

· 药物研究 ·

重组抗CD52单克隆抗体的食蟹猴单次静脉注射毒性研究

王欣^{1#}, 张琳^{1#}, 杨莹¹, 齐卫红¹, 姜华¹, 林志¹, 王海彬^{2*}, 耿兴超^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 浙江海正药业股份有限公司, 台州 318000)

摘要 目的: 开展食蟹猴静脉注射重组抗CD52人源化单克隆抗体注射液单次给药毒性研究, 考察动物体内耐受性、给药后出现的毒性反应及严重程度和药物毒性作用靶器官, 评价其安全性。方法: 首先应用流式细胞术检测方法, 筛选出8只红细胞表面CD52抗原阴性食蟹猴, 用于单次给药毒性研究。将动物随机分成4组, 包括溶媒对照组和3、10、30 mg·kg⁻¹剂量组, 每组2只, 雌雄各半。采用静脉推注给药, 给药1次。试验期间, 每天观察动物的临床症状和摄食量, 每周称量1次体质量。分别在给药第2、8、15 d采集动物外周血液进行临床病理检查, 包括血液学(含凝血)、血清生化(含电解质)。分别在给药第2、6、8、15、21 d采集动物外周血液进行T淋巴细胞及亚群和B淋巴细胞的分类计数。于给药第22 d解剖动物并进行大体病理学检查。**结果:** 动物给药后, 在10 mg·kg⁻¹和30 mg·kg⁻¹剂量下, 会引起白细胞总数、淋巴细胞、单核细胞数量和比例、T淋巴细胞数量及其亚群细胞数量下降, 这些变化与药物的免疫抑制作用相关。受试物还会引起血红蛋白浓度下降, 网织红细胞数量和比例和总胆红素升高。**结论:** 给予食蟹猴单次静脉注射3、10、30 mg·kg⁻¹重组抗CD52人源化单克隆抗体注射液后, 动物耐受良好, 最大耐受量是30 mg·kg⁻¹。本研究的给药剂量以及与药物相关的毒性发现, 为后续开展长期毒性研究提供了参考。

关键词: CD52抗原; 单克隆抗体; 食蟹猴; 单次给药毒性; 安全性评价

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)10-1147-19

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.10.007

A Study on Single Dose Toxicity of Recombinant Anti-CD52 Humanized Monoclonal Antibody Injection in Cynomolgus Monkeys

Wang Xin^{1#}, Zhang Lin^{1#}, Yang Ying¹, Qi Weihong¹, Jiang Hua¹, Lin Zhi¹, Wang Haibin^{2*}, Geng Xingchao^{1*} (1. National Center for Safety Evaluation of Drugs & the Beijing Key Lab for Pre-clinical Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China)

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(编号 2018ZX09201-017)

作者简介: 王欣 Tel: (010) 67876252; E-mail: wangxin-26@nifdc.org.cn

共同第一作者: 张琳 Tel: (010) 67872233-8520; E-mail: zhanglin2303@163.com

通信作者: 耿兴超 Tel: (010) 67876255; E-mail: gengxch@nifdc.org.cn

王海彬 Tel: (0576) 88828314; E-mail: hbwang@hiesunpharm.com

Abstract Objective: To conduct a study on single dose toxicity of recombinant anti-CD52 humanized monoclonal antibody injection in cynomolgus monkeys in order to investigate the tolerance of the animals, toxicity and severity of the injection and target organs of drug toxicity, and then the safety was evaluated. **Methods:** Eight cynomolgus monkeys with CD52 antigen negative on erythrocyte surface were selected by flow cytometry screening for the single dose toxicity study. All monkeys were randomly divided into four groups, including the vehicle control group and 3, 10, 30 mg·kg⁻¹ dose groups with 2 monkeys in each group, one male and the other female. The drug was administered intravenously for once. During the trial period, clinical symptoms and food intake by animals were observed every day. Body weight was measured once a week. On the 2nd, 8th, and the 15th day, the peripheral blood of animals were collected for clinical pathological examination, including hematology (coagulation included) and serum biochemistry (electrolyte included). On the 2nd, 6th, 8th, 15th and the 21st day, peripheral blood were sampled for counting the T lymphocyte, subsets and B lymphocytes. On the 22nd day after administering drugs, animals were necropsied, and gross pathological examination was performed. **Results:** Decrease in leukocyte, lymphocyte, monocyte quantity and proportion, T lymphocyte and its subsets were found in 10 mg·kg⁻¹ and 30 mg·kg⁻¹ test groups after administering drugs. These changes were considered as related to the immunosuppression of the drug. The test article also caused increases in reticulocyte quantity and proportion and total bilirubin and decrease in hemoglobin concentration. **Conclusion:** After the cynomolgus monkeys were administrated with 3, 10, 30 mg·kg⁻¹ recombinant anti-CD52 humanized monoclonal antibody injections, the test article was well tolerated in animals. The maximum tolerance dose was 30 mg·kg⁻¹. The doses and the related toxicological findings of this study provide references for a future long-term toxicity study.

Keywords: CD52 antigen; monoclonal antibody; cynomolgus monkey; single dose toxicity; safety assessment

CD52抗原是一种膜糖蛋白分子,由12个氨基酸组成,位于细胞膜表面外侧,主要参与介导分子识别和细胞识别。人CD52抗原大量表达在淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞表面,少量表达在粒细胞,而在红细胞、血小板和骨髓干细胞中不表达^[1-3]。CD52抗体可以与抗原特异性结合,通过激活补体依赖性和抗体依赖性细胞毒性作用裂解细胞,发挥免疫抑制作用和刺激机体免疫系统重建^[4-5]。因此,这类药物在临床上常用于治疗慢性淋巴细胞白血病,肝脏、肾、小肠移植术后抗宿主病,类风湿性关节炎,多发性硬化症等免疫疾病,应用范围十分广泛^[6-11]。

本研究开展创新药物全人源抗CD52单克隆抗体注射液单次给药毒性研究,评价其体内安全性;同时,重点关注动物对受试物的耐受性,给药后可能出现的毒性反应及严重程度,以及发现与药物作用相关的毒性靶器官,为后续长期毒性试验中的剂量选择和指标设定提供参考^[12]。由于靶点存在特殊性,研究中只能使用红细胞表面CD52抗原阴性食蟹猴。因此,首先建立特异性流式细胞术检测方

法,筛选符合条件的实验动物,同时验证筛选方法的系统适用性。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

受试物重组抗CD52人源化单克隆抗体注射液(批号20130102,浓度30 mg·mL⁻¹,浙江海正药业股份有限公司)、重组抗CD52人源化单克隆抗体注射液空白溶液(批号20130101,浙江海正药业股份有限公司),放置2~8℃、避光保存。阴性对照抗体(抗Her2人源化单抗注射液,批号M20120701,浓度150 mg·mL⁻¹,北京天广实生物技术股份有限公司),放置-20℃、避光保存。二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO, Amresco公司),HOOKTM-Dye Labeling Kit(GBiosciences公司),猴外周血单核细胞分离液、磷酸盐缓冲液[Phosphate Buffered Solution, PBS, 生工生物工程(上海)股份有限公司],全血及组织匀浆稀释液(北京索莱宝科技有限公司),细胞洗涤液(百事创新科技有限公司),牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA, 北京百灵威科技有限公

司), Mouse Anti-Human CD8-FITC抗体、Mouse Anti-Human CD4-PE抗体、Mouse Anti-Human CD3-PerCP抗体、Mouse Anti-Human CD20-APC抗体(BD公司), 血清生化检测试剂(北京中生生物工程公司)。

ADVIA 120血液学分析仪(拜耳公司); 7060型全自动生化分析仪(日立公司); Rapidchem 744电解质分析仪(拜耳公司); 流式细胞仪(BD公司); H-500FRS台式高速冷冻离心机(Kokusan公司)。

1.2 实验动物

8只食蟹猴(红细胞表面CD52抗原阴性): 雌性4只(2.22~3.68 kg), 雄性4只(2.70~3.60 kg), 3~4岁龄, 购自北京协尔鑫生物资源研究所, 实验动物许可证号: SCXK(京)2010-0007。动物饲养在不锈钢金属笼, 单笼饲养。每天定量喂食膨化猴料150 g(北京科澳协力饲料有限责任公司)和水果150 g, 自由摄取。动物由饮水瓶自由摄取饮用水。饲养室控制温度16~26 °C, 日温差 ≤ 4 °C, 湿度40%~70%, 换气次数8次 \cdot h⁻¹, 照明12 h \cdot d⁻¹。

1.3 实验方法

1.3.1 红细胞CD52抗原阴性食蟹猴筛选

抗体标记荧光染料FITC。使用试剂盒对受试物抗体和阴性对照抗体标记荧光染料FITC。将染料粉末完全溶解于100 μ L DMSO, 混匀备用。分别吸取200 μ L(6 mg)受试物或者阴性对照抗体溶液至5 mL离心管, 加入2.8 mL标记缓冲液, 混匀。吸取500 μ L稀释后抗体溶液至1.5 mL离心管, 加入5.26 μ L染液, 迅速涡流混匀, 短暂离心, 使染液沉降至管底, 室温避光孵育60 min。经过柱分离和反复洗脱去除未结合染料, 另取干净离心管1支, 分别收集纯化的FITC-CD52抗体和FITC-Her2抗体。放置-20 °C避光保存, 临用前4 °C复融。

食蟹猴外周血液样本制备。挑选数只健康状况良好的食蟹猴作为备选动物, 经前臂静脉对动物采血, 每只动物采血体积大约2.0 mL。取猴血0.8 mL与全血稀释液0.8 mL(体积比为1:1)混合。吸取混合液1.0 mL, 缓慢加至1.0 mL细胞分离液液面上。400 g离心20 min, 分离红细胞, 洗涤1次, 然后加入适量体积0.5% BSA-PBS溶液重悬细胞, 调整细胞密度至 $1.0 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。分别吸取40

μ L细胞液, 加入2支流式管中, 每管加入100 μ L 0.5% BSA-PBS溶液, 1管加入4 μ L FITC-CD52抗体, 1管加入4 μ L FITC-Her2抗体。放置4 °C, 避光孵育45 min。孵育结束, 清洗细胞2次, 每管加入300 μ L 0.5% BSA-PBS溶液重悬细胞, 待测定。

流式分析检测。以前向和侧向散射角散点图圈出红细胞门, 每个样本收集大约20000个细胞。在488 nm激发光下, 对标记细胞的几何平均荧光强度进行分析。每个样本, 计算受试物抗体标记细胞和阴性对照抗体标记细胞的荧光强度比值 X , 根据比值判定结果。其中, $X \geq 5$ 为阳性, $X < 5$ 为阴性。挑选测定结果为阴性的实验动物, 供单次给药毒性研究使用。

1.3.2 食蟹猴单次给药毒性研究

研究采用8只食蟹猴, 雌雄各半。检疫期结束后将动物随机分成4组, 每组2只动物, 雌雄各1只, 设置溶媒对照组和低、中、高3个剂量组, 给药剂量分别是3、10、30 mg \cdot kg⁻¹, 按照受试物临床拟用量为每人每次用药量30 mg计算(60 kg体重), 依次为人用剂量2.4、8.1、24.3倍(按体表面积折算), 认为设置高剂量可以达到抗体药物体内充分暴露目的。使用微量注射泵缓慢静脉推注给药, 给药速度60 mL \cdot h⁻¹, 给药1次。检疫期间, 观察动物的外观症状和摄食情况, 并进行临床病理学检查。试验期间, 每天观察动物的临床症状和摄食量, 每周称量1次体质量。分别在给药第2、8、15 d采集动物外周血液进行临床病理检查, 包括血液学、血凝、血清生化、电解质测定。分别在给药第2、6、8、15、21 d采集动物外周血液进行T淋巴细胞及亚群和B淋巴细胞的分类计数。在给药第22 d, 对全部动物静脉注射3.5%戊巴比妥钠麻醉, 股动脉放血处死, 然后进行解剖和大体病理学检查, 发现异常的组织器官进行组织病理学检查。

1.4 检测指标

研究期间, 每天观察动物的临床症状, 包括外观体征、行为活动、精神状态、呼吸状态、排泄物及分泌物等。动物每天定量给猴饲料150 g, 实验人员每天观察评估动物的摄食量和剩料量情况。摄食量是当日给饲料量与次日剩余饲料量之差。无剩余饲料时, 实验人员进行无饲料确认; 有剩余饲料时, 实验人员需要估算剩余饲料为前一天给饲料量的百分比范围, 分为4档范围: $< 25\%$ 、

25%~50%、50%~75%、>75%，记录剩余饲料范围。

血液学（含凝血）检查指标包括：白细胞数（WBC）、中性粒细胞绝对数及百分比（Neut）、淋巴细胞绝对数及百分比（Lymph）、单核细胞绝对数及百分比（Mono）、嗜酸性粒细胞绝对数及百分比（Eos）、嗜碱性粒细胞绝对数及百分比（Baso）、红细胞数（RBC）、血红蛋白浓度（HGB）、红细胞比容（HCT）、平均红细胞容积（MCV）、平均血红蛋白量（MCH）、平均血红蛋白浓度（MCHC）、血小板数（PLT）、平均血小板容积（MPV）、网织红细胞绝对数及百分比（Retic）、凝血酶原时间（PT）和活化部分凝血酶原时间（APTT）。

血清生化（含电解质）检查指标包括：丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）、肌酸磷酸激酶（CK）、 γ -谷氨酰转肽酶（GGT）、乳酸脱氢酶

（LDH）、总胆红素（TBIL）、尿素氮（BUN）、肌酐（CRE）、葡萄糖（GLU）、总胆固醇（CHO）、甘油三酯（TG）、总蛋白质（TP）、白蛋白（ALB）、白蛋白/球蛋白（A/G）、血清钾（K⁺）、血清钠（Na⁺）、血清氯（Cl⁻）、IgA、IgG、IgM、补体C3和C4。

外周血淋巴细胞检测包括：CD3⁺T细胞、CD3⁺CD4⁺T细胞、CD3⁺CD8⁺T细胞、CD3⁻CD20⁺B细胞。

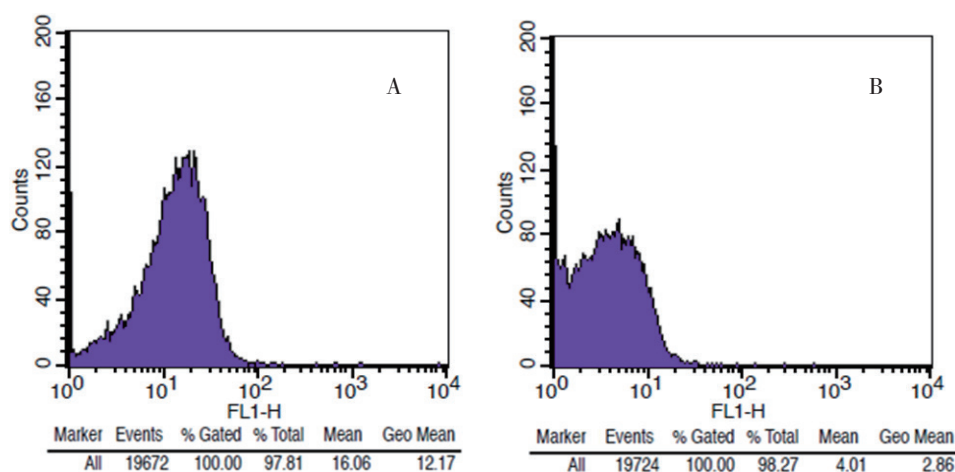
1.5 统计方法

各组仅列出个体动物的测定结果，不进行统计计算。

2 结果

2.1 动物筛选结果

经过流式分析检测，筛选出8只红细胞CD52抗原阴性食蟹猴，雌雄动物各4只，标记细胞荧光强度比值范围3.96~4.91，均为阴性实验动物，可以在单次给药毒性研究中使用（见表1和图1）。



A. FITC-CD52 标记红细胞流式测定图；B. FITC-Her2 标记红细胞流式测定图。

图1 抗体标记红细胞流式测定图

表1 红细胞 CD52 抗原阴性食蟹猴流式测定结果

性别	动物号	刺青号	标记 CD52 抗体红细胞 平均荧光强度	标记 Her2 抗体红细胞 平均荧光强度	比值 X
雄性	M001	1004001	12.76	2.94	4.34
	M002	1102003	12.17	2.86	4.26
	M003	0910773	12.53	2.98	4.20
	M004	1011001	12.06	2.79	4.32

续表 1

性别	动物号	刺青号	标记 CD52 抗体红细胞 平均荧光强度	标记 Her2 抗体红细胞 平均荧光强度	比值 X
雌性	F001	0905758	14.20	2.89	4.91
	F002	1007130	12.29	3.00	4.10
	F003	1001022	13.54	3.07	4.41
	F004	0905790	11.85	2.99	3.96

2.2 临床症状观察

实验期间, 动物分别静脉注射给予 3、10、30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量受试物后, 雌雄动物临床症状未见异

常。动物摄食正常, 未见剩余饲料。动物体质量正常, 未见明显变化 (见表 2)。

表 2 重组抗 CD52 人源化单克隆抗体注射液单次给药毒性研究动物体质量测定结果

剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物号	检疫期	第 1 d	第 8 d	第 15 d	第 21 d	kg
0	F001	3.10	3.08	3.18	3.22	3.20	
	M001	3.68	3.76	3.62	3.82	3.72	
3	F002	3.00	2.90	3.04	3.02	2.96	
	M002	2.90	2.94	2.82	2.96	2.90	
10	F003	2.46	2.52	2.46	2.58	2.54	
	M003	2.64	2.70	2.56	2.76	2.76	
30	F004	3.76	3.70	3.66	3.92	3.80	
	M004	3.22	3.30	3.10	3.28	3.34	

2.3 临床病理检查

血液学和凝血检查结果。将各剂量组动物的各项指标测定结果分别与自身检疫期测定结果比较, 并且与相同时期溶媒对照组动物测定结果比较。动物给予受试物以后, 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组各项指标未见明显变化。10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂

量组, 动物 WBC 绝对数、Lymph 绝对数及百分比、Mono 绝对数及百分比下降, Neut 绝对数及百分比、Eos 绝对数及百分比、Baso 绝对数及百分比无明显变化; RBC 数量无明显变化, HGB 下降, Retic 绝对数及百分比升高, 其他红系细胞指标无明显变化趋势; PT 和 APTT 时间无明显变化 (见表 3)。

表3 重组抗CD52人源化单克隆抗体注射液单次给药毒性研究动物血液学(含凝血)测定结果

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
WBC / (10 ⁹ · L ⁻¹)	0	F001	12.67	12.30	11.15	10.09
		M001	12.49	10.86	10.91	10.39
	3	F002	14.59	14.33	19.82	12.69
		M002	12.14	7.82	9.01	10.42
	10	F003	10.00	6.73	6.53	7.93
		M003	9.89	10.39	5.13	6.38
	30	F004	10.86	5.51	5.61	6.14
		M004	15.04	10.13	4.98	5.81
Neut / (10 ⁹ · L ⁻¹) 及百分比 /%	0	F001	5.43/42.9	7.74/62.9	4.82/43.2	6.41/63.6
		M001	5.53/44.3	6.38/58.7	6.12/56.1	5.00/48.2
	3	F002	2.11/14.4	5.84/40.8	6.33/31.9	4.33/34.1
		M002	5.90/48.6	3.35/42.8	4.07/45.2	4.54/43.5
	10	F003	1.73/17.3	4.62/68.6	2.17/33.3	3.75/47.3
		M003	3.32/33.6	6.51/62.6	3.69/71.9	3.89/61.0
	30	F004	5.03/46.3	4.22/76.6	3.89/69.3	4.34/70.6
		M004	4.99/33.2	6.52/64.3	3.45/69.1	2.75/47.3
Lymph / (10 ⁹ · L ⁻¹) 及百分比 /%	0	F001	6.47/51.0	4.05/33.0	5.82/52.2	3.33/33.0
		M001	6.39/51.2	4.14/38.1	4.35/39.9	4.93/47.5
	3	F002	7.66/52.5	7.04/49.1	10.55/53.2	7.42/58.5
		M002	5.69/46.9	3.90/49.9	4.02/44.6	5.23/50.2
	10	F003	7.73/77.3	1.93/28.6	3.95/60.6	3.89/48.7
		M003	6.07/61.4	3.57/34.4	1.06/20.6	2.10/33.0
	30	F004	5.17/47.6	1.11/20.1	1.36/24.2	1.33/21.7
		M004	8.99/59.8	3.42/33.7	0.87/17.4	2.29/39.4
Mono / (10 ⁹ · L ⁻¹) 及百分比 /%	0	F001	0.40/3.2	0.39/3.1	0.27/2.4	0.20/2.0
		M001	0.23/1.8	0.21/1.9	0.25/2.3	0.26/2.5
	3	F002	0.98/6.7	0.50/3.5	0.99/5.0	0.56/4.4
		M002	0.27/2.2	0.40/5.1	0.33/3.7	0.38/3.7
	10	F003	0.29/2.9	0.11/1.7	0.22/3.4	0.19/2.4
		M003	0.22/2.3	0.13/1.3	0.21/4.1	0.20/3.2
	30	F004	0.41/3.7	0.08/1.4	0.20/3.6	0.31/5.1
		M004	0.83/5.5	0.11/1.0	0.50/10.0	0.62/10.7

续表 3

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
Eos / (10 ⁹ · L ⁻¹) 及百分比 / %	0	F001	0.27/2.1	0.05/0.4	0.17/1.5	0.10/1.0
		M001	0.22/1.8	0.07/0.7	0.14/1.3	0.13/1.2
	3	F002	3.66/25.1	0.78/5.5	1.68/8.5	0.25/2.0
		M002	0.16/1.4	0.08/1.0	0.47/5.2	0.17/1.6
	10	F003	0.11/1.1	0.02/0.3	0.09/1.4	0.06/0.8
		M003	0.19/2.0	0.13/1.3	0.09/1.8	0.14/2.2
	30	F004	0.19/1.8	0.07/1.3	0.14/2.5	0.14/2.3
		M004	0.09/0.6	0.05/0.5	0.06/1.2	0.04/0.6
Baso / (10 ⁹ · L ⁻¹) 及百分比 / %	0	F001	0.04/0.4	0.03/0.2	0.04/0.3	0.02/0.2
		M001	0.04/0.3	0.03/0.3	0.02/0.2	0.02/0.2
	3	F002	0.10/0.7	0.06/0.5	0.12/0.6	0.06/0.4
		M002	0.04/0.3	0.02/0.3	0.04/0.4	0.04/0.4
	10	F003	0.05/0.5	0.02/0.3	0.02/0.3	0.02/0.2
		M003	0.03/0.3	0.02/0.2	0.01/0.2	0.02/0.3
	30	F004	0.03/0.2	0.01/0.3	0.01/0.2	0.01/0.1
		M004	0.06/0.4	0.03/0.3	0.02/0.3	0.05/0.9
RBC / (10 ¹² · L ⁻¹)	0	F001	5.50	4.71	5.22	5.58
		M001	5.67	5.02	5.30	5.72
	3	F002	6.47	5.02	5.13	5.46
		M002	6.12	5.39	6.02	6.26
	10	F003	6.08	6.61	5.15	5.33
		M003	6.75	4.44	5.41	6.05
	30	F004	5.38	6.15	4.77	5.30
		M004	5.91	5.27	3.95	4.71
HGB / (g · L ⁻¹)	0	F001	133	123	128	139
		M001	143	132	137	146
	3	F002	163	129	130	136
		M002	137	124	137	143
	10	F003	139	158	117	121
		M003	153	104	123	143
	30	F004	135	155	118	133
		M004	143	123	93	121

续表 3

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
HCT/%	0	F001	44.3	38.2	43.0	45.7
		M001	44.7	39.1	42.0	45.5
	3	F002	53.6	41.7	42.6	45.5
		M002	48.5	41.2	47.1	48.8
	10	F003	47.1	52.2	40.1	41.5
		M003	51.8	33.4	41.1	46.3
	30	F004	43.7	48.2	38.2	43.5
		M004	50.6	42.8	34.8	43.0
MCV/fL	0	F001	80.6	81.1	82.4	82.0
		M001	78.9	77.9	79.3	79.6
	3	F002	82.8	83.1	83.1	83.4
		M002	79.3	76.5	78.3	78.0
	10	F003	77.4	78.9	77.8	77.8
		M003	76.7	75.1	75.9	76.5
	30	F004	81.2	78.5	80.2	82.0
		M004	85.6	81.2	88.0	91.3
MCH/pg	0	F001	24.2	26.1	24.4	24.9
		M001	25.2	26.3	25.8	25.5
	3	F002	25.2	25.7	25.3	24.9
		M002	22.3	23.0	22.7	22.8
	10	F003	22.8	23.9	22.8	22.7
		M003	22.6	23.4	22.7	23.6
	30	F004	25.1	25.2	24.7	25.0
		M004	24.2	23.4	23.5	25.7
MCHC/ (g · L ⁻¹)	0	F001	300	322	296	304
		M001	320	338	325	321
	3	F002	304	310	305	298
		M002	282	300	290	292
	10	F003	294	303	293	292
		M003	295	312	300	308
	30	F004	309	321	308	305
		M004	282	288	267	281

续表 3

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
PLT/ (10 ⁹ · L ⁻¹)	0	F001	341	383	396	355
		M001	401	373	446	410
	3	F002	206	312	362	361
		M002	291	340	290	355
	10	F003	230	171	348	300
		M003	421	576	520	530
	30	F004	380	180	432	419
		M004	319	211	324	411
MPV/fL	0	F001	10.2	10.3	10.4	10.1
		M001	8.2	7.8	8.3	7.8
	3	F002	8.9	8.6	9.5	9.6
		M002	9.6	8.7	9.1	8.9
	10	F003	12.0	11.5	11.0	10.6
		M003	9.3	8.6	8.7	9.1
	30	F004	8.5	8.8	8.6	8.3
		M004	10.6	9.3	9.6	10.2
Retic/ (10 ¹² · L ⁻¹) 及百分比 /%	0	F001	0.069/1.2	0.060/1.3	0.074/1.4	0.090/1.6
		M001	0.052/0.9	0.063/1.3	0.083/1.6	0.091/1.6
	3	F002	0.023/0.4	0.037/0.7	0.088/1.7	0.058/1.1
		M002	0.075/1.2	0.073/1.4	0.161/2.7	0.104/1.7
	10	F003	0.049/0.8	0.126/1.9	0.106/2.1	0.119/2.2
		M003	0.069/1.0	0.059/1.3	0.152/2.8	0.127/2.1
	30	F004	0.070/1.3	0.080/1.3	0.172/3.6	0.119/2.2
		M004	0.091/1.5	0.020/3.8	0.469/11.9	0.295/6.3
PT/s	0	F001	8.5	8.7	8.3	8.4
		M001	8.6	9.4	8.7	8.6
	3	F002	8.8	9.0	8.4	8.5
		M002	8.8	9.1	8.7	8.9
	10	F003	9.3	9.3	9.1	9.4
		M003	8.4	9.9	8.5	8.4
	30	F004	9.0	10.8	9.2	9.0
		M004	9.3	11.5	9.3	9.9

续表 3

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
APTT/s	0	F001	19.1	17.9	17.1	15.1
		M001	18.6	19.2	18.5	17.5
	3	F002	20.2	19.5	17.6	17.5
		M002	16.3	17.6	16.5	17.2
	10	F003	20.2	20.8	19.0	17.7
		M003	17.8	19.4	17.1	16.6
	30	F004	18.5	22.4	18.0	17.6
		M004	21.9	24.9	19.3	19.6

血清生化和电解质检查结果。将各剂量组动物的各项指标测定结果分别与自身检疫期测定结果比较,并且与相同时期溶媒对照组动物测定结果比较。动物给予受试物后,3 mg · kg⁻¹剂量组各

项指标未见明显变化。10 mg · kg⁻¹和30 mg · kg⁻¹剂量组,动物(雄性M004)ALT、AST升高,且多数动物TBIL升高;其他指标未见明显变化趋势(见表4)。

表 4 重组抗 CD52 人源化单克隆抗体注射液单次给药毒性研究动物血清生化(含电解质)测定结果

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
ALT / (U · L ⁻¹)	0	F001	54	70	48	43
		M001	43	135	58	33
	3	F002	52	77	60	53
		M002	47	73	38	28
	10	F003	60	73	76	44
		M003	62	135	46	37
	30	F004	181	130	51	55
		M004	81	245	72	49
AST / (U · L ⁻¹)	0	F001	32	84	31	29
		M001	26	216	31	34
	3	F002	28	96	32	35
		M002	43	111	37	39
	10	F003	32	94	38	37
		M003	33	360	34	38
	30	F004	57	201	34	43
		M004	43	765	47	50

续表 4

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
ALP/ (U · L ⁻¹)	0	F001	159	146	146	174
		M001	328	241	230	237
	3	F002	227	178	183	187
		M002	459	440	486	461
	10	F003	244	208	204	238
		M003	392	472	484	550
	30	F004	194	171	165	164
		M004	682	520	498	547
CK/ (U · L ⁻¹)	0	F001	184	461	184	123
		M001	176	12819	153	134
	3	F002	269	1241	175	205
		M002	218	570	156	138
	10	F003	238	3874	147	161
		M003	176	4587	127	142
	30	F004	162	5328	158	246
		M004	525	760	303	262
GGT/ (U · L ⁻¹)	0	F001	30.67	29.69	30.20	33.43
		M001	85.52	59.85	56.76	57.65
	3	F002	43.25	41.64	41.39	41.80
		M002	74.94	87.10	85.53	86.89
	10	F003	62.54	55.81	56.20	58.21
		M003	60.05	72.69	59.30	67.92
	30	F004	58.45	64.98	51.12	52.38
		M004	98.79	102.68	67.88	76.67
LDH/ (U · L ⁻¹)	0	F001	380	717	389	362
		M001	371	1814	455	514
	3	F002	242	725	335	331
		M002	478	1145	551	505
	10	F003	398	1226	646	684
		M003	463	3247	613	460
	30	F004	481	2577	717	694
		M004	484	6510	1001	790

续表 4

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
TBIL/ (μ mol · L ⁻¹)	0	F001	3.23	3.91	2.83	2.79
		M001	3.28	5.58	3.63	3.82
	3	F002	3.04	3.97	3.20	3.38
		M002	2.80	4.10	3.38	3.14
	10	F003	2.95	5.80	3.79	3.36
		M003	4.14	28.24	4.78	4.84
	30	F004	4.12	28.58	3.92	3.87
		M004	2.84	23.41	4.88	4.36
BUN/ (mmol · L ⁻¹)	0	F001	6.5	5.8	6.5	5.8
		M001	5.4	7.9	7.5	8.0
	3	F002	6.3	5.6	7.1	5.5
		M002	5.4	4.5	4.9	5.3
	10	F003	6.2	6.1	7.0	6.9
		M003	6.2	6.0	6.2	7.2
	30	F004	6.9	7.8	6.8	7.7
		M004	7.8	6.9	5.9	5.9
CRE/ (μ mol · L ⁻¹)	0	F001	39	29	38	37
		M001	39	37	37	32
	3	F002	46	35	42	42
		M002	28	25	31	26
	10	F003	35	28	32	30
		M003	27	26	30	27
	30	F004	43	40	38	35
		M004	47	44	43	40
GLU/ (mmol · L ⁻¹)	0	F001	7.04	3.48	8.14	2.48
		M001	4.52	3.62	3.42	3.11
	3	F002	5.56	4.76	6.04	6.48
		M002	6.23	5.30	5.86	5.27
	10	F003	6.22	4.48	5.16	3.47
		M003	6.86	4.52	4.20	4.55
	30	F004	5.72	3.46	3.19	3.02
		M004	8.64	4.00	5.05	5.09

续表 4

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
CHO / (mmol · L ⁻¹)	0	F001	2.73	2.52	3.02	3.09
		M001	3.68	3.54	3.76	4.70
	3	F002	2.99	2.49	2.76	3.11
		M002	3.08	3.16	3.46	3.73
	10	F003	4.38	4.28	4.01	4.41
		M003	3.51	3.33	3.66	3.96
	30	F004	2.51	2.22	2.51	2.80
		M004	2.73	2.39	2.87	2.93
TG / (mmol · L ⁻¹)	0	F001	0.25	0.31	0.23	0.59
		M001	0.79	0.23	0.96	0.94
	3	F002	0.45	0.50	0.61	0.47
		M002	0.40	0.26	0.23	0.20
	10	F003	0.49	0.41	0.68	0.60
		M003	0.24	0.25	0.22	0.29
	30	F004	0.15	0.25	0.24	0.47
		M004	0.39	0.18	0.15	0.47
TP / (g · L ⁻¹)	0	F001	71.3	75.8	73.2	79.4
		M001	76.8	78.2	80.3	86.4
	3	F002	67.2	71.1	69.6	73.5
		M002	68.0	70.1	71.1	73.6
	10	F003	70.2	71.5	68.7	73.2
		M003	72.5	76.3	75.1	85.2
	30	F004	73.2	80.8	74.6	80.4
		M004	78.1	72.8	71.5	81.4
ALB / (g · L ⁻¹)	0	F001	40.8	42.0	40.8	43.6
		M001	53.0	53.9	56.5	57.4
	3	F002	41.2	41.7	42.2	44.3
		M002	44.6	46.3	48.3	47.0
	10	F003	45.2	45.6	46.0	46.5
		M003	48.9	49.3	49.9	52.7
	30	F004	44.4	46.6	47.5	48.2
		M004	50.0	44.7	47.7	51.0

续表 4

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
A/G	0	F001	1.34	1.24	1.26	1.22
		M001	2.23	2.22	2.37	1.98
	3	F002	1.58	1.42	1.54	1.52
		M002	1.91	1.95	2.12	1.77
	10	F003	1.81	1.76	2.03	1.74
		M003	2.07	1.83	1.98	1.62
	30	F004	1.54	1.36	1.75	1.50
		M004	1.78	1.59	2.00	1.68
IgA / (g · L ⁻¹)	0	F001	1.18	1.12	1.10	1.19
		M001	1.04	0.98	1.12	1.29
	3	F002	1.06	1.04	1.02	1.05
		M002	0.74	0.65	0.67	0.67
	10	F003	1.07	0.88	0.79	0.91
		M003	0.73	0.65	0.62	0.75
	30	F004	0.74	0.73	0.66	0.75
		M004	1.15	1.10	1.09	1.51
IgG / (g · L ⁻¹)	0	F001	9.35	9.92	9.92	10.59
		M001	5.91	5.30	5.89	6.43
	3	F002	7.96	8.37	8.24	8.53
		M002	5.89	6.00	6.27	6.49
	10	F003	5.93	5.98	5.61	6.08
		M003	6.28	6.78	6.68	8.34
	30	F004	10.39	10.53	9.27	10.04
		M004	8.70	7.24	7.15	8.59
IgM / (g · L ⁻¹)	0	F001	1.14	1.13	1.25	1.20
		M001	1.04	1.08	1.23	1.24
	3	F002	1.72	1.71	1.72	1.71
		M002	1.07	1.07	1.16	1.09
	10	F003	0.86	0.82	0.95	0.89
		M003	1.36	1.33	1.48	1.65
	30	F004	1.13	1.18	1.19	1.15
		M004	1.27	1.12	1.18	1.22

续表 4

指标	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
C3/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	F001	1.12	1.24	1.35	1.28
		M001	1.25	1.09	1.22	1.20
	3	F002	1.09	1.25	1.25	1.14
		M002	0.99	0.96	1.04	0.97
	10	F003	1.05	1.14	1.15	1.16
		M003	1.13	0.93	1.35	1.27
	30	F004	1.07	1.26	1.29	1.20
		M004	1.22	0.82	1.31	1.18
C4/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	F001	0.21	0.30	0.28	0.30
		M001	0.19	0.19	0.21	0.21
	3	F002	0.27	0.39	0.31	0.27
		M002	0.38	0.36	0.39	0.34
	10	F003	0.23	0.32	0.27	0.32
		M003	0.27	0.16	0.37	0.38
	30	F004	0.19	0.29	0.26	0.26
		M004	0.23	0.16	0.39	0.33
K^+ / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	F001	4.35	5.03	4.26	4.29
		M001	4.50	4.26	4.37	4.66
	3	F002	3.75	3.77	3.98	4.06
		M002	3.97	4.96	4.53	4.41
	10	F003	4.21	4.52	4.16	4.06
		M003	3.78	4.82	4.85	4.79
	30	F004	4.53	4.19	4.13	4.23
		M004	4.67	4.98	5.14	5.46
Na^+ / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	F001	149.4	147.7	146.0	147.6
		M001	148.7	147.3	149.3	148.0
	3	F002	147.8	149.2	148.8	149.6
		M002	151.6	149.4	151.6	149.1
	10	F003	149.8	150.4	148.5	147.1
		M003	150.8	152.4	150.9	150.5
	30	F004	148.7	149.1	149.7	148.1
		M004	155.2	149.8	153.8	153.2

续表 4

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 8 d	第 15 d
Cl ⁻ / (mmol · L ⁻¹)	0	F001	99.7	104.7	103.2	101.2
		M001	97.2	102.9	100.3	97.1
	3	F002	98.8	106.2	104.6	102.2
		M002	100.3	104.0	104.8	99.0
	10	F003	99.2	108.2	106.7	99.0
		M003	100.3	105.6	105.3	100.6
	30	F004	99.0	105.6	106.1	100.4
		M004	99.7	104.1	105.7	100.5

2.4 淋巴细胞测定

将各剂量组动物的各项指标测定结果分别与自身检疫期测定结果比较,并且与相同时期溶媒对照组动物测定结果比较。动物给予受试物以后,

3 mg · kg⁻¹剂量组外周血T细胞和B细胞水平未见明显变化; 10 mg · kg⁻¹和30 mg · kg⁻¹剂量组, CD3⁺T细胞、CD3⁺CD4⁺T细胞、CD3⁺CD8⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺比值均下降, B细胞水平无明显变化(见表5)。

表 5 重组抗 CD52 人源化单克隆抗体注射液单次给药毒性研究动物外周血淋巴细胞测定结果

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 6 d	第 8 d	第 15 d	第 21 d
CD3 ⁺ T 细胞 /%	0	F001	10.56	10.49	15.26	9.43	6.88	9.26
		M001	19.59	11.68	20.57	13.02	14.18	13.51
	3	F002	16.74	10.05	11.52	9.18	9.99	10.54
		M002	12.41	14.42	10.23	9.24	10.16	10.89
	10	F003	15.08	5.36	6.75	5.96	4.58	5.09
		M003	16.79	8.75	4.65	2.36	2.28	7.36
	30	F004	15.76	4.81	4.74	2.69	2.24	2.63
		M004	17.58	8.42	2.40	1.81	1.43	3.61
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 细胞 /%	0	F001	8.06	7.73	11.05	6.97	4.51	6.91
		M001	9.65	6.89	10.86	6.81	7.97	7.43
	3	F002	7.95	5.26	5.74	4.59	5.08	5.18
		M002	5.63	5.89	3.99	3.41	2.81	3.55
	10	F003	6.80	1.78	1.94	1.59	1.09	1.56
		M003	9.29	3.82	0.93	0.48	0.54	1.42
	30	F004	10.80	2.58	1.56	1.03	1.02	1.10
		M004	9.97	4.58	0.67	0.56	0.37	1.20

续表 5

指标	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物号	检疫期	第 2 d	第 6 d	第 8 d	第 15 d	第 21 d
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 细胞 /%	0	F001	2.50	2.76	4.21	2.46	2.37	2.35
		M001	9.94	4.79	9.71	6.21	6.21	6.08
	3	F002	8.79	4.79	5.78	4.59	4.91	5.36
		M002	6.78	8.53	6.24	5.83	7.35	7.34
	10	F003	8.28	3.58	4.81	4.37	3.49	3.53
		M003	7.50	4.93	3.72	1.88	1.74	5.94
	30	F004	4.96	2.23	3.18	1.66	1.22	1.53
		M004	7.61	3.84	1.73	1.25	1.06	2.41
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值	0	F001	3.22	2.80	2.62	2.84	1.90	2.94
		M001	0.97	1.44	1.12	1.10	1.28	1.22
	3	F002	0.90	1.10	0.99	1.00	1.03	0.97
		M002	0.83	0.69	0.64	0.59	0.38	0.48
	10	F003	0.82	0.50	0.40	0.36	0.31	0.44
		M003	1.24	0.77	0.25	0.26	0.31	0.24
	30	F004	2.18	1.16	0.49	0.62	0.83	0.72
		M004	1.31	1.19	0.39	0.45	0.35	0.50
CD3 ⁺ CD20 ⁺ B 细胞 /%	0	F001	1.72	5.19	2.64	5.88	3.59	4.80
		M001	7.99	8.35	6.73	5.10	8.07	6.91
	3	F002	18.12	16.81	14.14	15.67	23.31	19.97
		M002	6.98	6.91	6.33	8.13	9.05	7.45
	10	F003	18.33	13.85	12.51	16.80	21.37	19.95
		M003	8.05	7.32	3.92	3.87	7.35	9.09
	30	F004	10.00	10.88	7.30	8.66	7.17	7.55
		M004	12.80	12.57	4.01	4.84	9.08	7.80

2.5 大体病理学检查

对动物进行解剖检查, 未见与给予受试物相关的大体病理学改变。

3 讨论

3.1 红细胞CD52抗原阴性食蟹猴筛选方法

研究早期, 采用体外组织交叉反应实验筛选适宜的实验动物种属, 确定研究用相关动物为非人灵长类动物^[13-14]。该种属中大多数动物如狒狒、

恒河猴、食蟹猴, CD52抗原在淋巴细胞和红细胞表面都表达, 只有非常少数的食蟹猴红细胞表面不表达。研究中如果使用红细胞抗原阳性动物, 会发生严重的溶血反应干扰实验结果, 甚至引发动物的死亡。所以对CD52单抗开展安全性评价研究, 适宜的动物模型只有红细胞CD52抗原阴性食蟹猴^[15-16]。

本次研究, 首先建立特异性流式细胞术方法

筛选实验动物。使用荧光标记的CD52抗体和阴性对照抗体同时标记血液样本中的红细胞,分析标记细胞的几何平均荧光强度并计算比值,设定筛选临界值为5。当比值小于5时,判定样本为阴性。利用该方法筛出8只动物在本实验中使用。在文献^[16-18]报道的类似研究中,一些实验室采用红细胞凝集法筛选动物,通过显微镜下观察是否发生红细胞聚集区分阳性和阴性样本。本研究中,所有动物在给药后未见异常临床症状,血液学检查中未见红细胞数和凝血指标明显变化,说明动物体内没有发生溶血反应。本研究中建立的流式筛选方法,可以快速、准确地筛选出红细胞CD52抗原阴性实验动物,该方法适宜在CD52抗体相关研究中推广使用。

3.2 单次给药毒性试验研究的意义

试验结果显示,动物给予 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 受试物,体内各项指标未见明显变化。动物给予 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或者 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 受试物,出现WBC、Lymph明显下降,给药第15 d略有恢复;Mono短暂下降,给药第8 d恢复和改善;T细胞总数及分类细胞明显下降,给药第21 d略有恢复。以上变化与受试物强大而持久的免疫抑制药效作用相关^[19]。动物在给药后还出现TBIL升高、Retic升高和HGB下降,提示在长期毒性研究中需要关注这些指标的变化。并且,建议长毒试验的高剂量不宜设计过高数值,以避免动物出现死亡等不耐受情况。研究期间,实验人员需要做好临床观察和监测工作,当动物出现异常症状时应当及时采取护理和治疗措施。本研究也为受试物以后在临床使用时合理地开展安全监管工作提供了试验基础和数据支持^[20-21]。

4 结论

食蟹猴单次静脉注射3、10、30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 重组抗CD52人源化单克隆抗体注射液,动物在高剂量下未见异常临床症状和死亡,对受试物有良好的耐受性,所以本研究最大耐受量是 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。本研究中给药剂量以及与药物相关的毒性发现,可以为后续开展长期毒性研究提供参考。

参考文献:

[1] Xia MQ, Hale G, Lively MR, et al. Structure of the CAMPATH-1 Antigen, A Glycosylphosphatidylinositol-anchored Glycoprotein Which is An Exceptionally Good Target for Complement Lysis[J]. *Biochem J*, 1993, 293

(Pt 3): 633-640.

- [2] Kubota H, Okazaki H, Onuma M, et al. Identification and Gene Cloning of A New Phosphatidylinositol-linked Antigen Expressed on Mature Lymphocytes. Down-regulation by Lymphocyte Activation[J]. *J Immunol*, 1990, 145 (11): 3924-3931.
- [3] Hale G. The CD52 Antigen and Development of the CAMPATH Antibodies[J]. *Cytotherapy*, 2001, 3 (3): 137-143.
- [4] Golay J, Manganini M, Rambaldi A, et al. Effect of Alemtuzumab on Neoplastic B Cells[J]. *Haematologica*, 2004, 89 (12): 1476-1483.
- [5] Zent CS, Secreto CR, Laplant BR, et al. Direct and Complement Dependent Cytotoxicity in CLL Cells from Patients with High-risk Early-intermediate Stage Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Treated with Alemtuzumab and Rituximab[J]. *Leuk Res*, 2008, 32 (12): 1849-1856.
- [6] Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al. Alemtuzumab Compared with Chlorambucil as First-line Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25 (35): 5616-5623.
- [7] Cohen Y, Nagler A. Treatment of Refractory Autoimmune Diseases with Ablative Immunotherapy[J]. *Autoimmun Rev*, 2004, 3 (2): 21-29.
- [8] Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, et al. Regulatory T Cells and T Cell Depletion: Role of Immunosuppressive Drugs[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18 (3): 1007-1018.
- [9] Li Z, Richards S, Surks HK, et al. Clinical Pharmacology of Alemtuzumab, An Anti-CD52 Immunomodulator, in Multiple Sclerosis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 194 (3): 295-314.
- [10] Betjes MGH, Kho MML, Litjens NHR, et al. Alemtuzumab as Second-Line Treatment for Late Antibody-Mediated Rejection of Transplanted Kidneys[J]. *Transplant Proc*, 2021, 53 (7): 2206-2211.
- [11] Enblad G, Hagberg H, Erlanson M, et al. A Pilot Study of Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) Therapy for Patients with Relapsed or Chemotherapy-refractory Peripheral T-cell Lymphomas[J]. *Blood*, 2004, 103 (8): 2920-2924.

- [12] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 药物单次给药毒性研究技术指导原则 [EB/OL]. (2014-05-13) [2022-06-11]. <https://www.cde.org.cn/zdzy/domesticinfopage?zdzyIdCODE=0c935796de664b377759b4dcb6a2634e>.
- [13] Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, et al. Use of Tissue Cross-reactivity Studies in the Development of Antibody-based Biopharmaceuticals: History, Experience, Methodology, and Future Directions[J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38 (7) : 1138-1166.
- [14] Bussiere JL, Leach MW, Price KD, et al. Survey Results on the Use of the Tissue Cross-reactivity Immunohistochemistry Assay[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011, 59 (3) : 493-502.
- [15] Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, et al. Relevance, Advantages and Limitations of Animal Models Used in the Development of Monoclonal Antibodies for Cancer Treatment[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62 (1) : 34-42.
- [16] Wang Y, Zheng C, Zhuang C, et al. Preclinical Pharmacology and Toxicology Evaluation of An Anti-CD52 Monoclonal Antibody Produced by Perfusion Fermentation Process[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2021, 48 (9-10) .
- [17] Degiorgi L, Brent L, Linch D, et al. The Inheritance of A Macaca Fascicularis Red Cell Antigen Detected by CAMPATH-1 Antibody[J]. *Immunol Lett*, 1987, 15 (2) : 101-103.
- [18] Vanderwindt DJ, Smetanka C, Macedo C, et al. Investigation of Lymphocyte Depletion and Repopulation Using Alemtuzumab (Campath-1H) in Cynomolgus Monkeys[J]. *Am J Transplant*, 2010, 10 (4) : 773-783.
- [19] Shan T, Qu L, Zhang J, et al. Lymphocyte Depletion and Repopulation in Peripheral Blood and Small Intestine of Cynomolgus Monkeys after Alemtuzumab Treatment[J]. *J Surg Res*, 2011, 167 (1) : e21-27.
- [20] Zhang H, Deng M, Pei F, et al. Next-generation Antibody Therapeutics: Discovery, Development and Beyond: Highlights of the Third Annual Conference of the Chinese Antibody Society[J]. *Antib Ther*, 2019, 2 (4) : 99-107.
- [21] Hutchings C J. Mini-review: Antibody Therapeutics Targeting G Protein-coupled Receptors and Ion Channels [J]. *Antib Ther*, 2020, 3 (4) : 257-264.

(收稿日期 2022年3月7日 编辑 郑丽娥)