

临床前生物技术药物诱导免疫复合物的形成机制及检测方法研究进展

郑少秋^{1, 2, 3}, 李一昊³, 王 娅³, 张亚群³, 刘 军³, 吕建军^{3*}, 汪溪洁^{4*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330103

2. 长三角药物高等研究院, 长三角药物工程学院, 江苏 南通 226133

3. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133

4. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203

摘要: 生物技术药物的免疫原性在临床前药物安全性评价中表现为实验动物的超敏反应以及肾损伤, 但其诱导免疫复合物形成的机制尚未完全明确。目前国内外主要通过检测动物体内循环态和沉积态的免疫复合物, 来综合判断生物技术药物是否对动物造成免疫复合物性肾损伤。简述了临床前生物技术药物诱导免疫复合物的形成、清除、沉积、毒性反应以及检测方法的研究进展, 以期建立早期、简便、灵敏的生物技术药物免疫复合物性肾损伤的检测技术提供一定参考。

关键词: 生物技术药物; 免疫原性; 免疫复合物; 肾损伤; 超敏反应; 检测方法

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2022) 04-0788-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.04.024

Research progress on mechanism of formation and detection method of preclinical biopharmaceutical drug-induced immune complexes

ZHENG Shaoqiu^{1,2,3}, LI Yihao³, WANG Ya³, ZHANG Yaqun³, LIU Jun³, LÜ Jianjun³, WANG Xijie⁴

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330103, China

2. Yangtze Delta Advanced Research Institute, Yangtze Delta Pharmaceutical College Nantong, Nantong 226133, China

3. Innostar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong 226133, China

4. Shanghai Innostar Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: The immunogenicity of biopharmaceutical drugs is manifested as renal injuries as well as hypersensitivity reactions in experimental animals in preclinical safety evaluation of drugs. However, the mechanism of biopharmaceutical drug-induced immune complexes in experimental animals is still unclear. The immune complex-based injuries to the kidney of biopharmaceutical drugs have been mainly determined comprehensively by detecting the immune complexes of circulating and deposited states. In this paper, we briefly summarize that the formation, clearance, deposition, toxicological reactions, and detection of immune complexes induced by preclinical biopharmaceutical drugs in experimental animals, in the hope of providing some references for the establishment of early, simple, and sensitive detection methods of renal injuries caused by biopharmaceutical drug-induced immune complexes.

Key words: biopharmaceutical drug; immunogenicity; immune complex; renal injury; hypersensitivity reaction; detection method

自1986年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准首个单克隆抗体治疗药物上市,至2015年共有50个单克隆抗体药物上市,截止2021年5月已有100个单克隆抗体药物被FDA批准上市^[1]。2020年全球前10的畅销药品

中半数为生物技术药物,包括4个单克隆抗体类药物,即修美乐(adalimumab)、可瑞达(pembrolizumab)、喜达诺(ustekinumab)、欧狄沃(nivolumab)以及1个重组融合蛋白类药物:艾力雅(aflibercept)^[2]。中国生物技术药物开发和起步

收稿日期: 2021-11-22

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设项目(BM2021002)

第一作者: 郑少秋(1997—),男,硕士研究生,研究方向为药物毒理学研究。Tel: 15868537938 E-mail: sqzheng.hm@simm.ac.cn

*共同通信作者: 汪溪洁,女,研究员,主要从事药物毒理学研究。E-mail: xjwang@innostar.cn

吕建军,男,主任药师,研究方向为药物毒性病理学研究。E-mail: jjlv@innostar.cn

较晚,自1992年国内第1个干扰素产品(注射用重组人干扰素 $\alpha 1b$)上市以来^[3],从最初的抗人白细胞介素-8鼠单抗乳膏^[4]到现在国内已上市了41个单抗类药物、国内上市2个免疫细胞治疗产品(阿基仑赛注射液于2021年6月获批上市、瑞基奥仑赛注射液2021年9月上市),其中单克隆抗体类药物是研发上市的热点^[5]。

近10年来,随着生物技术药物的广泛应用,其免疫复合物性肾损伤的潜在危害日益受到关注,并对此类药品的临床前安全性评价提出了新的要求。在药物安全性评价中,生物技术药物的免疫原性常引起实验动物以及人类发生超敏反应,或导致血小板减少、凝血功能障碍以及组织器官炎症,且免疫复合物(immune complex, IC)出现在血液循环及肾脏中引起疾病^[6]。药物临床前安全性评价中,生物技术药物导致的IC性肾损伤仅通过常规组织病理学检查很难被发现。此外,在生理状态下实验动物体内也可出现少量的IC^[7]。目前,临床前阶段生物技术药物诱导IC性肾损伤的发病机制尚不完全清楚,早期、简便、灵敏的检测技术尚未建立,有待进一步研究。本文简要概述了临床前生物技术药物诱导IC的形成、清除、沉积、毒性反应以及检测方法的研究进展,以期为我国临床前药物安全性评价机构早期进行IC性肾损伤的诊断和检测提供一定参考。

1 生物技术药诱导的IC形成、清除、沉积和毒性反应

1.1 IC的形成

近年来,国内外生物技术药物呈现多样化发展趋势,除了抗体类药物、重组蛋白类药物、多肽类药物、核酸药物等类型外,还出现了细胞治疗产品、基因治疗产品等,治疗性蛋白药物为生物技术药物的主要形式之一。2019年FDA发布的《治疗性蛋白药物的免疫原性检测——抗药抗体分析方法的建立和验证》指导原则^[8]指出,免疫原性是治疗性蛋白药物具有产生免疫反应或诱导免疫相关不良临床事件的倾向。治疗性蛋白药物的毒理学研究中,生物技术药物不同于传统的化学药物,普遍具有更大的相对分子质量,对实验动物和人类都存在免疫原性及引发的不良反应的潜在可能,包括非人灵长类动物在内的实验动物可能会出现血管炎症、输液反应、诱发肾小球疾病和其他潜在的不良反应^[9]。机体对药物的免疫反应可能会影响药物在体内的药动学(pharmacokinetic, PK)、药效学(pharmaco-

dynamic, PD)和安全性特性。非人灵长类动物实验中,动物给予单克隆抗体和多克隆抗体这两种类型重组蛋白类药物后,常可产生抗药抗体(anti-drug antibody, ADA)^[10],与动物自身的免疫反应有关。而且人类和非人灵长类动物免疫反应有所不同,人类主要通过炎性细胞和免疫应答为主,而非人灵长类动物以抗原处理呈递和免疫应答功能为主,涉及到以主要组织相容复合物一类分子的抗原呈递为主^[11]。

IC是一种由抗原-抗体以非共价键结合形成的网格状结构化合物,常以血液系统的循环态和组织中的沉积态的形式存在,IC形成和许多因素有关,如ADA的滴度、分布、特异性、亲和力、形成循环IC的大小等^[12]。而ADA形成也受药物的浓度、注射部位、注射快慢等影响^[13],继而影响IC的形成。

已有研究表明影响IC形成的主要因素为ADA形成和补体系统的激活。通过对1988年到2010年欧盟许可上市的33个单克隆抗体类药品的研究,发现在灵长类动物和人类免疫原性评价中产生ADA一致性的概率为59%,在动物中免疫原性被高估的概率为30%,被低估的概率为11%^[10]。存在差异的原因是大多非人灵长类动物的ADA反应是针对可结晶(fragment crystallizable, Fc)片段,而人类药物诱导的ADA更多是结合互补决定区形成IC,ADA可以结合药物形成IC,也通过非ADA介导的补体激活来产生IC引起损伤。如1项关于食蟹猴静脉以及肌肉注射给予人源化IgG₁抗体GSK3050002的26周重复毒性试验中(每周剂量频率分别为0、30、300 mg·kg⁻¹),通过蛋白质印迹(Western blotting)法分析药物聚集体中的组成,发现该聚集体中存在高水平的C1q,结果暗示补体系统的激活,同时也能解释聚集体中为何存在C1q的下游信号C3补体成分。聚集体大小超过四聚体是结合大量C1q的条件之一,Western blotting法的分析结果提示该聚集体激活补体途径,其他检测结果显示动物体内产生ADA,同时表现为心脏、肾脏和肝脏IC沉积^[14],表明该药本身聚集可激活经典的补体系统形成IC。而非免疫性的IgG聚集会增大药物免疫原性或者模拟IC,影响因素可能是单抗药物合成、制剂化、生产过程中和塑料容器接触或者暴露在硅油中,增加了体内IC形成的风险^[15-16]。

在食蟹猴静脉给予人源化IgG₁单克隆抗体13周重复给药毒性试验中,第6周低、中剂量组共有6只动物可见补体活化片段C3a显著增加,同时这些

动物体内药物暴露量减少,而ADA/IC检测信号变强。研究结果表明在各个剂量组中均有IC介导的超敏反应,而且存在补体系统的激活^[17]。Van Schie等^[18]对ADA形成IC的分布和构象以及其对免疫系统激活水平的研究表明,静脉注射给药方式的药物浓度高于 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,体内药物和ADA的浓度短时间会处于高水平状态,容易形成大体积的IC,易引起不良反应。

在接受英夫利昔单抗长期治疗时,约10%患者体内会形成IC,于是进行了1项食蟹猴sc单次给药 $1.75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的英夫利昔单抗试验,以研究药物的IC形成、分布以及消除,结果发现血清存在循环IC以及肾脏中出现IC^[19]。此外,帕尼单抗(人源化的IgG₂型单克隆抗体)能够引起IC型的肾小球肾炎^[20],青霉素、青霉素胺以及金盐能引起肾脏IC沉淀^[21],反义寡核苷酸类药物能引起肾脏损伤(如2-甲氧基-乙基修饰的反义寡核苷酸)^[21],人源化的单克隆抗体(RN6G)可诱发IC形成并导致的疾病^[22],脂质化人源化重组蛋白(lipidated tetranectin-ApoA-I fusion protein, TN-ApoA-I)可导致肾脏IC出现^[23],奥滨尤妥珠单抗(Obinutuzumab)^[24]也可在动物体内形成IC。

1.2 IC的清除

机体的免疫反应和IC的性质决定IC在体内的清除,其中主要包括IC的大小,而IC的大小受到抗原抗体的化合价、抗原抗体的比率影响。

IC的大小受其抗原和抗体的化合价影响,单价抗原只能与1个抗体分子结合,抗原上可结合的表位增加会导致形成的IC相对分子质量和体积增大,提高机体清除难度。不同的物质结合化合价不同,如Fc段化合价为零,无和抗原结合的位点,一价态的单链抗体或抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)可以和抗原结合,二价态的免疫球蛋白有IgG、IgD、IgE、单体IgA,而二聚体IgA为四价态,以及更大价态的五聚体IgM,更高价态形成的IC通常较大^[12]。

Pierog等^[25]研究发现,食蟹猴sc给予单化合价的重组人类蛋白(每周2次, $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后,检测血清中出现的循环态IC,可见当抗原和抗体比值为0.25:1时,易形成较大的IC;当抗原和抗体比值为4:1时,往往形成小的IC。超过90%较小的可溶性IC在肝脏中被清除,少部分在脾脏中被清除。具有Fc片段大的IC通过Fc受体(Fc receptor, FcR)识别被巨噬细胞清除,易激活补体经典途径而被清除,小

于二聚体的IC基本不激活补体途径,IC沉积后会变得清除困难,可吸引可溶性IC沉积。Kijanka等^[26]对1种单克隆抗体IgG₁使用荧光片段进行标记后给小鼠皮下注射,观察药物聚集体的代谢,发现亚微米级别的聚集体可以部分滞留在注射部位,被免疫细胞识别或吸收进入体内,并在肝脏和脾脏被清除。

非人灵长类动物中,IC清除是双相的,由补体受体1(complementary receptor 1, CR1)结合状态转移到细胞上的FcR等一些C3b受体,C3b可以介导免疫球蛋白与红细胞上的CR1结合,红细胞结合型IC随血液循环转移到肝、脾脏等代谢器官而启动清除过程,其中肝库普弗细胞和脾巨噬细胞能通过FcR或CR1清除正常生理水平的红细胞结合型IC,对红细胞基本不造成损伤^[27]。在啮齿类动物中,IC的C3b特异识别受体不是CR,而是在大鼠的血小板、中性粒细胞、脾细胞以及小鼠的中性粒细胞和血小板上分布的膜结合因子H^[12]。IC的大小影响其清除,小的可溶性IC可能在循环中存在较长时间,因不满足低亲和力FcR的结合最小阈值,不会被补体和红细胞结合,并且可能脱离结合状态,将药物释放到循环中。通常大的IC是可以被巨噬细胞快速识别从而清除,而不会引起炎症;但有些大的可溶性IC会在循环中长时间停留,最终引起炎症反应^[28]。

1.3 IC的沉积

IC沉积成分包括药物、内源性免疫球蛋白以及补体成分,可能沉积在各种组织中,包括肾脏、肝脏、脾脏等过滤性的功能器官并与许多自身免疫疾病的发病机制相关,如系统性红斑狼疮就是典型事例^[29]。

给食蟹猴iv RN6G单克隆抗体6个月重复毒性试验中,每周给予0、10、30、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,通过对3只提前安乐死的中剂量组($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)食蟹猴检查,发现肝脏和肾脏部位存在IC沉淀,肾的病理学检查发现人IgG、猴IgG、C3a以及攻膜复合物SC5b-9沿肾小球基底膜呈颗粒状沉淀,电镜检查也发现肾小球基底膜有电子致密体存在^[22]。IC的沉积受到与特定组织吸引,如阳离子的抗原易在带有阴离子的部位(如膝关节、亚表皮连接点、肾小球基底膜上)沉积^[12],引起特定组织病理性变化,说明IC沉积与器官的功能和特异性有关。

食蟹猴iv给予人源化IgG₁6个月重复给药毒性实验中^[17],低剂量组的6只动物中有4只可见肾小

球肾炎,血清中检测到ADA和IC,同时伴有肾脏IC沉淀。高剂量组6只动物中有2只检测到血清中含有IC,有非肾脏器官处的炎性病变,3只动物可见肾小球肾炎并检测到血清和肾脏含有IC沉积,长期给药人源化IgG₁药物,动物表现为肾小球肾炎伴有IC沉淀。而食蟹猴iv脂质化人源化重组蛋白(TN-ApoA-I)3周重复给药毒性试验中^[23],给药方式为24 h缓慢iv,4天给药1次,所有食蟹猴血清中均检测出IC,100 mg·kg⁻¹组6只动物中有1只、400 mg·kg⁻¹组6只动物中有3只肾脏中可见IC沉积,100 mg·kg⁻¹组动物表现为血管炎症,400 mg·kg⁻¹组动物表现为血管炎症伴有肾小球肾炎,说明高剂量给药更易引起IC沉积且表现为肾小球肾炎。

联合使用生物技术药物,高剂量以及高的给药频率引起动物多个器官出现IC沉淀。食蟹猴静脉注射联合给予2种人源化IgG₂(给药频率分别为2天给药1次,每周1次)4周重复给药毒性试验中,高剂量组动物的多数器官存在IC沉积(如肝脏、肾脏、肺脏、肾小管和肾小球及动脉血管内皮)^[17]。

1.4 IC的毒性反应

免疫复合在机体内大多以两种存在形式,分别是循环IC(circulating immune complex, CIC)和沉积IC(deposited immune complex, DIC)。临床前研究中,通常可开展体内和体外试验进行检测。体外试验通常检测CIC和ADA,体内试验不仅检测血清中的ADA和CIC,同时检测组织器官中沉积的IC。IC能影响药物的药动学和药效学,毒性反应激活机体免疫系统引起组织炎症,或补体系统激活^[30],使组织的正常功能受到影响。

IC含有的Fc段能引起各种细胞产生反应,如巨噬细胞、多核粒细胞、肥大细胞等^[31]。FcR的多态性以及细胞表达分布差异影响IC的清除和病理效应,其中FcR可以分为高亲和力的FcγRI、低亲和力的FcγR IIA、FcγR IIIB、FcγR IIB、FcγR IIIB等^[32-33],低亲和力的FcγR IIB会负向调节循环中IC,使炎症促进细胞因子以及中性粒细胞脱颗粒释放抑制,导致IC清除不完全并在组织中形成沉积。研究表明在关节炎疾病中发现树突状细胞表面具有高表达的FcγR IIB^[34],该表型表达程度高、易导致IC沉积,使关节内炎症持续存在,影响疾病进程。而FcγR IIA被IC结合会激活炎症反应,FcγR IIA表达程度比较高的中性粒细胞和沉积的IC结合启动炎症反应,使肥大细胞激活,释放炎症因子,引起沉积部位的组织损伤^[35]。如肾小球血管处的IC沉积后,循环中的

单核细胞通过识别CD16被激活,随后促进中性粒细胞等炎症细胞与IC结合,引起炎症介质释放^[36],IC沉积后会引引起外部自由氧簇增加,促使未结合的中性粒细胞产生细胞脱颗粒和细胞因子^[37]。

补体系统激活损伤组织,如食蟹猴静脉注射obinutuzumab单克隆抗体6个月重复给药毒性试验中^[24],5 mg·kg⁻¹组6只动物中有1只可见血管炎,25、50 mg·kg⁻¹组均有3只动物可见肾小球肾炎,且伴有多器官炎症。采用免疫组化方法检测IC,对肾脏组织的猴IgG、猴IgM以及人补体C3进行表征,联合采用电镜观察,检测结果表明患有慢性肾小球肾炎的动物肾脏中存在IC沉积,C3沉积结果为补体激活介导损伤的证据。免疫组化检测发现肾小管上皮细胞、肾小管间质细胞以及肾小管周围细胞可见IgG和IgM颗粒状沉淀,炎症和补体激活继发于IC沉积,其沉积后激活补体系统和引起炎症反应^[38]。

食蟹猴静脉注射给予人源化IgG₁单克隆抗体13周(2周1次)重复给药毒性试验中,多数动物出现超敏反应,表现为肾小球肾炎、血管炎以及血管周围炎症^[17]。补体活性片段C3a的检测结果表明动物在给药后体内血清中IC存在且补体系统激活,这些炎症损伤与导致IC介导的补体激活反应有关。通过使用抗过敏药物、降低药物剂量和浓度以及放慢输液速度,可以降低实验动物由于给药形成IC介导的补体系统激活引起的过敏反应。

2 生物技术药物诱导免IC的检测方法

生物技术药物诱导的IC引起的病变仅通过常规组织病理学检查很难检测出来,IC来源主要为CIC和DIC,CIC常使用Western blotting法、尺寸排阻色谱法(size exclusion chromatograph, SEC)、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)进行检测,DIC常用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)、免疫荧光(immunofluorescence, IF)及电镜等方法进行检测。

2.1 CIC检测方法

血液等样品中的CIC可通过SEC、Western blotting或ELISA法进行检测分析。

SEC法是1种分离提纯蛋白的重要方法,常用SEC法分离血清中的IC,不会影响血清中IC的形成和分离时IC含量的损失,是准确分离IC的有效手段^[39]。1项关于抗人CCL20的人源化IgG₁抗体GSK3050002的毒理研究中,给食蟹猴iv 30 mg·kg⁻¹给药后1周,取血样通过SEC联用紫外和多角度光

散射等检测方法分离IC及进行相对分子质量和结构分析^[40]。通过SEC法也可以制定可视化的分析IC方法, Boyen等^[41]往血样中加入连有荧光标志物的Fab片段对IC进行表征, 基于SEC技术成功地对IC进行可视化, 但是不足之处仅能对10 mg·kg⁻¹浓度以上IC进行检测, 而且结合Fab片段会增大IC的相对分子质量, 对SEC分离IC产生干扰。

SEC法结合ELISA法检测手段能够克服血清中蛋白对SEC联用紫外检测结果的干扰^[42]。单用ELISA法也可以用于循环中IC的检测。已有研究表明, 给C57BL/6J小鼠sc 3种外源性蛋白(分别为50 mg·kg⁻¹牛血清白蛋白、10 mg·kg⁻¹单克隆抗体adalimumab、10 mg·kg⁻¹人源化单克隆抗体IgG, 给药频率均为2周1次) 13周毒理学研究中, 采用ELISA法可以在小鼠血清中检测包含补体C3结合IgG态的循环IC, 使用ELISA法证明了其中高剂量牛血清白蛋白组的动物体内具有更高的包含C3结合IgG态的循环IC水平^[43]。

ELISA法可以用来测定实验动物血清中CIC的含量, 该方法检测结果专属性强、灵敏度高、稳定性好、易实现标准化流程, 但需要可靠的标准品来制定标准曲线, 当标准品缺失情况下, 该方法获得的结果准确度难以保证, 且验证结果的过程复杂^[44]。

Western blotting法可以对蛋白进行定性和定量分析, 分析蛋白混合物中某一成分的含量, 如对食蟹猴静脉及肌肉注射给予人源化IgG₁抗体GSK3050002的26周重复毒性实验中(每周剂量频率分别为0、30、300 mg·kg⁻¹), 通过Western blotting法分析GSK3050002的聚集体中组成, 结果表明聚集集体中含有大量的补体C1q和C3, 推测聚集集体能够激活补体系统^[14]。

2.2 DIC检测

沉积IC在病变上的影响程度可通过沉积态的IC在组织中定位进行判断, 常采用IHC、IF及电镜等方法表征组织中IC沉积的数量和位置。

食蟹猴静脉注射obinutuzumab单克隆抗体6个月重复给药毒性实验中^[45], 对所有动物的IgG、IgM、C3进行了免疫组化染色以及IgG免疫荧光, 根据镜检结果电镜检查, 食蟹猴肾脏的IgG、IgM和C3的IHC以及IgG免疫荧光染色发现肾小球肾炎动物的上述各项检测结果多呈阳性, 主要为肾小球基底膜以及肾小球系膜有特征颗粒状的IC沉淀, 电镜结果显示肾小球基底膜存在大量电子致密体。Boysen等^[46]在C57BL/6J小鼠sc给予牛血清白蛋白

13周重复给药毒性实验中, 采用IHC法检测补体活化片段C3d, 结果发现主要在肾小管以及肾小球基底膜出现颗粒状IC沉淀, IF法检测C3d, 主要在肾小管上皮细胞膜上存在荧光染色。

IHC和IF都是通过免疫原理识别定位组织细胞中的抗原靶点, 能够较灵敏、特异性地准确定位组织靶抗原, 其中一抗的选择尤为重要。一抗的灵敏性、特异性是IHC和IF的基础, 一抗的好坏决定了抗原的定位能否成功。IHC的标本能够长时间保存, 但只能定位1个表位, 而IF可以同时采用不同一抗组合表征不同的靶点, 在1个标本中显示出多个表位的荧光, 但IF的标本会发生荧光淬灭, 不能长时间保存, 需要及时进行图像采集。

电镜是研究细胞、组织、器官等非常重要的工具, 通过聚焦电子束穿过样本, 然后在荧光屏上成像, 相较普通光学显微镜具有更高的分辨率和放大率, 能更好地观察到细胞组织器官的精细结构, 无论是生理学还是病理学研究中可以提供细胞形状和化学组成信息, 因此在研究IC引起的肾脏等疾病中展现出良好的应用, 通过特定处理后的组织在电镜下进行表征, 能够观察到IC沉积呈电子致密物^[47]。电镜针对肾小球沉积表征获得最多的信息, 但局限性是高分辨率会导致视野局限, 观察范围比较小^[48], 需要结合常规的HE染色、IHC和IF等定位1个大致的动物范围。如食蟹猴iv Obinutuzumab单克隆抗体6个月重复给药毒性实验和食蟹猴静脉注射RN6G单克隆抗体6个月重复毒性实验^[22,24], 上述2个实验中都对动物组织进行了一系列的IHC和IF的检测, 在这些基础上增加了电镜检测, 前期的动物范围确定后可以通过电镜观察到肾小球基底膜存在电子致密体。

3 结语

生物技术药物可引起机体产生免疫原性, 形成的抗原-抗体复合物可能会在肾小球沉积, 从而诱导炎症, 造成肾损伤。IC沉积导致的肾损伤是该类药物临床前安全性评价中需关注的重点之一。在生物技术药物的临床前安全性评价试验中, 由于免疫原性的产生, 继而可能形成IC。生物技术药物诱导的IC在体内形成、清除、沉积和药物的理化性质、药物的浓度、给药部位、ADA的滴度、抗原抗体比值以及机体特异性有关。IC的致病机制可能通过诱导机体炎症反应, 导致急性或慢性超敏反应, 进而影响细胞、组织和器官的正常生理功能, 诱导细胞凋亡、组织炎症以及器官功能变化。

当前的检测技术较为常用的是通过ELISA法、SEC和Western blotting检测体外ADA和CIC,以及通过IHC、IF和电镜等方法检测体内的沉积态IC。免疫组织化学和免疫荧光可用于分析猴IgG、IgM和C3等在肾脏中的表达,电镜能表征肾小球以及各种器官的微观精细结构,表征IC的空间位置分布,Western blotting、SEC及ELISA可用于离体血清的中IC的定性或定量的分析测定。电镜结合免疫组化、免疫荧光表征疾病动物组织中IC的存在,可作为判断IC与疾病进展的有力依据,与其他的尿液分析、血液检查等方法相结合佐证IC与疾病的相关性,但上述几种方法均较复杂、步骤较多或检查价格昂贵。

总之,临床前药物安全性评价试验中生物技术药物诱导的IC已经被广泛关注,并且仅通过常规组织病理学检查通常很难发现,其形成机制尚未完全明确,早期、简便、灵敏的检测技术尚未建立,有待以后深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(7): 491-495.
- [2] Urquhart L. Top companies and drugs by sales in 2020 [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(4): 253.
- [3] 郑丽舒,段招军,罗迪贤,等.干扰素的发展历史、现状与展望[J].皮肤科学通报,2021,38(6): 479-484.
Zheng L S, Duan Z J, Luo D X, et al. The development history, current situation and prospect of interferon [J]. Dermatol Bull, 2021, 38(6): 479-484.
- [4] 庞传超,王爽,姜萍,等.抗人白介素-8单克隆抗体乳膏治疗寻常型银屑病临床观察[J].中国麻风皮肤病杂志,2003(6): 630-631.
Pang C C, Wang S, Jiang P, et al. Clinical observation of anti-human interleukin-8 monoclonal antibody cream in the treatment of common psoriasis [J]. China J Lepr Skin Dis, 2003(6): 630-631.
- [5] Grilo A L, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market [J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(1): 9-16.
- [6] Vahle J L. Immunogenicity and immune complex disease in preclinical safety studies [J]. Toxicol Pathol, 2018, 46(8): 1013-1019.
- [7] Nydegger U E. Immune complex pathophysiology [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1109: 66-83.
- [8] FDA. Immunogenicity Testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection [EB/OL]. (2019-01) [2021-08-01]. <https://www.fda.gov/media/119788/download>.
- [9] Hansel T T, Kropshofer H, Singer T, et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(4): 325-238.
- [10] Van Meer P J, Kooijman M, Brinks V, et al. Immunogenicity of mAbs in non-human primates during nonclinical safety assessment [J]. Mabs, 2013, 5(5): 810-816.
- [11] Lin Z, Huang Y, Jiang H, et al. Functional differences and similarities in activated peripheral blood mononuclear cells by lipopolysaccharide or phytohemagglutinin stimulation between human and cynomolgus monkeys [J]. Annals Translat Med, 2021, 9(3): 257.
- [12] Rojko J L, Evans M G, Price S A, et al. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: Review and case studies [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(4): 725-764.
- [13] 黄瑛,姜华,李路路,等.生物技术药物免疫原性评价的技术发展概述[J].药物评价研究,2017,40(7): 999-1004.
Huang Y, Jiang H, Li L L, et al. Technology development of immunogenicity assessment for biopharmaceuticals [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(7): 999-1004.
- [14] Laffan S B, Thomson A S, Mai S, et al. Immune complex disease in a chronic monkey study with a humanised, therapeutic antibody against CCL20 is associated with complement-containing drug aggregates [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231655.
- [15] Kahook M Y, Liu L, Ruzyczki P, et al. High-molecular-weight aggregates in repackaged bevacizumab [J]. Retina, 2010, 30(6): 887-892.
- [16] Liu L, Ammar D A, Ross L A, et al. Silicone oil microdroplets and protein aggregates in repackaged bevacizumab and ranibizumab: Effects of long-term storage and product mishandling [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(2): 1023-1034.
- [17] Kronenberg S, Husar E, Schubert C, et al. Comparative assessment of immune complex-mediated hypersensitivity reactions with biotherapeutics in the non-human primate: Critical parameters, safety and lessons for future studies [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2017, 88: 125-137.
- [18] Van Schie K A, Kruithof S, De Ooijevaar Heer P, et al. Restricted immune activation and internalisation of anti-idiotypic complexes between drug and antidrug antibodies [J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(10): 1471-1479.
- [19] Rojas J R, Taylor R P, Cunningham M R, et al.

- Formation, distribution, and elimination of infliximab and anti-infliximab immune complexes in cynomolgus monkeys [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313(2): 578-585.
- [20] Izzedine H, Boostandoost H, Mathian A. Panitumumab-induced immune complex glomerulonephritis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2017, 69(2): 320-321.
- [21] Engelhardt J A. Comparative renal toxicopathology of antisense oligonucleotides [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2016, 26(4): 199-209.
- [22] Heyen J R, Rojko J, Evans M, et al. Characterization, biomarkers, and reversibility of a monoclonal antibody-induced immune complex disease in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 42(4): 765-773.
- [23] Regenass-Lechner F, Staack R F, Mary J L, et al. Immunogenicity, inflammation, and lipid accumulation in cynomolgus monkeys infused with a lipidated tetranectin-ApoA-I fusion protein [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 150(2): 378-389.
- [24] Husar E, Solonets M, Kuhlmann O, et al. Hypersensitivity reactions to obinutuzumab in cynomolgus monkeys and relevance to humans [J]. *Toxicol Pathol*, 2017, 45(5): 676-686.
- [25] Pierog P, Krishna M, Yamniuk A, et al. Detection of drug specific circulating immune complexes from *in vivo* cynomolgus monkey serum samples [J]. *J Immunol Methods*, 2015, 416: 124-136.
- [26] Kijanka G, Bee J S, Bishop S M, et al. Fate of multimeric oligomers, submicron, and micron size aggregates of monoclonal antibodies upon subcutaneous injection in mice [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(5): 1693-1704.
- [27] Taylor R P, Ferguson P J, Martin E N, et al. Immune complexes bound to the primate erythrocyte complement receptor (CR1) via anti-CR1 mAbs are cleared simultaneously with loss of CR1 in a concerted reaction in a rhesus monkey model [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997, 82(1): 49-59.
- [28] Krishna M, Nadler S G. Immunogenicity to biotherapeutics — The role of anti-drug immune complexes [J]. *Front Immunol*, 2016, 7(21): 1-13.
- [29] Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease [J]. *Lancet*, 2013, 382(9894): 819-831.
- [30] Frazier K S, Obert L A. Drug-induced glomerulonephritis: The spectre of biotherapeutic and antisense oligonucleotide immune activation in the kidney [J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46(8): 904-917.
- [31] Mayadas T N, Tsokos G C, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury [J]. *Circulation*, 2009, 120(20): 2012-2024.
- [32] Giragossian C, Clark T, Piché-Nicholas N, et al. Neonatal Fc receptor and its role in the absorption, distribution, metabolism and excretion of immunoglobulin G-based biotherapeutics [J]. *Curr Drug Metab*, 2013, 14(7): 764-790.
- [33] Opolka-Hoffmann E, Jordan G, Otteneider M, et al. The impact of immunogenicity on therapeutic antibody pharmacokinetics: A preclinical evaluation of the effect of immune complex formation and antibody effector function on clearance [J]. *Mabs*, 2021, 13(1): 1995929.
- [34] Smith K G, Clatworthy M R. Fc gamma RIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(5): 328-343.
- [35] Cloutier N, Tan S, Boudreau L H, et al. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: The microparticle-associated immune complexes [J]. *Embo Mol Med*, 2013, 5(2): 235-249.
- [36] Turner-Stokes T, Garcia Diaz A, Pinheiro D, et al. Live imaging of monocyte subsets in immune complex-mediated glomerulonephritis reveals distinct phenotypes and effector functions [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(11): 2523-2542.
- [37] Jakus Z, Németh T, Verbeek J S, et al. Critical but overlapping role of Fc gamma RIII and Fc gamma RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes [J]. *J Immunol*, 2008, 180(1): 618-629.
- [38] Tawara T, Hasegawa K, Sugiura Y, et al. Complement activation plays a key role in antibody-induced infusion toxicity in monkeys and rats [J]. *J Immunol*, 2008, 180(4): 2294-2298.
- [39] Hong P, Koza S, Bouvier E S. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2012, 35(20): 2923-2950.
- [40] Thomson A S, Mai S H, Bouma G, et al. Structure and functional characterization of a humanized anti-CCL20 antibody following exposure to serum reveals the formation of immune complex that leads to toxicity [J]. *J Immunol*, 2021, 206(5): 1067-1076.
- [41] Boysen M, Schlicksupp L, Dreher I, et al. SEC based method for size determination of immune complexes of therapeutic antibodies in animal matrix [J]. *J Immunol Res*, 2016, doi: 10.1155/2016/9096059.
- [42] Hoffmann E, Jordan G, Lauer M, et al. Generation, characterization, and quantitative bioanalysis of drug/anti-drug antibody immune complexes to facilitate dedicated

- in vivo* studies [J]. Pharm Res, 2019, 36(9): 129.
- [43] Boysen L, Lauritzen B, Viuff B M, et al. An ELISA for detection of complement-bound circulating immune complexes in mice [J]. J Immunotoxicol, 2019, 16(1): 82-86.
- [44] Hartman H, Wang Y, Schroeder HW, et al. Absorbance summation: A novel approach for analyzing high-throughput ELISA data in the absence of a standard [J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0198528.
- [45] Husar E, Solonets M, Kuhlmann O, et al. Hypersensitivity reactions to obinutuzumab in cynomolgus monkeys and relevance to humans [J]. Toxicol Pathol, 2017, 45(5): 676-686.
- [46] Boysen L, Viuff B M, Landsy L H, et al. Formation and glomerular deposition of immune complexes in mice administered bovine serum albumin: Evaluation of dose, frequency, and biomarkers [J]. J Immunotoxicol, 2019, 16(1): 191-200.
- [47] Burattini S, Falcieri E. TEM: A precious evergreen approach to cell biology and pathology [A]// International Conference on Trends in Material Science and Inventive Materials: ICTMIM 2020 [C]. Coimbatore: AIP Conference Proceedings, 2020-09-03.
- [48] Leach M W, Rottman J B, Hock M B, et al. Immunogenicity/hypersensitivity of biologics [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(1): 293-300.

[责任编辑 李红珠]