

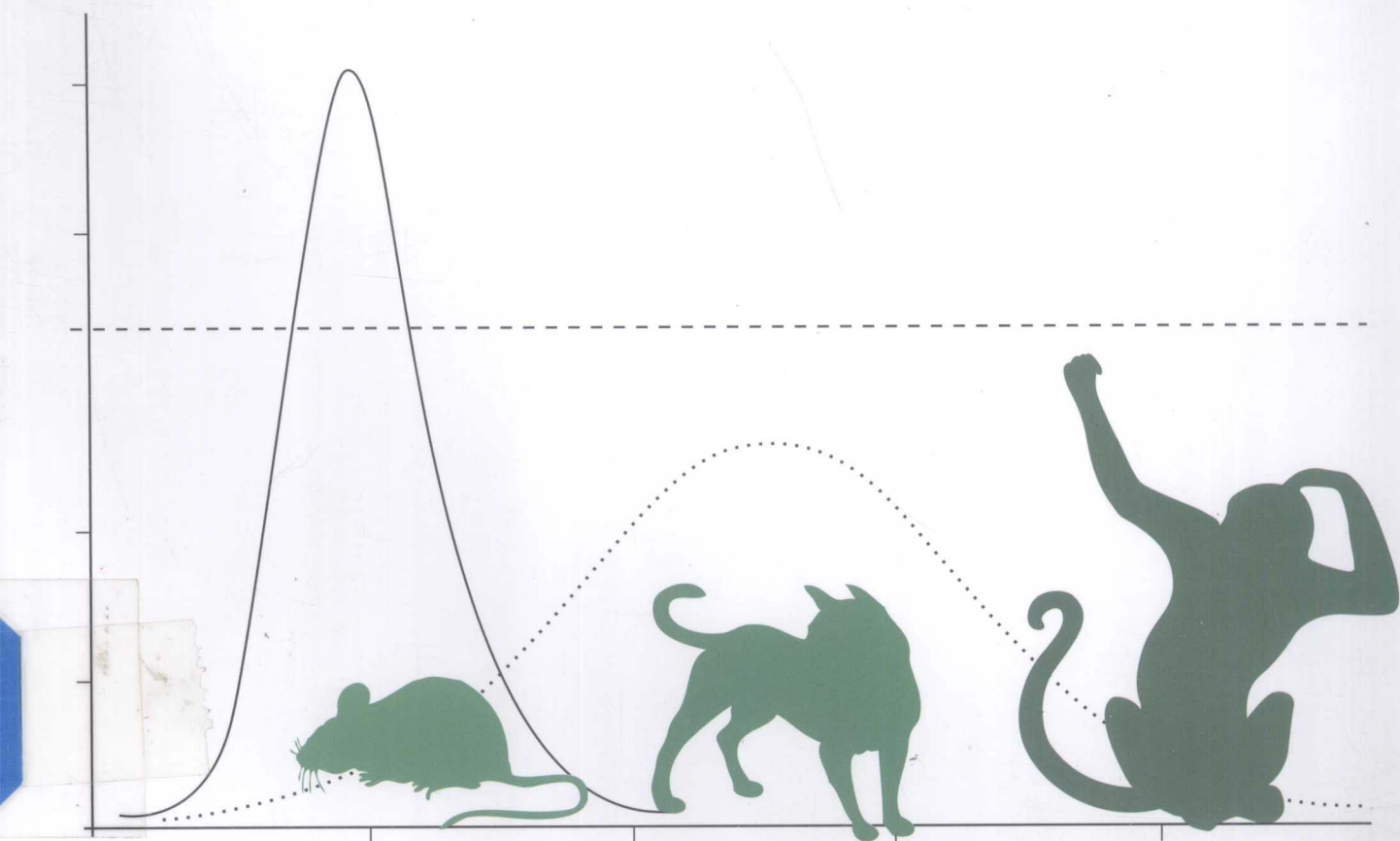
“十二五”国家重点出版物出版规划项目

毒理学安全性评价系列丛书

毒代动力学

DUDAI DONGLIXUE

主编 / 张双庆 范玉明



电子科技大学出版社

毒理学安全性评价系列丛书

毒代动力学

DUDAI DONGLIXUE

主 编 张双庆 范玉明

副主编 靳洪涛 崔纯莹 栗晓黎 魏敏吉 徐小平 张 舒

编 者 李 迎 赵继会 孔爱英 李鹰飞 吴彩胜 孙丽翠 郑 楠
郑爱萍 韩 鹏 贾 征 孙 锋 黄振武 董 卓 姚韧辉
高洪波 阎 玺 王雅雯 郑丽娥 黄宝斌 李 勇 何 婷



电子科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

毒代动力学 / 张双庆, 范玉明主编. —成都:
电子科技大学出版社, 2014. 9
ISBN 978-7-5647-1943-2

I. ①毒… II. ①张… ②范… III. ①毒物—代谢—
动力学—研究 IV. ①R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 121807 号

内 容 提 要

《毒代动力学》全书内容共 13 章。涉及药物理化性质用于毒物代谢动力学研究; 毒物在体内的吸收、分布、代谢和排泄; 毒代动力学模型; 毒代动力学与 GLP; 体外研究方法; 试验设计; 生物样品的采集程序; 制备与分析; 特殊药物的毒代动力学考虑; 代谢组学; 蛋白质组学及现代分离检测技术在毒代动力学中的应用等等。

本书最大的特点是具有实用性和先进性, 适用于从事药品、食品、化妆品、农药、兽药、医疗器械和工业化学品等安全性评价的工作人员, 是一部必备的工具书。也可作为生命科学、医学、兽医学等大专院校教师、研究生、广大科研工作者和药品检验人员的参考书。

毒代动力学

主 编 张双庆 范玉明

副主编 靳洪涛 崔纯莹 粟晓黎

魏敏吉 徐小平 张 舒

出 版: 电子科技大学出版社(成都市一环路东一段 159 号电子信息产业大厦 邮编: 610051)

策划编辑: 汤云辉

责任编辑: 汤云辉 李燕苓

主 页: www.uestcp.com.cn

电子邮箱: uestcp@uestcp.com.cn

发 行: 新华书店经销

印 刷: 成都蜀通印务有限责任公司

成品尺寸: 205 mm×280mm 印张 23.25 字数 615 千字

版 次: 2014 年 9 月第一版

印 次: 2014 年 9 月第一次印刷

书 号: ISBN 978-7-5647-1943-2

定 价: 128.00 元

■ 版权所有 侵权必究 ■

- ◆ 本社发行部电话: 028-83202463; 邮购部电话: 028-83208003。
- ◆ 本书如有缺页、破损、装订错误, 请寄回印刷厂调换。

前言

毒代动力学是融合药代动力学和毒理学的一门新兴交叉学科。它运用药代动力学的原理和方法,定量地研究在毒性剂量下药物在动物体内的吸收、分布、代谢、排泄等随时间变化的动态规律和特点,进而探讨药物毒性发生和发展规律。毒代动力学有别于经典的药代动力学,药代动力学主要研究临床剂量下药物在体内的动态变化规律;毒代动力学也不同于传统的静态药物毒理学安全性评价方法,如病理学、组织学和血液学评价,无法了解毒性发生和发展的动态变化规律性。毒代动力学研究,是在实验动物多次重复给予产生毒性作用剂量的条件下进行的毒性试验,此时,高剂量药物对动物体内的转运系统、代谢酶、血浆蛋白结合率饱和,全身生理系统的反应可能发生变化,可能导致体内药物的溶解性、稳定性、吸收、消除、蛋白结合率及代谢等发生变化;毒代动力学重点了解药物的全身暴露情况、致毒机理、毒性发生和发展的动态变化规律,通过比较种属间的毒性差异,最终对药物的临床前安全性进行全面和综合的评价,为首次临床试验的给药剂量设计提供可靠的依据,为非临床安全性评价及临床安全性评价提供量化的风险评价信息;降低临床用药的毒性风险。

毒代动力学已经成为药物安全性评价的重要研究内容之一,通过评价受试物和/或代谢物在不同动物种属、性别、年龄、机体状态(如妊娠状态)的毒性反应和毒代动力学结果,在临床前和临床试验间搭起了桥梁,探讨毒性发生机制,解释毒性试验结果,深入阐明药物全身暴露与毒性的关系及毒性发生和发展的规律性,为后续的研究和评价提供重要的线索和依据,同时也为药物的临床研究和使用时安全剂量的确定提供可靠的依据,有助于对药物的安全性做出更为科学、合理的综合评价。

1984年,经济合作与发展组织(OECD)颁布化学品毒代动力学研究指导原则,2010年对其进行全面修订。1994年人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)提出了经协商的毒代动力学研究指导原则,此后,ICH国家统一要求在药物毒理学试验中进行毒代动力学研究。

国内药物毒代动力学研究起步较晚,在国内目前还没有一本毒代动力学的教科书。

毒代动力学是近年毒理学领域关注的焦点,促进这项研究的必要性,在药学界已形成共识,因此它必然会随着药代动力学和毒理学研究的不断深入和发展而得到进一步的发展,随着理论和技术手段日趋成熟,毒代动力学在我国传统医药、新药研究和开发中的重要性将会越来越明显。

主编曾在美国和新加坡的毒代实验室工作多年,也具有国内大型药物分析及代谢研究实验室的工作经验,深感国内迫切需要一本教科书,介绍毒代动力学的知识以及应用,特与国内具有实际工作经验的一线专家,根据自己的工作经验及国内外的研究成果,汇编成册,以飨读者。

目 录

第一章 总论.....	1
第一节 概念与历史.....	1
第二节 目的与内容.....	1
第三节 毒代动力学与药代动力学联系与区别.....	4
第四节 毒代动力学研究实验设计.....	5
第二章 药物理化性质用于毒物代谢动力学研究.....	8
第一节 解离常数.....	8
第二节 溶解度.....	14
第三节 亲脂性.....	17
第四节 渗透性.....	22
第五节 纳米粒径.....	26
第六节 手性.....	30
第七节 稳定性.....	33
第八节 理化参数的互相影响.....	34
第三章 药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄.....	40
第一节 跨膜转运.....	41
第二节 药物的吸收.....	44
第三节 药物的分布.....	50
第四节 药物的代谢.....	53
第五节 药物的排泄.....	59
第四章 毒代动力学模型.....	62
第一节 线性药代动力学模型.....	62
第二节 非线性药代动力学模型.....	73
第三节 生理药代动力学模型.....	80
第四节 群体药物动力学模型.....	86
第五节 毒代与毒效结合模型.....	91
第五章 毒代动力学与 GLP	103
第一节 GLP 法规与讲解	103
第二节 供试品管理、配制、分析和贮存	110
第三节 体外制剂分析方法验证.....	117
第四节 仪器设备管理与验证.....	126

第五节	实验室信息管理系统.....	136
第六节	毒代动力学 GLP 符合性检查与稽查	141
第六章	毒代动力学的体外研究方法.....	146
第一节	简介.....	146
第二节	体外透皮实验.....	146
第三节	体外分离灌注猪皮瓣 (IPPSF) 实验.....	151
第四节	P-糖蛋白毒物物质体外转运实验	154
第五节	Transwell 小室培养的 Caco-2 细胞中毒性物质的转运	157
第七章	毒代动力学试验设计.....	164
第一节	毒代动力学试验该考虑的影响因素.....	164
第二节	毒性试验毒代动力学实验设计.....	181
第三节	毒代动力学 GLP 法规符合性检查与稽查关注点	190
第八章	生物样品的采集程序.....	194
第一节	大鼠小鼠采血、采尿、采集粪便和骨髓等样品	194
第二节	犬生物样本的采集.....	203
第三节	灵长类动物生物样本的采集.....	207
第四节	家兔生物样品采集.....	210
第九章	生物样品制备与分析.....	214
第一节	分析用生物样本的一般处理.....	214
第二节	用于分析的生物样品的制备方法.....	216
第三节	生物样品中待测组分的提取分离及浓缩.....	219
第四节	在线生物样品处理技术.....	221
第五节	常用分析检测方法.....	225
第六节	生物样品中化学药物定量分析方法的验证.....	232
第七节	大分子生物药物生物分析方法验证.....	236
第十章	特殊药物的毒代动力学考虑.....	243
第一节	生物制品的毒代动力学.....	243
第二节	抗肿瘤药物的毒代动力学	258
第三节	抗生素类药物的毒代动力学	272
第四节	化学致癌物的毒代动力学	283
第十一章	代谢组学.....	291
第一节	代谢组学的定义和研究领域.....	291
第二节	代谢组学目前常用的分析方法和数据统计分析技术.....	292

第三节	代谢组学研究的应用领域.....	299
第四节	代谢组学研究的实验方案.....	300
第五节	代谢组学在药物作用机制和毒性评价研究的应用实例	310
第六节	代谢组学的发展趋势.....	313
第十二章	蛋白质组学.....	317
第一节	蛋白质组学的发展历史.....	317
第二节	蛋白质组学概述.....	318
第三节	蛋白质组学研究技术.....	321
第四节	蛋白质组学应用展望.....	345
第十三章	现代分离检测技术在毒代动力学中的应用	347
引 子		347
第一节	现代分析仪器现状.....	347
第二节	常见仪器生产厂家的简介	348
第三节	应用实例.....	354

第一章 总论

第一节 概念与历史

毒代动力学 (Toxicokinetics), 又称“毒物动力学”或“毒性动力学”, 是药代动力学和毒理学相结合的新兴交叉学科。运用药代动力学的原理和方法, 结合毒理研究定量地研究毒性剂量下药物及其他外源性化学物在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄过程, 是药代动力学在全身暴露评价中的延伸。其研究结果可用于解释毒性试验结果, 探讨药物毒性发生机制和预测人体安全性。毒代动力学包括前瞻毒代动力学 (Prospective Toxicokinetics)、伴随毒代动力学 (Concomitant Toxicokinetics) 和回顾毒代动力学 (Retrospective Toxicokinetics)^[1]。前瞻毒代动力学是指毒理学研究开始前, 选择试验动物种属、给药处方、剂量和给药方案等, 从而确定治疗方案。伴随毒代动力学是指在毒理学研究过程开展的毒代动力学研究, 可在所有动物或有代表性的亚组或卫星组动物中进行, 用于解释剂量-暴露和暴露-毒性反应关系, 作为安全性评价的一部分, 伴随毒代动力学研究必须遵守 GLP 原则。回顾毒代动力学是在毒理学研究结束后开展, 用于评价毒代动力学数据不充足的药物暴露问题, 研发过程延长的药物和 20 世纪 80 年代前研发的药物都需要开展回顾毒代动力学研究。

20 世纪 80 年代前, 多数药物的临床前毒理安全性评价主要是观察药物对受试动物行为和存活的作用, 以及观察动物器官功能和形态的变化, 没有测定相应的全身暴露量。从 20 世纪 80 年代后期起, 国外大医药公司逐渐将其列为新药研究开发的重要内容。1984 年, 经济合作与发展组织 (OECD) 颁布化学品毒代动力学研究指导原则, 2010 年对其进行全面修改, 对动物、受试物、剂量、体内过程、毒代模型、报告格式等做了详细要求。1994 年, 人用药品注册技术要求国际协调会议 (ICH) 提出了经协商的毒代动力学研究指导原则, 此后 ICH 国家统一要求在药物毒理学试验中进行毒代动力学研究。国内药物毒代动力学研究起步较晚, 2005 年我国建议将毒代动力学研究列入新药研究内容, 直到 2013 年才公布药物毒代动力学研究征求意见稿。2008 年, 国家质量监督检验检疫总局颁布了化学品毒代动力学试验的国家标准 GB/T 21750—2008, 基本等同于 1984 年 OECD 颁布的毒代动力学指导原则。

第二节 目的与内容

一、目的

通常, 药理作用与起效部位药物浓度的相关性较用药剂量好, 同样, 药物的毒理学反应与特定毒性靶器官或组织的药物浓度相关性较好。直接测定毒性靶部位的药物浓度可能有一定难度, 但如果靶部位具有高渗透性, 则该部位的药物浓度与血液中的药物呈动态平衡和一定的比率, 可以采用测定血浆中的药物浓度。

药物的安全范围一般以动物最大无毒性反应剂量 (NOAEL) 与临床人用剂量的比率来估计。如果药物的安全范围很窄, 该药物可能被终止研究。传统上这种以动物给药剂量 mg/kg 换算得出的人体用药剂量的计算方法具有一定的局限性, 如毒性反应的产生可能是因为药物在动物体

内转化生成毒性代谢物,但在人体中却不会形成毒性代谢物。毒代动力学研究有助于发现药物毒性产生的机制,也有助于评价药物在不同种属、性别、年龄、身体状况(如疾病或怀孕)的毒性反应。

在非临床安全性评价早期阶段进行单剂量或短期剂量探索试验的毒代动力学研究,可为后续的重复剂量和其他毒性试验提供十分有价值的信息。毒代动力学提供了大剂量给药后毒性反应的标准,用于推断药物的安全范围。此外,毒代动力学可引导出新的试验策略,如FDA建议采用高剂量进行致癌性试验的策略。毒代动力学已成为药物安全性评价的一个重要组成部分,与非临床药代动力学、药物代谢、重复给药毒性试验等一起成为新药安全性评价的标准组合。

根据上述所述,毒代动力学研究的主要目的是:①阐述毒性试验中药物的全身暴露量与给药剂量和时间的关系;②描述重复给药的暴露延长对代谢过程的影响,包括对代谢酶的影响(如药物代谢酶的诱导或抑制);③解释药物在毒性试验中的毒理学发现或改变;④评价药物在不同动物种属、性别、年龄、机体状态(如疾病或怀孕)时的毒性反应,支持临床前毒性研究的动物种属选择和用药方案;⑤提升非临床动物毒性研究结果对临床安全性评价的预测价值。采用暴露量来评价受试物蓄积引起的靶部位毒性(如肝脏毒性或肾脏毒性)与暴露的关系,有助于为后续安全性评价提供量化的安全性信号;⑥毒理学试验结合毒代动力学研究可为临床研究提供更充足的信息支持,如临床I期起始剂量选择、剂量探索试验、毒性反应及其严重程度分析,并根据暴露程度来指导临床安全性监控。某些情况下,短期的亚急性毒性试验(1~3个月)伴随毒代动力学研究更能支持药物进入早期临床试验,有助于降低临床试验安全性风险,有助于缩短药物研发周期。

二、研究内容

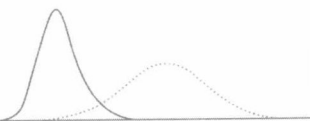
毒代动力学研究包括一般药物毒性的单剂量研究、剂量探索研究、多剂量研究、遗传毒性研究、致癌试验中的研究、生殖毒性中的研究以及特殊药物(如生物技术药物、抗癌药)的毒代动力学研究等。其研究方案要根据不同的试验来制定。毒代动力学研究在不同毒性试验中的关注重点不同:①对单剂量和重复剂量的毒性试验而言,毒代动力学研究的目的是获知毒性反应的最大暴露,并确定暴露量和给药剂量与时间的关系;②对遗传毒性研究而言,毒代动力学研究的目的是确定阴性试验结果时的体内暴露量;③对于致癌性试验研究而言,毒代动力学研究是评估更长时间用药引起的毒性反应与暴露量的关系,全身暴露的评价一般不超过12个月;④对生殖毒性试验而言,毒代动力学研究的目的是确定母体动物对胎儿的毒性暴露(如透过胎盘屏障的药物暴露量)。

(一) 单剂量毒性研究

单剂量毒性研究通常是在药物开发的早期阶段进行,此时生物样品中药物分析方法还没有建立,不可能在这项研究中进行毒代动力学监测。如果需要,可以在这类研究中采集生物样本并储存起来待以后分析测定。但是,以后要进行受试物在样本中稳定性的观察。为了回答在单剂量毒性研究中出现的特殊问题,可在此研究完成后开展另设的毒代动力学研究。单剂量毒代动力学研究结果有助于剂型的选择,预测给药期后暴露速率和持续时间,为后期试验中选择合适的剂量水平提供依据。

(二) 剂量探索研究

剂量选择在毒理学研究中是最重要,也是最难确定的问题。传统选择长期毒性研究剂量的方法是先进行剂量探索试验。动物每天给药剂量不断增加,连续给药1~4周,观察动物毒性反



应。据此结果,选择3个剂量组。低剂量为临床拟用剂量的数倍,中剂量为能出现轻微毒性反应的剂量,高剂量则为能出现明显毒性反应的剂量。该试验在缺少毒代动力学的血液药物浓度数据时,假定剂量水平的增加与安全性的减少成正比,但这种情况在安全性评价研究中比较少见,因为安全性评价研究中所用的剂量较高,造成药物在体内的处置与剂量成非线性关系。传统的剂量范围确定试验中加入毒代动力学的部分内容,可以建立剂量与血液药物浓度的数量关系,定量评价毒性反应与血液药物浓度的关系。这样得出的结果,对剂量选择确定才有较大的指导意义。剂量探索研究中进行毒代动力学研究时,每一次剂量递增都应记录最大血药浓度。当受试物被给予最大耐受剂量并持续一定时间,应监测血药浓度并计算AUC值。

(三) 多剂量毒性研究

多剂量毒性研究给药方案和动物种属的选择应与药效学和药物动力学的原则相一致,但在既无动物资料也无人体药代动力学资料可借鉴的研究初期阶段,该要求通常难以达到。毒代动力学应尽可能纳入毒性研究的设计中,包括适宜剂量下首次给药到试验结束全过程的暴露监测和特征研究。多剂量毒性研究一般选用啮齿类和非啮齿类动物进行毒物动力学研究。在选用啮齿类动物进行试验时,受血容量和给药剂量所限,通常需要增加卫星组动物。在初期反复给药研究(14天或更长时间重复给药)过程中对合适剂量水平下的整体暴露进行监测,以获得一些有价值的信息,如全身暴露情况、性别和种属差异、剂量相关性、是否有潜在的蓄积倾向和肝药酶的诱导或抑制作用等,为后期研究提供帮助。当早期毒性研究出现难以解释的毒性问题时,可能需要延长、缩短或改变对特定化合物的毒性监测和特征研究。后期研究方案将依据前期研究结果制定,后期研究中至少应该在毒性试验开始和接近结束时观察或监测药物的暴露水平。

(四) 遗传毒性研究

对于体外遗传毒性试验为阳性的化合物,通常应使用不同方法证明体内全身暴露水平,通过测定血浆或全血药物浓度和相关物质的浓度水平来评价药物暴露情况。对于体外试验为阴性的药物,体内暴露试验有助于说明药物靶组织的暴露水平,应在所使用动物种属身上进行毒物动力学测定,以便较好地描述所用动物种属的药物全身暴露水平和特定组织药物暴露情况。对于体内遗传毒性出现阴性结果,毒代动力学可以较好地描述所用动物种属的药物全身暴露水平和特定组织药物暴露情况。

(五) 致癌性研究

致癌试验中的毒代动力学研究,所得数据有助于致癌试验合理选择实验动物、给药方法和给药剂量,也有利于理解非线性动力学过程所致毒性。预试验中应进行适当的监测以获得有价值的毒物动力学资料,应特别注意在早期毒性研究中不曾使用过的动物种属、品系以及首次采用的给药途径和方法。当受试物通过掺食法或饮水法染毒时,应特别注意阐明它的可靠的毒物动力学参数。有条件时应做进一步的试验比较掺食法、饮水法、灌胃法或其他不同于临床给药途径的方式染毒后所能达到的全身暴露。原则上,理想的研究设计应该确保致癌试验所用剂量能产生一系列的全身毒性。但这种理想化的剂量选择会不可避免地受到动物种属特异性问题的影响,因此致癌研究应评价适当剂量时母体化合物及其代谢物在不同研究阶段达到的全身暴露,以便正确比较动物模型和人体的暴露,用于评价毒理学发现。致癌性试验应根据受试动物和人可能达到的全身暴露来确定最高剂量是可被接受的。在以往研究中,毒性终点指标通常用于高剂量的选择。目前一般以最大耐受量或治疗剂量的100倍作为致癌试验的高剂量。但是这种理想的剂量水平选择不可避免地要受到动物种属差异性的影响。因此,从估计全身暴露的需要出发,应该强调在各种剂量水平和致癌试验的不同阶段对母体药物和代谢产物的暴露进行评价,

从而用研究得到的结果来考虑和预测动物和人体药物的相对程度。

(六) 生殖毒性研究

一般生殖毒性试验(I段)中应该运用反复染毒毒性试验的一般原则,根据给药方案和以往动物试验资料决定是否需要进行毒物动力学监测。致畸敏感期毒性试验(II段)中药物暴露的限制通常来自母体毒性,因此II段生殖毒性试验中开展毒物动力学监测具有一定的价值。围产期毒性试验(III段)时,应根据受试物的毒性特点、药物动力学和毒代物动力学的原则来确定。与非妊娠动物相比,妊娠动物的全身暴露情况常常会发生变化,应考虑妊娠动物和非妊娠动物的动力学可能不同。在孕期和哺乳期试验中进行的毒物动力学测定包括在特定时期对母体、胚胎、胎仔或新生动物进行的药物暴露的评价;还应该包括评价受试物从乳汁中的分泌对新生动物全身暴露的作用。有时,有必要开展适当的附加试验来研究受试物的胎盘转运以及乳汁分泌。对于某些不能证实受试物具有胎盘转运的动物种属,对其生殖毒性试验结果的解释应加以注意。

(七) 特殊药物

免疫介入的清除机制对生物技术药物的动力学改变可能会影响药理作用,因此一般药物的毒代动力学研究方法不适用于生物技术药物。条件允许时,进行毒性研究时应进行毒代动力学研究来观察药物暴露情况。试验应使用与临床应用一致的药物,按临床预计的给药途径和剂量设计进行试验。可根据情况研究单剂量用药、多剂量用药的毒代动力学研究。使用放射性标记药物进行试验时应保持其生物活性,要考虑放射性物质的脱落对结果解释带来的误导。通过相应的动物模型的吸收、分布和消除试验,有助于根据暴露和剂量的信息预测其安全界限。

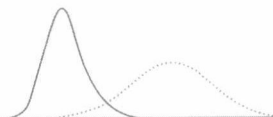
抗癌药物、抗菌药物、化学致癌物和纳米制剂等的毒代动力学详见各有关章节。

第三节 毒代动力学与药代动力学联系与区别

毒代动力学和药代动力学两者间既有区别,又相互联系。

毒代动力学研究不同于药代动力学研究,药代动力学是在治疗剂量下研究药物在体内的处置特性及其与效应之间的关系,描述药物或代谢物的基本药物动力学参数和特征,用于指导临床合理用药;药代动力学研究所用剂量与给药途径均可能与毒性试验不同,与毒性研究之间缺乏相同性,对毒性研究的价值极为有限。毒代动力学中所用高剂量水平会导致体内药物的溶解性、稳定性、吸收、消除、蛋白结合率及代谢等发生变化,因此毒代动力学侧重于药物毒性研究中的动力学,提供了毒代动力学参数及全身暴露与毒性的关系,在解释毒性试验结果和临床人体用药风险性、安全性时可提高毒理学资料的价值。毒代动力学已成为毒性试验的组成部分,成为临床前和临床试验间的桥梁,其研究重点是解释毒性试验结果,而不是描述受试物的基本药代动力学参数特征。如果在毒性试验中测定了合适的指标或参数,毒代动力学研究可避免重复的毒性试验。有时,模拟毒性试验的支持研究也可获得相应的毒代动力学数据,获取数据的优化设计可以减少试验动物数。毒代动力学与药代动力学的主要区别如表 1-1 所示。

毒代动力学与药代动力学研究的内容均为药物在体内吸收、分布、代谢、排泄随时间动态变化的研究。毒代动力学与药代动力学的试验原理和分析方法是基本相同的,技术可以共享或相互借鉴。已获取的药代动力学参数可以为毒代动力学和毒性试验给药方案的设计提供参考。药代动力学研究结果对毒代动力学试验设计有直接的参考价值。药物组织分布研究结果可为评



价药物毒性靶器官提供依据。药物与血浆蛋白结合试验的结果也是估算血药浓度与毒性反应关系的依据，生物转化研究所提供的代谢产物资料有助于判断可能引起毒性反应的成分和毒代动力学研究应检测的成分。

表 1-1 毒代动力学与药代动力学的主要区别

	毒代动力学	药代动力学
研究内容	毒性剂量下药物在体内处置的时间过程。可引起不可逆的严重疾病甚至死亡	无毒性反应动力学特征
研究对象	动物	动物、人
研究方法	传统的药代动力学研究方法、不可逆的药代动力学方法（如致癌性试验）	药代动力学研究方法
研究重点	解释毒理学发现	描述药代动力学参数
研究剂量	通常高于药理剂量或人体治疗剂量，有时高于药效剂量几个数量级	药理剂量或人体治疗剂量
动力学	增加剂量可能导致非线性动力学（但并非意味着剂量不可以递增或毒性反应无效）	药理学剂量的药物处置通常符合线性动力学
母体药物及其代谢物	毒性研究剂量下，药物在各系统的处置可能是过饱和的	在体内通常被认为是不饱和的（依赖于体内的药物浓度）

第四节 毒代动力学研究实验设计

一、暴露量评估

毒代动力学试验的基本目的是评估受试物或代谢物的全身暴露量，常通过适当数量的动物和剂量组来开展研究。毒代动力学研究所用动物数量至少应能获得足够的毒代动力学数据。研究中常采用两种性别动物，暴露测定也应包括两种性别的动物。选择单性别动物时应说明特殊理由。

暴露评估应考虑：蛋白质结合、组织摄取、受体性质和代谢特征的种属差异；代谢物的药理活性、毒理学作用和生物制品的抗原性。在血浆浓度相对较低时，特殊的组织或器官也可能会有较高水平的受试物和/或代谢物存在。对于高蛋白结合的化合物，用游离浓度来表示暴露则更为合适。

暴露评估中需关注血浆或体液中代谢物浓度的情况有：1) 受试物为“前体化合物”且其释放的代谢物为主要活性成份；2) 受试物可被代谢为一种或多种具有药理或毒理活性代谢物，且代谢产物可导致明显的组织/器官反应；3) 受试物在体内被广泛代谢，毒性研究仅可通过测定血浆或组织中的代谢物浓度来进行暴露评估。

二、给药方案

毒代动力学试验的给药方案设计应完全参照毒性试验研究方案，包括给药剂量、途径、动物种属选择和给药频率、周期等。

毒性研究的剂量设置主要依据受试动物的毒理学发现和药效反应确定，通常选择低、中、高 3 个剂量。低剂量最好是无毒性反应剂量，通常依毒理学的考虑而定，但应测定全身暴露量。

任何毒性研究中的动物暴露，在理论上应等同于或刚刚超过病人拟用的（或已知的）最高剂量，但这种理想状态并非总是可以达到。根据毒性研究目的，中等剂量的暴露通常是低剂量暴露的合适倍数和高剂量暴露的合适分数。在毒性研究中，高剂量通常依毒理学的要求而定，但所用剂量应达到可评价的暴露。当毒代动力学数据表明化合物的吸收特性限制了母体化合物和/或代谢物暴露，且无其他剂量限制因素存在时，该化合物能达到最大暴露的最低剂量将被认为是可采用的最高剂量。此外，高剂量设计需考虑剂量限制性的受试物效应、吸收饱和、最大的可行性给药剂量。当吸收过程限制了化合物或其代谢物的暴露水平时，达到最大暴露的最小剂量可认为是高剂量。当增加剂量导致非线性动力学时，应特别注意其与毒性研究中毒性反应的关联性，非线性动力学并不意味着剂量不可以递增，也不意味着不会有新毒性反应出现。

改变给药途径（例如吸入、局部或非肠道给药）毒代动力学的研究应根据受试物在拟给药途径下的药代动力学性质，需要根据临床给药途径采取合适的非临床给药途径。对某一药品，有时会被改变临床给药途径，例如一种口服剂型开发的产品后来被作为静脉给药途径开发。在此情况下，必须确定改变临床给药途径是否会明显缩小安全范围。改变给药途径时应该比较现有的和拟定改变的给药途径下母体化合物和/或其相关代谢物（ AUC 和 C_{max} ）的全身暴露。如果新途径导致 AUC 和/或 C_{max} 的增加或代谢途径的改变，则应考虑继续进行动物毒理学和动力学研究以保证安全性。如果推荐的新途径与现有途径相比，进入体内的药物无显著增加或改变，则附加的非临床毒性研究可侧重于局部毒性实验。

（一）样品采集

伴随毒代动力学研究中，体液采集的时间点应尽量达到所需的频度，但不可过于频繁以至于干扰正常进行的研究并引起动物过度的生理应激反应。每项研究中的时间点数量应满足暴露评价的要求，时间点的确定应以早期毒性试验、预试验或剂量探索毒性试验以及在相同动物模型或可以合理外推的其他动物模型上获得的动力学数据为基础。

应该考虑样品是从所有的试验动物采集，还是从一定代表性的亚组或卫星组动物来采集。通常情况下，在大动物的毒性试验中毒代动力学数据从主研究试验动物收集，而啮齿动物的毒性试验中毒代动力学数据可从卫星组试验动物收集。

采集血样的前提是受试物在血浆中的暴露量与作用靶点或毒性靶点的受试物浓度存在动态平衡关系，并且受试物容易进入动物和人的全身系统，否则，可能需要考虑采用尿液、其他体液、靶组织或器官来测定受试物浓度。

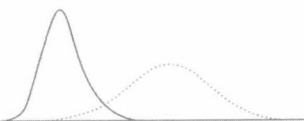
（二）分析方法

毒代动力学的分析方法应基于早期建立的分析物和基质的分析方法，且要根据代谢和种属差异而定。毒代动力学研究使用的分析方法对于被测物来说应该是特异性的，而且应有足够的精确度和精密度，检测限应满足毒代动力学研究时预期的浓度范围。分析物和基质分析方法的选择应排除样本中内源性物质可能引起的干扰。通常选择血浆、血清或全血作为毒代动力学研究的基质。

（三）毒代动力学参数

毒代动力学研究是通过测定合适时间点样品浓度来计算动力学参数的。暴露程度可用原型化合物和/或其代谢物的血浆（血清或全血）浓度或 AUC 来表示。某些情况下，可采取测定组织中的受试物浓度。

用于评价的毒代动力学参数通常有：血浆（血清或全血） AUC_{0-T} 、 C_{max} 、 T_{max} 。有时也仅开展毒代动力学的监测或特征的研究。



（四）数据统计与评价

暴露评价的数据需有代表性。由于动力学参数多存在个体差异，且毒代动力学资料多来源于小样本的动物，因此通常不需要高精度的统计学处理。应注意求算平均值或中位数并评估变异情况。某些情况下，个体动物暴露评价的数据或许比经整理、统计分析过的成组资料更为重要。

在评估毒代动力学连续给药引起的受试物体内蓄积问题时，不仅要观察是否出现蓄积现象，还要结合受试物半衰期长短、受试物暴露对关键代谢酶或转运体的影响等方面进行分析，并注意种属差异。

（五）报告

完整的毒代动力学资料应包括对毒代动力学研究结果的自身评价和对毒性反应的相关解释，并报告分析方法，说明测试中所选基质和分析物的理由。毒代动力学的结果分析应比较分析受试物和/或其代谢物的药效、毒性、药代和临床拟定用药的暴露量，采用暴露量来评价受试物的安全范围。可以参考 2002 年 ICH 颁布的“M4S (R2) Nonclinical overview and nonclinical summaries of module 2 Organisation of module 4”来组织毒代动力学报告。

参考文献

Cayen MN. Considerations in the design of toxicokinetic programs. Toxicol Pathol. 1995, 23(2): 148-157.

第二章 药物理化性质用于 毒物代谢动力学研究

药物分子的内在理化特性是药物毒代动力学特性的基础,本章对药物解离常数、溶解度、亲脂性、渗透性、粒度、手性和稳定性等基本理化性质的机理、研究意义和测定方法进行分类阐述。药物的理化性质不同,与生物膜、受体相互作用或结合的程度不同,由此产生了不同的毒性效应。因此,在药物高通量筛选阶段对药物理化性质的预测和测定,可以筛除大量理化性质不良的化合物;在药物研发中后期,理化性质的研究可以提示药物药效和毒效机制的可能原因,为整个药物研究提供方向性指导。另外,选择并优化生物体内的药物浓度的测定方法是获得可靠毒代动力学数据的必要条件。而药物的理化特性对于毒代动力学研究时选择合理的样品前处理和分析方法是非常重要的。

第一节 解离常数

理论上来说,能够接受质子并产生正电荷阳离子的化合物称为碱性化合物(Bases),质子化的阳离子称为共轭酸;能够去质子产生负电荷阴离子的化合物称为酸性化合物(Acids),去质子化的阴离子称为共轭碱。还有一些化合物既能获得也能失去质子,在不同的 pH 条件下以阳离子、阴离子或不电离的分子状态存在,这些化合物被称为两性电解质(Ampholytes)或两性离子(Zwitterions)。

以 1999 年的药物索引为基础的统计表明,在当时应用的 51 600 个药物中 63% 的药物是可以离子化的,这其中 67% 是碱性药物,15% 是酸性药物,18% 是两性化合物。约 95% 以上的药物均含有可离子化基团,都可以离子化。可离子化的药物或类药物分子在 pH1-13 范围内以电离或不电离的状态存在。这些可离子化的药物中大部分为碱性化合物,少部分为酸性化合物。酸或碱的强度用电离常数(Ionization constant, K_a)表示。 K_a 还有解离常数(Dissociation constant)、平衡常数(Equilibrium constant)和质子化常数(Protonation constant)等名称。 K_a 也常用其负对数($-\log_{10} K_a$)表示,即 pK_a 。

一、弱酸、弱碱的 pK_a

通常命名法使用 AH 代表弱酸, B 代表弱碱。对于一元酸碱来说,其电离化学反应式为:酸性化合物:



$$pK_a = -\log \left(\frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \right) \quad (2-2)$$

碱性化合物:



$$pK_a = -\log \left(\frac{[H^+][B]}{[HB^+]} \right) \quad (2-4)$$

当 $[A^-]=[HA]$ 或 $[B]=[HB^+]$ 时, $[H^+]=K_a$ 。因此对于单电离化合物,当溶液中离子组分和中性

分子组分相等时 $pK_a = pH$ 。等式 (2-2) 和 (2-4) 可以用 Henderson-Hasselbalch 方程描述:

酸性化合物:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (2-5)$$

碱性化合物:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HB^+]}{[B]} \quad (2-6)$$

如式 (2-5) 和 (2-6), 由于 pK_a 是一个特定的平衡常数, 当 pK_a 已知时, 即可计算不同 pH 条件下溶液中离子和中性分子的浓度。对于酸性化合物, 当溶液 pH 下降时, 溶液中中性分子浓度增大, 阴离子浓度减小, 而碱性化合物在 pH 下降的时候, 溶液中中性分子浓度减小, 阳离子浓度增大。

同样, 酸性化合物的酸性越强, pK_a 越小; 而碱性化合物碱性越强, pK_a 越大。一个化合物分子电离态和分子态的相对浓度 (百分率表示) 和 pK_a 可用图形来表示。

对于酸性化合物, 典型离子态图如图 2-1 所示。

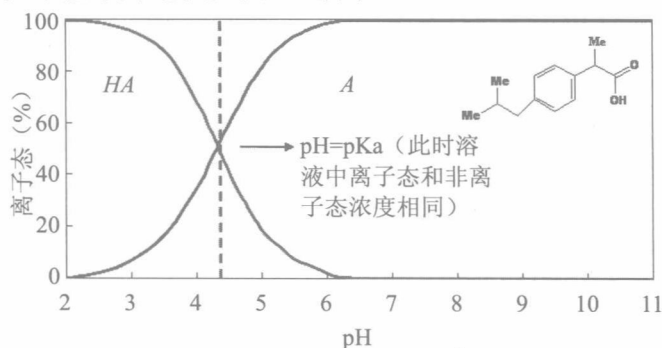


图 2-1 以布洛芬的离子分布为例, $pK_a = 4.35$, 当 $pH 5$ 时, 约有 18% 的布洛芬呈非离子态, 而这个 pH 正是空腹状态下十二指肠和空肠的 pH

$$[A^-] = \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \quad (2-7)$$

$$[HA] = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad (2-8)$$

对于碱性化合物, 典型离子态图如图 2-2 所示。

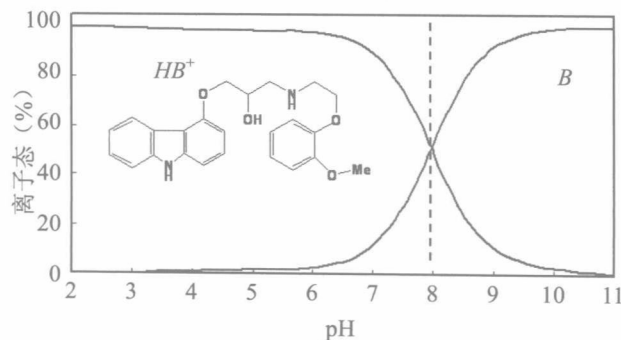


图 2-2 以卡维地洛的离子分布为例, $pK_a = 7.97$, 当 $pH 6.8$ 时, 约有 6.3% 的卡维地洛呈非离子态, 而这个 pH 正是空腹状态下十二指肠和空肠的 pH

$$[B] = \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \quad (2-9)$$

$$[HB^+] = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad (2-10)$$

多元酸和多元碱的 K_a 和不同离子态的相对浓度计算见 Butler 等人的专著^[1]。

二、两性化合物的 pK_a

相对于 AH 和 B , XH 常用来代表两性化合物。两性化合物是指至少有两个 pK_a 值的分子, 且电离的基团其中至少一个是酸性一个是碱性。如图 2-3 和 2-4 所示, 氯碘羟喹和氨苄西林分子均有两个 pK_a 。对于氯碘羟喹(两性电解质), 碱性离子 pK_a 低于酸性离子的 pK_a , 所以在两个 pK_a 之间的 pH 范围内, 分子呈中性。然而, 氨苄西林(两性离子)的酸性离子 pK_a 低于碱性离子的 pK_a , 在整个 pH 范围内, 其分子均呈离子态。两性电解质更具有亲脂性, 且它们在中性状态下溶解度最低。然而, 两性离子在不同的 pH 条件下电离成不同的离子, 其分子较多为亲水性, 在不同 pH 的水溶液中都易溶解的。它们的特殊性质可以用 XH 统一表示, XH 代表了能同时存在的两种分子状态 XH^0 (中性离子)和 X^+ (电离离子)。若酸性 pK_a 远低于碱性 pK_a , X^+ 离子为主; 若碱性 pK_a 远低于酸性 pK_a , XH^0 离子为主; 如果酸碱性 pK_a 相当, 那么两种离子共存。

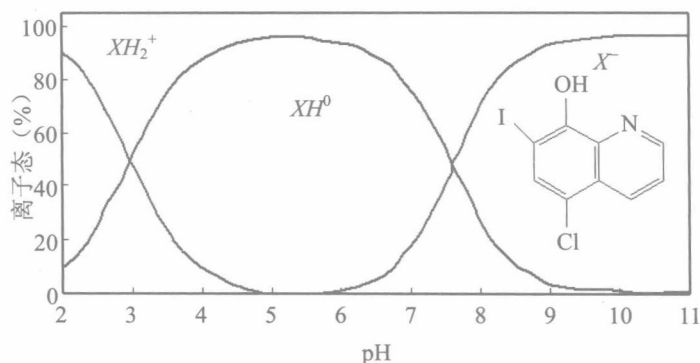


图 2-3 两性电解质氯碘羟喹的离子分布图, 其中碱性 $pK_a = 2.96$, 酸性 $pK_a = 7.60$ 。

氯碘羟喹在肠道 pH 条件下呈非离子态

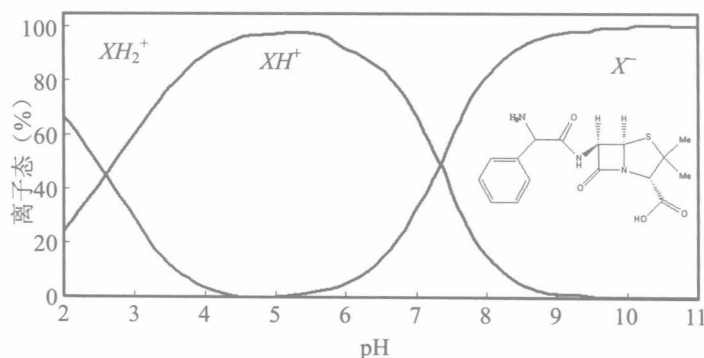


图 2-4 两性离子氨苄西林的离子分布图, 其中碱性 $pK_a = 7.14$, 酸性 $pK_a = 2.55$ 。

氯碘羟喹在所有 pH 条件下均呈离子态

两性电解质或两性离子的 K_a 和离子浓度计算公式如下: