

# 亲和毛细管整体柱在牛血清白蛋白与奈福泮对映体相互作用研究中的应用

曾 玥, 季一兵\*

(中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009)

**摘要** 利用胃蛋白酶键合的有机聚合物整体柱在电色谱中对手性药物奈福泮的拆分能力, 采用前沿分析法同时对奈福泮的两个对映体与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用情况进行了考察。经过优化后建立的电色谱条件为: 胃蛋白酶修饰的聚(甲基丙烯酸环氧丙酯-乙二醇二甲基丙烯酸酯)毛细管整体柱作为分离通道( $32\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$ , 有效长度  $22\text{ cm}$ ), 运行缓冲液为 pH 5.5 的  $15\text{ mmol/L}$  醋酸铵, 样品溶剂为 pH 7.4 的  $50\text{ mmol/L}$  醋酸铵, 运行电压为  $5.0\text{ kV}$ , 电压进样  $10\text{ kV} \times 6\text{ s}$ , 检测波长为  $215\text{ nm}$ 。此时奈福泮两个对映体平台峰彼此完全分离, 结合体系中 BSA 对对映体在电色谱中的分离和检测均无影响, 测得两个对映体与 BSA 的结合常数分别为  $443$  和  $527\text{ L/mol}$ , 结合位点数均为  $1.0$ , 结合位点为 Sudlow site II。

**关键词** 亲和毛细管整体柱; 手性药物; 牛血清白蛋白; 相互作用; 奈福泮; 前沿分析法

中图分类号 R917; O657 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)01-0066-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160109

引用本文 曾玥, 季一兵. 亲和毛细管整体柱在牛血清白蛋白与奈福泮对映体相互作用研究中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(1):66-72.

Cite this article as: ZENG Yu, JI Yibing. Study of interaction between bovine serum albumin and nefopam enantiomers with affinity capillary monolith[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(1):66-72.

## Study of interaction between bovine serum albumin and nefopam enantiomers with affinity capillary monolith

ZENG Yu, JI Yibing\*

Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** A pepsin modified poly (glycidyl methacrylate-ethyleneglycol dimethacrylate) (poly (GMA-EDMA)) capillary monolith ( $32\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$ , effective length  $22\text{ cm}$ ) was applied in exploring the interaction between nefopam enantiomers and bovine serum albumin (BSA). Frontal analysis was used to measure the binding constant, number of binding sites and the location of binding sites of BSA to both nefopam enantiomers. Optimal CEC conditions were as follows:  $15\text{ mmol/L}$  ammonium acetate was adjusted to pH 5.5 as running buffer, separation voltage was  $5.0\text{ kV}$ , detection wavelength was  $215\text{ nm}$ , and samples were dissolved with  $50\text{ mmol/L}$  ammonium acetate buffer at pH 7.4 and were injected at  $10\text{ kV} \times 6\text{ s}$ . The results indicated that two enantiomers could successfully be separated by CEC on the monolith column. BSA in the binding system showed no effect on the separation and determination of nefopam enantiomers. Frontal analysis demonstrated that BSA has only one binding site with both enantiomers, with binding constants ( $K$ ) of  $443\text{ L/mol}$  and  $527\text{ L/mol}$ , respectively. The displacement experiments indicated that binding site of both isomers to BSA molecule was Sudlow site II.

**Key words** affinity capillary monolith; chiral drug; bovine serum albumin; interaction; nefopam; frontal analysis

大多数药物进入血液后会与血清白蛋白发生快速、可逆的结合反应, 这一可逆结合会在结合型药物与游离型药物之间建立起重要的动态平衡。

从立体化学角度来说, 手性药物的两种对映体实际上是两种完全不同的药物, 两个对映体之间的药效学和毒理学可能都并不相同, 两者与血清白蛋白的

结合情况若存在差异,会直接影响到其药代动力学过程,因此不论在手性药物的早期研发过程还是临床的实际应用中,研究血清白蛋白对药物对映体的选择性结合都具有非常重要的意义。

以蛋白为手性拆分剂的亲和毛细管整体柱电色谱 (affinity capillary monolith electrochromatography) 具有制备简单、化学性质稳定、手性选择剂选择范围广等优势,在手性分离领域已经获得了越来越多的关注<sup>[1-5]</sup>。前沿分析法 (frontal analysis, FA)<sup>[6-9]</sup> 是毛细管电泳常用于药物与蛋白相互作用考察的模式之一,操作简便易行,样品消耗少,在模拟生理条件下测定结果与传统方法结果吻合度更佳,且能够用于多重平衡研究,在实际应用中具有较强优势<sup>[10-13]</sup>。毛细管电泳/前沿分析法用于手性药物与蛋白的相互作用研究时,或是使用各个单一对映体分别进行实验考察<sup>[14]</sup>,或是使用药物消旋体并在运行缓冲液中加入环糊精作为手性拆分剂<sup>[15-19]</sup>,这些方法均能达到对各对映体的测定要求,但是在环糊精添加法中手性选择剂的消耗较大,且由于进样量较大,分离过程中蛋白峰和结合物峰有时无法与游离药物的平台峰完全分离,对手性药物的分离和最后的定量计算可能产生一定影响。因此,本研究采用键合了手性选择剂的亲和毛细管整体柱作为手性药物的分离手段,药物对映体平台峰之间分离良好,不仅解决了手性选择剂的消耗问题,还发现蛋白在运行过程中未见出峰,仅游离药物直接洗脱检测,无需使用在线毛细管电泳液相预柱<sup>[15-16,19]</sup>,即可避免结合体系中的蛋白对游离药物的检测产生影响,又保证了测定的准确性。

本研究使用亲和毛细管整体柱电色谱结合前沿分析模式,考察了接近生理条件下手性药物奈福泮和牛血清白蛋白 (BSA) 之间的相互作用,测定了奈福泮一对对映体和 BSA 之间的结合常数、结合位点数目以及结合位置,不仅拓宽了亲和毛细管整体柱在手性研究领域的应用,也为手性药物与蛋白的结合研究提供了一种新的思路。

## 1 材 料

### 1.1 药品与试剂

胃蛋白酶修饰的聚(甲基丙烯酸环氧丙酯-乙二醇二甲基丙烯酸酯) (GMA-EDMA) 毛细管整体

柱 (32 cm × 75  $\mu\text{m}$ , 有效长度 22 cm) (制备方法参考文献[2], 前期研究已经证实其具有较好的分析精密度及稳定性, 可用于后续的定量考察实验); 牛血清白蛋白 (BSA, 纯度大于 99.6%, 上海 Sigma 试剂有限公司); 醋酸铵、氨水、乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为分析纯(南京凌峰化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司); 奈福泮(湖北顶辉化工有限公司); 华法林, 布洛芬(纯度均为 98%, 南京生利德生物技术有限公司); 水为市售纯净水。

### 1.2 仪 器

HP<sup>3D</sup> CE 7100 毛细管电泳仪(美国 Agilent 科技公司); BT-25S 电子天平, PB-10 型 pH 计(德国 Sartorius 公司); THZ-C 培英恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂)。

## 2 方 法

### 2.1 溶液的配制

取醋酸铵 0.289 g 溶于水 250 mL 中配成 15 mmol/L 醋酸铵缓冲液, 并用稀醋酸或稀氨水调节 pH 至 5.5, 作为运行缓冲液。同法取醋酸铵 0.963 g 溶于水 250 mL 中配成 50 mmol/L 醋酸铵缓冲液, 并用稀氨水或稀醋酸调节 pH 至 7.4, 作为样品溶剂。

以 pH 7.4 的 50 mmol/L 醋酸铵缓冲液作为样品溶剂, 分别配制 1 000  $\mu\text{mol/L}$  奈福泮、华法林和布洛芬储备液, 600  $\mu\text{mol/L}$  BSA 储备液, 4 °C 储存。其中华法林和布洛芬先用约占溶液总体积 1% ~ 2% 的甲醇溶解, 再以缓冲液定容。

奈福泮储备液稀释至 100 ~ 200  $\mu\text{mol/L}$  制备工作曲线。取一定量奈福泮储备液分别与不同体积蛋白储备液混合制备结合参数考察溶液, 以相同溶剂稀释定容配制一系列相互作用溶液, 使得最后溶液中奈福泮浓度均为 200  $\mu\text{mol/L}$ , 蛋白浓度分别为 50, 150, 250, 350, 400, 450  $\mu\text{mol/L}$ 。混合溶液进样前需在 37.4 °C 恒温反应至少 0.5 h 并经 0.22  $\mu\text{m}$  无机滤膜过滤。

取一定量奈福泮储备液、蛋白储备液和结合位点标记物(华法林或布洛芬)储备液混合制备结合位点考察溶液, 以相同溶剂稀释定容, 配制奈福泮浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ 、位点标记物浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ 、蛋白浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$  的混合溶液作为竞争结合

溶液。混合溶液进样前需在 37.4 ℃ 恒温反应至少 0.5 h 并经 0.22 μm 有机滤膜过滤。

## 2.2 电泳条件

以胃蛋白酶键合的聚 GMA-EDMA 毛细管整体柱 (32 cm × 75 μm, , 有效长度 22 cm) 为色谱柱, 运行缓冲液为 pH 5.5 的 15 mmol/L 醋酸铵, 正向运行电压 5.0 kV, 柱温 25 ℃, 检测波长 215 nm, 电压进样 10 kV × 6 s。亲和整体柱每次运行之间使用运行缓冲液在 200 kPa 压力下冲柱, 冲至基线平稳即可运行使用。

## 2.3 标准曲线测定

进样 100 ~ 200 μmol/L 奈福泮药物溶液, 以各对映体色谱平台峰峰高对药物浓度做图, 求得标准曲线。

## 2.4 结合参数测定

分别进样 200 μmol/L 奈福泮消旋体与不同浓度 BSA 的结合平衡溶液, 将检测到的游离药物平台峰峰高代入标准曲线, 计算游离药物浓度。将游离药物浓度与对应的蛋白浓度进行非线性拟合, 计算奈福泮对映体与 BSA 的结合常数和结合位点数。

## 2.5 竞争结合考察

分别进样以华法林和布洛芬为结合位点标记物的竞争结合溶液, 考察加入结合位点标记物前后溶液中游离药物量的变化。

## 3 结果与讨论

### 3.1 前沿分析原理

在前沿分析方法中, 使用已经达到结合平衡的药物-蛋白混合溶液作为进样样品, 将较大的样本塞 (sample plug) 注入毛细管柱内, 因此样品区段内同时含有游离药物、游离蛋白以及药物-蛋白结合物。在电泳运行过程中, 由于药物与蛋白迁移速率的差异, 二者逐渐以组分区带分离, 结合物同时不断解离, 达到新的平衡。在这一过程中游离药物总量随之不断增大, 浓度不变, 蛋白亦同, 3 个组分的区带状态由叠加向分离转变, 若结合物在电泳运行过程中完全解离, 则得到蛋白和药物的两个平台峰, 每个组分平台峰的峰高均与其浓度呈线性关系<sup>[20]</sup>。

对于血清白蛋白而言, 若与药物存在两类结合位点, 这两个结合位点所对应的结合常数  $K_1$  (主要

结合位点) 和  $K_2$  (次级结合位点) 范围分别通常在  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  L/mol 和  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$  L/mol 内, 因此在生理环境下, 仅当结合平衡体系中的游离药物浓度达到  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 时, 次级结合位点与药物的结合才可发生, 而通常药物的治疗浓度仅为  $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$  mol/L, 因此在模拟生理条件下考察药物与蛋白的相互作用时, 次级结合位点的相互作用基本可以忽略<sup>[21]</sup>。对此, Martínez-Pla 等<sup>[21]</sup>提出了针对血清白蛋白与药物在模拟生理环境下的结合常数和结合位点数的计算方程:

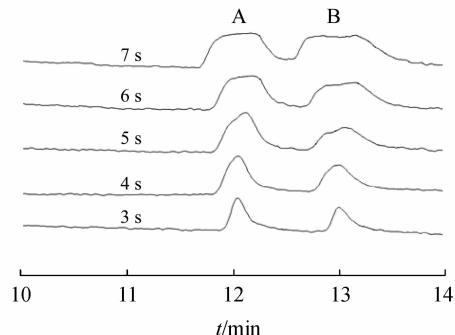
$$[D]_f = \frac{-(1 - K_1 c_D + n_1 K_1 c_P) + \sqrt{(1 - K_1 c_D + n_1 K_1 c_P)^2 + 4 K_1 c_D}}{2 K_1} \quad (1)$$

其中,  $[D]_f$ 、 $c_P$  以及  $c_D$  分别是游离药物、总蛋白以及总药物浓度,  $n_1$  和  $K_1$  分别是主要结合位点数目以及结合常数。将样品中蛋白浓度及对应测得的游离药物浓度带入方程中拟合, 即可算得结合参数  $n_1$  和  $K_1$ 。

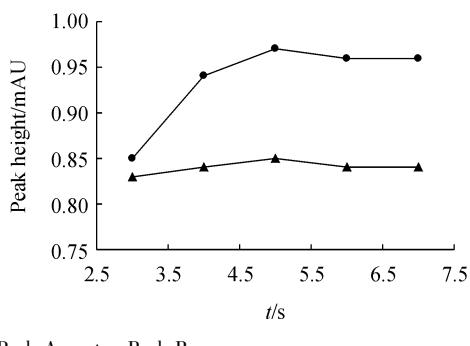
### 3.2 电色谱条件的优化

3.2.1 进样时间的优化 毛细管电泳中以前沿分析法测定药物与蛋白结合参数时, 要求结合平衡体系中的游离药物以平台峰洗脱, 也即在运行过程中柱内样品为过载状态, 因此进样量的大小直接影响平台峰的形成。若仅作为定量依据, 普通色谱峰峰面积或峰高都可用于浓度的计算, 因此严格意义上来说平台峰的形成并不是前沿分析法定量的必要条件, 但是在柱内完全饱和的状态下, 平台峰峰高可不受到迁移时间、电渗流大小、毛细管长度以及运行电压等的影响, 因而可获得更高的精密度以及更可靠的测定结果<sup>[21]</sup>。本研究考察了进样时间 (3 ~ 7 s) 对平台峰峰高及稳定性的影响, 结果如图 1 和图 2 所示, 在 3 ~ 7 s 的进样时间内, 较慢洗脱的对映体 (对映体 B) 峰高几乎不变, 而较快洗脱的对映体 (对映体 A) 在进样时间大于等于 5 s 之后峰高基本保持恒定, 但是两者均在进样时间达到 6 s 之后方能形成稳定的平台峰, 当进样时间达到 7 s 时可发现由于峰宽的增加, 两峰之间的分离度降低。虽然奈福泮消旋体中两个对映体的量是相等的, 但是通过峰高数据可以发现, A 峰峰高始终大于 B 峰, 这可能是因为洗脱时间较长的对映体 B 柱效较低, 峰展宽较严重, 因而峰高相对更低。综合考虑平台峰的稳定性和分离度, 实验中最后选择

的进样时间是 6 s。



**Figure 1** Electrophoretogram of nefopam (200  $\mu\text{mol/L}$ )-BSA (150  $\mu\text{mol/L}$ ) mixture solution with different injection times (3-7 s)  
Experimental conditions: separation voltage of 5.0 kV, 15 mmol/L ammonium acetate buffer at pH 5.5, temperature 25  $^{\circ}\text{C}$ , capillary monolith of 32 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$  (effective length 22 cm), injection voltage 10 kV, UV detection of 215 nm



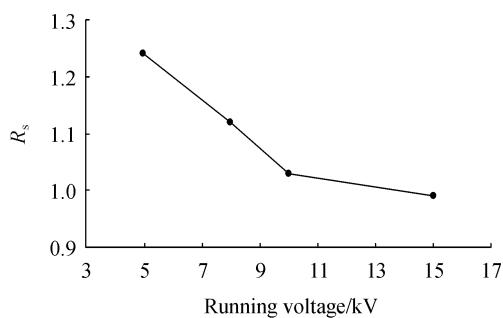
**Figure 2** Influence of injection time on the peak height of nefopam enantiomers  
Experimental conditions were the same to Figure 1

**3.2.2 样品溶剂的考察** 本研究分别考察了以磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液、Tris 缓冲液以及醋酸铵缓冲液作为结合反应发生的环境,也即样品溶剂时,对电色谱行为的影响。通常在毛细管电泳中,由于进样量较小,样品溶剂一般不会对电泳分离造成较大影响,但是在前沿分析模式下进样量较大,测定过程中会有大量溶剂随着样品进入毛细管柱内。实验中发现,仅当使用与运行缓冲盐同种类的醋酸铵缓冲液溶解进样样品时,方可得到理想的平台峰拆分结果,而磷酸盐作为结合反应体系时,奈福泮在 1 h 内未见洗脱,Tris 盐缓冲液作为结合反应体系时,对映体平台峰分离度降至 0.68,且灵敏度大大降低,600  $\mu\text{mol/L}$  奈福泮所得峰高与 200  $\mu\text{mol/L}$  奈福泮溶于醋酸缓冲液时所得峰高相同,不能满足分析要求。本实验中使用的是亲和有机整体柱,由于整体柱内的连续床层结构,相对于同

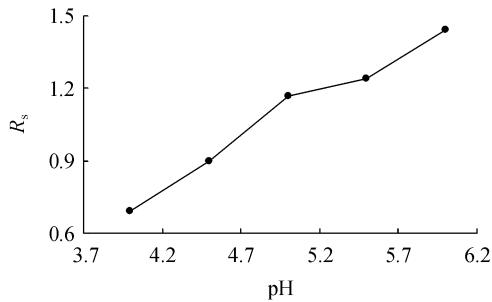
样规格的开管柱而言柱内能够容纳的运行缓冲液体积大大减小,样品溶剂若采用与运行缓冲液中不同种类的缓冲盐溶剂溶解,进样时使其大量进入柱内,可能会在很大程度上改变柱内运行缓冲液的组成,引起“电分散”<sup>[22]</sup> 现象。由于不同种类缓冲盐的引入,运行过程中毛细管内已不再是均匀的缓冲液,这可能会对亲和整体柱内键合的胃蛋白酶的构型及其活性产生影响,另外,运行缓冲液介电常数的改变也可能影响了电渗流大小以及奈福泮在柱内与手性固定相的相互作用,这一系列变化的结果都可能导致奈福泮对映体的洗脱时间和分离度发生改变。

**3.2.3 电压的优化** 粒子在缓冲液中的迁移速度及其电渗速率均与电压成正比,在较高的运行电压下,溶质的洗脱时间会减小,这也意味着在手性拆分过程中对映体与手性固定相发生相互作用的时间减少,从而导致分离度的降低,但同时也由于其出峰时间快,峰形往往更加尖锐,拖尾情况能得到更好的改善。在本实验中,平台峰之间的良好分离是保证在一次分析中同时获得两个对映体与蛋白相互作用信息的重要前提,因此本研究主要对不同电压下平台峰的分离度进行了考察。如图 3,随着电压的升高,奈福泮对映体之间的分离度逐渐降低。虽然在较低电压下会导致峰形拖尾以及柱效降低等后果,但是对于平台峰而言,这些问题并不会影响到平台峰稳定性及峰高的测定,也即对最后的定量分析不会产生误差,因此本研究最终选择的分离电压是 5 kV。

**3.2.4 缓冲液 pH 的优化** 缓冲液的 pH 不仅会对分析溶质的质子化程度和蛋白手性固定相的解离程度产生影响,还会影响电渗流的产生,是影响手性拆分的重要因素。手性选择剂胃蛋白酶是一种酸性蛋白,等电点约为 1.0,当所处环境呈中性或碱性时其构型和活性都会受到较大影响,因此本实验中对 pH 的考察范围定于 4.0 ~ 6.0 之间。当 pH 小于 4.0 时,奈福泮无明显的拆分迹象,随着 pH 的增加,胃蛋白酶的解离程度增加,净带电量增加,电渗流及其与分析物的相互作用程度增加,因此奈福泮对映体平台峰之间的分离度亦随着 pH 的增加而由 0.69 升至 1.44,如图 4。考虑到在后续实验中还要进样大量复杂样品,为了保持柱内胃蛋白酶的稳定性,最终确定使用的缓冲液 pH 为 5.5。



**Figure 3** Influence of running voltage on the resolution ( $R_s$ ) of nefopam enantiomers  
Experimental conditions: injection 10 kV  $\times$  6 s, other conditions were the same to Figure 1



**Figure 4** Influence of pH of running buffer on the resolution ( $R_s$ ) of nefopam enantiomers  
Experimental conditions were the same to Figure 3

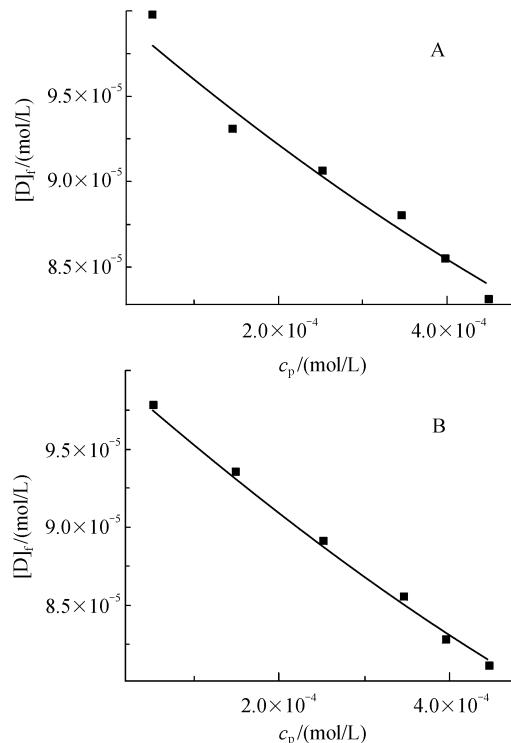
### 3.3 奈福泮对映体与 BSA 结合参数的计算

前沿分析中结合体系的组成有两种方案,一种是保持药物浓度接近其治疗浓度不变,添加系列浓度的蛋白,且蛋白浓度需增至体内蛋白浓度或接近体内蛋白浓度,另一种则是反之,保持蛋白浓度接近体内实际情况不变,添加系列浓度的药物。第二种方案中在每一份样品溶液中均使用较高浓度的蛋白,成本较高,而第一种方案在保证能够考察生理条件下蛋白结合的同时,大大减少了蛋白的消耗,成本更低,更适于高通量的药物筛选应用。

在亲和整体柱中奈福泮两个对映体在约 14 min 内洗脱,但是 BSA 在 50 min 内未见出峰,因此不会出现蛋白或结合物峰与游离药物峰重叠的情况。奈福泮在电泳条件下带正电荷,其电泳方向与电渗流方向一致,但是带有负电荷的 BSA 电泳方向则与电渗流方向相反,这可能是蛋白较晚出峰的原因。蛋白与药物迁移速率的较大差异使得样品中游离药物一进入整体柱便与蛋白快速分离,即使后续蛋白进入整体柱内并与手性固定相发生相互作用,也并不会影响游离药物对映体的分离及检测,

这些都保证了测定结果能够真实反映结合平衡体系中游离型药物的情况。

将奈福泮各对映体浓度及对应的峰高进行线性回归,得到良好的线性关系,对映体 A 和对映体 B 标准曲线相关系数均为 0.999。将含不同浓度蛋白的结合体系进样所得对映体游离药物峰峰高代入标准曲线算得其浓度,计算结果和对应的蛋白浓度代入式(1),通过 Origin 9.0 进行非线性拟合,如图 5,两对映体拟合所得相关系数分别是 0.982 和 0.998,计算得到对映体 A、B 与蛋白的结合常数分别为  $(443 \pm 21.2)$  L/mol 和  $(5.27 \pm 7.54)$  L/mol,结合位点数均为 1.0。



**Figure 5** Binding curves obtained by frontal analysis for nefopam enantiomers binding to BSA in 50 mmol/L, pH 7.4 ammonium acetate buffer at 37.4 °C  
A: Enantiomer corresponding to a shorter retention time in CE bind to BSA,  $r = 0.982$ ; B: Other enantiomer of a longer retention time bind to BSA,  $r = 0.998$ .

### 3.4 竞争结合考察

华法林与布洛芬分别与 BSA 上的 Sudlow site I 和 Sudlow site II 位点有着较强的结合能力,常作为结合位点标记物用于药物与 BSA 的结合位点考察。若将这些标记物加入药物与蛋白的结合溶液中,当药物与某一结合位点标记物对 BSA 的结合位于同一位点时,由于结合位点标记物对 BSA 的

竞争性结合,部分结合型的待测药物会被游离出来,结合体系中游离待测药物的浓度会增加。为了避免 BSA 上低亲和力结合位点的干扰,结合溶液中配体的总浓度(奈福泮+华法林,奈福泮+布洛芬)要低于蛋白浓度,以利于考察奈福泮与 BSA 的主要结合位点。分别测定奈福泮与 BSA 结合溶液中加入华法林或布洛芬前后游离奈福泮对映体的浓度,发现仅当加入布洛芬溶液时两对映体浓度分别增加 10.1% 和 12.0%,两对映体浓度的增加程度无太大差异,华法林对游离奈福泮浓度则无明显影响,说明奈福泮的一对对映体均与 BSA 上 Sudlow site II 位点结合。

#### 4 结 论

本研究利用胃蛋白酶修饰的聚合物整体柱作为手性分离通道,结合前沿分析对奈福泮两个对映体与 BSA 的结合常数、结合位点数以及结合位点进行了考察。胃蛋白酶修饰的亲和有机整体柱对奈福泮对映体表现了良好的分离能力,在前沿分析模式下得到了两个完全分离的对映体平台峰,游离型药物与 BSA 快速分离,仅游离药物洗脱,相比于之前添加环糊精作为手性选择剂的方法,避免了手性选择剂的大量消耗,无需特别采用在线毛细管电泳液相预柱技术即可避免蛋白对手性药物分离分析的影响,保证测定结果能够准确反映结合体系中的平衡状态。将亲和毛细管整体柱电色谱与前沿分析法结合,在未使用药物单一异构体的情况下测定了奈福泮一对对映体与 BSA 的相互作用信息,不仅拓展了亲和毛细管整体柱电色谱在手性研究领域的应用,也为手性药物的药代动力学研究提供了新的研究思路。

#### 参 考 文 献

- [1] Zheng Y, Wang X, Ji YB. Monoliths with proteins as chiral selectors for enantiomer separation [J]. *Talanta*, 2012, **91**: 7–17.
- [2] Chi CJ, Wang W, Ji YB. Preparation and evaluation of pepsin affinity organic polymer capillary monolithic column [J]. *Chin J Chromatogr( 色谱)*, 2014, **32**(8): 791–797.
- [3] Hong TT, Chi CJ, Ji YB. Pepsin-modified chiral monolithic column for affinity capillary electrochromatography [J]. *J Sep Sci*, 2014, **37**(22): 3377–3383.
- [4] Hong TT, Zheng Y, Hu WW, et al. Preparation and evaluation of bovine serum albumin immobilized chiral monolithic column for affinity capillary electrochromatography [J]. *Anal Biochem*, 2014, **464**: 43–50.
- [5] He J, Ji YB. Proteins as chiral selectors for enantiomer separation [J]. *Pharm Clin Res( 药学与临床研究)*, 2013, **21**(2): 166–171.
- [6] Girardot M, Li HY, Descroix S, et al. Determination of binding parameters between lysozyme and its aptamer by frontal analysis continuous microchip electrophoresis (FACMCE) [J]. *J Chromatogr A*, 2011, **1218**(26): 4052–4058.
- [7] Sisavath N, Leclercq L, Le Saux T, et al. Study of interactions between oppositely charged dendrigraft poly-L-lysine and human serum albumin by continuous frontal analysis capillary electrophoresis and fluorescence spectroscopy [J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1289**: 127–132.
- [8] Zhao LJ, Chen DY. Characterization of interactions between methoxatin disodium salt and human serum albumin by pressure-assisted capillary electrophoresis/frontal analysis and circular dichroism spectroscopy [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, **29**(1): 123–128.
- [9] Liu C, Kang JW. Improved capillary electrophoresis frontal analysis by dynamically coating the capillary with polyelectrolyte multilayers [J]. *J Chromatogr A*, 2012, **1238**: 146–151.
- [10] Busch MH, Carels LB, Boelens HF, et al. Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1997, **777**(2): 311–328.
- [11] Østergaard J, Schou C, Larsen C, et al. Evaluation of capillary electrophoresis-frontal analysis for the study of low molecular weight drug-human serum albumin interactions [J]. *Electrophoresis*, 2002, **23**(17): 2842–2853.
- [12] Tu FZ, Xiang XY, Dong Y, et al. Studies on the interaction for bovine serum albumin with benzoate by capillary zone electrophoresis frontal analysis [J]. *Chin J Anal Lab( 分析试验室)*, 2011, **30**(8): 73–76.
- [13] Jiang P, Wu LQ, Rena B, et al. Study of interaction of fluorescein sodium and bovine serum albumin by capillary electrophoresis/frontal analysis and molecular modeling technology [J]. *Chin J Anal Chem( 分析化学)*, 2011, **39**(5): 680–684.
- [14] Mohamed NA, Kuroda Y, Shibukawa A, et al. Enantioselective binding analysis of verapamil to plasma lipoproteins by capillary electrophoresis-frontal analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2000, **875**(1/2): 447–453.
- [15] Ohara T, Shibukawa A, Nakagawa T. Capillary electrophoresis/frontal analysis for microanalysis of enantioselective protein binding of a basic drug [J]. *Anal Chem*, 1995, **67**(19): 3520–3525.
- [16] Ding YS, Zhu XF, Lin BC. Study of interaction between drug enantiomers and serum albumin by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1999, **20**(9): 1890–1894.
- [17] Ishihama Y, Miwa T, Asakawa N. Drug-plasma protein binding assay by electrokinetic chromatography-frontal analysis [J]. *Electrophoresis*, 2002, **23**(6): 951–955.
- [18] Shiono H, Shibukawa A, Kuroda Y, et al. Effect of sialic acid res-

- ides of human alpha 1-acid glycoprotein on stereoselectivity in basic drug-protein binding [J]. *Chirality*, 1997, 9(3): 291-296.
- [19] Ding YS, Zhu XF, Lin BC. Albumin-drug binding study by capillary electrophoresis II. Determination of drug enantiomeric binding constants [J]. *Chin J Chromatogr (色譜)*, 1999, 17(2): 138-141.
- [20] Ding YS, Lin BC. Investigation of molecular association by capillary zone electrophoresis / frontal analysis [J]. *Chin J Anal Chem (分析化學)*, 1999, 27(1): 20-23.
- [21] Martínez-Pla JJ, Martínez-Gómez MA, Martín-Biosca Y, et al. High-throughput capillary electrophoresis frontal analysis method for the study of drug interactions with human serum albumin at near-physiological conditions [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(18/19): 3176-3185.
- [22] Liu Y, Liu YM, Xia ZN. Investigation of interaction of potassium ion to 18-crown-6 by capillary electrophoresis / frontal analysis [J]. *Chin J Anal Chem (分析化學)*, 2003, 31(12): 1500-1503.

### • 新 趋 势 •

## Evaluate Pharma 預測: 2016 年上市的十大潛力藥品(2)

### 5. 奥贝胆酸(Obeticholic Acid)

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种以胆管上皮细胞为靶细胞,以肝内胆汁淤积为特征的免疫介导的慢性炎症性疾病。该病以女性多见,发病率男女比例为1:8~1:10。熊去氧胆酸(UDCA)是目前唯一经美国FDA批准用于治疗PBC的药物。奥贝胆酸的临床优势在于可显著改善对UDCA治疗反应不佳的PBC患者的生化指标,减轻肝脏损伤,改善肝脏炎症及组织学改变,延缓PBC进程并改善预后。预计到2020年该药物的销售额将达到18亿美元。

### 6. Dupilumab

Dupilumab通过阻断2型辅助性T细胞(Th2)细胞因子白介素-4和白介素-13而发挥作用。临床试验证实,Dupilumab对特异性皮炎、湿疹,以及嗜酸性粒细胞水平增高的中重度持续哮喘有效。Dupilumab可快速且显著减轻特异性皮炎患者瘙痒症状,从而改善患者生活质量。Dupilumab的主要不良反应是鼻咽炎。预计到2020年该药物的销售额将达到17亿美元。

### 7. Disc Repair Project

Disc Repair Project是一种由Mesoblast公司研发的干细胞疗法,用以修复椎间盘病变。预计到2020年,该疗法的销售额将达到14亿美元。

### 8. Venetoclax

Venetoclax是一种B细胞淋巴瘤因子-2(BCL-2)抑制剂,Venetoclax有望用于治疗携带17p基因缺失的复发性或难治性慢性淋巴细胞白血病(CLL)。除CLL外,临床中本品单药及联合用药治疗的适应症还有非霍奇金淋巴瘤(NHL)、多发性骨髓瘤(MM)和急性髓性白血病(AML)。Venetoclax最常见的不良反应有腹泻、上呼吸道感染、恶心和中性白细胞减少症。预计到2020年该药物的销售额将达到12亿美元。

### 9. Selexipag

由爱可泰隆开发的口服环前列腺素受体激动剂Selexipag已于2015年11月22日获美国FDA批准,Selexipag有望于2016年1月上旬正式登录美国市场。与其它吸入型或注射型环前列腺素类药物相比,Selexipag给药方式更便捷,患者的依从性更高。值得一提的是,除Selexipag外,爱可泰隆还拥有包括伊洛前列素、波生坦和马西替坦在内的3个可用于治疗肺动脉高压的药物。毋庸置疑,爱可泰隆绝对是肺动脉高压药物治疗领域的先驱,从伊洛前列素到波生坦,再从波生坦到马西替坦和Selexipag,上述各药物的问世都展现出肺动脉高压治疗手段的进步。Selexipag的上市不仅为爱可泰隆因波生坦遭遇专利悬崖而引起的销售额下滑提供了有力保证,同时还为其巩固肺动脉高压药物市场坐上了头把交椅。预计到2020年该药物的销售额将达到11亿美元。

### 10. Elagolix

子宫内膜异位症(Ems)是育龄期女性较为常见的临床良性疾病,其发生率达10.0%,且呈明显之上升趋势。Ems以痛经、盆腔疼痛及不孕为主要特征,严重影响女性的生殖健康和生活质量。临床试验证实,与安慰剂相比,每天给药一次,给药剂量为150mg的Elagolix能明显降低绝经前妇女的子宫内膜异位症。Elagolix常见的不良反应是面部潮红、头痛、恶心和疲乏。预计到2020年该药物的销售额将达到9亿美元。

(新康界,本刊有删改)