

^{125}I -白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 大鼠体内排泄研究

张波^{1,2}, 张荣军^{1,2,*}, 蔡刚明^{1,2}, 顾晓波^{1,2}, 蒋孟军^{1,2},
杨健良³, 周尧远^{1,2}, 杨敏^{1,2}

(1. 卫生部核医学重点实验室, 江苏 无锡 214063; 2. 江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063;
3. 上海我武生物科技有限公司, 上海 200233)

摘要:为研究 ^{125}I -白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 大鼠体内排泄行为, 利用氯胺-T 法制备了 ^{125}I -白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$, 其标记率为 82.72%, 纯化纯度为 95.53%, 放射性比活度为 0.26 MBq/ μg 。体外 WISH/VSV 系统抗病毒活性比较分析表明, 白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 和 ^{125}I -白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 具有相近的抗病毒活性。SD 大鼠皮下注射 ^{125}I -白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 后, 0~6、6~12、12~24、24~48、48~96、96~192 和 192~300 h 7 个不同时段的尿、粪的放射性分析结果表明, ^{125}I -白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 主要通过肾脏排泄, 部分可通过粪便排泄, 300 h 时尿、粪中平均累积排泄率分别为 80.10% 和 16.00%; 0~1、1~2、2~4、4~6、6~12、12~24 和 24~30 h 7 个不同时段的胆汁的放射性分析结果表明, ^{125}I -白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 也可通过肝脏代谢后经胆汁排泄, 但这不是它的主要排泄途径, 30 h 时, 胆汁中的平均累积排泄率仅为 1.61%。

关键词:白蛋白融合干扰素 $\alpha 2\text{b}$; ^{125}I ; 排泄

中图分类号: R817.1; R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-6931(2010)02-0171-04

Excretion of ^{125}I -HSA-IFN $\alpha 2\text{b}$ Fusion Protein in Rats

ZHANG Bo^{1,2}, ZHANG Rong-jun^{1,2,*}, CAI Gang-ming^{1,2}, GU Xiao-bo^{1,2},
JIANG Meng-jun^{1,2}, YANG Jian-liang³, ZHOU Yao-yuan^{1,2}, YANG Min^{1,2}

(1. Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Wuxi 214063, China;

2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China;

3. Wolvo Biological Technology Co., Ltd, Shanghai 200233, China)

Abstract: ^{125}I -HSA-IFN $\alpha 2\text{b}$ was prepared with Ch-T method. The labeling yield is 82.72%, the radiochemical purity is 95.53%, and the specific activity is 0.26 MBq/ μg . The antiviral activities of ^{125}I -HSA-IFN $\alpha 2\text{b}$ are almost same as HSA-IFN $\alpha 2\text{b}$ analyzed with WISH/VSV system *in vitro*. After SD rats injected with ^{125}I -HSA-IFN $\alpha 2\text{b}$ subcutaneously, the radioactivity in urine and faeces in seven different periods of 0-6, 6-12, 12-24, 24-48, 48-96, 96-192 and 192-300 h shows that ^{125}I -HSA-IFN $\alpha 2\text{b}$ is excreted

收稿日期: 2009-02-10; 修回日期: 2009-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30670589); 卫生部科研基金资助项目(wkj2006-2-5); 江苏省“六大人才高峰”计划 B 类资助项目(06-B-026); 江苏省医学重点人才项目(RC2007097)

作者简介: 张波(1980—), 男, 江苏无锡人, 研究实习员, 有机化学专业

* 通信作者: 张荣军, 男, 副研究员, E-mail: zrhj@yahoo.com, 电话: 0510-85514482-3525

mainly by kidneys, partly by diachorema, and average accumulation excretory rates of 300 h in urine and feces are 80.10% and 16.00%, respectively; the radioactivity in bile in seven periods of 0-1, 1-2, 2-4, 4-6, 6-12, 12-24 and 24-30 h shows that ^{125}I -HSA-IFN α 2b also can be excreted by bile after being metabolized by liver, and average accumulation excretory rate of 30 h in bile is only 1.61%.

Key words: HSA-IFN α 2b; ^{125}I ; excretion

人血清白蛋白融合干扰素(HSA-IFN α)是一种新型长效干扰素,可有效克服普通干扰素的缺点,从而有利于慢性乙型肝炎和丙型肝炎的治疗^[1-4];它是将人白蛋白(HSA)基因与人干扰素基因进行融合,并与表达载体连接后应用基因工程技术来生产,首先由美国 HGS 公司研制成功,我方合作单位上海我武生物科技有限公司也已成功制备了此种长效干扰素——白蛋白融合干扰素 α 2b(HSA-IFN α 2b)。为研究其体内代谢和排泄行为,本工作拟制备 ^{125}I -HSA-IFN α 2b,进行大鼠体内排泄的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

HSA-IFN α 2b、人羊膜细胞(WISH)、水泡性口炎病毒(VSV)由上海我武生物科技有限公司提供,BSA、SRB 为 Aldrich-Sigma 公司产品,小牛血清为杭州四季青生物公司产品,RPMI-1640培养基为 GIBICOL 产品,PD-10 柱为 GE Healthcare 产品,Na ^{125}I 为四川中核高通同位素股份有限公司产品,氯胺-T、偏焦亚硫酸钠、三氯醋酸等均为国产分析纯。

SD 大鼠由扬州大学比较医学中心提供,江苏省实验动物合格证号为 SCXK(苏)2002-0009,江苏省实验动物使用许可证为 SYXK(苏)2002-0025。

所用仪器为 γ 计数器(PACKARD C5002)、离心机(上海手术器械厂 80-2 型)、组织天平(Sartorius CP2445)、动物天平(上海大和衡器有限公司)、倒置显微镜(OLYMPUS IX 51)、酶标仪(BIO-RAD MODEL 3550)。

1.2 ^{125}I -HSA-IFN α 2b 制备^[5]

采用 0.2 mol/L、pH=8.0 的磷酸缓冲溶液(PB)将 HSA-IFN α 2b 配制成为 4 g/L 的溶液,取 10 μL 加入标记管中,采用氯胺-T 法制备 ^{125}I -HSA-IFN α 2b,采用 PD-10 柱纯化,用含

0.2% BSA 的 50 mmol/L PBS、pH=7.4 的 BPBS 缓冲液洗脱,分管收集,每管 0.5 mL,共收 30 管,分别取 2 μL 加入塑料测量管中用 γ 计数器测量其计数率(min^{-1})。

1.3 放化纯度测定

在上述测量的蛋白峰管中,分别加入 750 μL BPBS 缓冲液,混匀,再加入 750 μL 10% TCA(三氯醋酸)溶液,混匀,于 4 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用 γ 计数器测量沉淀计数,将沉淀计数除以总计数算得其放化纯度。取放化纯度最高的 1 管用 BPBS 缓冲液适当稀释后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置冰箱备用。

1.4 ^{125}I -HSA-IFN α 2b 的抗病毒活性分析

体外用人羊膜细胞(WISH)/水泡性口炎病毒(VSV)系统比较 HSA-IFN α 2b 和 ^{125}I -HSA-IFN α 2b 的抗病毒活性,参照文献[6]的方法进行。

1.5 ^{125}I -HSA-IFN α 2b 大鼠尿液和粪便的排泄试验

取 12 只大鼠,雌雄各半,每个代谢笼 2 只大鼠,按 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{125}I -HSA-IFN α 2b 皮下注射给药,分别于给药后 0~6、6~12、12~24、24~48、48~96、96~192 和 192~300 h 共 7 个时段收集尿液和粪便,测定各时段尿液总体积,取 1 mL 尿样,测定 γ 放射性计数;将粪便分别称重后,取全部,测定 γ 放射性计数。

1.6 ^{125}I -HSA-IFN α 2b 大鼠体内胆汁的排泄试验

取 6 只大鼠,用巴比妥麻醉后,进行胆管插管术,按 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{125}I -HSA-IFN α 2b 皮下注射给药,分别于给药后 0~1、1~2、2~4、4~6、6~12、12~24 和 24~30 h 共 7 个时段分段收集胆汁,测定 7 个时段胆汁体积和 γ 放射性计数。

2 结果

2.1 ^{125}I -HSA-IFN α 2b 的特性

^{125}I -HSA-IFN α 2b 标记物经 PD-10 柱纯化

后其结果示于图 1, 标记率为 82.72%, 纯化纯度为 95.53%, 比活度为 0.26 MBq/ μ g。

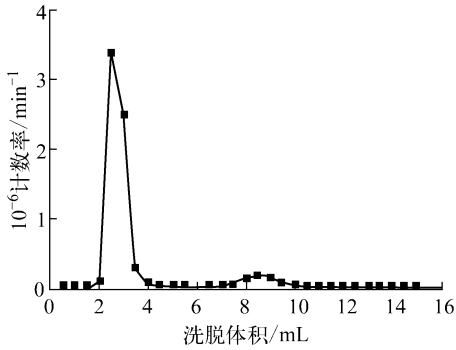


图 1 ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ PD-10 纯化分离
Fig. 1 Purification of ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ with PD-10 column

2.2 ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 的活性分析^[6]

体外抗病毒活性分析结果显示：¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 与未标记的 HSA-IFN $\alpha 2b$ 在相同的浓度下具有相似的曲线, 表明¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 与 HSA-IFN $\alpha 2b$ 具有相近的抗病毒活性, ¹²⁵I 标记对 HSA-IFN $\alpha 2b$ 的活性影响不大。

2.3 ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 的大鼠体内排泄研究

1) 尿排泄

¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 大鼠尿排泄的测量结果示于图 2。由图 2 可见, 大鼠 300 h 时尿中平均累积排泄率为 80.10%, 说明¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ (包括代谢产物) 主要通过肾脏排泄。

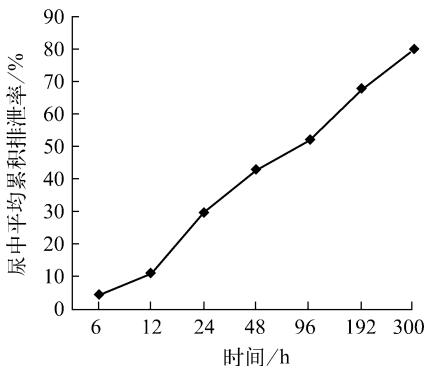


图 2 ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 大鼠尿中平均累积排泄率
Fig. 2 Average accumulation excretory rate of ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ in urine

2) 粪便排泄

¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 大鼠粪便排泄的测量结

果示于图 3。由图 3 可见, 大鼠 300 h 时粪便中平均累积排泄率为 16.00%, 说明¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ (包括代谢产物) 部分可通过粪便排泄。

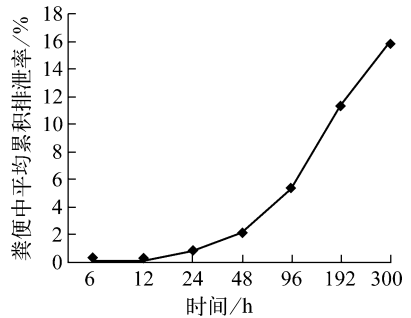


图 3 ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 大鼠粪便中平均累积排泄率
Fig. 3 Average accumulation excretory rate of ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ in feces

3) 胆汁排泄

¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 大鼠胆汁排泄的测量结果示于图 4。由图 4 可见, 大鼠 30 h 时胆汁中平均累积排泄率为 1.61%, 说明¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 可少量通过肝脏代谢后经胆汁排泄, 但这不是该药的主要排泄途径。

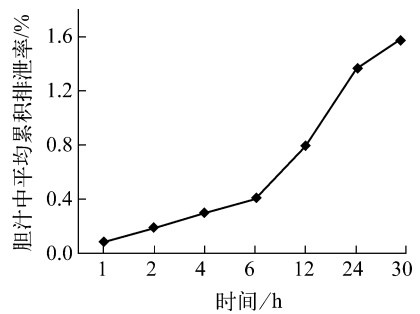


图 4 ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ 大鼠胆汁中平均累积排泄率
Fig. 4 Average accumulation excretory rate of ¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$ in bile

3 讨论

HSA-IFN $\alpha 2b$ 既有 IFN 的抗病毒活性又有 HSA 的长半衰期的特点, 是一种长效干扰素。上海我武生物科技有限公司采用基因重组技术, 已成功研制了此种长效干扰素。为研究其体内代谢情况, 本工作制备了¹²⁵I-HSA-IFN $\alpha 2b$, 并进行了溶液回收试验、血清回收试验和组织回收试验。3 项回收试验结果表明,

回收率均约为 100%，符合方法学考核要求。同时，还进行了¹²⁵I-HSA-IFN α 2b 的溶液干扰、血清样品干扰和组织样品干扰的研究，结果表明：溶液、血清和组织样品对测定均无干扰，可直接测定，说明采用¹²⁵I-HSA-IFN α 2b 放射性核素示踪法进行 HSA-IFN α 2b 的代谢研究是可行的^[6]。

本实验并未通过测定血中 HSA-IFN α 2b 原形药物来确定该药物在大鼠中的血液动力学参数，原因是蛋白多肽类药物在体内的代谢是一复杂的连续过程，且 HSA-IFN α 2b 的有些降解产物在体内仍具有生物学活性，有些降解产物的活性比 HSA-IFN α 2b 原形药还要高，因此，简单地用测定血中原形药物的方法往往并不能真实反映药物在体内的药代动力学和药效学全貌。另外，从各组织器官中将同位素标记的 HSA-IFN α 2b 原形药物与其代谢后的降解产物进行区分也存在很大的困难，在方法学上也很难获得令人信服的论证。因此，采用同位素示踪法研究蛋白多肽类药物的药代动力学可不需进行原形药物分离和测定。

¹²⁵I-HSA-IFN α 2b 大鼠体内的排泄研究结果表明，该药主要通过肾脏排泄，300 h 时尿中平均累积排泄率为 80.10%；部分可通过粪便排泄，300 h 时粪便中平均累积排泄率为 16.00%；也可通过肝脏代谢后经胆汁排泄，但这不是它的主要排泄途径，30 h 时胆汁中平均累积排泄率仅为 1.61%。

4 结论

HSA-IFN α 2b 是一种较好的长效干扰素，

主要通过肾脏排泄。

参考文献：

- [1] KOZLOWSKI A, HARRIS J M. Improvements in protein PEGylation; Pegylated interferons for treatment of hepatitis C[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 72(1-3): 217-224.
- [2] RAMON J, SAEZ V, BAEZ R, et al. PEGylated interferon-alpha2b: A branched 40K polyethylene glycol derivative[J]. *Pharm Res*, 2005, 22(8): 1 374-1 386.
- [3] MAGER D E, NEUTEBOOM B, JUSKO W J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEGylated IFN-beta 1a following subcutaneous administration in monkeys[J]. *Pharm Res*, 2005, 22(1): 58-61.
- [4] SUNG C, NARDELLI B, LaFLEUR D W, et al. An IFN-beta-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2003, 23(1): 25-36.
- [5] HUNTER W M, GREENWOOD F C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity[J]. *Nature*, 1962, 194: 495-496.
- [6] 顾晓波, 张荣军, 杨健良, 等. 同位素法体内示踪 HSA-IFN α 2b 的方法学研究[J]. *同位素*, 2008, 21(4): 220-225.
GU Xiaobo, ZHANG Rongjun, YANG Jianliang, et al. Methodology study on isotopic tracing HSA-IFN-alpha2b[J]. *Journal of Isotopes*, 2008, 21(4): 220-225(in Chinese).