

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

ISSN 1001-8255
CN 31-1243/R
ZYGZEA

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

- 中国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊
- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 中国药学会系列期刊

本期导读：

磺丁基醚- β -环糊精在药物制剂中的应用及安全性研究进展

王若男, 钱仪敏, 李 华, 马 琛

白及多糖作为纳米药物递送系统的分子设计及其应用进展

郭婷婷, 朱峻霄, 杨 野, 崔秀明, 王承潇



微信号: cjph-cjph



主 办
上海医药工业研究院
中国药学会
中国化学制药工业协会

9

2019年9月

第50卷
Vol.50 No.9

ISSN 1001-8255



9 771001 825190

中国医药工业杂志

二〇一九年

第五十卷

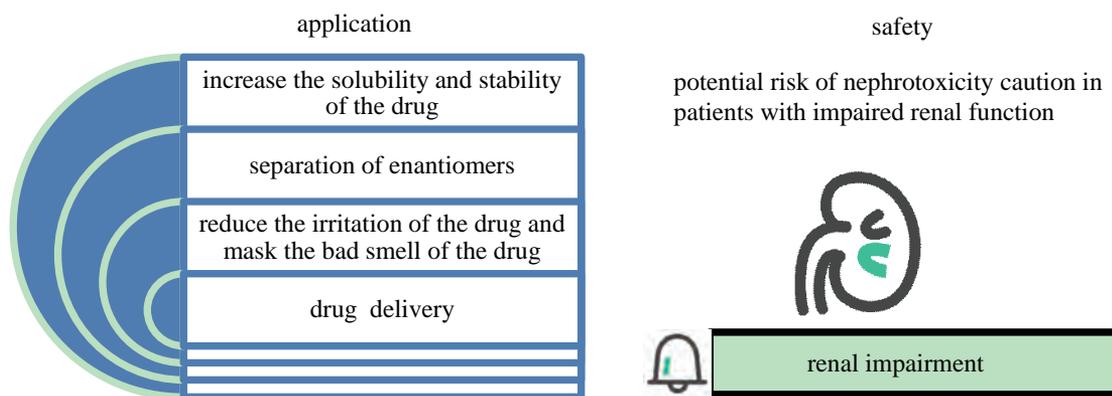
第九期

第949-1084页

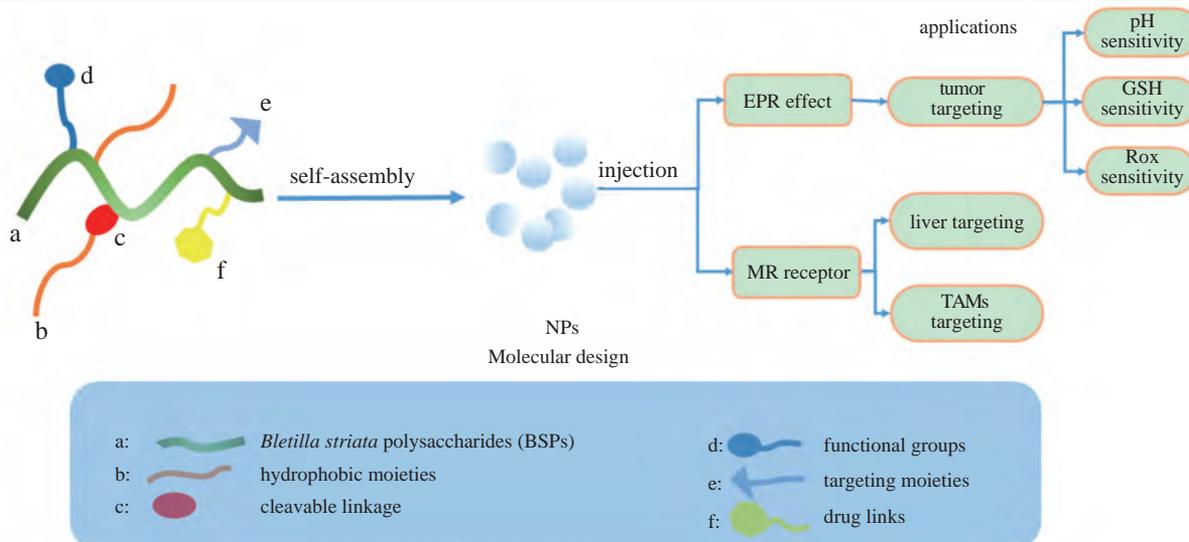
· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

- 949** 磺丁基醚-β-环糊精在药物制剂中的应用及安全性研究进展.....王若男, 钱仪敏, 李华*, 马璟
 Application and Safety Study of Sulfbutyl Ether-β-cyclodextrin in Pharmaceutical Preparations
WANG R N, QIAN Y M, LI H*, MA J
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.001

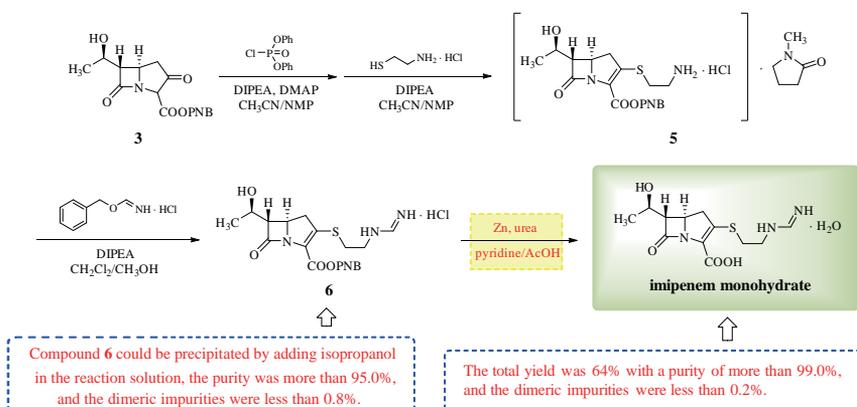
Sulfbutyl ether-β-cyclodextrin is an anionic high water-soluble cyclodextrin derivative.



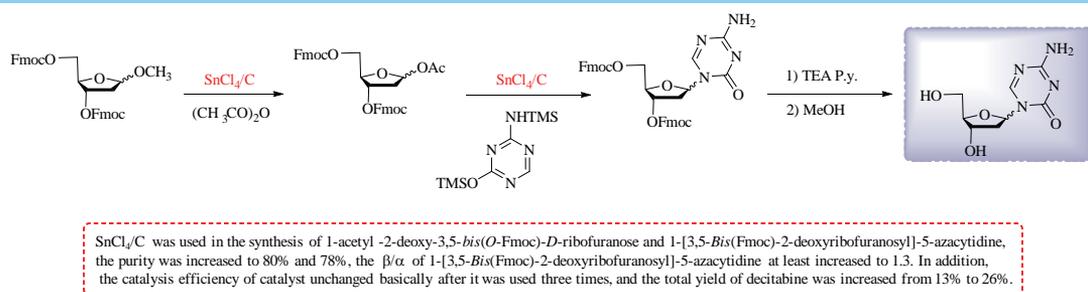
- 958** 白及多糖作为纳米药物递送系统的分子设计及其应用进展.....郭婷婷, 朱峻霄, 杨野, 崔秀明, 王承潇*
 Progress in the Construction and Application of Nano Drug Delivery Systems Based on *Bletilla striata* Polysaccharides.....GUO T T, ZHU J X, YANG Y, CUI X M, WANG C X*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.002



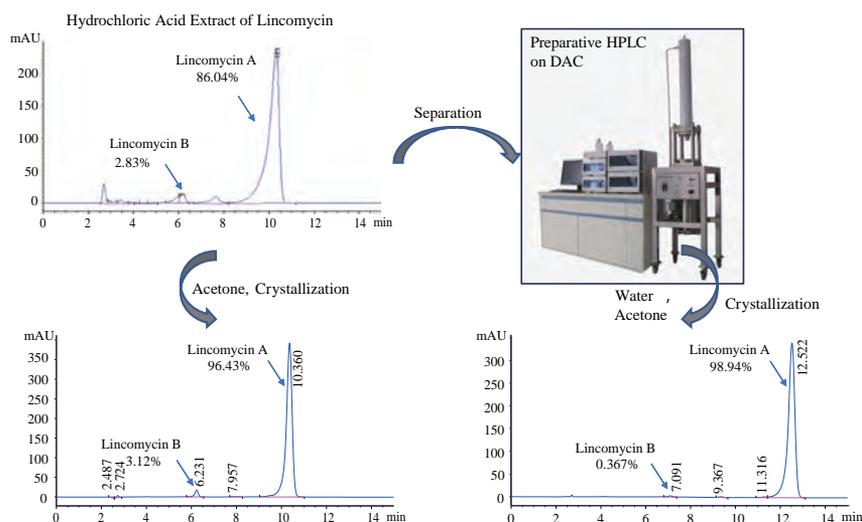
- 968 亚胺培南一水合物生产工艺改进.....于成彬, 段良兴, 张乃华, 王秀娟, 张贵民*
 Synthetic Process Improvement of Imipenem Monohydrate.....
YU C B, DUAN L X, ZHANG N H, WANG X J, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.003



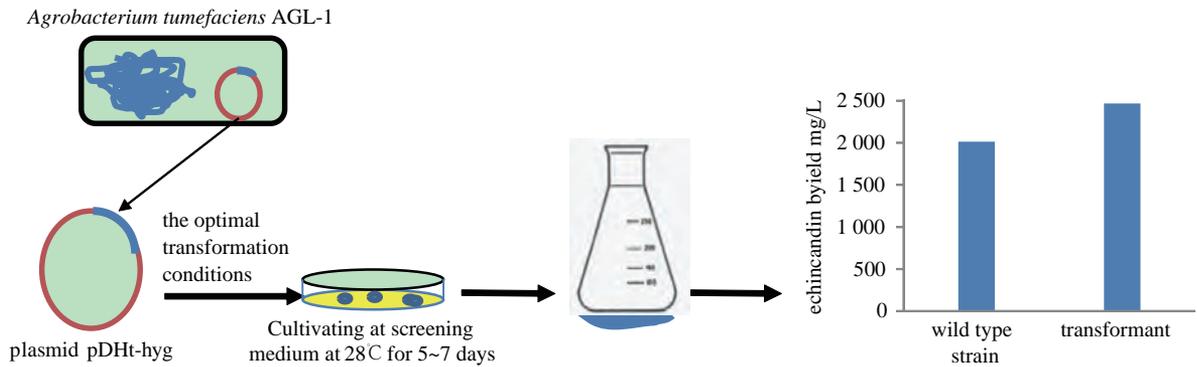
- 972 地西他滨合成工艺优化.....赵桂芳, 白文钦, 郑 艺, 孙秀玲, 张贵民*
 Optimized Synthetic Process of Decitabine.....
ZHAO G F, BAI W Q, ZHENG Y, SUN X L, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.004



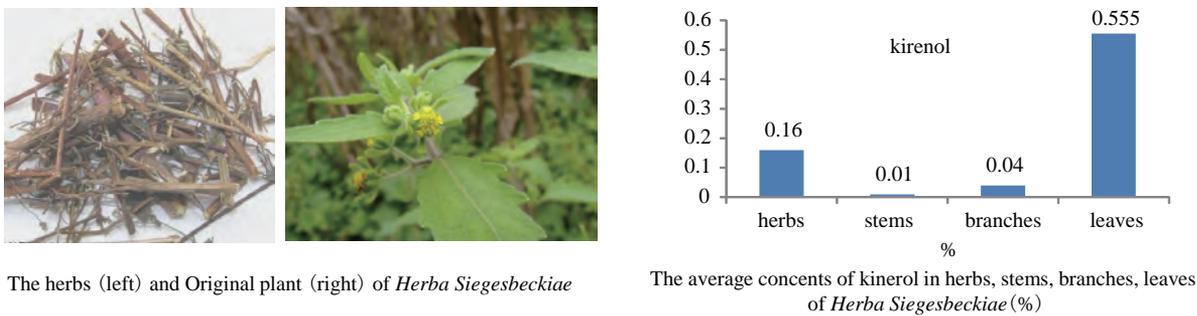
- 976 高效液相制备色谱降低 B 组分含量的林可霉素纯化工艺.....
吴海波, 薛兴亚, 李奎永, 周永正
 Lincomycin Purification Process for Reducing Component B Content by Preparative High Performance Liquid Chromatography.....
WU H B, XUE X Y, LI K Y, ZHOU Y Z
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.005



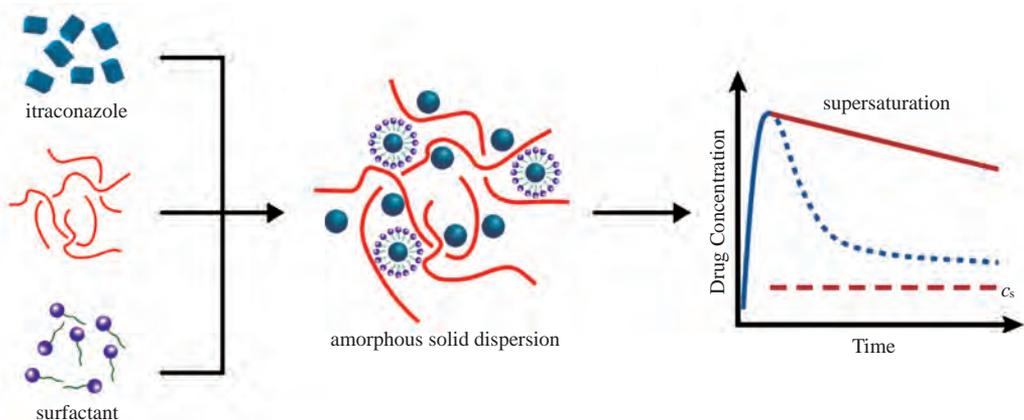
981 棘白菌素 B 高产菌株 *Aspergillus delacroxii* 转化体系的构建与优化..... 闵涛玲, 高 苹, 熊 磊, 陈昌发, 胡海峰*
 Establishment and Optimization of Transformation System for an Echinocandin B Overproduction Strain of *Aspergillus delacroxii*..... *MIN T L, GAO P, XIONG L, CHEN C F, HU H F**
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.006



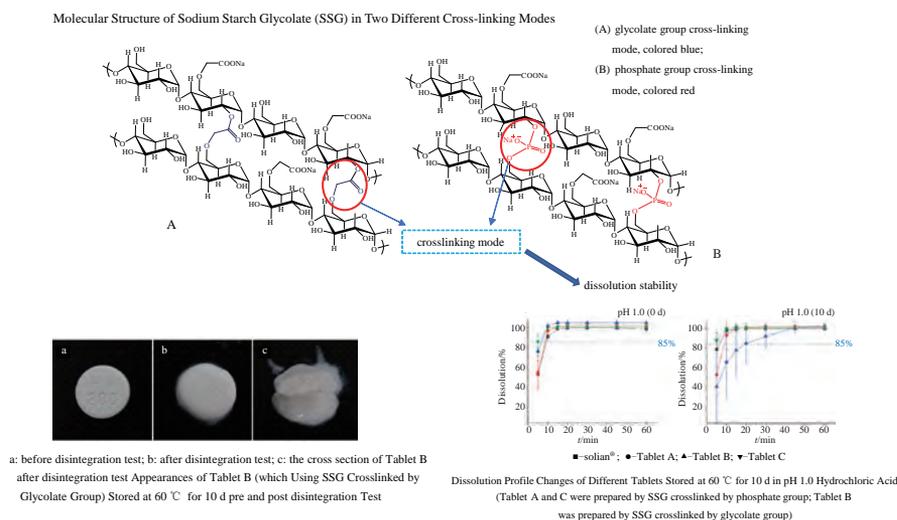
987 豨莶草茎、枝、叶的化学成分比较分析..... 郝五四, 范自全, 奚健强, 程志红*
 A Comparative Analysis of the Chemical Composition of the Stem, Branch and Leaf from *Herba Siegesbeckiae*..... *HAO W S, FAN Z Q, XI J Q, CHENG Z H**
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.007



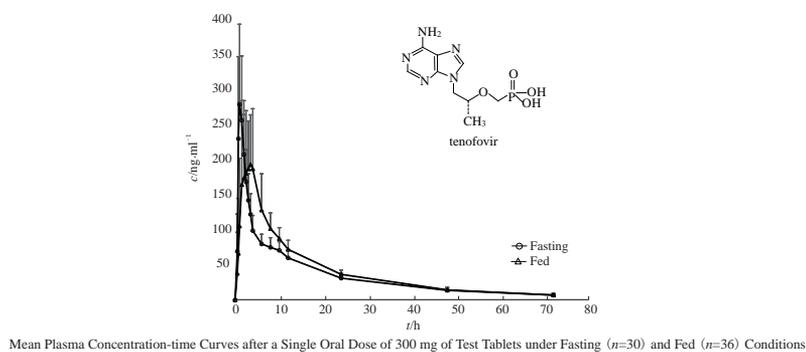
993 聚合物-表面活性剂二元体系抑制难溶性药物固体分散体的胃肠道析晶..... 杨蓓蓓, 冯地桑, 潘 昕, 权桂兰*, 吴传斌
 Polymer-surfactant Binary System Inhibits the Crystallization of Amorphous Solid Dispersions of Insoluble Drug in Gastrointestine..... *YANG B B, FENG D S, PAN X, QUAN G L*, WU C B*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.008



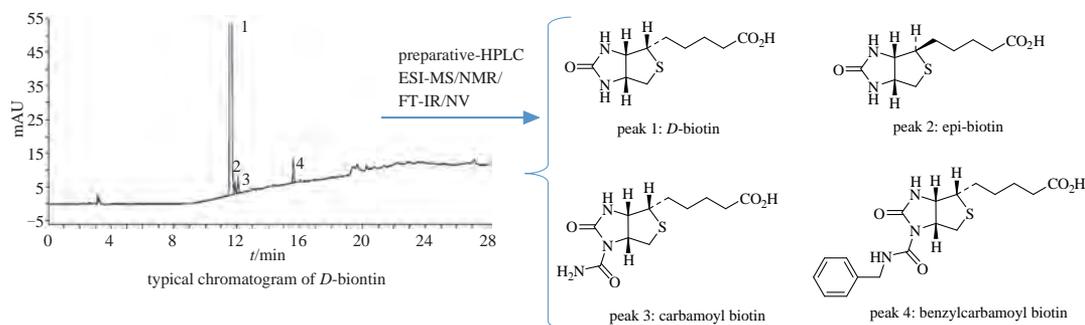
1005 不同厂家型号羧甲基淀粉钠对氨磺必利片溶出的影响.....黄 日, 彭俊清*, 陆 竞, 沈广青, 聂倩兰
 Effects of Different Types of Sodium Starch Glycolate from Different Manufacturers on Dissolution of Amisulpride Tablets.....HUANG R, PENG J Q*, LU J, SHEN G Q, NIE Q L
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.009



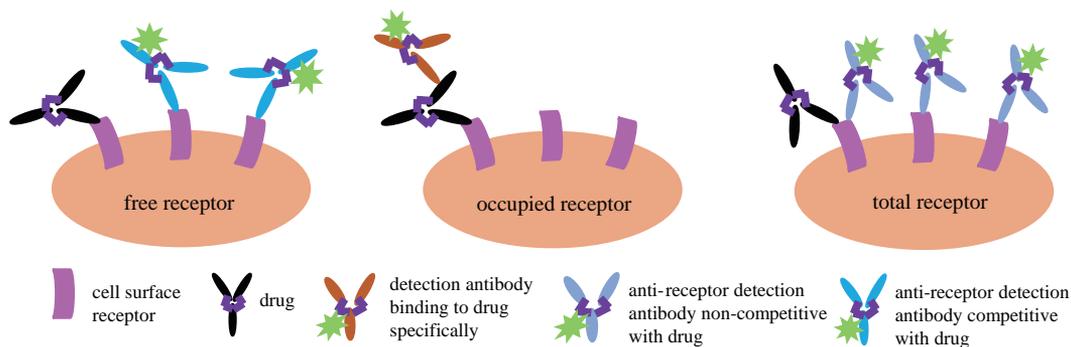
1011 人血浆中替诺福韦的 LC-MS/MS 测定法及其药动学应用.....马 欢, 周 臻, 方百欢, 李 周, 葛庆华*
 Determination of Tenofovir in Human Plasma by LC-MS/MS and Pharmacokinetic Study.....MA H, ZHOU Z, FANG B H, LI Z, GE Q H*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.010



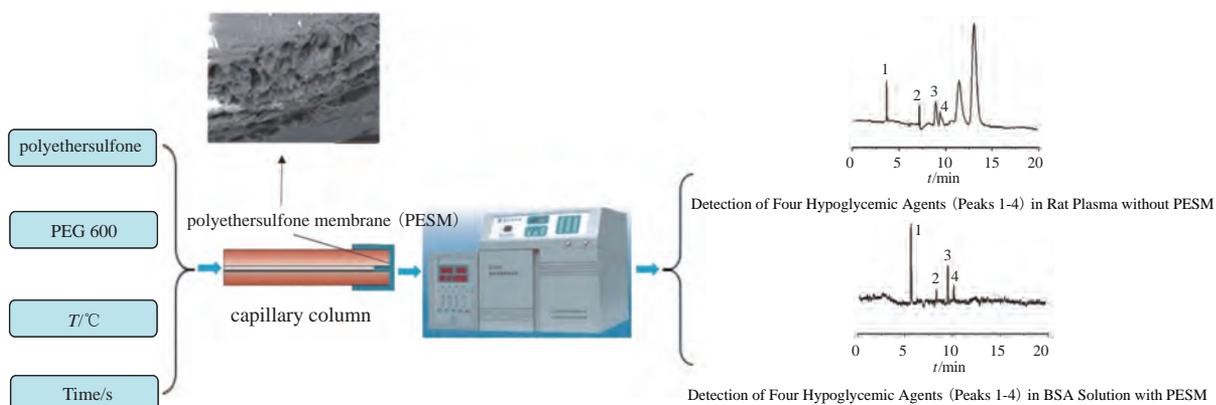
1017 生物素中有关物质的分离与结构鉴定.....顾立新, 徐旭巍, 吴旭锋*
 Isolation and Structure Identification of Related Substances from *D*-Biotin.....GU L X, XU X W, WU X F*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.011



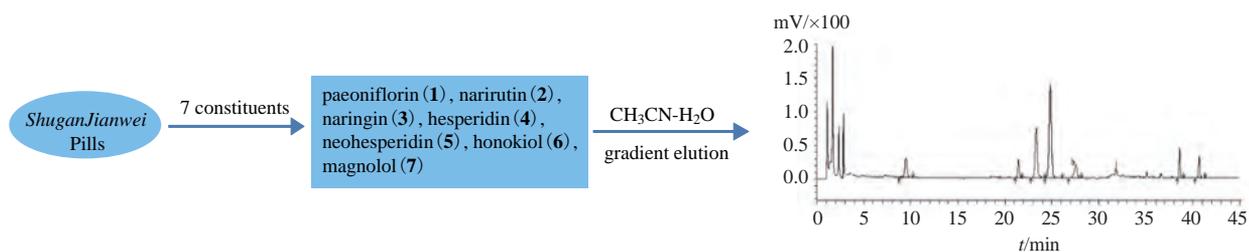
1024 基于流式细胞技术的受体占有率检测方法的建立及验证内容探讨.....孙晓卉, 陈亚会, 陈巨冰, 朱 晰, 马 璟*
 Discussion of Assay Development and Method Validation for Receptor Occupancy Study Based on Flow Cytometry.....SUN X H, CHEN Y H, CHEN J B, ZHU X, MA J*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.012



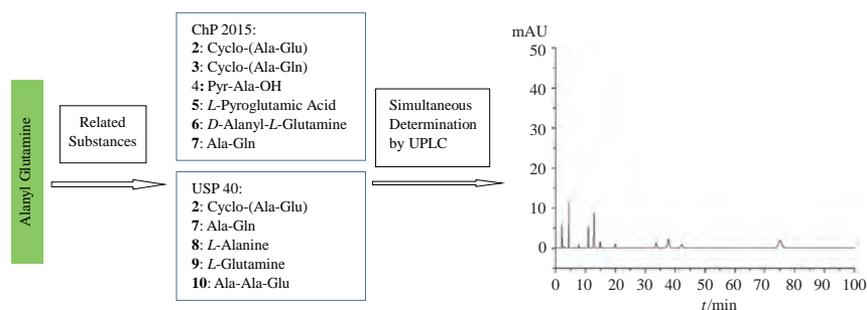
1029 毛细管柱内聚醚砜膜的制备及其对生物样品中 4 种降糖药的初步分离.....李海鹰, 陈彭月, 薛玉菡, 崔 颖, 杨文智*
 Preparation of Polyethersulfone Membrane in Capillary Column and the Preliminary Separation of Hypoglycemic Agents in Biological Samples.....LI H Y, CHEN P Y, XUE Y H, CUI Y, YANG W Z*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.013



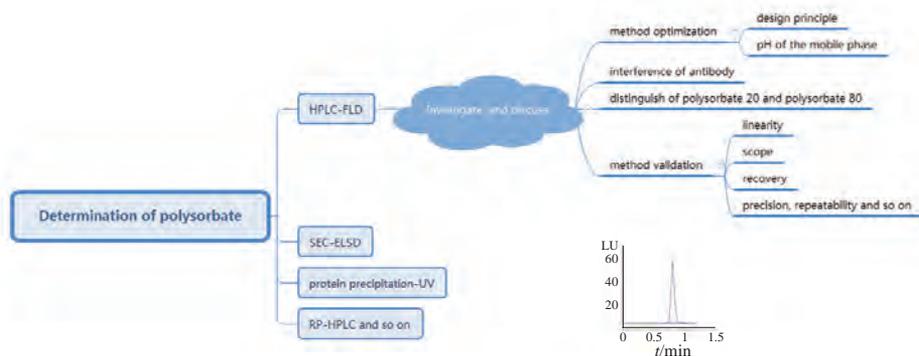
1038 HPLC 法同时测定舒肝健胃丸 7 种成分的含量.....崔庆德, 李海燕, 业艳芬
 Simultaneous Determination of Seven Constituents in *ShuganJianwei* Pills by HPLC.....
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.014



1042 丙氨酰谷氨酰胺 9 个有关物质的 UPLC 法测定·····吴 琼, 宋丽丽
 Simultaneous Determination of Nine Related Substances in Alanyl Glutamine by UPLC·····
 ······WU Q, SONG LL
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.015



1047 HPLC-荧光法测定单抗药物中聚山梨酯的含量·····徐明明, 程 菁, 吴利红, 邵 泓, 陈 钢*
 Determination of the Content of Polysorbate in Monoclonal Antibody Formulation by HPLC-
 Fluorescence·····XU M M, CHENG J, WU L H, SHAO H, CHEN G*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.016



· 药学管理与信息 (Pharmaceutical Management & Information) ·

1052 我国公立医院推行 DRGs-PPS 支付方式改革的评价与思考—基于北京市 2011—2018 年试点
 推行数据的实证分析·····丁锦希, 张 静, 陈 烨, 李佳明, 李 伟
 Evaluation and Thinking of the Reform of DRGs-PPS in Public Hospitals in China—Based on
 Empirical Analysis of Beijing 2011-2018 Pilot Implementation Data·····
 ······DING J X, ZHANG J, CHEN Y, LI J M, LI W
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.017

1059 国际药品检查组织 (PIC/S) 申请加入程序及对我国的启示·····
 ······郑永侠, 杜 婧, 杨 悦, 董江萍
 Procedures for Accession to PIC/S and Its Enlightenment to China·····
 ······ZHENG Y X, DU J, YANG Y, DONG J P
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.018

1065 关于体外溶出实验在仿制药一致性评价中的应用与思考.....程晓昆, 仇俊新, 王娅莉, 马苗锐, 刘月, 王会娟*
Application and Thinking of *in vitro* Dissolution in Consistency Evaluation for Generics.....
.....CHENG X K, QIU J X, WANG Y L, MA M R LIU Y, WANG H J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.019

1072 发达国家药品质量管理特点研究和启示.....胡骏, 薛礼浚, 邵蓉*
Research and Enlightenment of Drug Quality Management Characteristics in Developed Countries
.....HU J, XUE L J, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.020

1079 欧盟药品条件上市许可政策及效果分析.....李轩, 杨婷婷, 周斌*
An Analysis on the Policies of Conditional Marketing Authorisation for Medicine and Its
Implementation Effects in EU.....LI X, YANG T T, ZHOU B*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.021

· 其他 ·

广告索引(1058)

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2019年第50卷 第9期 9月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.50 No.9 September 10, 2019

©All Rights Reserved

主管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总编辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副总编辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责任编辑	刘玲玲	Executive Editor	LIU Lingling
出版单位	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编辑部地址	上海市北京西路1320号(200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电子邮件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电话	021-62126987, 62473200	Tel	021-62126987, 62473200
传真	021-62473200	Fax	021-62473200
电子邮件	ouyy@pharmadl.com	E-mail	ouyy@pharmadl.com
印刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发行范围	公开发行		
国内发行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国外发行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国内订阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人: 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*136*zh*P*20.00* *21*2019-09

2019年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

国内邮发代号 4-205

CN 31-1243/R

国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

基于流式细胞技术的受体占有率检测方法的建立及验证内容探讨

孙晓卉^{1,2}, 陈亚会^{1,2}, 陈巨冰^{1,2}, 朱 晰^{1,2}, 马 璟^{1,2*}

(1. 中国医药工业研究总院国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203; 2. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203)

摘要: 近年来, 受体占有率检测已成为抗体类药物临床前至早期临床药动-药效学(PK-PD)研究中的重要组成部分。受体占有率一般采用流式细胞技术检测, 能直观反映药物在体内与靶点作用的程度和时间, 对于人体首次剂量选择、最优药效剂量选择、给药周期等研究具有重要意义。检测方法的科学性、灵敏程度和稳健程度、方法学验证的完整性等均极大地影响受体占有率数据的可信程度。本研究结合本实验室经验, 并参考国外业界的一般做法和共识, 对受体占有率检测分析方法的开发和验证进行了探讨。

关键词: 受体占有率; 流式细胞技术; 药效动力学; 方法学验证; 生物技术药物

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)09-1024-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.09.012

Discussion of Assay Development and Method Validation for Receptor Occupancy Study Based on Flow Cytometry

SUN Xiaohui^{1,2}, CHEN Yahui^{1,2}, CHEN Jubing^{1,2}, ZHU Xi^{1,2}, MA Jing^{1,2*}

(1. National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203;

2. Shanghai Innostar Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203)

ABSTRACT: In recent years, receptor occupancy has become an important part of pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) investigation for antibody drugs from preclinical to early clinical stage. The study of receptor occupancy is usually based on flow cytometry. Receptor occupancy data directly reflect the degree of drug interaction with the target *in vivo*, which are valuable for the calculation of first-in-human dose, optimal effective dose, dosing regimen, etc. Scientific sensitivity and robustness of detection methods and integrity of method validation could all affect the trustworthiness of the data. In this article, in the light of the general principles and consensuses of industry and the experiences of our lab, considerations for the method development and validation for receptor occupancy are discussed.

Key Words: receptor occupancy; flow cytometry; pharmacodynamics; method validation; biotherapeutics

近年来, 国内外新靶点抗体类药物研发进展迅速, 尤其是包括程序性死亡受体-1(PD-1)及程序性死亡受体配体-1(PD-L1)抗体在内的免疫检查点药物, 在肿瘤治疗领域取得了巨大成绩^[1]。受体占

有率数据可以直观体现药物与体内靶点作用水平的关系, 已经成为部分抗体类药物药动-药效学(PK-PD)研究中不可或缺的组成部分^[2-3]。随着靶向药物研发模式的转变和转化医学模式在整个新药研发过程中的应用, 受体占有率检测对于人体首次剂量(FIH)选择、最优药效剂量选择、给药周期确定等具有越来越重大的意义^[4]。例如, 2006年, 抗CD28人源单克隆抗体(TGN1412)I期临床试验中, 由于FIH的选择不当引发了灾难性事件, 很大程度上改变了生物药的FIH计算的理论基础, 以最低预期生物效应水平(minimal anticipated biological effect level, MABEL)为依据的方法开始被纳入到

收稿日期: 2019-02-28

基金项目: 国家科技重大专项(2019ZX09732001-020)、浦东科委CRO项目(PKF2014-C01)、上海市生物技术药物PK-PD工程技术研究中心项目(17DZ2252900)、上海市扬帆计划项目(16YF1411300)

作者简介: 孙晓卉(1994—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 药物毒理学。

E-mail: 13122389725@163.com

通信联系人: 马 璟(1963—), 女, 研究员, 博士生导师, 从事毒理学研究。

Tel: 028-60211999

E-mail: jma@ncdser.com

从临床前到临床的剂量推算中^[5]。受体占有率检测几乎是一些抗体类药物 MABEL 建立的最佳方式^[4,6-7]。此外,在临床最优药效剂量和给药周期的评价上,以 PD-1/PD-L1 为代表的免疫检查点抗体也全方面利用受体占有率研究数据。在毒性评价方面,长期最大化受体占有率可能标志着给药过量,或者长期结合可能导致严重的不良反应甚至产生毒性^[8-9]。因此,在抗体类药物的临床前及临床研究中,受体占有率研究越来越受到国内外药物研发企业、新药审评部门的重视。

目前,抗体类药物的受体占有率检测主要依赖于流式细胞技术。检测模式的模式选择、方法耐用性、试剂选择等因素均会在极大程度上影响受体占有率研究的结果。建立符合作用机制,稳定、耐用、灵敏的检测方法,对于提高受体占有率数据的可靠程度具有重大意义。受体占有率作为广泛意义上的生物标志物,其检测目前国际上的共识是应视具体情况,采取“符合目的”(fit-for-purpose)的原则进行不同程度的验证^[10]。然而,由于流式细胞技术和受体占有率研究的特殊性,国内对其方法学开发和验证的重视程度不够,药企和研发机构容易忽视分析方法学的研究。

本研究根据本实验室的经验,结合国外相关研发机构一般做法,参考国外学术界的一些共识,对受体占有率检测分析方法的开发和验证进行了探讨。

1 受体占有率检测方法的开发

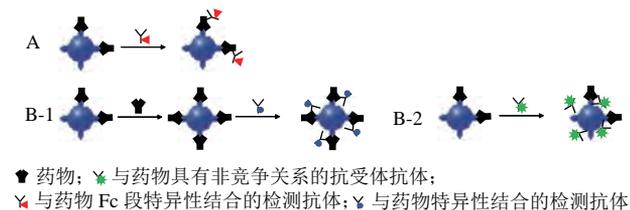
1.1 检测模式选择

受体占有率的检测模式选择,需要根据受体本身的特点和药物特性进行综合判断。目前常用的检测模式主要有以下 3 种。

1.1.1 通过检测已与受体结合的药物水平和总受体水平,计算受体占有率(图 1)

检测与受体结合的药物,可以采用荧光标记的非竞争性抗药物抗体或与药物 Fc 段特异性结合的抗体。总受体水平的检测一般有 2 种策略,一是在样本中加入饱和浓度的药物,随后采用检测与受体结合药物的方法进行,二是采用与药物具有非竞争

性关系的抗受体抗体进行。后者一般被认为较为直观和简单,并且在特殊试剂的选择、数据的变异程度等方面均具有一定优势。



A: 与药物结合的受体水平(采用荧光标记的、非竞争性抗药物抗体进行测定), B-1: 总受体水平(加入饱和浓度药物,占据细胞表面全部受体,采用荧光标记的、能够与药物特异性结合的抗体进行检测), B-2: 总受体水平(采用荧光标记的、与药物具有非竞争性的抗受体抗体进行测定)

图 1 通过检测已与受体结合的药物水平和总受体水平,计算受体占有率

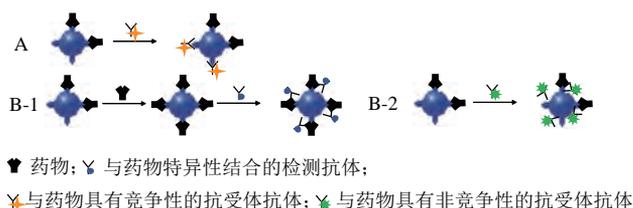
Fig.1 Calculation of Receptor Occupancy by Detecting Drug Levels That Have Been Bound to the Receptors and Total Receptor Levels

1.1.2 通过检测游离受体水平和总受体水平,计算受体占有率(图 2)

一般分别采用与药物具有竞争性或非竞争性关系的抗受体抗体,分别检测游离受体水平和总受体水平。该方法应格外注意抗体试剂的选择,采用与药物具有竞争性关系的抗受体抗体,其与受体的亲和力一般不应大于药物本身,以免由于过度竞争而低估受体占有率水平。当所评价的药物与受体的亲和力较高且解离很慢时(K_d 较低),也可以考虑采用荧光或生物素化的药物本身作为检测抗体。

1.1.3 通过检测给药后游离受体水平,与给药前游离受体水平进行比较来计算受体占有率(图 3)

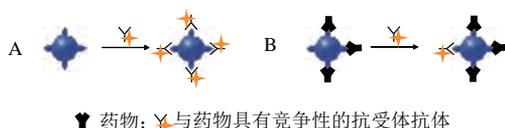
在给药后总受体水平检测较为困难时,可以考虑采用该策略。值得注意的是,该模式的受体占有率水平无法通过单个样本的检测得到,需要采用受试个体给药前的数据进行计算。由于抗体类药物半衰期长,该分析模式对于分析方法耐用性的要求较高,数据变异的风险较大。



A: 游离受体水平 (采用荧光标记的、与药物具有竞争性关系的抗受体抗体进行测定), B-1: 总受体水平 (加入饱和浓度药物, 占据细胞表面全部受体, 采用荧光标记的、能够与药物特异性结合的抗体进行检测), B-2: 总受体水平 (采用荧光标记的、与药物具有非竞争性关系的抗受体抗体进行测定)

图2 通过检测游离受体水平和总受体水平, 计算受体占有率

Fig.2 Calculation of Receptor Occupancy by Detecting the Levels of Free Receptor and Total Receptor



A: 总受体水平 (即给药前游离受体水平, 采用荧光标记的与药物具有竞争性的抗受体抗体进行测定), B: 给药后游离水平 (采用荧光标记的、与药物具有竞争性的抗受体抗体进行测定)

图3 通过检测给药前总受体水平和给药后游离受体水平, 计算受体占有率

Fig.3 Calculation of Receptor Occupancy by Detecting Total Receptor Levels before Administration and Free Receptor Levels after Administration

1.2 方法开发中的其他因素

受体占有率研究中的理想情况是目标细胞群具有稳定且较高的受体表达水平。在受体表达水平较低时, 则受体占有率研究对流式细胞仪的灵敏度、分析方法的稳健程度、荧光基团的选择有更高的要求^[11]。另外, 与药物结合后内化水平高或本身在细胞表面表达时间短的受体, 例如细胞毒 T 淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)^[12], 通常无法进行受体占有率的评价。

由于血液收集相对容易, 受体占有率检测一般针对不同的血细胞亚群进行分析。例如, 免疫检查点抗体通常用来评价 T 细胞表面的受体占有率水平。值得注意的是, 目标细胞群的选择需要基于药物的作用机制或数据目的进行判断。例如, 在

CD47 抗体的研究中, 由于红细胞表面表达 CD47 抗原, 治疗后由红细胞枯竭造成的贫血是主要的不良反应之一^[13]; 在该情况下, 除药效靶细胞外, 红细胞的占位水平可以为临床安全性评价提供重要数据。当靶点在特定组织的细胞表面表达时, 评价靶组织中的占有率水平更有价值。然而, 由于实际操作及伦理问题, 靶组织的获得往往十分困难, 此时以血液样本作为替代组织的受体占有率研究也可以提供有参考价值的数据。

受体占有率研究一般采用新鲜血液样本进行检测, 冻存的外周血单个核细胞 (PMBC) 可能会由于处理过程影响药物和受体之间的作用平衡, 从而导致数据与新鲜血液样本具有一定差异。根据靶点本身性质的不同, 样本的稳定性可能在几个小时到几天不等。这对于新药临床试验中全血样品从临床基地运送至检测中心实验室来说是个巨大的挑战。因此, 在进行方法开发、验证时, 也应充分考虑真实样品的采集和物流因素。

2 方法学验证

受体占有率分析一般采用半定量方法进行, 不使用标准曲线, 采用响应信号值 (包括但不限于平均荧光强度、中位荧光强度、百分比等) 作为报告值和计算依据。受体占有率分析方法的验证一般采用“符合目的”的原则, 根据具体应用环境和目的、目标受体、细胞群等因素衡量验证内容。方法学验证一般除下述内容外, 还应根据技术因素和实际情况, 有针对性地进行相关项目的考察。

2.1 检测范围

检测范围是受体占有率检测中最重要的验证参数之一。通过在空白样本中, 体外加入递增浓度的受试药物, 考察方法的浓度-响应关系和响应值的上下限。受试药物的浓度需要覆盖浓度响应曲线的上下平台, 并在一定浓度范围内表现出明显的浓度-响应关系曲线。

2.2 精密度

建议设置 3~6 个不同浓度的加样样品, 进行批内精密度和批间精密度考察。批内精密度是对同一分析批中的样品进行评价, 批间精密度应在数日内, 对不同分析批中的验证样品进行评价。采用受

体占有率的变异系数(CV%)作为精密度评价标准,根据方法和受体表达量的不同,接收标准一般可以设定为25%或更低^[2]。

2.3 生物变异程度

验证阶段对个体内、个体间的变异程度进行考察,有助于理解和评估真实检测样本的数据,或帮助设定样本检测时的接受标准。建议在多个健康和(或)疾病个体中考察饱和受体水平和(或)游离受体水平的响应值,评价可能的变异程度。该验证的目的是考察生物学固有的属性信息,因而无需设立接受标准。

2.4 特异性

当使用的抗体试剂与受试药物有明确的竞争或非竞争关系时,则应进行相关特异性验证。对于竞争性试剂,在加入递增浓度的药物后,受试样品的响应值应表现出明显上升或下降的趋势。对于非竞争性试剂,加入递增浓度的药物后,受试样品响应值与未加入药物样本响应值的相对偏差应控制在某一范围内(例如25%)。

2.5 稳定性

受体占有率样本通常很难在采集后立即进行分析,因此评估从样本收集到分析的时间对受体占有率水平的影响十分重要。可以通过新鲜采集的加样样本(基准值)与加样样本在不同条件下保存一段时间后的受体占有率的相对偏差(RE%)来进行评估。试验设计需要至少3~5个个体样本,建议稳定性评估应该包括至少1个超出预期最佳样本处理时间的时间点来建立稳定性下降时的分界点。稳定性试验的设计,应尽可能模拟试验样本移交的真实条件和突发可能性。一般情况下,稳定性样本与立即检测的结果的RE不大于25%,可以认为条件下样本稳定^[2]。如果样本稳定性不能得到有效的控制,则可能需要重新考虑和评估样本的采集、运输和处理过程,例如在临床基地收集样品之后立即染色和固定。

此外,还需要通过考察处理后样本稳定性,评估从样本处理后(例如裂红、染色等过程)到上机检测期间内可能的不稳定因素。

2.6 其他验证项目

根据流式细胞技术的特点,需要考察一些专属的验证项目。例如,多色流式荧光技术通常采用调节荧光补偿的方式解决不同通道间的荧光溢漏问题,在验证中应采用N-1染色样本对设置补偿参数后的溢漏程度进行考察^[14]。对于具有连续进样功能的流式细胞仪,应评估连续进样测定时的残留程度。

2.7 数据校正

由于仪器、处理过程和样本原因,不同人员、不同日期测得的响应值不可避免地具有一定变异。因此,在数据采集和分析时,采取适当的措施评估非特异性响应或进行数据校正十分重要。在受体占有率试验中,可以使用isotype control、FMO(fluorescence minus one)或非特异性染色等对照样本确定非特异性结合水平,并对样本的响应值进行校正。此外,在验证和试验期间,比较仪器质控试剂的数据,可以帮助评估流式细胞仪的数据的变异。

3 受体占有率数据的理解 and 应用

尽管受体占有率数据可以直观反映药物与靶点作用的程度,然而数据的解释和利用还应综合评估药物作用机制以及其他的影响因素^[15]。药物的作用机制不同,药效不同,受体占有率水平也会不同。对封闭细胞表面受体而不损伤靶细胞的拮抗药,阻断下游受体信号通常需要较高的占有率水平,因而受体占有率水平与药效关系密切;当药物的作用机制为对靶细胞有杀伤作用时,占有率水平可能仅能在靶细胞被消耗前的极短时间内进行评估,而且高占有率水平通常不是必须的;当药物为受体激动药时,很低的占有率水平就可能产生最大信号,因此下游通路的信号可能与药效动力学更为相关。

抗药物抗体(ADA)的产生可能会让数据的解释变得复杂^[3,16]。例如,当检测游离受体的竞争性抗体与药物具有类似的序列时,ADA可能会与检测试剂结合,从而低估游离受体水平,在药物已被完全清除时也将得到很高占有率的结果。因此在分析数据时,要综合考虑PK、ADA和RO的结果,并且充分考虑影响检测方法的因素。

临床前研究中,受体占有率研究一般在相关种属动物中进行。由于不同种属动物的靶点亲和力水平、受体目标细胞的表达量等均可能与人不一致,受体占有率数据并不应该直接外推至人。应该充分结合 PK、PD 和相关的体外数据,采用数学建模的方式,科学地进行预测。

4 结论与展望

受体占有率研究已经被广泛用于 PK-PD 研究、毒性评价等方面。通过规范检测模式设计和进行充分的方法学验证,可以充分提高受体占有率结果的可信度,加速相关药物在 FIH 及最佳药效剂量预测等方面的进度。可以预见,更灵敏的受体占有率检测方法可能会具有更大的数据应用潜力。目前,受体占有率研究基本上还处于半定量阶段,未来通过磁珠技术和绝对细胞计数技术,可以实现体内靶细胞受体数量的精确定量。采用定量药理学的手段,通过将总受体和占位受体的绝对定量数据、血药浓度、药物生物活性、生物标志物数据进行整合,可以为未来精准医疗时代的个性化用药提供重要的参考依据。

参考文献:

- [1] POSTOW M A, CALLAHAN M K, WOLCHOK J D. Immune checkpoint blockade in cancer therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2015, **33**(17): 1974-1982.
- [2] GREEN C L, STEWART J J, HOGERKORP C M, *et al.* Recommendations for the development and validation of flow cytometry-based receptor occupancy assays [J]. *Cytometry Part B*, 2016, **90**(2): 141-149.
- [3] VAINSHTEIN I, SCHNEIDER A K, SUN B, *et al.* Multiplexing of receptor occupancy measurements for pharmacodynamic biomarker assessment of biopharmaceuticals [J]. *Cytometry Part B*, 2016, **90**(2): 128-140.
- [4] LIANG M, SCHWICKART M, SCHNEIDER A K, *et al.* Receptor occupancy assessment by flow cytometry as a pharmacodynamic biomarker in biopharmaceutical development [J]. *Cytometry Part B*, 2016, **90**(2): 117-127.
- [5] ATTARWALA H. TGN1412: From discovery to disaster [J]. *J Young Pharm*, 2010, **2**(3): 332-336.
- [6] MOULARD M, OZOUX M L. How validated receptor occupancy flow cytometry assays can impact decisions and support drug development [J]. *Cytometry Part B*, 2016, **90**(2): 150-158.
- [7] STEWART J J, GREEN C L, JONES N, *et al.* Role of receptor occupancy assays by flow cytometry in drug development [J]. *Cytometry Part B*, 2016, **90**(2): 110-116.
- [8] LINDAUER A, VALIATHAN C R, MEHTA K, *et al.* Translational pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of tumor growth inhibition supports dose-range selection of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2017, **6**(1): 11-20.
- [9] SABER H, DALLE VALLE P L, RICKS T K, *et al.* An FDA oncology analysis of CD3 bispecific constructs and first-in-human dose selection [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, **90**: 144-152.
- [10] LEE J W, DEVANARAYAN V, BARRETT Y C, *et al.* Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement [J]. *Pharm Res*, 2006, **23**(2): 312-328.
- [11] WYANT T, ESTEVAM J, YANG L L, *et al.* Development and validation of receptor occupancy pharmacodynamic assays used in the clinical development of the monoclonal antibody vedolizumab [J]. *Cytometry Part B*, 2016, **90**(2): 168-176.
- [12] VALK E, RUDD C E, SCHNEIDER H. CTLA-4 trafficking and surface expression [J]. *Trends Immunol*, 2008, **29**(6): 272-279.
- [13] LIU J, WANG L J, ZHAO F F, *et al.* Pre-clinical development of a humanized anti-CD47 antibody with anti-cancer therapeutic potential [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(9): 1-23.
- [14] O'HARA D M, XU Y X, LIANG Z Y, *et al.* Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: II assays [J]. *J Immunol Methods*, 2011, **363**(2): 120-134.
- [15] WONG Y C, ILKOVA T, VAN WIJK R C, *et al.* Development of a population pharmacokinetic model to predict brain distribution and dopamine D₂ receptor occupancy of raclopride in non-anesthetized rat [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, **111**(111): 514-525.
- [16] HUA F, COMER G M, STOCKERT L, *et al.* Anti-IL21 receptor monoclonal antibody(ATR-107): Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamic evaluation in healthy volunteers: a phase I, first-in-human study [J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, **54**(1): 14-22.