

经眼玻璃体给药药物的研究进展及非临床研究的考虑要点

付淑军^{1#}, 于冰^{1#}, 廖琴², 孙涛^{1*}

(1. 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022; 2. 昭衍(苏州)新药研究中心股份有限公司, 江苏 太仓 215421)

摘要: 近年来, 随着眼科治疗药物的发展, 玻璃体作为眼科疾病尤其是眼底病药物治疗的通道, 为以湿性年龄相关性黄斑变性 (wet age-related macular degeneration, wAMD) 为代表的各种脉络膜新生血管性疾病、眼底病并发的黄斑水肿、葡萄膜炎等疾病的治疗开辟了新的治疗途径。经眼玻璃体给药的药物主要包括眼用抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 类注射剂、微纤溶酶及激素等。对于该类眼科产品, 目前国内外尚无明确的非临床研究技术指导原则和规范可循。本文结合审评实践和已上市产品的研发案例, 梳理了经眼玻璃体给药药物的研究进展及非临床研究评价考虑要点, 以为该类药物的研究评价提供参考。

关键词: 眼科治疗药物; 玻璃体; 经眼玻璃体给药药物; 非临床研究

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-0815-11

Research progress and considerations on non-clinical studies of the drugs administered through the ocular vitreous body

FU Shu-jun^{1#}, YU Bing^{1#}, LIAO Qin², SUN Tao^{1*}

(1. Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China;

2. Joynn Laboratories (Suzhou), Taicang 215421, China)

Abstract: In recent years, with the development of ophthalmic therapeutic drugs, the vitreous body, as a channel for the treatment of ophthalmic diseases, especially fundus diseases, has opened up a new therapeutic approach for various choroidal neovascular diseases, macular edema, uveitis and other diseases associated with fundus diseases, which is represented by wet age-related macular degeneration (wAMD). The drugs administered through the vitreous body mainly include ocular anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) injections, microplasmin and hormones. For this kind of ophthalmic products, there are no clear technical guidelines and norms for non-clinical research at home and abroad. This article combines review practices and cases of marketed products to sort out the research progress and considerations on non-clinical studies of ophthalmic drugs dosing through the ocular vitreous body, in order to provide references for the research and evaluation of such drugs.

Key words: ophthalmic therapeutic drug; vitreum; drugs administered through the vitreous body; non-clinical study

1 概述

随着科技的发展、生活方式的改变、老龄化的加重, 眼部疾病发病率成倍增长, 眼科药物已成为国内外医药研发的热门领域之一。眼睛是一个具有保护性解

剖学和生理学的独特器官, 有其特殊的解剖结构和生理屏障, 外源药物很难通过血液循环和组织渗透等途径进入眼内靶组织发挥疗效, 使得眼科药物研发面临诸多挑战。近年来, 随着科技的进步以及对眼科疾病发病机制认识的不断深入, 眼科治疗药物研发也取得了长足的进展。自 2006 年美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准雷珠单抗眼用注射液以玻璃体腔注射为给药途径应用于湿性年龄

收稿日期: 2022-11-22; 修回日期: 2023-02-15.

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-85243169, E-mail: sunt@cde.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1256

相关性黄斑变性 (wAMD) 患者且取得显著疗效以来, 多个经眼玻璃体腔给药的新品种, 包括生物制品、化药和/或新型递送系统, 陆续获批临床试验或上市^[1,2]。

玻璃体作为眼科疾病尤其是眼底病药物治疗的通道, 经眼玻璃体给药是将药物运送至眼后节组织最直接的方法, 可以使玻璃体和视网膜内的药物浓度达到较高水平, 为以 wAMD 为代表的各种脉络膜新生血管性疾病、各种眼底病并发的黄斑水肿、葡萄膜炎等疾病的治疗开辟了新的治疗途径。但经玻璃体给药可能导致眼内感染、非感染性免疫反应、晶体损伤、视网膜撕裂脱离、眼底出血等严重的不良反应或注射相关风险, 对操作者的技术和操作环境均有较高要求, 并且对于经玻璃体给药的眼科产品目前国内外尚无系统的技术指导原则, 其非临床研究和评价均存在一定的难度。本文结合审评实践和已上市产品的研发案例, 梳理了经眼玻璃体给药药物的研究进展及非临床评价考虑要点, 以期国内该类药物的研究评价提供参考。

2 经眼玻璃体给药药物的研究进展

2.1 眼玻璃体的解剖与生理特点^[3,4]

眼玻璃体是无色透明的凝胶体, 位于晶状体后面的玻璃体腔内, 占眼球内容积的 4/5, 成人玻璃体腔容积约为 4.5 mL。晶状体后部位于玻璃体前部的凹面内, 玻璃体其他部分附着于睫状体和视网膜的内表面。玻璃体周边部的胶原纤维排列紧密, 形成玻璃体膜, 位于晶状体后表面和睫状体平坦部 (又称玻璃体基底部) 的为玻璃体前界膜, 从前界膜到视盘边缘处为止的为玻璃体后界膜。玻璃体与视网膜附着最紧的部位是睫状体平坦部, 其次是视盘周围、黄斑中心凹部和视网膜的主干血管部。玻璃体表面与视网膜相连的是皮层玻璃体。玻璃体与视网膜的连接由玻璃体皮层和视网膜的内界膜组成。

玻璃体由水 (约占 98%)、胶原、透明质酸及其他蛋白多糖和糖胺多糖以及很少的玻璃体细胞组成, 是眼屈光介质的组成部分, 对光线的散射极少, 透明可导光。玻璃体构成血-玻璃体屏障 (又称视网膜玻璃体屏障), 能阻止血管内的大分子进入玻璃体。正常玻璃

体抑制多种细胞增生, 维持玻璃体内环境的稳定。玻璃体内无血管、无神经, 其所需营养来自房水和脉络膜, 代谢较为缓慢, 不能再生, 缺损后留下的空间由房水填充。随着年龄的增加, 玻璃体内透明质酸溶解、胶原网状结构塌陷, 可引起玻璃体凝缩、劈裂、后脱离 (玻璃体和视网膜内界膜分离) 和液化等组织学变化, 而眼内炎症、玻璃体积血、长眼轴等多种状态也可引起玻璃体后脱离。当玻璃体变性或液化甚至脱离时, 其透明度受影响且易导致视网膜脱离。

2.2 不同种属玻璃体的比较

不同种属的眼球尺寸和玻璃体腔大小不同, 经玻璃体给药可容纳的药物体积亦有不同 (表 1)。玻璃体结构成分的相对组成存在着物种和年龄上的差异^[5,6]。不同动物种属的玻璃体结构差异与透明质酸浓度的差异有关。与人和非人灵长类相比, 兔、狗、猫和啮齿动物玻璃体的透明质酸浓度相对于胶原蛋白较低, 而恒河猴的玻璃体在胶原蛋白和透明质酸含量、结构特征和老化方面与人类的玻璃体最为相似^[7]。因此, 在经眼玻璃体给药药物的非临床研究中应考虑到动物玻璃体大小的差异和年龄带来的玻璃体组织性质不同, 及其对药物分布和毒性的影响。

2.3 经眼玻璃体给药药物研究进展

眼科药物多通过眼局部给药, 包括外眼、眼表、眼周 (如结膜下、球后和眶内注射)、球壁 (如细胞和基因产品的视网膜下注射和脉络膜上腔注射) 和眼内 (玻璃体腔注射及前房注射等) 给药, 少数眼科用药通过全身途径如口服和静脉注射等给药。经玻璃体给药属于眼内给药, 采用的方式为玻璃体腔注射和玻璃体腔植入, 前者主要用于一些能够通过针管或装置直接注射的液体剂型或缓释剂型, 后者主要用于一些特殊递送装置的手术植入。

2.3.1 玻璃体腔注射给药

玻璃体腔注射 (intravitreal injection, IVT) 是一种有创的给药方法, 但注射后可使玻璃体和视网膜内的药物浓度达到较高水平, 是多种眼底病的有效治疗手段。随着需要 IVT 治疗的疾病种类及患者数量的快速

Table 1 Comparison for eyeball parameters of different species^[8-10]. The values in the table are approximate and the relevant values vary according to the testing technique, age of the animals, animal strain and study

Species	Vitreous chamber length/mm	Vitreous chamber volume/mL	Chamber injection volume/mL
Human	16.32	3.9-5	0.05-0.1
Non-human primate	11.25-11.30	1.5-4	0.05-0.1
Mini-pig	11.9 (est)	2-2.7; 3-3.2	0.1-0.3
Dog	10.02	2.4-3.5	0.1-0.2
Cat	7.80-8.13	1.7-3.2	-
Rabbit	6.2-7.1	1.4-1.8	0.025-0.1
Rat	1.4-1.5	0.013-0.054	0.003-0.005
Mouse	0.59-0.71	0.005-0.010	0.001-0.002

增长, 有关 IVT 注射方法和技术的临床证据也越来越多。2014 年 12 月美国专家小组根据新证据更新了玻璃体腔注射技术指南^[11]。2015 年 12 月中华医学会眼科学分会眼底病学组发布了我国视网膜病玻璃体腔注射术质量控制标准^[12]。2018 年 2 月欧洲视网膜专家学会 (EURETINA) 基于 IVT 最新流行病学数据更新发布了玻璃体内注射建议, 认为已有的临床证据显示 IVT 注射总体上是安全的, IVT 注射后发生眼内炎或其他并发症的风险极低, 而这些风险升高往往因未按照安全规范操作^[13]。

国内外获批上市的玻璃体腔注射药物主要包括抗血管内皮生长因子 (VEGF) 类药物、激素和酶, 具体信息参见表 2^[1,14-20]。目前, 通过玻璃体腔注射应用于眼部疾病的新型治疗药物也已在临床试验阶段, 如小分子酪氨酸激酶抑制剂 sunitinib^[17]、抗体-生物聚合物偶联物、基因治疗产品 (如纽福斯生物的 NR082, rAAV-ND4, 用于 Leber 遗传性视神经病变) 等, 为更多罹患眼科疾病甚至是遗传性眼病的患者带来了新希望, 也对非临床研究提出了挑战与思考。

2.3.2 玻璃体内植入给药

经玻璃体内植入给药, 即将药物与高分子材料混合制备成一定形态的制剂后装入微型装置, 再通过手术或注射将微型装置植入到玻璃体中, 从而使药物缓慢释放, 达到延长药物作用时间以及降低剂量和减小副作用的效果, 特别适合慢性及老年性眼疾病的长期治疗, 提高患者顺应性。玻璃体内植入物分为可生物降解和非可生物降解两类。部分已被美国 FDA 批准用于糖尿病性黄斑水肿 (diabetic macular edema, DME)、视网膜静脉阻塞性黄斑水肿 (retinal vein occlusion macular edema, RVO-ME) 和非感染性葡萄膜炎。

可生物降解的玻璃体内植入物: 如 2017 年 NMPA 批准的首个地塞米松玻璃体内植入剂 Ozurdex[®] (含 0.7 mg 地塞米松, 载体材料为聚乳酸-羟基乙酸共聚物), 用于治疗 RVO 继发的黄斑水肿, 由于药物释放和支架在玻璃体腔内的逐渐降解, 药物浓度呈指数级下降, 有效性可持续至植入后 3~6 个月; 又如溴硝柳胺药物输送系统 (Brimo DDS[®]), 在一项 II 期临床研究 (NCT00658619) 中被用于治疗继发于 wAMD 的地图

Table 2 The summary of marketed drugs administrated by intravitreal injection^[1,14-20]. wAMD: Wet age-related macular degeneration; RVO: Retinal vein occlusion; DR: Diabetic retinopathy; mCNV: Myopic choroidal neovascularization; DME: Diabetic macular edema; NMPA: National Medical Products Administration; VEGF: Vascular endothelial growth factor

Type	Drug	Company	MW	Ophthalmic indication	Description
Anti-VEGF drug	Pegaptanib	Gilead	50 kD	wAMD	Nucleic acid ligand, binding and inhibiting VEGF ₁₆₅ , approved by FDA in Dec. 2004, withdrawn from the market in 2014.
	Macugen [®]				
	Ranibizumab	Novartis/Roche	48 kD	AMD, DME, RVO, DR, mCNV	Recombinant anti-VEGF-A fab fragment, approved by FDA in Apr. 2006; approved by NMPA in Oct. 2012.
	Lucentis [®]				
	Aflibercept Eylea [®]	Regeneron/Bayer	115 kD	AMD, DME, RVO, DR, mCNV	A fully humanized recombinant fusion protein that blocks VEGF-A, VEGF-B and PlGF. Approved by FDA in Nov. 2011; approved by NMPA in Feb. 2018.
Hormone drug	Conbercept	Kanghong Biotechnologies	143 kD	AMD, mCNV, DME	A fully humanized recombinant fusion protein, approved by NMPA in Dec. 2013.
	Brolucizumab (RTH-285) Beovu [®]	Novartis	26 kD	wAMD, DME (Phase III)	Humanized single-chain variable fragment (scFv), with small molecular weight and higher tissue permeability. It's easier to be cleared from the circulation, and binds to all isoforms of VEGF-A. Approved by FDA in Dec. 2019.
	Faricimab (RG7716) Vabysmo [®]	Roche	146 kD	DME, wAMD	Humanized bispecific IgG1 monoclonal antibody (VEGF-A & Ang-2), approved by FDA in Jan. 2022.
	Triamcinolone acetonide injectable suspension, Triesence [®]	Novartis	434.5	Sympathetic ophthalmia, uveitis and ocular inflammation during vitrectomy; observation of the posterior hyaloid during vitrectomy	Approved by FDA in Nov. 2007.
Enzyme drug	Triamcinolone acetonide injectable suspension, Trivaris [®]	Allergan		The same as above	Approved by FDA in Jun. 2008. Now it has been withdrawn from the market.
	Ocriplasmin Jetrea [®]	Thrombogenics	27 kD	Vitreomacular traction syndrome	Approved by FDA in Oct. 2012.

样萎缩患者^[1]。

非可生物降解的玻璃体内植入物: 如 Retisert[®] (0.59 mg 醋酸氟轻松)/Illuvien[®] (0.19 mg 醋酸氟米龙), 通过聚合物共轭形成, 药物在玻璃体内可持续释放 2 至 3 年, 药物浓度在封闭的玻璃体腔内呈稳定的线性下降, 但这些装置仍然留在玻璃体腔内, 需手术取出^[1]; Vitrasert[®] (Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA), 在眼内持续释放更昔洛韦, 用于治疗巨细胞病毒视网膜炎^[1]。2021 年 10 月 FDA 批准了雷珠单抗港式递送系统 (port delivery system, PDS) 用于治疗 wAMD 的上市申请。PDS 是一种先进的不可降解、可补充的植入物, 通过手术固定在巩膜上, 由于浓度梯度而产生的被动扩散使药物从端口移动到玻璃体腔, 多孔金属元件可实现药物持续和可控释放, 减少了玻璃体腔注射的次数, 提高了患者的顺应性^[21]。

3 经眼玻璃体给药药物的非临床研究

非临床研究的最终目的是为临床研究和临床用药服务, 应针对临床研究拟达到的目的分阶段展开。相比全身或其他局部给药途径, 经由玻璃体给药虽然避开了肝脏的首过效应和/或眼静态屏障 (角膜屏障、血-房水和血-视网膜屏障), 将药物直接送达玻璃体及其周围组织如视网膜、脉络膜, 可在短时 (通常数小时) 获得更高的靶组织药物浓度, 但是既有可能产生快速且显著的靶效应, 也可能因药物局部暴露量过大或暴露持续时间过长引起药物相关的眼毒性, 且经玻璃体给药也可能带来严重的与注射或植入操作相关的不良反应。因此, 此类药物非临床研究的考虑与其他药物有所不同。

3.1 实验动物选择

合适的动物种属是开展药物非临床研究的基础, 可参考相关指导原则 (如 ICH S6 (R1)、《基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则》等) 要求进行选择。对于经眼玻璃体给药的药物, 还应综合考虑该动物种属眼球的解剖和病理生理特点及药物在眼内的作用方式。可供选择的常用实验动物有非人灵长类 (non-human primates, NHPs)、小型猪、犬、兔、豚鼠、大鼠和小鼠, 所选动物通常是正常健康动物, 考虑到一些产品 (如基因治疗产品) 或拟用适应症的特殊性, 某些情况下可能采用免疫缺陷型、转基因或基因敲除、人源化或其他基因修饰的动物, 甚至使用“非标”的牛、马等动物^[22]。

兔眼的解剖学和生理学上与人相似, 且成本低、易获得, 是眼科药物研发常采用的动物模型。Lucentis[®]、Eylea[®] 和 Beovu[®] 等产品非临床研究中均采用兔开展了相关研究。然而, 由于兔是免疫敏感动物, 其结果可能

受在兔中产生的免疫原性或免疫原性继发性反应的影响, 应谨慎解释和向人体推导。同时, 因兔的免疫原性反应可能改变药物的暴露情况, 特别是在重复给药研究中, 应慎重选用。此外, 眼部的葡萄膜和视网膜色素上皮富含黑色素, 若药物与黑色素具有较高的亲和力, 则会影响其在眼组织中的递送与分布, 如文献^[23]报道, 白化兔和色素兔均经玻璃体注射给予庆大霉素后, 白化兔的视网膜损伤比色素兔更严重, 研究者分析其原因可能是庆大霉素与色素兔眼部黑色素结合降低了游离庆大霉素的浓度所致。黑色素结合是眼部药代动力学和药效学的重要因素^[24], 建议研发早期关注药物与黑色素的结合研究。

啮齿类动物 (如小鼠和大鼠) 可用于全身安全性研究, 但也需考虑其潜在免疫原性反应对试验可能产生的影响。如 Eylea[®] 的非临床研究中发现, 在大鼠或小鼠中可产生与肾病有关的抗体反应和清除率的提高, 故不能用于开展更长周期的 Eylea[®] 的全身安全性重复给药毒性试验^[16]。

非啮齿类动物中, 犬和猴的眼球大小和解剖学及生理学上与人眼相似, 有利于眼部给药 (尤其是玻璃体腔给药) 和眼部检查, 也是眼科药物毒性研究的常用动物, 如 Lucentis[®]、Eylea[®] 和 Beovu[®] 等的研究中均使用食蟹猴作为关键性安全性评价的动物模型, 但犬的眼底有富含色素的毯层, 有可能结合药物并改变其生物利用度^[25]。近年来, 由于小型猪眼底没有毯层结构、有类似于人类的视锥细胞和视杆细胞比率^[26], 在眼科药物研发中的应用越来越多。

3.2 受试物

受试物是非临床研究与评价的物质基础, 其质量和配制的准确性是获取可靠结果的前提。通常非临床试验使用的受试物应与拟用于临床试验的产品具有可比性。在安全性评价试验中更应加强受试物检测, 一方面申请人应提供符合拟定质量标准的受试物, 且受试物的有效期满足试验周期的要求, 可通过提供质验报告和稳定性研究报告来体现; 另一方面研究机构负责研究用受试物的质量、稳定性和浓度一致性等^[27]。但是, 由于经玻璃体给药药物在给药后接触的组织 (角膜内皮细胞、虹膜-睫状体、晶状体和视网膜) 敏感性高, 暴露的玻璃体腔空间小且密闭、玻璃体液循环缓慢, 对此类药物的质量控制应更为严格。此外, 对于试验中研究用 IVT 受试物, 由于对其进行分装、复溶、稀释等配制操作可能引起药液污染、内毒素超标等严重影响试验结果的情况, 且单支临床拟用装量的 IVT 用受试物基本可以满足每只动物单眼或双眼的应用, 故建议直接采用不同浓度、临床拟用装量的研究用受

试物。

3.3 非临床药效学研究

3.3.1 基本考虑

药效学研究是新药开发过程中的重要内容, 据统计药物有效性问题是 II、III 期临床失败的最主要原因。非临床药效研究包括验证受试物在不同系统中的有效性, 考察其作用的量效、时效关系, 探索给药方案和阐明其作用机制。应结合受试物本身及其拟用适应症特点, 关注研究的科学性和合理性, 为受试物进入临床或在临床应用提供准确、可靠的有效性数据支持。由于绝大多数非临床药效学研究模型 (包括体外研究系统/模型、体内动物模型) 都存在一定的固有缺陷, 体内动物模型中有效性评价相较体外模型对预测受试物的临床药效虽然可能有更强的指导意义或相关性, 但因种属差异的存在, 单一实验系统/动物模型往往都无法完全模拟药物在人体中的作用, 建议采用多种模型从多个角度/层面组合验证评价药物的有效性^[28,29]。经玻璃体给药药物的药效学试验, 与其他眼用药物相似, 关键是选择合适的实验系统/动物模型和药效学指标, 证明药物在靶组织中具有活性或能达到有效治疗浓度、阐明作用机制^[30]。

3.3.2 药效学模型及指标

非临床药效学研究一般选用经典、公认的模型, 新方法、新模型应进行充分的验证^[29]。目前, 经眼玻璃体给药已上市药物的非临床药效学研究以及研究文献报道中, 已有多种体外和体内模型应用较广且经临床前及临床试验验证, 如: 针对眼底新生血管性疾病的抗 VEGF 类的生物制品, 体外研究包括受试物与不同种属/不同亚型靶结合的亲和力和抑制内皮细胞的生长试验、抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞的迁移试验、抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞出芽试验等, 体内研究模型有激光诱导的猴及啮齿类动物脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 模型、氧诱导的幼鼠 (大鼠、小鼠) 视网膜病变 (oxygen induced retinopathy, OIR) 和 DL-A-AAA (DL-A-氨基己二酸) 诱导的兔视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 模型等^[15,16,18,19,30], 针对眼部炎症的药物 (多为激素类小分子), 可采用外源性 VEGF 玻璃体内注射诱导的兔或大鼠视网膜渗漏/通透性增强 (血-视网膜屏障损伤) 模型、氧诱导的幼鼠 (大鼠) 视网膜病变等模型^[20,21,31]。

此外, 对于新型治疗产品, 可能需结合其作用机制开发并验证新的方法或模型以更好地阐明其作用特点。如, 在双抗类药物的药效学研究中应能提示双靶点抗体较同类单靶点抗体可产生相加或协同效应等^[32]。以 faricimab 为例, 研究者在初始研发阶段采用 JR5888 小

鼠自发脉络膜新生血管 (spontaneous choroidal neovascularization, sCNV) 模型, 探索了 faricimab 抗血管生成素-2 (angiotensin-2, VEGF-A/ANG-2) 联合治疗的潜力。JR5888 小鼠的眼底可见从原本就存在的脉络膜毛细血管中长出的新生血管束 (10~15 日龄出现, 约 30 日龄最明显), 与人类脉络膜损伤相似, 且其视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE)/脉络膜复合体、视网膜组织中的 VEGF mRNA 表达高于野生型小鼠, RPE/脉络膜复合体 Ang-2 mRNA 表达也高于野生型小鼠。通过腹腔注射 faricimab 对此模型小鼠分别进行早期 (于动物 14~19 日龄给药) 和晚期 (47~55 日龄给药) 干预, 末次给药后 5 或 7 天观察显示动物的 CNV 病灶数量及损伤面积均明显下降, 较单用 VEGF-A 单抗的效果好。此后, 在氧诱导的小鼠视网膜病变模型和激光诱导的非人类灵长类动物 CNV 模型中, faricimab 较单独使用雷珠单抗的疗效高^[33]。

对于无疾病相关体内模型的某些适应症, 需尽可能提供相关材料以充分支持受试物的药理作用。

药效学指标应尽量选择与临床疗效直接或有一定相关性、可行、稳定可靠的指标, 以较好地预测药物的有效性。如, 在 CNV 动物模型中, 通过眼底血管荧光造影检查能动态观察 IVT 给药后 CNV 病灶处荧光渗漏的情况及测量渗漏灶的面积, 采用视网膜/脉络膜光相干断层扫描能无创、实时监测相同 CNV 病灶的厚度或体积, 上述指标也需在 wAMD 患者中监测。对于一些临床试验不能监测的指标, 在相关动物模型中应尽量纳入, 如眼靶组织的病理学指标, 包括但不限于常规组织切片染色, 针对病灶物质基础进行的组织切片或离体眼组织的特殊染色, 或能阐明产品作用机制的生物标识物免疫组织化学染色等。

3.3.3 案例^[18-20]

3.3.3.1 Brolucizumab 体外药效学: 采用表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 检测了与不同种属 (人、小鼠、猪、猫、兔) 及三种 hVEGF-A 主要亚型的结合力; 考察了对 huVEGF₁₆₅ 诱导的人视网膜内皮细胞迁移、牛视网膜内皮细胞增殖的抑制作用, 并与 Lucentis[®] 对比。体内药效学: 在 VEGF 诱导的大鼠视网膜病变模型中, 单次 IVT 注射给药, brolucizumab 可剂量依赖性抑制 VEGF 诱导的视网膜血管通透性增加; 在氧诱导新生大鼠视网膜病变模型中, brolucizumab 可明显减少视网膜前新生血管形成; 在激光诱导脉络膜新生血管化小鼠模型中, brolucizumab 腹腔或 IVT 注射均能抑制小鼠 CNV 形成。

3.3.3.2 Ocriplasmin 体外药效学: 比较了 ocriplasmin 与天然人纤溶酶的酶学性质、底物特异性和底物降

解效率;使用动态光散射法评估猪玻璃体内注射 ocriplasmin 致药物性玻璃体溶解后的玻璃体动态特性。体内药效学:未开展。由于缺乏适合的动物模型,申报者提交了一系列的文献资料用以支持 ocriplasmin 在诱导后部玻璃体脱离和玻璃体液化方面的活性。

3.3.3.3 Faricimab 体外药效学:SPR 结果显示本品与不同种属(人、食蟹猴、小鼠、兔)全长 Ang-2、不同种属(人、小鼠和大鼠)受体结合域 Ang-2-RBD-Fc 具有高亲和力,本品与人 VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₆₅ 及大鼠 VEGF-A₁₂₁ 具有高亲和力,与小鼠 VEGF-A₁₂₁ 不结合;本品 Fc 区作了突变设计以防止与 Fc 受体结合,未见与人 Fc γ 受体 (I/IIa/IIIa) 或人、食蟹猴和小鼠的 FcRn 受体的结合。体内药效学:采用激光诱导的食蟹猴 CNV 模型评价了 faricimab 对 CNV 的抑制作用,IVT 注射给予本品可剂量依赖性的改善激光诱导的眼底新生血管渗漏,优于相同剂量的 RO5485202 (一种靶向 Ang-2 的单克隆抗体)和相同摩尔剂量的 lucentis。

3.4 非临床药代动力学研究

3.4.1 基本考虑

由于眼部复杂的解剖结构和动态生理屏障,获得眼组织的药代动力学参数难度更大。经玻璃体给药后,药物可直接进入玻璃体腔,但由于玻璃体液具有凝胶样性质,药物在玻璃体液中分布不均匀,可能需要几个小时才能扩散到整个玻璃体液中。药物的分布还取决于其分子量和理化性质,如结构、溶解度、log*P*、稳定性等。表面电荷的存在也会影响药物在眼组织中的分布,如阳离子脂质聚合物可以与玻璃体内带负电荷的透明质酸相互作用,导致聚集并最终固定在眼组织内。药物在玻璃体内达到平衡后,可通过视网膜或前房经房水消除。由于视网膜色素上皮细胞 (RPE) 的阻碍,药物从玻璃体腔到脉络膜的渗透缓慢,从玻璃体到视网膜的扩散也受到内界膜的限制。影响玻璃体腔内的药物浓度及其消除的因素包括初始剂量、分布容积、清除率和消除半衰期等^[34-36]。

对于经玻璃体给药药物,其眼组织分布考察尤为重要,通常采集的眼部组织包括角膜、房水、虹膜、晶状体、巩膜、玻璃体液、视网膜、脉络膜、视神经等;根据品种的特点,有时也可能需要增加其他组织。在采集眼组织样本时需注意,由于动物安乐死后,眼组织中的生物屏障会迅速破坏,药物会在整个眼组织中迅速达到平衡,应迅速摘取眼球并立即放入液氮或干冰中保存,以防止药物转移到邻近组织或被代谢消除,解剖分离眼组织时也应全程在冷冻状态下完成。样品分析与一般药物要求基本一致。但在对眼组织样品进行生物分析时,由于眼组织样本较小,考虑到 3R 原则,剖杀大

量动物来获得对照基质比较困难,可采用与眼组织样品高度相似的替代基质。玻璃体液因含有胶原蛋白、透明质酸及其他蛋白聚糖而具有凝胶样性质,药物在其中不均匀分布,因此应将全部玻璃体液混匀后再取样分析^[28]。

3.4.2 实验模型

新药研发中,人体药代动力学通常在给药后通过在不同时间点采集血样来评估。但对于眼部给药的药物,连续从人眼组织采集样品,既不符合伦理也不可行^[28],仅在少数情况下可从眼科手术患者身上收集活检或房水样本;另外,样本仅从患者的房水中收集,而相邻组织中的药物水平未知,若没有精确的眼部药代动力学数据,就很难预测眼科药物的最佳治疗方案^[37]。因此,眼部药代动力学研究常采用动物模型进行,通过动物的眼组织分布研究来外推或替代人眼药代动力学研究。小分子药物常采用兔开展药代动力学研究;大分子药物受免疫原性及严重炎症反应影响,常采用猴开展药代动力学研究^[28]。

近几年,文献报道了一些用于眼部研究的替代离体和体外人和动物细胞培养模型。尽管体外细胞模型不能完全模拟眼睛的特征,但比体内模型具有成本效益和伦理优势。文献^[38]报道 PK-Eye 模型是一种新的体外药代动力学模型,其为两室体外模型,适用于人眼,且成本低。该模型模拟了药物从血液循环到玻璃体的分布,具有成为体外模型所需的许多特征,有助于眼科药物的研发。又如,眼部富含黑色素(葡萄膜和视网膜等组织),有关研究已有多年,但其结合的结构和药代动力学特征尚不清楚。近期有研究者构建了定量构效关系 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 模型,以区分目标化合物与黑色素结合的程度;还进行了计算机药代动力学模拟,以评估各种动力学因素对体内药物与眼黑色素结合的影响,为眼科药物的研发提供了新的见解和思路。

此外,眼部药代动力学经常通过隔室模型进行模拟,可以将眼睛的每个组件视为由屏障与其他隔室隔开的不同隔室,假设药物在眼部每个组织中分布均匀。已有文献^[39]报道眼部药物递送的药代动力学隔室模型,用于描述眼部药物在眼中的吸收、分布和消除,包括两室、三室、四室和五室模型。但隔室模型的一个主要缺点是缺乏有关各种眼部结构局部分布的信息。

药代动力学模型是评估眼科药物的重要工具,一定程度上可减少眼部治疗制剂开发的时间和成本。在临床前阶段,可以通过药代动力学模型来增强眼用剂型的开发和优化,并可以获得初步的药代动力学特征。

3.4.3 其他需关注的事项

经玻璃体腔给药, 药物可能会与富含黑色素的脉络膜和视网膜上皮等色素组织相结合, 使其在色素组织中滞留时间延长, 从而影响其眼部药代动力学特征。同时也提示对于与黑色素具有高亲和性的药物, 需要用眼内游离的药物浓度而非总的药物浓度来推断其在眼内的起效浓度^[40]。

药物特性以及正常或疾病模型会影响其PK/PD结果^[41], 如与正常动物相比, 具有受损血视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)的动物模型会具有更高的药物消除率; 在疾病动物模型中还观察到更高的玻璃体内清除率, 试验设计时须予以考虑。

转运体在眼部治疗中也发挥重要作用并且可以影响药物的药代动力学和药效^[42]。外排转运体位于角膜和视网膜上, 通过在药物扩散到细胞质内后将其排出来保护组织免受毒性暴露, 对药物渗透具有屏障作用; 而摄取转运蛋白则作为药物载体, 促进药物的吸收和分布。但是转运体在眼部药物递送中的临床相关性尚不完全清楚, 还需要进行研究以确定其临床意义。

对于基因治疗产品, 则应根据《基因治疗产品非临床研究评价技术指导原则(试行)》要求, 生物分布研究应在临床试验开始前完成, 同时需根据基因治疗产品的特点评估开展脱落分析的必要性^[22]。

3.4.4 案例^[18-20]

3.4.4.1 Brolucizumab ① 食蟹猴静脉注射给药PK; ② 新西兰兔右眼单次玻璃体腔注射给药组织分布(房水、玻璃体液、视网膜、RPE-脉络膜), 其中玻璃体液 C_{\max} 水平最高; 眼内组织中半衰期大约为3天, 在视网膜中最长(82 h), 其次为RPE-脉络膜(77 h), 玻璃体液 $t_{1/2}$ 为71 h; ③ 食蟹猴单次玻璃体腔注射给药组织分布[双眼房水、玻璃体液、中央视网膜、外周视网膜、中央脉络膜(带有RPE)和外周脉络膜(带有RPE)], RTH258在眼组织中的 $t_{1/2}$ 为50~59 h, 在玻璃体液中暴露量最高, 其次是外周视网膜, 在外周脉络膜最低; 游离药物的全身暴露水平较低, 血清 C_{\max} 为60.9 ng·mL⁻¹, AUC_{0-168h} 为3 430 ng·h·mL⁻¹, $t_{1/2}$ 为78 h。

3.4.4.2 Ocriplasmin ① 离体猪眼玻璃体内注射给药后, 本品初始浓度与给药剂量相关, 眼内给药后观察到其活性随时间快速下降; ② 本品在PBS或离体猪玻璃体液之间的降解特征未见差异, 但是在缓冲液中的降解速率比在玻璃体液中快; ③ 本品在离体人玻璃体液中活性随时间下降; ④ 玻璃体切除术的患者玻璃体内注射给药后, 本品的活性迅速下降, 其速率与在人和猪的玻璃体液以及离体猪眼玻璃体中观察到的速率相似。

3.4.4.3 Faricimab 食蟹猴单眼单次静脉注射或IVT注射给药PK(每眼1.5、3 mg)采集样品包括血液、房水、玻璃体液。IVT注射给药后, 药物主要分布在玻璃体液中, 玻璃体液中药物暴露水平明显高于房水和全身暴露水平(分别约是房水和全身暴露水平的3.3和75倍), IVT给药后的生物利用度约为13%。毒代动力学(toxicokinetics, TK): 食蟹猴重复IVT给药显示, 在每眼0.5~6 mg剂量内, 全身药物暴露水平以及终末剖检时(约在给药后2周时)玻璃体液中药物浓度均随剂量增加而增加。IV和IVT给药, 药物全身暴露水平未见明显的性别差异, 每4周给药一次, 多次给药后未见明显药物蓄积, 部分动物的全身和玻璃体液中的药物暴露水平可见降低, 这可能与抗药抗体(anti-drug antibody, ADA)形成相关。

3.5 非临床安全性研究

3.5.1 基本考虑

经眼玻璃体给药药物的非临床安全评价研究策略与常规药物相似, 应按照ICH M3 (R2) 和ICH S6 (R1) 的要求分阶段开展以支持开展临床试验或上市, 此外还应重点关注经玻璃体给药后眼局部的毒性。

对于经眼玻璃体给药药物, 一般毒理学(单次/重复给药毒性试验)除需采用临床拟用给药途径外, 为充分暴露药物的潜在毒性(如血眼屏障破坏可能会增加系统暴露的风险), 建议另采用全身给药途径开展试验, 特别是对于新靶点、新化学实体等。对于全身重复给药毒性试验, 观察指标同常规的重复给药毒性试验, 旨在发现眼睛以外的毒性靶器官/毒性反应; 对于经眼玻璃体重复给药毒性试验, 除常规的观察指标外, 还应包括详细和系统的活体眼科检查和眼组织病理学检查。对于在生殖系统中有分布或本身有潜在生殖毒性风险的药物(如抗VEGF药物可抑制新生血管生成), 应结合药物作用机制、经玻璃体给药后系统暴露情况、组织交叉反应、非临床和临床安全性信息等进行生殖毒性评估, 必要时参考ICH M3 (R2) 和ICH S6 (R1) 的相关要求选择相关动物种属完成生殖毒性试验以支持临床试验及上市申请, 可采用全身给药途径。对于临床预期连续用药6个月及以上或治疗慢性复发性疾病而需经常间歇使用的药物, 根据相关法规和指导原则, 均应提供致癌性试验或文献资料, 因此, 建议在临床试验期间结合人体经玻璃体给药后系统暴露情况、用药人群、作用机制、已知毒性信息及用药周期, 采用证据权重法进行致癌性评估, 必要时参考ICH S1等指导原则的相关要求开展相关非临床试验。对于需要开展遗传毒性试验的药物, 可参考ICH M3 (R2) 的相关要求。对中枢神经系统、心血管系统或呼吸系统可能有影响

的药物,需关注其安全药理学,根据 ICH M3 (R2) 和 ICH S6 (R1) 可单独开展或伴随在重复给药毒性试验中考察。

经眼玻璃体给药药物的常用给药体积为每眼每次 50 μL (非啮齿类动物),一般不超过每眼每次 100 μL , 以免因给药体积过大导致临床不相关的毒性;给药频次一般应能覆盖临床试验给药频次;给药剂量可根据实验动物与人眼玻璃体腔的体积比进行总给药量等比换算。经玻璃体给药一般通过双眼同时给药以及适度地增加给药频率来尽可能提高眼部暴露量、暴露眼毒性,但应避免因手术、给药方式导致视网膜等的额外损伤以及给药频率过高引起的与给药方式相关的蓄积性眼损伤。

3.5.2 眼科检查

经眼玻璃体给药药物经玻璃体注射或植入后,眼科检查包括详细和系统的活体眼科检查和眼组织病理学检查,两者相结合能更全面地评估受试物潜在的眼部毒理学效应。

活体眼检常规项目包括裂隙灯检查、直接/间接检眼镜检查、眼压、眼底照相 (fundus photography, FP) 及血管荧光造影 (fluorescein angiography, FA)、光相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT)、眼电生理学检查等。对于涉及玻璃体腔注射或眼内手术的研究,可采用通用的或经改进的评分系统^[43-45]对所见眼部异常表现或植入物相关变化等进行评价。在观察前房和玻璃体细胞(浸润)时,可注意将细胞类型分为色素细胞、白细胞或红细胞,并记录各类型细胞大致的占比。对于评分系统未涉及的其他眼部异常表现或植入物相关变化,可或由诊断人员使用规范的语言描述所见异常,描述应尽可能准确、完整,如异常所在眼部亚组织的位置、范围、颜色、形状、程度等。

此外,一些眼科生理学指标如眼压、眼电生理学检查的结果可能受多种因素的影响。如,动物的精神压力和检测时的体位、是否麻醉、眼压计的类型等会影响眼压值,动物的麻醉深度和体温、记录用电极的种类等均可能影响视网膜电图 (electroretinography, ERG) 数据。各研究机构应建立本机构相关检测操作的标准流程,注重动物福利、避免动物产生压力和不适,并积累各种属动物相关检测指标的历史背景数据,以更好地解释动物试验中获得的数据。

实验动物眼科诊断人员则需熟悉所用到的眼科检查相关的理论知识、操作规程及影响因素,熟悉与受检动物种属相关的眼解剖学变化,能够确定哪些是遗传的或与种属有关的发现,哪些是与研究有关的影响。在眼组织病理学研究中,因眼球各个组成部分(包括

玻璃体)在组织固定液中固定的速度不同,玻璃体和视网膜间的附着物会对视网膜各个部分产生牵引力,在组织学上表现为视网膜褶皱或罗列。这种假象在白化兔中特别常见,在眼组织病理学评价中须将其与病理变性相区别。对于光学显微镜无法观察的眼组织学关键性指标,可用电镜进一步观察。

需特别注意的是,对于经眼玻璃体给药药物,玻璃体给药带来的机械损伤可能不可避免,试验中除尽量避免减少外,还应根据药物的作用机制、剂量-反应关系等对这类药物的毒性试验结果仔细分析评估及确定未见不良反应剂量 (no observed adverse effect level, NOAEL)。对于某些眼部病理改变,需确认是否为药物引起的不良反应,不能简单归因于机械损伤,必要时开展额外的附加试验以证明其分析结论,为临床试验风险控制提供支持。

3.5.3 其他需关注的事项

由于玻璃体给药对注射操作、制剂质量的要求较高,而注射操作规范或失当、制剂质量的高或低和不同给药剂量或体积的受试物在不同动物种属眼部都可能产生不同的异常反应,故在正式毒理试验开展前还应重视在规范注射技术的情况下开展眼内制剂筛选、局部耐受性考查及毒性剂量探索等研究。

对于经眼玻璃体给药的药物,还需针对受试物本身的特点(如药物类型、特殊剂型),考虑其非临床安全性评价的特殊性。如对于眼玻璃体植入给药的产品,免疫反应是其最常见的毒性反应,通过其他给药途径与人体具有良好“生物相容性”或“安全性”的聚合物在眼内却可能产生不耐受。非临床研究中应考虑眼组织对植入体聚合物的长期耐受性,某些皮质固醇类药物植入体可能是由于药物活性成分 (active pharmaceutical ingredient, API) 本身具有抗炎作用会掩盖异物的炎症反应,但一旦皮质固醇类药物消失,植入体聚合物最终会发生异物反应^[40]。植入剂的评价应明确与该制剂处方相关的所有材料(如植入剂的固体材料)的去向,且动物给药后的监测时间应足以评价制剂延迟释放的整个持续时间以及眼组织对植入体聚合物的长期耐受性。

对于基因治疗产品,则应根据《基因治疗产品非临床研究评价技术指导原则(试行)》^[22]要求,毒理学试验设计应综合考虑基因治疗产品本身的特点和临床应用,对其进行全面的安全性分析评价,必要时还应评价导入基因的表达产物的安全性。

3.5.4 案例^[18-20]

3.5.4.1 Brolucizumab 探索性毒性试验:①食蟹猴 IVT 给药 5 周 (Q5W*2 剂,非 GMP 产品)观察到眼部炎

症, ERG及视网膜组织学改变, 分析可能是受试物被内毒素(0.316 EU/眼)污染。②食蟹猴IVT给予等剂量的非GMP或GMP批产品6周(Q6W*2剂)给药分别可导致3/3眼, 1/3眼明显眼毒性。③作为试验①的后续研究, 在单剂量给药的食蟹猴中仍观察到严重眼部炎症, 认为与此批次受试物的内毒素含量(≥ 0.042 EU/眼)高有关。④兔单次IVT给药后监测制剂中辅料(蔗糖和枸橼酸钠)的毒性。⑤兔(0.025 EU/眼)制剂内毒素筛选试验。重复给药毒性试验: 食蟹猴IVT给药6周恢复期3周(Q3W*3剂, 原液每眼0.5、1、3 mg)、IVT给药6个月(Q4W*6剂+恢复期4周, 原液每眼1、3、6 mg)、IVT给药3个月(Q4W*3剂+恢复期4周, 制剂变更, 每眼6 mg), 均未见明显眼部及全身毒性。

3.5.4.2 Ocriplasmin 安全药理学: 大鼠和犬单次IV给药观察了对中枢神经系统、呼吸及循环系统功能的影响。单次给药毒性: ①兔(玻切或不玻切)、猴、小型猪单次IVT给药, 可见视网膜血管变窄伴视网膜萎缩、眼压、眼部炎症和ERG的改变及晶状体半脱位等眼部毒性反应。②大鼠单次IV给药。重复给药毒性: ①食蟹猴单眼给药2次(间隔28天, 每眼75、125 μg)观察12周, 可见晶状体半脱位及变性、眼压升高、眼部炎症、虹膜震颤、玻璃体混浊、ERG改变等。②大鼠、犬2周IV重复给药毒性伴随TK试验, 大鼠中未见明显异常, 犬可见流涎、干呕、呕吐、激动、吠叫。特殊毒性研究: 奥克微纤溶酶及其溶剂、*Pichia Pastoris*酵母表达系统提取液对大鼠行为异常的影响研究。

3.5.4.3 Faricimab 安全药理学: 未单独开展, 结合在2个月、6个月猴重复给药毒性试验中观察。单次给药毒性: 食蟹猴单次玻璃体腔注射PK试验中初步观察了眼局部耐受情况。重复给药毒性试验: 食蟹猴IV注射给药2个月(Q4W*3剂)及IVT给药2个月(Q4W*3剂)和26周(Q4W*7剂)。在两项IVT重复给药毒性试验中, 活体眼科检查项目包括裂隙灯和检眼镜检查、眼压、眼底照相、FA、OCT和ERG, 主要不良反应均为眼内炎症反应。眼组织病理学检查除了对眼球(带视神经)及其附属器进行了常规染色和光学显微镜镜检, 对出现眼部炎症的部分动物眼部组织进行IHC染色检查。在猴2个月重复给药毒性试验中还可可见主动脉炎症。生殖毒性试验: 猴胚胎-胎仔发育毒性试验: 妊娠食蟹猴自妊娠第20天开始每周一次静脉给予本品(共5次), 未见母体动物毒性、妊娠丢失或胎仔发育毒性及致畸作用。其他试验: 人组织交叉反应试验、健康人血细胞体外细胞因子释放及免疫细胞耗竭试验; 人血清补体活化体外评价试验。

4 结语及展望

随着眼部疾病发生率的增长, 其新的治疗手段也迅速发展, 而经眼玻璃体给药为眼科疾病尤其是眼底病药物开辟了新的治疗途径。但由于经玻璃体给药是一种有创的给药方法, 其带来的相应不良反应或注射相关风险也随之增加。同时, 经玻璃体将药物直接注射或植入玻璃体腔, 其眼动力学特征和安全风险与其他给药途径也不同, 需要予以特殊关注。

对于经眼玻璃体给药的药物, 在评估玻璃体内给药药物的非临床研究中, 应综合考虑不同动物种属玻璃体大小的差异和年龄带来的玻璃体组织性质等不同选择相关动物种属开展试验, 同时需考虑不同种属可能产生的免疫原性。黑色素结合是眼部药效学和药代动力学的重要因素, 对于玻璃体腔注射给药的药物, 需要关注药物是否与黑色素具有高亲和性, 以确认眼内游离的药物浓度还是总的药物浓度来推断其在眼内的起效浓度。另外采用不同的药代动力学模型可获得更充分的药代动力学信息, 进而促进眼用药物的发展和优化。安全性方面需同时考察眼局部毒性和全身毒性。在基于传统评价内容的基础上, 应结合其临床拟用适应症、用药人群、给药期限和给药频率等, 针对经玻璃体给药药物的特殊性, 遵循具体问题具体分析的原则, 不断完善其非临床评价内容, 为临床试验提供更加充分、真实可靠的数据, 以支持拟开展的临床试验或上市申请。

此外, 随着科技的发展, 用于眼科给药的新技术也不断涌现, 如眼部微透析技术, 其能够持续监测各种组织和细胞液中的药物浓度^[46], 可用于局部、全身和玻璃体内给药后的药物浓度采样和分析。由于玻璃体液的体积小, 因此该技术可以成为玻璃体腔注射药物药代动力学的有力工具。而影像学技术、定量整体动物自显影技术(quantitative whole-body autoradiography, QWBA)等近年来也常用于眼科的非临床研究中。

目前, 越来越多的经玻璃体给药的新型治疗药物进入临床试验阶段, 对非临床研究提出了更多的挑战。考虑到经玻璃体腔给药药物的特殊性及前沿性, 在药物研发过程中, 鼓励申请人就试验策略、设计、结果分析等与审评机构沟通交流, 以推动国内眼科药物的发展, 为更多罹患眼科疾病的患者能够尽早获得安全有效的药物治疗做出贡献。

作者贡献: 付淑军和于冰对这项工作做出了同样的贡献。付淑军、于冰和廖琴负责文献检索及论文撰写; 孙涛负责文章选题、指导写作和审阅。

利益冲突: 作者声明没有竞争的经济利益。

References

- [1] Hyeong MK, Se JW. Ocular drug delivery to the retina: current innovations and future perspectives[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 1-32.
- [2] Sun HX, Li HP, Liao Q. Practice and challenges in non-clinical safety evaluation of ocular administration[J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2018, 16: 1349-1354.
- [3] Ge J. *Ophthalmology (眼科学)* [M]. Beijing: People's Publishing House, 2011: 227-229.
- [4] Le Goff MM, Bishop PN. Adult vitreous structure and postnatal changes [J]. *Eye*, 2008, 22: 1214-1222.
- [5] Hockwin O, Green K, Rubin LF, et al. *Manual of Oculotoxicity Testing of Drugs* [M]. Stuttgart, Jenna, New York: Gustav Fischer Verlag, 1992: 35, 54.
- [6] Mains J, Tan LE, Zhang T, et al. Species variations in small molecule components of animal vitreous [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012, 53: 4778-4786.
- [7] Sebag J. *Vitreous: in Health and Disease* [M]. Berlin: Springer Science & Business Media, 2014: 13-20.
- [8] Vézina M. Comparative ocular anatomy in commonly used laboratory animals [M] // Weir AB, Collins M. *Assessing Ocular Toxicology in Laboratory Animals*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2013: 9, 11-21.
- [9] Ramos MF, Attar M, Stern ME, et al. Safety evaluation of ocular drugs [M] // Faqi AS. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (2nd Ed)*. Amsterdam: Elsevier Inc., 2017: 760.
- [10] Gilger BC, Abarca E, Salmon JH. Selection of appropriate animal models in ocular research: ocular anatomy and physiology of common animal models [M] // Gilger BC. *Ocular Pharmacology and Toxicology*. Totowa: Humana Press Inc., 2014: 10-11.
- [11] Avery RL, Bakri SJ, Blumenkranz MS, et al. Intravitreal injection technique and monitoring: updated guidelines of an expert panel [J]. *Retina*. 2014, 12: S1-S18.
- [12] Li XX, Xu X, Zhang JJ, et al. Chinese standard for quality control of vitreous injection for retinopathy [J]. *Chin J Ophthalmol (中华眼科杂志)*, 2015, 51: 892-894.
- [13] Grzybowski A, Told R, Sacu S, et al. 2018 update on intravitreal injections: euretina expert consensus recommendations [J]. *Ophthalmologica*, 2018, 239: 181-193.
- [14] FDA. Pharmacology review of Macugen® (pegaptanib sodium) Injection [EB/OL]. 2004-12-17 [2022-11-22]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-756_Macugen_pharmr.pdf.
- [15] FDA. Pharmacology review of Lucentis® (ranibizumab) Injection [EB/OL]. 2006-06-30 [2022-11-22]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/125156s0000_Lucentis_PharmR.pdf.
- [16] FDA. Pharmacology review of Eylea® (aflibercept ophthalmic solution) Injection [EB/OL]. 2011-11-18 [2022-11-22] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125387Orig1s000PharmR.pdf.
- [17] Aamir AA, Fawwaz AS, Ibrahim K, et al. New age-related macular degeneration injectables [J]. *Eur Ophthal Rev*, 2020, 14: 17-20.
- [18] FDA. Non-clinical review of Beovu® (brolocizumab) Injection [EB/OL]. 2019-10-08 [2022-11-22]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/761125Orig1s000PharmR.pdf.
- [19] FDA. Non-clinical review of Vabysmo® (faricimab) Injection [EB/OL]. 2022-01-24 [2022-11-22]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2022/761235Orig1s000PharmR.pdf.
- [20] FDA. Pharmacology review of Jetrea® (ocriplasmin) Intravitreal Injection [EB/OL]. 2012-10-17 [2022-11-22]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/125422Orig1s000PharmR.pdf.
- [21] Khanani AM, Aziz AA, Weng CY, et al. Port delivery system: a novel drug delivery platform to treat retinal diseases [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2021, 18: 1571-1576.
- [22] CDE. Guidelines for non-clinical research and evaluation of gene therapy products (draft for comments) [EB/OL]. 2021-12 [2022-11-22]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/41bc557bec23a6ebfb0e148cc989f041>.
- [23] Zemel E, Loewenstein A, Lei B, et al. Ocular pigmentation protects the rabbit retina from gentamicin-induced toxicity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36: 1875-1884.
- [24] Rimpel AK, Reinisalo M, Hellinen L, et al. Implications of melanin binding in ocular drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 126: 23-43.
- [25] Dillberger JE, Peiffer RL, Dykstra MJ, et al. The experimental antipsychotic agent 1192U90 targets tapetum lucidum in canine eyes [J]. *Toxicol Pathol*, 1996, 24: 595-601.
- [26] Lalonde MR, Chauhan BC, Tremblay F. Retinal ganglion cell activity from the multifocal electroretinogram in pig: optic nerve section, anesthesia and intravitreal tetrodotoxin [J]. *J Physiol*, 2006, 570: 325-338.
- [27] CDE. Q&A on the testing requirements for drug non-clinical safety evaluation [EB/OL]. 2014-05-13 [2022-11-22]. <https://www.cde.org.cn/zdzyz/domesticinfopage?zdzyzIdCODE=81fa9a957a31017b12e675d119ec688f>.
- [28] Dai XD, Yin HJ, Wang QL, et al. Considerations for non-clinical studies of ophthalmic drugs [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2018, 16: 1345-1349.
- [29] Yin HJ, Dai XD, Yin MS, et al. Focus of non-clinical pharmacodynamic evaluation of new drugs [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2019, 35: 2645-2648.
- [30] Li Y, Busoybc JM, Zaman BAA, et al. A novel model of persistent retinal neovascularization for the development of sustained anti-VEGF therapies [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 174: 98-106.
- [31] EMA. CHMP assessment report of Ozurdex® [EB/OL]. 2010-05-

- 20 [2022-11-22]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ozurdex-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [32] FDA. Guidance for Industry: bispecific antibody development programs [EB/OL]. 2021-05-20 [2022-11-22]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bispecific-antibody-development-programs-guidance-industry>.
- [33] Regula JT, Lundh von Leithner P, Foxton R, et al. Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 11: 1265-1288.
- [34] Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58: 1131-1135.
- [35] Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2009, 23: 791-815.
- [36] Del Amo EM, Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: clinical predictability and quality of the published data [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 137: 111-124.
- [37] Dua HS, Faraj LA, Said DG, et al. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer) [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120: 1778-1785.
- [38] Vellonen KS, Soini EM, Del Amo EM, et al. Prediction of ocular drug distribution from systemic blood circulation [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13: 2906-2911.
- [39] Vibhuti A, Abhirup M, Vivek A, et al. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2016, 6: 735-754.
- [40] Wang RN, Qian JY, Song S, et al. Nonclinical research strategies for fundus diseases [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*. 2020, 29: 1723-1728.
- [41] Shen J, Durairaj C, Lin T, et al. Ocular pharmacokinetics of intravitreally administered brimonidine and dexamethasone in animal models with and without blood-retinal barrier breakdown [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55: 1056-1066.
- [42] Mandal A, Agrahari V, Khurana V, et al. Transporter effects on cell permeability in drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2017, 14: 385-401.
- [43] Khairallah M. Are the Standardization of the Uveitis Nomenclature (SUN) working group criteria for codifying the site of inflammation appropriate for all uveitis problems? Limitations of the SUN working group classification [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2010, 18: 2-4.
- [44] Zierhut M, Deuter C, Murray PI. Classification of uveitis-current guidelines [J]. *Eur Ophthalm Rev*, 2007, 1: 77-78.
- [45] Eaton JS, Miller PE, Bentley E, et al. The SPOTS system: an ocular scoring system optimized for use in modern preclinical drug development and toxicology [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2017, 33: 718-734.
- [46] Boddu SH, Gunda S, Earla R, et al. Ocular microdialysis: a continuous sampling technique to study pharmacokinetics and pharmacodynamics in the eye [J]. *Bioanalysis*, 2010, 2: 487-507.