

结直肠癌特异性结合多肽 CP1564 的药代动力学研究

LCMSMS-204

摘要：建立一种测定小鼠血浆及尿液中的多肽类药物 CP1564 的超高效液相色谱串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 并比较正常小鼠和肿瘤模型小鼠之间的药代动力学差异。样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离多肽类药物 CP1564，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。比对 ICR 小鼠与 Balb/c 小鼠之间的种属差异，以及 Balb/c 小鼠与 Balb/c 诱导肿瘤小鼠在代谢上的差异。

关键词：结直肠癌 特异性结合 多肽类药物 CP1564 代谢动力学研究 超高效液相色谱串联质谱法

世界范围内结直肠癌是一种严重威胁人类健康的疾病，长期处于常见恶性肿瘤的前三位；而在我国，由于生活习惯的改变，近年来结直肠癌的发病率也呈现走高的趋势，2014 年报告结直肠癌已位于常见恶性肿瘤的第三位，国际上公认的原则是能够尽早地发现微小肿瘤原发灶，这些都充分证明了早期诊断的重要性。我们前期通过体内噬菌体展示技术发现了一种可以与结直肠癌组织血管系统特异性结合的小分子多肽 CP1564 (CTPSPFSHC)，与正常组织的血管不结合，500 nmol/只剂量携带荧光分子 FITC 的 CP1564 可发现小至 2mm 的微小结直肠肿瘤。

认识药物的代谢特征对于保证用药的安全和有效是至关重要的。多肽药物在结构和作用机理上不同于传统药物，有其自己独特的处置行为及代谢机理。研究多肽药物的代谢特征具有较大的挑战，对于药物代谢领域的发展具有较大意义和价值，我们开展了 CP1564 在 ICR 小鼠及 Balb/c 小鼠体内的药代动力学研究。

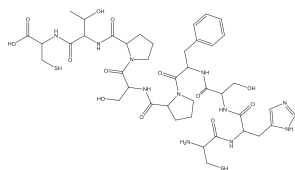


图1 多肽类药物CP1564结构式

实验部分

1.1 药物

CTPSPFSHC (CP1564) 及内标 TPSPFSH (TH-7) 由上海吉尔生化提供。

1.2 动物

ICR 雄性小鼠 (SPF 级)、Balb/c 雄性小鼠、及 Balb/c 诱导肿瘤小鼠，实验前小鼠 12 h 禁食，但自由饮水。

1.3 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站；AG-135 电子天平 (瑞士 Mettler 公司)；XW-80A 型微型漩涡混合仪 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司)；TH2-100 型恒温培养摇床 (上海一恒科技有限公司)；氮气吹扫仪 MD200-2 (杭州奥盛仪器有限公司)；Heraeus Pico 21 离心机 (Thermo Scientific, 德国)。

1.4 试剂

乙腈购自美国 Fisher 公司 (Fairlawn, NJ, USA); 实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 经去离子与二次净化制得; 甲酸 (纯度 99%, Wako, Japan); 其余试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

■ 方法和结果

2.1 对照品溶液及内标溶液的配制

由于 CP1564 在小鼠体内的浓度变化范围较大, 需建立两套方法学。超纯水配 2 mg/mL CP1564 储备液, 依次用超纯水稀释等到 CP1564 工作液 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/mL, 用于 CP1564 处于低浓度范围时检测; 10, 50, 100, 400, 800, 1600 µg/mL 用于 CP1564 处于高浓度范围时检测。0.02, 1, 8, 10, 150, 1500 µg/mL 溶液用于质控样品制备。内标溶液浓度配制为 10 µg/mL。

2.2 标准曲线与质控样品的配制

空白血浆 / 尿液与以上工作液混合, 使得最终样本中 CP1564 浓度为 0.5, 1, 5, 10, 40, 80, 160 µg/mL, 质控样本中 CP1564 浓度分别为 1, 15, 150 µg/mL (用于高浓度 CP1564 含量); 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/mL, 质控样本中 CP1564 浓度分别为 2, 100, 800 ng/mL (用于低浓度 CP1564 含量)。内标为 5 µg/mL。

2.3 生物样品处理方法

取 10 µL 尿液, 加 5 µL IS (10 µg/mL), 加 50 µL 乙腈沉淀蛋白后, 旋转 30 s 混匀, 14800 rpm 离心 5 min 取上清液, 氮气吹干。取上清 2 µL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 色谱条件

色谱柱采用岛津 Shim-pack XR-ODSII 75 mm×2 mm, 2.2 µm
 色谱条件为流动相: 水 (0.1% 甲酸) - 甲醇 (0.1% 甲酸);
 梯度: 0 min, 85:15; 1.50 min, 85:15; 3 min, 40:60; 4.00 min, 40:60; 4.01 min, 85:15; 5.00 min, 85:15;
 流速: 0.3 mL/min;
 柱温: 40°C;
 进样量: 2 µL

质谱条件

离子化模式: ESI(+)
 离子喷雾电压: 4.5 kV
 雾化气: 氮气 3.0 L/min
 干燥气: 氮气 15 L/min
 碰撞气: 氦气
 DL 温度: 300°C
 加热模块温度: 450°C
 扫描模式: 多反应监测 (MRM)
 驻留时间: 100 ms
 延迟时间: 3 ms
 MRM 参数: 见表 1

表1 MRM优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
CP1564 [M+2H] ²⁺	488.70	70.10	-18.0	-49.0	-29.0
		109.95*	-18.0	-53.0	-19.0
I.S.	386.70	70.00*	-27.0	-45.0	-28.0

*为定量离子对

2.5 方法学考察

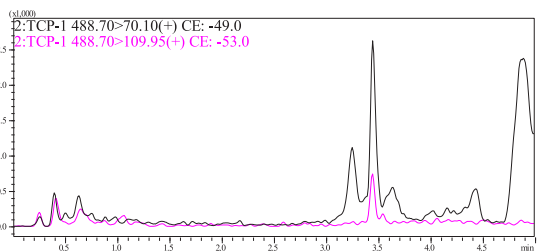


图2 小鼠尿液1 ng/mL色谱图

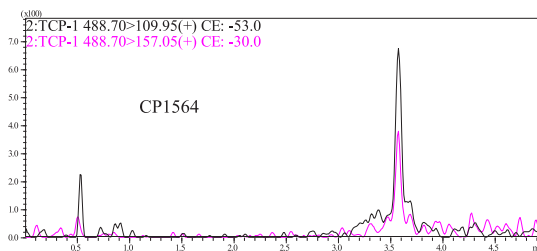


图3 小鼠血浆1 ng/mL色谱图

方法学遵照应用报告 LCMSMS-190 及应用报告 LCMSMS-191 相关数据。

2.6 肿瘤诱导



图4 Balb/c 小鼠诱导肿瘤

于肛门处注射结直肠癌肿瘤细胞 colon 26, 约 2×10^6 cell, 200 μ L。约10天后, 肉眼可见Balb/c 小鼠肛门处肿块结节, 瘤率达95%以上, 肿瘤成长约1 \times 1 cm, 可用于实验。

2.7 血浆动力学

对三种小鼠进行高中低三个浓度尾静脉注射给药 (50 mg/kg、25mg/kg、12.5mg/kg), 测定血浆中 CP1564 浓度。

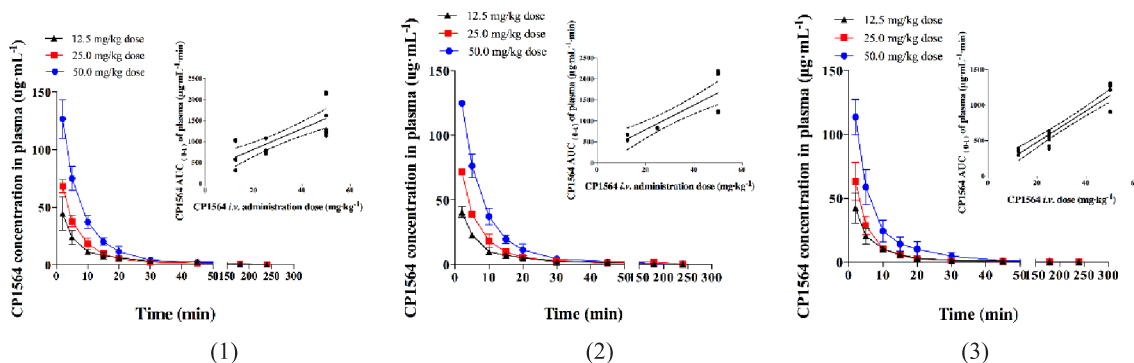


图5 三种小鼠模型血浆动力学曲线

(1) ICR 小鼠 (2) Balb/c 小鼠 (3) Balb/c 肿瘤小鼠

表2 三种小鼠三种剂量给药血浆动力学参数

Sample		T _{1/2} (min)	AUC _(0-∞) (ug/mL*min)	AUC _(0-t) (ug/mL*min)	C _{max} (μg/mL)	CLt (mL/min/kg)	Vz (mL/kg)
Species	Administration (mg/kg)						
ICR mice	12.5	30.33±11.25	668.90±291.00	668.86±291.02	44.45±14.27	22.56±10.67	1113.22±952.42
	25.0	29.72±12.43	851.20±154.87	850.60±155.24	68.35±5.52	30.14±5.08	1356.71±704.80
	50.0	27.37±5.94	1572.82±456.39	1572.78±456.39	126.78±16.87	34.00±9.00	1396.00±569.00
Balb/c mice	12.5	26.89±0.88	608.50±71.85	608.47±71.85	40.72±4.22	20.83±2.40	809.00±121.61
	25.0	29.20±15.29	838.03±17.84	835.63±17.86	71.61±1.30	25.67±4.80	1165.00±760.66
	50.0	24.77±4.91	1687.52±508.43	1687.49±508.43	124.48±2.47	32.00±10.00	1203.00±572.00
Tumor mice	12.5	45.51±17.26	358.42±33.58	357.96±34.35	36.58±9.60	35.17±3.60	2366.83±1203.31
	25.0	48.33±13.05	530.19±94.51	529.77±94.05	63.39±14.78	48.57±9.74	2624.50±504.62
	50.0	33.21±12.43	1152.11±184.58	1151.91±184.46	113.59±13.861	45.00±8.00	2086.00±648.00

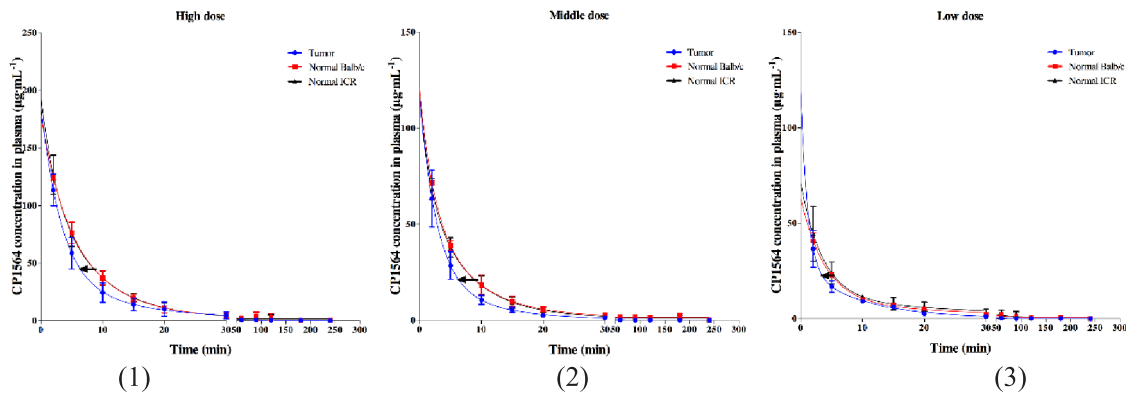


图6 三种模型同剂量药时曲线比较图
(1) 高剂量 (2) 中剂量 (3) 低剂量

CP-1564 在肿瘤模型鼠中的血浆药动力学特征与正常小鼠也表现出差异。如图 5-3 所示，三种剂量 CP-1564 平均血药浓度 - 时间曲线图均向左移动，三种剂量 CP-1564 在肿瘤模型鼠中的血浆暴露水平均较两种正常小鼠低。药代动力学参数 T_{1/2}, AUC, CLt, Vz 在肿瘤模型鼠与正常小鼠中表现出显著差异。

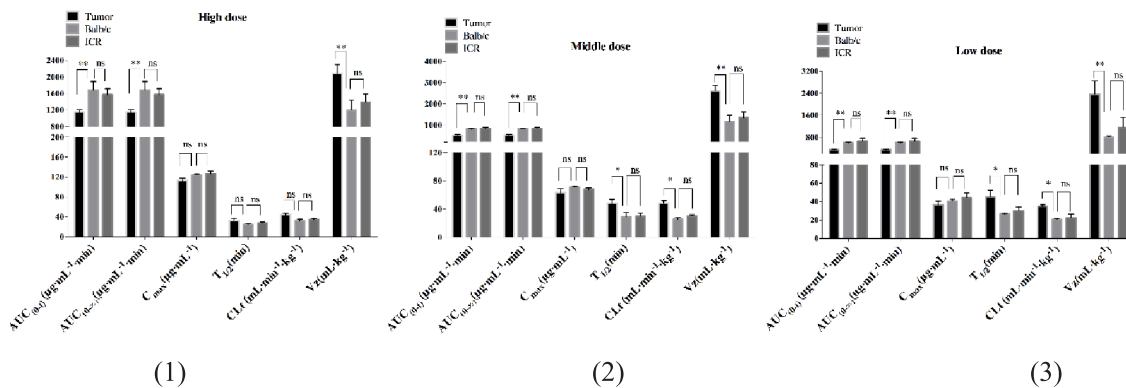


图7 三种模型同剂量动力学参数柱状分析
(1) 高剂量 (2) 中剂量 (3) 低剂量

CP-1564 肿瘤靶向性，会延长其体内滞留时间，血浆半衰期延长，约 40 min。CP-1564 与靶点结合，同样会加速 CP-1564 从血液转移至靶点，CP-1564 在肿瘤模型鼠中的血浆药时曲线下的面积 AUC 更低，三种给药剂量 CP-1564 的肿瘤小鼠 AUC 较正常小鼠下降 35%；血浆清除率 CLt 及表观分布容积 Vz 更大，约为正常小鼠的 2 倍。

2.8 排泄动力学

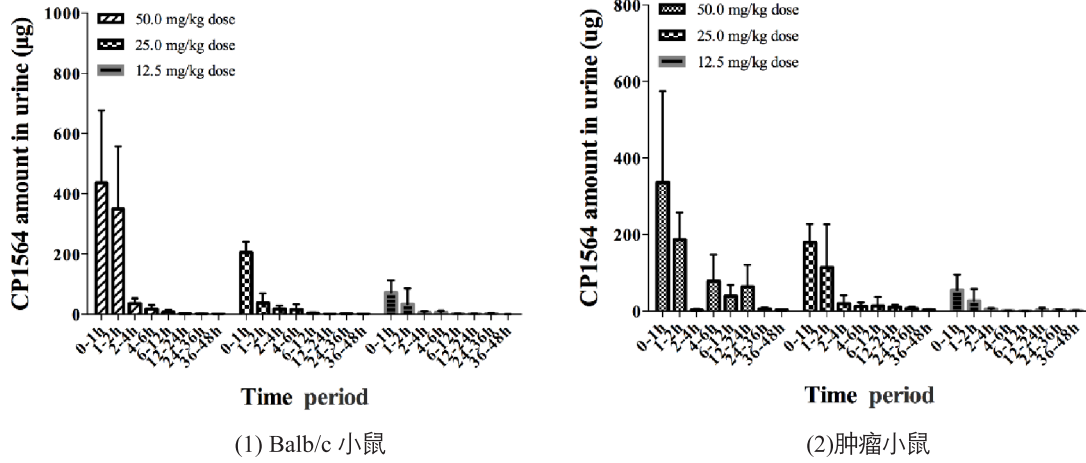


图8 三种剂量两种模型排泄动力学柱状分析

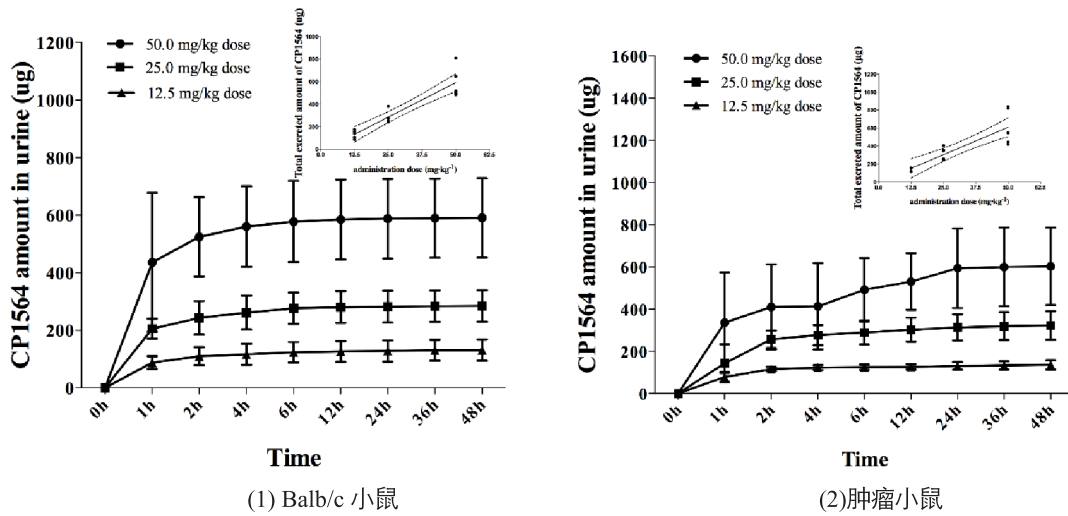


图9 三种剂量两种模型排泄动力学曲线分析

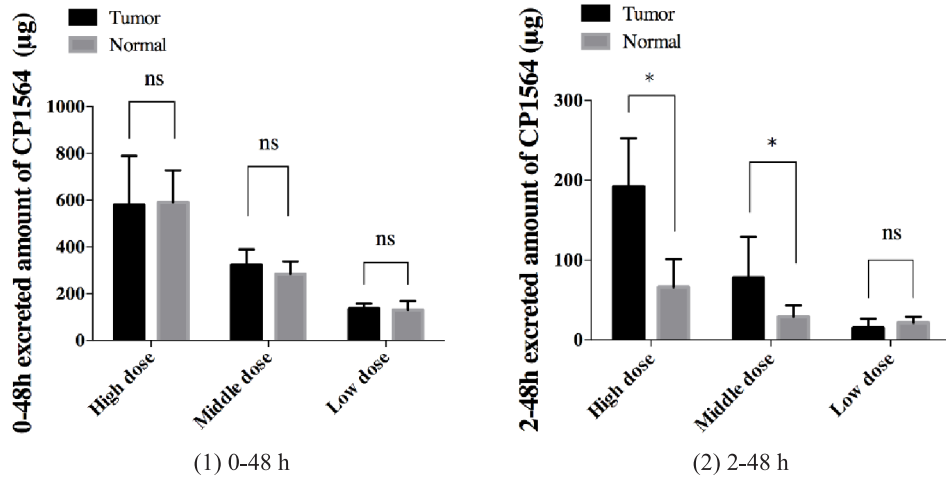


图10 三种剂量小鼠尾静脉给药CP1564自尿液排泄量比较

在肿瘤小鼠中，CP-1564 同样大部分以原型药物的形式自尿液快速排出体外。1 h 内大量排泄，48 h 排泄完毕，48h 内累计排泄量随给药剂量呈线性增大。三种给药剂量 CP-1564(12.5, 25, 及 50 mg/kg)，尿中回收到的原型药物分别为 53.34 ± 8.25 , 64.61 ± 13.48 及 $60.28 \pm 18.39\%$ ，48h 总的排泄量，肿瘤模型鼠和正常小鼠并未表现出差异。但由于 CP-1564 与肿瘤的相互作用，会延长其体内滞留时间，CP-1564 在肿瘤小鼠中 1 h 内的排泄量较正常小鼠低，CP-1564 在 2-48 h 的排泄量在肿瘤小鼠及正常小鼠中显示出显著差异。

2.9 组织分布

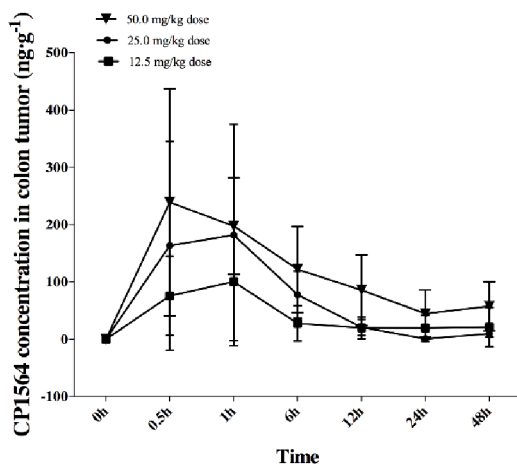


图11 肿瘤组织中CP1564量随时间变化

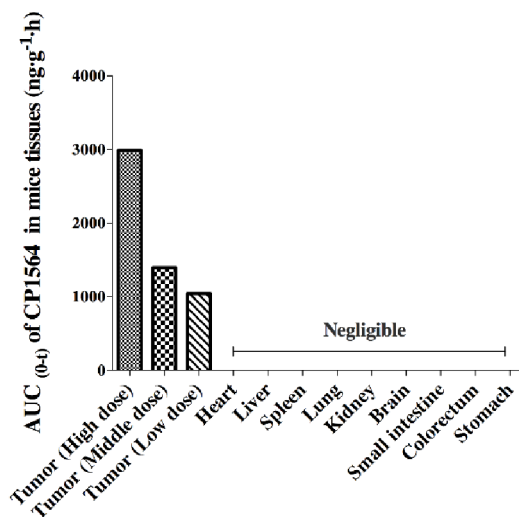


图12 CP1564在各组织器官中AUC比较

充分的灌注后，组织样品中测得的 CP-1564，是与组织高度结合的多肽。在正常小鼠体内各组织器官中，检测不到 CP-1564，表示 CP-1564 不与正常组织器官结合。在肿瘤小鼠体内，我们只能在肿瘤组织检测到 CP-1564，其余组织均检测不到 CP-1564。肿瘤小鼠尾静脉注射三种剂量 CP-1564 后，CP-1564 快速到达肿瘤部位，PK 曲线显示，CP-1564 在 30 min 内即可到达肿瘤部位（最早的样品采集点），在 1 h 达到峰值。AUC 及 C_{max} 均随给药剂量增大而增大。MRM 检测的 CP-1564 是与靶组织紧密结合的多肽，简单的乙腈沉淀前处理方法会将多肽随沉淀去除。含 10% 三氟乙酸 (TFA) 或三氯乙酸 (TCA) 的有机溶剂沉淀蛋白，将会使多肽同结合的蛋白大分子解离，能提高其检测灵敏度并更准确客观地反映在靶组织的分布。

结论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定小鼠尿液中多肽类药物 CP1564 的快速方法并进行了代谢研究。代谢研究表明 CP-1564 在肿瘤组织中随时间的含量变化与在血浆及尿液中的含量变化相比较，三种给药剂量 CP-1564，CP-1564 在 30 min 内自血浆迅速减少，靶向肿瘤组织，在肿瘤部位 1 h 内达到峰值。CP-1564 与肿瘤充分作用后，快速从肾脏自尿液排泄，绝大部分在 2 h 以原型药物形式从尿液回收。多肽 CP-1564 具有靶点介导的药物处置 (Target-mediated drug disposition, TMDD) 这一特殊性质，其体内药代动力学与其靶点的高度亲和力相关联。多肽 CP-1564 与他的靶点 (结直肠癌) 有高度的亲和力，这种相互作用将显著地反应在药物的体内药代动力学当中，导致 CP-1564 在肿瘤小鼠体内有更低的血浆暴露及更长的滞留时间。