

## 反义寡核苷酸药物癌泰得及其代谢产物的猕猴体内药代动力学研究

王秀中<sup>1</sup>, 王诗鸿<sup>1</sup>, 宋海峰<sup>2\*</sup>, 王清清<sup>2</sup>, 王升启<sup>2</sup>

(1. 解放军第一八八医院, 广东 潮州 521000; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** 研究反义寡核苷酸药物癌泰得 (cantide) 及其代谢产物在猕猴体内的药代动力学特征。通过采用两步固相萃取法结合无胶筛分毛细管电泳技术测定猕猴血浆中的癌泰得及其代谢产物的血药浓度, 并计算药代动力学参数。研究比较了猕猴单次静脉滴注不同剂量 (8, 16, 24 mg·kg<sup>-1</sup>) 癌泰得后血浆中原形药物及其代谢产物 M1 和 M2 的药代动力学行为。猕猴经静脉滴注给药后, 癌泰得在血浆中消除迅速, 末端  $t_{1/2}$  为 57.91~77.97 min, 其  $C_{\max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  和  $AUC_{0-t}$  与给药剂量的线性相关系数 ( $r$ ) 分别为 0.991 8、0.956 8 和 0.977 3。代谢产物紧随原形药物之后达到峰浓度, 且峰浓度均明显低于原形药物。原形药物及其代谢产物 M1 和 M2 的  $CL_s$  分别为 1.60~2.19、5.92~8.58 和 6.07~8.78 mL·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>。结果表明癌泰得原形及其代谢产物的  $C_{\max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  和  $AUC_{0-t}$  均随给药剂量增加而增加。代谢产物的清除率大于原形药物, 且代谢产物在高剂量组表现为 MRT 明显延长, 末端消除相半衰期亦增大。

**关键词:** 反义寡核苷酸; 癌泰得; 代谢产物

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1370-04

## Pharmacokinetics of cantide, an antisense oligonucleotide, and its metabolites in rhesus monkeys

WANG Xiu-zhong<sup>1</sup>, WANG Shi-hong<sup>1</sup>, SONG Hai-feng<sup>2\*</sup>, WANG Qing-qing<sup>2</sup>, WANG Sheng-qi<sup>2</sup>

(1. The 188th Hospital of PLA, Chaozhou 521000, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** To study the pharmacokinetics of cantide, an antisense oligonucleotide, and its metabolites after *iv* gtt administration in rhesus monkeys, a dual solid phase extraction pretreatment method coupling with non-gel sieving capillary electrophoresis analysis method was used for determination of cantide and its metabolites in plasma and their pharmacokinetic parameters were calculated. The pharmacokinetic behavior of cantide and its metabolites (M1 and M2) after *iv* gtt administration (8, 16 and 24 mg·kg<sup>-1</sup>) in rhesus monkeys were investigated. After *iv* gtt administration of cantide to rhesus monkeys, cantide in plasma was eliminated rapidly and the terminal elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) was 57.91–77.97 min, the correlation coefficients ( $r$ ) to the dose of  $C_{\max}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  and  $AUC_{0-t}$  of the prototype was 0.991 8, 0.956 8 and 0.977 3, respectively. The metabolites of cantide reached the  $C_{\max}$  following cantide immediately and the  $C_{\max}$  of metabolites were lower than that of the prototype. The  $CL_s$  of cantide and its metabolites (M1 and M2) were 1.60–2.19, 5.92–8.58 and 6.07–8.78 mL·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>, respectively. So, it is concluded that the  $C_{\max}$  of cantide and its metabolites increased with the dose, which is the same as their  $AUC_{0-\infty}$  and  $AUC_{0-t}$ . The  $CL_s$  of metabolites were higher than that of the prototype. The MRT and  $t_{1/2}$  of metabolites in the high dose group increased obviously.

**Key words:** antisense oligonucleotide; cantide; metabolite

收稿日期: 2011-06-26.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA021602); “重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09503-021); 国家自然科学基金资助项目 (39870879).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66930259, Fax: 86-10-66931230, E-mail: bapklab@yahoo.com

全硫代寡聚脱氧核糖核苷酸癌泰得 (cantide) 为军事医学科学院放射与辐射医学研究所研发的第一代反义药物 (国内专利号 CN1253179A, 国际专利号 PCT/CN99/00173), 碱基序列: 5'-ACTCACTCAGG CCTCAGACT-3'。它以人端粒酶催化亚基 (hTERT) 信使核糖核酸 (mRNA) 为靶点, 通过抑制端粒酶活性, 导致肿瘤细胞凋亡或诱导其分化, 从而具有抗肿瘤作用。体内、外抗肿瘤药效学活性评价显示 Cantide 有较好的抗肿瘤活性, 对胃癌细胞 (BGC-823) 作用最强, 对肝癌、肺癌、乳腺癌的作用强度中等<sup>[1-3]</sup>。

毛细管电泳作为一种主要的分析技术, 常联合固相萃取法 (SPE) 进行生物样品的分析, 具备高效快速且耗样量少的优点<sup>[4]</sup>。本研究采用前期建立的两步固相萃取法结合无胶筛分毛细管电泳 (NGCE) 技术<sup>[5]</sup>测定猕猴经静脉滴注癌泰得后原形药物及其代谢产物 M1 和 M2 的血药浓度, 观察比较癌泰得及其代谢产物 M1 和 M2 在猕猴体内的药代动力学特征, 了解其在猕猴体内的代谢特点, 以便为今后的临床试验提供参考。

## 材料与方 法

**药品和试剂** 反义寡核苷酸: 全硫代寡聚脱氧核糖核苷酸癌泰得和内标 IS (序列结构: 5'-ACTGAC TCACTCAGGCCTCAGACT-3') 由军事医学科学院放射与辐射医学研究所合成提供, 白色冻干粉末, 毛细管电泳检测纯度大于 97%, 于 4 °C 保存。癌泰得批号: 0408-3, 规格: 400 mg/支。

**仪器** P/ACE MDQ 毛细管电泳仪, 配用于单链脱氧核糖核酸 (DNA) 分析的 eCAP™ ssDNA 100-R 试剂盒 (批号: S709077, 美国 Beckman Coulter 公司)。美国 Millipore 纯水系统。强阴离子交换柱 (Agilent 公司, 200 mg, 3 mL), 反相 C<sub>18</sub> 柱 (GracePure 公司, 200 mg, 3 mL), 0.025 μm VS 滤膜购自 Millipore 公司。

**实验动物** 猕猴, 北京协尔鑫生物资源研究所产 [SCXK (京) 2005-0005], 雌雄各半, 体重 (4.6 ± 0.2) kg。分笼饲养于军事医学科学院实验动物中心, 饲以实验动物中心配制的标准颗粒饲料, 自由饮水, 每日给新鲜水果两次。

**实验分组** 设低、中、高 3 个剂量组 (8, 16 和 24 mg·kg<sup>-1</sup>), 每剂量组设 4 只动物, 雌雄各半。将癌泰得溶解于 50 mL 生理盐水, 30 min 内恒速静脉滴注完毕。

**血浆样品采集** 3 个剂量组于给药前以及滴注开始后 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 和 90 min 和 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8 和 10 h 在给药部位对侧后

肢静脉取血, 血样均用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管采集, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 分离血浆, -80 °C 保存待测。

**血浆内癌泰得及其代谢产物的固相萃取** 血浆样品的前处理采用两步固相萃取法<sup>[5]</sup>, 萃取前, 使血浆样品快速融化, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 用微量加样器吸取 200 μL, 并在其中加入 1 mg·mL<sup>-1</sup> 内标 8 μL, 充分混匀, 取 5 mL 上样缓冲液稀释并于 4 °C 保存, 待加载到强阴离子交换柱。

**血浆内癌泰得及其代谢产物的定量分析** 采用紫外检测器, 检测波长 254 nm, 电动进样 10 kV·10 s, 毛细管温度 25 °C, 采用负极到正极模式于 24 kV 恒压分离。用毛细管电泳仪自带的 32 karat 软件进行积分计算。

实验结果用 MicroCal 公司 Origin7.5 软件绘制浓度-光吸收度的标准曲线。用双对数线性回归拟合实验数据:  $Y = A + B X$ 。式中  $Y$  为归一化积分面积 (待测物与内标的积分面积比值),  $X$  为样品中待测物的浓度。根据标准曲线方程计算血浆药物浓度, 实验中每测 100 个样品做一条标准曲线。

**药代动力学参数计算和统计分析** 用 WinNonlin 5.2 软件非房室模型计算公式计算各药代动力学参数, 猕猴药代参数比较用 Student's  $t$ -检验法进行统计学判断。用 MicroCal Origin 7.5 软件对实验结果作图, 以血药浓度对时间做半对数曲线。

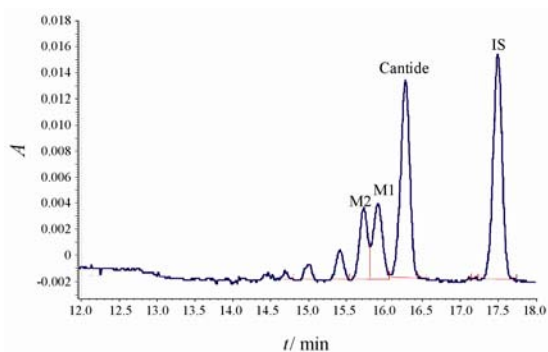
## 结 果

### 1 方法学确证结果

血浆样品中癌泰得检测条件的优化和方法学确证见文献<sup>[5]</sup>。方法学确证结果表明, 猕猴血浆中癌泰得在 1.95~250 μg·mL<sup>-1</sup> 呈良好的线性, 定量限 (LOQ) 为 1.95 μg·mL<sup>-1</sup>。批内准确度为 93.38%~100.71%, 批内相对标准偏差 <11%; 批间准确度为 89.46%~103.46%, 批间相对标准偏差 <9%。在不同条件下 (室温 4 h, 4 °C 存放 24 h, -80 °C 至室温反复冻融 2 次, -80 °C 保存 1 个月) 癌泰得在猕猴血浆中稳定性良好。结果表明, 该方法准确、灵敏度高、特异性强、线性范围宽, 可作为癌泰得药代动力学的定量分析方法。同时该方法对于癌泰得在猕猴体内的代谢产物 M1 和 M2 也能很好地进行分离分析, 显示了该方法优良的可行性和特异性, 见图 1。

### 2 猕猴单次静脉滴注不同剂量癌泰得后的血浆原形药物及其代谢产物 M1 和 M2 浓度-时间变化

图 2 为猕猴单次给药后 3 个剂量组原形药物及代谢产物 M1 和 M2 的药时曲线, 由图中可见, 给药后



**Figure 1** Specificity of separation of cantide, IS (5'-ACTGAC TCACTCAGGCTCAGACT-3') and its metabolites in plasma after a single administration of 8 mg·kg<sup>-1</sup> cantide for 60 min

癌泰得在猕猴血浆中清除迅速，各剂量组的血药浓度随给药剂量的增大而增大，血浆中代谢产物的浓度变化趋势与原形药物基本一致，两种代谢产物的浓度接近，且均明显低于原形药物。原形药物及其代谢产物在各剂量组之间的达峰浓度有明显差异。

**3 猕猴单次静脉滴注不同剂量癌泰得后血浆原形药物及其代谢产物 M1 和 M2 的药代动力学参数**

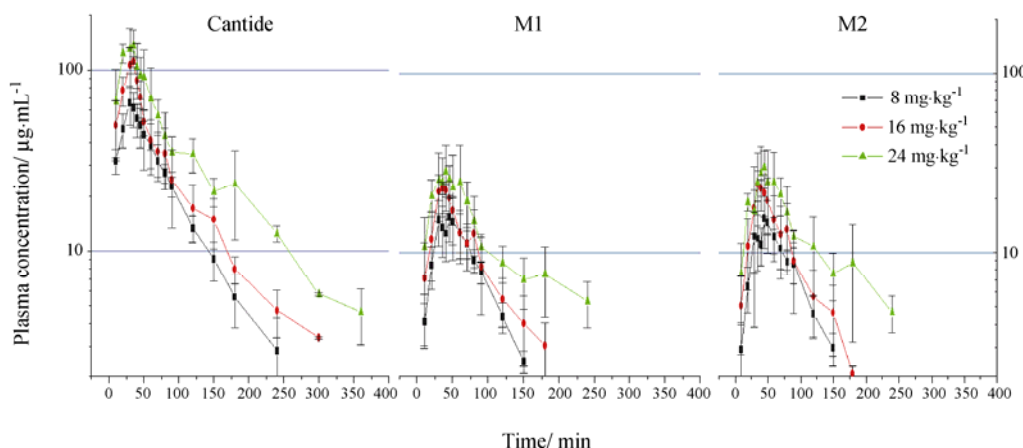
表 1~3 分别为猕猴静脉滴注 8, 16 和 24 mg·kg<sup>-1</sup>

癌泰得后各组猕猴血浆原形药物及其代谢产物 M1 和 M2 的药代动力学参数比较。各剂量组给药剂量之比为 1 : 2 : 3，原形药物及其代谢产物 M1 和 M2 的 AUC<sub>0-inf</sub> 的增长比分别为 1 : 1.43 : 2.42, 1 : 1.40 : 2.73 和 1 : 1.36 : 3.67。

**讨论**

前期研究结果表明癌泰得在小鼠体内呈线性动力学特性，并且迅速消除<sup>[6]</sup>。本研究中，猕猴经静脉滴注癌泰得 (8, 16 和 24 mg·kg<sup>-1</sup>) 后，血浆中癌泰得被迅速消除，随即便可观察到链缩短代谢产物吸收峰的出现，代谢产物紧随原形药物之后达到峰浓度，峰浓度均明显低于原形药物。原形药物及代谢产物的 C<sub>max</sub>、AUC<sub>0-inf</sub> 和 AUC<sub>0-t</sub> 均随给药剂量增加而增加，各剂量组的末端消除相半衰期大多无统计学意义差别，但在数值上均已呈现随剂量增加而延长的趋势。尽管清除率仅在低中剂量组之间存在统计学意义的差别，但 MRT 仍表现为随剂量增加而增大，高剂量组增加幅度尤为明显。

本研究中同时观察了癌泰得给药后分别相差一



**Figure 2** Mean plasma concentration-time curves of cantide, M1 and M2 after iv gtt administration at three different doses (8, 16, 24 mg·kg<sup>-1</sup>) in rhesus monkeys (n = 4,  $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1** Pharmacokinetic parameters of cantide in rhesus monkey plasma after iv gtt administration of the three doses. n = 4,  $\bar{x} \pm s$ . \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001 vs 16 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\Delta$ P < 0.05,  $\Delta\Delta$ P < 0.01 vs 8 mg·kg<sup>-1</sup>

Parameter	Dose /mg·kg <sup>-1</sup>		
	8	16	24
AUC <sub>0-t</sub> /µg·min·mL <sup>-1</sup>	4 874.46 ± 844.08*	6 998.54 ± 1 094.18	11 057.38 ± 2 068.03* $\Delta\Delta$
AUC <sub>0-inf</sub> /µg·min·mL <sup>-1</sup>	5 148.73 ± 1 018.81*	7 392.22 ± 1 019.76	12 462.22 ± 3 485.74 $\Delta$
MRT /min	67.85 ± 13.98	73.37 ± 13.35	100.83 ± 4.29* $\Delta$
CL <sub>s</sub> /mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	1.60 ± 0.31*	2.19 ± 0.27	2.04 ± 0.53
V <sub>SS</sub> /mL·kg <sup>-1</sup>	106.44 ± 16.26*	160.69 ± 35.43	205.75 ± 57.72 $\Delta$
t <sub>1/2</sub> /min	57.91 ± 23.64	73.58 ± 25.45	77.97 ± 8.84
C <sub>max</sub> /µg·mL <sup>-1</sup>	72.21 ± 8.68***	119.90 ± 11.22	150.01 ± 17.84* $\Delta\Delta$

**Table 2** Pharmacokinetic parameters of M1 in rhesus monkey plasma after *iv* gtt administration of three doses.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 16 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 8 mg·kg<sup>-1</sup>

Parameter	Dose /mg·kg <sup>-1</sup>		
	8	16	24
AUC <sub>0-7</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 190.20 $\pm$ 171.25*	1 648.96 $\pm$ 278.01	2 696.36 $\pm$ 646.85* $\Delta$
AUC <sub>0-inf</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 385.35 $\pm$ 248.89	1 945.88 $\pm$ 468.44	3 776.77 $\pm$ 1 473.07 $\Delta$
MRT /min	65.60 $\pm$ 4.66	82.92 $\pm$ 32.71	140.86 $\pm$ 40.75 $\Delta$
CL <sub>s</sub> /mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	5.92 $\pm$ 1.06	8.58 $\pm$ 2.00	7.02 $\pm$ 2.35
V <sub>SS</sub> /mL·kg <sup>-1</sup>	385.70 $\pm$ 54.61*	670.51 $\pm$ 125.37	923.96 $\pm$ 172.34 $\Delta\Delta$
t <sub>1/2</sub> /min	40.35 $\pm$ 4.14	65.11 $\pm$ 36.96	101.72 $\pm$ 27.90 $\Delta$
C <sub>max</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	17.51 $\pm$ 2.94**	25.25 $\pm$ 1.95	34.94 $\pm$ 7.54 $\Delta$

**Table 3** Pharmacokinetic parameters of M2 in rhesus monkey plasma after *iv* gtt administration of three doses.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs 16 mg·kg<sup>-1</sup>;  $\Delta P < 0.05$  vs 8 mg·kg<sup>-1</sup>

Parameter	Dose /mg·kg <sup>-1</sup>		
	8	16	24
AUC <sub>0-7</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 124.23 $\pm$ 195.44*	1 676.51 $\pm$ 296.90	2 787.38 $\pm$ 762.04 $\Delta$
AUC <sub>0-inf</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 359.80 $\pm$ 273.52*	1 847.17 $\pm$ 242.32	4 994.15 $\pm$ 4 004.19
MRT /min	74.02 $\pm$ 1.81	72.72 $\pm$ 15.63	192.03 $\pm$ 145.42
CL <sub>s</sub> /mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	6.07 $\pm$ 1.21*	8.78 $\pm$ 1.17	6.60 $\pm$ 3.05
V <sub>SS</sub> /mL·kg <sup>-1</sup>	448.85 $\pm$ 90.03	640.11 $\pm$ 175.72	946.24 $\pm$ 233.23 $\Delta$
t <sub>1/2</sub> /min	44.38 $\pm$ 3.76	55.07 $\pm$ 37.95	133.39 $\pm$ 106.30
C <sub>max</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	15.98 $\pm$ 4.39*	26.22 $\pm$ 3.67	33.97 $\pm$ 9.35 $\Delta$

个和两个碱基的代谢产物的血浆浓度变化, 并对其药代动力学参数进行计算和趋势分析。结果表明, 代谢产物由于相对分子量减小, 极性增大, 因而清除率与原形药物相比显著增大, 但两种代谢产物之间的清除率大小差异并不明显, 提示单个碱基的相对分子量变化并不是清除率改变的主要因素, 体内降解过程中的极性改变可能是其重要因素。在低中剂量组, 代谢产物的末端消除相半衰期略低于原形药物, 在高剂量组却大幅度增加, 且表现为  $t_{M2} > t_{M1} > t_{原形}$ , 这是因为机体对代谢产物进行降解清除的同时, 原形药物在体内不断转化生成代谢产物, 又由于高剂量组给药量大, 原形药物转化为代谢产物时间较长, 因而增加幅度尤为明显。

本研究作为癌泰得临床前研究的一部分, 通过观察癌泰得及其代谢产物在猕猴体内的血浆药物浓度-时间变化, 从而获得原形药物和代谢产物的药代动力学参数, 揭示癌泰得及其代谢产物在猕猴体内的代谢清除过程, 为将来的临床试验提供参考。

## References

[1] Wang SQ, Lin L, Chen ZB, et al. Effect of antisense

oligonucleotides targeting telomerase catalytic subunit on tumor cell proliferation *in vitro* [J]. Chin Sci Bull (科学通报), 2002, 47: 993-997.

- [2] Du QY, Wang XB, Chen XJ, et al. Antitumor mechanism of antisense cantide targeting against human telomerase reverse transcriptase [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 2030-2036.
- [3] Lin L, Wang SQ, Guan W, et al. Antitumor activity of antisense oligonucleotides targeted to IGF1R *in vivo* and *in vitro* [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 2002, 29: 247-251.
- [4] Wu JF, Chen LX, Luo GA, et al. Recent advances in the application of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 385-389.
- [5] Wang XZ, Wang QQ, Wang SH, et al. Quantitative determination of Cantide, an antisense oligodeoxynucleotide in rhesus monkey plasma using non-gel sieving capillary electrophoresis method [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2010, 28: 561-565.
- [6] Lu DD. The Studies on Preclinical Pharmacokinetics of Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides (硫代反义寡核苷酸药物的临床前药代动力学研究) [D]. Beijing: Institute of Radiation Medicine of Academy of Military Medical Sciences, 2007.