

单链尿激酶型纤溶酶原激活剂在兔及猕猴中的生物转化和药代动力学

窦桂芳, 汤仲明*, 刘秀文

(军事医学科学院放射医学研究所, 生物技术药物代谢实验室, 北京 100850)

摘要 目的: 研究重组单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(rh-sc-uPA)单链和代谢物双链(tc-uPA)的药代动力学和转化。方法: ^{125}I 标记结合生化反应及 RP-HPLC 测定血浆 ^{125}I -sc-uPA 和 ^{125}I -tc-uPA 浓度; 平板溶圈法测定血浆溶纤组分浓度。结果: 兔 iv ^{125}I -sc-uPA 后单链呈双指数消除, $T_{1/2\alpha}$ 和 $T_{1/2\beta}$ 分别为 7 和 43 min, 双链呈单指数消除 $T_{1/2} = 9$ min, 约有 38% 单链转化为双链。猕猴静脉推注不同剂量 rh-sc-uPA 后血浆溶纤组分浓度呈单指数下降, $T_{1/2}$ 分别为 (6.3 ± 1.8) min, (11.5 ± 2.1) min 和 (12.3 ± 2.9) min, CL_S 随剂量变慢。推注 rh-tc-uPA $T_{1/2} = (13.7 \pm 2.7)$ min。结论: 兔 iv ^{125}I -sc-uPA 后可检测到 ^{125}I -rh-sc-uPA 与 ^{125}I -tc-uPA。猕猴 iv rh-sc-uPA 后血浆溶纤组分浓度呈非线性变化。

关键词 单链尿激酶; 双链尿激酶; 反相高效液相色谱; ^{125}I 标记; 药代动力学; 溶纤活性

尿激酶(two chain urokinase-type plasminogen activator, tc-uPA)及链激酶等溶栓药对纤维蛋白无选择性,常有出血不良反应^[1]。研究表明尿激酶原或单链尿激酶(single chain urokinase-type plasminogen activator, sc-uPA),对纤维蛋白专一性高,出血不良反应少^[2-3];sc-uPA 内加入少量 tc-uPA 可提高疗效,简化工艺^[4-6];体外实验表明 sc-uPA 须转化为 tc-uPA 才能发挥溶纤作用^[11],故应了解注射 sc-uPA 后体内是否同时存在 sc-uPA 和 tc-uPA, sc-uPA 体内代谢动力学是否与 tc-uPA 相同, sc-uPA 浓度与溶纤活性有无相关。为此研究 iv rh-sc-uPA 后 sc-uPA 和 tc-uPA 间的转化及各自的药代动力学;测定了猕猴 iv 不同剂量 rh-sc-uPA 后血浆溶纤组分浓度-时间曲线,并和 iv 相同剂量天然尿源性激酶(rh-tc-uPA)进行比较。

材料与方 法

药品与试剂 CHO 细胞表达重组人糖基化单链尿激酶(rh-sc-uPA,含 rh-tc-uPA 10%~14%),军事医学科学院生物工程研究所产,批号 981027, 2 mg/支,加或不加保护剂;S-2251 生色试剂(购自太阳生物技术公司);Na ^{125}I (Amersham, # 826 A, 放射纯度 98.0%,比活度 $581.0 \text{ MBq} \cdot \mu\text{g}^{-1}$);考马斯亮蓝 G 250 (GBBG-250);琼脂糖(promega);牛血纤

维蛋白原冻干粉(80 mg/支, # 9827)和牛血凝血酶冻干粉(50 BP/支, # 9818)及国家尿激酶标准品(780 u/支,批号:9818)均购自中国药品生物制品检定所。

实验动物 大耳白兔(军事医学科学院动物中心),体重 (2.5 ± 0.2) kg,共 4 只,♀ ♂各半。猕猴(军事医学科学院实验动物中心),共 10 只,♀ ♂各半,体重 (3.5 ± 0.2) kg。

仪器与色谱条件 HP1100 四元梯度泵, Spherisorb C_{18} 柱(300 Å, 15 μm, 4.6 mm × 200 mm)大连物化所装填;Sephacryl S-200 HR(Pharmacia);WIZARD 1470 自动 γ 计数器;分部收集器(Pharmacia)。BISOSEP SEC-S2000(300 mm × 7.8 mm)分子排阻分析:0.05 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液(PBS), pH 7.0,流速 1.0 mL · min⁻¹。Spherisorb C_{18} 分析:A 和 B 洗脱液分别为含 0.1% 三氟醋酸的双蒸水和 100% 乙腈,线性梯度洗脱:在 0~20 min 内从 A 液转为 50% B 液,20~30 min 转为 100% B 液,用 B 液洗柱 5 min,流速 1 mL · min⁻¹。分部收集洗脱液,测定 γ 放射性。

血浆尿激酶纤溶组分检测方法 校正聚苯乙烯长方槽水平后,将琼脂糖储备液 100℃ 融化后稀释冷却至 40℃,加入适量纤维蛋白原和牛凝血酶液(最终浓度分别为 0.51%, 0.51 mg · mL⁻¹ 和 0.11 BP · mL⁻¹),混匀后立即倾入槽内,冷却凝成 12.5 cm × 8.5 cm,厚度 3.7 mm 纤维蛋白平板;用外径 0.3 cm 打孔器打孔 16 个,孔间距 2.0 cm。各孔内加入样品,37℃ 孵育 14 h,卡尺测定各孔溶圈直径。

放射性标记、分离纯化、放化纯度鉴定、蛋白含量测定 参照文献的方法^[10]。放化纯度鉴定如前所述 SHPLC 方法。

纤溶酶激活实验 参照文献^[3]略加修改。

给药和采样 兔 iv ¹²⁵I-rh-sc-uPA 4 × 10⁴ U·kg⁻¹。耳静脉取血,加入预置抑酶肽(终浓度 500 kIU·mL⁻¹)离心管内,0.13 mol·L⁻¹枸橼酸钠(1:9)抗凝,1 340 × g 离心 5 min 分离血浆,4 °C 保存待测。猕猴 iv 7.5 × 10⁴, 1.5 × 10⁵ 或 3.0 × 10⁵ U·kg⁻¹ rh-sc-uPA,或 1.5 × 10⁵ U·kg⁻¹ rt-tc-uPA。其中 1.5 × 10⁵ U·kg⁻¹ rh-sc-uPA 与 rt-tc-uPA 交叉设计自身比较,药物清除期 16 ~ 18 d。注药后不同时间静脉取血,抗凝和分离血浆同前,取 0.5 mL 血浆与醋酸酸化液(4 °C pH 3.9) 0.5 mL 在硅化管混匀,-20 °C 保存待测。

药代动力学参数估算和统计 用 3 P97 实用药代动力学程序估算药代动力学参数,用梯形法计算非房室模型参数。用 t-检验统计判断。按 log y = a + b x 方程用 Microcal Origin 软件拟合。

结 果

1 RHPLC 测定血浆 ¹²⁵I-rh-sc-uPA 和 ¹²⁵I-rh-tc-uPA 的方法学验证

1.1 ¹²⁵I-rh-sc-uPA 放化纯度及溶纤活性 标记混合物的 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤放射性和蛋白图谱重叠,表明纯化品为¹²⁵I-标记蛋白,放射性回收率 97.4%,蛋白标记率 44%。SHPLC 法鉴定¹²⁵I-sc-uPA 放化纯度 96.0%,比放射性 7.95 kBq·μg⁻¹ 蛋白。平板法测定¹²⁵I-rh-sc-uPA 有明显溶纤活性,与未标记样品比较曲线平行右移。S-2251 生色底物法测定 sc-uPA 标记前后溶酰胺活性,EC₅₀ 分别为 18 和 68 ng·mL⁻¹,标记后活性减低。

1.2 血浆 ¹²⁵I-rh-sc-uPA 和 ¹²⁵I-rh-tc-uPA 生化及 RHPLC 测定 血浆加入抑酶酶和¹²⁵I-rh-sc-uPA 后,SHPLC 图谱出现保留体积与非标记 rh-sc-uPA 相同的放射性单峰,同一样品被 dithiothreitol (DTT)在 4 °C 处理 24 h 后峰形变化,放射性主峰下降,出现分子量较小的肩峰,未达到基线分离。改用分辨率较高的 RHPLC 梯度分析,相同处理样品达到基线分离(图 1)。DTT 未处理样品表现 35%乙腈浓度洗脱的放射性单峰;DTT 在 4 °C 处理 24 h 后为双峰,在 25%乙腈浓度洗脱处出现亲水性小峰,占总放射性 9.0% ± 0.3%,两峰基线分离。根据结

构和 PAGE 电泳结果,将 DTT 未处理样品的 35%乙腈洗脱单峰视作¹²⁵I-sc-uPA + ¹²⁵I-tc-uPA 混合物,DTT 处理后 35%乙腈洗脱峰为¹²⁵I-sc-uPA;¹²⁵I-tc-uPA = 混合物-sc-uPA 量。用纤溶酶将¹²⁵I-sc-uPA 激活转化为¹²⁵I-tc-uPA 后,DTT 4 °C 处理 24 h 的 RHPLC 图谱中¹²⁵I-sc-uPA 主峰消失,出现 15% ~ 30%乙腈洗脱亲水性宽峰,表明已全部转化为 tc-uPA 的裂解物。

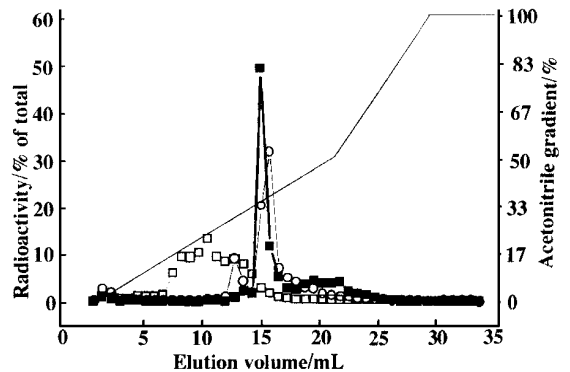


Fig 1 Chromatograms of plasma spiked with ¹²⁵I-sc-uPA. — Acetonitrile (%) in mobile phase. Plasma spiked with ¹²⁵I-sc-uPA (■); Plasma spiked with ¹²⁵I-sc-uPA treated with 0.05 mol·L⁻¹ dithiothreitol (DTT) at 4 °C for 24 h (○); Plasma spiked with ¹²⁵I-sc-uPA treated with plasmin at 37 °C for 6 h and DTT at 4 °C for 24 h (□).

1.3 方法的线性、回收率、精密度和灵敏度 兔血浆预先加抑酶酶和随后加入不同量¹²⁵I-rh-sc-uPA 制备标准曲线,用 RHPLC 方法测定血浆¹²⁵I-sc-uPA 和¹²⁵I-tc-uPA,分别绘制标准曲线和求线性回归方程。结果表明¹²⁵I-sc-uPA + ¹²⁵I-tc-uPA 和¹²⁵I-sc-uPA 的放射性量随加入血浆¹²⁵I-rh-sc-uPA 量呈线性增加,表现为通过零点的两条直线,γ 分别为 0.9998 和 0.9987,斜率分别为 44.8 ± 0.6 和 40.0 ± 1.0 Bq·mL⁻¹。从斜率估算¹²⁵I-rh-sc-uPA 内¹²⁵I-tc-uPA 的含量为 10.9% [(44.9 - 40.0) × 100/44.9],与电泳法测定未标记 rh-sc-uPA 内含 10% tc-uPA 相符。重复测定的变异较大,但 RSD < 20%。血浆放射性平均回收率为 57.2% ± 4.2%。但线形良好,回收率稳定。本法灵敏度以 RHPLC 进样量 10 ~ 50 μL 血浆,35%乙腈梯度洗脱放射性峰,比放射性本底的放射性计数明显增高(4.4 Bq) 为准。

2 血浆纤溶组分浓度的纤维蛋白平板法测定 纤维蛋白平板法是纤溶酶原激活剂激活纤溶酶

原转化为纤溶酶,继而水解纤维蛋白产生溶圈,是根据溶圈大小间接测定纤溶酶原激活剂浓度。sc-uPA 必须转化为 tc-uPA 才产生溶圈,方法不能区别 rh-sc-uPA 和 tc-uPA。因血浆固有的纤溶酶和激肽释放酶可将 sc-uPA 转化为 tc-uPA,测定值是各种纤溶组分浓度的综合变化。方法学着重考察血浆配制 rh-sc-uPA 的溶纤作用。结果表明,新鲜猴血浆配制的不同浓度 rh-sc-uPA 产生的溶圈直径与国家标准尿激酶产生溶圈直径量效关系相似,对数浓度-溶圈直径的直线平行(斜率分别为 0.67 ± 0.05 和 $0.73 \pm 0.07 \text{ cm} \cdot \text{U}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$),同一块板测得 rh-sc-uPA 溶纤 UK 当量($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)数值稳定。孔内加入新鲜猴正常血浆 激肽释放酶均未见溶纤圈。灵敏度取决于孔内加入纤溶酶原激活剂的浓度、体积和肉眼能观察到溶圈直径的大小,最低可靠测定直径为 0.5 cm 孔外径外有 0.1 cm 宽溶圈环,相当于尿激酶(简称 UK 当量) $3.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度时 $10 \mu\text{L}$ 的上样量。加入 $20 \mu\text{L}$ 和多次重现时,最低检测浓度为 $2.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。标准品板内精密 RSD 一般 $< 10\%$,低浓度 $3.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时最大误差 14.7% 。检测 rh-sc-uPA 时板内 RSD $< 20\%$,板间 RSD $< 24.5\%$ 。在 3.7 至 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,标准品对数浓度与溶圈直径(cm)呈线性,相关系数 $r > 0.99$ 以上,个别实验高浓度点偏离线性, $r > 0.97$ 。因此对 $> 100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品必须稀释至线性区,再乘上稀释倍数才能获得可靠测定值。对 $< 3.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的未知样品则需增加样量至 $20 \mu\text{L}$ 和重复测定以获得可靠结果。

3 rh-sc-uPA 在体内的生物转化和药代动力学

3.1 ^{125}I -rh-sc-uPA 在兔体内的药代动力学

图 2 显示兔耳缘 iv ^{125}I -rh-sc-uPA ($4 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后,血浆样品用 RP-HPLC 分析可测得 ^{125}I -rh-sc-uPA 和 ^{125}I -rh-tc-uPA, 随时间延后亲水性很强 ^{125}I -代谢降解物峰增多。分别计算各兔 ^{125}I -rh-sc-uPA 和 ^{125}I -rh-tc-uPA 浓度随时间的变化。图 3 显示了兔耳缘 iv ^{125}I -rh-sc-uPA 后不同时间血浆 ^{125}I -rh-sc-uPA 和 ^{125}I -rh-tc-uPA 浓度时间曲线。表 1 是根据浓度时间曲线数据按线性房室模型和非房室模型估算的药代动力学参数。曲线形状和参数表明两者的药代动力学行为明显不同, ^{125}I -rh-sc-uPA 浓度在体内按双指数衰减,而 ^{125}I -rh-tc-uPA 按单指数更迅速消失。 ^{125}I -rh-sc-uPA 的 $T_{1/2\alpha}$ 与 ^{125}I -rh-tc-uPA 的消除 $T_{1/2\beta}$ 相近。从 $\text{AUC}_{\text{rh-tc-uPA}} / \text{AUC}_{\text{rh-sc-uPA}}$ 估算生物转化率约为 38% 。

Tab 1 Pharmacokinetics of ^{125}I -rh-sc-uPA and its active metabolite ^{125}I -rh-tc-uPA following intravenous injection (iv) of ^{125}I -rh-sc-uPA $4 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ in rabbits

Parameters	^{125}I -rh-sc-uPA	^{125}I -rh-tc-uPA
V_c / L	0.15 ± 0.04	0.45 ± 0.34
$T_{1/2\alpha} / \text{min}$	7 ± 2	-
$T_{1/2\beta} / \text{min}$	43 ± 10	$9 \pm 3^{***}$
K_{21} / min^{-1}	0.023 ± 0.008	-
K_{10} / min^{-1}	0.085 ± 0.031	-
K_{12} / min^{-1}	0.058 ± 0.059	-
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{kBq} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$	398 ± 46	$151 \pm 15^{***}$
MRT / min	22 ± 4	$12 \pm 2^*$
$\text{CL}_S / \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	0.012 ± 0.001	$0.029 \pm 0.003^{***}$

$\bar{x} \pm s, n = 4. ^* P < 0.05$ or $^{***} P < 0.001$ vs ^{125}I -rh-sc-uPA.

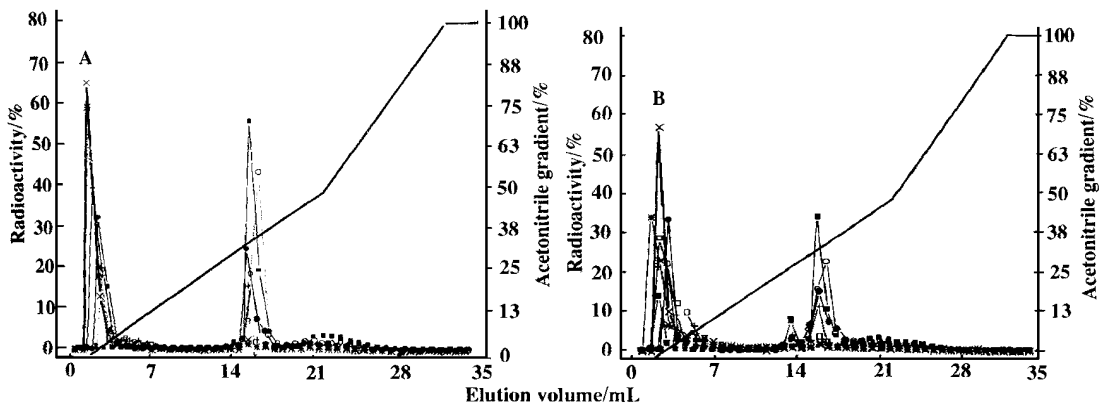


Fig 2 Chromatograms of plasma samples [collected at 1(■), 5(○), 10(●), 20(+), 40(□), 60(*) and 90(×) after iv of ^{125}I -rh-sc-uPA in rabbits] analyzed at various conditions: A: without DTT treatment; B: treated with DTT $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ at 4°C for 24 h.

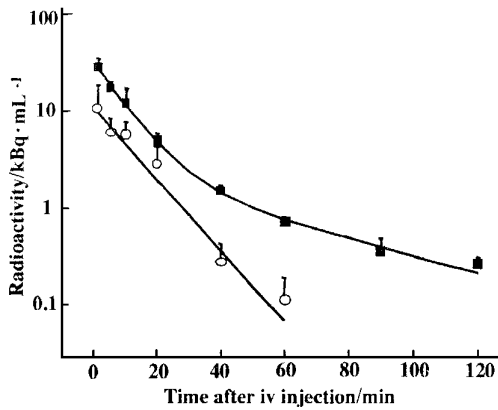


Fig 3 Concentration-time curves of ^{125}I -rh-sc-uPA (■) and ^{125}I -rh-tc-uPA (○) after iv injection of $4 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^{125}I -rh-sc-uPA in rabbits ($n = 4$).

3.2 猕猴 iv 不同剂量 rh-sc-uPA 和 rh-tc-uPA 后的血药纤溶组分浓度-时间曲线

图 4 显示猕猴 iv 7.5×10^4 , 1.5×10^5 和 $3.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 rh-sc-uPA 和 $1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ rh-tc-uPA 后平均血药纤溶组分浓度-时间曲线。对数浓度-时间曲线上表现为依赖于剂量的衰减速度减慢,提示存在非线性消除过程。iv 相同剂量的 rh-sc-uPA 和 rh-tc-uPA, rh-tc-uPA 组血浆纤溶组分浓度明显高于 rh-sc-uPA 组, 20 min 和 40 min 时间点浓度差别有统计意义 ($P < 0.05$), 猴 3 和猴 4 血浆浓度自身比较也有统计意义。

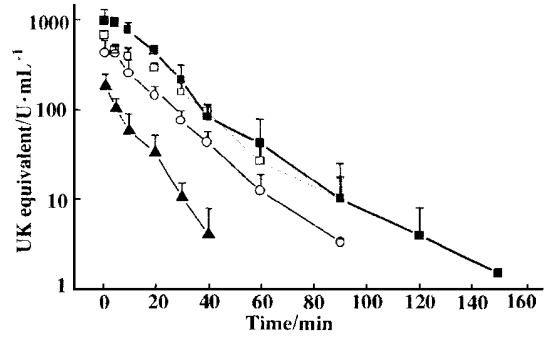


Fig 4 Concentration-time curves of fibrinolytic components in plasma after intravenous injection of $7.5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (▲, $n = 7$), $1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (○, $n = 4$), $3.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (■, $n = 5$) of rh-sc-uPA and $1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (□, $n = 4$) of natural urokinase in rhesus monkeys.

表 2 是猕猴 iv 7.5×10^4 , 1.5×10^5 和 $3.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ rh-sc-uPA 和 $1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ rh-tc-uPA 后血药浓度时间曲线按梯形法计算 AUC 及按非房室模型所得的药代动力学参数。主要特点是消除 $T_{1/2}$ 和 MRT 依赖于剂量地延长 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); AUC 的增大明显大于剂量增长, 全身清除率 CL_s 随剂量增加而减慢 ($P < 0.05$)。提示研究剂量范围内可能涉及多个酶反应, 为依赖于剂量的非线性过程。相同剂量的 rh-sc-uPA 和 rh-tc-uPA 的 $T_{1/2}$ 相近, 而 rh-sc-uPA 的 $AUC_{0-\infty}$ 明显小于 rh-tc-uPA ($P < 0.05$)。

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of fibrinolytic components in plasma ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ equivalent to national urokinase standard assayed at the same plate) after iv injection of various doses of rh-sc-uPA or natural urokinase (rh-tc-uPA) in rhesus monkeys

Parameter	rh-sc-uPA		rh-tc-uPA	
	$7.5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (7)	$1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (4)	$3.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (5)	$1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ (4)
$V_c / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.51 \pm 0.17^{**}$	0.39 ± 0.01	$0.31 \pm 0.08^{\#}$	$0.26 \pm 0.04^*$
$T_{1/2ke} / \text{min}$	$6.3 \pm 1.8^{**}$	11.5 ± 2.1	$12.3 \pm 2.9^{\#\#}$	13.7 ± 2.7
$AUC_{0-\infty} / \text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$	$1995 \pm 719^{**}$	8251 ± 2395	$22156 \pm 3784^{\#\#\#}$	$13828 \pm 1089^*$
MRT / min	$10.6 \pm 2.8^{**}$	16.1 ± 3.1	$17.0 \pm 4.4^{\#}$	19.6 ± 3.8
$CL_s / \text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.051 \pm 0.030^*$	0.022 ± 0.006	$0.016 \pm 0.003^{\#}$	0.012 ± 0.001
$V_{ss} / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.53 \pm 0.31^*$	0.36 ± 0.14	0.26 ± 0.004	0.24 ± 0.05

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ vs iv $1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ of rh-sc-uPA by Student's *t*-test. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ or ### $P < 0.001$ vs iv $7.5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ of rh-sc-uPA by the "student" *t*-test. Number of rhesus monkeys were in parentheses.

讨 论

单链尿激酶体内药代动力学研究困难主要是同时测定原形药物 sc-uPA 和活性代谢物 tc-uPA。因两者由 411 个相同氨基酸和相同排列顺序组成,分子间都有 12 个双硫键,分子量相同。唯一结构差别是纤溶酶或激肽释放酶作用下 sc-uPA 的¹⁵⁸ Lys-¹⁵⁹ Ile 裂解形成 tc-uPA。因此一般的 ELISA^[8,9]、纤维蛋白平板法、生色底物法都不能分别测得体内单双链的量。本实验参照 PAGE 法^[11]原理,依据 sc-uPA 链内二硫键和 tc-uPA 链间二硫键的结构差异,设计了以抑肽酶抑制体外酶转化、DTT 还原打开 tc-uPA 的唯一链间二硫键形成 A 和 B 链,及 A、B 链与原形 sc-uPA 在 RHPLC 色谱行为上的明显差异,成功地实现 iv ¹²⁵I-rh-sc-uPA 后同时测定¹²⁵I-sc-uPA 和¹²⁵I-tc-uPA 的目的,此方法未见文献报道。方法的缺点是步骤过于复杂,RSD 较大。

注射¹²⁵I-rh-uPA(¹²⁵I-rh-sc-uPA 和¹²⁵I-rh-tc-uPA 比值接近于 0.9:0.1)后,取血时立即加抑肽酶抑制¹²⁵I-rh-sc-uPA 转化为¹²⁵I-rh-tc-uPA,血浆内可同时检测到单、双链尿激酶,¹²⁵I-rh-sc-uPA 比例比注入时减低,¹²⁵I-rh-tc-uPA 相对增多;¹²⁵I-rh-tc-uPA 按单指数消除,¹²⁵I-rh-sc-uPA 按双指数消除,¹²⁵I-rh-sc-uPA 快速(相半衰期与¹²⁵I-rh-tc-uPA 消除半衰期相近,而且接近溶纤平板法生物活性测得的数值,¹²⁵I-rh-sc-uPA 末端相半衰期较长。提示¹²⁵I-rh-sc-uPA 转化为有溶纤功能的¹²⁵I-rh-tc-uPA 而发挥作用;MRT 和 CL_S 与半衰期显示相同的趋势;AUC 数值表明¹²⁵I-rh-sc-uPA 与¹²⁵I-rh-tc-uPA 呈动态平衡。为¹²⁵I-rh-sc-uPA 为主(占总量 90%)的制剂药效学特点和出血副作用少,再梗塞发生率低提供了重要的药代动力学分子物质依据。

实验表明纤维蛋白平板法存在着专属性差、灵敏度较低、板间和日间 RSD 较大等明显缺点,但预试验表明特异性高于 S-2251 生色底物法,其优点是操作简易,价格便宜,故仍是动物特别是临床药代动力学可行的研究方法。为了克服该缺点未知样品浓度应以同一板所设置的标准品量效曲线标定,高浓度样品必须稀释至线性范围内,对低浓度样品需加大样品体积多次重复测定可获得可靠结果。鉴于国际上尚无 sc-uPA 的标准品和标准单位及测定方法不易区别各种纤溶酶原激活剂(包括内源性、药用和代谢生成的组分)的现状,根据 10%新鲜猴血浆配制 sc-uPA 和国家标准 UK 溶纤活性量效曲线平行

的实验结果,所以用国家标准尿激酶溶纤圈直径比较计算未知样品内多个纤溶组分的 UK 当量浓度,虽不够准确,但是目前可行的方法。

静脉注射 rh-sc-uPA 后血浆纤溶组分浓度快速减低,半衰期较短,随剂量明显减慢($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。AUC 的增加与 iv 剂量不呈正比。表明药物体内存在非线性动力学过程。静注相同剂量的 rh-sc-uPA 血浆 UK 当量浓度明显低于 rh-tc-uPA。生物活性依赖于剂量地快速消除:一次 iv rh-sc-uPA 后,消除半衰期随剂量延长,低剂量组明显短于中及高剂量组($P < 0.01$)。MRT 也有相同变化($P < 0.05$)。相同剂量的单、双链尿激酶的半衰期相近,差别无统计意义。单链尿激酶的 AUC_{0-inf}明显小于双链尿激酶。

参 考 文 献

- 1 Lijnen RH, Collen D. Fibrinolytic agents: mechanisms of activity and pharmacology. *Thromb Haemost*, 1995, **74**: 387
- 2 Gurewich V, Pannell R, Louie S, et al. Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study *in vitro* and in two animal species. *J Clin Invest*, 1984, **73**: 1731
- 3 Pannell R, Gurewich V. Pro-urokinase, a study of its stability in plasma and of a mechanism for its selective fibrinolytic effect. *Blood*, 1986, **67**: 1215
- 4 Kasper W, Hohn SH, Wngler H, et al. Coronary reperfusion studies with pro-urokinase in acute myocardial infarction: evidence for synergism of low dose urokinase. *J Am Coll Cardiol*, 1990, **16**: 733
- 5 Gulba DC, Fischer K, Barthels M, et al. Low dose urokinase preactivated natural prourokinase for thrombolysis in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 1989, **63**: 1025
- 6 Kasper W, Meinertz T, Hohnloser S, et al. Coronary thrombolysis in man with pro-urokinase: improved efficacy with low dose urokinase. *Klin Wochenschr*, 1988, **66**: 109
- 7 Kasai S, Arimura H, Nishida M, et al. Primary structure of single-chain pro-urokinase. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 12382
- 8 Stump DC, Kiechens L, Collen D, et al. Pharmacokinetics of single chain forms of urokinase-type plasminogen activator. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, **242**: 245
- 9 Kohler M, Sen S, Miyashita C, et al. Half-life of single-chain urokinase type plasminogen activator (scuPA) and two chain urokinase-type plasminogen activator (tcuPA) in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res*, 1991, **62**: 75
- 10 刘秀文, 汤仲明, 柴彪新. 高纯度¹²⁵I-蛇毒生长因子的

制备. 同位素, 1998, 11: 144

11 Pannell R, Gurewich V. Activation of plasminogen by single chain urokinase or by two-chain urokinase — a

demonstration that single-chain urokinase has low catalytic activity (pro-urokinase). *Blood*, 1987, 69: 22

BIO TRANSFORMATION AND PHARMACOKINETICS OF SINGLE CHAIN UROKINASE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR IN RABBITS AND RHESUS MONKEYS

Dou Guifang, Tang Zhongming and Liu Xiuwen

(Laboratory of Metabolism of Biotechnology Derived Drugs, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT **AIM:** The concentration profiles of recombinant human single chain urokinase-type plasminogen activator (rh-sc-uPA) and bio-transformation to two-chain metabolite (tc-uPA) were studied after iv bolus injection of ^{125}I -rh-sc-uPA in rabbits. Fibrinolytic components-time curves in plasma were determined after iv bolus injection at different doses of rh-sc-uPA in rhesus monkeys and were compared with natural urokinase (r-tc-uPA). **METHODS:** Aprotinin was added into plasma immediately after sampling for preventing the conversion of single-chain to two-chain. Plasma ^{125}I -sc-uPA concentrations was determined by RP-HPLC of dithiothreitol (DTT) treated plasma, while concentrations of ^{125}I -sc-uPA + ^{125}I -tc-uPA was obtained by analysis of untreated DTT plasma. Concentration of fibrinolytic components was assayed by fibrin plate method *in vitro*. **RESULTS:** The ^{125}I -sc-uPA and ^{125}I -tc-uPA were both detected after iv bolus injection of in rabbits. The ^{125}I -sc-uPA concentrations were best fit by a two-compartment model with $T_{1/2\alpha}$ and $T_{1/2\beta}$ equaled to 7 and 43 min, respectively. ^{125}I -tc-uPA concentrations were best fit by a one-compartment model with elimination $T_{1/2}$ of 9 min. Nearly 38% of ^{125}I -sc-uPA transformed to ^{125}I -tc-uPA. Concentration of fibrinolytic components decreased rapidly after iv bolus injection of 7.5×10^4 , 1.5×10^5 , and $3.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ rh-sc-uPA in rhesus Monkeys. Elimination $T_{1/2}$ were 6.3 ± 1.8 , 11.5 ± 2.1 and 12.3 ± 2.9 min, respectively ($P < 0.05 \sim P < 0.01$). Systemic clearance were 0.051 ± 0.030 , 0.022 ± 0.006 and $0.016 \pm 0.003 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively ($P < 0.05$). Concentration of fibrinolytic components after $1.5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ of rh-sc-uPA was significantly lower than that after r-tc-uPA. **CONCLUSION:** ^{125}I -rh-sc-uPA and its active metabolite- ^{125}I -rh-tc-uPA were detected after iv of ^{125}I -rh-sc-uPA in rabbits, their pharmacokinetic behaviors were different. Deposition profiles of fibrinolytic components after iv of various doses of rh-sc-uPA in monkeys follows non-linear pharmacokinetics.

KEY WORDS single chain urokinase-type plasminogen activator; two chain urokinase type plasminogen activator; RP-HPLC; ^{125}I -radiolabeling; pharmacokinetics; fibrinolytic activity