

【药动学评价】

国产重组人促红素注射液与进口制剂在大鼠体内的药动学对比研究

刘文君¹, 魏滋鸿^{2, 3}, 孙英辉⁴, 张 臣¹, 张星艳⁴, 王 泽⁴, 武卫党^{2, 3}, 曾 勇^{2, 3}, 李亚卓^{2, 3*}, 傅 鹏^{3*}

1. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 释药技术与药代国家重点实验室, 天津 300301

3. 天津药物研究院, 天津 300193

4. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: **目的** 对国产重组人促红素注射液(济脉欣)与进口同类型制剂Eprex®在大鼠体内的药动学进行对比研究, 为实现临床替代提供依据。**方法** 采用¹²⁵I标记示踪方法测定药物浓度, 采用DAS2.0进行药动学参数的计算, 在大鼠体内分别进行单次sc 2 000 U/kg 济脉欣和Eprex®的血浆药物动力学对比研究、药物组织分布对比研究和尿、粪、胆汁排泄对比研究。**结果** 大鼠sc相同剂量(2 000 U/kg)的济脉欣和Eprex®后, RA法所得血浆动力学参数: $t_{1/2}$ 分别为(15.8±1.67)和(15.6±3.15) h; C_{max} 分别为(2 527±471)和(2 470±598) mU/mL; t_{max} 分别为(10.3±1.51)和(9.00±2.45) h; AUC_{0-t} 分别为(64 196±12 544)和(59 630±9 391) mU/mL·h, TCA-RA法所得血浆动力学参数: $t_{1/2}$ 分别为(15.9±4.19)和(16.2±2.45) h; C_{max} 分别为(2 201±584)和(1 907±517) mU/mL; t_{max} 分别为(10.0±1.27)和(9.00±2.45) h; AUC_{0-t} 分别为(53 709±11 992)和(48 519±8 623) mU/mL·h。用RA和TCA-RA法测定济脉欣和Eprex®给药后2、8、24、36 h各主要脏器及组织药物浓度, 显示大部分组织在给药后8 h药物含量最大, 然后逐渐降低, 各主要脏器及组织药物变化趋势与血浆药物消除一致, 没有发现蓄积现象。大鼠sc给药济脉欣和Eprex®后, 在120 h内从尿中分别可回收给药总量的75.7%和76.2%, 在粪中可回收给药量的14.7%和14.9%。48 h内胆汁排泄量为11.4%和10.3%。**结论** 国产重组人促红素注射液济脉欣与国外上市制剂Eprex®大鼠sc给药后, 主要药动学参数 $t_{1/2}$ 、 t_{max} 、 C_{max} 和 AUC_{0-t} 基本一致, 经统计检验无差异; 两种制剂在各组织脏器内的暴露以及尿、粪、胆汁排泄对比也无差异。

关键词: 重组人促红素; ¹²⁵I标记示踪方法; 药动学; 对比研究

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)11-2169-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.11.008

Comparative study on pharmacokinetics of domestic recombinant human erythropoietin injection and imported preparations in rats

LIU Wenjun¹, WEI Zihong^{2,3}, SUN Yinghui⁴, ZHANG Chen¹, ZHANG Xingyan⁴, WANG Ze⁴, WU Weidang^{2,3}, ZENG Yong^{2,3}, LI Yazhuo^{2,3}, FU Peng³

1. Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co. Ltd., Tianjin 300301, China

3. Tianjin Pharmaceutical Research Institute, Tianjin 300193, China

4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective The pharmacokinetics of domestic recombinant human erythropoietin injection (qimaxin) and imported Eprex® of the same type in rats were compared to provide a basis for clinical substitution. **Methods** The drug concentration was determined by ¹²⁵I labeling method. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0. Plasma pharmacokinetic

收稿日期: 2019-06-25

第一作者: 刘文君, 研究方向为药代动力学。E-mail: liuwj@tjipr.com

*通信作者: 李亚卓 E-mail: liyz@tjipr.com

付 鹏 fup@tjipr.com

comparison of sc 2 000 U/kg zymaxin and Eprex® in rats, comparison of drug tissue distribution, and comparison of urinary, fecal and bile excretion. **Results** After the same dose (2 000 U/kg) of Jimaixin and Eprex® were injected subcutaneously in rats, the plasma kinetic parameters obtained by RA method were: $t_{1/2}$ were (1.57 ± 1.67) and (15.6 ± 3.15) h, respectively. C_{max} were (2 527 ± 471) and (2 470 ± 598) mU/mL, respectively. T_{max} were (10.3 ± 1.51) and (9.00 ± 2.45) h, respectively. AUC_{0-t} were (64 196 ± 12 544) and (59 630 ± 9 391) mU/mL·h, respectively. Plasma kinetic parameters obtained by TCA-RA. **Method** $t_{1/2}$ were (15.9 ± 4.19) and (16.2 ± 2.45) h, respectively. C_{max} were (2 201 ± 584) and (1 907 ± 517) mU/mL, respectively. T_{max} was (10.0 ± 1.27) and (9.00 ± 2.45) h, respectively. AUC_{0-t} was (53 709 ± 11 992) and (48 519 ± 8 623) mU/mL·h, respectively. The concentrations of major organs and tissues at 2, 8, 24, and 36 h after administration of Jimaixin and Eprex® were measured by RA and TCA-RA, indicating that most of the tissues had the highest drug content at 8 h after administration, and then gradually decreased. The trend of drug changes in all major organs and tissues were consistent with the elimination of plasma drugs, and no accumulation was observed. After administration of Jimaixin and Eprex® in SC, rats were able to recover 75.7% and 76.2% of the total dose from the urine within 120 hours, and 14.7% and 14.9% of the dose could be recovered in the feces. The biliary excretion in 48 hours was 11.4% and 10.3%. **Conclusion** The main pharmacokinetic parameters $t_{1/2}$, T_{max} , C_{max} and AUC_{0-t} of the domestic recombinant human erythropoietin injection and the foreign marketed Eprex® rats were basically the same, and there was no difference by statistical test. There was no difference in the exposure of the two preparations in the organs of each tissue and the comparison of urine, feces and bile excretion.

Key words: recombinant human heme; ^{125}I labeled tracer method; pharmacokinetics; comparative study

促红细胞生成素(EPO)是一种人体内源性糖蛋白激素,生理功能主要是与红系祖细胞的表面受体结合,促进骨髓内红系定向干细胞分化为红系母细胞、有核红细胞的血红蛋白合成以及骨髓内网织红细胞和红细胞的释放。EPO作为体内红细胞增殖、分化以及维持外周循环红细胞数量正常的最主要的造血生长因子,用于治疗恶性贫血症,对肾衰竭病人长期接受透析后引起的贫血症状尤为有效^[1]。目前我国慢性肾脏病(CKD)的患病率逐年增高,其中肾性贫血是影响CKD患者生活质量的最常见并发症^[2];全国每年新发肿瘤病例约312万例,化疗仍是目前肿瘤治疗的最重要手段,约50%化疗患者会出现贫血^[3]。近年来,国内慢性患者和癌症患者增多,这些都是EPO的潜在使用者。因此,EPO的研发具有巨大的科研价值。

重组人促红细胞生成素(rhEPO)是以重组DNA技术生产的红细胞生成素,rhEPO与天然人EPO具有相同的体内体外活性,比活基本相当^[4-5]。早已有rhEPO用于临床,用于治疗肾功能不全合并的贫血、获得性免疫缺陷综合征/艾滋病本身或治疗引起的贫血、恶性肿瘤伴发的贫血及风湿病贫血等多种贫血^[6-8]。自1989年Amgen公司上市第一个rhEPO产品以来,rhEPO药物就以其良好的抗贫血效果而迅速增长。国内的rhEPO市场是1992年从国外进口药品开始的,由于rhEPO在贫血领域的优良效果再加上国外药企的专业化学术推广,其临床应用率稳步上升^[9]。本实验对华北制药金坦生物技术股份有限公司生产的rhEPO注射液(济脉欣)和

强生公司同类型制剂(Eprex®)在大鼠体内进行了药动学行为对比研究,为实现临床替代提供依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

注射用Eprex®和济脉欣标准品:华北制药金坦生物技术股份有限公司提供,Eprex®规格为1 mL:10 000 IU,批号HAS3H00,济脉欣规格为1 mL:4 000 IU,批号为201712YD17; ^{125}I -济脉欣和 ^{125}I -Eprex由北京北方生物技术研究所有限公司制备,经鉴定放射化学纯度分别为97.63%和98.05%。

1.2 动物

健康SD大鼠,体质量(200±10)g;颈静脉插管SD大鼠,体质量(200±10)g;胆管插管大鼠,体质量(250±10)g。雌雄兼用,动物来源北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号SCXK(京)2016-0006。

1.3 仪器

WIZARD2 2470自动伽马计数器(美国PE公司出品);台式离心机(美国Thermo Scientific公司产品);DL-5型冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司);平头针注射器(思科诺思生物科技(北京)有限公司产品)。

2 方法

2.1 采用总放射性法(RA)/三氯醋酸沉淀结合放射性测定法(TCA-RA)测定血浆样品中rhEPO药物浓度的分析方法

2.1.1 标准曲线 将高浓度的rhEPO(Eprex/济脉欣)注射液加入适量的 ^{125}I -rhEPO(Eprex/济脉欣),

用PBS稀释成2 000 U/mL工作液。并以空白大鼠血浆将上述工作液稀释配成浓度为100、300、1 000、3 000、10 000、30 000 mU/mL的标准液,各取50 μ L置于测定管中在 γ 计数器上测定放射计数值(CPM),每个浓度平行做两管取平均值,以药物浓度为横坐标、CPM为纵坐标作图即得到RA法标准曲线。各取50 μ L不同浓度标准液置于测定管中,分别加入20%三氯乙酸溶液200 μ L混匀,离心弃上清后,在 γ 计数器上测定沉淀CPM值,每个浓度平行做两管取平均值,以药物浓度为横坐标、CPM为纵坐标作图即得到TCA-RA法标准曲线。

2.1.2 精密度和准确度 将2 000 U/mL rhEPO工作液(Eprex/济脉欣)用空白大鼠血浆配成浓度200、5 000、15 000 mU/mL的QC血样,分批按“2.1.10方法进行测定,计算批内变异和批间变异。

2.1.3 样品测定过程中的随行质量控制 在测定样品同时,平行测定低、中、高3个浓度(200、5 000、15 000 mU/mL)的质控血浆样品。质控样品测定结果的RE在 $\pm 15\%$ 之内为合格,最多允许1/3不在同一浓度的质控样品结果超限,当日数据方可接受。

2.2 测定组织样品中rhEPO药物浓度的分析方法

用空白大鼠心、肝、肾、脑和肌肉等组织匀浆为基质,将2 000 U/mL rhEPO工作液(Eprex/济脉欣)稀释配成浓度为30、100、300、1 000、3 000、10 000 mU/mL的标准液,各取400 μ L置于测定管中,在 γ 计数器上测定CPM,每个浓度平行做两管取平均值,以药物浓度为横坐标、CPM为纵坐标作图即得到RA法标准曲线。各取400 μ L不同浓度标准液置于测定管中,分别加入20%三氯乙酸溶液400 μ L混匀,离心弃上清后,在 γ 计数器上测定沉淀CPM值,每个浓度平行做两管取平均值,以药物浓度为横坐标、CPM为纵坐标作图即得到TCA-RA法标准曲线。其中心脏组织标准曲线用于测定心脏、肺脏药物浓度;肝脏组织标准曲线用于测定肝脏、脾脏药物浓度;肾脏组织标准曲线用于测定肾脏药物浓度;脑组织标准曲线用于测定脑、脂肪、子宫和睾丸组织药物浓度;肌肉组织标准曲线用于测定肌肉、胃、肠、组织药物浓度。

2.3 测定排泄物中rhEPO药物浓度的分析方法

用空白大鼠尿、胆汁和粪匀浆为基质,将2 000 U/mL rhEPO工作液(Eprex/济脉欣)稀释配成浓度为30、100、300、1 000、3 000、10 000 mU/mL的标准液,各取400 μ L置于测定管中,在 γ 计数器上测定CPM,每个浓度平行做两管取平均值,以药物浓度

为横坐标、CPM为纵坐标作图即得到标准曲线。

2.4 济脉欣和Eprex®的血浆药物动力学对比研究

12只颈静脉插管SD大鼠(雌雄各半)随机分成2组(每组3雌3雄),分别皮下注射济脉欣和Eprex®,给药后0、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h取约0.2 mL全血,肝素抗凝管离心分离出血浆,测定时取50 μ L血浆置于测定管中,进行RA法测定,然后加20%三氯醋酸200 μ L,振荡混匀,离心后弃上清液,对沉淀物进行TCA-RA法测定,分别从RA或TCA-RA标准曲线计算出药物的浓度。

2.5 济脉欣和Eprex®的药物组织分布对比研究

48只健康SD大鼠(雌雄各半)随机分成2组,分别皮下注射济脉欣和Eprex®,给药后2、8、24、36 h每组各处死6只动物(3雌3雄),取心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、脑、肌肉、脂肪、子宫及卵巢、睾丸,匀浆后取400 μ L进行RA测定,加400 μ L 20%三氯醋酸,离心后弃上清液,对沉淀物进行TCA-RA测定,分别从RA或TCA-RA组织标准曲线计算出药物的浓度。

2.6 济脉欣和Eprex®的药物排泄对比研究

2.6.1 药物尿粪排泄对比研究 12只健康SD大鼠(雌雄各半)随机分成2组(每组3雌3雄),分别皮下注射济脉欣和Eprex®,给药后放入代谢笼内,分别收集0~2、2~4、4~6、6~8、8~10、10~12、12~24、24~36、36~48、48~72、72~96、96~120 h的尿样和0~4、4~8、8~10、10~12、12~24、24~36、36~48、48~72、72~96、96~120 h粪样,并计量。测定尿样时取400 μ L的置于测定管内,用 γ -计数器测定CPM,从尿标准曲线计算出药物的浓度,计算出尿中药物排泄量和排泄率。粪样用生理盐水按1:5的比例制成匀浆,取400 μ L的置于测定管内,用 γ -计数器测定CPM,从粪标准曲线算出药物的浓度,再计算出粪中药物排泄量和排泄率。

2.6.2 药物胆汁排泄对比研究 12只胆管插管SD大鼠(雌雄各半)随机分成2组(每组3雌3雄),分别皮下注射济脉欣和Eprex®,给药后分别收集0~2、2~4、4~6、6~8、8~12、12~24、24~48 h的胆汁,用 γ -计数器测定CPM,从胆汁标准曲线计算出药物的浓度,计算出药物排泄量和排泄率。

2.7 药动学参数计算

采用DAS 2.0药动学软件进行参数计算。统计使用Execl进行双侧 t 检验。

3 结果

3.1 RA/TCA-RA测定血药浓度方法的建立及确认

3.1.1 RA法 在100~30 000 mU/mL浓度范围内,

济脉欣/Eprex®药物浓度均与CPM呈直线相关, QC样品测定值的准确度均在±15%之内, 批内变异和批间变异均<15%, 本方法的最低定量限为100 mU/mL。

3.1.2 TCA-RA法 在100~30 000 mU/mL浓度范围内, 济脉欣/Eprex®药物浓度均与CPM呈直线相关, 沉淀中平均放射性回收率分别为97.7%和96.7%, QC样品测定值的准确度均在±15%之内, 批内变异和批间变异均<15%, 本方法的最低定量限为100 mU/mL。

3.1.3 质控样品测定 无论是RA法还是TCA-RA法, 分析批随行质控样品测定结果的RE值准确度均在±15%之内。

3.2 血浆药物动力学对比研究结果

大鼠sc 2 000 U/kg 济脉欣和Eprex®的药时曲线分别见图1(RA)和图2(TCA-RA)。DAS计算所得的主要药代动力学参数见下表1。两制剂药代参数经双侧t检验结果均无差异。

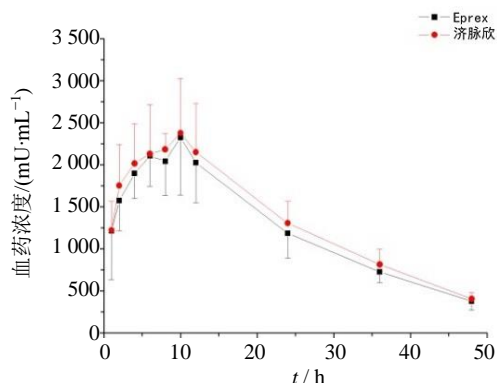


图1 sc rhEPO(Eprex®&济脉欣)2 000 U/kg后大鼠RA法所得药时曲线(n=6)

Fig.1 Time curve of rhEPO (Eprex® and Jimaixin) after 2 000 U/kg sc administration in rats by RA method (n=6)

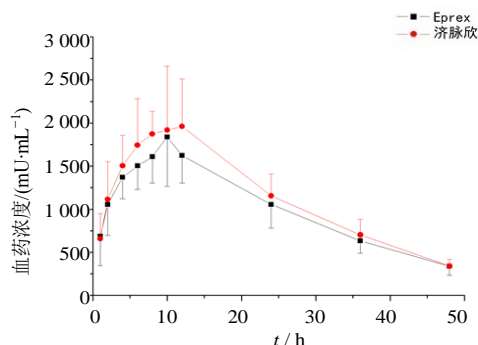


图2 2 000 U/kg 剂量sc给药rhEPO(Eprex®&济脉欣)后大鼠TCA-RA法所得药时曲线(n=6)

Fig.2 Time curve of rhEPO (Eprex® and Jimaixin) after 2 000 U/kg sc administration in rats by TCA-RA method (n=6)

3.3 济脉欣和Eprex®的药物组织分布对比研究结果

大鼠皮下注射2 000 U/kg 济脉欣和Eprex®后, 用RA和TCA-RA法测定给药后2、8、24、36 h各主要脏器及组织药物浓度, 显示大部分组织在给药后8 h药物含量最大, 然后逐渐降低, 各主要脏器及组织药物变化趋势与血浆药物消除一致, 没有发现有蓄积现象。另外两种制剂在各组织脏器内的暴露也无差异。

3.4 济脉欣和Eprex®的药物排泄对比研究结果

大鼠皮下注射2 000 U/kg 济脉欣和Eprex®后, 用RA法测定不同时间段内尿、粪和胆汁的放射性总量。在120 h内济脉欣和Eprex®从尿中分别可回收给药总量的76.2%和75.7%, 在粪中可回收给药量的14.9%和14.7%。48 h内胆汁排泄量分别为10.3%和11.4%, 说明两种制剂排泄并无差异。

4 讨论

生物等效性是指在相同试验和相同剂量条件下, 待测药物与已经上市药物能否达到相同或相近的效应^[10]。生物等效性研究对于保证受试药(仿制

表1 2 000 U/kg 剂量sc给药后测定的rhEPO(Eprex®和济脉欣)主要药代参数(RA/TCA-RA法)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of rhEPO (Eprex® and Jimaixin) determined after sc administration at a dose of 2 000 U/kg (RA/TCA-RA method)

方法	给药组	t _{1/2} /h	C _{max} /(mU·mL ⁻¹)	T _{max} /h	AUC _(0-t) /(mU·mL ⁻¹ ·h)	AUC _(0-∞) /(mU·mL ⁻¹ ·h)	Cl/(L·h ⁻¹ ·kg)
RA法	Eprex®	15.6±3.15	2 470±598	9.00±2.45	59 630±9 391	68 922±11 123	0.661±0.129
	济脉欣	15.8±1.67	2 527±471	10.3±1.51	64 196±12 544	74 537±13 990	0.028±0.006
	P值	0.902	0.858	0.282	0.492	0.459	
TCA-RA法	Eprex®	16.2±2.45	1 907±517	9.00±2.45	48 519±8 623	57 123±12 022	0.037±0.008
	济脉欣	15.9±4.19	2 201±584	10.0±1.27	53 709±11 992	62 607±10 829	0.033±0.006
	P值	0.876	0.377	0.395	0.410	0.426	

药)与参比药(标准药)生物等效,具有相同的有效性和安全性,保证受试药品的质量是极其重要的药物研制环节,在新药开发和评价过程中发挥着非常重要的作用^[11]。通过济脉欣和Eprex®的药物血浆药代动力学对比研究,两制剂药代参数经双侧 t 检验^[11-12]结果均无差异;组织分布和排泄过程的对比研究,表明两种制剂在各组织脏器内的暴露和排泄并无差异。因此,本研究中的国产和已上市的同类制剂具有生物等效性。

参考文献

- [1] 徐秀英,陈琳,卢柏松,等.人红细胞生成素(EPO)工程细胞建立及特性分析[J].生物工程进展,2000,20(3):72-75.
- [2] 姜永生,于世英.重组人促红细胞生成素在肿瘤相关性贫血中的应用[J].中国新药杂志,2005,14(8):961-964.
- [3] 冯玫.红细胞生成素治疗血液肿瘤贫血的进展[J].白血病.淋巴瘤,2003,12(4):244-246.
- [4] 苏香玲.国产重组人促红素治疗28例肾性贫血的疗效分析研究[J].中外医疗,2008,27(34):9.
- [5] Meyer F R L, Steinborn R, Grausgruber H, et al. Expression of platelet-derived growth factor BB, erythropoietin and erythropoietin receptor in canine and feline osteosarcoma [J]. Vet J, 2015, 206(1): 67-74.
- [6] 金尚福,林蔚素,黄德周,等.重组人促红细胞生成素对慢性肾功能衰竭维持性血液透析患者营养状态和红细胞免疫功能的影响[J].海峡药学,2009,21(4):114-116.
- [7] 杨海虹,方平,王春燕,等.重组人促红细胞生成素治疗恶性血液病化疗相关性贫血[J].中国综合临床,2006,22(5):404-406.
- [8] 刘瑜,徐娟,常红,等.大剂量重组人促红细胞生成素在多发性骨髓瘤贫血中的应用[J].华西医学,2009,24(5):1147-1149.
- [9] 高云莉.EPO的市场现状及展望[J].中国新药杂志,2001,10(2):147-150.
- [10] 沈卓之,杨珉.生物等效性研究中的统计学问题[J].中国卫生统计,2015,32(4):716-720.
- [11] 黄圣凯,韩可勤.生物等效性评价的统计方法[J].中国药科大学学报,1994,29(5):312-314.
- [12] 魏敏吉,单爱莲,李丽,等.不同方差分析方法对生物等效性研究结果的影响[J].中国临床药理学杂志,2016,32(23):2195-2198.