

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.008

舒洛地特注射液非临床安全性评价

张娟, 冷佳蔚, 李水仙, 赵岩, 祝清芬[△]

(山东省食品药品检验研究院·仿制药研究与评价重点实验室, 山东 济南 250101)

摘要:目的 评价舒洛地特注射液的安全性。方法 采用血管刺激性试验、肌肉刺激性试验、溶血性试验观察舒洛地特注射液对家兔试验部位及溶血的影响,采用主动全身过敏性试验和被动皮肤过敏性试验观察舒洛地特注射液对豚鼠过敏反应的影响。结果 舒洛地特注射液未见血管刺激性反应,给药结束 24 h 后家兔肌肉刺激性反应与上市药物对照一致,均为轻度刺激,14 d 恢复期结束后均未出现刺激性反应及溶血和红细胞凝聚现象;豚鼠过敏性试验结果为阴性。结论 试验动物注射舒洛地特注射液后未发生刺激性反应、溶血性反应及过敏反应。

关键词:舒洛地特注射液;安全性评价;刺激性试验;溶血性试验;过敏反应;非临床安全性

中图分类号:R965.3;R973+.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0028-04

Non - Clinical Safety Evaluation of Sulodexide Injection

ZHANG Juan, LENG Jiawei, LI Shuixian, ZHAO Yan, ZHU Qingfen

(Shandong Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Jinan, Shandong, China 250101)

Abstract: Objective To evaluate the safety of Sulodexide Injection. Methods The blood vessel stimulation test, muscle stimulation test and hemolytic test were used to observe the effect of Sulodexide Injection on the experimental site and hemolysis in rabbits. Active systemic anaphylaxis and passive cutaneous anaphylaxis were used to observe the effect of Sulodexide Injection on allergic reaction in guinea pigs. Results Sulodexide Injection had no vascular stimulation reaction. The muscle stimulation reaction of rabbits after the last administration for 24 h was consistent with that of the marketed drug control, which was mild stimulation, and no stimulation reaction, hemolysis or erythrocyte aggregation occurred after 14 d of the recovery period. The result of the allergy test in guinea pigs was negative. Conclusion The experimental animals have no stimulation response, haemolytic and allergic reaction after injection of Sulodexide Injection.

Key words: Sulodexide Injection; safety evaluation; stimulation test; hemolytic test; allergic reaction; non - clinical safety

舒洛地特作为治疗糖尿病肾病的新药受到越来越多的关注^[1]。舒洛地特是从猪肠黏膜提取精制的高度纯化的天然糖胺聚糖,是由重复的二糖结构单元组成的带有负电荷的长链大分子,二糖单元包含 2 个改构糖,即 N-乙酰半乳糖胺或 N-乙酰葡萄糖胺及糖醛酸^[2-3],具有抗凝、溶栓、抗炎免疫、调血脂和保护肾脏的作用。本研究中参照原国家食品药品监督管理(总)局《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》和《药物非临床研究质量管理规范》,对舒洛地特注射液进行了非临床安全性试验。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器

BSA4000S 型电子天平(精度为 ± 0.01 g)、BP211D 型电子天平(精度为 ± 0.01 mg),均购自德国 Sartorius 公司;TC10KA 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂,分辨率为 2 g);3-18K 型台式冷冻离心机(美国 Sigma 公司);PURA22 型水浴锅(优莱博技术 <北京>有限公司);ASP200s 型全自动全封闭脱水机、EG1150 H & C 型包埋机、RM2245 型半自动轮转式切片机、HI1210 型摊片机、HI1220 型烘片机、XL 型全自动染色机、CV5030 型

全自动封片机,均购自德国 Leica 公司;BX51 型生物显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 试药

舒洛地特注射液 1(供试品,国内某公司,批号为 1704290,规格为每支 2 mL:600 LSU);舒洛地特注射液 2(上市药物对照,意大利 Alfa Wassermann 公司,批号为 14606,规格为每支 2 mL:600 LSU);戊巴比妥钠(西亚试剂,批号为 05636);氯化钠注射液(山东齐都药业有限公司,批号为 1E17081803);卵清蛋白(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号为 SLBB5992V);伊文思蓝(上海化学试剂采购供应站分装厂,Fluka 公司进口分装,批号为 82-11-02);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 动物

普通级新西兰家兔 31 只,体质量 2.0~3.0 kg,雌性 15 只,雄性 16 只,购自济南西岭角养殖繁育中心[动物生产许可证号为 SCXK(鲁)2015 0001];普通级 Hartley 豚鼠 60 只,体质量 300~400 g,雌雄各半,购自济南金丰实验动物有限公司[动物生产许可证号为 SCXK(鲁)2014 0006];均饲养于山东省食品药品检验研究院普通环境动物实验室[动物使用许可证号为 SYXK(鲁)2013 0012]。

第一作者:张娟,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品检验及药理毒理评价,(电子信箱)zhangjuan1357@163.com。

[△]通信作者:祝清芬,男,博士研究生,主任药师,研究方向为药品检验及药理毒理评价,(电子信箱)zhuqingfen73@163.com。

试验方案实施前获动物伦理委员会批准。标准条件饲养,温度 20~26.0℃,相对湿度 40%~70%,日温差≤3℃,照明 12h(明暗交替),每小时换气次数不少于 10 次。兔维持饲料、豚鼠生长繁殖饲料均购自北京科澳协力饲料有限公司[饲料生产许可证号为京饲证(2014)06054,实验动物(饲料)生产许可证号为 SCXK(京)2014-0010]。

1.4 方法^[4-7]

1.4.1 剂量设计及依据

剂量及使用方法:按制剂说明书执行,每日 1 支,肌肉注射或静脉滴注,连用 15~20 d。

血管刺激性试验和肌肉刺激性试验:采用与临床制剂相同的浓度给药,即每日最大给药量以 60 kg 成人体质量计算为 10 LSU/kg,临床使用最大浓度为 300 LSU/mL,人用最大剂量为 0.03 mL/kg;人与家兔标准体质量等效剂量系数为 3.08,家兔给药剂量设定为 0.2 mL/kg。

溶血性试验、主动全身过敏试验和被动皮肤过敏试验:选用临床使用最高浓度原液,作为供试品溶液。

1.4.2 试验方法

血管刺激性试验:取家兔 15 只,雌性 7 只、雄性 8 只,按体质量随机分为供试品组、上市药物对照组和阴性对照组,各 5 只。供试品组和上市药物对照组家兔左侧耳缘静脉注射舒洛地特注射液 0.2 mL/kg(原液浓度为 300 LSU/mL),阴性对照组家兔相同部位注射等体积 0.9% 氯化钠注射液;每日 1 次,连续给药 7 d,给药前称定体质量。末次给药 72 h 时各组分别处死 3 只家兔,14 d 恢复期结束后各组分别处死 2 只家兔。分别于注射部位近心端距离给药部位约 1 cm 处剪取耳缘静脉组织 1.0~4.0 cm,分 1.0~2.5 cm 和 2.5~4.0 cm 二段取材,观察有无红肿、淤血等肉眼可见的明显刺激性表现;10% 甲醛溶液固定,常规组织切片,并进行显微镜检查。

肌肉刺激性试验:取家兔 15 只,雌性 7 只、雄性 8 只,按 1.4.2 项下血管刺激性试验中分组方法分为 3 组。供试品组和上市药物对照组家兔右侧股四头肌分别注射舒洛地特注射液 0.2 mL/kg,阴性对照组家兔相同部位注射等体积 0.9% 氯化钠注射液;每日 1 次,连续给药 7 d,给药前称定体质量。末次给药后 48 h 各组分别处死 3 只家兔,14 d 恢复期结束后各组分别处死 2 只家兔。解剖取出股四头肌,纵向切开,观察注射部位有无充血、红肿等刺激性症状。10% 甲醛溶液固定,常规组织切片,并进行显微镜检查。

溶血性试验:于家兔心脏采血约 10.0 mL,置装有玻璃珠的三角瓶中,不停沿同一方向振摇 10 min,去除纤维蛋白原后将其移入离心管中。加入 0.9% 氯化钠注射液混匀,1 500 r/min 离心 15 min,取下层红细胞,用 0.9% 氯化钠注射液按上述方法洗涤 3 次,至上清液无

色透明为止。最后将所得红细胞按体积用 0.9% 氯化钠注射液制备成 2% 红细胞悬液。取 12 支试管并进行编号,其中 1~5 号管为供试品管,6 号管为阴性对照管,7 号管为阳性对照管,8~12 号管为上市药物对照管。分别加入 2% 红细胞悬液、0.9% 氯化钠注射液、纯化水、供试品和上市药物对照(见表 1),混匀,于(37±0.5)℃ 水浴锅中温育,1 h 内每隔 15 min 观察 1 次,1 h 后每隔 1 h 观察 1 次,连续观察 3 h。肉眼观察各管溶血与红细胞凝聚情况,必要时进行显微镜检查。

主动全身过敏试验:取健康豚鼠 24 只,按体质量随机分为阴性对照组、阳性对照组、供试品组和上市药物对照组,各 6 只,雌雄各半。各组豚鼠分别腹腔注射 0.5 mL 0.9% 氯化钠注射液、0.4% 卵清蛋白溶液、舒洛地特注射液原液、上市药物对照原液进行致敏,隔日 1 次,共致敏 3 次。末次致敏后第 14 天和第 21 天,以 2 倍致敏量于豚鼠后肢小隐静脉注射相应药液(1.0 mL)进行激发。激发即刻至激发后 30 min,连续观察 3 h。观察豚鼠反应及其反应出现、消失时间,并按全身致敏性评价标准^[8](见表 1)评判过敏反应。

表 1 全身致敏性评价标准

Tab. 1 Evaluation criteria of systemic sensitization

症状	分级	反应强度
0. 正常	-	阴性
1. 不安宁;2. 竖毛;3. 发抖;4. 搔鼻	+	弱阳性
5. 喷嚏;6. 咳嗽;7. 呼吸急促;8. 排尿;9. 排粪;10. 流泪	++	阳性
11. 呼吸困难;12. 哮喘音;13. 紫癜;14. 步态不稳;15. 跳跃; 16. 喘息;17. 痉挛;18. 旋转;19. 潮式呼吸	+++	强阳性
20. 死亡	++++	极强阳性

被动皮肤过敏试验^[9-10]:取豚鼠 12 只,按体质量随机分为阴性对照组、阳性对照组、供试品组和上市药物对照组,各 3 只。各组豚鼠分别腹腔注射相应溶液(同 1.4.2 项下主动全身过敏试验)0.5 mL,隔日 1 次,共致敏 3 次。末次致敏后第 10 天腹主动脉取血,2 000 r/min 离心 10 min,分离血清,组内豚鼠血清合并备用;-20℃ 保存,2 周内使用。取豚鼠 24 只,同法分组。各组豚鼠背部脱毛(3 cm×4 cm)。制备的抗血清用氯化钠注射液按 1:2 稀释,在脱毛区皮内注射相应的抗血清 0.1 mL,进行被动致敏;24 h 后,各组豚鼠后肢小隐静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原加等量 1% 伊文思蓝共 1.0 mL。激发 30 min 后颈椎脱臼处死各组豚鼠,剪取背部皮肤,测量皮肤内层的斑点大小,直径大于 5 mm 者判定为阳性。不规则斑点的直径计为长径与短径的均值。

2 结果

2.1 血管刺激性试验

舒洛地特注射液耳缘静脉注射第 2 天后,供试品组 001,004 号和上市药物对照组 007,009 号家兔注射部

位出现少量瘀血,停药 48 h 后恢复正常。其他家兔试验各阶段一般临床症状观察未见异常。给药前及恢复期给药局部血管均清晰,未见血管扩张、收缩及淤血等症状,血管周围组织亦无水肿等。末次给药结束约 72 h 和 14 d 恢复期结束后,肉眼观察未见异常,显微镜下检查显示,供试品组和上市药物对照组家兔的血管组织均未见明显刺激性症状,与阴性对照组比较无明显差异。详见图 1。

2.2 肌肉刺激性试验

供试品组 001,003,005 号和上市药物对照组 006,008,010 号家兔给药第 2 天后注射部位出现充血和红肿,停药 48 h 后恢复正常。其他家兔试验各阶段一般临床症状观察未见异常。大体病理学检查显示,末次给药 48 h 后及 14 d 恢复期结束后,分别解剖取出给药侧股四头肌,纵向切开。末次给药结束 48 h 后,肉眼可见供试品组 001,003,005 号和上市药物对照 006,008,010 号家兔注射部位出现充血,供试品组和上市药物对照组等级均为轻微刺激,阴性对照组等级为无刺激;恢复期观察结束后肉眼观察未见充血、红肿等刺激性症状。组织病理学检查显示,末次给药 48 h 后,供试品组 001,003,005 号和上市药物对照组 006,008,010 号家兔给药侧股四头肌见出血,肌纤维变性、坏死,炎性细胞浸润,间质巨噬细胞数目增多;阴性对照组 011 号家兔给药侧股四头肌见出血,肌纤维变性、坏死,伴炎性细胞浸润,间质巨噬细胞数目增多,其他家兔给药侧股四头肌未见明显组织病理学改变。恢复期观察结束,供试品组、上市药物对照组及阴性对照组家兔给药侧股四头肌均未见明

显组织病理学改变。详见图 2。

2.3 溶血性试验

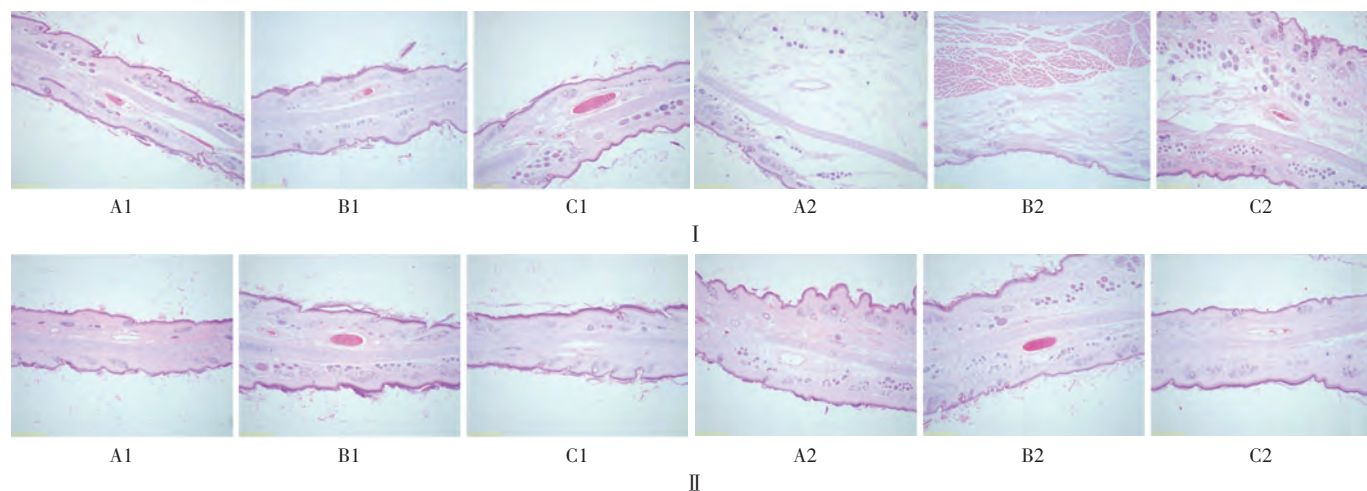
7 号管加入纯化水后于 15 min 出现澄清红色,表明已经溶血;前几个观察时点,1~6 号管和 8~12 号管溶液呈混浊状态,未见澄清红色或棕红色现象;后几个观察时点,1~6 号管和 8~12 号管红细胞开始下沉,3 h 后全部下沉,轻摇各管红细胞散开。与 6 号管比较,1~5 号管和 8~12 号管未见明显异常,1~6 号管和 8~12 号管均未见红细胞凝聚现象。与 7 号管比较,1~6 号管和 8~12 号管有明显差异。本品和上市药物对照均无溶血和致红细胞凝聚现象发生。加样情况见表 2。

2.4 主动全身过敏试验

阳性对照组豚鼠激发后即刻出现不安宁(6/6)、挠鼻(6/6)、排尿(4/6)、步态不稳(5/6)、喘息(2/6)、死亡(6/6)等明显过敏反应,6 只豚鼠均在激发后 5 min 内死亡。按全身致敏性评价标准评判为极强阳性。豚鼠激发后一般状况良好,未见明显过敏反应症状。阴性对照组豚鼠激发后一般状态良好,未见明显过敏反应症状。与阴性对照组比较,供试品组和上市药物对照组豚鼠均未见明显差异,按全身致敏性评价标准评判为阴性。试验期间各组豚鼠未见明显异常,体质量增长良好,供试品组和上市药物对照组与阴性对照组比较无明显差异。

2.5 被动皮肤过敏试验

试验期间,各组豚鼠一般状态良好,未发现明显异常。激发后 30 min 处死豚鼠,剪取背部皮肤:阳性对照组豚鼠皮内注射抗血清处可见明显蓝斑,蓝斑直径分别为 18,



A1. 供试品组耳缘静脉远心端 A2. 供试品组耳缘静脉近心端 B1. 上市药物对照组耳缘静脉远心端 B2. 上市药物对照组耳缘静脉近心端 C1. 阴性对照组耳缘静脉远心端 C2. 阴性对照组耳缘静脉近心端

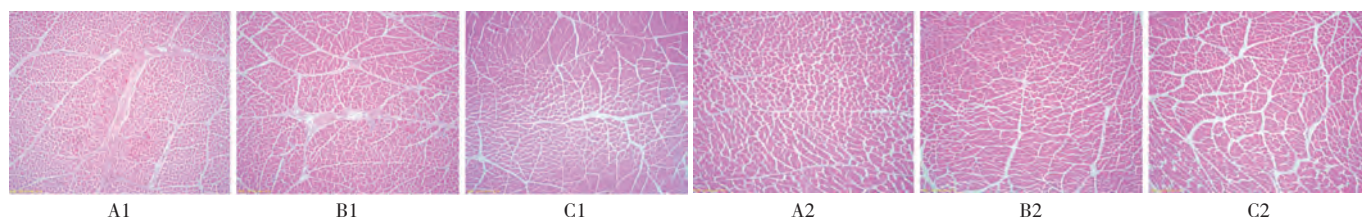
I. 末次给药结束 72 h 后 II. 恢复期结束时

图 1 家兔血管组织的病理学改变(HE, ×100)

A1. Distal ear vein of sample group A2. Proximal ear vein of sample group B1. Distal ear vein of marketed drug control group B2. Proximal ear vein of marketed drug control group C1. Distal ear vein of negative control group C2. Proximal ear vein of negative control group

I. After the last administration for 72 h II. At the end of the recovery period

Fig. 1 Histological changes in the vascular tissue of rabbits(HE staining, ×100)



A1. 供试品组(给药结束 48 h 后) A2. 供试品组(恢复期结束时) B1. 上市药物对照组(给药结束 48 h 后) B2. 上市药物对照组(恢复期结束时) C1. 阴性对照组(给药结束 48 h 后) C2. 阴性对照组(恢复期结束时)

图 2 家兔肌肉组织的病理学改变(HE, ×100)

A1. Sample group(after the last administration for 48 h) A2. Sample group(at the end of the recovery period) B1. Marketed drug control group(after the last administration for 48 h) B2. Marketed drug control group(at the end of the recovery period) C1. Negative control group(after the last administration for 48 h) C2. Negative control group(at the end of the recovery period)

Fig. 2 Histological changes in the muscle tissue of rabbits(HE staining, ×100)

表 2 舒洛地特注射液溶血性试验加样表

Tab. 2 Hemolytic test of Sulodexide Injection

加样	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2% 红细胞悬液(mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
0.9% 氯化钠注射液(mL)	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	0	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4
纯化水(mL)	0	0	0	0	0	0	2.5	0	0	0	0	0
供试品溶液(mL)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0	0	0	0	0	0
上市药物对照溶液(mL)	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1

15, 26, 21, 35 mm, 均大于 5 mm, 被动皮肤过敏反应发生率为 100.00%。阴性对照组、供试品组、上市药物对照组豚鼠激发后均未见明显蓝斑, 过敏反应呈阴性。

3 讨论

注射药物的安全性评价是药物临床试验的重要研究内容^[11]。药物的活性成分及其代谢物、辅料、有关物质及理化性质(如 pH、渗透压等)均有可能引起刺激性和/或过敏性和/或溶血性反应的发生^[12]。本研究中对舒洛地特注射液进行了血管刺激性、肌肉刺激性、溶血性及过敏性观察。舒洛地特注射液未见明显的血管刺激性作用, 也未见溶血和红细胞凝集现象, 对豚鼠的主动全身过敏反应和被动全身过敏反应均呈阴性。虽然舒洛地特注射液对家兔的股四头肌在末次给药 48 h 后产生一定的肌肉刺激反应, 但同其上市药物对照的肌肉刺激性程度基本一致, 均为轻度刺激, 且均在停药后逐渐恢复, 恢复期结束后肌肉刺激性均已恢复。

综上所述, 舒洛地特注射液临床前相关安全性评价试验结果符合新药申报要求, 可供静脉注射或肌肉注射, 结合临床使用, 应注意监测凝血酶原时间、凝血酶时间、活化部分凝血活酶时间、血浆纤维蛋白原、血浆抗凝血酶Ⅲ、D-二聚体等 6 项凝血指标^[13]。

参考文献

[1] 杨绪枫, 王筱霞, 汪年松. 等. 舒洛地特对糖尿病大鼠肾脏病变的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(1): 12-14.

- [2] NOTI C, SEEGERER PH. Chemical approaches to define the structure-activity relationship of heparin-like glycosaminoglycans[J]. Chem Biol, 2005, 12(7): 731-756.
- [3] 王亚敏. 舒洛地特研究进展及临床应用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(1): 110-113.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 237.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 157.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 159.
- [7] 魏霞, 刘娜, 谢强胜, 等. 注射用奥美拉唑钠配伍辅酶 Q10 氯化钠注射液的稳定性和安全性[J]. 药学研究, 2017, 36(4): 215-218.
- [8] 翁谢川, 樊星, 王青秀, 等. 药物安全性评价中豚鼠全身过敏反应方法的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(5): 51-55.
- [9] 黄凤娇, 杨雅婷, 王平慧, 等. 注射用埃索美拉唑钠安全性评价[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(3): 242-243.
- [10] 张璐, 岳永花, 程玉钊, 等. 红花注射液致 I 型过敏反应试验[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(17): 1319-1321.
- [11] 王欣, 周继春, 景爱华, 等. 注射用间苯三酚的非临床安全性评价[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2017, 35(2): 100-103.
- [12] 黄凤娇, 吴森, 王平慧, 等. 注射用帕瑞昔布钠特殊安全性评价[J]. 药物评价研究, 2017, 40(8): 1090-1093.
- [13] 张娟, 魏霞, 李水仙, 等. 舒洛地特原料药安全性检查法的研究[J]. 中国药业, 2019, 28(14): 22-24.

(收稿日期: 2020-07-09)