

[¹²⁵I]西夫韦肽在大鼠体内的药代动力学

刘德胜^{1,2}, 孟志云¹, 赵桂森², 窦桂芳^{1*}, 张亚东¹

(1. 军事医学科学院野战输血研究所药物代谢与药物动力学实验室, 北京 100850;

2. 山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要:目的 为临床上合理安全地应用西夫韦肽提供药代动力学资料。方法 Iodogen 法制备 [¹²⁵I]西夫韦肽, 大鼠单次给 [¹²⁵I]西夫韦肽后, 三氯醋酸(TCA)沉淀法测定血浆或组织中的放射性含量。结果 大鼠单次 sc 0.8, 2.4, 7.2 mg·kg⁻¹ [¹²⁵I]西夫韦肽后, AUC 分别为 10.6, 32.2 和 112.3 mg·h·L⁻¹; 达峰时间在 1.40~4.60 h 之间, 吸收较为缓慢; t_{1/2}(ke) 分别为 7.39, 4.53, 13.84 h; 血浆清除率相近, 分别为 0.44, 0.70 和 0.50 L·h⁻¹; TCA 法测定大鼠 sc 给药 [¹²⁵I]西夫韦肽组织分布, 放射性分布特点为泌尿系统和胃肠道系统浓度最高, 血浆其次, 脑组织和脂肪组织内浓度最低。结论 大鼠 sc [¹²⁵I]西夫韦肽后, 在给药剂量范围内呈线性动力学。TCA 沉淀法测得泌尿系统和胃肠道系统放射性最高。 [¹²⁵I]西夫韦肽主要经肾脏排泄。

关键词: 西夫韦肽; 药代动力学; 分布

中图分类号: R969.1, R978.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)04-0296-04

西夫韦肽(sifuvirtide, 中国专利号: ZL01130985·7, 美国专利申请号: 10/751014)是一种全新合成的含有36个氨基酸的多肽化合物, 它通过抑制病毒和细胞膜的融合而干预 HIV-1 病毒进入细胞。第一代膜融合剂优夫韦肽(enfuvirtide)在一期和二期临床研究中呈现出很好的抗 HIV 作用^[1,2]。

西夫韦肽是依据 HIV 膜蛋白的结构设计的新

一代膜融合抑制剂。细胞融合测定实验表明, 西夫韦肽体外具有很高的抑制 HIV 的活性(IC₅₀为 0.33 μg·L⁻¹, 内部资料)。为了合理安全应用于临床, 有必要进行药代动力学研究。本研究观察了 [¹²⁵I]西夫韦肽在大鼠体内的药代动力学及组织分布情况。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

西夫韦肽, 扶素生物技术有限公司, 批号: Y20030401, 纯度 > 95.0%; Na¹²⁵I, 批号: AC4255, 185 MBq, 放化纯度 99.9%, 比活度 > 0.6 PBq·g⁻¹, Amersham 公司; Iodogen 试剂, Sephacryl S-100 HR 填料, Pharmacia 公司; 二金鸡钠酸 BCA 蛋白测定试剂盒, Pierce 公司; 混合功能蛋白酶抑制剂(cocktail protease inhibitor), Roche 公司, 批号: 10710100。

Wallac1470 γ 计数仪, Packard 公司; 500TR 流式液闪测定仪, Packard 公司; Agilent 1100 四元梯度泵, Agilent 公司; TSK-GEL G3000SWXL 凝胶过滤柱(序列号 008541, 300 mm × 7.8 mm), Tosoh 公司。

1.2 动物

Wistar 大鼠, ♂, 35 只, 体重 220~300 g, 10~12 周龄, 购自军事医学科学院实验动物中心。

1.3 [¹²⁵I]西夫韦肽的制备及纯化

Iodogen 法标记西夫韦肽^[3], 标记混合物用 S-100 填料分子筛柱纯化, 洗脱条件为 pH 7.25 的 0.05 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 分部收集洗脱液, 用计数仪测定放射性; 凝胶高效液相色谱、流式液闪仪鉴定标记物的纯度。同时使用二金鸡钠酸测定法测蛋白含量^[4]。

1.4 纯度鉴定

用 TSK 凝胶色谱法鉴定标记化合物的纯度, 洗脱条件为: 流动相: pH 为 7.25 的 0.05 mol·L⁻¹ 的磷酸钠缓冲液, 含 0.1 mol·L⁻¹ NaCl, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 流式液闪仪检测 γ 放射性。

收稿日期: 2004-11-17 接受日期: 2005-04-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371669); 国家重大科技专项资助项目(2003AA2Z347B)

作者简介: 刘德胜(1979-), 男, 山东省莱阳人, 山东大学在读硕士研究生。

* 联系作者 E-mail: douguifang@vip.sina.com Tel: (010)66932951

1.5 样品的采集和预处理

Wistar大鼠15只,每组5只,单次sc 0.8, 2.4和7.2 mg·kg⁻¹[¹²⁵I]西夫韦肽后15 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24和36 h取血0.2 mL,肝素抗凝,取50 μL血浆样品,加入等量20%三氯醋酸(TCA)溶液沉淀蛋白,6000×g离心3 min后去上清,用10%TCA溶液洗涤后,测定酸沉淀部分γ放射性。

Wistar大鼠20只,每组5只,sc [¹²⁵I]西夫韦肽0.8 mg·kg⁻¹(1.4 MBq·kg⁻¹)后0.5, 4, 12和48 h放血杀死,取脑、脂肪、胸腺、骨骼、生殖腺、胰腺、骨骼肌、心脏、脾、肝脏、大肠、肺脏、小肠、血浆、膀胱、胃壁、肾上腺、背部皮肤、肾、肠道内容物、胃内容物、甲状腺等组织或体液;液体用微量吸管定量,组织称重,制成匀浆,加入等量20%TCA溶液沉淀蛋白,离心后去上清液,用10%TCA溶液洗涤1次,然后测定酸沉淀部分γ放射性。

1.6 药代动力学参数估算和统计学分析

使用3P97软件和Microsoft Excel 2000计算药代动力学参数以及统计学分析。

2 结果和结论

2.1 [¹²⁵I]西夫韦肽的分离纯化和放射化学纯度^[5]

[¹²⁵I]西夫韦肽的洗脱体积为12.0 mL;蛋白主峰也于相同保留体积洗脱,蛋白回收率88.0%。纯化后使用SHPLC鉴定[¹²⁵I]西夫韦肽放射化学纯度,[¹²⁵I]西夫韦肽的洗脱时间为12.5 min,放射化学纯度99.0%,3次重复测定纯度为(99.0±0.2)%。表明标记后的[¹²⁵I]西夫韦肽纯度达到药代动力学研究的要求,将纯度符合要求的部分合并,测定西夫韦肽含量并计算[¹²⁵I]西夫韦肽的比活为3.91 GBq·g⁻¹蛋白。

2.2 三氯醋酸沉淀法测定血浆[¹²⁵I]西夫韦肽的原理和特异性

比较了不同沉淀剂对[¹²⁵I]西夫韦肽的沉淀作用(表1)。^[125I]西夫韦肽是由36个氨基酸组成的小肽,87.57%可以被10%TCA沉淀,[¹²⁵I]小分子降解代谢物不被沉淀,这样可将[¹²⁵I]西夫韦肽与小分子[¹²⁵I]标记物分开。样品离心后去除上清,沉淀部分为分子量较大的[¹²⁵I]标记物。

2.3 方法学确证

不同新鲜组织加入[¹²⁵I]西夫韦肽,在100~700 000 cpm范围内,使用TCA沉淀法检测的线性关系良好,

Tab 1. Selection of precipitator for [¹²⁵I]sifuvirtide

Precipitator	10 ⁻³ × Total radioactivity/cpm	10 ⁻³ × Radioactivity of precipitate/cpm	Ratio/%
50% methanol	200.6	70.9	35.3
10% TCA	213.1	186.6	87.4
50% acetone	192.8	63.6	33.0
50% ethanol	208.6	144.0	69.5

TCA: trichloroacetic acid.

相关系数均大于0.9983,方法灵敏度取决于[¹²⁵I]西夫韦肽的比活度和放射性测量时间。最低检出量为5 Bq·g⁻¹组织湿重,回收率为(76.2±4.2)%。

2.4 药代动力学

大鼠单次sc 0.8, 2.4和7.2 mg·kg⁻¹[¹²⁵I]西夫韦肽后,不同时间点血浆经TCA沉淀后测定放射性,以血浆的放射性浓度和取血时间点绘制药时曲线(图1),使用3P97软件计算药代动力学参数(表2)。

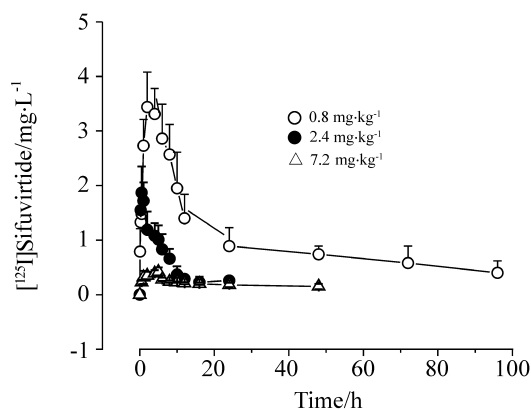


Fig 1. Plasma concentration of [¹²⁵I] sifuvirtide after sc administration of [¹²⁵I] sifuvirtide 0.8, 2.4 and 7.2 mg·kg⁻¹ to rats. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$.

大鼠单次sc后达峰时间在1.40~4.60 h之间,吸收较为缓慢,随后血药浓度缓慢降低, $t_{1/2}(ke)$ 分别为7.39, 4.53和13.84 h, AUC为10.6, 32.2和112.3 mg·h·L⁻¹,与剂量成正比。全身清除率相近,分别为0.44, 0.70和0.50 L·h⁻¹,与线性药代动力学特征相符。

2.5 组织分布

各组织不同时间点[¹²⁵I]西夫韦肽平均分布结果见表3。由表3结果可见,大鼠sc [¹²⁵I]西夫韦肽0.8 mg·kg⁻¹后体内放射性分布特点为:泌尿排泄系

Tab 2. Pharmacokinetic parameters of [¹²⁵I]sifuvirtide after sc administration of [¹²⁵I]sifuvirtide to Wistar rats

[¹²⁵ I]Sifuvirtide /mg·kg ⁻¹	t _{1/2} (ka) /h	t _{1/2} (ke) /h	t _p /h	C _{max} /mg·L ⁻¹	AUC /mg·h·L ⁻¹	Cl _s /L·h ⁻¹	V _c /L·kg ⁻¹
0.8	1.01 ± 0.39	7.39 ± 2.49	4.60 ± 2.19	0.49 ± 0.04	10.6 ± 1.2	0.44 ± 0.16	1.19 ± 0.55
2.4	0.12 ± 0.08	4.53 ± 0.55	1.40 ± 0.55	1.87 ± 0.48	32.2 ± 4.9	0.70 ± 0.20	1.12 ± 0.20
7.2	0.56 ± 0.12	13.84 ± 6.75	2.80 ± 1.10	3.44 ± 0.64	112.3 ± 36.0	0.50 ± 0.24	2.00 ± 0.40

$\bar{x} \pm s, n = 5.$

Tab 3. Tissues level of [¹²⁵I]sifuvirtide after sc administration of [¹²⁵I]sifuvirtide (0.8 mg·kg⁻¹) to Wistar rats

Tissue	[¹²⁵ I]Sifuvirtide/μg·g ⁻¹			
	0.5	4	12	48 (h)
Brain	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01
Gastric wall	0.76 ± 0.36	1.42 ± 0.57	0.25 ± 0.22	0.14 ± 0.07
Bone (thighbone)	0.17 ± 0.08	0.17 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.01
Gonad	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.09	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.00
Muscle	0.17 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Spleen	0.32 ± 0.19	0.17 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.00
Pancreas	0.26 ± 0.26	0.11 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.00
Heart	0.41 ± 0.32	0.16 ± 0.07	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.06
Bladder	0.39 ± 0.23	0.44 ± 0.35	0.21 ± 0.20	0.07 ± 0.03
Thymus gland	0.18 ± 0.05	0.20 ± 0.13	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Large intestinal wall	0.23 ± 0.16	0.20 ± 0.11	0.11 ± 0.08	0.05 ± 0.02
Back skin	0.46 ± 0.30	0.71 ± 0.30	0.38 ± 0.17	0.23 ± 0.05
Liver	0.40 ± 0.17	0.27 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Adipose tissue	0.11 ± 0.17	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.05	0.01 ± 0.00
Small intestinal wall	0.54 ± 0.35	0.28 ± 0.10	0.17 ± 0.09	0.06 ± 0.01
Lungs	0.42 ± 0.15	0.29 ± 0.08	0.13 ± 0.08	0.07 ± 0.01
Adrenal gland	0.28 ± 0.23	0.18 ± 0.08	0.28 ± 0.51	0.07 ± 0.03
Intestinal content	0.09 ± 0.10	0.21 ± 0.34	0.58 ± 0.13	0.48 ± 0.08
Gastric content	1.52 ± 1.01	3.28 ± 2.57	1.06 ± 1.10	0.44 ± 0.23
Kidneys	1.83 ± 0.77	0.94 ± 0.23	0.43 ± 0.06	0.31 ± 0.03
Plasma	0.44 ± 0.14	0.29 ± 0.07	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.03

$\bar{x} \pm s, n = 5.$

统和胃肠道系统浓度最高,血浆其次,脑组织和脂肪组织内浓度最低,表明[¹²⁵I]西夫韦肽不易通过血脑屏障,不易进入脂肪组织。

3 讨论

标记之后需要用非标记的西夫韦肽溶液将[¹²⁵I]西夫韦肽稀释,并依据用药剂量调整浓度,这样有利于样品的保存和使用。所取的血浆加入适量混合功能蛋白酶抑制剂,使得血浆中[¹²⁵I]西夫韦肽不易分解。标记过程是否对西夫韦肽的正常代谢产

生影响,有一定争议^[5],但由于没有 P3 实验室愿意接收放射性标记的化合物而无法实现活性的检测。本实验室利用[¹²⁷I]冷标记西夫韦肽,体外细胞融合实验证明[¹²⁷I]西夫韦肽的 EC₅₀ 为 1.79 μg·L⁻¹,未标记西夫韦肽 EC₅₀ 为 0.33 μg·L⁻¹,活性下降。分部收集器收集[¹²⁷I]西夫韦肽后含蛋白各管的纯度未进行严格挑选,同时比[¹²⁵I]标记过程增加了冷冻干燥的步骤。这可能是导致活性下降的原因之一。本研究预示[¹²⁵I]西夫韦肽仍然具备一定的生物活性,用[¹²⁵I]西夫韦肽进行药代动力学研究一定程度上

能够反映西夫韦肽在动物体内的动态变化过程。

TCA 沉淀法测定沉淀放射性不全是西夫韦肽原型药物的分布特征,因为沉淀物中可能含有降解产物或者脱落后的 [^{125}I] 标记化合物重新利用部分。但在没有更好方法替代的情况下,该法在一定程度上能够描述西夫韦肽在动物体内的分布情况。

组织分布结果表明,在给药后的很长时间,血浆中的血药浓度一直较高,这有利于西夫韦肽发挥抗病毒作用。

4 参考文献:

- [1] Matsushita S. Current status and future issues in the treatment of HIV-1 infection[J]. *Int J Hematol*, 2000, **72**(1): 20 - 27.
- [2] Coleman CI, Musial BL, Ross J. Enfuvirtide: the first fusion inhibitor for the treatment of patients with HIV-1 infection[J]. *Formulary*, 2003, **38**:204 - 222.
- [3] Fraker PJ, Speck JC Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, **80**(4):849 - 857.
- [4] Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples [J]. *Anal Biochem*, 1978, **87**(1):206 - 210.
- [5] Tang ZM, Song HF. The methods to study pharmacokinetics of bio-technology derived drugs [A]. In: Tang ZM, Liu XW, Song HF, ed. *Pharmacokinetics of Bio-Technology Derived Drugs* (生物技术药物药代动力学) [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2004. 19 - 30.

Pharmacokinetics of [^{125}I]sifuvirtide in rats

LIU De-Sheng^{1,2}, MENG Zhi-Yun¹, ZHAO Gui-Sen², DOU Gui-Fang^{1*}, ZHANG Ya-Dong¹

(1. *Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*; 2. *College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China*)

Abstract: **AIM** To provide pharmacokinetic data for safe use of sifuvirtide in clinics. **METHODS** [^{125}I]Sifuvirtide was prepared by Iodogen method. The radioactivity in plasma or tissues was determined following trichloroacetic acid (TCA) precipitation of [^{125}I]sifuvirtide after single sc injection. **RESULTS** The AUC for plasma were 10.6, 32.2 and 112.3 $\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ following sc dose of 0.8, 2.4, 7.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. Time to maximum concentration over the dose range tested was between 1.40 - 4.60 h following sc [^{125}I]sifuvirtide, showing the slow absorption of [^{125}I]sifuvirtide. The half-life of [^{125}I]sifuvirtide was 7.39, 4.53, 13.84 h, respectively. The plasma clearance of [^{125}I]sifuvirtide, determined after sc administration was similar: 0.44, 0.70 and 0.50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively. Acid-precipitable

radioactivity of plasma was higher than that of other tissues but lower than that of urinary system and gastrointestinal system. The radioactivity of the brain and adipose tissues were the lowest. **CONCLUSION** In dosage range studied pharmacokinetic behavior appeared as linear kinetics. Acid-precipitable radioactivity in urinary system and gastrointestinal system were the highest. [^{125}I]sifuvirtide was excreted out of body mainly from urine.

Key words: sifuvirtide; pharmacokinetics; distribution

Foundation item: The project supported by National Natural Sciences Foundation of China (30371669); and National High Technology Research and Development Program (2003AA2Z347B)

* Corresponding author.

(本文编辑 石涛)