

细胞治疗药物非临床药代动力学研究

汪宁¹, 杨欢¹, 徐楠楠¹, 夏艳², 侯德宝², 刘颖^{3*}, 李洪贞^{1*}

(1. 北京昭衍新药研究中心股份有限公司, 北京 100176;

2. 昭衍(苏州)新药研究中心有限公司, 江苏 苏州 215421;

3. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

[摘要] 细胞治疗作为新兴的治疗手段, 在多种疾病尤其是难治性疾病中展现出巨大潜力。细胞治疗药物包括干细胞、免疫细胞以及其他终末分化细胞等, 经体外操作或基因改造后, 回输体内实现治疗效果。鉴于其独特的生物学特性, 细胞治疗药物的药代动力学(Pharmacokinetics, PK)研究面临诸多挑战。本文系统综述了细胞治疗药物的PK特征, 深入剖析现有法规框架与已上市药物的非临床PK试验设计及适用的生物分析方法, 以期为细胞治疗药物的研发与评价流程提参考, 促进该领域的发展与应用。

[关键词] 细胞治疗; 药代动力学; 非临床研究; 药物评价

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-3593(2024)06-0439-07

Non-clinical Pharmacokinetic Studies of Cell Therapy Products

WANG Ning¹, YANG Huan¹, XU Nan-nan¹, XIA Yan², HOU De-bao², LIU Ying^{3*}, LI Hong-zhen^{1*}

(1. Joinn Laboratories (China) Co., Ltd., Beijing 100176, China;

2. Joinn Laboratories (Suzhou) Co., Ltd., Jiangsu Suzhou 215421, China;

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

[Abstract] As an emerging treatment, cell therapy shows great potential in a variety of diseases, especially refractory ones. Cell therapy drugs include stem cells, immune cells and other terminally differentiated cells, which are reinfused into the body to achieve therapeutic effect after in vitro operation or genetic modification. However, given their unique biological characteristics, the pharmacokinetics (PK) study of cell therapy drugs presents many challenges. In this paper, we systematically review the PK characteristics of different kinds of cell therapy drugs, analyze the existing regulations and discuss the design of non-clinical PK studies and applicable bioanalytical methods of marketed drugs, to provide references for the development and evaluation of cell therapy drugs and promote the development and application in this field.

[Key Words] Cell therapy; Pharmacokinetics; Non-clinical study; Drug evaluation

近年来, 随着干细胞治疗、免疫细胞治疗和基因编辑等基础理论、技术手段和临床医疗探索研究的不断发展, 细胞治疗产品为一些严重及难治性疾病提供了新的治疗思路与方法。全球范围内, 已有多种细胞治疗产品获批上市, 其类型包括间充质干细胞(MSC)、造血干细胞(HSC)、嵌合抗原受体T细胞

(CAR-T)、树突细胞(DC)等, 覆盖急性心肌梗死、肌萎缩侧索硬化、急性移植物抗宿主病、退行性骨关节炎、克罗恩病、腺苷脱氨酶缺乏症, 地中海贫血以及肿瘤等多种疾病治疗领域。

细胞产品的非临床药代动力学(Pharmacokinetics, PK)研究是评估药物安全性和有效性的重要环节, 对于指导临床研究和药物开发具有重要意义。细胞治疗产品的PK特征与传统药物不同, 具有独特的细胞动力学特性, 细胞本身具备体内存续、增殖和/或分化、细胞间相互作用等能力, 在体内表现出多项细胞动力学参数, 包括分布、扩张、收缩和持续期。本文将围绕不同类型细胞治疗药物的PK特征进行分析, 结

[基金项目] 国家重点研发计划资助项目(2021YFC2302505); 建设医药科技成果转移转化公共服务平台项目(2021019611); 中国食品药品检定研究院关键技术研究基金(CJJS-2022-9-1)

[作者简介] 汪宁, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 药物代谢与分析。

***[通讯作者]** 李洪贞, 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 药物代谢与分析。刘颖, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 药代动力学与药物分析。

合当前法规、指导原则及相关文献,对细胞治疗类药物的非临床PK研究提出设计思路和生物分析策略。

1 细胞治疗药物的药代特征

1.1 细胞治疗产品

细胞治疗产品根据细胞来源和分化潜能分为干细胞、体细胞,体外操作方法包括常规培养、定向诱导分化、基因编辑、遗传修饰等。干细胞治疗包括胚胎干细胞、间充质干细胞以及诱导多潜能干细胞等^[1]。最常见的体细胞治疗是肿瘤免疫细胞治疗,主要包括诱导杀伤细胞和过继性细胞治疗。其中过继性细胞治疗包括细胞因子诱导的自然杀伤

细胞(CIK)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)以及T细胞受体嵌合T细胞(TCR-T)等^[2]。

截至2024年,已有多款细胞治疗产品获批上市(表1)。获批上市的干细胞治疗产品多为间充质干细胞,作用机制主要分为两大类,组织修复和免疫调节。另有3款自体造血干细胞的基因疗法获批,将功能性的基因转入造血干细胞后回输患者体内,用以治疗遗传性疾病。免疫细胞目前只有T细胞和DC细胞批准上市,绝大多数T细胞产品为治疗血液系统恶性肿瘤的CAR-T产品。

表1 已获批的细胞治疗产品

| 细胞类型 | 产品名称 | 细胞来源/靶点 | 适应证 | 获批时间(国家) |
|--------|--------------------|-------------|-------------------|------------|
| 间充质干细胞 | Queencell | 自体脂肪 | 皮下组织缺损 | 2010年(韩国) |
| | Cellgram | 自体骨髓 | 急性心肌梗死 | 2011年(韩国) |
| | Cartistem | 异体脐血 | 退行性骨关节炎 | 2012年(韩国) |
| | Cupistem | 自体脂肪 | 克罗恩病 | 2012年(韩国) |
| | Prochymal | 异体骨髓 | 急性GvHD | 2012年(加拿大) |
| | Temcell | 异体骨髓 | 急性GvHD | 2015年(日本) |
| | NeuroNata-R | 自体骨髓 | 肌萎缩侧索硬化 | 2014年(韩国) |
| | Stempeucel | 异体骨髓 | 严重肢体缺血 | 2017年(印度) |
| | Stemirac | 自体骨髓 | 脊髓损伤 | 2018年(日本) |
| | Alofisel | 异体脂肪 | 克罗恩病 | 2018年(欧盟) |
| | | | | 2021年(日本) |
| 造血干细胞 | Stimvelis | 腺苷脱氨酶 | 腺苷脱氨酶缺乏症 | 2016年(欧盟) |
| | Zynteglo | β-珠蛋白基因 | 输血依赖性地中海贫血 | 2019年(欧盟) |
| | Skysona | ABCD1基因 | 肾上腺脑白质营养不良 | 2022年(美国) |
| T细胞 | Yescarta (CART) | CD19 | 急性淋巴细胞白血病弥漫性大B淋巴瘤 | 2017年(美国) |
| | Tescarts (CART) | CD19 | 肥大细胞白血病 | 2020年(美国) |
| | Kymriah (CART) | CD19 | 非霍奇金淋巴瘤 | 2017年(美国) |
| | Breyanz (CART) | CD19 | 弥漫性大B淋巴瘤 | 2021年(美国) |
| | Abecma (CART) | BCMA | 多发性骨髓瘤 | 2021年(美国) |
| | 奕凯达(CART) | CD19 | 大B细胞淋巴瘤 | 2021年(中国) |
| | 贝诺达(CART) | CD19 | 大B细胞淋巴瘤 | 2021年(中国) |
| | 西达基奥仑赛(CART) | BCMA | 多发性骨髓瘤 | 2022年(美国) |
| | Immuncell-LC (CIK) | 肿瘤相关抗原 | 肝细胞癌 | 2007年(韩国) |
| | Ebvallo (同种异体T细胞) | EBV | EBV相关移植后淋巴增生性疾病 | 2022年(欧盟) |
| DC细胞 | Kimmtrak (TCR-T) | gp100 + CD3 | 葡萄膜黑色素瘤 | 2022年(美国) |
| | CreaVax-RCC | 肿瘤相关抗原 | 转移性肾细胞癌 | 2007年(韩国) |
| | Provence | 前列腺特异性癌相关抗原 | 前列腺癌 | 2010年(美国) |
| | APCeden | 肿瘤相关抗原 | 前列腺癌、卵巢癌等 | 2017年(印度) |

1.2 细胞产品的PK特征

不同细胞治疗药物的生物学特性、给药方式、在体内的相互作用等因素存在显著差异,加之一系列体

外操作(如分离纯化、体外刺激、基因编辑或基因修饰、诱导分化等),不同细胞治疗药物的药代动力学特征呈现出多样性。本文仅以间充质干细胞和CAR-

T 细胞系统给药为例,简单阐述不同细胞治疗产品的 PK 特征。

间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSC) 静脉注射给药后,数分钟内即在血液中迅速清除,由于其细胞直径远大于肺微毛细血管的宽度,大部分细胞滞留于肺部^[3],随后在数小时至数天内重新分布在肝脏、脾脏和其他组织中,并逐渐从肺中清除,给药后 1 周内 MSC 存留不足 1%^[4,5]。除被动分布外, MSC 还存在主动定向迁移的特征“归巢”,即在特定组织中血管系统里被捕获,随后跨越血管内皮细胞迁移至特定炎症组织的过程^[6]。许多研究者认为, MSC 的归巢对于其治疗起到关键作用,当机体缺血、缺氧或损伤时, MSC 具有向损伤部位优势分布的特征。然而研究表明 MSC 归巢的损伤部位的数量有限,且持续时间不长。通过冠脉注射,骨髓来源的 MSC 在注射 75 min 后只有不到 2.6% 留在梗阻区域^[7]。在肿瘤动物模型中,向肿瘤部位发生归巢的 MSC 不足注射剂量的 0.01%^[8]。

嵌合抗原受体 T 细胞 (Chimeric antigen receptor T cells, CAR-T) 在体内的良好增殖是其发挥治疗作用的物质基础,通常在输入后几天内出现快速地增殖,以 CD8⁺ 细胞为主^[9],可见在各组织脏器中广泛分布。随后经历快速的指数增长期,与靶抗原结合杀伤靶细胞,刺激 CAR-T 细胞的增殖,在 1~2 周达到最大扩增时间 (T_{\max}),此时可检测到 CAR-T 细胞的达峰浓度 (C_{\max}),其增殖幅度与疗效及细胞因子风暴等毒性反应有关。随后 CAR-T 细胞数量呈双指数下降,初始收缩以较快的速率发生,与活化的 CAR-T 细胞的程序性死亡及增殖降低相对应。随着时间的推移,下降的第二阶段逐渐发生,免疫记忆表型的 CAR-T 细胞的持续存在^[10,12]。

综合比较 MSC 和 CAR-T 的不同药代特征,可以发现由于不同类型细胞治疗产品作用机制的差异,其在动物模型体内的预期生物分布及清除过程展现出显著差异。因此在进行非临床 PK 研究设计时,需根据产品自身的作用机制 (Mechanism of Action, MoA) 选择合适的研究时长,进行动态观察。此外,细胞治疗药物的 PK 特征还受到细胞的来源、制备过程以及患者的免疫状态等多种因素的影响。这些因素均需在非临床 PK 研究设计中加以考虑,根据细胞产品自身特点设计科学合理的 PK 研究,以期更好地阐明细胞的体内过程以及伴随的生物学行为。

2 非临床 PK 研究设计

评估细胞命运能够有力地支持动物种属、给药剂

量和途径选择的合理性,以及研究持续时间的恰当性,并证明收集安全性数据所涉及器官的必要性^[13]。全球各地的监管机构均已出台相应的指导原则,以规范并指导此类研究。

我国监管机构要求采用相关动物模型开展药代动力学试验以阐明基因修饰细胞在体内的命运和行为,包括生物分布、迁移、归巢、定植、增殖、分化和存续性。对于基因修饰的细胞产品,还要求阐明转基因产物在局部和/或全身的暴露特征^[14-16]。此外,FDA 还要求对特异性靶组织和非靶组织中的分布进行研究,EMA 对于预期功能是基于细胞分泌生物活性物质的细胞产品,还要求评价分泌能力和持续时间^[17]。

非临床药代研究应根据治疗产品类型和特点,选择合适的动物模型,根据研究目的及检测指标的临床价值,建立合适的生物分析方法并进行必要的验证。

2.1 种属选择

非临床 PK 研究评价应尽可能选择相关动物种属/模型进行试验,所选动物对细胞治疗产品的生物反应与预期人体反应接近或相似。生理学和解剖学与人类具有可比性,给药系统/流程可行。对于人源细胞产品及其携带的转基因产物应具有一定的免疫耐受性,转运的细胞或表达产物可以达到靶点发挥相似的药理学作用。不同动物种属/模型的选择对细胞产品的 PK 特征有显著影响。

选择与受试药物临床相同药理学作用的动物种属作为 PK 研究的对象尤为重要。间充质干细胞受损伤部位炎症因子招募,聚集损伤部位发挥药效。有研究表明, MSC 在损伤大鼠体内可以存续 14 d,而在正常大鼠体内 7 d 已基本消除^[18]。CAR-T 细胞表面 CAR 与肿瘤靶点结合,激活 T 细胞增殖,发挥肿瘤杀伤作用。在免疫缺陷小鼠中,CAR-T 细胞输注后随时间延长逐渐消除,细胞存续时间仅 7 d。而以上述剂量的 1/100 注射给予荷瘤免疫缺陷小鼠(含 CAR 结合靶点)后,药后 3 d 可见细胞的增殖达峰,药后 1 个月可持续观察到细胞存续,42 d 后可见由于 GvHD 引发的细胞二次达峰。KYMRIAH 审评报告显示,使用免疫系统人源化的荷瘤小鼠,CAR-T 细胞组织中的存续时间可维持 203 d^[19]。

动物对于人源细胞产品以及转基因产物的免疫反应也是细胞治疗产品种属选择所需要重点考虑的问题。尽管 MSC 几乎不表达 MHC-I,或仅表达可以忽略的 MHC-II 类分子,被认为免疫原性较低,但也有研究表明 MSC 在免疫缺陷动物中的存续时间明显长于免疫正常小鼠^[20]。并且人源间充质干细胞在食

蟹猴外周血中存续时间仅为4 h,而猴源间充质干细胞在食蟹猴外周血中的存续时间可持续24 h以上。上述结果均表明MSC在动物体内免疫原性导致的细胞快速清除仍不可忽视。由于尚欠缺对不同种属干细胞相似性的研究,动物源替代产品的非临床数据需谨慎分析,仍建议使用免疫缺陷动物或免疫系统人源化动物进行非临床PK研究。虽然可使用清髓、给予免疫抑制剂等方式抑制动物的免疫反应,但需同时考虑额外操作及给药对细胞产品PK特征产生的影响。此外,对于Til细胞,DC细胞,CAR-NK细胞等需要依赖个体自身免疫系统才能发挥药理学作用的细胞产品,则需要使用免疫系统健全,且存在肿瘤靶点的动物模型进行PK研究。

2.2 受试物

细胞治疗药物在非临床研究阶段,要求使用可充分模拟临床拟用样品的受试物进行评估。当无法采用临床拟用产品进行动物实验时,可以采用动物源替代产品。替代产品应与临床拟用产品采用相同的生产工艺,关键质量参数也需要进行对比。使用替代产品进行研究时,需明确替代产品与临床拟用产品的相似性。受试物本身的细胞形态,代次,活率,细胞密度,辅料成分,产品包材,以及运输条件和温度等,都会对PK研究结果产生影响,均需关注。研究表明, MSC平均传代9次后,普遍会丢失性状,形态改变后,其分化能力也会显著下降^[21]。

细胞治疗产品中最常见剂型为冻存细胞,使用冻存细胞制剂进行试验时,除受试物的选择与细胞状态外,临床前PK研究还涉及对细胞进行复苏,计数、测活以及浓度调整等一系列关键步骤。每一步操作均对细胞的活力及存活率有显著影响。例如细胞复苏时,应重点关注复苏温度及离心力,快速升温会导致细胞内形成冰晶,损伤细胞结构。过慢升温会导致细胞在低温下暴露时间过长,影响代谢活动。复苏时的离心力也需严格控制,过高会损伤细胞,过长导致细胞受到过度的压力,制动速度过快也可能对细胞造成剪切力。

细胞浓度与活率的测定是确保动物给药剂量准确性的重要基础步骤,不同类型的细胞需采用相应的染色方法。最常见的计数方法是台盼蓝染色,当细胞状态良好时,可准确区分细胞死活,而当细胞状态变差,或存在细胞碎片等杂质时,台盼蓝染色区分不明显,容易造成计数不准确。AO/PI荧光计数法采用核酸特异性标记原理,根据死活细胞的荧光不同,可直接排除杂质碎片的干扰,是目前干细胞、免疫细胞等细胞

治疗产品更为常用的计数方式。

冻存细胞中一般会含有一定比例的二甲基亚砜(DMSO),低温时DMSO对细胞无毒性,保护细胞免受冻存损伤。细胞复苏后常温下DMSO具有很强的细胞毒性,会显著影响复苏后细胞活率,4℃条件下长时间放置也会对细胞造成损伤^[22,23]。因此,研究中需关注产品复苏后保存温度及时长,以确保给予动物的受试物的活率及活性(如:细胞干性,分化潜能等)。DMSO也会对动物产生一定毒性反应,作为溶剂使用时,推荐在动物给药时的使用量可占给药总体积的10%~20%^[24]。而作为细胞冻存液,其比例一般不高于10%,当DMSO比例低≤5%时,动物无明显毒副作用。

细胞产品配制及计数过程中,需根据产品临床应用方式,优化、复苏、离心、洗涤条件,并选择合适的计数测活方法,重点关注辅料成分,尤其是冻存液中成分对于细胞活率和活性的影响,严格控制细胞产品从复苏到完成动物给药的时长,必要时可以对给药完成后的剩余细胞再次进行活率和活性的检测,以确保给药所用产品充分代表临床样本。

2.3 试验设计

试验设计除考虑受试物、动物种属外,还需关注药物的给药途径、给药剂量、动物性别和数量,样本采集,以及研究时长等多种因素。给药途径需最大程度模拟临床拟用给药方式,当无法模拟临床给药方式时,研究需明确替代的给药方式或方法,并阐明其科学合理性。如临床需采用特殊装置给药,非临床研究需与临床保持一致。

非临床PK研究剂量设计需考虑多种因素。由于细胞治疗药物的特殊性,往往量效关系不显著。干细胞或终末分化的细胞类药物系统给药后,作为异源细胞在循环系统中迅速清除;而局部病灶注射后,入血水平较低,动物局部病灶可给药体积往往远小于临床给药体积。为更好地观测干细胞药物在体内的命运和存续时间,通常选择最大可行剂量进行临床前PK研究。而CAR-T细胞进入体内后立即呈指数增殖,给药剂量的增加远低于细胞增殖速度,因此剂量增加不会导致C_{max}的明显变化,无需为了表征分布而提高给药剂量。但动物模型的肿瘤负荷和给药的细胞量之间存在相互作用,当肿瘤负荷过大时,限制了CAR-T细胞的增殖,同时已存在的CAR-T细胞迅速耗竭,无法正常增殖。而当肿瘤负荷过小时,CAR-T细胞增殖尚未达峰,肿瘤细胞就已迅速清除,此时CAR-T细胞无法继续激活增殖。两种肿瘤负荷动物

模型均无法呈现 CART 细胞在体内的真实命运^[10]。因此需参考药效研究结果,根据肿瘤负荷程度选择合理的有效剂量作为 PK 研究剂量。

除非临床适应证仅针对单一性别(如前列腺癌或子宫癌治疗),药代动力学研究通常应纳入雌雄各半的受试群体。鉴于细胞治疗产品个体间差异显著,一般建议每个性别/组/时间点至少使用 5 只啮齿类动物或 3 只非啮齿类动物。遵循 3R 原则(替代、减少、精炼),动物总数量可以来自多项试验的总和,但前提是必须提供科学充分的依据,说明这些试验数据合并使用的合理性和有效性^[25]。当受试物评价对于年龄有特殊考虑时,可参考 ICH S11 附录 A 的不同属间的器官成熟的比较信息确定研究动物的年龄^[26]。

非临床 PK 的样本采集应选择足以反应产品随时间改变的特征,研究时长应覆盖细胞的分布、迁移、归巢及其存续和消亡的特性。包括其达峰,稳态长度或持续性等信息。对于有复制能力的,应涵盖因复制而产生的二次达峰和后续清除阶段。基因修饰的细胞产品还需要采集表达产物的达峰和清除或持续性信息。ICH S12 提出了主要采集的 13 种样本类型^[25],此外,依据细胞产品的特点,还需要采集靶组织、毒性靶器官、表达产物靶组织等。其中基因修饰的细胞产品还需重点关注生殖腺分布情况,确保遗传物质没有持续存在。对于基因修饰的造血细胞,系统给药后预期广泛分布,除常规 PK 研究外,还需要重点关注其在不同组织中的分化情况,对于其疗效和毒性的解释分析有更为重要的意义。

2.4 生物分析

细胞药物目前的检测手段可以分为侵入式和非侵入式两大类。侵入式指采集体液和/或组织样本,对其核酸、蛋白或细胞水平进行定量/半定量检测。非侵入式多采用活体成像技术,包括光学成像、同位素标记等方式。

各国法规及指导原则多建议采用一种或多种合适方法评估细胞产品的分布、迁移、归巢及其存续和消亡特性,同时要求阐述方法的科学性。其中 ICH S12 明确指出基于核酸扩增方法(qPCR/dPCR 等)是检测生物样本基因治疗产品水平随时间推移的标准方法,并对方法的性能参数提出要求,包括灵敏度、重现性和加标回收率^[25]。但目前尚未有对于 qPCR/dPCR 方法学的验证指标及可接受标准的指导原则发布,仅 FDA 在基因治疗长期随访指导原则中对 qPCR 灵敏度有明确要求:检测的定量下限

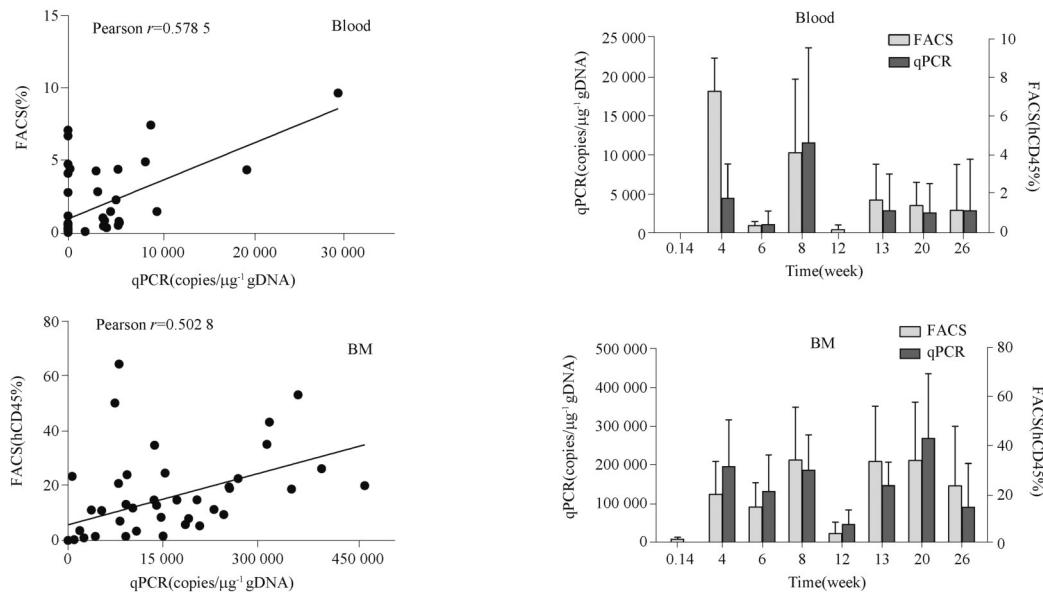
不低于 50 copies/ μg gDNA,为目前唯一明确的接受标准。

在基因治疗领域,关于方法学验证的讨论已相当广泛,并形成了一系列的参考文献及白皮书^[28-32],这些文献所确立的验证指标通常涵盖以下几个方面:标准曲线的建立、精密度与准确度的评估、灵敏度的测定、特异性/选择性的确认、加样回收率的考量,以及稳定性的验证。然而,在各项验证指标的可接受标准以及具体考察方法上,学术界与实践领域仍存在一定的分歧与差异性理解。

尽管 qPCR/dPCR 技术在细胞治疗药物的生物分析中得到了广泛应用,但其同样具有局限性。首先,使用基因拷贝数间接定量细胞产品,不能反映细胞的状态和完整性,即使细胞出现凋亡或者丧失生物学功能,只要目的片段存在,仍可以检测到分布。其次,以 copy/ μg^{-1} gDNA 为单位而非药理学相关单位表征细胞药物浓度,难以与药理毒理学反应建立明确关系,不利于药效指标及毒性结果的评价。再次,在细胞含量较低或细胞增殖明显的体液/组织中,如 CART 细胞在血液中,造血干细胞在清髓个体的骨髓中等,使用 copy/ μg^{-1} gDNA 定量,一定程度会导致药代动力学特征中的细胞扩增期的低估^[33]。

因此,除 qPCR/dPCR 方法外,流式细胞术通过荧光标记直接测量细胞,能够解析细胞治疗产品的亚群和生理状态,成为 qPCR 方法的有效补充。但需注意,流式检测对样本稳定性要求较高,检测结果易受样本状态及操作过程影响。在对某造血干细胞产品进行生物分布检测时,同时采用了 qPCR 和流式细胞术,相关性分析显示两者数据呈中度正相关性,均揭示了产品随时间变化的相似趋势(图 1)。

此外,成像技术、原位杂交技术等也逐渐应用到细胞治疗产品的体内示踪中,每种技术均有其优势和局限性,见表 3。光学成像方法也是细胞治疗产品临床前研究使用的检测手段之一,不同细胞标记方式对其检测结果影响较大。绿色荧光蛋白和荧光素酶等,具有提供移植细胞活力信息的优势,但存在组织穿透力差、空间分辨率低的问题,同时需考虑其转染效率以及转染后细胞表达水平的差异对检测准确性的影。DiR 染料背景低,标记效率高,穿透性好,但会随细胞增殖逐渐稀释而消失。放射性核素标记具有高分辨率和准确性,但是其半衰期导致持续时间有限,限制对分布后期的评估,且放射性可能从死亡细胞释放,导致非特异信号产生。



A:某细胞治疗产品小鼠组织分布研究中所有全血样本分别使用流式细胞术和qPCR法检测供试品含量的相关性分析;B:对应全血样本两种检测方法测得的含量变化趋势;C:所有骨髓样本两种检测方法的相关性分析;D:对应骨髓样本两种检测方法测得的含量变化趋势

图1 qPCR与流式细胞术检测相关性

表3 生物分析方法比较

| 方法 | 标记物 | 定量限 | 追踪时间 | 优点 | 缺点 |
|-----------|---|------------------------------------|---------|---------------------------------------|----------------------------|
| qPCR/dPCR | Taqman/SYBR | 50 copies/ μg^{-1} gDNA | 持续 | 灵敏度高,特异性强,操作简单 | 不能体现完整细胞的分布信息,需要牺牲动物 |
| 流式细胞术 | 荧光染料/蛋白 | - | 持续 | 操作简单快速。 | 不能绝对定量,对样本稳定性要求高 |
| 光学成像 | 萤火虫荧光素酶、海肾荧光素酶等 | - | 持续 | 操作简单,非侵入性,节省动物 | 不能精确定量,穿透力弱,不适合大动物 |
| PET-CT | 直接标记: ^{18}F 、 ^{89}Zr 、 ^{64}Cu 等;报告基因:HSV-Tk | 分辨率:0.55~2 mm | 5~6个半衰期 | 高敏感性,动物利用度高,灵敏度高 | 同位素昂贵,半衰期短;直接标记会随细胞分裂而稀释 |
| SPECT-CT | ^{111}In 、 ^{99}mTc 、 ^{123}I | 分辨率:0.2 mm | 5~6个半衰期 | 动物利用度高;同位素价格低,成像时间长,分辨率较低 | 半衰期较长 |
| 核磁共振 | SPIO、MnO 纳米颗粒 | - | 6周 | 标记物生物可降解性,低剂量标记物不影响细胞活性和增殖能力,可直接转化至临床 | 无法区分死细胞和巨噬细胞,直接标记会随细胞分裂而稀释 |

3 结论

细胞治疗药物的非临床药代动力学研究具有特殊性和复杂性,因产品类型而异。研究设计时,需全面考虑动物种属及模型、给药途径、样本采集时间点设计及生物分析方法。受试验设计、动物模型、样本采集和检测方法等多种因素影响,临床前PK数据常存在显著个体差异。在结果解读时,应深入理解细胞治疗产品的特性,对比分析其在非临床动物模型与临床药理作用的异同,并重视个体数据分析,从而为临床应用提供更丰富、更有价值的非临床药代研究信息。

参考文献

- [1] Mahla RS. Stem Cells Applications in regenerative medicine and disease therapeutics[J]. Int J Cell Biol, 2016;6940283.
- [2] Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer[J]. Science, 2015, 348(6230):62-68.
- [3] Krueger TEG, Thorek DLJ, Denmeade SR, et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise[J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(9):651-663.
- [4] Lee R, Pulin A, Seo M, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5:54-63.
- [5] Zangi L, Margalit R, Reich-Zeliger S, et al. Direct imaging of immune rejec-

- tion and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(11):2865-2874.
- [6] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 206-216.
- [7] Djouad F, Bony C, Apparailly F, et al. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells [J]. *Transplantation*, 2006, 82(8): 1060-1066.
- [8] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium [J]. *Circulation*, 2005, 111(17): 2198-2202.
- [9] García-Calderón CB, Sierro-Martínez B, García-Guerrero E, et al. Monitoring of kinetics and exhaustion markers of circulating CAR-T cells as early predictive factors in patients with B-cell malignancies [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1152498.
- [10] Qi T, McGrath K, Ranganathan R, et al. Cellular kinetics: A clinical and computational review of CAR-T cell pharmacology [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188(9):114421.
- [11] 高丽丽, 刘晓, 王玉珠, 等. 嵌合抗原受体T细胞治疗产品的临床药理学研究有关问题的探讨 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(12): 1820-1824.
- [12] Mueller KT, Maude SL, Porter DL, et al. Cellular kinetics of CTL019 in relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2017, 130(21):2317-2325.
- [13] US Food and Drug Administration. Guidance for industry: preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products [EB/OL]. (2013-11) [2024-08-30]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>
- [14] 国家药品监督管理局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行) [EB/OL]. (2017-12-22) [2024-08-30]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/listpage>
- [15] 国家药品监督管理局. 人源干细胞产品非临床研究技术指导原则 [EB/OL]. (2024-01-18) [2024-08-30]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/listpage>
- [16] 国家药品监督管理局. 基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则 [EB/OL]. (2021-12-03) [2024-08-30]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/listpage>
- [17] European Medicines Agency. Guideline on cell-based medicinal products [EB/OL]. (2007-11-01) [2024-08-30]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-human-cell-based-medicinal-products_en.pdf
- [18] Jiang X, Jiang X, Qu C, et al. Intravenous delivery of adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuates acute radiation-induced lung injury in rats [J]. *Cyotherapy*, 2015, 17(5):560-570.
- [19] US Food and Drug Administration. KYMRIAH(tisagenlecleucel) approval information [EB/OL]. (2017-08-30) [2024-08-30]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah>
- [20] Zangi L, Margalit R, Reich-Zeliger S, et al. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* [J]. 2009, 27(11):2865-2874.
- [21] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro [J]. *BMC Cell Biol*, 2006, 10(7):14.
- [22] Svalgaard JD, Haastrup EK, Reckzeh K, et al. Low-molecular-weight carbohydrate Pentaisomaltose may replace dimethyl sulfoxide as a safer cryoprotectant for cryopreservation of peripheral blood stem cells [J]. *Transfusion*, 2016, 56(5):1088-1095.
- [23] Fry LJ, Querol S, Gomez SG, et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation [J]. *Vox Sang*, 2015, 109(2):181-190.
- [24] Li P, Zhao L. Developing early formulations: practice and perspective [J]. *Int J Pharm*, 2007, 341(1-2):1-19.
- [25] European Medicines Agency. ICH S12 Guideline on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products [EB/OL]. (2023-09-08) [2024-08-30]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s12-nonclinical-biodistribution-considerations-gene-therapy-products-step-5_en.pdf
- [26] European Medicines Agency, ICH S11 Guideline on nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals [EB/OL]. [2020-03-31]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s11-nonclinical-safety-testing-support-development-paediatric-pharmaceuticals-step-5_en.pdf
- [27] US Food and Drug Administration. Guidance for industry: Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products [EB/OL]. (2020-01) [2024-08-30]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>
- [28] Yang TY, Doddareddy R. Considerations in the development and validation of real-time quantitative polymerase chain reaction and its application in regulated bioanalysis to characterize the cellular kinetics of CAR-T products in clinical studies [J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(2):115-128.
- [29] Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 17(20):152-168.
- [30] Wissel M, Poirier M, Satterwhite C, et al. Recommendations on qPCR/ddPCR assay validation by GCC [J]. *Bioanalysis*, 2022, 14(12):853-863.
- [31] Uchiyama A, Naritomi Y, Hashimoto Y, et al. Understanding quantitative polymerase chain reaction bioanalysis issues before validation planning: Japan Bioanalysis Forum discussion group [J]. *Bioanalysis*, 2022, 14(21):1391-1405.
- [32] Loo L, Harris S, Milton M, et al. 2021 white paper on recent issues in bioanalysis: tab/nab, viral vector cdx, shedding assays; crispr/cas9 & car-t immunogenicity; per & vaccine assay performance; ada assay comparability & cut point appropriateness (part 3-recommendations on gene therapy, cell therapy, vaccine assays; immunogenicity of biotherapeutics and novel modalities; integrated summary of immunogenicity harmonization) [J]. *Bioanalysis*, 2022, 14(11):737-793.
- [33] Yamamoto S, Matsumoto SI, Goto A, et al. Quantitative PCR methodology with a volume-based unit for the sophisticated cellular kinetic evaluation of chimeric antigen receptor T cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):17884.

(编辑:温庆辉 收稿日期:2024-09-25)