

• 论著 •

五种抗结核新药在小鼠体内的药代动力学/ 药效学初步研究

朱慧 付雷 张炜焱 王彬 陈曦 陆宇

【摘要】 目的 在 BALB/c 小鼠结核病模型中,研究普托马尼(pretomanid, PA-824)、德拉马尼(delamanid, Dlm)、氯法齐明(clofazimine, Cfz)、贝达喹啉(bedaquiline, Bdq)、PBTZ-169 共 5 种抗结核药物在不同给药剂量下的药代动力学/药效学(pharmacokinetic/pharmacodynamics, PK/PD)。**方法** BALB/c 小鼠经气溶胶感染结核分枝杆菌标准株 H37Rv, 5 种药物分为高中低 3 个剂量组灌胃给药。在给药 4 周和 8 周时,解剖小鼠,取脾、肺脏进行菌落单位(colony forming unit, CFU)计数以评价药物疗效,同时在 4 倍测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的含药培养板上,挑取单菌落并测定 MIC 值。在各给药组给予最后一个剂量 3 h 后,通过眼眶采血,用液相色谱-质谱法测定血浆药物浓度。**结果** 以各药物引起小鼠肺部 CFU 计数下降且与对照组差异有统计学意义为标准,得到最低有效剂量分别为 PA-824 30 mg/kg, Dlm 5 mg/kg, Cfz 5 mg/kg, Bdq 6.25 mg/kg, PBTZ-169 20 mg/kg。自最低有效剂量起,各药物均使得小鼠肺 CFU 计数下降,其中 Bdq 与 PA-824 高剂量组小鼠肺 CFU 计数分别下降 2.99 和 2.66 $\log_{10}$ 值。5 种药物给药 8 周时,在最低有效剂量下的血药浓度(C_{3h})分别为 PA-824 (7.60 ± 1.28) $\mu\text{g/ml}$, Dlm (0.20 ± 0.05) $\mu\text{g/ml}$, Cfz (0.26 ± 0.02) $\mu\text{g/ml}$, Bdq (0.22 ± 0.07) $\mu\text{g/ml}$, PBTZ-169 (74.56 ± 17.80) ng/ml。各药物高剂量时, $C_{\max}/\text{MIC}$ 大于特定数值,即 PA-824 100 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 147$; Dlm 10 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 100$; Cfz 20 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 2$; Bdq 25 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 13.6$; PBTZ-169 20 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 150$, 不易产生药物耐受性/表型抗性。**结论** 5 种抗结核药物在有效剂量下,血药浓度随药物剂量增加而上升,CFU 计数与给药剂量呈负相关, $C_{\max}/\text{MIC}$ 是与疗效呈良好相关性的 PK/PD 参数,可为这些药物的临床使用提供指导。

【关键词】 结核; 药代动力学; 抗药性; 研究

Preliminary study on pharmacokinetics/pharmacodynamics of five new anti-tuberculosis drugs in mice ZHU Hui, FU Lei, ZHANG Wei-yan, WANG Bin, CHEN Xi, LU Yu. Department of Pharmacology, Beijing Key Laboratory of Drug Resistance Tuberculosis Research, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China
Corresponding author: LU Yu, Email: luyu4876@hotmail.com

【Abstract】 Objective To evaluate the pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) of five anti-tuberculosis drugs including pretomanid (PA-824), delamanid (Dlm), clofazimine (Cfz), bedaquiline (Bdq) and PBTZ-169 in BALB/c mice tuberculosis model at different doses. **Methods** BALB/c mice were infected with *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) by aerosol. Five drugs were divided into high, middle and low dose groups. After 4 and 8 weeks of treatment, the mice were dissected and the colony forming unit (CFU) of spleens and lungs were counted. At the same time, the lungs and spleens homogenate were inoculated on the plate containing 4× minimum inhibitory concentration (MIC) to observe the colony growth. Three hours after the last dose was given to each group, the orbital blood was collected and the drug concentration were determined by HPLC-MS/MS. **Results** The lowest effective dose of each drug was PA-824 30 mg/kg, Dlm 5 mg/kg, Cfz 5 mg/kg, Bdq 6.25 mg/kg, PBTZ-169 20 mg/kg, which obtained according to the significant difference of lung CFU count between treatment and control



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2021.10.015

基金项目:“十三五”国家科技重大专项(2019ZX09721001-007-

003);北京市医院管理中心临床医学发展专项(ZYLX202123)

作者单位:101149 首都医科大学附属北京胸科医院/北京市结核病胸部肿瘤研究所药理学研究室/耐药结核病研究北京市重点实验室

通信作者:陆宇, Email: luyu4876@hotmail.com

groups. From the lowest effective dose, the CFU counts in the lungs of mice were decreased in all treatment groups. At the high-dose of Bdq and PA-824, the CFU counts in the lungs of mice decreased by 2.99 and 2.66 $\log_{10}$ values respectively. At 8 weeks, the plasma concentrations (C_{3h}) of each drug at the lowest effective dose were PA-824 (7.60 ± 1.28) $\mu\text{g/ml}$, Dlm (0.20 ± 0.05) $\mu\text{g/ml}$, Cfz (0.26 ± 0.02) $\mu\text{g/ml}$, Bdq (0.22 ± 0.07) $\mu\text{g/ml}$, PBTZ-169 (74.56 ± 17.80) ng/ml , respectively. At high dose, when $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ was higher than the specific value (PA-824 100 mg/kg , $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 147$; Dlm 10 mg/kg , $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 100$; Cfz 20 mg/kg , $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 2$; Bdq 25 mg/kg , $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 13.6$; PBTZ-169 20 mg/kg , $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 150$), drug tolerance/phenotypic resistance was not easy to occur. **Conclusion** At the effective dose of the five anti-tuberculosis drugs, the plasma concentration increased with the increase of the dosage, but the CFU count was negatively correlated with the dosage. Our study showed that $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ was a good PK/PD parameter correlation with treatment effect, which could provide guidance for the clinical use of these drugs.

【Key words】 Tuberculosis; Pharmacokinetics; Drug resistance; Interdisciplinary studies

药物是治疗结核病的主要手段。近年来,抗结核新药的研发取得了一定的成果,二芳基喹啉类化合物贝达喹啉(bedaquiline, Bdq)和硝基咪唑类化合物德拉马尼(delamanid, Dlm)是近 50 年来抗结核新药研发成果的代表,被多个国家批准用于治疗耐多药结核病(MDR-TB)^[1-3]。药代动力学/药效学(pharmacokinetic/pharmacodynamics, PK/PD)研究在这些新药的研发和应用过程中不可或缺,在优化药物治疗、预防结核分枝杆菌耐药性的产生等诸多方面均有重要作用^[4]。感染动物 PK/PD 的实验可用于研究抗菌药物的不同给药方案进入感染动物体内的 PK 特点、抑菌或杀菌效果(包括细菌菌落计数降低或动物存活率/死亡率)及治疗时间的长短,据此获得动物 PK/PD 指数及靶值,与临床研究结果有较好的一致性,可用于临床疗效的预测。

本研究选择近年来有代表性的 5 种抗结核药物,对其 PK/PD 进行了初步研究。按照 WHO 对 MDR-TB 推荐治疗药物的分类, Bdq、氯法齐明(clofazimine, Cfz)和 Dlm 分属于 A、B、C 类药物^[5]。硝基咪唑类化合物普托马尼(pretomanid, PA-824)于 2019 年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准与 Bdq 和利奈唑胺联合使用治疗广泛耐药结核病(XDR-TB),以及对其他疗法不耐受或无响应的 MDR-TB。苯并噻嗪酮类化合物 PBTZ-169 尚处于临床试验阶段^[6-7]。本研究对感染了结核分枝杆菌的 BALB/c 小鼠给予不同剂量的上述 5 种抗结核药物,观察它们在小鼠体内不同时间的治疗效果,同时测定血浆药物浓度、含药培养板上生长菌株的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentra-

tion, MIC), 分析不同给药剂量下血浆药物浓度与治疗效果, $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ 与耐药的关系, 为临床抗结核药物的使用提供更多的理论依据。

材料和方法

一、材料

1. 药物及试剂: Bdq(瀚香生物科技有限公司; 批号 20190329); PA-824(瀚香生物科技有限公司; 批号 20190528); Cfz(瀚香生物科技有限公司; 批号 20190328); PBTZ-169(中国医学科学院医药生物技术研究所); Dlm(上海陶术生物科技有限公司; 批号 T4202); 甲醇(赛默飞世尔科技公司; 色谱纯, 批号 086535); 甲酸(北京迪科马科技有限公司; 色谱纯, 批号 7297697); 水为去离子水。

2. 动物: 无特定病原体(SPF)级雌性 BALB/c 小鼠 170 只, 体质量 16~18 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司(小鼠批号 20200414; 合格证号 1100112011016474)。饲养在为感染动物设计的有空调的房间, 每笼 5 只小鼠, 温度(21 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\% \pm 15\%$, 保持 12 h 灯光/12 h 黑暗的循环, 动物可以方便地获取食物和过滤的水。实验开始前使动物适应环境一周。小鼠实验由北京胸科医院动物伦理委员会审批后进行(编号 2020-003)。

3. 菌株: 结核分枝杆菌标准株 H37Rv(ATCC 27294)为本研究室保存菌株。

4. 其他设备: 美国 Agilent 公司 1200 型高效液相色谱系统, 配备电喷雾(ESI)离子源的 G6410B 型三重串联四极杆质谱仪, 其他设备还包括 Milli Q 纯水机、Mettler Toledo XS 105 十万分之一分析天平。

二、研究方法

(一)小鼠感染结核分枝杆菌标准株模型的建立

按照气溶胶感染装置(099C A4224 Inhalation Exposure System)的标准操作规程以结核分枝杆菌标准株 H37Rv 感染小鼠,感染剂量为 5×10^6 CFU/ml。170 只小鼠感染后,随机抓取分笼,5 只/笼。感染 14 d 后处死 5 只小鼠,以菌落形成单位(CFU)计数基线值;感染后第 28 天开始治疗,治疗当天处死 5 只小鼠进行 CFU 计数。治疗分为 4 周和 8 周治疗组。

(二)给药及处理

感染后 14 d、28 d 分别处死 5 只小鼠,做肺、脾组织活菌计数。感染第 28 天开始给予药物治疗,药物均用 0.5%羧甲基纤维素钠制成混悬液,4 ℃ 保存,给药前药物经温水浴,口服灌胃给药,给药量 0.2 ml/只,1 次/d,每周给药 5 次(表 1)。对照组小鼠不给予治疗,灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠 0.2 ml/只。给药后的 4 周和 8 周,在最后一次给药 3 h 后,于小鼠眼眶采血,由高效液相色谱质谱法测量药物在血浆中的浓度。之后,分别处死各组小鼠,在无菌操作下解剖,使用 Bdq 和 Cfz 治疗的小鼠组活菌计数使用含 0.4%活性炭的 7H10 培养基。

(三)含药培养基的制备及接种

在 7H10 培养基中加入 $4 \times \text{MIC}$ 浓度的药物溶液,终浓度为 Dlm 0.02 $\mu\text{g/ml}$, PA-824 0.25 $\mu\text{g/ml}$, PBTZ-169 2 ng/ml, Bdq 0.2 $\mu\text{g/ml}$, Cfz 1 $\mu\text{g/ml}$ 。在 4 周和 8 周解剖小鼠后,各给药组小鼠的肺、脾匀浆液原液(3 ml/脏器)取 0.1 ml 接种于含 4 倍 MIC 浓度药物的培养板上,在 37 ℃ 5%CO₂ 培养箱内培养 4 周后观察结果。

(四)高效液相色谱质谱检测中对照品溶液的配制

精密称取 5 种药物,溶于甲醇中配制成 2 mg/ml 储备液,−80 ℃ 冰箱保存,使用时稀释至所需浓度。

(五)液相色谱质谱检测血药浓度

1. 样品处理方法及质控样制备:小鼠空白血浆室温解冻后,精密量取 45 μl ,加入已知浓度的各药物 5 μl ,再加入乙腈溶液 100 μl 沉淀蛋白,旋涡振荡混匀后,4 ℃,11 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清液置于

表 1 五种药物实验分组

组别	剂量 (mg/kg)	4 周小鼠 数量(只)	8 周小鼠 数量(只)	小鼠数量 合计(只)
对照组		5	5	10
PA-824				
L 组	10	5	5	10
M 组	30	5	5	10
H 组	100	5	5	10
Dlm				
L 组	2.5	5	5	10
M 组	5	5	5	10
H 组	10	5	5	10
Cfz				
L 组	5	5	5	10
M 组	10	5	5	10
H 组	20	5	5	10
Bdq				
L 组	6.25	5	5	10
M 组	12.5	5	5	10
H 组	25	5	5	10
PBTZ-169				
L 组	5	5	5	10
M 组	10	5	5	10
H 组	20	5	5	10
合计		80	80	160

注 PA-824: 普托马尼; Dlm: 德拉马尼; Cfz: 氯法齐明; Bdq: 贝达喹啉; 感染后 14 d 和 28 d 分别处死 5 只小鼠作为基线对照; L、M、H 分别表示低、中、高剂量组

进样瓶中,进样检测。

2. 色谱条件: 分析柱为 Agilent ZORBAX SB-C18(直径 $\times$ 长度为 2.1 mm $\times$ 100 mm, 填料粒径 3.5 μm); 流动相: 水(含 0.1% 甲酸, 5 mmol/L 甲酸胺)、甲醇、乙腈; 各药物流动相比比例: Bdq(水: 甲醇=15: 85), Dlm(水: 甲醇=25: 75), Cfz(水: 乙腈=20: 80), PBTZ-169(水: 甲醇=20: 80), PA-824(水: 甲醇=25: 75); 流速: 0.3 ml/min, 进样量为 2 μl 。

3. 质谱条件: 离子化方式: ESI; 离子极性: 正离子; 检测方式: 多反应监测, 母离子和子离子 m/z 分别为 555. 2/58. 2 (Bdq)、535. 2/352. 0 (Dlm)、473. 1/431. 0 (Cfz)、457. 2/344. 1 (PBTZ-169)、360. 2/175. 1 (PA-824); 毛细管电喷雾电压: 4 kV, 去溶剂气体温度: 350 ℃, 去溶剂气体流速:

10 L/min。

(六)结核分枝杆菌 MIC 值测定

从有菌落生长的含药培养板中挑取单菌落后研磨,加入 7H9 液体培养基中培养至对数生长期,再进行 MIC 测定(每株菌测定最少 2 次)。MIC 测定采用 Alamar Blue 法,具体方法参见文献[8]。

三、统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行统计分析。本研究计量资料均呈正态分布,方差齐,以“ $\bar{x} \pm s$ ”描述,采用 t 检验进行比较;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、小鼠给药 4 周和 8 周时体质量变化情况

170 只小鼠分为对照组及 5 个给药组,小鼠体质量变化情况见表 2。经统计分析,4 周时各给药组小鼠体质量与对照组比较,差异均无统计学意义

(P 值均 > 0.05),8 周时 Dlm-M、Bdq-M、PBTZ-169-M、PBTZ-169-H 组体质量与对照组比较,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05)。

二、药物剂量与血药浓度

在给药 4 周和 8 周时,各组药物在小鼠血浆中的浓度测定结果见表 3。5 种药物在多剂量给药后,测得的血药浓度均高于其对 H37Rv 标准株的 MIC 值。Cfz 在 10 mg/kg 剂量时血药浓度达到稳值,此后不随剂量增加而继续增长;Bdq、PBTZ-169、PA-824 的血药浓度随给药剂量递增,其中 PBTZ-169 和 PA-824 的血药浓度增长并不完全随剂量的比例而等比例增加;Dlm 在 5 mg/kg 和 2.5 mg/kg 剂量时血药浓度相当,10 mg/kg 时血药浓度约为低、中剂量组的 2 倍。

三、CFU 计数结果(药效学指标)

在给药 8 周后,各给药组小鼠脾、肺脏器匀浆液计数结果见表 4 和图 1。比较各给药组与对照组

表 2 各组小鼠给药 4 周和 8 周时体质量变化情况

组别	剂量(mg/kg)	4 周($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值	8 周($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
对照组		21.44 $\pm$ 1.07			21.86 $\pm$ 0.85		
PA-824							
L 组	10	20.87 $\pm$ 0.98	-0.883	0.403	22.56 $\pm$ 1.05	1.169	0.276
M 组	30	21.97 $\pm$ 0.57	0.972	0.359	23.04 $\pm$ 0.81	2.261	0.054
H 组	100	22.49 $\pm$ 0.71	1.829	0.105	22.35 $\pm$ 1.01	0.838	0.426
Dlm							
L 组	2.5	21.56 $\pm$ 0.37	0.241	0.816	22.56 $\pm$ 0.85	1.306	0.228
M 组	5	21.63 $\pm$ 1.33	0.244	0.814	23.30 $\pm$ 1.06	2.389	0.044
H 组	10	21.39 $\pm$ 1.05	-0.078	0.940	21.51 $\pm$ 1.03	-0.577	0.580
Cfz							
L 组	5	22.01 $\pm$ 1.04	0.846	0.422	23.20 $\pm$ 1.20	2.047	0.075
M 组	10	21.08 $\pm$ 1.82	-0.385	0.710	22.41 $\pm$ 1.18	0.854	0.418
H 组	20	20.76 $\pm$ 0.79	-1.152	0.283	22.82 $\pm$ 0.67	1.988	0.082
Bdq							
L 组	6.25	22.14 $\pm$ 1.12	1.016	0.339	22.10 $\pm$ 0.48	0.556	0.593
M 组	12.5	21.68 $\pm$ 0.66	0.417	0.688	23.52 $\pm$ 0.35	4.064	0.004
H 组	25	21.32 $\pm$ 1.05	-0.188	0.855	22.78 $\pm$ 0.66	1.923	0.091
PBTZ-169							
L 组	5	21.30 $\pm$ 0.48	-0.275	0.790	22.45 $\pm$ 0.88	1.095	0.305
M 组	10	21.37 $\pm$ 0.38	-0.138	0.894	23.66 $\pm$ 0.69	3.690	0.006
H 组	20	20.84 $\pm$ 0.75	-1.032	0.332	23.45 $\pm$ 0.41	3.798	0.005

注 各给药组小鼠体质量均与相应时间对照组小鼠体质量进行比较;L、M、H 分别表示低、中、高剂量组;PA-824:普托马尼;Dlm:德拉马尼;Cfz:氯法齐明;Bdq:贝达喌啉

表 3 各组小鼠给药 4 周和 8 周时药物在血浆中的浓度

组别	剂量(mg/kg)	4 周时浓度($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)	8 周时浓度($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)	参考 MIC ^a ($\mu\text{g/ml}$)
PA-824				0.07
L 组	10	3.75 $\pm$ 0.92	2.84 $\pm$ 0.61	
M 组	30	9.05 $\pm$ 1.70	7.60 $\pm$ 1.28	
H 组	100	17.95 $\pm$ 2.87	14.68 $\pm$ 1.02	
Dlm				0.004
L 组	2.5	0.02 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.06	
M 组	5	0.24 $\pm$ 0.12	0.20 $\pm$ 0.05	
H 组	10	0.43 $\pm$ 0.17	0.40 $\pm$ 0.07	
Cfz				0.24
L 组	5	0.22 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.02	
M 组	10	0.23 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.05	
H 组	20	0.36 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.07	
Bdq				0.022~0.05
L 组	6.25	0.31 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.07	
M 组	12.5	0.32 $\pm$ 0.14	0.42 $\pm$ 0.07	
H 组	25	0.68 $\pm$ 0.25	0.68 $\pm$ 0.26	
PBTZ-169				0.4~0.5 ^b
L 组	5	7.25 $\pm$ 1.69 ^b	6.91 $\pm$ 1.52 ^b	
M 组	10	18.70 $\pm$ 6.69 ^b	21.23 $\pm$ 4.45 ^b	
H 组	20	51.54 $\pm$ 20.35 ^b	74.56 $\pm$ 17.80 ^b	

注 ^a: 参考 MIC 为 H37Rv 标准株测得的值; ^b: 单位为 ng/ml; L、M、H 分别表示低、中、高剂量组; PA-824: 普托马尼; Dlm: 德拉马尼; Cfz: 氯法齐明; Bdq: 贝达喌啉

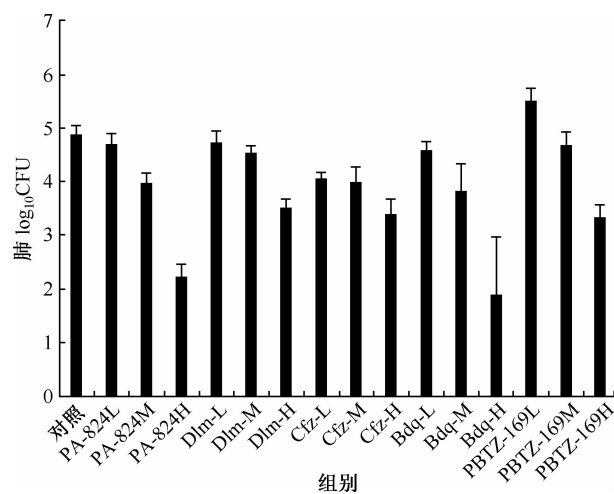
表 4 各组小鼠给药 8 周后菌落形成单位计数结果

组别	剂量(mg/kg)	肺(log ₁₀ CFU, $\bar{x} \pm s$)	<i>t</i> 值 ^a	<i>P</i> 值 ^a	脾(log ₁₀ CFU, $\bar{x} \pm s$)	<i>t</i> 值 ^a	<i>P</i> 值 ^a
对照组							
治疗前 14 d		4.70 $\pm$ 0.11			1.48 $\pm$ 0.00		
治疗当天		5.21 $\pm$ 0.08			3.60 $\pm$ 0.18		
治疗 8 周		4.90 $\pm$ 0.16			3.08 $\pm$ 0.44		
PA-824							
L 组	10	4.72 $\pm$ 0.19	-1.542	0.162	4/5 为 0, 1 只为 2.08	-5.775	<0.001
M 组	30	4.00 $\pm$ 0.17	-8.654	<0.001	0	-15.475	<0.001
H 组	100	2.24 $\pm$ 0.22	-21.951	<0.001	0	-15.475	<0.001
Dlm							
L 组	2.5	4.75 $\pm$ 0.20	-1.255	0.245	4/5 为 0, 1 只为 2.08	-5.775	<0.001
M 组	5	4.55 $\pm$ 0.14	-3.627	0.007	4/5 为 0, 1 只为 1.48	-7.803	<0.001
H 组	10	3.54 $\pm$ 0.16	-13.574	<0.001	0	-15.475	<0.001
Cfz							
L 组	5	4.07 $\pm$ 0.12	-9.405	<0.001	2.47 $\pm$ 0.19	-2.799	0.023
M 组	10	4.02 $\pm$ 0.27	-6.231	<0.001	2.40 $\pm$ 0.80	-1.657	0.136
H 组	20	3.41 $\pm$ 0.28	-10.397	<0.001	2.06 $\pm$ 0.23	-4.538	0.002

续表 4

组别	剂量(mg/kg)	肺(log ₁₀ CFU, $\bar{x} \pm s$)	<i>t</i> 值 ^a	<i>P</i> 值 ^a	脾(log ₁₀ CFU, $\bar{x} \pm s$)	<i>t</i> 值 ^a	<i>P</i> 值 ^a
Bdq							
L 组	6.25	4.61 ± 0.15	-2.918	0.019	2.90 ± 0.33	-0.731	0.485
M 组	12.5	3.85 ± 0.51	-4.405	0.008	4/5 为 0, 1 只为 2.38	-5.045	0.001
H 组	25	1.91 ± 1.08	-6.109	<0.001	0	-15.475	<0.001
PBTZ-169							
L 组	5	5.54 ± 0.22	5.306	0.001	3.16 ± 0.17	0.381	0.713
M 组	10	4.71 ± 0.23	-1.505	0.171	0	-15.475	<0.001
H 组	20	3.36 ± 0.21	-12.999	<0.001	4/5 为 0, 1 只为 1.48	-7.803	<0.001

注^a:各给药组 log₁₀CFU 值与对照组 8 周数据进行比较;L、M、H 分别表示低、中、高剂量组;PA-824:普托马尼;Dlm:德拉马尼;Cfz:氯法齐明;Bdq:贝达喹啉



注 Bdq:贝达喹啉;Dlm:德拉马尼;Cfz:氯法齐明;PA-824:普托马尼;L、M、H 分别表示低、中、高剂量组

图 1 给药 8 周时各给药组小鼠肺脏 log₁₀CFU

CFU 计数结果,PA-824 与 Dlm 在 3 个剂量下,脾脏菌落培养均为阴性,肺脏菌落计数随着给药剂量的增加而下降,PA-824 高剂量组下降 2.66 log₁₀ 值(低剂量组 $P > 0.05$,中、高剂量组 $P < 0.01$);Cfz 组 3 个剂量下,脾、肺脏 CFU 计数与对照组差异均有统计学意义,低剂量组与中剂量组间差异无统计学意义;Bdq 组肺脏菌落计数随着给药剂量的增加而下降,高剂量组下降 2.99 log₁₀ 值(低剂量组 $P < 0.05$,高剂量组 $P < 0.001$);PBTZ-169 在低剂量组与对照组之间差异无统计学意义,中剂量组脾脏菌落培养阴性,高剂量组肺脏菌落计数下降 1.54 log₁₀ 值($P < 0.001$)。以肺 CFU 计数与对照组差异有统计学意义为判断标准,各药物最低有效剂量分别为 PA-824 30 mg/kg,Dlm 5 mg/kg,Cfz 5 mg/kg,Bdq

6.25 mg/kg,PBTZ-169 20 mg/kg。在有效剂量下,Bdq 显示出明显的杀菌活性,其次是 PA-824。

四、含药培养基中单菌落 MIC 值的测定

对给药 8 周的 BALB/c 小鼠肺、脾匀浆液接种后 CFU,包括在含药/不含药培养板上的 CFU 结果进行总结,具体见表 5~9。给药 8 周后,PA-824、Dlm 及 PBTZ-169 组小鼠肺脾 CFU 计数极少,为排除药物残留引起的抗生素后效应,对此三组药物,再次制备含 0.4%活性炭的固体 7H10 培养板,第 2 次接种肺、脾匀浆液,对含药培养板上生长的菌落进行 MIC 测定。

与 H37Rv 标准株相比,Bdq 组 4 周时中、高剂量组有菌落 MIC 值约为其 2 倍,8 周时 Bdq 高剂量组有 1 株菌 MIC 值约为其 10 倍,低、中剂量组有菌落 MIC 值约为其 2 倍;Cfz 组 4 周时低剂量组有菌落 MIC 值约为其 2~5 倍,8 周时高剂量组有 3 株菌 MIC 值约为其 5~6 倍,低、中剂量组 MIC 值约为其 2 倍;PA-824 组 4 周时低剂量组有菌落 MIC 值约为其 2 倍,8 周时低剂量组有 1 株菌 MIC 值约为其 4 倍;8 周时 PBTZ-169 低剂量组有 1 株菌 MIC 值约为其 10 倍;Dlm 低、中、高剂量组 MIC 值约为其 2 倍。

五、C_{max}/MIC 与肺菌落计数及耐药

给药 8 周时对 C_{max}/MIC 与小鼠肺 log₁₀CFU 进行相关性分析,图 2 中可以看到二者呈负相关, R^2 值均在 0.9 以上,相关性较好。5 种药物给药后的小鼠肺、脾脏器匀浆液均在含药培养板上发现有菌落生长,大部分菌落 MIC 值与标准株 H37Rv —

表 5 给药普托马尼 8 周 BALB/c 小鼠肺、脾匀浆液接种后菌落数

培养板 脏器	L 组 (10 mg/kg)		M 组 (30 mg/kg)		H 组 (100 mg/kg)	
	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板
不含活性炭培养板						
肺脏	+++	1 只为 1 CFU	74~171 CFU	未生长	3~10 CFU	未生长
脾脏	4 只未生长, 1 只为 4 CFU	未生长	未生长	未生长	未生长	未生长
活性炭含药培养板						
肺脏	—	100~300 CFU	—	44~150 CFU	—	0~73 CFU
脾脏	—	4 只未生长, 1 只为 4 CFU	—	未生长	—	未生长

注 每组 5 只小鼠, 3 ml/脏器匀浆液, 接种 0.1 ml; 含药培养板是含有 4×MIC 浓度药物的培养板; +++ 表示菌落数大于 300 个/视野。第一次实验采用不含活性炭的含药培养板时, CFU 计数几乎均未生长, 为排除抗生素后效应, 采用含活性炭的含药培养板重复一次实验; “—”表示未进行该项研究; L、M、H 分别表示低、中、高剂量组

表 6 给药德拉马尼后 8 周 BALB/c 小鼠肺、脾匀浆液接种后菌落数

培养板 脏器	L 组 (2.5 mg/kg)		M 组 (5 mg/kg)		H 组 (10 mg/kg)	
	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板
不含活性炭培养板						
肺脏	+++	未生长	+++	未生长	85~210 CFU	未生长
脾脏	4 只未生长, 1 只为 4 CFU	未生长	4 只未生长, 1 只为 1 CFU	未生长	未生长	未生长
活性炭含药培养板						
肺脏	—	1~200 CFU	—	3~150 CFU	—	1~16 CFU
脾脏	—	4 只未生长, 1 只为 1 CFU	—	4 只未生长, 1 只为 1 CFU	—	未生长

注 每组 5 只小鼠, 3 ml/脏器匀浆液, 接种 0.1 ml; 含药培养板是含有 4×MIC 浓度药物的培养板; +++ 表示菌落数大于 300 个/视野。第一次实验采用不含活性炭的含药培养板时, CFU 计数几乎均未生长, 为排除抗生素后效应, 采用含活性炭的含药培养板重复一次实验; “—”表示未进行该项研究; L、M、H 分别表示低、中、高剂量组

表 7 给药 PBTZ-169 后 8 周 BALB/c 小鼠肺、脾匀浆液接种后菌落数

培养板 脏器	L 组 (5 mg/kg)		M 组 (10 mg/kg)		H 组 (20 mg/kg)	
	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板
不含活性炭培养板						
肺脏	+++	未生长	+++	未生长	34~125 CFU	未生长
脾脏	27~69 CFU	未生长	未生长	未生长	4 只未生长, 1 只为 1 CFU	未生长
活性炭含药培养板						
肺脏	—	35~120 CFU	—	160~200 CFU	—	+++
脾脏	—	4 只未生长, 1 只为 1 CFU	—	3 只未生长, 2 只为 1 CFU	—	7~100 CFU

注 每组 5 只小鼠, 3 ml/脏器匀浆液, 接种 0.1 ml; 含药培养板是含有 4×MIC 浓度药物的培养板; +++ 表示菌落数大于 300 个/视野。第一次实验采用不含活性炭的含药培养板时, CFU 计数几乎均未生长, 为排除抗生素后效应, 采用含活性炭的含药培养板重复一次实验; “—”表示未进行该项研究; L、M、H 分别表示低、中、高剂量组

表 8 给药氯法齐明后 8 周 BALB/c 小鼠肺、脾匀浆液接种活性炭含药培养板后菌落数

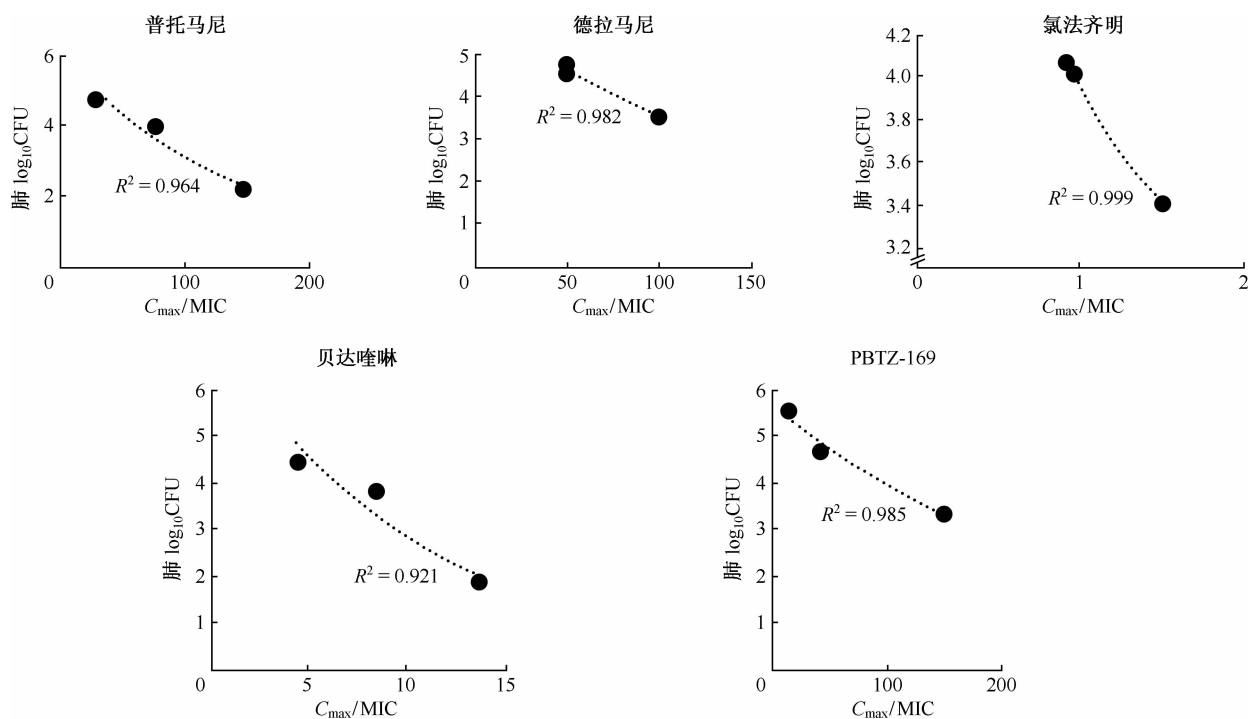
脏器	L 组 (5 mg/kg)		M 组 (10 mg/kg)		H 组 (20 mg/kg)	
	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板
肺脏	++	++	++	++	55~82 CFU	43~48 CFU
脾脏	5~15 CFU	2~18 CFU	1~60 CFU	3~49 CFU	3~10 CFU	1~11 CFU

注 每组 5 只小鼠, 3 ml/脏器匀浆液, 接种 0.1 ml; 含药培养板是含有 $4 \times \text{MIC}$ 浓度药物的培养板; ++ 表示菌落数大于 200 个/视野; “—” 表示未进行该项研究; L、M、H 分别表示低、中、高剂量组

表 9 给药贝达喹啉后 8 周 BALB/c 小鼠肺、脾匀浆液接种活性炭含药培养板后菌落数

脏器	L 组 (6.25 mg/kg)		M 组 (12.5 mg/kg)		H 组 (25 mg/kg)	
	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板	不含药培养板	含药培养板
肺脏	+++	++	53~171 CFU	++	0~17 CFU	4~10 CFU
脾脏	14~93 CFU	9~34 CFU	4 只未生长, 1 只 8 CFU	0~13 CFU	未生长	未生长

注 每组 5 只小鼠, 3 ml/脏器匀浆液, 接种 0.1 ml; 含药培养板是含有 $4 \times \text{MIC}$ 浓度药物的培养板; ++ 表示菌落数大于 200 个/视野, +++ 表示菌落数大于 300 个/视野; L、M、H 分别表示低、中、高剂量组

图 2 给药 8 周时 $C_{\max}/\text{MIC}$ 与小鼠肺 $\log_{10}\text{CFU}$ 关系图

致,少数菌株 MIC 值有所增高,这些 MIC 值增高的菌株对药物表现出耐受性/表型抗性。以 $C_{\max}/\text{MIC}$ 的数值来分析,在本实验中,PA-824 100 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 147$; Dlm 10 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 100$; Cfz 20 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 2$; Bdq 25 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 13.6$; PBTZ-169 20 mg/kg 时, $C_{\max}/\text{MIC} > 150$, 则不易产生药物耐受性/表型抗性。

讨 论

近 10 年来,抗结核新药的研发取得了明显进展,PK/PD 研究在其中的重要性也进一步凸显^[9-10]。笔者对近些年上市和处于临床研究阶段的 5 种抗结核药物的 PK/PD 进行了初步研究。5 种药物剂量设定,参考已报道的多项小鼠实验中最低有效剂量^[11-15],分为高中低剂量组,除 PA-824 外,

高、中、低剂量组给药量依次倍比递减,以小鼠肺脾 CFU 计数评估疗效。

CFU 计数结果显示,除 Cfz 外,其余药物组的脾组织治疗效果均优于肺组织,可能与实验采用了气溶胶感染,小鼠肺部荷菌量高于脾脏有关。早期有其他研究提到,Dlm 以 2.5 mg/kg 的剂量给药 4 周,可使尾静脉感染 *M. tuberculosis* Kurono 菌株的美国癌症研究所(ICR)小鼠肺组织荷菌数下降 4.1 log₁₀ 值^[11],PA-824 以 100 mg/kg 剂量连续给药 8 周,可使气溶胶感染 H37Rv 菌株的 BALB/c 小鼠肺组织荷菌数下降 4 log₁₀ 值^[12],本实验未观察到如此明显的下降,推测与不同小鼠品系、不同感染方式,以及开始治疗时肺组织荷菌量不同(文献[11]和[12]中初始肺脏荷菌量均高于 7 log₁₀ CFU)有关。

结合 C_{max} 分析 CFU 结果可以看到,各组从最低有效剂量起,随给药剂量增加,血药浓度增加,肺 CFU 计数下降增加,即在本实验最低有效剂量和最高剂量范围区间,药物疗效与剂量和血药浓度呈正相关。C_{max}/MIC、AUC/MIC、血药浓度高于 MIC 的时间(%T_{MIC})是主要的 PK/PD 参数,我们观察到 C_{max}/MIC 与小鼠肺 log₁₀ CFU 具有明显的相关性。有报道显示,AUC_{0~24}/MIC 是与 Dlm 治疗效果相关的 PK 参数,C_{max}、AUC_{0~24} 与给药剂量呈正比^[9]。在本实验中,Dlm 2.5 mg/kg 组与 5 mg/kg 组 C_{max} 相近,CFU 计数差异无统计学意义,随着剂量增加至 10 mg/kg,C_{max} 增长近 2 倍,高剂量组治疗效果优于中剂量组。PA-824 相关的 PK/PD 参数为游离血药浓度高于 MIC 的持续时间(ft) > MIC^[16],本实验中高剂量组 CFU 计数下降比中剂量组更明显,因为高剂量组血药浓度高于中剂量组,在消除速率相同的前提下,ft > MIC 的时间更长。Swanson 等^[14]报道 Cfz 在 6.25、12.5、25 mg/kg 时,血浆与组织浓度随剂量增加,2 周后对结核感染小鼠有剂量依赖性的杀菌活性,本实验中 Cfz 20 mg/kg 组血药浓度高于中剂量和低剂量组,治疗效果更好。Bdq 尚无明确的与疗效相关的 PK/PD 参数报道,但有研究表明,Bdq 的暴露量与疗效相关^[17],与本实验中观察到 C_{max} 与疗效的正相关一致。而 PBTZ-169 在人体内,有报道单次和多次给

药后,在 640 mg 剂量范围内 PK 呈线性关系^[18],本实验中 PBTZ-169 疗效高剂量组优于中剂量组。

本研究还对含药培养基上分离的菌落进行了 MIC 值的测定。结果可以看到,在低剂量时,含药培养基上菌落数更多,MIC 升高,高剂量时含药培养基上菌落数减少,但是能分离到 MIC 值更高的菌株,笔者认为这与高剂量药物大量杀死小鼠体内敏感菌,使得存活的结核分枝杆菌更耐受药物有关。Ismail 等^[19]报道 Bdq 在 0.24 μg/ml 时,敏感株突变率为 5 × 10⁻⁸,0.12 μg/ml 时,敏感株突变率为 5 × 10⁻⁷,即外部药物压力较低时,突变率更高,与本实验中低剂量组含药培养基上菌落数更多的现象一致。结合 C_{max}/MIC 参数,在结核病治疗过程中,若结核分枝杆菌 MIC 增高,就需要增加给药剂量以获得更高的 C_{max},从而保证治疗效果。

本研究存在不足之处:(1)小鼠的 PK 仅测定了 3 h 血浆药物浓度用于估算 C_{max},并不一定是真实的 C_{max};(2)没有测定结核感染小鼠靶器官——肺脏的药物浓度;(3)测定 MIC 时,仅挑选了培养板上的部分菌落,不一定能代表全部生长菌落的 MIC 值范围;(4)仅考察了 C_{max}/MIC 参数,未进行其他 PK/PD 参数的研究。这些不足需要在后续实验中进一步研究。

综上,本文对 5 种抗结核药物在小鼠体内 PK/PD 进行初步探讨,发现 C_{max}/MIC 作为主要 PK/PD 参数之一,与疗效有较好的相关性。C_{max}/MIC 大于临界值时,结核分枝杆菌不易产生药物耐受性/表型抗性。根据每种药物的 PK/PD 特性,在临床用药过程中对治疗药物进行监测,获得相应的 PK 参数,结合 PD 可以判断药物是否达到有效暴露量,并及时调整给药剂量、给药间隔等,从而优化抗结核药物的使用。

参 考 文 献

- [1] 韦媛媛,杨帆,汤杰,等. 抗结核药物的研究进展. 中国药科大学学报, 2020, 51(2): 231-239. doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200215.
- [2] Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, et al. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Appl Microbiol, 2020, 128 (6):1547-1567. doi:10.1111/jam.14478.
- [3] Tiberi S, du Plessis N, Walzl G, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. Lancet Infect Dis, 2018,

- 18(7): e183-198. doi:10.1016/S1473-3099(18)30110-5.
- [4] 赵皎洁, 陆宇. 抗结核药物药代动力学/药效学的研究及进展. 中国防痨杂志, 2019, 41 (6): 700-704. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.06.020.
- [5] World Health Organization. WHO consolidated guidelines for drug-resistant tuberculosis treatment (2020 update). Geneva: World Health Organization, 2020.
- [6] Working Group on New TB Drugs. 2021 Global New TB Drug Pipeline[EB/OL]. [2021-03-30]. <http://www.newtndrugs.org/pipeline/discovery>.
- [7] 时翠林, 牛广豪, 王霞芳, 等. 耐药结核病治疗药物研究进展. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43 (1): 58-63. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2020.01.013.
- [8] 陈曦, 刘忠泉, 王彬, 等. 14 种抗结核药物在巨噬细胞内的抗结核活性评价. 中国防痨杂志, 2019, 41(9): 993-998. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.09.014.
- [9] Mallikaarjun S, Chapagain ML, Sasaki T, et al. Cumulative Fraction of Response for Once- and Twice-Daily Delamanid in Patients with Pulmonary Multidrug-Resistant Tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 65(1): e01207-20. doi:10.1128/AAC.01207-20.
- [10] Alghamdi WA, Al-Shaer MH, Kipiani M, et al. Pharmacokinetics of bedaquiline, delamanid and clofazimine in patients with multidrug-resistant tuberculosis. J Antimicrob Chemother, 2021, 76(4): 1019-1024. doi:10.1093/jac/dkaa550.
- [11] Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, et al. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazo[4,5-c]pyridine derivative with promising action against tuberculosis *in vitro* and in mice. PLoS Med, 2006, 3(11): e466. doi:10.1371/journal.pmed.0030466.
- [12] Tyagi S, Nuermberger E, Yoshimatsu T, et al. Bactericidal activity of the nitroimidazopyran PA-824 in a murine model of tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (6): 2289-2293. doi:10.1128/AAC.49.6.2289-2293.2005.
- [13] Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 2005, 307 (5707): 223-227. doi:10.1126/science.1106753.
- [14] Swanson RV, Adamson J, Moodley C, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clofazimine in a mouse model of tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59 (6): 3042-3051. doi:10.1128/AAC.00260-15.
- [15] Makarov V, Lechartier B, Zhang M, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. EMBO Mol Med, 2014, 6 (3): 372-383. doi:10.1002/emmm.201303575.
- [16] Lakshminarayana SB, Boshoff HI, Cherian J, et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics analysis of bicyclic 4-nitroimidazole analogs in a murine model of tuberculosis. PLoS One, 2014, 9(8): e105222. doi:10.1371/journal.pone.0105222.
- [17] Svensson EM, Karlsson MO. Modelling of mycobacterial load reveals bedaquiline's exposure-response relationship in patients with drug-resistant TB. J Antimicrob Chemother, 2017, 72 (12): 3398-3405. doi:10.1093/jac/dkx317.
- [18] Mariandyshev AO, Khokhlov AL, Smerdin SV, et al. The main results of clinical trials of the efficacy, safety and pharmacokinetics of the perspective anti-tuberculosis drug makozinone (PBTZ169). Ter Arkh, 2020, 92(3): 61-72. doi:10.26442/00403660.2020.03.000621.
- [19] Ismail N, Omar SV, Ismail NA, et al. Collated data of mutation frequencies and associated genetic variants of bedaquiline, clofazimine and linezolid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Data Brief, 2018, 20: 1975-1983. doi:10.1016/j.dib.2018.09.057.

(收稿日期:2021-04-22)

(本文编辑:郭萌)