

◇ 药学研究 ◇

新型蒽环类衍生物 HY-014 大鼠体内药代动力学和组织分布的研究

赵明霞^{1,2,3}, 鲁晓蓉³, 张俊东², 刘胜利², 王界永², 魏伟¹

摘要 目的 研究新型蒽环类衍生物 HY-014 在大鼠体内的药代动力学和组织分布特征, 为临床研究提供实验依据。方法 大鼠单次尾静脉注射 1.5 mg/kg 的 HY-014 后, 采用 LC-MS/MS 法测定各时间点血浆和组织中 HY-014 及其代谢物 HY-M3 的浓度, 药代动力学参数经 DAS 3.0 统计软件计算获得。结果 采用统计矩方法处理药物浓度时间数据, HY-014 药代动力学参数 C_{max} 、 $T_{1/2}$ 、 V_d 、 CL 、 AUC_{0-4} 、 MRT_{0-4} 分别为 $(1\ 628.6 \pm 618.6) \mu\text{g/L}$ 、 $(24.4 \pm 3.6) \text{h}$ 、 $(23.4 \pm 5.2) \text{L/kg}$ 、 $(0.66 \pm 0.08) \text{L/kg/h}$ 、 $(2\ 219.5 \pm 276.9) \mu\text{g/L} \cdot \text{h}$ 、 $(15.1 \pm 2.4) \text{h}$; HY-M3 药代动力学参数 C_{max} 、 AUC_{0-4} 分别为 $(2.2 \pm 0.6) \mu\text{g/L}$ 、 $(103.1 \pm 13.7) \mu\text{g/L} \cdot \text{h}$ 。静脉注射该药后, 很快向机体的各组织广泛分布, 且具有明显的靶向性, 主要分布在脾、肾、肺、心脏、肝等组织, 脑组织中浓度极低。结论 静脉注射 HY-014 组织分布广泛, 具有明显的靶向性, 肺、肝组织中的药物浓度均较高, 不能通过血脑屏障。

关键词 HY-014; 蒽环类衍生物; 药代动力学; 组织分布; 大鼠; 液相色谱-串联质谱

中图分类号 R 969.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0472-05

蒽环类药物自 20 世纪 70 年代问世以来, 因疗效较好、抗肿瘤谱较广, 已成为临床上有效的抗肿瘤药物之一, 是治疗各种血液性肿瘤(淋巴瘤、白血病等)和实体瘤(乳腺癌、卵巢癌、肉瘤等)的一线化疗药物^[1-3]。HY-014 为新一代具有二糖配基的蒽环类衍生物, 该化合物设计原理: 改变环类抗生素糖基链长度和种类, 提高药物糖基与 DNA 双螺旋小沟间的结合位点, 从而增加药物-DNA-拓扑异构酶形

成的三元复合物的稳定性和选择性。另外分子中含有的氨基基团还可伸出 DNA 双螺旋的小沟并与另一 DNA 链或拓扑异构酶 II 结合。HY-014 相对于其他蒽环类抗生素的优势已在多种肿瘤细胞系体外试验和多种人类肿瘤异种移植荷瘤裸鼠的体内实验中得到证实。本课题组前期试验结果显示, HY-014 以原形代谢为主, 半衰期短于多柔比星和表柔比星, 已知 C13 醇毒性代谢产物显著低于多柔比星, 表现为更好的安全性, 且与顺铂联合使用毒性不叠加, 而药效有协同作用。该研究参照《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》^[4] 要求, 通过 LC-MS/MS 法观察 HY-014 在大鼠体内药代动力学及组织分布情况, 以了解 HY-014 在大鼠体内吸收、分布规律, 为其进一步研究与开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠, SPF 级, 180 ~ 280 g, 共 72 只, 雌雄各半, 购于苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司。

1.2 仪器与试剂 Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX 型 LC-MS/MS (美国 Thermo 公司); XW-80A 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂); XS105 分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); Milli-Q Academic 纯水机 (上海密理博贸易有限公司); KQ-250E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HGC-24 型氮吹仪 (北京瑞邦兴业科技有限公司); 16K 平衡离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司)。

HY-014 原料药 (批号: 20110704, 含量: 93.9%)、HY-014 标准品 (批号: 20110502, 含量: 97.95%)、代谢物 HY-M3 (批号: 20110523, 含量: 88.00%) 均购自合肥合源药业有限公司; 盐酸多柔比星 (批号: 130509-200301, 含量: 97.4%) 由中国药品生物制品检定所提供; 甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯) 购自德国 Merck 公司; 二氯甲烷 (分析纯) 购自天津博迪化工股份有限公司; 水为自制纯化水。

1.3 方法

1.3.1 色谱与质谱条件 色谱条件: 色谱柱 (Phe-

2014-12-26 接收

基金项目: 国家十二五“重大新药创新”科技重大专项资助, 企业创新药物孵化基地建设课题 (编号: 2011ZX09401-021)

作者单位: ¹ 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

² 合肥合源医药科技股份有限公司、³ 合肥合源药业有限公司, 合肥 230031

作者简介: 赵明霞, 女, 硕士研究生;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

nomenex Luna 5 μ C₁₈ 150 mm $\times$ 2.0 mm 柱)、流动相(乙腈:水(含0.1%甲酸)=28:72)、流速0.2 ml/min、柱温40 $^{\circ}$ C、进样量10 μ l。质谱条件:离子源为电喷雾电离源;正离子方式检测,电喷雾电压为4.7 kV;加热毛细管温度为320 $^{\circ}$ C;源CID为-8 V;鞘气(N₂)压力为30 Arb;辅气(N₂)压力为3 Arb;碰撞气(Ar)压力为1.0;扫描时间均为0.5 s;扫描方式为选择反应监测。用于定量的离子分别为HYY-014 m/z:母离子644.0、子离子331.0、碰撞能33 eV;HYY-M3 m/z:母离子646.0、子离子332.7、碰撞能27 eV;内标物多柔比星 m/z:母离子544.0、子离子396.8、碰撞能15 eV。

1.3.2 HYY-014 原料药的配制 称取所需量的HYY-014原料药于灭菌后的容器中,用5%葡萄糖注射液溶解成0.30 mg/ml溶液,并用0.22 μ m过滤膜过滤杀菌。

1.3.3 药代动力学研究 根据课题组HYY-014前期药效学研究及预试验结果,选择8只大鼠,雌雄各半,经大鼠尾静脉缓慢推注1.5 mg/kg HYY-014,分别于给药前(0)和给药后5、15、30 min、1、2、4、8、16、24、36、48、72、96 h从眼眶后静脉丛取血约0.2 ml置于肝素抗凝管,3 000 r/min离心15 min后分离血浆。

1.3.4 组织分布研究 取64只大鼠随机均等分成8组,雌雄各半,经大鼠尾静脉缓慢推注1.5 mg/kg HYY-014,分别于给药前(0)和给药后5 min、1、4、10、24、72、120 h处死动物,取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胃、脑、小肠、肌肉、脂肪、皮肤、骨骼、睾丸(卵巢)等组织,用滤纸吸干组织表面血液,剪取称重约0.5 g,剪碎后按照1:4(w:v)的比例,加入生理盐水,制成匀浆液,-70 $^{\circ}$ C冷冻保存待测。

1.3.5 样品处理方法 精密吸取10 μ l内标物多

柔比星溶液(86.4 μ g/L)加入空白离心管中,加入一定体积的组织匀浆液(血浆取50 μ l,胃、肝、脾、肺、睾丸、心脏、肾脏、卵巢取300 μ l,脂肪、肌肉、骨骼取1 000 μ l,皮肤、小肠、脑取2 000 μ l),涡旋1 min,加入混合提取液(二氯甲烷:甲醇=9:1),涡旋3 min,14 000 r/min离心10 min,提取有机层,N₂下吹干,100 μ l复溶液(甲醇:水=50:50),10 μ l进样分析。

1.4 统计学处理 标准曲线采用线性回归分析,药代动力学参数采用DAS 3.0软件计算。

2 结果

2.1 方法学验证

2.1.1 专属性 取空白血浆/组织匀浆液,除不加内标外,按1.3.5项下操作,获得空白样品色谱图。将一定浓度HYY-014、HYY-M3标准溶液和内标溶液加入大鼠空白血浆/组织匀浆液中,同法操作,获得相应的色谱图;同法得到大鼠给药后血浆样品及组织样品色谱图。HYY-014保留时间为3.9 min,代谢物HYY-M3保留时间为2.8 min,内标物多柔比星保留时间为2.6 min。在色谱条件下,大鼠组织匀浆中内源性物质不干扰HYY-014、代谢物HYY-M3及内标的测定。心脏组织典型色谱图见图1,血浆及其他组织与代表性组织的色谱图相同。

2.1.2 标准曲线 精密吸取不同浓度的HYY-014、HYY-M3标准溶液及内标工作液各10 μ l,加入不同体积空白血浆/组织匀浆液,混匀,按1.3.5项下方法处理制备标准曲线。以血浆/组织浓度(X)为横坐标,以样品峰面积与内标峰面积的比值(Y)作为纵坐标,用加权最小二乘法($W=1/X^2$)进行线性回归,结果显示HYY-014及其代谢物HYY-M3线性关系均良好, $r \geq 0.99$ 。见表1。

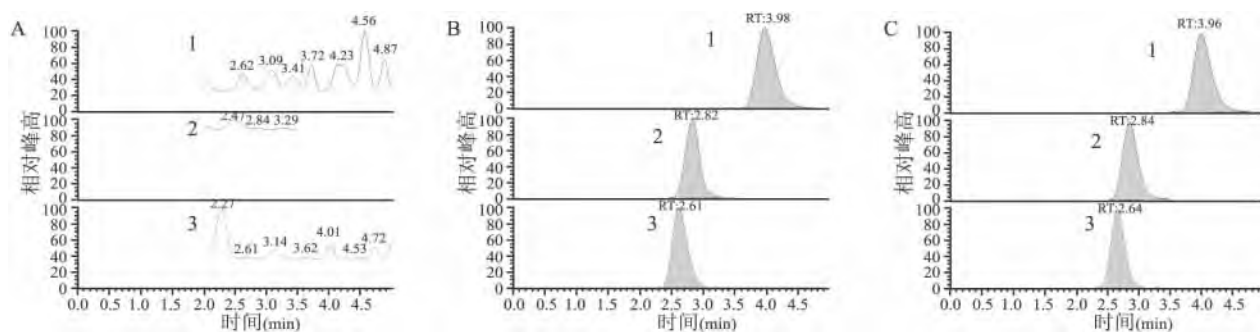


图1 大鼠心脏组织专属性色谱图

A:大鼠心脏组织空白样品色谱图;B:大鼠心脏组织加入标准溶液色谱图;C:大鼠给药后1 h心脏组织色谱图;1:HYY-014;2:代谢物HYY-M3;3:内标多柔比星

表1 大鼠血浆/各组织中 HY-014 及 HY-M3 的线性范围、回归方程及相关系数

项目	HY-014			HY-M3		
	线性范围($\mu\text{g/L}$)	回归方程	r 值	线性范围($\mu\text{g/L}$)	回归方程	r 值
血浆	1.563 ~ 2 000.444	$\hat{Y}=0.0159X-0.0001$	0.998	0.420 ~ 15.006	$\hat{Y}=0.0121X-0.0023$	0.996
心	3.515 ~ 899.922	$\hat{Y}=0.1214X+0.0429$	0.999	0.234 ~ 30.000	$\hat{Y}=0.1321X-0.0170$	0.998
肝	3.906 ~ 499.957	$\hat{Y}=0.1312X+0.0178$	0.998	0.234 ~ 30.000	$\hat{Y}=0.1407X-0.0125$	0.999
脾	39.059 ~ 2 499.783	$\hat{Y}=0.1263X+0.9731$	0.995	0.469 ~ 30.000	$\hat{Y}=0.1751X-0.0163$	0.997
肺	23.435 ~ 1 499.870	$\hat{Y}=0.1366X+0.1413$	0.997	0.773 ~ 49.499	$\hat{Y}=0.2299X-0.0357$	0.998
肾	15.624 ~ 1 999.826	$\hat{Y}=0.1315X+0.1854$	0.998	0.619 ~ 39.599	$\hat{Y}=0.1387X-0.0208$	0.999
胃	7.812 ~ 499.957	$\hat{Y}=0.1620X-0.0154$	0.997	0.309 ~ 19.800	$\hat{Y}=0.1969X-0.0293$	0.995
脑	0.619 ~ 39.597	$\hat{Y}=0.8994X-0.0596$	0.996	0.031 ~ 1.960	$\hat{Y}=0.9116X-0.0176$	0.996
肠	7.812 ~ 1 999.826	$\hat{Y}=0.1301X+0.1478$	0.999	0.469 ~ 59.999	$\hat{Y}=0.1527X-0.0278$	0.998
肌肉	3.867 ~ 494.957	$\hat{Y}=0.4898X+0.1107$	0.998	0.187 ~ 12.000	$\hat{Y}=0.5278X-0.0385$	0.998
骨骼	3.867 ~ 494.957	$\hat{Y}=0.4646X+0.1594$	0.998	0.187 ~ 12.000	$\hat{Y}=0.6131X-0.0592$	0.997
脂肪	2.344 ~ 149.987	$\hat{Y}=0.4953X+0.0845$	0.997	1.531 ~ 196.017	$\hat{Y}=0.0419X-0.0178$	0.996
皮肤	0.937 ~ 59.995	$\hat{Y}=0.9679X+0.0747$	0.999	0.046 ~ 2.970	$\hat{Y}=1.1578X-0.0277$	0.996
睾丸	0.619 ~ 19.798	$\hat{Y}=0.8366X+0.0994$	0.998	0.061 ~ 1.960	$\hat{Y}=0.8811X-0.0130$	0.994
卵巢	7.812 ~ 499.957	$\hat{Y}=0.1347X+0.0613$	0.998	0.234 ~ 15.000	$\hat{Y}=0.1494X-0.0200$	0.998

2.1.3 精密度 按 1.3.5 项下方法处理制备高、中、低 3 个浓度的 HY-014、HY-M3 样品,平行操作 6 份,于同 1 d 内测定 3 次,计算日内精密度;连续测定 3 d,计算日间精密度。HY-014、HY-M3 日内精密度相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 3.12% ~ 9.98%、3.23% ~ 10.09%;日间精密度 RSD 分别为 6.49% ~ 8.84%、6.50% ~ 8.48% 符合要求。

2.1.4 提取回收率与基质效应 按 1.3.5 项下方法处理制备高、中、低 3 个浓度的 HY-014、HY-M3 样品,平行操作 3 份,以处理后的样品色谱峰面积与相应浓度的未经处理的样品色谱峰面积之比,考察方法的提取回收率;以空白血浆处理后再加入标准溶液所得色谱峰面积与相应浓度的未经处理的样品色谱峰面积之比考察基质效应。结果显示 HY-014、HY-M3 及内标提取回收率分别为 71.06% ~ 90.99%、55.23% ~ 67.44%、82.79% ~ 92.07%,基质效应分别为 96.62% ~ 109.24%、92.78% ~ 115.27%、89.65% ~ 108.10%;RSD 值均小于 12% 符合要求。

2.1.5 稳定性 按 1.3.5 项下方法处理制备高、中、低 3 个浓度的 HY-014、HY-M3 样品,平行操作,分别考察在室温放置 6 h、室温放置 7 h 再处理、4 °C 放置 23 h、反复冻融 3 次、长期冷冻 33 d 条件下的稳定性。结果显示 RSD 值均小于 10% 样品在上述条件下均稳定。

2.2 大鼠药代动力学研究 大鼠静脉注射 HY-014 后, HY-014、HY-M3 血药浓度用 DAS 3.0 软件采用统计矩方法统计相应药代动力学参数。见图

2、表 2。

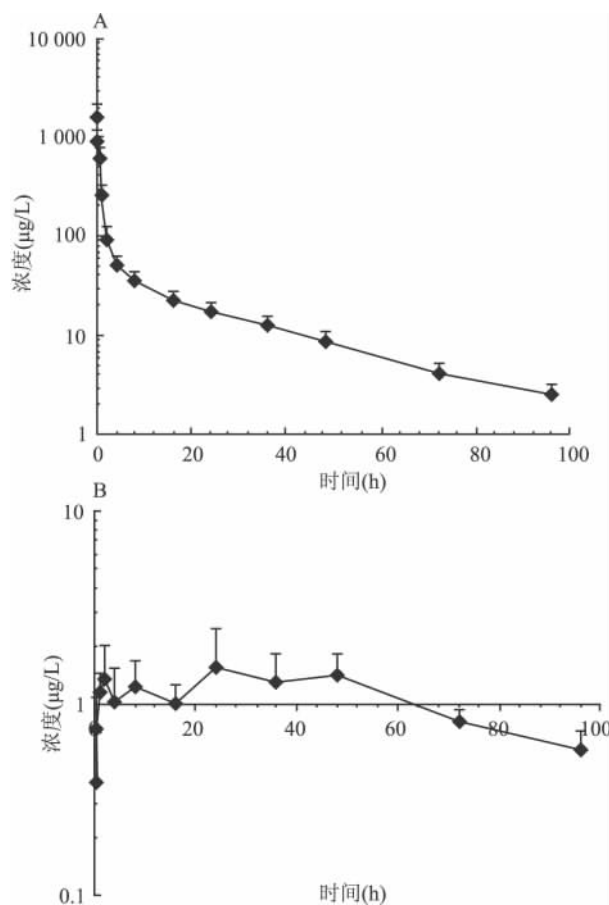


图2 大鼠静脉注射 HY-014 后血药浓度-时间曲线图(半对数图)

A:大鼠静脉注射 1.5 mg/kg HY-014 后 HY-014 血药浓度-时间曲线;B:大鼠静脉注射 1.5 mg/kg HY-014 后 HY-M3 血药浓度-时间曲线

2.3 大鼠体内组织分布研究 静脉给予 HY-014

表2 大鼠静脉注射 1.5 mg/kg HY-014
后药代动力学参数 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

参数	HY-014	HY-03
AUC_{0-1} ($\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$)	$2\,219.50 \pm 276.90$	103.1 ± 13.7
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/L}$)	$1\,628.60 \pm 618.60$	2.2 ± 0.6
$T_{1/2}$ (h)	24.40 ± 3.60	—
MRT_{0-1} (h)	15.10 ± 2.40	—
CL (L/kg/h)	0.66 ± 0.08	—
V_d (L/kg)	23.40 ± 5.20	—

后,该药可很快向机体的各组织广泛分布。5 min 时组织中 HY-014 浓度依次为:脾>肾>肺>小肠>心脏>卵巢>肝>胃>骨骼>肌肉>脂肪>皮肤>睾丸>脑,其中脾、肾、肺等器官达到最高;1~24 h 后各器官浓度均下降(除小肠、肌肉和脂肪外),脾、肾、肺浓度均降低较少;72~120 h 后,各器官浓度趋于平稳,但仍旧能够检测到,120 h 后脾和肺中的浓度较高。皮肤、睾丸、脑均分布较低。HY-03 在组织分布中从 5 min~10 h 逐渐升高,5 min 时脾、骨髓、肌肉、血浆和脑中均未检测到 HY-03,大部分组织在 10 h 或 24 h 时达到最高浓度,而后逐渐降低,在 120 h 后仍可检测到。见图 3、4。

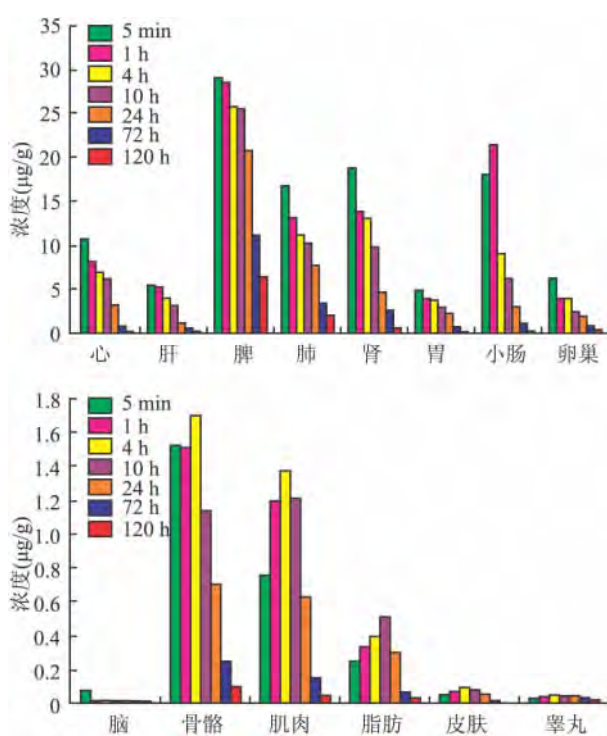


图3 不同时间点各组织中 HY-014 的浓度分布图

3 讨论

在新药研发过程中,药物在吸收、分布、代谢和消除过程中具有良好的药代动力学性质和较低的毒

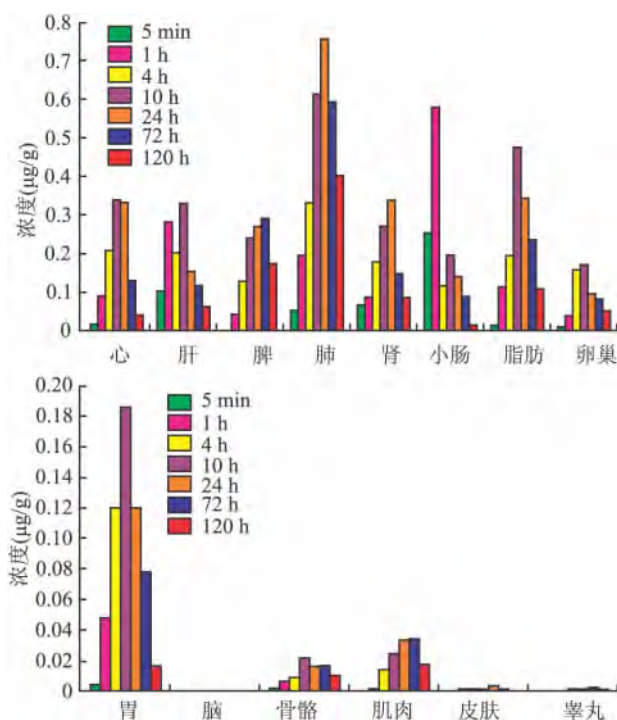


图4 不同时间点各组织中代谢物 HY-03 浓度分布图

副作用是候选药物通过临床试验的关键。由于吸收率、稳定性、不良反应等原因被淘汰的药物占到新药开发的 50%^[5]。研究药物的组织分布特点,有助于了解药物作用的靶器官,预测药物的药理作用,对扩大药物的临床用途有重要意义;组织分布研究还提供了药物的可能蓄积部位及其程度,对于预测药物不良反应有重要价值。

在蒽环类抗生素中,多柔比星为最具代表性的药物,目前已在临床中用于多种肿瘤疾病的治疗。然而骨髓毒性、剂量依赖性累积心脏毒性和耐药性的出现会限制蒽环类抗生素药物的使用。过去的 25 年中人们为开发新的高效、低毒蒽环类抗生素药物付出了巨大的努力。自多柔比星发现以来,为拓展多柔比星的抗肿瘤谱和突破其毒性限制,已有超过 2 000 种结构类似物被合成和开发。第二代蒽环类抗生素药物表柔比星和依达比星已应用于临床,前者降低了心脏毒性,因此可以使用更高累积剂量;后者则使药物针对血液学恶性肿瘤具有更强大的药理活性。降低药物毒性及增加对肿瘤的选择性成为蒽环类抗生素药物开发的主要方向。

本研究结果表明,静脉注射 HY-014 后,大鼠体内主要以原形代谢为主,血浆中消除半衰期较短,血药浓度较高,结合课题组其他试验结果显示,HY-014 具有良好的药代动力学特征,在治疗浓度

范围呈线性特征,较其他类似物有更高的浓度和较短的半衰期;该药物在组织中的分布较广泛,具有一定的靶向性,主要分布在脾、肾、肺、心脏、肝等组织,其中脑组织浓度极低,提示该药不易通过血脑屏障。其分布特征提示了其抗肿瘤活性具有组织选择性,HYY-014在肺脏具有较高浓度,临床前药效学研究已表明该药对小细胞肺癌疗效均优于多柔比星。毒性代谢产物 HYY-M3 在组织中的浓度较低,特别是在心脏组织浓度较低,提示 HYY-014 可能较其他蒽环类抗生素类似物心脏毒性低。

蒽环类同类型抗肿瘤药物多柔比星等检测多采用荧光法^[6-9]在检测限方面有一定局限性。本研究采用 LC-MS/MS 测定血浆/组织浓度,灵敏度高,最低检测浓度可至 0.031 $\mu\text{g/L}$ 。文献^[9]中生物样品预处理方法多使用大体积的氯仿、氯仿-甲醇混合液提取,或者使用固相萃取法,氯仿不仅毒性大且萃取过程中容易发生乳化,固相萃取柱价格昂贵,成本高。本研究采用二氯甲烷和甲醇混合物萃取,降低了有机试剂的毒性和用量。

参考文献

[1] 韩崇,朱雄,徐云根. 蒽环类抗肿瘤化合物的研究进展

- [J]. 中国新药杂志,2013,22(3):307-12.
- [2] Ding Q, Zhan J. Amrubicin: potential in combination with cisplatin or carboplatin to treat small-cell lung cancer [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013(7):681-9.
- [3] Zhou Z Y, Wan L L, Yang Q J, et al. Evaluation of the pharmacokinetics and cardiotoxicity of doxorubicin in rat receiving nilotinib [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(1):238-44.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则[H]GPT5-1. 2005-03.
- [5] 王琳,陈涵. 药物体外吸收、分布、代谢和排泄筛选模型 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(50):9957-61.
- [6] 孙习鹏,万丽丽,徐志儒,等. 高效液相色谱法测定大鼠血浆及组织中多柔比星含量 [J]. 中国药物应用与监测, 2010, 7(4):211-5.
- [7] Huan M, Tian S, Cui H, et al. Deposition of doxorubicin in rats following administration of three newly synthesized doxorubicin conjugates [J]. *Biomed Res Int* 2013, 2013:926584.
- [8] 秦燕,徐智儒,王向伟,等. PEG 化脂质体多柔比星在动物体内的药动学及组织分布 [J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(8):596-9.
- [9] 蓝晓红,李祥,许锐,等. 高效液相-荧光检测法测定兔血浆中表柔比星的药动学研究 [J]. 解放军药科学学报, 2010, 26(6):503-5.

Pharmacokinetic and tissue distribution studies of HYY-014 , a novel derivate of anthracycline

Zhao Mingxia^{1,2,3}, Lu Xiaorong³, Zhang Jundong², et al

(¹Institute of Clinical Pharmacology Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Hefei Cosource Medicine Technology Co. Ltd, ³Hefei Cosource Pharmaceuticals Co. Ltd, Hefei 230031)

Abstract Objective To study the pharmacokinetics and tissue distribution on HYY-014, a novel derivate anthracycline. **Methods** The plasma and tissues concentrations of HYY-014 and HYY-M3 were detected by LC-MS/MS method after intravenous administration of 1.5 mg/kg HYY-014. The pharmacokinetic parameters were calculated by the procedure of DAS 3.0. **Results** The concentration-time data were analyzed by statistical moment principle. The pharmacokinetic parameters $C_{\max}$, $T_{1/2}$, V , CL , AUC_{0-4} and MRT_{0-4} of HYY-014 were $(1\ 628.6 \pm 618.6) \mu\text{g/L}$, $(24.4 \pm 3.6) \text{h}$, $(23.4 \pm 5.2) \text{L/kg}$, $(0.66 \pm 0.08) \text{L/kg/h}$, $(2\ 219.5 \pm 276.9) \mu\text{g/L} \cdot \text{h}$, $(15.1 \pm 2.4) \text{h}$. The pharmacokinetic parameters $C_{\max}$ and AUC_{0-4} of HYY-M3 were $(2.2 \pm 0.6) \mu\text{g/L}$, $(103.1 \pm 13.7) \mu\text{g/L} \cdot \text{h}$. After administrated intravenously, HYY-014 was quickly distributed to the body widely, the target organs were spleen, kidney, lung, heart and liver. The concentration of the brain was very low. **Conclusion** The distribution of HYY-014 is higher in lung and liver after administrated intravenously. It can't permeate blood brain barrier.

Key words HYY-014; anthracycline; pharmacokinetics; tissue distribution; rats; LC-MS/MS