

解,血液检查显示,炎性标志 C 反应蛋白和 IL-6 在最初治疗的 1 周内明显下降。

正式的双盲、随机、安慰剂对照试验在欧洲的四个中心进行,使用 cA_2 1 和 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 与安慰剂对照比较,结果显示,8% 的安慰剂组患者达到有效标准,而 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ cA_2 组有效率为 44% ($P = 0.0083$), $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组为 79% ($P < 0.0001$)。在其后的 II 期临床试验中,比较了 1, 3, $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 cA_2 单用且与每周 7.5 mg 的甲氨蝶呤(MTX)合用的疗效。结果显示, $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 cA_2 在无 MTX 辅助下不能获得长期疗效,而 3 和 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 则有效。当与 MTX 合用时,各剂量 cA_2 均有效, cA_2 与 MTX 的协同作用机制尚不明确,但在应用 MTX 患者血液中可检测到高水平的 cA_2 ,且抗自身抗体反应明显降低。TNF 对于感染的保护性免疫反应已在实验模型中建立,因此,应用抗 TNF 治疗可能有增加感染的危险。但目前证

据表明,抗 TNF 治疗的疗效大于应用药物后的危险性。

2.4 结语

英昔单抗是第一个有效治疗 RA 的 TNF 拮抗剂。另外两个 TNF 拮抗剂依他那西普和阿达木单抗也获准用于 RA 及一些炎症性疾病的治疗,如银屑病等。在治疗肾小球肾炎、淀粉样变性、溃疡性结肠炎和脉管炎等疾病中获得了阳性结果。此类药物治疗具有重要的医学及药理学意义。

展望未来,抗 TNF 治疗不可能仅仅限于目前已经注册的三种制剂,其他制剂已用于临床试验,包括聚乙二醇化的可溶性的 TNF 受体及聚乙二醇化单克隆抗体 Fab 片段,抗细胞因子治疗也不仅限于 TNF 及 IL-1 受体拮抗剂,其他细胞因子(如 IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8 等)也正在成为动物实验及临床试验的目标。

组合给药在药代动力学高通量筛选中的应用

姜云云¹, 范国荣¹ 综述 刘皋林² 审校

(1. 第二军医大学药学院,上海市药物代谢产物研究重点实验室,上海 200433;

2. 第二军医大学长征医院药学部临床药理研究室,上海 200003)

摘要:组合给药,即同时给动物服用多种药物,可以实现体内高通量筛选,这种方法目前应用不是很广泛,因此有较大的研究空间。该法的实施依赖于现代分析技术的高灵敏度和高选择性,尤其是 HPLC/MS/MS 联用技术的使用。本文将对组合给药法的实验设计、分析技术及应用状况作一综述。

关键词:组合给药;药代动力学;高通量筛选

中图分类号:R969.1;R914.2 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2005)01-0038-04

新药研发是一个快速发展的领域,随着组合化学等高新技术的出现,大大加快了候选药物出现的速度。每年都有成千上万个化合物需要筛选,目前新药研发的关键不再是化合物的来源问题,而是如何快速地对这些化合物进行筛选。传统的筛选方法需要消耗大量的样品和实验动物,但筛选的效率却并不高。因此,迫切需要建立一套全新的药物筛选体系,以提高新药研发的成功率,缩短研究周期,降低开发成本。

20 世纪 80 年代出现了一种全新的药物筛选体系,即高通量筛选(high throughput screening, HTS),又

称大规模集群式筛选。目前,HTS 已被广泛应用于候选药物的生物活性筛选,每天可以筛选成千上万个化合物,但在新药研发的药代动力学筛选中尚未被推广应用。虽然目前已经建立了许多研究候选药物的吸收、分布和代谢的体外筛选模型,体内的药代动力学筛选仍然不是很成熟。

体内药代动力学筛选在新药研发过程中是相当重要的,因为药物在体内的代谢过程极为复杂,受到很多因素的影响,如很多原因都可以造成药物口服生物利用度低,其中包括药物难以透过肠粘膜、存在肝脏或肠道的首过效应、存在 P-糖蛋白(P-gp)参与的外排机制,或通过胆汁迅速排泄等,因此,很难用简单的体外模型进行分析。此外,可以通过口服或

注射给药后的体内药代动力学研究获得一些非常重要的药代动力学参数,如生物利用度、半衰期、清除率、分布容积等。但体内药代动力学筛选费时费力,样品和实验动物的消耗量也很大,因而研究费用很高^[1]。为了克服上述缺点,Berman等^[2]提出了一种新的给药方法,即盒式给药法(cassette dosing),又称为组合给药法,即给动物同时口服或注射几种药物,分别取不同时刻的动物血样,通过现代分析方法作药代动力学研究。这种方法可以一次从一个动物身上获得多个药物的药代动力学参数,既节约时间又节约实验动物。但组合给药法也存在很多问题,如药物间的相互作用(吸收和排泄可能存在饱和及竞争抑制,药酶可能会被诱导或抑制等)会影响到其药代动力学参数的估算。另外,适合于这种方法的分析技术还不是很成熟^[3]。本文着重介绍组合给药法的实验设计、血样分析技术及应用等。

1 实验设计

组合给药实验设计必须考虑到每组实验包含几种候选药物最为合适,哪几种候选药物可以放到同一组中,所选的分析技术是否符合要求等。

1.1 药物分组

当候选药物较多的时候,必须对其进行分组,否则难以得到令人满意的实验结果。分组时需考虑以下几个问题^[4](1)候选药物中有没有分子量相等的化合物及候选药物是否可能产生相同的碎片离子。因为要对血样作质谱(MS)分析,所以分子量相等的化合物不能放在同一组。如果两种候选药物可能产生相同的碎片离子,则也不宜放在同一组,因为在多反应离子监测扫描(multiple-reaction monitoring, MRM)方式下它们之间会产生干扰。另外,还要考虑是否存在分子量相等的代谢产物,然而这些代谢产物都是未知的,所以无法预测它们在MRM方式下的行为。虽然MRM有很高的专属性,但是当样品是一组结构相关的化合物时,专属性也就失去了意义,所以实验中最好不要只用MRM方式。(2)候选药物的理化性质是否相似。很多药物的溶解性不是很好,需要加入一定量的酸或者碱才能溶解,需要加酸、加碱的两类药物则不能放在同一组。另外,如果组内化合物的性质差异比较大,则样品溶液的制备和HPLC条件的摸索都会比较困难。(3)一些化合物在MS的阳离子模式下电离得很好,另外一些化合物则在阴离子模式下电离较好,这两种化合物

也不能放在同一组。(4)每组候选药物中最好有一种药代动力学参数已知的化合物,可以利用这种化合物来监测组内其他候选药物的药代动力学行为是否正常。

1.2 组的大小

每组实验所包含的候选药物的数量非常重要,一方面,HTS要求每组所包含的候选药物越多越好;另一方面,每组中的药物越多,实验就越复杂,也越容易失败。当组内药物较多时,MS的灵敏度就显得尤为重要,因为各种药物的浓度之和不能太大,以免降低MS的灵敏度,组内候选药物越多,每种药物的浓度就越小,对分析技术的要求也就越高。另外,组内药物越多、存在代谢抑制剂的几率越大,则越有可能发生相互作用^[5]。

2 药物之间的相互作用

药物之间的相互作用相当常见。同时服用两种药物,其中一种药物的代谢减慢,这往往是因为某些药酶受到抑制引起的。

药物之间的相互作用大致有以下几种情况(1)清除途径的竞争(对药酶及转运蛋白的竞争)(2)吸收途径的竞争(对转入转出蛋白的竞争)(3)竞争与血浆蛋白结合(4)清除途径的相互促进(一种药的代谢酶被另一种药激活)(5)对器官的药理学作用和毒性作用(6)酶感应现象。

尽管存在上述问题,但组合给药仍是可能的。组合给药的最大障碍在于药物之间的相互作用,通过降低给药剂量、避免组内存在药酶抑制剂或在组内加入一种药代动力学参数已知的参照物等方式可以将此相互作用降至最低。另外,药物之间的相互作用只会使药代动力学数据优于单独给药的药代动力学数据,所以在药物粗选中不会造成漏选,而被误选的药物在接下来的筛选中将被淘汰^[6]。

3 血样分析

用于组合给药法血样分析的气相色谱(GC)比较少见,目前仍在使用的是气相色谱-负化学离子化-质谱(GC-NCl-MS)联用技术,但这种联用技术要求样品反复纯化,很费时间,一台仪器每天最多能检测100~200个样品,每个样品包含2~8个候选药物^[7]。

现在应用较为广泛的是HPLC的联用技术。最早是HPLC与紫外检测器的联用,该法灵敏度不高,

专属性也不够强。随着 MS 的出现 ,HPLC-MS 也相继问世 ,HPLC-MS 中一项重要的技术是 MRM 的使用^[8,9]。尽管不同的化合物所产生的碎片离子可能有相同的质荷比 ,但它们的分子离子峰肯定不一样。MRM 带来的高选择性使分析组合给药的血样变得简单易行。

近年来 ,LC 和大气压电离质谱的联用技术成了快速筛选化合物的首选工具。LC-MS-MS 的灵敏度高 ,专属性强 因此需要的样品量也少 ,而且每个样品所需要的分析时间缩短到 1.5 ~ 4 min ,运用 LC-MS-MS 联用技术 3 h 内可以分析 120 个血样 ,大大提高了分析效率^[10]。

键合人造膜色谱 (immobilized artificial membrane , IAM) ,即在 HPLC 的硅胶固定相上键合上磷脂类似物^[11] ,适用于极性化合物和离子化合物的分离 ,使用方便 ,但与其相连的 UV 检测器却限制了其作用的发挥 ,仍有部分化合物对其没有响应 ,而且分析周期较长。IAM-MS 联用技术弥补了上述缺陷 ,同时专属性和灵敏度也有所改善。

为了更好地分离血样中的各种成分 ,HPLC 中往往采用梯度洗脱的方法 ,然而梯度洗脱也存在两个不足 (1)寻找每组候选药物的最佳流动相要花费很多时间 (2)注射剂中常用的辅料聚乙二醇类对离子化有显著抑制作用。为解决上述问题 ,一种新的柱切换技术应运而生 ,该技术使组合给药法的运用更广泛 ,同时也避免了生物样品中可能存在的聚乙二醇类成分对离子化的抑制作用^[12]。这种柱切换技术很简单 ,两种柱子都是固定的 ,流动相也只有两种 ,选择流动相只需要数小时 ,大约有 50 组候选药物相当于 200 个化合物用这种柱切换技术进行了检测 ,结果表明 ,这种新的柱切换技术完全满足组合给药法进行药物筛选的精确性要求^[13]。

4 组合给药的应用

4.1 药物在体内清除率的研究

分别通过组合给药和单化合物给药两种方式给狗静脉注射 21 种 α_1A -肾上腺素能受体类化合物 ,各化合物经两种给药方式所得的清除率数据吻合得很好 ,虽然数据有些离散 ,但还是可以识别出清除率较低的化合物^[4]。

4.2 药物半衰期的研究

实验者将 90 种 α_1A -肾上腺素能受体拮抗剂作为一个给药组 ,并将这组化合物分为 $n < 22$ 的几个

小组作为给药对照。由于组内化合物较多 ,存在累积药代动力学效应 ,所以总剂量必须保持在一个较低的水平 ,这就使组内单个化合物的浓度相对于 MS 的检测限来说就显得很低 ,为此 ,可以将化合物分为不同的四组并间隔 1 h 给药。结果表明 ,大组给药 ($n = 90$)与小组给药 ($n < 22$)所得半衰期数据基本吻合 ,且相当一部分化合物在大组中的代谢速度比在小组中慢。同时还发现某些化合物具有“负半衰期” ,在实验的后半段这些化合物的浓度明显增高。很明显 ,这些化合物并不是真负的消除半衰期 ,主要是由于它们的代谢速度比较慢 ,半衰期可能延长到实验观察时间以外 (实验时间以 8 h 计) 。选出的药代动力学行为良好的 20 个化合物中只有一个在初选时险遭淘汰 ,这个化合物在小组内的半衰期大于 20 h ,而在 $n = 90$ 的组内只有 3.4 h。尽管如此 ,类似的大组用于药代动力学的粗选还是可行的^[4]。

4.3 血脑屏障通透性的研究

在药物的体内 HTS 中 ,除了药代动力学参数以外 ,还要考虑药物对血脑屏障的通透性。分别通过组合给药和单个化合物给药两种方式给小鼠静脉注射 89 种三嗪类化合物 ,给药后 1 h 测定脑脊液中各药物浓度 ,结果表明各药物经两种给药方式所得的浓度数据吻合得很好^[4]。组合给药法的应用使得用于动物脑组织的切除、匀浆、提取的时间大大减少 ,且实验数据与单个化合物给药非常近似 ,所以组合给药法很适合于血脑屏障通透性的研究^[14]。

4.4 口服给药后药物-时间曲线的研究

Frick 等^[4]在实验时发现其中一个化合物在小鼠体内的相对口服生物利用度超过了 300% ,而对其进行单个化合物给药时相对生物利用度却小于 10%。造成这种结果的原因可能是组内一种或几种药物的代谢存在首过效应 ,从而使清除机制达到饱和。为了验证这种假说 ,给一只小鼠先口服这组药物中除了一种药以外的其他所有药 ,4 h 以后再给这只小鼠静脉注射剩下的那种药物 ,接着 ,再给第二只小鼠静脉注射组内所有药物 ,给第三只小鼠静脉注射剩下的那种药物。结果表明 ,组合静脉给药似乎也存在药物之间的相互作用 ,然而这种相互作用在口服组合给药中显得更为明显。前两只小鼠和第三只小鼠的药物-时间曲线之间有一定偏差 ,可能是由于口服给药后肝脏中药物浓度太高所致 ,也有可能是因为口服给药后得到的某种代谢产物对药物代谢

具有很强的抑制作用所致^[4]。

5 结语

组合给药法作为体内 HTS 的一种方法正在逐渐被人们所接受,该法要求实验设计合理、分析技术灵敏可靠。目前,组合给药法面临的主要问题是药物之间的相互作用及分析技术的滞后。由于体内复杂的代谢过程及代谢产物的多样化,药物之间的相互作用不可能完全避免,只有通过提高分析技术的灵敏度和专属性来减少相互作用对实验结果造成的不利影响。总的来说,组合给药法在某种程度上还是实现了体内 HTS,其准确率比较令人满意。随着 HTS 要求的不断提高,在丰富的实践经验的基础上,还应该去寻找组合给药法的理论依据,以求更好地指导实践。另外,为了进一步缩短研究周期,人们正在试图将混合血浆法运用于组合给药法中,即将各时间点的血浆混合为一个样品进行分析,大大减少了样品个数^[15]。组合给药法应用范围广泛,几乎适用于所有体内药代动力学参数的研究,且各大类药物都有所涉及。目前,已有人将组合给药法应用于临床试验,这将成为组合给药法发展史上的一个重要里程碑^[16]。随着组合化学、分析化学和计算机科学的发展,组合给药法将会有更大发展,为加速新药开发作出巨大的贡献。

参考文献

[1] Kerns EH, Di L. Pharmaceutical profiling in drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8(7): 316-323.

[2] Berman J, Halm K, Adkison K, et al. Simultaneous pharmacokinetic screening of a mixture of compounds in the dog using API LC/MS/MS analysis for increased throughput [J]. *J Med Chem*, 1997, 40(6): 827-829.

[3] Christ DD. Cassette dosing pharmacokinetics: valuable tool or flawed science [J]? *Drug Metab Dispos*, 2001, 29(7): 935.

[4] Frick LW, Adkison KK, Wells-Knecht KJ, et al. Cassette dosing: rapid *in vivo* assessment of pharmacokinetics [J]. *Pharm Sci Technol Today*, 1998, 1(1): 12-18.

[5] White RE, Manitpisitkul P. Pharmacokinetic theory of cassette dosing in drug discovery screening [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29(7): 957-966.

[6] Manitpisitkul P, White RE. Whatever happened to cassette-dosing pharmacokinetics [J]? *Drug Discov Today*, 2004, 9(15): 652-658.

[7] Beaudry F, Le Blanc JC, Coutu M, et al. *In vivo* pharma-

cokinetic screening in cassette dosing experiments; the use of on-line Pprospekt liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry technology in drug discovery [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998, 12(17): 1216-1222.

- [8] Dumphy JC, Busch KL. Imaging analysis and selected sequence monitoring of small peptides using planar chromatography/secondary ion mass spectrometry [J]. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1988, 17(5): 405-410.
- [9] McLafferty FW. Trends in analytical instrumentation [J]. *Science*, 1984, 226(4672): 251-253.
- [10] Olah TV, McLoughlin DA, Gilbert JD. The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an *in vivo* drug screening procedure [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11(1): 17-23.
- [11] Escuder-Gilbert L, Sagrado S, Villanueva-Camanas RM, et al. Development of predictive retention-activity relationship models of non-steroidal anti-inflammatory drugs by micellar liquid chromatography: comparison with immobilized artificial membrane columns [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 740(1): 59-70.
- [12] Ayrton J, Dear GJ, Leavens WJ, et al. Optimisation and routine use of generic ultra-high flow-rate liquid chromatography with mass spectrometric detection for the direct on-line analysis of pharmaceuticals in plasma [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 828(1/2): 199-207.
- [13] Deng Y, Wu JT, Lloyd TL, et al. High-speed gradient parallel liquid chromatography/tandem mass spectrometry with fully automated sample preparation for bioanalysis: 30 seconds per sample from plasma [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16(11): 1116-1123.
- [14] Zhang MY, Kerns E, McConnell O, et al. Brain and plasma exposure profiling in early drug discovery using cassette administration and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 34(2): 359-368.
- [15] Hop CE, Wang Z, Qing C, et al. Plasma-pooling methods to increase throughput for *in vivo* pharmacokinetic screening [J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87(7): 901-903.
- [16] Zhou H, Tong Z, McLeod JF. 'Cocktail' approaches and strategies in drug development: valuable tool or flawed science [J]? *J Clin Pharmacol*, 2004, 44(2): 120-134.