

国际人用药品注册技术协调会

## ICH 三方协调指导原则

生物制品的临床前安全性评价

**S6 (R1)**

1997年7月16日总指导原则

现行 *第四阶段*版本

2011年6月底整合2011年6月12日的增补

*按照ICH进程，本指导原则由相应的ICH专家工作组制定，已递交管理部门征求意见。在ICH进程第四阶段，最终草案被推荐给欧盟、日本和美国的监管机构采纳。*

### S6 (R1) 文件历史

最初编码	历史	日期	新编码
			<b>2005年11月</b>

#### 总指导原则：生物制品的临床前安全性评价

S6	指导委员会批准进入第二阶段，并发布以公开征求意见	1996年11月6日	S6
S6	指导委员会批准进入第四阶段，并推荐给ICH三方监管机构采纳。	1997年7月16日	S6

#### 总指导原则增补

S6 (R1)	指导委员会批准此增补进入第二阶段，并发布以公开征求意见。	2009年10月29日	S6 (R1)
---------	------------------------------	-------------	---------

#### 现行第四阶段版本

S6 (R1)	指导委员会批准此增补进入第四阶段，并推荐给ICH三方监管机构采纳。 总指导原则整合增补后重新命名为S6(R1)。	2011年6月12日	S6 (R1)
---------	---	------------	---------

# 生物制品的临床前安全性评价

## ICH三方协调指导原则

### 目录

第I部分: .....	3
1. 前言 .....	3
1.1 背景 .....	3
1.2 目的 .....	3
1.3 范围 .....	3
2. 受试物的质量标准 .....	4
3. 临床前安全性试验 .....	4
3.1 一般原则 .....	4
3.2 生物活性/药效学 .....	5
3.3 动物种属/模型选择 .....	6
3.4 动物的数量/性别 .....	7
3.5 给药途径/剂量选择 .....	7
3.6 免疫原性 .....	7
4. 特殊考虑 .....	8
4.1 安全药理学 .....	8
4.2 暴露评估 .....	8
4.2.1 药代动力学和毒代动力学 .....	8
4.2.2 测定 .....	9
4.2.3 代谢 .....	9
4.3 单次给药毒性试验 .....	10
4.4 重复给药毒性试验 .....	10
4.5 免疫毒性试验 .....	10
4.6 生殖发育毒性试验 .....	11
4.7 遗传毒性试验 .....	11
4.8 致癌性试验 .....	11
4.9 局部耐受性试验 .....	12
注释 .....	12

第II部分: .....	13
序言: .....	14
1. 前言 .....	14
1.1 增补的目的 .....	14
1.2 背景.....	14
1.3 指导原则的范围 .....	14
2. 种属的选择 .....	14
2.1 一般原则 .....	14
2.2 一或两个种属 .....	15
2.3 同源蛋白的使用 .....	16
3. 试验设计 .....	16
3.1 剂量选择和PK/PD原则的应用 .....	16
3.2 试验期限.....	17
3.3 恢复.....	17
3.4 探索性临床试验 .....	17
4. 免疫原性 .....	17
5. 生殖发育毒性 .....	18
5.1 总评.....	18
5.2 生育力.....	18
5.3 胚胎-胎仔发育 (EFD) 和围产期发育 (PPND) .....	19
5.4 试验的时间安排 .....	20
6. 致癌性 .....	21
注释.....	22

**第I部分：**  
**生物制品的临床前安全性评价**  
**ICH三方协调指导原则**

在1997年7月16日的ICH指导委员会会议上进入ICH进程*第四阶段*，本指导原则被推荐给ICH三方监管机构采纳。

## **1. 前言**

### **1.1 背景**

生物制品的开发始于20世纪80年代初。80年代后期批准了第一个上市许可。对于生物制品的安全性评估，不同的监管机构已发布了一些指导原则和考虑要点文件。对来自监管机构的这些文件的回顾，可能会为开发新生物制品提供有用的背景资料。

目前，随着生物制品的申报，已积累了大量的经验。对这些经验的综述，为本指导原则的制定奠定了基础。本指导原则的目的在于为设计科学合理的临床前安全性评价试验提供一般原则。

### **1.2 目的**

目前，欧盟、日本和美国对于生物制品的监管标准基本一致。三方均采用灵活、个案处理和基于科学的方法评价临床前安全性，以支持临床开发和上市许可。在这一快速发展的科学领域，需要地区之间达成共识并且保持持续对话。

临床前安全性评价的主要目的是：1) 确定人体安全起始剂量和后续剂量递增方案；2) 确定潜在毒性靶器官，并研究毒性是否可逆；3) 确定临床监测的安全性指标。本指导原则旨在提高临床前安全性数据的质量和一致性，以利于生物制品的开发。

### **1.3 范围**

本指导原则的主要目的是推荐一种评价生物制品临床前安全性的基本框架，适用于采用多种表达系统的已鉴定细胞，包括细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物细胞所制备的产品。这些产品包括体内诊断、治疗或预防。其活性物质包括蛋

白质、多肽及其衍生物或由其组成的产品；它们可能是通过细胞培养或者采用重组DNA技术（包括转基因植物和动物）获得的产品。例如：包括但不限于细胞因子、纤维蛋白溶酶原激活因子、重组血浆因子、生长因子、融合蛋白、酶、受体、激素和单克隆抗体。

本指导原则可能也适用于重组DNA蛋白疫苗、化学合成多肽、血浆衍生产品、从人组织提取的内源性蛋白和寡核苷酸药物。

本指导原则不适用于抗生素、变应原提取物、肝素、维生素、血细胞成分、常规的细菌或病毒疫苗、DNA疫苗、细胞和基因治疗。

## **2. 受试物的质量标准（SPECIFICATION）**

药物中存在的杂质或污染物可能导致安全性担忧。最好依靠纯化工艺去除杂质和污染物，而不是为了限度确定建立一套临床前试验计划。在任何情况下，都应该充分明确产品的特征，以便对临床前安全性试验进行合理设计。

宿主细胞如细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物细胞的污染存在潜在风险。宿主细胞污染物可导致过敏反应和其他免疫病理学反应。与核酸污染物相关的不良反应虽是理论上的，但也存在整合到宿主细胞基因组的可能性。源于昆虫、植物和哺乳动物细胞或转基因植物和动物的产品，还可能有额外的病毒感染风险。

通常，用于确证性药理学和毒理学试验的产品应与拟用于早期临床试验的产品具有可比性。但在药物开发进程中允许为提高产品的质量和产量进行正常的生产工艺改进，应考虑这种变更对于动物试验结果外推至人体的可能影响。

在药物开发过程中，如果采用了一种新的或改进的生产工艺，或者产品、处方发生有意义的变更时，应说明产品的可比性。可比性评价可基于生化和生物学特征（即鉴别、纯度、稳定性和效价）。某些情况下可能需要进行附加试验（即药代动力学、药效学和/或安全性试验）。应阐明所用方法的科学合理性。

## **3. 临床前安全性试验**

### **3.1 一般原则**

临床前安全性试验的目的是在人体试验开始前和整个临床开发过程中，阐明药物的药理学和毒理学作用。体外和体内试验都有助于确定其特征。对于那些在

结构和药理作用上与已有广泛临床应用经验的产品具有可比性的生物制品，可减少毒性试验。

临床前安全性试验应考虑：

- 1) 相关动物种属的选择；
- 2) 年龄；
- 3) 生理状态；
- 4) 给药方式，包括剂量、给药途径和给药方案；
- 5) 受试物在使用条件下的稳定性。

毒性试验应遵循药物非临床试验质量管理规范（GLP），但因为有些生物制品往往需要采用特殊试验系统，可能无法完全遵循GLP的要求。应明确不遵循GLP的情况，并且评估其对总体安全性评价的影响。在某些情况下，不完全遵循GLP要求并不一定意味着这些试验数据不能用于支持临床试验和上市许可。

药物毒性试验的传统方法不一定适用于生物制品，因为其具有独特性的和多样性的结构和可能包括种属特异性、免疫原性和非预期的多功能活性的生物学性质。

### 3.2 生物活性/药效学

可采用体外方法评价生物活性，以确定产品的哪些作用与临床活性相关。细胞系和/或原代细胞培养的应用，可能有助于检测药物对细胞表型和增殖的直接作用。因为许多生物制品具有种属特异性，选择相关动物种属进行毒性试验非常重要。体外哺乳动物细胞系可用于预测体内活性的某些特殊方面，并且可以定量评价不同种属（包括人）对生物制品的相对敏感性。此类试验可设计用于测定受体占位、受体亲和力和/或药理作用等，帮助选择合适的动物种属进行进一步的体内药理学和毒理学试验。综合考虑体外和体内试验结果有助于将试验结果外推至人体。评价药理作用的体内试验，包括作用机制的解释，通常用于支持临床试验中产品拟定应用的合理性。

对于单克隆抗体，应详细描述抗体的免疫学特性，包括抗体的抗原特异性、补体结合、对人非靶组织的任何非预期反应和/或细胞毒性。在一系列的人体组织中应采用适当的免疫组织化学方法进行此类交叉反应试验。

### 3.3 动物种属/模型选择

许多生物制品伴随种属和/或组织特异性的生物学活性，常使得采用常规种属（如大鼠和犬）进行的标准毒性试验不适用。安全性评价方案应包括相关种属的使用。相关种属是指受试物在此类动物上，由于受体或抗原表位（对单克隆抗体而言）的表达，能产生药理学活性。可以使用多种技术（如免疫化学或者功能试验）确定相关种属。有关受体/抗原表位分布的知识，有助于更多地了解潜在的体内毒性。

用于单克隆抗体试验的相关动物种属应能表达所预期的抗原表位，并能证明其与人体组织具有类似的组织交叉反应。这将显著提高评价与抗原决定簇结合和任何非预期组织交叉反应所致毒性的能力。如果能证明非预期的组织交叉反应与人体相似，即使是一种不表达预期抗原表位的动物种属，对毒性评价仍有一定意义。

安全性评价项目中一般应包括两种相关动物种属，但在某些已经证明合理的情况下（如只能确定一种相关动物种属，或对该生物制品的生物学活性已经充分了解），一种相关种属也可能满足要求。此外，即使短期毒性试验中可能需要用两种动物试验测试毒性特征，随后的长期毒性试验中可能仍有理由仅使用一种动物（如短期毒性试验中两种动物的毒性特征相似时）。

不相关动物种属的毒性试验可能会产生误导，因而不鼓励使用。当无相关动物时，应考虑使用表达人源受体的相关转基因动物或者使用同源蛋白。当产品与人源受体的相互作用和人体中预期生理结果相似时，在表达人源受体的相关转基因动物模型上所获得的信息是更有价值的。尽管使用同源蛋白也能得到有用的信息，但应注意到同源蛋白和临床拟用的产品之间，在生产工艺、杂质/污染物的范围、药代动力学和确切的药理学机制方面都可能不同之处。当不能使用转基因动物模型或者同源蛋白时，仍应采用单一动物种属开展有限的毒性试验，对某些潜在毒性进行评价，例如：包括重要功能终点（如心血管和呼吸）的 $\leq 14$ 天的重复给药毒性试验。

近年来，与人疾病相似的动物模型开发取得了很大进展。这些动物模型包括诱发的和自发的疾病模型、基因敲除和转基因动物。这些模型不仅对明确产品的药理作用、药代动力学特征和剂量选择提供进一步的认识，也有助于确定安全性

（如评价疾病进展的不良促进作用）。在某些情况下，可以用疾病动物模型替代正常动物进行毒性试验（*注释1*）。应注意提供使用疾病动物模型评价安全性的科学依据。

### 3.4 动物的数量/性别

每个剂量使用的动物数量直接影响毒性检测能力。小样本量可能仅因为观察频次少而导致未能观察到毒性事件（无论其严重程度如何）。样本量的局限性（常见于非人灵长动物试验）可以通过增加监测频次和时间而得到部分补偿。一般应使用两种性别的动物，使用单一性别动物时应阐明其合理性。

### 3.5 给药途径/剂量选择

应尽可能模拟临床拟用的给药途径和给药频率。需要考虑产品在所用动物种属中的药代动力学和生物利用度，以及安全和人道的给药体积。例如，可以增加实验动物的给药频率（与临床试验拟用的给药方案相比），以补偿活性成分的快清除率或低溶解度。此时，应确定实验动物与人体的相对暴露水平。同时还应考虑给药体积、给药浓度、给药制剂和给药部位的影响。如受生物利用度、给药途径、或者动物大小/生理状态等限制而必须改变给药途径时，使用与临床不同的给药途径也可以接受。

剂量选择应反映剂量-反应关系，包括中毒剂量和未见不良反应剂量（NOAEL）。对于某些毒性很小或无毒性的产品，不可能规定一个特定的最大给药剂量。在此情况下，应提供剂量选择依据及其预计的人体暴露量倍数。选择高剂量时，应该考虑其预期的药理/生理作用、合适受试物的可获得性和预期的临床应用。当产品在所选动物细胞中的亲和力或效价低于人体细胞时，使用更高剂量进行试验非常重要。用于确定足够安全范围所需的人用剂量倍数，可能随生物制品的类别及其临床适应症而有所不同。

### 3.6 免疫原性

很多拟用于人的生物制品在动物中有免疫原性。因此这类产品进行重复给药毒性试验时，应检测抗体以帮助解释试验结果。应阐述抗体反应特点（如滴度、

出现抗体的动物数量、中和或者非中和抗体），以及抗体的出现与任何药理学和/或毒理学变化的相关性。在解释数据时应特别考虑抗体形成对药代动力学/药效学参数、不良反应发生率和/或严重程度、补体活化、或者出现新毒性作用的影响，也应注意评价与免疫复合物形成和沉积相关的可能病理学变化。

除非大多数动物的免疫反应抵消了生物制品的药理学和/或毒理学作用，否则检出抗体不能单独作为早期终止临床前安全性试验或者改变试验设计的给药期限的标准。正如在人体中观察到的一样，多数情况下，生物制品的免疫反应是可变的。如对安全性试验数据的解释不受这些问题的干扰，可以认为抗体反应没有特殊意义。

在动物中诱导了抗体形成并不能预示在人体可能形成抗体。人体可能产生抗人源蛋白的血清抗体，往往出现抗体后仍存在治疗作用。人罕见出现对重组蛋白的严重过敏反应。就此而言，蛋白产品的豚鼠过敏试验结果（通常呈阳性）不能预测人体反应，因此，这类试验对此类产品的常规评价几乎没有价值。

## **4. 特殊考虑**

### **4.1 安全药理学**

用合适的动物模型研究潜在的不良药理学活性很重要，必要时应结合毒性试验和/或临床试验对这些活性进行特别监测。安全药理学试验是检测与潜在毒性相关的功能性指标，这些功能性指标可以通过单独的试验也可以结合在毒性试验中考察。安全药理学试验的目的是揭示任何对主要生理系统功能的影响（如心血管、呼吸、肾脏和中枢神经系统）。试验也可包括使用离体器官或其他非整体动物的试验系统。所有上述试验可用于特定器官毒性的机制解释，应结合人体应用和适应症的关系，对这些毒性认真考虑。

### **4.2 暴露评估**

#### **4.2.1 药代动力学和毒代动力学**

很难制定统一的生物制品的药代动力学试验指导原则。在相关动物种属中进行单次给药和多次给药的药代动力学、毒代动力学和组织分布试验是有价值的；但试图评价物质平衡的常规试验是无价值的。不同动物种属间药代动力学的差异

对动物试验的预测性或评估毒性试验中的剂量-反应关系有显著影响。由免疫介导的清除机制引起的药代动力学特征改变,可能会影响动力学特征和对毒性试验数据的解释。某些产品可能存在与药代动力学特征相关的药效学作用表达(如细胞因子)的固有的、明显的延迟,或者可能存在与血浆暴露水平相关的药效作用的延长。

药代动力学试验应尽可能使用能够代表毒性试验和临床试验拟用样品,给药途径也应与临床试验拟用途径相关。制剂/处方(formulation)、浓度、给药部位和/或给药体积均可能影响吸收模式。应尽可能在毒性试验中监测药物的全身暴露情况。

当使用放射性标记蛋白时,说明放射标记的受试物仍保持与非标记受试物相当的活性和生物学性质是重要的。因为体内代谢迅速或者放射性标记连接不稳定,可能难以解释使用放射性标记蛋白得到的组织放射活性浓度和/或放射自显影数据。在解释特定氨基酸的放射性示踪试验时应谨慎,因为氨基酸可进入与药物无关的蛋白/肽再循环。

临床试验前应提供在相关动物模型中吸收、处置和清除的信息,以便根据暴露水平和给药剂量预测安全范围。

#### **4.2.2 测定**

应该在个案分析的基础上提出使用一种或多种测定方法,并阐述其科学合理性。通常认为使用一种经过验证的方法是足够的。例如,一种放射标记蛋白给药后定量测定TCA沉淀部分的放射活性,可能会提供足够的信息,但优先考虑使用对分析物特异的分析方法。比较理想的是在动物和人体试验中使用相同的分析方法。应该确定血浆/血清中的血浆结合蛋白和/或抗体对测定的可能影响。

#### **4.2.3 代谢**

生物制品代谢的预期结果是降解成为小肽和单个氨基酸。因此,通常对其代谢途径已有了解,一般不需要进行传统的药物生物转化试验。

应了解生物制品在生物基质(如血浆、血清、脑脊液)中的行为以及对结合蛋白的可能影响,这对于了解药效学作用非常重要。

### 4.3 单次给药毒性试验

单次给药试验可得到用于描述全身和/或局部毒性剂量反应关系的有用数据，这些数据可用于选择重复给药毒性试验的剂量。作为药理学或动物模型有效性试验的一部分，通过进行单次给药毒性试验可收集到剂量-反应关系的信息。应考虑将安全药理学参数结合在这些试验的设计中。

### 4.4 重复给药毒性试验

重复给药试验的动物种属选择考虑参见第3.3节。给药途径和方案（如每天给药vs间隔给药）应该反映临床拟定使用或者暴露情况。如果可行，这些试验应该包括毒代动力学。

试验设计一般应包括恢复期，以确定药理学/毒理学作用的可逆性或潜在恶化和/或潜在的延迟毒性效应。对于药理学/毒理学作用持续较长的生物制品，应对恢复组动物进行监测直至观察到毒性反应的可逆性。重复给药试验的期限应根据预期临床暴露的期限和适应症确定。大多数生物制品的动物给药期限为1-3个月。对于计划短期使用（如 $\leq 7$ 天）或者治疗急性危及生命疾病的生物制品，2周的重复给药试验可以支持其临床试验以及上市许可。对于拟用于慢性适应症的生物制品，试验期限一般为6个月，尽管在一些案例中短或长的试验期限都已用于支持批准上市。计划长期使用的生物制品，应科学地阐明长期毒性试验期限的合理性。

### 4.5 免疫毒性试验

免疫毒理学评价的内容之一是对潜在免疫原性的评估（参见第3.6节）。很多生物制品试图刺激或抑制免疫系统，因而不仅影响体液免疫也影响细胞免疫。注射部位的炎症反应可能是一种刺激性反应的表现，重要的是应认识到单纯注射损伤和/或制剂赋形剂引发的特定毒性作用也可导致注射部位的毒性反应。此外，靶细胞表面抗原的表达可能被改变，这提示有潜在的自身免疫性（autoimmune potential）。免疫毒理学试验策略可能需要伴随机制试验的筛查试验以阐明这些问题。但常规的分层试验（tiered approaches）方法或者标准试验组合不推荐用于生物制品。

#### 4.6 生殖发育毒性试验

应根据产品、临床适应症和目标患者人群决定是否需要进行生殖/发育毒性试验（注释2）。具体的试验设计和给药方案可根据种属特异性、免疫原性、生物学活性和/或较长的消除半衰期等问题加以修改。例如，当存在某些涉及潜在发育免疫毒性的担忧时，特别是对于某些具有长效免疫作用的单克隆抗体，应对试验设计进行修改，以评价新生动物的免疫功能。

#### 4.7 遗传毒性试验

常规用于药物评价的遗传毒性试验的范围和类型并不适用于生物制品，因此这些试验也不是必需的，而且给予大量的多肽/蛋白质可能得到无法解释的结果。预计这类物质不会直接与DNA或其他染色体物质发生相互作用（参见注释3）。

当对产品有担忧时（例如，因结合蛋白产品中含有机连接分子），应考虑采用已有和相关的试验系统，包括新开发的系统进行试验。标准遗传毒性试验并不适合检测生产过程中污染物的潜在遗传毒性，如果为此目的而进行试验，应阐述其合理性。

#### 4.8 致癌性试验

标准致癌性生物试验一般不适用于评价生物制品。但是，可能也需要根据产品（如生长因子、免疫抑制剂等）的临床用药疗程、患者人群和/或生物活性，对特定产品潜在致癌性进行评估。当存在潜在致癌性的担忧时，可考虑采用多种方法评价其风险。

具有支持或者诱导转化细胞增殖和克隆扩增潜力的产品可能具有致瘤性，应采用与试验患者人群可能相关的多种恶性细胞和正常的人体细胞，对其受体表达进行评价。应确定产品刺激表达该受体的正常或恶性细胞生长的能力。当体外数据提示存在潜在致癌性担忧时，可能需要采用相关动物模型进行进一步试验。在长期重复给药毒性试验中检测一些灵敏的细胞增殖指标可能会提供有用的信息。

在某些情况下，如果产品在啮齿类动物中具有生物活性且无免疫原性，而其他试验又未提供评估潜在致癌性的充分信息，则应考虑使用一种啮齿类动物进行试验。应慎重选择用药剂量。将药代动力学和药效学终点结合使用，同时考虑受体特征比较和预期的人体暴露量，是确定合适剂量的最科学的方法。应阐述剂量选择的合理性。

## 4.9 局部耐受性试验

应评价局部耐受性。应采用拟上市的制剂进行试验，但在某些已证明合理的情况下，使用代表性的制剂进行试验是可行的。某些情况下，产品的这些潜在不良反应可在单次或重复给药毒性试验中评价，因此可避免进行单独的局部耐受性试验。

### 注释

*注释1* 疾病动物模型可能有助于确定毒性终点、选择临床适应症和确定合适的制剂、给药途径和治疗方案。评价试验结果时应注意这些疾病模型往往缺乏历史数据作为参考。因此，收集同期对照数据和基线数据对于优化试验设计是非常重要的。

*注释2* 对于特殊类别化合物（如干扰素）的潜在生殖和/或发育作用（唯一相关动物种属为非人灵长类动物）可能已有大量公开发表的资料。在这种情况下，如果机制试验提示，一个新的相关的分子很可能引起相似的作用时，则可能无需进行正式的生殖毒性试验。上述情况下均应该提供评价其潜在生殖/发育作用的科学依据。

*注释3* 有些生物制品可能存在自发突变细胞的累积（如通过促进增殖的选择优势）而有致癌的担忧。但标准的遗传毒性试验组合并不能用于检测这类情况。针对这些问题，可能需要开发替代的体外或者体内模型来进行相关评价。

## 第II部分：

### S6增补

生物制品临床前安全性评价

ICH三方协调指导原则

在2011年6月12日已经达到ICH进程第四阶段，并在2011年6月结束时与总指导原则整合，本指导原则被推荐给ICH三方监管机构采纳。

## 序言：

本增补应该紧密结合原ICH S6指导原则一起阅读。总体来讲，本增补是对原指导原则的补充，当增补与原指导原则的内容不一致时，应以增补为准。

## 1. 前言

### 1.1 增补的目的

本增补的目的旨在对原ICH S6指导原则中讨论的以下主题进行补充、阐明和更新：动物种属选择、试验设计、免疫原性、生殖发育毒性、以及潜在致癌性的评估。自原ICH S6指导原则发布以来取得的科学进步和获得的经验推动了本次增补的制定。经协调达成的本增补将有助于对目前的建议进行明确并降低各地区间存在重大差异的可能性。

本指导原则有助于促进及时进行临床试验，按照3R（减少/优化/替代）原则减少动物的使用，以及减少使用其他药物开发资源。虽然在本指导原则中未进行讨论，但应考虑使用合适的体外替代方法进行安全性评价。如果所有ICH监管机构均接受，那么这些方法可以替代现行的标准方法。

本指导原则将推动新药安全且符合伦理要求的开发和可及性。

### 1.2 背景

本增补中的建议对非临床安全性试验进行了进一步协调，以支持在欧盟（EU）、日本和美国各地区进行的不同阶段的临床开发。目前的增补反映了对生物制品安全性评价的现有共识。

### 1.3 范围

本增补并未改变原ICH S6指导原则的适用范围。对于拟用于肿瘤的生物制品，请参考抗肿瘤药物的非临床评价指导原则（ICH S9指导原则）。

## 2. 种属选择

### 2.1 一般原则

在确定种属相关性时，应该考虑若干因素。通常从种属间目标序列同源性的

比较开始，之后进行体外分析，对相对靶点结合的亲和力、受体/配体占位以及动力学进行定性和定量的种属间比较。

另外还推荐进行功能活性评估。可以在种属特异性细胞系统和/或体内药理学或毒理学试验中证明功能活性。对已知的生物学反应或药效学（PD）标记物的调控，能够为支持种属相关性的功能活性提供证据。

在拟定给药剂量下，对靶向结合和功能活性种属间差异进行考虑，考虑结果应该有力地证明模型能够显示靶点调控的潜在不良后果。当在健康的临床前种属上靶点表达水平非常低时（如炎症细胞因子或者肿瘤抗原），可以利用细胞系统中的结合亲和力和活性指导种属的选择。

动物组织交叉反应性的评估对种属选择的意义有限（参见注释1）。但在特定的情况下（如上述方法不能证明药理学相关种属时），组织交叉反应（TCR）试验可以通过对预期具有靶向结合的人体和动物组织结合特征的比较指导毒理学种属的选择。

如ICH S6指导原则所述，如果因为生物制品与所有种属的直系同源靶点均没有相互作用而不能确定相关种属时，则可以考虑使用同源分子或者转基因模型。

对于单克隆抗体和以外源性物质（如细菌、病毒等）为靶点的其他相关抗体产品，可以考虑在一个种属（由申请人说明种属选择的合理性）中进行短期安全性试验（参见ICH S6指导原则），无需附加毒性试验，包括生殖毒性试验。或者，当采用疾病动物模型进行原理验证的评价时，可以纳入安全性评估，提供与潜在靶点相关的安全性信息。如果不可行，则应该在临床试验中采用适当的风险控制（mitigation）策略。

对于含有新型毒素/毒物的抗体-药物/毒素结合物（ADC），种属选择遵循与非结合抗体相同的一般原则（参见上述并参见注释2）。

## 2.2 一或两个种属

如果临床候选物有两种药理学相关的种属（一种啮齿类和一种非啮齿类），那么应该使用两个种属进行短期（期限不超过1个月）一般毒性试验。如果这些试验的毒理学发现相似，或者可以从产品的作用机制方面解释这些结果，那么通常在一个种属中进行更长期限毒性试验即可。除非有使用非啮齿类动物的科学依

据，否则应该使用啮齿类动物进行试验。在两个非啮齿类种属中进行试验并不合适。

当临床候选物仅在一个种属中具有药理学活性时，在一种种属上进行所有一般毒性试验是合理的。在第二种属中进行同源产品的试验对于风险评估没有进一步的价值，因此不推荐进行。

## 2.3 同源蛋白的使用

使用同源蛋白是ICH S6指导原则第3.3部分中描述的替代方法之一。使用同源蛋白的试验可以用于风险识别，和对放大的药理作用造成的不良作用潜能的了解，但是一般对定量风险评估没有帮助。因此，为了风险识别，只要试验设计和剂量（如最大药理学剂量）选择科学合理，就可以使用一个对照组和一个给药组进行安全性评价试验。

## 3. 试验设计

### 3.1 剂量选择和PK/PD原则的应用

大多数生物制品的毒性都与其靶向作用机制相关；因此，相对高剂量会引起随着药理作用放大而变得明显的不良反应。

剂量选择应考虑剂量-反应关系。通过确认以下要素，药代动力学-药效学（PK-PD）方法（如简单的暴露量-反应关系，或者更加复杂的建模和模拟方法）有助于高剂量选择：1）临床前种属预期最大药理学作用的剂量；2）暴露量约为临床最大暴露10倍的剂量。在临床前毒性试验中应该选择上述两种剂量中的较高者，除非有合理的理由选用较低剂量（如最大的可行剂量）。

在无法获取体内/离体PD终点指标的情况下，高剂量选择可以依据PK数据和已有的体外结合和/或药理学数据。应该考虑对非临床动物种属与人体之间靶点结合和体外药理学活性的差异进行校正，以调整暴露范围使其高于预期的最高临床暴露量。例如，在结合亲和力和/或体外效价方面存在相对较大的差异可能提示在非临床试验中适合采用较高的剂量。如果在采用这种方法所选的剂量上也无法证明毒性，那么使用人体剂量的更高倍数进行额外毒性试验可能也无法提供其他有用的信息。

### 3.2 试验期限

对于长期使用的产品，只要按照上述第3.1节的原则选择高剂量，那么在啮齿类或者非啮齿类中进行6个月的重复给药毒性试验即可。期限更长的试验通常也不会再提供能够改变临床开发进程的有用信息。

对于拟用于晚期肿瘤患者长期用药的生物制品，毒性试验期限的原则见ICH S9。

### 3.3 恢复

如果在临床相关的暴露水平下出现具有潜在不良临床影响的药理学和毒理学作用，应了解这些作用是否可以恢复。可以通过对观察到的独特作用总体上是否可逆的认识，或者在至少一项试验中设置至少一个剂量水平的非给药期来获取该信息，由申请人证明其合理性。非给药期的目的是检测这些作用的可逆性，而不是评价延迟的毒性。没有必要证明完全恢复，也无需仅为了评价潜在免疫原性而额外设置恢复期。

### 3.4 探索性临床试验

ICH M3 (R2) 指导原则中概述的支持探索性临床试验的灵活方法也适用于生物制品。建议对这些方法进行讨论，并与相关监管机构达成共识。

## 4. 免疫原性

进行免疫原性评估有助于对试验结果解释以及随后的试验设计。在非临床动物试验中，此类分析与预测人体蛋白或者人源化蛋白在人体上的潜在免疫原性无关。

如果存在以下情况，应该对非临床试验中抗药抗体（ADA）测定值进行评价：1) PD活性改变；2) 在缺乏PD标记物时出现非预期的暴露量改变；3) 出现免疫介导的反应（免疫复合物疾病、血管炎、过敏性反应等）。由于在试验的整个阶段完成之前很难预测是否需要进行分析，因此在试验过程中获取充分的样本，以便随后在需要时对其进行分析以帮助对试验结果的解释。当检测到ADAs时，应评价它们对试验结果解释的影响（亦可参见第I部分，第3.6节，第2段，对

免疫原性影响的进一步指导)。

如果检测到ADAs、并且在体内毒性试验中没有PD标记物可以表明存在持续活性时，应对ADAs的中和潜能特征进行试验。可以在离体生物活性分析中或者以适当的PK-PD联合分析形式间接评价抗体的中和作用，或者在特异性试验中直接评估抗体的中和作用。

## 5. 生殖发育毒性

### 5.1 一般性评价

生殖毒性试验应该按照ICH S5 (R2) 指导原则概述的原则来进行。可以根据对种属特异性、产品的性质、以及作用机制、免疫原性和/或药代动力学行为和胚胎-胎仔暴露的理解，对具体的试验设计和给药方案进行修订。

一般来讲，最好可以在一个相关种属中对临床候选物进行生殖毒性评估。生殖毒性评价应该只在药理学相关种属中进行。当临床候选物在啮齿类动物和兔中均具有药理学活性时，应该使用两个种属进行胚胎-胎仔发育 (EFD) 试验，除非在一个种属中已经确认有胚胎致死性或者致畸性。

当非人灵长类动物 (NHPs) 是唯一的相关种属时，应该只在非人灵长类动物中进行发育毒性试验。

当临床候选物只在NHPs上具有药理学活性时，在NHPs中进行临床候选物试验是首选做法。如果可以提供充分的科学合理性，则可以使用替代模型替换NHPs。

如果没有测试临床候选物的相关动物种属，假设对模型具有充分的背景知识 (如历史背景数据)，可以考虑使用表达人体靶点的转基因小鼠，或者使用表达人体靶点同源基因种属中的同源蛋白 (参见第I部分，注释1)。对于以外源性物质 (如细菌和病毒) 为靶点的产品，一般不需要进行生殖毒性试验 (参见第2.1部分)。

当证据权重分析 (作用机制、基因修饰动物的表型数据、类别效应) 提示可能在生育力或者妊娠结果方面出现不良反应时，这些数据可以提供足够的信息来传达生殖的风险，在适当的情况下，可能无需进行额外的非临床试验。

### 5.2 生育力

如果小鼠和大鼠都是某一产品的药理学相关种属，可以在这些啮齿类动物的一个种属中进行生育力的评估（参见ICH S5指导原则）。如果其他种属也具有药理学相关性，那么ICH S5指导原则也适用于其他种属；此外，应对试验设计进行酌情修订，例如探讨产品的性质和潜在的免疫原性。

交配试验对于NHPs并不切合实际。但是，当NHPs是唯一的相关种属时，可以在性成熟的NHPs中进行至少3个月期限的重复给药毒性试验，通过评价生殖系统（器官重量和组织病理学评价）评估对雄性和雌性生育能力的潜在影响。如果根据药理学活性或者既往结果，存在导致担忧的特别原因，那么可以在重复给药毒性试验中进行专项评估，如评价月经周期、精子数、精子形态/精子活力、以及雄性或者雌性生殖激素水平。

如果存在药理学活性对受精/着床方面潜在影响的特别担忧，并且NHP是唯一的相关种属时，这些问题应该通过试验来解决。当对这些担忧关注时，同源产品或者转基因模型可能是评估对受精或者着床潜在影响的唯一可行的方法。但不建议仅为在啮齿类动物中进行交配试验，而生产同源产品或者建立转基因模型。在缺乏非临床信息的情况下，应通过临床试验管理过程、知情同意、以及适当的产品说明书来降低患者的风险。

### **5.3 胚胎-胎仔发育（EFD）和围产期发育（PPND）**

在设计和解释发育毒性试验时，要考虑到生物制品在胎盘转移方面的潜在差异（参见注释3）。

对于仅在NHPs中具有药理学活性的产品，依据预期的临床用途和药理学作用，可以考虑几种试验设计。单独的EFD和/或PPND试验、或者其他试验设计（申请人说明合理性）均可用，尤其是存在某些担忧，如作用机制可能导致对胚胎-胎仔发育的不良影响或者流产情况。但可以考虑一个设计良好的NHPs试验，从妊娠第20天到出生期间给药（强化PPND, ePPND），而不是单独的EFD和/或PPND试验。

对于上述的单一ePPND试验设计，无需设置剖腹产组，但是应该在自然分娩时对妊娠结果进行评估。该试验也应该同时评价后代的生存力、外观畸形、对骨骼的影响（如通过X-射线确定）、以及处死后尸体剖检时的内脏形态学。超声检

查可用于追踪妊娠的维持状况，但是不适用于发现畸形，后者的数据来源于产后的观测结果。由于对母体哺育后代具有混杂的影响，所以一般不推荐母体产后给药。如果与药理学活性相关，那么也可以对子代中的其他终点指标进行评价。产后阶段的期限将取决于基于作用机制认为具有相关性的其它终点指标（参见注释4）。

在NHPs中进行的发育毒性试验只能用于风险识别。每组动物的数量应该满足可以对数据做出有意义的解释（参见注释5）。

如果使用了其他NHP种属，申请人应该说明试验设计的合理性。上述在NHPs中进行的发育毒性试验仅用于风险识别；只要已经证明所选剂量水平的科学合理性，就可以使用一个对照组和一个给药组来进行试验。一个适当的科学合理性的例子是一个单克隆抗体，在临床给药方案下与一种可溶性靶点结合使靶点结合达到饱和。如果能够在所选动物种属中表明靶点结合达到了饱和，并且达到了治疗药物水平的10倍暴露量以上，则设置单一剂量水平组和对照组即可提供充分的对胚胎-胎仔发育危害的证据。

#### 5.4 试验时间安排

如果在获得对胚胎-胎仔发育影响的信息之前，临床试验需要包含有生育可能的女性，那么需要适当的临床风险管理措施，例如采用高效的避孕方法（参见ICH M3（R2）指导原则）。

对于只在NHPs中具有药理活性的生物制品，如果避孕措施充分（参见ICH M3（R2）指导原则，第11.3节，第2段），EFD或者ePPND试验可以在III期临床试验期间进行，并在上市申请时提交报告。当申请人在临床试验中不能采取充分的避孕措施时，应该在III期临床试验启动之前提交完整的EFD试验报告或者ePPND试验的中期报告（参见注释6）。当产品只在NHPs中具有药理学活性，并且其作用机制引发胚胎-胎仔发育方面的严重担忧时，无需在NHPs中进行发育毒性试验即可将该担忧列入产品说明书，有生育可能的女性应避免使用。

如果啮齿类动物或者兔是相关种属，生殖毒性试验的时间安排参见ICH M3（R2）指导原则。当啮齿类动物是相关种属时，产品对生育力影响试验的时间安排也应遵循ICH M3（R2）指导原则。

属于ICH S9指导原则范围内的抗肿瘤产品，参见该指导原则中与试验实施时间安排相关的内容。

## 6. 致癌性

应该从临床拟用人群和治疗期限方面，确定是否需要生物制品进行特定产品的潜在致癌性评估（参见ICH S1A指导原则）。如果需要评估，申请人应制定一项应对潜在风险的策略。

该策略可以将证据权衡法作为基础，包括对不同来源相关数据的审查。数据来源可以包括已发表的数据（如来自转基因、基因敲除或疾病动物模型、人遗传疾病的信息）、类别效应的信息、靶点生物学和作用机制的详细信息、体外数据、慢性毒性试验的数据以及临床数据。在某些情况下，现有数据即可以充分说明潜在的致癌性，并且告知临床风险，而无需额外的非临床试验。

某些生物制品的作用机制，可能会引起潜在致癌性的担忧（如免疫抑制剂和生长因子）。如果证据权衡结果支持潜在致癌性的担忧，则无需进行啮齿类动物的生物试验。在这种情况下，潜在的风险最好通过产品说明书和风险管理实践来解决。当证据权衡结果并不明确时，申请人可以提议进行额外试验，减少机制带来的担忧（参见第I部分，第5.8节）。

对于产品具体特征和潜在致癌性相关的作用模式方面没有充分认知的产品，应该进行更加广泛的评估（如了解与潜在致癌性担忧相关的靶点生物学性质、在毒性试验中纳入额外的终点指标）。

如果这种更加广泛评估的证据权衡结果没有提示潜在致癌性，则不推荐进行额外的非临床试验。或者，如果证据权衡结果提示存在潜在致癌性的相关担忧，那么申请人可以提议进行附加非临床试验降低此类担忧，或者在产品说明书中列出。

特定产品的潜在致癌性评估用于传达风险，并且可以与说明书拟定、临床监测、上市后监测或者上述方法的组合，一起完善风险管理计划。

使用同源产品进行的啮齿类生物试验（或者短期致癌性试验），通常对临床候选物潜在致癌性评价的意义有限。

如果建立了新的策略/试验，可以考虑作为替代的方法。

## 注释

**注释1** 组织交叉反应（TCR）试验是采用免疫组织化学（IHC）技术进行的体外组织结合试验，确定单克隆抗体及相关类抗体产品与抗原表位在组织内的结合特征。可以采用其他技术代替IHC技术，表明靶点/结合位点的分布。使用一组人体组织进行的TCR试验，是推荐的支持此类产品初始临床给药剂量的系列安全性评估试验之一。但在某些情况下，临床候选物不是一种良好的IHC反应物时，TCR试验可能在技术上不可行。

TCR试验可以为靶点分布提供有用的补充信息，还可以提供潜在非预期结合的信息。组织结合本身并不能表明在体内具有生物学活性。此外，在体内与抗体一般无法达到的区域（即细胞质）结合通常不具有相关性意义。应该在药理学和安全性评估全部数据的背景下对结果进行评价和解读。

如果在人体组织中出现非预期结合，对所选动物组织进行评价，可以提供补充信息，说明这些非预期结合与临床前毒性是否存在潜在相关性。不推荐使用全套动物组织进行TCR试验。

由于双特异性抗体产品使用一组人体组织的TCR试验进行评价，因此没有必要试验单个的结合组分。

如果已经在人体组织中使用临床候选物进行了TCR试验，同源产品的组织结合评价则不会再提供其他有价值的信息，因此不推荐进行。

TCR试验不能检测到关键质量属性的细微变化。因此，在整个开发项目中，不推荐工艺变更时用TCR试验评价受试物的可比性。

**注释2** 如果已经使用了两个种属评价ADC的安全性，则应该在至少一个种属中，使用非结合毒素进行额外的短期试验，或者在短期试验的一个试验组中使用非结合毒素。在这种情况下，应该首选啮齿类，除非使用的毒素对啮齿类没有活性。如果只有一种药理学相关的种属，就应该在该种属中进行ADC试验。对于新型毒素，需要以具体情况具体分析原则为基础，采用与新型化学实体相似的方法选择种属（如抗癌产品遵循ICH S9指导原则）。如果不是新型的毒素或者毒物，并且其现有科学信息体系充分，则无需对非结合毒素进行单独的评价。应该提供数据来比较ADC在动物和人体中的代谢稳定性。

**注释3** 在对试验进行解读时，应该考虑妊娠期间胚胎-胎仔暴露的种属特异性。

高分子量 (>5,000 D) 的蛋白质不能通过简单的扩散穿过胎盘。对于分子量高至150,000 D的单克隆抗体，存在特异的转运机制，即能够决定胚胎暴露并且具有种属间差异的新生儿Fc受体 (FcRn)。

在NHPs和人中，IgG的胎盘转运率在器官形成期间很低，在妊娠中期的早期开始增加，在妊娠晚期的后期达到最高水平 (5)。因此，从孕早期至妊娠第50天给药的标准胚胎试验对器官形成期胚胎-胎仔直接影响的评估没有价值，尽管对胚胎-胎仔的影响可以作为对母体影响的间接结果进行评价。此外，因为IgG只在初始乳汁 (即初乳) 中分泌，在哺乳期的后期不再分泌，所以在NHPs中分娩后的母体给药通常没有意义。

啮齿类动物的情况不同于NHPs和人，因为IgG能够通过FcRn转运机制穿过卵黄囊，啮齿类动物的妊娠暴露与NHPs和人相比出现的相对较早。此外，啮齿类动物的分娩是在发育阶段，此时的幼仔没有达到与NHPs或者人新生儿相同的成熟水平。因此，应对哺乳期大鼠/小鼠的母体给药，使幼仔经由乳汁暴露至少9天，待其达到与人新生儿等同的发育阶段。

**注释4** 出生后观察的最短期限为1个月，以便进行早期功能性试验 (如生长和行为)。

通常，如果在一般毒性试验中，有证据显示存在对免疫系统 (或者免疫功能) 的不良影响，则应在强化围产期发育试验 (ePPND) 的产后期间，在后代中进行免疫功能试验。情况适宜时，在出生后第28天即可尽早获得免疫表型。根据所采用的功能性试验，评估免疫功能的出生后观察期限可以为3-6个月。

神经行为学评估可能仅限于临床行为观察结果。工具/仪器性学习

(instrumental learning) 需要一个训练期，该训练期期限至少为出生后9个月，因此不推荐。

**注释5** 决定猕猴ePPND试验中各组动物数量方法的详细讨论见Jarvis等2010年的文献 (6)。ePPND试验中各组动物数量应该可以获得足够数量的幼仔 (出生后第7天时，每组6-8个后代)，以对出生后发育进行评估，必要时 (如免疫系统) 提供专家评价的机会。

大多数ePPND试验需要数周或数月获取妊娠动物。当某个试验项目组提示出现治疗相关作用的流产时，应该考虑终止在试验中进一步增加妊娠动物，并调整试验设计（如采用剖腹产）。

提倡对溶媒对照组母体动物的再利用。

如果存在作用机制可能导致对EFD的影响或流产的担忧，则可以在有限数量的动物中进行试验来确认危害。

注释6 在NHPs、ePPND试验中期报告中应该包括如下试验终点指标：

- 母体数据：生存情况、临床观察、体重、妊娠暴露数据（如果可以获得）、任何特定的PD终点指标；
- 妊娠数据：试验开始时妊娠动物的数量、器官形成结束时（GD50）和GD100时的妊娠状态、流产发生率和流产的时间。在中期报告中，不需要超声检查来确定胎仔大小；因为可以获得出生时的实际体重，因此这些检查并不重要；
- 妊娠结果数据：活胎/死胎的数量、幼仔出生体重、产后7天的幼仔存活情况和体重、外部形态学定性评估（即确定外观属于正常范围内）、幼仔暴露数据（如有）、幼仔的任何特定PD终点指标（如适用）。

## 参考文献

1. ICH S5(R2) Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products and Toxicity to Male Fertility; June 1993.
2. ICH S1A Guideline: Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies for Pharmaceuticals; November 1995.
3. ICH M3(R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorisation for Pharmaceuticals; June 2009.
4. ICH S9 Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals; November 2008.
5. Pentsuk N, Van der Laan JW. An interspecies comparison of placental antibody transfer: new insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. Birth defects research (Part B) 2009; 86: 328-344.
6. Jarvis P, Srivastav S, Vogelwedde E, Stewart J, Mitchard T, Weinbauer G. The Cynomolgous Monkey as a model for Developmental Toxicity Studies: Variability of Pregnancy losses, Statistical power estimates, and Group Size considerations. Birth Defects Research (Part B) 2010, 89: 175-187.