·实验研究·

应用整体自显影定量技术开展的单多次给药后大鼠组织分布比较研究

何隆孟[1],熊雅婷[1],冯　浩[2],喻振文[1],吴　磊[1],朱轩轩[1],顾哲明[3]
(1 江苏万略医药科技有限公司,南京 211800;2 深圳万略医药科技有限公司,深圳 518000;
3 成都中医药大学,成都 610075)

[摘要] **目的:**应用整体自显影定量技术(QWBA),比较单次和重复多次给药后大鼠体内的组织分布情况,以指导人体放射性物质平衡试验设计。**方法:**按 15 mg·kg^{-1}剂量,分别灌胃给予雄性 Long-Evans(LE)大鼠 0,7 和 14 次的非放射性标记药物 VPS-01(*qd*)24 h 后单次灌胃给予 100 μCi/15 mg·kg^{-1}的[^{14}C]VPS-01(分别定义为 0 +1,7 +1 和 14 +1 给药组);于给予放射性标记药物后的 3,24,168 和 504 h 每组处死 1 只大鼠,收集尸体并立即冷冻。使用大型冰冻切片机(Leica CM3600 XP)切片,适当处理后使用磷显像技术获得切片中各组织和感兴趣区域的放射性强度。**结果:**采用 3 种不同方式给药后总放射性均广泛分布于各组织中,VPS-01 和/或其相关代谢产物与黑色素存在结合的现象。与 0 +1 给药组比,7 +1 给药组中大鼠各组织放射性浓度及暴露量均显著降低;据大鼠组织暴露量估算的人体单次口服[^{14}C]VPS-01 可给予的最大放射性剂量从 61.6 增加到 611 μCi。14 +1 给药组大鼠的组织放射性浓度和暴露量更低,但与 7 +1 组无显著性差异。**结论:**具有组织共价结合导致体内消除缓慢的药物在物质平衡试验中易引起人体放射性暴露量高,如先重复给予受试者数次非放射性标记药物,待人体内达到稳态后单次给予^{14}C-标记药物,可显著降低受试者辐射暴露、加大人体放射性剂量可选择范围并增加循环血液中放射性浓度而易于代谢产物的鉴定。

[关键词] 整体自显影技术;组织分布;人体放射性给药剂量;物质平衡
[中图分类号] R965.2　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)03 - 0259 - 08

Tissue distribution by quantitative whole body autoradiography after single and repeated administration in rats

HE Long-meng[1], XIONG Ya-ting[1], FENG Hao[2], YU Zhen-wen[1], WU Lei[1], ZHU Xuan-xuan[1], GU Zhe-ming[3]
(1 *Value Pharmaceutical Service Co., Ltd.*, *Nanjing* 211800, *China*; 2 *Value Pharmaceutical Service Co., Ltd.*, *Shenzhen* 518000, *China*; 3 *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*, *Chengdu* 610075, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: Tissue distribution after single and repeated doses in rats was compared by quantitative whole body autoradiography technique (QWBA) to guide the design of human radioactive mass balance study. **Methods**: Male Long Evans (LE) rats were given, by gavage, 0, 7 and 14 doses (once a day) of non-radiolabeled drug VPS-01, at 15 mg·kg^{-1}, followed by a single dose of [^{14}C]VPS-01 at 100 μCi/15 mg·kg^{-1}, *po*, at 24 h post last non-radioactive dose (defined as 0 + 1, 7 + 1 and 14 + 1 groups, respectively). And then, after 3, 24, 168 and 504 h of radiolabeled drug administration, one rat from each group was sacrificed and carcasses were collected and frozen immediately, followed by sliced using Leica CM3600 XP. After proper treatment, the radioactivity level of each tissue and region of interest in the slices were obtained by phosphorus imaging technology. **Results**: The total radioactivity of VPS-01 and/or its related metabolites was observed bound to melanin. Compared with 0 + 1

[作者简介] 何隆孟,男,硕士,主要从事药动学研究。E-mail:he_longmeng@walueps.com。
[通讯作者] 顾哲明,男,教授,主要从事药动学研究。E-mail:gu_zheming@walueps.com。

group, the radiation concentration and exposure of rats in 7 + 1 group significantly reduced, and the maximum radiation dose of [^{14}C]VPS-01 in humans could accordingly increase from 61.6 μCi to 611 μCi. However, no significant difference of exposure was observed between 14 + 1 group and 7 + 1 group. **Conclusion**: Drugs with slow elimination due to tissue covalent binding are easy to result in high radiation exposure in the human body in the mass balance study. If the subjects are given non-radiolabeled drugs repeatedly for several times to reach a steady state in human body before a single dose of the ^{14}C-drug is given, the radiation exposure of subjects can be significantly reduced, the optional range of human radiation dose can be increased, and the radioactivity in the circulating blood will be increased, facilitating metabolite identification.

[**Key words**] quantitative whole body autoradiography; tissue distribution; dosimetry; mass balance

药物在体内的物质平衡研究(药物的吸收、分布、代谢和排泄)对评估药物在体内是否存在不成比例代谢产物[1-2]、药物-药物相互作用风险评估[3-5]等提供了重要信息,是新药注册申请资料(NDA)药动学研究中的重要组成部分[6]。在新药研究中,小分子药物(包括抗癌新药)某些情况下需要进行^{14}C 人体物质平衡研究。低能量放射性同位素标记技术因其结果简单、明了、可靠,至今仍被公认为物质平衡研究的"金标准"[7]。

用于物质平衡研究的^{14}C-标记药物属于放射性药物(radioactive drug),需遵循放射性药物的法规对其放射性安全剂量进行确定。常规药物的人体放射性物质平衡试验中每个受试者给予 100 μCi 即可满足放射性检测的要求。但对于存在不可逆共价结合、组织清除缓慢的药物,相同放射性剂量的药物单次给药后,具有部分组织半衰期长、暴露量大等现象;加之血浆蛋白共价结合使得可提取放射性比例随给药后时间逐渐减少,给循环代谢产物鉴定带来较大难度;如果提高放射性剂量将对受试者健康引入更大的风险,不符合伦理的要求。

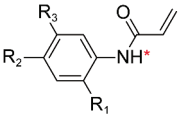
替尼类抗癌药物是一类常见的具有共价结合及组织半衰期较长等特点的化合物[8]。在人体^{14}C-物质平衡试验时,如果单次(即首次)给予^{14}C-标记药物,放射性势必与靶点/蛋白结合较多,可能造成人体内不必要的放射性高暴露。欧洲 EMA 建议对于这种可能存在剂量依赖性消除和多次给药显著蓄积的药物,在开展人体放射性代谢试验时,可先重复给予未标记化合物使其达到稳态后,再单次给予放射性标记化合物[9]。但是,目前尚未见到支持这种给药方式的动物实验数据报道。

本试验在大鼠给予 0,7 和 14 次非放射性标记药物后,单次给予^{14}C-标记药物并采用整体自显影技术(quantitative whole body autoradiography,QWBA)确定各组织放射性分布及消除,比较 3 种不同方式给予放射性药物后相同时间点大鼠各组织放射性浓度、计算放射性暴露量,并估算可给予人体的最高^{14}C-放射性剂量,报道如下。

材料与方法

1 药物与试剂

VPS-01 为替尼类化合物,其结构式(仅共价结合部分)见图 1。^{14}C 标记和非放射性标记的 VPS-01 均为江苏万略医药科技有限公司(简称江苏万略)自购,化学纯度和放化纯度均 >99%,[^{14}C]VPS-01 的放射性给药溶液比活度为 14 807 DPM·μg^{-1};研究中使用的所有其他材料均由商业供应商提供,所有分析试剂均为标准实验室试剂级。



*:^{14}C 的标记位置

图 1 VPS-01 部分结构式

2 仪器

Tri-Carb 4910 TR 液闪计数仪(LSC,Perkin Elmer 仪器公司);OX-501 生物氧化燃烧仪(美国 Harvey 仪器公司);v. ARC™在线放射性同位素检测仪(美国 AIM 研究公司);Leica CM3600 XP 大型冰冻切片机(德国徕卡公司);Amersham Typhoon IP 荧光成像扫描仪(美国 GE 公司)。

3 实验动物

雄性 Long-Evans(LE,含色素大鼠),体重 160 ~ 180 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。动物饲养室为恒温(22.1 ~ 23.1 ℃)和恒湿(40% ~ 60%)环境,照度每 12 h 明暗交替,自由进食和饮

水。每笼 3 只于给药前 24 h 转移至不锈钢笼具中饲养。

4 动物给药与采样

健康雄性 LE 大鼠 12 只,随机分为 3 组,每组 4 只,每天灌胃给药 1 次,分别连续给予 15 mg·kg^{-1}的 VPS-01 0,7 和 14 次;末次给药 24 h 后,每只大鼠灌胃给予 100 μCi/15 mg·kg^{-1}的[^{14}C]VPS-01;并于给予[^{14}C]VPS-01 的 3,24,168 和 504 h 后,每组每个时间点取 1 只大鼠给予过量 CO_2 麻醉,经心脏穿刺采血 0.4 mL 置于含抗凝剂(EDTA-K_2)的离心管中,分装全血后,于 5 100 r·min^{-1}和 4 ℃条件下离心 5 min 获得血浆样品用于放射性分析。采血后尸体置于含正己烷的干冰浴内冷冻用于整体自显影分析。

5 全血和血浆放射性分析

全血样品采用氧化燃烧法,将样品放入生物氧化燃烧仪,在 900 ℃高温环境中充分燃烧 4 min,并用 15 mL 的^{14}C 闪烁液捕获样品燃烧生成的[^{14}C]CO_2 处理后全血样品;血浆样品直接加入到 5 mL 闪烁液中进行处理。经处理后的全血和血浆样品,采用液体闪烁计数仪测定样品中总放射性量。

6 整体自显影定量分析

使用 2.5% 羧甲基纤维素包埋各大鼠尸体、标样及质控样品,在约 -20 ℃条件下,使用 Leica CM3600 XP 大型冰冻切片机进行矢状位切片,每片厚 30 μm。使用 821 型号的 Scotch®胶带将切片转移至固定框上并于 -20 ℃的冷冻切片机箱内脱水处理。

将已脱水切片与暗盒中显像板相贴,并置于铅柜内曝光 3 d。扫描曝光后的显像板并应用 AIDA 软件进行图像分析,获得每平方毫米的光激励发光强度(PSL·mm^{-2})。根据切片中质控样品的标示值(氧化燃烧测定值)与实测值的比值作为该切片的校正因子,利用标准曲线分析并乘以校正因子得到待测组织放射性浓度[10-11]。

7 药动学参数分析

根据全血、血浆和组织样品中的放射性浓度,使用药动学分析软件 WinNonLin 7.0 版以非房室模型计算药动学参数,包括峰浓度(C_{max})、消除半衰期($t_{1/2}$)和药时曲线下面积($AUC_{0\to t}$和 $AUC_{0\to\infty}$)等。

8 人体放射性剂量估算

按照大鼠与人组织器官的相对重量,推算口服[^{14}C]VPS-01 后人体组织可能受到的放射性暴露量及全身总暴露量;然后根据^{14}C 衰变释放出的辐射能量推算人体组织及全身所接受的辐射量。依据国际放射保护委员会对人体全身和器官组织辐射量的限值要求,计算人体单次口服[^{14}C]VPS-01 可给予的最大放射性剂量[12]。

结　果

1 不同给药方式对各组织放射性浓度和暴露量的影响

1.1 组织中的放射性分布 大鼠给予 0,7,和 14 次非标记放射性药物、单次给予^{14}C-标记药物后,采用放射性自显影定量分析技术,获得各组织和感兴趣区域放射性浓度。结果(表 1)显示,3 种不同方式给予[^{14}C]VPS-01 后,放射性分布相似、广泛分布于各组织中(图 2 和图 3),大多数组织的放射性浓度在首个采集时间点 3 h 时最高,之后缓慢消除,给药后 504 h 仍有半数以上的组织可检测到放射性;放射性主要分布于肝肾和胃肠道中,组织中放射性的消除显著慢于血浆;在含色素的组织中,如含色素皮肤和葡萄膜有明显放射性分布,提示 VPS-01 和/或其相关代谢产物与黑色素存在结合。

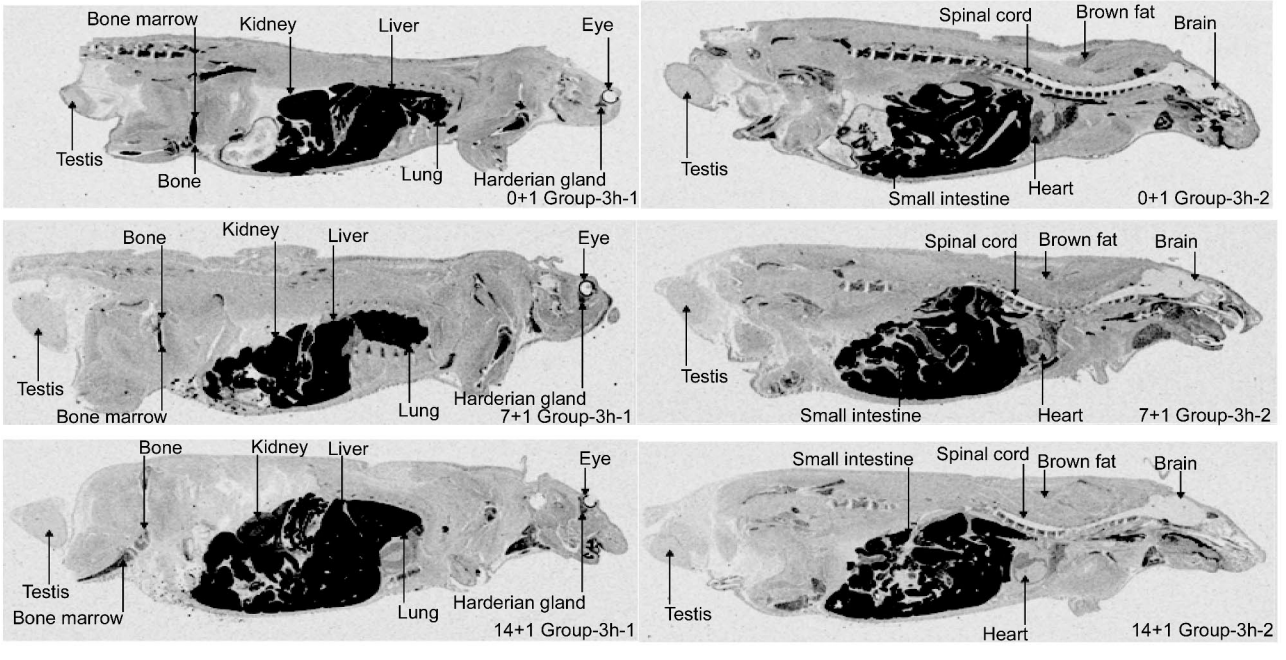
表 1 不同给药方式雄性 Long-Evans 大鼠在给药后全血、血浆和组织中的放射性浓度 nCi·g^{-1}

组织	3 h			24 h			168 h			504 h		
	0+1 组	7+1 组	14+1 组	0+1 组	7+1 组	14+1 组	0+1 组	7+1 组	14+1 组	0+1 组	7+1 组	14+1 组
全血(LSC)	8.04	9.18	6.72	8.63	5.57	7.29	6.33	4.43	4.28	3.39	2.88	2.63
血浆(LSC)	6.86	7.77	5.42	1.46	0.918	1.09	0.157	0.122	0.113	0.0188	0.0150	BLQ2
肾上腺皮质	80.4	67.4	49.1	14.8	11.1	7.29	5.71	4.25	4.09	2.92	1.37	0.545
骨髓(股骨)	5.31	4.51	2.89	4.70	3.87	1.64	1.24	1.03	0.93	0.847	BLQ2	BLQ2
全脑	3.68	3.15	2.83	2.23	2.09	1.40	1.27	0.628	0.563	0.576	BLQ2	BLQ2
棕色脂肪	17.8	15.0	10.1	7.07	5.89	5.85	3.35	2.89	2.06	2.36	1.19	0.861
食道壁	115	52.3	32.6	76.9	20.0	15.8	3.32	0.823	0.672	0.799	0.687	BLQ2
眼睛	22.0	13.9	9.97	54.2	30.6	28.2	31.3	27.9	16.4	22.6	11.9	11.2
心脏	23.1	17.8	13.5	9.24	6.14	4.43	5.06	3.23	2.81	2.72	1.37	1.31

续表 1

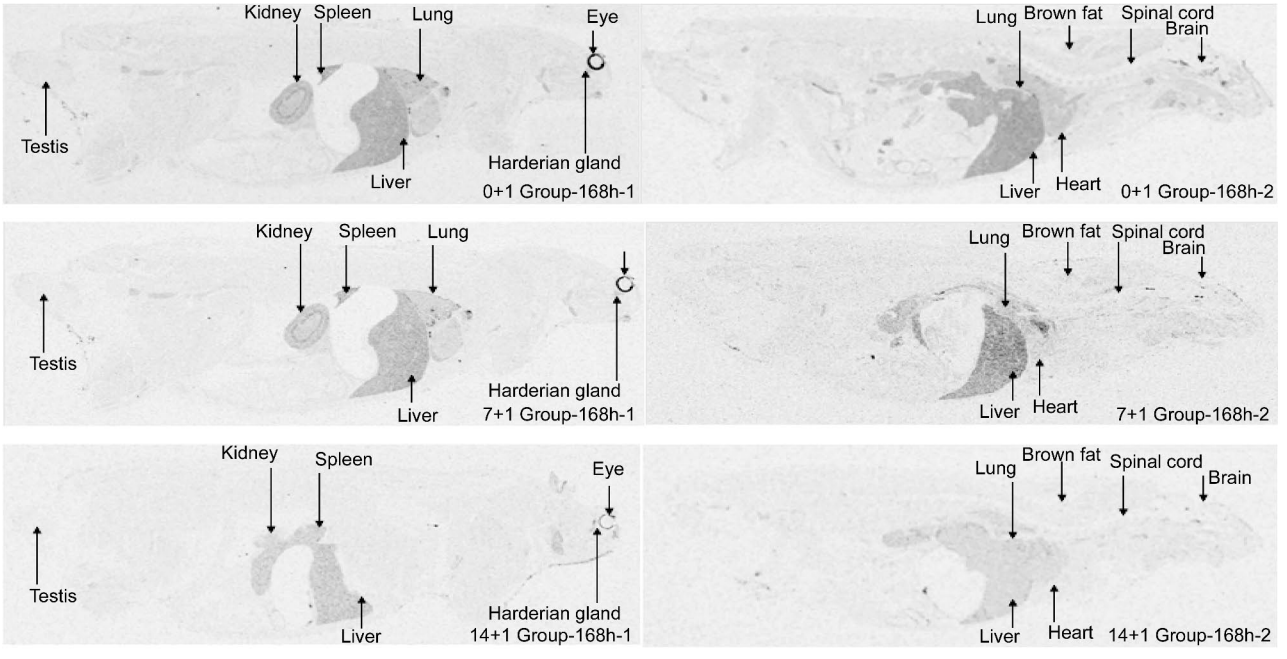
组织	3 h			24 h			168 h			504 h		
	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组
肾脏	94.6	66.0	42.8	68.1	22.0	19.4	9.33	4.41	3.88	2.26	1.28	1.25
晶状体	1.72	1.66	1.54	3.67	3.64	3.12	3.05	1.84	1.72	2.25	1.62	1.2
肝脏	112	109	71.4	46.5	20.8	17.8	12.3	6.30	6.29	2.22	1.44	1.27
肺脏	178	128	96.1	13.9	9.24	7.24	16.1	4.81	3.67	2.61	2.39	1.91
淋巴结(颈部)	38.6	28.1	22.9	20.9	18.3	9.37	5.33	3.57	3.50	3.14	1.43	0.929
肌肉(股骨)	11.3	9.62	8.46	5.55	4.02	3.05	2.48	1.68	1.58	1.31	0.883	0.563
非色素化皮肤	13.5	9.89	6.45	4.88	4.37	2.90	1.30	1.01	0.681	0.556	BLQ2	BLQ2
口腔黏膜	60.5	36.0	28.3	33.5	30.0	13.6	1.29	1.03	0.723	BLQ2	BLQ2	BLQ2
色素化皮肤	13.8	10.6	7.37	9.92	9.17	7.88	1.43	1.29	1.04	0.848	0.781	0.596
垂体	56.1	50.2	38.0	19.3	14.2	8.20	5.39	4.88	4.35	1.63	1.39	0.908
前列腺	17.5	7.96	6.73	3.91	3.57	2.50	1.93	1.11	1.09	0.584	BLQ2	BLQ2
唾液腺	52.5	38.1	27.6	12.2	8.76	6.57	5.37	2.39	2.14	1.68	0.815	0.86
脊髓	3.25	2.87	2.30	1.64	1.50	1.48	1.11	BLQ2	BLQ2	0.535	BLQ2	BLQ2
脾脏	95.3	55.7	44.6	29.8	16.0	13.0	9.58	5.59	4.48	4.77	2.81	1.77
睾丸	7.18	5.73	3.66	4.73	3.04	2.88	1.64	0.913	0.614	0.838	BLQ2	BLQ2
甲状腺	44.2	40.4	27.9	18.7	14.0	12.1	8.75	4.67	3.04	3.17	1.92	1.82
气管	145	17.6	13.8	10.7	4.44	4.45	3.93	2.04	1.35	1.46	1.10	0.676
膀胱壁	24.0	8.67	6.64	9.82	4.06	1.78	2.34	1.05	1.78	0.537	BLQ2	BLQ2
葡萄膜	142	95.1	90.6	546	259	222	683	153	87.0	560	97.4	75.3
白色脂肪(腹股沟)	4.59	4.15	2.56	2.13	2.01	1.29	BLQ2	BLQ2	BLQ2	BLQ2	BLQ2	BLQ2

BLQ1:低于 LSC 法定量下限,即 $<0.01\ nCi\cdot g^{-1}$;BLQ2:低于 QWBA 方法定量下限,即 $<0.5\ nCi\cdot g^{-1}$



切片图像的颜色深浅表示放射性的强弱程度;选取 3 种给药方式给药后 3 h 2 个深度水平(-1 和 -2)切片的整体自显影图像,图像显示 3 种给药方式下 VPS-01 相关放射性分布相似,主要集中在肺脏、肝脏、肾脏、胃肠道系统(大肠、小肠和内容物)和葡萄膜中,少量分布于其他组织

图 2 不同给药方式雄性 Long-Evans 大鼠在给药后 3 h 的代表性切片的自显影图像



切片图像的颜色深浅表示放射性的强弱程度;选取 3 种给药方式给药后 168 h 2 个深度水平(-1 和 -2)切片的整体自显影图像,VPS-01 相关放射性在肝脏、肾脏和葡萄膜中有较高放射性;与 0 + 1 组相比,7 + 1 组和 14 + 1 组放射性在葡萄膜、肝脏和肾脏中分布的量显著降低

图 3 不同给药方式雄性 Long-Evans 大鼠在给药后 168 h 的代表性切片的自显影图像

1.2 不同给药方式组织放射性浓度比较 结果显示(表 2),7 + 1 组和 14 + 1 组大鼠组织的放射性浓度均显著低于 0 + 1 组。以 3 h 大鼠切片放射性检测结果为例:7 + 1 组大鼠所有组织的放射性浓度均显著低于 0 + 1 组;其中低于 50% 以上的组织有气管、膀胱壁、前列腺和食道,低于 25% ~ 50% 的有脾脏、眼等 9 种组织,低于 10% ~ 25% 的有全脑、心脏等 11 种组织,其余 3 种组织也低于 3% ~ 10% 不等;而且,7 + 1 组和 14 + 1 组大鼠组织的放射性消除较 0 + 1 组快(图 4),其中放射性浓度最高的葡萄膜区域的消除速率差异最为显著,在 504 h 时 3 种不同给药方式在该区域的浓度分别是各自峰浓度(C_{max})的 82%(0 + 1 组),38%(7 + 1 组)和 34%(14 + 1 组)。14 + 1 组多数组织放射性略低于 7 + 1 组,但两组间无显著性差异。

表 2 不同给药方式雄性 Long-Evans 大鼠全血、血浆和组织在给药后 3 h 放射性浓度的比较

组织	浓度/nCi·g^{-1}	% Diff		组织	浓度/nCi·g^{-1}	% Diff	
	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组		0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组
全血(LSC)	8.04	-14%	16%	非色素化皮肤	13.5	27%	52%
血浆(LSC)	6.86	-13%	21%	口腔黏膜	60.5	40%	53%
肾上腺皮质	80.4	16%	39%	色素化皮肤	13.8	23%	47%
骨髓(股骨)	5.31	15%	46%	垂体	56.1	11%	32%
全脑	3.68	14%	23%	前列腺	17.5	55%	62%
棕色脂肪	17.8	16%	43%	唾液腺	52.5	27%	47%
食道壁	115	55%	72%	脊髓	3.25	12%	29%
眼睛	22.0	37%	55%	脾脏	95.3	42%	53%
心脏	23.1	23%	42%	睾丸	7.18	20%	49%
肾脏	94.6	30%	55%	甲状腺	44.2	9%	37%

续表 2

组织	浓度/nCi·g^{-1}	% Diff		组织	浓度/nCi·g^{-1}	% Diff	
	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组		0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组
晶状体	1.72	3%	10%	气管	145	88%	90%
肝脏	112	3%	36%	膀胱壁	24.0	64%	72%
肺脏	178	28%	46%	葡萄膜	142	33%	36%
淋巴结(颈部)	38.6	27%	41%	白脂肪(腹股沟)	4.59	10%	44%
肌肉(股骨)	11.3	15%	25%				

$\%\ Diff = [(C_{3\,h})_{0+1组} - (C_{3\,h})_{7+1组或14+1组}]/(C_{3\,h})_{0+1组} \times 100$

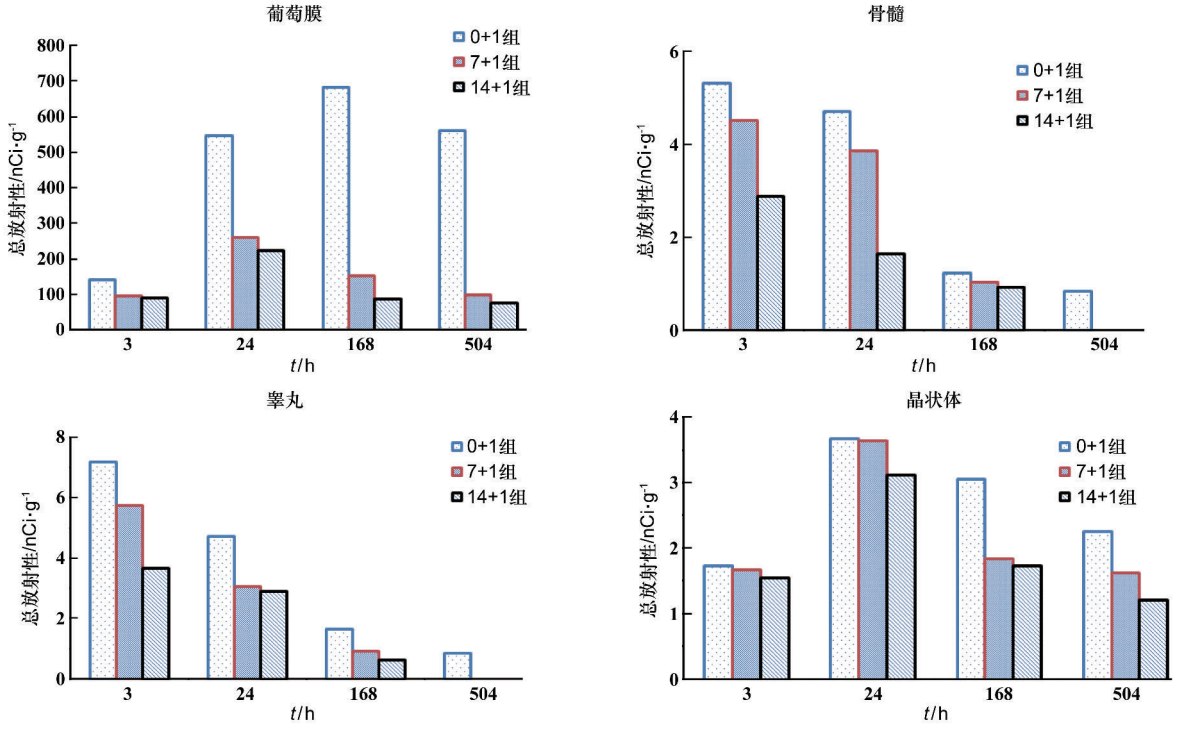


图 4 不同给药方式雄性 Long-Evans 大鼠在给药后辐射敏感组织的总放射性分布图

1.3 不同给药方式对组织放射性暴露量比较 根据 3,24,168 和 504 h 的组织放射性浓度,计算各组织放射性暴露量($AUC_{0\to\infty}$)。结果显示(表 3),7 + 1 组和 14 + 1 组大鼠的组织放射性 $AUC_{0\to\infty}$ 均显著低于 0 + 1 组,其中低于 50% 以上的有葡萄膜、生殖腺等 10 种组织,低于 25% ~50% 的有脾脏、眼等 13 种组织,低于 5% ~25% 的有垂体、口腔黏膜等 4 种组织;14 + 1 组多数组织放射性 $AUC_{0\to\infty}$ 略低于 7 + 1 组,但两组间无显著性差异。

表 3 不同给药方式雄性 Long-Evans 大鼠全血、血浆和组织总放射性暴露量 $AUC_{0\to\infty}$ 的比较

组织	$AUC_{0\to\infty}$/h·nCi·g^{-1}	% Diff[b]		组织	$AUC_{0\to\infty}$/h·nCi·g^{-1}	% Diff[b]	
	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组		0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组
全血(LSC)	4 653	9%	26%	非色素化皮肤	1 103	43%	62%
血浆(LSC)	246	17%	31%	口腔黏膜	3 639	17%	57%
肾上腺皮质	4 978	34%	53%	色素化皮肤	1 658	10%	27%
骨髓(股骨)	1 161	52%	59%	垂体	4 168	17%	39%
全脑	840	62%	70%	前列腺	1 244	51%	86%

续表 3

组织	$AUC_{0\to\infty}$/h·nCi·g^{-1}	% Diff[b]		组织	$AUC_{0\to\infty}$/h·nCi·g^{-1}	% Diff[b]	
	0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组		0 + 1 组	7 + 1 组	14 + 1 组
棕色脂肪	3 140	39%	53%	唾液腺	3 626	43%	52%
食道壁	8 748	69%	80%	脊髓	763	87%	85%
眼睛	29 568	42%	51%	脾脏	8 062	42%	57%
心脏	3 833	43%	49%	睾丸	1 263	62%	70%
肾脏	9 716	58%	64%	甲状腺	5 592	36%	48%
晶状体	3 685	42%	58%	气管	4 182	60%	72%
肝脏	8 868	43%	52%	膀胱壁	1 843	67%	62%
肺脏	8 267	43%	55%	葡萄膜	1 252 381	90%	93%
淋巴结(颈部)	4 884	34%	54%	白脂肪(腹股沟)	136	5%	38%
肌肉(股骨)	1 875	31%	47%				

$\%\ Diff = [(AUC_{0\to\infty})_{0+1组} - (AUC_{0\to\infty})_{7+1组或14+1组}]/(AUC_{0\to\infty})_{0+1组} \times 100$

2　不同给药方式人体最大放射性剂量估算结果比较

按照核医学内照射吸收剂量(Medical Internal Radiation Dose,MIRD)模型的计算方法[12],根据 3 种给药方式大鼠组织放射性 $AUC_{0\to\infty}$ 数据,估算成年男性受试者可给予[^{14}C]VPS-01 的最大口服剂量分别为 61.6,611 和 838 μCi,与 0 + 1 相比,7 + 1 和 14 + 1 给药方式可提高放射性给药剂量 9.92 倍或 13.6 倍。

讨　论

具有不可逆共价结合特点的药物如第 2 代、第 3 代替尼类药物[8,13],单次给予放射性标记药物,药物分子与靶点/蛋白结合率相对重复给药组织结合达到平衡后比例较高,易造成人体内不必要的放射性高暴露。推测该类药物通过重复给药使靶点占有率达到平衡后再给予放射性标记药物,可以显著降低受试者放射性暴露量,也更能真实反映药物在人体内的吸收、分布、代谢和排泄情况。且在药物达到稳态后再给予^{14}C-标记药物,^{14}C-标记药物与靶点/蛋白的结合率会显著低于直接给予^{14}C-标记药物,因而游离药物血浆浓度增加易于代谢产物鉴定。目前已有临床采用这种给药方式开展人体放射性研究的案例[14],但仍无相关动物实验数据证实这一给药方式的合理性以及如何设计动物实验以支持这类药物的物质平衡临床试验。

本研究首次采用 3 种不同给药方式考察替尼类药物在 LE(含色素)大鼠各组织中的分布情况及暴露量。结果表明:先重复给予非放射性标记药物使其达到稳态,再单次给予放射性标记药物的大鼠各组织放射性浓度均显著低于直接给予放射性标记化合物的大鼠,因而各组织的总放射性暴露量($AUC_{0\to\infty}$)也显著降低。此直接给予放射性标记药物(0 + 1 组)大鼠,其眼葡萄膜总放射性 $AUC_{0\to\infty}$ 最高,并于给药后 168 h 才达峰,消除半衰期也很长(约 1 180 h),而 7 + 1 组和 14 + 1 组大鼠的葡萄膜于给予放射性药物后 24 h 达峰,放射性 $AUC_{0\to\infty}$ 显著小于 0 + 1 组,极大地降低了眼毒性和光毒性的风险[15]。

美国 FDA 21CFR361 中规定,在开展人体放射性物质平衡试验前需提供放射性剂量估算报告(dosimetry report)[16],其中单次使用放射性药物所致的全身、造血器官、晶状体和性腺的最高限值为 30 mSv,其他器官为 50 mSv。人体放射性安全剂量需要根据动物放射性实验结果进行估算,最常用的是大鼠^{14}C-标记药物的排泄和组织分布实验结果[17]。目前,国际上药物研究中大鼠组织分布一般采用 QWBA,该技术自 20 世纪 70 年代引进磷显像新技术后,极大地提高了检测灵敏度和定量范围(可达 5 个数量级),利用电脑成像软件显现的组织图像清晰直观,并可通过定量软件获得药物在动物所有组织/区域中分布的药动学参数。QWBA 技术可以快速直观获得药物在体内的分布情况,为明确药物毒性靶向器官及潜在药物积聚部位的检测提供有力的依据,在 21 世纪已逐渐发展为药动学和毒理学研究的常用方法[18-19]。

本研究 7 + 1 组和 14 + 1 组大鼠各组织(尤其是辐射敏感器官如眼睛、骨髓和性腺)的放射性浓度均低于 0 + 1 组大鼠,显著降低了组织中不必要的辐射暴露。根据 7 + 1 组和 14 + 1 组组织分布数据进

行人体放射性剂量估算,结果显示单次口服最大放射性剂量可以从 0 + 1 组的 61.6 μCi 分别提高到 611 和 838 μCi,从而满足临床样品放射性检测要求。因此,具有组织共价结合、消除缓慢、易引起人体放射性暴露量高的药物,在进行人体放射性物质平衡试验时可使用欧洲 EMA[9] 推荐方案:根据大鼠组织消除结果,先重复给予受试者一定次数(比如本文给药 7 次)的非放射性标记药物使其达到稳态后,再单次给予放射性标记药物。

[参 考 文 献]

[1] 国家药品监督管理局. 药物代谢产物安全性试验技术指导原则[EB/OL]. (2012). http://www.cde.org.cn.

[2] US Food and Drug Administration. Guidance for industry: safety testing of drug metabolites, US Department of Health and Human Services [EB/OL]. (2020). https://www.fda.gov/media/72279/download.

[3] 国家药品监督管理局. 药物相互作用研究指导原则[EB/OL]. (2012). http://www.cde.org.cn.

[4] European Medicines Agency. Guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man, Oncology Working Party[EB/OL]. (2013). http://www.ema.europa.eu.

[5] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. S9 Nonclinical Evaluation for anticancer pharmaceuticals[EB/OL]. (2010). http://www.fda.gov.

[6] COPPOLA P, ANDERSSON A, COLE S. The importance of the human mass balance study in regulatory submissions[J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2019, 8(11):792 - 804.

[7] 国家药品监督管理局. 药物非临床药代动力学研究技术指导原则[EB/OL]. (2014). http://www.cde.org.cn.

[8] DICKINSON PA, CANTARINI MV, COLLIER J, *et al*. Metabolic disposition of Osimertinib in rats, dogs, and humans: insights into a drug designed to bind covalently to a cysteine residue of epidermal growth factor receptor[J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44:1201 - 1212.

[9] European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions. Committee for Human Medicinal Products[EB/OL]. (2013). http://www.ema.europa.eu.

[10] SOLONA EG, LEE F. Methods determining phosphor imaging limits of quantitation in whole-body autoradiography rodent tissue distribution studies affect predictions of ^{14}C human dosimetry [J]. *J Pharmacol Toxicol*, 2002, 46:83 - 91.

[11] AKIYO S. MICHIAKI, A. Proposition for assessment of quantitative whole-body autoradiography[J]. *Exp Mol Pathol*, 1999, 67:75 - 90.

[12] ICRP Publication 53, Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals[M]. Ann ICRP, 1988:1 - 4.

[13] 褚超男, 黄琪. 阿帕替尼治疗复发性卵巢癌的疗效及安全性评价[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(3):299 - 302.

[14] GOLDINGER SM, RINDERKNECHT J, DUMMER R, *et al*. A single-dose mass balance and metabolite-profiling study of vemurafenib in patients with metastatic melanoma[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2015, 3:e00113.

[15] GOKULGANDHI MR, VADLAPUDI AD, MITRA AK. Ocular toxicity from systemically administered xenobiotics[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8(10):1277 - 1291.

[16] 21 CFR 361.1 Radioactive Drugs for Certain Research Uses[EB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov.

[17] NIJENHUIS CM, SCHELLENS JH, BEIJNEN JH. Regulatory aspects of human radiolabeled mass balance studies in oncology: concise review[J]. *Drug Metab Rev*, 2016, 48(2):266 - 280.

[18] 孙杰,郑钊铖,石劲敏,等. 定量全身放射性自显影技术(QWBA)在大鼠组织分布研究中的应用[J]. 毒理学杂志, 2018, 32(5):390 - 392.

[19] SCHWEITZER A. Contribution of quantitative whole-body autoradioluminography to the early selection and development of drug candidates[M]. Springer, 2011:243 - 259.

编辑:杨青/接受日期:2020 - 11 - 16