药剂量都有关系,但出现高滴度中和抗体的临床意义尚不清楚。因此,在临床前安全性评价中应检测动物体内针对受试物的这两种抗体,并将抗体的出现与毒性反应结合起来。本试验中,给药30 d发现所有动物都产生了抗重组人干扰素 β -1a的抗体,抗体的滴度与剂量呈非相关性

关系,具有明显中和活性且随给药时间延长抗体强度增强的趋势,提示可能会降低rhIFN β -1a的疗效。其他指标检测未发现与用药有关的毒性反应,说明结合抗体和中和抗体的升高毒理学意义不大。

食蟹猴连续sc重复给予rhIFN β -1a注射液30 d,无可见有害作用水平(NOEL)为13.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,该剂量为人临床拟用剂量0.135 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的97.8倍。rhIFN β -1a注射液对食蟹猴具有一定的免疫原性。

参考文献

- [1] 李家伦,毕贵平. 多发性硬化症药物治疗进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(4): 388-390.
- [2] 陈晔,张久丹,王坚,等. 利拉鲁肽联合胰岛素和二甲双胍治疗1例多发性硬化症的类固醇糖尿病患者[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(3): 245.
- [3] 王斌,谢翀,胡江林. 干扰素- β 的研究进展[J]. 齐鲁药事, 2010, 29(8): 483-486.
- [4] 韩玉杰,王倩,张竞. 干扰素 β 的研究现状[J]. 化学工程与装备, 2016, 8: 255-257.
- [5] 刘喷颀,张星虎,周衡,等. 干扰素- β -1b治疗多发性硬化的疗效及不良反应观察[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2011, 18(1): 37-41.
- [6] Rudicka RA, Goelz SE. Beta-interferon for multiple sclerosis [J]. Exp Cell Res, 2011, 307(9): 1301-1311.
- [7] 李海峰. 干扰素 β 治疗复发-缓解型多发性硬化[J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(4): 250-256.
- [8] 黄志斌,党建章,王妍. 重组人干扰素 β 表达体系及其适应证的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(1): 117-121.
- [9] 祖艳颖,方乐,王田蔚,等. 干扰素 β -1b治疗复发缓解型多发性硬化的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(7): 1625-1627.
- [10] 李磊,杨雨晗,王双,等. 细胞活性检测方法之比较[J]. 生物学杂志, 2011, 28(1): 87-90.
- [11] FDA. PHARMACOLOGY REVIEW(S) of Peginterferon beta-1a)BLA: 125499 [EB/OL]. (2013-05-15) [2019-01-17]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/125499orig1s000pharmr.pdf
- [12] 原野,吴纯启,廖明阳,等. 重组人干扰素- β 1b对恒河猴免疫原性的影响[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(1): 28-30.