金黄色葡萄糖球菌肠毒素 C2 改构蛋白大鼠药动学研究

吴雅丽 1#, 李洪义 2#, 潘德桐 1, 胡晓丞 1, 申文晋 1*, 蔡永明 1, 司端运 1

- 1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301
- 2. 沈阳协合生物制药股份有限公司, 辽宁 沈阳 110179

摘 要:目的 研究金黄色葡萄糖球菌肠毒素 C2 改构蛋白(2M-118)在大鼠体内单次和多次给药后的药动学特征。方法 24 只大鼠随机分为3 组,每组 8 只,雌雄各半,分别单次 iv 低、中和高剂量(1、2 和 4 mg/kg)2M-118,高剂量组大鼠于单次给药后,继续每天给药 1次,共给药 8次。于给药前(0 h),首次及末次给药后 5、10、20、30、45 min 和 1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0 h 采集眼静脉丛全血约 0.5 mL,制备血清。采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测大鼠血清药物浓度,采用 DAS 3.2.8 药动程序计算药动学参数。结果 大鼠单次 iv 2M-118 后,在 1~4 mg/kg 剂量内,峰浓度(C_{\max})、初始浓度(C_0)和药时曲线下面积(AUC)均与剂量呈正相关;消除相半衰期($t_{1/2z}$)随剂量递增明显延后,平均 $t_{1/2z}$ 分别为 0.24、0.60 和 1.18 h;表观分布容积(V_z)随剂量递增而增大;各剂量组的清除率(C_z)较为一致。与同剂量(4 mg/kg)单次给药相比,大鼠多次给药后的主要药动学参数基本保持一致,体内药物无蓄积倾向。结论 大鼠单次 iv 2M-118 后,在 1~4 mg/kg 剂量内,体内暴露量与剂量呈正相关,其清除可能呈现非线性动力学特征;单次与多次 iv 给予相同剂量 2M-118 后,药动学行为特征基本一致,无明显药物蓄积。

关键词:金黄色葡萄糖球菌肠毒素 C2 改构蛋白 (2M-118); 药动学; 大鼠; 双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA); 药物蓄积中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 06-1059-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.013

Pharmacokinetics of a mutated staphylococcal enterotoxin C2 in rat

WU Yali¹, LI Hongyi², PAN Detong¹, HU Xiaocheng¹, SHEN Wenjin¹, CAI Yongming¹, SI Duanyun¹

- 1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Company Ltd, Tianjin 300301, China
- 2. Shenyang Xiehe Biological Pharmaceutical Co., Ltd, Shenyang 110179, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetic profiles of a mutated staphylococcus enterotoxin C2, named 2M-118, after single and multiple intravenous administration in rat. Methods 24 rats were randomly divided into three groups, including low-dose (1 mg/kg), medium-dose (2 mg/kg) and high-dose (4 mg/kg) groups of 2M-118. Each group included 8 rats, with male and female animals each half. All animals were intravenously administrated at a single dose, after that the rats in high-dose group were continuously dosed once a day for another 7 times. Before administration (0 h), 5, 10, 20, 30, 45 min (0.083, 0.170, 0.750, 0.330, 0.500, 0.750 h), 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 h after the first and last administration, 0.5 ml of whole blood was collected to prepare serum. An ELISA method was developed to determine the dynamic changes of drug concentration in serum, and pharmacokinetic parameters were calculated by using DAS 3.2.8 pharmacokinetics program. Results Pharmacokinetic parameters in rat between different single dose groups were as follows: the peak concentration C_{\max} , initial concentration C_0 , and area under the drug curve AUC were all positively related with increasing dose. The elimination phase half-life $t_{1/2Z}$ was significantly delayed with increasing dose. The mean values of $t_{1/2Z}$ were 0.24, 0.60 and 1.18 h, respectively. The apparent distribution volume V_z tended to increase with the increasing dose. The values of clearance rate CL_z were consistent between groups. Compared with the single dose (4 mg/kg), the main PK parameters were basically consistent after multiple same doses, indicating that there was no tendency of drug accumulation after repeatedly intravenous administration of 2M-118 in rats. Conclusion After a single intravenously dose of 2M-118 in rats, drug exposure in vivo was positively correlated with dose in the range of 1-4 mg/kg, and its clearance possibly presen

基金项目: "十二五"国家重大新药创制项目(2012ZX09102301-013)

第一作者: 吴雅丽(1987—), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事生物技术药物临床、非临床药代动力学评价研究。 E-mail: wuyl@tipr.com.cn 李洪义(1977—), 男, 总工程师, 硕士, 主要从事生物技术新药研发。 E-mail: Lihy15998863898@163.com

收稿日期: 2019-10-02

^{*}通信作者: 申文晋(1984—) Tel:(022)84845058 E-mail:shenwenjin1202@163.com

dynamic characteristics. The characteristics of pharmacokinetics were basically consistent between single and multiple dose of 4 mg/kg 2M-118, and there was no significant drug accumulation observed.

Key words: staphylococcus enterotoxin C2 mutant protein (2M-118); pharmacokinetics; rat; double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); drug accumulation

金黄色葡萄糖球菌肠毒素 C2(SEC2)作为一种超抗原,可通过高效激活肿瘤患者的免疫系统发挥抗肿瘤作用,但因其毒副作用较大限制了其临床应用[1-2]。金黄色葡萄糖球菌肠毒素 C2 改构蛋白(2M-118)属生物技术I类新药,是 SEC2 经减毒和抗肿瘤活性特异性筛选后获得的改构蛋白[3]。改构重建的候选药物 2M-118通过直接作用于 T细胞提高免疫功能,促进与抗癌相关的细胞因子表达,通过多途径、多靶点的新机制发挥抗肿瘤作用。本试验通过研究 2M-118 在大鼠体内单次和多次给药后的药动学特征,旨在探究药物系统暴露程度和持续时间及其在体内的蓄积情况,为该药的进一步非临床试验提供参考。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

金黄色葡萄糖球菌肠毒素 C2 改构蛋白 2M-118(规格 5 mL/支,批号 20140711),由沈阳协合生物制药股份有限公司提供。抗2M-118 小鼠单克隆抗体 14C6(批号 14080129716)、辣根过氧化酶标记的小鼠单克隆抗体 HRP-1C11(批号 14080813518),均由北京爱博生生物技术有限公司提供。

1.2 主要仪器

Varioskan Flash 酶标仪(美国 Thermo 公司); Thermo Scientific Sorvall ST 16R 低温离心机(美国 Thermo 公司);XW-80A 微型漩涡混合仪(上海沪西 分析仪器厂有限公司);MB100-2A 微孔板恒温振荡 器(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.3 实验动物

24只SD大鼠,SPF级,雌雄各半,6~7周龄,由 北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动 物生产许可证号SCXK(京)2012-0001。

2 方法和结果

2.1 设计方案、样本采集

采用随机、平行和剂量递增设计,将 24 只大鼠随机分成 2M-118 低、中和高剂量(1、2 和 4 mg/kg)组,每组 8 只,雌雄各半。大鼠分别单次 iv 2M-118,于给药前(0 h),给药后 5、10、20、30、45 min 和 1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0 h 采集眼静脉丛全血约 0.5 mL,2~8 °C静置 30 min 后,于低温(4 °C) 5 000 r/min

离心 10 min,分离制备血清,-20 ℃保存待测。高剂量组8只大鼠于单次给药24 h后,每天再给药1次,连续给药7 d,共计8次。在末次给药后,采集动态血样本,采血时间点与血清制备方法同单次给药。

2.2 ELISA法的检测步骤

基于双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法定量检测大鼠血清中2M-118的浓度。将抗2M-118小鼠单克隆抗体14C6用包被液稀释,包被于96孔酶标板上,100 μ L/孔,2~8 °C过夜;洗涤后,加2% BSA封闭液,200 μ L/孔,25 °C孵育2 h;分别加入标准溶液、质控样品或待测样品,100 μ L/孔,25°C孵育1 h;洗涤后,加入稀释一定倍数的 HRP-1C11 抗体,100 μ L/孔,25 °C孵育1 h;洗涤后,加 HRP 底物四甲基联苯胺(TMB)A、B液,各50 μ L/孔,25 °C避光反应15 min;加入 H_2 SO₄终止液;在微孔板读数仪上读取各孔450 nm处的吸光度(A)值。

2.3 PK参数计算及统计学分析

大鼠血药浓度-时间数据采用 DAS 3.2.8(北京博之音科技有限公司)药动程序软件进行处理,用非房室模型拟合计算主要药动学参数:峰浓度(C_{\max})、初始浓度(C_0)、药时曲线下面积(AUC)、消除半衰期($t_{1/2z}$)、清除率(CL_z)、表观分布容积(V_z)等; T_{\max} 和 C_{\max} 采用实测值, AUC 采用梯形法计算。采用 DAS 3.2.8 中多剂量线性分析模块中的相关分析法检验 C_{\max} 、 C_0 和 AUC 是否与剂量呈线性相关。采用 SPSS 17.0 软件对单次和多次给药的主要药动学参数均值进行显著性检验。

2.4 药物蓄积评价

采用 DAS 3.2.8 多次用药蓄积分析模块中个体比值法进行多次用药蓄积分析,以评价连续给药是否引起体内蓄积。判别标准:蓄积指数 95% 置信区间下限(CIL)>1.25 则有蓄积,小于此值则无蓄积。

2.5 ELISA方法学验证

2.5.1 最低需求稀释度(MRD) 分别采用样品稀释液(含2%BSA的PBS溶液)、20%、10%大鼠空白血清配制2M-118系列浓度溶液,以考察大鼠空白血清对血药浓度测定结果的干扰。结果表明,10%大鼠空白血清 4 值低于 0.150,基质干扰较小;且在所

测定质量浓度范围内(0.5~32.0 ng/mL)标准曲线拟合关系良好,因此选择大鼠空白血清稀释10倍作为最低需求稀释度。

- **2.5.2** 标准曲线和定量范围 采用 10%的大鼠空白血清配制系列质量浓度的 2M-118校正标样:0.5、1.0、2.0、4.0×8.0×16.0×32.0 ng/mL,按"2.2"项下测定 A 值。以药物浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,经四参数 Log-Logistic(4-PL)模型拟合成 Sigmoidal 型曲线,求得标准曲线的回归方程为: $Y=6.885-6.916/[1+(X/36.140)^{1.085}]$, $r^2=0.999$ 2。标准曲线的定量范围为 $0.5\sim32.0$ ng/mL,定量下限为 0.5 ng/mL。
- 2.5.3 精密度和准确度 在标准曲线范围内,采用 10%的大鼠空白血清配制 2M-118 定量上限、高、中、低和定量下限(LLOQ)浓度的 QC 样品,即:32.0、25.0、6.0、1.2 和 0.5 ng/mL,考察批内和批间的精密度(RSD%)、准确度(RE%)及方法总误差(TE%)。结果显示,2M-118 QC 样品的精密度和准确度均在±15%以内,方法总误差均在25%以内,见表1。
- 2.5.4 特异性 选择胰岛素样生长因子1(IGF-1)、表皮细胞生长因子(EGF)、重组人白介素-11(rhIL-11)、重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)、重组人干扰素γ(rhIFN-γ)、重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子(rhGM-CSF)、重组人II型肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白(rhTNFRII:Fc)、重组人成纤维细胞生长因子-21(FGF-21)等8种内源性细胞因子或相关蛋白,考察本方法的特异性。以10%的大鼠空白血清配制2M-118 QC样品(25和1.2 ng/mL),分别加入高和低浓度(800和80 ng/mL)的上述蛋白。结果表明,加入上述蛋白的大鼠空白血清4值均低于定量下限,高和低浓度2M-118 QC样品 RE%在一18.0%~4.3%范围内。结果提示,上述蛋白均不干扰2M-118的测定。
- 2.5.5 选择性 选取11只不同个体大鼠的空白血清,分别加入定量上限(32 ng/mL)和定量下限(0.5 ng/mL)水平的2M-118,并同时测定未加入

2M-118的空白血清的 A 值。结果显示,未加入 2M-118的 11 个空白血清测定值均低于定量下限。用上述不同来源大鼠空白血清配制的 2M-118 定量上限和定量下限的 RE%分别在一14.2%~11.6%和一19.5%~17.8%之间。表明本法不受血清基质中其它非相关物质的干扰,对目标蛋白 2M-118的测定具有良好的选择性。

- 2.5.6 稀释线性 采用10%大鼠空白血清配制2M-118稀释度分别为1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200和1:6400的QC样品,计算回算浓度(实测浓度×稀释倍数)的RSD%和RE%。结果表明,当稀释度不大于1:6400时(1:200~1:6400),样品稀释后对测定结果的准确度影响不大,其RSD%均小于6.0%,平均RE%均在±7.4%内。
- 2.5.7 平行性 选取 3 只大鼠 0.083 h 血清样品,将 其等量混合后以大鼠空白血清稀释至 4 个倍比浓度,再以样品稀释液稀释 10 倍。将所测得浓度均值 对数 (Log C)与 A 均值对数 (Log Abs)进行线性拟合,采用"标准曲线平行性测定法"检验系列稀释的血清样品曲线与校正标样制备的标准曲线的平行性^[4]。结果表明,2M-118 的标准曲线和系列稀释的受试动物血清样品的曲线相互平行,基质效应等因素对样品测定无影响。
- 2.5.8 稳定性 用大鼠空白血清分别配制 2M-118 低、高质量浓度 QC 样品,即 12 和 250 ng/mL。分别考察在 − 20 °C 储存 1、50 d、2~8 °C 储存 1 d、室温(25 °C)储存 2 h 和经历 3 次冷冻-解冻循环等 5 种不同条件下的稳定性。测定即日,以样品稀释液稀释 10 倍后立即测定。结果显示,2M-118 在上述 5 种条件下 QC 样品 RE%在 − 11.6%~7.5% 之间。提示,2M-118 在上述储存条件下稳定。

2.6 大鼠血清中2M-118浓度的测定

采用经验证的 ELISA 法测定 24 只大鼠分别单次或多次iv不同剂量 2M-118 后不同时间血清药物浓度,各剂量组平均血药浓度-时间曲线比较见图 1。

表1 ELISA 法检测大鼠血清中 2M-118 的精密度和准确度 (x±s)

Table 1 Precision and accuracy for analysis of 2M-118 in rat serum by using $ELISA(x\pm s)$ 批内变异(n=5) 批间变异(n=6)

质量浓	批内变异(n=5)			批间变异(n=6)				
度/(ng·mL ⁻¹)	测定值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%	TE/%	测定值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%	TE/%
32	29.97±0.71	2.4	-6.3	8.7	32.41±1.47	4.5	1.3	5.8
25	23.82 ± 0.51	2.2	-4.7	6.9	25.06±1.65	6.6	0.3	6.9
6	5.71 ± 0.10	1.8	-4.9	6.7	6.26±0.31	4.9	4.3	9.2
1.2	1.04 ± 0.06	6.0	-13.0	19.0	1.18±0.06	4.7	-1.7	6.4
0.5	0.57 ± 0.04	6.8	13.7	20.5	0.53±0.05	8.7	5.7	14.4

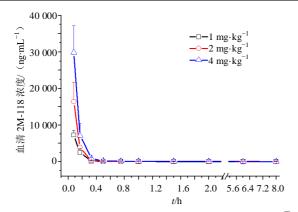


图 1 大鼠单次 iv 2M-118后的平均血药浓度-时间曲线(x = s, n=8)

Fig. 1 Mean serum concentration-time curves of 2M-118 in rat after iv administration $(\bar{x} \pm s, n=8)$

结果显示,大鼠单次iv不同剂量2M-118后,药物清除速率均较快,给药后5min内,2M-118浓度即降低至初始浓度的1/3以下,低、中剂量组分别在给药后1.5和4.0h有6只动物(6/8)的血药浓度低于LLOQ,高剂量组给药后8h有5只动物(5/8)的血药浓度低于LLOQ。各时间点的血药浓度与剂量呈正相关。2M-118高剂量末次(第8次)给药后2M-118的血药浓度变化趋势与单次给药基本一致(见图2)。

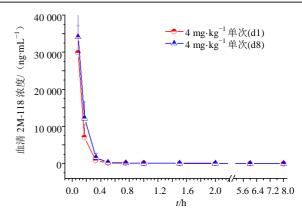


图 2 大鼠单次或多次 iv 2M-118(4 mg/kg)后的平均血药浓度-时间曲线比较 $(\bar{x}\pm s, n=8)$

Fig. 2 Mean serum concentration-time curves of 2M-118 in rat after single and multiple intravenous administration at dose of 4 mg/kg($\bar{x}\pm s, n=8$)

2.7 药动学参数的计算和分析

大鼠血清2M-118药物浓度数据采用DAS 3.2.8 药代计算程序进行数据处理,各剂量组经非房室模型拟合所得主要参数比较见表2、3。

单次给药结果: 2M-118 各剂量组的 C_{max} 、 C_0 和 AUC 随剂量递增而增大。经 DAS 3.2.8 多剂量线性

表 2 大鼠单次 iv 2M-118后的主要药动学参数 $(x \pm s, n=8)$

Table 2 Pharmacokinetic parameters of 2M-118 in rat after iv administration ($\bar{x}\pm s$, n=8)

全 ₩r	公	2M-118				
参数	单位	1 mg·kg ⁻¹	2 mg·kg ⁻¹	4 mg·kg ⁻¹		
$AUC_{(0-8h)}$	μg·h·L ⁻¹	1 819±407	4 459±1 730	8 393±2 054		
$\mathrm{AUC}_{(0\text{-}\infty)}$	$\mu g \!\cdot\! h \!\cdot\! L^{-1}$	1 822±408	4 466±1 729	8 406±2 047		
$t_{I/2z}$	h	0.24 ± 0.15	0.60 ± 0.53	1.18 ± 1.01		
$V_{\rm z}$	$L \cdot kg^{-1}$	0.180 ± 0.099	0.475 ± 0.480	0.924 ± 0.942		
CL_{z}	$L \cdot h \cdot kg^{-1}$	0.578 ± 0.153	0.496 ± 0.145	0.500 ± 0.119		
$C_{ m max}$	$\mu g{\cdot}L^{1}$	7 239±1 323	16 382±5 364	29 875±7 287		
$C_{\scriptscriptstyle 0}$	$\mu g \cdot L^{-1}$	21 554±9 009	61 490±32 023	116 566±41 419		

表 3 大鼠单次或多次 iv 2M-118(4 mg/kg)后的主要药动学 参数比较(\bar{x} ± s, n=8)

Table 3 Comparison of pharmacokinetic parameters of 2M-118 in rat after single and multiple iv administration at dose of 4 mg/kg ($\bar{x}\pm s, n=8$)

参数	单位	单次给药(d1)	末次给药(d8)
$AUC_{\scriptscriptstyle (0\text{-}8h)}$	$\mu g{\cdot}h{\cdot}L^{-1}$	$8\ 393 \pm 2\ 054$	$8\;517\pm 1\;489$
$AUC_{\scriptscriptstyle (0\text{-}\infty)}$	$\mu g{\cdot}h{\cdot}L^{1}$	$8\ 406 \pm 2\ 047$	$8\ 558 \pm 1\ 464$
$t_{1/2z}$	h	1.18 ± 1.01	1.31 ± 1.03
$V_{\rm z}$	$L \cdot kg^{-1}$	0.924 ± 0.942	0.931 ± 0.774
CL_z	$L \cdot h \cdot kg^{-1}$	0.500 ± 0.119	0.480 ± 0.084
$C_{ ext{max}}$	$\mu g{\cdot}L^{-1}$	$29\ 875 \pm 7\ 287$	$34\ 211\pm 6\ 127$
C_0	$\mu g \cdot L^{-1}$	$116\ 566 \pm 41\ 419$	$90\ 278 \pm 22\ 964$

分析的相关分析法,结果表明, C_0 、 C_{max} 和 AUC 均与剂量呈正相关。 $t_{1/2Z}$ 随剂量递增明显延后; V_z 随剂量递增而增大, CL_z 则较为一致。提示,2M-118 在大鼠体内的清除可能呈现非线性动力学特征。

单次与多次PK比较:与单次iv同剂量(4 mg/kg) 2M-118相比,大鼠末次给药(第 8 次)后的主要药动学参数基本保持一致,均未见统计学差异。提示,大鼠单次与多次iv给予2M-118(4 mg/kg)的药动学行为特征基本一致。

2.8 多次给药动物体内药物蓄积评价

采用 DAS 3.2.8 多次用药蓄积分析模块中个体

比值法计算药物蓄积指数(R),并评价连续给药后的 于 1.25(见表 4),表明大鼠多次 iv 2M-118(4 mg/kg) 药物蓄积情况。结果表明,其蓄积指数 95% CIL均小 后,体内药物无蓄积倾向。

表 4 大鼠单次或多次 iv 2M-118(4 mg/kg)后的药物蓄积分析(x = s, n = 8)

Table 4 Drug accumulation analysis of 2M-118 in rat after single and multiple iv administration at dose of 4 mg/kg ($x \pm s, n = 8$)

分析指标	R	95% CIL	95%置信区间的上限(CIH)	RSD%	结论
$\mathrm{AUC}_{(0\text{-}8h)}$	1.053	0.885	1.221	23.0	无蓄积倾向
$AUC_{(0\text{-}\infty)}$	1.056	0.890	1.222	22.6	无蓄积倾向
$C_{ m max}$	1.195	0.999	1.391	23.7	无蓄积倾向
C_0	1.195	0.999	1.391	23.7	无蓄积倾向

3 讨论

SEC2作为超抗原,仅需微量即能高效地刺激T 细胞增殖,产生大量具有生物学活性的细胞因子, 从而杀伤和抑制肿瘤细胞[2]。早在上世纪末,沈阳 协合集团率先研制出以SEC2为主要成分的超抗原 生物制剂一金葡素注射液(商品名:高聚生)。该制 剂作为首个应用于临床的超抗原类抗肿瘤药物,在 增强机体免疫力、抗肿瘤、升高白细胞、提高放化疗 疗效等方面发挥着重要作用[2,5]。尽管 SEC2 在临床 上具有显著的抗癌疗效,但作为肠毒素仍存在诸多 副反应,如引起呕吐、发热、腹泻、腹绞痛等,这也严 重制约其临床应用[2]。研究表明,SEC2分子中的二 硫环结构对维持 SEC2 的稳定性和生物学活性至关 重要,二硫环中的特定氨基酸可能与其催吐效应有 关[68]。Xu等对SEC2二硫环内部不同氨基酸残基 进行基因定点突变,构建了一系列突变蛋白。这些 蛋白在刺激淋巴细胞增殖能力和抗肿瘤活性方面 较野生型 SEC2 均显著增强,但致热活性的强弱存 在较大差异[9-11]。这些研究为在 SEC2 的基础上开 发和筛选增效、减毒的新型抗肿瘤候选药物奠定了 大量的工作基础。

本研究中,2M-118也是在SEC2蛋白结构基础上进行基因定点突变得到的改构蛋白[3]。体外试验结果显示,在1~10000 ng/mL质量浓度范围内,2M-118刺激小鼠脾淋巴细胞增殖的能力与野生型SEC2相比未见明显差异。在BALB/c小鼠移植瘤模型中,当分别iv给予递增剂量的2M-118(5、10 mg/kg)时,肿瘤抑制率由45.82%上升至60.95%。此外,2M-118在多次给药后可在小鼠体内产生非中和活性的抗药抗体,其抗体滴度与剂量和给药频率基本呈正相关。Zhang等[3]研究认为,2M-118的超抗原活性与野生型SEC2相当,同时其胃肠道毒副作用显著低于SEC2,作为一种潜在的抗肿瘤候选药物,其应用前景非常广阔。

ELISA 法因其准确、快速、高效,仍为生物制品 检测的首选方法。2M-118具有全新的分子结构,无 任何商品化 ELISA 检测试剂盒或抗体,因此需要筛 选抗 2M-118 特异性抗体并构建 ELISA 检测试剂 盒。本试验采用的抗体对(14C6/HRP-1C11)可特异 性识别 2M-118, 且不受内源性 SEC2 测定的干扰。 在此基础上,本课题组对试验过程中的显色剂、终 止液、封闭时间、HRP-1C11稀释液等条件进行优 化,并对建立的ELISA法进行较为全面的方法学验 证。验证结果均符合2015年版中国药典"生物样品 定量分析方法验证指导原则"中有关配体结合分析 的技术要求[12]。本研究采用 ELISA 法首次对 2M-118在大鼠体内的药动学特征进行探究。值得注意 的是,2M-118大鼠单次iv给药后,t_{1/2}随剂量递增而 明显延后,提示药物在体内的清除可能呈现非线性 动力学特征,此时 $t_{1/2Z}$ 不再为常数,而随初始浓度或 剂量的增加而延后。生物大分子药物在体内的消 除途径主要包括肾小球滤过、酶水解、受体介导的 胞吞消除和抗药物抗体介导的消除[13]。非线性药 动学的原因通常来源于酶或受体的饱和性,如药物 清除时受体转运达饱和。本研究结果将为2M-118 进一步的非临床试验提供一定参考。

参考文献

- [1] Wu T, Zhang J, Wang B, et al. Staphylococcal enterotoxin C2 promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells and accelerates fracture healing [J]. Bone Joint Res, 2018, 7 (2):179-186.
- [2] 胡风庆,彭雪.金黄色葡萄球菌超抗原肠毒素临床应用研究进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 1-8.
- [3] Zhang J, Cai Y M, Xu M K, et al. Anti-tumor activity and immunogenicity of a mutated staphylococcal enterotoxin C2 [J]. Pharmazie, 2013, 68 (5): 359-364.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

- [5] 陈廷祚. 高聚生研发历程述评及其用于癌症治疗的理论基础 [J]. 微生物学免疫学进展, 2001, 29(2): 63-69.
- [6] Wang X G, Xu M K, Cai Y M, et al. Functional analysis of the disutlphide loop mutant of staphylococcal enterotoxin C2 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82: 861-871.
- [7] 杨浩民, 郁建平, 胡风庆. 金黄色葡萄球菌肠毒素 C2基因定点突变分析 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(11): 1334-1336.
- [8] Hui J, Cao Y, Xiao F, et al. *Staphylococcus aureus* enterotoxin C2 mutants: biological activity assay *in vitro* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35(9):975-980.
- [9] Xu M K, Wang X G, Cai Y M, et al. An engineered superantigen SEC2 exhibits promising antitumor activity

- and low toxicity [J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(5):705-713.
- [10] 张国俊,徐明恺,孙 健,等.增强型金黄色葡萄球菌肠毒素 C2 突变体及其超抗原活性 [J]. 生物工程学报, 2013, 29(6): 803-813.
- [11] Fu X H, Xu M K, Yao S Y, et al. Staphylococcal enterotoxin C2 mutant drives T lymphocyte activation through PI3K/mTOR and NF-κB signaling pathways [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 333:51-59.
- [12] 中国药典[S]. 四部. 2015.
- [13] 许 娜, 田 浤, 姚文兵. 生物大分子药物代谢消除途径 及体外代谢研究方法进展 [J]. 药学与临床研究, 2018, 26(4): 273-277.