

· 专 论 ·

## PEG-蛋白质类药物的体内代谢与安全性评价

张 旋<sup>1</sup>, 刘昌孝<sup>2\*</sup>

1 天津派格生物技术有限公司, 天津 300457;

2 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

**摘 要** 聚乙二醇化蛋白质 (pegylated protein, PEG-蛋白质) 是延长蛋白质类药物半衰期的最有效的途径之一, 通过延缓蛋白的排泄, 提高其抗酶解的能力, 增加其溶解性与稳定性, 以及降低其免疫原性, 可显著延长蛋白质类药物体内的生物活性, 从而改善蛋白质类药物的药代动力学和药效学性质。由于方法学上的限制, PEG-蛋白质类药物的代谢、组织分布和排泄研究极具挑战, 但众多的文献资料表明, 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 分子的体内代谢与安全性已经确立, 无需过度担心 PEG-蛋白质类药物的安全性。将从 PEG-蛋白质体内组织分布与排泄研究方法、PEG 的代谢与安全性和 PEG-蛋白质类药物动物和临床应用的安全性 3 方面介绍和评述 PEG-蛋白药物的体内代谢与安全性评价问题。

**关键词** 评价研究; 代谢; 聚乙二醇化; 蛋白质类药物; 安全性

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 04-0249-05

### *In vivo* metabolism and safety evaluation of PEGylated proteins drugs

ZHANG Xuan<sup>1</sup>, LIU Changxiao<sup>2</sup>

1 Tianjin Pegylatt Biotechnology Co. Ltd., Tianjin 300457, China

2 State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract** Pegylation is one of the most effective methods to prolong the serum half-life of therapeutic protein drugs, by delaying clearance, increasing solubility as well as stability, protecting against susceptibility to enzymatic degradation, and reducing immunogenicity. The PEGylated proteins have also enhanced their pharmacokinetic and pharmacodynamic performance along with sustained actions. However, it is a significant challenge for studying the metabolism, distribution and excretion of PEGylated proteins because of the limitation of methods. Fortunately, literature data indicate that the polyethylene glycol (PEG) associated with a protein should provide no extra concern because the exposure-toxicity relationship of PEG between animals and humans has been thoroughly investigated and metabolism / excretion of PEG is well understood. We reviewed the metabolism and safety evaluation of PEGylated proteins, through introduction and assessment of the method limited for studying distribution and excretion, the *in vivo* metabolism and safety of PEG, and the toxicity of PEGylated proteins in animals and humans.

**Key words** Evaluation study; metabolism; pegylation; PEGylated protein; safety

化学修饰是延长蛋白质类药物半衰期的有效途径之一, 是一种将相对分子质量小的蛋白质类药物共价连接到较大相对分子质量的分子上, 例如 PEG 和白蛋白。共价连接到大分子 PEG 等上能减小免疫原性, 改善可溶性和生物利用度, 增加抗蛋白水解

作用, 同时也能够延长半衰期。PEG 是由环氧乙烷聚合而成的大分子聚合物, PEG 类修饰剂和其他修饰剂相比, 具有无毒性、溶解性好、免疫原性低且相对分子质量范围较宽、种类选择较多等优点。而且 PEG 可以将它的许多优良特性赋予修饰后的生

收稿日期: 2010-04-28

作者简介: 张 旋 (1961—), 男, 科学博士, 兼职教授。主要从事基因工程新药开发工作。Tel: (022) 66200006 E-mail: xuanzhang890@hotmail.com

\* 通讯作者 刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liucx@tjipr.com

物分子。经聚乙二醇共价修饰后,蛋白质类药物的相对分子质量显著增加,延缓了药物排泄,提高药物抵抗酶解的能力,增加了其稳定性,并降低了免疫原性,这些改变均有利于延长药物在体内的半衰期、增加体内活性,从而明显改善蛋白质类药物的药动学和药效学性质。

详尽的代谢研究资料是小分子药物临床前安全评价的重要组成,但由于受到方法学上的明显限制和分子本身性质的影响,PEG-蛋白类药物的代谢、组织分布和排泄研究却具挑战,幸运的是前人对于PEG分子的体内代谢机制与安全性已经确立,如PEG化干扰素的代谢研究,就明确表明不论支链还是直链的PEG与药物结合形成的长效干扰素,PEG均可通过粪或尿排泄,而不在体内积蓄<sup>[1]</sup>。近年来,PEG-蛋白质类药物开发数量明显增加,丰富了临床前和临床应用安全性的知识与认识,为此类新药的研究奠定了基础,这使评价PEG-蛋白质类新药的安全性可以无需进行其代谢和排泄研究。

本文将从PEG-蛋白质体内组织分布与排泄研究方法、PEG的代谢与安全性和PEG-蛋白质类药物动物和临床应用的安全性3方面介绍和评述PEG-蛋白药物的体内代谢与安全性问题。

## 1 PEG-蛋白质体内组织分布与排泄研究方法

通常,采用同位素标记以及同位素标记结合高效液相色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳、酸沉淀等方法研究生物技术新药的体内组织分布和排泄。各种同位素,尤其是常用的<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H等,标记氨基酸分子均不甚稳定,容易脱落,如在人体上给予<sup>131</sup>I标记人生长激素(同位素标记在氨基酸上),给药后数分钟血浆中就出现游离<sup>131</sup>I,而给药后6~90 min游离<sup>131</sup>I已占血浆总放射性的主要部分<sup>[2]</sup>;此外,标记同位素的氨基酸有可能在体内被重新利用而掺入其他内源蛋白或循环摄取定位于组织,如大鼠给予内标(<sup>3</sup>H-亮氨酸)或给予重组人<sup>3</sup>H-生长激素时,发现重组人<sup>3</sup>H-生长激素的放射性标记在组织中的分布模式与<sup>3</sup>H-亮氨酸相似,提示<sup>3</sup>H标记生长激素的氨基酸重新掺入至内源蛋白<sup>[2]</sup>; <sup>131</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>111</sup>In等同位素都可以标记PEG分子,最常用的方法是同位素与PEG分子末端的羟基(-OH)结合<sup>[3-6]</sup>,但PEG-蛋白质中的PEG分子,游离的一端是单甲基PEG,即mPEG(CH<sub>3</sub>(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-),另一端为活化基团与蛋白的氨基等偶联,故PEG-蛋白质分

子中的PEG通常没有同位素标记的合适位点。此外,采用质谱等方法通过直接检测PEG和其代谢产物的方法研究PEG-蛋白质的体内组织分布与排泄,更是受到交叉反应和机体(人或动物)通过各种途径摄入体内的外源性PEG的严重干扰;因此,目前研究PEG-蛋白质体内组织分布和排泄试验的方法存在明显的缺陷和限度<sup>[7]</sup>。

相对分子质量大于20 000的PEG分子所偶联形成的PEG-蛋白质,其体内的血浆清除半衰期较长,常常大于20 h,这种大相对分子质量的PEG-蛋白质主要还是以原型形式从肾脏和/或胆汁(少量)中排泄<sup>[8]</sup>,但因其排泄速度较小相对分子质量(小于5 000)PEG明显降低,排泄时间明显延长,尿液或胆汁中的浓度显著降低,使现有的方法更难检测到其浓度和分子的完整性。此外,PEG-蛋白质分子在血循环中的稳定性或完整性也较难确定,不排除有蛋白酶降解、PEG链脱落或断裂的可能。因此,目前尚无合适的方法对PEG-蛋白质进行体内组织分布和排泄的研究,采用现有同位素标记法研究其体内组织分布与排泄的技术不难,方法简单,但其价值非常有限甚或毫无意义<sup>[7]</sup>。

## 2 PEG的代谢与安全性

### 2.1 PEG的清除途径

综合各种人或动物试验,相对分子质量在190 000以内PEG分子,主要从肾脏排泄清除,较少部分是经胆汁从肠道清除。Yamaoka等<sup>[3]</sup>的试验详细论证了PEG相对分子质量对肾排泄和胆汁排泄方式的影响,如图1所示。

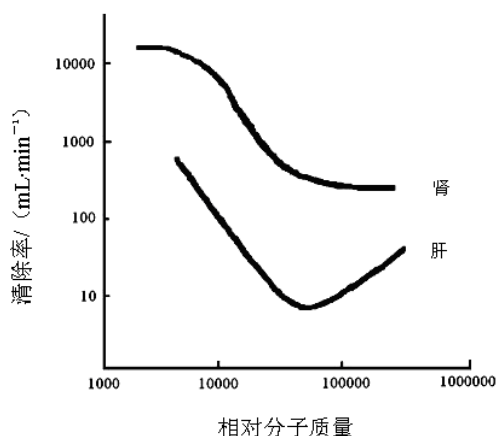


图1 PEG相对分子质量与肾排泄率和肝排泄率的关系  
Fig.1 Relationship between PEG molecular weight and excretion rate in kidney and liver

Yamaoka 等<sup>[3]</sup>的试验得出的重要结论是: 1) 随着相对分子质量的增大, PEG 分子的肾清除率逐渐降低, 当相对分子质量大于 20 000, PEG 分子肾清除率明显降低, 但是, 肾清除仍是其主要的清除机制; 2) 胆汁的清除也与 PEG 的相对分子质量大小有关, 50 000 的 PEG 胆汁清除率最低, 低于或高于 50 000 PEG 的胆汁清除率都增高, 但两者的机制不同, 高于 50 000 PEG 时, 主要通过明显增加的肝 Kupffer 细胞吞噬作用而是使肝清除 PEG 增加; 3) 虽然相对分子质量的大小影响肾和胆汁排泄 PEG 分子的效率, 但相对分子质量在 190 000 内的 PEG 分子其主要的排泄途径仍然是肾脏, 胆汁排泄仅占较少的部分。

## 2.2 PEG 的代谢

人和动物 PEG 的体内代谢形式基本一致<sup>[7]</sup>, 也比较简单, 主要通过乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase) 将 PEG 的乙醇基 (alcohol groups) 氧化成羧酸 (carboxylic acids), PEG 分子体内代谢的比率与其相对分子质量密切相关, 相对分子质量大于 5 000 的 PEG 分子 (如多数 PEG-蛋白质新药中的 PEG 分子) 极少或几乎不发生体内代谢; 相对分子质量在 5 000~50 000, 随着相对分子质量的增加, PEG 分子从胆汁中清除的比例逐渐降低; PEG-蛋白质分子中因 PEG 分子的主要代谢点“-OH”已被“占用”(一个被甲基化, 另一个用于与蛋白氨基偶联), 故极少通过酶代谢。因此, 从代谢的角度分析, 大分子 PEG 比小分子 (小于 5 000) 安全性更高; 且 PEG 的主要代谢产物为乙二酸和羧酸, 其毒性很小, 但在病人使用超大剂量 (100 g/d) PEG 时, 也会因此出现酸中毒和高钙血症<sup>[9]</sup>。

## 2.3 PEG 的安全性

动物急性应用 PEG 的半数致死剂量 (LD<sub>50</sub>) 在 10 g/kg 体质量以上<sup>[10]</sup>, 家兔出现中毒症状时 PEG 的血浆浓度在 30~70 nmol/L<sup>[11]</sup>。大鼠经口给予 PEG 1500 (相对分子质量 1 500) 0.06 g/(kg·d), 连续 2 年未见明显毒副作用; 猴 iv 60%PEG 400 (相对分子质量 400) 溶液 3 g/(kg·d), 连续一个月, 出现食欲不振、生殖器和下肢水肿等副反应<sup>[10]</sup>; PEG 的应用未见生殖或致畸毒性, 也未见致癌性<sup>[12]</sup>。

据 McCabe 等<sup>[13]</sup>报道, 在 3~5 d 内静脉应用呋喃旦啶 (Nitrofurantoin, PEG300, 治疗尿路感染药, 其制剂配方含 PEG300) 累积达 121~220 g/周 (或

PEG 300 的输入量达 400~750 mmol/周) 使 32 例病人中的 6 例出现急性肾小管坏死、血容量减少和氮质血症; 局部应用呋喃西林 (Nitrofurazone, 局部抗感染药) 可出现相似的毒性<sup>[14]</sup>; Laine 等<sup>[15]</sup>报道了 1 例连续应用抗抑郁药氟羟安定 (Iorazepam) 累积剂量达 240 g/周 PEG (PEG 400, 600 mmol/周) 的病人出现肾小管坏死等毒性; 根据 Herold 等<sup>[11]</sup>的试验研究, 局部应用含有 60%PEG300 或 5%PEG 1000 或 32%PEG 4000 的乳剂累计要达到血浆 PEG 浓度 30~70 mmol 时才会出现毒性; 故 PEG 反复应用所致的人体亚急性毒性靶器官是肾脏, 主要的毒性是急性肾小管坏死及其所引起的急性肾功能衰竭。

因此在人或动物体内, 相对分子质量在 190 000 以内的 PEG 分子, 主要以原型形式从肾脏排泄清除, 较少部分经胆汁从肠道清除; PEG 在体内主要通过乙醇脱氢酶将 PEG 的乙醇基氧化成羧酸代谢, 且多数 PEG-蛋白质新药中的 PEG 分子极少或几乎不发生体内代谢; PEG 的毒性很低, 人体应用的安全性很高, PEG-蛋白质类药物中的 PEG 投入量与引起机体毒性的 PEG 投入量相差甚大, 至少在 600 倍或以上, 即 PEG-蛋白质类药物的治疗指数在 600 倍以上。

## 3 PEG-蛋白质动物和临床应用的安全性

### 3.1 PEG-蛋白质动物应用的安全性

Pegasys (PEG-IFN alfa-2a) 的重复毒性试验选择了动物食蟹猴, 包括 3 种给药方式即, 562.5 μg/kg 2 次/周或 600 μg/(kg·d), 连续应用 4 周以及 150 μg/kg 2 次/周, 连续应用 13 周, 结果表明, 所有上述给药方式动物耐受良好, 其毒性特征与 IFN-alfa-2a 一致, 表现为造血系统的抑制和肝脏转氨酶的增高, 而停药后各项指标均可恢复正常<sup>[16]</sup>; 同样地, PEG-Intron (相对分子质量 12 000 PEG 与干扰素 alfa-2b 的偶联产物) 在食蟹猴上的皮下隔日注射 1 次, 连续 1 月的重复毒性试验, 也仅发现可逆性血细胞和血钙、磷、钾等的降低, 与干扰素 alfa-2b 的毒性反应完全一致<sup>[7]</sup>; PEG-IFN 的长期毒性试验均未发现与 PEG 有关的毒性。Neulasta (PEG20-rhG-CSF) 的重复毒性试验选择了大鼠和食蟹猴 2 种动物, 大鼠重复毒性试验的给药方式有 2 种, 即每周给药 1 次连续 24 周和隔日给药 1 次连续 2 周, 食蟹猴的重复毒性试验的给药方式为每周给

药 1 次连续 4 周, 3 种给药模式所观察到的毒副反应一致, 表现为加强的药理反应, 即骨髓和脾、肝等髓外造血系统功能的亢进, 且停药恢复后上述反应均可恢复, 与 rhG-CSF 的重复毒性试验发现基本一致<sup>[17]</sup>。因此, PEG-protein 药物的重复毒性主要表现为其中“protein”分子的药理反应或毒副作用, 并未显现与“PEG”分子有关的毒副作用。

### 3.2 PEG-蛋白质临床应用的安全性

Neulasta 自 2002 年先后在美国、澳大利亚和欧洲部分国家上市以来, 目前临床应用的病人数已超过 100 万人; Neulasta 的注射剂量为 6 mg / (次·化疗周期), 是临床相同指正 Filgrastim 应用剂量 5  $\mu\text{g}$  / (kg·d) (300  $\mu\text{g}$  / 次) 的 20 倍; 但主要的副反应仍是骨痛, 发生率与 Filgrastim 相当, 未见其他特殊毒副反应报道<sup>[18]</sup>。目前给药量较大的 PEG-蛋白质类新药是聚乙二醇化可溶性肿瘤坏死因子受体 (PEG-sTNFRI) 和聚乙二醇化人生长抑素 (somavert), PEG-sTNFRI 的相对分子质量为 60 000, 由相对分子质量 30 000 的 PEG-ALD 与 sTNF RI 蛋白 N 末端偶联而成, 与 Neulasta (PEG-rhG-CSF) 所使用的 PEG 种类、偶联方式与位点一致, 在给药 60 mg / 次、1 次 / 2 周、连续 28 周的模式下, 未发现与 PEG 分子相关的毒副作用<sup>[19-20]</sup>; Somavert 由 4~6 个相对分子质量的 PEG 偶联而成, 其相对分子质量为 42 000、47 000 和 52 000, 在每天应用 20 mg / 次、连续 12 周的给药模式下, 也未发现与 PEG 分子相关的毒副作用。因此, 作为长效制剂的 PEG-蛋白质新药, 无论是每天连续给药或每 2 周给药 1 次, 每月投药总量达到 600 mg 不会发现与 PEG 分子相关的毒副反应。由于代谢清除仅占 PEG-蛋白质很少部分, 且通常 PEG-蛋白质的临床应用剂量很低, PEG 投入量与引起机体毒性的 PEG 投入量相差甚大, 至少在 600 倍以上, 且 PEG 分子本身的代谢与安全性已经确立, 因此, 评估 PEG-蛋白质新药的安全性无需进行其代谢和排泄研究, 且已批准上市的 PEG-蛋白质类新药, 如 Pegasys (40 000 PEG 与 IFN alfa 2a 的偶联产物) 和 Neulastra 等, 在提交给 FDA 或 EMEA 的临床前研究报告中均未提供相应的体内组织分布与排泄试验的资料和数据<sup>[16-17]</sup>。

## 4 结语

综上所述, 在没有合适的同位素标记法, 也很

难对其代谢产物进行有效的检测时, 仅用同位素标记法研究 PEG-蛋白质类新药的代谢与排泄研究的价值是有限的。由于代谢清除仅占 PEG-蛋白质很少部分, 且通常 PEG-蛋白质的临床应用剂量很低, PEG 投入量与引起机体毒性的 PEG 投入量相差甚大, 至少在 600 倍以上, 且 PEG 分子本身的代谢与安全性已经确立, 因此, 评估 PEG-蛋白质新药的安全性无需进行其代谢和排泄研究, 且已批准上市的 PEG-蛋白质类新药, 在欧美提交给 FDA 或 EMEA 的临床前研究报告中均未提供相应的体内组织分布与排泄试验的资料和数据。

### 参考文献

- [1] 刘昌孝. 聚乙二醇干扰素  $\alpha$  研究的新进展: 聚乙二醇化技术[J]. 中国临床医学, 2004, (3): 25-27.
- [2] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [3] Yamaoka T. Distribution and tissue uptake of Poly (ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice [J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83: 601-606.
- [4] Wen X, Wu Q P, Ke S, *et al.* Improved radiolabeling of PEGylated protein: PEGylated annexin V for noninvasive imaging of tumor apoptosis [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2003, 18: 819-827.
- [5] Chen X, Park R, Hou Y, *et al.* MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with 18F-labeled PEGylated RGD peptide [J]. *Eur J Nucl Med Imaging*, 2004, 31: 1081-1089.
- [6] Shemilt G I. The Synthesis of Carbon-14 Labelled PEGs [M]. London: John Wiley and Sons Ltd., 2004.
- [7] Webster R, Didier E, Harris P, *et al.* PEGylated proteins: Evaluation of their safety in absence of definitive metabolism studies [J]. *Drug Metabol Dispos*, 2007, 35 (1): 9-16.
- [8] Friman S, Svanvik J. Biliary excretion of 400-to-1, 000-d polyethylene glycol will influence the calculation of small intestinal absorption in portacaval-shunted rats [J]. *Hepatology*, 1997, 25: 500.
- [9] Bruns D E, Herold D A, Rodehever G T, *et al.* Polyethylene glycol intoxication in burn patients [J]. *Burns Incl Therm Injury*, 1982, 9: 49-52.
- [10] Fruijtier-Polloth C. Safety assessment on polyethylene glycol (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products [J]. *Toxicology*, 2005, 214: 1-38.
- [11] Herold D A, Keil K, Bruns D E, *et al.* Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase [J].

- Biochem Pharmacol*, 1989, 38: 73-76.
- [12] Working P. Safety of the Poly (ethylene glycol) and Poly (ethylene glycol) derivatives [M]. *San Francisco: American Chemical Society*, 1971.
- [13] Anne M Pilaro. Memorandum: Summary Pharmacology / Toxicology Review of PEGASYS for hepatitis C [S]. 2001.
- [14] Scientific Discussion (for the approval of Neulasta) EMEA [S]. 2004.
- [15] McCabe W R, Jackson GGEE. Treatment of chronic pyelonephritis [J]. *Arch Intern Med*, 1959, 104: 701-719.
- [16] Hunt D F, Giordani A B, Rhodes G, *et al*. Mixture analysis by triple-quadrupole mass spectro-metry: metabolic profiling of urinary carboxylic acids [J]. *Clin Chem*, 1982, 2387-2392.
- [17] Laine G A, Hosain S M, Solis R T, *et al*. Polyethylene glycol nephrotoxicity secondary to prolonged high-dose intravenous lorazepam [J]. *Am Pharmacother*, 1995, 29: 1110-1114.
- [18] Renwick W, Petengell R, Green M. Use of filgrastim and Pegfilgrastim to support delivery of chemotherapy- Twenty years of clinical experience [J]. *Biodrugs*, 2009, 23 (3): 175-186.
- [19] Multicenter A. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Safety of Extended Treatment with PEG sTNR-RI in Subjects with Rheumatoid Arthritis (RA) [S]. 2005.
- [20] Darlington C. PEG-STNF-RI Amgen [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, 4 (5): 583-587.

## 版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊（光盘版）电子杂志社签订数字出版独家合作协议，在协议期间，中国药学会主办的 19 本科技期刊（包括天津**中草药**杂志社出版的 3 本期刊《**中草药**》、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志）的网络版由中国学术期刊（光盘版）电子杂志社（其出版和信息服务网站为“中国知网”）独家出版发行，读者可登陆“中国知网”（[www.cnki.net](http://www.cnki.net)）查阅浏览全文。

天津**中草药**杂志社