

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)06-0061-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.06.013



吸入用乙酰半胱氨酸溶液自研药非临床安全性评价*

刘静欢^{1,2}, 孙立杰^{1,3}, 杨 嫻^{1,3△}

(1. 石家庄四药有限公司, 河北 石家庄 050000; 2. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050000;
3. 河北省大容量注射剂工程技术研究中心, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 为吸入用乙酰半胱氨酸溶液自研药的临床安全使用提供依据。方法 取18只雄性日本大耳白兔,按体质量分层随机化分组法分为阴性对照组(等体积0.9%氯化钠注射液)、上市品对照组(原研药0.1 mg/mL)和给药组(自研药0.1 mg/mL),各6只。雾化吸入给药35 mg/kg,给药体积均为0.35 mL/kg,各组均给予相应药物,每日上午、下午各1次,连续14 d。记录呼吸道刺激性症状发生及恢复时间。分别于末次给药24 h及14 d后,各组取3只兔处死并解剖,肉眼观察刺激反应,采用苏木素-伊红染色,观察病理形态。取30只Hartley豚鼠,按体质量分层随机化分组法分为阴性对照组(0.9%氯化钠注射液0.8 mL/d)、阳性对照组(0.9%氯化钠注射液0.8 mL/d)、上市品对照组[原研药80 mg/d(0.8 mL/d)]及低剂量组[自研药40 mg/d(0.4 mL/d)]和高剂量组[自研药80 mg/d(0.8 mL/d)],各6只,各组动物隔日致敏(10%卵白蛋白溶液0.6 mL/d)1次,共3次。分别于末次致敏14 d及21 d后,各组取3只豚鼠,按2倍致敏剂量进行激发。根据过敏反应发生率和发生程度综合评价主动全身过敏反应发生情况。结果 各组兔的外观、行为、粪便等均正常,给药后无咳嗽等症状;大体解剖均未见明显异常;与阴性对照组和上市品对照组比较,给药组未见药物延迟或蓄积作用。各组豚鼠未出现与给药相关的异常症状,过敏反应均为阴性。结论 吸入用乙酰半胱氨酸溶液自研药对日本大耳白兔无明显呼吸道刺激作用,对豚鼠无明显的全身致敏作用。

关键词:吸入用乙酰半胱氨酸溶液;自研药;安全性评价;呼吸道刺激性试验;主动全身过敏性试验

Non - Clinical Safety Evaluation of Self - Made Acetylcysteine Solution for Inhalation

LIU Jinghuan^{1,2}, SUN Lijie^{1,3}, YANG Xian^{1,3}

(1. Shijiazhuang No. 4 Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang, Hebei, China 050000; 2. College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050000; 3. Hebei Large Capacity Injection Engineering Technology Research Center, Shijiazhuang, Hebei, China 050000)

Abstract : Objective To provide a basis for the clinical safe use of self - made Acetylcysteine Solution for Inhalation. **Methods** Eighteen Japanese male white rabbits were selected and divided into the negative control group (equal volume of 0.9% Sodium Chloride Injection), the marketed drug control group (original - patented drug, 0.1 mg / mL), the treatment group (self - made drug, 0.1 mg / mL) by the stratified randomization method based on body mass, with six rabbits in each group. The drugs were given by atomizing inhalation at a dosage of 35 mg / kg and a volume of 0.35 mL / kg. Each group was given the corresponding drug once a day in the morning and afternoon for 14 d. The occurrence and recovery time of respiratory irritation symptoms was recorded. After 24 h and 14 d of the last administration, three rabbits in each group were selected for dissection respectively, and the irritation reaction was observed by naked eyes. The hematoxylin - eosin staining was used to observe pathological morphology. Thirty Hartley guinea pigs were selected and divided into the negative control group (0.9% Sodium Chloride Injection, 0.8 mL / d), the positive control group (0.9% Sodium Chloride Injection, 0.8 mL / d), the marketed drug control group [original - patented drug, 80 mg / d (0.8 mL / d)], the low - dose group [self - made drug, 40 mg / d (0.4 mL / d)], and the high - dose group [self - made drug, 80 mg / d (0.8 mL / d)] by the stratified randomization method based on body mass, with six guinea pigs in each group. Guinea pigs in each group were given drugs (10% ovalbumin solution, 0.6 mL / d) once every other day for three times. After 14 d and 21 d of the last administration, three guinea pigs in each group were selected and stimulated at the twice dose of the above administration. The active systemic allergic reaction was comprehensively evaluated based on the incidence and severity of the allergic reactions. **Results** The appearance, behavior and feces in each group of rabbits were normal, and there was no relevant symptoms such as cough; after gross anatomy, no obvious abnormality was observed; and there was no drug delay or accumulation effect in the treatment group compared with the negative control group and the marketed drug control group. No drug - related abnormal symptom was observed in each group of guinea pigs, and all allergic reactions were negative. **Conclusion** Self - made Acetylcysteine Solution for Inhalation dose not induce the obvious respiratory irritation in Japanese white rabbits or obvious systemic sensitization in guinea pigs.

*基金项目:河北省创新能力提升计划项目[225A2704D];河北省高层次人才资助项目[B2022003038]。

第一作者:刘静欢,女,在读硕士研究生,研究方向为新型药物制剂研发,(电子信箱)1603051646@qq.com。

△通信作者:杨嫻,女,博士研究生,高级工程师,研究方向为新药的非临床研究,(电子信箱)xianyang323@163.com。

Key words: Acetylcysteine Solution for Inhalation; self-made drug; safety evaluation; respiratory irritation test; active systemic allergic test

乙酰半胱氨酸来源于葱属植物,为L-半胱氨酸和抗氧化剂谷胱甘肽的前体,具有抗氧化、抗炎和黏液溶解作用,其常见剂型有颗粒剂、片剂、泡腾片、胶囊、雾化吸入剂等^[1-3]。雾化吸入给药剂量低、起效快,能直接作用于气道,以达到较高的局部药物浓度,已广泛用于呼吸道疾病的治疗^[4]。吸入用乙酰半胱氨酸溶液[原研药为Zambon SpA公司的Fluimucil(富露施)],临床主要用于治疗浓稠黏液分泌物过多的呼吸道系统疾病。《药品注册管理办法》要求,申请药品注册时应提供临床前安全性等相关资料^[5],安全性实验是药物研发过程中的基础工作,其中对于雾化吸入给药,呼吸道刺激性和主动全身过敏反应为较可能出现的安全问题^[6]。因此,本研究中依据《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》《药物非临床研究质量管理规范》和吸入用乙酰半胱氨酸溶液临床拟订用法用量,通过开展日本大耳白兔呼吸道刺激性实验和豚鼠主动全身过敏实验,对吸入用乙酰半胱氨酸溶液自研药进行非临床安全性评价研究。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

NE-C28型压缩式吸入器(日本Omron公司);BSA5201-CW型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.1 g);ASP300S型全自动组织脱水机、HI210型摊片机、HI1220型烘干机、ST5020型多功能染色机、DM3000型生物显微镜、病理图像分析系统(含DFC450型摄像头+Leica Application Suite V4图像采集软件),均购自德国Leica公司。

1.2 试药

吸入用乙酰半胱氨酸溶液(自研药,某公司,批号为16052231,含量为100.8%;原研药,批号为28003128;规格均为3 mL:0.3 g);0.9%氯化钠注射液(山东齐都药业有限公司,批号为2A15032901,规格为每袋100 mL:0.9 g);10%卵白蛋白溶液(美国Sigma公司,批号为SLBL1882V,规格为每瓶250 g,临用前加入适量氯化钠注射液充分溶解并定容);10%中性福尔马林溶液(中国Biosharp公司,批号为BL388A);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号为G1120)。

1.3 动物

普通级日本大耳白兔20只,雄性,检疫结束剔除2只,用于实验前雾化速率测定;普通级Hartley豚鼠36只,雌雄各半,其中6只用于检疫剔除;均购于北京市昌扬西

山养殖场,实验动物生产许可证号分别为SCXK(京)2011-0010,SCXK(京)2016-0007,动物质量合格证编号分别为11402300002572,11402300002573。本实验所用动物及相关处置均符合动物福利标准。

2 方法与结果

2.1 供试品粒径分析

检测样品粒径分布,需符合供雾化器用的液体剂型要求。

2.2 呼吸道刺激实验^[7-10]

2.2.1 方法

剂量设计依据:吸入用乙酰半胱氨酸溶液成人和儿童不区分剂量,临床拟用最大量计算,即为10 mg/kg,日本大耳白兔折算系数为3.1^[11],故等效剂量为31 mg/kg,本次实验家兔一次给药量按35 mg/kg计算。

分组及给药:取18只兔,给药前称定体质量,据此按分层随机化分组法分为阴性对照组(等体积0.9%氯化钠注射液)、上市品对照组(原研药0.1 mg/mL)和给药组(自研药0.1 mg/mL),各6只,依次编为1-18号,各组雾化吸入给予相应药物(35 mg/kg,0.35 mL/kg),每日上下午各1次,连续14 d。

观察指标:给药前后观察兔的外观、行为、粪便等,每天观察呼吸道刺激性4次,并记录症状(如咳嗽)发生及恢复时间。分别于末次给药24 h及14 d后,以2%戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)静脉注射麻醉,每组取3只兔,以股动脉放血的方法处死,解剖,肉眼观察动物口腔(唇、上颚、舌),鼻,咽,喉,气管,支气管,肺有无充血、红肿等刺激性反应。取上述组织器官,经常规脱水,石蜡包埋,切3~5 μm厚片,HE染色,显微镜下检查病理形态。

2.2.2 结果

实验期间,各组兔外观、行为、粪便等均正常,给药后无咳嗽等症状。大体解剖后,除给药组中1只兔气管内见少量红色液体外,其余兔的呼吸系统均未见明显异常。末次给药结束和恢复期结束后的病理学检查中,3组兔均出现刺激反应。与阴性对照组和上市品对照组比较,给药组未见药物延迟或蓄积作用。详见表1、图1。

2.3 主动全身过敏实验^[7-8,12-13]

2.3.1 方法

剂量设计依据:乙酰半胱氨酸溶液临床使用剂量约为10 mg/kg,每日2次,豚鼠折算系数为4.6^[11],则豚鼠等效剂量为92 mg/kg,豚鼠的平均体质量按400 g计算,每只豚鼠给药剂量约为36.8 mg。

表 1 呼吸道刺激性试验组织病理学检查结果

Tab. 1 Results of histopathological examination in the respiratory irritation test

解剖时间	组别	动物编号	组织病理学检查结果	解剖时间	组别	动物编号	组织病理学检查结果
末次给药	阴性对	1	鼻腔、咽喉见轻微炎性分泌物	末次给药	阴性对	4	鼻黏膜轻度炎性细胞浸润,鼻腔见中度炎性分泌物,肺脏见轻微肺水肿
24 h后	照组	2	鼻黏膜轻度炎性细胞浸润,肺泡壁骨化生	14 d后	照组	5	肺泡壁骨化生
		3	鼻黏膜轻度炎性细胞浸润			6	未见明显异常
	上市品对	7	未见明显异常		上市品对	10	未见明显异常
	照组	8	鼻黏膜轻度至中度炎性细胞浸润,鼻腔、咽喉见轻度炎性分泌物		照组	11	鼻腔见轻微炎性分泌物,肺泡壁骨化生
		9	鼻黏膜轻度至中度炎性细胞浸润,鼻腔支气管腔见轻度炎性分泌物,气管、支气管黏膜固有层轻度扩张充血			12	未见明显异常
	给药组	13	未见明显异常		给药组	16	鼻黏膜轻度炎性细胞浸润,咽喉、气管见轻度炎性分泌物,鼻腔见轻度至中度炎性分泌物
		14	鼻黏膜轻度炎性细胞浸润			17	鼻黏膜中度炎性细胞浸润,咽喉、鼻腔分别见轻度、中度炎性分泌物
		15	鼻黏膜轻度炎性细胞浸润,鼻腔、咽喉见轻度炎性分泌物,肺泡壁骨化生			18	咽喉、气管、左右支气管、左右肺脏均可见轻度炎性细胞浸润,鼻黏膜中度炎性细胞浸润,鼻腔见中度炎性分泌物

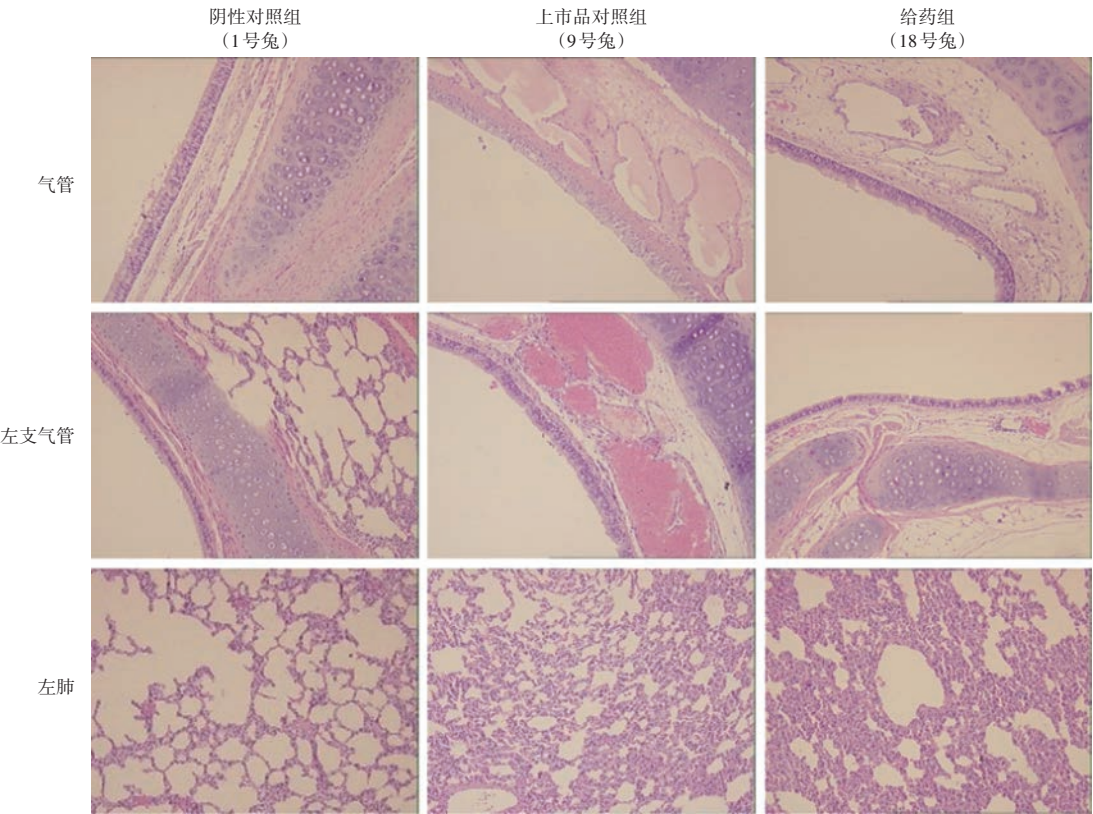


图 1 末次给药 24 h 后实验兔肺及气管的病理形态 (HE, ×10)

Fig. 1 Pathological morphology of lungs and trachea in rabbits after 24 h of the last administration (HE, ×10)

分组及给药:取 30 只豚鼠,检疫期最后 1 天称定豚鼠体质量,据此按分层随机化分组法分为阴性对照组(0.9%氯化钠注射液 0.8 mL/d),阳性对照组(0.9%氯化钠注射液 0.8 mL/d),上市品对照组[原研药 80 mg/d(0.8 mL/d)],以及低剂量组[自研药 40 mg/d(0.4 mL/d)]和高剂量组[自研药 80 mg/d(0.8 mL/d)],各 6 只,雌雄各半。各组隔日致敏给药(10%卵白蛋白溶液 0.6 mL/d)1 次,共 3 次。分别于末次致敏 14 d 和 21 d 后,每组分别取 3 只豚鼠,按致敏剂量的 2 倍进行激发。致敏期间每

日观察豚鼠的症状;激发时,给药后即刻至给药后 3 h 详细观察豚鼠的反应、症状的出现及消失时间。过敏反应发生程度参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》全身致敏性评价标准^[8],实验中豚鼠出现不安宁、竖毛、发抖和搔鼻为过敏反应弱阳性,喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪和流泪为过敏反应阳性,呼吸困难、哮喘音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、旋转和潮式呼吸为过敏反应强阳性,死亡为过敏反应极强阳性。同时根据观察结果计算过敏反应发生率,并进行

综合评价。

2.3.2 结果

实验期间,各组豚鼠饮水、摄食及行为活动正常,健康状况良好,未出现与给药相关的异常症状。低、高剂量组,上市品对照组及阴性对照组豚鼠激发后即刻至观察结束均未见过敏反应症状,过敏反应均为阴性。仅阳性对照组豚鼠激发后出现不安宁(6/6)、咳嗽(3/6)、呼吸困难(4/6)、痉挛(6/6)、潮式呼吸(6/6)等不同程度的过敏反应症状,并在激发后5 min内全部死亡;过敏反应均呈极强阳性(6/6)。表明豚鼠雾化吸入吸入用乙酰半胱氨酸溶液自研药未发生全身主动过敏反应。

3 讨论

制剂的原料和辅料及制备、贮存过程中产生的杂质均可能引发药物毒性作用,进而影响制剂的安全性^[8]。吸入制剂在非临床研究阶段,以经口鼻吸入给药与临床拟用途径最接近^[14]。本研究中将连有压缩雾化器的喷雾面罩紧贴于大耳白兔与豚鼠口鼻部,开启压缩雾化器,进行雾化吸入给药,最大限度地模拟吸入用乙酰半胱氨酸的给药方式。雾化给药剂量通过给药时间控制,使用分组后的剩余动物模拟实际给药过程,以测定雾化速率,根据雾化时间和溶液消耗体积计算出溶液雾化器平均喷雾速率,并据此计算雾化吸入给药时间。其中,供试品的给药剂量均根据临床使用剂量与不同动物间的折算系数进行设计,且吸入剂量均高于临床拟用最大剂量,可充分暴露药物在使用中可能产生的局部和全身毒性。

吸入用乙酰半胱氨酸溶液对鼻咽和胃肠道有一定刺激作用。据报道,患者吸入富露施后出现胸闷、气短症状^[15]。本研究的主动全身过敏实验中,低、高剂量组及上市品对照组豚鼠无任何呼吸困难、痉挛等过敏反应症状。在呼吸道刺激性实验中,给药结束期的阴性对照组、给药组与上市品对照组大部分实验兔出现鼻黏膜炎细胞浸润、鼻腔炎性分泌物、咽喉表面炎性分泌物等轻微呼吸道刺激反应,且病变程度无明显差异。另外,部分动物咽喉表面可见少量炎性分泌物,9号兔(归属给药结束时的上市品对照组)的气管、支气管黏膜固有层血管轻度扩张充血,其余组织未见明显组织病理学改变。呼吸道刺激性实验恢复期结束,阴性对照组、上市品对照组和给药组实验兔仍可见鼻腔炎性分泌物、鼻黏膜炎细胞浸润,但给药组家兔鼻黏膜炎细胞浸润、鼻腔炎性分泌物有一定程度的增加。另外,18号兔(归属恢复期结束时的给药组)的气管、支气管黏膜有轻度炎细胞浸润,肺脏有轻微炎细胞浸润。综合已有家

兔呼吸道组织病理学背景资料,考虑该组织病理学改变主要和动物自身的健康状态有关。肺泡壁骨化生散在分布于阴性对照组、上市品对照组和给药组家兔,且程度不做分级处理,为家兔的背景性病变。

综上所述,乙酰半胱氨酸溶液自研药对日本大耳白兔无明显呼吸道刺激作用,对豚鼠无明显的全身致敏作用。

参考文献

- [1] SALAMON S, KRAMAR B, MAROLT TP, et al. Medical and Dietary Uses of N - Acetylcysteine [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(5): 111.
- [2] TENÓRIO MCDS, GRACILIANO NG, MOURA FA, et al. N - Acetylcysteine (NAC) : Impacts on Human Health [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 967.
- [3] 程天贵. 乙酰半胱氨酸制剂与临床应用研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 28(6): 430 - 432.
- [4] LI X, WEI X, CHEN C, et al. N - Acetylcysteine inhalation improves pulmonary function in patients received liver transplantation [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(5): BSR20180858.
- [5] 国家市场监督管理总局. 药品注册管理办法 [A / OL]. (2020 - 01 - 22) [2023 - 05 - 11]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2020/content_5512563.htm.
- [6] 高云航, 李 晗, 宋 玲, 等. 醒脑静雾化吸入给药的安全性及对干酵母致热模型大鼠的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(2): 273 - 277.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 药物非临床研究质量管理规范 [A / OL]. (2017 - 07 - 27) [2023 - 05 - 11]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5241929.htm.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局关于发布药物安全药理学研究技术指导原则等8项技术指导原则的通告(第4号) [A / OL]. (2014 - 05 - 13) [2023 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqgtgtg/20140513120001448.html>.
- [9] 雷春华, 肖海文, 黄洁瑕, 等. 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂安全性研究 [J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(5): 428 - 431.
- [10] 肖 伟, 张 晖, 昌兴龙, 等. 一种色甘酸钠雾化吸入溶液及其制备方法: CN111388456A [P]. 2020 - 07 - 10.
- [11] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71.
- [12] 翁谢川, 樊 星, 王青秀, 等. 药物安全性评价中豚鼠全身过敏试验方法的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(5): 51 - 55.
- [13] 张 娟, 冷佳蔚, 李水仙, 等. 舒洛地特注射液非临床安全性评价 [J]. *中国药业*, 2021, 30(6): 28 - 31.
- [14] 刘学武, 陈琼芳, 唐小燕, 等. 吸入药物非临床安全性评价策略 [J]. *中南药学*, 2021, 19(5): 902 - 908.
- [15] 张明惠, 张亚坤, 张云琛. 乙酰半胱氨酸吸入用溶液致胸闷、气喘1例 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(14): 1769.

(收稿日期: 2023 - 06 - 03; 修回日期: 2023 - 11 - 17)