

酶联免疫法研究注射用重组人胸腺肽 $\alpha 1$ 的猕猴药动学

蔡永明^{1,2}, 陈拯民¹, 孙超渊¹, 刘昌孝^{1*}

1 天津药物研究院 天津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 天津大学化工学院 制药工程专业, 天津 300072

摘要 **目的:** 研究猕猴单次 sc 重组人胸腺肽 $\alpha 1$ (rh-T $\alpha 1$) 的药动学。**方法:** 6 只猕猴单次 sc rh-T $\alpha 1$ 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 采用酶联免疫分析检测 (ELISA) 法测定动物的血药浓度, 实验数据用 3P97 药代软件拟合并计算药动学参数。**结果:** rh-T $\alpha 1$ 在猕猴体内的消除符合一房室模型, 6 只动物的达峰时间 (t_{max}) 均为 1.5 h, 平均消除半衰期 ($t_{1/2\text{ke}}$) 为 (2.9 ± 0.8) h; 峰浓度 (C_{max}) 均值为 (297.0 ± 43.3) ng/mL; 平均清除率 (CL) 为 (0.373 ± 0.116) mL/(h $\cdot$ kg); 药时曲线下面积 ($\text{AUC}_{0-24\text{h}}$) 均值为 $(1\ 165 \pm 333)$ ng $\cdot$ h/mL。**结论:** 血清样品经 5 倍稀释后用 ELISA 方法能较准确测定猕猴血清中 rh-T $\alpha 1$ 的量。6 只猕猴 sc rh-T $\alpha 1$ 后达峰时间一致且较短, 主要药动学参数显示一定个体差异, 但无明显性别差异。

关键词 重组人胸腺肽 $\alpha 1$ (rh-T $\alpha 1$); ELISA; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2009)02-0088-04

Pharmacokinetics of rh-T $\alpha 1$ for injection in monkeys by enzyme-linked immunosorbent assay

CAI Yong-ming^{1,2*}, CHEN Zheng-min¹, SUN Chao-yuan¹, LIU Chang-xiao¹

1 State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

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

Abstract **Objective:** To explore pharmacokinetic properties of a recombinant human Thymosin $\alpha 1$ (rh-T $\alpha 1$) following sc administration in monkeys. **Methods:** The monkeys received single sc doses of rh-T $\alpha 1$ at 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Serum concentration of rh-T $\alpha 1$ was measured at various time-points after dosing by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pharmacokinetic parameters were calculated with 3P97 software. **Results:** The concentration-time profile of rh-T $\alpha 1$ in monkeys was described by an one-compartment model. The mean time to reach peak concentration (t_{max}) was 1.5 h. The mean elimination half-life ($t_{1/2\text{ke}}$) was (2.9 ± 0.8) h. The average clearance rate was (0.373 ± 0.116) mL/(h $\cdot$ kg). The mean peak concentration (C_{max}) was (297.0 ± 43.3) ng/mL. The mean area under the serum concentration-time curve ($\text{AUC}_{0-24\text{h}}$) was $(1\ 165 \pm 333)$ ng $\cdot$ h/mL. **Conclusion:** Serum concentration of rh-T $\alpha 1$ is detected accurately by ELISA method when serum samples are diluted five times. The t_{max} of the six monkeys are the same, but the main pharmacokinetic parameters demonstrate a certain degree of individual differences without obvious sex differences.

Key words recombinant human Thymosin $\alpha 1$ (rh-T $\alpha 1$); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); pharmacokinetics

人胸腺肽 $\alpha 1$ 是由 28 个氨基酸组成的多肽类物质, 相对分子质量为 3 108。目前国外上市产品日达仙注射液 (美国赛生公司提供) 为合成乙酰化胸腺肽 $\alpha 1$ ^[1,2], 它具有免疫调节作用, 可用于治疗慢

性 B 型和 C 型肝炎^[3,4], 并对 AIDS 和癌症有很好的应用前景^[5]。重组人胸腺肽 $\alpha 1$ (rh-T $\alpha 1$), 是一种非乙酰化的生物工程产品, 经药效学研究证实具有良好的免疫增强作用。本实验研究了健康猕猴单

收稿日期: 2009-05-09

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (No. 2007BAI14IB04), 国家重点基础研究发展计划 (No. 2004CB518902)

作者简介: 蔡永明, 女, 博士研究生, 副研究员, 主要从事生物技术药物的药动学研究。Tel: 022-23006871, E-mail: caiymtj@126.com

*通讯作者 刘昌孝, 博士生导师。Tel: 022-23006863; E-mail: liuchangxiao@vip.163.com

次 sc rh-T α 1, 用 ELISA 法^[6]检测药后不同时间血液中的药物浓度变化, 以进行非临床药动学研究, 为临床合理用药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

重组人胸腺肽 α 1 (rh-T α 1), 白色冻干粉针, 1.5 mg/瓶, HPLC 法检测质量分数为 99.5%, 批号 20050301, 样品试验前于 4 °C 保存。ELISA 试剂盒, 由北京望尔生物技术有限公司提供。

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 试验动物

6 只健康成年猕猴, 雌雄各半, 平均体质量为 (4.2 $\pm$ 0.3) kg, 4~5 岁龄。动物单笼饲养在不锈钢笼内, 自由饮水, 适应期为 1 个月。猕猴由苏州西山中科实验动物有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2002-0007; 实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2002-0002。

1.4 给药及采血方法

猕猴单次 sc 剂量为 350 μ g/kg。rh-T α 1 用生理盐水配制成浓度 1 mg/mL, 给药体积为 0.35 mL/kg。将药物注射于动物大腿外侧皮下, 于给药前 (0 h) 和给药后不同时间 (0.5、1、1.5、2、3、4、8、12、16、24 h) 从猕猴给药对侧后肢隐静脉采血, 室温放置 30 min 后于 4 000 r/min 离心 10 min, 分离出血清, -20 °C 保存待测。

1.5 ELISA 法测定血药浓度

在预包被第一抗体的 96 微孔板加入样品 (标准品或待测样品) 和已稀释好的 rh-T α 1 抗体各 50 μ L, 轻轻混匀 20 s 后于 25 °C 反应 1 h。除去孔内液体, 洗板 5 次, 拍干, 加入酶标二抗 100 μ L, 25 °C 再反应 0.5 h。除去孔内液体, 洗板 5 次, 拍干, 加入酶反应底物液 A 和 B 各 50 μ L, 25 °C 避光反应 0.5 h, 加 50 μ L 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 药代软件拟合分析并计算药动参数; 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

将猕猴空白血清用样品稀释液稀释 5 倍后配制不同浓度的 rh-T α 1 溶液, 使终浓度分别为 0、1.56、6.25、25、100 和 400 ng/mL。测定 rh-T α 1 各浓度在 450 nm 处的 A 值, 经 Logistic 四参数曲线模型拟合 (Origin Version 7.0), 可以得到药物浓度对数与 A 值呈反 “S” 型的标准曲线 (图 1)。每次测定均制备 1 条标准曲线, 8 条标准曲线平均拟合方程为: $Y=0.138\ 1+1.412\ 3/[1+(X/11.053)^{0.980\ 8}]$, $r=0.999\ 6$ 。本方法的灵敏度按 10 份零标准品的测定浓度平均值加 2 倍标准差 ($\bar{x} \pm 2s$) 计为 1.52 ng/mL, 本方法的最低定量限为标准曲线的最低浓度点, 即 1.56 ng/mL。在 5~100 ng/mL 质量浓度范围内, 测定血清中 rh-T α 1 的板内 RSD 为 5%~15%, 平均准确度为 86%~111%; 板间 RSD 为 7%~19%, 平均准确度为 87%~95%, 结果见表 1。另外, 该药盒对 IL-11, IL-6, G-CSF, SCF, TNF- α , GH, IFN- α 、IFN- β 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代动力学的实验要求^[7]。

2.2 血清中 rh-T α 1 的测定

按照 1.5 项下规定的方法, 每次测定均制备一条标准曲线以计算血清中药物的量, 并随板测定 3 个质量浓度 (5、15 和 45 ng/mL) 的质控样品, 以确保测定方法的可靠性。动物 sc 给予 350 μ g/kg rh-T α 1 后平均血药浓度-时间曲线见图 2。

2.3 药动学参数的计算和分析

血药浓度试验数据用 3P97 药代计算程序进行数据处理, 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。

不同性别猕猴的主要药动学参数比较显示没有显著性差异。

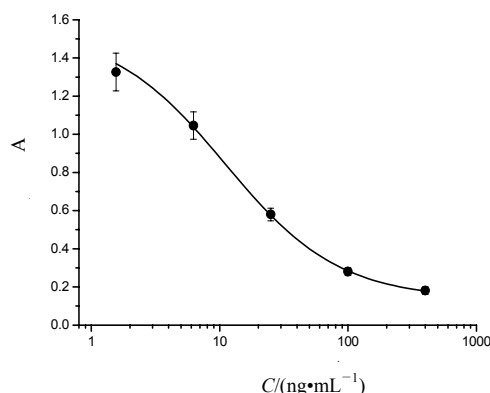


图1 rh-T α 1 平均标准曲线 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Calibration curve for rh-T α 1 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表 1 ELISA 法测定 rh-Tα1 的精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Precision and accuracy of rh-Ta1 by ELISA ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度/ (ng · mL ⁻¹)	板间			板内		
	测定值/(ng · mL ⁻¹)	RSD/%	准确度/%	测定值/(ng · mL ⁻¹)	RSD/%	准确度/%
5	5.5 ± 0.8	15	111	4.7 ± 0.9	19	93
15	12.9 ± 0.6	5	86	13.3 ± 1.4	11	89
45	37.6 ± 4.1	10	88	39.1 ± 2.8	7	87
100	92.1 ± 10.8	12	92	94.8 ± 11.7	12	95
均值		11 ± 4	94 ± 11		12 ± 5	91 ± 4

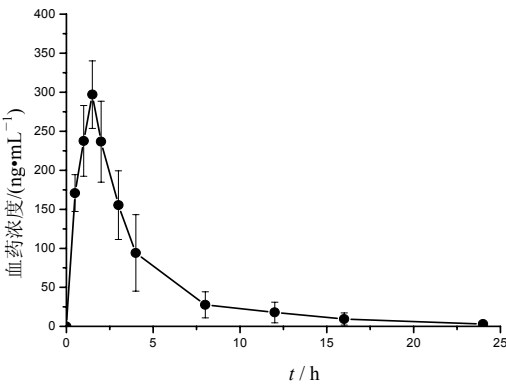


图 2 猕猴单次 sc rh-Tα1 (350 µg/kg) 后的平均药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 2 Mean serum concentration-time profile in monkeys after single sc injection of 350 µg/kg rh-Ta1 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 6 只猕猴单次 sc rh-Tα1 (350 µg/kg) 后的药动学参数
Table 2 Pharmacokinetic parameters in monkeys after single sc injection of 350 µg/kg rh-Ta1

参数	1 [#] (♀)	2 [#] (♀)	3 [#] (♀)	4 [#] (♂)	5 [#] (♂)	6 [#] (♂)	$\bar{x} \pm s$
A/ (ng · mL ⁻¹)	258.8	338.6	309.8	170.0	228.6	324.3	271.7 ± 64.9
t _{1/2ke} /h	4.1	2.0	3.5	2.9	2.4	2.6	2.9 ± 0.8
t _{max} /h	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5 ± 0.0
C _{max} / (ng · mL ⁻¹)	350.7	256.9	270.2	252.7	309.1	342.3	297.0 ± 43.3
AUC _(0-∞) / (ng · h · mL ⁻¹)	1 548	976	1623	821	922	1260	1192 ± 339
AUC _(0-24h) / (ng · h · mL ⁻¹)	1 524	966	1568	818	858	1257	1165 ± 333
CL/ (mL · h ⁻¹ · kg ⁻¹)	0.248	0.425	0.243	0.515	0.472	0.333	0.373 ± 0.116
V/ (mL · kg ⁻¹)	1.45	1.24	1.21	2.13	1.61	1.22	1.48 ± 0.36

3 讨论

3.1 关于方法学

本实验所用 ELISA 试剂盒是采用间接竞争 ELISA 方法检测血清样本中的 rh-Ta1, 在微孔板上预包被偶联抗原, 所要检测的标本或标准品中的 rh-Ta1 和微孔板上的偶联抗原共同竞争抗 Ta1 抗体, 加入酶标二抗后, 用 TMB 底物显色, 样本 A 值与其所含 Ta1 的量成负相关, 标本中 rh-Ta1 的量

可通过与标准曲线的比较而计算出来。用空白血清经样品稀释液稀释 5 倍后制备 rh-Ta1 的标准曲线, 经 Logistic 四参数曲线模型拟合后, 药物浓度对数与 A 值均呈反 S 型曲线。在 5~100 ng/mL 几近直线。但用动物空白血清配制的 rh-Ta1 标准曲线, 同浓度下 A 值均较低, 可能是由于血清中含有的杂蛋白干扰所致。而空白血清稀释 5 倍和 10 倍后所配制的标准曲线的

A值差别不大(如图3所示)。基于猕猴 sc rh-Tα1 后体内血药浓度水平,所以本试验选择空白血清稀释5倍后配制标准曲线,同时所有血清样品经样品稀释液稀释5倍后测定,所测样品的A值通过标准曲线拟合后计算出浓度,再乘以稀释倍数(×5)作为动物实际血药浓度。为确保血药浓度测定的准确性,每次测定均制备一条标准曲线,用于计算板内样品的药物浓度。并随板测定3个质量浓度(5、15和45 ng/mL)的质控样品,以确保测定方法的可靠性。精密度和准确度试验结果表明,药物浓度范围为5~100 ng/mL时,即标准曲线近直线段范围时,具有较好精密度和准确度,绝大部分时间点的

血清样品浓度经5倍稀释后均落在5~100 ng/mL,保证了本试验结果的可靠性。

3.2 rh-Tα1 药动学特点

本试验采用非人灵长类猕猴 sc rh-Tα1 350 μg/kg 后,6只动物药后的血药浓度均在1.5 h时达到峰值,而 $t_{1/2ke}$ 的个体差异较大,在2.0~4.1 h。据文献报道^[8],3种不同人工合成乙酰化胸腺肽α1的健康人体药动学比较试验中,单次 sc 剂量为 900 μg/m²时, $t_{1/2ke}$ 在1.8~2.6 h,达峰时间在1.2~1.5 h,与本试验结果基本一致。另外,不同性别猕猴 sc rh-Tα1 后的主要药动学参数不存在显著差异。

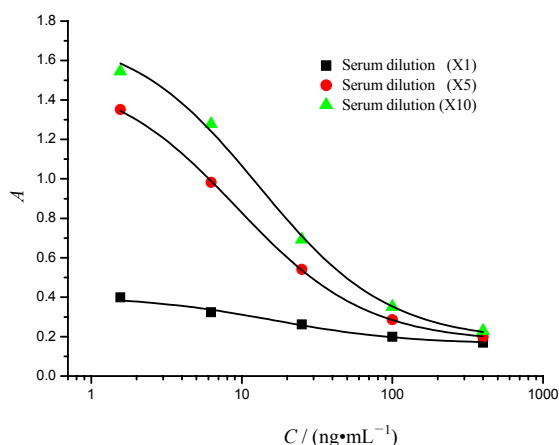


图3 用不同稀释倍数的猕猴空白血清配制的 rh-Tα1 标准曲线

Fig.3 Calibration curves for rh-Tα1 in blank serum of monkeys by different dilute times

参考文献:

- [1] Low T, McClure J, Rossio J, *et al.* Isolation of thymosin alpha 1 from thymosin fraction 5 of different species by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr.* 1983, 266:533-544.
- [2] Badamchian M, Mora C A, Baumann C A, *et al.* Biodistribution of synthetic thymosin alphal in the serum, urine and major organs of mice[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1997, 19(2):59-66.
- [3] Tuthill C W, Rudolph A, Li Y, *et al.* Quantitative analysis of thymosin al in human serum by LC-MS/MS. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2000, 1 (2) :11-18.
- [4] Chien R N, Liaw Y F, Chen T C, *et al.* Efficacy of thymosin alphas in patients with chronic hepatitis B: A randomized, controlled trial [J]. *Hepatology*, 1998, 27:1383-1387.
- [5] Garaci E, Milanese G, Vella S, *et al.* A randomized controlled study for the evaluation of the activity of a triple combination of zidovudine, thymosin alpha 1 and interferon alpha in HIV-infected individuals with CD4 counts between 200 and 500 cells/mm³ [J]. *Antiviral Therapy*. 1998, 3(8):103-111.
- [6] 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动学[J]. *中草药*, 2006, 37(3): 402-405.
- [7] 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则(EB) [S]. SFDA, GPT 5-1, 2005
- [8] Rost K L, Wierich W, Masayuki F, *et al.* Pharmacokinetics of thymosin alphas after subcutaneous injection of three different formulations in healthy volunteers[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1999, 37(1): 51-57.