

聚乙二醇化重组人生长激素在大鼠体内的药代动力学研究

姜 凌*, 蔡永明, 曾 勇, 黄 霁, 陈拯民

(天津药物研究院药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要: 用 ^{125}I 标记示踪法研究大鼠皮下注射聚乙二醇化重组人生长激素 (PEG-rhGH) 药代动力学特征。大鼠 sc PEG-rhGH 后, 测定血清 PEG-rhGH 浓度, 用 3P97 程序拟和分析并计算药代动力学参数。大鼠 sc PEG-rhGH 150、300 或 600 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 药物消除符合一房室模型。经与相关文献比较可知, 生长激素经 PEG 化修饰后能延长其在体内的作用时间, 达到长效目的。

关键词: 聚乙二醇修饰; 放射性标记示踪法; 药代动力学

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 05-0506-04

Pharmacokinetics of rhGH decorated by polyethylene glycol in rat *in vivo*

JIANG Ling*, CAI Yong-ming, ZENG Yong, HUANG Ji, CHEN Zheng-min

(National Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: To study the pharmacokinetics of rhGH decorated by polyethylene glycol (PEG-rhGH) after sc administration in rat, serum PEG-rhGH concentrations were measured by ^{125}I labeled method after sc in rat, the pharmacokinetic model and parameters were fitted and calculated by the 3P97 program. After sc injection at doses of 150, 300, and 600 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in rat, the serum PEG-rhGH concentration-time curves were fitted to a one-compartment model. The rhGH decorated by polyethylene glycol could prolong the action duration of rhGH *in vivo*, and reach the goal of long-action.

Key words: pegylation; radioactive labeled tracer method; pharmacokinetics

重组人生长激素 (recombinant human growth hormone, rhGH) 是一条单链、非糖化、由 191 个氨基酸组成的亲水性球蛋白, 具有调节代谢、刺激蛋白质合成和加速脂肪降解等生理功能, 并能促进骨骼和肌肉组织的生长发育。目前临床主要应用在以下方面: ① 治疗由于垂体或下丘脑 rhGH 分泌不足引起的矮小症; ② 用于严重烧伤和烫伤的治疗; ③ 用于复杂手术和严重创伤^[1]。虽然 rhGH 临床应用广泛, 但由于蛋白质多肽类药物易被体液中酶降解和肾脏排泄, 在体内的半衰期很短^[2], 为了获得理想的疗效, 需每日注射, 不仅给患者带来痛苦, 并增加经济负担, 使

其临床应用受到限制。为了减轻患者痛苦, 扩大应用, 国际上现多采用聚乙二醇修饰的方法, 以延缓 rhGH 在体内的代谢, 起到长效的作用。

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是一种无活性、安全无毒的水溶性高分子物质。通过共价键连接至蛋白质上进行化学修饰, 蛋白质聚乙二醇化 (pegylation) 可改变其生物化学特性, 包括分子大小、疏水性及电荷量等, 增加蛋白水溶性和稳定性^[3]。已有大量事实证明聚乙二醇化蛋白在保留天然蛋白质的内在生物学活性的同时, 能有效地克服蛋白质类药物在临床应用中的一些缺点, 如提高血浆半衰期, 增强生物利用度, 减低蛋白质的免疫原性进而提高药物疗效及安全性等^[4,5]。国内外均开展了对聚乙二醇化生长激素相关的研究: 如采用单甲氧基聚

收稿日期: 2008-11-21.

*通讯作者 Tel: 86-22-23006905, Fax: 86-22-27375473,

E-mail: audreyjiang@tom.com

乙二醇活性酯 (mPEG-ALD) 或多聚聚乙二醇为修饰剂, 通过适当的修饰反应条件及纯化方法, 能获得单聚/多聚聚乙二醇修饰的重组人生长激素, 这种 PEG-rhGH 在延长体内代谢的同时, 可明显提高药效^[6,7]; 国外也开展了对聚乙二醇修饰的重组人生长激素药物代谢的研究, 结果表明可延长药物在体内的半衰期^[8,9]。本试验采用大鼠 sc ¹²⁵I 标记 PEG-rhGH, 以总放射性代表原形药和代谢产物 (RA 法)、三氯醋酸沉淀结合的放射性测定原形药物 (TCA-RA 法), 所得数据计算药代动力学参数。

材料与方 法

试剂和仪器 PEG-rhGH 注射剂, 比活为 3 U·mg⁻¹, 纯度 93.40%, 含量 6 mg·mL⁻¹, 4 °C 保存。¹²⁵I-PEG-rhGH, 由中国原子能科学研究院同位素研究所标记并提供, 系采用氯胺 T 法对 PEG-rhGH 进行 ¹²⁵I 标记。

γ -计数器, FJ630G/12 型微机多探头 γ 计数器, 北京核仪器厂出品。

实验动物 健康 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体重 (200 ± 20) g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 清洁级, 动物生产合格证: SCXK-(军)2002-001。

PEG-rhGH 标准曲线的建立 (RA 法) 将 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PEG-rhGH 溶液 (每毫升含 ¹²⁵I-PEG-rhGH 1.85 × 10⁷ Bq) 以生理盐水配成质量浓度为 3.0、9.0、30、90、300 和 900 ng·mL⁻¹ 的标准液, 取系列溶液各 200 μL 经 γ 计数器测定。

RA 法和 TCA-RA 法制备血清 PEG-rhGH 的校正曲线 按制备标准曲线的方法用空白大鼠血清将浓度为 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PEG-rhGH 溶液 (每毫升含 ¹²⁵I-PEG-rhGH 1.85 × 10⁷ Bq) 配成和标准曲线相同的浓度, 制备测定血清中 PEG-rhGH 的校正曲线。按本法另制备血清校正曲线, 然后每管各加入 20% 三氯醋酸 (TCA) 200 μL , 振荡混匀, 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后弃去上清液, 测定沉淀物的放射性计数, 即为 TCA-RA 法血清 PEG-rhGH 的校正曲线。

给药方案和血样采集 大鼠分别 sc 150、300 或 600 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ PEG-rhGH 后, 于 4、6、8、12、16、24、30、36、48、60、72、96、120 和 144 h 分别由眼眶静脉丛取血, 分离出血清, 按 RA 法和 TCA-RA 法分别进行放射性测定。

数据处理 应用 3P97 药代动力学软件 (由中国药理学学会数学药理委员会编制), 对药时曲线进行房

室模型拟合, 并计算药代动力学参数。

结果

1 方法确证

1.1 PEG-rhGH 标准曲线 在 3.0~900 ng·mL⁻¹ 内, 药物浓度 (x) 与计数值 (y, min⁻¹) 呈直线相关, 其标准曲线方程为: $y = 31.2 + 75.9x$ ($r = 0.9999$)。

1.2 RA 法测定血清 PEG-rhGH 的校正曲线、最低定量限、回收率和精密度 校正曲线方程为: $y = 49.7 + 76.2x$ ($r = 0.9999$)。最低定量限为 3.0 ng·mL⁻¹。在 9~900 ng·mL⁻¹ 内平均回收率为 (99.2 ± 4.8)%; 其日内、日间测定精密度 (RSD) 分别为 2.0%~4.2% 和 2.7%~4.4%。

1.3 TCA-RA 法测定血清中 PEG-rhGH 的校正曲线、最低定量限、回收率和精密度 校正曲线方程为: $y = -77.9 + 71.1x$ ($r = 0.9999$)。最低定量限为 3 ng·mL⁻¹。血清 PEG-rhGH 浓度的平均回收率为 (92.0 ± 4.7)%。测定日内和日间精密度 (RSD) 分别为 2.5%~5.9% 和 2.7%~6.0%。

2 动物血清 PEG-rhGH 浓度的测定和药动学参数的计算

2.1 RA 法 血清 PEG-rhGH 浓度-时间数据符合一房室模型。3 个剂量的平均消除相半衰期 ($t_{1/2k_e}$) 为 (29.12 ± 0.85) h; 平均清除率 (CL) 为 (0.019 ± 0.001) L·kg⁻¹·h⁻¹。C_{max} 和 AUC_{0-144h} 均与剂量呈正相关, 相关系数分别为 0.9999 和 0.9993, $t_{1/2k_e}$ 和 CL 与剂量无相关性, 表明其符合线性动力学特征。3 个剂量血清 PEG-rhGH 浓度-时间曲线比较, 见图 1, 药动学参数结果见表 1。

2.2 TCA-RA 法 血药浓度-时间数据符合一房室模型。3 个剂量的平均消除相半衰期 ($t_{1/2k_e}$) 为

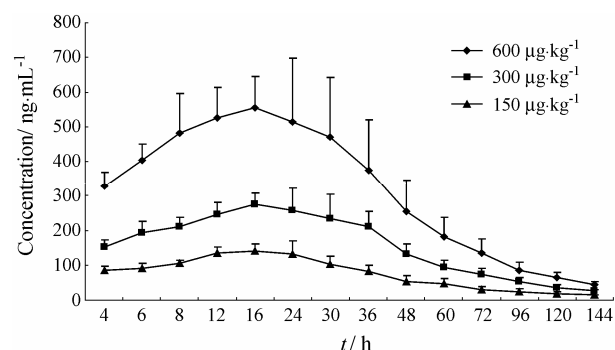


Figure 1 Serum PEG-rhGH concentration-time curve of sc PEG-rhGH in rat (RA method). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

(33.13 ± 1.85) h; 平均清除率 (CL) 为 (0.022 ± 0.001) L·kg⁻¹·h⁻¹。C_{max} 和 AUC_{0-144 h} 均与剂量呈正相关, 相关系数分别为 0.999 8 和 0.999 9, t_{1/2k_e} 和 CL 与剂量无相关性, 表明其符合线性动力学特征。3 个剂量血清 PEG-rhGH 浓度-时间曲线比较见图 2。药动学参数结果见表 2。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of sc PEG-rhGH in rat (RA method). n = 6

Parameter	Dose/μg·kg ⁻¹		
	150	300	600
A / ng·mL ⁻¹	203.33	447.48	899.13
K _e / h ⁻¹	0.024	0.023	0.025
K _a / h ⁻¹	0.17	0.14	0.16
t _{1/2k_a} / h	4.14	4.94	4.28
t _{1/2k_e} / h	29.26	29.89	28.21
C _{max} / ng·mL ⁻¹	139.80	273.91	554.56
AUC _{0-144 h} / h·ng·mL ⁻¹	7 287.46	15 584.23	29 966.09
CL/F _(s) / L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	0.020	0.019	0.019
V/F _(c) / L·kg ⁻¹	0.86	0.80	0.79

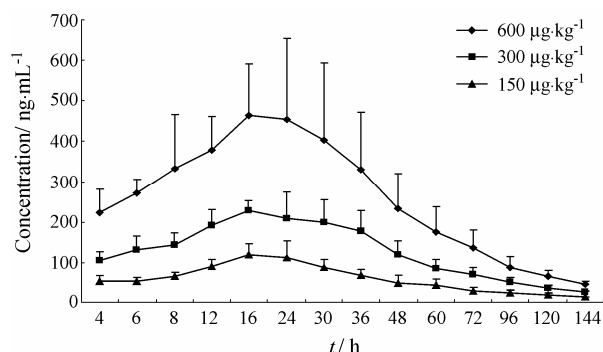


Figure 2 Serum PEG-rhGH concentration-time curve of sc PEG-rhGH in rat (TCA-RA method). n = 6, $\bar{x} \pm s$

Table 2 Pharmacokinetic parameters of sc PEG-rhGH in rat (TCA-RA method). n = 6

Parameter	Dose/μg·kg ⁻¹		
	150	300	600
A / ng·mL ⁻¹	150.33	353.32	746.17
K _e / h ⁻¹	0.020	0.021	0.022
K _a / h ⁻¹	0.15	0.13	0.13
t _{1/2k_a} / h	4.74	5.54	5.35
t _{1/2k_e} / h	34.83	33.40	31.16
C _{max} / ng·mL ⁻¹	118.87	228.46	465.00
AUC _{0-144 h} / h·ng·mL ⁻¹	6 256.49	13 469.88	26 543.85
CL/F _(s) / L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	0.023	0.021	0.022
V/F _(c) / L·kg ⁻¹	1.15	1.02	0.97

讨论

目前蛋白多肽类药物药代动力学的研究方法有同位素示踪法, ELISA 法和生物检定法。同位素示踪法灵敏度高, 特异性好, 可获得药物血药浓度、组织分布、代谢和排泄等的全面资料, 是分析测定蛋白和多肽类药物的高灵敏度方法。但因为药物进入体内后会被降解, 所以总放射性测定不能代表原形药物。采用 TCA 沉淀蛋白再测定放射性同位素的方法, 可以尽量排除分解产物及游离 ¹²⁵I 的干扰, 此法可以认为测定的基本是原形药物的浓度。

本实验中大鼠皮下注射不同浓度的 PEG-rhGH 后, 3 组动物的血药浓度均随剂量的增加而增大, 与剂量存在明显的线性关系, 实验数据用药代计算程序进行数据处理, 测得的 RA 法消除相半衰期平均为 29.12 h, 清除率平均为 0.019 L·kg⁻¹·h⁻¹; TCA-RA 法消除相半衰期平均为 33.13 h, 清除率平均为 0.022 L·kg⁻¹·h⁻¹。据文献^[9]报道大鼠皮下注射 100 μg·kg⁻¹ rhGH 消除半衰期为 (1.35 ± 0.2) h, 清除率为 (0.496 ± 0.086) L·kg⁻¹·h⁻¹, 皮下注射 100 μg·kg⁻¹ PEG-rhGH 后半衰期达 (24 ± 7) h。本实验与文献比较, PEG 修饰后清除率降低近 20 倍, 而消除半衰期延长近 20 倍; 与 PEG-rhGH 半衰期较一致, 表明 PEG-rhGH 能降低药物在体内的清除速率, 延长半衰期。增加了药物在体内的作用时间, 从而起到长效的作用。

关于聚乙二醇修饰能够延长蛋白质的体内半衰期的机制探讨至今仍未明确, 经 PEG 修饰后, 许多蛋白质在体内的药代动力学性质都发生了显著改变, 血浆半衰期明显延长, 肾清除率显著降低。目前认为这种变化主要是基于以下 3 点: ① 蛋白质药物经静脉给药后迅速被网状内皮组织 (RES)、肾、肝、脾消除, 这种消除依赖于蛋白质分子的大小、电荷及与特定细胞内受体的亲和力, 蛋白质药物经 PEG 修饰后, 上述性质均发生了改变。据文献^[10]报道, 蛋白质的肾消除速率与蛋白分子量呈负相关, 蛋白分子量越大, 肾消除越慢。② 蛋白质易被体内的蛋白水解酶代谢, 半衰期和滞留时间较短, PEG 可利用空间位阻作用减少受水解酶攻击的几率, 从而减少降解^[11]。③ 药用的非人源性蛋白质都具有一定的免疫原性, 进入体内后易被免疫系统清除, PEG 的空间位阻作用可掩蔽蛋白质上的抗原决定簇, 从而减少被免疫系统清除的几率, PEG 修饰后的蛋白质的免疫原性会有显著地降低^[12, 13]。因此, 蛋白多肽类药物 PEG 修饰的作用机制仍是需要着重研究的问题。

References

- [1] Shen YN. Clinical application of Growth Hormones [J]. Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志), 1998, 17: 377-378.
- [2] Hershfield MS, Chafee S, Koro-Johnson L, et al. Use of site-directed mutagenesis to enhance the epitope-shielding effect of covalent modification of proteins with polyethylene glycol [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7185-7189.
- [3] Delgado C, Francis GE, Fisher D. The uses and properties of PEG-linked proteins [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1992, 9: 249.
- [4] Molineux G. Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy [J]. Cancer Treat Rev, 2002, 28 (suppl A): 13.
- [5] Harris JM. Peptide and protein pegylation II-clinical evaluation [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55: 1259.
- [6] Li ZJ, Yang HX, Xu KS. Polyethylene glycol-conjugated recombinant human growth hormone was evaluated the long-acting and *in vivo* bioactivities [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理与治疗学杂志), 2005, 10: 1270-1274.
- [7] Wei LP, Wang RH, Rong LF, et al. Characteristics and biological activity of mono-PEG-GH [J]. Chin J Biol (中国生物制品学杂志), 2005, 18: 138-140.
- [8] Tsubery H, Mironchik M, Fridkin M, et al. Prolonging the action of protein and peptide drugs by a novel approach of reversible polyethylene glycol modification [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 38118-38124.
- [9] Clark R, Olson K, Fuh G, et al. Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 21969-21977.
- [10] Wu J, Lu SD. PEGylation of portion [J]. Prog Eng (生物工程进展), 1995, 15(4): 48-51.
- [11] Hinds KD, Kim SW. Effects of PEG conjugation on insulin properties [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54: 505-530.
- [12] Abuchowski A, Van ET, Palczuk NC, et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol [J]. Biol Chem, 1977, 252: 3578.
- [13] Hershfield MS. Biochemistry and immunology of poly(ethylene glycol) Modified adenosine deaminase [M]//Hans JM. S-Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. Washington: American Chemical Society, 1998: 145-154.