

国产药物辅料磺丁基倍他环糊精钠的 注射安全性研究

申 健¹, 孙 涛²

(1.潍坊学院 化学化工与环境工程学院, 山东 潍坊 261061; 2.复旦大学 药学院, 上海 201203)

摘 要 磺丁基倍他环糊精钠(Sulfobutyl beta cyclodextrin sodium, SBCD),作为一种重要的、对多种药物可起包结作用的药用辅料,长期以来受控于国外“Cyclolab”等公司,是我国药物辅料界一款著名的被“卡脖子”的产品。对国产SBCD的注射安全性考察,是重要的破局式研究。分别对国产SBCD的取代度、溶血性、肾上皮细胞毒性,以及其超大剂量静脉注射安全性,进行了系统性研究。相比于原研市售产品,国产SBCD表现出了相当的溶血安全性和肾上皮细胞毒性;且在SD大鼠进行动物水平研究发现,国产SBCD拥有良好的超大剂量静脉注射安全性。研究为国产SBCD突破国外产品封锁和进一步的市场应用提供重要参考依据。

关键词 国产辅料;磺丁基倍他环糊精钠;溶血性;肾毒性;超大剂量注射安全性

中图分类号 R94

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on the Injection Safety of Domestic Medicinal Excipient Sulfobutyl Beta Cyclodextrin Sodium

SHEN Jian¹, SUN Tao²

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Weifang University, Weifang 261061, China;
2.School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract Sulfobutyl beta cyclodextrin sodium (SBCD) can be employed as medicinal excipients for many pharmaceuticals via an inclusion model. However, for a long period, the SBCD production was limited by external incorporations such as Cyclolab, which has been always regarded as a famous “bottleneck” pharmaceutical product. The study on the injection safety of domestic SBCD is an important ice-breaking area. In this work, the substitution degree, hemolysis, renal toxicity, safety of supreme large injection doses of domestic SBCD were studied in detail. Compared with the original marketed product, domestic SBCD show comparable hemolysis and renal safety. Based on the in vivo experiments obtained from SD rats, the domestic SBCD possessed favorable biosafety upon supreme large injection doses. This work will provide important reference for breaching the blockade of foreign products and further marked application of the domestic SBCD.

收稿日期:2021-02-01

基金项目:科技部“科技助力经济2020”重点专项项目(山东省立项列表序号16)资助

通讯作者:孙涛,男,汉族,博士,副教授,研究方向:功能导向的靶向药物递释系统, E-mail: sunt@fudan.edu.cn。

Key words domestic excipient; sulfobutyl beta cyclodextrin sodium; hemolysis; renal toxicity; safety of supreme large injection doses

0 引言

新冠疫情(COVID-19)仍在全球肆虐。2020年5月1日,美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)授予“吉利德科学”公司的抗病毒药物——瑞德西韦以紧急使用权,用于新冠的临床治疗^[1]。SBCD(图1(a))是瑞德西韦的主要成药辅料,在瑞德西韦药物分子制剂化过程中起到了重要的增溶、保护等作用。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的数据,瑞德西韦的12%(重量/体积比)由SBCD构成^[2]。

SBCD是美国“Cydex”公司开发出的倍他环糊精的重要衍生物^[3]。SBCD是由1,4-丁烷磺内酯与倍他环糊精羟基发生取代反应制备,其上市产品的平均取代度为6.2-6.9。SBCD具备良好的水溶性,溶解度超过50 g;其生物稳定性优于母体倍他环糊精;且其对小分子药物的包合力更强;肾毒性更低,溶血性和生物刺激性均较小。因此,SBCD被广泛应用于提高许多小分子药物的注射成药性能^[4]。但SBCD的生产及销售,长期以来被匈牙利Cyclolab公司垄断,是我国一款著名的被“卡脖子”的药用辅料产品。在当今复杂国际形势下,开发、研究和实现国产化的SBCD,显得尤为重要。近年来经过不断努力,国产SBCD的生产制备等有了新突破,特别是国内最大的环糊精类产品生产公司——山东滨州智源生物科技有限公司,在环糊精的基础和应用研究领域有了显著进展。进一步缩小与国外先进辅料产品在各方面的差距,是当前亟待研究的课题。

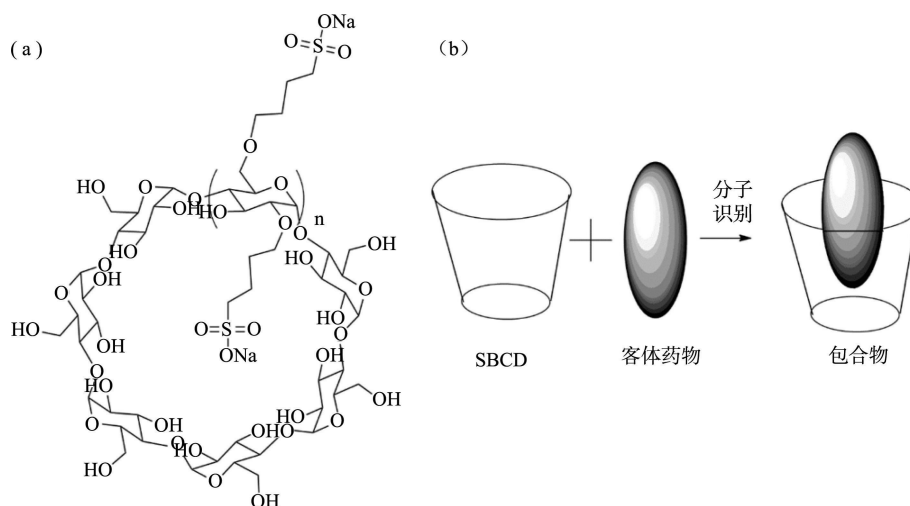


图1 (a)SBCD的化学结构示意图;(b)SBCD与客体药物通过分子识别作用形成包合物的过程

从新药研发角度看,人类使用的药品及辅料都必须经过严格的毒理实验测试,前期需采用动物实验进行安全性评价,以证明其对人体无急、慢性毒性,且无致癌、致病、致畸、致毒、致突变、致残的作用^[4]。SBCD主要通过包合作用增溶和稳定小分子药物,这种超分子主客体式成药形式(一般是1:1的摩尔比,图1(b)),而SBCD分子量一般大于常见小分子药物,这注定在成药过程中SBCD用量相比于其他类型的药用辅料要大得多。加上SBCD可直接用于注射剂型,因此对其毒理学研究是非常有必要的。鉴于国产SBCD仍属于“卡脖子”级产品,其安全性和大剂量注射研究,成为制约其推广的瓶颈,本课题的开展显得尤为重要。

1 材料和方法

1.1 药物、试剂与器械

SBCD为山东滨州智源生物科技有限公司生产,批号SB20200413、SB20200505、SB20200517,生产日期为2020年4-5月,有效期至2022年4-5月。0.9%生理盐水,自配;75%酒精,自配;1 mL注射器;40 mL灌注注射器;大鼠固定笼。

1.2 动物

清洁级 SPF 级 SD 大鼠 25 只, 雄性 13 只, 雌性 12 只。饲养温度: 20-23 °C, 湿度: 50%-60%, 试验前大鼠禁食(不禁水) 12 h。

1.3 SBCD 取代度的测定

利用美国药典中推荐 SBCD 测定标准的毛细管电泳的方法来检测 SBCD 取代度^[5]。具体如流动相: 乙腈: 0.1 M 硝酸钾水溶液(1:4, 体积比); 待检测 SBCD 溶液浓度: 10 mg/mL; 检测器: 示差折光检测器; 检测器温度: 35±2 °C; 分离柱: 7.8 mm×30 cm 分析柱, 填充 L37 填料; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL。

1.4 红细胞悬液的制备

SD 雄性大鼠眼睑取血 3 mL, 3000 r/min 离心 10 min 去除血浆和纤维蛋白原等, 留沉淀红细胞, 再加入 10 倍量的生理盐水, 重复离心步骤, 反复洗涤三次, 至上清液澄清无色, 留得的红细胞沉淀用生理盐水配成 2% 的混悬液, 待用。

1.5 溶血作用测定

用生理盐水分别配置浓度为 10、20、50、100、150 mg/mL 的磺丁基-β-环糊精溶液, EP 管中加入 200 μL 红细胞悬液和 800 μL SBCD 溶液, 摇匀后, 置于 37 °C 中缓慢摇晃 1 h, 将温育好的试管溶液以 3000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液转入 96 孔板中, 用酶标仪读取每个试管溶液的 OD 值, 选择的波长为 545 nm, 阳性对照为蒸馏水, 阴性对照为生理盐水。用下面方程式计算溶血率

$$n = (OD_t - OD_{nc}) / (OD_{pc} - OD_{nc}) \times 100\%$$

其中 OD_t 为受试管吸光度; OD_{nc} 为阴性管吸光度; OD_{pc} 为阳性吸光度。

1.6 细胞培养

HEK-293 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 IU/mL 的双抗(青霉素-链霉素)的 DMEM 培养基, 置于 37 °C, 饱和湿度 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 待细胞汇合度达到 70%-80% 时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代或制成单细胞悬液, 继续培养。

1.7 SBCD 对 HEK-293 细胞存活率的影响

取对数生长期的 HEK-293 细胞制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^3 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 将 96 孔板置于 37 °C, 饱和湿度 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h, 待其贴壁完全后, 每孔分别更换浓度为 150、100、50、20、10 mg/mL 的两个批次和原研 SBCD 培养基溶液, 设置空白孔(无细胞培养基)和对照空(有细胞, 但培养基内不加 SBCD), 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 增强型溶液, 培养箱内培养 1 h, 利用酶联免疫检测仪测定各孔在 450 nm 波长处的光密度 OD 值。则细胞存活率 m 为

$$m = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$$

其中 A_s 为实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、环糊精)的吸光度; A_c 为对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8、无环糊精)的吸光度; A_b 为空白孔(不含细胞和环糊精的培养基、CCK-8)的吸光度。

1.8 高浓度 SBCD 注射液配置

SBCD 注射液现配现用。精确称取 SBCD 25 g, 加入到 30 mL、0.9% 的生理盐水中, 在室温、避光下超声 2 h, 溶解至完全澄清透明状态, 避光储存在 4 °C 冰箱中。

1.9 大鼠的大剂量静脉注射实验

大剂量静脉注射预实验: 先取清洁级 SD 大鼠 4 只, 体重 190-210 g, 雌雄各半。注射前大鼠称重, 利用大鼠固定装置固定大鼠, 75% 酒精消毒尾静脉, 尾静脉注射给药(3000 mg/kg 体重), 每周给药一次, 给药时观察大鼠反应, 给药后观察大鼠行为, 给药 2 次。给药 2 周内观察大鼠生存率。

大剂量静脉注射实验: 取清洁级 SD 大鼠 25 只, 雄性 13 只, 雌性 12 只, 体重 190-210 g。注射前大鼠称重, 利用大鼠固定装置固定大鼠, 75% 酒精消毒尾静脉, 以 1.0 mL/250 g 尾静脉注射 0.9% 生理盐水, 注射速度为 0.5 mL/min, 每周给药 1 次, 给药时观察大鼠反应, 给药后观察大鼠行为, 给药 2 次。给药 2 周内观察大鼠生存率。

1.10 大鼠的大剂量静脉注射后灌流实验

将大鼠以 10% 水合氯醛(0.3-0.4 mL/100 g)或戊巴比妥钠(5-6 mg/100 g)麻醉。切勿麻醉过量, 否则大

鼠可能在灌流前死亡。大鼠麻醉后,沿剑突上剪开 0.5 cm 皮肤,钝性分离,不要随意剪以防出血,出血量过大会直接影响灌流效果。后再剪开皮肤、暴露肌层,而后仍需钝性分离肌层暴露肋骨,用有齿镊将肋骨提起,U 字型剪开、翻起后以血管钳固定,此时心脏暴露,用眼科剪将心尖部剪裂,用平头灌注针从心尖裂处稍用力即刺入左心室,顺势上探,遇脱空感则为入主动脉。灌流前用生理盐水冲洗输液器并排掉气泡。打开输液器后,开始灌注 37 °C 温生理盐水,见右心耳明显充盈后,将右心耳剪开后使血涌出。灌注前 20 s,维持速度 60-80 滴/min,防止初期灌注过快冲破肺部血管致使口鼻出水,使灌流效果不佳;之后控制在 150-180 滴/min,在灌流 400 mL 生理盐水(含 150 μ L 肝素注射液)后,后迅速换上 4 °C 的多聚甲醛(4%)生理盐水溶液,约 20-40 s 内可见大鼠全身明显抽动,约 30-60 s 后渐止,多聚甲醛灌注应先快后慢,前 3-5 min 以同生理盐水的速度灌,而后可控制于 60-90 滴/min,灌流结束后需将组织取出,置于 4 °C 的多聚甲醛(4%)生理盐水溶液中后固定 24 h,之后石蜡切片并利用苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色,利用显微镜观察 HE 染色结果。

2 结果和讨论

2.1 SBCD 取代度研究

倍他环糊精是由 7 个 D-吡喃葡萄糖构成的环状低聚糖,每个葡萄糖残基上有 3 个可被取代的羟基(分别是 1、2、6 位),而 SBCD 是由倍他环糊精作为反应原料,在碱性条件下,羟基被 1,4-丁烷磺酸内酯烷基化的钠盐^[6]。因此,不同的投料比、加料顺序和反应温度等条件不同,会导致 SBCD 的取代度有区别。随着 SBCD 取代度的不同,其包含性能、稳定性,乃至下游溶血性、安全性等参数或性能也均会不同^[7]。我们利用毛细管电泳的方法,检测了原研和国产 SBCD 的取代度的差别。由图 2 结果可以看出,原研和国产 SBCD 的取代度差别不大,峰形略有细微差异,峰值取代度均在 7 左右。因此理论上,原研和国产 SBCD 对同一小分子药物的包含性能差别不大。

2.2 溶血性

环糊精类衍生物在用于注射给药辅料时,安全性是需考虑的第一因素。尽管 FDA 已经批准其在食品和药品中的应用,但在内部报告中仍提到:考虑到环糊精类衍生物溶血性,对其参与的注射剂型需额外慎重^[8]。红细胞破裂,血红蛋白逸出称为红细胞溶解,简称溶血。溶血指标是辅料用于注射剂型前一个非常重要的参考依据^[9]。在辅料生物相容性测试时,如出现严重溶血行为,则该测试辅料不能用于注射剂型。根据《药物非临床研究质量管理规范》,辅料的溶血性测试遵循随机、对照、重复的原则来进行,观察测试辅料对受试动物红细胞的影响。

SBCD 浓度小于 50 mg/mL 时,试管红细胞全部下沉,上清液呈现无色澄明状态,无溶血现象出现。浓度为 100、150 mg/mL 时,溶液呈淡红色,管底有红细胞残留。国产批号 SB20200413、SB20200505、原研组浓度为 150 mg/mL 时,溶血百分比分别为 13.7%,16.3%,14.5%。结果如下。

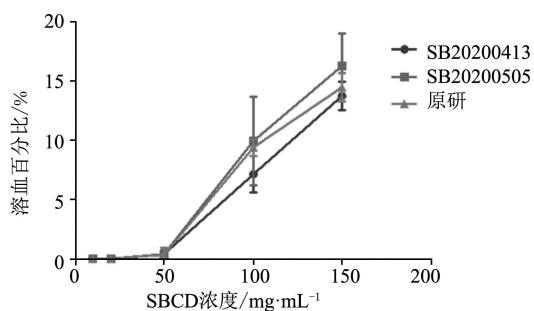


图3 不同浓度的 SBCD 浓度的溶血百分比

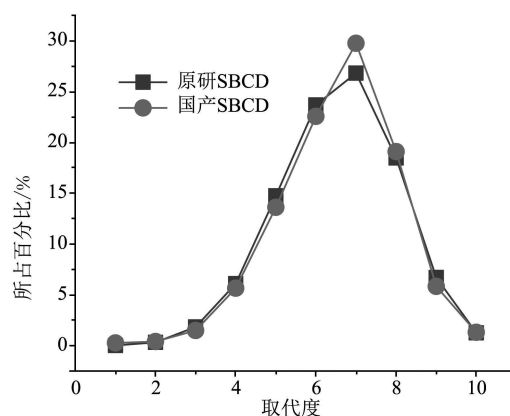


图2 原研和国产 SBCD(批号 SB20200413) 的取代度比较结果

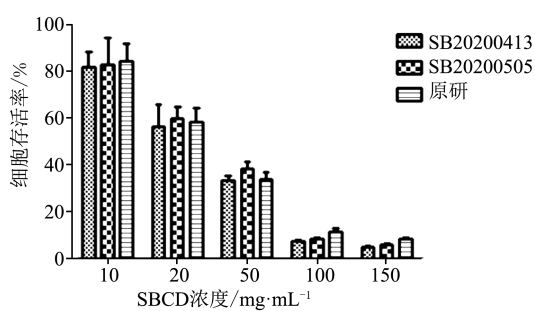


图4 不同浓度的 SBCD 的细胞存活率

智源提供的两批 SBCD 产品在 50 mg/mL 时,仍展现了令人满意的有限溶血行为。与原研相比,所有

数据点均无统计学差异。SB20200505 批次,溶血性能甚至优于原研产品。该实验初步为智源 SBCD 产品,可用于注射剂辅料提供了进一步佐证。

辅料的本身性质、杂质、pH、无机盐(引起渗透压变化)等均可能导致溶血,本实验的进行,验证了智源提供的两批 SBCD 产品在以上指标中均不亚于原研产品。

2.3 肾毒性

人胚胎肾细胞 293(HEK-293),是一个衍生自人胚胎肾细胞的细胞系。对 HEK-293 的细胞毒性进行研究,可用于初步表征药物辅料对人体正常组织、特别是肾组织的生理毒性^[10]。三组细胞存活率随 SBCD 浓度升高逐渐降低,SBCD 浓度 10 mg/mL 时,孵育 24 h 后细胞存活率大于 80%,各组之间的细胞存活率并未存在显著差异(图 4)。

智源提供的两批 SBCD 产品在 10 mg/mL 时,HEK-293 细胞仍有 80%以上存活,证明了其较低的细胞毒性。与原研相比,所有数据点均无统计学差异。该实验初步为智源 SBCD 产品,在用于注射剂辅料时,不会造成生理毒性提供了进一步佐证。

2.4 超大剂量注射安全性

SBCD 可作为增强生物相容性、络合剂、增溶剂、渗透剂、稳定剂、片剂或胶囊剂的稀释剂、粘度增加剂和降低水的活性等,用于注射剂、口服固体制剂、眼用制剂、鼻内制剂、吸入剂和外用制剂,还可以作为渗透压剂或增溶剂用于控制制剂等。

因为 SBCD 分子量较大,所包裹的药物一般都是小分子化合物,一般是 1:1 应用进行包合^[11]。因此,如果后期进行静脉给药的话,环糊精的用量会比真正的发挥疗效的药用量大的多。因此,对 SBCD 的生物安全性,特别是大剂量注射的安全性考察,显得尤为重要^[12]。因此本项研究中,选取了超大剂量的 SBCD 剂量(3000 mg/kg 体重,远远大于常规注射所需浓度)^[13],直接注射进动物体内观察动物的生存和主要脏器变化。如此剂量被证实安全,可顺延推测低于此剂量的 SBCD 的生物安全性也是良好的。综合前期实验中发现的优秀的耐溶血性,可结合在一起得到 SBCD 大剂量注射的安全性良好的结论。

表 1 大鼠静脉注射大剂量给药预实验结果

观察项目	肤色、毛色	呼吸	眼鼻口腔分泌物	行为活动	行为学	死亡
结果	正常	正常	正常	正常	注射时尖叫	无

表 2 大鼠静脉注射大剂量给药正式实验结果

观察项目	肤色、毛色	呼吸	眼鼻口腔分泌物	行为活动	行为学	死亡
结果	正常	正常	正常	正常	注射时明显躁动、尖叫	无

第 1 周给药:25 只大鼠第一次给药完毕后,3000 mg/kg 体重。尾静脉打药时大鼠比较暴躁,可能与浓度大时有一定渗透压刺激性有关。生存率 100%。给药后大鼠正常进食饮水,无反常现象。

第 2 周给药:尾静脉打药时大鼠仍然比较暴躁。生存率仍是 100%。大鼠体重稳步上升,24 h 内监测体温,无显著性变化。但是需要注意的是:6 只大鼠(24%)给药尾部部位出现红肿、皮肤轻度溃烂现象。

第 3 周给药:尾静脉打药时大鼠比较暴躁。生存率仍是 100%。大部分大鼠体重稳步上升,24 h 内监测体温,无显著性变化。给药后大鼠尾部出现轻微颤抖现象。

20 只大鼠(80%)给药尾部部位出现红肿、皮肤轻、中度溃烂现象。因此可以认为,磺丁基-β-环糊精钠生物相容性良好,即时是超大剂量下也不会出现死亡现象。但是超大剂量下 SBCD 会导致给药溶液胶体渗透压上升,致使给药部位有一定刺激性,在用药时需要注意少量多次、低渗溶液配制药物等操作。经动物伦理委员会动物福利准则评估,给药 3 次后,如再次给药会导致动物较强疼痛感,不适合继续给药,因此将给药次数停留在 3 次。以上结果均表明 SBCD 静脉给药安全度较大,为注射用药的包合辅料的临床应用提供了参考依据。

环糊精本身是有淀粉经酶发酵所得,属于典型的低聚糖结构。某些细菌(如大肠杆菌),有可能利用环糊精或其衍生物作为碳源,进行繁殖,因此热源是环糊精系列产品的重要控制指标。本实验中,给药前后大鼠体温均无明显变化,证明智源生产的 SBCD 热原控制良好。

给药周期结束后,大鼠麻醉后分别经生理盐水和 4%多聚甲醛灌流,包括心肝脾肺肾等主要脏器解剖切

片后,经 HE 染色结果如下。经分析,主要脏器无明显异常现象(图 5)。

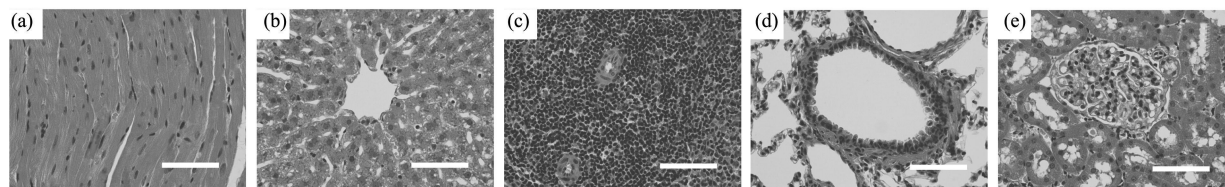


图 5 超大剂量 SBCD 尾静脉给药(批号 SB20200517)三周后主要脏器的 HE 染色处理结果(放大 400 倍),
(a)-(e)分别为心、肝、脾、肺、肾(比例尺为 25 μm)

3 结论

进一步发展我国“卡脖子”的技术,是当前国内科研界孜孜不倦追求的目标。SBCD 作为一种在药物制剂领域需求量巨大,效果良好的材料,其国产化的目标,在当今科研和国际形势下显得尤为迫切,而制剂材料的安全性为首要考虑因素^[13]。本文对国产的 SBCD 的取代度、溶血行为、对肾上皮细胞毒性,以及超大剂量静脉注射安全性等关键数据和指标进行了评估。我们研究发现,山东滨州智源生物科技公司,作为国内环糊精生产和应用领域的领军者,其生产的 SBCD 的安全性能指标上,基本已达到或超过了 Cydex 公司原研水平,这为打破国外公司对该关键产品的垄断,奠定了重要基础。

参 考 文 献

- [1] RUBIN D, CHAN-TACK K, FARLEY J, et al. FDA approval of remdesivir—a step in the right direction[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383:2598-2600.
- [2] DRAKSLER P, MIKAC U. The impact of molecular mass and tablet composition[J]. *Acta Pharmaceutica*, 2020, 71(2):25-33.
- [3] KUMAR S V, POLICE A, PANDEY P, et al. Optimization of sulfobutyl-ether-beta-cyclodextrin levels in oral formulations to enhance progesterone bioavailability[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 12:208-212.
- [4] DRAKSLER P, MIKAC U, LAGGNER P, et al. Polyethylene oxide matrix tablet swelling evolution; The impact of molecular mass and tablet composition[J]. *Acta Pharmaceutica*, 2020, 71(2):215-243.
- [5] CALTABIANO A M. Quantitation of sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin (Captisol (TM)) in Vestipitant IV solution by liquid chromatography with ultraviolet (UV) detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 118:276-283.
- [6] MA D-Y, ZHANG Y-M, XU J-N. The synthesis and process optimization of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin derivatives, *Tetrahedron*, 2016, 72(22):3105-3112.
- [7] ANRAKU M, HIRAGA A, IOHARA D, et al. Slow-release of famotidine from tablets consisting of chitosan/sulfobutyl ether beta-cyclodextrin composites[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 487(1/2):142-147.
- [8] HUANG X X, ZHOU C L, WANG H, et al. Pharmacokinetics, efficacy, and safety evaluation of docetaxel/hydroxypropyl- sulfobutyl-beta-cyclodextrin inclusion complex[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(2):665-672.
- [9] DA SILVA E, SHAHGALDIAN P, CPLEMAN A W. Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 273(1/2):57-62.
- [10] WANG H, XIE X, ZHANG F, et al. Evaluation of cholesterol depletion as a marker of nephrotoxicity in vitro for novel beta-cyclodextrin derivatives[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(6):1387-1393.
- [11] RAMESH K V R N S, YADAV H K S, SARHEED, et al. Characterization of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin binary and ternary inclusion complexes of loratadine[J]. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2020, 14(4):634-644.
- [12] WANG M, JIANG J, CAI Y, et al. In vitro and in vivo evaluation of a posaconazole-sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin inclusion complex [J]. *Biomedical Chromatography*, 2018, 32(12):e4364.
- [13] DONALISIO M, ARGENZIANO M, RITTA M, et al. Acyclovir-loaded sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin decorated chitosan nanodroplets for the local treatment of HSV-2 infections[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 587:119676.
- [14] LUKE D R, TOMASZEWSKI K, DAMLE B, et al. Review of the basic and clinical pharmacology of sulfobutylether- β -cyclodextrin (SB-ECD)[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 99(8):3291-3301.