

【安全性评价】

扩增活化的淋巴细胞EAL在C57BL/6小鼠中的重复给药毒性研究

黄瑛¹, 高阳¹, 霍艳^{1*}, 张澄¹, 姜华¹, 王超¹, 张永华², 王歆², 王军志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 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 北京永泰生物制品有限公司, 北京 101111

摘要: 目的 对小鼠重复给予扩增活化的淋巴细胞EAL, 考察其毒性反应, 为临床应用提供安全性依据。方法 采用C57BL/6小鼠, 设A、B两大项目组, 每个大项目组均设置阴性对照组、溶媒对照组、低剂量(1.5×10⁶/只)及高剂量(1×10⁷/只)组。A项每组36只, 进行常规毒性检测、血清生化测定、血液学测定、外周血T淋巴细胞亚群分布测定、大体病理学及组织病理学检查; B项每组24只, 进行免疫学测定, 包括γ-干扰素(IFN-γ)水平和外周血T淋巴细胞亚群分布测定。所有组别均雌雄各半, 静脉注射给药, 每周1次, 共17次, 恢复期为28 d。结果 重复给予EAL可能会使C57BL/6小鼠体质量和摄食量增加(P<0.05)。IFN-γ检测结果显示给药组动物个别时间点IFN-γ水平升高。组织病理学检查结果显示给予供试品会加重低剂量组、高剂量组动物脾脏生发中心明显及易染体巨噬细胞增多的病变程度和/或病变频度。供试品未对其他评价指标产生明显影响。结论 C57BL/6小鼠重复给予EAL, 可能会引起动物体质量、摄食量的增加以及脾脏生发中心明显和易染体巨噬细胞增多, 未见其他相关的毒理学反应。该结果为EAL进入临床试验奠定了基础。

关键词: 细胞治疗; EAL; C57BL/6小鼠; 安全性

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)10-1968-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.009

Toxicity investigation of Expanded Activated Lymphocytes in C57BL/6 mice

HUANG Ying¹, GAO Yang¹, HUO Yan¹, ZHANG Cheng¹, JIANG Hua¹, WANG Chao¹, ZHANG Yonghua², WANG Yu², WANG Junzhi¹

1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, The Beijing Key Lab for Pre-clinical Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China

2. Immunotech Applied Science Limited, Beijing 101111, China

Abstract: **Objective** EAL was repeatedly administered to mice to investigate its toxicity and provide a safety basis for clinical application. **Methods** C57BL/6 mice are randomized into two parts, A and B. Each part including negative control group, the vehicle control group, low dose group (1.5×10⁶ cells per mouse) and high dose group (1×10⁷ cells per mouse). 36 mice in each group of part A and 24 mice in each group of part B. All animals were administered by intravenous injection of EAL for seventeen times with 28-day recovery. For A groups, mortality, clinical signs, body weights, food consumption were measured, and hematology, clinical chemistry analysis, T lymphocyte subset assay in peripheral blood and grossly pathological and histopathological examination were conducted at terminal and recovery necropsy respectively. IFN-γ level and T lymphocyte phenotypes in peripheral blood were measured for satellite animals in B groups. **Results** Following repeated administration of different doses of EAL, it was found that body weight and food consumption were markedly elevated in C57BL/6 mice (P < 0.05). Histopathological examination showed that the extent and/or frequency of the lesions in the low-dose group and the high-dose group were aggravated by the administration of the test product. The test products had no significant impact on other evaluation indicators. **Conclusion** Repeated EAL administration in C57BL/6 mice may increase animal body weight, food intake, spleen germinal center and dyeable

收稿日期: 2019-03-25

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”(2015ZX09501007-004); 细胞治疗产品临床前安全性评价关键技术的建立(2015X1)

第一作者: 黄瑛(1983—), 女, 副研究员, 博士, 主要从事药物临床前安全性评价。Tel: (010)67876252 E-mail: huangying1002@nifdc.org.cn

*通信作者: 霍艳, 女, 研究员, 主要从事药物临床前安全性评价。Tel: (010)67872233-8001 E-mail: yanhuo@nifdc.org.cn

macrophages. No other related toxicological reactions were observed. The results laid a foundation for EAL to enter clinical trials.

Key words: immunocyte therapy; EAL; C57BL/6 mice; safety

细胞治疗是指利用某些具有特定功能的细胞的特性,体外获取后通过扩增培养等操作处理,使该细胞具有增强免疫、杀死肿瘤细胞、促进组织器官再生和机体康复等治疗功效,移植或回输患者体内从而达到治疗疾病的目的。细胞治疗产品作为一种很有价值的资源,在多项临床试验尤其是肿瘤免疫治疗中取得良好的疗效,但相比传统的化学药物,细胞具有独特且复杂的生物学特性,细胞治疗作用机制在很多方面尚不十分明确,且非临床试验资料缺乏,难以预见早期临床试验中可能遇到风险,故其安全性成为多方关注和争论的焦点^[1-3]。

扩增活化的淋巴细胞(Expanded Activated Lymphocytes, EAL),是细胞免疫治疗的一种,可有效辅助恶性肿瘤和慢性传染性病毒感染的治疗,其适应症包括众多恶性实体/非实体瘤以及慢性炎症^[4-8]。为了充分考察该产品的临床前安全性,本研究对由北京永泰免疫应用科技有限公司自主研发的EAL进行小鼠重复给药毒性研究,观察其产生的毒性反应及严重程度、主要毒性靶器官及损害的可逆程度,从而为进一步临床研究提供数据支持。

1 材料

1.1 供试品和对照品

鼠源 EAL 细胞,浓度 7.5×10^6 cells/mL、 5×10^7 cells/mL,乳白色液体,4~25 °C 保存,给药当天制备,由北京永泰免疫应用科技有限公司提供。

EAL 溶媒,含 1% 小鼠血清的生理盐水(1% 鼠血清 NS),为无色透明液体,4~25 °C 保存,给药当天制备,由北京永泰免疫应用科技有限公司提供。

生理盐水(NS),无色透明液体,4~25 °C 保存,国药集团容生制药有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂 PE Hamster Anti-Mouse CD3e,批号 52089,美国 BD Pharmingen 公司; PerCP Rat Anti-Mouse CD4,批号 301171,美国 BD Pharmingen 公司; FITC Rat Anti-Mouse CD8a,批号 38609,美国 BD Pharmingen 公司; 小鼠 γ -干扰素(IFN- γ)ELISA 试剂盒,批号 M150306-101a, NeoBioscience。

1.2.2 仪器 流式细胞仪, FACSCalibur, BD 公司; 血液分析仪, XFA-6100 型, 南京普朗医用设备有限公司; 血液检查仪, ADVIA120, 德国西门子; 脱水机, LEICA ASP300, 日本樱花; 切片机,

SAKURAIVS-410, 日本樱花; 全自动染色机, SAKURA Tissue-TekDRS-2000, 日本樱花; 包埋机, SAKURATecc4714 型, 日本樱花; 封片机, SAKURATissue-TekGLAS C410, 日本樱花; 生物显微镜, OLYMPUS BX51, 日本奥林巴斯。

1.3 实验动物的饲养和管理

C57BL/6 小鼠 240 只, SPF 级, 雌雄各半, 6~7 周龄, 体质量 15~20 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001。检疫驯化 5~6 d, 每笼 5 只, 自由摄食、饮水。动物饲养于 SPF 屏障系统, 每天上、下午各 1 次对检疫动物进行观察, 饲养室 12 h 照明, 温度 20~25 °C, 日温差 ≤ 3 °C, 湿度 40%~70%, 换气次数 10~20 次/h。笼具采用 PC 聚碳酸酯鼠盒 CP-5 型(294 mm×190 mm×125 mm), 底铺高压蒸汽灭菌的玉米芯垫料, 每周 1 次更换、清洗及消毒笼具。

2 方法

2.1 动物分组给药以及毒理学指标观测

整个实验共使用 240 只小鼠, 根据不同测定项目分别分为 A、B 两大项目组, 每个大项目组设置 4 个剂量组: 阴性对照组(0.9% NS)、溶媒对照组(1% 鼠血清 NS)、低剂量(1.5×10^6 /只)组及高剂量(1×10^7 /只)组(表 1)。A 组进行常规毒性检测、血清生化测定、血液学测定、外周血 T 淋巴细胞亚群分布测定、大体病理学及组织病理学检查; B 组进行免疫学测定, 包括 IFN- γ 水平和外周血 T 淋巴细胞亚群分布测定。各组动物静脉注射给药, 每周给药 1 次, 共给药 17 次, 给药体积为 0.2 mL/只, 恢复期为 28 d。

2.2 小鼠血清 IFN- γ 水平测定

分别于给药第 35、70、105 天以及恢复期第 28 天对 B 组动物采血, 应用 NeoBioscience 小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒进行小鼠血清 IFN- γ 水平测定。按照试剂盒说明书推荐操作步骤进行, 在预包装酶标板中分别加入标准品、小鼠血清、样本稀释液, 36 °C 孵育 1.5 h 后, 加入生物素化抗体工作液, 36 °C 孵育 1 h, 再加入酶结合物工作液避光孵育 30 min, 最后加入底物显色液及终止液。用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(A)值, 每个标准品和样品的 A 值减去空白孔的 A 值, 以标准品作横坐标, A 值作纵坐标, 用软件绘制标准曲线, 通过

表1 实验设计概况
Table 1 Overview of experimental design

项目组别(检测项目)	剂量组别	对照品/供试品	给药剂量(cells/只)	检测时间和动物数(雌性/雄性)			
				末次给药后第1天		恢复期结束	
A组(常规毒性、血清生化、血液学和病理学检查等)	阴性对照	0.9% NS	0	12/12		6/6	
	溶媒对照	1% 鼠血清 NS	0	12/12		6/6	
	低剂量	EAL	1.5×10 ⁶	12/12		6/6	
	高剂量	EAL	1×10 ⁷	12/12		6/6	
项目组别(检测项目)	剂量组别	对照品/供试品	给药剂量(cells/只)	检测时间和动物数(雌性/雄性)			
				第6次给药后	第11次给药后	第16次给药后	恢复期结束
B组(免疫学测定)	阴性对照	0.9% NS	0	3/3	3/3	3/3	3/3
	溶媒对照	1% 鼠血清 NS	0	3/3	3/3	3/3	3/3
	低剂量	EAL	1.5×10 ⁶	3/3	3/3	3/3	3/3
	高剂量	EAL	1×10 ⁷	3/3	3/3	3/3	3/3

样品的A值在标准曲线上查出其浓度。

2.3 数据的统计与处理

对动物体质量、摄食量、血液学、血清生化、外周血T淋巴细胞亚群分布测定等结果进行统计分析,统计方法如下:(1)首先用Bartlett检验方法进行数据均一性检验,如果数据均一(检验 $P \geq 0.05$),则进行方差分析检验(F检验);如果Bartlett检验的结果显著($P < 0.05$),则进行Kruskal-wallis检验。(2)如果方差分析检验结果显著($P \leq 0.05$),则进一步用Dunnett参数检验法进行多重比较检验;如果方差分析结果不显著,则统计结束。(3)如果Kruskal-wallis检验结果显著($P \leq 0.05$),则进一步用Dunnett非参数检验法进行多重比较检验;如果Kruskal-wallis检验结果不显著,则统计结束。

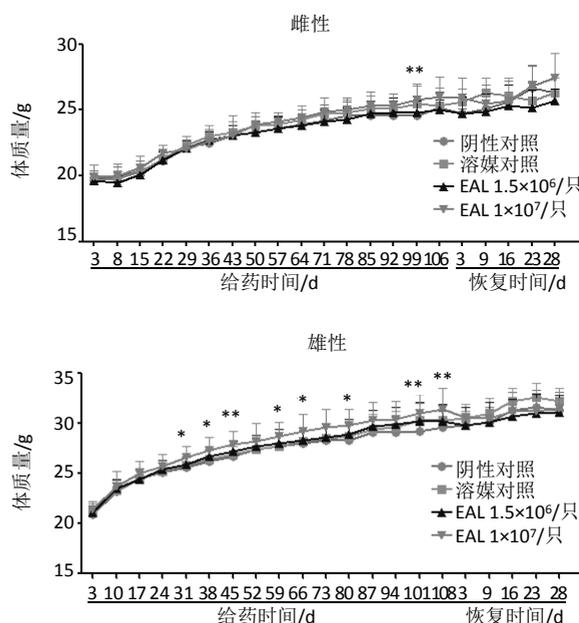
3 结果

3.1 临床症状观察与注射部位刺激性观察结果

给药期间动物临床症状均未见明显异常变化。而各剂量组动物给药后注射部位均未见出血、发红、肿胀、硬结、化脓、坏死等异常。认为EAL给药后未引起供试品相关的异常临床症状。

3.2 体质量测定结果

给药期间和恢复期期间,各剂量组体质量均保持增长趋势(图1)。高剂量组雌性动物给药第99天与对应的阴性对照组比较体质量显著升高($P < 0.01$);高剂量组雄性动物,给药第31~45天、给药第59、66、80、101、108天与对应的阴性对照组比较体质量显著增加($P < 0.05, 0.01$)。高剂量组雄性动物,给药第38天和给药第45天,与对应的溶媒对照组比较体质量增加($P < 0.05$)。高剂量组动物在多个时间点相比对应的阴性和溶媒对照组体质量均



阴性对照与组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs negative control group

图1 EAL重复给药后动物体质量变化

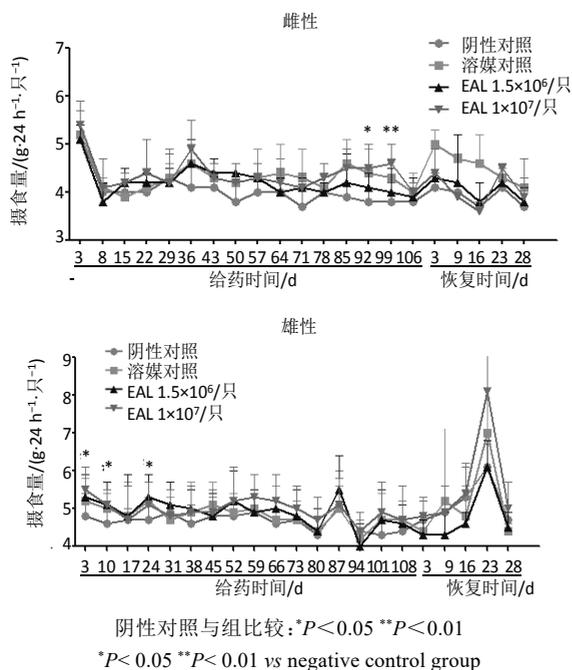
Fig. 1 Changes in body weight after EAL repeated administration

显著增加,表明高剂量EAL长期给药可能会使动物体质量增加。

3.3 摄食量测定结果

与阴性对照组比较,溶媒对照组雌性动物在给药第92天、高剂量组雌性动物在给药第92天和第99天摄食量均值增加,具有统计学意义($P < 0.05, 0.01$);给药第3天、第10天,低、高剂量组雄性动物与对应的阴性对照组比较摄食量增加($P < 0.05, 0.01$);给药第24天,溶媒对照组、低剂量组雄性动物与对应的阴性对照组比较摄食量增加($P < 0.01$);

其余检测时间,给药组雌雄动物摄食量与对照组比较未出现有统计学意义的差异,但也稍有增加的趋势(图2)。综合之前动物体质量的变化,认为EAL给药可能会引起动物摄食量增加。



阴性对照与组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs negative control group

图2 EAL重复给药后动物摄食量变化

Fig. 2 Changes of intake after EAL repeated administration

3.4 血清生化与血液学检测结果

血液学检测:与相应的阴性对照组相比,雌性溶媒对照组血小板压积(PCT)显著减少($P < 0.05$),雌性溶媒对照组和高剂量组的血小板平均体积(MPV)显著减少($P < 0.01$);与相应的溶媒对照组比较,低剂量雌性动物血小板(PLT)、PCT和MPV显著升高($P < 0.01$),而高剂量组未见明显变化。上述变化无明显剂量相关性,且PCT和MPV的统计

学意义的升高可能与溶媒对照组的降低有关。综合动物临床症状和组织病理学检测结果,认为与供试品作用不相关。

血清生化检测:雌性高剂量组动物总蛋白(TP)与相应的阴性对照组或溶媒对照组相比均表现出显著升高($P < 0.05$),白蛋白(ALB)与相应的溶媒对照组相比显著升高($P < 0.05$),白蛋白/球蛋白比值(A/G)与相应的阴性对照组比较显著升高($P < 0.05$)。恢复期结束时,雌性高剂量组TP与相应的阴性对照组相比显著升高($P < 0.01$)。上述雌性动物TP、ALB和A/G仅在个别剂量的变化具有统计学意义,且变化幅度小,因此认为不具有毒性意义,可能与供试品药效学作用即相关的免疫反应有关。

3.5 外周血T淋巴细胞亚群分布结果

外周血T淋巴细胞亚群分布检测结果如图3所示,与溶媒对照组相比,给药第35天,雌性低剂量和高剂量组CD4⁺T淋巴细胞占淋巴细胞的比例偏高,CD8⁺T细胞占淋巴细胞的比例偏低,CD4⁺/CD8⁺比值偏高。对比该组动物在其余时间点的检测结果,变化并不明显,因此认为该变化不具有毒理学意义。恢复期第28天,低剂量组外周血CD4⁺T细胞占淋巴细胞的比例比同期阴性对照组升高了17.64%($P < 0.05$),该差别是由动物个体差异所致,不具有生物学改变的意义。因此认为给予供试品对外周血T淋巴细胞亚群分布无影响。

3.6 IFN- γ 检测结果

IFN- γ 检测结果如图4所示,与同期阴性对照组相比,给药第35天高剂量组雌性动物IFN- γ 水平升高(60.290 \pm 9.695 vs 156.427 \pm 167.435),给药第37天高剂量组雄性动物IFN- γ 水平也有升高(80.903 \pm 81.892 vs 572.326 \pm 655.758);给药第70天低、高剂量组雌性动物IFN- γ 水平升高,但低剂量组升高幅度

表2 血液学检查结果(Mean \pm SD)

Table 2 Hematology detection results

检测时期	组别	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	GR/%	LY/%	MO/%	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	PCT/L	MPV/fl			
给药结束	阴性对照	2.66 \pm 1.03	16.0 \pm 4.5	0.42 \pm 0.18	77.6 \pm 4.7	2.08 \pm 0.89	6.4 \pm 2.0	0.16 \pm 0.06	540 \pm 191	0.59 \pm 0.28	10.4 \pm 2.1
	溶媒对照	2.46 \pm 0.64	15.3 \pm 3.2	0.37 \pm 0.11	79.8 \pm 4.8	1.97 \pm 0.57	4.9 \pm 2.2	0.11 \pm 0.04	356 \pm 183	0.31 \pm 0.25*	8.0 \pm 1.4*
	低剂量	1.92 \pm 0.81	14.8 \pm 5.4	0.30 \pm 0.18	78.8 \pm 7.6	1.49 \pm 0.60	6.4 \pm 3.2	0.13 \pm 0.09	596 \pm 140 [#]	0.64 \pm 0.24 [#]	10.4 \pm 2.0 [#]
	高剂量	2.08 \pm 0.71	14.3 \pm 3.6	0.31 \pm 0.16	80.4 \pm 4.6	1.66 \pm 0.53	5.3 \pm 1.5	0.11 \pm 0.06	414 \pm 178	0.38 \pm 0.25	8.4 \pm 1.8*
恢复期	阴性对照	3.85 \pm 1.17	12.2 \pm 1.4	0.48 \pm 0.18	82.1 \pm 2.2	3.17 \pm 0.98	5.7 \pm 2.0	0.21 \pm 0.06	447 \pm 218	0.43 \pm 0.31	8.8 \pm 2.2
	溶媒对照	4.68 \pm 2.01	16.0 \pm 3.4	0.73 \pm 0.25	79.5 \pm 5.2	3.77 \pm 1.82	4.5 \pm 2.5	0.18 \pm 0.08	604 \pm 168	0.68 \pm 0.25	11.0 \pm 1.8
	低剂量	2.93 \pm 1.75	14.6 \pm 2.6	0.43 \pm 0.26	81.3 \pm 3.9	2.38 \pm 1.43	4.1 \pm 1.8	0.12 \pm 0.08	553 \pm 210	0.57 \pm 0.33	9.6 \pm 2.3
	高剂量	3.27 \pm 1.30	14.1 \pm 3.9	0.48 \pm 0.29	82.6 \pm 4.8	2.69 \pm 1.00	3.2 \pm 1.2	0.11 \pm 0.07	464 \pm 106	0.39 \pm 0.16	8.2 \pm 1.6

表3 血清生化检查结果(Mean±SD)
Table 3 Clinical chemistry analysis of C57BL/6 mice

检测时期	组别	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	GLU/(mmol·L ⁻¹)
给药结束	阴性对照	50±18	123±40	73±14	6.24±1.29
	溶媒对照	39±25	98±63	71±13	7.41±1.20
	低剂量	45±32	152±101	83±12	6.30±1.47
	高剂量	40±15	109±42	74±12	5.93±1.49
恢复期	阴性对照	28±4	92±24	59±11	6.00±0.51
	溶媒对照	32±9	90±15	60±12	5.61±0.27
	低剂量	34±9	95±22	64±19	6.21±0.84
	高剂量	26±4	76±9	59±11	6.30±0.69
检测时期	组别	CHO/(mmol·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	A/G
给药结束	阴性对照	1.79±0.14	55.8±1.9	24.7±0.7	0.80±0.02
	溶媒对照	1.76±0.20	55.4±2.6	24.3±1.0	0.78±0.03
	低剂量	1.80±0.16	57.3±2.2	24.9±0.9	0.77±0.02
	高剂量	1.92±0.10	58.2±1.8* [#]	25.3±0.8 [#]	0.77±0.03*
恢复期	阴性对照	1.74±0.34	50.0±1.3	23.8±0.6	0.91±0.05
	溶媒对照	1.73±0.25	51.6±0.9	24.3±0.7	0.89±0.05
	低剂量	1.66±0.08	51.3±1.9	24.5±0.6	0.92±0.05
	高剂量	1.82±0.23	54.1±4.2**	25.0±1.2	0.86±0.05

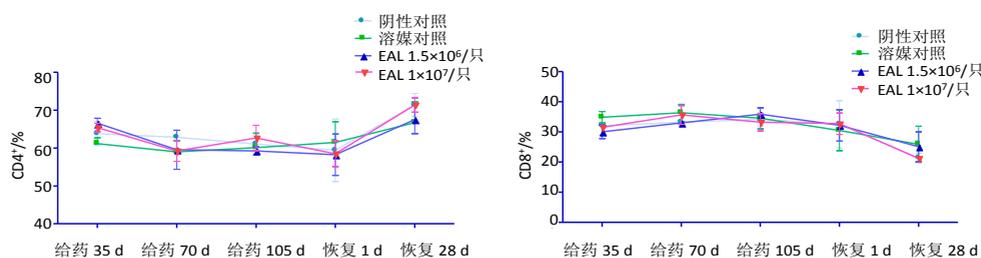


图3 血液中T淋巴细胞亚群检测结果

Fig. 3 Changes of T lymphocyte subsets in blood

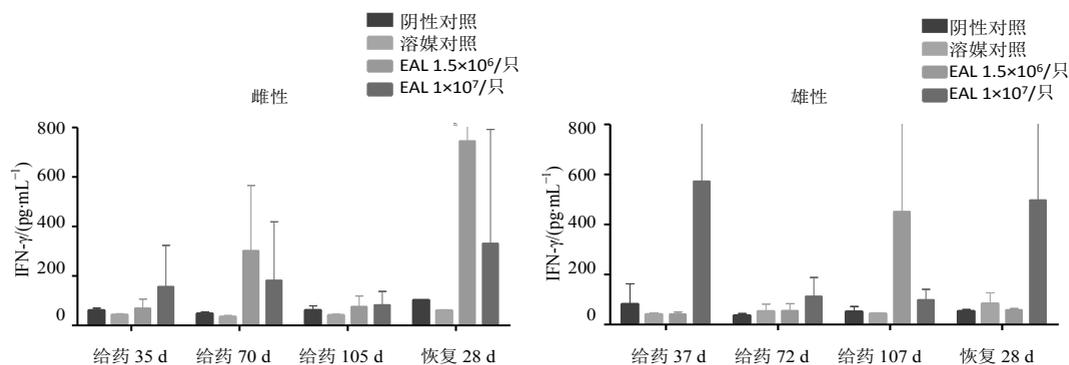


图4 血清中IFN-γ水平检测结果

Fig. 4 Changes of IFN-γ levels in serum

更明显(低剂量组 301.654 ± 264.165 vs 46.711 ± 8.323 ;高剂量组 181.861 ± 237.156 vs 46.711 ± 8.323);给药第72天高剂量组雄性动物 IFN- γ 水平也有升

高(112.450 ± 75.922 vs 35.785 ± 8.311);给药第107天低剂量组雄性动物 IFN- γ 水平升高(450.998 ± 625.473 vs 51.263 ± 21.295);恢复期第28天低、高剂

量组雌性动物 IFN- γ 水平升高(低剂量组 745.068±656.079 vs 101.452±1.614; 高剂量组 330.940±461.475 vs 101.452±1.614), 高剂量组雄性动物 IFN- γ 水平升高(497.021±713.720 vs 53.200±6.834)。结果表明, EAL 可能会使动物血清中 IFN- γ 水平升高, EAL 属于 T 淋巴细胞, 分析原因可能是与其药效学作用相关。

3.7 脏器质量和病理学检查结果

EAL 未引起 C57BL/6 小鼠主要脏器质量的显

著变化。组织病理学检查发现, C57BL/6 小鼠在给予阴性对照品、溶媒及供试品后, 在给药结束和恢复期结束, 各组均有动物注射部位产生不同频度的极轻度至轻度病理改变。另外, 在给予阴性对照品、溶媒及供试品后, 在给药结束和恢复期结束, 各组均有动物脾脏出现生发中心明显及易染体巨噬细胞增多的病理改变, 但阴性对照组和溶媒对照组相比低、高剂量组症状较轻(表 2)。

表 2 注射部位病理改变及病变发生频度

Table 2 The incidence of pathological changes in injection site

检测时期	组别	雌性		雄性	
		生发中心明显	易染体巨噬细胞增多	生发中心明显	易染体巨噬细胞增多
给药结束	阴性对照	7/11	7/11	1/12	1/12
	溶媒对照	9/11	10/11	2/12	2/11
	低剂量	11/12	11/12	10/12	10/12
	高剂量	9/12	9/12	9/12	9/12
恢复期结束	阴性对照	5/6	5/6	5/6	5/6
	溶媒对照	4/6	4/6	6/6	6/6
	低剂量	4/6	4/6	6/6	6/6
	高剂量	6/6	6/6	5/5	5/5

4 讨论

重复给药毒性研究是药物临床前安全性研究的有机组成部分, 是药物非临床毒理学研究中综合性最强、获得信息最多和对临床指导意义最大的一项毒理学研究^[9]。EAL 是自体回输免疫细胞治疗产品, 为避免可能会导致的免疫排斥反应, 本研究采用鼠源 EAL 替代人源产品进行重复给药毒性研究。EAL 临床用药方案为至少间隔 1 周进行静脉注射, 最多给药次数为 16 次, 本研究中采用临床拟用的给药途径和给药间隔, 通过静脉注射方式每周 1 次给药, 共 17 次给药。检测指标包括临床症状观察、体质量、摄食量、血清生化、血液学、外周血 T 淋巴细胞亚群分布和病理学检查等。

在剂量选择方面, 主要依据人用回输外周血单个核细胞(PBMC)量占人血 PBMC 数的比例推算动物细胞回输量。EAL 临床上为自体回输细胞治疗产品, 每人回输细胞数约是人 PBMC 数的 1 倍, 小鼠每只 PBMC 数大约是 10⁶/只, 则每只小鼠相当于人临床回输的等效剂量为约 10⁶/只^[10, 11]。本研究分别采用临床剂量的 1.5 倍和 10 倍作为给药的低剂量和高剂量。研究结果表明, 上述两个剂量均被很好耐受。

在给药次数与实验周期设计方面, 考虑到 EAL 临床用药方案为至少间隔 1 周进行静脉注射, 根据病情最多给药次数为 16 次, 本研究采用比临床给药次数多 1 次的方案, 设定给药期限为 17 周。为了解毒性反应的可逆程度和可能出现的延迟性毒性反应, 在给药结束后对部分动物进行 28 d 恢复期观察。

因不同的给药途径对供试品的功效和免疫作用有很大影响, 本研究为保证动物研究结果能够成功的外推至临床研究, 给药途径选择与临床拟用途径一致的静脉注射。C57BL/6 小鼠肿瘤发病率较低, 补体活性高, 干扰素产量较高, 本研究中 EAL 为免疫细胞治疗产品, 相较传统药物具有一定的致瘤性风险, 同时 C57BL/6 小鼠也是肿瘤学、免疫学等研究中常用的品系, 因此本研究选择 C57BL/6 小鼠为动物模型。

给予 EAL 后, 检测到高剂量组动物体质量和摄食量在多个时间点相比对应的阴性或溶媒对照组显著增加, 具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明 EAL 高剂量重复给药可能会引起动物体质量和摄食量增加。检测到少数血清生化、血液学和外周血 T 淋巴细胞亚群分布变化虽具有统计学意义,

但无明显的剂量相关性且变化幅度小,认为不具有毒性意义。IFN- γ 检测结果表明,EAL可能会使动物血清中IFN- γ 水平升高,EAL属于T淋巴细胞,分析原因可能是与其药效学作用相关。

本研究中,病理学检查发现,在给药结束和恢复期结束,各组均有动物注射部位产生不同频度的极轻度至轻度病理改变。分析认为因给药方式为尾静脉注射,共计17次,这对注射部位的血管产生机械刺激,血管壁受损,直接导致出血,甚至发生炎症反应;同时由于血管内皮细胞受损、血流速度改变等因素使得血小板聚集并黏附于受损血管内皮下的胶原纤维,激活内源性凝血系统,从而导致血管内血栓形成。因此,该病理改变与静脉注射给药时的机械刺激有关,与给予供试品不相关。

此外,在给药结束和恢复期结束病理学检查可见,各组均有动物脾脏生发中心明显及易染体巨噬细胞增多,但阴性和溶媒对照组症状较轻。分析认为EAL本身为扩增活化的淋巴细胞,研究中的供试品来自同一小鼠品系,属于同种异体细胞,并非动物个体自体细胞的对应回输,不同动物间存在的个体差异可能会导致动物的自身免疫反应,导致上述脾脏病变的产生,因此给予供试品可能会加重低剂量组、高剂量组动物脾脏生发中心明显及易染体巨噬细胞增多的病变频度和病变程度。

综上所述,在本研究的剂量范围和研究条件下,EAL可能会造成小鼠体质量和摄食量的增加,以及脾脏生发中心明显和易染体巨噬细胞增多,未见其他相关的毒理学反应。该研究结果为EAL进入人体期临床试验提供了数据支持,目前该产品已经进入临床研究阶段。

参考文献

- [1] Jäkel C E, Vogt A, Gonzalez-Carmona M A, et al. Clinical studies applying cytokine-induced killer cells for the treatment of gastrointestinal tumors [J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 1-12.
- [2] Jäkel C E, Hauser S, Rogenhofer S, et al. Clinical studies applying cytokine-induced killer cells for the treatment of renal cell carcinoma [J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 1-7.
- [3] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368.
- [4] Yu R L, Yang B, Chi X H, et al. Efficacy of cytokine-induced killer cell infusion as an adjuvant immunotherapy for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11: 851-864.
- [5] Jiang J T, Wu C P, Lu B F. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity [J]. J Transl Med, 2013, 11: 83.
- [6] Introna M, Golay J, Rambaldi A. Cytokine Induced Killer (CIK) cells for the treatment of haematological neoplasms [J]. Immunol Lett, 2013, 155(1/2): 27-30.
- [7] 刘金荣, 韩宗政, 熊勤, 等. 自体CIK细胞联合化疗治疗老年急性髓细胞白血病的临床研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(21): 2334-2336.
- [8] 黄浩, 张正涵, Allen Edward Goldenthal, 等. 过继性免疫细胞治疗临床应用中的几个问题 [J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(9): 1306-1310.
- [9] CFDA. 药物重复给药毒性研究技术指导原则 [EB/OL]. (2018-10-8) [2019-03-23]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=192>.
- [10] 赵树铭. 细胞治疗的研究进展 [J]. 中国输血杂志, 2010, 23(2): 79-85.
- [11] Parretta E, Cassese G, Santoni A, et al. Kinetics of in vivo proliferation and death of memory and naive CD8 t cells: parameter estimation based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation in spleen, lymph nodes, and bone marrow [J]. J Immunol, 2008, 180(11): 7230-7239.