

表面等离子共振技术测定药物与人血清白蛋白的相互作用

路萍萍^{1,2}, 孟志云¹, 王敏伟², 刘 婷^{1,2}, 王 欣¹, 毕学智¹,
田慧芳^{1,2}, 王 慧³, 窦桂芳^{1*}

(1. 军事医学科学院野战输血研究所药物代谢与药代动力学研究室, 北京 100850; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016; 3. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要: 目的 应用表面等离子共振技术(SPR)建立一种新的测定白蛋白与化合物相互作用的方法。方法 将人血清白蛋白(HSA)固定在CM5芯片表面。不同化合物的溶液流经固定于芯片表面的HSA, SPR显示在芯片表面的折射系数变化。分析软件处理数据,用HSA流通池得到的数据减去参比池得到的数据进行拟合,确定结合常数。结果 所有测试药物与固定的HSA可逆结合。紫草素1的平衡结合常数 K_A 为 $3000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。SPR样品需要量最小而且能够自动分析,还可以直接检测小分子(M_r 308~585)结合,使之适用于评价药物与HSA相互作用。结论 HSA主要的药物键合位点没有因为被固定到芯片表面而破坏。验证了SPR可以准确简易测定化合物的结合解离。

关键词: 表面等离子共振技术; 血清白蛋白; 药代动力学

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)02-0147-05

白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白,因此它对药物的分布的影响十分重要。许多化合物能够与白蛋白可逆性的结合。药物与白蛋白结合能力强,血

液中的游离浓度少,致使其生理活性低。当游离药物通过各种途径消除时,循环系统中的药物-蛋白结合物解离,补充游离药物,从而延长药物作用时间。因此,在目的生理活性和副作用的微妙平衡之间,药物的蛋白结合水平是一项重要的影响因素。

理想情况下,每一候选药物的游离浓度都应该在应用该药物的病人体内测量到。早期测定蛋白结合水平和其他药物代谢动力学参数,对药物开发很重要。因此需要简单测定蛋白结合水平的方法。目前常用的方法包括平衡透析法、超滤法、超速离心法、分光光度法、亲和与分子排阻色谱以及电泳法。这些方法或依赖于分离结合与游离的药物,或需要改变内部参数,例如蛋白迁移或药物蛋白结合物的电泳特性。为了使药物蛋白相互作用研究简单化,通常会使用单一的蛋白,如白蛋白或 α_1 糖蛋白单体代替血液或血浆^[1]。这些方法在筛选多药物的蛋白结合时非常有用。有报道,应用固定人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的高效液相色谱真实反映了药物与HSA的结合^[2]。

这些研究结果鼓励作者应用生物传感技术进行血浆蛋白亲和力分析。BIAcore系统由微型液体流动系统、传感器芯片和表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)光学检测系统3个核心部分组成^[3]。SPR是一种监测结合动力学非常有用的方法,称为表面等离子体共振技术。广泛应用于研究各种分子相互作用的特性,包括抗体-抗原结合、配基-受体结合以及蛋白和DNA、碳水化合物、小分子和其他蛋白的结合。生物传感技术的主要优点为^[4]:可以直接检测化合物的结合不用放射性标记,样品消耗量低、分析自动迅速。本实验基于单浓度样品测试,通过与参照化合物的对比测定目标化合物的亲和常数。

收稿日期: 2006-06-21 接受日期: 2006-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371669); “863”国家高科技研究发展项目(2003AA2Z347B); 国际科技合作重点项目(2005DFA30080); 北京市科技计划项目(Z0004105040131)

作者简介: 路萍萍(1979-),女,黑龙江伊春人,在读博士,主要从事单克隆抗体临床前评价的研究工作。

*联系作者 E-mail: douguifang@vip.sina.com Tel: (010)66932951 Fax: (010)66932951

1 材料与方法

1.1 药品、试剂、仪器

1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-dicaffeoylquinic acid, IBE5), 军事医学科学院放射医学研究所; 紫草素 1 (shikonin 1, AKJ1), 北京金本草中药科技有限公司; 17-烯丙胺基-17-脱甲氧基格尔德霉素[17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamyin, 17-AAG], 深圳生尔易美公司; 椒苯酮胺(pepper phentonamine, JBAT), 中国科学院药物研究所; 来福昔布(lefucosib, LEFU), 中国人民解放军 301 医院; 埃坡霉素(epothilone D, UTD1), 北京华昊中天生物技术公司; 华法林(warfarin), Sigma; 西格列他钠(chiglitazar, CS38) 与西达苯胺(chidamide, CS55), 深圳微芯生物科技有限公司; HSA, Sigma。N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS), N-乙基-N-二甲基-氨丙基碳二亚胺(N-ethyl-N-dimethylaminopropylcarbodiimide, EDC), 瑞士 BIAcore AB 公司。

BIAcore 3000 生物传感器, 瑞士 BIAcore AB 公司。CM5 传感芯片, 瑞士 BIAcore AB 公司。

1.2 芯片表面活化和白蛋白的耦联固化

按操作说明书将人血清白蛋白耦联固化于 CM5 传感芯片上。即用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDC 和 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NHS 活化 CM5 表面 7 min 后, HSA 样品用醋酸钠(pH 5.2) 稀释为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 耦联到 CM5 的 FC3 通道, HSA 进样 7min 后用乙醇胺封闭 7 min。最终固定水平为 19 000 反应单位(response unit, RU), 见图 1。活化条件相同但表面没有固定 HSA 的 FC2 通道设为空白参比。

1.3 样品测试

化合物用 DMSO 溶解为母液, 用 HBS ($\text{mmol} \cdot$

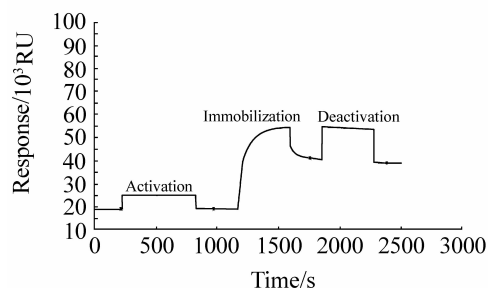


Fig 1. Immobilization of human serum albumin (HSA) on the surface of a sensor chip coated with a carboxymethyl dextran layer. The response generated from the ligand surface (flow cell 3) is shown as the curve. RU: response unit.

L^{-1} : HEPS 10; NaCl 150; EDTA 3) 稀释为 DMSO 含量不大于 3% 的样品溶液。化合物同时注入参比流通池和 HSA 流通池, 结合反应在 $22 \sim 24^\circ\text{C}$, pH 7.4 条件下进行, 流速为 $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。每个循环包括 1 min 的休息时间以监测基线稳定性, 2 min 注射样品, 1 min 解离期。AKJ1 亲和常数测定, 以 HBS 缓冲液系列稀释 AKJ1 为 197, 121, 68.4, 36.6 和 $3.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 将系列稀释 AKJ1 与耦联固化在芯片上的白蛋白反应。记录梯度浓度化合物的结合, 每一浓度重复测定 1 次。

1.4 数据处理

SPR 信号以信号图形式从 BIAcore 仪器传递到 BIAcore3000 控制软件中, Biaevaluation 分析软件处理数据, 用 HSA 流通池得到的数据减去参比池得到的数据进行拟合, 确定结合常数。

为了得到 K_D 值和饱和浓度的响应 (R_{\max}), 化合物不同浓度 (c) 的响应 (R_{eq}) 符合方程:

$$R_{\text{ep}}/M_r = cR_{\max}/(c + K_D) \quad (1)$$

公式中单位点结合的饱和水平 R_{\max} 值相同, R_{\max} 作为一个全局参数, 不同化合物的剂量-响应曲线用相同的 R_{\max} 分析, 而 K_D 作为一个局部参数对每个化合物是不同的。本实验中利用文献报道^[6] 的华法林的 K_D 和本实验数据计算 R_{\max} 作为全局参数计算其他化合物的 K_D 值。

应用结合百分比平衡方程对比用此方法测得的 K_D 值与本实验室得到数据的一致性:

$$[\text{HSA}] \times [\text{Drug}] / [\text{Drug complex}] = K_D \quad (2)$$

设定体内血清中白蛋白的浓度为 $0.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5], x 为总体药物浓度, p 为结合的百分比。方程 2 转化为:

$$(0.68 - xp) \times (x - xp) / xp = K_D \quad (3)$$

可以利用此公式计算已知结合百分比药物在某一浓度的亲和常数。

2 结果

2.1 固定人血清白蛋白的活性和稳定性

HSA 主要的药物键合位点没有因为被固定到芯片表面而破坏。所有测试药物与固定的 HSA 可逆结合。进样几秒钟范围内即可以取得稳态反应。

进样完毕药物解离迅速,信号立即回归基线。165 nmol·L⁻¹的华法林与 HSA 结合的响应为 45 RU。在作者测试的所有药物中,只有 17AAG 与 HSA 表面的结合能力较低,其他药物的结合能力与华法林相似。药物与 HSA 的结合强度随着时间的延长会有一定程度的下降,但不影响同一批样品的响应。

2.2 平衡常数的测定

图 2 是 AKJ1 的剂量-效应曲线。AKJ1 的响应规律经软件拟合显示单位点结合。AKJ1 与 HSA 芯片结合 3 min 后,用缓冲液洗涤,SPR 实时监测得到 AKJ1 和 HSA 结合解离的 SPR-时间变化曲线。由 AKJ1 与 HSA 的结合和解离过程可见 AKJ1 与 HSA 的初期结合迅速,但随时间延长而减缓,洗涤时 AKJ1 的解离相对缓慢。分析软件根据不同浓度响

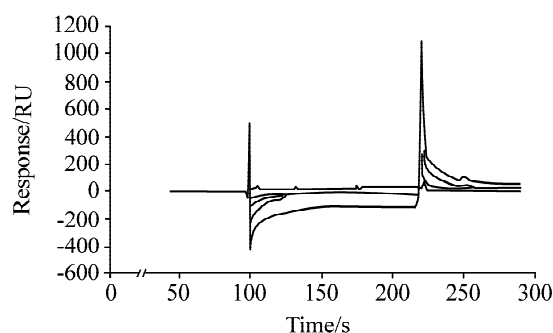


Fig 2. Overlaid sensorgrams of 197, 121, 68.4, 36.6 and 3.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AKJ1 flowed over the HSA surface.

应的变化计算 AKJ1 与 HSA 的结合速率 $k_a = 8.17 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$;解离速率 $k_d = 2.72 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$;平衡解离常数 $K_D = k_d/k_a = 0.33 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,平衡结合常数 $K_A = 3000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

2.3 高通量测定化合物与人血清白蛋白的相互作用

用高通量的方法分析解离常数,选定的药物浓度高到可以给出合理的响应信号,同时也低到可以避免药物与多个 HSA 结合位点结合。他们的分子量范围在 308 ~ 585 之间,之前用平衡透析法测定这些化合物与 HSA 结合水平在 80% ~ 99.9% 之间。为了得到不同化合物的结合解离常数,用单结合位点模型拟合数据。采用方程 1 限定最大反应 (R_{\max}) 为整体参数而 K_D 为局部参数。HSA 固定当天 BIAcore 测定的解离常数和本实验室测定的解离常数见表 1,亲和力范围在 0.23 ~ 85.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,证明整体拟和方程可以用于确定 100 倍范围的亲和力。

2.4 表面等离子共振技术测定的结合百分比与其他方法的相关性

平衡解离常数与结合百分比之间的转换需要应用质量守恒定律同时假定化合物与 HSA 的结合比例为 1:1,作者应用方程 3 将 SPR 测定的 K_D 转换为结合百分比。假设 HSA 的浓度为 0.68 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,药物浓度为 0.165 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用 SPR 取得化合物的百分比与其他方法的结果见表 1,说明用 SPR 方法测定化合物与 HSA 结合百分比的可行性。为了

Tab 1. Comparison of percent bound and corresponding K_D from the equilibrium expression of our laboratory data, with K_D obtained with biosensor analysis

Drug	Biosensor analysis			Ultrafiltration method		
	RU	Percentage of bound/%	^a $K_D/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$x/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Percentage of bound/%	^b $K_D/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
AAG	9.1	88.7	85.91	0.427	94.3	41.16
CS55	30.9	97.6	16.74	0.385	98.1	13.16
JBAT	49.8	98.6	9.33	0.283	>99	<48.74
Lefu	52.5	98.5	9.88	0.207	97.0	20.34
UTD1	53.5	98.2	12.12	0.204	99.3	4.79
IBE5	59.1	98.3	11.53	0.387	90.5	69.54
CS38	1959.7	99.9	0.23	0.168	99.6	2.73
AKJ1	23.4	96.9	21.24	0.165	99.4 ^c	18.10
Warfarin	45.0	98.6	9.00			

17-AAG: 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin; CS55: chidamide; JBAT: pepper phenonamine; LEFU: lefucocixib; UTD1: epothilone D; IBE5: 1,5-dicaffeoylquinic acid; CS38: chiglitazar; AKJ1: shikonin 1. x: drug concentration; a: calculated with the equation 1. b: calculated with the equation 3. c: calculated with multiple concentration fit by Bioevaluation software.

确定单一浓度是否适合测定化合物与 HSA 的 K_D , 选择将 SPR 测定多浓度拟合的 K_D 值与单浓度整体方法计算的 K_D 值比较, 结果非常相似, 见表 1 中 AKJ1 亲和力测定结果。

3 讨论

早期的药代动力学特性评价可以补足药物与其药理靶点相互作用数据。汇总后的数据使人们对药物功能有更全面的了解, 也有利于将他们开发为候选药物^[7]。因为人们对血浆蛋白结合能力强的药物特别感兴趣^[8]。作者建立了一种基于生物传感技术测定化合物与固定 HSA 结合能力的方法。

用整体拟和方法计算实验得到的平衡数据, 确定化合物与 HSA 的亲合常数。为了与其他方法得到的结果对比, 再用方程 3 将亲合常数转化为结合百分比。尽管 SPR 结果与其他方法测定的结果并不完全相同, 其他方法存在着如样品提取回收率和测定方法定量限较高的问题。考虑到这些, SPR 方法与其他方法的结果有差异是可以接受的。作者证实以华法林作为标准用整体拟和方法测定单一浓度的结合百分比与多系列浓度的结果相似, 这极大的加速了 SPR 测定亲和力的通量。

BIAcore 方法与其他方法相比: BIAcore 方法前处理简单, 只需固定 HAS, 将化合物配置为目的浓度即可测定, 而其他方法需要配置样品后离心, 透析, 样品提取等, 操作繁琐; BIAcore 方法用时短, 每个样品测定在 5 min 左右完成, 而一般的液相测定约 10 min; BIAcore 方法可以同时测定多种样品, SPR 测定样品不受样品紫外、荧光吸收、酸碱度不同的影响, 而液相测定要根据每个样品的特性建立不同的检测条件; 但是 BIAcore 方法还不是一种已推广的方法, 所以费用相对较高, 而且 HAS 固定后如果不在 1 周内测定, 其活性会降低, 不能长期使用。

本实验室对 AKJ1 的药代动力学评价的过程中, 药物在生物样品中的含量测定一直是困扰我们的难题, 本实验室已经对它的测定方法进行了详细的研究, 包括提取和沉淀方法及液相和质谱条件考察, 通过以上考察作者发现, AKJ1 在体内的游离浓度非常低, 它在体内可能与离子螯合、与血红素结合或与白蛋白结合, 通过本实验作者验证了 AKJ1 的确与蛋白的结合能力较高。但不是影响体内测定血浆中药物浓度的决定因素, 至少在单位点结合时。

同时也测定了 AKJ1 的同系物 AKJ2, 他们的差别仅在于 AKJ2 的侧链末端甲基被 AKJ1 的异丁烯基取代, 因此 AKJ1 可能比 AKJ2 多出了一段手臂与 HSA 结合, 与 HSA 的结合能力更高。

良好的重复性和 HSA 表面的稳定性使 SPR 技术非常适合预测药物的结合水平。这一方法特别之处在于测定一个样品就可以进行相关研究。而且易操作、提供了必要的信息还避免了复杂的数据分析^[9]。SPR 还用于测定药物与 AGP、脂质体^[10]和肠绒毛膜^[11]的相互作用, 将越来越多的应用于药物代谢动力学的研究。作者希望 BIAcore 技术应用于大规模测定化合物与 HSA 的相互作用和候选药物的结合特性。当目的是增加或降低特定量的结合活性时, SPR 为临床候选药物提供了进行详细结构与活性研究的可能性。总之, 这些特点将使 SPR 生物传感器对药物与 HSA 相互作用的研究翻开革命性的一页。

4 参考文献:

- [1] Day YS, Myszka DG. Characterizing a drug's primary binding site on albumin [J]. *J Pharm Sci*, 2003, **92** (2): 333 - 343.
- [2] Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, Wainer IW. Use of a human serum albumin-based high-performance liquid chromatography chiral stationary phase for the investigation of protein binding: detection of the allosteric interaction between warfarin and benzodiazepine binding sites [J]. *J Pharm Sci*, 1991, **80** (2): 164 - 166.
- [3] Rich RL, Myszka DG. BIAcore J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis [J]. *J Mol Recognit*, 2001, **14** (4): 223 - 228.
- [4] Myszka DG. Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology [J]. *Anal Biochem*, 2004, **329** (2): 316 - 323.
- [5] Frostell-Karlsson A, Remaeus A, Roos H, Andersson K, Borg P, Hamalainen M, et al. Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels [J]. *J Med Chem*, 2000, **43** (10): 1986 - 1992.
- [6] Ferrer JM, Leiton MJ, Zaton AM. The binding of benzopyranes to human serum albumin. A structure-affinity study [J]. *J Protein Chem*, 1998, **17** (2): 115 - 119.
- [7] Day YS, Baird CL, Rich RL, Myszka DG. Direct com-

- parison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods [J]. *Protein Sci*, 2002, **11**(5): 1017 – 1025.
- [8] Tang Y, Mernaugh R, Zeng X. Nonregeneration protocol for surface plasmon resonance: study of high-affinity interaction with high-density biosensors [J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(6):1841 – 1948.
- [9] Cimitan S, Lindgren MT, Bertucci C, Danielson UH. Early absorption and distribution analysis of antitumor and anti-AIDS drugs: lipid membrane and plasma protein interactions [J]. *J Med Chem*, 2005, **48**(10): 3536 – 3546.
- [10] Baird CL, Courtenay ES, Myszka DG. Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions [J]. *Anal Biochem*, 2002, **310**(1):93 – 99.
- [11] Kim K, Cho S, Park JH, Byun Y, Chung H, Kwon IC, et al. Surface plasmon resonance studies of the direct interaction between a drug/intestinal brush border membrane [J]. *Pharm Res*, 2004, **21**(7):1233 – 1239.

Interactions between drug and human serum albumin investigated using surface plasmon resonance technology

LU Ping-Ping^{1,2}, MENG Zhi-Yun¹, WANG Min-Wei², LIU Ting^{1,2}, WANG Xin¹, BI Xue-Zhi¹,
TIAN Hui-Fang^{1,2}, WANG Hui³, DOU Gui-Fang^{1*}

(1. *Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*; 2. *Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*; 3. *Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*)

Abstract: **AIM** The interactions between a set of drugs and immobilized human serum albumin (HSA) were investigated using surface plasmon resonance (SPR) technology. **METHODS** HSA was immobilized to the sensor chip, using carbodiimide coupling. The compounds were injected across the sensor surface. The SPR reflects changes in refractive index at the sensor surface. Data obtained in the reference flowcell was subtracted from that obtained in the HSA flowcell. Biaevaluation software analyzes the data to get the affinity constant. **RESULTS** All compound tested bound reversibly to immobilize HSA. The affinity constant of shikonin 1 is $3000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. The ability to examine directly the binding of small molecules (M_r 308 – 585), coupled with minimal sample requirements and automated instru-

mentation, makes BIAcore technology applicable for evaluating drug/HSA interactions. **CONCLUSION** Major HSA binding sites are available after immobilization. These results validate the biosensor technology and illustrate how BIAcore can be used to study drug/HSA interactions in a high resolution mode.

Key words: surface plasmon resonance; serum albumin; pharmacokinetics

Foundation item: The project supported by National Natural Sciences Foundation of China (30371669); National High Technology Research and Development Program of China (2003AA2Z347B); International Cooperation Program (2005DFA30080); and Technology Program of Beijing (Z0004105040131)

* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)