

注射用替加环素临床前安全性研究

赵 涛, 牟丽丽, 李 斌, 王现珍, 张莹莹, 王恩力, 李 欣*

鲁南制药集团股份有限公司新药安评中心, 山东 临沂 273400

摘要: **目的** 评价注射用替加环素的安全性。**方法** 对注射用替加环素进行血管刺激、肌肉刺激、溶血性及被动皮肤过敏、全身主动过敏性、类过敏性试验。**结果** 注射用替加环素对血管无明显刺激性、对肌肉组织产生轻度可逆性的刺激, 对家兔红细胞无溶血、凝聚作用, 大鼠被动皮肤过敏反应(PCA)试验未出现过敏反应; 豚鼠全身主动过敏反应(ASA)试验部分豚鼠出现过敏反应; 注射用替加环素与已上市药品 Tygacil 在同等剂量下, 豚鼠出现同等程度的类过敏反应。**结论** 注射用替加环素可能会引起肌肉刺激性及过敏、类过敏反应, 临床应用时应关注患者给药后的反应。

关键词: 注射用替加环素; 血管刺激; 肌肉刺激; 溶血性; 被动皮肤过敏; 过敏及类过敏

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)05-0441-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.05.015

Preclinical safety of Tigecycline for injection

ZHAO Tao, MU Li-li, LI Bin, WANG Xian-zhen, ZHANG Ying-ying, WANG En-li, LI Xin

Center for New Drug Safety Evaluation of Lunan Pharmaceutical Group Corporation, Linyi 273400, China

Abstract: **Objective** To evaluate the safety of Tigecycline for injection. **Methods** The reactions of stimulation on blood vessel and muscle of rabbit, hemolysis, PCA on SD rat, ASA and anaphylactoid on Guinea pig were studied. **Results** No hypersensitive action was found on blood vessel, red cell, and PCA of rabbit, and mild reversible reactions on muscle tissue was observed. Anaphylactic and anaphylactoid reactions were found on some Guinea pigs. Tigecycline for injection and marketed drug Tygacil can cause anaphylactoid reaction in Guinea pigs with the same degree at an equivalent dose. **Conclusion** Tigecycline for injection may cause muscle stimulation, allergy, and anaphylactoid reaction, and the patients should be followed after taking the medicine.

Key words: Tigecycline for injection; vascular irritation; muscle irritation; hemolysis; PCA; anaphylactic and anaphylactoid reactions

替加环素是第一个用于临床的甘氨酸四环素, 经过结构改造使其抗菌活性优于四环素, 抗菌谱广, 特别是临床上的多重耐药菌, 如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)等^[1]。2005年6月17日美国FDA批准用于成人复杂皮肤及其软组织感染和成人复杂的腹内感染, 包括复杂阑尾炎、烧伤感染、腹内脓肿、深部软组织感染及溃疡感染^[2]。本研究按照《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》要求进行了血管、肌肉刺激性试验, 溶血性试验, 被动皮肤过敏反应(PCA)试验, 全身主动过敏反应(ASA)试验, 全身类过敏试验。

1 材料

1.1 药品与试剂

注射用替加环素, 批号 111201, 规格 50 mg/

瓶, 山东新时代药业有限公司。白蛋白(鸡蛋), 批号 110209, 规格 1 g/瓶, 上海伯奥生物科技有限公司。0.9%氯化钠注射液(NS), 批号 11122871, 规格为 4.5 g 氯化钠/500 mL, 山东洁晶药业有限公司。泰阁(Tygacil), 批号 F02750, 规格为 50 mg/瓶, Wyeth 公司。

1.2 受试动物

SPF级SD大鼠, 140~230 g, 雌雄各半, 山东新时代药业有限公司, 生产许可证号为 SCXK(鲁)20060019, 质量合格证号为 No0005072。普通级 Hartley 豚鼠, 体质量 280~380 g, 雄性, 济南西岭角养殖繁育中心, 生产许可证号为 SCXK(鲁)20100005, 质量合格证号为 No0012060、0012446。普通级新西兰兔, 体重 2.5~3.0 kg, 雄性, 济南西岭角养殖繁育中心, 生产许可证号为 SCXK(鲁)

收稿日期: 2014-04-11

作者简介: 赵 涛(1983—), 男, 学士, 助理工程师, 研究方向为药理、毒理。E-mail: zyt155@126.com

*通信作者 李 欣 E-mail: ss07ss@163.com

20100005, 质量合格证号为 No0012055、0012056、0012057。

2 方法

2.1 血管刺激性试验^[3]

新西兰兔经 2 周观察, 选取 4 只健康新西兰兔, 采用自体自身对照法, 左侧耳缘静脉以无菌操作方法注射 0.5 mg/mL 的替加环素 55.25 mg/m² (给药浓度、剂量与临床用量相同), 右侧耳缘静脉注射等体积的 NS, 1 次/d, 连续给药 5 d。末次给药后约 48 h 肉眼观察注射部位有无红肿、充血、坏死等刺激现象, 并用安乐死术处死 2 只家兔, 取注射部位及周围组织, 用 10% 中性缓冲福尔马林溶液固定, 常规组织切片, HE 染色, 显微镜下病理组织学检查, 剩余的动物继续观察 14 d, 再次进行组织病理学检查, 了解刺激的可逆程度。评价标准见表 1、2。

表 1 血管刺激反应评价标准

Table 1 Evaluation standards of vascular irritation

分值	刺激反应	分值	刺激反应
0	无明显反应	3	中-重度充血, 肿胀, 耳下垂
1	轻度充血	4	同 3, 且有轻-中度坏死
2	轻-中度充血	5	同 3, 且有重度广泛坏死

表 2 血管刺激组织病理学评价标准

Table 2 Evaluation standards of vascular irritation of tissue pathology

分值	血管壁刺激反应
0	基本无变化
1	血管变化限于耳缘静脉, 可能有坏死或栓塞, 也可见中度水肿, 纤维蛋白沉积或出血, 但仅限于血管周围
2	变化类似“1”, 水肿, 纤维蛋白沉积, 出血或炎性浸润, 扩展至半只耳壳
3	变化类似“2”, 但耳缘静脉以外的静脉也有栓塞和/或坏死, 水肿, 纤维蛋白沉积, 出血或炎性浸润扩展至半只耳壳以上, 但栓塞和坏死限于半只耳壳
4	变化类似“3”, 病变扩展至 2/3 耳壳
5	变化类似“4”, 但全耳发生弥漫性变化

2.2 肌肉刺激性试验^[3]

新西兰兔经 2 周观察, 选取 4 只健康雄性新西兰兔, 采用自体自身对照法, 左侧股四头肌以无菌操作法注射给予 0.5 mg/mL 的替加环素 1 mL, 右侧给予 1 mL 的 NS。1 次/d, 连续给药 5 d。末次给药后约 48 h, 安乐死术处死 2 只家兔, 解剖观察注射部位的刺激性。取注射部位的肌肉组织, 用 10% 中

性缓冲福尔马林溶液固定, 常规组织切片, HE 染色, 镜下病理组织学检查。剩余的动物继续观察 14 d, 再次进行组织病理学检查, 了解刺激的可逆程度。评价标准见表 3。

表 3 肌肉刺激反应评价标准

Table 3 Evaluation standards of muscle irritation

反应级	刺激反应
0	无明显变化
1	轻度充血, 范围在 0.5~1.0 cm 以下
2	中度充血, 范围在 0.5~1.0 cm 以上
3	重度充血, 伴有肌肉变性
4	出现坏死, 伴有褐色变性
5	出现广泛性坏死

2.3 溶血性试验^[4]

2.3.1 红细胞悬液的制备 兔心脏取血约 10 mL, 放入含玻璃珠的三角烧瓶中振摇约 10 min, 除去纤维蛋白原, 加入 NS 混匀, 1 500 r/min 离心 10 min, 除去上清液, 沉淀的红细胞再用 NS 按上述方法洗涤 3~4 次, 至上清液不显红色为止。取 1 mL 沉淀的红细胞加氯化钠注射液至 50 mL, 配制成 2% 的红细胞混悬液。

2.3.2 方法 取洁净试管 7 只, 进行编号, 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。按表 4 依次加入 2% 红细胞悬液、NS、蒸馏水和供试品。加样后混匀, 立即置 (37±0.5) °C 的恒温箱中进行温育。开始每隔 15 min 观察 1 次, 1 h 后, 隔 1 h 观察 1 次, 观察 3 h。

表 4 溶血性试验

Table 4 Tests of hemolysis

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
红细胞悬液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
NS	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	—
蒸馏水	—	—	—	—	—	—	2.5
供试品	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	—	—

2.3.3 结果判定 ①全部溶血: 溶液澄明红色, 管底无细胞残留。②部分溶血: 试管中的溶液呈澄明红色, 管底无细胞残留或有少量红细胞残留。③无溶血: 如红细胞全部下沉, 上清液体无色澄明, 表明无溶血发生。④凝聚: 溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀, 振摇后不分散。

2.4 大鼠 PCA 试验^[3]

2.4.1 含 IgE 的抗血清制备 48 只 SD 大鼠分为高

剂量组、低剂量组、阳性对照组和阴性对照组,共4组,每组12只,雌雄各半;各组动物分别给予替加环素16、8 mg/kg、白蛋白5 mg/只、NS 1.0 mL/只。每组雌、雄各选取2只,分别ip药物,1次/2 d,共4次。末次给药后第12天心脏采血,经4 000 r/min离心10 min后,分离血清备用。

2.4.2 致敏 将各组分离出的抗血清用NS按照1:2、1:4、1:8、1:16进行稀释。在剩余大鼠背部两侧左前区(A)、左后区(B)、右前区(C)、右后区(D)四个点(预先脱毛3 cm×4 cm)皮内注射各对应组的抗血清0.1 mL,进行被动致敏。注射区域与抗血清稀释比对应如下:A-1:2、B-1:4、C-1:8、D-1:16。

2.4.3 激发 被动致敏24 h后,尾静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原(内含1%伊文思兰染料)进行激发,30 min后安乐死术处死各组动物,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。不规则斑点的直径为长径与短径之和的一半。

2.5 豚鼠ASA试验^[5]

2.5.1 致敏 24只豚鼠按体质量以简化随机分组法分为以下4组:注射用替加环素高、低剂量组,白蛋白阳性对照组和NS阴性对照组,每组动物数6只;各组分别给予替加环素12、6 mg/kg,白蛋白5 mg/只,NS 1.0 mL/只。所有豚鼠ip相应药物,2 d 1次,共注射4次。致敏时各组每只豚鼠ip 15 mg/mL的氢氧化铝佐剂0.2 mL。

2.5.2 激发 末次致敏后第14天,按照2倍的致敏剂量,各组动物一次快速iv相应药物。激发后立刻至30 min,并按表5、6观察症状、判断反应程度。

2.6 豚鼠全身类过敏试验^[5]

30只豚鼠随机分为5组,替加环素高、低剂量组,泰阁高、低剂量组,阴性对照组,每组6只豚鼠;各组分别给予替加环素18、6 mg/kg,泰阁18、6 mg/kg,NS 1.0 mL/只。耳缘静脉一次性注射给药,给药后立刻至30 min,最长观察3 h,按表5、6观察症状、判断反应程度。

3 结果

3.1 血管刺激性试验

耳缘静脉注射部位局部及周围组织,均未见红肿、充血等异常改变,光镜观察双侧兔耳注射部位结构完整、血管内皮无水肿、变性、坏死,管壁无炎细胞浸润,管腔无血栓形成。

表5 过敏反应症状

Table 5 Allergy symptoms

分级	症状	分级	症状	分级	症状
0	正常	7	呼吸急促	14	步态不稳
1	躁动	8	排尿	15	跳跃
2	竖毛	9	排粪	16	喘息
3	颤抖	10	流泪	17	痉挛
4	搔鼻	11	呼吸困难	18	旋转
5	喷嚏	12	哮鸣音	19	潮式呼吸
6	咳嗽	13	紫癜	20	死亡

表6 过敏反应评价标准

Table 6 Evaluation standards of allergic reaction

过敏症状	分级	过敏反应强度
0	-	过敏反应阴性
1~4 症状	+	过敏反应弱阳性
5~10 症状	++	过敏反应阳性
11~19 症状	+++	过敏反应强阳性
20	++++	过敏反应极强阳性

3.2 肌肉刺激性试验

切开皮肤,暴露股四头肌,大体观察内皮光滑,股四头肌外面有肌外膜包绕,肌束结构清晰完好。穿刺点周围肌组织未见明显肿胀、出血、变性、坏死、萎缩、肿物形成等病理变化;光镜观察,末次给药后约48 h,有1只新西兰兔注射替加环素的一侧股四头肌见肌纤维变性、坏死,间质出血、炎细胞浸润;NS侧股四头肌未见异常病理改变。剩余1只及恢复期的2只新西兰兔未见异常病理改变。

3.3 溶血性试验

7号管澄清红色,发生溶血;6号管红细胞下沉,上清液无色澄清;1~5号管红细胞下沉,上清液无色澄清,未见有棕红色絮状沉淀,未见溶血和红细胞凝聚发生。

3.4 大鼠PCA试验

替加环素高、低剂量组及阴性对照组大鼠均未见背部皮肤产生蓝斑。阳性组A区过敏反应阳性发生率为100%,B区过敏反应阳性发生率为75%,C、D区未见大鼠背部皮肤产生蓝斑。

3.5 豚鼠ASA试验

豚鼠激发后高、低剂量组出现不同程度过敏反应症状,具体结果见表7。

3.6 豚鼠全身类过敏试验

豚鼠一次性耳缘iv替加环素、泰阁,在同等剂量下,出现的反应症状基本一样,结果见表8。

表7 ASA 试验结果
Table 7 Results of ASA

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	分级	过敏反应评价
替加环素	12	++	过敏反应阳性
	6	+	过敏反应弱阳性
白蛋白	5	++++	过敏反应极强阳性
阴性	—	—	过敏反应阴性

表8 全身类过敏反试验结果 (n=6)
Table 8 Results of anaphylactoid reactions (n=6)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	过敏反应症状级别					发生率/%
		-	+	++	+++	++++	
替加环素	16	0	0	0	4	2	100
	8	1	2	3	0	0	83.3
泰阁	16	0	0	0	4	2	100
	8	1	2	3	0	0	83.3
阴性	—	6	0	0	0	0	0

4 讨论

类过敏反应与 I 型超敏反应均与肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒释放组胺等活性介质有关,但两者发生机制不同。类过敏反应无需 IgE 介导,首次接触药物即可出现过敏症状,可能于直接刺激肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒释放组胺等活性介质有关。I 型超敏反应必须 IgE 介导,首次接触抗原时产生抗原特异性 IgE 并使机体致敏,当机体再次接触同一抗原时,激活肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒引发生物活性介质的释放,产生生物效应。

替加环素属甘氨酸环素类抗菌药物,在结构上与四环素类抗生素相似,据资料替加环素有过敏或类过敏反应的报道,并且可能威胁生命。因此对四环素类抗生素过敏的患者应慎用替加环素^[6]。

本研究豚鼠全身类过敏试验中,注射用替加环素组、泰阁组豚鼠给药后高、低剂量组都表现出过敏反应,高剂量组比低剂量组严重,呈剂量相关性趋势,两种药物过敏反应的程度及发生率基本一

致,可见新时代药业提供的替加环素与 Wyeth 公司的泰阁在豚鼠类过敏试验中无明显差异。

注射用替加环素豚鼠全身主动过敏试验中部分豚鼠出现 I 型超敏反应的过敏症状,在类过敏试验中豚鼠也表现出类过敏反应的症状,两种类型的试验豚鼠均表现出阳性,替加环素这种药物本身是否具有免疫原性,在本研究中未能得出结论,有待于进一步的研究证实。

在本试验条件下,新西兰兔两侧股四头肌大体观察均未见异常。但在光镜观察中,发现一只新西兰兔注射替加环素的一侧肌纤维变性伴炎细胞浸润。即连续 5 次肌肉注射供试品,在末次给药 48 h 时发现肌肉损伤的形态学证据 1 例,在经 14 d 恢复期后未见滞后性肌肉损伤的形态学证据。参考其他厂家注射用替加环素说明书(药品不良反应有注射部位疼痛、注射部位炎症、注射部位反应,发生率<2%),考虑注射用替加环素可能对注射部位肌肉组织产生刺激性。提示注射用替加环素有可能会对人体肌肉组织产生刺激性。注射用替加环素临床使用时虽然没有肌肉注射的给药途径,但在临床静脉滴注过程中仍应注意避免药液外漏于血管外,以免对肌肉组织产生损伤。

参考文献

- [1] 刘春亮,王 华. 替加环素的研究进展及临床应用 [J]. 安徽医药, 2007, 11(7): 648-650.
- [2] 周澎涛,刘 蕾. 新型静脉用甘氨酸环素类抗菌药替加环素 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(4): 328-332.
- [3] 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2005.
- [4] 梁新丽,廖正根,高秀蛟,等. 注射用盐酸槐定碱对血管刺激性、溶血、过敏性试验研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1890-1891.
- [5] 袁伯俊,廖明阳,李 波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 第一版. 北京: 化学工业出版社. 2007: 242-260.
- [6] 翁谢川,潘 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.