

家兔经皮给药安全性评价研究方法的探讨

杨宏博^{1, 2}, 张柏娥^{1, 2}, 杨雪松³, 杨坤芬^{1, 2}, 王京昆^{1, 2*}

1. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111

2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111

3. 云南省中医医院, 云南 昆明 650021

摘要: 近年来, 经皮给药因具有避免肝脏的“首关效应”、保护胃肠道免受药物损伤、血药浓度持久恒定等优势而备受青睐。而药物临床前安全性评价研究对新药临床研究, 以及上市前审批过程中均起重要的作用。以《药物非临床安全性评价指导原则》为依据, 结合多年的研究经验, 从实验动物、剂量设置、给药量的换算、皮肤去毛及破损模型制备、指标评价等多个方面对家兔经皮给药的安全性评价研究方法进行探讨, 为经皮给药的受试药物安全性评价研究提供方法参考。

关键词: 家兔经皮给药; 安全性评价; 药物毒性; 实验动物; 新药审批

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2023) 05-0962-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.005

Discussion of research methods based on transdermal administration safety evaluation in rabbits

YANG Hongbo^{1, 2}, ZHANG Baie^{1, 2}, YANG Xuesong³, YANG Kunfen^{1, 2}, WANG Jingkun^{1, 2}

1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China

2. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China

3. Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China

Abstract: In recent years, transdermal drug delivery system (TDDS) is attractive because of its avoiding liver metabolism, protecting gastrointestinal tract mucosa from drug, stable blood concentration, etc. Nevertheless, drug non-clinical safety evaluation study play an important role in clinical study and NDA. In order to provide reference for research methods of transdermal administration safety evaluation, research methods based on transdermal administration safety evaluation in rabbits were discussed from experimental animal, dose setting, conversion of total dose, depilation and animal model preparation of damage skin, evaluation index and so on, which is according to 'guideline on non-clinical safety evaluation of drug' and many years research experience of ours GLP.

Key words: transdermal administration in rabbit; safety evaluation; drug toxicity; experimental animal; new drug approval

经皮给药系统(transdermal drug delivery systems, TDDS)是药物通过皮肤吸收的一种方法, 经由皮肤吸收进入机体血液循环并达到有效血药浓度、实现预防或治疗疾病一种给药途径^[1]。该给药方法具有避免肝脏的“首关效应”, 保护胃肠道免受药物损伤, 同时还具有血药浓度持久恒定、患者依从性好、生物利用度及安全性高、价格低廉等诸多优势^[2]。未来, TDDS可能会成为继口服、注射给

药之后一种新的研究热点, 同时伴随而来的药物安全性评价研究也将会大幅度增加。

多年以来, 研究者对有明显优势和特点的口服和注射制剂新药的研发相对较多, 其安全性评价方法也更为成熟, 相关文献报道也相对较多。而对于经皮给药途径制剂新药开发相对较少, 同时又因安全性评价研究方法在很大程度上不同于传统的口服制剂和注射剂, 文献中也未系统介绍关于经皮给

收稿日期: 2022-12-02

基金项目: 云南省重大科技专项计划资助项目(2017ZF011)

第一作者: 杨宏博(1981—), 男, 高级工程师, 硕士, 主要从事新药研发和药物安全性评价。E-mail: yanghongboo@126.com

*通信作者: 王京昆(1969—), 男, 正高级工程师, 主要从事药理毒理学。E-mail: wjkyimm@163.com

药安全性评价研究方法的报道。本文主要依据国家食品药品监督管理局2014年5月13日颁布实施的《药物单次给药毒性研究技术指导原则》^[3]、《药物重复给药毒性研究技术指导原则》^[4]和《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[5](下文统称为《指导原则》),并以人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)指导原则^[6]相关要求为参考,再结合笔者多年工作经验,以家兔皮肤给药为切入点,从动物的选择、剂量设置、给药量、皮肤去毛及破损模型的制备、指标评价等多个方面对经皮给药的毒理学试验研究中的方法进行探讨,从而为该受试药物安全性评价研究提供方法参考。

1 实验动物

目前,中国常用实验兔主要有日本大耳白兔、新西兰白兔、青紫兰兔、中国白兔4个品系,其国际上通用的家兔品种为新西兰白兔和日本大耳白兔在试验研究中最为常用^[7]。从动物洁净等级上看,家兔可分为普通级、清洁级和SPF级,我国正在积极推荐和推广使用清洁级家兔,国内科研或检定、检验工作中大部分都已采用,而作为国际标准的SPF家兔,由于饲养成本高,购买价格不菲等原因,在中国还未得到广泛应用^[8]。因此,在开展药物安全性评价研究过程中,应选择厂家具有动物生产许可证和动物质量合格证的清洁级及以上的国际公认品种,以避免获得的实验结果不被业内认可。

对于动物的使用年龄,结合家兔生物学上的特点,除了一些特殊研究目的或儿童、老年用药物外,一般选择4~5月龄性成熟的健康青壮年家兔较为适宜,且在实验开始前确保足够时间的适应性饲养。其中,值得一提的是若要开展1个月以内的重复给药毒性试验时,为保证评价结果的稳定可靠,可考虑选择动物年龄再后延1个月。此外,实践经验表明家兔体质量也是保证实验研究质量的重要因素。一般而言,同龄中较重的家兔对环境及实验操作的适应能力相对较强,且在实验研究过程中也更容易获得可靠的结果,故4~5月龄家兔,体质量3.0 kg左右较为有益于实验研究。

2 剂量设置

在开展试验之前,首先要深入了解受试药物的相关信息,一般包括委托方提供的资料[如受试药物基本情况、配方成分、剂型、药效剂量或人拟用剂量、给药次数、以及该受试药物前期探索性内容(如果有)等]、相关文献(如相关药理学、毒理学等研究报道)。在此基础上,设计并开展样品预配制试

验(如需要)和与安全性评价研究相关的预涂擦或贴敷试验,初步了解受试药物的物理化学特性、毒性情况等信息,综合考虑为相应正式试验的剂量设置提供依据。

在正式试验研究的剂量设置上,由于经皮给药不同于直接给予到动物体内的口服、注射等给药方式,以单位体表面积剂量表示较为直观,同时也更方便各剂量组动物给药量的计算,在实验最后若有必要时,可再辅以体质量剂量表示。另外,对于需要在主试验开展伴随试验研究(如皮肤刺激性、伴随毒代动力学试验等)的,在剂量设置时应结合其因素综合考虑。

3 给药量的换算

在经皮给药试验中,动物的给药量由给药面积与单位体表面积剂量共同确定,并同时与受试药物的毒性直接相关,但在《指标原则》中对两者的要求均无明确规定。因此,在具体的研究中当受试药物的毒性较大时,研究者可依据试验的目的综合平衡给药面积与单位体表面积剂量的关系。而当受试药物的毒性较小或几乎无毒时,可考察动物最大给药面积和最大单位体表面积剂量下的安全性^[9]。对于此情况下的最大单位体表面积剂量可通过受试药物的相关资料或预涂擦试验确定,但动物最大给药面积在《指导原则》中无明确规定。通过查阅文献报道^[10-12],普遍以动物体表面积的10%作为经皮给药的最大给药面积,其主要是依据《化妆品安全技术规范》中关于“染毒部位面积不应小于动物体表面积的10%”^[13]的规定,故本文也以体表面积10%作为开展家兔外用药物毒性研究参考依据。

然而,动物体表面积数据通常不可直接得到,一般利用动物体质量通过计算近似获得。目前,可通过以下2个公式近似获得动物体表面积,分别为经验公式^[10,14]: $A = K \times \sqrt[3]{W^2} \times 10^4$ 和通用公式: $\lg A = 0.8762 + 0.698 \lg(W \times 10^4)$ 。其中 A 为体表面积(cm^2)、 W 为体质量(kg)、 K 为体型系数。

例如:计算1.8 kg标准体质量家兔体表面积($K_{\text{新法}}=0.1014$)^[15]

经验公式: $A = 0.1014 \times \sqrt[3]{1.8^2} \times 10^4 \approx 1500 \text{ cm}^2$ 。

通用公式: $\lg A = 0.8762 + 0.698 \lg(1.8 \times 10^3)$, $A \approx 1407 \text{ cm}^2$ 。

从以上结果可以看出,2个公式计算获得的动物体表面积差异不大。但由于在进行标准体质量不同动物之间等效剂量换算时所查的换算系数(R)

均以经验公式获得,因此建议选用经验公式计算动物体表面积。一般通过公式计算获得的理论给药面积,往往不是整数值,实践经验表明 5 cm^2 的精度可满足家兔皮肤给药的要求。

4 关键技术操作方法

4.1 皮肤去毛

一般动物皮肤表面都长有厚厚的被毛,为了避免动物毛发影响皮肤对受试药物的充分接触和吸收,在开展经皮给药试验研究过程中,首先需要对动物给药部位(通常为背臀部或腹部)进行去毛。

而对于家兔的去毛方法主要包括拔毛法、剪毛法、剃毛法、硫化钠或脱毛膏去毛法等。其中,拔毛法主要用于家兔皮肤小面积快速去毛。当采用剪毛法去毛时,在去毛后的皮肤表面上往往仍残存一层参差不齐的毛茬,使其在一定程度上影响受试药物与皮肤表面有效接触和吸收,同时由于家兔被毛细密而冗长,当进行大面积去毛时,效率相对较低。对于硫化钠和脱毛膏去毛法,具有去除动物被毛相对较为干净和彻底的特点,但其中含有的化学成分对动物皮肤是否存在刺激性或对皮肤毛囊是否会造成微观损伤,或是否因皮肤吸收对机体造成影响,事前很难评估对受试药物的作用存在叠加影响;再者开展的长给药周期实验研究时,当去毛部位再次长出毛新或调整给药面积时,该方法的反复操作还会给试验带来不便。而相比上述各去毛法,剃毛法具有操作简单,去毛效率高且去毛干净彻底,去毛过程中虽对动物皮肤有一定的物理刺激,但有可快速恢复等优点,符合动物数量多、去毛面积大、反复多次、长给药周期等特点的家兔药物安全性评价试验研究要求。

当采用剃毛法^[10-11]去毛时,应尽量轻柔,避免损伤去毛部位皮肤。去毛后使用湿润的毛巾或纱布轻擦去毛部位,擦净附着于皮肤上的被毛。实验开展过程中,若需多次去毛,其频率具体依据是否影响给药和局部皮肤观察,以及动物各体被毛的生长速度而定(通常每周去毛1~2次)。值得注意的是,为了避免去毛操作对皮肤产生机械刺激的影响,皮肤刺激性评价应至少在去毛后的0.5 h。

4.2 皮肤破损模型的制备

在皮肤给药的安全性评价研究中,当需要考察受试药物在破损皮肤上的毒性时,则应首先制备动物皮肤破损模型。对于家兔皮肤破损模型的制备方法,主要有锐器划伤法、铁木梳刮伤法、砂纸打磨法、激光照射法等。其中,针头或刀片等锐器划伤

和铁木梳刮伤法是以适宜力度在去毛部位皮肤上制造破损创口。由于家兔皮肤较薄,操作人员很难把控力度达到《指导原则》中“以损伤表皮层为限”的要求和动物间创口均一性,并对同时需要进行反复破损的试验更难以保证实验质量。激光照射法虽然具有动物痛苦小,操作方便,皮损深度、面积可控等特点,但该方法仅作为治疗烧、烫伤的受试药物皮肤破损的首选方法。而对于砂纸打磨法是制备家兔及其他动物破损皮肤最常用的方法,具体是用砂纸(1 000目左右)以适宜力度、一定方向在家兔皮肤上反复摩擦,至皮肤出现轻微发红即可。由此可见,该方法对操作简单,对破损力度控制要求不高,获得的皮肤破损程度相对可控,且同时适用于需要反复破损的安全性评价试验。

在制备破损皮肤模型过程中,需要注意的是家兔身体抵抗能力相对较弱,消毒不当容易导致破损部位皮肤以及全身性的感染,影响试验结果判断,所以在皮肤破损前,应对家兔饲养环境和破损器具进行消毒;破损时对破损部位皮肤先用75%酒精消毒,待酒精挥发后再进行破损^[14]。另外,若在试验过程中需要多次皮肤破损,应待破损的皮肤基本恢复正常后,再进行重复破损。

4.3 涂敷固定、去药方法

给药前,以涂擦、喷敷、贴敷等方式将药物给予相应面积的动物去毛部位皮肤上,除贴膏类剂型外的其他受试药物涂、敷于皮肤后,其上盖1层柔软覆盖物(破损皮肤上的覆盖物需无菌),如硫酸纸、空白膏药贴等,使用无刺激的胶带固定,再用脖圈固定动物头部,避免动物啃咬覆盖物和进一步舔食受试药物,当脖圈或固定物脱落时,要及时处理(此处只要能避免动物舔食或蹭掉受试药物的操作方法均可使用)。受试药物在动物皮肤上达到涂、敷时间后,应及时取下脖圈和固定物,去除受试药物。一般极性较大易溶于水的受试药物,可用柔性物(如:医用纱布、医用脱脂棉等)蘸取温水清洗(注意去除辅料或赋形剂时,与受试药物分开);极性较小难溶于水的受试药物,可直接用柔性物(如医用脱脂棉、软纸等)反复轻擦,至受试药物擦除干净为止。而对于设置有破损皮肤组动物,为了避免用清水直接擦洗导致动物造成感染,应使用无菌或灭菌的柔性物擦去受试药物,且注意创口部位受试药物的擦除。

4.4 动物采血

在试验研究过程中,当需要检查家兔血常规、

血清生化、电解质、毒代动力学等相关指标时,则首先需要进行采血。然而,家兔体型相对较小,四肢静脉血管较细、弯曲,且充盈不足,相对于犬、猪、猴等体型较大动物而言,采血相对较为困难。依据家兔自身的生理特点和实践工作经验表明,通过采集家兔耳中央动脉血即能同时满足多时间点采血量和血液质量的要求,又符合动物福利。但即便如此,采血操作仍具有一定的难度,其原因是由于家兔血液中纤维蛋白含量较高致凝血较快,同时耳动脉血管较细且弹性较差,当在血管不够充盈时进针或在开始收集血液时的采血管内瞬间负压使针头处血管收缩,从而使血流速度较慢,甚至出现停滞的状态,若此时不及时采取措施,血液很快凝结致采血失败。因此,在操作过程中为了避免以上情况的发生,采血人员应实时关注血流速度,在当血流速度变慢时,及时用手指轻弹家兔耳根部和针头刺入前端动脉血管,待血管充盈,血流速度即可恢复。

另外,需要注意的是家兔循环血液总量相对较少(一般为体质量的4%~7%),当1天的采血总量超过循环血液总量10%时,对家兔正常生理机能会产生一定的影响^[16]。因此依据动物福利要求,在试验研究过程中尽量避免过采或超采行为的发生。

5 评价指标

家兔经皮给药评价指标主要包括一般临床症状、体征、给药局部皮肤刺激性等观察指标,摄食量、体质量、体温、心电、血常规及凝血、血清生化及电解质、胸骨骨髓象等生理学检测指标,组织器官的体积、颜色、质地等外观观察及其病理学检查,以及脏器质量、系数和脏/脑比指标,而一般不进行粪的寄生虫检查和尿检。在选择评价指标上,研究者应以试验目的为出发点,并结合受试药物的作用特点,合理选择观察或检查指标综合评价受试药物的安全性。

但由于体温、心电(ECGII)、血常规及凝血、血清生化及电解质等生理性指标受动物自身的应激反应影响比较大,而家兔对环境及操作更为敏感,因此为了减少应激性对上述指标检测结果的影响,试验前应有足够时间的饲养适应环境和有针对性操作训练,且在操作过程中要尽量轻柔;同时在指标检测时,试验前应至少进行2次,并以后两次结果的平均值作为基础值更具有可靠性。另外,为了保证凝血指标检测结果的准确,采血时应注意采血管的刻度线,因采血管中含有固定量的抗凝剂致使超出或不足均可能影响结果的准确性。在ECGII检查

中,以考查时限指标为主,振幅为辅,其中QT间期校正公式[经验公式 $QTc=QT\text{间期}/\sqrt{RR\text{间期}}$]家兔不同于犬、猴等大动物,值得大家关注。最后,在开展药物安全性评价研究的单次/重复给药毒性试验时,可将毒代动力学和刺激性试验作为伴随试验整合其中,一并考察。

6 结语

非临床安全性评价研究指为评价药物安全性,在实验室条件下用实验系统进行的试验,目的是通过毒理学试验对受试药物的毒性反应进行暴露,以提示其临床安全性,从而降低临床研究安全性方面的风险^[17]。自20世纪30年代出现的“磺胺酞剂”“沙利度胺”“反应停”等多起严重的药物不良反应事件以来,人们开始逐渐认识到药物临床前安全性评价研究的重要性,经过几十年的发展,目前已形成较为完备的方法评价体系。然而,本文所述的经皮给药不同于其他的给药方式制剂,虽然《指导原则》中对各给药方式的受试药物安全性评价研究策略大体相同,但在实验动物种属或品系的选择上,除皮肤刺激性试验外的其他毒理学试验均没有明确规定,因此在进行经皮给药的毒理学研究时,选用大鼠、家兔和(或)小型猪为实验动物,通常可被广大研究者普遍认同。

从可被用于经皮给药3种动物自身特点上看,大鼠有体型较小、来源充足、成本低廉等优势,一般作为啮齿类动物的首选,但具有皮肤组织结构与人类差异较大,实验时要求使用的动物数量多,且同时为了防止动物间舔食致使单笼饲养而有悖于动物群居习性等问题需要考虑。而对于小型猪,虽然其皮肤的功能结构与人类极为相似,近年来用于经皮给药研究也有逐年上升的趋势,但也有成本较高、供应受限、体型偏大、驯化不足等缺点。就目前动物使用的总体情况相比而言,家兔有皮肤薄易于药物吸收,对刺激也更为敏感的特点,同时还具有体型适中、性情温和、来源充足、成本较低、易于驯化和提取等优势,使其在经皮给药的毒理学研究中相对最为广泛,这也是本文以家兔为实验动物进行介绍的主要原因之一。但是,家兔相对脆弱,饲养不当容易死亡,以及个体应激性较高,导致一些生理指标检测结果波动较大等问题,故在选用家兔时应予以注意。另外,经皮给药的具体操作方法与其他给药方式也有许多不同之处。

综上所述,本文以家兔经皮给药安全性评价研究方法为切入点,结合笔者多年来实践经验,对实

验研究过程中可能影响评价质量的关键点进行总结和探讨,为从事经皮给药安全性评价的研究工作者提供方法参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王锐,张贝贝,杨婧,等.经皮给药系统中促渗方法的研究进展[J].中华中医药杂志,2021,36(5):2855-2858.
Wang R, Zhang B B, Yang J, et al. Advances in research progress on promoting penetration methods of transdermal drug delivery system [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(5): 2855-2858.
- [2] 管咏梅,沈倩,许攀,等.中药经皮制剂皮肤毒性的研究进展[J].中华中医药学刊,2022,40(6):14-19.
Guan Y M, Shen Q, Xu P, et al. Research progress on skin toxicity of transdermal preparations of traditional Chinese medicine [J]. Chin Archiv Tradit Chin Med, 2022, 40(6): 14-19.
- [3] 药物单次给药毒性试验技术指导原则[S].2014.
Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of single dose toxicity testing for pharmaceuticals [S]. 2014.
- [4] 药物重复给药毒性试验技术指导原则[S].2014.
Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of repetitive dose toxicity testing for pharmaceuticals [S]. 2014.
- [5] 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S].2014.
Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of irritation, anaphylaxis, hemolysis testing for pharmaceuticals [S]. 2014.
- [6] ICH/M3 (R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals [S]. 2009.
- [7] 郑锦芬,黄芝瑛,周晓冰,等.家兔用于药物生殖发育毒性评价的研究[J].药物评价研究,2022,45(6):1194-1199.
Zheng J F, Huang Z Y, Zhou X B, et al. Research progress in evaluation of drug developmental and reproductive toxicity in rabbit [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(6): 1194-1199.
- [8] 冯仁蕊,周运琴,于晓猛,等.实验用兔饲养管理的探究[J].中国养兔,2020(5):33-35.
Feng R R, Zhou Y Q, Yu X M, et al. Study on feeding and management of experimental rabbits [J]. Chin J Rabbit Farm, 2020(5): 33-35.
- [9] 萧惠来.FDA对皮肤外用活性成分人体最大用量试验的要求[J].药物评价研究,2018,41(10):1753-1758.
Xiao H L. FDA requirements for human maximal usage trials of active ingredients in topical dermatological product [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(10): 1753-1758.
- [10] 杨宏博,叶建州,梅晶,等.紫连膏家兔皮肤重复给药4周毒性研究[J].中医药信息,2022,39(9):8-17.
Yang H B, Ye J Z, Mei J, et al. Toxicity study of Zilian Cream on 4-week repeat percutaneous administration in rabbits [J]. Inform Tradit Chin Med, 2022, 39(9): 8-17.
- [11] 王晓娟,李娟,郑芳昊.活血通络搽剂对新西兰家兔皮肤给药皮肤不良反应研究[J].现代中医药,2020,40(6):15-19.
Wang X J, Li J, Zheng F H. A Study on adverse dermatic reactions of Huoxue Tongluo Liniment on New Zealand rabbit skin [J]. Mod Tradit Chin Med, 2020, 40(6): 15-19.
- [12] 王明建,巨少华,谭友莉.红藤瘀痛洗药的皮肤毒性和安全性研究[J].湖南中医杂志,2018,34(9):164-166.
Wang M J, Ju S H, Tan Y L. Dermal toxicity and safety of Hongteng Yutong Lotion [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2018, 34(9): 164-166.
- [13] 国家食品药品监督管理总局.化妆品安全技术规范[S]. China Food and Drug Administration. Safety and technical standards for cosmetics [S]. 2016.
- [14] 杨宏博,杨雪松,杨坤芬,等.紫连膏家兔破损皮肤重复给药4周毒性研究[J/OL].辽宁中医药大学学报,2022,(2022-09-14)[2023-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.R.20220914.1038.010.html>.
Yang H B, Yang X S, Yang K F, et al. Toxicity study of Zilian Cream on repeat administration for 4 weeks in New Zealand rabbit of damaged skin [J/OL]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, (2022-09-14)[2023-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.R.20220914.1038.010.html>.
- [15] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
Huang J H, Huang X H, Chen Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [16] Diehl K H, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substance and removal of blood, including routes and volumes [J]. J Applied Toxicol, 2001, 21(1): 15-23.
- [17] 孙祖越,周莉.儿科用药非临床安全性评价中方案设计的策略[J].中国新药杂志,2016,25(21):2473-2482.
Sun Z Y, Zhou L. Strategy of study design to non-clinical safety evaluation of paediatric medicines [J]. Chin J New Drugs, 2016, 25(21): 2473-2482.

[责任编辑 李红珠]