

## • 研究论文 •

## 重组人甲状旁腺素类似物 PTH (1-34) 在大鼠体内药动学研究

曾 勇\*, 姜 凌, 蔡永明, 陈拯民, 刘昌孝

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

**摘要** 目的: 研究大鼠 sc PTH (1-34) 的药动学特征。方法: 用  $^{125}\text{I}$  标记 PTH (1-34) 示踪法对大鼠 sc PTH (1-34) 后的血清药物浓度进行了测定, 并用 3P97 程序拟和分析并计算药动学参数, 采用超滤离心的方法进行药物与血浆蛋白结合率的研究。结果: 大鼠 sc PTH (1-34) 10、20 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  后, 药物消除符合一房室模型。平均  $t_{1/2\text{ke}}$  为  $(0.92 \pm 0.04)$  h; 平均 CL 为  $(0.56 \pm 0.05)$  L / (kg · h);  $C_{\text{max}}$  和  $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$  均与剂量呈线性正相关, 不同剂量药物与血浆蛋白平均结合率为 13.4%。结论: 大鼠 sc PTH (1-34) 后, 药物消除符合线性动力学特征。

**关键词** 重组人甲状旁腺素类似物;  $^{125}\text{I}$  标记; 药动学; 蛋白结合

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 06-0409-04

### *In vivo* pharmacokinetics of recombinant human parathyroid hormone analogue in rats

ZENG Yong, JIANG Ling, CAI Yong-ming, CHEN Zheng-ming, LIU Chang-xiao

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

**Abstract Objective:** To study the pharmacokinetic characteristics on parathyroid hormone (PTH, 1-34) after sc injection in rats. **Methods:** Serum drug concentration was measured by  $^{125}\text{I}$  labeled method after sc injection in rats, the pharmacokinetic model and parameters were fitted and calculated by the 3P97 program. **Results:** After sc injection at doses of 10, 20, and 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in rats, the serum drug concentration-time curve was fitted to a one-compartment model. Mean  $t_{1/2\text{ke}}$  was  $(0.92 \pm 0.04)$  h and mean CL was  $(0.56 \pm 0.05)$  L/(kg·h). The  $C_{\text{max}}$  and  $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$  were positive linear correlation with the dose. Mean binding ratio of various doses drug with plasma protein was 13.4%. **Conclusion:** After sc injection of PTH (1-34) to rats, the elimination of PTH (1-34) could fit to the linear kinetics.

**Key words** recombinant human parathyroid hormone analogue ( PTH, 1-34);  $^{125}\text{I}$  labled; pharmacokinetics; protein binding

人甲状旁腺素 (hPTH) 是一种多肽类激素, 由 84 个氨基酸组成, 是人体内极为重要的调节血液和骨骼内钙和磷水平的活性物<sup>[1]</sup>, 早期的研究证明小剂量的 hPTH 可以有效治疗绝经后妇女的骨质流失<sup>[2]</sup>。后来对 hPTH 构效关系的研究发现, 其 N 端 1-34 位氨基酸组成的活性片段 PTH (1-34) 具有与完整分子基本相同的增加造骨细胞活性、直接促进骨质形成的功能<sup>[3]</sup>。美国礼来公司开发的重组 PTH (1-34) (商品名 Forteo) 作为治疗骨质疏松症的有效药物, 于 2002 年被美国 FDA 批准上市<sup>[4-5]</sup>。本试验采用  $^{125}\text{I}$  标记 PTH (1-34) 示踪法结合三氯醋酸

沉淀的方法进行了国产 PTH (1-34) 大鼠 sc 给药的药代动力学研究。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 PTH (1-34)

由重庆富进生物医药有限公司提供, 冻干物, 500  $\mu\text{g}$  / 瓶, HPLC 测定质量分数 >95%, 比活性为 22 500 单位 / mg 蛋白, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

##### 1.1.2 $^{125}\text{I}$ -PTH (1-34)

由中国原子能科学研究院同位素研究所标记并提供, 系采用氯胺 T 法对 PTH (1-34) 进行  $^{125}\text{I}$  标

收稿日期: 2010-08-02

基金项目: 国家科技支撑计划 (2007BAI14IB04)

\* 通讯作者 曾 勇, E-mail: zengy@tjipr.com

记。放射比活度为  $1.46 \times 10^7$  Bq/ $\mu$ g, 使用时将 PTH (1-34) 用生理盐水配成 20  $\mu$ g/mL 并加入  $^{125}$ I-PTH (1-34) 至  $1.85 \times 10^6$  Bq/mL。

1.1.3 实验动物健康 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 (200 $\pm$ 10) g, 由天津药物研究院动物室提供, 动物生产合格证为津科动管 001 号。

#### 1.1.4 主要试剂及仪器

三氯醋酸 (TCA), 上海化学试剂采购供应站产品; 生理盐水, 中国大冢制药有限公司产品; 超滤离心管, 容量为 0.5 mL, 超滤膜规格为截流相对分子质量 30 000, 美国 Millipore 公司产品; FJ630G/12 型微机多探头  $\gamma$  计数器, 北京核仪器厂出品。

### 1.2 测定方法的建立和认证

#### 1.2.1 测定血清或组织中 PTH (1-34) 标准曲线

将质量浓度为 20  $\mu$ g/mL 并含  $^{125}$ I-PTH (1-34) 的 PTH (1-34), 用空白大鼠血清或组织匀浆配成质量浓度为 0.25、1.0、2.5、10、25、100 和 250 ng/mL 的标准液, 各取 200  $\mu$ L 置于测定管中, 然后每管各加入 20% TCA 200  $\mu$ L, 振荡混匀, 3 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 在  $\gamma$  计数器上测定沉淀物的放射计数 (cpm), 在 0.25~250 ng/mL 药物质量浓度与计数值呈直线相关。

#### 1.2.2 测定回收率和精密度

将质量浓度为 20  $\mu$ g/mL 并含  $^{125}$ I-PTH (1-34) 的 PTH (1-34), 用空白大鼠血清配成 4 个不同浓度 1.0、25、100、250 ng/mL, 分批重复测定 PTH (1-34) 的质量浓度, 计算日内、日间的精密度和回收率。

### 1.3 给药和血清制备

根据药效学和长毒实验结果, 本试验设计了大鼠 sc PTH (1-34) 10、20、40  $\mu$ g/kg 作为给药剂量, 给药体积为 1.0 mL/kg。sc 给药后 0.08、0.17、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12 和 24 h 眼眶取血, iv 给药后 0.03、0.08、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12 和 24 h 眼眶取血, 分离出血清按上述标准曲线方法测定, 每一时间点 6 只动物 (雌雄各半)。

### 1.4 组织分布试验

大鼠 sc 给以 PTH (1-34) 20  $\mu$ g/kg 后 0.08、0.5、2 和 6 h 处死动物, 取脑、心、肺、肝、肾、脾、胃、肠、肌肉、脂肪、子宫、卵巢、睾丸, 每一脏器或组织均用蒸馏水制成 20% 匀浆, 各取 200  $\mu$ L 按上述标准曲线方法测定, 每一时间点 6 只动物 (雌雄各半)。

### 1.5 PTH (1-34) 与血浆蛋白的结合实验

根据动物 3 个剂量组给药后的血药浓度值, 设计 3 个浓度 (15、30 和 60 ng/mL) 进行结合试验。先用大鼠血浆将掺入  $^{125}$ I-PTH (1-34) 的 PTH (1-34) 溶液稀释到这 3 个浓度, 37  $^{\circ}$ C 保温 15 min, 取 100  $\mu$ L 至超滤离心管 5 000 r/min 离心 20 min; 并用生理盐水洗涤超滤离心管上部 2 次, 每次 100  $\mu$ L, 同条件离心, 在  $\gamma$  计数器上分别测定超滤离心管上、下两部分放射计数, 按公式计算结合率。

血浆蛋白结合率 (%) = 上部放射计数 / 上下部总放射计数  $\times$  100

### 1.6 数据处理

血药浓度-时间数据用 3P97 药代计算程序进行计算,  $t_{peak}$ 、 $C_{max}$  取实测值, AUC 用统计矩法计算。

## 2 结果

### 2.1 测定方法的建立和认证

#### 2.1.1 PTH (1-34) 标准曲线的建立

在 0.25~250 ng/mL 药物质量浓度与计数值 (cpm) 呈线性相关, 标准曲线方程为  $Y=14.3234+721.6438X$  ( $r=0.999$ )。本法最低定量限为 0.25 ng/mL。

#### 2.1.2 测定血清中 PTH (1-34) 的回收率和精密度

PTH (1-34) 质量浓度为 1.0、25、100、250 ng/mL 时, 从血清中测定 PTH (1-34) 的平均回收率为 (79.0 $\pm$ 1.5) %。测定日内和日间精密度, RSD 分别为 2.2%~8.2% 和 2.9%~10.4%。

### 2.2 血药浓度的测定和药动学参数的计算

大鼠分别 sc 10、20 和 40  $\mu$ g/kg 的 PTH (1-34) 后不同时间后, 血药浓度-时间变化趋势比较见图 1。

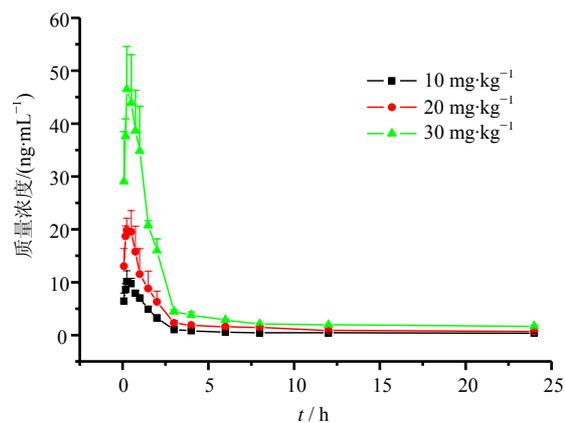


图 1 大鼠 sc PTH (1-34) 后的血药浓度-时间曲线  
Fig.1 Serum drug concentration-time curve of sc injection of PTH (1-34) in rat

血药浓度-时间数据用 3P97 药代计算程序进行拟合, 符合一房室模型, 3 个剂量的平均消除半衰期 ( $t_{1/2ke}$ ) 为  $(0.92 \pm 0.04)$  h; 平均清除率 (CL)

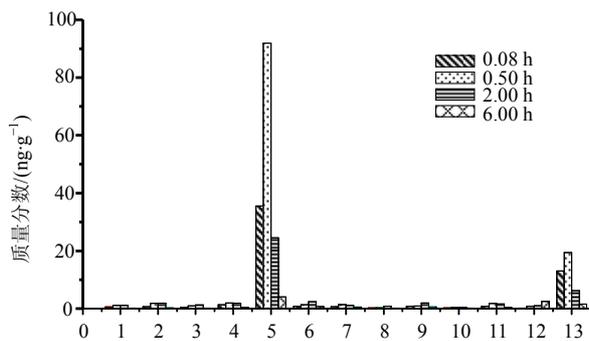
为  $(0.56 \pm 0.05)$  L / (kg·h); 药时曲线下面积 ( $AUC_{0-8 h}$  统计矩法) 分别为 18.39、37.93 和 87.18 h·ng/mL。药动学参数结果见表 1。

表 1 大鼠 sc PTH (1-34) 后的药动学参数  
Table 1 Pharmacokinetic parameters of sc injection of PTH (1-34) in rat

参数	单位	不同剂量 ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 下参数值		
		10	20	40
$A$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	14.28	26.29	68.96
$K_e$	$\text{h}^{-1}$	0.76	0.72	0.78
$K_a$	$\text{h}^{-1}$	8.29	10.02	7.38
$t_{1/2ka}$	h	0.08	0.07	0.09
$t_{1/2ke}$	h	0.92	0.96	0.89
$AUC_{0-8h}$	$\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	18.39	37.93	87.18
$CL/F_{(s)}$	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.58	0.59	0.50
$V/F_{(c)}$	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.77	0.82	0.65

### 2.3 大鼠 sc PTH (1-34) 药物组织分布

大鼠 sc 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PTH (1-34) 后 0.08、0.5、2 和 6 h 主要器官和组织药物分布测定结果如图 2 所示, 在上述 4 个时间点, 药物在肾脏的量最高, 脑和脂肪组织的量最低。



1-心; 2-肝; 3-脾; 4-肺; 5-肾; 6-胃; 7-肠; 8-脑; 9-肌肉; 10-脂肪; 11-子宫; 12-睾丸; 13-血液  
1-heart; 2-liver; 3-spleen; 4-lung; 5-kidney; 6-stomach; 7-intestines; 8-brain; 9-muscle; 10-fat; 11-uterus; 12-testicle; 13-blood

图 2 大鼠 sc PTH (1-34) 后 0.08、0.5、2 和 6 h 主要器官和组织分布图

Fig. 2 The tissue distribution of PTH (1-34) at 0.08, 0.5, 2 and 6h after single sc injection 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in rat.

### 2.4 PTH (1-34) 与血浆蛋白的结合实验

#### 2.4.1 标准曲线的制备

在 0.75~75 ng/mL 药物质量浓度与 cpm 呈直

线相关, 其标准曲线方程为  $Y=828.48 X-59.26$  ( $r=0.9994$ )

#### 2.4.2 药物-血浆蛋白结合试验

对超滤下液和超滤上液进行计数, 并根据标准曲线换算成质量浓度。计算出结合率分别为 10.6%、15.0% 和 14.7%, 平均结合率为 13.4% (表 2)。

表 2 PTH (1-34) 的血浆蛋白结合率  
Table 2 Protein binding ratio of PTH (1-34) in plasma

质量浓度/ ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	血浆蛋白结合率/%			
	1	2	3	$\bar{x} \pm s$
15	10.3	11.3	10.1	$10.6 \pm 0.6$
30	15.0	14.9	15.2	$15.0 \pm 0.2$
60	14.6	14.6	14.8	$14.7 \pm 0.1$

### 3 讨论

目前蛋白多肽类药物药代动力学的研究方法有同位素示踪法、ELISA 法和生物检定法。同位素示踪法灵敏度高, 特异性好, 可获得药物血药浓度、组织分布、代谢和排泄等的全面资料, 是分析测定蛋白和多肽类药物的高灵敏度方法。但因为药物进入体内后会被降解, 所以总放射性测定不能代表原型药物。我们采用 TCA 沉淀蛋白再测定放射性同位素的方法可以尽量排除分解产物及游离  $^{125}\text{I}$  的干扰, 此法可以认为测定的是原型药物的浓度。

本实验中大鼠 sc 不同质量浓度的 PTH (1-34) 后, 3 组动物的血药浓度均随剂量的增加而增大,

与剂量存在明显的线性关系，实验数据用药代计算程序进行数据处理，测得的  $C_{max}$ （实测值）分别为 10.11、19.81 和 46.51 ng/mL，与剂量呈正相关，相关系数为 0.997； $AUC_{0-8h}$ （统计矩法）分别为 18.39、37.93 和 87.18 h·ng/mL，也与剂量呈正相关，相关系数为 0.999。表明 PTH（1-34）在动物体内的代谢过程符合线性动力学特征。

大鼠 sc PTH（1-34）后不同时间的组织药物浓度结果显示，在肾脏中有远远高于其它组织（包括血浆）的药物水平，这与通常蛋白或多肽类药物的分布结果相一致，说明 PTH（1-34）的主要代谢途径是经体内蛋白水解酶降解后从肾脏排出。

参考文献

[1] Habener J F, Rosenblatt M, Potts J J T. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion,

action, and metabolism [J]. *Physio Rev*, 1984, 64: 985-1053.  
 [2] Reeve J. Recombinant human parathyroid hormone [J]. *Brit Med J*, 2002, 324: 435-436.  
 [3] Kimmel D B, Bozzato R P, Kronis K A, *et al*. The effect of recombinant human (1-84) or synthetic human (1-34) parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats [J]. *Endocrinology*, 1993, 32: 1577-1584.  
 [4] Neer R M, Arnaud C D, Zanchetta J R, *et al*. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fracture and bone mineral density with osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344 (19): 1434-1441.  
 [5] Quattrocchi E, Kourlas H. Teriparatide: a review [J]. *Clin Ther*, 2004, 26: 841-854.



## 郑重声明

天津**中草药**杂志社（出版《**中草药**》、Chinese Herbal Medicines (CHM, 中草药英文版)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊）未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议，凡是以天津**中草药**杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动，均严重侵害了天津**中草药**杂志社的合法权益，天津**中草药**杂志社将保留对其采取法律行动的权利，特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津**中草药**杂志社门户网站“[www.中草药杂志社.中国](http://www.中草药杂志社.中国)或 [www.tiprpress.com](http://www.tiprpress.com)”，切勿上当受骗；若发现假冒天津**中草药**杂志社及所属期刊的情况，请检举揭发。

电话：022-27474913 E-mail:zcy@tiprpress.com

天津**中草药**杂志社