

出國報告(出國類別：短期進修) ①

以二氦平(diazepam)為模式藥評估肝清除的預測模式②

③服務機關：國防醫學院

姓名職稱：王鴻展 中校教師

派赴國家：美國

出國期間：106年10月1日至107年3月31日

報告日期：107年4月12日

摘要

當藥物的器官清除(organ clearance)是以抽取率(extraction ration, ER)乘以進入器官的血流(blood flow, Q)進行計算時(Eq. 1)，吾人認定，此時藥物的清除率僅與藥物動力學中所提及的well-stirred model所預測的結果相吻合。

$$CL = Q \cdot ER = Q \cdot \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} \quad (\text{Eq. 1})$$

這是由定義上所獲得的根本道理，因為藥物在器官中清除的驅動力(driving force)就是由藥物進入器官的初始濃度(C_{in})所決定，而非藥物在進入器官後，代謝反應已然發生的濃度來決定(i.e., Rate Out = CL · C_{in})，因此由公式上可以得知，抽取率的定義是指藥物進出器官的濃度差除以藥物進入器官的初始濃度(Eq. 1)，當然，滿足這個定義的前提必須是：藥物在器官內的清除並不涉及其他額外的機制，所有的排除(elimination)都是由進入器官的藥物濃度所驅動。

在過去已提出的文獻中可知，描述藥物肝清除的模式，除了經由清除率的定義所獲得的well-stirred model以外，尚有藥物在器官內涉及擴散效應而衍生的parallel-tube及dispersion model，然而此兩種預測模式的基礎仍建立在清除率(Eq. 1)的定義上，也就是：藥物在器官內的清除並不涉及其他額外的機制，所有的排除都是由進入器官的藥物濃度所驅動，因此實驗觀察值必須符合以清除率為理論基礎所獲得的預測值(well-stirred model)，本次短期進修所進行的實驗，即是運用具有高度內生性清除(intrinsic clearance, CL_{int})性質的二氮平(diazepam)作為模式藥，以評估肝清除的預測模式。

目 次

摘 要.....	1
目 次.....	2
本 文.....	3
一、目的	3
二、過程.....	5
三、心得及建議	12

目 的

源起：

Dr. Benet 在藥學界是夙負盛名的科學家，在藥學領域的研究成果不勝枚舉，其中最為人熟知的包括：開發拉普拉斯轉換應用於多室模式計算的簡化程序及計算方法、藥物清除率的概念、生物藥劑學藥物分類系統(BDDCS)及近期有關轉運蛋白與代謝酵素間的交互作用等，均是對藥學發展影響甚鉅的創新研究。此外，Dr. Benet 曾經兩度以訪問教授身分蒞臨本校分享研究成果，因此與本校藥學系有相當良好的互動及友誼，基於此，本人選擇藉由短期進修的機會前往 Dr. Benet 位於 UCSF 實驗室，期許獲得更多研究經驗。

個人專長：

本人目前主要研究方向為鴉片類麻醉止痛劑的藥動學研究，包含其製藥開發、遞藥傳輸以及代謝研究，並運用串聯質譜及核磁共振技術，解析代謝產物的結構及含量，並進一步進行化合物活性分析。藥物代謝學是銜接藥物化學、生物藥劑學及藥物治療學之間的橋梁，同時也是評估療效及藥物副作用的有效工具，深入探討藥物代謝的機轉，並攫取國外新穎技術將有助於此項科學在臨床應用的發展及進步。

進修目的：

藥物代謝學是涵蓋理論科學並利用新穎技術及精密儀器，分析探討藥物在生物體內的代謝變化並予以驗證，因此可作為銜接藥物化學、生物藥劑學及藥物治療學之間的橋梁。本人欲透過短期進修的機會學習國外目前的新知與技術，並從學術交流活動中截

長補短以增強個人與學校的教學及研究能量。另一方面則可藉此機會讓國外學者了解國內的學術環境與研究方向，進一步透過合作的關係，維持雙方學術交流並提升國內學術風氣。此行第二目的則是參訪該校藥學教育的執行方法，尤以高階藥物動力學的教學模式為主，以作為爾後是類研究及教學的參考方向。

過 程

Dr. Benet 實驗室研究概況：

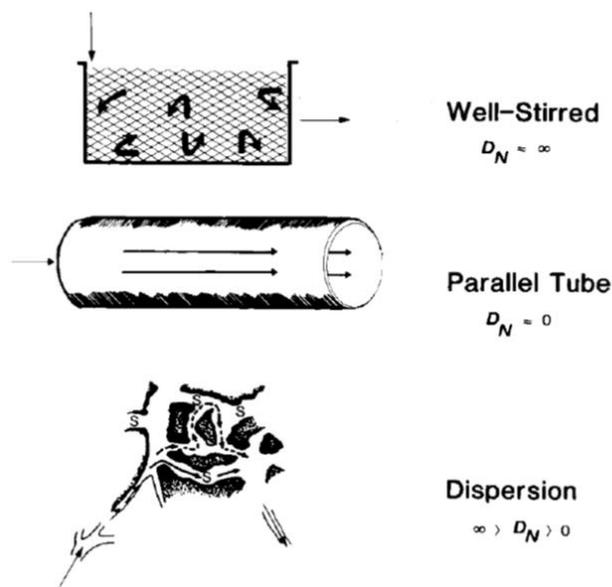
舊金山是開創性醫療科學突破的全球領導者。Dr. Benet 實驗室可進行電腦、體外和體內實驗以及人體試驗等研究，並大量參與轉化醫學，即 Bench to Bedside。Benet 實驗室隸屬於生物工程和治療科學系，是 UCSF 藥學院和 UCSF 醫學院的聯合部門，並與 UCSF 臨床與轉化科學研究所(CTSI)緊密合作，使之能在 UCSF 所進行的研究更順利。

Dr. Benet 實驗室著重於闡述目前理論所無法解釋的藥物動力學、藥效學反應以及藥物交互作用。其實驗室的研究涉及各種病患群體中，藥物的藥物動力學和藥效學關係的發展，重點是特定代謝酶和轉運蛋白之間的相關性，他的實驗室是第一個假設和證實稱為藥物轉運蛋白的蛋白質可以控制藥物進入這些代謝酶，導致轉運酶-代謝酶相互作用的概念。轉運蛋白現在是 UCSF 和其他地方的藥物遺傳學研究的重點，研究旨在確定藥物代謝中重要的個體差異。

除了代謝酶和轉運蛋白之間的相關性研究，肝清除一直是該實驗室持續進行的研究重點。給予適當劑量的處方藥對於確保安全性和有效性非常重要，準確計算藥物從身體中清除的速度是瞭解在特定時間，藥物於體內動態變化的關鍵，而 Dr. Benet 正是“清除率”這個概念的創建者和傳播者之一，並將之延伸應用於臨床治療，以作為計算給予病人多少處方藥物的依據。Benet 在 1973 年與同事 Malcolm Rowland 和 Gary Graham 闡述了基於清除率概念的第一個模型，截至目前仍廣為使用，這些模型與早期計算藥物劑量的方法不同，可用於解釋疾病期間或不同病患之間存在的生理差異，而 Dr. Benet

目前仍致力於代謝模型的驗證以正確闡述藥物清除的正確模式，並將此結果應用於藥物代謝的作用。本次短期進修及著眼於藥物於肝臟代謝的模式模擬，並嘗試以高內生性清除率藥物驗證肝清除的正確模型。

肝清除之評估模型：



(DMD 28: 807-813, 2000)

三種肝臟排除的評估模型(如上圖)已先後由 Rowland 等人所提出，由於考量藥物在進入肝臟後伴隨而來的擴散型態不同，因此由清除率定義所導入的 well-stirred model 衍生出另兩種 parallel-tube model 及 dispersion model，其相對應的公式如下所列，然而後兩種模型的基礎理論仍舊是根據清除率的生理模式($CL = Q \cdot ER$)所推演而得，因此建立 parallel-tube model 及 dispersion model 的根據就是等同於 well-stirred 的觀念，即藥物進入肝臟後立即均勻分布並瞬時完成代謝反應，在此推論及假設的前提下，藥物在肝臟的代謝理應接近 well-stirred model 的預測結果，而非後兩種考量擴散模式所衍生的預測模型。

Well-stirred model:

$$F = \frac{Q}{Q + fu_b CL_{int}} = \frac{1}{1 + R_N} \quad (\text{Eq. 2})$$

where $R_N = \frac{fu_b \cdot CL_{int}}{Q}$

Parallel-tube model:

$$F = e^{-\left(fu_b \frac{CL_{int}}{Q}\right)} = e^{-R_N} \quad (\text{Eq. 3})$$

Dispersion model:

$$F = \frac{4a}{(1+a)^2 \exp\left[\frac{a-1}{2D_N}\right] - (1-a)^2 \exp\left[\frac{-(a+1)}{2D_N}\right]} \quad (\text{Eq. 4})$$

where $a = \sqrt{1 + 4R_N D_N}$

實驗設計：

實驗設計以高內生性清除率藥物 diazepam 為模式藥，在各種 HSA 濃度下，以 IPRL 觀察實驗 F 值，針對三個模型中的每個測量方法計算 CL_{int} ，其中根據 Diaz-Garcia 等人(1992 年)在分散模型中 D_N 設定為 0.34。然後在每個模型中的各個 HSA 濃度所獲得的 CL_{int} 值進行平均，並且使用每個模型的平均 CL_{int} 來推論三個模型的理論 F，並對比相對應的未結合分率繪製理論曲線，再以觀察值驗證三種模式理論值的正確性。

實驗方法：

加利福尼亞大學舊金山分校 (UCSF) 批准使用管制藥品 diazepam 後，diazepam (DZP) 及其內標 diazepam-d5 分別從 Spectrum (Gardena, CA) 和 Cerilliant (Round Rock, TX) 獲得。IPRL 實驗中使用的緩衝試劑包括牛磺膽酸鹽，碳酸氫鈉和 Krebs-Ringer

粉末均購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。無脂肪酸的人血清白蛋白(HSA)由 SeraCare (Milford, MA) 商購。快速平衡透析 (RED) 裝置購自 Thermo Scientific (Rockford, IL)。用於分析的所有其他化學品和溶劑均為分析型或液相色譜-質譜 (LC-MS) 等級。

Diazepam 蛋白質結合：

使用 RED 裝置進行 DZP 的平衡透析實驗 (Waters 等人, 2008)。在含有 0%、0.025%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2% 和 4% 的不同 HSA 濃度 (W / V) 的 Kreb's 緩衝液中加入 $1 \mu\text{g/ml}$ DZP。將 $500 \mu\text{l}$ 體積的 DZP 測試溶液加入 RED 裝置的樣品室中，然後在相鄰室中加入 $750 \mu\text{l}$ 空白緩衝液。將裝載的樣品槽組裝在鐵氟隆材質的基座中，並且將基座用自粘蓋子密封，在振盪器 (Feasterville, PA) 37°C 下以每分鐘 20 次沖擊搖動，所需的實驗時間分別為 4、8、12 或 24 小時。

手術和肝臟灌注：

將雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (350-400g; Charles River Lab, Hollister, CA) 以 12 小時光照/黑暗週期飼養在 UCSF 動物護理設施中，並允許自由獲得水和食物。UCSF 動物研究委員會獲得了它們在實驗中使用的批准。手術前腹腔注射 1 ml/kg 劑量的氯胺酮/賽拉嗪 (91mg, 9.1 mg/ml) 進行麻醉。如先前所述，通過輕微修改 (Prueksaritanont 等, 1992; Wu 和 Benet, 2005)，將肝隔離以便非原位灌注。補充有不同濃度的 HSA (範圍從 0% 至 2%)，碳酸氫鈉 (15 mM) 和牛磺膽酸鈉 ($10 \mu\text{M}$) 的含氧 Krebs-Ringer 碳酸氫鹽緩衝液 (pH 7.4) 以流速通過插入門靜脈的導管以 15 ml/min 的速度進行。在 8 隻大鼠中，在 37°C 下以單程方式從含有 500ml 培養基的儲庫通過 $1 \mu\text{m}$ 孔徑玻璃纖維過

濾器，氧合器和置於肝前的氣泡捕集器進行灌注。在進入肝臟之前，灌注液在通過半透性管時被碳水化合物（95%O₂/5%CO₂）氧化。基於其外觀（均勻粉紅色至棕色），門靜脈壓力（8-10mmHg）和灌注液 pH（7.35-7.45）以及代謝能力判斷肝存活力。在 20 分鐘穩定期後，順序開始單次灌注，灌注液含有 1 μg/ml DZP 和不同的 HSA 濃度（0%，0.025%，0.05%，0.1%，0.5%和 2.0%）。灌注液濃度的順序隨機地遵循圖 1 所示的兩個序列之一。在每個大鼠灌注實驗期間，在 16,17,18,19 和 20 分鐘時從下腔靜脈(C_{out}) 採集 2ml 樣品。在每個灌注期結束時，獲得 2ml 流入樣品 (C_{in})。由於肝臟隔離後來自插管的膽管的膽汁流速波動，因此沒有嘗試對膽汁中的 DZP 進行定量。

樣品製備和分析：

樣品製備中採用簡單快速的蛋白質沉澱方法。每 200 μl 灌注液樣品與 40 μl 內標溶液（500ng / ml 的乙腈溶液）以及 560 μl 冷乙腈混合。然後將最終的樣品/內標/有機溶劑混合物短暫混合，然後以 13,000g 離心 10 分鐘。然後將 200 μl 上清液轉移到 HPLC 螺旋蓋小瓶中。初步研究表明沒有基質效應作為不同 HSA 濃度的函數，因此 DZP 的校準曲線在含有 2%HSA 的灌注液中在 1ng / ml 至 1000ng / ml 範圍內構建。使用與 Biosystems-Sciex API 4000 系列三重四極質譜儀（Foster City, CA）偶聯的 Shimadzu LC-20AD 高效液相色譜（Kyoto, Japan）分析 DZP 及其內標 DZP-d5。使用由溶劑 A（2mM 乙酸銨和 0.1%甲酸的水溶液）和溶劑 B（2mM 乙酸銨）組成的流動相在 Thermo BDS Hypersil C18 柱（4.6×100mm，5 μm）上進行色譜分離和 0.1%甲酸的甲醇溶液）在 3 分鐘分析時間和 0.7ml / min 流速的程序下進行。自動進樣器在 10°C 條件下進樣，進

樣體積設定為 $10\ \mu\text{l}$ 。採用正離子模式進行串聯質譜的採集，並選擇多重反應監測模式對分析物進行定量。分析物中產生離子躍遷的 DZP 及 DZP-d5 母離子分別是 $285.2\rightarrow 154.1$ 和 $285.2\rightarrow 193.0$ ，以及 $290.2\rightarrow 154.1$ (Marin et al., 2012)。離子源溫度保持在 550°C ，離子噴霧電壓為 5.0kV 。使用 Analyst 1.4.2 軟件 (Applied Biosystems-Sciex; Foster City, CA) 收集和處理數據。

參考文獻：

- Ahmad AB, Bennett PN, and Rowland M (1983) Models of hepatic drug clearance: discrimination between the 'well stirred' and 'parallel-tube' models. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 35:219-224.
- Diaz-Garcia JM, Evans AM, and Rowland M (1992) Application of the axial dispersion model of hepatic drug elimination to the kinetics of diazepam in the isolated perfused rat liver. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 20:171-193.
- Jones DB, Morgan DJ, Mihaly GW, Webster LK, and Smallwood RA (1984) Discrimination between the venous equilibrium and sinusoidal models of hepatic drug elimination in the isolated perfused rat liver by perturbation of propranolol protein binding. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 229:522-526.
- Marin SJ, Roberts M, Wood M, and McMillin GA (2012) Sensitive UPLC-MS-MS assay for 21 benzodiazepine drugs and metabolites, zolpidem and zopiclone in serum or plasma. *Journal of analytical toxicology* 36:472-476.
- Pang KS and Rowland M (1977) Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 5:625-653.
- Prueksaritanont T, Koike M, Hoener BA, and Benet LZ (1992) Transport and metabolism of cyclosporine in isolated rat hepatocytes. The effects of lipids. *Biochemical pharmacology* 43:1997-2006.
- Rowland M, Leitch D, Fleming G, and Smith B (1984) Protein binding and hepatic clearance: discrimination between models of hepatic clearance with diazepam, a drug of high intrinsic clearance, in the isolated perfused rat liver preparation. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 12:129-147.
- Waters NJ, Jones R, Williams G, and Sohal B (2008) Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *Journal of pharmaceutical sciences*

97:4586-4595.

Wu CY and Benet LZ (2005) Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical research* 22:11-23.

與 Dr. Benet 合照



心得及建議事項

心得：加州大學舊金山分校(UCSF)位於加州第二大城，舊金山，其教學醫院同時也是舊金山首屈一指的醫學中心，該校標榜頂尖醫學研究及人文關懷，在此次短期進修的半年期間，有幸得以近窺該校在基礎及臨床研究的卓越成績，有別於國內藥學教育的規劃及建置，UCSF 的研究所僅建置博士學程，由於該校藥學院評比為全美排名前十頂尖藥學院，因此學生多半具有相當高的素質及研究能力，並能藉由良好且便利的教育及研究資源，包含：圖書館資料檢索能力、充沛及多樣化的貴重儀器中心、實驗消耗品專責單位以及豐沛研究預算，而將各個實驗室的研發能力發揮到頂點。然而，該校繁瑣的行政程序及多重的管理分層卻是影響工作效率的一大缺點，在死板及高度分工後所出現的「怠速」情形，則是最令人無法苟同的現象。

在教學方面，最令人印象深刻的則是該校藥學教育的教學品質，由於質精且前端的研究發展，因此課程的設計高度結合各實驗室的研究領域及成果，並非侷限於教科書的教條式表述，因此可讓授課學生有更深入的體會，並能將課堂中的學習成果應用於實際研究課題。

在生活上的體驗則是：此處生活開銷極高，平日膳食必須自行烹飪及料理。舊金山是人文薈萃的都市，也是個不折不扣的多元文化大熔爐，當地華人比例高居 40%，進修期間適逢農曆新年，配合當地華人節慶，在舊金山唐人街可感受到濃厚年節氣息，然而因華人及大陸地區學生眾多，因此日常生活中多半仍以華語溝通，錯失了語文學習的強度及機會。

建議事項：

- 一、 舊金山生活開銷太過高昂，建議重新審定各城市物價水平以作為生活費核給依據。
- 二、 個人有感短期進修過程中，最難掌控是住宿需求搭配合理房屋租金，建議可蒐整各進修地點租房資訊，以供後續國內學者參考運用。