

创新药物体外 ADMET 的高通量筛选技术研究进展 *

邓志婷 戚欣 李静[△]

(海洋药物教育部重点实验室, 中国海洋大学医药学院 山东 青岛 266003)

摘要: 目前的新药研发策略已从传统的以活性为主导的筛选模式, 转变为在测定药效的同时平行评价化合物的 ADMET 性质, 并建立了系列体外 ADMET 高通量筛选技术。本文综述了近年来药物体外 ADMET 高通量筛选技术的研究进展。

关键词: 高通量筛选 理化性质 ADMET

中图分类号: R917, R927 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)06-1176-03

High Throughput Screening of in Vitro ADMET Profiling in Drug Discovery*

DENG Zhi-ting, QI Xin, LI Jing[△]

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy of Ocean University of China, Qingdao Shandong, 266003, China)

ABSTRACT: Evaluation and optimization of drug metabolism and pharmacokinetic data plays an important role in drug discovery and development. In this review, we summarize state of the high throughput assays for screening of key physicochemical properties such as pKa, lipophilicity and solubility as well as in vitro ADMET profiling.

Key Words: High throughput screening; Physicochemical property; ADMET

Chinese Library Classification(CLC): R917, R927 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)06-1176-03

前言

新药研发是一个耗时和耗资的过程, 平均研发一个新药约需 12 年并耗资 10 亿美元, 许多候选药物由于药物吸收、分布、代谢和排泄及毒理学(ADMET)存在问题而被淘汰, 1993 年由 ADMET 性质不佳导致 40% 的药物在临床试验中失败^[1]。

目前的国外制药公司的新药研发策略已从传统的以活性为主导的筛选模式, 转变为在测定药效的同时平行评价化合物的 ADMET 性质, 并建立了体外高通量筛选 ADMET 技术^[2]。有数据显示^[1,3], 随着新策略和新技术的应用, 因 ADMET 问题而终止新药开发的比例下降为 11%。ADMET 体外高通量筛选技术发展至今, 主要集中在两个方面: 与药物 ADMET 性质密切相关的理化性质研究, 以及体外生物的高通量筛选模型。

1 药物的理化性质

药物的理化性质如解离度(pKa)、脂水分配系数(LogP)、溶解性等, 决定其体外、体内活性和 ADMET 性质, 是预测化合物生物利用度、代谢动力学(PK)和毒性的重要参数。

1.1 解离度

消化道上皮细胞是药物吸收的屏障, 通常只允许未解离型分子通过而被吸收, 而解离后的离子型不易透过, 难以吸收。解离度的测定方法有电势滴定法、紫外分光光度法、毛细管电泳-质谱联用(CE-MS)等, 其中利用毛细管电泳-质谱联用

(CE-MS)测定 pKa 为近年来迅速发展的高通量筛选方法^[4], 该方法选择甲酸或醋酸铵盐等挥发性成分作为缓冲溶液, 鞘液中添加甲酸铵或氢氧化铵增强样品电离度, 同时得到迁移时间、准分子量和碎片特征信息, 在 150 分钟内能将超过 50 种化合物组成的混合物同时进行分离测定, 不仅灵敏度高, 且适用于溶解性差和没有紫外光谱吸收的化合物。此外 Wan 等建立^[5]了一种新的数据分析程序, 可以将质谱数据转化为迁移时间并自动计算化合物的 pKa 值, 解决了 pKa 分析测定的瓶颈。

酸性或碱性较强的药物主要以离子形式存在于体内, 过膜性和生物利用度较低。改变化合物的 pKa 后, 可以有较好的生物利用度。Leslie^[6]通过 N-甲基化仲胺和哌啶环上引入氟原子等结构对治疗肥胖的神经肽 Y(NPY)受体拮抗剂进行改造后, 神经肽 Y 的 pKa 值从 11.0 降低到了 7.9, 能更容易地穿越血脑屏障, 提高了药物在中枢神经系统中的浓度。

1.2 脂水分配系数

药物在水相和有机相间分配平衡后, 其在两相中浓度的比值可表示其亲脂性和亲水性。一个理想的药物具有合适的脂水分配系数, 该系数常用 LogP 来表征。

生物膜色谱是一种新型液相色谱模式, 它以天然或人工膜模拟生物膜为固定相, 主要用来研究溶质分子与生物膜间的相互作用, 已成为目前测定脂水分配系数(LogP)的主要方法。主要应用的生物膜色谱有微乳液电动色谱(MEEKC)、磷脂膜色谱(IAMC)、微乳液相色谱(MLC)、脂质体毛细管电泳(LCE)等。

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2007AA09Z405)

作者简介: 邓志婷(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤药理学, E-mail: dengzhiting26@163.com

[△] 通讯作者: 李静(1968-), E-mail: ljiliac@163.com

(收稿日期: 2011-04-28 接受日期: 2011-05-23)

Faller 等^[7]建立了人工膜模型中通过测量化合物在人工辛醇液体膜中的渗透性,得到的脂水分配系数与摇瓶法或双相电位滴定法所得的数据相关性较好,对中性、弱碱性和酸性化合物都适用。

Edward^[8]等认为脂水分配系数在 0~3 的化合物,通过口服给药后在胃肠道中能被较好地吸收。将脂溶性过强的化合物进行结构改造后得到脂溶性较低的基质金属蛋白酶抑制剂 ABT-518,后者的血药浓度和生物利用度均显著增加,可用于治疗实体瘤。

1.3 溶解性

药物溶解性的高通量筛选方法有摇瓶法、浊度法、液质联用法(LC-MS)和紫外光谱法等。Zhou^[9]运用微量过滤小瓶(mini-prep filter vials,MPV)和高效液相色谱(HPLC)对平衡溶解度进行高通量、微量测定。该方法为溶解度测定的金标准-"摇瓶法"的迷你、高通量形式。Bard 等^[10]建立的化合物溶解性测定方法建立在 96 孔板和酶标仪基础上,通过测定化合物在多种实验条件下(如人工胃液、人工肠液)的紫外吸光光度值,计算溶解度,从而达到高通量筛选的目的。

Flower 提出先导化合物的理化性质标准时指出,化合物的脂水分配系数(LogP)以 0~3 较合适,水溶解性应大于 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Lipinski 在对 2287 个候选药物的理化性质与药物通过生物膜的渗透性的关系进行研究的基础上,提出了"类药 5 原则"(Rule of five),认为具有以下性质的化合物可能具有较差的吸收或渗透性:(1)分子量 >500 , (2) $\log P > 5$, (3) 氢键给体数目 > 5 , (4) 氢键受体数目 > 10 , 已成为目前研发口服小分子药物的指导性原则。

2 体外 ADMET 筛选模型

药物的体外 ADMET 筛选模型主要涉及药物的肠吸收情况、血脑屏障渗透性、体外代谢、药物相互作用和各种体外毒性模型等,有助于进一步了解化合物在生物体内的吸收、转运、代谢及潜在的毒性等情况。

2.1 肠吸收模型

口服药物的肠吸收情况,相关细胞模型有狗肾上皮细胞(MDCK)模型和人结肠癌细胞(Caco-2)模型等,其中 Caco-2 细胞模型由于其人源性以及多种胃肠道转运蛋白的表达,以及多种代谢酶的存在,可以预测化合物的口服吸收情况和转运机制的研究而应用更广泛。

最近发展起来的 Caco-2 细胞悬链线模型(catenary model)可以准确地描述 Caco-2 单细胞层的动力学现象如细胞内转运、细胞代谢、药物结合等。同时具有不同种类和表达水平的代谢酶和载体的 Caco-2 细胞模型应运而生,如 P-gp- 诱导模型, CYP3A4 诱导模型, P-gp 敲除模型和加速的 Caco-2 细胞的替代模型,广泛地用于药物的高通量筛选。

2.2 血脑屏障模型

体外血脑屏障模型包括平行人工膜渗透性分析(the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay, PAMPA)、MDCK-MDR1 细胞模型、血管内皮细胞和星形胶质细胞共培养模型,以及永生化的大鼠 RBE4 细胞、cEND 细胞等。

其中 PAMPA 是一种非细胞的体外透膜性的筛选方法,以

脂质人工膜代替单层细胞膜,用 UV 平板读数器测量浓度,可以预测药物经被动扩散通过血脑屏障的情况。Megard 等建立了一种原代人脑毛细血管内皮细胞和人星形胶质细胞共同培养的体外模型,该模型表达多种主动外排蛋白,可以预测经主动和被动转运进入中枢神经系统的分子,且与动物模型相比无种属差异。

进入临床研究的神经系统药物,只有约 9% 的药物能顺利通过临床期,而最终进入市场的仅 3%~5%,如此高的失败比率,其中超过 65% 的原因是由于药物缺乏血脑屏障渗透性^[11]。

2.3 药物体外肝脏代谢模型

肝脏作为人体内最大的代谢器官,几十年来建立了许多的体外肝脏模型,其中应用最广泛的是人肝微粒体体外孵育模型,该模型是由人肝微粒体加入辅因子,在生理环境条件下进行反应的体系,可以进行药物代谢、相代谢研究、药物的葡萄糖醛酸化研究、药物相互作用研究等。

Bu 等^[12]利用同位素标记法和高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS)在人肝微粒体体外孵育体系中,建立了一种"连续孵育法"来研究抗艾滋病病毒药物卡普韦林的氧化产物及氧化途径,可以根据 ^{14}C 标记的卡普韦林和 ^{14}C 标记代谢产物的消除程度,来精确计算卡普韦林的代谢情况。

发生药物相互作用的主要原因是 CYP 酶系被抑制或被诱导,其中 CYP 抑制性药物相互作用与 CYP 诱导性药物相互作用相比较,临床发生几率更高,产生的后果通常更为严重。CYP 酶系抑制实验通常采用人或动物的肝微粒体进行。近年来鸡尾酒底物微粒体孵育技术结合 LC-MS/MS 分析技术("N in one" LC-MS/MS based assay)的应用,以及利用盒式分析法(cassette analysis)计算 CYP 各亚型抑制剂的 IC₅₀ 值,促进了 CYP 抑制剂的高通量体外筛选。

2.4 药物体外毒性模型

2.4.1 药物线粒体毒性模型 因肝脏毒性和心脏毒性而被美国药监局给予黑框警告的药物中,80% 与其对线粒体的损伤有关^[13]。目前筛选药物线粒体毒性的体外模型主要是利用人肝癌细胞系(HepG2)、人 T 淋巴细胞白血病细胞株(CEM)等来评价线粒体的结构、功能和基因含量等的影响。在 Lisa^[14]等建立的体外筛选模型中,将 HepG2 细胞培养在半乳糖的培养基中,取代原有的葡萄糖培养基,细胞的代谢方式从原来的糖酵解途径转变为线粒体氧化磷酸化,增强了细胞对线粒体毒剂的敏感性,而对非线粒体毒剂的敏感性并未降低,可以准确高效地筛选药物线粒体毒性。

2.4.2 药物磷脂病模型 多种含阳离子的两性药物可能通过静电和疏水力与脂质极相结合,形成难以被溶酶体酶降解的药物-脂质的复合物,并在胞浆内蓄积形成溶酶体内包涵体,此类化合物在体内应用和体外培养时均可引起细胞内的磷脂质沉积,而且此类药物可能会造成器官的损伤。

Mesens^[15,16]等建立了一种高通量筛选磷脂阳性药物的方法,人单核细胞(THP-1)经药物作用后,与荧光标记的磷脂质孵育,运用流式细胞仪检测细胞溶酶体内磷脂质含量的变化,根据荧光的变化判断药物否会造成磷脂质沉积。

2.4.3 药物心脏毒性模型 hERG (human ether-a-go-go related gene)编码的钾通道介导的外向钾电流是人心肌细胞动作电位3期快速复极的主要电流(I_{Kr})。研究表明,一些临床药物和候选化合物所表现出的心脏毒副作用,主要通过作用于心肌细胞的hERG钾通道而造成Q-T间期延长。如特非那定、西沙比利、阿司咪唑、格雷杀星等都发现可抑制hERG钾离子通道而导致心律失常,而且导致hERG抑制的药物在化学结构上没有明显的共性,因而很难预测,只能通过实验解决。

人用药品注册技术规定国际协调会议(ICH)和美国FDA都颁布了关于非临床检测I_{Kr}的规章,要求药物上市时必须提供作用于离子通道的电流变化数据,检测药物对hERG毒副作用的"金标准"为膜片钳技术。

2.4.4 药物基因毒性模型 基因毒性试验的目的在于检测药物是否直接或间接引发基因损伤,并测知其对基因的损伤程度,实验方法有细菌回复突变试验(Ames试验)、体外染色体畸变试验、鼠骨髓微核试验、小鼠淋巴瘤细胞试验等。

Hastwell^[17]建立了一种Green Screen HC筛选方法,可将人生长阻滞和DNA损伤基因(GADD45a基因)的调节和绿色荧光蛋白(GFP)的表达连接起来,通过绿色荧光融合蛋白将化合物造成的DNA损伤表现出来,该方法的特异性和灵敏性比Ames试验和小鼠淋巴瘤细胞试验更高。

3 展望

随着分子酶学、生物芯片技术、计算机技术、高灵敏度微量分析技术等多学科的发展,药物ADMET技术发展迅速。计算机辅助预测^[18]可以根据理化性质以及软件建立的虚拟筛选模型对药物的ADMET性质进行初步筛选;日益完善的体外ADMET模型能在已获得众多化合物且样品较少的情况下,可以快速、微量地进行高通量筛选。针对高通量筛选所获得的大量ADMET相关数据,近几年发展起来的计算方法^[19]能使研究者对药物分子进行选择和设计作出正确选择。我们有理由相信随着ADMET技术的发展及运用,创新药物研发的成功率将大大提高。

参考文献(References)

- [1] Kubinyi H. Drug research: myths, hype and reality [J]. *Nat Rev Drug Discov*,2003,2(8):665-668
- [2] Pereira D A, Williams J A. Origin and evolution of high throughput screening[J]. *Br J Pharmacol*,2007,152(1):53-61
- [3] Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates [J]. *Nat Rev Drug Discov*,2004,3(8):711-715
- [4] Wan H, Holmen A G, Wang Y, et al. High-throughput screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*,2003,17(23):2639-2648
- [5] Wan H, Ulander J. High-throughput pKa screening and prediction amenable for ADME profiling [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006,2(1):139-155
- [6] Leslie C P, Di Fabio R, Bonetti F, et al. Novel carbazole derivatives as NPY Y1 antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2007,17 (4): 1043-1046
- [7] Faller B, Grimm H P, Loeuillet-Ritzler F, et al. High-Throughput Lipophilicity Measurement with Immobilized Artificial Membranes [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*,2005,48(7):2571-2576
- [8] Edward Harvel Kerns L D. Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization [M]. Academic Press,2008.44-46
- [9] Zhou L, Yang L, Tilton S, et al. Development of a high throughput equilibrium solubility assay using miniaturized shake-flask method in early drug discovery [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*,2007,96 (11):3052-3071
- [10] Bard B, Martel S, Carrupt P A. High throughput UV method for the estimation of thermodynamic solubility and the determination of the solubility in biorelevant media [J]. *Eur J Pharm Sci*,2008,33 (3): 230-240
- [11] Hurko O, Ryan J L. Translational research in central nervous system drug discovery[J]. *NeuroRx*,2005,2(4):671-682
- [12] Bu H Z, Kang P, Zhao P, et al. A simple sequential incubation method for deconvoluting the complicated sequential metabolism of capravirine in humans[J]. *Drug Metab Dispos*,2005,33(10):1438-1445
- [13] Dykens J A, Will Y. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development [J]. *Drug Discov Today*,2007,12 (17-18): 777-785
- [14] Marroquin L D, Hynes J, Dykens J A, et al. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants [J]. *Toxicol Sci*, 2007,97(2):539-547
- [15] Natalie M, Margino S, Erik H, et al. A 96-well flow cytometric screening assay for detecting in vitro phospholipidosis-induction in the drug discovery phase[J]. *Toxicol In Vitro*,2009,23(2):217-226
- [16] Mesens N, Steemans M, Hansen E, et al. Screening for phospholipidosis induced by central nervous drugs: comparing the predictivity of an in vitro assay to high throughput in silico assays[J]. *Toxicol In Vitro*, 2010,24(5):1417-1425
- [17] Hastwell P W, Li-Leng C, Kevin J R, et al. High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: Validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay [J]. *Mutation Research*,2006,607(2):160-175
- [18] Pelletier D J, Gehlhaar D, Tilloy-Ellul A, et al. Evaluation of a published in silico model and construction of a novel Bayesian model for predicting phospholipidosis inducing potential [J]. *J Chem Inf Model*, 2007,47(3):1196-1205
- [19] Segall M, Champness E, Obrezanova O, et al. Beyond profiling: using ADMET models to guide decisions [J]. *Chem Biodivers*,2009,6(11): 2144-2151