

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动学

蔡永明¹, 陈拯民¹, 李 铭¹, 刘昌孝¹, 刘 鹏², 韩晓红², 石远凯^{2*}

(1. 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;

2. 中国医学科学院肿瘤医院, 北京 100021)

摘要:目的 研究癌症患者化疗后单次 sc 不同剂量的注射用聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子 (PEG-rhG-CSF) 的药动学。方法 采用酶联免疫分析检测 (ELISA) 法测定癌症患者 sc PEG-rhG-CSF 后的血药浓度, 实验数据用 3P97 药动程序拟合分析并计算药动学参数。结果 癌症患者化疗后 48 h 单次 sc PEG-rhG-CSF 30、60、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每组 4 例病人的平均消除半衰期 ($t_{1/2\text{ke}}$) 差异不大, 分别为 (47.8 ± 7.3)、(49.8 ± 6.9)、(45.7 ± 9.6) 和 (44.6 ± 6.3) h; 平均达峰时间 (t_{max}) 分别为 (21.0 ± 6.0)、(24.0 ± 0)、(21.0 ± 6.0)、(42.0 ± 12.0) h; 平均清除率 (CL) 分别为 (5.44 ± 0.86)、(5.06 ± 0.69)、(3.36 ± 0.35)、(3.31 ± 1.20) $\text{mL}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, CL 有随剂量增加而下降的趋势; 平均达峰浓度 (C_{max}) 分别为 (54.0 ± 10.8)、(129.0 ± 20.9)、(344.9 ± 73.4)、(828.9 ± 245.6) ng/mL ; 平均药时曲线下面积 ($\text{AUC}_{0-432\text{h}}$) 分别为 (5714 ± 786)、(12781 ± 1745)、(32714 ± 6486)、(85142 ± 26186) $\text{h} \cdot \text{ng}/\text{mL}$; C_{max} 和 AUC 与剂量均呈正相关。结论 PEG-rhG-CSF 的较长半衰期和较慢清除率 (与 rhG-CSF 相比) 保证了该药在体内的长效特性。

关键词: 聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子 (PEG-rhG-CSF); ELISA; 药动学

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1267-04

Pharmacokinetics of PEGrhG-CSF of injection to cancer patients by ELISA

CAI Yong-ming¹, CHEN Zheng-min¹, LI Ming¹, LIU Chang-xiao¹,

LIU Peng², HAN Xiao-hong², SHI Yuan-kai²

(1. State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract : Objective To explore clinical pharmacokinetics by sc injection of pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (PEG-rhG-CSF) at various doses to cancer patients with chemotherapy-induced neutropenia. **Methods** Serum concentration of PEG-rhG-CSF was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pharmacokinetic parameters were calculated with 3P97 software. **Results** After 48 h chemotherapeutic treatment, patients received single sc doses of PEG-rhG-CSF at 30, 60, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In every group with four cases showed no significant difference, the mean elimination half-life ($t_{1/2\text{ke}}$) was (47.8 ± 7.3), (49.8 ± 6.9), (45.7 ± 9.6), and (44.6 ± 6.3) h, respectively. The mean time to reach peak concentration (t_{max}) was (21.0 ± 6.0), (24.0 ± 0), (21.0 ± 6.0), and (42.0 ± 12.0) h. The mean drug clearance from serum (CL) was (5.44 ± 0.86), (5.06 ± 0.69), (3.36 ± 0.35), and (3.31 ± 1.20) $\text{mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$. The mean peak concentration (C_{max}) was (54.0 ± 10.8), (129.0 ± 20.9), (344.9 ± 73.4), and (828.9 ± 245.6) ng/mL . The mean area under the serum concentration-time curve ($\text{AUC}_{0-432\text{h}}$) was (5714 ± 786), (12781 ± 1745), (32714 ± 6486), and (85142 ± 26186) $\text{h} \cdot \text{ng}/\text{mL}$. Pharmacokinetics of PEG30-rhG-CSF was dose-dependent, both C_{max} and the AUC were increased with the increasing doses. CL , however, was decreased with dose increasing. **Conclusion** Due to the longer $t_{1/2\text{ke}}$ and slower CL , PEG-rhG-CSF results in more desirable pharmacokinetic properties *in vivo* compared to rhG-CSF.

Key words: pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (PEG-rhG-CSF); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); pharmacokinetics

* 收稿日期: 2008-12-25

基金项目: 国家“863计划”资助项目 (2003AA2Z347D); 国家“973计划”资助项目 (2004CB518902)

作者简介: 蔡永明 (1962—), 女, 天津人, 副研究员, 主要从事生物工程新药的药动学及临床前安全性评价研究。Tel: (022) 23006871

Fax: (022) 27375473 E-mail: caiymtj@126.com

重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF) 是防治肿瘤化疗引起的中性粒细胞减少症的有效药物,具有提高外周血中性粒细胞数的功能,在造血干细胞移植中被广泛应用^[1,2]。但其半衰期短,需要每日给药^[3~5]。聚乙二醇 (PEG) 化重组人粒细胞集落刺激因子 (PEGrhG-CSF) 是通过基因重组技术生产的 PEG 化多肽类一类新药,是将相对分子质量为 20 000 的单链 PEG 共价偶联到 rhG-CSF 的 N 末端氨基上而形成的长效制剂。PEG 本身没有明显的生物活性^[6~8],PEGrhG-CSF 与 rhG-CSF 作用机制相同,都是与细胞表面特异性受体结合,促进骨髓造血干细胞的分化和增值,但 PEG 化后的 rhG-CSF 降低肾清除并延长药物在体内持续时间^[9]。本实验研究了癌症患者化疗后 48 h 单次 sc 不同剂量的 PEGrhG-CSF,用酶联免疫 (ELISA) 法^[10]检测药后不同时间血液中的药物浓度变化,以进行临床药动学研究,为临床合理用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:PEGrhG-CSF 质控样品,无色透明液体,每支 0.5 mL,150 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HPLC 测质量分数为 99.8%,批号 20030201,由山东格兰百克生物制药有限公司提供。样品试验前于 4℃ 保存。检测 PEGrhG-CSF 的 ELISA 试剂盒,购自美国 Bio-source 公司。

1.2 仪器:Model 550 型酶标微板读数仪 (美国 Bio-Red 公司);Columbus 洗板机 (奥地利 Tecan 公司)。

1.3 受试患者:16 例住院癌症患者 (中国医学科学院肿瘤医院),男女各 8 例,经组织病理学或细胞学确诊为非小细胞肺癌或乳腺癌 (其中 14 例非小细胞肺癌,2 例乳腺癌),年龄 35~65 岁 (中位年龄 50 岁),用药前的基础中性粒细胞 $2.11 \times 10^9 \sim 10.42 \times 10^9/\text{L}$ (中位值 $5.84 \times 10^9/\text{L}$)。既往未接受过化疗或放疗,KPS 功能状态评分标准 (Karnofsky, KPS) ≥ 60 分,预计生存期 3 个月以上,骨髓无肿瘤转移,造血功能和外周血常规正常,无出血倾向,无明显心、肝、肾功能异常,自愿受试,签署知情同意书。

1.4 给药及采血方法:患者化疗结束后 48 h 单次 sc 给予 PEGrhG-CSF,剂量分别为 30、60、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每组 4 例病人。于给药前和给药后不同时间从前肢肘窝静脉取血,每次 5 mL。取血时间点为 0 d (药前)、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18 d (药后)。血液在室温放置 30 min 后,

4 000 r/min 离心 15 min,分离出血清,-20℃ 保存待测 (血清样品由中国医学科学院肿瘤医院提供)。

1.5 ELISA 法测定血药浓度:在预包被第一抗体的 96 微孔板上,孔内加入样品 (标准品或待测样品)和生物素化第二抗体各 50 μL (标准品 100 μL),轻轻混匀 20 s 后于 37℃ 保温 2 h。除去孔内液体,洗板 4 次,每次 3 min,除净孔内残液后每孔加 100 μL 链亲和素-辣根过氧化物酶,室温放置 0.5 h。洗去并除净孔内残液后,每孔加 100 μL 底物液 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺),室温反应 0.5 h 后加 100 μL 硫酸终止反应。在酶标仪 450 nm 处读取各孔的吸光度 (A) 值。

1.6 数据处理及药动学参数计算:血药浓度-时间数据用 3P97 药动程序拟合分析并计算药动学参数;采用梯形法计算 AUC 值, $t_{\max}$ 和 $C_{\max}$ 采用实测值;实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 方法学研究:分别用药盒中提供的 rhG-CSF 标准品和本实验中 PEGrhG-CSF 的质控样品制备标准曲线。rhG-CSF 的终质量浓度为 0、39、78、156、312、625、1 250、2 500 pg/mL ,PEGrhG-CSF 的终质量浓度为 0、78、156、312、625、1 250、2 500、5 000 pg/mL 。在上述质量浓度范围内,药物质量浓度对数与吸光度值对数呈直线相关,回归方程分别为 $\lg A = -2.636 + 0.902 \times \lg C$, $r = 0.9987$ (rhG-CSF) 和 $\lg A = -2.850 + 0.869 \times \lg C$, $r = 0.9979$ (PEGrhG-CSF),经平行性测验表明,两条标准曲线平行相关 ($P > 0.05$)。本试验最低定量限为标准曲线的最低质量浓度点,即 78 pg/mL 。在 100~4 000 pg/mL 质量浓度,测定血清中 PEGrhG-CSF 的板内 RSD 为 6.6%~9.6%,平均准确度 96%~105%;板间 RSD 为 6.3%~10.2%,平均准确度为 99%~100%。结果见表 1。另外,该药盒为 IL-2、IL-3、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α 等多种细胞因子均无明显的交叉反应。以上各项条件均能满足药动学的实验要求^[11]。

2.2 血清中 PEGrhG-CSF 的定量测定:按照测定方法项下规定的方法测定,每次测定均制备 1 条标准曲线以计算血清中药物的量。癌症患者化疗后 48 h 分别单次 sc 给予 PEGrhG-CSF 30、60、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后的平均血药浓度-时间曲线见图 1。

2.3 药动学参数的计算和分析:血药浓度试验数据用 3P97 药代计算程序进行处理。经拟合优度分析,药物消除符合一房室模型,具体药动学参数见表 2。

表 1 ELISA 法测定 PEGrhG-CSF 的精密度和准确度
($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 1 Precision and accuracy of PEGrhG-CSF
by ELISA method ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

加入质量 浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	孔内			孔间		
	测得质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/ %	准确度/ %	测得质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/ %	准确度/ %
100	104.6 $\pm$ 10.0	9.6	105	99.2 $\pm$ 10.1	10.2	99
500	478.5 $\pm$ 42.0	8.8	96	495.8 $\pm$ 41.2	8.3	99
2 000	2 065.3 $\pm$ 135.9	6.6	103	1 993.6 $\pm$ 153.8	7.7	100
4 000	3 898.6 $\pm$ 289.4	7.4	97	3 906.9 $\pm$ 244.8	6.3	98
$\bar{x} \pm s$	-	8.1 $\pm$ 1.4	100 $\pm$ 4	-	8.1 $\pm$ 1.6	99 $\pm$ 1

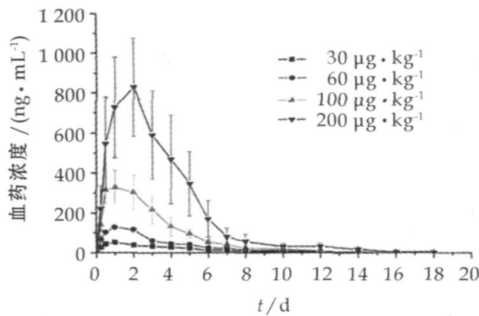


图 1 癌症患者 sc 不同剂量 PEGrhG-CSF 后的
平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 1 Serum concentration-time curves of single
sc injection of PEGrhG-CSF to cancer
patients at various doses ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

表 2 癌症患者 sc 不同剂量 PEGrhG-CSF 后的
药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of single sc injection
of PEGrhG-CSF to cancer patients at various
doses ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

参 数	单 位	不同剂量 PEGrhG-CSF/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
		30	60	100	200
A	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	123.9 $\pm$ 47.5	210.1 $\pm$ 68.4	610.1 $\pm$ 265.5	1 279.2 $\pm$ 205.8
$t_{1/2\text{ke}}$	h	47.8 $\pm$ 7.3	49.8 $\pm$ 6.9	45.7 $\pm$ 9.6	44.6 $\pm$ 6.3
t_{max}	h	21.0 $\pm$ 6.0	24.0 $\pm$ 0.0	21.0 $\pm$ 6.0	42.0 $\pm$ 12.0
C_{max}	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	54.0 $\pm$ 10.8	129.0 $\pm$ 20.9	344.9 $\pm$ 73.4	828.9 $\pm$ 245.6
AUC	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	5 714 $\pm$ 786	12 781 $\pm$ 1 745	32 714 $\pm$ 6 486	85 142 $\pm$ 26 186
CL	$\text{mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	5.44 $\pm$ 0.86	5.06 $\pm$ 0.69	3.36 $\pm$ 0.35	3.31 $\pm$ 1.20

3 讨论

3.1 关于 ELISA 药盒:本实验所用 ELISA 药盒中的两株抗体是针对天然和重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的单克隆抗体组成,用药盒提供的标准品 rhG-CSF 作标准曲线能很好地重复出药盒说明书上的数据,标准品浓度的对数与吸光度值对数呈直线相关;但用该药盒测定本研究提供的 PEGrhG-CSF,相同质量浓度下所测定的 A 值均偏低,这可能与 PEG 大分子影响了抗 rhG-CSF 抗体的亲和力有关,造成对 PEGrhG-CSF 结合灵敏度的降

低;但基于两条标准曲线平行相关,说明该药盒没有改变测定 rhG-CSF 的本质,可以用于测定样品中的 PEGrhG-CSF。每次试验均用 PEGrhG-CSF 质控样品制备标准曲线,从而确保了血药浓度测定的准确性。另外,本方法的精密度和准确度,最低定量限以及特异性均能符合新药药动学的试验要求。

3.2 PEGrhG-CSF 临床药动学的特点:病人 sc 给予 PEGrhG-CSF 后,4 个剂量组的消除相半衰期($t_{1/2\text{ke}}$)差异不大,组间平均半衰期为 47.0 h (44.6 ~ 49.8 h); C_{max} 和 AUC 随给药剂量的增大而增大,CL 随剂量增大有降低的趋势, t_{max} 在 30 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量范围内基本一致,而高剂量组 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 则明显延长。病人化疗后 48 h 单次 sc 给予 PEGrhG-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后血药浓度变化与中性粒细胞提升的关系如图 2 所示,化疗后病人先经历 3 d 由于化疗而自身动员中性粒细胞的升高期后,从化疗后第 3 天(给药次日)起开始下降,到化疗后第 6 天(药后 4 d)降到低谷 ($3.00 \times 10^9/\text{L}$),该期间血液中 PEGrhG-CSF 一直维持在较高的质量浓度;药后 5 ~ 7 d 中性粒细胞开始持续上升,在第 7 天达峰值 $11.59 \times 10^9/\text{L}$;此时 PEGrhG-CSF 的血药浓度开始很快下降,提示 PEGrhG-CSF 在血液中的清除受中性粒细胞的介导,这与非 PEG 化的 rhG-CSF 主要是通过肾小球滤过被清除的机制不尽相同,该结果与文献报道基本一致^[12]。

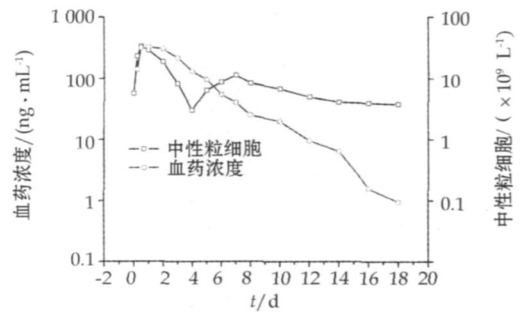


图 2 癌症患者 sc PEGrhG-CSF (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 后的
血药浓度与中性粒细胞变化关系

Fig. 2 Relationship between mean serum level and ANC's
by sc injection of PEGrhG-CSF (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
to cancer patients

3.3 与非 PEG 化 rhG-CSF 比较:津恤力是山东格兰百克生物制药有限公司上市的非 PEG 化的 rhG-CSF 产品,其血液消除半衰期为 3.5 h,血液清除率为 30 $\text{mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$,临床上用 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量,需要每天注射 1 次^[13];PEG 化后的本品在血液中的清除半衰期明显延长(平均半衰期为 47.0 h),清除率

明显减慢 [平均清除率为 $4.29 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]。根据文献报道^[14], 当 PEGrhG-CSF 剂量为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 一周只需要 sc 1 次, 就可以达到持续升高中性粒细胞的临床效果; 与每天注射 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的 rhG-CSF, 连续注射 1 周的效果相同。本实验结果也证明了这一长效作用。

3.4 与国外同类产品 Pegfilgrastim 比较: Pegfilgrastim (PEG 化重组人粒细胞集落刺激因子) 是美国 Amgen 公司的同类产品。据文献报道^[15,16], 3 例临床非小细胞肺癌病人化疗后 24 h 按 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量单次 sc Pegfilgrastim 后的平均半衰期为 33.2 h ($30.3 \sim 53.8 \text{ h}$), 平均清除率为 $14.0 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$ [$4.2 \sim 15.8 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]; 而本实验 4 例病人化疗后 48 h 单次 sc 同剂量 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) PEGrhG-CSF, 平均半衰期为 45.7 h ($34.7 \sim 58.2 \text{ h}$), 平均清除率为 $3.36 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$ [$2.96 \sim 3.67 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]。两者比较, 本实验结果的半衰期更长, 清除率更低, 这可能是个体差异或药物本身差异所致, 其所显示的更强的长效和临床意义有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Kuwabara T, Kato Y, Kobayashi S, et al. Nonlinear pharmacokinetics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor derivative species differences among rats, monkeys and humans [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271(3): 1535-1543.
- [2] Tanaka H, Satake-Ishikawa R, Ishikawa M, et al. Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(14): 3710-3714.
- [3] Morstyn G, Foote M A, Walker T, et al. Filgrastim (r-metHuG-CSF) in the 21st century: SD/01 [J]. *Acta Haematol*, 2001, 105(3): 151-155.
- [4] Takahashi M, Yoshizama H, Tanaka H, et al. A phase I dose escalation study of multicyclic, dose-intensive chemotherapy with peripheral blood stem cell support for small cell lung cancer [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25(1): 5-11.
- [5] Vose J M, Crump M, Lazarus H. Randomized, multicenter, open-label study of pegfilgrastim compared with daily filgrastim after chemotherapy for lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(3): 514-519.
- [6] Greenwald R B, Choe Y H, McGuire J, et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(2): 217-250.
- [7] Greenwald R B, Zhao H, Xia J, et al. Poly (ethylene glycol) transport forms of vancomycin: a long-lived continuous release delivery system [J]. *J Med Chem*, 2003, 46(23): 5021-5030.
- [8] Zhao H, Greenwald R B, Reddy P, et al. A new platform for oligonucleotide delivery utilizing the PEG prodrug approach [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(4): 758-766.
- [9] Yang B B, Kido A, Shibata A. Serum pegfilgrastim concentrations during recovery of absolute neutrophil count in patients with cancer receiving pegfilgrastim pegfilgrastim after chemotherapy [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(10): 1387-1393.
- [10] 蔡永明, 孙超渊, 李 铭, 等. 酶联免疫法研究天花粉蛋白突变体在猕猴体内的药理学 [J]. *中草药*, 2006, 37(3): 402-405.
- [11] 化学药物临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2005.
- [12] 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.
- [13] Johnston E, Crawford J, Blackwell S, et al. Randomized dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(13): 2522-2528.
- [14] Van Der Auwera P, Platzer E, Xu Z X, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of single doses of subcutaneous pegylated human G-CSF mutant (Ro 25-8315) in healthy volunteers: comparison with single and multiple daily doses of filgrastim [J]. *Am J Hematol*, 2001, 66(4): 245-251.
- [15] Zamboni W C. Pharmacokinetics of pegfilgrastim [J]. *Pharmacotherapy*, 2003, 23(8): 9-14.
- [16] Green M D, Koelbl H, Baselga J, et al. A randomized double-blind multicenter phase study of fixed-dose single-administration pegfilgrastim versus daily filgrastim in patients receiving myelosuppressive chemotherapy [J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(1): 29-35.

红花注射液对肝星状细胞 HSC-T6 增殖、凋亡及凋亡相关基因表达的影响

刘 珺, 徐选福, 杨文娟, 郭传勇*

(同济大学附属第十人民医院 消化科, 上海 200072)

摘要:目的 研究红花注射液对肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) HSC-T6 增殖、凋亡及凋亡相关基因 bcl-2 及 bax mRNA 表达的影响。方法 体外培养 HSC 株, 用不同质量浓度的红花注射液处理 HSC-T6, 采用

* 收稿日期: 2008-10-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973 计划”资助项目 (2006CB504810); 上海市自然科学基金资助项目 (06ER14090)

作者简介: 刘 珺 (1982—), 女, 山西省洪洞县人, 博士, 讲师, 研究方向为中西医结合消化系统疾病诊治。

Tel: 13816951240 E-mail: liujun19820124@yahoo.com.cn

* 通讯作者 郭传勇 E-mail: guochuanrong@sina.com