



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103336128 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 02

(21) 申请号 201310229591. 5

(22) 申请日 2013. 06. 08

(71) 申请人 天津药物研究院

地址 300193 天津市南开区鞍山西道 308 号

(72) 发明人 蔡永明 张宗鹏 申文晋 宋紫辉

李春雨 王海荣 项宗尚 张春云

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/534 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法

(57) 摘要

本发明提供一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法,该方法包括以下步骤:采用细胞裂解液提取、液氮冻存等关键技术制备实验动物不同脏器/组织的匀浆提取液;根据被测药物的性质和特点,以免疫学分析测定技术即放射免疫分析(RIA)法或酶联免疫分析(ELISA)法作为主要定量分析手段。

1. 一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法,该方法包括以下步骤:
 - (1) 制备脏器 / 组织提取液;
 - (2) 采用免疫学测定技术测定脏器 / 组织提取液中药物的浓度;
 - (3) 根据步骤(2) 所测得浓度,计算不同时间脏器 / 组织中药物的浓度,可得药物的组织分布随时间变化趋势。
2. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(1)中将液氮冻存和细胞裂解液提取相结合,用于小分子多肽类药物组织提取液的制备。
3. 根据权利要求 2 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(1) 中液氮冻存时间为 0.5h ~ 3.5h,优选为 2h。
4. 根据权利要求 2 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(1)中细胞裂解液的加入比例为 1mL ~ 4mL/0.5g 组织,优选为 2.5mL ~ 3mL/0.5g 组织。
5. 根据权利要求 2 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(1)中组织匀浆液的离心速度和时间为 :5000rpm 和 20min。
6. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(2)中根据小分子多肽类药物的性质,采用放射免疫分析(RIA)法和酶联免疫分析(ELISA)法测定药物浓度。
7. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(2) 的 RIA 法中,小分子多肽类药物的放射性同位素选自 ^{125}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^3H 、 ^{14}C 或 ^{35}S ,优选 ^{125}I 。
8. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(2) 的标准溶液的制备中,以心、肝、肾、肌肉、脑等相应空白组织制备的匀浆提取液而非一般的样品稀释液(含动物蛋白的 PBS 缓冲液等) 配制标准曲线。
9. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,在步骤(3)中按以下公式计算单位质量组织所含被测药物量 : (被测药物的浓度 \times 细胞裂解液体积) / 被测组织质量 $\times 100\%$ 。

一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生命科学技术领域,涉及一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法,具体来说,涉及一种将细胞裂解液提取、液氮冻存和免疫学分析测定技术相结合检测小分子多肽类药物组织分布的方法。

背景技术

[0002] 近年来随着基因组学、蛋白组学及生物技术的发展,各种与内源性活性蛋白或肽类物质结构、功能相似或功能独特的小分子多肽类药物不断涌现,涉及疾病的预防、诊断和治疗等各方面,尤其在癌症、自身免疫性疾病、代谢类疾病治疗等诸多领域具有显著的疗效。与传统的小分子化学药物相比,小分子多肽类药物具有生物活性强、用药量小等优点,但基于分子结构特点,亦具有稳定性差,易被体内蛋白酶降解,半衰期短,扩散性差,分配系数小等不足。将小分子多肽类药物与新型释药系统如微球、微囊、纳米粒、脂质体、乳剂等相结合是当今的研究热点。既解决了小分子多肽类药物半衰期短、需要长期频繁注射给药、结构不稳定、体内渗透性差等引起的体内系统递送技术难点,也可以利用给药载体实现针对特定组织和器官释放药物的靶向性及缓释性。

[0003] 研究小分子多肽类药物的组织分布,即监测给予药物后不同时间药物在多种组织中的分布状况具有重大意义。在药效学研究方面,可了解药物在体内的作用部位,为探索可能的靶器官、靶组织和作用机理提供依据;在毒理学研究方面,可了解药物过量给予后在体内的蓄积程度和毒性靶器官、靶组织,预测可能出现的毒性反应,为阐释药物在重复给药毒性研究中所产生毒性反应的中毒靶器官提供依据。尤其对于靶向作用的药物,进行组织分布研究还有助于评价和检验其制剂工艺、水平和作用的靶向性。

[0004] 目前,针对化学药物和大分子蛋白的组织分布研究开展较多,方法亦相对成熟,而针对小分子多肽类药物的组织分布检测,目前尚无较为成熟和普适性强的方法。由于小分子多肽类药物稳定性差,易被体内蛋白酶降解,且免疫原性低,因此对组织提取液的制备方法具有较高的要求。基于药物特点,方法应保证在保留原有生物学活性或免疫学活性的基础上最大限度提取组织中的药物,以满足定量测定组织中药物含量的要求。

[0005] 针对小分子多肽类药物生物活性高,给药剂量小,血药浓度低,内源性物质干扰等技术难点,如何建立灵敏、特异、快速简便的定量检测多种组织、器官中药物浓度的方法也是小分子多肽类药物组织分布研究的难点所在。免疫学分析(放射免疫和酶联免疫)测定技术是小分子多肽类药物生物样品分析的主要手段之一,具有灵敏、快速、适合于批量处理等特点。其基本原理是基于药物与相应抗体结合时具有专一性和饱和性的特点,利用被测药物与酶或放射性同位素标记药物之间竞争性的与抗体结合,以及被测药物与酶标记抗体特异性结合等原理,采用放射性同位素计数法或比色法等手段的定量测定技术。因此,免疫学分析技术是研究小分子多肽类药物组织靶向分布较为适宜的方法。

发明内容

[0006] 涉及一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法,具体来说,涉及一种将细胞裂解液提取、液氮冻存和免疫学分析测定技术相结合检测小分子多肽类药物组织分布的方法。

[0007] 因此,本发明的目的是提供一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法,该方法将细胞裂解液提取、液氮冻存和免疫学分析测定技术有机结合,成功地运用到检测小分子多肽类药物组织分布中。实验表明,这种以细胞裂解液提取、液氮冻存为关键技术的组织提取液制备方法,以免疫学测定技术为主要定量手段的检测小分子多肽类药物组织分布的方法,能够成功地应用于检测注射用醋酸曲普瑞林微球等小分子多肽类药物的组织分布中。

[0008] 本发明提供的用于测定小分子多肽类药物组织分布的方法包括以下步骤:

[0009] 1. 组织提取液制备:实验动物于给药前或给药后特定时间点实施安乐死,根据被测药物的药理活性和作用机制,选取动物的多种组织/脏器,如心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、胸腺、肌肉、脑、脂肪、卵巢、子宫、睾丸、前列腺等,用冰浴 0.9% 生理盐水冲洗组织表面残血后,用滤纸吸干水分,称重,放液氮中冻存 2 小时。取出后加入一定比例细胞裂解液裂解,在冰浴下匀浆,离心,取上清液,冷冻保存待测。

[0010] 2. 免疫学测定技术:根据被测药物的性质,可以采用放射免疫分析(RIA)法或酶联免疫分析(ELISA)法。

[0011] RIA 法:

[0012] (1) 采用放射性同位素标记小分子多肽;放射性同位素选自 ^{125}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^3H 、 ^{14}C 或 ^{35}S , 优选为 ^{125}I , 标记方法为氯胺 T 法或 Iodogen 法。分离纯化标记抗原后,考察其放射化学纯度、放射性活度、生物活性和免疫活性等。

[0013] (2) 以步骤 1 制备的心、肝、肾、肌肉、脑等空白组织匀浆提取液,以及空白血清将被测药物配制成一系列已知浓度的标准溶液。

[0014] (3) 将一定量放射性同位素标记的被测药物加入至标准溶液或被测药物组织提取液中,使其与一定量的特异性抗体产生竞争性免疫结合反应。放射性同位素标记的被测药物与抗体的结合量和标准溶液或样品组织提取液中被测药物的含量呈一定的函数关系。

[0015] (4) 用免疫分离(PR)试剂将抗原-抗体结合部分与游离抗原部分分离后,测定抗原-抗体结合部分的放射性强度(B,通常以放射性计数 cpm 表示),和/或游离抗原部分的放射性强度(F),并制备标准曲线。其中纵坐标为放射性反应参数,包括 B/B_0 (零标准管)、 $B/(B+F)$ 、 F/B 、 B/F 等;横坐标为步骤(2)标准溶液的浓度。拟合后自动取拟合度优的方法计算样品中被测药物的浓度。

[0016] ELISA 法:

[0017] (1) 采用酶标记小分子多肽类药物(抗原)或特异性抗体,常用的酶包括辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)和葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOX)等,其中以 HRP 应用最为广泛。

[0018] (2) 以步骤 1 制备的心、肝、肾、肌肉、脑等空白组织匀浆提取液,以及空白血清将被测药物配制成一系列已知浓度的标准溶液。

[0019] (3) 双抗体夹心法:在预包被固相抗体的 96 微孔板上加入标准溶液或被测药物的组织提取液,反应一定时间后形成固相抗原-抗体复合物,洗去未结合的其他物质。加入步骤(1)制备的酶标记第二抗体,反应一定时间后使其与抗原结合,洗去未结合的酶标记二

抗,加入酶底物显色,最后以终止液终止酶反应。采用比色法测定吸光度(以 OD 值表示)。OD 值与被测抗原的浓度成正比。竞争法:在预先包被固相抗体的 96 微孔板上加入标准溶液或被测药物的组织提取液,以及步骤(1)中制备的酶标记抗原,二者与抗体竞争特异性结合位点。反应一定时间后,洗去未结合的其他物质,加入酶底物显色,最后以终止液终止酶反应。采用比色法测定吸光度(以 OD 值表示)。OD 值与被测抗原的浓度成反比。

[0020] (4) 根据不同方法要求,选取拟合度优的方法计算样品中被测药物的浓度。

[0021] 3. 药物的组织分布:根据步骤 2 所测得浓度,按以下公式计算单位质量组织所含被测药物量:(被测药物的浓度 × 细胞裂解液体积) / 被测组织质量 × 100%。通过测定不同时间器官 / 组织中药物的浓度,可得药物的组织分布随时间变化趋势。

[0022] 目前,对于小分子多肽类药物的组织分布研究刚刚起步,国内外相关文献报道较少,尚无成熟和普适性强的方法和技术。小分子多肽类药物组织分布研究的原则是在保留其原有生物学活性或免疫活性的基础上,最大限度地提取组织、器官中的药物。基于此类药物的分子结构特征,我们反复优化组织提取液的制备方法,首先考察了细胞裂解液、超声、4℃ 浸泡过夜等 3 种不同方法破碎组织细胞、制备匀浆以检测被测药物的提取效率,结果以细胞裂解液结合液氮冻存的组织匀浆提取效果最优;其次也对离心条件等手段进行探索。随着标记技术和抗体制备水平的不断提高,免疫学测定技术发展迅猛,已可实现多种小分子多肽类药物的定量测定研究。目前其测定的生物基质主要仍为血浆、血清和细胞培养液等。针对免疫学测定技术的特点和基本原理,我们通过反复实践,成功将其应用至组织分布研究领域,并首次将其与胞裂解液提取和液氮冻存法相结合,建立了针对小分子多肽类药物的普适性强的组织分布检测方法。

[0023] 综上所述,本发明首次将所建立的细胞裂解液提取、液氮冻存和免疫学分析测定技术相结合的方法应用于检测小分子多肽类药物组织分布研究领域,填补了该类药物组织分布检测的空白,完善了药代动力学研究的试验技术和方法。本发明快速、灵敏、特异性强,尤适用于检测小分子多肽类药物的组织分布。

附图说明

[0024] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0025] 图 1 为醋酸曲普瑞林的标准曲线(肝空白组织);

[0026] 图 2 为大鼠肌肉给予(i. m.) 注射用醋酸曲普瑞林微球(0.34mg/kg) 后不同组织中平均醋酸曲普瑞林含量($\bar{x} \pm s$, n=2);

[0027] 图 3 为人重组胸腺肽的标准曲线(肝空白组织);

[0028] 图 4 为大鼠皮下注射(s. c.) 人重组胸腺肽(rh-T α 1) (300 μ g/kg) 后,不同组织中平均 rh-T α 1 含量。

具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0030] 实施例 1

[0031] 本实施例利用本发明建立的将细胞裂解液提取、液氮冻存和放射免疫分析(RIA)

法相结合的方法,进行了注射用醋酸曲普瑞林微球大鼠的组织分布检测研究。具体检测方法如下:

[0032] 1. 注射用醋酸曲普瑞林微球,由长春金赛药业股份有限公司提供。规格:3.75mg/支,内含冻干粉(28天缓释)和专用溶剂(2mL)。批号分别为冻干粉20091104,有效期至20111103;专用溶剂20090601,有效期至20110531。25℃以下贮存。采用氯胺T法(Ch-T)标记醋酸曲普瑞林,制备¹²⁵I标记的醋酸曲普瑞林冻干品。

[0033] 采用氯胺T法(Ch-T法)标记醋酸曲普瑞林,制备¹²⁵I标记的醋酸曲普瑞林冻干品。醋酸曲普瑞林由长春金赛药业股份有限公司生产,批号为20070206,样品为白色粉末,纯度>98%,试验前样品于4℃保存。分别将20μL(0.25μg/μL)醋酸曲普瑞林、5μL(2mCi)Na¹²⁵I和20μL(0.4μg/μL)Ch-T加至80μL0.05M pH7.4的磷酸缓冲液中,反应2min后,立即加入20μL(0.8μg/μL)的偏重亚硫酸钠(Na₂S₂O₅)终止反应。在C18(40×0.39cm)柱上分离纯化反应混合物得到¹²⁵I-标记物,流动相即A相:0.1%三氟醋酸水溶液(TFA),B相:80%乙腈水梯度洗脱(流速1mL/min),程序如下:0-10min20%B相,10-20min30%B相,20-30min40%B相,30-40min50%B相。收集单碘标记的¹²⁵I-醋酸曲普瑞林峰。测定其放射比活度为560mCi/mg(20720MBq/mg),放化纯度为98.4%。向收集到的标记物中加入含1%牛血清白蛋白(BSA)的0.05M pH7.4磷酸缓冲液冻干,于-20℃保存备用。

[0034] 2. 本实施例采用16只SD大鼠,SPF级,体重250-270g,雌雄各半。由天津市山川红实验动物科技有限公司提供。生产单位许可证编号:SCXK(津)2009-0001。动物质量合格证:0002971。除2只用于给药前组织的制备外,其中14只肌肉注射(i.m.)0.34mg/kg注射用醋酸曲普瑞林微球。分别于给药后0.5h,1h,4h,24h,72h,336h和672h乙醚轻度麻醉,眼静脉丛取血后实施安乐死,摘取不同脏器组织,每个时间点处死2只动物(1雌1雄)。

[0035] 3. 取大鼠的肝、肾、脑、睾丸、卵巢、前列腺、肌肉等组织,用冰浴的生理盐水冲洗组织表面残血后,用滤纸吸干水分,称重,放液氮中冻存2h。加入细胞裂解液(3mL/0.5g组织)裂解,在冰浴下匀浆,离心5000rpm,20min,取其上清,-20℃保存直至测定。

[0036] 4. 采用RIA法测定大鼠脏器组织中醋酸曲普瑞林浓度。测定原理如下:应用均相竞争原理,标准品或样品中的醋酸曲普瑞林和加入的¹²⁵I-醋酸曲普瑞林共同与一定量的特异性抗体产生竞争性免疫结合反应。¹²⁵I-醋酸曲普瑞林与抗体的结合量与标准品或样品中醋酸曲普瑞林的含量呈一定函数关系。用免疫分离试剂(PR)将结合部分(B)与游离部分(F)分离后,测定结合部分的放射性强度,并计算相应结合率B/B₀。采用GAMMA-C12计数器内附带软件,拟合后自动取拟合度优的方法计算待测样品中醋酸曲普瑞林的含量。

[0037] 5. 取放免试管编号,按表1所示步骤进行操作,最后在γ计数器上测得各管放射性计数,计算出各管计数与零标准管计数的比值B/B₀(%)。样品浓度的计算:可按logC与logit(B/B₀)线性拟合求算样品浓度;也可用二次拟合求算样品浓度,函数基本方程 $Y=(D-C)/[1+(X/A)B]+C$,其中X为待测样品浓度,Y为样品测定的cpm值,A、B、C、D是函数的四个参数(A为50%零标准管cpm对应的样品浓度,B为标准曲线斜率,C、D分别是反S型曲线下渐进线和上渐进线的估计值。本试验采用γ计数器附带的软件,拟合后自动取拟合度优的方法计算出结果。

[0038] 表1. RIA法测定曲普瑞林的操作步骤

[0039]

试剂	总放射性管 (T)	非特异管 (NSB)	零标准管 (B ₀)	标准管 (B)	样品管 (S)
温育液(μL)	/	200	100	/	/
标曲液(μL)	/	/	/	100	/
样品(μL)	/	/	/	/	100
[0040]					
¹²⁵ I-醋酸曲普瑞林(μL)	100	100	100	100	100
兔抗-醋酸曲普瑞林抗 体(μL)	/	/	100	100	100
充分摇匀后, 4℃反应 20h 以上					
驴抗兔免疫分离剂(μL)	/	500	500	500	500
充分摇匀后, 室温放置 15min, 3500 rpm, 离心 15min, 吸弃上清液, 在 γ 计数器上 测定总 T 及各沉淀管的放射性计数 (cpm) 60s					

[0041] 6. 分别以空白血清、肝、肾、脑、睾丸、卵巢、前列腺、肌肉等不同空白组织匀浆提取液配制不同浓度的醋酸曲普瑞林标准溶液, 使其终浓度分别为 10、30、100、300、1000、3000pg/mL, 测定各浓度的 cpm 值, 制得标准曲线。分别以各标准曲线计算相应组织 / 器官中醋酸曲普瑞林的含量。本实施例以肝匀浆液为例说明。

[0042] 取空白大鼠肝组织, 用冰浴的生理盐水冲洗组织表面残血后, 用滤纸吸干水分, 称重, 放液氮中冻存 2h。加入细胞裂解液 (3mL/0.5g 组织) 裂解, 在冰浴下匀浆, 离心 5000rpm, 20min, 取其上清液配制不同浓度的醋酸曲普瑞林标准溶液, 使其终浓度分别为 10、30、100、300、1000、3000pg/mL, 测定各浓度的 cpm 值, 制得标准曲线 (见表 2 和附图 1)。在此浓度范围内 (10 ~ 3000pg/mL), 药物浓度对数与 B/B₀ 呈 Logistic 线性相关。

[0043] 表 2. 醋酸曲普瑞林的标准曲线 (肝空白组织匀浆提取液配制)

[0044]

Concentration (pg/mL)	B/B ₀ (%)
10	86.61
30	79.34
100	57.07
[0045]	
300	34.05
1000	13.71
3000	6.37

[0046] 7. 大鼠肌肉给予注射用醋酸曲普瑞林微球 (0.34mg/kg) 后, 药后不同时间点各组织中醋酸曲普瑞林的含量见表 3, 药物的组织分布随时间变化趋势见附图 2。

[0047] 表 3. 大鼠 i.m. 醋酸曲普瑞林微球 (0.34mg/kg) 后不同组织中平均曲普瑞林的含

量 (pg/g 组织, $\bar{x} \pm s$, n=2)

[0048]

脏器/组织	组织含量 (pg/g 组织)			
	0 h	0.5 h	1 h	4 h
肝	905 ± 367	1236 ± 661	1560 ± 315	1932 ± 273
肾	1752 ± 16	3217 ± 1788	5268 ± 1266	2701 ± 426
脑	3126 ± 633	3033 ± 1033	3453 ± 807	3179 ± 100
睾丸 ^a	2955	6966	5923	4778
卵巢 ^a	6632	3693	9804	9736
前列腺 ^a	1826	4868	7902	4507
肌肉	1845 ± 798	2579 ± 631	2461 ± 364	3269 ± 997
血清 ^b	170 ± 80	2744 ± 872	1752 ± 179	1100 ± 136
脏器/组织	24 h	72 h	336 h	672 h
肝	2048 ± 751	3195 ± 614	4744 ± 1273	1291 ± 721
肾	3191 ± 420	3940 ± 24	10248 ± 825	2414 ± 1911
脑	3372 ± 339	5428 ± 1026	12047 ± 5258	6048 ± 1349
睾丸 ^a	4924	6304	12960	3534
卵巢 ^a	7884	7293	10436	5756
前列腺 ^a	5405	8245	12218	12507
肌肉	7398 ± 5349	4400 ± 3224	3628 ± 337	3616 ± 404
血清 ^b	471 ± 166	598 ± 199	42 ± 5	53 ± 14

[0049] ^a:n=1 ;^b:浓度为 pg/mL

[0050] 实施例 2

[0051] 本实施例利用本发明建立的将细胞裂解液提取、液氮冻存和酶联免疫分析法 (ELISA) 相结合的方法,进行了重组人胸腺肽 $\alpha 1$ 大鼠的组织分布研究。具体研究方法如下:

[0052] 1. 重组人胸腺肽 $\alpha 1$ (rh-T $\alpha 1$), 由深圳海王药业有限公司提供,批号:20050301, 样品为白色冻干粉针,纯度 98.51%, 含量:1.5mg/瓶;试验前样品于 4℃ 保存。

[0053] 2. ELISA 检测 rh-T $\alpha 1$ 试剂盒,由北京望尔生物技术有限公司提供,2 ~ 8℃ 保存。550 型酶标微板读数仪 (Model550Micro-plate reader),为美国 Bio-red 公司产品。

[0054] 3. 试验动物:Wistar 大鼠,24 只,雌雄兼用,体重 180 ± 10 克,由北京大学医学部实验动物科学部提供,动物生产合格证:SCXK(京)2002-0001。大鼠 s. c. rh-T $\alpha 1$ 300 μ g/kg (给药体积为 1.0mL/kg),于给药后 0.25、1、4 和 12h 处死动物,取脑、肝、肌肉、心、脾、肺、肝、肾、胸腺和子宫等脏器/组织,每一时间点取 6 只动物,雌雄各半。用冰浴的生理盐水冲洗

组织表面残血后,用滤纸吸干水分,称重,放液氮中冻存 2h。加入细胞裂解液(2.5mL/0.5g 组织)裂解,在冰浴下匀浆,离心 5000rpm,20min,取其上清,-20℃保存直至测定。

[0055] 4. 标准曲线:取空白血清、脑、肝、肌肉、心、肾等匀浆液用样品稀释液稀释 5 倍后配制不同浓度的标准溶液,使终浓度分别为 0、1.56、6.25、25、100、400 和 1600ng/mL。

[0056] 5. 测定方法:在预包被第一抗体的 96 微孔板上,加入样品(标准品或待测样品)和已稀释好的 rh-T α 1 抗体各 50 μ L,轻轻混匀 20s 后于 25℃反应 1h。除去孔内液体,洗板 5 次,拍干,加入 100 μ L 酶标二抗,25℃反应 0.5h,除去孔内液体,洗板 5 次,拍干。加入底物液 A 和 B 各 50 μ L,避光 25℃反应 30min,加 50 μ L 硫酸终止反应,在酶标仪 450nm 处读取各孔的吸光值。经 Logistic 四参数曲线模型拟合(Origin Version7.5),可以得到药物浓度对数与吸光值呈反 S 型的标准曲线。附图 3 是平均标准曲线图(以肝空白匀浆液制备),曲线拟合方程为: $Abs=0.1095+1.4547/[1+(\log C/11.077)^{0.899}]$, $r^2=0.9988$ 。

[0057] 6. 大鼠 s. c. rh-T α 1 (300 μ g/kg) 后,药后不同时间点各组织中 rh-T α 1 的含量随时间变化趋势见附图 4。

[0058] 结论:上述结果表明,本发明所述建立的将细胞裂解液提取、液氮冻存和免疫学分析测定技术相结合的方法可成功检测小分子多肽类药物的组织分布。

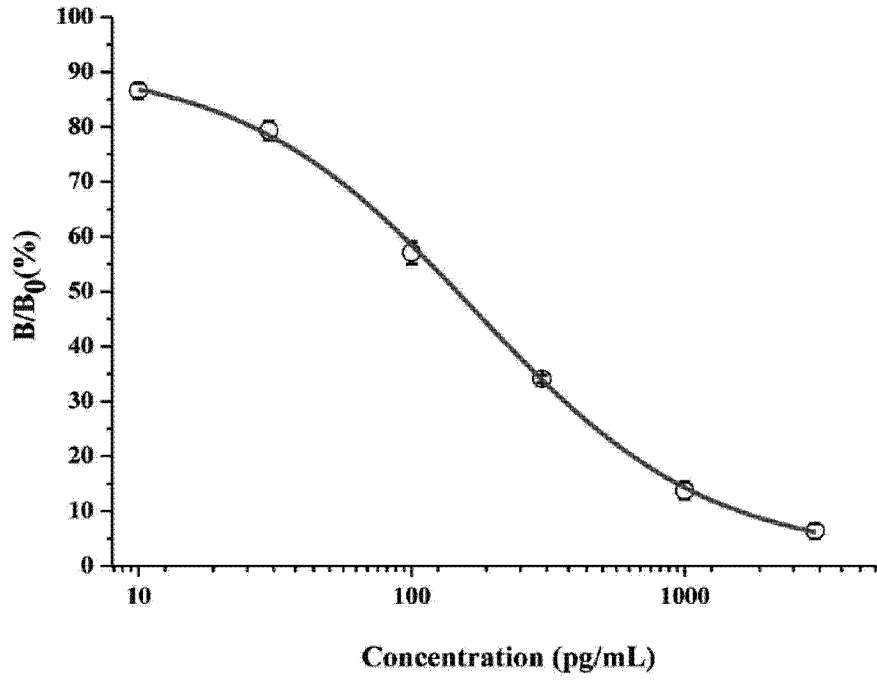


图 1

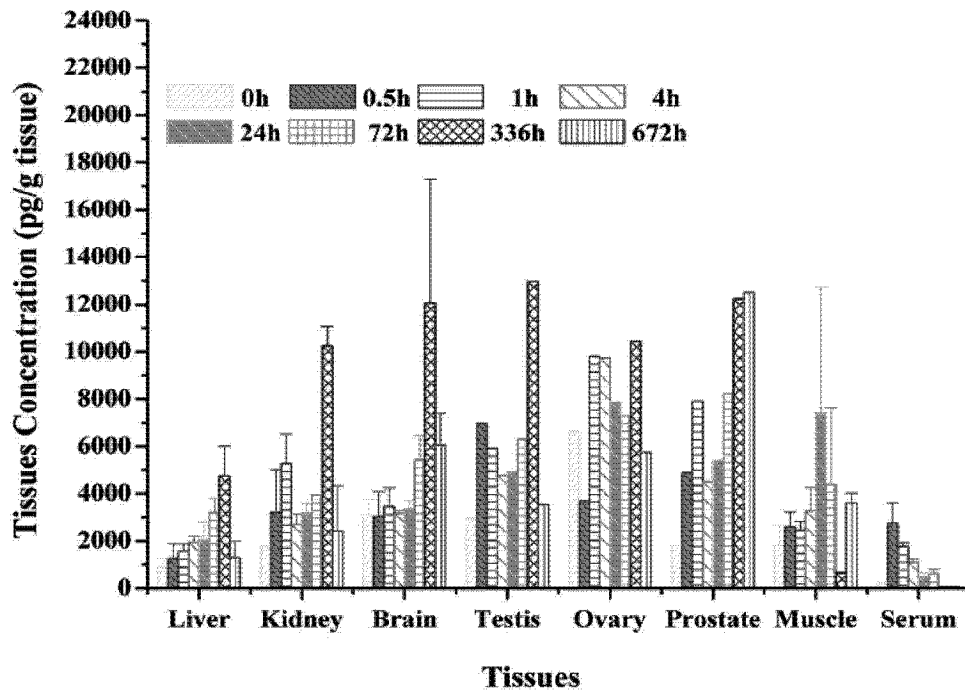


图 2

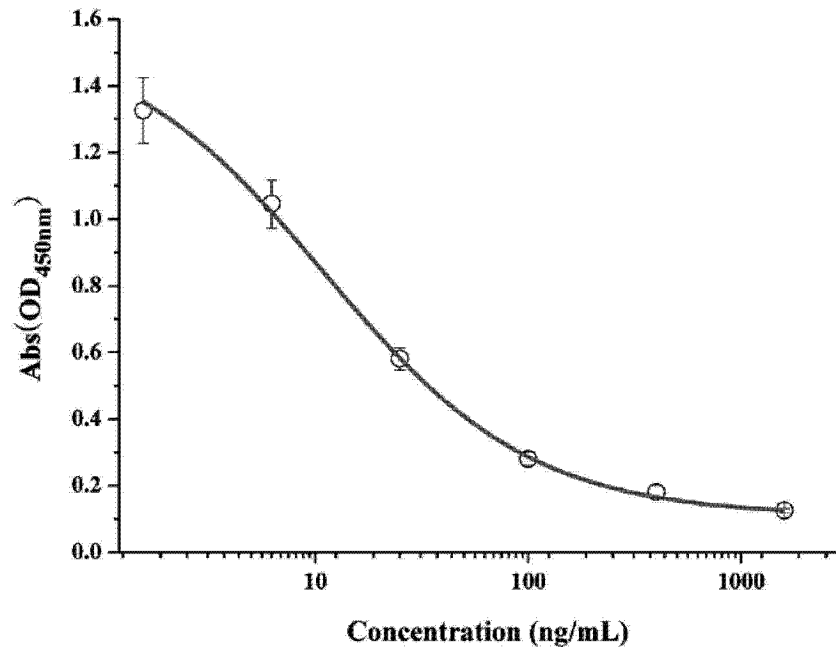


图 3

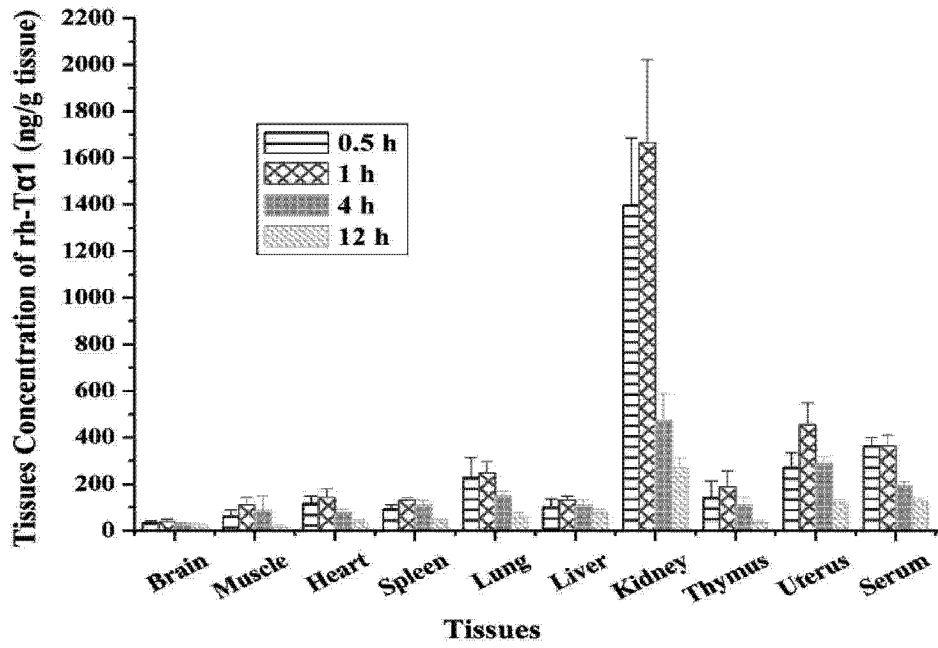


图 4

专利名称(译)	一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法		
公开(公告)号	CN103336128A	公开(公告)日	2013-10-02
申请号	CN201310229591.5	申请日	2013-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	天津药物研究院		
申请(专利权)人(译)	天津药物研究院		
当前申请(专利权)人(译)	天津药物研究院		
[标]发明人	蔡永明 张宗鹏 申文晋 宋紫辉 李春雨 王海荣 项宗尚 张春云		
发明人	蔡永明 张宗鹏 申文晋 宋紫辉 李春雨 王海荣 项宗尚 张春云		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/534 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测小分子多肽类药物组织分布的方法，该方法包括以下步骤：采用细胞裂解液提取、液氮冻存等关键技术制备实验动物不同脏器/组织的匀浆提取液；根据被测药物的性质和特点，以免疫学分析测定技术即放射免疫分析（RIA）法或酶联免疫分析（ELISA）法作为主要定量分析手段。

试剂	总放射性管 (T)	非特异管 (NSB)	零标准管 (B ₀)	标准管 (B)	样品管 (S)
温育液(μL)	/	200	100	/	/
标曲液(μL)	/	/	/	100	/
样品(μL)	/	/	/	/	100