

抗体夹心酶联免疫吸附法测定重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶及药代动力学研究

陈建华¹, 吴梧桐^{1*}, 平野和行²

(1. 中国药科大学 分子生物学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 岐阜药科大学 药剂学实验室, 日本 岐阜 502 - 8585)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶的抗体夹心酶联免疫吸附测定法, 并进行药代动力学研究。方法 应用重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶免疫家兔, 分离 IgG, 用 DEAE 纤维素柱色谱纯化, 辣根过氧化物酶标记抗体, 建立抗体夹心酶联免疫吸附法, 测定大鼠血浆中重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶浓度。结果 方法的线性范围为 1 ~ 64 U·L⁻¹, 血药浓度与时间的关系符合二房室模型, 初期和末端的 $T_{1/2}$ 分别为 0.50 ~ 0.57 h 和 2.45 ~ 3.02 h, AUC 与剂量成正比。结论 建立的抗体夹心酶联免疫吸附法在灵敏度、特异性、线性范围、精密度和回收率等方面, 满足药代动力学研究要求。实验方法和重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶在大鼠中的药代动力学参数为临床研究提供了手段和依据。

关键词: 重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶; 辣根过氧化物酶标记抗体; 抗体夹心酶联免疫吸附法; 药代动力学

中图分类号: R917.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)08 - 0613 - 04

Antibody sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay for determination of recombinant *E. coli* L-asparaginase in rat plasma and its pharmacokinetics

CHEN Jian-hua¹, WU Wu-tong^{1*}, HIRANO Kazuyuki²

(1. Department of Molecular Biology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Laboratory of Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University, Gifu 502 - 8585, Japan)

Abstract: **Aim** To establish antibody sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay for determination of recombinant *E. coli* L-asparaginase in rat plasma and study its pharmacokinetics. **Methods** A Japanese white rabbit was immunized with recombinant *E. coli* L-asparaginase. Immunoglobulin G was separated and purified by using DEAE-cellulose chromatography. Conjugation of horseradish peroxidase to immunoglobulin G was obtained using the two-step glutaraldehyde method. Recombinant *E. coli* L-asparaginase protein in plasma was measured by antibody sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay. Pharmacokinetic parameters were assessed with model-dependent method. **Results** The linearities was 1 - 64 U·L⁻¹. Concentration-time profile after iv of 1.250, 2.50, 5.00 kU·kg⁻¹ of recombinant *E. coli* L-asparaginase fitted with a two-compartment model. The first and terminal elimination $T_{1/2}$ were 0.50 - 0.57 h and 2.45 - 3.02 h, respectively. The AUC was linearly related to the doses. **Conclusion** Antibody sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay was constant, reliable, sensitive, and suitable for the determination of recombinant L-asparaginase. Pharmacokinetics of recombinant *E. coli* L-asparaginase in rats is warranted for the design of future clinical trails.

Key words: recombinant *E. coli* L-asparaginase; IgG conjugated horseradish peroxidase; antibody sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay; pharmacokinetics

收稿日期: 2002-10-08.

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目(96 - 902 - 01 - 25).

* 通讯作者 Tel: Tel:86 - 25 - 3305360, Fax:86 - 25 - 3321714, E-mail: wwtong@mailbox.cpu.edu.cn

L-天冬酰胺酶(*L*-asparagine hydrolase, E.C.3.5.1.1)催化水解 *L*-天冬酰胺生成 *L*-天冬氨酸和氨,从而导致某些缺乏天冬酰胺合成酶的肿瘤细胞蛋白质合成障碍,选择性地杀死肿瘤细胞,临床用于治疗急性白血病、恶性淋巴瘤。治疗用 *L*-天冬酰胺酶来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)和欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)。重组 *E. coli* pKA/CPU 210009 能高效表达 *L*-天冬酰胺酶^[1,2],为我国工业化生产 *L*-天冬酰胺酶开辟了新路。*L*-天冬酰胺酶同位素标记示踪分析和酶活性分析的药代动力学研究已有报道^[3,4],但由于酶活性检测受灵敏度制约,而同位素标记示踪分析不能进行人体药代动力学研究,因此,本文用重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶免疫家兔,制备抗体,首次将辣根过氧化物酶标记重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶抗体,建立了抗体夹心酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA),用于测定大鼠血浆中重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶,并进行了药代动力学研究,此法及实验结果为重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶临床研究提供了手段和依据。

材料和方法

试剂和仪器 重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶由中国药科大学生化教研室提供,SDS-PAGE 用 RP-HPLC 检测,纯度大于 99%,酶的比活力为 $160.5 \text{ kU} \cdot \text{g}^{-1}$,辣根过氧化物酶、完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂购自 Sigma 公司。包被缓冲液: $0.015 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 9.6 碳酸盐缓冲液;洗涤缓冲液:磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲液),含 0.05% Tween-20;封闭缓冲液:PBS 缓冲液,含 0.05% Tween-20 和 0.5% 牛血清白蛋白。微量滴定板(Nalge Nunc International, Denmark),微量滴定板读数仪(Microplate Reader, MTP-120, Corona Electric, Japan)。

实验动物 日本种家兔由 Nippon Biosupp. Center 提供;Std: Wistar 大鼠购自日本 エスエルシ 株式会社,体重(150~200)g,9 周龄。动物购买后饲养 4 d 以上用于实验,环境温度(23.0 ± 2.0) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为(60 ± 10)%,灯光昼夜交替,自由进食和饮水。

重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶的抗体制备 将重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶冻干制剂溶于 PBS 缓冲液中,制备成乳剂。采用多点注射法免疫日本种家兔,每隔 2 周加强免疫 1 次,第 4 次加强免疫,检测抗体效价,达到预期效价后,第 8 周从颈动脉采血,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,离心后的血清加饱和硫酸铵沉淀,透析除盐。透析液经 DEAE-纤维柱色谱分离纯化免疫球蛋白 G

(immunoglobulin G, IgG),分部收集,于 280 nm 处测吸光度,合并蛋白含量高的组分备用。

辣根过氧化物酶标记抗体^[5] 辣根过氧化物酶溶于 1.25% 戊二醛溶液,室温反应过夜。经 Sephadex G-25 色谱,加入纯化的抗体交联。反应液用 Sephacryl S-300 色谱,分离酶标抗体、未标记抗体和辣根过氧化物酶。分部收集,测定各收集管 280 nm 处吸光度。

辣根过氧化物酶活性检测 从分部收集的各管中取适量于微量滴定板中,补充 PBS 缓冲液 150 μL ,再加入反应底物邻苯二胺 50 μL ,反应 3 min,加入 $2.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液 50 μL 终止反应,应用微量滴定板读数仪按 492 nm 吸光度减去 415 nm 吸光度差分法自动读取吸光度。

辣根过氧化物酶标记抗体酶活性检测 重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶溶于包被缓冲液中,包被于 96 孔微量滴定板各孔中,洗涤缓冲液洗涤。从 Sephacryl S-300 色谱分部收集的各管中,吸取适量分别加入上述各孔中,温育后再洗涤。加入底物邻苯二胺反应, H_2SO_4 溶液终止反应,测定吸光值。收集标记的抗体酶活性最高的组份分装保存备用。

交叉连续稀释法确定抗体夹心 ELISA 最佳试剂浓度^[6] 在 96 孔微量滴定板各孔中,分别包被质量浓度为 20,50 和 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶抗体。洗涤后在 $1 \sim 250 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别加入按等比梯度稀释的重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶溶液,温育后洗涤,加入按 1:50,1:100,1:200,1:400 和 1:800 稀释的酶标抗体,温育后洗涤,加入反应底物,终止反应后测定各孔吸光度,选择合适反应试剂浓度。

大鼠血浆中重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶检测标准曲线的制备 取 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗体 80 μL 包被 96 孔微量滴定板,分别加入含正常大鼠血浆浓度为 64,32,16,8,4,2,1 和 $0 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶溶液温育,洗涤后加入按 1:50 稀释的酶标抗体溶液,温育洗涤后,加入反应底物,终止反应后检测。

大鼠血浆中重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶回收率测定 用正常大鼠血浆配制成浓度为 32,16,8 和 $4 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶溶液各 6 份,用抗体夹心 ELISA 法检测,计算回收率。

大鼠血浆中重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶精密度测定 用正常大鼠血浆配制成 64,32,16,8,4,2,1 和 $0 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的重组 *E. coli* *L*-天冬酰胺酶溶液各 6 份,用抗体夹心 ELISA 法检测,进行日内精密度实验。

药代动力学研究 参照药效学、毒理学试验,设

置高、中、低 3 个剂量组(5.00, 2.50, 1.25 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$), 注射体积为 $2.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重。大鼠随机分成 3 组, 每组 3 只, iv 后 10 min, 0.5, 1, 2, 4, 8 和 12 h, 从尾静脉用肝素化的毛细管 (heparinized capillary tube, made by Drummond Scientific Co. USA) 采血, 离心收集血浆, 每份样品立即用抗体夹心 ELISA 法检测。每块微量滴定板在测定血浆样品的同时都作 2 条标准曲线, 若所测标准曲线拟合线性欠佳 ($r < 0.98$), 则该板结果作废。所得血药浓度-时间曲线, 用 3P87 实用药动学程序估算药动学参数。

结果

1 重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶抗体 IgG 的制备

等体积的重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶和福氏佐剂混合制备乳剂, 第 4 次加强免疫 1 周后从兔颈动脉采血, 制备的抗血清, 经硫酸铵沉淀, 透析, 粗提液采用 DEAE 纤维素柱色谱分离纯化 IgG, 收集、合并洗脱峰组分, 用紫外分光光度法定量, IgG 的质量浓度为 $69.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 辣根过氧化物酶标记抗体的制备

戊二醛作为双活性试剂先与辣根过氧化物酶反应, 再与 IgG 交联, 生成酶标抗体。Sephacryl S-300 柱色谱分离的各组蛋白紫外检测, 酶标抗体检测, 辣根过氧化物酶检测结果表明, 交联反应液通过 Sephacryl S-300 色谱, 辣根过氧化物酶和酶标抗体可被完全分开, 合并酶标抗体活性高的组分, 用于大鼠血浆中重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶浓度测定。

3 抗体夹心 ELISA 法

3.1 抗体夹心 ELISA 法的建立 交叉连续稀释法选择抗体夹心 ELISA 中, 抗体、酶标抗体最佳浓度, 重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶测定线性范围的结果表明, 包被 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶抗体, 重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶浓度检测范围为 $1 \sim 64 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, 酶标抗体 1:50, 1:100, 1:200 稀释, 都有良好的线性。考虑到血浆在样品检测中对抗原、抗体结合速率的影响, 选择按 1:50 稀释的酶标抗体浓度。

3.2 大鼠血浆中重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶检测的标准曲线、灵敏度、回收率、精密度 以浓度为 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗体包被 96 孔微量滴定板, 分别加入含正常大鼠血浆浓度为 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 和 $0 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶, 再加入 1:50 稀释度的酶标抗体, 加入底物后检测, 利用样品吸收率 A 对样品浓度 C 作直线回归, 得标准曲线方程 $A = 0.023 C + 0.002$, $r = 0.997$, 线性范围 $1 \sim 64 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。灵敏度为

$0.4 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

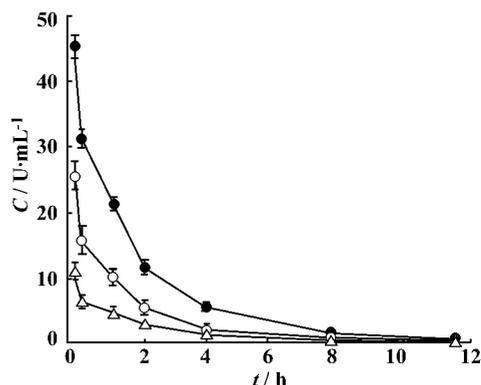
测定大鼠血浆中重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶 32, 16, 8 和 $4 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 种浓度, $n = 6$, 平均回收率为 106.7%。

大鼠血浆中重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 和 $0 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 日内精密度 6 次重复测定相关系数 $r > 0.991$, 批内 RSD 在检测线性范围(0.3 ~ 12)%。空白对照样品的吸收值在 0.012 ~ 0.015, 未见空白血浆结合干扰, 因而该方法具有良好的特异性。

以上方法学可靠性考察结果表明, 实验所建立的抗体夹心 ELISA 法检测重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶的线性范围、灵敏度、特异性、回收率和精密度, 满足药代动力学研究要求。

4 重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶在大鼠体内的药代动力学

大鼠 iv 5.00, 2.50 和 $1.25 \text{ kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 种剂量的重组 *E. coli L*-天冬酰胺酶的血药浓度-时间曲线见图 1。血药浓度-时间数据经实用药动学软件 3P87 拟合, 符合二房室模型, 其动力学参数见表 1。



●—● $5.00 \text{ kU}\cdot\text{kg}^{-1}$; ○—○ $2.50 \text{ kU}\cdot\text{kg}^{-1}$; △—△ $1.25 \text{ kU}\cdot\text{kg}^{-1}$

Figure 1 Concentration-time curves of recombinant *E. coli L*-asparaginase in plasma samples of rats after iv administration ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters for recombinant *E. coli L*-asparaginase in plasma after iv administration ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Dose/ $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$		
	5.00	2.50	1.25
$T_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.56 ± 0.11	0.56 ± 0.15	0.6 ± 0.3
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	2.45 ± 0.08	2.7 ± 0.4	3.0 ± 1.2
K_{21}/h^{-1}	0.58 ± 0.08	0.54 ± 0.23	0.6 ± 0.4
K_{10}/h^{-1}	0.62 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.62 ± 0.06
K_{12}/h^{-1}	0.36 ± 0.08	0.36 ± 0.15	0.5 ± 0.4
$\text{AUC}/\text{kU}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	85 ± 4	43 ± 5	21 ± 4
$\text{CL}_s/\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	59 ± 3	58 ± 6	61 ± 12
$V_c/\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$	95.5 ± 1.2	90 ± 12	101 ± 28

讨论

蛋白质多肽类药物药代动力学分析方法主要有生物检定法、免疫学方法、同位素标记示踪法和色谱法^[6]。目前色谱法除了仪器本身价格昂贵,分析成本高外,技术上亦存在一些问题,因而尚处于起步阶段。本文通过抗体制备、酶标抗体,建立了检测重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶抗体夹心 ELISA 法,测定方法的线性范围为 $1 \sim 64 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,平均回收率为 107.4%,灵敏度为 $0.4 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,批内 RSD 在检测线性范围在 (0.3 ~ 12)%,未见空白血浆对检测的干扰,该方法灵敏、简便,适于批处理。方法学可靠性检测结果表明,建立的抗体夹心 ELISA 法检测重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶的灵敏度、特异性、线性范围、精密度和回收率,满足了药代动力学研究要求。其方法学为重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶临床研究以及其他新的蛋白质多肽类药物的药代动力学免疫学分析提供了手段。

应用所建立的抗体夹心 ELISA 法,检测静脉注射大鼠血浆中 3 种剂量重组 *E. coli* L-天冬酰胺酶浓度,血药浓度与时间的关系符合二房室模型,初期和末端的 $T_{1/2}$ 分别为 0.50 ~ 0.57 h 和 2.45 ~ 3.02 h, AUC 与剂量成正比。

致谢: 本课题得到了岐阜药科大学药剂教研室白井茂之博士、真由美好子博士的帮助。

References:

- [1] Li J, Liu JJ, Wu WT, *et al.* Molecular cloning and expression of ansB, the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 1995, 2(4): 8 - 15.
- [2] Liu JJ, Li J, Wu WT, *et al.* High expression of the asparaginase II gene of *Escherichia coli* [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27(11): 696 - 700.
- [3] Benbough JE, Wiblin CN, Rafter TNA, *et al.* The effect of chemical modification of L-asparaginase on its persistence in circulating blood of animals [J]. *Biochem Pharmacol*, 1979, 28(6): 833 - 839.
- [4] Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubiger DL, *et al.* L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans [J]. *Cancer Res* 1981, 41(11): 4554 - 4558.
- [5] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology* [M]. 3rd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- [6] Zhang Q, Wang GJ. The progress of the analysis method of protein polypeptide drug pharmacokinetics [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2000, 7(2): 126 - 128.