DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.031
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0311-03

论著

肝靶向抗病毒药 Lac-PLL-ACV 的制备及其趋肝性研究

项贵明,周世文,汤建林,徐 颖,黄永平 (第三军医大学附属新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 减少抗病毒药阿昔洛韦(Acyclovir, ACV)在治疗乙型肝炎中的肝外毒副作用,获得肝靶向 ACV 偶联物。方法 多聚赖氨酸(Poly-L-lysine, PLL)在氰硼酸钠的催化作用下与乳糖反应生成乳糖化多聚赖氨酸,乳糖化多聚赖氨酸与咪唑化阿昔洛韦在 37 ℃ pH 9.5 的条件下反应合成偶联物乳糖化多聚赖氨酸-阿昔洛韦(Lactosaminated poly-L-lysine-acyclovir, Lac-PLL-ACV)。偶联物经尾静脉注射进入小鼠体内后,收集小鼠血浆及肝脏样品,用高效液相色谱法测定药物浓度,研究偶联物的体内分布和药代动力学。结果 HPLC 检测证实 Lac-PLL-ACV 在血浆中十分稳定,不易解离出 ACV。偶联物的肝最大摄取率约为 60%,是 ACV 组的 10 倍以上,偶联物肝中的 $T_{1/2}$, AUC, CL 分别为 ACV 的 4.2 倍,56.6 倍和 1/57,具有明显的肝靶向性。结论 乳糖化多聚赖氨酸作为肝去唾液酸糖蛋白受体(Asialoglycoprotein receptor, ASGPR)介导的一种药物载体,能使抗病毒药 ACV 获得较满意的肝靶向性。

关键词:去唾液酸糖蛋白受体;肝靶向;阿昔洛韦;药代动力学
中图法分类号:R512.62;R969.1;R978.7 文献标识码:A

Preparation and targeted delivery of hepatotropic antiviral drug Lac-PLL-ACV

XIANG Gui-ming, ZHOU Shi-wen, TANG Jian-lin, XU ying, HUANG yong-ping (Base of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective To reduce extrahepatic side effects of ACV in treatment of chronic hepatitis B, the drug was conjugated with lactosaminated poly-L-lysine (Lac-PLL) which selectively enters hepatocyte by Asialoglycoprotein receptor. Methods Lactosylation of the poly-L-lysine was performed by reductive lactosamination in the presence of sodium cyanoborohydride. The conjugate Lac-PLL-ACV was prepared via the ACV imidazolides incubated with lactosaminated poly-L-lysine at 37 ℃ under pH9.5. Pharmacokinetic properties of the conjugate were studied by determining ACV concentration in plasma and liver by HPLC after intravenously administered to Kunming mice. Results The conjugate was stable in human plasma. After i.v. injection, maximally about 60% of the injected dose was taken up by the liver. The $T_{1/2}$, AUC, CL values in liver were about 4.2, 56.6, 1/57 times of the i.v. ACV group. Conclusion The results suggested that the Lac-PLL were a suitable carrier for targeting antiviral drugs ACV to liver.

Key words asialoglycoprotein receptor; liver targeting; acyclovir; Pharmacokinetics

病毒性肝炎是临床的常见病、多发病之一,这类疾病之所以缺乏有效地治疗,除了药物本身的药理作用不够理想之外,一个重要的原因就是没有将药物有效地运输至肝脏的病变部位,即药物的肝靶向性差。肝去唾液酸糖蛋白受体(Asialoglycoprotein receptor, ASGPR)位于肝实质细胞膜的肝窦一侧,能特异性识别并结合糖链中的非还原性半乳糖末端,是血浆中去唾液酸糖蛋白的一种受体。由于其特殊的生理位置及识别结合特性,现已广泛用于肝靶向药物的研究之中[1,2]。为减少抗病毒药阿昔洛韦(Acyclovir, ACV)的肝外毒副作用,推广 ACV 抗乙肝病毒的临床应用,本研究以 ASGPR 的特异性配体乳糖化多聚赖氨酸为载体[3],将 ACV 与载体偶联得偶联物乳糖化多聚赖氨酸—阿昔洛韦(Lactosaminated poly-L-lysine-acyclovir, Lac-PLL-ACV),并以此作为肝靶向药物的模型化合物,通过血浆及肝脏等组织的 HPLC 检测,观察了偶联物的趋肝性,以期为实用性肝靶向药物的研究提供新途径。

1 材料与方法

1.1 药物-载体偶联物的合成

1.1.1 乳糖化多聚赖氨酸的合成 取多聚赖氨酸(Mw 40,000Da)200 mg,α-乳糖 800 mg,氰硼酸钠 500 mg 共溶于 200 ml 水中,37 ℃反应 24 h 后,将反应液调至 pH 8.5,37 ℃继续反应 6 h。反应液室温下用水透析终止反应去除未反应的乳糖,产物真空干燥备用。

1.1.2 药物-载体偶联物 Lac-PLL-ACV 的合成 ACV 溶于磷酸三甲酯中,低温—2 ℃条件下经三氯氧化磷催化生成单磷酸盐 ACVMP,然后按文献报道的方法使其转化成咪唑化产物 ACV—MPIm[4]。在 0.1 mol/L pH9.5 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 缓冲液中药物与载体 37 ℃反应 48 h 得 Lac-PLL-ACV,反应液用 Sephadex G-100 柱纯化,洗脱相 125 mmol/L Na_2SO_4 + 2 mmol/L NaH_2PO_4, pH6.0,收集产物真空干燥备用。

1.1.3 偶联物载药量的测定 测定偶联物标准水溶液在 254 nm 处的吸光度值,根据 ACV 的吸收系数($E^{1\%}$ = 622)求出载药量。

1.2 Lac-PLL-ACV 的稳定性

偶联物溶于新鲜肝素化人空白血浆中,37 ℃保温,在不同时间间隔(0,1,2,4 h)用 PEG-6000 沉淀蛋白和偶联物,HPLC 法

作者简介:项贵明(1974—),男,湖北省武穴市人,硕士,主治医师,主要从事肝靶向药物合成方面的研究。电话:(023)68755000—74695

收稿日期:2001-05-22;修回日期:2001-07-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分别测定由偶联物中游离出的 ACV 的浓度，以游离 ACV 占偶联 ACV 总量的百分比评价偶联物在血浆中的稳定性。

色谱条件：Beckman Gold 系列高效液相色谱仪，ODS 柱，流动相为甲醇-水(5∶95，V/V)，流速 1.0 ml/min，检测波长 254 nm，柱温为室温。采用外标法定量，以色谱峰面积对 ACV 标准品的浓度作标准曲线。

1.3 Lac-PLL-ACV 的体内分布及药代动力学研究

1.3.1 Lac-PLL-ACV 的体内分布及经时过程研究 昆明株小鼠 120 只，体重(20±2)g，雌雄各半，随机分成 20 组，每组 6 只，ACV10 组，Lac-PLL-ACV10 组，分别按 ACV 5 mg/kg 体重尾静脉注射给药。于给药后不同时点分别眼眶取血后断颈处死，肝脏去胆后，以生理盐水洗去残余血液，滤纸吸干，称重后加入 0.1 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液制成 50% 匀浆。全血置 1.5 ml 肝素化离心管中，离心分离出血浆。血浆 0.20 ml 和肝匀浆 0.20 g 加 12% 三氯醋酸 0.40 ml，50 ℃水浴 30 min 后旋涡振荡 90 s，12 000 r/min 离心 5 min，吸取 20 μl 上清液进样，HPLC 法测定样品中 ACV 浓度。色谱条件同前。

1.3.2 药代动力学数据处理 用 3P87 程序对静脉注射给药后 Lac-PLL-ACV 和 ACV 的血药浓度-时间数据和肝药浓度-时间数据进行药代动力学处理，计算药代动力学参数，所得结果以均值±标准差表示。

Lac-PLL-ACV 组和 ACV 组组间数据用 SPSS 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 Lac-PLL-ACV 的化学性质

偶联物中 ACV 的载药量为 10.02%，药物/载体的摩尔比约为 28。偶联物 37 ℃保温 1 h 后，游离药物的浓度仅占阿昔洛韦总含量的 3%，4 h 后仅占 6%，说明在人血浆中偶联物的稳定性较高。

2.2 按药物浓度平均值绘制的血药时曲线和肝药时曲线，见图 1

小鼠 i.v ACV 后血和肝中药物浓度均较低，12 h 后已检测不到。i.v 含同剂量 ACV 的 Lac-PLL-ACV 后血浆中 ACV 浓度仍然较低，但 12 h 后可以测得；肝中 ACV 浓度明显增加，45 min 达峰值 59.47 μg/g，约为 ACV 组的 10 倍以上，12 h 后仍高达 5.16 μg/g。说明 Lac-PLL-ACV 在血和肝中停留时间比 ACV 长。将各相同时点 Lac-PLL-ACV 用药组和 ACV 用药组的血药数据和肝药数据的平均值进行成对比较的 t 检验，结果各点均有非常显著的差异($P<0.01$)，说明 i.v 后 Lac-PLL-ACV 偶联物的体内分布有别于 ACV。

为进一步研究两者之间在动力学上的差异，用统计矩的方法对两者的血药浓度、肝药浓度-时间数据进行处理，结果见表 1 和表 2。在血浆中 Lac-PLL-ACV 组的 AUC 是 ACV 组的 1.4 倍，Lac-PLL-ACV 组的 $T_{1/2}$ 是 ACV 组的 3.6 倍；在肝脏中 Lac-PLL-ACV 组的 AUC 是 ACV 组的 56.6 倍，Lac-PLL-ACV 组的 $T_{1/2}$ 是 ACV 组的 4.2 倍。结果表明：Lac-PLL-ACV 较 ACV 在药代动力学特征上有较大的改变，尤其在肝脏中 AUC 明显增加，MRT 和 $T_{1/2}$ 显著延长，清除率明显降低。其中 Lac-PLL-ACV 的肝、血浆 AUC 之比高达 18.04，说明 Lac-PLL-ACV 的体内分布具有明显的肝靶向性。

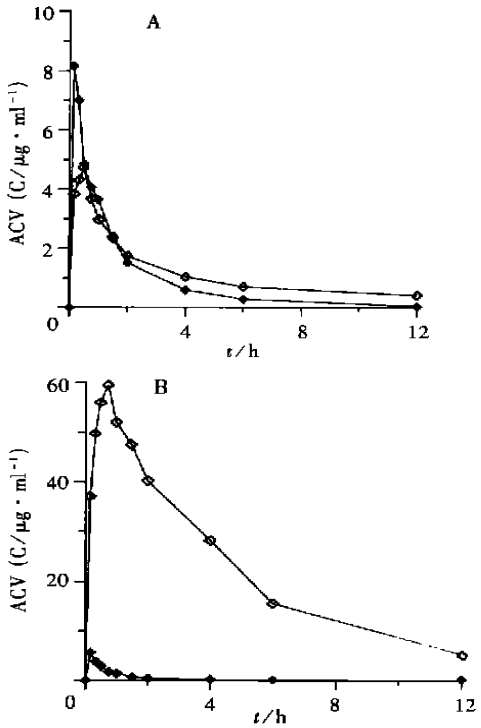


图 1 小鼠静脉注射 ACV (◆)和 Lac-PLL-ACV(◇)后血浆(A)和肝脏(B)中的药物浓度-时间曲线

Fig 1 ACV concentration-time curves of plasma(A) and liver(B) injected i.v with ACV(◆) and Lac-PLL-ACV(◇) in mice

表 1 血浆 ACV 和 Lac-PLL-ACV 统计矩动力学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of ACV and Lac-PLL-ACV in plasma of statistic moment algorithm

Group	AUC(μg/ml)*h	MRT(h)	$T_{1/2}$(h)	CL(ml/h)
ACV	11.6667	1.6185	1.1807	8.5712
Lac-PLL-ACV	16.4990	5.7679	3.9912	6.0609

表 2 肝脏 ACV 和 Lac-PLL-ACV 统计矩动力学参数

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of ACV and Lac-PLL-ACV in liver of statistic moment algorithm

Group	AUC(μg/g)*h	MRT(h)	$T_{1/2}$(h)	CL(g/h)
ACV	5.2682	1.1148	0.7561	19.0114
Lac-PLL-ACV	296.2703	4.6089	3.2197	0.3375

3 讨论

ACV 抑制病毒 DNA 合成的作用明显，与干扰素合用有协同作用，对乙肝具有较高的治疗指数；但 ACV 水溶性较差，不易进入肝细胞，且肝内半衰期较短，这些都是局限其用于临床乙肝治疗的重要制约因素。所以我们选用 ACV 作为模型药物制备肝靶向偶联物 Lac-PLL-ACV，以提高 ACV 的生物利用度，增加其肝内浓度。

人们很早就认识到乳糖分子及许多药物分子可以通过 L-赖氨酸的 ε-氨基形成氨基磷酸键与蛋白载体结合[5]，在此基础上合成了多聚赖氨酸作为肝靶向药物

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的载体原料，其优点在于[6]：①ε-氨基数量多载药量大，在用药部位较易达到有效浓度；②来源广泛，PLL 可以大批量化学生产；③偶联物分子大小可以控制，PLL 的聚合程度由人工控制；④偶联物可通过肌注方式给药；⑤生物可降解，在肝溶酶体内被蛋白水解酶迅速降解产生释药作用；⑥长期使用无免疫原性等。有研究发现肝 ASGPR 对分子量大于 30×10^3 的配体才有较好的识别和结合特性，考虑到可溶性及肾清除率等因素，本研究选用平均分子量为 40×10^3 的多聚赖氨酸，经乳糖分子部分修饰后获得了良好的肝靶向性。

偶联物的载药量与稳定性是衡量药物载体的重要指标。文献报道 ACV 制剂的定量分析多采用吸收系数法，本研究采用此法测定偶联物中 ACV 的含量。测得药物/载体的摩尔比约为 28，载药量高于国内报道的其它类型载体[7]。HPLC 法证明偶联物在人血浆中相当稳定，37 ℃保温 1 h 后，游离药物的浓度仅占阿昔洛韦总量的 3%，而体内分布实验表明偶联物 iv 给药 45 min 后即有超过 60%的药物蓄积在肝组织，说明偶联物内化进入肝细胞时绝大部分药物仍与载体相连，从而保证了肝靶向的效果。

总之，本研究所获得 Lac-PLL-ACV 的各种特性支持乳糖化多聚赖氨酸作为肝靶向药物研究的载体，进一步的工作将阐明偶联物在肝内的释药过程及药效作用。

参考文献：

[1] Nashikwa M, Hirabawashi H, Takakura Y, *et al*. Design for cell-specific targeting of proteins utilizing sugar-recognition machanism[J]. Pharm Res, 1995, 12(2): 209－212.

[2] Collard W T, Yang Y S, Kwok K Y, *et al*. Biodistribution, metabolism and in vivo gene expression of low molecular weight glycopeptide polyethylene glycol peptide DNA co-condensates[J]. J Pharm Sci, 2000, 89(4): 499－512.

[3] Di stefano G, Busi C, Mattiolo A, *et al*. Selective Delivery to the liver of antiviral nucleoside analogs coupled to a high molecular mass lactosaminated poly-L-lysine and administered to mice by intramuscular route[J]. Biol Phar, 1995, 49(12): 1 769－1 775.

[4] Hashida M, Nishidawa M, Tadakura Y. Hepatic targeting of drugs and proteins by chemical modification[J]. J Controlled Release, 1995, 36(1): 99－103.

[5] Fiume L, Di stefano G, Busi A, *et al*. Inhibition of woodchuck hepatitis virus replication by adenine arabino monophosphate coupled to lactosaminated poly-L-lysine and administerd by intramuscular route[J]. Hepatology, 1995, 22(8): 1 072－1 077.

[6] Di Stefano G, Busi C, Derenzini M, *et al*. Conjugation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine with lactosaminated poly-L-lysine to reduce extrahepatic toxicity in the treatment of hepatocarcinomas[J]. Ital J Gastroenterol Hepatol, 1998, 30(2): 173－177.

[7] 李崇辉，温守明，池木根，等. 肝靶向配体半乳糖基白蛋白和多聚谷氨酸[J]. 生物化学与生物物理进展，1998，25(6)：532－535.

（编辑 潘式文）

文章编号：1000-5404(2002)03-0313-01

个案与短篇

充血性心力衰竭患者血浆内皮素和降钙素基因相关肽的水平

Plasma levels of endothelin and calcitonin gene-related peptide in patients with congestive heart failure

赵洪涛 （第四军医大学西京医院老年病科，西安 710032）

近年来发现内皮素（Endothelin，ET）和降钙素基因相关肽（Calcitonin gene-related peptide，CGRP）分别是体内最强的缩血管和舒血管生物活性多肽[1~3]，在体内它们广泛分布在于中枢、周围神经系统和心血管系统和某些器官组织；目前在充血性心力衰竭（Congestive heart failure，CHF）方面的大多数研究仅局限在 ET 和 CGRP 单一研究，对 CHF 患者体内 ET 和 CGRP 平衡状态研究报道不多，为此我们同期检测了 60 例 CHF 患者血浆 ET 和 CGRP 水平，以及 ET/CGRP 比值，报告如下。

1 资料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 对照组 随机选择 60 例通过体检及辅助检查排除器质性疾病的健康人，其中男 27 例，女 33 例，年龄 45.8±8.2（26~65）岁。

1.1.2 CHF 组 随机选择按 NYHA 心功能分级为Ⅲ~Ⅳ级的心内科住院的 CHF 患者 60 例其中风心病 18 例，高心病 15 例、冠心病 15 例、扩张性心肌病 8 例、肺源性心脏病 4 例。男 36 例、女 24 例，年龄 55.6±9.2（28~72）岁。

1.2 方法

CHF 组和对照组在清晨采血，分别将周围外周静脉血 2.5 ml 缓慢注入有 10% EDTA-Na_2 30 μl 和抑肽酶 400 U 的塑料管中，混均后全血离心（3 000 r/min －4 ℃，10 min）分离血浆。标本置－30 ℃冰箱保存备测。ET 和 CFRP 放免药均由北京东亚免疫技术研究所提供，严格按说明书操作，批内差别分别为 8.3%和 7.2%，批间差异分别为 11.4%和 13.8%。测定仪器为西安 262 厂 XH-6010 型放射免疫测定仪，数据由 PC 机同步自动打印，同时测定 ET、CGRP 浓度，单位均以 pg/ml 表示，并求出 ET/CGRP 比值。

1.3 统计学方法

采用 t 检验，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

（下转 316 页）

作者简介：赵洪涛（1961－），女，江苏省新沂市人，主治医师，主要从事老年病的防治与研究。电话：(029)4399791

收稿日期：2001-10-05；修回日期：2001-12-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net