

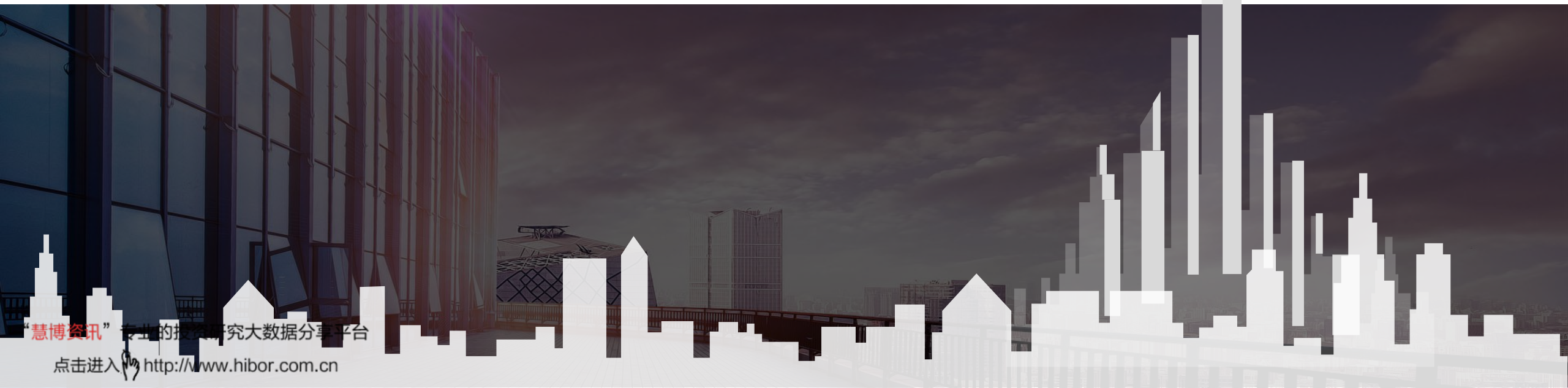
## 谱写新药诗篇的序章——浅析药物临床前研究过程

分析师：黄翰漾（S0190519020002）

孙媛媛（S0190515090001）

徐佳熹（S0190513080003）

报告发布日期：2020年9月21日



# 引言

近几十年来，随着药物作用靶点不断涌现、药物筛选和优化技术不断创新，全球小分子和大分子药物市场均保持着稳定较快的成长。同时，新药研发成本持续提升逐步成为行业常态，新药研发难度持续加大、新药研发成功率不断降低。因此，临床前研究作为新药发现的核心环节，重要性日益加深。而国内市场方面，在近年政策驱动下，药品行业正处于深刻变革进程中，“鼓励创新、接轨国际”将是未来的大趋势。在这种环境下，me-too类的创新药将逐步丧失生存的土壤，向Me-better/Best-in-class过渡，最终开发First-in-class的药物，将是我国创新药市场的必经之路。基于此，新药临床前开发将至关重要。

本篇报告着眼于新药临床前研究的细节过程，通过对化学药和生物药类别特性和相关法规的介绍；通过对药物发现、药物临床前生产、药物临床前评价三个方面的细节分析，初探化学药和生物药临床前研究各步骤的研究内容、目标和具体方法。

# 目录 CATALOGUE

01 药物类别特性和相关法规

02 药物发现

03 药物临床前生产

04 药物临床前评价

# 01

## 药物类别特性和相关法规

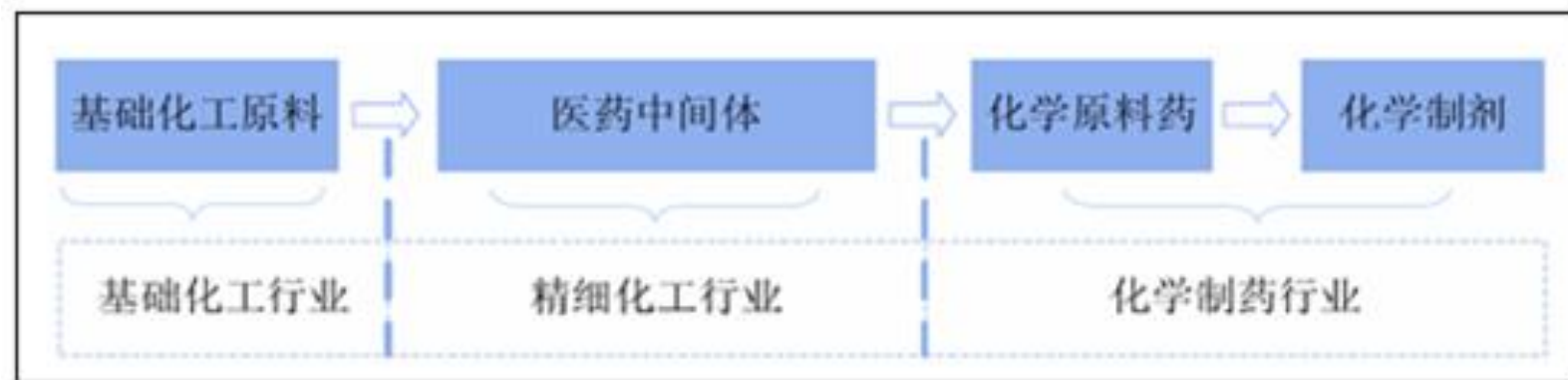


## 1.1 化学药的定义和特性

化学药是指通过合成或者半合成的方法制得的原料药及其制剂；天然物质中提取或者通过发酵提取的新的有效单体及其制剂；用拆分或者合成等方法制得的已知药物中的光学异构体及其制剂。

化学药多为小分子药物，结构比较容易鉴定，同时以口服为主，可直接进入细胞产生药效。随着生物药越来越多应用于临床治疗，化学药在医药市场的占比正逐步降低，但仍是当前候选药物的最主要来源。化学制药产业价值链包括基础化工原料、医药中间体、化学原料药和化学制剂。

图1、化学制药产业价值链





## 1.1 化学药的类别

国家食品药品监督管理局规定化学药品新注册分类共分为5个类别：

### 1类

- 境内外均未上市的创新药
- 含有新的结构明确的、具有药理作用的化合物，且具有临床价值的药品。

### 2类

- 境内外均未上市的改良型新药
- 在已知活性成份的基础上，对其结构、剂型、处方工艺、给药途径、适应症等进行优化，且具有明显临床优势的药品。

### 3类

- 境内申请人仿制境外上市但境内未上市原研药品的药品
- 该类药品应与原研药品的质量和疗效一致
- 原研药品指境内外首个获准上市，且具有完整和充分的安全性、有效性数据作为上市依据的药品。

### 4类

- 境内申请人仿制已在境内上市原研药品的药品
- 该类药品应与原研药品的质量和疗效一致。

### 5类

- 境外上市的药品申请在境内上市

## 1.2 生物药的定义和特性

- 生物药是指运用生物学、医学、生物化学等的研究成果，利用生物体、生物组织、细胞、体液等制造的一类用于预防、治疗和诊断的药物。
- 生物药尤其是抗体药优点在于靶向性高、选择性好，因此疗效确切、副作用小；缺点有膜透过性差（不易进入细胞，很难突破血脑屏障）、部分具有免疫原性等。

表1、生物药特性

| 特性    | 内容  |
|-------|---|
| 药理学特性 | <ul style="list-style-type: none"><li>• 药理活性高</li><li>• 治疗针对性强</li><li>• 毒副作用较少</li><li>• 生理副作用常有发生</li></ul>                                       |
| 理化特性  | <ul style="list-style-type: none"><li>• 生物材料中的有效物质含量低，杂质种类多且含量相对较高</li><li>• 生物活性物质组成结构复杂，稳定性差</li><li>• 生物材料易染菌，腐败</li><li>• 生物药物制剂有特殊要求</li></ul> |

## 1.2 生物药的类别

- 生物药包括氨基酸及其衍生物类、多肽和蛋白质类、核酸及其衍生物类、糖类、脂类、激素类、生物制品类（疫苗、细胞因子、生长因子、抗毒素及抗血清、血液制品、抗体、酶和辅酶等）
- WHO INN已发展和建立了近40种生物药的INN药学分类，包括单抗、抗体受体融合蛋白、各种多肽药物、重组蛋白酶等。

表2、生物技术药物部分种类统计

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| 激素       | FSH, LH, 生长激素, 胰岛素<br>胰岛素类似物, 促红素 |
| 生长因子     | PDGF, NGF, IGF-1                  |
| 细胞因子     | 干扰素, 白介素, 集落刺激因子                  |
| 血液制品     | 白蛋白, 凝血因子, 溶栓剂, 纤溶剂               |
| 单克隆抗体    | 鼠源性, 嵌合性, 人源化及 rDNA 技术            |
| 抗体相关性产品  | 抗体单链, 抗体片段融合产物                    |
| 疫苗       | 常规疫苗, 重组蛋白抗原,<br>细菌或病毒修饰物, 拟位抗原   |
| 核酸类产品    | 基因治疗, DNA 疫苗, 核酶                  |
| 细胞、组织和器官 | 自源性, 同种异型性, 异种性                   |



2017年10月，国家食品药品监督管理总局起草《药品注册管理办法(修订稿)》，按照产品成熟度不同分别将预防用生物制品和治疗用生物制品分别分为5个大类，新的注册分类更加侧重于是否原创，未对生物制品属性、制备和处方工艺、剂型、给药途径等进行分类，更方便注册申报。

表3、治疗用生物制品注册分类列表

|   |
|---|
| <b>1类：</b> 新型生物制品：指未在境内外上市的全新治疗用生物制品。由已上市的治疗用生物制品成分组成的新复方制剂，在境内外已上市制品基础上，改变氨基酸序列、改变蛋白质高级结构和多聚体形态的，改变翻译后修饰，或者对产物进行化学修饰（包括PEG化偶联修饰等）的，应当按照注册分类1类申报。   |
| 全新的基因治疗和细胞治疗类生物制品（例如创新机理、新载体、新靶细胞等），应当按照注册分类1类申报。   |
| <b>2类：</b> 改良型生物制品：指在境内外已上市制品基础上，对其制剂水平的结构（如影响释放和生物利用度的粒径及其分布、包合、聚合结晶等制剂技术产生的结构改变）剂型、处方工艺、给药途径等进行优化，对适应症进行增加、优化或者用药人群的增加（如增加儿童、老年人用药人群）；或者首次采用DNA重组技术制备的制品（例如以重组技术替代合成技术、生物组织提取技术等）、与境内外已上市制品制备方法不同的制品（例如采用不同表达体系、宿主细胞等）。 |
| 在境内外已上市制品基础上进行改进的基因治疗和细胞治疗类生物制品，应当按照注册分类2类申报。   |
| 除了儿童用药的外推之外，改良型生物制品应当具有明显临床优势，或者对制品的安全性、质量控制方面有显著的改进。   |
| <b>3类：</b> 境外上市、境内未上市的生物制品：若原研药/参照药仅在境外上市，申请人按生物类似药研发的生物制品可据此类别申报临床试验申请；不能按生物类似药技术要求进行研制申报的，申请人应根据制品情况按照注册分类1类或者2类申报临床试验申请。   |
| 原则上，注册分类3的生物制品应当在其原研药/参照药获得境内临床试验批准后方可开展临床试验。完成临床试验后，根据当时情势按照适宜的注册分类提交上市申请。   |
| <b>4类：</b> 境内已上市的生物制品。包括：   |
| 4.1生物类似药；   |
| 4.2不能按生物类似药技术要求进行研制申报的生物制品。   |
| <b>5类：</b> 进口生物制品：根据其成熟程度分为上述同样4种情形。  |
| 5.1新型生物制品；  |
| 5.2改良型生物制品；   |
| 5.3境外上市、境内未上市的生物制品：包括境外已上市的原研药提交的临床试验申请和上市申请，以及按生物类似药研发的进口生物制品的临床试验申请按此类申报。不能按生物类似药技术要求进行研制申报的，申请人应根据制品情况按照注册分类5.1类或者5.2类申报临床试验申请；  |
| 5.4境内已上市的生物制品。若原研药已在境内上市，申请人按生物类似药研发的生物制品按此类申报。   |

表4、预防用生物制品注册分类列表

|   |
|---|
| <b>1类：</b> 新型疫苗：指境内外均未上市的创新疫苗。在境内外已上市制品基础上制备的新的结合疫苗或者联合疫苗，与境内外已上市疫苗对应的抗原群或者型别不同的疫苗，境内外已上市疫苗保护性抗原谱不同的重组疫苗，更换其他未经批准使用过的表达体系或者细胞基质生产的疫苗，DNA疫苗，应当按照注册分类1类申报。      |
| <b>2类：</b> 改良型疫苗：指对境内已上市疫苗产品进行改良创新，使新产品具有重大技术进步和/或具有显著临床优势，或者对制品的安全性、质量控制方面有显著改进的疫苗。包括：   |
| 2.1 疫苗实体的改变，例如灭活疫苗或减毒活疫苗已上市，申报基因重组疫苗；减毒活疫苗已上市申报灭活疫苗等；   |
| 2.2 基于重大技术改进的疫苗，包括疫苗菌毒种/生产工艺/制剂处分的改进。如，由非纯化或全细胞（细菌、病毒等）疫苗改为纯化或者组份疫苗等；采用新的菌毒株、细胞基质或表达体系的疫苗；改变已上市结合疫苗的载体；改变灭活剂（方法）或者脱毒剂（方法），采用新工艺制备并且实验室研究资料证明产品安全性和有效性明显提高的疫苗； |
| 2.3 改变佐剂或采用新佐剂的疫苗；  |
| 2.4 改变给药途径或改变剂型，且新的给药途径或剂型具有显著临床意义；   |
| 2.5 改变免疫剂量和免疫程序，且新免疫剂量和免疫程序具有显著临床意义；  |
| 2.6 改变适用人群，且新适用人群具有显著临床意义；  |
| <b>3类：</b> 境外上市、境内未上市的疫苗。   |
| <b>4类：</b> 境内已上市的疫苗。  |
| <b>5类：</b> 进口疫苗：根据其成熟程度分为上述同样4种情形。  |
| 5.1新型疫苗；  |
| 5.2改良型疫苗；若在境外已上市制品基础上进行改变的，应当按照注册分类2类申报。  |
| 5.3境外上市、境内未上市的疫苗；   |
| 5.4境内已上市的疫苗。  |

## 1.3 化学药和生物药区别

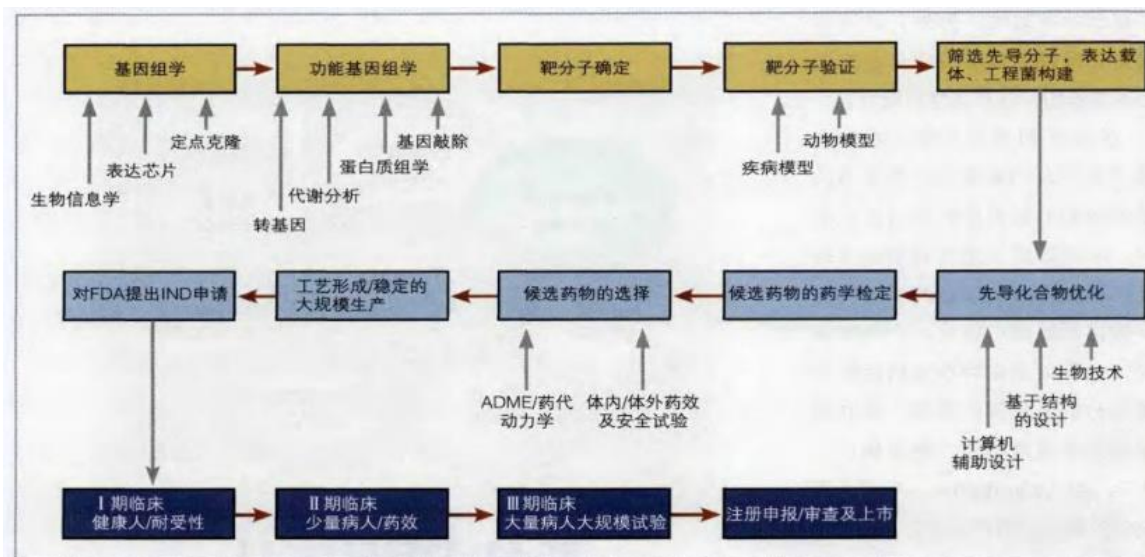
| 区别        | 化学药                 | 生物药                               |
|-----------|---------------------|-----------------------------------|
| 分子量       | 大多为小分子，通常分子量<1000Da | 大多为蛋白质，其分子量巨大，通常>5000Da，蛋白质空间结构复杂 |
| 结构复杂度     | 相对简单                | 相对复杂                              |
| 研发生产和仿制难度 | 相对小                 | 相对大                               |
| 原料来源      | 有机合成或天然产物分类         | 发酵、单体克隆、生物半合成                     |
| 核心技术      | 化学合成                | 生物合成（菌种和细胞培养技术）                   |

## 1.4 相关法规

《药品注册管理办法》（局令第28号）对于临床前的规定：

- 第二十一条 为申请药品注册而进行的药物临床前研究，包括药物的合成工艺、提取方法、理化性质及纯度、剂型选择、处方筛选、制备工艺、检验方法、质量指标、稳定性、药理、毒理、动物药代动力学研究等。生物制品还包括菌毒种、细胞株、生物组织等起始原材料的来源、质量标准、保存条件、生物学特征、遗传稳定性及免疫学的研究等。
- 第二十二条 药物临床前研究应当执行有关管理规定，其中安全性评价研究必须执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）。

图2、新药研发历程



## 1.4 相关法规

药品不同阶段的相关规范：

| 阶段      | 规范                   | 内容   |
|---------|----------------------|--|
| 药品临床前研究 | 《药物非临床研究质量管理规范》（GLP） | 非临床安全性评价试验设计、实施、查验、记录、归档保存和报告等组织管理过程的质量体系。   |
| 药品临床研究  | 《药品临床试验管理规范》（GCP）    | 药物临床试验全过程的标准规定，包括方案设计、组织实施、监查、稽查、记录、分析总结和报告。   |
| 药品厂家生产  | 《药品生产质量管理规范》（GMP）    | 药品生产和质量管理的基本准则，适用于药品制剂生产的全过程和原料药生产中影响成品质量的关键工序。  |
| 药品经营    | 《药品经营质量管理规范》（GSP）    | 在药品流通过程中，针对计划采购、购进验收、储存、销售及售后服务等环节而制定的保证药品符合质量标准的一项管理制度。                                       |
| 药品使用    | 《药品使用质量管理规范》（GUP）    | 医疗机构在药品使用过程中，针对药事管理机构设置、人员素质制度职责、设施设备，药品的购进、验收、储存、养护和调剂使用，药品不良反应监测、信息反馈、合理用药等环节而制定的一整套管理标准和规程。 |



## 1.4 相关法规

《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）：非临床安全性评价试验设计、实施、查验、记录、归档保存和报告等组织管理过程的质量体系。开展非临床药物安全性评价的机构需要有GLP认证资质。GLP认证分为申请与受理、资料审查与现场检查以及审核与公告三大环节。

要点：

- 申请试验项目应满足《认证管理办法》要求
- 组织管理体系设置应合理
- 实验设施及仪器设备能满足开展试验的需要
- 实验动物饲养管理应规范,记录应完整
- 参加研究的人员必须训练有素
- 从始至终必须有严格的管理和监督
- 实验的各个环节都必须制订出SOP（标准操作程序）且具有可操作性
- 供试品的管理记录应完善



## 1.4 相关法规

由于各国对药品注册管理上的差别,所制定的GLP规范也有所不同。非临床药物安全性评价GLP认证资质颁发机构主要包括我国国家食品药品监督管理局(NMPA)、美国食品药品监督管理局(FDA)、经济合作与发展组织(OECD)。药品出口必须凭相关国际机构GLP认证实验室出具的安全性评价数据到相关部门登记注册。

表5、NMPA、FDA、OECD GLP规则异同比较

|          | NMPA   | FDA  | OECD  |
|----------|--|--|---|
| 法律地位     | 法规   | 强制执行的法规  | 原则,不是强制执行的  |
| 项目管理     | 需要提前进行认证,只有进行提前认证并且通过后才可开展相关试验                         | 无提前认证  | 需要提前进行认证,只有进行提前认证并且通过后才可开展相关试验  |
| 被检单位的选择  | 定期检查为主,对已经通过认证的机构不定期飞行检查                               | 以风险为基础,不定期的检查  | 定期对已经通过认证的单位进行检查,通常每两年一次  |
| 检查方式     | 重点对试验机构进行检查,确定被检的试验机构及其所进行的试验符合GLP的程度                  | 针对课题的检查  | 重点对试验机构进行检查,确定被检的试验机构及其所进行的试验符合GLP的程度   |
| 质量保证体系   | 质量保证部门审核研究方案,定期检查档案、实验设施、实验仪器设备。                       | 质量保证部门审核研究方案并保存所有的研究方案及修订,负责监测试验研究而来的设施、设备、人员、方法、操作、记录和控制的管理 | 不要求质量保证部门必须签署研究方案,但要求有所有的研究方案及研究方案的修订的拷贝。有计划,有目的,有步骤的对试验项目、设施、过程的检查和对供应商或承包商进行审查。                   |
| 标准操作规程   | 需经过质量保证部门的检查,部门负责人签字确认,经机构负责人批准。对SOP的制定、管理和实施有明确的条款要求。 | 要求试验场所有足够保证研究质量和数据完整性的SOP。操作偏离SOP要求项目负责人员进行审查和评判,并形成原始记录。    | 需经过质量保证部门的检查要求试验机构拥有一套完善的标准操作规程要求SOP系统应覆盖面全、试验操作一致性高、可用性强,集中对SOP进行管理。操作偏离SOP要求项目负责人员进行审查和评判并形成原始记录。 |
| 档案的管理和存储 | 档案的保存期限为药品上市后的至少五年                                     | 保存最短期限在向FDA提交申请后的5年或者研究/上市申请批准后的2年                           | 档案的保存期限没有明确的规定,但对于易腐坏的标本,应保存至其不再具有保存价值为时限。  |
| 总结性报告    | 不需要附有质量保证部门的监管记录                                       | 需要总结性报告中附有质量保证部门的监管记录  | 不需要附有质量保证部门的监管记录,视其为机构内部工作文件,一般情况下不应提供给监管当局,可以鼓励机构质量保证部门诚实的报告所有发现,无需担心因监管记录的泄漏而损坏实验室的名誉。            |

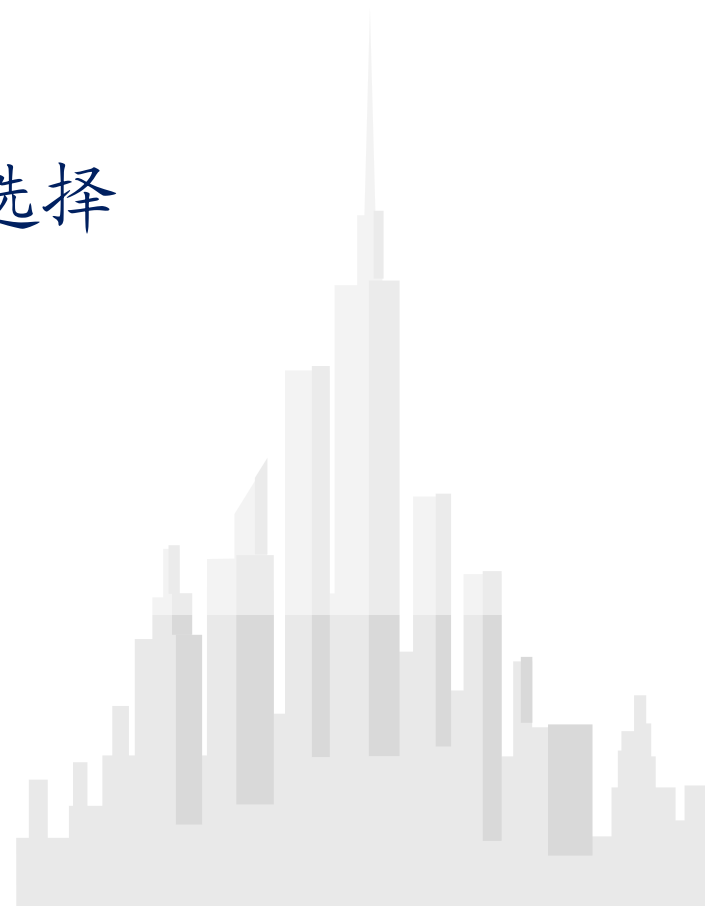
# 02

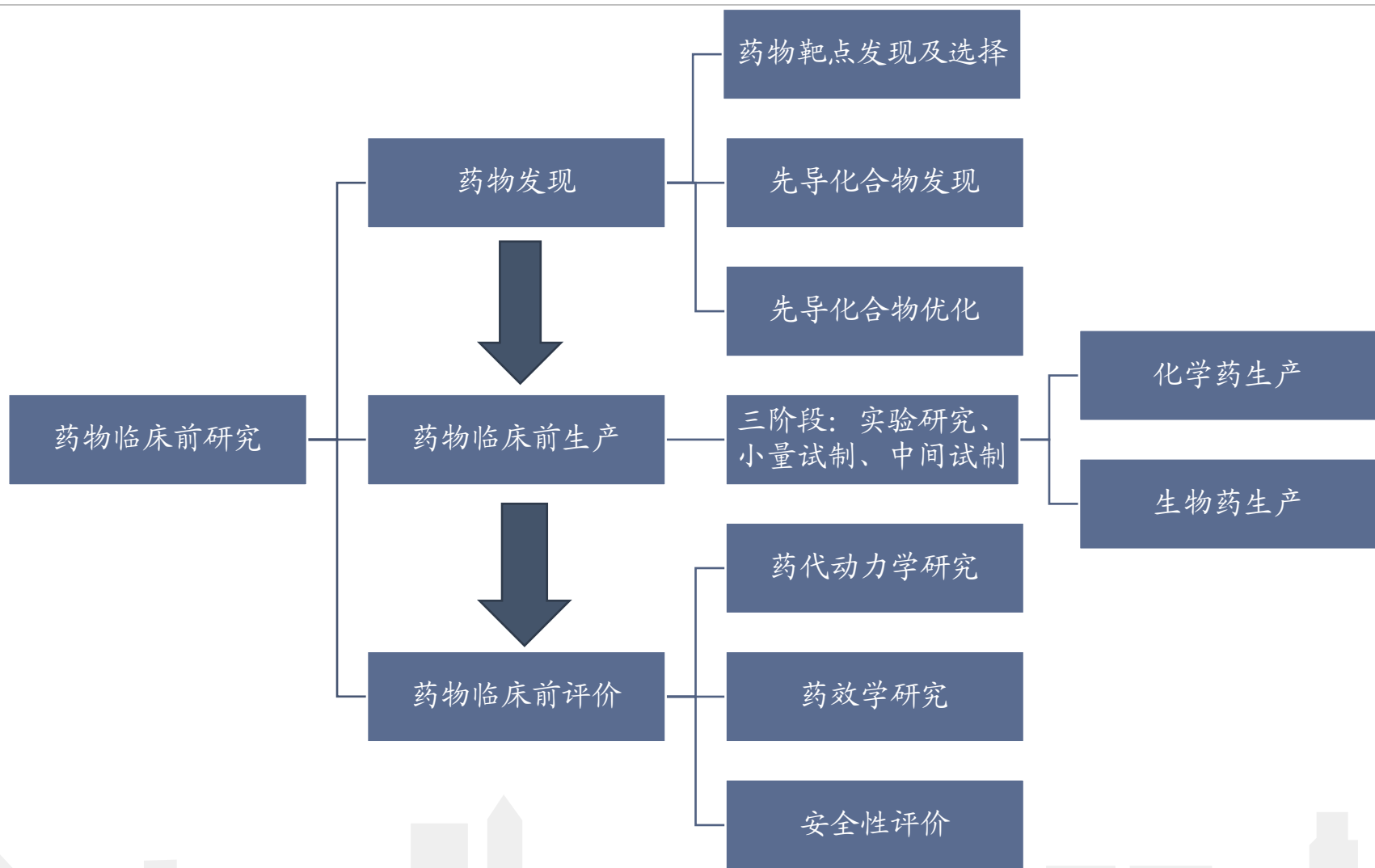
## 药物发现

药物靶点发现及选择

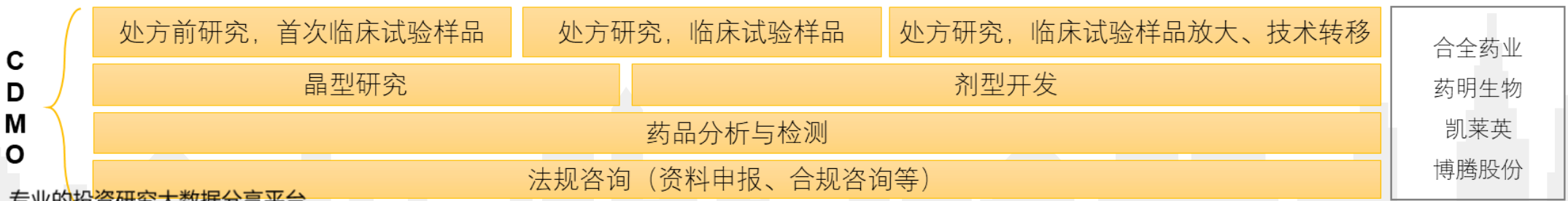
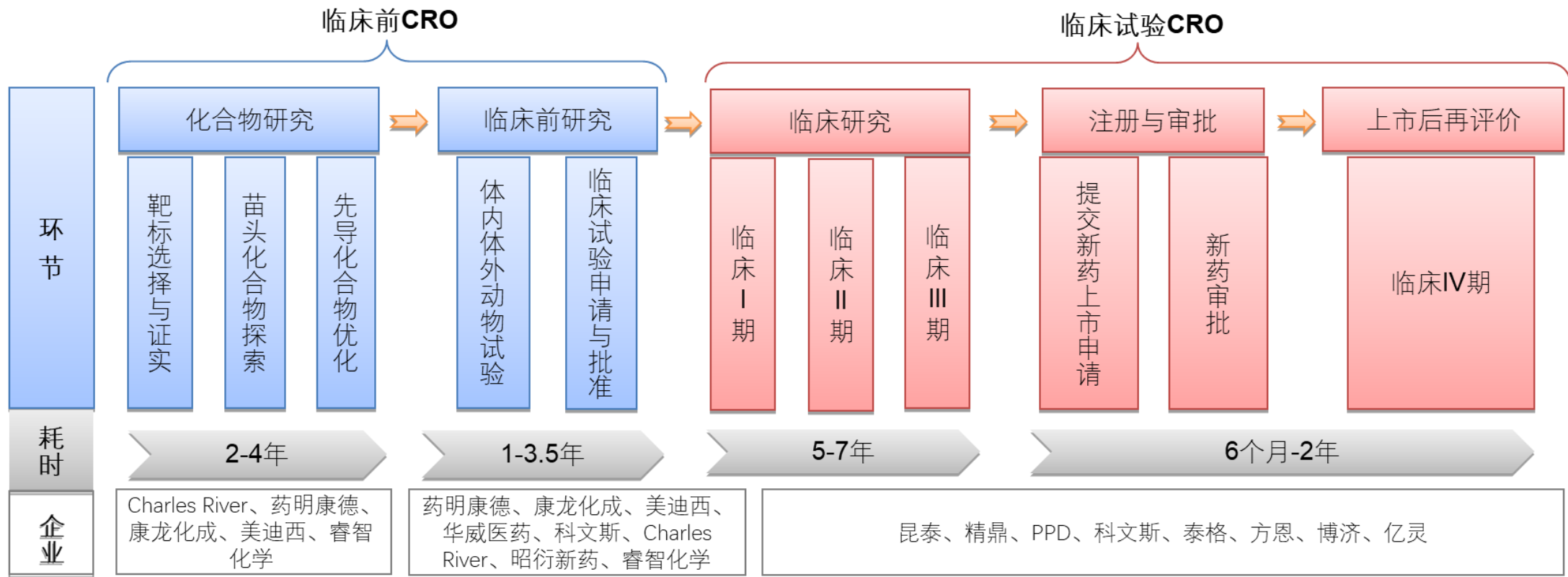
先导化合物发现

先导化合物优化





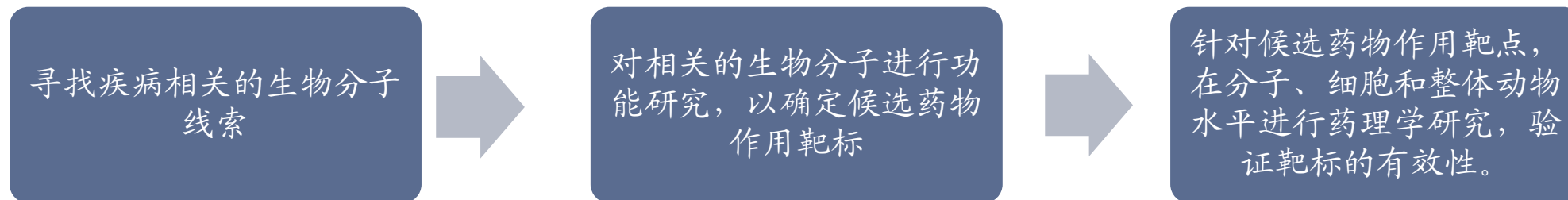
## 新药研发过程与CXO关系



## 2.1 药物靶点的发现及选择

- 选定一种潜在的可治疗性疾病作为研究目标之后，就需要**识别与疾病相关的靶分子**，即确定有特殊生物活性且有潜在治疗作用的分子（通常是蛋白质）。
- 鉴定出在普通及特殊细胞中起关键作用的多种蛋白，形成如何调节特定的疾病相关蛋白的功能的假说。这些假说的基础可以是一个科学理论，也可能是由特殊疾病组织的基因分析所获得的信息。建立假说的过程称为**靶点确认**。
- 根据人类基因组学计划研究成果估计，人体内可能的药物作用靶点大约有5000个以上，**更多的药物作用靶点有待于进一步挖掘**。

图3、药物靶点发现与确证流程





## 2.1 药物靶点的发现

靶基因和靶蛋白与疾病间的关系尚不清楚，但是作为潜在的**药物靶点**并不影响其对小分子配体的亲和选择作用，在疾病细胞或动物模型的活性检测及临床研究中可以进一步了解靶点与疾病间的关系，实现对靶基因或蛋白的功能分析，从分子水平上揭示疾病机理及其治疗机制。

表6、药物靶点的发现技术

| 技术种类    | 内容   |
|---------|--|
| 基因组学技术  | 包含差异基因表达（DGE）、表达序列标签（EST）等技术   |
| 蛋白质组学技术 | 在蛋白质水平上研究疾病状态以及正常状态下的细胞或组织的蛋白质差异变化，可以发现潜在的 <b>药物靶蛋白</b>  |
| 比较分析研究  | 化合物的基因表达、蛋白组谱、表型的多参数分析、细胞毒性数据形成数据库，可通过相似性比较识别当前小分子的 <b>靶标</b> 。  |
| 副作用报告系统 | 化学小分子 <b>靶标</b> 的鉴定可用于阐明相关化合物的作用方式，也可用来识别“ <b>脱靶</b> ”蛋白，即化学小分子作用的 <b>靶标</b> 以外的蛋白。药物小分子与“ <b>脱靶</b> ”蛋白结合，产生不良反应甚至生物毒性。 |

## 2.1 药物靶点的发现

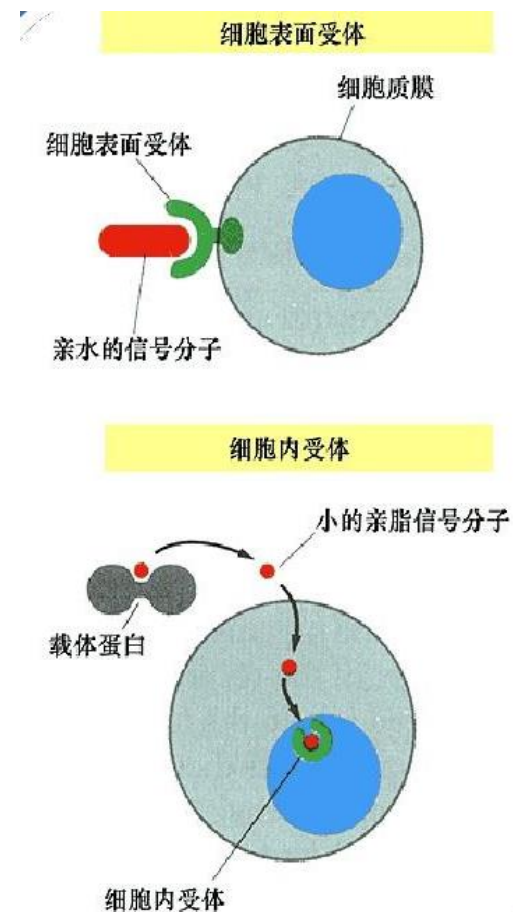
### ● 结构非特异性药物

不与受体结合，作用主要取决于分子的物理或物理化学性质，如甘露醇改变渗透压产生利尿作用。

### ● 结构特异性药物

与受体结合，大多数临床应用的药物属于此类，产生生物活性的类型和强度主要是因为药物分子与特异的生物大分子在空间发生互补的相互作用或复合而发挥药理作用，主要包括受体、酶、离子通道、转运体、核酸等。这些大分子是现代新药研究与开发的关键，需要寻找、确定和制备药物筛选靶点。

图4、两种药物的作用方式



## 2.1 药物靶点的发现：蛋白质组学方法

蛋白质组学主要是寻找小分子作用的蛋白质，分离纯化，确定小分子的靶标，为其作用方式提供直接证据。

**蛋白质差异表达的应用** 化学小分子作用前后细胞蛋白质的种类和数量发生了变化，通过对差异表达的检测可以估计小分子的作用方式，筛选出相应靶标。

### 荧光差异二维凝胶电泳技术

- 相对于普通凝胶电泳，可在一块聚丙烯凝胶上直接比较两种蛋白质样本，避免了两块凝胶比较时可能产生的系统误差。
- 可以定量分析大量修饰过的蛋白，提供结构和翻译后修饰信息，使重要生物系统变化的鉴定和蛋白功能阐述得以实现
- 可以定量分析截短的或部分降解的蛋白质。

### 色谱共洗脱

- 配体-靶标复合物在高效液相色谱共洗脱加上配体-靶蛋白结合导致化合物色谱滞留时间的特征性转移
- 可用高效色谱液相法-质谱/质谱法来确定靶蛋白。

## 2.1 药物靶点的发现：蛋白质组学方法

**蛋白质亲和特性的应用** 亲和纯化是利用生物分子间的特异性结合进行蛋白质的分离和纯化。利用蛋白质亲和特性研究药物与靶蛋白的结合，需要对药物分子进行构效关系研究，但无需了解药物与靶蛋白之间可能发生的某些特定的细胞或生化反应。研究可能受药物小分子衍生产物的限制，合适的作为阴性对照的化学小分子药物也较难得到。

### 细胞培养稳定同位素标记法

- 在细胞培养过程中利用稳定同位素标记的氨基酸结合质谱技术对蛋白的表达进行定量分析的一种体内代谢标记技术。
- 目前标记的氨基酸的种类已扩展到亮氨酸、精氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸以及酪氨酸等。

### 小分子探针

- 小分子探针主要由报告基团、连接基团以及活性基团组成
- 作用原理是小分子活性基团部分与靶标紧密结合，而报告基团部分可有效标记靶标生物大分子，之后通过亲和层析、凝胶电泳和质谱分析等手段确认靶标蛋白。

### 蛋白质芯片技术

- 将一个蛋白质库以二维可设定位置的网格格式固定在一个载玻片或芯片上，可测定亲和力低和含量低的蛋白质。
- 由于蛋白会变性，制造过程中要保证蛋白的构象和功能，并且要表达和纯化大量正确折叠且有活性的蛋白，蛋白质芯片耗时长，实验要求高，制造难度远高于基因芯片。

## 2.1 药物靶点的发现：蛋白质组学方法

**蛋白质稳定性的应用** 基于靶蛋白与小分子结合后稳定性变化，包括抗酶解活性、热稳定性等，发展出了一系列小分子靶标的筛选鉴定方法。

### 蛋白质抗酶解活性

- 小分子化合物的结合可能会掩盖蛋白酶的剪切位点或结合小分子后的靶蛋白局部或整体构象的稳定性增加，对蛋白酶的易感性下降，导致结合小分子的靶蛋白可能较未结合状态的靶蛋白不易被蛋白酶降解。

### 氧化速率的蛋白稳定性 (SPROX)

- SPROX与药物亲和反应的靶点稳定性 (DARTS) 类似，DARTS利用的是蛋白质不同的水解特性，而SPROX利用的是不同的折叠状态和热力学稳定性。
- 小分子化合物与靶蛋白结合后可能对靶蛋白的折叠状态以及热动力学稳定性产生影响而使靶蛋白发生变化。

### 蛋白质热稳定性

- 临床药物作用于细胞裂解液中不同的靶蛋白时，所有的靶蛋白都有其独特的溶解曲线，当已知可结合到这些蛋白上的药物加入细胞裂解液中，可观测到明显的溶解曲线移动，根据这一原理开发出细胞热转移 (CETSA) 方法
- 可以直接测量药物到达靶细胞的程度，检测小分子在细胞裂解液甚至完整细胞组织中的作用。



## 2.1 药物靶点的发现：基因组学方法

基因组学方法主要分析化学小分子对基因组表达水平的影响，获得小分子作用的特征表达谱，通过分析确定分子靶标。但由于基因表达与蛋白质表达之间的对应关系存在一定的不确定性，不能直接确定药物靶标，因此存在一定的局限性。

### 基因芯片技术

基因芯片技术在DNA测序、基因表达分子与基因调控机制研究、基因药物设计与筛选等方面应用广泛，利用基因芯片技术和双重荧光法，通过分析检测正常组织和癌细胞中MicroRNAs (miRNAs) 的差异表达，获得miRNAs癌症表达谱，并进一步确定程序性细胞死亡因子。

### 特征基因及人工构建菌株

基因表达谱存在较多无效信息和干扰信息，通过一定的选取可发掘在相应组织（如肿瘤组织）中特异表达的基因和药物治疗的靶序列。特征基因集合建立后，联合人工构建菌株技术，用这些基因构建相关预测菌株，这些预测菌株的基因表达可直接揭示相关药物的作用机制。

### 生化抑制策略

在基因组中，由一个基因突变引起的表型改变可被其他基因的过表达消除，该现象是生化抑制策略的基础。生化抑制策略是用化学抑制剂作为“突变基因”，而其他部分纯化的蛋白混合物作为一种“过表达蛋白”，以此研究相关化学抑制剂的作用方式与靶标。

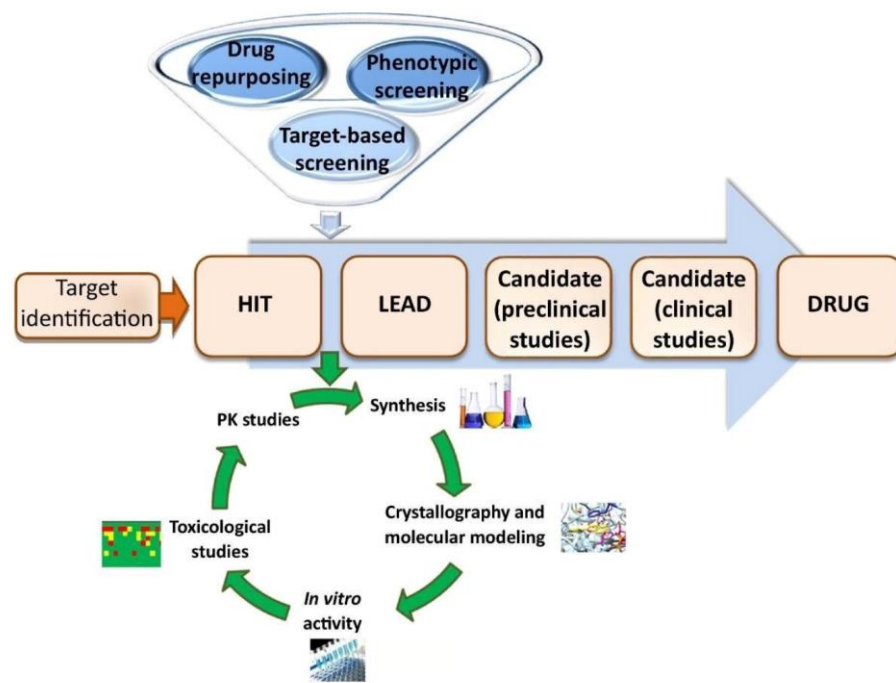
## 2.1 药物靶点的选择

药物发现中的**靶点选择**过程是由科学、医学、市场、法规及战略性思考间的复杂平衡。药物失败的一个主要原因就是开发初期对药物靶点生物学功能的认识不足或错误理解。因此，**确定靶点，识别并确认其生理学、病理学特征**是药物开发阶段极其重要的一个部分。



苗头化合物是指一个对特定靶点有活性的化合物，可能是天然配体或从文献中选取的分子。把筛选中发现的“苗头化合物(hits)”变成“先导化合物”(Hit to Lead)，先导化合物可能是筛选出的一个苗头化合物或者一系列的同系物，也可能是来源于文献的化合物。对于高通量筛选，可能会产生离散的、多个系列的苗头化合物，这就需要选择其中一个系列继续研究。

图5、先导化合物的发现流程



## 2.2 化学药先导化合物的发现

| 发现方式             | 内容和特点  |
|------------------|--|
| 广泛筛选             | 获得先导化合物的传统方法，是在众多研究的基础上获得生物活性物质的过程。  |
| 意外发现             | 对意外发现的化合物进行构效研究，开发出一系列的新药。   |
| 根据疾病的发病原因和药物作用机理 | 针对其关键环节及限制性步骤，同时考虑药物在体内的转运和代谢设计化学药物，称为摹于机理的药物设计。在疾病机理的基础上对信号分子的作用机理进行研究从而发现和获得新的先导化合物。                   |
| 通过化合物库           | 世界上大型药物研究和开发组织都有自己的化合物库：包括天然产物提取分离、结构测定所得的天然产物库，化学合成特别是用组合化学技术形成的化学分子库，通过蛋白质表达建立的基因工程库等。                 |
| 高通量虚拟筛选          | 利用计算机强大的计算能力。采用三维药效基团模型或分子对接的方法，在化合物数据库中寻找可能的活性化合物的方法。在找到一些潜在的活性分子之后，可以通过向有关公司订购、合成或提取分离的方法得到样品，并进行药理测试。 |

## 2.2 化学药先导化合物的发现

- 1、**广泛筛选：**获得先导化合物的传统方法，是在众多研究的基础上获得生物活性物质的过程。初期的新药寻找和先导化合物的获得都是以这种方法进行的。早期的筛选是从天然药用植物中提炼有效成分为特点。随着化学方法的日益进步和医疗需求的不断提高，促使人们进行大规模广泛的药理筛选，发现了大批有医疗价值的化学药品。
- 2、**意外发现：**获得先导化合物和药物的方法之一，如抗菌药青霉素、抗肿瘤药顺铂和viagrat21等，人们随后对其进行构效研究，开发出一系列的新药。



## 2.2 化学药先导化合物的发现

### 3、根据疾病的发病原因和药物作用机理

针对其关键环节及限制性步骤，同时考虑药物在体内的转运和代谢设计化学药物，称为摹于机理的药物设计。它是先导化合物发现的有效捷径。人的机体是由细胞组成，细胞的活性受外部信号控制。外部信号传导到细胞内部，引起细胞内的一系列反应：信号传导途径一旦发生差异，就会导致平衡失调。这是疾病机理的基础，在此基础上对信号分子的作用机理进行研究。从而发现和获得新的先导化合物。

#### 由药物副作用发现新的先导化合物

- 常可从已知药物的毒副作用出发找到新药或将毒副作用与治疗作用分开而获得新药。
- 在某些情况下，某药物的毒副作用能对另一疾病有治疗作用，例如吩噻嗪类抗精神失常药氯丙嗪及其类似物是由结构类似的抗组胺药异丙嗪的镇静副作用发展而来的。

#### 通过化合物代谢研究得到新的先导化合物

- 药物通过体内代谢过程可能被活化，也可能被失活。甚至转化成有毒的化合物。
- 可以选择其活化形式或考虑口服以避免代谢失活或毒化的结构作为药物的先导物。
- 运用这类先导化合物，得到优秀的药物的可能性较大，甚至直接得到比原来更好的药物。如奥沙西洋就是地西洋的活性代谢物。

#### 以现有突破性药物作为新的先导化合物

- 近年来随着对生理生化机制的了解，得到疾病治疗的突破性药物称为原形药物。
- 以原形药物为先导化合物，通过生物电子等排等方法获得了大量的“Me-too”药物。

#### 通过代谢产物寻找新的先导化合物

- 对动物的排泄物和分泌物等的研究，如抗瘤酮A10是一个从人的血液和尿液中分离出来的天然小分子抗癌活性物质。作为寻找无毒抗癌药物的新的先导化合物，抗瘤酮A10是一个理想的分子，其抗癌结构类似物的设计、合成和构效关系的研究，国内外已有大量报道。

## 2.2 化学药先导化合物的发现

### 4、通过化合物库获得

世界上大型药物研究和开发组织都有自己分离、合成或收集的化合物储备，形成化合物库：包括天然产物提取分离、结构测定所得的天然产物库，化学合成特别是用组合化学技术形成的化学分子库，通过蛋白质表达建立的基因工程库等。

#### 天然产物是先导化合物发现的有效途径

- 主要有动植物和微生物发酵产物两方面。
- 天然产物又称次级代谢产物，其蕴藏资源非常丰富，特别是海洋生物资源。天然产物在抗肿瘤、抗病毒、抗菌、治疗心脑血管疾病以及抗衰老等领域具有优势。
- 从特殊生态环境下生长的植物(如高原、高寒、高盐、高压等地区的生物)以及有毒植物、低等植物和真菌等中发现结构新颖的活性天然产物的机率也比较高。

#### 组合化学和化合物组合库是一种合成策略

- 将一些基本的小分子(称为构造砌块，如氨基酸、核苷酸、单糖以及各种各样的化学小分子)通过化学或生物合成的程序系统地装配成不同的组合，目的是得到大量的、具有多样性特征的化合物，建立大容量的化合物库。
- 化合物库结合群集筛选方法用于新药研究和开发中的先导化合物的发现，基本原理是在芯片或合成珠等同体相载体材料表面，通过连接功能进行原位合成、原位筛选。

#### 基因重组技术

- 合成结构复杂的天然化合物及利用微生物产生新结构类型活性物组成基因重组库。
- 将一些靶酶的活性中心、受体或受体的亚基等在微生物中大量表达，满足了大规模筛选样品的需要，并且可以用来确定一些尚不清楚的药物作用靶位。

## 2.2 化学药先导化合物的发现

### 5、高通量虚拟筛选

利用计算机强大的计算能力。采用三维药效基团模型或分子对接的方法，在化合物数据库中寻找可能的活性化合物的方法。在找到一些潜在的活性分子之后，可以通过向有关公司订购、合成或提取分离的方法得到样品，并进行药理测试。

#### 基于药效基团的数据库搜索模型

- 一种重要的间接药物设计方法。药效基团通常是指那些可以与受体结合位点形成氢键相互作用、静电相互作用、范德华相互作用和疏水键相互作用的原子或官能团。
- 药效基团及药效基团元素在空间的分布（距离限制）构成三维药效基团。三维药效基团模型一般是通过一组有生物活性的化合物进行结构活性关系分析，找出其共同的特征结构来建立的。还可以通过活性化合物与其靶标的复合物结构进行分析得到三维药效基团模型。

#### 基于分子对接的虚拟筛选分子对接技术

- 指分子模拟环境中，两个或两个以上的分子模型通过几何形状、化学环境及能的匹配形成最佳结合的技术。分子对接的虚拟筛选需要靶标生物大分子和小分子化合物的三维结构信息。
- 首先要建立大量化合物（例如几十个甚至上百个化合物）的三维结构数据库。然后将库中的分子逐一与靶标分子进行“对接”，通过不断优化小分子化合物的位置（取向）以及分子内部柔性键的面角（构象），寻找小分子化合物与靶标大分子作用的最佳构象，计算其相互作用及结合能。

## 2.3 化学药先导化合物的优化

先导化合物的优化是选择一个先导化合物对其进行临床前评估，将其转化为候选药物的过程：

- 修饰先导化合物时，关注其物理化学性质的变化
- 对于没有选择性的化合物，考虑脱靶效应/毒性
- 密切关注临床前研究要求

图6、先导化合物的临床前评估因素

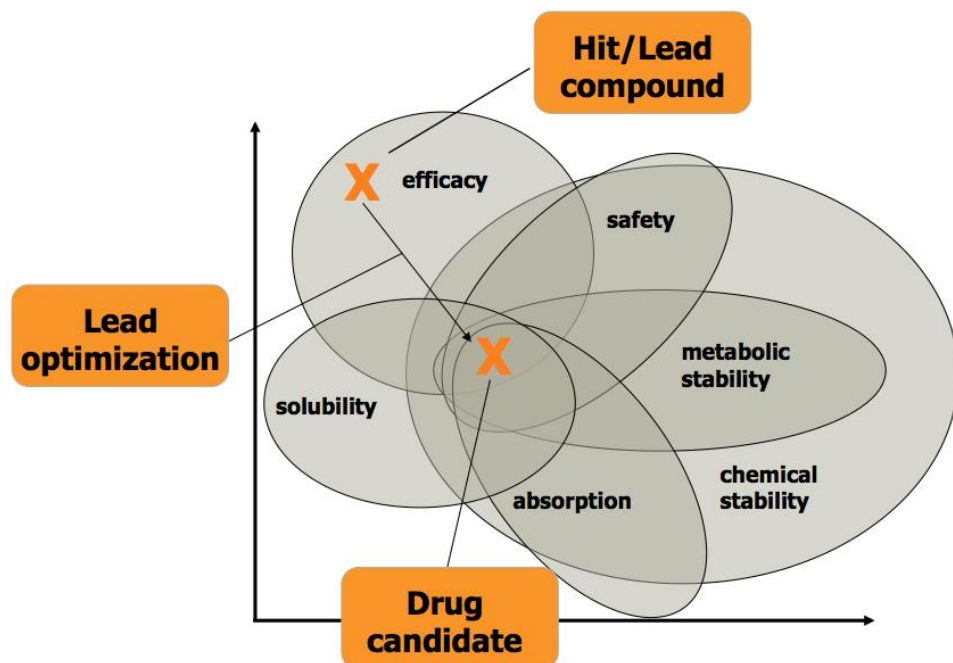
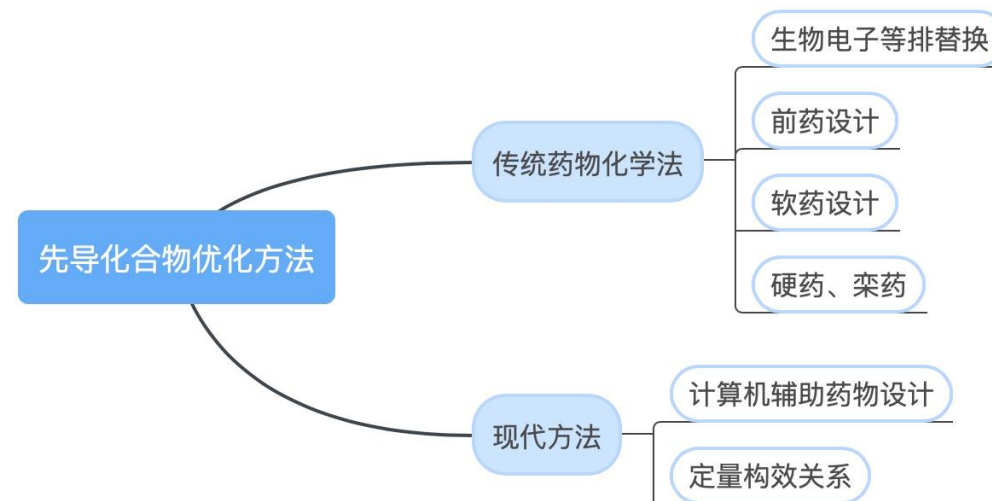


图7、先导化合物的优化方法

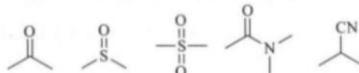
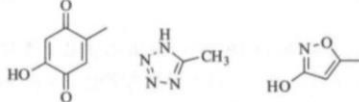
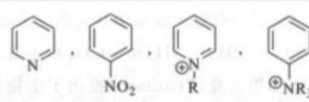
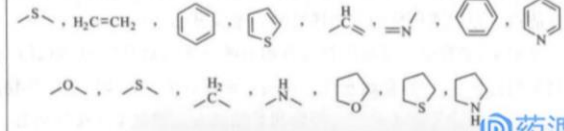




## 2.3 化学药先导化合物的优化：生物电子等排

生物电子等排体是具有相似的分子形状和体积、相似的电荷分布，并由此表现出相似的物理性质(如疏水性)，对同一靶标产生相似或拮抗的生物活性的分子或基团。药物设计中常用的生物电子等排体如表所示。采用生物电子等排体替换法优化得到的新化合物往往会与先导化合物具有类似的或具有相反的生物活性。

表7、药物设计中常用的生物电子等排体

| 生物电子等排体的分类 |         | 相互替换的等排体   |
|------------|---------|--|
| 经典电子等排体    | 一价电子等排体 | $-F, -OH, -NH_2, -CH_3, -SH, -t-C_4H_9, -C_5H_5$   |
|            | 二价电子等排体 | $-O-, -S-, -CH_2-, -NH-$   |
|            | 三价电子等排体 | $-N=, -P=, -CH=, -As=$   |
|            | 环内等排体   | $-CH=CH-, =CH-, -S-, =N-, -O-, -S-, -CH_2-, -NH-$  |
| 非经典电子等排体   | 羟基      | $-OH, -CH_2OH, -NHCOR, -NHSo_2R, -NHCONH_2, -NHCN$   |
|            | 羰基      |   |
|            | 羧基      | $-COOH, -SO_2NHR, -SO_2H, -CONHOH, -CH_2ONHCN$<br> |
|            | 卤素      | $F, Cl, Br, I, CF_3, CN, N(CN)_2, C(CN)_3$   |
|            | 吡啶      |   |
|            | 环-链交换   |    |



## 2.3 化学药先导化合物的优化：前药修饰

- 前药是指一些在体外活性较小或者无活性的化合物，在体内经过酶的催化或者非酶作用，释放出活性物质从而发挥其药理作用的化合物，其常常指将活性药物(原药)与某种无毒性化合物以共价键相连接而生成的新化学实体，即前体药物。
- 前药应具备以下三个条件：一是根据具有生物活性的药物分子性质，按治疗需要进行化学改造；二是进入机体后，不论是否需要酶的作用，要保证恢复原来的药物分子；三是本身不显示生物活性。
- 前药修饰目的：

提高药物选择性

增强药物稳定性

延长药物作用时间

改善药物吸收，  
提高生物利用度

改善药物溶解性

降低毒副作用

## 2.3 化学药先导化合物的优化：软药、硬药、李药

**软药：**本身有生物活性的药物，在体内起作用后，经预料的和可控制的代谢作用，转变为无活性和无毒性化合物。因为药物一旦到达作用位点，呈现了预期的药效反应后，就应经代谢途径以适宜的速度排出体外，否则会继续保留在体内，产生的药效长于预期时间，会造成药物在体内蓄积，导致细胞毒性。

- 目的：在原药药物分子中设计极易代谢失活的部位来设计安全而温和的药物。软药缩短了药物在体内的过程，避免了有毒的代谢中间体的形成，使毒性和活性得以分开，减轻药物的毒副作用，提高了治疗指数。
- 条件：分子结构中含有易代谢的部位；代谢过程清晰，即代谢方式和代谢的速率须按预期进行。

**硬药：**与软药相反，是具有发挥药物作用所必需的结构特征，在体内不能被代谢，直接从胆汁或肾排泄的药物或者不易代谢、需经过多步氧化后排出体外的药物。硬药可以解决药物代谢产生毒性产物的问题，因此使用安全。但在实际的药物开发中，由于体内酶的作用很强，使得开发成功的硬药数量非常有限。只有亲水或疏水性极强的化合物，或者由于功能基的位阻较大，不易代谢的化合物，才符合硬药的定义。

**李药：**将两个相同或不同的先导化合物或药物经共价键连接，缀合成一个新的分子，经体内代谢后，生成以上两种药物而产生协同作用，增强活性或产生新的药理活性、或者提高作用的选择性。

## 2.3 化学药先导化合物的优化：计算机辅助

运用计算机辅助药物设计技术进行先导化合物优化，较之前药理学家借助各类模型或者药物化学家对大量化合物展开合成等方式展开规模较大的筛选，可以全面提升整体工作效率。计算机辅助药物设计在先导化合物优化上的应用，主要包括基于结构的药物设计、基于配体的药物设计、高通量虚拟筛选等技术在先导化合物优化上的应用。

### 基于结构的药物设计

- 根据药物靶点结构，研究受体和小分子之间的相互作用，设计与活性口袋互补的新分子或寻找新型先导化合物的技术。

### 基于配体的药物设计

- 从已有的活性小分子结构出发，通过建立药效团模型或定量构效关系，预测新化合物活性或指导原有化合物结构改良。

### 高通量虚拟筛选

- 针对靶点的三维结构或已建立的药效团模型、QSAR模型，从化合物数据库中，将符合条件的小分子挑选出来，进行生物活性测试。

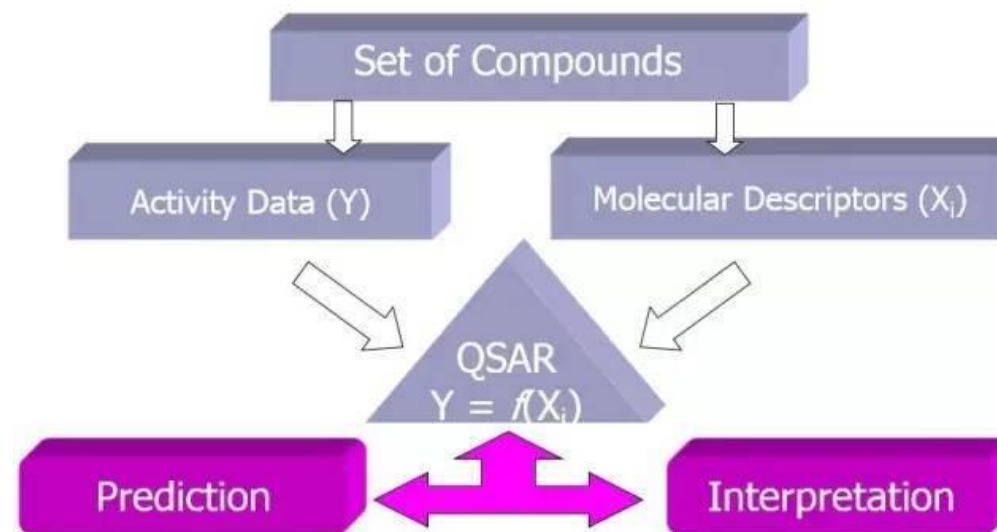
## 2.3 化学药先导化合物的优化：定量构效关系

定量构效关系（简称QSAR），QSAR研究基于生物活性变化与一组化合物中的结构和分子变化相关联，从相关性产生统计模型，以开发数学模型预测新型化合物的生物学特性。

### 目的

- 将结构特征改变与其各自生物活性变化相关联的尝试；
- 设计新的候选药物；
- 有助于预测化合物的毒性；
- 有时有助于阐明酶的化学-生物相互作用的机制；
- 预测设计、不可用化合物和未测试活性化合物的生物活性。

图8、QSAR模型基础结构



## 2.4 生物药先导化合物的发现

图9、生物药的研发流程

作为药物初步结构类型和线索物质,发现先导化合物并进行结构变换和修饰,可得到具有优良药理作用的药物。选择何种类型先导化合物对药物开发成功率有较大影响。

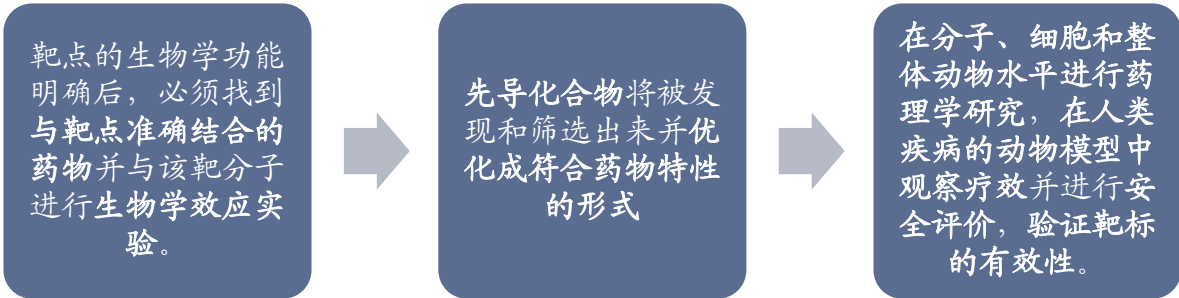


表8、先导化合物类型及优缺点

| 类型                          | 特点和评价  |
|-----------------------------|--|
| 激素及治疗性酶制剂类药物                | 多为功能活性明确, 作用位点清楚并且局限, 对符合适应症的特殊疾病群体具有不可替代性, 甚至部分需要终生依赖服用。尽管随着功能基因组学、蛋白质组学和代谢组学等研究的深入, 越来越多的蛋白质与疾病的关系将被揭示, 但可作为该类药物开发的候选蛋白分子仍将越来越少。   |
| 细胞因子和生长因子                   | 具有微量强效、作用快速、多短期使用等特点, 可满足如增强造血及免疫功能、止血及抗凝血、平衡内分泌紊乱、调节生育及生长过程等临床需求, 临床效果显著。多数在体内生物活性广泛、作用靶点多元, 其药理学作用延伸可引起复杂的生物效应, 甚至毒副作用, 将限制其成为药物的潜能。而目前已知的作用位点单一的分子(如刺激红细胞生成、促进白细胞增殖的细胞因子等)多数已经开发成为药物。 |
| 天然存在的非人源蛋白质药物               | 包括某些有新功能的外源蛋白及只在特定时间或机体特定部位发挥功能的内源蛋白。例如, 对大分子酶促降解的胶原酶、透明质酸酶, 对小分子代谢物酶促降解的聚乙二醇化天冬酰胺酶, 将血浆酶原降解为血浆酶的链激酶, 凝血酶抑制剂重组水蛭素等。未来发展主要依赖于人类生理及药理学功能方面的进一步认识。较高的免疫原性将一定程度限制该类药物的开发及应用。                 |
| 单克隆抗体及抗体融合蛋白<br>(免疫球蛋白相关分子) | 直接干扰靶分子或靶组织功能, 针对靶点范围广泛、疗效确切, 已经涉及到肿瘤及相关疾病、自身免疫性疾病、感染性疾病、器官移植、过敏性疾病、血液疾病、呼吸性疾病等多种疾病领域, 具备较大的发展前景。  |



## 2.4 生物药先导化合物的发现

| 发现方式      | 内容和特点   |
|-----------|---|
| 杂交瘤平台     | 传统的制备手段，获得的抗体结构稳定，亲和力较好，但也存在周期长和遗传异质性的缺点。有两次筛选过程，第一次是使用选择性培养基选出杂交瘤细胞，第二次是进一步选出能产生需要的抗原特异性抗体的杂交瘤细胞。通过对已有的杂交瘤细胞测序，获得抗体的基因序列，即可利用体外重组技术表达抗体。 |
| 噬菌体天然抗体文库 | 目前体外筛选人类重组抗体最常用的技术，技术成熟稳定，可获得更大的库容量。构建噬菌体文库，经过数轮吸附-洗脱-扩增分离出具有最高亲和力和稳定性的展示抗体的噬菌体。  |
| 转基因小鼠     | 具有较高的靶结合亲和力，且时间较短、费用较低。但存在免疫耐受，且存在鼠源抗体干扰和对毒性抗原较难进行免疫的问题。抗体生成从鼠抗体生成基因被相应人基因所取代的小鼠开始，最终由单克隆抗体的杂交瘤分泌出全人序列的抗体。                                |
| 酵母展示平台    | 建立全人非免疫单链抗体酵母展示文库，可以快速针对不同靶标筛选高亲和力全人抗体序列。真核表达使得其展示的抗体折叠更完全，可有效与流式细胞术结合，提高筛选通量，并可定量鉴定引入了筛选过程。  |
| B细胞克隆     | 通过免疫动物细胞分离获得浆细胞，找到产生所需抗体的克隆并扩增克隆的基因到表达载体中，酶联免疫吸附测定（ELISA）筛选表达好的克隆进行测序，用体外重组技术生产抗体。  |

## 2.4 生物药先导化合物的发现

### ● 杂交瘤平台

杂交瘤技术是传统的制备手段，其获得的抗体结构稳定，亲和力较好，但也存在周期长和遗传异质性的缺点。有两次筛选过程，第一次是使用选择性培养基选出杂交瘤细胞，第二次是进一步选出能产生需要的抗原特异性抗体的杂交瘤细胞。通过对已有的杂交瘤细胞测序，获得抗体的基因序列，即可利用体外重组技术表达抗体。

图10、杂交瘤平台

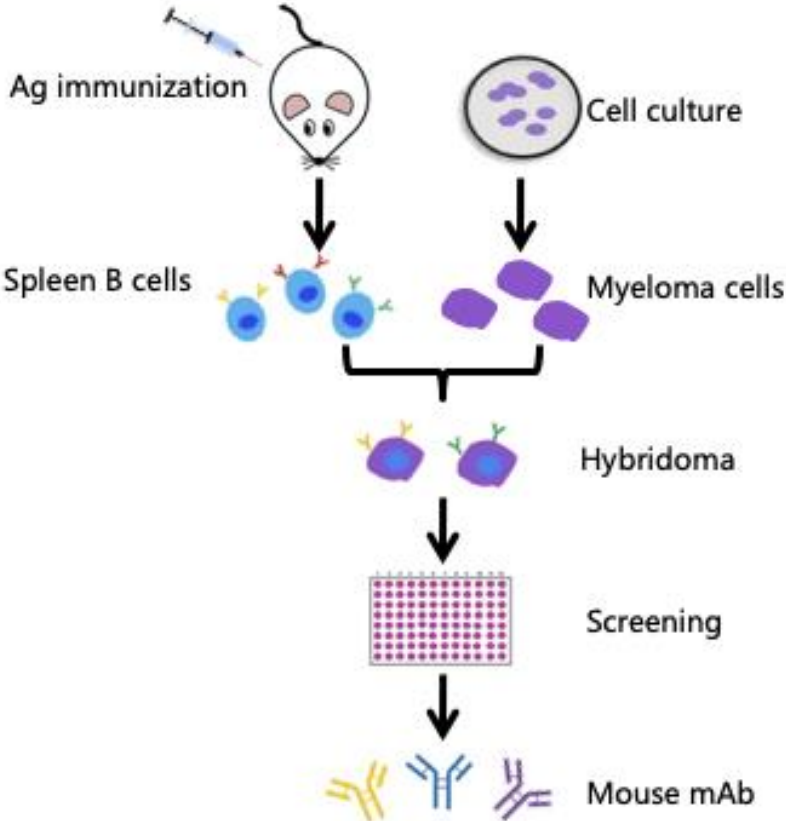


表9、杂交瘤与其他技术优缺点比较

| 技术类别    | 优点                      | 缺点            |
|---------|-------------------------|---------------|
| 杂交瘤     | 技术成熟，获得鼠源单抗简便           | 通量低，周期长，成本高   |
| 噬菌体展示技术 | 能够快速获得备选的全人源抗体          | 抗体分子评价和改造较为费时 |
| 转基因动物技术 | 现在主要获得全人源单抗的技术，成功效率高    | 技术垄断，不易推广     |
| 酵母展示    | 真核表达和筛选系统，优于噬菌体展示技术     | 成功案例较少，技术有待完善 |
| 单个B细胞克隆 | 建立高通量文库容易，筛选最优化的抗体可变区组合 | 技术垄断，不易推广     |

## 2.4 生物药先导化合物的发现

### ● 噬菌体天然抗体文库

目前体外筛选人类重组抗体最常用的技术，将单链抗体（scFv）或抗原结合片段（Fab）展示于噬菌体表面，并构建数百万甚至数十亿个展示出抗体片段的噬菌体，得到一个数以千计的噬菌体文库，每个噬菌体携带不同的抗体，经过数轮的“吸附-洗脱-扩增”，最终分离出具有最高亲和力和稳定性的展示抗体的噬菌体。

**评价：**技术成熟稳定，可获得更大的库容量，强大和完善的大肠杆菌表达系统和文库的可测量性，可设计多样化的筛选策略获得识别突变抗原的特异性的抗体，通过选择和对筛选条件的控制可针对特定的抗原构象或表位产生抗体，如加入竞争物可以筛选靶向指定表位的抗体。

图11、噬菌体天然抗体文库筛选过程

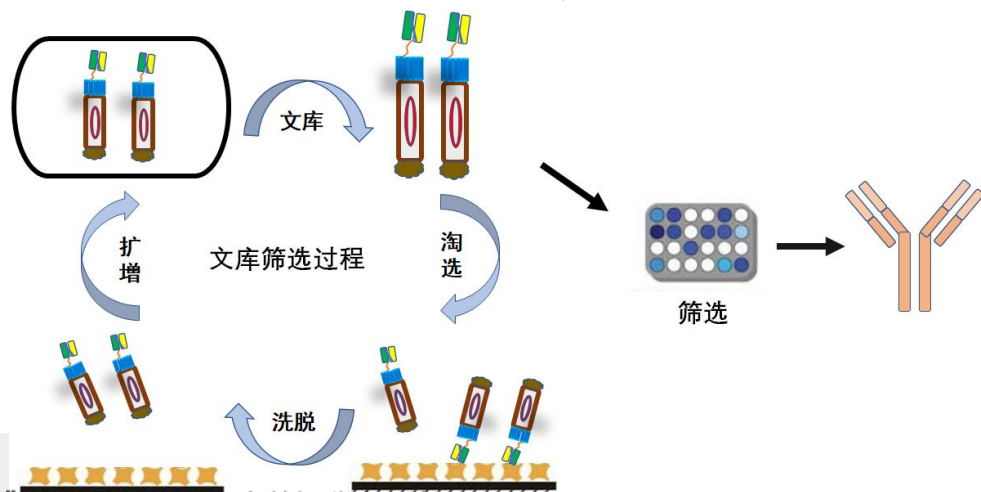


表10、噬菌体天然抗体文库与杂交瘤平台特点比较

| 项目    | 天然文库       | 杂交瘤        |
|-------|------------|------------|
| 应用范围  | 所有抗原       | 针对单一抗原     |
| 筛选通量  | 很高 $>10^9$ | 较低 $<10^8$ |
| 时长    | 1月         | 3~5月       |
| 成本    | 较低         | 高          |
| 分子亲和力 | 较低         | 高          |
| 免疫原性  | 很低，无需人源化   | 高，需人源化     |

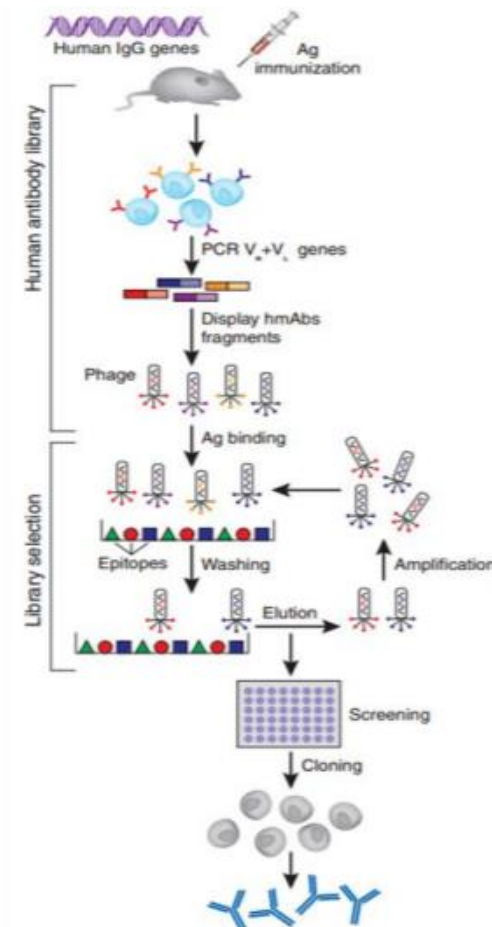
## 2.4 生物药先导化合物的发现

### ● 转基因小鼠

抗体生成从鼠抗体生成基因被相应人基因所取代的小鼠开始。要求人的抗体基因片段在鼠体内进行有效的重排与表达且能与小鼠细胞的免疫系统信号机制相互作用，使小鼠在受抗原刺激后，人抗基因片段能被选择，表达并活化B细胞分泌人抗体。采用在鼠胚胎干细胞（ES）中的同源重组来使得鼠原有基因缺失，再通过显微注射等技术将重建的人源抗体胚系基因微位点转入小鼠体内，最终由单克隆抗体的杂交瘤分泌出全人序列的抗体。

由于抗体是在体内产生，经历正常装配和成熟过程，保证成品具有较高的靶结合亲和力，且时间较短、费用较低。但存在免疫耐受，虽然可以通过免疫佐剂的使用和免疫方法的改进来提高免疫反应强度，但对于一些人类抗原仍然较难获得高亲和力抗体，且存在鼠源抗体干扰和对毒性抗原较难进行免疫的问题。

图12、 转基因小鼠流程





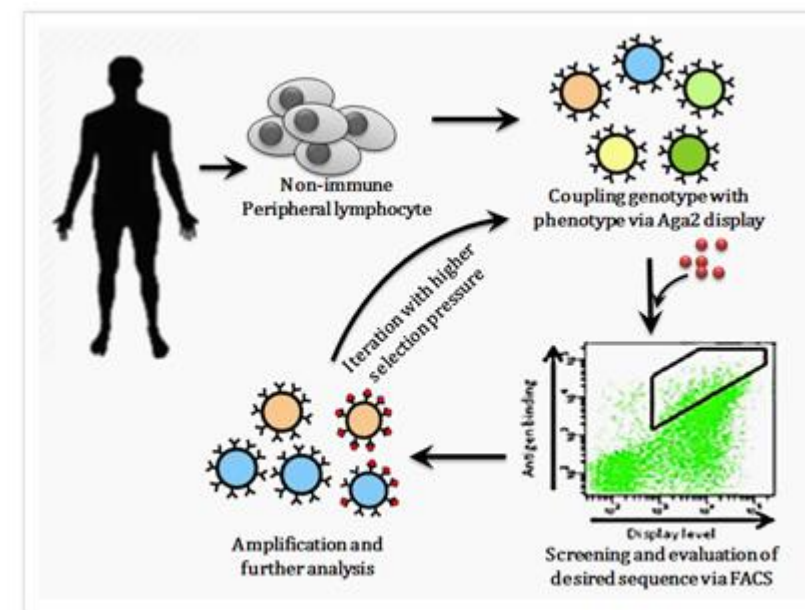
## 2.4 生物药先导化合物的发现

### ● 酵母展示平台

建立全人非免疫单链抗体酵母展示文库，可以快速针对不同靶标筛选高亲和力全人抗体序列。利用从未免疫的健康人群的外周淋巴细胞中获取的Naive可变区cDNA片段，通过基因工程技术构建于酵母表面展示重组载体上，构建完成非免疫scFv酵母展示文库。配合高通量筛选的流式细胞术，在8-10周内得到初筛序列，4-6周内得到亲和力成熟至pM级别的候选全人抗体序列。

其优点在于：1) 真核表达使得其展示的抗体折叠更完全；2) 可有效与流式细胞术结合，提高筛选通量，并可将定量鉴定引入了筛选过程。

图13、酵母展示平台



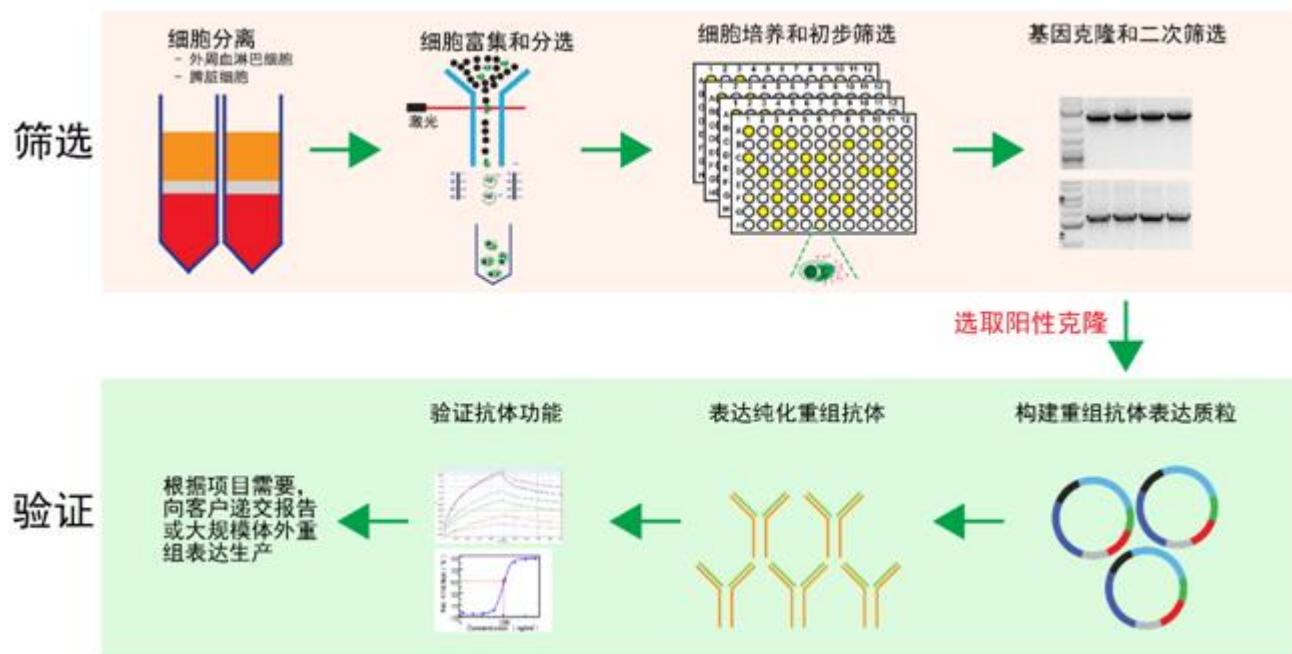


## 2.4 生物药先导化合物的发现

### ● B细胞克隆

免疫动物细胞分离获得浆细胞，使用流式细胞术将它们彼此分离。筛选分离的细胞以找到产生所需抗体的克隆，并扩增克隆的基因克隆到表达载体中，通过酶联免疫吸附测定（ELISA）筛选表达较好的克隆。然后进行测序，利用体外重组技术生产抗体。

图14、基于单个B细胞的单克隆抗体筛选平台



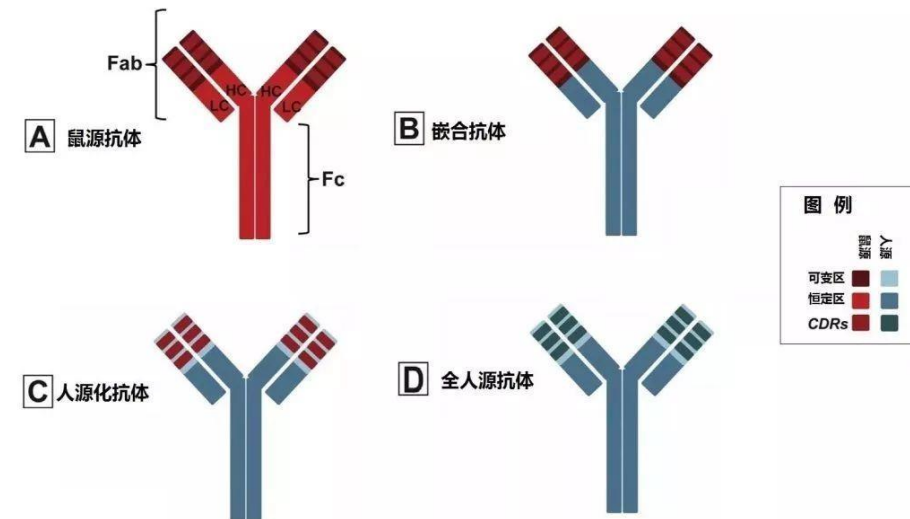
## 2.5 生物药先导化合物的优化

### 嵌合或人源化降低免疫原性：

基于抗体结构模型的基础上，兼顾活性、免疫原性和产量，可以进行抗体人源化设计。通过嵌合或人源化，使抗体更接近人类抗体。人-鼠嵌合抗体是将鼠抗体可变区基因片段连接到人抗体恒定区基因上。人源化抗体是将鼠抗体的互补决定区（CDR）移植到人抗体的相应部位，这样人源化程度可达90%以上。

- **嵌合抗体**：利用DNA重组技术将异源单抗的轻、重链可变区基因插入含有人抗体恒定区的表达载体中，转化哺乳动物细胞表达出嵌合抗体，表达的抗体分子中轻重链的V区是异源，C区是人源，减少了异源性抗体的免疫原性，同时保留了亲本抗体特异性结合抗原的能力。
- **全人源化抗体**：将人类抗体基因通过转基因或转染色体技术，将人类编码抗体的基因全部转移至基因工程改造的抗体基因缺失动物中，使动物表达人类抗体，达到抗体全人源化的目的。

图15、鼠抗、嵌合抗体、人源化抗体、全人源抗体



## 2.5 生物药先导化合物的优化

对天然蛋白结构进行改造或修饰：

各种修饰多从改变重组蛋白质的性状入手，如增加分子量、减缓蛋白酶降解、降低免疫原性、提高生物及化学稳定性等，进而改善其体内药代动力学性质，弥补某些体内功能蛋白的缺陷或增加蛋白在人体内的功能，延长体内半衰期或加速体内的释放，降低中和抗体产生率，提高患者适应性及治疗效果等。

性质优化：

- 抗体基因胚系化，以减少免疫原性
- 表达水平，可溶性，生产可行性
- 免疫球蛋白IgG类型转换，抗体片段化，蛋白融合，骨架化

抗体特异性优化：

为提高抗体的靶向性，需要对抗体进行工程改造以优化其特异性。随机诱变和靶向诱变是常用优化抗体特异性的方法。

### 体外亲和力成熟：

对于治疗性抗体来说，抗体亲和力的提高有助于降低用量和毒副作用。抗体体外亲和力成熟策略来源于体内抗体成熟过程。构建集中突变或特点突变的小容量抗体库，或将突变引入到原始抗体的可变区域，通常是互补决定区，通过表面展示技术筛选出高亲和力抗体，提高抗体对靶点的结合能力，一般可得到10倍的亲和性改善。

- 模拟体细胞高频突变：通过细胞突变和展示抗体蛋白筛选对抗原高亲和的抗体。合适的B细胞系可以作为工具细胞，用于抗体的亲和力成熟。在具体应用中，可以将特定的抗体模板基因插到细胞的免疫球蛋白基因位点，然后进行细胞培养和高亲和力细胞群的筛选。
- 基于抗体库：基于抗体库的抗体亲和力成熟与基于抗体库的抗体筛选均为体外高亲和力抗体筛选，重点仍是库的构建和筛选系统的选择。区别在于后者所用的库在构建或合成时无偏向性或只具有针对某抗原的有限的偏向性；而前者所用的库是基于确定的抗体序列模板所构建的。突变区域的选择主要是基于抗原抗体复合物的结构信息或胚系基因热点的预测。突变策略主要包括易错PCR、链置换、定点突变、DNA改组。

### 抗体成药性的改善:

- 提高热稳定性: 热稳定性差可能导致抗体聚集和低表达。提高抗体的热稳定性, 可通过优化疏水性核心和带电荷簇残基、可利用数据库的点突变研究和计算机的设计来优化。
- 提高溶解度: 作为临床候选药物的抗体应具有良好较佳的溶解性和黏度。提高抗体溶解度的主要方法是去除表面疏水性。
- 提高化学稳定性: 机体内的化学降解常常会导致治疗性抗体的效力降低, 抗体蛋白质结构表面上的酶解位点也会影响抗体的化学稳定性, 可应用晶体结构或计算机构建的3D模型结构来研究并改良抗体结构表面的特性, 或通过噬菌体/酵母/哺乳动物文库进行随机或靶向突变这些方法来进行改善。
- 降低异质性: 蛋白翻译后的糖基化、N-焦谷氨酰胺环化修饰引起抗体蛋白的异质性, 也会引起不同生产批次之间抗体质量的不一致。可采用“靶位点突变”去除可以引起抗体异质性的氨基酸。
- 降低聚合性: 主要方法有改变抗体框架、抗原结合环和结合域结合界面。



## 2.5 生物药先导化合物的优化

恒定区（Fc）修饰增强效应功能和半衰期：

对Fc区域的修饰可以对特定抗体的药理作用产生深远的影响，延长抗体的半衰期。Fc  $\gamma$  受体 (Fc  $\gamma$  R) 是免疫球蛋白G（IgG）Fc段受体，主要表达于免疫细胞膜上，在特异性抗体和效应细胞功能间象桥梁使体液免疫和细胞免疫紧密关联。补体依赖的细胞毒性（CDC）是补体系统被激活后在靶细胞表面形成膜攻击复合体，导致靶细胞溶解的效应。

典型方法：

- 点突变增强与Fc  $\gamma$  R的结合，根据需要将突变引入抗体的Fc结构域
- 糖基化工程改善抗体与Fc  $\gamma$  R结合
- 通过交换不同抗体亚型Fc结构域增加与Fc  $\gamma$  R的结合（亚型交叉抗体）
- IgG多聚化以提高与Fc  $\gamma$  R的结合
- 点突变提高与血清补体 (C1q) 的结合以及增强补体依赖的杀伤作用
- 插入或缺失突变引起的与C1q结合增强及补体依赖的细胞毒性 (CDC) 作用的增强
- 交叉抗体亚型提高与C1q的结合
- IgG1六聚化形式增强与C1q结合和CDC作用

## 2.5 生物药先导化合物的优化

### 双特异性抗体 (BsAb):

通过基因工程手段将两个分别靶向不同抗原的抗体片段组合在一起，所以具有两种抗原结合位点，发挥协同作用，进而提高治疗效果。这种结构设计能有效地改善抗体药物在体内的药物代谢动力学过程，增强临床治疗效果。同时识别两种分子提高了抗体的选择性和功能性亲和力，改善了药物的安全性和有效性，与两种单克隆抗体药物联合用药治疗相比减少了开发和临床试验成本。

### 制备方法:

- 化学偶联法：该方法于1985年首次被使用，其原理是通过化学偶联剂将两个单抗或Fab片段偶联成一种双特异性抗体。
- 双杂交瘤融合法：将两种杂交瘤细胞通过细胞融合的方法，合成双杂交瘤细胞株，筛选出具有两种抗体功能的稳定靶细胞株。
- 基因工程法：利用基因工程技术对抗体进行改造，从而形成多种形式的双特异性抗体。

# 03

## 药物临床前生产

阶段：实验研究、小量试制、中间试制

类别：化学药生产、生物药生产

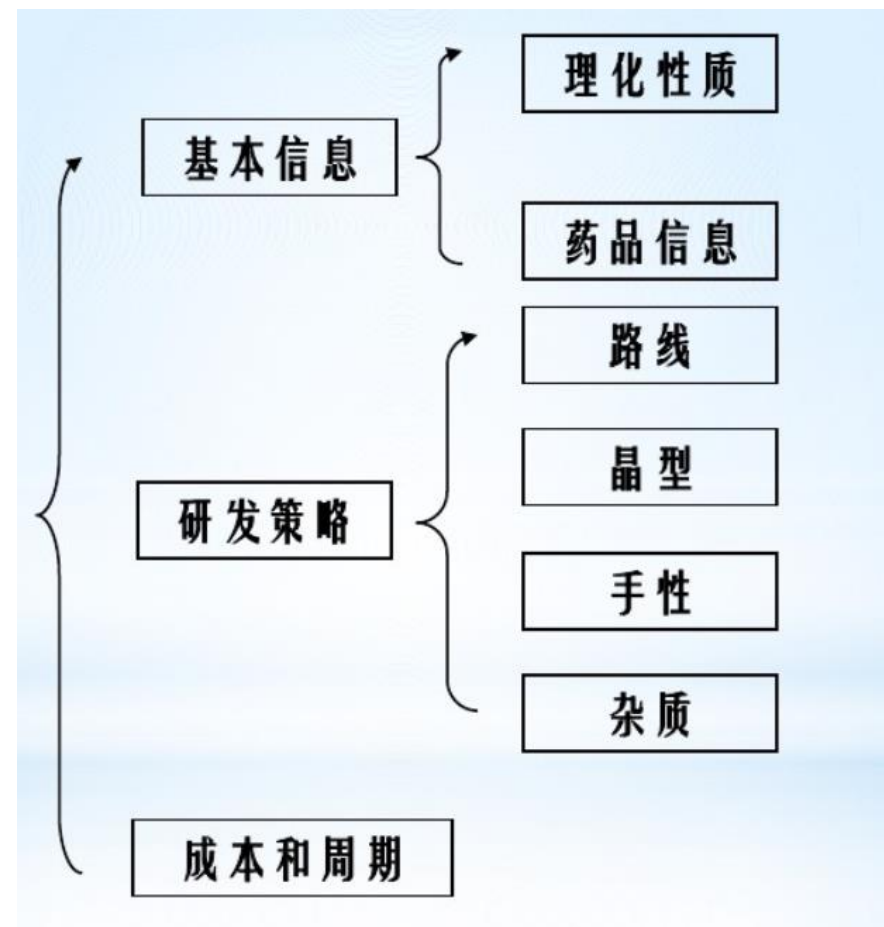


## 3.1 阶段一：实验研究

基础性研究，取得制造和质量检定的基本条件和方法

- **理化性质**如分子式、结构式、解离度、PH值、熔点、沸点、冰点、渗透压
- **工艺流程**如反应条件、生产工艺、精制方法、原料规格、结构确证、杂质研究（来源机理分析、合成分离制备、结构确证）、晶型研究（选择依据、晶型及粒度影响因素、晶型及粒度控制方法）。
- **路线筛选**如终产品的收率、杂质种类，结合理论选择最优
- **研究预算**如各研究阶段成本和预计周期

生物药研究还包括生产用菌、毒种和细胞株的构建、培养、遗传稳定性和生物组织选择，有效成分的提取，纯化及其理化特性、结构与生物特征分析等研究。



## 3.1 阶段二：小量试制

- 探索性开发和优化方法，对实验室原有的合成路线和方法进行全面的、系统的优化，提出一条基本适合于中试生产的合成工艺路线。
- 研究重点应围绕影响工业生产的关键性问题，如缩短合成路线，提高产率，简化操作，降低成本和安全生产等，确定结构、反应参数、工艺过程后处理方式、物料控制、物料属性。
- 根据实验研究结果：

确定配方及给药方式

建立制备工艺和检定方法

实验小批量样品进行临床前初步安全性和有效性的实验

制定制造与检定基本要求

确定目的化合物具有新药的可能性



## 3.1 阶段三：中间试制

- 验证和使用方法，把实验室研究成果扩大成中试规模的产业化生产，采用的工艺路线基本与实验室工艺规程一致。
- 中试规模连续生产三批产品，要求工艺稳定，质量稳定，有工艺规程和质量控制标准。三批产品的总量要达到：自检和中检所全部检用量，加上临床前动物试验全部用量和I、II期临床试验用量。如果临床剂量大、疗程长，需要产品量大，要根据不同产品来确定中试规模。

工艺路线优化记录

记录各步的体积、浓度、纯度、回收率等

中间产品质量控制要求

主药与辅料相互作用研究

依据《中国药典》制剂通则的要求进行制剂稳定性试验研究

必须在NMPA认证过的厂房内生产

## 3.1 阶段三：中间试制

生产工艺基本定型，产品质量和产率相对稳定，并能放大生产。

有产品质量标准、检定方法和保存稳定性资料，并有测定效价的参考品或对照品。

全面、系统地完成临床前研究工作，包括药物化学研究，药理学研究（主要药效学研究、一般药理学研究、药物代谢动力学研究），毒理学研究，以及生物等效性、生物利用度研究和耐受性、依赖性试验等。

提供自检和检定所复检报告及能满足临床试验研究用量的连续三批产品。

制定较完善的制造检定试行规程和产品使用说明书(草案)。在新药临床前研究项目中，最重要的是新药的安全性及其有效性是否优于已知药物，因此取得临床试验批件的最重要资料是满意的药理学和毒理学研究结果。

## 3.2 化学药生产——CMC（化学成分生产和控制）

CMC (Chemical, Manufacturing and Control) 主要是指生产工艺、杂质研究、质量研究，稳定性研究等药学研究资料，是药物研发的重要方面，CMC申报也是药品申报资料中非常重要的部分。在临床前研究阶段，CMC的研究重点有：

### 化合物的性质确定

- 全面了解化合物的性质可以为选择剂型、处方提供重要的依据。如溶解度、粉体学性质、pH值（等电点等）、引湿性、稳定性研究等。
- 明确化合物的结构可以保证化合物的稳定，保证后续研究药物的一致性。

### 剂型、处方和规格确定

- 由于该阶段属于药物研发的初期阶段，随着研究的深入剂型、处方均有可能变化。
- 化合物的规格没有明确，因此剂型和处方的设计在保证安全性的前提下需要保证制剂质量的一致及杂质的可控。

### 工艺研究

- 在此阶段由于化合物的开发价值尚未明确，因此，研发的重点在于制备充足的原料和制剂，满足药理毒理和I期临床的研究，同时也要满足CMC的研究需要。
- 工艺的研究基本上在实验室进行，一般情况下没有必要对工艺进行优化，但是要对工艺中产生的杂质，如反应副产物、有机溶剂、重金属等进行有效的控制，初步确定处方工艺。

## 3.2 化学药生产——CMC（化学成分生产和控制）

CMC申报中原料药中常见问题：

- 杂质未定义明确，包括工艺杂质、制剂杂质、容器中浸出杂质或残留溶剂等；
- 对原料药的了解不够充分；
- 遗传毒性研究不充分；
- 缺乏药物与安全相关的临床与临床前关联评价；
- 方法及放行标准不适用。

CMC申报中制剂中常见问题：

- 方法及放行标准不适用；
- 处方组成中辅料的了解程度不够；
- 没有足够的稳定性数据支持临床周期；
- 设备适用性问题
- 包材相容性问题。

## 3.2 化学药生产流程——原料药生产

### 化学合成原料药生产工艺

化学合成原料药是指工业生产中各种化学原料在一定条件下通过化学反应得到具有一定药效的产品，再经过结晶、干燥等工序使其达到药品的各种指标的原料药生产方法。

### 发酵类原料药生产工艺

发酵是原料药生产工艺的重要方式之一，尤其是抗生素类原料药如青霉素类、头孢类等，通常是通过**发酵和化学合成结合的半合成方式**得到的。首先通过生物发酵得到目标化合物的主要结构，如青霉素特定的3-内酰胺结构，再进行结构修饰，得到最终的目标化合物；最后经过精制重结晶得到最终的原料药产品。发酵过程一般需要经过培养基的制备、消罐处理、接种、发酵、破壁、过滤、沉淀、离心、干燥等过程。

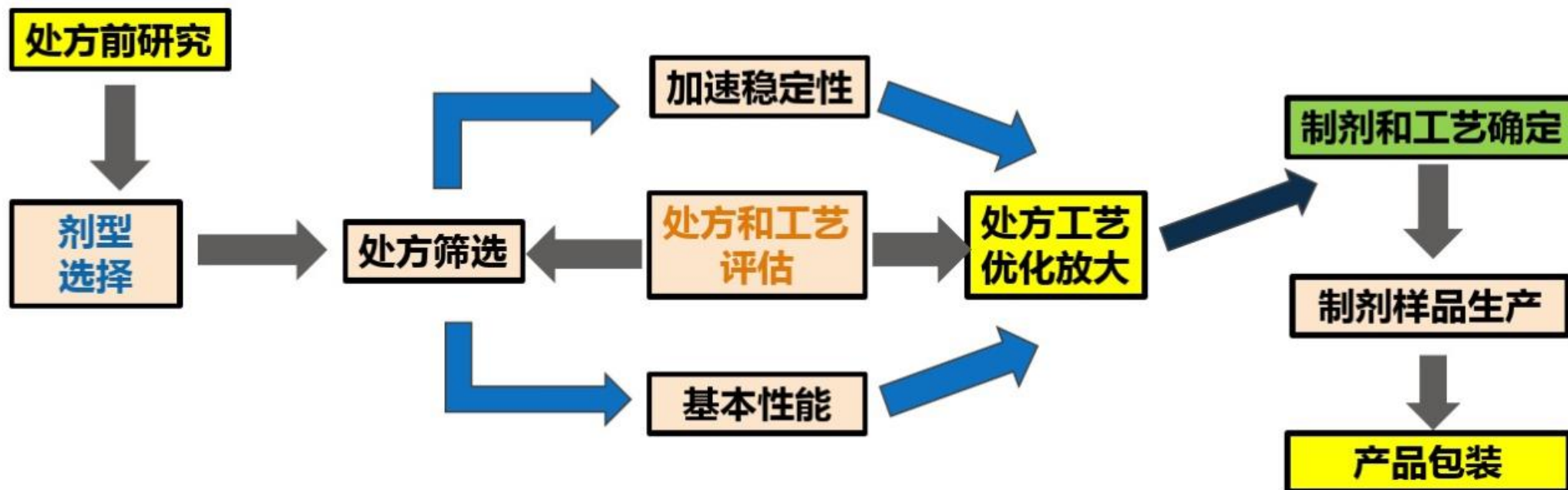
### 动植物提取类原料药生产工艺

自然界是天然的化合物宝库，动物或植物通过自身新陈代谢，产生了许多目前无法合成却对治疗疾病有重大意义的化合物，因此动植物提取是获取目标原料的途径。



## 3.2 化学药生产流程——制剂生产

制剂生产流程：



## 3.2 化学药生产流程——化合物的性质确定

对物理化学和生物性质的研究，有助于剂型的确立和处方筛选

• 不同溶剂的溶解度

• 不同pH溶解度

• pKa

• LogP/D

• Caco-2

• 稳定性研究

• 筛选合适的盐类

• 多晶型筛选

• 吸湿性

• 流动性

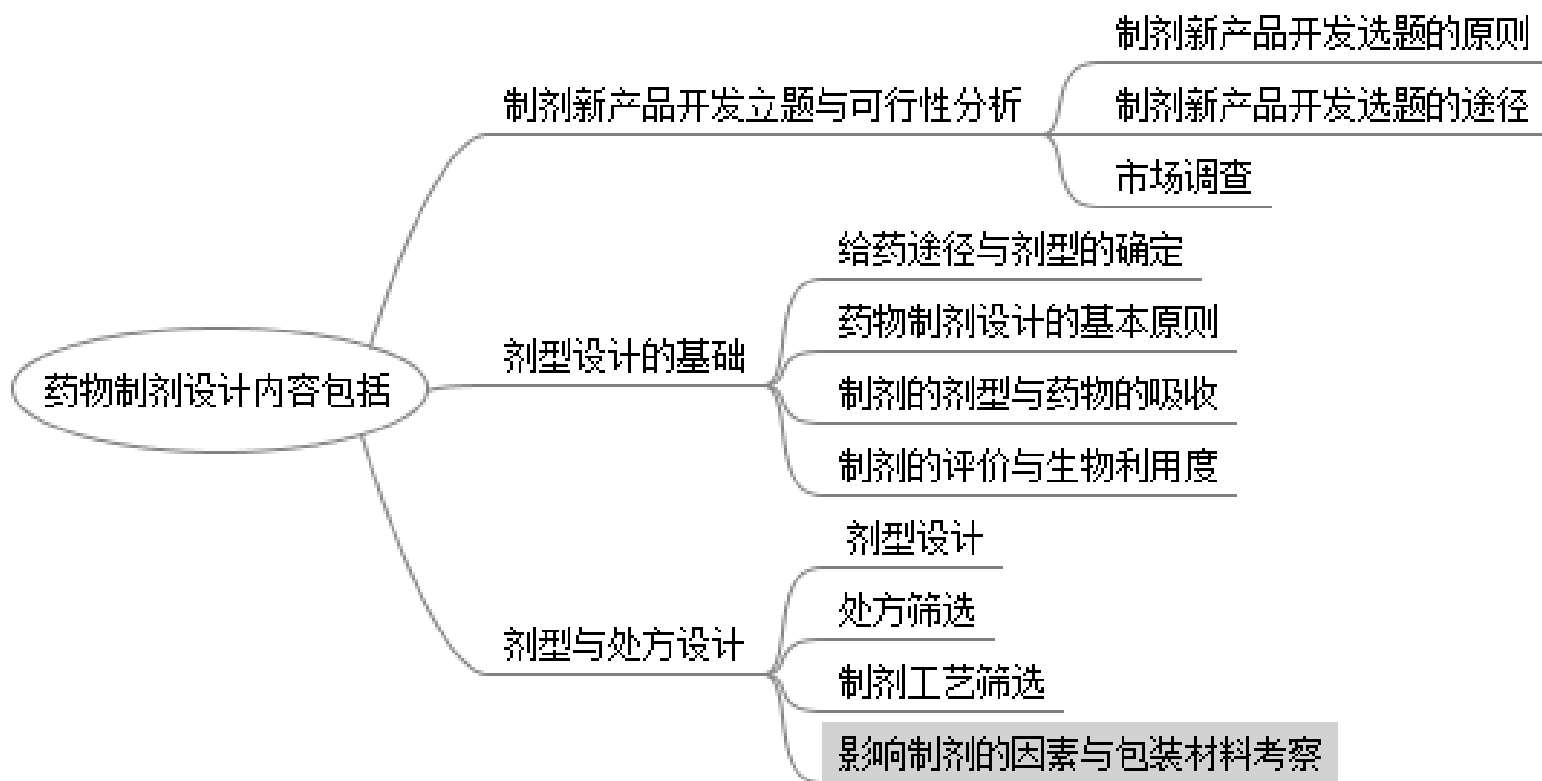
• 可压性

• 粒径分布

• 相容性

• 降解杂质

## 3.2 化学药生产流程——剂型、处方和规格确定



## 3.2 化学药生产流程——剂型、处方和规格确定

制剂研究的总体目标是通过一系列研究工作，保证剂型选择的依据充分，处方合理。

处方选择：根据药物理化性质、稳定性试验结果和药物吸收等情况，结合所选剂型的特点，确定适当的指标，选择适宜的辅料，进行处方筛选和优化，初步确定处方。

表11、剂型、处方和规格开发

| 途径            | 举例   |
|---------------|--|
| 开发新剂型         | 透皮控释制剂, 纳米技术产品   |
| 改变给药途径        | 胰岛素吸入给药, 芬太尼口腔黏膜给药                                       |
| 改进给药方案        | 伊班膦酸钠一月 1次口服、三月 1次注射, 唑来膦酸输液一年 1次静脉滴注                    |
| 减小剂量、提高制剂质量   | 非诺贝特纳米结晶片  |
| 扩大新适应证        | 复方屈螺酮/炔雌醇片   |
| 调整处方辅料、改进制剂质量 | 利用碳酸氢钠代替肠溶包衣制备复方奥美拉唑制剂, 采用纳米粒技术革除紫杉醇普通注射剂所含有的可致严重不良反应的溶媒 |
| 制成复方制剂        | 复方苯磺酸氨氯地平 阿托伐他汀钙片, 服用方便的一日 1次 3药复方片                      |
| 改进药品包装        | 琥珀酸舒马普坦新注射剂, 白蛋白输液软塑袋包装, 糠酸莫米松灌装粉雾吸入器                    |

## 3.2 化学药生产流程——剂型、处方和规格确定

### 剂型选择:

药品申请人通过对下列因素的考察, 根据需要选择适宜的剂型。

- 1) 原料药理化性质及生物学性质;
- 2) 临床治疗的需要: 疾病种类和特点、给药途径、用药部位、吸收快慢要求等;
- 3) 临床用药的安全性: 正常使用药品后, 人体产生毒副反应的程度;
- 4) 临床用药的顺应性: 药物剂型与临床应用的适应性。

表12、主要剂型及其基本评价项目

| 剂型               | 制剂基本评价项目   |
|------------------|--|
| 片剂               | 性状、硬度、脆碎度、崩解时限、水分、溶出度或释放度、含量均匀度(小规格)、有关物质、含量   |
| 胶囊剂              | 性状、内容物的流动性和堆密度、水分、溶出度或释放度、含量均匀度(小规格)、有关物质、含量   |
| 颗粒剂              | 性状、粒度、流动性、溶出度或释放度、溶化性、干燥失重、有关物质、含量   |
| 注射剂              | 性状、溶液的颜色与澄清度、澄明度、pH 值、不溶性微粒、渗透压、有关物质、含量、无菌、细菌内毒素或热原、刺激性等   |
| 滴眼剂              | 溶液型: 性状、可见异物、pH 值、渗透压、有关物质、含量<br>混悬型: 性状、沉降体积比、粒度、渗透压、再分散性(多剂量产品)、pH 值、有关物质、含量                           |
| 软膏剂、乳膏剂、糊剂       | 性状、粒度(混悬型)、稠度或粘度、有关物质、含量   |
| 口服溶液剂、口服混悬剂、口服乳剂 | 溶液型: 性状、溶液的颜色、澄清度、pH 值、有关物质、含量<br>混悬型: 性状、沉降体积比、粒度、pH 值、再分散性、干燥失重(干混悬剂)、有关物质、含量<br>乳剂型: 性状、物理稳定性、有关物质、含量 |
| 贴剂               | 性状、剥脱力、粘附强度、透皮速率、释放度、含量均匀性、有关物质、含量   |
| 凝胶剂              | 性状、pH 值、粒度(混悬型)、粘度、有关物质、含量   |
| 栓剂               | 性状、融变时限、溶出度或释放度、有关物质、含量  |



## 3.2 化学药生产流程——工艺研究

由于原料药本身的可压性和流动性均较差，因此剂量较小的药物，可以忽略原料药的可压性和流动性而直接采用直接压片。而对于剂量较大的药物，可以通过湿法制粒来改善其流动性和可压性。

### 直接压片

- 工艺关键在于辅料的选择
- 主要考查混合均匀性，流动性和可压性等，也包括其它必检项目如含量，杂质，溶出等。

### 湿法制粒

- 选择合适的混合设备和批量，预混时间，制粒所需的润湿剂用量，制粒终点的确定，水分的限度，干燥温度的选择，干燥时间和水分的量化关系等。
- 颗粒的测试和片的检测项目同直接压片。

**工艺研究及优化：**对影响制剂产品质量的工艺参数等进行研究，如：混合工艺、制粒用的筛网大小、压片的初步工艺、包衣工艺、包衣增重等。确认两个或三个最佳处方工艺，分别作出小样，初步确定处方工艺。

一个药物的合成工艺路线通常可由若干个合成工序组成，每个合成工序包含若干个化学单元反应，每个单元反应又包括反应和后处理两部分，后处理是产物的分离、精制的物理处理过程，只有经过适当而有效的后处理才能得到符合质量标准的药物。

| 反应影响因素 | 内容  |
|--------|---|
| 配料比    | 参与反应的各物料之间物质量的比例，也称投料比。凡属可逆反应，可采取增加反应物之一的浓度（即增加其配料比），或从反应系统中不断除去生成物之一的办法，以提高反应速率和增加产物的收率。当反应生成物的生成量取决于反应液中某一反应物的浓度时，则应增加其配料比。 <b>最适合的配料比应在收率较高，同时又是单耗较低的某一范围内。</b> 倘若反应中有反应物不稳定，则可增加其用量以保证有足够量反应物参与主反应。当参与主、副反应的反应物不尽相同时，应利用这一差异，增加某一反应物的用量，以增加主反应的竞争能力。为防止连续反应和副反应的发生，有些反应的配料比小于理论配比，反应进行到一定程度后停止反应。需要重视反应机理和反应物的特性与配料比的关系。  |
| 溶剂     | 作为化学反应的介质， <b>反应溶剂性质和用量直接影响反应物的浓度、溶剂化作用、加料次序、反应温度和反应压力等。</b> 在药物合成中，绝大部分化学反应都是在溶剂中进行的，溶剂还是一个稀释剂，它可以帮助反应散热或传热，并使反应分子能够均匀分布，增加分子间碰撞的机会，从而加速反应进程。采用重结晶法精制反应产物，也需要溶剂。在化学反应或在重结晶条件下，溶剂应是稳定而惰性的。尽量不要让溶剂干扰反应，不要在反应物、试剂和溶剂之间发生副反应或在重结晶时溶剂与产物发生化学反应。溶剂直接影响化学反应的反应速率、反应方向、转化率和产物构型等。在选用溶剂时还要考虑如何将产物从反应液中分离。为了使反应能成功地按预定方向进行，必须选择适当的溶剂。  |
| 温度     | 常用类推法选择反应温度，即根据文献报道的类似反应的反应温度初步确定反应温度，然后根据反应物性质作适当改变，综合各种影响因素，进行设计和试验。如果是全新反应，一般从室温开始，用薄层层析法追踪发生的变化，若无反应发生，可逐步升温或延长时间；若反应过快或激烈，可降温或控温缓和进行。常用冷却介质有冰/水、冰/盐、干冰/丙酮和液氮。加热温度可通过具有适当沸点的溶剂予以固定，也可用蒸汽浴、控温油浴将反应温度恒定在某一温度范围。 <b>选择最佳反应温度，应先了解温度与活化能、反应速率及反应平衡之间的关系。</b> 反应温度升高，反应速率相应增大，在高温条件下不利于副反应的进行。应将反应液尽快加热至所需要的反应温度，而不宜缓缓加热。根据这些要求，制定出传热面积大的管道反应工艺。温度控制是生产过程中的重要问题，温度影响反应速率和产量，在一些情况下温度对这两者的影响是相反的。对于复杂反应，可从温度变化对反应速率及产量（转化率）的影响来讨论最佳温度；如一定转化率下，将反应总速率对温度变化作图，曲线的最高速率点所对应温度即为该条件下的最佳温度。 |
| 压力     | <b>多数反应是在常压下进行的，但有些反应要在加压下才能进行或提高产率。</b> 压力对于液相或液-固相反应一般影响不大，而对气相、气-固相或气-液相反应的平衡、反应速率以及产率影响比较显著。对于反应物或反应溶剂具有挥发性或沸点较低的反应，提高温度，有利于反应进行，但可能成为气相反应。在工业上，加压反应需要特殊设备并需要采取相应的措施，以保证操作和生产安全。压力对于理论产率的影响，依赖于反应物与产物体积或分子数的变化，如果一个反应的结果使分子数增加，即体积增加，加压对产物生成不利。反之，如果反应的结果使体积缩小，则加压对产物的生成有利。压力既影响化学平衡，又可影响其它因素，如催化氢化反应中加压能增加氢气在反应溶液中的溶解度和催化剂表面上氢的浓度，从而促进反应的进行。又如需要较高反应温度的液相反应，如果反应温度超过反应物或溶剂的沸点，也可以在加压下进行，以提高反应速率，缩短反应时间。  |
| 催化剂    | 化学合成药物的工艺路线中常见催化反应，如酸碱催化，金属催化，相转移催化，生物酶催化等，来加速化学反应、缩短生产周期、提高产品的纯度和收率。   |
| 反应时间   | 反应物在一定条件下通过化学反应转变成产物，与化学反应时间有关。有效地控制反应终点，力图以高收率获得高纯度的产物。  |
| 后处理    | 由于药物合成反应常伴随着副反应，反应完成后需要从副产物和未反应的原辅材料及溶剂中分离出主产物；分离方法与实验室所用方法类似，如蒸馏、过滤、萃取、干燥等技术等。   |
| 产品的纯化  | 为了保证产品质量，所有中间体都必须有一定的质量标准，最终产品必须符合国家规定的药品标准。  |

## 3.3 生物药生产流程

生物药生产工艺的开发过程一般需要经历工程细胞库的构建、摇瓶工艺开发、小试工艺开发、中试放大、生产纯化和制剂等步骤。

图16、生物药生产工艺开发流程

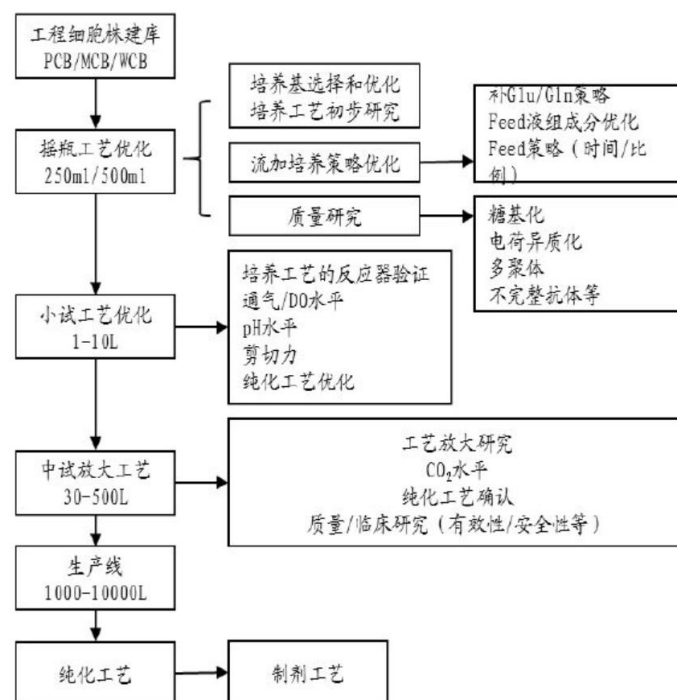
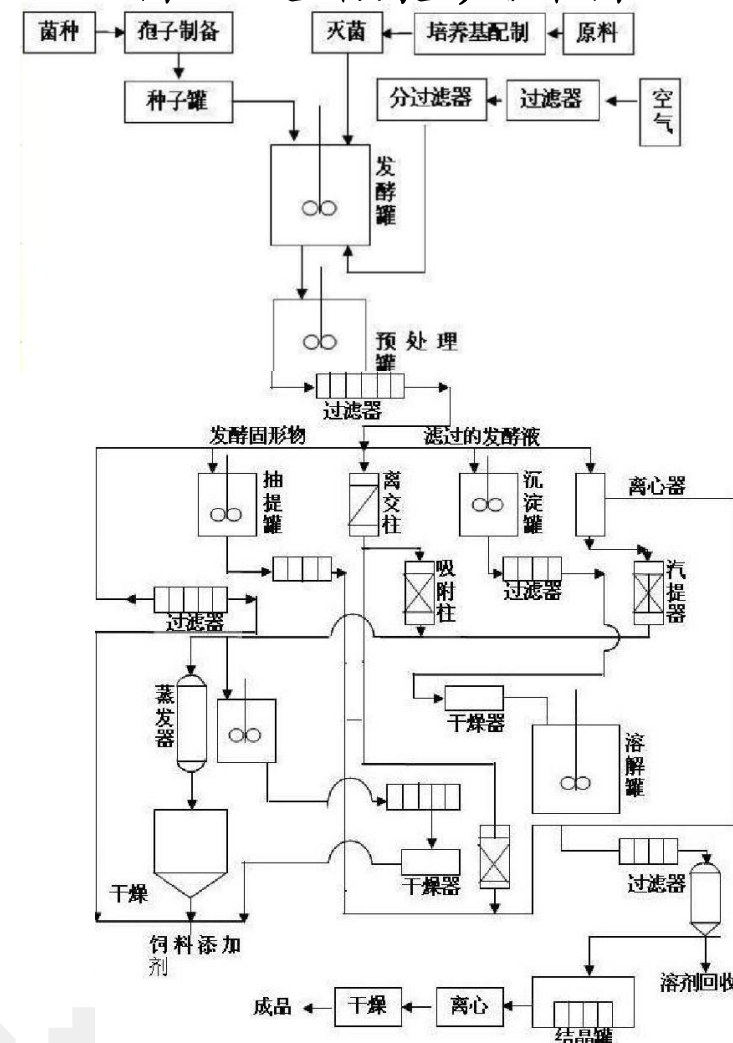


图17、生物药生产流程图



## 3.3 生物药生产流程——选择和预处理

### (1) 原料选择

原则：有效成分含量高，原料新鲜，来源丰富、易得，产地较近，原料中杂质含量少，成本低。

### (2) 预处理

去除不用的成分，将有用成分保鲜处理，收集微生物原料时，要及时将菌体与培养液分开，进行保鲜处理。细胞及蛋白质的预处理方式有加入凝聚剂、加入絮凝剂、变性沉淀、吸附、等电点沉淀、加沉淀剂。选择方法的依据有生物活性物质存在方式与特点、后续操作的要求、目的物稳定性。

### (3) 保存

方法：冷冻法，适用于所有生物原料， $-40^{\circ}\text{C}$ ；有机溶剂脱水法，丙酮，适用于原料少、价值高，有机溶剂对原料生物活性无影响；防腐剂保鲜，常用乙醇、苯酚等，适用于液体原料，如发酵液、提取液。

### 3.3 生物药生产流程——选择和预处理

#### 培养基选择





### 3.3 生物药生产流程——药物提取

#### (1) 组织与细胞的破碎

常用破碎方法：磨切法、机械破碎法（设备为组织捣碎机、胶体磨、匀浆器、球磨机）、压力法（加压和减压）、反复冻融法、超声波震荡破碎法、自溶法或酶解法。

#### (2) 提取

根据具体对象选择提取试剂，常用水、缓冲溶液、盐溶液、乙醇、有机溶剂（氯仿、丙酮）等。提取剂的用量、次数、时间需保证充分提取，且不变性。

提取方法：沉淀法（盐析、有机溶剂、等电点）；按分子大小分离（超滤、透析、层析、离心）；电荷（离子交换、层析、电泳、等电聚焦）；亲和层析法（酶与底物、抗原与抗体、激素与受体）。

## 3.3 生物药生产流程——药物提取

### 核酸类药物

- 提取法和发酵法。

### 糖类药物

- 非降解法适用于从含一种粘多糖的动物组织中提取粘多糖，用水或盐
- 降解法适用于从组织中提取结合比较牢固的粘多糖，酶解
- 分离用沉淀和离子交换。

### 脂类药物

- 提取用有机溶剂(醇、氯仿、甲醇)将所需成分从原料中溶解出来
- 纯化有沉淀法、层析法、离子交换法。

### 氨基酸类药物

- 提取用蛋白质水解法，酸水解迅速、完全，但色氨酸被破坏，丝氨酸等部分破坏；碱水解易产生消旋作用；酶水解不完全
- 发酵法，从发酵液中提取
- 化学合成与酶促合成法，化学合成产物混旋需拆分，酶促合成效果较好
- 分离用沉淀法（溶解度差异），吸附法（吸附能力差异），离子交换法（所带电荷不同）。

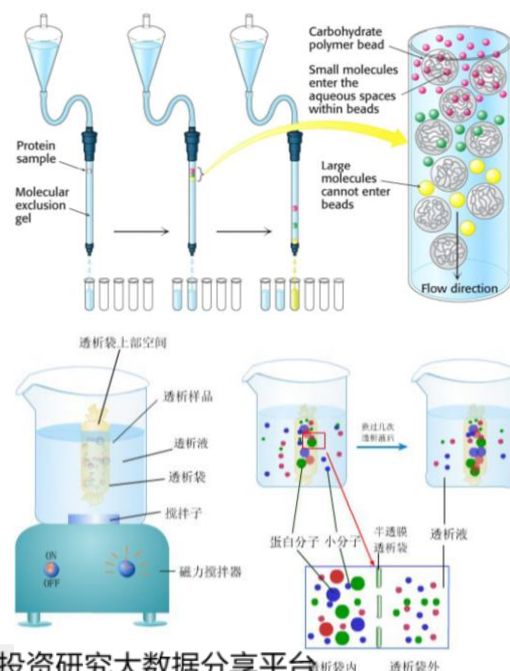
### 蛋白质类药物

- 提取用水溶液、有机溶剂和表面活性剂
- 分离用沉淀法、亲和层析法、超滤法、透析法、凝胶层析法、超速离心法、离子交换柱层析法、电泳法、等电聚焦法。

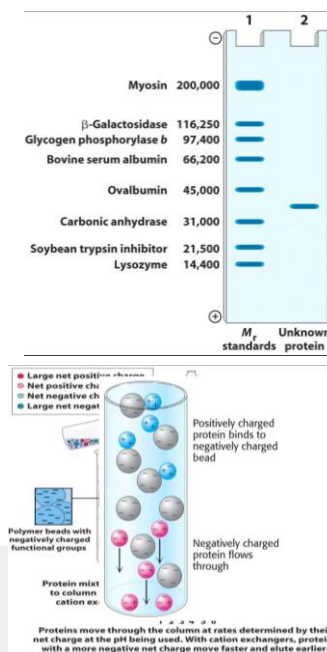
## 3.3 生物药生产流程——分离纯化

生物材料组成非常复杂，有些化合物在生物材料中含量极微，生物活性成分离开生物体后，易变性破坏，须注意保护其生理活性。生物制药中的分离方法常带有很大的经验成分，多采用温和的“多阶式”方法。主要原理是根据分子形状和大小、分子电离性质（带电性）、分子极性大小及溶解度、物质吸附性质、配体特异性的差异进行分离。判断分离纯化标准有分辨力、重现性（精密度、样品稳定性、重复性）、回收率。

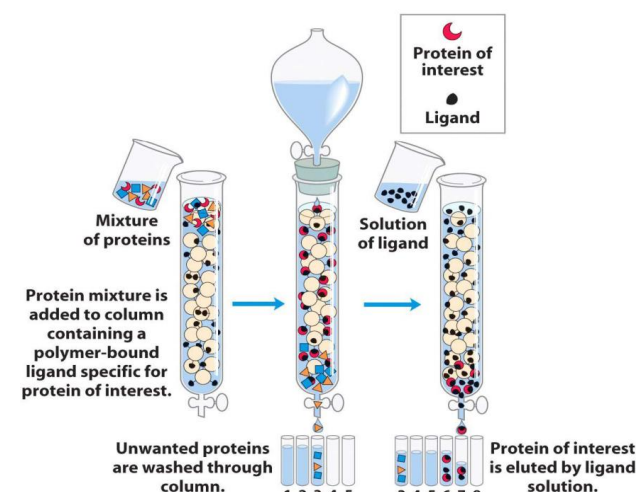
根据分子大小分离：  
凝胶过滤法和透析法



根据电离性质分离：  
电泳法和离子交换层析法



根据配基特异性分离：亲和层析法



### 3.3 生物药生产——基因工程药物的生产

基因工程药物是以基因组学研究中发现的功能性基因或基因的产物为起始材料，通过生物学、分子生物学或生物化学、生物工程等相应技术制成的、并以相应分析技术控制中间产物和成品质量的生物活性物质产品，临床上可用于某些疾病的诊断和治疗。基因药物类型广泛，包括重组蛋白质药物、人源化单克隆抗体、基因治疗药物、重组蛋白质疫苗、核酸药物等10多种类型。

图18、基因工程药物生产流程



### 3.3 生物药生产——重组蛋白质药物的生产

| 参与合成的基因数量                                 | 相应蛋白举例                        |
|---|-------------------------------|
| 由单一基因产生的一条氨基酸链                            | 生长激素                          |
| 单一基因经过翻译后由“连接肽”形成的两条相同氨基酸链（同型二聚体）重组人蛋白衍生物 | $\alpha$ -半乳糖苷酶A              |
| 从两种不同的基因产生                                | 人胰岛素、脑垂体激素、促甲状腺激素、促黄体激素和卵泡刺激素 |
| 众多的人类基因片段经过“体细胞重组”过程进行基因重排                | 重组治疗性抗体的高变区域                  |

重组蛋白的表达、翻译后修饰及分泌均具有高度复杂性，参与合成的基因数量及是否有糖基化都可影响蛋白质的活性。因此，对于特定的重组蛋白必须选择相对应的某一特定表达体系作为生产平台。



### 3.3 生物药生产——重组蛋白质药物的生产

目前所有被批准为药物的重组蛋白质，基本上都是由大肠杆菌、酿酒酵母、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）和乳仓鼠肾（BHK）4种生产系统生产的。近5年新批准的重组蛋白药物，多数使用哺乳动物细胞系统，其中CHO的应用更多。

表13、不同表达系统的优缺点对比

哺乳类细胞生产体系对软硬件要求均很高，在工业化大规模表达、分离纯化和存储时，蛋白的稳定性、折叠、聚集等可影响蛋白质的生物学活性。生产成本较高及产能扩增瓶颈导致重组蛋白药物治疗费高于普通小分子药物。

| 宿主细胞       | 优势   | 劣势  | 代表性宿主名称   |
|------------|--|---|---|
| 原核生物       | 1.操作经验丰富；<br>2.生长繁殖速度快；<br>3.不存在没有必要的糖基化；<br>4.不存在脱病毒或病毒污染的问题；               | 1.产出物培养液中，内毒素和宿主细胞蛋白水平较高；<br>2.缺少表达蛋白的翻译后修饰（如糖基化）；<br>3.无法完成表达蛋白所需要的重新折叠；     | 大肠杆菌/溶组织梭状芽胞杆菌/肉毒芽胞梭菌/葡欧文菌等   |
| 真核（酵母）     | 1.操作经验丰富；<br>2.大规模培养成本低；<br>3.可以进行一些翻译后修饰；<br>4.可以达到较高的细胞密度，表达蛋白直接分泌到培养液中；   | 1.可能会过度糖基化（超糖基化）；<br>2.酵母的糖基化与人糖基化不完全相同；<br>3.表达蛋白发生蛋白水解；                     | 酿酒酵母/毕赤酵母等  |
| 真核（昆虫）     | 1.操作经验较为丰富；<br>2.表达蛋白分泌到培养基中；<br>3.较多的翻译后修饰；<br>4.杆状病毒载体对人类无害；<br>5.合理的表达效率； | 1.感染导致的细胞死亡会释放胞内蛋白；<br>2.感染动物病毒风险；<br>3.对剪切力有些敏感；                             | 被杆状病毒感染的卡特彼勒草地贪夜蛾细胞系等   |
| 真核（哺乳动物细胞） | 1.操作经验丰富；<br>2.分泌蛋白以最原始状态分泌到培养液中；<br>3.蛋白翻译后修饰水平高；<br>4.可以成功表达复杂蛋白；          | 1.相对较长的细胞表达周期；<br>2.表达培养液成本较高及复杂的营养要求；<br>3.对剪切力和极端渗透压敏感；<br>4.感染哺乳动物细胞病毒的风险； | 中国仓鼠卵巢细胞（CHO）/乳仓鼠肾（BHK）/NSO 小鼠骨髓瘤/Sp2/0 小鼠骨髓瘤/HEK293/HT-1080 成纤维细胞/转基因兔/转基因羊等 |

### 3.3 生物药生产——抗体类生物药的生产

由一种抗原决定簇刺激机体，由一个B淋巴细胞接受该抗原刺激所产生的抗体称之为单克隆抗体。由多种抗原决定簇刺激机体，相应地就产生各种各样的单克隆抗体，这些单克隆抗体混杂在一起就是多克隆抗体，机体内部所产生的抗体就是多克隆抗体；除了抗原决定簇的多样性以外，同一种抗原决定簇，也可刺激机体产生IgG、IgM、IgA、IgE和IgD等五类抗体。

图19、抗体类生物药的生产流程

细胞株在合理的生长环境进行逐步扩大，以最终满足生产的需要。

在细胞培养过程中，生物药所处的环境包括细胞、各种蛋白质水解酶、营养物质和溶解氧等，通常需要维持在相对较高的温度（ $> 30^{\circ}\text{C}$ ）和中性pH条件下，保持 $\geq 10\text{d}$ 时间，直到足够的蛋白质合成并分泌至胞外为止。

生物药合成结束后，通过离心或过滤的方法除去不溶性的细胞残渣，再将所含生物药的上清液通过亲和蛋白A色谱、阳离子交换色谱和阴离子交换色谱等几步色谱柱纯化，并进行病毒的去和灭活。

纯化后通过超滤或渗滤的方法把生物药置换到适当的缓冲液里，通过原液保存，或加入最终制剂成分以半成品的形式保存。

通过灌装到不同内包材得到成品，或进一步通过冷冻干燥处理制备成冻干粉末。

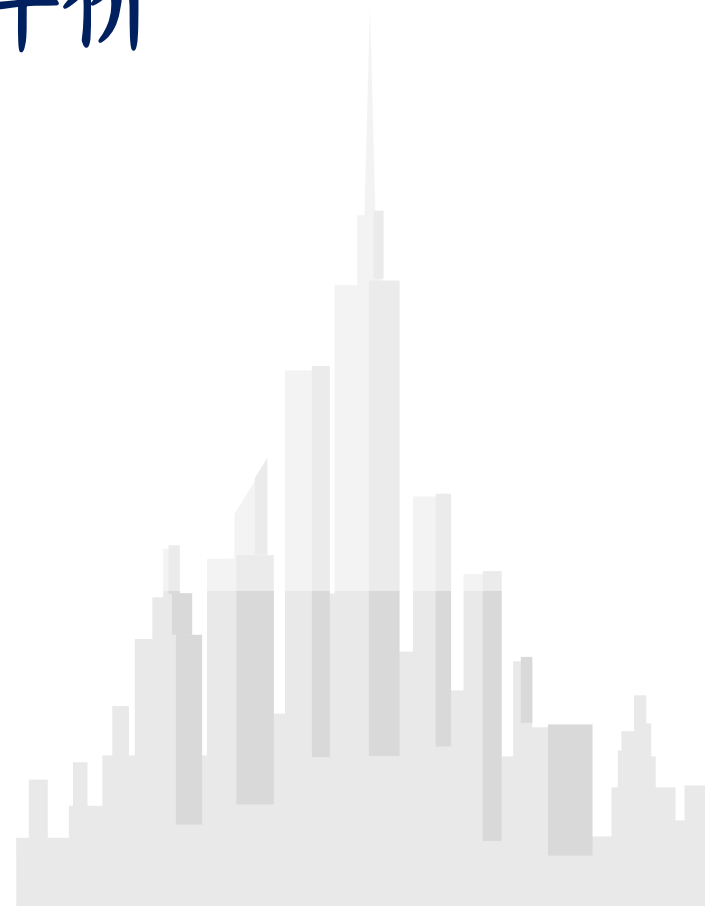
# 04

## 药物临床前评价

药代动力学研究

药效学研究

安全性评价



## 4.1 临床前评价试验

每一种药物是独特的，应根据药品的具体情况制定不同的临床前评价试验方案，内容包括主要药效学实验、一般药理研究、急性毒性试验、长期毒性试验、动物药代动力学试验、生殖毒性试验资料、致癌试验资料、免疫毒性或免疫原性研究、溶血性和局部刺激性研究、复方制剂中多种组份药效、毒性、药代动力学相互影响的实验、依赖性实验等。

表14、临床前评价试验信息

|        |   |
|--------|---|
| 试验目的   | 对中试产品进行综合性评价，并初步确定产品的临床试验方案   |
| 评价体系   | 涵盖新药成药性的药代特性和安全性早期评价以及临床前药动学、药效学、毒理学等研究   |
| 管理规定   | 执行《药物非临床研究质量管理规范》(GLP)，包括: 体内、体外药效试验、药理试验、过板试验、急性毒性试验、长期毒性试验、药代动力学试验、三致试验(致癌、致畸、致突变)。必须具有与试验研究项目相适应的人员、场地设备、仪器和管理制度: 所用试验动物、试剂和原材料应当符合国家有关规定和要求，并应当保证所有试验数据和资料的真实性。 |
| 生物分析手段 | 同位素标记/离心/超滤、酶免法、放免法、同位素示踪法、细胞活性测定法、免疫学法结合高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法等   |



## 4.2 生物药临床前评价的特殊性

生物技术药物与常规小分子化学药物相比在物理化学特性、免疫学和毒理学性质、代谢过程、制剂配方等方面均存在差异。由于生物药的作用靶点主要是受体或抗原表位，具有种属特异性、免疫原性、结构确证不完全性以及多功能性等特点，所以生物技术药物的评价与传统的临床前评价方法有所不同。

许多生物药在动物体内具有免疫原性，在单次或多次给药后产生抗体，使得长期毒理学评价受限，但可用于确定对不同动物的相对免疫原性。一般对动物呈强免疫原性对人也具有免疫原性；给药频率、患者个体差异、并发其他疾病及合并使用其他药物也影响对人体的免疫原性。

绝大多数生物药通过生物降解排出体外，因此除了某些为了延长显效时间而特意改进配方的药物外，不必进行常规的体内外药物代谢研究。生物药的作用时间一般较长，如人源性单抗和修饰性蛋白的可作用数天至数周。因此，生物技术药物的给药频率一般为每周2-4次、每周1次或每月1次。

生物药的毒性常与药理作用扩大化有关，其剂量反应曲线的形状无法预测。如对免疫调节剂而言，当剂量或浓度增加时，其生理效应常发生逆转。因此，难以将动物实验结果外推至人。虽然绝大多数生物药的设计目的是作用于特异的靶受体，但是靶受体经常对多种细胞功能具有调节作用。

生物技术药物的配方比较简单，给药途径经常为胃肠外给药或局部给药。近年来，随着新型给药技术的不断应用，也可能通过吸入或经口给药



- 根据研究目的选择相应的等级、种属、年龄、性别、体重的动物，一般选择对研究药物的反应与人接近的动物品系，如前期采用大小鼠，后期再选用等级更高的动物，如猴子、狒狒等。
- 通过检测受试产品在体外对人和动物的细胞结合力或功能活性，并确定受试品在体内具有药理活性或交叉反应来选择合适的实验动物，针对某些特定的问题可相应采用不同动物。
- 疾病动物模型是指各种医学科学研究中建立的具有人类疾病模拟表现的动物。宜使用成熟的、规范的、公认的动物模型，且遵循相似性、可重复性、可控性及经济性等原则。
- 建立的实验动物模型通常有猕猴、犬、家兔、豚鼠、金黄地鼠、大鼠、小鼠以及幼猫。

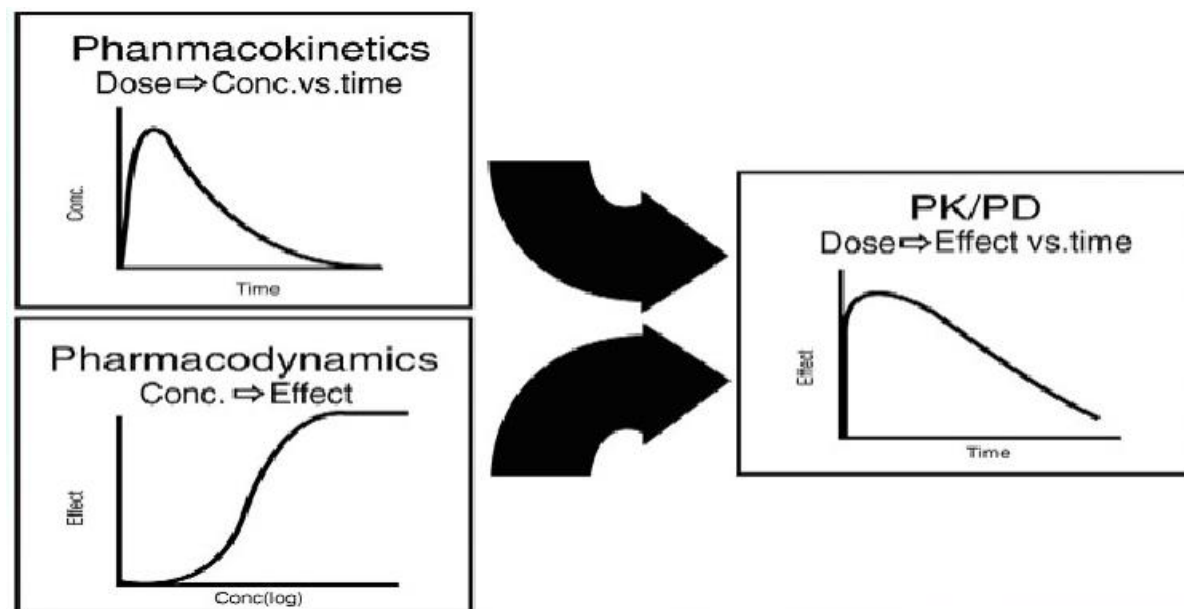
## 4.4 给药途径和剂量

- 给药途径宜与推荐的临床用药途径保持一致，从新药研发角度来说，口服最好。然而并非所有药物或者病症都适合口服，应考虑药物在所用动物种属的药代动力学和生物利用度，如生物利用度低，则给药途径可与临床不一致。
- 在具体实验研究中应该选择最合适的给药方式。生物技术药物的配方比较简单，给药途径经常为胃肠外给药或局部给药。近年来，随着新型给药技术的不断应用，也可能通过吸入或经口给药。
- 应做多种剂量的药效反应，一般会做剂量爬坡实验，如从不起作用的低剂量开始逐渐按倍数加大剂量，进而绘制剂量效应曲线，找到确保安全条件下的最佳药效的剂量范围。通常采用费氏递增法设计剂量爬坡方案，即当初试剂量为 $n$  (g/m<sup>2</sup>)时，其后按顺序递增的剂量分别是 $2n$ 、 $3.3n$ 、 $5n$ 、 $7n$ ，此后则依次递增前一剂量的 $1/3$ 。其特点是开始递增速度快，后期增速较慢，在确保受试者安全的情况下，以合理的速度和梯度迅速达到耐受性临床试验的终止目标。剂量递增方案的确定要考虑起始剂量与药效学有效剂量和毒性剂量之间的距离、毒代和药代动力学特征等因素。

## 4.5 PK-PD结合模型

- **PK/PD**: 综合研究体内药物的动力学过程与药效量化指标的动力学过程，本质是研究一种药量与效应之间转换的过程。其研究目的是确定用药剂量、体液浓度、用药剂量强度与时间的关系。
- **药代动力学 (pharmacokinetics, PK)**: 药物在体内吸收、分布、代谢、排泄及其经时过程。
- **药效动力学 (pharmacodynamics, PD)**: 描述药物对机体的作用，即效应随着时间和浓度而变化的动力学过程。（与前者相比更有临床意义）

图20、PK-PD结合模型



PK: 机体对药物的作用

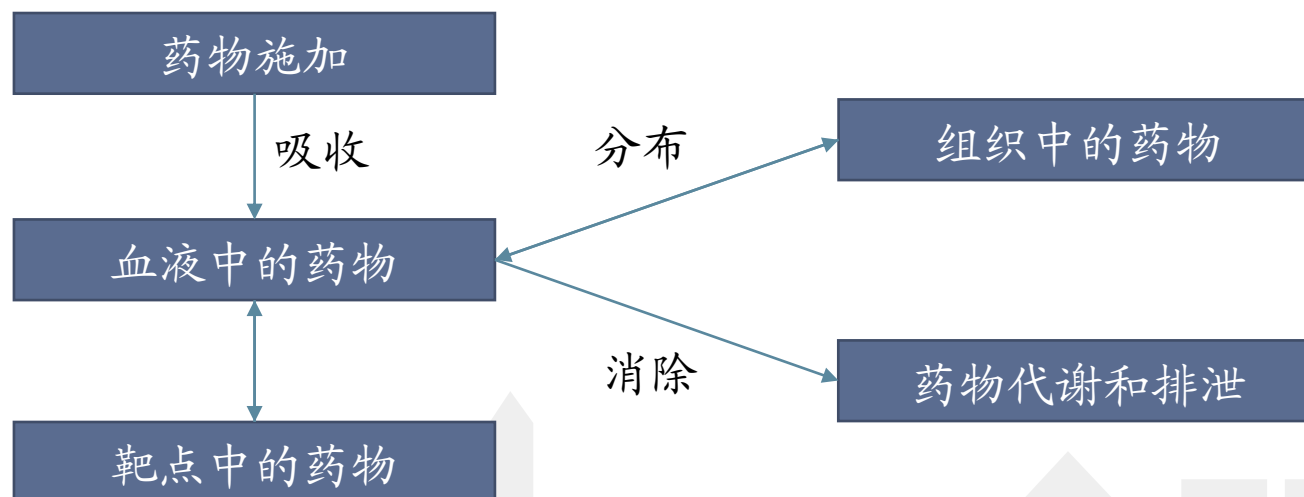
PD: 药物对机体的作用

PK/PD: 某一给药剂量的时间-效应过程

## 4.6 药代动力学研究

- 研究目的在于利用生物分析等技术研究药物在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄情况及时间进程，并将这些结果与人体联系起来，以揭示药物有效性及安全性的物质基础。
- 在研制期间应尽早地进行(在分析方法的限度内)，内容应包括活性要素的浓度及其药理学效应与时间的关系，对于选用什么样的剂型进行药理学与毒理学试验和确定重复剂量的持续时间具有指导意义。
- 考虑样品分析方法的筛选、生物代谢转化、生物利用度、组织分布、物料平衡信息、代谢过程的复杂性等。

图21、药代动力学内容



## 4.6 药代动力学：参数

通过测定给药后不同时间体液（主要是血液）中的药物浓度，得到浓度-时间曲线（c-t curve），根据c-t曲线选择适当的药物动力学模型。求算以下相应的动力学参数。

- 表示药物在使用部位吸收入大循环的速度。
- $K_a$  值增大，血药浓度的峰值也升高，但峰时减少。

吸收速度常数  
( $K_a$ )

- 表示药物进入体循环的量与所用剂量的比值。
- 静脉注射的 $F=1$ ；口服或肌肉注射的 $F \leq 1$ ，口服时， $F$ 值与饮食、服药时间有关。

吸收分数 ( $F$ )

- 表示药物在体内分布的程度。
- 静脉注射时， $V=\text{剂量}(D)/C$ ； $V$ 值增大，药物浓度下降，二者呈反比关系。

表观分布容积 ( $V$ )

- 表示药物在体内代谢、排泄的速度，反映体内药物消除快慢。
- 即单位时间内消除的药量与体内初始药量的比值。由药物代谢与排泄过程决定。单位为时间的倒数。

消除速度常数 ( $K$ )



药物含量分析方法包括分光光度法、色谱法、免疫分析法、同位素标记法。

表15、药物含量分析方法原理和特点

| 方法  | 原理   | 特点   |
|---|--|--|
| <b>分光光度法</b><br>包括紫外-可见分光光度法、荧光分光光度法及原子吸收光谱法                          | 相同的物质由于含量不同对光的吸收程度不同。利用物质对一定波长光的吸收程度来测定物质含量（定量分析）  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 仪器设备简单、投资少、成本低、操作方便，只要有一定吸收光谱的物质均能测得。</li> <li>• 灵敏度较低，对体内许多内源性物质难以区分，所以常与色谱法联用。</li> </ul>                           |
| <b>色谱法</b><br>包括薄层层析法、薄层扫描法、气相色谱法、气相-质谱联用，高效液相色谱法（单维、二维、三维、荧光）液相-质谱联用 | 待分离物质分子在固定相和流动相之间分配平衡的过程，不同的物质在两相之间的分配会不同，这使其随流动相运动速度各不相同  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 色谱法尤其是高效液相色谱法，经过多年发展已趋于完善，其稳定性、可操作性、准确性、灵敏度均有了较大的提高。</li> <li>• 薄层层析分离效率高，不易受溶剂和杂质的干扰，其缺点是线性范围较窄，操作技术要求较高。</li> </ul> |
| <b>免疫分析法</b><br>包括放射免疫法和酶联免疫法   | 免疫反应，即抗原与抗体结合形成抗原-抗体结合物，这种结合是疏松、可逆的，利用样品中待测药物与标记药物之间的竞争，使标记药物从标记的抗原-抗体结合物上被取代，取代量与加入的待测药物的量相关，通过测定被取代的标记药物来定量分析待测药物。 | 有较高的灵敏度和准确性，操作简单，适用于对大分子物质的检测，但对于许多内源性相似物质的辨别能力有待提高。   |
| <b>同位素标记法</b>   | 利用放射性核素或稳定性核素作为示踪剂对研究对象进行标记，制成含有同位素的标记药物代替相应的非标记药物。  | 灵敏度高，方法简便，定位定量准确，符合生理条件，可用作示踪剂研究药物在体内的分布、代谢、疗效、作用机制等   |

## 4.6 药代动力学研究体系案例

生物药的药代动力学研究体系案例：

采用抗原偶联大分子技术，建立酶联免疫吸附实验（ELISA）法检测新突变体小分子蛋白血药浓度的方法。

建立放免分析法（RIA）测定蛋白或多肽类药物的生物分析方法。

建立“同位素标记/离心/超滤”技术测定多肽类药物血浆蛋白结合的方法。

建立相关动物“豚鼠模型”研究新型重组人干扰素类药物的组织分布及排泄。

建立药代动力学-药效动力学（PK-PD）同步分析方法研究新型释药系统的作用及清除机制。

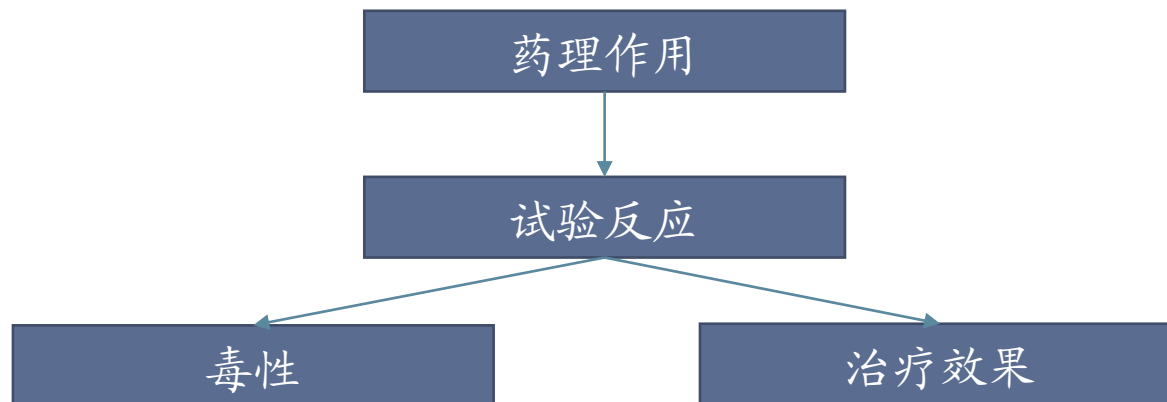
建立局部给药途径作用于靶器官的药代动力学研究。

采用同位素标记示踪结合三氯醋酸沉淀及高效液相色谱法（HPLC）分离方法进行药动学研究。

## 4.7 药效学研究

- 研究目的在于使用不同的实验技术来显示在有关的主要生理系统中存在的基本效应和作用模式，为了分析药物的药理和治疗作用，为临床治疗提供真实有效的依据。
- 通过体内、外试验研究药物作用机理、药效作用的量效关系及时效关系和疗效特点，以及结合药物代谢特点的PD/PK试验（研究体内药物浓度与疗效的关系），包括初步有效性试验来探索对特定适应症的治疗作用及量效关系和主要药效学研究来评价药物对特定适应症的治疗作用和作用特点。

图22、药效学内容



## 4.7 药效学研究常用方法

药效学研究方法可分综合法和分析法。综合法是指在整体动物身上进行，是在若干其它因素综合参与下考察药物作用，根据实验动物情况不同，可分为正常动物法和实验治疗法。分析方法是采用离体脏器，例如离体肠管、离体心脏、血管、子宫及离体神经肌肉制备等，单一地考察药物对某一部分的作用。深入研究还包括细胞水平、分子水平的分析研究。

### 离体器官实验

- 常用的离体器官有心脏、血管、肠段、子宫及神经肌肉标本，用离体标本可比较直观地观测药物的作用。不同的动物标本用于测定不同类的药物作用。

### 细胞培养实验

- 在细胞水平研究药物作用并分析作用机理。

### 生化或酶学手段

- 在分子水平研究药物作用并分析作用机理。

整体动物实验根据不同情况可用**正常动物**、**麻醉动物**、**病理模型动物**。

- **正常动物**：举例来看，可通过观察药物对动物行为影响来研究中枢神经系统药物作用。将动物的行为分级，对用药组和对照组动物进行细心观察，并按分级法打分，求出平均数，进行显著性测验，可判定新药是中枢抑制作用还是中枢兴奋作用。也可用于观察药物对记忆力和影响，以及测定药物的依赖性。
- **病理模型动物**：观测药物对疾病的疗效。
- **麻醉动物**：整体动物实验尽量采用清醒动物，也可以在麻醉动物上进行。应注意麻醉深度的控制和麻醉药物的选择。



## 4.7 药效学研究体系案例

生物药的药效学研究体系案例：

建立基于不同动物白细胞减少模型用于评价长效升高白细胞作用的细胞因子。

建立不同血栓性疾病动物模型用于评价葡激酶等溶栓和抗栓新药。

建立犬或大鼠等高血糖模型用于评价胰岛素等生物药的降血糖作用。

建立 BALB/C 小鼠 colon26 移植瘤等小鼠模型研究靶向抗体药物的抗肿瘤作用。

建立“幼猫催吐活性实验模型”用于评价金黄色葡萄球菌肠毒素 C2（SEC2）不同突变蛋白减毒作用。

表16、安全性评价试验种类和内容

| 试验种类        | 研究内容  |
|-------------|---|
| 安全药理学       | 观察药物对主要生命器官功能的影响，主要观察中枢神经系统、呼吸系统、循环系统功能   |
| 单次给药毒性试验    | 观察单次给药后或 24 小时内多次给药后一定时间内的动物毒性反应及死亡情况   |
| 重复给药毒性试验    | 通过较高剂量较长周期的重复给药来考察动物接受药物后表现的毒性特征  |
| 毒代动力学       | 包括以下几个方面：<br>1) 方法学建立与验证；<br>2) 血药浓度测定并评估药物在体内的暴露量与毒性的关系                              |
| 生殖毒性试验      | 观察供试药物对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响，预测其可能产生的对生殖细胞、受孕、妊娠、分娩、哺乳等亲代生殖机能的不良影响，以及对子代胚胎-胎儿发育、出生后发育的不良影响 |
| 遗传毒性试验      | 通过系列的体外、体内试验考察受试物对生物细胞的结构和功能的变化，导致机体遗传信息的改变的有害效应                                      |
| 致癌试验        | 检测受试药物是否诱发动物发生肿瘤的风险   |
| 局部毒性试验      | 观察药物对给药部位如皮肤、粘膜、眼、肌肉、皮下等刺激性损伤的试验  |
| 免疫原性及免疫毒性试验 | 根据药物特点设计一系列免疫学试验或结合一般毒性试验，评估供试品对机体免疫系统的影响，包括但不限于主动全身过敏反应、皮肤被动过敏反应等试验研究                |
| 特殊安全性试验     | 溶血试验、光毒性试验等   |

全球创新药物研发的历史经验表明35%-40%的新药因安全性原因而研发失败。安全性问题发现得越晚，给制药公司带来的经济损失就越大。因此，药物的安全性问题一直以来受到各国药品管理部门和新药研发人员的高度重视。

药物安全评价又称非临床药物安全性评价，是指通过实验室研究和动物体外系统对治疗药物的安全性，进行评估，是新药品进入最终临床试验和最终的批准前的必要程序和重要步骤。

## 4.8 安全性评价——生物药的特殊性

- 生物技术药物大多数为蛋白、多肽和核酸等生物大分子，具有生物活性和种属的特异性及多效性，需要**选择合适的评价模型并合理检测和解释体内免疫状态的改变情况**。
- 欧共体、日本和美国的专家以国际协调会议 (ICH) 的形式通过相互交流和讨论，制定了生物技术药物临床前安全性评价的指导原则。
- 在产品的质量及一致性方面应**重点掌握产品特性、效力和纯度**，以保证产品达到微生物学安全性的要求。
- 在设计安全性评价实验时除了相关动物种属的选择、动物的数量、给药方案、受试物的稳定性和量的恒定，还应考虑**异源性蛋白、载体、细胞、组织及杂质的免疫原性问题**，在毒理学研究中应采取适当的方式检测抗体，尤其是中和抗体以便解释各种实验结果。
- 对于转基因类产品，载体的分布和体内持续性，载体序列在非靶细胞组织中的表达潜能，尤其是性腺分布和生殖细胞整合的可能性也是应重点考虑的问题，FDA建议在临床试验前对转基因类产品应进行生物分布研究。

表17、生物技术制品的安全性评价因素

|         |  |
|---------|--|
| 微生物学安全性 | 外来感染原：细菌、支原体、真菌、病毒、克雅氏病原体等<br>转基因产品体内重建为强复制型病毒载体的潜能<br>细胞携带同源性或异源性病毒，如逆转录病毒，EB病毒，巨细胞病毒<br>在环境中扩散的可能性，如载体传播             |
| 免疫学安全性  | 抗药物抗体<br>宿主细胞的蛋白质或其他杂质<br>转基因产品的病毒载体<br>细胞治疗中的杂质细胞<br>组织(器官类)产品中的“外源”表位<br>DNA 疫苗的免疫耐受性                                |
| 药理学安全性  | 扩大的药理作用或意外的受体结合<br>分布于非靶组织<br>细胞治疗中细胞表型、功能和定位的改变   |
| 生物分布    | 治疗中所用基因及细胞的分布及其体内的持续时间<br>转基因产品转移至生殖细胞<br>转基因产品的插入突变<br>载体播散及病毒传播  |
| 致癌性     | 产品(如生长因子)活性或药理作用，免疫调节活性<br>产品中残留的致癌性 DNA<br>转基因产品的插入突变<br>细胞治疗中供体的恶性或癌前细胞<br>细胞培养过程导致永生性、恶性转化和生长因子非依赖性<br>细胞治疗产品中的杂质细胞 |
| 一般安全性问题 | 蛋白质，病毒载体的物理特征<br>共价结合性配体分子，如毒素<br>产品配方及赋型剂<br>局部耐受性  |

## 4.8 安全性评价:毒理学研究

在药物研发的整个流程来说，毒性是终止药物研发的重要原因之一。通过研究在动物模型上药物暴露量与毒性反应的关系，解释可能的毒性靶器官和毒性反应，预测人体安全性，为后期（人体）临床试验用药提供可靠的毒代动力学依据。

表18、毒理学研究类别和主要内容

| 类别      | 主要内容  |
|---------|---|
| 单次剂量的毒性 | 单次高剂量对主要生理系统的效应，采用广范围的技术进行研究。应选用拟将在人体中采用的剂量及其持续时间。对大多数生物技术药物，动物给药时间常为1-3个月。短期使用（≤7d）和用于威胁生命急性疾病治疗的药物，在申报临床试验前宜进行长达2周给药时间的毒性试验。对拟用于慢性适应症的药品6个月的毒性试验适当。 |
| 重复剂量的毒性 | 当药效和单剂毒理学研究不足以评估其安全性时需进行  |
| 免疫毒性试验  | 评价受试物的潜在免疫原性，生物技术药物能调节体液和细胞免疫。  |
| 生殖毒性    | 用量可以调整以将预期/潜在的免疫应答降至最小。如果合适，可以缩短或者再细分正常处理的时间。   |



## 4.8 安全性评价:毒理学研究方法

### 通过基因组学

- 利用基因组学的相关信息,将遗传学与生物信息学相结合,从基因整体水平研究外源化合物的毒性作用,建立毒性作用与基因表达变化之间的关系,从而有效监测接触外源化合物后基因水平的改变,继而筛选和鉴别潜在的遗传毒物,并快速确定未知毒物的作用机制。
- 毒物基因组学将基因组学方法与技术应用于毒理学研究领域,主要采用DNA微阵列技术研究毒物和毒作用机制,有助于对毒物进行分类、检测,鉴定毒作用机制亚型,判断细胞损伤的严重程度并阐明化学物的量-效关系。

### 通过蛋白组学

- 毒理蛋白质组学作为毒理基因组学的延伸也已经应用到毒理学研究领域当中,是一种利用全蛋白质表达分析技术,确认生物物种受有害外源化学物影响的关键蛋白质和信号通路的组学技术。
- 该技术通过比较特定细胞、组织或器官在毒物作用前后蛋白质谱发生的变化,在短时间内筛选出与毒物相关的差异蛋白,再通过抗体分析技术快速寻找新的毒性蛋白标志物,因此比传统毒理学研究方法更具灵敏性和特异性。

### 通过代谢组学

- 利用现代分析方法对某一特定生理时期内所有低相对分子量代谢产物进行定量和定型分析。与其他相关技术的整合可以判定毒性终点的生物标志物,为推断毒性发生机制以及毒性评价提供可靠的科学依据,提供有关药物毒理、药物药效学评价、药物作用机制、临床诊断以及基因功能等方面的信息。
- 该研究常用核磁共振和质谱联用技术,包括气相色谱-质谱联用仪和液相色谱-质谱联用仪等。其中核磁共振光谱分析法应用最为广泛,具有不损害样品、处理方法简单、无需分离过程等优点,但检测灵敏度较低。



## 4.8 安全性评价:毒理学研究实验动物

### ● 正常动物

包括啮齿类动物（如大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠等）和非啮齿类动物（如家兔、比格犬、猴、小型猪等），主要用于进行急性毒性实验、长期毒性实验和特殊毒性实验等。通过不同的给药方式给予相应的受试药物一定时间后，采用特定方法测定各项生理生化指标用于评价受试药物对健康动物有无毒性，确定试验动物对毒物的毒性反应、中毒剂量和致死剂量等，为药物进入临床阶段提供参考依据并将结果外推至人类。传统的急性毒性实验已经在减少动物的使用量上取得了很大的进步，主要表现为应用上下法、固定剂量法、探测剂量法、近似致死剂量法等新的方法替代传统的急性毒性实验，并已经很大程度上减少了实验动物的使用量。

### ● 基因动物

对受试物进行器官毒性评价等研究时，经常使用各种模型动物。将诱发性模型动物、转基因动物、基因敲除动物应用到实验当中，进而研究各种模型下应用受试物后机体的异常反应，以寻找预测各类疾病更加有效的手段。

## 4.8 安全性评价:毒理学研究体外替代实验

使用正常动物的实验在毒理学研究的应用中存在着不敏感、周期长、所需受试物样品多、所需实验动物量大、难以揭示毒作用位点和毒作用机制以及结果可靠性差等问题。模型动物也存在着制造价格昂贵、受世界动物保护法限制等不足之处。在“3R”原则（替代、优化、减少）的指导下，一些发达国家率先开展了替代方法的研究。目前体外替代方法的研究已成为实用性毒理学研究新方向。主要包括离体器官实验和体外细胞培养实验。这类方法的应用一方面解决了整体动物实验中大量使用实验动物且以动物濒死或死亡为终点的伦理问题，另一方面增加了实验过程中的可控因素，提升了实验结果的可靠性。

- **离体器官实验**以体内脏器为基础的体外模型，一方面保留着完整的营养供给系统，能够确保在一定时间内保持离体器官的正常生理活性及生化功能，另一方面离体系统可排除其他组织器官的干扰，可控制受试物浓度，并可定量观察受试物对离体系统的毒性作用。目前，离体器官实验主要采用离体灌流技术，包括离体的肝脏、肾脏、心脏灌流技术等，用于研究外源化合物的靶器官毒性。
- **体外细胞培养**体外细胞培养使毒理学研究从简单的整体动物实验深入到复杂的细胞和分子水平，脱离了整体稳态和内分泌调控作用，从蛋白质、酶、受体、分子通道以及遗传因素等方面解析了药物与机体间的相互作用，在投药准确性和结果可靠性上显示了优越性。

## 4.8 安全性评价:毒理学研究体系案例

生物药的毒理学研究体系案例:

建立间接ELISA法检测结合抗体和细胞测活法检测中和抗体免疫原性规范化方法。

建立免疫原性/毒性结合细胞因子含量测定的方法研究抗体药物的毒性作用机制。

建立基于恒河猴长期毒性结合毒代动力学方法,评价小分子多肽药物的安全性。

将现代生物学、免疫学等技术应用于毒理学评价中综合分析毒性暴露的作用机制。

建立基于不同实验动物模型的安全性评价方法。

创建金黄地鼠模型研究基因重组干扰素的生殖毒性。

建立不同动物模型规范化的生物技术创新药物的遗传毒性和生殖毒性研究方法。

## 4.8 安全性评价：免疫原性评价

药物的免疫原性是指**药物刺激机体形成特异抗体或致敏淋巴细胞**的性质。应充分考虑到方法的适应性，设计有**效可行的检测方法**，以产生高质量的抗药抗体数据，并结合PK、安全性和有效性等数据进行综合判定，更好了解和预测免疫原性对毒性或疗效可能产生的影响。通常用多层的方法，包括**抗药抗体筛选、确证、抗体滴度检测、中和抗体检测和抗体亚型分析**。常用的**抗体药物ADA检测方法**有桥连ELISA法、直接ELISA法、间接ELISA法、生物薄膜干涉法、电化学发光法、中和抗体检测、放射免疫沉淀法（RIP）、表面等离子共振法（SPR）等。

表19、免疫原性研究主要内容、必要性和提升方向

|      |   |
|------|---|
| 主要内容 | 方法的开发、验证、药物诱导的抗体反应水平检测（滴度）、抗体的特性研究、抗体的中和活性测定、分析抗体产生对 <b>疗效、毒性和药动力学的影响</b> ，并预测对人体潜在的免疫原性强弱。   |
| 流程步骤 | 首先对结合抗体进行检测，如果检测结果表明存在抗体反应，则需要对抗体反应进行进一步的研究，如抗体滴度、抗体反应的阳性率、是否为中和抗体以及抗体的亚型等。抗体形成还应与药理学和毒理学变化相联系，进行综合分析，例如抗体产生对药代动力学、药效动力学、补体激活或毒性反应出现等是否存在影响，还应关注抗体产生与免疫复合物形成和沉积相关的病理变化。 |
| 必要性  | 在临床前，免疫原性对药物具有竞争抑制作用，可能会中和药物的活性，影响药物的清除、血浆半衰期和组织分布，改变药效或药动学，使在非临床研究中观察到的效应可能并非药物真正的药理学和毒性反应。 <b>评价非期望的免疫原性是生物技术药物的安全性和疗效评价中重点评估的一项。</b>                                 |
| 提升方向 | 优化检测技术、实现评价方法的规范化和标准化、提高动物模型的预测性。   |



## 4.8 安全性评价：致癌性评价

药企申请新药上市时通常需提供必要的完整动物致癌性试验结果，对于明显存在致癌性风险的化合物，可在早期完成该项试验以支持长期用药的临床试验。国外新药的致癌性试验的建立和评价起步较早，目前对致癌性试验已经积累了大量评价研究经验并建立了技术研发平台。我国于2011年5月颁布的致癌试验的指导原则中规定，预期临床连续用药至少为6个月的药物都应进行致癌试验，通常应在药物申请批准上市前完成，国内开展新药致癌性试验的工作正式起步。近几年，国内各新药非临床安全性评价机构均着手建立自己的致癌试验评价方法，累积背景数据。

### ● 致癌性的评价方法与模型：

#### 哺乳动物长期致癌试验

- 迄今为止最具有说服力的致癌性评价模型
- 建立试验体系内背景数据库集，建立和开展GLP条件下新药的临床前致癌试验评价试验。

#### 转基因动物短期致癌试验

- 目前国际上已经建立多种转基因动物模型用于评价化合物的致癌性
- 所转入或敲除的目的基因常为基因修复或者与肿瘤发生相关有关的基因。

#### 体外转化试验

- 对于致癌化合物的早期评价，其中一部分具有遗传毒性的化合物可采用常规的遗传毒理试验检测。
- 国际癌症研究机构(IARC)归类为1、2A 和2B级别的致癌物中有12%为非遗传致癌物，常规的遗传毒理试验无法检测此类化学品。

对于致癌作用的早期检测需要发展更为快速可靠的体外筛选模型。建立新的致癌物检测方法尤其是可用于非遗传致癌物检测的试验方法对于致癌风险的评价非常迫切及重要。



## 4.8 安全性评价：药物依赖评价

表20、药物依赖评价主要内容、必要性和提升方向

|      |   |
|------|---|
| 必要性  | 药物依赖性 <b>是药物长期与机体相互作用，使机体在生理机能、生化过程或形态学发生特异性、代偿性和适应性改变的特性</b> ，停止用药可导致机体的不适或心理上的渴求。                             |
| 评价指导 | FDA在2010年提出了临床前药物依赖评价指南，主要涉及体外和体内动物模型试验   |
| 实验动物 | 首选动物是啮齿类动物，在有明确的证据表明啮齿动物模型不能够足以说明的情况下使用非人灵长类动物，在研究中使用两种性别动物是最佳的。研究中使用的动物的数量应该基于统计学分析，以确保样本大小适合于检测可归因于试验药物的行为变化。 |
| 实验方法 | 条件位置偏爱实验、自身给药实验、药物辨别实验、躯体依赖反应等  |

- 生物药的特殊性：生物药相对需要进行临床前药物依赖安全评价的要求降低，进入大脑的治疗性单克隆抗体的浓度相对于全身(血浆)浓度仅为0.01% - 0.35%，**生物制剂的脑渗透相对不足。某些生物制剂也要考虑临床前药物依赖性安全评价**，如治疗缺血性中风、多发性硬化症、帕金森病等疾病的生物制剂易到达脑区；一些生物制剂可能导致高血浆浓度，如果血浆浓度 > 100 mg/mL的单克隆抗体，可导致脑水平 > 0.35 mg /mL。鉴于较高剂量的相应长的血浆半衰期，加上脑内未清除的单克隆抗体，如果脑区内存在任何脱靶结合，也可能引起成瘾的潜在危险性。

## 5 风险提示

- 1) 新药研发技术发展存在不确定性;
- 2) 新药临床前研发过程梳理尚不完善;
- 3) 行业政策变化趋势存在不确定性。

分析师声明

本人具有中国证券业协会授予的证券投资咨询执业资格并注册为证券分析师，以勤勉的职业态度，独立、客观地出具本报告。本报告清晰准确地反映了本人的研究观点。本人不曾因，不因，也将不会因本报告中的具体推荐意见或观点而直接或间接收到任何形式的补偿。

投资评级说明

| 投资建议的评级标准   | 类别   | 评级   | 说明   |
|---|------|------|--|
| 报告中投资建议所涉及的评级分为股票评级和行业评级（另有说明的除外）。评级标准为报告发布日后的12个月内公司股价（或行业指数）相对同期相关证券市场代表性指数的涨跌幅。其中：A股市场以上证综指或深圳成指为基准，香港市场以恒生指数为基准；美国市场以标普500或纳斯达克综合指数为基准。 | 股票评级 | 买入   | 相对同期相关证券市场代表性指数涨幅大于15%                                     |
|   |      | 审慎增持 | 相对同期相关证券市场代表性指数涨幅在5%~15%之间                                 |
|   |      | 中性   | 相对同期相关证券市场代表性指数涨幅在-5%~5%之间                                 |
|   |      | 减持   | 相对同期相关证券市场代表性指数涨幅小于-5%                                     |
|   |      | 无评级  | 由于我们无法获取必要的资料，或者公司面临无法预见结果的重大不确定性事件，或者其他原因，致使我们无法给出明确的投资评级 |
|   | 行业评级 | 推荐   | 相对表现优于同期相关证券市场代表性指数  |
|   |      | 中性   | 相对表现与同期相关证券市场代表性指数持平                                       |
|   |      | 回避   | 相对表现弱于同期相关证券市场代表性指数  |

信息披露

本公司在知晓的范围内履行信息披露义务。客户可登录www.xyzq.com.cn内幕交易防控栏内查询静默期安排和关联公司持股情况。

## 使用本研究报告的风险提示及法律声明

兴业证券股份有限公司经中国证券监督管理委员会批准，已具备证券投资咨询业务资格。

本报告仅供兴业证券股份有限公司（以下简称“本公司”）的客户使用，本公司不会因接收人收到本报告而视其为客户。本报告中的信息、意见等仅供客户参考，不构成所述证券买卖的出价或征价邀请或要约。该等信息、意见并未考虑到获取本报告人员的具体投资目的、财务状况以及特定需求，在任何时候均不构成对任何人的个人推荐。客户应当对本报告中的信息和意见进行独立评估，并应同时考量各自的投资目的、财务状况和特定需求，必要时就法律、商业、财务、税收等方面咨询专家的意见。对依据或者使用本报告所造成的一切后果，本公司及/或其关联人员均不承担任何法律责任。

本报告所载资料的来源被认为是可靠的，但本公司不保证其准确性或完整性，也不保证所包含的信息和建议不会发生任何变更。本公司并不对使用本报告所包含的材料产生的任何直接或间接损失或与此相关的其他任何损失承担任何责任。

本报告所载的资料、意见及推测仅反映本公司于发布本报告当日的判断，本报告所指的证券或投资标的的价格、价值及投资收入可升可跌，过往表现不应作为日后的表现依据；在不同时期，本公司可发出与本报告所载资料、意见及推测不一致的报告；本公司不保证本报告所含信息保持在最新状态。同时，本公司对本报告所含信息可在不发出通知的情形下做出修改，投资者应当自行关注相应的更新或修改。

除非另行说明，本报告中所引用的关于业绩的数据代表过往表现。过往的业绩表现亦不应作为日后回报的预示。我们不承诺也不保证，任何所预示的回报会得以实现。分析中所做的回报预测可能是基于相应的假设。任何假设的变化可能会显著地影响所预测的回报。

本公司的销售人员、交易人员以及其他专业人士可能会依据不同假设和标准、采用不同的分析方法而口头或书面发表与本报告意见及建议不一致的市场评论和/或交易观点。本公司没有将此意见及建议向报告所有接收者进行更新的义务。本公司的资产管理部门、自营部门以及其他投资业务部门可能独立做出与本报告中的意见或建议不一致的投资决策。

本报告并非针对或意图发送予或为任何就发送、发布、可得到或使用此报告而使兴业证券股份有限公司及其关联子公司等违反当地的法律或法规或可致使兴业证券股份有限公司受制于相关法律或法规的任何地区、国家或其他管辖区域的公民或居民，包括但不限于美国及美国公民（1934年美国《证券交易所》第15a-6条例定义为本「主要美国机构投资者」除外）。

本报告的版权归本公司所有。本公司对本报告保留一切权利。除非另有书面显示，否则本报告中的所有材料的版权均属本公司。未经本公司事先书面授权，本报告的任何部分均不得以任何方式制作任何形式的拷贝、复印件或复制品，或再次分发给任何其他人，或以任何侵犯本公司版权的其他方式使用。未经授权的转载，本公司不承担任何转载责任。

特别声明

在法律许可的情况下，兴业证券股份有限公司可能会持有本报告中提及公司所发行的证券头寸并进行交易，也可能为这些公司提供或争取提供投资银行业务服务。因此，投资者应当考虑到兴业证券股份有限公司及/或其相关人员可能存在影响本报告观点客观性的潜在利益冲突。投资者请勿将本报告视为投资或其他决定的唯一信赖依据。

联系方式

| 上 海  | 北 京  | 深 圳  |
|--|--|--|
| 地址：上海浦东新区长柳路36号兴业证券大厦15层<br>邮编：200135<br>邮箱：research@xyzq.com.cn | 地址：北京西城区锦什坊街35号北楼601-605<br>邮编：100033<br>邮箱：research@xyzq.com.cn | 地址：深圳福田区皇岗路5001号深业上城T2座52楼<br>邮编：518035<br>邮箱：research@xyzq.com.cn |



# THANKS