

【综述】

放射性同位素示踪技术在药物研发过程中的应用

李亚卓^{1,2}, 慈小燕^{1,2}, 伊秀林^{1,2}, 曾勇^{1,2*}, 刘昌孝^{1,2*}

1. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 药物的吸收、分布、代谢和排泄过程决定了药物分子在体内的过程和命运。作为常规生物样本检测技术的有效补充, 放射性同位素标记示踪技术如今也被广泛应用于药物发现和开发过程中的各个阶段。特别是其高灵敏性、适用范围广的特点使其具有不可比拟的优势。通过对近年来放射性标记技术在药物评价领域中的应用进行了归纳和梳理, 为药物研发相关领域研究人员提供可借鉴的参考。

关键词: 放射性同位素示踪; 跨膜转运; 药物转运蛋白; 药物代谢; 药物安全性

中图分类号: R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)07-1348-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.037

Application of radiolabeled isotope tracing technology in drug development

LI Yazhuo^{1,2}, CI Xiaoyan^{1,2}, YI Xiulin^{1,2}, ZENG Yong^{1,2}, LIU Changxiao^{1,2}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, State Key Laboratory of Drug Technologies and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co. Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: The *in vivo* process and fate of drug molecules are determined by its absorption, tissue distribution, metabolism and excretion. As an effective complementary to conventional biological sample measurements. Radiolabeled isotope tracing technology has been widespread applied in all stages of drug discovery and development. Due to its high sensitivity and applicability, the radiolabeled approach exhibits advantages. In the review, the application of radiolabeled tracing technology has been reviewed and summarized, which may provide valuable information for scientists in this field.

Key words: radiolabeled isotope tracing; permeation across membrane; drug transporter; drug metabolism; safety assessment

药物的吸收、分布、代谢和排泄(ADME)研究是新化学分子实体开发过程中最重要的研究内容之一,也是药物注册过程中不可缺少的关键部分。相对于常规生物样本检测技术,放射性标记示踪技术优势明显,例如生物体对标记与非标记的药物分子不做区分,两者所表现的生物学特征是一致的,同时,放射性核素通过衰变释放可被检测的射线信号进行物质定量和定位,可以避免生物基质的干扰。在CFDA发布的《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》中也指出了放射性同位素示踪技术在药

动力学研究过程中的应用价值和优势。随着放射性标记技术的迅速发展,在药物发现和开发阶段中的应用也越来越广泛。本文对近年来放射性同位素在药物研发中的应用进行了梳理和总结,特别是该技术在体外、体内动力学和药物安全性评价领域中的价值和优势,以及放射性标记检测新技术的应用,以期能为药物研发企业、相关领域研究人员提供新的可借鉴的参考。

1 放射性同位素示踪剂的选择

在放射性标记示踪中,除了放化纯度和比活度

收稿日期: 2018-01-30

第一作者: 李亚卓, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为药理学。Tel: (022)84845243 E-mail: liyz@tjipr.com

*通信作者: 曾勇, 男, 研究员, 研究方向为药理学。E-mail: zengy@tjipr.com

刘昌孝, 中国工程院院士。Tel: (022)23006860 E-mail: liuchangxiao@163.com

外,选择合适的放射性核素和标记位置至关重要。常用的核素有 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等,其中 ^{14}C 和 ^3H 是药动学研究中最常用的放射性核素,其特点首先是它发出的是很安全的低能 β 射线,易于防护并可用液闪技术测得,实验操作及结果检测十分方便,特别是 ^{14}C ;其次由于其半衰期长(5730年),在实验中测得的数据结果计算时不需要作物理半衰期的矫正。 ^{14}C 主要应用于小分子药物的示踪研究,在标记位点的选择时,一般应首先考虑对分子结构中的芳香环或脂环上的C原子进行标记^[1-2],而尽可能避免在羧基、羟基、巯基、氨基等活性部位进行标记,还应远离化学键断裂位置,因为一旦这些不稳定基团脱离母体化合物,就失去了对母体药物及主要代谢物的示踪能力。目前在小分子化药的放射性同位素应用实例中, ^{14}C 超过80%^[3]。

^3H 特点与 ^{14}C 有些相似(发射低能 β 射线,半衰期12.35年),与 ^{14}C 比其缺点是标记物容易与环境中的 ^1H 原子发生交换,因此稳定性较差。 ^3H 的优点是标记物的合成较为方便廉价,因此在标记物能够满足实验需求的情况下,也常选用 ^3H 标记物作为示踪剂。此外, ^3H 不仅能用于小分子药物ADME研究,还可以用于某些大分子药物(如多糖)的示踪剂。

另外主要用于蛋白/多肽类药物研究的核素是 ^{125}I ,它可以用化学合成法共价结合到酪氨酸或组氨酸的侧链上。 ^{125}I 发射 γ 射线,可以用 γ 计数器检测,由于 γ 射线穿透性较强,样品检测几乎不受基质效应影响。另外 ^{125}I 半衰期较短(59.6 d),放射性废物存放一定时间后,待放射活度降低至环境本底水平,即可按普通废物进行处理,相较于其他核素来说对环保的负面影响较少。

常规实验多采用一种放射性同位素标记待测的药物,但有时原型药物在代谢过程中因化学键断裂同时生成2个重要代谢产物,这时可采取双标记技术的放射性示踪剂,此时最好选用不同能量或发射

不同类型射线的核素,例如 $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}/^{125}\text{I}$ 等^[4-5]。

2 放射性同位素示踪技术在体外研究中的应用

2.1 在体外肠吸收试验中的应用

药物在胃肠道的吸收性可通过药物透过胃肠道的渗透能力评价,此外肠壁细胞内侧存在药物外排泵,可以把已经摄入细胞内的药物外排出去,从而影响药物的吸收与药物的生物利用度。人类结肠腺癌Caco-2细胞系,具有与小肠上皮细胞相似的形态和功能,在透性支持物上培养可完成自动分化,形成具微绒毛以及紧密连接等类似于小肠上皮细胞刷状缘侧的分化特征的单细胞层^[6]。目前,该细胞模型结合放射性同位素示踪技术已广泛用于评价药物肠道渗透能力、预测药物口服吸收利用度及预测药物与外排转运蛋白的亲合力等^[7-9]。

放射性探针药物如 ^{14}C -聚乙二醇4000、 ^{14}C -甘露醇、 ^3H -普萘洛尔等可用于细胞完整性和致密性研究,常作为Caco-2系统的模型药物在各种文献中提到,并被FDA推荐应用^[10-11]。 ^3H -地高辛为推荐的外排型药物转运蛋白P-gp的标准底物,可以作为探针药物用于Caco-2细胞中P-gp的活力验证。总结文献报道及国内外指导原则,结合本实验室研究经历,本文对Caco-2细胞模型常用的放射性工具药及评价标准做出了归纳,可供研究者参考,见表1。因同位素探针药物的测定相较于质谱测定操作简易,耗时短,检测限低,在用Caco-2细胞进行人体生物等效性豁免试验时经常将其作为不同BCS分类的工具药使用。 ^3H -普萘洛尔、 ^3H -美托洛尔、 ^3H -米诺地尔、 ^3H -肌酐、 ^{14}C -二甲双胍、 ^{14}C -甘露醇等目前在本实验室作为不同渗透性工具药用于人体生物等效性豁免试验^[12-13],详细结果见表2。

2.2 在基于药物转运蛋白的体外研究中的应用

从药物研发和临床的观点,药物转运蛋白研究的重要性是集有效性和安全性于一身。药物转运蛋白不仅直接参与药物的吸收、分布、排泄等药动学行为,同时与分布于靶器官的有效药物浓度密切相

表1 不同放射性工具药及评价标准

Table 1 Validation of radioactive medicines and evaluation standard

放射性探针药物	用途	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$	外排率(R_E)/%	给药浓度/ $(\mu\text{Ci} \cdot \text{mL}^{-1})$
^3H -地高辛	P-gp 活力验证	摄入方向 < 1	> 4	1
^3H -地高辛(含维拉帕米)		摄入方向 > 1	< 2	1
^3H -普萘洛尔	细胞完整性验证	< 49	≈ 1	1
^{14}C -甘露醇	细胞完整性验证	< 1	≈ 1	0.5
^{14}C -聚乙二醇4000	细胞完整性验证	< 1	≈ 1	0.5

表2 不同放射性工具药在 Caco-2 细胞单层中在摄入方向的不同时间点的 P_{app} 值

Table 2 Different of radioactive medicines for determining the permeability of the Caco-2 cell monolayer system in uptake direction at different times

BCS 工具药	渗透性类别	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$		
		30 min	60 min	90 min
^3H -普萘洛尔	High ($f_a \geq 85\%$)	18.0±0.232	16.3±0.432	14.6±0.347
^3H -美托洛尔	High ($f_a \geq 85\%$)	12.5±0.676	12.9±0.618	12.3±0.650
^3H -米诺地尔	High ($f_a \geq 85\%$)	4.45±0.194	5.54±0.038	5.99±0.086
^{14}C -二甲双胍	Moderate ($f_a = 50\% \sim 84\%$)	1.77±0.176	1.77±0.047	1.81±0.087
^3H -肌酐	Moderate ($f_a = 50\% \sim 84\%$)	2.14±0.132	1.99±0.125	2.26±0.162
^{14}C -甘露醇	Low ($f_a < 50\%$)	1.22±0.368	1.28±0.225	1.23±0.147

关, 直接影响药效的发挥、药物的体内清除和毒副作用的产生^[14]。因此, 建立有效的药物转运蛋白体外筛选评价体系, 是加速新药研发的有效方法。

本研究室通过基因克隆、基因重组、载体构建、细胞转染等技术, 构建了 20 余人源转运蛋白稳定表达细胞系, 以放射性同位素标记的不同转运蛋白的特异性底物为探针, 用液体闪烁计数仪进行测定, 进行药物与不同药物转运蛋白的亲性和研究。现将

本实验室构建好的人源药物转运蛋白稳定表达细胞系及所用的放射性同位素总结于表 3, 供研究者参考。在细胞模型试验中, 同位素标记化合物的应用是最常见的, 包括 ^3H 和 ^{14}C 两种标记方式。 ^{14}C 标记化合物半衰期长, 且结构稳定, 但 ^3H 的检测灵敏度能达到 ^{14}C 的 1 000 倍左右, 因此在选择放射性标记种类时, 既要考虑标记化合物的稳定性, 还要考虑与转运体的亲和性和检测灵敏度^[15]。

表3 本实验室具备的转运体表达细胞株及使用的放射性探针底物

Table 3 The transporters cell lines in our laboratory present and radioactive probe substrates

药物转运蛋白	细胞株	放射性探针底物
OAT1	S2	^{14}C -对氨基马尿酸
OAT2	S2	^3H -前列腺素 F2 α
OAT3	S2	^3H -硫酸雌酮
OAT4	S2	^3H -硫酸雌酮
OAT7	S2	^3H -硫酸雌酮
OCT1	S2	^{14}C -四乙胺
OCT2	S2	^{14}C -四乙胺
OCT3	S2	^3H -组胺
PEPT1	CHO	^3H -甘氨酸肌氨酸
PEPT2	CHO	^3H -甘氨酸肌氨酸
URAT1	HEK293	^{14}C -尿酸
OCTN1	S2	^{14}C -四乙胺 (TEA)
OCTN2	S2	^3H -L-肉碱
OATP1B1 (OATP2)	HEK293	^3H -硫酸雌酮
OATP1B3 (OATP8)	HEK293	^3H -17 β -雌二醇-17 β -D-葡萄糖苷酸
OATP2B1 (OATP-B)	HEK293	^3H -硫酸雌酮
LAT1	CHO	^{14}C -L-亮氨酸
LAT2	CHO	^{14}C -L-亮氨酸
MDR1/P-gp	MDCK/Caco-2	^3H -地高辛
MRP2 (ABCC2)	Vesicle/Caco-2	^3H -17 β -雌二醇-17 β -D-葡萄糖苷酸
BCRP (ABCG2) S	Vesicle/Caco-2	^3H -硫酸雌酮
BSEP (ABCB11)	Vesicle	^3H -牛黄胆酸盐

2.3 在体外酶代谢中的应用

在药物发现和早期开发阶段, 还没进行人体试验, 体外代谢实验将提供可能在人体内观察到的代谢模式的早期信息, 而放射性同位素示踪技术在体外酶代谢中更是起着无可替代的作用。通常用肝组分(微粒体或S9)或肝细胞获得体外代谢物谱。体外代谢物谱的经典做法是, 将一种药物与肝微粒体等孵化, 然后通过放射性检测和LC/MS/MS对孵化液进行色谱分析, 以追踪和鉴定代谢物^[16]。放射性标记药物作为示踪剂还可以方便地比较药物在不同种属的代谢情况。体外反应表型实验中, 常应用质谱法比较代谢产物和原药的离子化程度等评估代谢产物的相对生成量, 但一旦获得放射性标记药物, 可以应用HPLC-放射性检测法, 通过比较特征放射性峰测定体外代谢表型研究中代谢产物的相对丰度, 然后用特定酶在微粒体等的相对丰度对重组酶的反应速率进行换算^[17]。

2.4 在血浆蛋白结合率和血细胞分配率研究中的应用

血浆蛋白结合在测定药物总的代谢分布中发挥着非常重要的作用。血浆中非结合的药物很容易到达靶器官, 反之结合到血浆蛋白上的药物则很难通过毛细血管壁以及穿透细胞膜^[18]。药物进入血管外空间的能力也由药物在血液成分(如红细胞)中的分配特性决定。红细胞分离和血浆蛋白结合度通常可以通过体外研究评估。测定血浆蛋白结合最可靠的方法是检测平衡透析试验中血浆及缓冲液内游离药物的含量。液质联用方法比较耗时, 涉及到方法建立、方法确证和样品制备等问题, 且还存在基质干扰问题(因血浆蛋白结合实验含有高盐浓度的样品溶液中会产生离子抑制等问题)。相反, 若采用放射性标记化合物研究蛋白结合实验, 则可以通过液体闪烁计数器直接测定药物浓度。而且因其独特的检测特性, 放射性检测也能够获得更加准确的数据。

3 放射性同位素标记在药物体内动力学研究中的应用

药物的吸收、分布、代谢和排泄是药物开发阶段研究中重要的组成部分, 通过获得的药动学参数, 可以很好地阐明药物在体内的动态变化规律。在生物药剂学评价中, 药代参数可以用于评价制剂的特性和质量。而在药效学和毒理学评价中, 药代行为可以为揭示药物的作用机制, 选择适宜的动物种属提供参考, 特别是药物及其相关代谢产物的体内浓

度也与其药效/毒效高度相关^[19]。因此获取药物动力学数据对于药品开发评价就显得尤为重要。

诺和诺德公司通过³H和¹⁴C标记针对其开发的新型长效凝血因子 IX 产品(nonacog beta pegol, N9-GP)进行了完整的动力学特征评价^[20]。吸收动力学、组织分布、排泄数据通过单次静脉注射给予雄性 Wistar 大鼠和犬标记药物后采集样本测定获得。研究结果显示原型药物具有某种程度的两相分布特征, 血浆消除较快(半衰期1~2 d), 而总放射性检测则显示出明显的两相特征, 初始分布1~2周($t_{1/2\alpha}$: 2~3 d)而后表现出较长的末端消除过程($t_{1/2\beta}$: 15~18 d), 长半衰期也与其他PEG化的蛋白末端消除的行为一致。通过放射性表型分析发现血浆中两种主要的放射性标记物分别是完整的N9-GP和40 kDa左右的PEG, 给药后1周左右, 血浆中的主要成分是N9-GP, 而随着N9-GP的降解消除, 游离的PEG的含量上升并且长期存留于血液循环中。另外, 组织分布研究指出N9-GP的放射性多集中于肝和肾脏, 结果与排泄研究一致, 大约有44%和28%的总放射性(³H), 56%和49%的总放射性(¹⁴C)分别经尿和粪便回收。其中最强烈的放射性回收集中于给药后的24 h, 并且约有一半的放射性在给药后2~3周回收。N9-GP的肝肾分布和排泄也通过放射自显影研究得到了进一步的确证。

Lee等^[21]通过对PEG化的血红素SB1进行¹²⁵I标记示踪研究其药动学行为。在分别静脉给予雄性SD大鼠(5、12.5 mL/kg)和beagle犬(10 mL/kg)放射标记的血红素SB1后, 利用伽马计数器检测全血和血浆中的放射信号。大鼠低剂量组给药后血浆 C_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、AUC和 T_{\max} 分别为9.055 mg/mL、9.6 h、79.6 mg/(h·mL)和0.2 h, 全血中 C_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、AUC和 T_{\max} 则分别为4.954 mg/mL、9.7 h、37.6 mg/(h·mL)和0.11 h。而高剂量组给药后 C_{\max} 和 T_{\max} 呈现明显剂量相关性, 分别增加2.1和2.8倍。给予beagle犬后, 血红素 $t_{1/2}$ 显著增加约5倍, 显示出慢消除的特点。相关研究为评估PEG化血红素药理特征提供了数据支持。

除应用放射性标记进行临床前药物动力学研究外, 人体试验中放射性标记也十分重要, GSK开发了一种口服MEK1/2选择性抑制剂曲美替尼并在I期临床研究中通过微量示踪(microtracer)研究了药物在人体内的暴露, 特别是其生物利用度^[22]。先口服给予受试者2 mg未标记的曲美替尼后, 再经

静脉注射给予 5 μg (约 7.4 kBq, 200 nCi) ^{14}C 标记的药物。结果显示曲美替尼的绝对生物利用度约 72.3%, 同时其血浆清除率约为 3.21 L/h。较高的生物利用度和较低的清除率也表明药物的肝脏提取率较低, 首关效应不明显。另外, 药物经口服和静脉给药的消除半衰期为 10~11 d。对于这种长半衰期的药物, 放射微量示踪技术就体现出了明显优势, 例如可以避免传统交叉试验中的较长的清洗期, 因此可以让受试者无需等待就可以接受其他药物治疗或者招募正在清洗期的病人进入新的试验研究。

4 放射性同位素示踪技术在物质平衡、代谢机制中的应用

在药物临床前开发和早期临床研究阶段, 通过收集动物或受试者的排泄物 (包括粪、尿和胆汁) 可以进行物质平衡研究, 进而获取受试药物的排泄途径和排泄速率, 以及进行代谢产物鉴定和药物吸收行为估计。在物质平衡研究和代谢机制研究方面, 放射性同位素标记结合传统 LC-MS 法已经显示出了明显优势。

基因泰克公司在研究曲妥珠单抗-Emtansin 偶联物组成中的微管抑制剂 DM1 的代谢过程中通过静脉单次给药给予了 SD 大鼠 ^3H 标记的 DM1^[23]。研究指出放射性从血液中快速消除, 并分布在主要器官。给药 5 d 后, 近乎 100% 的总放射性通过粪便进行了回收, 其中胆汁排泄占据了药物主要的排泄途径 (3 d 回收了 46%), 而尿液排泄不足 5%。另外除胆汁样本分析提示原型药物占比较小外, DM1 的代谢产物主要通过氧化、水解、S-甲基化和结合反应生成。结果表明 DM1 在体消除快速, 并且药物代谢途径广泛, 同时主要通过肝胆途径排除体外。

Richter O 等^[24]在近期针对一种口服 MEK1/2 高选择性抑制剂 Pimasertib 进行了完整的人体药理学研究时使用了放射性同位素标记。受试者分别接受静脉推注 2 μg (约 9 kBq) 和口服 60 mg (约 2.6 MBq) ^{14}C 标记的 Pimasertib。研究结果表明口服给药后 85.1% 的总放射性可以在排泄物中回收, 其中药物主要通过尿 (52.8%) 和粪便 (30.7%) 排泄, 另外 78.9% 的放射性是以代谢产物的形式存在, 并且找到了两种血浆中主要的代谢产物。

由于放射性同位素更高的灵敏度, 通过给予动物或者受试者放射性标记的物质后采集排泄物样本可以获得比传统生物检测方法更好的物质平衡研究结果, 结合药理学结果可以更好地对原型药物和代

谢产物进行鉴定和定量分析。尽管通常条件下, 放射性标记技术可以达到总放射性回收率 85% 甚至更高, 但是低回收率情况也时有发生, 例如样本收集不完全, 特别是对于大动物 (beagle 犬、猴) 难以完全收集其排泄物, 同时笼具清洗困难; 另外放射标记位置选择也会决定放射性回收, 那些可以断裂进入内源性代谢途径的位点可以导致标记部位最终代谢为 $^{14}\text{CO}_2$ 而从呼吸道排出^[25], 因此在选择动物种属和标记位点是应全面考虑, 尽可能避免造成低回收的情形出现。

5 放射性同位素示踪技术在药物安全性评价中的应用

药物及其代谢产物需要在开发阶段进行动物和人体实验研究其暴露程度以确保药物相关物质的安全性。在 ICH 非临床安全性评价研究指南《Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals》中对于超过 10% 总暴露量的代谢产物要求进行评估^[26], 而以非放射性标记方法测定所有代谢产物的暴露量通常是不可靠的, 特别是对于那些有很多代谢产物的药物, 而单剂量给予放射性标记的药物则可以很好解决这些问题。

以利希普坦 (Lixivaptan) 为例, Prakash C 等^[27]利用口服单次给予受试者 ^{14}C 标记的利希普坦后采样进行血浆中代谢产物的表征和定量分析, 与临床前毒理研究所得代谢产物数据进行比较发现代谢产物的差异。对于广泛代谢的利希普坦, pyrrolocoxylic (M5) 和 anthranilic acid (M6) 被鉴定是利希普坦的主要代谢产物, 其中 anthranilic acid 在人体、大鼠和犬上都被证实是主要代谢产物, 而 pyrrolocoxylic acid 在大鼠和犬上暴露则相对低得多。另一个吡咯烷酮代谢产物 M3 在大鼠和犬上被确证为主要代谢产物, 而在人体试验中 M3 难以与另外 2 个代谢产物 M1 和 M2 进行区分, M3 的作用因此难以在人体上确证。除了主要代谢产物外, 研究还找到了另外 6 个代谢产物, 其中 M6、7、8 的暴露量均高于大鼠或犬上的含量, 而 M1、2、3 的暴露相较于动物则低得多。另外还有其他未能指认的成分, 但是总暴露量低于 5%, 因此与药物的安全性相关性较弱, 可不做过多关注。尽管在人体上唯一暴露的代谢产物情况比较罕见, 更多的情况还是药物的代谢产物表型种属差异小, 而暴露量存在明显差别, 因此 FDA 指南建议在早期药物开发

阶段进行药物代谢差异分析^[28]。另外启动大规模临床研究前需要明确药物代谢产物的类型和种属差异,因此尽可能早的进行代谢产物表征和确证就显得十分迫切。

6 放射性标记检测新技术

在放射性同位素检测应用中,液体闪烁分析(liquid scintillation counting, LSC)、流动液体闪烁分析(flow scintillation analyzer, FSA)和微孔液体闪烁分析(microplatescintillation counting, MSC)通常作为在线或离线检测器与传统分析方法联用进行代谢产物分析、结构确证和定量分析。而正电子发射断层成像技术(positron emission tomography, PET)包括PET/CT和PET/MRI作为一种高灵敏的非侵入式成像技术正在被大量应用于药物开发的临床和非临床研究阶段^[29-33]。PET通过给予受试者或者动物¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F等缺中子同位素,基于这些元素衰变同时释放正电子的特性,并结合湮灭反应过程中产生光子强度不同的特点通过计算机处理放大进行影像重建,进而从分子水平反映组织器官病理生理、生化代谢、功能性改变或体内受体分布。PET技术除了在疾病早期筛查和诊断外(如病灶定位),PET也可以对于药物的在体过程进行精确定位。例如将¹⁸F标记的脱氧葡萄糖(FDG)给予受试者后通过其分布进行癌症筛查,通常健康的甲状腺中FDG含量很低,而异常高水平的FDG可根据其摄取方式作为慢性甲状腺炎或肿瘤恶性程度的判定指标^[34]。另一个PET技术的成功应用则是利用¹¹C标记的维拉帕米研究环孢霉素对P-gp底物摄取的抑制作用^[35]。作为血脑屏障中最重要的外排型转运体,P-gp控制着很多药物包括抗肿瘤药物的外排过程。但是由于难以检测,因此在体研究P-gp抑制剂的作用极为困难。Muzi等^[35]通过给予健康受试者¹⁵O标记的水分子进行血流评估,之后注射¹¹C标记的维拉帕米进行P-gp功能评估。通过比对是否给予环孢素A的条件下¹¹C标记的维拉帕米的动态影像数据定量,发现环孢素A对于P-gp的抑制可显著提高脑组织中维拉帕米的含量约73%,因此通过这种非侵入方式可以方便地对P-gp介导的药物脑组织中的暴露影响,特别是其抑制剂进行研究。尽管PET技术灵敏、分辨率高,但是相对于其他稳定同位素,PET所用同位素半衰期一般较短,¹¹C和¹⁸F的半衰期分别只有约20 min和2 h,这为制备放射标记的化合物提出了相当高的要求,同时组织分布

研究也只能在较短的时间里完成。当然较短的半衰期也减少了在体研究过程中对放射剂量调整的要求。

除PET技术外,另一种近些年来被广泛应用的放射性同位素检测技术是加速器质谱技术(accelerator mass spectrometry, AMS)^[36-38]。作为传统放射性检测技术的补充和替代方法,加速器质谱现在多与液相或液质联用进行生物样本的定量分析。AMS通过测量样本中碳同位素的比例(¹⁴C/¹²C)进而对含¹⁴C标记的待测物进行定量^[39]。与依赖同位素衰变的传统检测技术相比,AMS极大地提高了检测的灵敏度,相较于液闪检测可提高至约3千万倍^[40]。随着检测灵敏度的提高,含¹⁴C标记的化合物的给药剂量也可以随之大幅下降。除此之外,AMS检测物质单一、不受化合物结构和基质效应的影响,也很好弥补了传统LC-MS检测技术的不足。

基于技术发展,AMS现如今已经被大量应用于药物研究,特别是药理学领域中。微量给药(通常也指0期临床研究)可以通过给予人体常规治疗剂量的1%甚至更低的水平来获得药物的动力学参数,例如吸收动力学、组织分布、代谢和排泄。由于给药剂量有限,监管机构对此也准许免于在研新药申请即可进行有限人体实验用以采集相关数据^[41]。尽管微量给药与常规剂量给药后药物在体过程并不完全一致,但是微量给药研究所得PK数据与常规剂量给药所得结果相关性整体上依然高达80%以上^[42]。另外在代谢产物安全性研究方面,AMS的优势也十分明显。通过给予受试者混有一定比例¹⁴C标记的药物(通常约10 kBq)后检测血浆中总放射性与原型药物含量进行比较,可以直接判断代谢产物的水平并决定是否后续进行代谢产物分析。通过LC-AMS联用可以直接对原型药物及其相关代谢产物暴露水平进行定量分析,并与临床前研究所获得数据进行比对来确证主要代谢产物是否有差别^[39]。

7 放射性同位素示踪技术应用前景

现如今,放射性同位素标记示踪技术在药物开发中,特别是药理学中已经得到了广泛应用,与传统生物检测手段互为补充,相得益彰。除了在药物动力学表征、组织分布、代谢/排泄机制和物质平衡等方面发挥积极作用外,放射性标记还在以下领域显现出了不可比拟的优势:(1)非常规代谢产物鉴定^[43],通过对维莫德吉(Vismodegib)进行¹⁴C标

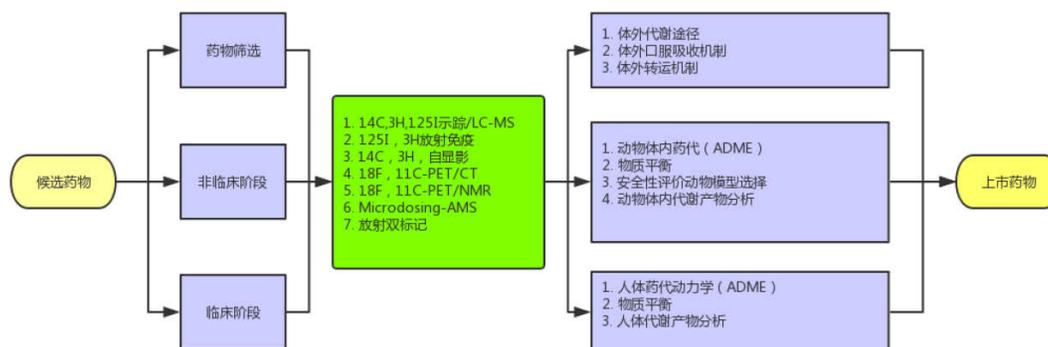


图1 放射性同位素示踪技术在药物评价中的应用

Fig. 1 Application of radioisotope tracer technique in drug evaluation

记研究代谢产物，发现了吡啶环非常规开环过程；(2) 药物的蛋白共价结合 (covalent protein binding, CPB), 药物分子代谢生成活性中间体并与酶或核酸共价结合进而导致功能蛋白失活^[44]，为此默克公司开发了在体和离体 CPB 测试方案来评估候选药物生物激活的可能性^[45]；(3) 生物等效豁免 (BE Waiver), 如果某药物生物利用度超过 90%或者 90%以上药物经由尿液排出, 对于生物药剂学 III 类药物则可以判定为高渗透性^[3]。另外, 新核素的标记应用和新标记方法, 例如双标法^[46-47]研究药物动力学特征和组织分布也使获取相关信息更加方便和准确。

从监管机构和制药企业的认识角度尽管已经对应用放射性标记研究药物特征达成共识, 但是在何时、何种情况下进行放射标记的 ADME 研究尚存争论。通常来讲, 利用体外模型进行早期代谢评估可以有效提高开发效率, 进行跨种属的代谢表型分析可以为临床前毒理研究选择合适动物模型提供相应依据。FDA 也明确鼓励申办方在药物开发阶段通过多种手段获取相关代谢数据, 因而, 尽早通过放射标记技术获取所需数据可以加速药物研发进程, 缩短品种上市进程。

参考文献

[1] Huskey S E, Zhu C Q, Fredenhagen A, et al. KAE609 (Cipargamin), a new spiroindolone agent for the treatment of malaria: Evaluation of the absorption, distribution, metabolism, and excretion of a single oral 300-mg dose of [¹⁴C]KAE609 in healthy male subjects [J]. Drug Metab

Dispos, 2016, 44(5): 672-682.

- [2] Chen Y, Skende E, Lin J, et al. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴C]-dasotraline in humans [J]. Pharmacol Res Perspect, 2017, 5(1): e00281.
- [3] Penner, N, Xu L, Prakash C. Radiolabeled absorption, distribution, metabolism, and excretion studies in drug development: why, when, and how? [J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(3): 513-531.
- [4] Shaffer C L, Langer C S. Metabolism of a ¹⁴C/³H-labeled GABAA receptor partial agonist in rat, dog and human liver microsomes: evaluation of a dual-radiolabel strategy [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(4): 1195-1205.
- [5] Sasahara T, Kobori S, Kasho M, et al. The metabolic fate of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins internalized into HepG2 cells: resecreted lipoproteins as a potent inducer for cholesterol efflux [J]. Atherosclerosis, 1994, 106(2): 179-190.
- [6] 慈小燕, 夏媛媛, 曾勇, 等. 3-乙酰基-11-羰基-β-乙酰乳香酸在 Caco-2 和 MDCK 细胞模型中的吸收研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1162-1167.
- [7] 斯琴朝克图, 黄玲利, 袁宗辉. 放射性同位素标记药物在药物代谢与处置研究中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(13): 10.
- [8] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 175(3): 880-885.
- [9] El-Zein O, Kreydiyyeh S I. Pine bark extract inhibits glucose transport in enterocytes via mitogen-activated kinase and phosphoinositol 3-kinase [J]. Nutrition, 2011, 27(6): 707-712.

- [10] Huang S M, Temple R, Throckmorton D, et al. Drug interaction studies: study design, data analysis, and implications for dosing and labeling [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81(2): 298-304.
- [11] 魏敏吉. 创新药物药代动力学研究与评价 [M]. 北京: 北京大学医学出版社. 2008.
- [12] 人体生物等效性试验豁免指导原则 [S]. 2016.
- [13] 慈小燕. 不同BCS分类药物的肠道渗透性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(1): 63-68.
- [14] 伊秀林, 司端运, 刘昌孝. 应用药物转运体的药代动力学评价 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(5): 341-346.
- [15] 刘昌孝. 中药药物代谢动力学研究思路与实践 [J]. 北京: 科学出版社. 2013.
- [16] McGinnity D F, Soars M G, Urbanowicz R A, et al. Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(11): 1247-1253.
- [17] Proctor N J, Tucker G T, Rostami-Hodjegan A. Predicting drug clearance from recombinantly expressed CYPs: intersystem extrapolation factors [J]. *Xenobiotica*, 2004, 34(2): 151-178.
- [18] Wilkinson G R. Plasma and tissue binding considerations in drug disposition [J]. *Drug Metab Rev*, 1983, 14(3): 427-465.
- [19] 药物非临床药代动力学研究技术指导原则 [S]. 2014.
- [20] Sternebring O, Christensen J K, Bjornsdottir I. Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion, and metabolite profiling of PEGylated rFIX (nonacog beta pegol, N9-GP) in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 92: 163-172.
- [21] Lee J, Lee J, Yoon S, et al. Pharmacokinetics of 125I-radiolabelled PEG-hemoglobin SB1 [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2006, 34(3): 277-292.
- [22] Leonowens C, Pendry C, Bauman J, et al. Concomitant oral and intravenous pharmacokinetics of trametinib, a MEK inhibitor, in subjects with solid tumours [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 78(3): 524-532.
- [23] Shen B Q, Bumbaca D, Yue Q, et al. Non-clinical disposition and metabolism of DM1, a component of trastuzumab emtansine (T-DM1), in sprague dawley rats [J]. *Drug Metab Lett*, 2015, 9(2): 119-131.
- [24] von Richter O, Massimini G, Scheible H, et al. Pimasertib, a selective oral MEK1/2 inhibitor: absolute bioavailability, mass balance, elimination route, and metabolite profile in cancer patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 82(6): 1498-1508.
- [25] Roffey S J, Obach R S, Gedge J I, et al. What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs [J]. *Drug Metab Rev*, 2007, 39(1): 17-43.
- [26] Sjöberg P, Jones D R. Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals: ICH M3 and M3(R2) [J]. *Aaps Adv Pharm Sci*, 2013, 5:299-309.
- [27] Prakash C, Li Z, Orlandi C, et al. Assessment of exposure of metabolites in preclinical species and humans at steady state from the single-dose radiolabeled absorption, distribution, metabolism, and excretion studies: a case study [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(7): 1308-1320.
- [28] FDA. Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry R1 [S]. 2016.
- [29] González Trotter D E, Meng X, McQuade P, et al. *In vivo* imaging of the programmed death ligand 1 by (18)F PET [J]. *J Nucl Med*, 2017, 58(11): 1852-1857.
- [30] Lamichhane N, Dewkar G K, Sundaresan G, et al. (18)F-labeled carboplatin derivative for PET imaging of platinum drug distribution [J]. *J Nucl Med*, 2017, 58(12): 1997-2003.
- [31] Alsaid H, Skedzielewski T, Rambo M V, et al. Non invasive imaging assessment of the biodistribution of GSK2849330, an ADCC and CDC optimized anti HER3 mAb, and its role in tumor macrophage recruitment in human tumor-bearing mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176075.
- [32] Jiang H, Schmit N R, Koenen A R, et al. Safety, pharmacokinetics, metabolism and radiation dosimetry of (18)F-tetrafluoroborate ((18)F-TFB) in healthy human subjects [J]. *Ejnmri Res*, 2017, 7(1): 90.
- [33] Burvenich I J, Lee F T, Guo N, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of 89Zr-DS-8273a as a theranostic for anti-death receptor 5 therapy [J]. *Theranostics*, 2016, 6(12): 2225-2234.
- [34] Tsubaki F, Kurata S, Tani J, et al. Clinical significance of patterns of increased [18F]-FDG uptake in the thyroid gland: a pictorial review [J]. *Jap J Radiol*, 2017: 1-13.
- [35] Muzi M, Mankoff D A, Link J M, et al. Imaging of cyclosporine inhibition of P-glycoprotein activity using 11C-verapamil in the brain: studies of healthy humans [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(8): 1267-1275.
- [36] Prakash C, Shaffer C L, Tremaine L M, et al. Application of liquid chromatography-accelerator mass spectrometry (LC-AMS) to evaluate the metabolic profiles of a drug candidate in human urine and plasma [J]. *Drug Metab Lett*, 2007(1): 226-231.

- [37] Morris C A, Dueker S R, Lohstroh P N, et al. Mass balance and metabolism of the antimalarial pyronaridine in healthy volunteers [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2015(40): 75-86.
- [38] Graham R A, Lum B L, Morrison G, et al. A single dose mass balance study of the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in humans using accelerator mass spectrometry [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011(39): 1460-1467.
- [39] Seymour M A. Accelerator MS: its role as a frontline bioanalytical technique [J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(24): 2817-2823.
- [40] Vogel J S, Turteltaub K W, Finkel R, et al. Accelerator mass spectrometry - isotope quantification at attomole sensitivity [J]. *Anal Chem*, 1995(67): 353A-359A.
- [41] FDA. Guidance for industry, investigators, and reviewers exploratory IND studies [S]. 2006.
- [42] Lappin G, Garner R C. The utility of microdosing over the past 5 years [J]. *Drug Metab Toxicol*, 2008(12): 1499-1506.
- [43] Yue Q, Chen Y H, Mulder T, et al. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴C]GDC-0449 (vismodegib), an orally active hedgehog pathway inhibitor, in rats and dogs: a unique metabolic pathway via pyridine ring opening [J]. *Drug Metab Disp*, 2011, 39(6): 952-965.
- [44] Zhou S, Sui Y C, Goh B C, et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44(3): 279-304.
- [45] Evans D C, Watt A P, Nicoll-Griffith D A, et al. Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development [J]. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17(1): 3-16.
- [46] Munekane M, Ueda M, Motomura S, et al. Investigation of biodistribution and speciation changes of orally administered dual radiolabeled complex, bis(5-chloro-7-[(¹³¹I]iodo-8-quinolinolato)[(65)Zn]zinc [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(4): 510-515.
- [47] Schwab D, Portron A, Backholer Z, et al. A novel double-tracer technique to characterize absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of [¹⁴C]tofogliflozin after oral administration and concomitant intravenous microdose administration of [¹³C]tofogliflozin in humans [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52(6): 463-473.