

重组人干扰素 β -1a 注射液制剂安全性研究

高绪聪, 张金晓, 肖宇萌, 张树江, 段蕊, 申秀萍*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: **目的** 检测重组人干扰素 β -1a 注射液的制剂安全性并探讨可能的影响因素。**方法** 分别以重组人干扰素 β -1a 注射液进行家兔肌肉和皮下刺激性试验、豚鼠主动全身过敏性试验、大鼠被动皮肤过敏性试验和体外溶血性试验, 检测药物的局部刺激性、 \square 型过敏反应性和溶血作用。**结果** pH 3.6 的 11、22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 重组人干扰素及其空白溶媒对家兔肌肉和皮肤黏膜具有轻度刺激作用, 相应剂量下 pH 为 4.3 的重组干扰素及其空白溶媒对家兔组织无明显刺激作用; pH 3.5 的 5.5、22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量下重组人干扰素及其空白溶媒对大鼠无被动致敏作用, 对豚鼠主动致敏作用呈强阳性, 辅料中不含人血清白蛋白的样品则对豚鼠无致敏作用; pH 3.5 的重组人干扰素对家兔红细胞具有极轻度体外溶血作用, pH 4.5 样品则无体外溶血和致红细胞凝聚作用。**结论** pH 值对重组人干扰素 β -1a 注射液刺激性和体外溶血性具有一定影响, 应注意对其 pH 值的控制; 干扰素对豚鼠致敏作用为辅料中血清白蛋白所致, 临床使用中对人产生致敏的可能性很小。重组人干扰素 β -1a 注射液制剂安全性较好。

关键词: 重组人干扰素; 刺激性; 过敏性; 溶血性; 制剂安全性

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)04-0380-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.04.007

Safety study of recombinant human interferon β -1a preparation

GAO Xu-cong, ZHANG Jin-xiao, XIAO Yu-meng, ZHANG Shu-jiang, DUAN Rui, SHEN Xiu-ping

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Drug Safety Assessment Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To test the preparation safety of recombinant human interferon β -1a injection and investigate probable influencing factors. **Methods** The study includes rabbit im and sc irritation test, guinea pigs active systemic anaphylaxis test (ASA), rat passive cutaneous anaphylaxis test (PCA), and hemolysis test of recombinant human interferon β -1a injection, and intends to investigate the drug's local irritation, type I allergy, and hemolysis. **Results** Recombinant human interferon (11 and 22 g/kg), and the blank solvent in pH 3.6 had mild stimulation on rabbit muscle, skin, and surrounding tissue, otherwise the corresponding dose for pH 4.3 recombinant interferon and its blank solvent had no stimulation on rabbit tissue. The passive sensitization was negative in the rats administered with 5.5 and 22 g/kg doses of pH 3.5 recombinant human interferon and blank solvent. Meanwhile the guinea pigs had strong positive initiative sensitization with the same doses of pH 3.5 recombinant human interferon which contained human serum albumin, and the human serum albumin free materials had not induced sensitization at all. Recombinant human interferon (pH 3.5) had very mild hemolysis to rabbit erythrocytes *in vitro*, but the pH 4.5 sample had no hemolysis and condensation effect *in vitro* to the rabbit erythrocyte. **Conclusion** The pH value obviously influenced the stimulation and hemolysis *in vitro* of recombinant human interferon β -1a injection, attentions should be paid to controlling the pH value of the preparation. The cause of the active sensitization to guinea pigs is the human serum albumin in preparation's accessories, so the sensitization occurring clinically will be rare. The preparation of recombinant human interferon β -1a injection will be safe in clinic.

Key words: recombinant human interferon; irritation; allergic; hemolysis; preparation safety

多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是一种以中枢神经系统脱髓鞘病变为特征的自身免疫性疾病, 其发病人群以青壮年为主, 尤以女性多见, 在病程中表现出缓解-复发倾向^[1]。复发性多发性硬化

症 (RMS) 是一种中枢神经系统的慢性炎性自身免疫性疾病, 患者往往会出现疲倦、视力衰退、行走不稳、身体麻木、眩晕甚至小便失禁等问题, 严重影响日常生活^[2]。浙江海正药业股份有限公司研发

收稿日期: 2015-03-19

作者简介: 高绪聪 (1982—), 女, 山东青岛人, 助理研究员, 硕士研究生, 从事新药安全性评价研究工作。

*通信作者 申秀萍 Tel: (022)84845266 E-mail: shenxp@tjpr.com

的重组人干扰素 β -1a 注射液临床拟用于治疗 MS 且在过去两年内至少有 2 次复发的患者, 已完成的多项临床前药理毒理研究结果表明其具有很好的开发前景。本试验对重组人干扰素 β -1a 注射液的制剂安全性进行全面评价, 为其临床应用提供参考依据。

1 材料与仪器设备

1.1 实验动物

大耳白家兔, 体质量 2~3 kg, 由北京隆安实验动物养殖中心提供, 生产许可证号 SCXK (京) 2009-0005; Hartley 豚鼠, 体质量 300~400 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号 SCXK (京) 2006-0009; SD 大鼠, 体质量 100~200 g, 由天津市山川红实验动物科技有限公司提供, 生产许可证号 SCXK (津) 2009-0001。所有动物均饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼内, 家兔饲养温度 18~26 °C, 湿度 40%~70%, 换气次数 8~10 次全新风/h, 光照 12 h 明/12 h 暗; 豚鼠和大鼠饲养环境温度 20~26 °C, 湿度 40%~70%, 换气次数 8~10 次全新风/h, 光照 12 h 明/12 h 暗。

1.2 药品和试剂

重组人干扰素 β -1a 注射液 (批号 20101003, 规格 0.5 mL: 22 μ g, pH 3.5; 批号 20110605, 规格 5 mL: 440 μ g, pH 3.6; 批号 20120201, 规格 0.5 mL: 22 μ g, pH 4.5; 批号 20120303, 规格 5 mL: 440 μ g, pH 4.3)、不含人血清白蛋白重组人干扰素 β -1a (批号 20110606, 规格 1 mL: 44 μ g) 样品、含人血清白蛋白空白溶媒 (批号 20110502, 规格 5 mL/支, pH 3.6; 批号 20120302, 规格 5 mL/支, pH 4.3) 及相同规格不含人血清白蛋白空白溶媒 (批号 20110503), 均由浙江海正药业股份有限公司提供; 生理盐水购自河北天成药业股份有限公司; 甲醛购自天津市风船化学试剂科技有限公司; 冰醋酸购自天津市凯信化学工业有限公司; 卵清白蛋白购自 Sigma 公司; 百白破联合疫苗购自成都生物制品研究所。

1.3 仪器

组织自动脱水机 (日本樱花检验仪器株式会社), 组织石蜡包埋机 (德国 Leica), 自动切片机 (日本樱花检验仪器株式会社), 自动封片机 (日本樱花检验仪器株式会社), 自动染色装置 (日本樱花检验仪器株式会社), 普通光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 图像采集系统 (日本 Olympus 公司), 数显

电热培养箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), 恒温培养箱 (Sanyo), 酶标仪 (Tecan)。

2 方法

2.1 家兔肌肉和皮下刺激性试验

大耳白家兔分别经腿部肌肉和胸部皮下按 11 (低剂量组)、22 μ g/kg (高剂量组) 注射给予 pH 3.6 和 pH 4.3 的重组人干扰素连续 7 d, 并以相同途径给予相应空白溶媒 (溶剂对照组), 同时以生理盐水设置生理对照组, 每组家兔 4 只, 雌雄各半。每天观察给药局部刺激反应, 并于末次给药后 4 d 和 14 d 每组剖杀 1/2 动物进行大体解剖和组织病理学检查。

2.2 豚鼠主动全身过敏性试验

豚鼠连续间日 sc pH 3.5 的重组人干扰素 5.5 μ g/kg (低剂量 1 组) 和 22 μ g/kg (高剂量组), 同时以其空白溶媒设置溶剂对照组、以 5.5 μ g/kg 不含人血清白蛋白样品设低剂量 2 组、以 10 mg/mL 卵清白蛋白卵清白蛋白设阳性对照组、以生理盐水设阴性对照组, 每组豚鼠 6 只, 雌雄各半。共致敏 5 次, 末次致敏后 12 d, 于豚鼠前肢静脉一次快速给予 2 倍体积的相应药物进行激发, 观察动物过敏反应症状。

2.3 大鼠被动皮肤过敏性试验

被动过敏性试验组别设置和剂量设计同主动过敏性试验, 其中卵清白蛋白质量浓度为 40 mg/mL。大鼠连续间日 sc 致敏给药 5 次, 同时 ip 百白破联合疫苗, 末次致敏后 12 d, 腹腔采血制备抗体血清。皮内注射不同稀释度抗血清 0.1 mL 进行被动致敏, 被动致敏后 48 h, 静脉快速注射相应药物和伊文思兰染液进行激发, 观察大鼠皮肤蓝斑反应。

2.4 体外溶血性试验

家兔 1 只, 经心脏取血, 制备 2% 红细胞混悬液。pH 3.5 和 pH 4.5 的临床制剂浓度重组人干扰素, 用生理盐水按 1:3 进行稀释备用。供试品管内分别加入 0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mL 重组人干扰素稀释液, 并以去离子水设阳性对照管、以生理盐水设阴性对照管。各管 37 °C 孵育 3 h, 观察管内溶血和红细胞聚集情况; 孵育结束后, 离心, 以酶标仪检测各管吸光度 (A) 值, 计算溶血率, 以溶血率 5% 判断药物是否有体外溶血作用。

溶血率 = (试验管 A 值 - 阴性对照管 A 值) / (阳性对照管 A 值 - 阴性对照管 A 值)

以上试验均参照《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[3]和《治疗用生物制品非临床安全性技术评价指导原则》^[4]的要求进行设计。

3 结果

3.1 重组人干扰素对家兔的局部刺激作用

重组人干扰素 (pH 3.6) 及其溶媒给药组家兔, 给药和恢复期间给药局部肉眼观察和大体解剖均未见明显刺激反应表现。组织病理学检查, 给药后 4 d, 溶剂对照和重组人干扰素高、低剂量组分别有 1 只

家兔腿部肌肉见骨骼肌纤维变性坏死、间质炎细胞浸润, 至给药后 14 d 已无明显异常; 给药后 4 d 和 14 d, 溶剂对照组和重组人干扰素高、低剂量组分别有 1 只家兔胸部皮下及周围组织镜下见散在炎细胞浸润、局部肌纤维变性, 生理对照组家兔未见明显异常。溶剂对照和重组人干扰素高、低剂量组家兔组织病理学改变见图 1。

重组人干扰素 (pH 4.3) 及其溶媒给药组家兔, 给药和恢复期间给药局部肉眼观察、大体解剖和组织病理学检查均未见明显药物刺激反应。

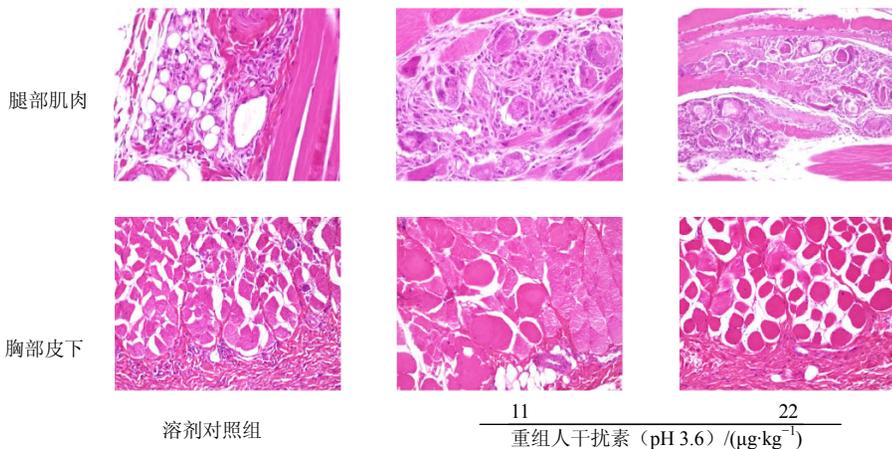


图 1 组织病理学图片

Fig.1 Histopathologic pictures

3.2 重组人干扰素对豚鼠的主动全身过敏反应

阳性对照组、溶剂对照组和重组人干扰素高剂量、低剂量 1 组豚鼠激发给药后出现搔鼻、呼吸困难、紫癜、步态不稳、痉挛等症状, 发生强过敏反应, 死亡率分别为 100%、83.3%、100%、83.3%。空白豚鼠 iv 给予激发剂量的溶剂对照、低剂量 1 组和高剂量组药物, 未出现类似过敏反应症状, 可以

判定以上为过敏反应所致, 而非药物直接毒作用。低剂量 2 组和阴性对照组豚鼠未发生任何过敏反应。各组具体反应情况见表 1。

3.3 重组人干扰素对大鼠的被动致敏作用

除阳性对照组大鼠皮肤蓝斑反应呈阳性外, 其余各组大鼠未发生蓝斑反应, 重组人干扰素对大鼠无被动致敏作用。

表 1 重组人干扰素 β-1a 注射液对豚鼠的主动过敏反应结果 (n=6)

Table 1 ASA results of recombinant human interferon β-1a injection (n=6)

组别	剂量/(μg·kg ⁻¹)	过敏反应动物数/只			死亡率/%	结果判定
		-	+++	++++		
阴性对照	—	6	0	0	0	阴性
溶剂对照	—	0	1	5	83.3	强阳性
卵清白蛋白	10	0	0	6	100	强阳性
重组人干扰素低剂量 1 组	5.5	0	1	5	83.3	强阳性
重组人干扰素高剂量组	22	0	0	6	100	强阳性
重组人干扰素低剂量 2 组	5.5	6	0	0	0	阴性

3.4 重组人干扰素对家兔红细胞的体外溶血作用

重组人干扰素(pH 3.5) 试验管, 孵育期间肉眼观察与阴性对照管一致, 上清澄清无明显溶血现象; 溶液内未见絮状沉淀, 管底沉淀振摇后可均匀分散, 无红细胞凝聚发生。酶标仪测定上清 A 值, 计算溶血率见表 2, 其中管 1 和管 2 溶血率略高于 5%, 为可疑轻度溶血。

重组人干扰素(pH 4.5) 的溶血性检测, 肉眼观察无溶血现象和红细胞凝聚发生; 上清经酶标仪检测, 溶血率均明显低于 5%, 无溶血发生。具体结果见表 3。

表 2 pH3.5 的重组人干扰素 β -1a 注射液溶血性试验结果

Table 2 Hemolysis test results of pH 3.5 recombinant human interferon β -1a injection

试管号	A	溶血率/%
1	0.097	5.90
2	0.104	6.39
3	0.076	4.40
4	0.047	2.46
5	0.014	0.15
6	0.012	0.00
7	1.462	100.00

表 3 pH 4.5 的重组人干扰素 β -1a 注射液溶血性试验酶标仪测定结果

Table 3 Hemolysis test results of pH 4.5 recombinant human interferon β -1a injection

试管号	A	溶血率/%
1	0.009	-0.15
2	0.007	-0.29
3	0.012	0.00
4	0.009	-0.20
5	0.010	-0.08
6	0.012	0.00
7	1.427	100.00

4 讨论

本试验 pH 3.6 组的重组人干扰素 β -1a 注射液及其溶媒, 对家兔肌肉和皮肤黏膜及其周围组织有一定刺激作用; pH 4.3 组的重组人干扰素 β -1a 注射液及其溶媒均对家兔肌肉和皮肤黏膜及其周围组织无刺激作用发生。同时, pH 3.5 的重组人干扰素 β -1a 注射液对家兔红细胞具有可疑轻度体外溶血作用; pH 4.5 的重组人干扰素 β -1a 注射液对家兔红细胞体外溶血和红细胞凝聚作用则均为阴性。以上刺激和溶血试验, 除被检药物 pH 值不同外, 其他各项操作和指标检测完全一致, 结果表明重组人干扰素 β -1a 注射液 pH 值为 3.5 或 3.6 时具有一定的刺激性

和体外溶血作用, pH 值为 4.3 或 4.5 则对给药局部无刺激性、对家兔红细胞不具体外溶血和红细胞凝聚作用, 提示 pH 值为药物产生刺激和溶血作用的原因^[5-7]。

重组人干扰素 β -1a 注射液以人血清白蛋白为主要赋形剂。本试验分别对含有人血清白蛋白和不含人血清白蛋白的样品进行过敏性检测, 发现含有人血清白蛋白的样品及其溶媒可使豚鼠发生强阳性主动过敏反应, 过敏反应的发生无药物特异性。而给予不含人血清白蛋白样品的豚鼠不发生任何过敏反应症状, 可知溶媒和重组人干扰素 β -1a 注射液药物本身对豚鼠无致敏作用。因此推测该制剂过敏原为其赋形剂人血清白蛋白, 而非重组人干扰素 β -1a 药物本身。由于人血清白蛋白对豚鼠为种属异源性蛋白, 可使豚鼠产生严重过敏反应, 人体则极少发生对人源蛋白的严重过敏反应, 因此重组人干扰素 β -1a 注射液在临床应用产生过敏反应的可能性不大。

综上所述, 重组人干扰素 β -1a 注射液的 pH 值对其刺激性和体外溶血作用有明显影响, 制剂生产中需注意对 pH 值的控制; 虽然该制剂对豚鼠具有明显致敏作用, 但药物本身无致敏作用, 过敏反应为其赋形剂人血清白蛋白所致, 对人体发生致敏作用的可能不大。重组人干扰素制剂安全性较好, 推测可能对人无明显刺激、过敏和溶血作用。

参考文献

- [1] 张玉镇, 王运良. 甲泼尼龙冲击治疗急性期多发性硬化症疗效观察 [J]. 中国基层医药, 2013, 20(19): 2929-2930.
- [2] 张秀颖, 白秋江, 李岩峰, 等. 治疗复发性多发性硬化症新药——特立氟胺 [J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1928-1930.
- [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] 治疗用生物制品非临床安全性技术评价指导原则[S]. 2012.
- [5] Antoine J L, Contreras J L, Van Neste D J. pH influence of surfactant-induced skin irritation. A non-invasive, multiparametric study with sodium laurylsulfate [J]. *Derm Beruf Umwelt*, 1989, 37(3): 96-100.
- [6] Sutinen R, Paronen P, Saano V, et al. Water-activated, pH-controlled patch in transdermal administration of timolol. II. Drug absorption and skin irritation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(1): 25-31.
- [7] 关 昕, 解黎雯. pH 值对注射用双黄连中间体溶血凝血的影响 [J]. 基层中药杂志, 2000, 14(2): 13.