

【审评规范】

FDA《狂犬病:为暴露后预防的被动免疫成分研制单克隆抗体鸡尾酒供企业用指导原则》介绍

萧惠来

国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100022

摘要: 狂犬病是由狂犬病毒引起的急性传染病, 及时给予暴露后预防 (PEP) 可阻止临床症状出现。PEP 由清洗伤口、给予狂犬病疫苗和在伤口内和周围给予抗狂犬病病毒免疫球蛋白 (RIG) 3 部分构成。由于多种原因限制了 RIG 的使用, 其全球使用率不到狂犬病病毒暴露的 2%。因此, 抗狂犬病病毒单克隆抗体鸡尾酒正被开发为 PEP 被动免疫成分 RIG 的替代品。美国食品药品监督管理局 (FDA) 于 2021 年 7 月发布了《狂犬病: 为暴露后预防的被动免疫成分研制单克隆抗体鸡尾酒供企业用指导原则》, 旨在促进抗狂犬病病毒单克隆抗体鸡尾酒的开发, 并对抗狂犬病病毒单克隆抗体鸡尾酒的研究提出了详细而具体的建议, 其中包括临床和非临床研究的要点以及临床 III 期疗效试验设计。详细介绍该指导原则主要内容, 期望对中国在此方面的研究和监管提供帮助, 对《抗狂犬病病毒单克隆抗体新药临床试验技术指导原则 (征求意见稿)》的修订有所启示。

关键词: 美国食品药品监督管理局; 狂犬病; 病毒; 暴露后预防; 被动免疫; 单克隆抗体; 指导原则

中图分类号: R951 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2021) 10-2134-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.014

Introduction to FDA's Rabies: Developing Monoclonal Antibody Cocktails for the Passive Immunization Component of Post-Exposure Prophylaxis Guidance for Industry

XIAO Huilai

Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China

Abstract: Rabies is an acute infectious disease caused by rabies virus, timely administration of rabies post-exposure prophylaxis (PEP) is effective in preventing clinical rabies. PEP consists of washing the wound, administering rabies vaccine and administering anti rabies virus immunoglobulin (RIG) in and around the wound. Due to various reasons, the use of RIG is limited, and its global use rate is less than 2% of rabies virus exposure. Therefore, anti-rabies virus monoclonal antibody cocktails are being developed as an alternative to RIG as the passive immunization component of PEP. FDA issued *Rabies: Developing Monoclonal Antibody Cocktails for the Passive Immunization Component of Post-Exposure Prophylaxis Guidance for Industry* in July 2021, which aims to promote the development of monoclonal antibody cocktails against rabies virus. The guidelines put forward many detailed and specific suggestions for the study of monoclonal antibody cocktail against rabies virus, including the key points of clinical and non clinical research and the design of clinical phase III efficacy trial. This article details the guidelines, expected to be helpful to China's research and supervision in this regard. It also has enlightenment for the revision of *Technical Guidance for Clinical Trials of New Anti-Rabies Virus Monoclonal Antibodies (Draft)* in China.

Key words: FDA; rabies; virus; post-exposure prophylaxis; passive immunization; monoclonal antibody; guidance

狂犬病是由狂犬病毒引起的急性传染病, 出现临床症状后死亡率几乎 100%。狂犬病及时给予暴露后预防 (post-exposure prophylaxis, PEP) 几乎可 100% 阻止临床症状出现。PEP 由彻底清洗伤口、迅

收稿日期: 2021-08-01

第一作者: 萧惠来, 男, 教授, 主要从事药品审评工作。E-mail: penglai8051@aliyun.com

速给予狂犬病疫苗和立即在伤口内和周围给予抗狂犬病病毒免疫球蛋白(rabies virus immunoglobulin, RIG)3部分构成。其中被动免疫成分RIG包括人狂犬病免疫球蛋白(HRIG)和马抗狂犬病免疫球蛋白(ERIG)。由于RIG供应量有限,价格较高而且有血源性病原体传播的潜在风险等因素,全球RIG使用率不到狂犬病病毒暴露的2%。因此,抗狂犬病病毒单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)鸡尾酒(cocktails)正被开发为PEP被动免疫成分RIG的替代品。世界卫生组织(WHO)建议单克隆抗体鸡尾酒至少含有2种针对狂犬病病毒包膜糖蛋白G上不同的非重叠抗原位点的单克隆抗体。

美国食品药品监督管理局(FDA)于2021年7月发布了《狂犬病:为暴露后预防的被动免疫成分研制单克隆抗体鸡尾酒供企业用指导原则》^[1],旨在帮助药品注册申请人开发抗狂犬病病毒单克隆抗体鸡尾酒。该指导原则对抗狂犬病病毒单克隆抗体鸡尾酒的临床和非临床研究提出了详细而具体的建议。中国是狂犬病流行国家,本文详细介绍该指导原则,期望对中国2021年8月发布的《抗狂犬病病毒单克隆抗体新药临床试验技术指导原则(征求意见稿)》^[2]的修订及其研究和监管有所帮助。

1 该指导原则的前言

该指导原则的目的是帮助申请人开发抗狂犬病病毒单克隆抗体鸡尾酒,作为PEP的被动免疫成分-抗狂犬病病毒免疫球蛋白的替代品,用于接触狂犬病或可能接触狂犬病动物后,立即给予,以预防狂犬病。该指导原则草案旨在作为抗病毒药物部门、申请人、学术界和公众继续讨论的焦点。该指导原则不涉及狂犬病疫苗、治疗狂犬病的药品或其他适应症的单克隆抗体的开发。该指导原则中的建议与根据《公共卫生服务法》(Public Health Service Act)第351节[美国法典第42卷第262节(42 U.S.C. §262)]和联邦法规第21章601部(21 CFR part 601)实施规定,提交的支持生物制品许可证申请(biologics license application, BLA)的研究有关。

该指导原则不涉及统计分析或临床试验设计的一般问题。这些论题分别在国际人用药品注册技术协调会(ICH)供企业用指导原则E9临床试验统计原则^[3]、E9(R1)临床试验统计原则、附录、临床试验中的估计目标和敏感性分析^[4]和E10临床试验中对照组的选择和相关问题^[5]中阐述。

2 该指导原则出台的背景

出现临床症状后,狂犬病死亡率几乎100%,而且没有经证实的有效治疗方法。然而,及时给予狂犬病PEP,对预防临床狂犬病几乎100%有效^[6]。在全球范围内,每年约有2 000万人在可能暴露狂犬病病毒后,接受PEP^[7],其中包括美国约55 000人^[8]。尽管有可用的预防措施,但全世界每年约有59 000人死于狂犬病^[6,9],通常是因为未给予PEP或未正确给予PEP^[6]。

PEP适用于事先未接种狂犬病疫苗的患者,由下列3部分构成:(1)彻底清洗伤口;(2)迅速启动狂犬病疫苗系列;(3)立即在伤口内和周围给予RIG。

在美国,建议在认为PEP任何合适的情况下使用RIG(在之前未接种狂犬病疫苗的患者中)。在美国境外,RIG仅适用于世界卫生组织(WHO)III级暴露,包括任何咬伤或抓伤经皮暴露、经动物舔舐唾液的黏膜或破损皮肤污染的暴露或直接接触蝙蝠的暴露。

对于事先未接种过疫苗的个体,RIG应与第1剂疫苗同时给予。在事先接种过疫苗的个体,PEP由伤口清洗和简化疫苗系列构成,而没有RIG。

尽管彻底清洗伤口并立即完成最新狂犬病疫苗接种系列,已被估计可在约99%的狂犬病病毒暴露人群中预防狂犬病^[6],但在较严重的暴露后,RIG对狂犬病预防至关重要^[10]。在头部和颈部被咬伤后,RIG尤其重要,因为狂犬病病毒从伤口转移到脑可能需时较短。接种狂犬病疫苗系列的人,在7~14 d内产生大于0.5 IU/mL的狂犬病病毒中和抗体(rabies virus neutralizing antibodies, RVNAs),WHO将此水平用作充分疫苗反应的指标^[6]。RIG的主要作用是在疫苗诱导的RVNAs出现之前提供中和活性。

RIG产自狂犬病病毒高免疫个体的混合血清,目前来源于人(HRIG)或马(ERIG)。HRIG和ERIG被认为具有同等效力,但2种产品的安全性可能不同。只有HRIG在美国上市。在全球范围内,在狂犬病流行的发展中国家,ERIG更常用。

在全球范围,由于数个因素,包括RIG对冷链的依赖以及供应有限等管理问题,使RIG使用率不到狂犬病病毒暴露的2%。在美国,RIG普遍可以获得,在RIG短缺情况可使用RIG替代品,并消除了血源性病原体传播的理论风险。由于这些原因,单克隆鸡尾酒正被开发为PEP被动免疫成分RIG的替代品。WHO建议单克隆抗体鸡尾酒至少含有2种针

对狂犬病病毒包膜糖蛋白G上不同、非重叠抗原位点的单克隆抗体,该蛋白是疫苗接种诱导的RVNAs的唯一靶点^[7]。

狂犬病单克隆抗体鸡尾酒的开发途径具有挑战性,因为有许多复杂因素,包括4个方面:

(1)没有RIG,伤口清洗和狂犬病疫苗接种本身对预防临床狂犬病约99%有效。使用RIG完成PEP,将该比率提高至99.9%,但RIG对PEP有效性的确切作用尚不清楚。因此,即使可以确定非劣效性界值,但非劣效性试验与以死亡率为终点的RIG试验统计效能所需的试验样本量,是不可行的;而安慰剂对照试验则可能被认为是不可接受的。这些议题在FDA公共研讨会和咨询委员会会议上进行了讨论^[11-12]。

(2)多种因素可影响通过动物咬伤潜在暴露后狂犬病发生的风险,这使得与历史对照比较具有挑战性。是否被狂犬病动物咬伤通常不得而知,而且动物患狂犬病的可能性因地域有很大差异。其他因素包括咬伤身体的部位、伤口的数量和深度、咬伤动物唾液的病毒接种量、作为PEP一部分使用的狂犬病疫苗类型、宿主因素以及咬伤和PEP开始之间的时间间隔。

(3)为单克隆抗体鸡尾酒选择合适的剂量具有挑战性,因为剂量过高可能干扰疫苗反应,从而增加患狂犬病的风险。

(4)单克隆抗体鸡尾酒与HRIG制剂性质不同,因此它们具有不同的开发途径。单克隆抗体鸡尾酒的主要问题是各种狂犬病病毒株的活性范围和持久性降低,因为与多克隆RIG相比,单克隆抗体鸡尾酒可能只含有2种抗体。RVNA水平在许多HRIG试验中被用作终点,但不能测定活性范围。对于标准化为与已上市的HRIG产品相同效价并且具有类似的RVNA特征的新的HRIG制剂,可以合理地假设这些新产品可能与已上市的HRIG产品具有类似的功效和活性范围。这一假设不能外推到单克隆抗体鸡尾酒。

由于狂犬病单克隆抗体鸡尾酒药物开发的独特复杂性,FDA召集了多个利益相关者的讨论,包括2017年的公共研讨会^[11]和2019年的咨询委员会会议^[12]。这些讨论帮助FDA制定了狂犬病单克隆抗体鸡尾酒开发的推荐监管途径。在这些讨论中,一致认为对于PEP被动免疫成分,单克隆抗体鸡尾酒与安慰剂的优效性试验可能被认为是不可接受的,并且单克隆抗体鸡尾酒与RIG的充分非劣性试

验在逻辑上是不可行的。此外,一致认为不为PEP的被动免疫成分建立保护的替代终点。因此,FDA推荐一种非临床和临床数据结合的方法,显示狂犬病单克隆抗体鸡尾酒有效性的实质性证据。

3 对开发方案的一般考虑

开发用于狂犬病PEP的单克隆抗体,需要仔细平衡和综合评估,非临床研究数据、健康志愿者临床试验数据和纳入已知或疑似狂犬病暴露者临床试验的数据。由于PEP被动免疫成分作用下降的不利结果可能是致命的,但罕见且难以归因于因果关系,因此申请人应考虑开发序列每一步其他可用类型的数据。以下各节内容将强调其中一些相互关系。

3.1 对非临床病毒学开发的考虑

3.1.1 抗原表位图谱(epitope mapping) 申请人应确定每个单克隆抗体的抗原表位特征,包括识别中和关键氨基酸(如接触残基)。这些研究应包括选择和表征细胞培养中的中和-耐药变异株,理想情况下,使用从抗原多样性病毒中独立选择的多重耐药变异株。申请人应确定循环狂犬病病毒株中关键氨基酸位置的氨基酸多态性频率。

3.1.2 细胞培养中的抗病毒活性 应在细胞培养中,用代表循环株抗原多样性的1组狂犬病病毒株,评价单克隆抗体鸡尾酒、鸡尾酒的单个单克隆抗体成分和HRIG对照组的中和活性。该组应包括来自多个宿主种(如蝙蝠、狗、狐狸、浣熊、臭鼬)和多个地方(即美国以及狂犬病流行的亚洲和非洲地区)的毒株。此外,该组应包括在每个单克隆抗体中和关键氨基酸位置具有多态性的毒株。中和分析的结果应以半数有效浓度[EC₅₀,单位为ng/mL和(或)IU/mL]报告。理想情况下,单克隆抗体鸡尾酒将显示中和活性的范围,至少与HRIG的范围相同。如果适用,申请人应考虑评价潜在的抗体的Fc蛋白域介导的抗病毒活性机制(如抗体依赖性细胞毒性)。

3.1.3 动物攻击研究(animal challenge studies) 狂犬病PEP动物模型(如仓鼠、狗)应证明在将要上市的浓度和剂量下,单克隆抗体鸡尾酒降低死亡率优于安慰剂,与HRIG相似或更好。这些动物攻击研究应试验各种浓度和剂量的单克隆抗体鸡尾酒,并在同时接种狂犬病疫苗有和无的情况下进行。申请人应完成单克隆抗体鸡尾酒和HRIG对动物模型疫苗应答影响的比较研究,并且应考虑比较单克隆抗体鸡尾酒和HRIG的预防窗口。根据细胞培养数据,选择狂犬病病毒攻击株应取决于人体暴露风

险(如狗和蝙蝠株)和单克隆抗体的敏感性;理想情况下,这些研究将包括在细胞培养中对中和最不敏感的攻击毒株,以增强攻击毒株死亡率的降低,可外推到其他较敏感毒株的信心。

FDA支持3R原则,即在可行的情况下减少(reduce)、优化(refine)和替代(replace)试验使用动物。如果申请人希望使用他们认为合适、充分、有效和可行的非动物试验方法,FDA鼓励他们同FDA协商。FDA将考虑评估这种替代方法是否等同于动物实验方法。

3.2 对早期临床开发的考虑

未暴露于狂犬病病毒的健康受试者的试验,应该评价单独使用以及与狂犬病疫苗系列合用时,单克隆抗体鸡尾酒与HRIG的药动学、RVNA水平、初始安全性和耐受性。

在没有狂犬病疫苗的情况下,健康志愿者的单克隆抗体鸡尾酒与HRIG的剂量范围试验,应包括肌肉注射和皮下注射,以反映这些产品如何用于PEP。应在多个时间点采集血样,以准确捕获RVNA峰值水平和RVNA浓度-时间曲线,并充分描述每个单克隆抗体的药动学特点。重要终点包括,为进一步开发选择的单克隆抗体鸡尾酒剂量的如下证明:整个14 d的多个时间点,单克隆抗体鸡尾酒与HRIG的RVNA水平(单位IU/mL)相似或更高(即在被动抗体可能是中和活性的主要因素的最早时间段,以及在疫苗诱导的RVNA预计在大多数联合接种疫苗的人中变得明显的第7天到第14天期间)。

健康志愿者的第2次试验,应比较与狂犬病疫苗系列合用时,不同剂量的单克隆抗体鸡尾酒、HRIG和安慰剂。如果预计在III期试验中使用各种狂犬病疫苗和疫苗给药途径(肌内或皮内),则在I期健康志愿者试验中,应使用单克隆抗体鸡尾酒与每种狂犬病疫苗和疫苗给药途径试验,以评估疫苗干扰的可接受水平。如果在III期试验中没有使用FDA批准的狂犬病疫苗,则应在健康志愿者试验中评价干扰FDA批准的狂犬病疫苗的可能性。与狂犬病疫苗系列一起给予单克隆抗体鸡尾酒或HRIG的健康志愿者试验的重要终点,包括在可能暴露于狂犬病的受试者的试验中,为进一步开发选择的单克隆抗体鸡尾酒剂量的证明如下:

(1)在疫苗产生的RVNA占优势之前,在早期时间点(长达7 d),单克隆抗体鸡尾酒与HRIG的RVNA水平相当,在早期时间点没有确定的保护阈

值,但认为HRIG是有效的。

(2)与观察到的HRIG疫苗干扰相当的第14天RVNA ≥ 0.5 IU/mL受试者比例,用于检测最近FDA批准的HRIG产品的疫苗干扰。然而,如果单克隆抗体鸡尾酒在第14天及其后,可单独将RVNA水平增加至 ≥ 0.5 IU/mL,可能完全干扰疫苗应答,而使用该方法无法检测到。在这种情况下,在预期单克隆抗体对RVNA水平的影响远小于0.5 IU/mL时,可通过评估后期时间点,RVNA ≥ 0.5 IU/mL受试者的比例,检测疫苗干扰。

(3)根据狂犬病病毒感染的病理生理学,单克隆抗体鸡尾酒组与HRIG组在第14天的RVNA几何平均滴度相当,确认这些RVNA将是疫苗诱导的RVNA和使用单克隆抗体鸡尾酒或HRIG被动免疫产生RVNA的组合,无论RVNA来源如何,此时的总RVNA对于狂犬病病毒中和都很重要。

3.3 对有效性的考虑

如果上述细胞培养、动物模型数据和健康志愿者数据的证据支持多中心临床试验结果,则常规的批准可能基于疑似暴露于狂犬病受试者的多中心临床试验。根据纳入的受试者人数和证明的有效性水平,狂犬病单克隆抗体鸡尾酒的初始生物制品许可申请(biologic license application, BLA)资料可提交2线或1线适应症。该指导原则中的讨论,假设首先进行支持2线适应症的试验,然后再进行更大的试验,以支持发展到1线适应症。

在这2种方案,由于狂犬病单克隆抗体鸡尾酒的有效性降低可能导致死亡,因此狂犬病单克隆抗体鸡尾酒的研制应以逐步方式进行,以将试验受试者的风险降到最低。最初选择用于鸡尾酒开发的单克隆抗体,应在中和活性方面具有互补性,并具有抗多种狂犬病病毒株的活性。广泛的覆盖范围对其在美国的开发尤为重要,据报道,美国国内的狂犬病死亡病例来自国内暴露(主要是由于蝙蝠、浣熊、狐狸和臭鼬毒株)和国际旅行期间的暴露(由于犬毒株)^[8]。此外,单克隆抗体的选择应考虑氨基酸序列,以及互补决定区的任何残基是否可能影响抗原结合的翻译后修饰。申请人选择单克隆抗体后,应获得细胞培养活性研究、动物攻击研究、毒理学研究和未暴露于狂犬病病毒的健康志愿者的临床试验(无论是接种狂犬病疫苗)的数据。这些数据可以为剂量选择提供信息,并为抗病毒活性和覆盖范围提供支持。下一步是可能暴露于狂犬病病毒的受试者的单克隆抗体鸡尾酒与RIG并结合

伤口清洗和狂犬病疫苗系列的临床试验。

在与狂犬病疫苗和伤口清洗合用的情况下,充分支持无狂犬病存活率终点的临床试验,以证明单克隆抗体鸡尾酒与RIG的非劣效性是可行的。PEP被动免疫成分的确切作用尚不清楚,但与伤口清洗和狂犬病疫苗接种相比,认为其作用非常小。此外,在没有单克隆抗体鸡尾酒或RIG的情况下,WHO III级狂犬病病毒暴露的患者,发生临床狂犬病的实际风险,具有高度异质性。由于包括RIG在内的PEP几乎100%有效,因此,充分支持临床试验,证明单克隆抗体鸡尾酒相对于RIG的优效性也是不可行的。

因此,有效性评价将依赖于临床试验,证明在狂犬病流行国家接受单克隆抗体鸡尾酒代替RIG作为PEP的一部分的WHO III类狂犬病病毒暴露的受试者的无狂犬病存活率可接受。然而仍然建议双盲、随机、阳性对照设计,比较单克隆抗体鸡尾酒与RIG(同时合用伤口清洗和狂犬病疫苗),以便在伤口内和周围给予单克隆抗体鸡尾酒或RIG时,充分显示安全性特征,并确认可比较的早期RVNA水平和疫苗干扰。此外,在PEP失败的情况下,包括阳性对照将作为参考依据,以便更好地确定失败是否是由于单克隆抗体鸡尾酒的疗效低,而不是意外因素,如意外的疫苗反应低或新病毒株。

就该指导文件而言,狂犬病流行国家被视为狂犬病在狗群中传播的国家,并且已知狗咬伤对人类造成狂犬病传播和死亡的重大风险。建议在这类狂犬病流行国家进行大量临床试验的原因包括:(1)犬狂犬病对需要PEP的人狂犬病暴露的全球总负担至关重要;(2)关于接受PEP的暴露后人狂犬病死亡可能性的假设和估计,主要基于狂犬病流行国家的狗咬伤经验,因此在其他类型的已知或可疑狂犬病暴露后,对试验结果的解释可受到更多预期结果的不确定性影响。

3.4 对安全性的考虑

因为受影响人群的广泛多样以及可能符合PEP要求的暴露,所以适当人群的充分盲法、良好对照的人体试验生成的可靠的安全性数据库非常重要。用于PEP被动免疫成分的新型单克隆抗体鸡尾酒的申请,应包括至少1 000例受试者的安全数据,这些受试者接受了拟上市单克隆抗体鸡尾酒的剂量。如果开发过程识别出重要的安全信号,则可能需要大于1 000例受试者的安全数据库。这一总数包括I期试验的健康受试者以及狂犬病流行国家和非流

行国家的可能暴露于狂犬病病毒的受试者。如果单克隆抗体鸡尾酒已在其他国家获得批准,且在上市后数据(患者剂量、狂犬病死亡数和严重不良事件)方面具有良好的特征描述,而且FDA同意这些数据,可考虑用作安全数据库的一部分。

4 对III期疗效试验的考虑

除“4.9.4”节外,下列各节描述了FDA对支持2线适应症设计的试验建议。

4.1 试验设计(包括随机、分层和盲法)

该试验应遵循WHO III级暴露的狂犬病病毒受试者的单克隆抗体鸡尾酒与RIG的多中心、双盲、随机对照试验,每项试验都合用彻底的伤口清洗和狂犬病疫苗系列。FDA建议临床试验1:1随机分组,以支持颁发许可证。该试验设计应确保在狂犬病流行国家至少有750例WHO III级暴露的受试者,接受包括单克隆抗体鸡尾酒的PEP治疗,并随访至少1年,以证明无狂犬病存活率>99.5%。这意味着该试验应在狂犬病流行国家,至少纳入1 500例WHO III级暴露的受试者,并在非狂犬病流行国家纳入更多的受试者,以进行充分的安全性评价。

分层应考虑影响发生狂犬病风险的因素,如暴露与随机化之间的时间间隔(≤ 24 h或 > 24 h)、咬伤部位(颈部上方与下方)以及咬伤次数。申请人应仔细记录所有纳入病例的PEP的所有成分。如果任何受试者发生狂犬病,不知道受试者治疗分配的专家,应以盲法对该病例的PEP给药审查和记录。

4.2 试验人群和地点

为了从临床试验存活结果得出关于单克隆抗体鸡尾酒疗效的结论,该试验应主要纳入狂犬病流行国家的受试者。当为狂犬病PEP招募时,通常不知道暴露是否来自狂犬病动物。在临床试验中也将出现这种情况。可能来自狂犬病动物的暴露,因地区有很大差异,狂犬病流行国家的风险很高。FDA倾向于该试验在数个狂犬病流行国家招募具有不同狂犬病病毒株的受试者。然而,FDA鼓励申请人,包括美国和其他非狂犬病流行国家的一些试验点,以便在广泛人群中评价安全性。

试验开始时,在没有RIG的情况下,应纳入患狂犬病风险较低伤口(如下肢伤口)的成年人。青少年(在该指导原则中,定义为12岁及12岁以上的儿科受试者)可能从试验开始就包括在成年人中,特别是在没有RIG的地点招募时。如果预先规定的中期分析发现没有理由停止试验,则应扩大试验

到纳入具有较高风险的WHO III级暴露的受试者。在预先规定的中期分析后,该试验还应扩大到包括小于青少年(即小于12岁)的儿童受试者,因为大约40%的狂犬病病例发生在儿童^[6]。可利用获得的数据,确定初始儿科剂量,并在初始儿科人群中进行药动学和RVNA取样,确定剂量。鼓励申请人根据其开发方案的可用信息,尽早与FDA讨论,纳入儿科临床试验受试者的适当时间。

纳入不同种族、民族、性别和年龄以及不同并发症的各种受试者,对于评价狂犬病PEP单克隆抗体鸡尾酒的试验尤其重要,因为暴露于狂犬病动物的每一部分人群都需要狂犬病PEP。此外,年龄或基因变异等宿主因素,可影响对狂犬病疫苗的反应,进而影响疫苗干预。

4.3 入选标准

及时给予PEP是降低临床狂犬病风险的关键。因此,试验入选标准应限于可在短时间内(不超过1 h)评估的因素。入选标准应明确定义暴露类型,包括可承认的造成暴露的动物。如果方案中明确规定,可以使用认为重要、但在短时间内无法确定的基线因素(如先前狂犬病疫苗接种的证据),将受试者排除在意向治疗(intention-to-treat, ITT)人群之外。

RIG或单克隆抗体鸡尾酒的被动免疫,可给暴露后出现的受试者增加最多的益处。因此,这些受试者的无狂犬病存活率,将最好地支持单克隆抗体鸡尾酒的疗效,但如果单克隆抗体鸡尾酒不如RIG有效,则纳入这些受试者将与最大风险相关。将受试者限制在暴露于狂犬病病毒后2~3 d内,平衡治疗延迟的风险和无狂犬病存活数据的信息需求,这是合理的。

4.4 剂量选择

申请人应根据健康志愿者的非临床研究和健康志愿者的I期临床试验数据,选择III期试验的剂量。所选剂量应足够高,以使其在细胞培养活性研究中提供与HRIG相当的中和活性范围,在动物攻击研究中提供与HRIG相似的死亡率降低,第14天在无疫苗的I期临床试验中提供与HRIG相似或更高的RVNA水平,在有疫苗的I期临床试验中与HRIG相比,早期RVNA水平(截至第7天)具有可比性。然而,所选择的剂量应足够低,以便在疫苗I期临床试验中,提供与HRIG相似或更低水平的疫苗干扰。

4.5 阳性对照组的使用

出于在美国批准的考虑,由于可以使用单克隆

抗体鸡尾酒代替HRIG,申请人应在足够的受试者中使用HRIG作为对照组,以便充分的安全性对比。然而,在狂犬病流行国家的试验中,可以使用HRIG或ERIG作为阳性对照组(active comparator),比较评价无狂犬病存活率。不同研究地点的对照组的选择,应考虑当地的护理标准以及来自当地监管部门和利益相关者的投入。鼓励申请人在临床试验设计阶段的早期,与FDA讨论在不同研究地点选择阳性对照组。

4.6 疗效终点

建议下列终点作为疗效证据:(1)在疫苗产生的RVNA为主之前,早期时间点(到第7天),单克隆抗体鸡尾酒与RIG接受者的RVNA水平相当。(2)单克隆抗体鸡尾酒与RIG接受者对疫苗的干扰相当。疫苗干扰可通过疫苗诱导的RVNA ≥ 0.5 IU/mL(WHO用作判断疫苗充分应答的阈值)的受试者比例评估。对于单独给予导致RVNA水平远低于0.5 IU/mL的单克隆抗体鸡尾酒产品,可在第14天或第28天测量疫苗干扰。对于单独给予导致RVNA水平接近或高于0.5 IU/mL的单克隆抗体鸡尾酒产品,应在预期单克隆抗体鸡尾酒对RVNA水平的作用远小于0.5 IU/mL(5个半衰期后)的稍后时间点测量疫苗干扰。(3)在PEP开始后至少1年内没有狂犬病死亡。1个或多个狂犬病死亡的发生将引起重大的审评关注。

4.7 试验程序和评估时间

该试验应随访受试者至少1年,以监测狂犬病死亡状况。应记录暴露的描述性详细信息,并应包括是否引起咬伤、咬伤数量、咬伤部位和深度(包括咬伤照片)、暴露和PEP开始之间的时间间隔,以及暴露涉及的动物种类或类型。申请人应尽合理的努力以确定并记录涉及暴露的动物的狂犬病状态,因为这些数据对于获益分析至关重要。此外,申请人应前瞻性地评估是否及时、正确地PEP,并在给予PEP时予以记录。

4.8 终点判断

试验应该包括对任何死亡全面、没有偏见、盲法的判断方案。

4.9 对统计的考虑

关于统计分析方法的考虑,申请人应参考FDA《提供人用药品和生物制品有效性临床证据供企业用指导原则》^[13]。

4.9.1 分析人群 一般来说,主要疗效分析应包括在试验期间随机接受指定治疗任何部分的所有受

试者。然而,如果根据之前的狂犬病疫苗接种或筛选期间无法确定的其他基线因素,受试者被排除在意向治疗(ITT)人群之外,则可考虑用调整的ITT人群,做初步疗效分析。申请人可使用符合方案的人群作为次要疗效人群,这可能受随机化后排除的影响。

4.9.2 有效性分析 III期临床试验的首选共同主要终点,如“4.6”节所述。下面是分析主要疗效终点的建议:

(1)对于早期RVNA水平,申请人应在试验开始前证明,可比性标准和规定时间点选择的合理性。

(2)对于疫苗干扰,RVNA ≥ 0.5 IU/mL的受试者比例的非劣效性界值不超过10%临床上一般可接受。然而,申请人应在试验开始前,与FDA讨论其非劣效性界值的选择。包括HRIG+疫苗的PEP方案后疫苗反应的研究表明,第14天RVNA ≥ 0.5 IU/mL的受试者比例非常高。例如,在1项研究的疗效分析人群中,116列受试者随机接受2种HRIG产品加疫苗中的1种,所有59例接受第1种HRIG产品的受试者第14天,RVNA ≥ 0.5 IU/mL(100%,95%置信区间为93.9%~100%);接受第2种HRIG产品的56/57例,第14天,RVNA ≥ 0.5 IU/mL(98.2%,95%置信区间为90.6%~100%)^[14]。

(3)BLA提交2线适应症应得到临床试验的支持,该临床试验证明在狂犬病流行国家作为PEP的一部分的单克隆抗体鸡尾酒治疗的WHO III级暴露受试者的无狂犬病存活率 $>99.5\%$ 。这表明无狂犬病存活率的95%置信区间下限将为 $>99.5\%$ (采用Clopper-Pearson法)。选择大于99.5%的无狂犬病存活率阈值,是因为它高于仅使用伤口清洗和狂犬病疫苗(无RIG)估计的约99%的无狂犬病存活率,但不需要太大的试验规模。

(4)申请人应根据人口统计学和基线特征[如性别、种族、年龄、肾功能损害、肝功能损害、暴露与随机化之间的时间间隔(≤ 24 h或 >24 h)、咬伤的部位(颈部上方与下方)以及咬伤的数量],在重要亚组内进行主要疗效终点分析。这些分析的目的是探索这些亚组主要疗效终点结果的一致性。

4.9.3 丢失数据的处理 申请人应尽一切努力限制受试者退出试验。当丢失不可避免时,申请人应解释丢失数据的原因,并尝试确定未完成方案的受试者的最终状态。排除丢失数据或其他治疗后结果的受试者的分析,可能存在偏倚,因为未完成试

验的受试者与仍在试验的受试者相比,测量和未测量方面可能存在显著差异。处理分析中丢失数据的主要方法,应在方案或统计分析计划中预先规定。敏感性分析应证明主要分析结果应与有关丢失数据的假设相符。

4.9.4 对支持1线适应症试验的统计学考虑 为了从2线适应症扩展到1线适应症,申请人可进行额外的临床试验,或可能使用多个试验的合并数据、先前批准的单克隆抗体鸡尾酒的其他国家提供的数据,或与FDA讨论后从注册处获得的信息。如前文“3.3”节所述,支持1线适应症的临床试验数据可在初始批准后的补充BLA或原始BLA中提交。该试验应包括至少6 000例在狂犬病流行国家暴露于WHO III级狂犬病病毒后,接受作为PEP一部分的单克隆抗体鸡尾酒的受试者的数据。由于估计PEP(包括RIG)的存活率 $>99.9\%$,扩大到1线适应症,将需要提交额外的临床数据,证明在狂犬病流行国家作为PEP的一部分的单克隆抗体鸡尾酒治疗的WHO III级暴露受试者,无狂犬病存活率 $>99.9\%$ 。如果含有单克隆抗体鸡尾酒的PEP的真实无狂犬病存活率为99.99%,则至少纳入6 000例受试者,提供至少80%效能,证明存活率 $>99.9\%$ 。

支持1线适应症的临床试验应为随机对照试验,以使疗效数据更易于解释,并允许比较安全性评价。试验随机化,单克隆抗体鸡尾酒与RIG对照药2组患者的比例最好为3:1(共纳入8 000例受试者),或最多不超过6:1(共纳入7 000例受试者),两者均合用伤口清洗和疫苗。从2线适应症扩展到1线适应症试验的主要终点,应该是在PEP开始后至少1年的无狂犬病存活率。无狂犬病存活率的95%置信区间下限(使用Clopper-Pearson法)将用于评价存活率是否 $>99.9\%$ 。

4.10 对风险-获益的考虑

在美国,替代RIG使用单克隆抗体鸡尾酒的获益,与不易获得RIG的狂犬病流行国家不同;除了几次短暂的短缺外,HRIG易于获得。HRIG被认为是非常有效的,而且具有良好的安全性。因此,为了获得FDA的批准,单克隆抗体鸡尾酒应具有类似于HRIG的安全性和疗效。除了无狂犬病存活率的不平衡外,任何关于单克隆抗体鸡尾酒的非临床或临床数据表明,与HRIG相比,新的安全信号或可能降低疗效的问题,可导致不利的获益-风险评估。可能降低疗效的问题包括但不限于,单克隆抗体鸡尾酒的半衰期较短或RVNA峰值水平较低,这可能导

致疫苗反应出现前RVNA覆盖出现漏洞,疫苗干扰率较高,或细胞培养研究表明各种狂犬病毒株的覆盖率降低。

5 其他考虑

5.1 对非临床安全性的考虑

开发抗狂犬病病毒单克隆抗体鸡尾酒的非临床安全性评估,应遵循ICH S6(R1)生物技术衍生药物临床前安全性评估供企业用指导原则^[15]中概述的方法。

对于针对狂犬病病毒的单克隆抗体,按照ICH S6(R1)的规定,申请人可进行1种动物的毒理学研究。对于非临床安全性评估的种属选择,ICH S6(R1)指出,当药理学相关种属无法通过其他方法识别时,可通过比较人和动物组织之间的组织结合谱,使用免疫组织化学技术进行组织交叉反应(tissue cross reactivity, TCR)研究。FDA建议使用32个人体组织的组合,进行符合实验室管理规范的TCR研究。关于组织清单和免疫组织化学研究的详细技术信息,申请人应查阅《人用单克隆抗体产品的生产和检定中考虑的要点:供企业用指导原则》^[16]。申请人还应考虑替代技术,如使用蛋白质微阵列,评价非靶结合,但这些技术不能取代使用免疫组织化学技术的TCR研究,除非有正当理由。虽然可以单独评价单克隆抗体,但通常以预期的临床比例使用单克隆抗体鸡尾酒进行TCR研究足矣。

如果在TCR和(或)使用人体组织/蛋白质的替代研究中,未观察到明显临床关注的非靶结合(如未观察到或仅观察到最小的细胞质结合),则在1种动物进行短期重复给药毒理学研究(如3周)就足够了。尽管在这种情况下通常使用大鼠,但申请人可以根据理由选择动物的种属。或者,如果在TCR研究中单克隆抗体与人体组织结合,申请人应评价单克隆抗体与用于毒理学试验的非临床动物组织的结合。如ICH S6(R1)所述,评价选择的动物组织,还可以提供所观察毒性外推的信息。申请人应使用从数种候选动物中选择的组织进行TCR研究,并包括与观察到人体组织结合对应的动物组织。通常,在这种情况下,申请人可选择1种动物进行毒理学试验。尽管申请人可以选择与人体组织中所见的具有类似结合的任何动物种属,但FDA特别建议申请人在开始毒理学研究之前,与FDA讨论动物种属选择,以便于最终确定。任何非靶人体组织/蛋白质结合的临床关注的数量,要根据具体情况确定。当观察到潜在的临床关注的结合(如细胞膜结合)

时,FDA可能建议进行额外的研究,以帮助了解发现的潜在临床相关性。

重复给药毒理学研究的设计,应遵循ICH S6(R1)中的现有指导原则。对于狂犬病单克隆抗体,申请人应考虑如下9点:(1)建议进行持续时间至少为3周(即给药3周)的符合实验室管理规范的重重复给药毒理学研究,包括所有标准毒性终点,包括毒动学分析。(2)建议包括末次给予单克隆抗体后,约5个半衰期的无给药期的恢复组。(3)毒理学研究的给药途径,应与健康受试者临床试验的给药途径相同,通常为肌肉注射。(4)应根据ICH S6(R1)选择合理的剂量(即高剂量应提供约大于最大预期临床暴露10倍的产品暴露)。(5)毒理学研究通常应给予,与临床给药选择的比例相同的狂犬病单克隆抗体。(6)毒理学研究中使用的原料药或原料(即毒理学的批次原料)应充分代表生产质量管理规范级别的临床用药的原料。(7)应在毒理学研究中使用预期的临床剂型。(8)如ICH S6(R1)所述,应按照规定进行抗药抗体测定。申请人应在研究期间(如在给药和恢复期结束时)收集适当的样本,进行可能的抗药抗体分析,以帮助解释毒理学研究结果。(9)局部耐受性评估应作为重复给药毒理学研究的一部分。

无需进行长期重复给药、遗传毒性和致癌性研究。为了了解潜在的生殖和发育作用,申请人应使用人体胎儿组织进行TCR研究,或使用替代蛋白质相互作用技术研究,并提供适当的理由。如果在重复给药毒理学和TCR研究中,未发现具体问题,则无需进行发育和生殖毒理学研究。

ICH S6(R1)规定,如果使用动物疾病模型评价原理论证时,安全性评估可包括在提供潜在目标相关安全方面信息的评价中。因此,FDA鼓励申请人在可行的情况下,在动物攻击研究中收集狂犬病单克隆抗体的安全信息。

5.2 对化学、生产和控制的考虑

申请人应研制至少2种单克隆抗体的鸡尾酒,以识别狂犬病病毒糖蛋白的不同、非重叠的保守表位。鸡尾酒中的所有单克隆抗体,应广泛中和来自多种动物和多个地点的狂犬病病毒株(见“3.1.1”节)。制作鸡尾酒的单个单克隆抗体组合,可发生在制剂原料药生产步骤或制剂生产过程中。

5.2.1 候选单克隆抗体的选择 在候选筛选阶段,FDA建议申请人评估候选单克隆抗体的可变(V)区氨基酸序列,以确定可能影响与抗原结合的翻译后

修饰的潜在位点。这种翻译后修饰包括但不限于脱酰胺、氧化、V区糖基化或糖化。如果任何最终候选单克隆抗体,具有易于翻译后修饰的氨基酸残基,可能导致产品效力降低,则应将这些初级氨基酸序列从序列中剔除,前提是氨基酸对结合特异性不是至关重要的。如果特定氨基酸残基对单克隆抗体的活性至关重要,则应在开发早期进行配方和强制降解研究,以确定在不降低效力的情况下,可能存在的翻译后修饰水平。

5.2.2 效价测试 单个单克隆抗体原料药和单克隆抗体鸡尾酒(原料药或制剂)的效力通常包括结合酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和快速荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)。结合ELISA的效价结果,以参考标准的百分比报告。RFFIT试验的效价结果通常报告为每毫升IU。对于RFFIT试验,参考标准应为国际标准,如WHO国际标准抗狂犬病免疫球蛋白(也称为SRIG)或美国标准狂犬病免疫球蛋白。或者,内部参考标准可根据其中1个国际参考标准进行鉴定。申请人应解释如何报告RFFIT效价结果以及选择的参考标准。在确定组合单克隆抗体的比例时,应考虑基于RFFIT试验的单个单克隆抗体的效价。使用国际参考标准的优点是,每个单克隆抗体的效价可以与同一标准比较确定。

5.2.3 鸡尾酒中的单克隆抗体比例 鸡尾酒中单个单克隆抗体的比例可基于质量或效力。鸡尾酒中的每个单克隆抗体在RFFIT试验中可能具有不同的效价,使用国际参考标准时可能更明显。申请人应证明该比例是合理的,并开发1种能够证明批次间一致性的检测方法。

5.3 对说明书的考虑

为了支持批准将单克隆抗体鸡尾酒作为预防狂犬病的PEP的被动免疫成分,申请人应证明单克隆抗体鸡尾酒对各种狂犬病病毒株,包括在美国发现的(蝙蝠、狐狸、臭鼬和浣熊毒株)以及返国旅行者国际暴露(主要是狗毒株)的毒株,中和活性等于或优于HRIG。FDA不建议将适应症仅限于狂犬病病毒株的亚型,因为在给予PEP时,狂犬病病毒株是未知的,并且咬伤患者的动物种属不一定与狂犬病病毒株的谱系相关^[17]。

5.4 对上市后的考虑

应制定计划,监测狂犬病死亡情况以及在上市后使用单克隆抗体鸡尾酒时,可能出现的安全问

题。此外,申请人应有计划和基础设施,监测新的狂犬病病毒株,并评估单克隆抗体鸡尾酒对这些新毒株的活性,这应在产品开发期间与FDA讨论。

6 结语

FDA的“狂犬病:为暴露后预防的被动免疫成分研制单克隆抗体鸡尾酒供企业用指导原则”对非临床病毒学研究、早期临床研究、临床有效性研究和临床安全性研究的要点提出了建议;对临床III期疗效试验设计提出了详细的建议,包括试验人群、剂量选择、阳性对照、疗效终点和统计学等;对非临床安全性研究也提出了许多具体建议。

对FDA该指导原则的下列建议,值得我国相关研究和监管者特别关注和思考以下7个方面:

(1)应综合研究和评估。FDA建议开发用于狂犬病PEP的单克隆抗体,需要仔细平衡和综合评估,非临床研究数据、健康志愿者临床试验数据和纳入已知或疑似狂犬病暴露者临床试验的数据,由于PEP被动免疫成分作用下降的不利结果,可能是致命的。还应考虑开发序列每一步其他可用类型的数据。

(2)至少有2种单克隆抗体的组合。WHO建议单克隆抗体鸡尾酒至少含有2种针对狂犬病病毒包膜糖蛋白G上不同的非重叠抗原位点的单克隆抗体。

(3)确证性试验受试者应有多样性。FDA建议应纳入不同种族、民族、性别和年龄以及不同并发症的各种受试者,对于评价狂犬病PEP单克隆抗体鸡尾酒的试验尤其重要,因为暴露于狂犬病动物的每一部分人群都需要狂犬病PEP。

(4)临床安全性评估的例数。FDA建议用于PEP被动免疫成分的新型单克隆抗体鸡尾酒的申请,应包括至少1 000例受试者的安全数据。如果开发过程识别出重要的安全信号,则可能需要大于1 000例受试者。这一总数包括I期临床试验的健康受试者以及狂犬病流行国家和非流行国家的可能暴露于狂犬病病毒的受试者。

(5)III期临床疗效试验的例数。FDA建议临床试验1:1随机分组,以支持颁发许可证。该试验设计应确保在狂犬病流行国家至少有750例WHO III级暴露的受试者,接受包括单克隆抗体鸡尾酒的PEP治疗。

(6)上市后监测应注意的问题。FDA建议申请人应有计划和基础设施,监测新的狂犬病病毒株,并评估单克隆抗体鸡尾酒对这些新毒株的活性。

(7)非临床研究的建议。包括非临床病毒学研究和非临床安全性研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] FDA. Rabies: Developing Monoclonal Antibody Cocktails for the Passive Immunization Component of Post-Exposure Prophylaxis Guidance for Industry(Draft) [EB/OL]. (2021-07-28) [2021-08-24]. <https://www.fda.gov/media/151102/download>.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 抗狂犬病病毒单克隆抗体新药临床试验技术指导原则(征求意见稿) [EB/OL]. (2021-08-17) [2021-08-24]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=5b0c668696222fd7>. CDE, NMPA. Technical Guidance for Clinical Trials of New Anti-Rabies Virus Monoclonal Antibodies (Draft) [EB/OL]. (2021-08-17) [2021-08-24]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=5b0c668696222fd7>.
- [3] ICH. E9 Guidance for industry Statistical Principles for Clinical Trials [EB/OL]. (1998-09-16) [2021-08-24]. <https://www.fda.gov/media/71336/download>.
- [4] ICH. E9(R1) Statistical Principles for Clinical Trials: Addendum: Estimands and Sensitivity Analysis in Clinical Trials Guidance for Industry [EB/OL]. (2021-05-11) [2021-08-24]. <https://www.fda.gov/media/148473/download>.
- [5] ICH. E10 Guidance for industry Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials [EB/OL]. (2001-05-14) [2021-08-24]. <https://www.fda.gov/media/71349/download>.
- [6] WHO. Rabies vaccines: WHO position paper-April 2018 [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2018, 93: 201-220.
- [7] WHO. WHO Expert consultation on rabies: Second report [J]. World Health Organ Tech Rep Ser, 2013(982): 1-139.
- [8] Pieracci E G, Pearson C M, Wallace R M, et al. Vital signs: Trends in human rabies deaths and exposures—United States, 1938 – 2018 [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2019, 68(23): 524-528.
- [9] Hampson K, Coudeville L, Lembo T, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(4): e0003709.
- [10] Baltazard M, Bahmanyar M. Field trials with rabies vaccine on persons bitten by rabid wolves [J]. Bull World Health Organ, 1955, 13: 747-772.
- [11] FDA. Materials for the 2017 workshop Developing Rabies Monoclonal Antibody Products as a Component of Rabies Post-exposure Prophylaxis [EB/OL]. (2017-07-17) [2021-08-24]. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/developing-rabies-monoclonal-antibody-products-component-rabies-post-exposure-prophylaxis>.
- [12] FDA. Materials for the 2019 Antimicrobial Drugs Advisory Committee are available [EB/OL]. (2019-04-25) [2021-08-24]. <https://www.fda.gov/advisory-committees/advisory-committee-calendar/april-25-2019-antimicrobial-drugs-advisory-committee-meeting-announcement-04252019-04252019>.
- [13] FDA. Guidance for Industry Providing Clinical Evidence of Effectiveness for Human Drug and Biological Products [EB/OL]. (1998-05-15) [2021-07-22]. <https://www.fda.gov/media/71655/download>.
- [14] Matson M A, Schenker E, Stein M, et al. Safety and efficacy results of simulated post-exposure prophylaxis with human immune globulin (HRIG; KEDRAB) co-administered with active vaccine in healthy subjects: A comparative phase 2/3 trial [J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 16(2): 452-459.
- [15] ICH. S6(R1) Guidance for Industry Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals [EB/OL]. (2012-05-18) [2021-08-24]. <https://www.federalregister.gov/documents/2012/05/18/2012-12039/international-conference-on-harmonisation-addendum-to-international-conference-on-harmonisation>.
- [16] FDA. Guidance for Industry Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use [EB/OL]. (1997-02-27) [2021-08-24]. <https://www.fda.gov/media/76798/download>.
- [17] Ma X, Monroe B P, Cleaton J M, et al. Rabies surveillance in the United States during 2016 [J]. J Am Vet Med Assoc, 2018, 252(8): 945-957.

[责任编辑 李红珠]