

聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子大鼠和 Beagle 犬的免疫原性

蔡永明^{1,2}, 姜 凌¹, 李 铭¹, 付 鹏¹, 张宗鹏^{1*}

1 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

2 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072

摘 要 **目的:** 在进行聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子 (PEG30-rhG-CSF) 大鼠和 Beagle 犬重复给药毒性试验时, 观察给药后动物血清中抗 PEG30-rhG-CSF 抗体的产生和抗体的中和活性, 为非临床安全性评价的确切性以及临床给药周期提供依据。**方法:** 大鼠分为赋形剂对照组、PEG30-rhG-CSF 0.75、3.0、12 mg / kg 组, sc 给药, 隔日 1 次, 连续 2 周; Beagle 犬分为赋形剂对照组、PEG30-rhG-CSF 0.25、1.0 和 4.0 mg / kg, sc, 每周 1 次, 连续 4 周。采用 ELISA 法检测动物血清中抗 PEG30-rhG-CSF 的抗体, 采用 NFS-60 细胞 / MTT 比色法检测抗体的中和活性。**结果:** 大鼠在给药期和恢复期各剂量组动物血清中均未检测到抗 PEG30-rhG-CSF 的结合抗体。Beagle 犬在给药的第 1 周和第 2 周, 未检测到结合抗体, 但在第 4 周时, 低、中和高 3 个剂量组各有 5 只 (5/6) 的动物血清中检测到结合抗体, 而抗体滴度与剂量无明显相关性。恢复 4 周后, 仅高剂量组 1 只 (1/2) 动物出现抗体, 且抗体滴度呈下降趋势。另外, 在给药期和恢复期, 血清中所产生的抗体均无中和 PEG30-rhG-CSF 的活性。**结论:** 大鼠重复给予 PEG30-rhG-CSF 的毒性试验中, 所有动物血清中均未检测到结合抗体和中和抗体; Beagle 犬用药组的绝大部分动物血清中出现抗 PEG30-rhG-CSF 的抗体, 但所产生抗体无中和活性。

关键词 PEG30-rhG-CSF; 免疫原性; 大鼠; Beagle 犬

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 04-0272-03

Immunogenicity of PEGylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor in rats and Beagle dogs

CAI Yong-ming^{1,2}, JIANG Ling¹, LI Ming¹, FU Peng¹, ZHANG Zong-peng¹

1 Tianjin Centre for Drug Safety Evaluation and Research, Tianjin 300193, China

2 Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract **Objective:** To investigate the anti-pegylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor (PEG30-rhG-CSF) antibody formation and neutralizing antibody activity of PEG30-rhG-CSF in repeated-dose toxicity studies in rats and Beagle dogs. **Methods:** The rats received sc injection of PEG30-rhG-CSF at doses of 0 (placebo), 0.75, 3.0, and 12 mg / kg (every other day dosing for up to 2 weeks) and Beagle dogs at doses of 0 (placebo), 0.25, 1.0, and 4.0 mg / kg (weekly dosing for up to 4 weeks), respectively. Anti-PEG30-rhG-CSF antibody in serum was measured using ELISA and the neutralizing antibody activity was determined by cell-based bioassay. **Results:** No anti-PEG30-rhG-CSF responses were observed in rats during the experiment. The antibody titers in serum samples were determined in dogs during the treatment and recovery period, but no neutralizing antibodies were found. There was no apparent dose-response in either incidence of antibody positivity or titer of antibody development in dogs, and titers sharply declined at the end of the recovery period. **Conclusion:** Antibodies to PEG30-rhG-CSF were not detected in the rats. The dogs have developed binding antibodies, but no neutralizing potency.

Key words PEG30-rhG-CSF; Immunogenicity; rats; Beagle dogs

重组人粒细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF) 已广泛应用于临床, 是一种防治肿瘤病人因

放化疗引起的中性粒细胞 (ANC) 减少症的有效药物, 但半衰期短, 需要每日给药^[1-2]。聚乙二醇化 rhG-CSF (PEG30-rhG-CSF) 是利用 N 末端聚乙二

收稿日期: 2010-02-16

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (Z20082X09305-005); 天津创新药物安全评价技术平台建设。

* 通讯作者 张宗鹏, 研究员。Tel: (022) 23006865 E-mail: zhangzp@tjipr.com

醇修饰技术,把相对分子质量为 30 000 的单链 PEG 共价偶联到 rhG-CSF 的 N 末端氨基上而形成的新型长效制剂,其平均相对分子质量为 49 000。经药理学实验证实,PEG30-rhG-CSF 单次给药后升高 ANC 的效果比多次给予 rhG-CSF 作用更强且维持时间更长^[3]。目前国内尚未见 PEG30-rhG-CSF 注射剂的免疫原性报道,为给该药非临床安全性评价的确切性提供依据,我们进行了大鼠和 Beagle 犬的免疫原性试验。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

PEG30-rhG-CSF 注射剂,天津派格生物技术有限公司提供,浓度为 1.5 mg/mL。大鼠 IgG 和狗 IgG 由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供。羊抗大鼠 IgG-HRP,美国 KPL 公司产品;羊抗狗 IgG-HRP,美国 Rockland Immunochemicals 公司产品。酶反应底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和噻唑蓝(MTT)为 Sigma 产品。NFS-60 细胞由中国药品生物制品检定所提供。RPMI 1640 培养液为美国 Gibco 产品。96 孔酶标板和细胞培养板,均为美国 Costar 产品。550 型酶标微板读数仪,美国 Bio-red 公司产品。Columbus 洗板机,奥地利 TECAN 公司产品。

1.2 动物及实验设计

SD 大鼠,SPF 级,体质量(210±14)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产单位许可证编号:SCXK(京)2002-0003,饲养环境为屏障系统。Beagle 犬,普通级,体质量(8.2±0.5)kg,阜阳市维光实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(皖)06-001,全封闭观察室,单笼饲养。动物适应期结束后随机分组,大鼠分为 PEG30-rhG-CSF 0.75、3.0、12 mg/kg 3 个剂量组和赋形剂对照组,共 4 组,每组 24 只动物,雌雄各半,隔日给药 1 次,连续 2 周,恢复期 2 周,于 2 次活杀前摘眼球取血,制备血清。Beagle 犬分 PEG30-rhG-CSF 0.25、1.0 和 4.0 mg/kg 和赋形剂对照组,共 4 组,每组 6 只动物,雌雄各半,每周给药 1 次,连续 4 周,恢复期 4 周,于给药期及恢复期不同时间从前肢隐静脉采血,制备血清。本试验在 GLP 实验室进行。

1.3 间接 ELISA 法测定抗 PEG30-rhG-CSF 抗体

将 PEG30-rhG-CSF 用 pH 9.6 的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 溶液稀释成 10 μg/mL,包被于 96 孔酶标板上,每孔 100 μL,4℃过夜。用 2%BSA 封闭液 37℃封闭 2 h 后,各孔加入 100 μL 用样品稀释液稀释的待

检血清样品,同时设阳性和阴性对照孔,37℃孵育 1 h。洗涤后每孔加 100 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗大鼠 IgG(1:160 000)或羊抗狗 IgG(1:300 000),37℃再孵育 1 h。洗涤后各孔加 100 μL 酶反应底物 TMB,37℃反应 20~25 min。用 2 mol/L 硫酸 50 μL 终止反应,在酶标微板读数仪上读取各孔 450 nm 处的吸光度(A)值^[4]。

1.4 体外测活法测定抗体的中和活性

采用 NFS-60 细胞/MTT 比色法检测抗体的中和活性^[5-6]。小鼠骨髓白血病细胞(NFS-60)为 rhG-CSF 依赖型细胞,其生长状况依 rhG-CSF 的生物活性的不同而不同。若血清出现了抗 rhG-CSF 的中和抗体,抗体“灭活”了 rhG-CSF 的生物活性,则 NFS-60 细胞增殖速率降低或根本不能存活。据此原理进行检测血清是否具有抗 PEG30-rhG-CSF 的中和活性。在 96 孔细胞培养板中,每孔分别加入浓度为 2 ng/mL 的 PEG30-rhG-CSF(50 μL)和待测血清样品(50 μL)等体积振荡混合,37℃作用 2 h,试验同时设阴性和阳性对照。然后每孔加入 50 μL 活化 24 h 的 NFS-60 细胞悬液(2.0×10⁵/mL),37℃、5% CO₂ 培养 42 h。每孔再加入 20 μL MTT 溶液,继续培养 5 h。最后每孔加入 100 μL 裂解液,混匀后,在酶标微板读数仪上读取各孔 570 nm 处的 A 值(参比波长为 630 nm)。

1.5 阳性结果的判断标准及统计学处理^[4,7]

以同期赋形剂对照组动物血清标本所测得 A 值的 2.1 倍作为产生抗体的阈值,凡给药后血清标本测得的 A 值大于或等于阈值者,判定为阳性。各剂量组动物血清中所测的结合抗体和中和抗体的试验数据均以抗体滴度对数的表示,用组间 t 测验进行显著性检验。统计软件为 SPSS 11.5。

2 结果

2.1 抗 PEG30-rhG-CSF 抗体滴度的测定

大鼠各剂量组在给药期及恢复期结束取血采用 ELISA 方法检测结合抗体,结果显示所有动物血清所测的 A 值均低于同期抗体的阈值,表明血清中没有检测到抗 PEG30-rhG-CSF 的抗体。

Beagle 犬在给药第 1 周和第 2 周时,各剂量组动物血清中均未检测到抗 PEG30-rhG-CSF 抗体;在给药第 4 周时,每组各有 5 只动物产生抗 PEG30-rhG-CSF 的结合抗体(占 5/6),抗体滴度的强度与给药剂量无明显相关性。恢复 4 周时,仅高剂量组 1 只(1/2)动物血清中检测到抗 PEG30-rhG-CSF

抗体，且抗体滴度呈下降趋势。结果见表 1、2。

表 1 Beagle 犬 sc PEG30-rhG-CSF 后产生结合抗体的动物比例

Table 1 Incidence of anti-PEG30-rhG-CSF antibodies in Beagle dogs sc administered by PEG30-rhG-CSF

分组	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	产生抗体动物数 / 总动物数			
		第 1 周	第 2 周	第 4 周	恢复 4 周后
对照组	—	0/6	0/6	0/6	0/2
PEG30-	0.25	0/6	0/6	5/6	0/2
rhG-CSF	1.0	0/6	0/6	5/6	0/2
	4.0	0/6	0/6	5/6	1/2

表 2 ELISA 法测定 Beagle 犬 sc PEG30-rhG-CSF 后抗体的滴度 (lg, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Determination of antibody titer of Beagle dogs sc administered with PEG30-rhG-CSF by ELISA (lg, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分组	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	滴度的对数值			
		第 1 周	第 2 周	第 4 周	恢复 4 周后 ($n=2$)
对照组	—	—	—	—	—
PEG30-	0.25	—	—	1.67±0.82	—
rhG-CSF	1.0	—	—	1.83±1.17	—
	4.0	—	—	1.83±0.98	1.00±1.41

2.2 中和抗体检测结果

对采用 ELISA 方法检测出产生结合抗体的血清样品，进行抗体中和活性测定，以观察所产生的结合抗体是否为中和抗体。本试验针对 Beagle 犬给药 4 周和恢复 4 周后动物血清样品进行体外细胞测活试验。结果显示，各给药组血清样品的 A 值均值范围（0.344~0.373）与同期对照组（0.365）比较均无显著性差异（ $P>0.05$ ），表明各剂量组的待检动物血清中均未检测到中和抗体产生。

3 讨论

大多数生物技术药物是由蛋白质、多肽类组成，相对分子质量较大、具有复杂的高级结构，对非同源的动物而言具有免疫原性^[8]，所产生的抗体是否有中和活性视药物和动物而异。在重复给药的毒性试验中，如果出现具有中和活性的抗体会减弱药物的药理作用，干扰毒性反应；而抗原抗体复合物的产生又可能会出现新的毒性反应。因此监测抗体的产生和监测抗体中和活性的强弱就显得格外重要。本课题组在进行 PEG30-rhG-CSF 注射剂大鼠和 Beagle 犬长期毒性试验中的不同阶段，检测血清中

是否产生抗 PEG30-rhG-CSF 的抗体以及抗体的中和活性，并将抗体出现与所有药理和毒理的变化综合考虑，有助于解释试验结果，为 PEG30-rhG-CSF 注射剂临床前安全性评价的确切性以及临床给药周期提供依据。

Beagle 犬重复 sc PEG30-rhG-CSF 注射剂 4 周的毒性试验中，血清中能检测到抗 PEG30-rhG-CSF 的抗体，但所检测到的抗体不具有中和活性，表明 PEG30-rhG-CSF 对 Beagle 犬具有一定的免疫原性。但该免疫原性并不会减弱药物的活性以及与活性相关的毒性，不会影响 PEG30-rhG-CSF 毒性的正确判断。在大鼠重复给药毒性试验中体内未检测到抗体产生，可能是该药对啮齿类动物大鼠的免疫原性较低或 PEG 化降低了蛋白质药物的免疫原性^[9]。因此用大鼠和 Beagle 犬进行长期毒性试验来评价 PEG30-rhG-CSF 的重复给药毒性，均能正确反映药物毒性，为临床合理用药提供依据。但本试验结果提示，临床多次用药后应注意监测血清中抗体的产生。

志谢：天津派格生物技术有限公司张璇老师对本研究和抗体检测提供帮助。

参考文献

[1] Roskos L K, Lum P, Lockbaum P, *et al.* Pharmacokinetic / pharmacodynamic modeling of pegfilgrastim in healthy subjects [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46 (7): 747-757.

[2] 蔡永明, 陈拯民, 李 铭, 等. 酶联免疫法研究注射用聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子的临床药理学 [J]. *中草药*, 2009, 40 (8): 1267-1270.

[3] Cai Y M, Chen Z M, Jiang L, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single doses of subcutaneous pegylated human G-CSF mutant (PEG30-rhG-CSF) in Beagle dogs [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 5 (5): 326-332.

[4] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1992.

[5] Grossberg S E, Kawade Y. The expression of potency of neutralizing antibodies for interferons and other cytokines [J]. *Biotherapy*, 1997, 10 (1): 93-98.

[6] 中国药典[S]. 三部. 2005.

[7] Lu Q J, Gao Y, Tao L B, *et al.* Production of neutralizing antibodies to recombinant human basic fibroblast growth factor and its renal deposition in rhesus monkeys and rats [J]. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1999, 23 (3): 168-171.

[8] ICH. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6 [S]. 1997.

[9] Delgado C, Francis G E, Fisher D. The uses and properties of PEG-linked proteins [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1992, 9 (3-4): 249-304.