

## 两种重组抗蓖麻毒素人源化单克隆抗体制剂在猕猴体内的药代动力学研究

高雅, 朱晓霞, 孟志云, 甘慧, 顾若兰, 吴卓娜, 孙文种, 窦桂芳\*

(军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** 重组抗蓖麻毒素人源化单克隆抗体 (MIL50) 是针对蓖麻毒素靶点的重组人源化单克隆抗体。本文利用 ELISA 的方法建立猕猴血清中 MIL50 的测定方法, 并运用交叉设计方法, 将 12 只猕猴先后单次静脉推注  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  受试制剂 (MIL50 冻干粉剂) 和参比制剂 (MIL50 液体制剂), 测定不同时间点 MIL50 血药浓度, 并进行相关药动学参数分析, 比较 MIL50 液体制剂与冻干粉剂在猕猴体内的药代动力学特征, 动物福利和实验过程均遵循军事医学科学院动物伦理委员会的规定, 以及军事医学研究院辐射研究所动物实验和福利委员会制定的法规 (IACUC-DWZX-2020-503)。结果显示, 两组  $C_{\max}$  与  $AUC_{0-5d}$  差异没有统计学意义; 液体制剂为参比制剂,  $C_{\max}$  比值为 101.6%,  $AUC_{0-5d}$  比值为 101.9%;  $C_{\max}$  的 90% 可信区间为 79.42%~129.92%,  $AUC_{0-5d}$  的 90% 可信区间为 85.72%~121.18%。这提示不同剂型 MIL50 在猕猴体内血药浓度变化有一定差异。

**关键词:** 蓖麻毒素; 重组抗蓖麻毒素人源化单克隆抗体; 药代动力学; 液体制剂; 冻干粉剂

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0480-04

## Pharmacokinetics of two recombinant humanized monoclonal antibodies against ricin in rhesus monkeys

GAO Ya, ZHU Xiao-xia, MENG Zhi-yun, GAN Hui, GU Ruo-lan, WU Zhuo-na,  
SUN Wen-zhong, DOU Gui-fang\*

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** Recombinant humanized anti-ricin monoclonal antibody (MIL50) is a recombinant humanized monoclonal antibody targeting ricin. In this study, an ELISA method was used to establish a method for the determination of MIL50 in macaque serum, and a cross design method was used. Twelve rhesus monkeys were intravenously injected  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  test preparation (MIL50 freeze-died powder injection) and reference preparation (MIL50 liquid preparation) to determine the plasma concentration of MIL50 at different time points, and the pharmacokinetic parameters were analyzed to compare the pharmacokinetic characteristics of MIL50 liquid preparation and freeze-died powder injection in rhesus monkeys. Animal welfare and experimental procedures follow the regulations of the Animal Ethics Committee of the Chinese Academy of Medical Sciences and Use of Laboratory Animals and the regulations derived by the Animal Care and Welfare Committee of the Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences (IACUC-DWZX-2020-503). The results showed that there was no significant difference between  $C_{\max}$  and  $AUC_{0-5d}$  in the two groups. The liquid preparation was the reference preparation, with  $C_{\max}$  ratio of 101.6% and  $AUC_{0-5d}$  ratio of 101.9%, the 90% confidence interval of  $C_{\max}$  was 79.42%–129.92%, and the 90% confidence interval of  $AUC_{0-5d}$  was 85.72%–121.18%. These results suggested that different dosage forms of MIL50 had certain differences in the changes of blood drug concentration

收稿日期: 2021-05-17; 修回日期: 2021-06-24.

\*通讯作者 Tel: 86-10-66931993, E-mail: douguifang@vip.163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0753

in rhesus monkeys.

**Key words:** ricin; recombinant humanized monoclonal antibody; pharmacokinetics; liquid preparation; freeze-died powder injection

蓖麻毒素 (ricin) 是蓖麻油提取过程中的副产物<sup>[1]</sup>, 是毒性最强的植物毒素之一, 可使几乎所有真核细胞染毒<sup>[2]</sup>。由于其来源广、易生产, 并可通过气溶胶形式传播, 目前被美国国立过敏症和传染病研究所列为重点研究毒剂<sup>[3]</sup>。

单克隆抗体是目前发展最为迅速的蛋白类药物之一, 随着全人源化单抗的出现, 其在治疗各种心血管疾病、癌症、血液病、自身免疫性疾病和感染等多个方面的疗效和安全性得到显著提高<sup>[4]</sup>。重组抗蓖麻毒素人源化单克隆抗体 (MIL50) 注射液是针对蓖麻毒素靶点的重组人源化单克隆抗体, 包括两条含有 450 个氨基酸的重链和两条含有 213 个氨基酸的轻链; 只保留了鼠源单抗的部分可变区序列, 人源化程度达到 85.5% 以上, 在最大限度地保持其亲和活性的同时, 降低了免疫原性。目前该注射液已获国家特需药临床批件<sup>[5-9]</sup>。但是 MIL50 注射液需 2~8 °C 避光保存, 有效期暂定 24 个月。为了更好地满足对药品便于运输、储存的要求, 浙江大学通过“三维集成”生物制剂技术、新型玻璃态固化制剂技术和创新型电子自旋共振 (ESR) 等检测技术的综合利用对其原液和成品的制剂进行优化, 开发出了冻干粉剂型, 在常温时可维持 3 年, 在 40 °C 维持 6 个月, 在 50 °C 能维持 2~4 周稳定, 提高了稳定性。

本文通过建立测定猕猴血清中 MIL50 含量的 ELISA 方法, 观察 MIL50 不同制剂静脉推注给药后药代动力学性质。本实验旨在从临床前药动学研究入手进行新研制的冻干粉剂型与原研液体制剂的对比研究, 探讨和验证了药物的比较药代动力学/生物等效性的评价方法, 以期 MIL50 不同制剂的临床应用及提升产品质量提供实验依据, 为在人体内进行的类似研究奠定基础。因抗体类药物半衰期长, 本等效性实验采用平行组设计。

## 材料与方法

**试药与仪器** 重组人源化单克隆抗体 (MIL50) 注射液 (30 mg/3 mL/支, 批号 KR060F20200901, 北京天广实生物技术股份有限公司); MIL50 冻干粉剂 (MIL50A, 每支 30 mg, 批号 20200702, 浙江海正博锐生物制药有限公司); ricin (1 mg·mL<sup>-1</sup>, 军事医学研究院毒物药物研究所); 大鼠血清、豚鼠血清 (军事医学研究

院辐射医学研究所); 猕猴血清 (四川横竖生物科技股份有限公司); 酶标仪 (型号 SPECTRA MAX190, Molecular Devices 公司); 96 孔酶联板 (批号 20420004, Costar 公司)。

**血清 MIL50 浓度测定** 采用间接 ELISA 法。将抗原蓖麻毒素预包被于 96 孔板上形成固相抗原, 加入待检抗体 MIL50 标准品或样品, 与抗原发生特异性结合形成抗原-抗体复合物, 其他未结合物质经洗涤后除去。加入酶标抗抗体, 反应后形成抗原-待检抗体-酶标抗抗体的复合物, 游离的酶标抗抗体经洗涤除去。加入底物溶液, 形成蓝色复合物, 加终止液终止反应, 颜色变黄, 成色量与 MIL50 标准品或样品内所含 MIL50 量成正相关。用吸光度值和标准 MIL50 浓度绘制标准曲线, 进行四参数拟合, 计算未知样品浓度。

**MIL50 溶液的配制** 精密量取 MIL50 注射液 (1 mg·mL<sup>-1</sup>) 适量, 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 配制成 100 μg·mL<sup>-1</sup> 溶液作为储备液, 备用。使用前精密吸取 MIL50 的储备液, 用混合猕猴血清稀释成以下浓度的标准溶液: 20、10、5、2.5、1 和 0.5 ng·mL<sup>-1</sup>。质量控制样品的配制同标准曲线的配制方法, 低、中、高质量控制浓度分别为 1.5、7.5 和 15 ng·mL<sup>-1</sup>。

**实验动物** 猕猴 12 只, 雌雄各半, 体重 (4.0 ± 1.0) kg, 购买并饲养于四川横竖生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证: SCXK (川) 2019-029, 实验动物使用许可证: SYXK (川) 2019-198。动物福利和实验过程遵循军事医学科学院动物伦理委员会的规定。

**实验分组与给药** 实验分液体制剂和冻干粉剂两组, 采用平行设计, 每组 6 只动物, 雌雄各半, 单次静脉推注 MIL50 剂量为 1 mg·kg<sup>-1</sup>, 给药量按猕猴体重计算, 推注前以氯化钠注射液将 MIL50 稀释到所需浓度, 控制推注速度在 10 min 内推注完。采血时间分别为给药前及给药结束后 0.5、3、12、24 h、3~9 天隔天 1 次、12~61 天隔 3~4 天 1 次, 直至 61 天。全部血样均于室温凝固 30 min 后, 离心获得血清, 分装后于 -20 °C 保存, 待测。

**统计学方法** 用 phoenix32 (WinNonlin) 8.2.0.4383 软件的非房室模型计算药动学参数, 比较药代动力学分析采用 WinNonlin 软件生物等效性模块及成组 *t* 检验。用 Microsoft Excel 和 MicroCal Origin 7.5 软件进

行数据处理和制图。

## 结果

### 1 猕猴血清 MIL50 测定方法学考察

**1.1 定量范围** 用该方法检测 MIL50 的可靠定量浓度范围是  $0.5\sim 20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 在此范围内标准品 MIL50 与吸光度值呈浓度依赖关系, 四参数 Logistic 拟合:  $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$ , 其中  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $x_0$  和  $p$  为常数, 相关系数  $r^2$  均大于 0.99; 最低定量限为  $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。对于含量超出标准曲线范围的样品用混合猕猴血清适当稀释至此浓度范围内进行测定。

**1.2 特异性** 采用 ELISA 方法分别考察了抗肉毒毒素三联抗体 ML01、ML02 和 ML03 等抗体以及大鼠血清、豚鼠血清、猕猴血清与 ricin 抗原的反应性。结果显示, 抗肉毒毒素抗体 ML01、ML02、ML03 与 ricin 抗原不存在交叉反应, 大鼠血清、豚鼠血清和猕猴血清不存在本底干扰。

**1.3 精密度和准确度** 分别制备  $1.5$ 、 $7.5$  和  $15\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  三个浓度的质量控制样品和  $0.5$ 、 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  两个浓度的定量上、下限样品, 每一浓度进行 3 样本分析, 重复 6 批, 随行标准曲线, 采用单因素方差分析法计算分析方法的准确度 RE 和精密度 RSD。结果显示日内精密度 RSD 为  $11.1\%\sim 19.8\%$ , 日间精密度 RSD 为  $4.1\%\sim 8.2\%$ , 准确度 RE 为  $2.3\%\sim 11.6\%$ 。

**1.4 稳定性** 用混合猕猴血清分别制备  $1.5$  和  $15\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 MIL50 质量控制样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 分别考察在室温放置 3 h、在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  放置 7 天、反复冻融 3 次和  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  放置 75 天的稳定性。结果表明血清样品在 4 种条件下, 检测结果浓度偏差均小于  $16.5\%$ , 说明 MIL50 血清样品在上述 4 种条件下较为稳定。

**1.5 稀释线性** 由于 MIL50 给药剂量较大, 实际血清样品浓度较高, 超出了定量范围, 需要进行稀释, 因此对血清样品的稀释准确度进行了考察。分别考察了血清样品稀释 10 000、50 和 2 倍的准确度。结果表明, 猴血清样品最高稀释 10 000 倍后, 浓度偏差在  $-11.6\%\sim -9.5\%$  之间, 不会对样品的测定造成影响。

**1.6 选择性** 生物大分子样品一般不经提取, 基质中存在的相关物质可能会干扰分析物的测定, 因此需要进行选择性的考察来准确测定分析物。取来源于 10 只不同猕猴个体的空白血清分别制备定量上限 ( $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、定量下限 ( $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 及空白基质 3 个样品, 总共 30 个样本。所有样本的分析随行标准曲线, 以计算样品中 MIL50 的浓度。结果表明, 满足至少 80% 的定量上限的样品浓度在标示值的  $\pm 20\%$  范围内, 定量下限的样品浓度在标示值的  $\pm 25\%$  范围内,

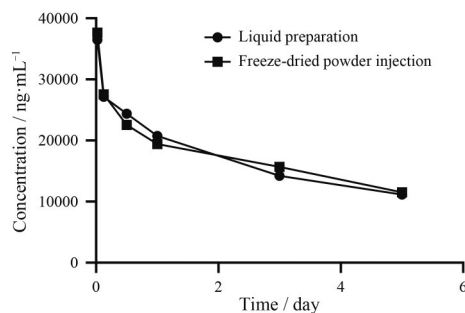
符合方法学要求。

**1.7 平行性** 为发现可能存在的基质效应以及代谢物的亲和性差异, 在获得真实实验样品后, 对实验样品进行系列稀释考察平行性。选取高浓度 ( $C_{\max}$  附近) 的真实样品 6 个, 每个样品用空白混合血清将其分别稀释 5 000、4 000 和 1 500 倍至 3 个不同的浓度后测定, 随行标准曲线计算样品 MIL50 的浓度。结果表明, 每个浓度系列稀释样品间的精密度 RSD 均不超过  $8.0\%$ , 满足方法学考察的要求。

## 2 药代动力学

猕猴分别单次  $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量静脉推注 MIL50 液体制剂和冻干粉后, 从第 7 天开始部分猕猴血药浓度消除明显加快, 且此后血药浓度消除速度显现出明显的个体差异, 这可能与抗抗体产生有关, 而且不同个体之间抗抗体产生的时间和抗体滴度可能也不一样, 因此在进行比较分析时采用  $AUC_{0-5d}$ 。结果显示,  $C_{\max}$  (实测浓度) 与  $AUC_{0-5d}$  经双单侧  $t$  检验两组间差异没有统计学意义; 液体制剂为参比制剂,  $C_{\max}$  比值为  $101.6\%$ ,  $AUC_{0-5d}$  比值为  $101.9\%$ ; 用平均生物等效性方法分析,  $C_{\max}$  的 90% 可信区间为  $79.42\%\sim 129.92\%$ ,  $AUC_{0-5d}$  的 90% 可信区间为  $85.72\%\sim 121.18\%$ 。

12 只猕猴分别单剂量静脉推注 MIL50 液体制剂和冻干粉后血清中的平均血药浓度-时间曲线见图 1, 主要药动学参数见表 1。



**Figure 1** Comparison of plasma concentration-time curves of recombinant humanized anti-ricin monoclonal antibody (MIL50) different preparations after intravenous injection

**Table 1** Main pharmacokinetic (PK) parameters of MIL50 different preparations in rhesus monkeys after intravenous injection.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

PK parameter	Liquid preparation	Freeze-dried powder injection
$T_{\max}/\text{day}$	$0.02 \pm 0.00$	$0.06 \pm 0.05$
$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$36\ 481.50 \pm 6\ 288.54$	$37\ 768.67 \pm 10\ 617.95$
$T_{\text{last}}/\text{day}$	$5.00 \pm 0.00$	$5.00 \pm 0.00$
$C_{\text{last}}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$11\ 151.50 \pm 3\ 730.59$	$11\ 500.67 \pm 5\ 829.92$
$AUC_{0-5d}/\text{day}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$85\ 395.04 \pm 15\ 889.70$	$86\ 412.87 \pm 11\ 816.71$
$AUC_{0-\infty}/\text{day}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$170\ 285.32 \pm 79\ 576.59$	$224\ 777.42 \pm 97\ 509.24$
$MRT/\text{day}$	$2.03 \pm 0.15$	$2.08 \pm 0.28$

## 讨论

体内生物大分子的定量分析常采用 ELISA 方法<sup>[10]</sup>, 本研究建立了用 ELISA 的方法检测猕猴血清样品中 MIL50 的浓度。确证结果表明方法的精密度、准确度、稳定性、稀释线性、选择性和平行性均符合生物样品分析方法指导原则要求, 能够满足 MIL50 临床前生物样品分析和药代动力学研究。

近年来, 国内外多家研究机构从被动免疫和主动免疫两方面, 投入大量人力物力发展蓖麻毒素的解毒剂。由于蓖麻毒素中毒机制复杂且毒性强, 人体实验较难进行, 动物实验成为最常用的代偿手段。猕猴单次静脉推注  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量的 MIL50 液体制剂和冻干粉制剂, 用 ELISA 方法测定血药浓度。经两组  $t$  检验, 液体制剂组与冻干粉剂组  $C_{\max}$  (实测浓度)  $P$  值为 0.994 1,  $AUC_{0-5d}$   $P$  值为 0.902 3, 两组间差异均没有统计学意义; 液体制剂为参比制剂,  $C_{\max}$  比值为 101.6%,  $AUC_{0-5d}$  比值为 101.9%。《中华人民共和国药典》2020 版四部生物等效的判定标准为  $C_{\max}$ 、 $AUC_{0-t}$  几何均值比的 90% 置信区间在 80%~125%, 本实验  $AUC_{0-5d}$  的 90% 可信区间符合规定, 但  $C_{\max}$  的 90% 置信区间略超出等效范围, 可能与实验动物数量少、动物个体间变异较大有关, 而且由于生物大分子药物的免疫学测定方法测定精密度低于化学小分子药物的方法, 在生物等效性的接受标准上也彼此相同, 但因为误差大有时需要更多的配对例数, 若增加实验动物数可望达到生物等效性的要求。实验中还出现部分猕猴血药浓度异常可能是因为以前接触过药物类似物, 研究前未进行抗人源化抗体筛查造成, 有抗体存在; 也可能是因为动物给予 MIL50 后, 体内有抗体产生, 检测到的 MIL50 浓度偏低, 后期将继续进行抗抗体的检测。

仿制药一致性评价任务一直是国家食品药品监督管理局的重要工作之一, 本实验结果显示不同 MIL50 制剂间药代动力学结果存在一定的差异, 但这种未能引起明显差异的不同对 MIL50 制剂的影响程度如何值得深入研究。

**作者贡献:** 窦桂芳、朱晓霞和高雅提供了研究思路; 窦桂芳、高雅、朱晓霞、孟志云、甘慧、顾若兰、吴卓娜和孙文种参与了本项研究的设计; 高雅和朱晓霞收集和分析了大部分数据并撰写了论文; 高雅、朱晓霞和窦桂芳讨论了研究结果并修订了论文。

**利益冲突:** 作者声明不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Griffiths GD. Understanding ricin from a defensive viewpoint [J]. *Toxins*, 2011, 3: 1373-1392.
- [2] Sylvia W, Martin S, Martin S, et al. Characterization of ricin and *R. communis* agglutinin reference materials [J]. *Toxins*, 2015, 7: 4906-4934.
- [3] John W, Veselina K, David B, et al. Intrapulmonary delivery of ricin at high dosage triggers a systemic inflammatory response and glomerular damage [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170: 1497-1510.
- [4] Zhu WW, Li ML, Zhang JL. Development of mass spectrometry technique for quality assessment of monoclonal antibodies [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2843-2853.
- [5] Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus S, et al. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 4775-4784.
- [6] Smallshaw JE, Richardson JA, Vitetta ES. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol [J]. *Vaccine*, 2007, 25: 7459-7469.
- [7] Guo J, Shen B, Sun Y, et al. A novel neutralizing monoclonal antibody against both ricin toxin A and ricin toxin B, and application of a rapid sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Hybridoma*, 2006, 25: 225-229.
- [8] Wang YG, Guo LM, Zhao KP, et al. Novel chimeric anti-ricin antibody C4C13 with neutralizing activity against ricin toxicity [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 1811-1816.
- [9] Luo LL, Luo Q, Guo LM, et al. Structure-based affinity maturation of a chimeric anti-ricin antibody C4C13 [J]. *Biomol Struct Dyn*, 2014, 32: 416-423.
- [10] Li XL, Chen XY, Zhong DF. Bioanalysis in the development of antibody-drug conjugates [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 517-528.