

酶联免疫吸附试验法研究 PEG-rhG-CSF 与 rHSA-hG-CSF 在小鼠体内的药代动力学

马国昌^{1,2}, 陈枢青^{*}, 朱振洪², 黄岩山³, 潘会强², 周金宝²

(1. 浙江大学 药学院, 浙江 杭州 310031; 2. 杭州九源基因工程有限公司, 浙江 杭州 310018
3. 浙江大学 医学院, 浙江 杭州 310031)

摘要: 研究重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF)、聚乙二醇修饰的重组人粒细胞集落刺激因子 (PEG-rhG-CSF) 与重组人血清白蛋白-粒细胞集落刺激因子融合蛋白 (rHSA-hG-CSF) 在小鼠体内的药代动力学, 验证两种方法对 rhG-CSF 半衰期 ($T_{1/2}$) 的影响。小鼠分别皮下给药 rhG-CSF, PEG-rhG-CSF 与 rHSA-hG-CSF 后, 在不同时间点采血并分离血清, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验法测定血清中 rhG-CSF 的浓度, 用 3P87 药动学软件进行曲线拟合并计算参数。结果显示, rhG-CSF, PEG-rhG-CSF 与 rHSA-hG-CSF 的半衰期 ($T_{1/2}$) 分别为 2.1, 14.2 和 10.6 h, 后两者半衰期分别为 rhG-CSF 的 7 倍、5 倍; PEG-rhG-CSF 和 rHSA-hG-CSF 的达峰时间 T_{peak} 分别为 rhG-CSF 的 15 倍、13 倍。通过 ELISA 法检测比较 rhG-CSF, PEG-rhG-CSF 与 rHSA-hG-CSF 在小鼠体内的药代动力学, 表明 PEG 修饰与白蛋白融合技术可以延长 rhG-CSF 的半衰期。

关键词: 人粒细胞集落刺激因子; 聚乙二醇; 白蛋白; 药代动力学; ELISA

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)02-0197-04

Pharmacokinetics of PEG-rhG-CSF and rHSA-hG-CSF in mice determined with ELISA

MA Guo-chang^{1,2}, CHEN Shu-qing^{*}, ZHU Zhen-hong², HUANG Yan-shan³,
PAN Hui-qiang², ZHOU Jin-bao²

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co., Ltd, Hangzhou 310018, China; 3. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract Double antibody sandwich-type ELISA was used to detect rhG-CSF in serum to study the pharmacokinetics of rhG-CSF, PEG-rhG-CSF and rHSA-hG-CSF in mice and to confirm that PEGylation and albumin fusion of rhG-CSF technology can prolong half-life of G-CSF. Pharmacokinetic parameters were calculated with 3P87 software. $T_{1/2}$ s of rhG-CSF, PEG-rhG-CSF and rHSA-hG-CSF are 2.1, 14.2 and 10.6 h respectively. $T_{1/2}$ s of PEG-rhG-CSF and rHSA-hG-CSF are 7, 5 times than $T_{1/2}$ s of rhG-CSF, respectively. T_{peak} s of PEG-rhG-CSF and rHSA-hG-CSF are 15, 13 times than T_{peak} of rhG-CSF, respectively. The result of ELISA indicates that PEGylation and albumin fusion of rhG-CSF technology can prolong half-life of G-CSF.

Key words G-CSF; PEG; albumin; pharmacokinetics; ELISA

重组人粒细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF) 是刺激骨髓细胞集落形成的集落刺激因子之一, 能特

异性地刺激和调节粒细胞系统的增殖、分化、存活和活化, 主要用于治疗各种原因引起的中性粒细胞减少症^[1]。但是 rhG-CSF 的临床应用存在体内半衰期短, 易被酶水解和肾脏清除, 需要多次注射的问题。目前延长蛋白药物半衰期的方法主要有两种: 一是采用聚乙二醇 (PEG) 修饰, 另一是采用白蛋白融合。

收稿日期: 2006-06-13

* 通讯作者 Tel: 86-571-86879133

E-mail: mgc777@163.com

聚乙二醇修饰是用聚乙二醇共价修饰蛋白质、多肽等生物分子的过程^[2]。聚乙二醇具有良好的生物相容性、无毒性和无抗原性等优点,修饰后的蛋白和多肽类药物的药代动力学和药效学性质得到改善。这主要是因为 PEG 在蛋白质表面具有遮蔽作用挡住表面的抗原决定簇^[3],降低免疫原性,能保护蛋白不易被蛋白酶降解^[4],稳定性提高,并且蛋白质被修饰后相对分子质量大大提高,不易被肾小球过滤,因此经修饰的蛋白质循环半衰期均有不同程度的提高等^[5]。目前,PEG 修饰技术多用于长效药物的开发。

人血清白蛋白(HSA)本身是许多内源因子和外源药物的载体,药物和血清白蛋白结合后,可以在减少其生物利用度的同时增加其在体内的半衰期^[6-9]。这是由于 HSA 本身是一种大分子蛋白,不易被肾小球滤过,并可抵御生物体内酶的作用,它还是一个稳定的“惰性”蛋白,因而蛋白药物与其融合后可以提高药物的稳定性,延长蛋白药物在体内的半衰期。另外 HSA 的表达水平较高^[10],与其融合后可以提高目的蛋白药物的表达水平。

酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)特异性强、灵敏度高,广泛用于蛋白和多肽类生物制品的药代动力学研究^[11,12]。本实验用双抗体夹心 ELISA 法测定血清中的吉粒芬(重组人集落刺激因子, rhG-CSF), PEG-rhG-CSF, HSA-hG-CSF 的血药浓度,对比它们在小鼠体内的药代动力学行为,证明 PEG 修饰与 HSA 融合技术能延长 rhG-CSF 的半衰期,同时为临床用药提供依据。

材料和方法

药品与试剂 PEG-rhG-CSF, HSA-hG-CSF, 吉粒芬(rhG-CSF)由杭州九源基因工程有限公司提供, 4℃保存。PEG-rhG-CSF($M_r = 40\ 700$)与 HSA-hG-CSF($M_r = 85\ 800$)的质谱图见图 1(B 图中另一个峰为内标物)。Human G-CSF DuoSet 试剂盒, 购自美国 R&D 公司。

仪器 Model 450 型酶标仪(美国 Bio-RAD 公司); 96 孔酶标可拆式板条(美国 Coming 公司); 2-16K 型台式离心机(美国 Sigma 公司)。

实验动物 雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 18~ 22 g 由中国科学院上海动物试验中心提供。

给药及采血方法 采集每个时间点 3 只动物的血样见表 1, 再将血样离心 30 min 后分离血清, -20℃保存待测。

Table 1 Method of administration (sc) and sampling

| Sample | n | Dosage /mg• kg ⁻¹ | Sampling time |
|-------------|----|------------------------------|--|
| PEG-rhG-CSF | 39 | 1 | 0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h |
| HSA-hG-CSF | 39 | 5 | 0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h |
| rhG-CSF | 30 | 1 | 0, 5 min, 15 min, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h |

双抗体夹心 ELISA 法检测样品 具体操作参见 Human G-CSF DuoSet 试剂盒的操作手册。

数据处理及药代参数计算 得到标准品的数据用 MicroCal Origin 软件中的四参数逻辑曲线绘制标

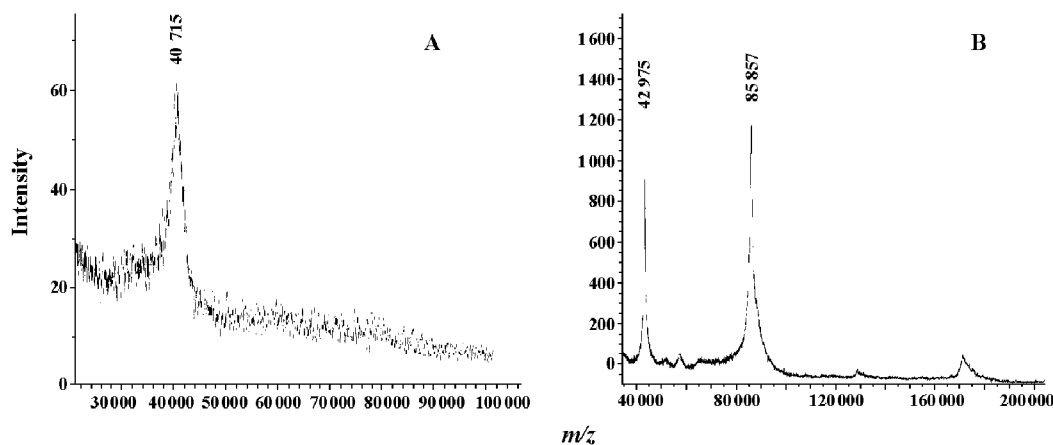


Figure 1 Mass spectrum of PEG-rhG-CSF and HSA-hG-CSF. A: PEG-rhG-CSF ($M_r = 40\ 700$); B: HSA-hG-CSF ($M_r = 85\ 800$)

准曲线, 并求回归方程及相关统计参数; 用 Microsoft Excel 2003 软件将样品数据代入标准曲线的回归方程计算相关数值并作图; 最后用 3P87 软件进行曲线拟合并计算主要药代动力学参数。

结果

1 测定方法的考察

1.1 方法的灵敏度 用 Human G-CSF DuoSet 试剂盒的检测方法检测血清中 rhG-CSF, 最低检测灵敏度为 $30 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用 MicroCal Origin 软件, 四参数逻辑曲线 (4-PL curve-fit) 求回归方程。 $Y = (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^p] + A_2$, $A_1 = 0.11789$, $A_2 = 2.095$, $X_0 = 3360.1$, $P = 0.91329$, $R^2 = 0.9995$ 。

1.2 方法的特异性 对正常小鼠血清中加入一些潜在的干扰因素观察本法检测 rhG-CSF 的特异性。在小鼠血清中不加 rhG-CSF, 而只加 IL-11, PEG, 小牛血清或不加任何物质的空白小鼠血清, 它们在波长为 450 nm 处的吸收值 (A_{450}) 为 0.2 左右, 这个值可能是血清内源性因素导致的本底吸收, 可认为无 rhG-CSF 的免疫反应; 当加 IL-11, PEG, 小牛血清, 再分别加 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ rhG-CSF 并不影响 rhG-CSF 的相对吸收值, 与单独 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ rhG-CSF 的吸收值基本一致 (图 2), 说明本方法具有很高的特异性。

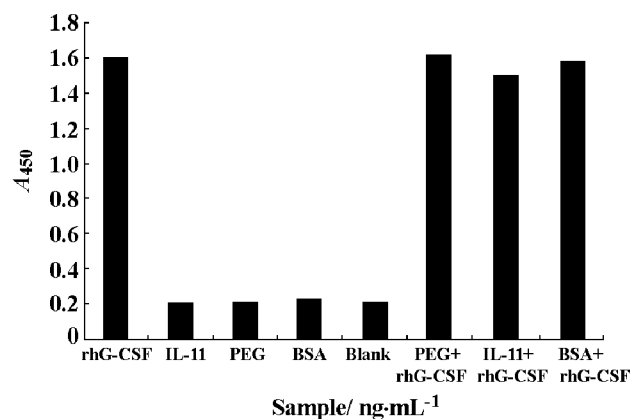


Figure 2 Effect of adding potential interfering substances to serum with or without rhG-CSF was assessed by ELISA

2 小鼠的药代动力学研究

小鼠皮下给予 rhG-CSF, PEG-rhG-CSF, HSA-hG-CSF 后的血药浓度-时间数据输入 3P87 软件进行, 得主要药代动力学参数 (表 2), PEG-rhG-CSF, HSA-hG-CSF 与 rhG-CSF 在小鼠体内的血药浓度-时间曲线比较见图 3。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of rhG-CSF, PEG-rhG-CSF and HSA-hG-CSF after sc administration to mice

| Parameter | rhG-CSF | PEG-rhG-CSF | HSA-hG-CSF |
|---|----------|-------------|------------|
| Lag time/h | 0.035 | 1.503 | 2.729 |
| $T_{1/2}$ /h | 2.143 | 14.298 | 10.609 |
| T_{peak} /h | 1.388 | 20.698 | 17.628 |
| C_{max} /ng·mL ⁻¹ | 1854.623 | 2739.169 | 2711.069 |
| AUC /ng·h·mL ⁻¹ | 8881.870 | 143280.000 | 109833.12 |
| CL /l(s) (L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹) | 0.113 | 0.007 | 0.015 |
| V /l(c) (L·kg ⁻¹) | 0.349 | 0.144 | 0.296 |

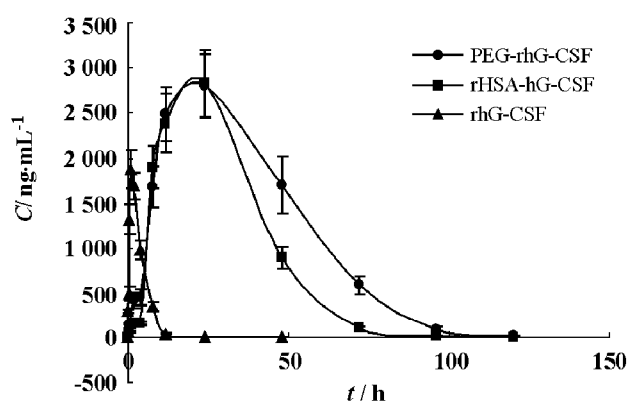


Figure 3 Concentration-time curve of PEG-rhG-CSF, HSA-hG-CSF and rhG-CSF after sc administration to mice

讨论

对于用 ELISA 法研究血清中药物的药代动力学, 本文首先考察了此方法对所研究药物的灵敏性, 用 Human G-CSF DuoSet 试剂盒检测 rhG-CSF 有很高的灵敏度, 最低可检测到 $30 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。其次验证了此方法的特异性, 从图 2 中可证实这个方法有高度的特异性, 能抗血清、血清中的细胞因子及其他物质对所研究药物的干扰。

本实验用同一条标准曲线来研究 PEG-rhG-CSF, HSA-hG-CSF 和 rhG-CSF 的药代动力学, 可能会由于 HSA 融合或 PEG 修饰的影响, 而使最终结果存在误差。但由于 ELISA 法本身在检测上就有较大的误差; 另外本实验目的是为得到药物的半衰期、清除率等药代参数, 这些参数都是同一药物的数值间相对比较产生的, 因而虽然 HSA 融合或 PEG 修饰的影响会导致数据整体偏大或偏小, 但通过数据间相对比较后会抵消原有的偏差而不影响半衰期和清除率等药代参数。本实验药代参数与国外相关研究^[12]得到的参数基本一致。

从表 2 中可看到: PEG-rhG-CSF 和 HSA-hG-

CSF的半衰期 ($T_{1/2}$)分别为 rhG-CSF的 7倍和 5倍; PEG-rhG-CSF和 HSA-hG-CSF的 T_{peak} 值分别为 rhG-CSF的 15倍和 13倍; PEG-rhG-CSF和 HSA-hG-CSF的 AUC值分别是 rhG-CSF的 16倍和 13倍; PEG-rhG-CSF和 HSA-hG-CSF的 Lag time值分别为 rhG-CSF的 43倍和 77倍; PEG-rhG-CSF和 HSA-hG-CSF的清除率 CL值分别为 rhG-CSF的 1/16和 1/8。从图 3可直观看出来, PEG-rhG-CSF和 HSA-hG-CSF的达峰时间明显大于 rhG-CSF,并且 70 h后在血液中可以检测到 rhG-CSF的血药浓度,血药浓度的波动显著减少。从上述药代参数对比来看, PEG修饰与白蛋白融合技术确实可以延长 G-CSF的半衰期,从而达到长效的目的。

从图 3还可以看到, PEG-rhG-CSF和 HSA-hG-CSF的曲线前半段与峰高几乎一样,后半段 PEG-rhG-CSF的清除率小于 HSA-hG-CSF,并且表 2中 PEG-rhG-CSF和 HSA-hG-CSF的 C_{max} 值几乎一样,而半衰期 ($T_{1/2}$)又大于 HSA-hG-CSF。从此可推测对于 rhG-CSF来说 PEG修饰带来的长效性可能好于 HSA融合。

通过 ELISA法检测表明, PEG修饰与 HSA融合技术可以延长 rhG-CSF的半衰期,得到长效的 rhG-CSF,这样不但可以减少 rhG-CSF的用药次数,提高病人的顺应性,而且还可以减少血药浓度的波动,减少不良反应,从而可能会带来广阔的市场前景。

References

[1] Hsieng SL, Christi LC, Linda ON, et al. Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *E. coli* [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 8770-8779.

[2] Abuchowski A, Van ET, Palczuk NC, et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of poly(ethylene glycol) [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252: 3578-3581.

[3] Lee GK. PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92: 24-34.

[4] Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 1451-1458.

[5] Richard BG, Greenwald Yun HC, et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 217-250.

[6] Petes TP. All About Albumin [M]. San Diego Academic Press, 1996.

[7] Wu J, Chang SH, Gong X, et al. Serum albumin and granulocyte colony stimulating factor fusion protein: CN, 01124114.4 [P]. 2003-03-26.

[8] Rosen CA, Haseltine WA, et al. Albumin fusion protein US, 6994857 [P]. 2006-02-07.

[9] Flier R, Fournier A, Guillon JD, et al. G-CSF and albumin fusion protein US, 7041478 [P]. 2006-05-09.

[10] Chuang VT, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin [J]. *Pharm Res*, 2002, 19: 569-577.

[11] Ju Y, Lu L, Wu YJ, et al. Pharmacokinetic study of novel recombinant human tumor necrosis factor- α (rhTNF- α) in mice using ELISA [J]. *Chin Pharm Bull (中国药理学通报)*, 2005, 21: 847-851.

[12] Halpern W, Riccobene TA, Agostini H, et al. AlbumgraninTM, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys [J]. *Pharm Res*, 2002, 19: 1720-1729.