

shēngwù yàowùxué

生物药理学 (biopharmacy) 研究生物药物的结构组成、理化性质、安全性评价、药理作用、临床应用及有关制备技术等综合学科。生物药物指利用生物技术生产的用于预防、治疗和诊断的医用药物和制品。生物药理学是近代药理学的一个重要分支,是生物技术与药学相互结合的产物。生物药理学研究内容包括各类生物药物的来源、结构、应用和制备技术等各方面的知识,以及生物技术药物在疾病防治及其临床上的应用。

简史 1953年,美国生物学专家沃森与英国生物学专家克里克共同提出了DNA结构的双螺旋模型,这项突破标志着现代生物技术的诞生。1977年,板仓(Itakura K)等用基因工程的方法表达了人脑激素——生长抑素,这是人类第一次用基因工程方法生产具有药用价值的产品。1978年,美国基因泰克公司利用重组DNA技术成功地通过大肠杆菌生产出胰岛素,1982年,美国批准重组人胰岛素上市,这是全球第一个基因重组药物,由此揭开了生物制药的序幕。2000年2月前,美国共批准生物药物76个,欧美共有84种生物药物上市,这些药物被广泛应用于临床,使6000万患者从中受益。到2002年美国已批准的生物技术药物和疫苗共141个,生物技术公司1000多家。到2015年,中国已经有二十多个国家级生物技术药物重点实验室,300多家生物制药企业。通过基因工程制药技术生产的蛋白、多肽、酶、激素、疫苗、细胞生长因子及单克隆抗体等生物药物已广泛应用在肿瘤、自身免疫性疾病、病毒感染性疾病、心血管疾病等

医学领域。由于生物药物副作用小、疗效显著,所以生物药物广泛受到关注,已经成为新药研究的重要方向。

1975年中国商业部在南京成立了全国生化制药情报中心站,创办了《中国生化药物》杂志(双月刊),对国内重点生物药物进行了专题调研,并组织国内生物技术制药行业的技术交流等。1981年中国药学会生化药物专业委员会和中国生化学会工业生化专业委员会成立,这两个学会在生化药理学和工业生化学两个学科的交叉中产生并使生物药理学凸现出来,自两个学会成立以来,已开展了关于生物药理学学术交流活动七十多次,推动了生物药理学的发展。随着现代生物制药技术的发展。20世纪70年代以后,国际上的医学、化学和生物学三者紧密结合,使药物治疗从整体治疗发展到分子治疗水平,进入了生物药理学时期。1987年中国国家教委颁发了新修订的专业目录,确定生物制药学等11个科目为药学类本科专业所学科目。21世纪初中国药学会又将生化药物的定义和范围扩展为生化与生物技术药物,经中国药学会批准,2002年将原中国生化药物专业委员会改名为中国生化与生物技术药物专业委员会。20世纪90年代以来,中国国家技术科技委员会、中国科学院、中国医学科学院及各有关高等院校和重点生物制药企业都加强了生物技术制药的科研力量,逐步建立了一些科研院所、中心、研究室、教研室和基地,促进了生物药理学的发展。

研究内容 以生物药物的特性、种类及生物药物制药技术为研究对象,旨在阐明生物药物的生物学特性及功能,明确生物药

物的结构组成、理化性质、剂型、毒性、安全性评价、药理作用、注意事项和生物药物制药技术的基本原理和临床应用等。

结构特点及理化性质 由于生物药物主要由生物大分子组成,如多肽、蛋白质等。它们具有与小分子化学合成药物完全不同的结构特点和理化性质。如多肽和蛋白质分子不仅存在由氨基酸组成的结构序列问题,还存在可以形成二级等高级结构和多种分子构象的现象。由于这些分子的生物活性不仅与其结构有关,且与构象有关,因此研究多肽、蛋白质药物的构象就成为这类药物研究中的一个特色。

生物大分子的理化性质与小分子化合物的理化性质也有很大的不同。它们的相对分子质量较大,直接影响到它们的体内吸收,这类分子的晶型又影响到它们的水溶性、熔点、脂溶性,分子带有电荷的情况还直接影响到它们的稳定性等等,这些对生物药物分子的理化性质研究直接影响到它们的成药性。

成药性研究 包括生物药物分子的药效学、毒理特性、药动学特性、药物剂型和质量控制等研究。生物药物主要包括多肽药物、蛋白质药物、抗体药物及生物治疗制剂等多种类型。由于生物药物多数易受人体消化道酸碱环境的作用和各种消化酶的降解而失活,因此生物技术药物制剂学受到更多关注,需研究如何对生物药物进行化学修饰以及添加酶抑制剂等来解决生物药物的特殊问题。

生物制药技术研究 生物药物是利用基因工程技术、细胞工程技术、微生物工程技术、酶工程技术、蛋白质工程技术、分子

生物学技术等来研究和开发的,如天然生物药物分离纯化技术、基因工程制药技术、细胞工程制药技术、抗体药物制备技术、疫苗制备技术、蛋白质工程制药技术和生物药物筛选模型的建立和使用等,这些技术均属于生物技术的范畴。生物药物学主要研究这些现代生物制药技术的基本原理、关键操作技术、技术路线、工艺过程及其在生物药物方面的应用等。

研究方法 生物药物学的知识和理论主要来源于实验和科学观察,主要从动物整体水平、离体器官、细胞水平和分子水平来获取有关生物药物的信息。常用的研究方法包括三个方面的内容。

动物模型的建立和使用 生物药物学最主要的体内研究方法。常用动物模型主要包括小型动物模型和非人灵长类动物模型。小型动物来源广泛,价格低廉,用其表达的基因产物和基因转运系统的生物反应与在人体上出现的反应非常相似,而非人灵长类动物与人类的亲缘关系很近,在研究生物药物的免疫作用及病理等方面有较好效果,所以在小型动物身上建立动物模型是研究生物药物的有效方法。使用的动物模型包括正常动物模型和病理动物模型。正常动物模型也称为体内筛选模式动物,如小鼠、灵长类猴、猕猴、树鼩、猪、线虫、果蝇、斑马鱼等。大多数用来筛选评价药物的安全性、药动学等指标。但由于其不能充分反应药物在病理条件下的治疗作用,在药物筛选中应用更广泛的是整体动物病理模型,也称为疾病动物模型。包括自发性动物模型、诱发性动物模型、基因工程动物模型、抗疾病型动物模型和生物医学动

物模型等。

体外实验方法 在各种动物的体外器官、组织和细胞以及分子水平上研究的方法。如常以肝脏为基础的体外研究系统,是利用细胞理化常数和细胞毒理学的知识等探索生物药物的代谢、安全性及有效性的研究方法。常用的体外模型包括肝微粒体、肝切片及分离肝细胞等。常用的还有如组织培养实验、离体血管实验、心脏灌流实验等体外器官、组织模型。肿瘤细胞模型是最常用的筛选、研究抗肿瘤生物药物的体外方法,也是发展较快的细胞实验方法。分子水平上的研究主要是药物与其作用的靶点的关系,为在细胞水平和整体动物水平研究药物的作用机制奠定基础。体外实验与体内实验需要互相补充、互相验证,体外模型由于操作简单,能够较为真实的模拟体内环境,极大促进了对生物药物的评价研究,有利于研发出更为安全有效的生物药物。

临床观察方法 以临床收集的血液、尿液、脑脊液等样品进行化验测定或通过仪器进行检查,对生物药物的代谢、药理、毒理及稳定性进行研究的方法。临床观察是生物药物学的一个重要研究方法,为生物药物学的研究提供了可靠资源。

同医学其他学科的关系 生物药物学是以生物学、医学、药学中的先进技术为一体,以组合化学、药物基因组学、功能抗原学、生物信息学等学科为依托,以分子遗传学、分子生物、生物物理等基础学科的突破为基础形成的综合学科。为了研究生物药物的理化性质、药效性、毒理、药动学特性、生物药物剂型及生物药物质量控制,必须运用有关

基础学科的理论和方法,因此生物药物学与生物化学、有机化学、分子生物学、物理化学、人体生理学、药物化学、药理学、药物分析等基础学科密切相关。另一方面,生物药物学又与临床医学各学科如外科学、内科学、妇产科学、消化科学等密不可分,在各科的临床实践中,可能会不断出现与生物药物学有关的问题,如生物药物的作用机制和不良反应的探究,药效作用的阐明,生物药物质量的改进等。生物药物学专业研究者及临床研究人员,必须对上述问题进行深入研究,从而对生物药物的认识及研究开发不断深化和全面。其中生物药物学在药物药效及药理等方面的研究结果,还需要到临床医学中验证和付诸实践。

应用和有待解决的问题 生物药物学研究为应用生物药物打下了坚实的药学基础。现代药学的知识不断更新和充实,生物药物品种日新月异,分子药理学和分子免疫学等相关基础学科快速发展,这些均促进了生物药物学向更深的方向发展,生物制药产业逐渐成为全球化时代最为活跃的经济力量。生物制药技术将与计算机技术、生物芯片技术、组合化学合成技术、纳米技术和高通量筛选技术等融合,这将推动生物药物学不断向新的领域发展。传统生物药物学研究对象将通过不断创新的科学技术产生新方法和新理念,并得到进一步深化和补充。生物药物学是生命科学和生物工程技术领域的重要学科,并且与医药学、农业科学、食品科学有直接的关系。

自从1982年美国批准第一个基因工程产品——重组人胰岛素上市以来,伴随着生物技术的快

速发展,生物药物学作为生物学、医学和药学的交叉学科应运而生。中国生物药物在研制开发力量上还较薄弱,必须提高新药开发决策和管理水平。

(陈志南)

shēngwù yàowù

生物药物 (biological drugs) 利用生物技术生产的用于预防、治疗和诊断的医用药物和制品。包括生物制品在内的生物体的初级和次级代谢产物或生物体的某一组成部分,甚至整个生物体。生物制品按照来源,又可分为预防用疫苗(含细菌性疫苗和病毒性疫苗)、抗毒素药物、血液制品、抗血清药物和胎盘制品等。生物技术是以现代生命科学为基础,结合其他基础科学的科学原理,采用先进的科学技术手段,按照预先的设计改造生物体或加工生物原料,为人类生产出所需产品。具体包括天然生物药物分离纯化技术、基因工程制药技术、细胞工程制药技术、抗体药物制备技术、疫苗制备技术、蛋白质工程制药技术和生物药物筛选模型等。1953年,美国生物学专家沃森与英国生物学专家克里克共同提出了DNA结构的双螺旋模型,这项突破标志着现代生物技术的诞生。1977年,板仓(Itakura K)等用基因工程的方法表达了人脑激素——生长抑素,这是人类第一次用基因工程方法生产具有药用价值的产品。1978年,美国基因泰克公司利用重组DNA技术成功地通过大肠杆菌生产出胰岛素,1982年,美国批准重组人胰岛素上市,这是全球第一个基因重组药物。此后生物药物迅猛发展,2013年生物药物全球销售额达1500亿美元,全球畅销药物前10位中的7个席位已被生物制剂占

据。截至2014年,全球已经上市的生物医药产品达100多个,另有400多个品种正在进行临床研究。

与传统药物相比,生物药物具有如下特点:①在机体内的分泌量极低,但其生理、药理活性极高。大多数细胞生长因子药物在组织中的含量比一般内分泌激素更低,但引起的生物学反应却有逐级放大的作用。如干扰素剂量为10~30 μg,白介素-12剂量为0.1 μg,表皮生长因子临床剂量为纳克水平。②毒副作用小。由于有些生物药物属于内源性物质,如生长因子类药物的表皮生长因子、血小板衍生生长因子等,药物本身取自体内,所以具有良好的安全性。③给药途径的特殊性。由于生物药物易被胃肠道中的消化酶分解,所以给药途径一般为注射给药,这就要求生物药物的质量控制,如理化性质检测、安全性检测等要比其他药物更严格。④制备及生产过程的特殊性。由于原料中有效物质含量低,所以提取纯化工艺复杂。如用于治疗侏儒症的人生长激素,以往主要从动物脏器提取,不仅来源困难,且由于免疫抗原性的缘故,在使用上受到限制;且动物脏器还存在病毒污染等诸多问题,对患者治疗会造成严重后果。此外,因生物药物制备量小,所以实验室和工业制备无太大差异。⑤能够进行结构改造。利用基因工程制药技术、蛋白质工程制药技术可以改造内源生理活性物质,进一步提高其生理活性。

根据药物化学本质和化学特性,生物药物主要包括多肽药物、蛋白质药物、抗体药物、疫苗及生物治疗制剂等,还包括血液制品和胎盘制品等传统的生物制品。

其中多肽药物是研究和应用较多地生物药物品种,根据来源不同可分为动物源性多肽药物、植物源性多肽药物、微生物源性多肽药物、基因重组多肽药物、化学合成多肽药物、半合成多肽药物以及动植物源性混合肽药物。蛋白质药物包括各种激素、酶类药物,如消化酶药物、消炎酶药物、心脑血管疾病治疗酶药物、抗肿瘤酶药物以及氧化还原酶药物等。抗体药物是20世纪80年代出现的生物药物,按照用途分为诊断性抗体药物和治疗性抗体药物,是研究和发展较快的一类生物药物,它利用抗体药物的特异性,开创了可特异性结合、选择性杀伤靶细胞、在体内靶向性分布和更具有疗效的药物研究方向。疫苗按用途可分为预防用疫苗和治疗性疫苗。生物治疗制剂包括细胞治疗制剂、基因药物、核酸药物、细胞因子药物,其中干细胞治疗最令人关注。血液制品包括血液成分制品、血浆蛋白制品、抗毒素药物和抗血清药物,其中较常见的药物如人免疫球蛋白、抗蛇毒血清等。胎盘制品包括人胎盘血丙种球蛋白等。

生物药物具有:①治疗功能。生物药物可以通过调节机体代谢反应、神经内分泌功能、免疫功能、细胞增殖和分化等诸多生物过程,对肿瘤、免疫性疾病、糖尿病及心脑血管疾病等多种疾病有显著疗效,如胰岛素可用于治疗糖尿病、链激酶可用于治疗血栓栓塞病的溶栓等。②预防功能。许多疾病尤其是传染性疾病,如麻疹、百日咳等,预防比治疗更重要。最常见的预防生物药物为疫苗。③诊断功能。大部分临床诊断试剂都来自生物药物,生物药物诊断有速度快、灵敏度高和

特异性强特点。如抗甲胎蛋白单抗、抗骨钙素单抗等。

(陈志南)

shēngwù yàowù shuǐróngxìng

生物药物水溶性 (water-solubility of biological drugs) 生物药物在极性溶剂中的溶解性质。狭义上,是指生物药物在水中的溶解性质。具有水溶性的物质分子中通常含有极性基团如 $-OH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、 $-COOH$ 等,以及较短的碳链。生物药物的水溶性和生物药物剂型密切相关,尤其是与固体制剂的溶出度关系密切,药物水溶性好,制剂在体内崩解后颗粒周围液体能容纳的药物浓度越大,溶出速度就越快。因此提高固体制剂中药物水溶解度对于提高药物的溶出度及其生物利用度有非常重要的意义。

影响生物药物水溶性的因素主要有:①极性。若药物为极性药物,则具有亲水性,易溶于水;若药物为非极性药物,则具有疏水性,不易溶于水。②温度。一般情况下,药物水溶性随温度升高而增加。③晶型。药物可分为结晶型和无定型两种存在形式。结晶型药物因晶体中有晶格能的存在,溶解时需要给予一定的能量才能使晶格能破坏进而发生溶解,而无定型药物溶解时则不需要消耗那么多的能量,因而两者溶解度差别很大。当一种药物有多种结晶形式时,被称为多晶型药物。多晶型药物因晶格排列不同,晶格能也不同,致使在相同条件下其水溶性也有很大差别。不容易被水解的生物药物,一般在水中溶解度小;容易被水解的生物药物,在水中的溶解度大。此外,生物药物粒子的大小、所用溶剂不同等因素,也是影响生物药物水溶性的重要因素。

生物药物的水溶性关系到其溶解和进一步的体内生物利用度,因此提高生物药物水溶性是提高其生物利用度的一个重要的手段。在制备生物药物口服固体制剂的过程中,增加生物药物溶解度的方法有:制备成包合物,使药物分子被全部或部分包入另一种物质的分子腔中而形成络合物,可增大其溶解度;改变药物的晶型;将其制备成固体分散物等方法。在制备生物药物液体制剂中,若需将难溶性药物制备成液体制剂,为使溶液中药物能够达到治疗时所需要的浓度,并避免在贮藏过程中析出沉淀,保证用药的安全性和有效性,需要加入助溶剂、增溶剂、潜溶剂等辅料,或制备成包合物、脂质体、微乳、纳米粒等。

(蒋建利 张雪芹)

shēngwù yàowù jīngxìng

生物药物晶型 (crystal form of biological drugs) 生物药物分子在结晶时由于受各种因素影响,分子内或分子间键合方式发生改变,致使分子或原子晶格空间排列不同而形成的不同晶体结构。对于特定的生物药物晶型,所形成的晶体中原子或分子的排列具有三维空间的一致性。同一生物药物具有两种或两种以上的空间排列和晶胞参数,形成多种晶型的现象称为同质多晶 (polymorphism)。虽然在一定的温度和压力下,只有一种晶型在热力学上是稳定的,但由于从亚稳态晶型转变为稳态的晶型过程通常非常缓慢,因此许多结晶的生物药物都存在同质多晶现象。

1913年英国物理学专家布格父子开创了X射线晶体学。1954年英国晶体学专家佩鲁兹等提出了在蛋白质晶体中引入重原子的

同晶置换法,使测定生物大分子的晶体结构成为可能。1960年英国晶体学专家肯德鲁等首次解析出由153个氨基酸组成、相对分子质量为1750000的蛋白质分子——肌红蛋白的三维结构。中国继1965年首次人工合成牛胰岛素之后,于1971年测定了猪胰岛素的三维晶体结构。

生物药物固体多晶型包括对象多晶型、构型多晶型、色多晶型和假多晶型四种。其中,小分子药物的多晶型的分类描述方法有多种,如I、II、III分类(如利福平),A、B、C分类(如西咪替丁),以及 α 、 β 、 γ 分类(如吡哆美辛)。生物药物因大多结构复杂,还没有统一的分类和描述方法。

在生物药物的研发中,通常会用质谱、核磁共振、红外与紫外四种光谱学方法来测定药物的化学结构与纯度质量;而X射线衍射测定方法是确定生物药物晶型的主要方法。随着计算机技术的发展,计算机辅助预测药物晶型的研究也有了较大进展。在固体药物结构已知的前提下,可运用商业程序 Polymorph Predictor,通过计算点阵能量最小化方法寻找能量上可能的晶体结构和分子排列规律,并将它们按能量大小排列,从而计算出不同结晶条件下的最可能生成的晶型。除上述常见的两种方法外,还可根据不同晶型药物因其分子或原子在晶格空间排列不同所导致的在密度、折射率、吉布斯自由能等方面的差异,通过测定药物的密度、折光率或采用磁性异向仪和膨胀计等仪器进行不同晶型的确定;对于存在色多晶型的药物,还可通过观察药物的颜色,推测药物可能的晶型。

生物药物晶型有可能影响生物药物的药效发挥,如通过影响药物的吸收而改变其生物利用度。了解并控制生物药物的晶型后,将有助于保证药物制剂的物理化学稳定性,提高药物的生物利用度,减少毒性,增进治疗效果,保证每批生产的药物间的生物等效性,防止在制备或储藏中产生晶型转变而影响质量。同时,可以通过一定的转晶手段,寻求药物新的晶型和新的疗效。

(杨向民)

shēngwù yàowù róngdiǎn

生物药物熔点 (melting point of biological drugs) 一定压力下,结晶的生物药物由固态转变为液态过程中固液共存状态的温度。

由于生物药物种类很多,其在熔点方面各有不同的特点,但有两个因素对其熔点影响很大:①压强。对同一种晶体,压强越大,熔点越高;反之亦然。②药物中的杂质。杂质会让药物熔点下降。当含有杂质时,假定两者不形成固溶体,根据拉乌耳定律可知,在一定的压力和温度条件下,药物与杂质形成的混合物,其固液两相达到熔点时的固液相平衡共存点要较纯物质低。这一特性可以作为检测某些生物药物纯度的方法。

一般用毛细管法和微量熔点法测定晶型药物的熔点。在一定压力下,固-液两相之间的变化都非常敏锐,初熔至全熔的温度不超过 $0.5\sim 1^{\circ}\text{C}$,这个温度范围称为熔点范围或称熔距、熔程。因此熔点测定是辨认晶体药物的基本手段,可以区分出不同晶型药物,了解同药物晶型的自由能等,也是纯度测定的重要方法之一。

(杨向民)

shēngwù yàowù zhīróngxìng

生物药物脂溶性 (liposolubility of biological drugs) 生物药物在非极性溶剂中分散溶解的性能。脂溶性物质的分子中通常带有较长的碳链,如:烷烃、脂肪酸、油脂、脂肪等。一般说来,生物药物分子中会含有较长的碳链结构,如含有6个以上碳原子的醇、醛、酮、酸等的生物药物分子则常不易溶于水而具有脂溶性的特点;此外,药物分子自身带电情况也会影响生物药物的脂溶性。

生物药物脂溶性主要影响药物分子在非极性溶剂中的分散能力。药物在非极性溶剂中的溶解度是药物分子与溶剂分子间相互作用的结果。若药物分子间的作用力大于药物分子与溶剂分子间作用力,则药物溶解度小;反之,则溶解度大。由于细胞膜是脂质双分子层结构,即两外层疏水亲脂,中间亲水,所以药物的穿膜能力与其极性有关。脂溶性药物可以穿过细胞膜,而非脂溶性药物的运输则需要受体等介导的主动运输过程参与。在极性溶剂中,如果药物分子与溶剂分子之间可以形成氢键,则溶解度增大。如果药物分子形成分子内氢键,则在极性溶剂中的溶解度减小,而在非极性溶剂中的溶解度增大。

生物药物的脂溶性关系到其溶解和进一步的体内生物利用度。分子极性越强则其亲水性强,分子极性弱则亲脂性强。药物的极性强弱主要影响到药物在体内的透膜吸收,因此,很多生物药物保健品,包括各类生物药物都会强调其水溶性,往往通过包结、脂质体等现代制剂技术将脂溶性生物药物改造成水溶性,便于提高其生物利用度,更好地发挥药物药效。

(杨向民)

shēngwù yàowù jiěfú dù

生物药物解离度 (dissociation degree of biological drugs) 生物药物分子在溶剂中达到解离平衡时,已解离的分子个数与原有分子个数之比。解离度用希腊字母 α 来表示,单位为1,习惯上也可以百分率来表示。药物分子的解离度可用药物解离常数(K_a)的负对数值即 pK_a 来表示, K_a 指药物分子解离50%时所在溶液的pH值。当药物分子是一种电解质时,电解质溶液的浓度越小,弱电解质的解离度 α 越大,无限稀释时,弱电解质也可看作是完全解离的。生物药物解离度特点与一般药物的解离度特点基本相同。

多数药物是弱酸性或弱碱性的,在体内以解离和非解离两种形式存在。每个药物都有固定的 pK_a 值。当 pK_a 与pH的差值以数学值增减时,药物的离子型与非离子型浓度比值以指数值相应变化。从一般规律来看,弱酸性药物 pK_a 值越低,酸性越强,弱碱性药物的 pK_a 值越高,则碱性越强。 pK_a 值不是药物自身的pH值。酸性药物在pH低的溶液中解离度小,容易转运吸收,在pH高的溶液中解离度大,不容易被吸收;碱性药物相反。通常药物分子以非解离的形式被吸收,通过生物膜进入细胞后,在膜内的水介质中解离成解离形式而起作用。

根据药物分子 pK_a 值可以得知药物在胃和肠道中的吸收情况,同时还可以计算出药物在胃液和肠液中离子型和分子型的比率。弱酸性药物,如多肽类药物中的尿多酸肽,在酸性的胃液中几乎不解离,呈分子型存在,易在胃中吸收。弱碱性药物,在胃中几乎全部呈解离形式存在,很难被吸收;而在肠道中,由于pH值比

较高, 药物容易被吸收。碱性极弱的咖啡因和茶碱在酸性介质中解离也很少, 在胃中易被吸收。强碱性药物, 如胍乙啶, 在整个胃肠道中多是离子化的, 以及完全离子化的季铵盐类和磺酸类药物, 它们在消化道吸收很差。

用于测定 pKa 值的方法有滴定法、光谱法和毛细管电泳法, 其中滴定法和光谱法是最常用的方法。也有用压力辅助毛细管电泳法实现药物 pKa 值的检测。

生物药物的解离程度直接影响其亲脂性、溶解性等, 进一步则影响药物的吸收、分布、代谢、排泄性质, 因此是药物早期研究中对其成药性评价很重要的性质之一。此外, 获知生物药物的 pKa 值可为生物药物筛选、纯化、色谱分离条件的开发、结构优化、制剂工艺优化提供重要参考。

(杨向民)

shēngwù yàowù xiāngduì fēnzǐ zhiliàng

生物药物相对分子质量 (relative molecular weight of biological drugs) 构成生物药物分子式中所有原子的相对原子质量的总和。曾称生物药物分子量。相对分子质量的符号为 Mr。生物药物分子质量为组成药物分子化学计量式的各原子的相对原子质量之和, 即根据各元素原子的个数和各元素的相对原子质量计算得到。由于有些生物药物分子结构复杂, 其相对分子质量成为一个主要的研究指征参数。生物药物的相对分子质量一般比化学药物大。

生物药物相对分子质量测定方法主要有蛋白质凝胶或核酸电泳、质谱等方法。对于结构明确的生物药物分子, 一般采用质谱的方法, 可以快速、微量、精确测定生物药物相对分子质量。主

要包括电子轰击质谱、场解吸附质谱、快原子轰击质谱、基质辅助激光解吸附飞行时间质谱、电子喷雾质谱等等, 其中能测定大分子生物药物相对分子质量的是电子喷雾质谱和基质辅助激光解吸附飞行时间质谱方法, 可以测量的相对分子质量达 100 000。对于某些结构复杂的生物药物大分子, 往往都是通过蛋白质凝胶或核酸电泳、分析超速离心法或谱分析等方法测得其近似相对分子质量, 这些方法均是已知相对分子质量的参照物的迁移率与相对分子质量的对数作图, 可得到一条标准曲线。将未知相对分子质量的生物药物, 如蛋白质样品, 在相同的条件下进行分析, 根据它的迁移率可在标准曲线上查得它的相对分子质量, 也可以用相关分析软件得出回归方程并计算出结果, 因而更是一个相对概念的量值。

通过相对分子质量的测量, 可知生物药物分子的准确和完整性。如通过使用蛋白质凝胶电泳方法对蛋白质的相对分子质量的测定, 可以获得其表观相对分子质量的大小, 从而获知该蛋白质是否发生了降解或聚集等, 从而也为蛋白质药物的鉴定和稳定性研究提供依据。同时, 相对分子质量的测定可以为生物新药的研发中, 发现新结构的蛋白质药物或 DNA 药物提供重要的依据。

(杨向民)

shēngwù yàowù diànhè

生物药物电荷 (charge of biological drugs) 构成生物药物的分子所带电荷的量。根据生物药物电荷的情况, 一方面可实现对生物药物质量的表征和监测, 另一方面可实现生物药物生产过程中含药物分子不同组分的分离和

纯化。

核酸、蛋白质等生物大分子药物, 都是多聚的电解质分子, 既可带正电荷, 又可带负电荷, 其带电特性常常是其生物功能的决定因素, 带电荷量影响到蛋白质与核酸的相互作用、分子构象以及蛋白质与其他脂质分子的相互关系等。

活性药物分子电荷变异的分析对药物特性的维持具有重要的作用, 这是因为蛋白质自身的变化和修饰作用会导致电荷变异体的形成, 在某些情况下, 会影响蛋白质等生物药物的原子间键合、生物活性、使用安全性和保质期。蛋白质自身变化和修饰作用包括脱酰胺化、N 端焦谷氨酸基团修饰、异构化、唾液酸化聚糖和 C 端赖氨酸裁剪等。多种化学修饰会引起重组蛋白质药物等电点的改变, 其中脱酰胺化、唾液酸化聚糖、重链 C 段赖氨酸清除均会造成重组蛋白质药物带正电荷; 赖氨酸/甘氨酸酰胺化反应、甲硫氨酸氧化作用等会造成蛋白质药物带负电荷。在细胞工程制药技术的细胞培养环节, 提高培养基中 Cu^{2+} 浓度, 降低 Zn^{2+} 浓度, 可以增强重组蛋白 C 端脯氨酸的酰胺化, 最终导致重组蛋白质药物发生碱性电荷变异。

蛋白质药物属于带电的生物分子, 带电情况使得其对溶液中 pH 值非常敏感。酶蛋白和跨膜蛋白的活性依赖于其带电情况, 因为两种蛋白质的活性位点必须有合适的表面电荷才能与具体作用底物或受体结合。受体和酶也是以蛋白质为主要成分的生物大分子, 从组成上来讲也是由各种氨基酸经肽键结合而成, 在整个蛋白质的链上存在各种极性基团, 造成电子云密度的分布不均匀,

有些区域的电子云密度较高,形成负电荷或部分负电荷;有些区域电子云密度比较低,即带有正电荷或部分正电荷。如果药物分子中的电子云密度分布正好和受体或酶的特定位置相适应时,由于电荷产生的静电引力有利于药物分子与受体或酶结合,可以形成比较稳定的药物-受体或药物-酶的复合物。

许多结构复杂的生物药物分子,如当抗体药物是复杂的四聚体糖蛋白时,具有结构复杂、质量不均一的特点,即“异质性”,异质性可能来自于抗体药物复杂的生物合成途径(如细胞系及培养工艺影响糖基化),也可能来自于纯化或制剂工艺过程中。这种异质性表现为在等电聚焦电泳图上出现弥散或多个条带或离子交换色谱图主峰前后出现小峰。异质性是由于抗体分子所带电荷差异造成的,也被称为抗体的电荷变异。美国基因泰克公司对抗体药物电荷变异现象的研究显示:当分子的电荷变异超过一个pH单位时,会影响抗体药物的组织分布及药动学;增加正电荷会提高抗体药物的组织停滞,降低其血浆清除率;降低正电荷,则会减少抗体药物的组织停滞,提高药物的全身清除率,从而影响药物疗效。在建立生物药物制备方法时,通常会对所有可能涉及生物药物电荷的实验参数进行全面评估,例如缓冲液pH值、盐梯度、流速和柱温等,以决定使用何种方法对含药物分子的不同组分进行分离和纯化。离子交换色谱法使用方便、适用性广且分离度高,因此是生物药物开发中最为常用的纯化方法。

生物制药过程中可通过离子交换色谱、等电聚焦凝胶电泳和

毛细管电泳等方法来对生物药物的电荷变异体进行表征,即实现对生物药物电荷的测量。

(杨向民)

shēngwù yàowù wěndìngxìng

生物药物稳定性 (stability of biological drugs) 生物药物在规格标准范围内,保证其特性、含量(效价)浓度、质量和纯度的能力。研究生物药物稳定性,即研究生物药物在一定温度、湿度、光线等条件的变化下随时间变化的规律,是为其生产、制备、包装、贮存、运输条件和有效期(或复验期)的确定提供科学依据,以保障临床用药安全有效。

性质分类 生物药物分子依赖于严格复杂的空间构象和特定活性中心以维持特定的生理功能,其稳定性本质上可分为化学稳定性和物理稳定性。其中化学稳定性涉及生物药物分子的结构稳定性,即是否有新的共价键的生成和断裂以及新物质的生成,该过程涉及水解(如天冬氨酸、色氨酸的水解)、脱氨(如天冬酰胺的脱氨)、氧化(如甲硫氨酸、半胱氨酸、色氨酸的氧化和光氧化),以及 β -消除反应、二酮哌嗪生成、焦谷氨酸形成、转肽作用、外消旋作用、二硫键交换等。物理稳定性是生物药物分子物理状态的改变,包括蛋白质的变性、聚集、沉淀和吸附等。

研究内容 稳定性研究可由影响因素试验、加速试验、长期试验等组成,以此确定生物药物的贮存条件、包装材料(或容器)和有效期。其中加速试验是为了确定药物有效期,而长期试验是在上市药品规定的贮存条件下进行,考察药品在运输、保存、使用过程中的稳定性,是确定药物有效期和贮存条件的最终依据。

根据不同试验研究的不同目的,结合生物物理化学性质、剂型特点和具体的处方及工艺条件,确定研究的生物药物样品的批次和规模、包装及放置条件、考察时间点、考察项目和分析方法等,通过考察光、湿、热、酸、碱、氧化等对生物药物稳定性和敏感性的影响,获知生物药物主要的降解途径及降解产物,并据此验证所用分析方法的可行性。稳定性研究获得的数据包括原始稳定性数据(primary stability data)和基础性稳定性数据(supportive stability data)。原始稳定性数据是指在适用于市场的贮存条件下,用所建议的密闭容器贮存药物所获得的与建议有效期有关的整体检测数据;而基础性稳定性数据则是与定制药物有效期和贮存条件有关的所有基础科学资料和原理阐述,包括不投入市场的研究性配方稳定性数据、原料药物的加速研究、已发表的稳定性数据、准备投入市场药品的加速研究、存储容器有关试验结果报告等。

影响因素 通过应用不同的添加剂等方法可改变生物药物的稳定性:①通过调整pH值、改变离子强度可达到控制生物药物的水解、脱氨的作用。②通过使用抗氧化剂、螯合剂、低pH值、无氧加工与包装过程控制生物药物的氧化。③通过低pH值、螯合剂和缓冲液的应用达到控制 β -消除反应、转肽作用和外消旋作用。④通过防冻剂/防水剂的添加达到控制冷冻干燥过程中的蛋白质变性。⑤通过控制pH值、添加表面活性剂、减低机械压力等可降低蛋白质的凝集、沉淀。⑥通过添加表面活性剂、白蛋白、预饱和和处理等可减少生物活性蛋白质的表面吸附和沉淀等。2006年,

美国 Aegis Therapeutics 公司开发出一种应用于多肽及蛋白质类药物的新技术 ProTek。该技术是在制剂中加入一种无毒赋形剂,这种赋形剂既有助于保持蛋白质的物理稳定性和生理活性,又可降低蛋白质免疫原性,保持生物药物活性成分均一性和稳定性。

功能意义 生物药物稳定性研究是新药开发和确认上市药品安全的重要基础。生物药物稳定性研究数据具有阶段性特点,贯穿生物药物研究与开发的全过程,始于药品的临床前研究,在药品临床研究期间和上市后还应继续进行稳定性研究,是进行生物制品检定、新药临床试验申请、新药申请、生物药物许可证申请的重要依据,中国和美国等国家药品监督管理部门均有提交药品和生物制品稳定性文件指南发布。

(杨向民)

dànbáizhì tiānrán gòuxiàng

蛋白质天然构象 (protein natural conformation) 由氨基酸分子首尾相连形成的共价多肽链通过螺旋、折叠等方式以及肽链间的非共价键作用形成的蛋白质特定空间三维结构。每一种蛋白质都至少有一种天然构象在生理条件下是稳定的,并具有生物活性。所有蛋白质都是由不同的 L 型 α -氨基酸组成。氨基酸由肽键连接形成的多聚体,即多肽链。蛋白质要发挥生物学功能,需要多肽链正确折叠为具有特定空间结构的生物大分子,这种折叠的动力主要是通过大量的非共价键相互作用,如氢键、离子键、范德华力和疏水作用来实现。此外,一些蛋白质(特别是分泌性蛋白质)的肽链在折叠中,二硫键也起到关键作用。

结构层次 为了表示蛋白质

结构的不同结构层次,将蛋白质的分子结构划分为 4 个层次。有些蛋白质分子只有一、二、三级结构,并无四级结构,如肌红蛋白、细胞色素 C、核糖核酸酶和溶菌酶等。有些蛋白质则一、二、三、四级结构同时存在,如血红蛋白、过氧化氢酶、谷氨酸脱氢酶等。蛋白质分子的结构除了以上 4 个层次外,在二级结构和三级结构之间,还可分为超二级结构和结构域。

一级结构 (primary structure)

蛋白质中以共价键连接的氨基酸分子的排列顺序,同时也包括链内或链间二硫键的数目和位置。氨基酸排列顺序是决定蛋白质空间结构的基础,而蛋白质的空间结构决定着其生物学功能。1953 年,英国生物化学专家弗雷德·桑格尔发现了胰岛素的一级结构,是世界上第一个被确定一级结构的蛋白质。蛋白质一级结构可以通过测定其对应编码基因的碱基序列来确定。此外,也可以通过埃德曼降解法或连续质谱法对蛋白质样品进行直接测序来获得。

二级结构 (secondary structure) 多肽链本身折叠和盘绕方式,以及蛋白质分子中的肽链沿单一方向卷曲而形成的有周期性重复的主体结构或构象。这种周期性的结构以肽链内或各肽链间的氢键来维持。常见的二级结构有 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角等。

三级结构 (tertiary structure)

在蛋白质二级结构的基础上,肽链进一步卷曲折叠,构成的不规则的具有特定构象的蛋白质分子结构。维持三级结构的作用力主要是一些弱的相互作用,如氢键、盐键、疏水键和范德华力等。盐键又称离子键,是蛋白质分子

中带正、负电荷的侧链基团互相接近,通过静电吸引而形成的,如羧基与氨基、胍基、咪唑基等基团之间的作用力。疏水键是多肽链上的某些氨基酸的疏水基团或疏水侧链(非极性侧链)由于避开水而造成的相互接近和黏附聚集的非共价键。范德华力是分子之间的吸引力。此外二硫键也对三级结构的构象起到稳定作用。

四级结构 (quaternary structure) 由两条或两条以上的具有三级结构的多肽链聚合而成的具有特定构象的蛋白质分子结构。这些肽链构成了蛋白质的功能单位,称为亚基。亚基单独存在时没有生物活性,只有聚合成四级结构才具有完整的生物活性。如磷酸化酶是由两个亚基构成,谷氨酸脱氢酶是由 6 个相同的亚基构成,血红蛋白是由 4 个不同的亚基(两个 α 链,两个 β 链)构成,每个肽链都是一个具有三级结构的球蛋白。亚基聚合成四级结构,是通过分子表面的一些次级键,主要是盐键和氢键结合而联系在一起。

超二级结构 (super-secondary structure) 超二级结构是在蛋白质分子中特别是在球状蛋白质分子中,由若干相邻的二级结构元件(主要 α -螺旋和 β -折叠片)组合在一起,彼此相互作用,形成种类不多的、有规则的二级结构组合或二级结构串,在蛋白质中充当三级结构的构件。超二级结构的概念由美国物理学专家及微生物学专家迈克尔(Michael G. Rossmann)于 1973 年首次提出,已知的超二级结构有三种基本组合形式: $\alpha\alpha$ 、 $\beta\alpha\beta$ 和 $\beta\beta$ 。

结构域 (structure domain)

多肽链在二级结构或超二级结构的基础上形成三级结构的局部

折叠区,它是相对独立的紧密球状实体,一般含有40~400个氨基酸残基,最常见的结构域含有序列上连续的100~200个氨基酸残基。对于那些较小的球状蛋白质分子或亚基来说,结构域和三级结构是一个含义,也就是说这些蛋白质或亚基是单结构域的,如红氧还蛋白、核糖核酸酶和肌红蛋白等。对于较大的球状蛋白或亚基,其三级结构由两个或多个结构域组成,即它们是多结构域的,例如免疫球蛋白的每条轻链含有2个结构域,组织纤溶酶原激活物含6个结构域。

影响因素 蛋白质变性实质上是其天然构象发生了改变,引起蛋白质变性的原因分为物理和化学因素两类。物理因素有加热、加压、脱水、搅拌、振荡、紫外线照射、超声波等。化学因素有强酸、强碱、尿素、重金属盐、十二烷基磺酸钠等。重金属盐使蛋白质变性是因为重金属阳离子可以和蛋白质结构中游离的羧基形成不溶性的盐。强酸、强碱使蛋白质变性是因为强酸、强碱可以使蛋白质中的氢键断裂,也可以和游离的氨基或羧基形成盐。尿素、乙醇、丙酮等可以提供自己的羟基或羰基上的氢或氧与蛋白质形成氢键,从而破坏了蛋白质中原有的氢键,使蛋白质变性。加热、紫外线照射、剧烈振荡等物理方法使蛋白质变性,主要是破坏了蛋白质分子中的氢键。

结构测定 1939年英国生物学家伯纳尔(John Desmond Bernal)首先采用晶体衍射的方法测定了蛋白质的晶体结构。1959年英国物理学专家肯德鲁(John Cowdery Kendrew)和佩鲁兹(Max Ferdinand Perutz)利用X射线衍射技术解析了肌红蛋白及血

红蛋白的三维结构,并论证了这些蛋白质在输送分子氧过程中的特殊作用。蛋白质晶体X射线衍射测定方法是蛋白质空间结构测定的主要方法,但这种方法需要得到适当的蛋白质晶体。多维核磁共振测定方法因使用的是蛋白质的溶液样品,因而可用于解析蛋白质在溶液中的空间结构和运动状态。另外,质谱技术也可用来进行蛋白质结构分析,基本原理是将蛋白质分子转化为离子,然后利用质谱分析仪的电场、磁场将具有特定质量与电荷比值(M/Z)的蛋白质离子分离开来,经过离子检测器收集分离的离子,确定离子的M/Z值,从而分析鉴定未知的蛋白质分子量和一些特定结构。通常结合其他技术,如高效液相色谱分离技术、数据库序列比对和蛋白质功能预测软件等,能够准确、快速地鉴定蛋白质分子的大小和结构序列。

结构预测 由于人类生命的功能主要由蛋白质完成,而蛋白质功能则由其相应的天然构象所决定。因此蛋白质天然结构预测研究在生物学研究中有重要意义。预测方法主要有两大类:一类方法是理论分析方法,通过理论计算,如分子力学、分子动力学计算,进行结构预测。这是可以根据物理、化学的原理,通过计算来进行的结构预测,但这种方法在实际应用中并不合适。另一类蛋白质结构预测的方法是统计方法,该类方法是通过对已知结构的蛋白质进行统计分析,建立序列结构的映射模型,进而根据映射模型对未知结构的蛋白质直接从氨基酸序列预测结构。这是进行蛋白质结构预测较为成功的一类方法。主要包括同源建模方法、

经验性方法、结构规律提取方法、同源模型化方法等。

(边惠洁 王喜龙)

dànbáozhì tiānrán gòuxiàng yùcè

蛋白质天然构象预测 (protein natural conformation prediction)

对蛋白质特定空间三维结构进行预测的研究过程。蛋白质的功能主要由其相应的天然构象所决定,而对蛋白质的天然构象进行预测是研究蛋白质天然构象的基础。此外,继人类基因组计划完成后,根据已知的氨基酸序列来预测相应的蛋白质天然构象也已成为后基因组计划中最重要的组成部分。蛋白质天然构象预测在药物设计方面有重要应用,对基于受体结构的药物设计,首先要得到靶点蛋白质的天然构象才能用计算机辅助方法筛选相应的药物先导化合物,所以蛋白质天然构象的预测在整个分子生物学研究和药学研究中有重大意义。

预测方法 蛋白质的天然构象预测主要包括蛋白质二级结构预测和蛋白质三级结构预测。蛋白质二级结构预测方法主要包括经验性方法、GOR方法、立体化学方法、同源分析法、人工神经网络方法及综合方法等。蛋白质三级结构预测方法主要分为三类:同源建模法、折叠识别法和从头预测法。同源建模法也称比较建模法,是应用较成功的一种方法。但该方法受到蛋白质同源性的限制,而使其应用范围很小。该技术可针对高同源性蛋白质进行预测。折叠识别法适用于低同源性蛋白质的结构预测。其精度要低于同源模型法。从头预测法是直接从蛋白质序列预测其空间结构,通过空间构象搜索找到其天然构象,无需以已知的蛋白质结构作为模板。从理论上讲,该方法是

最理想的蛋白质结构预测方法。从头预测法的精度要逊于前两种，但由于其不受同源性的限制，因此该方法引起许多预测工作者的重视。

预测数据库 蛋白质天然构象数据库通过整合数据库信息，确定蛋白质构象模型，从而具有预测蛋白质的结构域及其蛋白质构象的功能。主要包括蛋白质序列数据库和结构数据库。常用的蛋白质序列数据库主要有 Swiss-Prot、TrEMBL、PIR (protein information resource) 和 UniProt 等。常用的结构数据库主要有 PDB (protein data bank) 数据库、HSSP 数据库、SCOP 数据库 CATH 数据库、DSSP 数据库和 NRL-3D 数据库等。

预测评估 国际上知名的蛋白质天然构象预测专家组织的蛋白质结构预测技术评比 (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction, CASP) 会议是一种对世界性的蛋白质结构预测技术的评比活动，代表着蛋白质结构预测领域的世界先进水平。CASP 测评工作主要包括：①要从实验研究协会收集并确定预测目标蛋白，并请 X 射线晶体检测学专家和核磁共振光谱学专家在限定时间内测出结构。②公布目标蛋白质序列，要求结构模型研究协会在限定时间内提交预测结果和组织独立的讨论和测评。③通过 CASP 会议，组织者可以深入客观地了解当下的蛋白质结构预测技术的水平，对预测模型进行评估，确定最先进的技术，掌握当前的方法能够做什么，了解存在的困难以及明确将来的发展方向。CASP 会议促进了蛋白质天然构象预测技术的发展，使得预测结果越来越接近实际的蛋白

质天然构象。

(边惠洁 李 灿)

dànbáizhì èrjí jiégòu yùcè

蛋白质二级结构预测 (protein secondary structure prediction)

对由氨基酸残基组成的肽链主链原子间相互作用形成的螺旋、折叠等蛋白质空间结构进行预测的研究过程。蛋白质的二级结构基本状态有 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角等。蛋白质二级结构的规律性比较强，约 85% 的蛋白质二级结构具有上述 3 种基本二级结构特点。蛋白质二级结构预测是从一级结构预测其三级空间结构的关键步骤，例如一个确定的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构模式，就是铁氧化还原蛋白的记号。二级结构预测还可以用于推测蛋白质的功能，预测蛋白质的结合位点等。通过分析蛋白质的二级结构，确认功能单位或者结构域，可以为蛋白质的遗传操作提供目标，为设计新的蛋白质或改造已有蛋白质提供可靠的依据，同时为新的蛋白质类生物药物分子设计提供合理的分子靶点。

发展历史 蛋白质二级结构预测始于 20 世纪 60 年代中期，其发展过程可分为三个阶段。第一阶段是基于单个氨基酸残基统计分析，从有限的中提取各种氨基酸残基形成特定二级结构的倾向，这种方法预测蛋白质二级结构的准确率较低，大致在 50%~59%。第二阶段是基于氨基酸片段，在预测蛋白质中心氨基酸残基形成的二级结构时，以氨基酸残基在特定环境中形成特定二级结构的倾向作为预测依据，这种方法预测蛋白质二级结构的准确率有所提高，尤其是使用了神经网络方法以后预测准确率首次提高到 70% 以上。第三阶段是

运用蛋白质序列相关信息进行预测，使二级结构预测的准确度达到 72%~80%。

方法 蛋白质二级结构预测方法主要包括经验性方法、GOR 方法、立体化学方法、同源分析法、人工神经网络方法及综合方法等。

经验性方法 此方法是基于单个氨基酸残基的统计进行的。通过对已知二级结构的蛋白质进行多肽链上单个氨基酸残基的统计分析，可以发现各种氨基酸形成不同二级结构的倾向有不同，从而形成了关于二级结构预测的经验性方法规则。

GOR 方法 1978 年由英国学者奥斯古索普 (Osguthorpe DJ)、罗布森 (Robson B) 和法国学者加尼耶 (Garnier J) 提出，该方法不仅考虑了被预测位置氨基酸残基种类对形成二级结构的影响，而且考虑了相邻氨基酸残基种类对该位置构象的影响。

立体化学方法 氨基酸的理化性质对形成蛋白质的二级结构影响较大，因此在进行蛋白质结构预测时需要考虑氨基酸残基的物理化学性质，如疏水性、极性和侧链基团的大小等。立体化学方法是根据氨基酸残基各方面的理化性质及残基之间的组合来预测可能形成的蛋白质二级结构。

同源分析法 这类方法的理论依据是如果组成两个蛋白质的氨基酸序列比较相似，则其二级结构也可能比较相似。因此将待预测的蛋白质片段与数据库中已知二级结构的蛋白质片段进行相似性比较，利用数学方法计算出相似性得分，根据相似性得分以及数据库中的构象态，即 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角等，构建出待预测蛋白质片段的二级结构。该方

法对数据库中同源序列的存在非常敏感,若数据库中氨基酸序列相似性大于30%,则蛋白质二级结构预测准确率可大幅度提高。

人工神经网络方法 由三层(底层为输入层,中间为隐含层,顶层是输出层)相同的神经元构成的层状网络,使用反馈式学习规则,信号在相邻各层间逐层传递,不相邻的各层间无联系,根据输入的一级结构和二级结构的关系的信息,最终找到一种好的输入与输出的映象,并对未知二级结构的蛋白进行预测。截至2015年,人工神经网络方法被认为是应用最广、前景最乐观的方法之一,并不断进行改良和创新,将量子计算和多种群算法融入到传统的神经网络中,同时考虑到氨基酸残基的众多理化性质和构象信息,提出了一种新的基于理化性质和构象信息编码的算法。另外,基因表达式编程是一种用线性编码解决复杂问题的进化算法,用基因表达式编程优化设计的人工神经网络法,解决了以往预测方法中结构和参数确定的随机性和盲目性。再者,通过神经网络的集成,提高了蛋白质二级结构的预测准确率。

综合方法 综合方法不仅包括了各种预测方法的综合运用,而且也包括结构实验结果、序列对比结果、蛋白质结构分类预测结果等信息的综合。常用的综合方法是同时使用多个软件进行预测,通过分析各个软件的特点以及各个软件预测的结果,最终形成二级结构一致性的预测结果。双重预测是另一类综合方法,先预测蛋白质的二级结构类型,再根据不同二级结构类型的蛋白质的二级结构形成规律以预测新蛋白质的二级结构。

发展现状 蛋白质二级结构预测是蛋白质结构组学研究的重要问题之一,也是生物信息学研究中的重要分支领域,应用蛋白质序列相关信息,准确率可达75%左右。然而蛋白质二级结构预测研究仍然存在许多不足点,如各个蛋白质数据库搜集的蛋白质序列信息不够完整;各个数据库中对蛋白质的注释信息尚不统一;对一些蛋白质特征信息和蛋白质二级结构之间的关系认识还不是十分清楚。

(边惠洁 陆蒙)

dànbáizhì sānjí jiégòu yùcè

蛋白质三级结构预测 (protein tertiary structure prediction) 对由蛋白质二级结构元件构建的总三维结构进行预测的研究过程。蛋白质在生物体内具有重要的作用,而氨基酸形成肽链后只有折叠成特定的空间结构才能具有生物学功能。因此蛋白质的三级结构预测有助于了解蛋白质间相互作用,是研究蛋白质结构及其功能的重要部分。此外,蛋白质三级结构预测有助于了解蛋白质作为药物的靶点与药物结合的情况以及蛋白质药物间的相互作用,对医学、药学和生物学均具有重要意义。

蛋白质的三级结构预测方法主要有同源建模法 (comparative homology modeling)、折叠识别法 (threading fold recognition) 和从头预测法 (ab initio/de novo methods) 等方法。同源建模法预测的质量较高,该方法需要有至少一个与预测蛋白质氨基酸序列有较高的相似性的已知三维结构的同源蛋白质。而折叠识别法次之,通过寻找与未知蛋白质最合适的模板,进行蛋白质氨基酸序列与结构的比对,最终建立起要预测

的蛋白质结构模型。从头预测法因不需要知道与预测蛋白质序列相似的同源蛋白质,仅根据预测蛋白质的氨基酸序列来预测,因而偏差较大。

同源建模法 将未知结构的蛋白质氨基酸序列与数据库中已知结构的蛋白质氨基酸序列进行比对,从而预测未知蛋白质三级结构的方法。该方法的原理是基于同源的保守蛋白质氨基酸序列可以进化成具有相似的三维结构,从而利用进化相关的结构模板信息获得目的蛋白质的三维模型。同源建模法包括五个步骤:①以目的蛋白质的氨基酸序列作为查询序列来搜索已知蛋白质结构数据库,找出氨基酸序列相似性最高的已知结构蛋白质作为序列的模板。②将目的蛋白质的氨基酸序列和模板蛋白质氨基酸序列进行比对。③以模板氨基酸序列形成的三维结构为基础,构建目的蛋白质的三维结构。④对预测的三维结构模型进行精细优化。⑤对构建的蛋白质三维结构模型进行可信度评估,并进行能量优化和分子动力学优化。

折叠识别法 用于预测目的蛋白质氨基酸序列与模板氨基酸序列同源性低或找不到已知结构的蛋白质为模板的三级结构预测的方法。是将已知蛋白质结构模式作为与目的蛋白质结构匹配的模板,然后经过对现有数据库的观察,总结出可以区分正误结构的平均势函数作为判别标准,将目的蛋白质的氨基酸序列与数据库中可能的构象进行匹配,并用该势函数计算相应的能量来选择最佳的匹配方式,从而给出相似的蛋白折叠并进行评估。

从头预测法 适用于缺乏合理的远源同源性模板蛋白的蛋白

质三维结构预测,仅根据目标蛋白质的氨基酸序列本身来预测其三维结构。其基本理论是依据1973年美国学者克里斯·安芬森(Christian Anfinsen)提出的蛋白质天然结构具有最低自由能的热力学假设,利用能量函数来构建目的蛋白质的三维结构。该方法有两种策略:①根据已知的二级结构、结构类型等结果,结合结构间的相互作用力,将二级结构进行组装,构建三级结构。②不依赖二级结构直接进行三级结构的预测。

(边惠洁 雍遇乐)

dànbáizhì tiānrán gòuxiàng yùcè
shùjùkù

蛋白质天然构象预测数据库
(protein natural conformation prediction database) 通过蛋白质序列测定和结构解析获得蛋白质结构的原始数据,将其整理归类,并附加注释信息,形成的可用于预测未知蛋白质结构和功能的数据库。用于预测未知蛋白质的卷曲螺旋、跨膜螺旋和前导序列以及是否包含保守序列基序或结构域等。

预测蛋白质天然构象的数据库主要包括蛋白质序列数据库和结构数据库。常用的蛋白质序列数据库主要存储序列测定产生的蛋白质一级结构即氨基酸序列,有 Swiss-Prot、TrEMBL、PIR (protein information resource) 和 UniProt 等。常用的蛋白质结构数据库主要存储 X 射线衍射和核磁共振结构测定产生的蛋白质二级结构和三级结构,包括蛋白质螺旋、折叠、片层、不连续的结构或功能域等结构区域数据,有 PDB (protein data bank) 数据库、HSSP 数据库、SCOP 数据库、CATH 数据库、DSSP 数据库和 NRL-3D 数据

库等。

Swiss-Prot 数据库是经过注释的蛋白质序列数据库,由欧洲生物信息研究所维护。数据库中每个条目都包含蛋白质序列、引用文献信息、分类学信息、注释等。其中注释包括蛋白质功能位点、跨膜区域、结构域、二硫键位置、突变体和翻译后修饰等信息。TrEMBL 数据库是 Swiss-Prot 数据库增补部分,包括了没有被 Swiss-Prot 数据库所收录的氨基酸序列翻译部分。PIR 数据库整合了公共生物信息资源,用于基因组和蛋白质组的研究,提供了蛋白质的分类、结构和功能信息。为了使蛋白质预测和实验数据之间有较好的吻合,PIR 数据库还建立了一套允许研究者们递交、分类和提取文献信息的系统。UniProt 数据库整合了 Swiss-Prot、TrEMBL 和 PIR 三大数据库,是含有信息最丰富、收集资源最广的蛋白质数据库,包含了大量蛋白质研究的生物学功能信息。PDB 数据库是储存蛋白质结构信息最全面的数据库,包含了通过核磁共振、电子衍射和 X 射线单晶衍射等技术确定的核酸和蛋白质等的三维结构数据。每个蛋白质样本数据包括测定方法、分辨率、二硫键位置、蛋白质的一级结构、二级结构以及三级结构等。HSSP 数据库是对 PDB 数据库中每个已知三维结构蛋白质序列进行序列同源性比较的数据库,同源蛋白质序列很有可能具有相同的三维结构,因此根据蛋白质的同源性,HSSP 数据库给出了 Swiss-Prot 数据库中所有蛋白质序列最有可能的三维结构。SCOP 数据库是根据不同蛋白质氨基酸组成以及蛋白质三级结构的相似性,描述已知结构蛋白质功能及进化关系,并

对已知结构蛋白质进行分类的数据库,它主要应用于验证预测方法的性能、建立结构预测的模板库及确定新的蛋白质功能等。CATH 数据库是从蛋白质种类、二级结构、拓扑结构和蛋白质同源超家族等结构角度对蛋白质进行分类,提供特定蛋白质结构域图像、功能信息和分析模块。对于结构未知但序列已知的蛋白质,CATH 数据库可根据其结构比较算法将目标蛋白质与 CATH 数据库中背景蛋白质进行相似结构搜索,最终确定该蛋白质结构和相应结构域信息。DSSP 数据库用于蛋白质二级结构的识别和基于蛋白质序列对二级结构的预测,从而为准确地预测蛋白质三级结构提供了保障基础。NRL-3D 数据库是已知三维结构蛋白质的一级结构序列数据库,提供了贮存在 PDB 数据库中的蛋白质序列信息,也提供了蛋白质二级结构、活性位点和结合位点等与蛋白质结构直接有关的注释信息,它主要用于构建同源蛋白质分子模型等。

蛋白质天然构象预测数据库是一类重要的生物分子信息数据库,是结构生物信息学的关键组成。通过整合数据库信息,确定蛋白质结构模型,预测蛋白质的结构域等,进一步揭示未知蛋白质的功能,对配体类药物设计以及异常蛋白质分子调控机体发病机制的研究都有重要指导作用。

(边惠洁 刘泽昆)

shēngwù yàowù yàoxiàoxué

生物药物药效学 (pharmacodynamics of biological drugs) 研究生物药物对生命系统的药理作用及作用机制的学科。又称生物药物效应动力学或生物药物效力学。研究包括生物药物对机体或存在

于机体内、外的微生物或寄生虫的生物化学和生理学作用及作用机制,及影响生物药物作用的因素等。生物药物药效学常与生物药物药动学相区别,前者指药物对机体的作用研究,而后者指机体对药物作用的研究。

研究内容 生物药物对生命系统的作用具有两重性,即期望获得的治疗效应和不期望获得的不良反应。治疗效应是通过生物药物成功地靶向其作用靶点,与靶点之间发生相互作用而实现的。因此研究生物药物结合靶点十分重要。其靶点包括细胞膜、酶、结构蛋白、载体蛋白、离子通道和受体等。生物药物通过与这些靶点相互作用,以两种方式发挥对生命系统的作用:①模拟正常生理、生化过程,或抑制病理过程。②抑制机体内或皮肤表面的寄生虫和微生物的生命过程。通过这两种方式,生物药物对生命系统的作用主要有:①刺激作用。生物药物通过与受体结合,直接激活受体及其下游效应而产生的刺激作用。②抑制作用。生物药物通过直接激活受体及其下游效应而产生的抑制作用。③封闭或拮抗作用。生物药物结合但并不激活受体,而是阻止受体与其配体的相互作用,从而使受体所介导的生理或病理效应不能发生,即封闭或拮抗了受体的功能。④稳定作用。生物药物与受体结合,保持受体的正常生理活性,防止受体过度激活或功能低下。⑤交换/替代机体代谢物质或使之积累,如糖原储备。⑥直接诱发有益的化学反应,如自由基清除。⑦直接诱发有害的化学反应。通过诱导毒性或致死性损伤,使细胞损伤或破坏,如生物药物介导的细胞毒性。

生物药物对机体除产生治疗效应外,还可因生物药物、机体及用药不当等多方面原因引发不良反应。

影响因素 生物药物药效学主要与生物药物催化活性、生物药物亲和力以及生物药物种属特异性有关,受机体和药物两方面因素影响。一方面机体年龄、性别、功能或病理状态、个体敏感性、遗传因素、种族及精神因素等差异,均可影响生物药物的作用。如婴幼儿和老年人对药物的敏感性与成人不同,故生物药物能够发挥作用的有效剂量也不同。另一方面,生物药物的用药剂量与治疗效应间,在一定的剂量范围内存在剂量-效应关系(dose-effect relationship),即在一定剂量范围内,药物效应与剂量成正比。剂量不同,发挥的药理作用也可不同。介于能够发挥治疗效应(有效剂量)和引发不良反应的药物剂量之间的药物剂量范围,称为治疗窗(therapeutic window)。使用治疗窗小的药物要对用药过程进行控制,如监测血药浓度,防止药物失去作用或产生不良反应。另外,生物药物剂型、用药途径及生物药物相互作用,均可影响治疗效应及药效持续时间;而生物药物的自身特点,如自身的催化活性、对其作用靶点的亲和力及其种属特异性等,是影响其药理作用的根本因素。

研究方法 常用研究方法包括:①整体动物实验,采用小鼠、大鼠等正常动物或病理模型动物,观察药物对动物行为影响,观测药物对疾病的疗效。②离体器官实验,采用心脏、肠段等离体器官,直观地观测药物作用。③细胞培养实验,从细胞或亚细胞水平研究药物作用及其机制。④生

物化学与分子生物学实验方法,采用生物化学、分子生物学手段从分子水平分析药物的药理学作用和作用机制。

(徐静)

shēngwù yàowù cuīhuà huóxìng

生物药物催化活性(catalytic activity of biological drugs) 生物药物在一定底物浓度、环境温度、pH值、离子浓度等条件下,改变其作用底物所参加的特定化学反应的反应速度的能力。属于生物药物药效学的研究范畴。

具有催化活性的生物药物通常是酶药物,其化学本质多为蛋白质,少数为核酸。在反应前后,酶本身的质和量一般不发生改变。其催化活性的高低,影响着酶药物的治疗效果。催化活性通常用符号 z 表示,其国际单位自1999年起被定名为开特(katal; kat),单位为mol/s。在1999年以前,也有用U作为催化活性的单位,其与kat的换算关系为:1 U = 16.667 × 10⁻⁹ kat。自kat衍生出的单位还包括:kat/L、kat/kg等。生物药物催化活性与药物的治疗效果直接相关,利用其作用原理及催化活性,可以在肿瘤、心血管疾病、病毒感染、创伤、遗传病等疾病中发挥临床疗效。

研究内容 对生物药物的催化活性研究包括:①生物药物对作用底物的专一性。具有催化活性的生物药物对其作用底物通常具有高度专一性,只选择性地作用于某种或某类底物。其专一性往往依赖于药物和底物的空间结构。但不同药物的专一性不同,有些药物专一性相对较弱,可以作用于不同的底物。对生物药物的作用底物专一性的研究,有利于明确药物的应用范围及安全性。②催化活性的强度。强度决定催

化反应的效率,具有催化活性的生物药物常可大大加快特定反应的反应速度,这一作用通常通过降低反应所需的活化能来实现,但并不改变反应的平衡点。③催化活性的调节。有些生物药物是无催化活性的酶原,进入体内后在特定的位置被切除一部分结构而转化为有活性的酶,保证了在局部病灶的有效作用浓度,并减少了在其他部位发挥催化活性可能带来的副作用。生物药物在体内的稳定性,也会影响其活性的发挥,可采用基因工程或化学修饰方法,增加生物药物的稳定性。也可通过定点突变或引入辅因子等方法改良生物药物的催化性质及底物特异性。

影响因素 生物药物的催化活性可受多种因素影响。药物分子正确的三维结构通常是保证其催化活性的基础,若三维结构被破坏,则药物也会失活。此外,pH值、离子浓度、底物浓度、电磁波(如微波)等也可影响生物药物的催化活性。生物药物常有最适的pH值,即在特定pH值下可发挥最强催化活性。

生物药物催化活性还可受到抑制剂或激活剂的影响,二者分别可以降低或增加其催化活性。某些生物药物催化的化学反应产物可以与药物结合,当产物浓度增高,其与药物的结合可抑制药物的催化活性,降低反应速度,起到负反馈调节的作用。许多药物或毒物也是生物药物的抑制剂,如青霉素和阿司匹林。抑制剂可以通过可逆或不可逆,竞争性、非竞争性或反竞争性抑制作用及复合抑制作用等方式抑制生物药物的活性。因此,临床用药要考虑药物间的相互作用,包括抑制作用和协同作用,如某些化学治

疗药物可协同增强蛋氨酸酶的催化活性。

测定方法 可通过测定生物药物催化特定反应的速度来反映其催化活性。一般采用定时法或连续监测法两种方式进行。定时法指在一定时间内通过测定反应中底物的消耗量或产物的生成量,计算出反应速度的方法。连续监测法是每隔一定的时间连续监测反应中某一底物或产物的量变化,再计算出反应速度。

(徐静)

shēngwù yàowù qīnhé lì

生物药物亲和力 (affinity of biological drugs) 生物药物与机体中相应的药物作用靶点结合的能力。属于生物药物药效学的研究范畴。生物药物进入机体后,常需与其作用靶点结合,形成复合物,进而发挥相应的药理作用。依据生物药物的种类不同,可形成酶-底物复合物、抗原-抗体复合物以及受体-配体复合物等。生物药物亲和力不直接决定生物药物的药理作用,但却是生物药物发挥药理作用的必要前提条件。生物药物亲和力越高,越利于生物药物发挥其药理作用,且其在体内的稳定性通常也越好,因此药效也越强。所以,生物药物亲和力是生物药物筛选和药效判断的重要依据。研究生物药物亲和力,即研究生物药物与其靶点相结合,形成复合物的能力。

研究内容 生物药物与其作用靶点间的相互作用大多是可逆地,存在着动态的相互作用,即不断地发生结合和解离。因此,生物药物亲和力是生物药物对其作用靶点的结合和解离的动态过程,结合快、解离慢的,即亲和力高。一般而言,生物药物亲和力越高,越利于生物药物发挥其药理作用,

药效也就越好。提高生物药物亲和力,还可延长生物药物在体内的半衰期,从而进一步提高药效。因此,如何有效地提高生物药物亲和力,是生物药物筛选和改良的一个重要依据和目标。

生物药物亲和力常由生物药物及其作用靶点的三维结构决定,受两者间非共价分子间相互作用影响,包括分子间的氢键、静电相互作用、疏水作用及范德华力等。因此,根据生物药物及其作用靶点的结构信息进行优化筛选,是获得高亲和力生物药物的一种方法。另外,对生物药物进行化学修饰,也可提高其亲和力。如给反义核酸药物的T、C碱基上加上丙炔基团,可使其对靶点RNA分子的亲和力增加10~100倍。还可采用基因工程制药技术和蛋白质工程制药技术,对生物药物进行突变改造,以提高其亲和力。如错配聚合酶链式反应技术可对生物药物引入随机突变,进而筛选获得具有高亲和力的突变药物。

生物药物亲和力常是有选择性的,即特异性地与其作用靶点相识别并结合,形成复合物。这也是生物药物发挥药效的前提和基础。但若生物药物与体内的非特异性位点也具有较高的亲和力,即发生脱靶效应(off-target),则会造成药物的副作用。因此,生物药物研发的一个重要目标就是设计、筛选只对所期望的特异性作用靶点具有高亲和力的生物药物。

影响因素 生物药物亲和力由生物药物的三维空间结构所决定,也可受大分子拥挤现象的影响,即细胞内由于存在高浓度的生物大分子所致的高度拥挤状态。另外,生物药物所处溶液环境的条件,如温度、pH值、盐浓度等,均会显著地影响生物药物亲

和力。在体外溶液环境不变的情况下,生物药物亲和力一般不受药物浓度的影响。

测定方法 生物药物亲和力的大小常用解离常数表示,是平衡常数的一种,采用摩尔单位 mol/L。指生物药物与 50% 的作用靶点相结合时的浓度,也是生物药物对其作用靶点的解离速率常数与结合速率常数的比值。解离常数越小,则生物药物亲和力越大。解离常数常采用基于表面等离子共振技术 (surface plasmon-resonance, SPR) 的方法进行测定,即将生物药物的作用靶分子固定交联在芯片上,采用不同浓度的生物药物分子流过交联分子的表面,根据两者发生结合时光学性质的改变,判断亲和力的大小。也可采用放射性同位素标记示踪分析、酶联免疫吸附实验或等温滴定量热法测定。在复杂、多变的体内环境中,需采用动态方法来分析生物药物的亲和力。

若生物药物与其作用靶点的结合属于抗原-抗体结合,也常用亲和力常数 (affinity constant) 来表示其亲和力大小。亲和力常数是解离常数的倒数,因此亲和力常数越大,则生物药物对其靶点的亲和力越大。

(徐静余璐)

shēngwù yàowù jiéhé bǎidiǎn

生物药物结合靶点 (binding target of biological drugs) 生物药物与机体自身存在的细胞或分子相结合的部位。属于生物药物药效学的研究范畴。生物药物与此部位结合后,可发挥相应的药理作用,从而产生防治疗效。生物药物结合靶点的确定和选择对生物药物的研发具有重要意义,其在机体的分布、自身的功能作用等均影响着生物药物药理效应的

预期效果。G-蛋白偶联受体和蛋白激酶是常用的生物药物研究的结合靶点。

类别 生物药物结合靶点通常位于机体自身存在的蛋白质或核酸,也可以是糖、脂等生物大分子,这些分子可以是机体天然存在的正常物质,也可以是在病理情况下发生突变、修饰或改变的异常物质。蛋白质是最常见的生物药物结合靶点,按其功能不同又可分为:①受体。相当比例的生物药物以受体为结合靶点,如 G-蛋白偶联受体、核激素受体等。②酶。一类主要的生物药物结合靶点,包括蛋白激酶、蛋白酶、酯酶、磷酸酶等种类。③离子通道。包括配体门控离子通道、电压门控离子通道等。④结构蛋白。如组成细胞骨架的微管蛋白等。⑤膜转运蛋白。⑥核酸包括核糖核酸和脱氧核糖核酸。如多数核酸药物的结合靶点为核酸。⑦细胞中的糖、脂等生物大分子。它们也可成为生物药物结合靶点,如构成细胞膜系统的脂分子。⑧其他蛋白。

研究内容 生物药物设计、筛选或发现的基础是生物药物结合靶点的选择。生物药物研发常基于机体已知的生理或病理过程及其分子机制,并针对在此过程或机制中具有关键作用的蛋白质或核酸等生物大分子进行设计、筛选药物,使得药物在结合此靶点后,能够发挥防治疾病的药理效应。由于蛋白质、核酸等生物大分子结构比较复杂,生物药物往往只结合其分子中的一部分结构,而在同一生物大分子中,往往存在多个不同的结构域或序列位点,生物药物靶向该分子中不同的位点,即可能产生不同的药理作用,在这种情况下,明确其

分子结构中对于疾病防治具有关键作用的位点,是获得具有良好疗效生物药物的前提。在某些情况下,生物药物也可通过大规模筛选的方法获得,或者在明确生物药物对某一生理或病理过程有影响的前提下,再进一步确定其结合靶点,并在此基础上对生物药物进行优化和改良。

生物药物结合靶点被生物药物结合后,常会改变自身行为或功能,例如,如果结合靶点为受体,当生物药物与其结合后,受体可被激活或抑制,使得下游信号转导通路被活化或受抑,从而发挥药理作用。生物药物可以通过改变其结合靶点的空间构象,以诱导其功能改变;也可不直接改变结合靶点,而是与靶点结合后,阻止机体的内源性物质与该靶点结合,从而影响靶点的功能。

如果生物药物结合靶点不仅存在于病理过程发生的部位,而且也存在于机体其他非病变位置,则生物药物对非病变位置的结合,可能带来药物的副作用。另外,生物药物对其结合靶点的特异性越强,则其带来副作用的可能性越小。

(徐静余璐)

shēngwù yàowù zhǒngshǔ tèyìxìng

生物药物种属特异性 (species specificity of biological drugs)

由于生物体种属、个体差异及组织特异性导致的生物药物药理学活性的特异性。属于生物药物药效学的研究范畴。

种属特异性是特定生物体物种个体的特征性行为、解剖结构或物质系统,如免疫反应、新陈代谢反应、基因或者基因突变。由于生物体之间的种属差异或同种生物体之间的个体差异较大,导致使用生物药物时可能会发生

免疫反应和过敏反应,也可能无药效作用。如由于许多生物技术药物是人源化的或靶向作用于人类的蛋白,其作用往往只针对人类和非人灵长类动物,应用于兔、大鼠或小鼠时产生的交叉反应较弱或无交叉反应。人血型抗原不同,输血时可引起输血反应,组织相容性抗原或移植抗原型不同也可引起移植排斥反应。此外,免疫球蛋白分子上存在的 Gm、Am、Km 标志均属异型抗原,可用以鉴别免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 A 及 K 轻链的异型,即这种抗原具有种属特异性。

由于生物药物具有高度种属特异性,因此在进行药效学实验选择动物模型时,应选择对该药不会产生抗体或较低产生抗体的动物模型,因为产生抗体后,首先会中和血液中的药品,其次是发生变态反应干扰药物生物学效应的观察。如重组人碱性成纤维细胞生长因子,为一碱性非糖基化蛋白,在大鼠体内产生明显的抗体,而在猕猴体内则不产生抗体,是因为其在人与猕猴的氨基酸残基同源性上高达 90%,而在人与大鼠之间的同源性仅为 80%,所以抗体的产生与该受试物在人与动物之间具有的种属差异程度有关。哺乳动物细胞系可用于预测体内活性的特异性并可定量评估生物药物对不同动物种属的相对灵敏度。设计此类试验时可通过测定受体数量、受体亲和力或药理作用,帮助选择合适的动物种属进行进一步的体内药理和毒理试验。免疫化学和功能试验等许多技术可用于确定相关种属。

生物药物种属特异性是生物药物安全性评价的重要组成部分,由于高度种属特异性及其可能产生的免疫原性与免疫反应,外加

在临床广泛应用中的多因素性质,已有生物技术药物的临床前安全评价方法还很不完善,如选择相关动物种属与有针对性和灵敏的观察指标还很困难,甚至还不能判定生物药物在动物体内产生的反应在临床上的意义,因此规范的生物药物种属特异性及安全评价方案有待在大量的实践中逐步完善。

(蒋建利 郭慧芳)

shēngwù yàowù dúlǐ xìng

生物药物毒理特性 (toxicological characteristics of biological drugs) 生物药物在给药时所引起的机体毒性反应。主要包括生物药物急性毒性、生物药物长期毒性、生物药物特殊毒性等。研究生物药物的毒性作用机制,主要目的在于评价新药安全性,指导临床合理用药,降低药物的副作用。

生物药物具有结构和生物学性质上的专一性和多样性,包括种属特异性、免疫原性及无法预料的多种组织亲和性等特性,而且在药物的理化特性、制剂配方、代谢过程等方面与常规小分子化学药物存在较大的差异,因此常规的化学药物和中药临床前安全性评价方法并不完全适合于生物技术药物的研究,其安全性评价应该考虑到更多的因素,为药物的评价提供更多的安全性信息。

免疫原性 许多生物药物在动物体内具有免疫原性,例如抗体药物,在单次或多次给药后动物体内可产生针对抗体药物的抗体,引发人抗鼠抗体反应或人抗人抗体反应,可降低药物的有效性或产生一系列不良后果,如注射部位局部反应或轻度及致命性全身反应。一般而言,对动物呈强免疫原性的药物对人也具有免

疫原性;同时,给药频率、患者个体差异、患者同时患有其他疾病及合并使用其他药物等混杂因素也会影响到药物对人体的免疫原性。免疫原性研究包括:抗体滴度、抗体的出现时间、出现抗体的概率、剂量关系、抗体滴度的动态变化、抗体的中和活性、同期的药效和(或)药代和(或)毒性反应的变化、补体激活与否、免疫复合物在肝肾的沉积、终止给药的条件、临床意义分析等。

半衰期 绝大多数生物药物均通过生物降解方式排出体外。化学药物的药效作用时间一般较短,即数分钟至数小时,而生物药物的作用时间一般较长,如人源性单抗和修饰性蛋白药物可作用数天至数周。

剂量反应 生物技术药物的毒性常与药理作用扩大化有关,其剂量反应曲线的形状无法预测,如呈钟形或双峰形。如对免疫调节剂而言,当剂量或浓度增加时,其生理效应常发生逆转。因此,难以将动物实验结果外推至人,预测出在人体使用的剂量。

种属特异性 生物药物具有的种属特异性要求在实验开始前确定实验动物的种属相关性。一般而言,需通过检测受试药物在体外对人和动物的细胞结合力或功能活性,并确定受试品在两者体内具有药理活性或交叉反应来选择合适的实验动物。生物药物的临床前毒理学研究最好使用拥有相应靶受体或表位的动物。与常规的化学药物毒性评价不同,评价生物药物的毒性在某些情况下可考虑使用一种动物,但如果前期实验发现不同物种的毒性反应各不相同,或用一种实验动物无法阐明某些临床适应证的相关问题时,应使用一种以上的动物。

另外,针对某些特定的问题可相应采用不同动物,例如用大鼠评价药物对神经系统的毒性作用,用狗或猴评价药物对心血管系统的毒性作用。

免疫毒性 受试药物引起的免疫抑制或增强、过敏反应或自身免疫反应,可能与药理活性相关(如抗排斥药物)或不相关(如部分抗肿瘤药物)。生物药物尤其是治疗用细胞因子对免疫系统常具有直接作用,如白介素-2等所致的脉管泄漏综合征或白介素-2、干扰素和肿瘤坏死因子等所致的流感样症状均属于产生了免疫毒性。与免疫失调有关的间接作用还包括产生自身抗体,已有疾病如自身免疫疾病的恶化及细胞免疫改变等均属于此类。(见生物药物免疫毒性)

(蒋建利 张 征)

shēngwù yàowù jìxìng dúxìng

生物药物急性毒性 (acute toxicity of biological drugs) 一次或24h内多次接受生物药物后,机体在短时间内所产生的毒性反应。属于生物药物毒理特性的研究内容。生物药物急性毒性评价在药物毒理研究的早期阶段进行,有助于进行药物长期毒性试验时重复给药剂量的选择。主要通过啮齿类或非啮齿类动物进行,通常为小鼠或大鼠。通过测定半数致死量/浓度、观察急性中毒表现,经皮肤吸收能力以及皮肤、黏膜和眼睛有无局部刺激等指标,可初步判断受试物可能的毒性作用靶器官,同时可能出现的一些迟发性毒性反应,可为受试药物的作用方式、中毒反应和亚急性和长期毒性试验的观察指标、剂量分组和药物I期临床试验起始剂量的选择提供参考。

研究目的 ①确定生物药物

的半数致死量/浓度。②确定最大耐受剂量和无明显损害作用水平。③通过观察动物中毒表现、毒性作用强度和死亡状况,初步评价毒物对机体的毒性效应特征、靶器官、剂量-反应(效应)关系、毒性的转归、临床监测参数和对人体产生危害的危险性。④为后续重复剂量毒性试验、亚慢性和慢性毒性实验研究以及其他毒理试验提供剂量设计依据。⑤提供毒理学机制研究的初步线索。

实验动物选择 考虑到受试药物在实验动物体内产生的毒性反应需与药物在人体内产生的毒性反应基本相同。在实验开始前就要根据生物药物的种属特异性要求确定实验动物的种属相关性。可以通过在体外检测受试品对人和动物的细胞结合力或功能活性,确定受试品在体内的药理活性或交叉反应来选择合适的实验动物。生物药物的急性毒理学研究最好使用拥有相应靶受体或表位的动物。与常规的化学药物毒性评价不同,评价生物技术药物一般使用一种动物,但如果不同种属的动物对同一药物的反应会有所不同,则应使用一种以上的动物。针对某些特定的问题可相应采用不同动物,例如用大鼠评价神经系统作用,用狗或猴评价心血管系统作用。在缺乏相关种属的实验动物时,应考虑使用表达人源受体的相关转基因啮齿动物。试验所用的动物数,应根据动物的种属和试验目的来确定。通常使用3~5个剂量组(其中包括阴性对照组),每组的动物数,一般小动物数目相对多于大动物,如啮齿类动物每性别不少于5只,而非啮齿类动物不少于两只。

影响因素 主要包括给药途径和给药剂量。由于给药途径不

同,药物的吸收率、吸收速度和血液循环中的药物量会有所不同,因此需要采用多种途径进行急性毒性试验,其中应包括临床拟用途径和一种能使原形药物较完全进入循环的途径。如果临床拟用途径为静脉注射,则仅用此一种途径进行急性毒性试验即可;急性毒性试验应以给药剂量和不同剂量下出现的毒性指征间的剂量-效应关系为观察主线。因此,急性毒性试验应以近似致死剂量下观察量效关系为主,非啮齿类动物给予出现明显毒性的剂量即可,而不必达到致死剂量。

观察指标 给药后,以适当的间隔连续观察一般至少14天,观察的间隔和频率应适度,以便能观察到毒性指征出现的时间、恢复时间及动物死亡时间等。观察的指标包括一般临床指标(如动物外观、行为、分泌物、排泄物等)、动物死亡情况(死亡时间、死亡前反应等)、动物体重变化(给药前、试验结束处死动物前各称量一次,观察期间可多次称量)等。记录所有的死亡、临床症状,以及临床症状开始的时间、严重程度、持续时间、是否可逆等。对于所有的动物均应进行大体解剖,包括因垂死而处死的动物、死亡的动物以及试验结束时处死的动物。任何器官出现体积、颜色、纹理改变时,均应记录并进行组织病理学检查。

数据分析及评价指标 判断各种反应的量效关系。记录所观察到的各种反应出现的时间、严重程度、持续时间等,统计分析各种反应在不同剂量时的发生率、严重程度。根据每日的统计分析结果,判断每种反应的量效关系及随时间的变化(提示该反应是否可逆)。①判断出现的各种反应