

治疗用乙型肝炎腺病毒注射液 TC007 食蟹猴免疫原性、免疫毒性和生物分布研究

窦德虎^{1,2}, 李建祥^{1*}, 张雪峰²

1. 苏州大学医学部公共卫生学院, 江苏 苏州 215123

2. 江苏鼎泰药物研究股份有限公司, 江苏 南京 211800

摘要: 目的 重复给予食蟹猴治疗用乙型肝炎腺病毒注射液 (TC007), 观察其免疫原性、免疫毒性、生物分布。方法 普通级食蟹猴随机分为溶媒对照组, TC007低、中、高剂量 (1.0×10^9 、 1.0×10^{10} 、 1.0×10^{11} VP/只) 组, Ad5-Null (1.0×10^{11} VP/只, 空载对照) 组, 每组 10 只, 背部肩胛区 sc 给药, 每周给药 1 次, 共 7 次, 停药恢复 28 d。应用流式细胞仪进行外周血中淋巴细胞分群检测, 检测经 TC007 刺激后分泌干扰素- γ (IFN- γ) 的特异 T 细胞水平; 免疫组化检测肝脏 IFN- γ 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2) 表达; 试剂盒法测定血清中抗 Ad5 抗体的中和活性, 补体成分 C3、C4 及免疫复合物 (CIC) 水平; 给药期及恢复期结束, 进行多个组织取材, HE 染色后进行病理学阅片, TaqMan 探针 qPCR 法进行 Ad5 分布检测。结果 与溶媒对照组比较, 各组动物血浆中 CD3⁺CD8⁺ T 细胞、CD4⁺CD8⁺、CD3⁻CD56⁺ NK 细胞、CD3⁺CD56⁺ NKT 细胞、巨噬细胞 CD45⁺CD14⁺ 百分率均未见明显异常; Ad5-Null 组特异 T 细胞均未见明显改变, TC007 各剂量组针对 HBV 3 种抗原 (Core、Env、Pol) 分泌 IFN- γ 的特异性 T 细胞水平显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 停药恢复末期 (d68), 效应值仍略高; TC007 各剂量组和 Ad5-Null 组食蟹猴肝脏组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 均高于溶媒对照组, 且呈剂量相关性, 但 TC007 各剂量组与 Ad5-Null 组比较未见明显差异; TC007 各剂量、Ad5-Null 组动物均产生抗 Ad5 抗体, 39/40 例具有中和活性; TC007 各剂量组补体 C3、C4 未见明显异常, 高剂量组 CIC 轻微升高 ($P < 0.05$)。Ad5 主要分布于给药局部, 在腋下淋巴结有少量分布, 其他组织未见分布。TC007 及 Ad5-Null 组均可见给药局部轻微至轻度皮下组织炎性细胞浸润, 停药恢复 28 d, 病变可见明显恢复, 其他组织未见病理学改变。结论 TC007 在食蟹猴体内具有一定免疫原性, 抗 Ad5 抗体具有中和活性, 高剂量组可见轻微免疫复合物形成, 未见免疫器官损伤, 生物分布主要集中于给药部位, 可产生特异性 T 细胞。

关键词: 治疗用乙型肝炎腺病毒注射液; 腺病毒; 食蟹猴; 免疫原性; 免疫毒性; 生物分布

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 10-1810-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.011

Immunogenicity, immunotoxicity, and biodistribution in cynomolgus monkey with hepatitis B adenovirus injection TC007

DOU Dehu^{1,2}, LI Jianxiang¹, ZHANG Xuefeng²

1. Soochow University, Suzhou 215123, China

2. Jiangsu TRIPOD Preclinical Research Laboratories Co, Ltd., Nanjing 211800, China

Abstract: Objective In this study, 6-week repeated sc injection to cynomolgus monkey with TC007 to assess the immunogenicity, immunotoxicity, and vivo biodistribution. **Methods** Ordinary grade cynomolgus monkeys were randomly divided into solvent control group, TC007 low, medium, and high doses (1.0×10^9 , 1.0×10^{10} , 1.0×10^{11} VP / rat) group, Ad5-Null (1.0×10^{11} VP / rat, no-load control) group, 10 monkeys in each group, in the back scapular region was sc given once a week for 7 weeks, and the withdrawal was resumed for 28 d. Flow cytometry was used to detect the lymphocyte population in peripheral blood and the level of IFN- γ -secreting T cells stimulated by TC007; immunohistochemistry was used to detect the expression of IFN- γ /TNF- α /IL-2 in liver; kit method was used to determine the neutralization activity of anti-Ad5 antibody in serum and the levels of complement components C3, C4 and immune complex (CIC). At the end of convalescence, multiple tissue samples were taken, histopathological examination was performed after HE staining, and the distribution of Ad5 was detected by TaqMan probe qPCR. **Results** Compared with solvent

收稿日期: 2018-06-04

第一作者: 窦德虎, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: doudehu@btrchina.com

*通信作者: 李建祥, 苏州大学公共卫生学院博士生导师, 教授。E-mail: aljxcr@suda.edu.cn

control group, the percentage of CD3⁺CD8⁺T cells, CD4⁺/CD8⁺, CD3⁺CD56⁺ NK cells, CD3⁺CD56⁺NKT cells and macrophage CD45⁺CD14⁺ in plasma of all groups were not significantly abnormal; the specific T cells of Ad5-Null group were not significantly changed, and the level of specific T cells targeted the three antigens of HBV (Core, Env, and Pol) secreting IFN- γ increased significantly in TC007 group, and the effect remained slightly higher after 4 weeks of withdrawal and recovery. The levels of IFN- γ /TNF- α /IL-2 in liver tissues of cynomolgus monkeys in TC007 and Ad5-Null groups were higher than those in the solvent control group in a dose-dependent manner; But there was no significant difference between TC007 and Ad5-Null groups. Anti-Ad5 antibodies were produced in all the animals in Ad 5-Null group, and 39 of 40 cases had neutralization activity. Complement C3 and C4 were not abnormal in TC007 different dose groups, but CIC was slightly elevated in high dose group ($P < 0.05$). Ad5 was mainly distributed in the local administration, but there was a little distribution in the axillary lymph nodes with no distribution in other tissues. In TC007 and Ad5-Null groups, mild subcutaneous inflammatory cell infiltration was stopped for 28 days, and the pathological changes were obviously recovered. No pathological changes were found in other tissues. **Conclusion** TC007 has a certain immunogenicity in cynomolgus monkeys and anti-Ad5 antibody has neutralizing activity. In high-dose group, slight immunocomplex formation can be found. There is no damage to immune organs. The biodistribution is mainly concentrated at the site of administration. Specific T cells can be found in high dose group.

Key words: hepatitis B vaccine; adenovirus; cynomolgus monkey; immunogenicity; immunotoxicity; biodistribution

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界性流行,不同地区HBV感染的流行强度差异较大。HBV感染机体后可导致不同程度的肝脏损伤,临床上表现为急性肝炎、慢性肝炎、重型肝炎等,可进一步发展为肝硬化甚至肝癌,HBV感染仍是威胁公众健康的难题^[1]。乙肝表面抗原(HBsAg)清除和乙肝分泌型抗原(HBeAg)血清转化被认为是乙肝治疗有效的标志。当前用于慢性乙肝病毒治疗的药物分为两类:一类是免疫调节剂,包括干扰素- α (IFN- α)和聚乙二醇 IFN- α ;另一类是核苷类似物和核苷酸类似物前体药,现有治疗药物均有各自的优缺点。目前,有很多治疗性疫苗处在临床前及临床开发阶段,治疗性疫苗在不破坏宿主细胞的前提下,诱导机体进行免疫应答,消除乙肝病毒,且有希望清除共价、闭合、环状 DNA 分子(covalently closed circular DNA, cccDNA)^[2],达到治愈肝炎目的。治疗用乙型肝炎腺病毒注射液(代号 TC007)是以 5 型腺病毒(Ad5)为载体的重组治疗性注射液,能在一定程度上模拟病原在体内的复制过程,长时间地反复刺激免疫系统,从而诱导强烈、持久、全面的免疫反应,清除乙肝病毒。本研究通过重复给予食蟹猴 TC007,初步考察其免疫原性、免疫毒性及体内生物分布情况,观察针对 HBV 3 种抗原(Core、Env、Pol)分泌 IFN- γ 的特异性 T 细胞,为安全性评价提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

普通级食蟹猴 50 只,雌雄各半,体质量 2.5~3.2 kg,约 48 月龄,由海南新正源生物科技有限公司

提供,实验动物生产许可证号 SCXK(琼)2011-0002。

1.2 药物及主要试剂

TC007,批号 S150107,规格 1.0×10^9 、 1.0×10^{10} 、 1.0×10^{11} VP/mL;对照品:腺病毒空载体(代号 Ad5-Null),均来自天士力创世杰(天津)生物制药有限公司。猴 IFN- γ ELISpot 试剂盒,购自 Mabtech 公司;FITC Mouse Anti-Monkey CD3、APC Mouse Anti-Monkey CD8、PE Mouse Anti-monkey CD4、APC Mouse Anti-Monkey CD14、PE - Cy7 Mouse Anti-Monkey CD45、PE Mouse Anti-Monkey CD56 等,购自 BD 公司。

1.3 主要仪器

流式细胞仪,BD FacsCalibur;生物安全柜,HF SAFE-1500,上海力电科学仪器;离心机,By320A,北京北洋医疗器械有限公司;超纯水系统,EXLIX-10, MILIPORE;CO₂培养箱,Forma SeriesII, Thermo Forma 公司;-80 °C 冰箱,MDF-38ZE, SANYO。

2 方法

2.1 动物分组及给药

普通级食蟹猴 50 只随机分为溶媒对照组,TC007 低、中、高剂量(1.0×10^9 、 1.0×10^{10} 、 1.0×10^{11} VP/只)组,Ad5-Null(1.0×10^{11} VP/只,空载对照)组,共 5 组,每组 10 只;背部肩胛区 sc 给药,1 mL/只,每周给药 1 次,共 7 次,停药恢复 28 d,开始给药当天记为 d1。

2.2 评价指标

2.2.1 淋巴细胞分群检测 于 d7、d21、d45 及 d68 用一次性肝素钠负压管,经由后肢采集静脉血,采

血量约 1.0 mL,应用流式细胞仪检测外周血中如下指标,T细胞:检测 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ T细胞百分率;自然杀伤(NK)细胞:检测 NK细胞(CD3⁻CD56⁺)和 NKT(CD3⁺CD56⁺)细胞百分率;巨噬细胞 CD45⁺CD14⁺百分率。

特异 T 细胞及细胞因子检测:在 d7、d35、d45、d68 时间点一次性肝素钠负压采血管,经由后肢采集静脉血,采血量约 3.0 mL,轻轻手动摇匀,不要剧烈震荡。采用固相酶联免疫斑点技术(ELISpot),应用 Mabtech 公司的 Monkey IFN- γ 流式 ELISpot 试剂盒,检测外周血淋巴细胞经 TC007 刺激后分泌 IFN- γ 的特异 T 细胞。

2.2.2 抗 Ad5 抗体、活性、免疫复合物分析 给药前、d7、d21、d45、d68 用一次性干管,经由后肢采集静脉血,采血量约 1 mL;3 500 r/min、4 °C 离心 10 min,收集血清(分装成 2 管),测定动物血清样本中抗 Ad5 抗体的中和活性,方法如下:取空白 Nunc 酶标板条,用包被缓冲液配制 TC007 进行包被,每孔包被 100 μ L;每孔加入 350 μ L 的洗液洗板 3 遍,拍干;在对应孔内分别加入 100 μ L 的血清样品,封板膜封板,37 °C 200 r/min 振荡孵育 1 h;洗板后每孔加入 100 μ L 鼠抗猴抗体,封板膜封板,37 °C 100 r/min 振荡孵育 1 h;洗板后加 HRP 标记的三抗:在相应的孔中加入 100 μ L Hrp 标记的羊抗鼠,37 °C 100 r/min 振荡孵育 1 h;洗板后每孔加 100 μ L 底物,避光,封板膜封板,37 °C 孵育 15 min;每孔加入 50 μ L 终止液终止反应,放入酶标仪,利用酶标仪震荡功能混匀,工作波长 550 nm、参比波长 620 nm 下读板。

给药前、d10、d45 及 d68 用一次性干管,经由后肢采集静脉血,采血量约 1 mL;3500 rpm、4 °C 离心 10 min,收集血清。采用间接 ELISA 试剂盒检测血清补体成分 C3、C4,操作步骤参考说明书;给药前、d44 采用 ELISA 检测试剂盒对血清免疫复合物(CIC)进行检测,操作步骤参考说明书。

2.2.3 HE 染色及 Ad5 分布检测 d46 每组剖检 6 只动物(3 雌 3 雄),d71 每组剖检 4 只动物(2 雌 2 雄),分别取脑、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、给药局部、淋巴结(腋下、肠系膜)、胸腺、睾丸/卵巢、血液、骨髓,剪取部分组织用无菌水冲洗后,立即放入液氮中,取材完成后转移至 -70 °C 冰箱冻存。

对心、肝、脾、肺、肾、肠道、生殖器官等组织进行石蜡包埋,切片,制片,HE 染色;免疫组化检测肝脏 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 表达;进行病理学阅片。

d46、d71 分别取脑、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、给

药局部、淋巴结(腋下、肠系膜)、胸腺、睾丸/卵巢、血液、骨髓,进行 Ad5 分布检测。用基因组 DNA 小量抽提试剂盒及 Magen 中量提取试剂盒,对组织及血液中 DNA 进行提取,操作严格参照试剂盒说明书进行;用 TaqMan 探针 qPCR 法对各组织中 TC007 和 Ad5-Null 进行定量,操作严格按照 QIAGEN 公司的 QuantiTect® Probe PCR Kit 说明书进行。

2.3 统计学分析

数据结果经 SPSS 13.0 软件或 Excel 统计处理,对淋巴细胞分群、CIC 浓度、补体 C3、C4、IFN- γ 数据先进行正态分布检验,对于正态分布的数据进行方差齐性检验,若方差齐则做单因素方差分析,有显著性差别($P < 0.05$),则做 Dunnett 检验;若非正态分布或方差不齐($P < 0.05$),则进行非参数检验(Kruskal-Wallis H, K-W H),如 K-W H 检验有统计学差异($P < 0.05$),则使用非参数两两检验。

3 结果

3.1 猴血浆淋巴细胞分群

与溶媒对照组比较,TC007 低、中、高剂量组,Ad5-Null 组动物血浆中 CD3⁺CD8⁺T 细胞、CD4⁺CD8⁺、CD3⁻CD56⁺NK 细胞、CD3⁺CD56⁺NKT 细胞、巨噬细胞 CD45⁺CD14⁺百分率均未见明显异常。

3.2 各剂量组特异 T 细胞表达情况

与溶媒对照组比较,Ad5-Null 组特异 T 细胞均未见明显改变;d7、d35、d45 TC007 各剂量组针对 HBV 3 种抗原(Core、Env、Pol)分泌 IFN- γ 的特异性 T 细胞水平显著增加,差异具有统计学差异($P < 0.05$ 、 0.01 , $n = 10$)。停药恢复末期(d68),TC007 各剂量组的上述效应值仍略高于溶媒对照组($P < 0.05$ 、 0.01 , $n = 4$),结果见表 1。

3.3 肝组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 表达情况

与溶媒对照组比较,末次给药后,TC007 1.0×10^{11} 组和 Ad5-Null 1.0×10^{11} 组肝脏组织中 IFN- γ 的表达水平明显升高;给药结束以及停药恢复后,TC007 各剂量组和 Ad5-Null 组食蟹猴肝脏组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 均不同程度高于溶媒对照组,且阳性程度随着剂量的增加而呈增加趋势;但 TC007 各剂量组与空载体 Ad5-Null 组比较,阳性程度未见明显差异。

3.4 抗 Ad5 抗体分析

d7、d21、d45,TC007 低、中、高剂量组及 Ad5-Null 组均可见抗 Ad5 抗体产生,且滴度随剂量增加呈现升高趋势;停药恢复末期(d68),各剂量组动物抗体滴度依然较高。

表1 TC007重复给予食蟹猴后血浆效应T细胞表达情况(x±s)

Table 1 Expression of effector T cells in plasma after repeated administration of TC007 to cynomolgus monkeys (x±s)

组别	剂量/ (VP·只 ⁻¹)	Core3 效应T细胞/ Sports·(10×10 ⁶ PBMC) ⁻¹				Env3 效应T细胞/ Sports·(10×10 ⁶ PBMC) ⁻¹				Pol8 效应T细胞/ Sports·(10×10 ⁶ PBMC) ⁻¹	
		d7	d35	d45	d68	d7	d35	d45	d68	d7	d35
溶媒对照	—	11±6	8±6	9±5	13±8	12±4	10±8	9±6	20±8	12±8	7±6
TC007	1.0×10 ⁹	67±32**	123±51**	159±51**	21±9	97±44**	149±92**	140±66**	27±14	78±54**	183±118**
	1.0×10 ¹⁰	155±80**	405±202**	416±183**	32±8*	197±52**	378±213**	399±225**	27±14	183±112**	397±225**
	1.0×10 ¹¹	300±178**	431±251**	429±179**	44±12**	435±106**	401±250**	418±319**	42±7*	393±200**	394±209**
Ad5-null	1.0×10 ¹¹	12±6	13±13	13±7	15±2	26±34	13±8	8±5	16±4	17±8	13±14

组别	剂量/ (VP/只)	Pol8 效应T细胞/ Sports·(10×10 ⁶ PBMC) ⁻¹		Pol11 效应T细胞/ Sports·(10×10 ⁶ PBMC) ⁻¹		Pol13 效应T细胞/ Sports·(10×10 ⁶ PBMC) ⁻¹					
		d45	d68	d7	d35	d45	d68	d7	d35	d45	d68
溶媒对照	—	10±8	12±2	11±5	9±5	9±6	15±4	6±5	9±6	8±7	14±8
TC007	1.0×10 ⁹	137±61**	13±7	89±33**	141±53**	156±78**	18±6	76±41**	159±69**	166±80**	16±6
	1.0×10 ¹⁰	380±200**	19±13	194±57**	398±153**	365±144**	25±9	130±67**	342±127**	358±189**	19±12
	1.0×10 ¹¹	362±202**	32±18	322±130**	385±149**	392±180**	29±12	293±107**	448±154**	380±174**	23±16
Ad5-null	1.0×10 ¹¹	7±4	10±8	23±30	12±9	8±7	20±9	11±6	14±6	8±7	8±6

与溶媒对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs solvent control group

抗Ad5抗体中和活性的数据结果显示,39/40例动物(TC007 1.0×10⁹、1.0×10¹⁰、1.0×10¹¹、Ad5-Null组)抗Ad5抗体均具有中和活性;相同稀释度的动物血清的中和效应滴度吻合,且Ad5-Null组与高剂量组中和效应无差异。

3.5 补体检测

与溶媒对照组比较,d10、d45 TC007各剂量组补体C3、C4水平未见剂量相关性差异;停药期间,TC007各剂量组、Ad-null组C3、C4均未见异常。

3.6 CIC结果

与自身给药前及溶媒对照组比较,Ad5-Null组CIC水平未见明显异常;TC007高剂量组CIC与自身给药前及溶媒对照组比较均可见轻微升高(P<0.05)。见表2。

3.7 重复给药后Ad5生物分布情况

生物分布检测结果显示,Ad5主要分布于给药局部(TC007 1.0×10¹¹ VP/只组为9 080.3 Copies/μg DNA),在腋下淋巴结有少量分布(TC007 1.0×10¹¹ VP/只组为244.5 Copies/μg DNA),心脏、肝脏、脾脏、生殖系统及肾脏等组织未见分布;TC007 1.0×10¹¹ VP/只组给药局部Ad5分布量远高于1.0×10⁹ VP/只组(609.9 Copies/μg DNA)。停药恢复4周(d71),检测到给药局部仍有少量Ad5分布(1.0×10¹¹ VP/只组为2 325.0 Copies/μg DNA),显示Ad5生物分布呈明显消除趋势。

3.8 重复给药后组织病理学结果

给药末期溶媒对照组未见异常,TC007 1.0×10⁹、1.0×10¹⁰、1.0×10¹¹ VP/只组及Ad5-Null组均可见

表2 TC007重复给予食蟹猴后各剂量组血清CIC浓度(x±s, n=10)

Table 2 CIC concentration in Serum of group after repeated administration of TC007 to cynomolgus monkeys (x±s, n=10)

组别	剂量/ (VP·只 ⁻¹)	CIC/(μg·mL ⁻¹)	
		给药前	给药d44
溶媒对照	—	22.076±7.150	25±5.097
TC007	1.0×10 ⁹	23.024±6.116	26.417±3.790
	1.0×10 ¹⁰	29.476±6.193	30.986±6.595
	1.0×10 ¹¹	24.908±10.104	32.542±6.982**
Ad5-Null	1.0×10 ¹¹	14.318±4.583	16.742±3.917

与溶媒对照组比较: *P<0.05;与自身给药前比较: #P<0.05

*P<0.05 vs solvent control group; #P<0.05 vs same group before administration

给药局部轻微至轻度皮下组织炎性细胞浸润,以浆细胞、淋巴细胞为主,停药恢复4周,病变可见明显恢复。其他组织未见病理学改变。见图1。

图1 给药局部病理学结果(HE染色,×40)

Fig. 1 Local pathological results of administration (HE stain, × 40)

4 讨论

HBV治疗性疫苗作为一种长效抗病毒治疗或辅助治疗方式,一直处于研发状态^[3],有望打破机体的免疫耐受状态,最终清除病毒感染,在乙肝转归病人的肝脏及血中,HBV特异性CD4及CD8 T细胞明显高于慢性乙肝患者^[4],但是在临床定义的表型组之间,HBV特异性乙肝与泛T细胞功能障碍之间无明显差异^[5]。近年来有关腺病毒研究已经展示了很好的前景,腺病毒载体和其他真核表达载体相似,腺病毒载体进入细胞后,保持自身线性结构,不整合入染色体,非整合作用使其更安全,与其它载体(如细菌或其它病毒)相比,低毒性,载体高表达;腺病毒同时诱导B细胞与T细胞免疫反应^[6]。乙肝表面抗原(HBsAg)重组腺病毒疫苗选择腺病毒做载体是高效安全的,也是非常有必要的,有报道证明,表达HBsAg的重组腺病毒载体能诱导体内免疫应答,有的甚至能抵抗乙型肝炎病毒的攻击,可以诱导针对HBV病毒的特异性T细胞免疫^[7-9]。临床前和临床研究发现,腺病毒载体乙肝疫苗TG1050能刺激机体产生很强的针对外源基因的特异性T细

胞反应^[11]。TC007作为一种5型腺病毒为载体的乙型肝炎生物技术药物,能在一定程度上模拟病原在体内的复制过程,长时间地反复刺激免疫系统,可以诱导出现强烈、持久、全面的免疫反应^[10]。

腺病毒载体类药物作为一种新型生物药,需要进行新药安全性评价。对于腺病毒载体类药物的临床前安全性评价,除考察常规评价指标外,还应考虑DNA生物分布影响,评价载体的安全性,一般组织分布结合在重复给药试验中进行,考察组织分布特征及分布时间,是否有非期望组织分布,是否与宿主细胞整合产生其他的风险。本研究重复给药试验的目的之一是阐述毒性作用机制,确定临床安全剂量,提示临床需要监测指标。载体可能会引起的细胞或体液免疫反应或免疫毒性反应也是该类药物的评价重点,由载体引起的免疫反应可以减弱药效作用,并改变毒性反应的过程。

本研究中,TC007重复给予食蟹猴,可以诱导体内产生抗Ad5抗体,抗体滴度显现剂量相关性,相同稀释度的动物血清的中和效应与血清中阳性抗体的滴度吻合,且Ad5-Null组与高剂量组抗Ad5抗体中和活性效应无差异;针对HBV 3种抗原(Core、Env、Pol)均可以检测到分泌IFN- γ 的特异性T细胞,淋巴细胞分群及免疫器官未见明显免疫毒性损伤,高剂量组CIC有轻微改变但未激活补体;组织学检查未见明显损伤,生物分布显示,Ad5主要分布于给药局部,心脏、肝脏、脾脏、生殖系统及肾脏等组织未见分布,未见非期望组织分布,且Ad5生物分布呈明显消除趋势。

腺病毒可以激活机体先天免疫系统和产生获得性免疫,本试验观察到食蟹猴在给予TC007和Ad5-null对照后,肝脏组织中IFN- γ /TNF- α /IL-2含量明显增加,产生了抗Ad5抗体且具有中和活性,但针对HBV(Core、Env、Pol)3种抗原分泌IFN- γ 的特异性T细胞以及肝脏组织中IFN- γ /TNF- α /IL-2的阳性程度,在给药末期均未因中和抗体的产生而减少或降低,推测中和抗体的产生并未影响TC007在食蟹猴体内的药理作用。本研究中的免疫原性、免疫毒性及组织分布考察有助于支持TC007非临床安全性评价结果,对于指导临床具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 刘求明, 尧晨光, 郭晓红, 等. 抗乙肝病毒药物研究进展[J]. 病毒学报, 2016, 09, 32(5): 650-658.
- [2] Asabe S, Wieland S F, Chattopadhyay P K, et al. The size

- of the viral inoculum contributes to the outcome of Hepatitis B virus infection [J]. *J Virol*, 2009, 83: 9652-9662.
- [3] Li W, Zhi Q Z, Cheng X L, et al. Immunotherapeutic interventions in chronic hepatitis B virus infection: A review [J]. *J Immunol Methods*, 2014, 407: 1 - 8
- [4] Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 859-868.
- [5] Park J J, Wong D K, Wahed A S, et al. Hepatitis B virus-specific and global T-Cell dysfunction in chronic hepatitis B [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150: 684-695.
- [6] 杨勇, 周冬明. 腺病毒载体疫苗的临床研究进展 [J]. *生命的化学*, 2014, 34(1): 46-51.
- [7] Himoudi N, Abraham J D, Fournillier A, et al. Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection [J]. *J Virol*, 2002, 76 (24): 12735-12746.
- [8] Patterson L J, Malkevitch N, Venzon D, et al. Protection against mucosal simian immunodeficiency virus SIV (mac251) challenge by using replicating adenovirus - SIV multigene vaccine priming and subunit boosting [J]. *J Virol*, 2004, 78(5): 2212- 2221.
- [9] Thammanichanon D, Moneer S, Yotnda P, et al. Fiber - modified recombinant adenoviral constructs encoding hepatitis C virus proteins induce potent HCV-specific T cell response [J]. *Clin Immunol*, 2008, 128(3): 329-339.
- [10] Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(6): 546-556.
- [11] Martin P, Dubois C, Jacquier E, et al. TG1050, an immunotherapeutic to treat chronic hepatitis B, induces robust T cells and exerts an antiviral effect in HBV-persistent mice [J]. *Gut*, 2015, 64: 1961-1971.