

聚乙二醇修饰重组人血管内皮抑制素对 BALB/c 小鼠自主活动和协同睡眠的影响

耿兴超¹, 吴非², 王超¹, 彭茜¹, 李波^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全性评价北京市重点实验室, 北京 100176
2. 清华大学生命科学学院, 抗肿瘤蛋白质药物国家工程实验室, 北京 100084

摘要: **目的** 根据新药申报要求, 研究聚乙二醇修饰重组人血管内皮抑制素 (M2ES) 对小鼠自主活动和协同睡眠的影响, 以确定其可能关系到人安全性的非期望药理作用。 **方法** 120 只 BALB/c 小鼠, 随机分为 4 组: 对照组和 M2ES 低、中、高剂量组, 分别单次尾 iv 氯化钠注射液和 6、12、24 mg/kg 的 M2ES 注射液。测定给药前和给药后 15、60、120、240、360 min 小鼠 5 min 内的自发活动次数, 以及对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的影响。 **结果** 与对照组比较, M2ES 低、中、高剂量组在给药前后各时间点小鼠的自主活动次数以及睡眠发生率均差异不显著。 **结论** M2ES 在 24 mg/kg 及其以下剂量下对小鼠自主活动无显著性影响, 与阈下催眠剂量的戊巴比妥钠无明显协同催眠作用。

关键词: 聚乙二醇修饰重组人血管内皮抑制素; BALB/c 小鼠; 自主活动; 协同睡眠; 戊巴比妥钠

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)04-0585-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.04.013

Effects of polyethylene glycol modified recombinant human endostatin on spontaneous activity and synergy sleep of BALB/c mice

GENG Xing-chao¹, WU Fei², WANG Chao¹, PENG Qian¹, LI Bo¹

1. Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100176, China
2. National Engineering Laboratory for Anti-tumor Protein Therapeutics, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Objective To investigate the effects of polyethylene glycol modified recombinant human endostatin (M2ES) on spontaneous activity and synergy sleep of BALB/c mice according to the requirement of new drug registration and application, and to assess the potential unexpected pharmacology effects on human. **Methods** Totally 120 BALB/c mice were divided into four groups: control group, M2ES low, medium, and high dose groups randomly, injected with sodium chloride injection and M2ES injection (6, 12, and 24 mg/kg), respectively. The number of spontaneous activity of the mice in 5 min before and 15, 60, 120, 240 and 360 min after treatment was determined, and the effects on hypnosis with pentobarbital sodium of subthreshold dose were also investigated. **Results** No significant difference in the number of spontaneous activity and sleep incidence between M2ES groups and control group in mice were observed. **Conclusion** M2ES has no significant effects on the spontaneous activity and hypnosis with pentobarbital sodium in mice at the dose of 24 mg/kg and below.

Key words: M2ES; BALB/c mice; spontaneous activity; synergy sleep; pentobarbital sodium

聚乙二醇修饰重组人血管内皮抑制素 (简称 M2ES) 是一种长效抗新生血管生成药物。通过基因操作, 在内皮抑制素 (endostatin) N 末端加入一

个蛋氨酸, 并对其进行了单一聚乙二醇修饰, 质量分数在 98% 以上。M2ES 在代谢上比血管内皮抑制素具有更高的稳定性和更长的体内半衰期, 可长时

收稿日期: 2016-03-20

基金项目: 十二五“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09302001)

作者简介: 耿兴超, 副研究员, 博士, 研究方向为药物安全性评价。Email: gengxch@nifdc.org.cn

*通信作者 李波, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药物安全性评价。Email: libo@nifdc.org.cn

间维持蛋白药物在血液中的有效治疗浓度, 无需进行频繁的注射或点滴^[1]。动物实验发现, M2ES 具有抑制血管内皮细胞迁移和小鼠肿瘤生长的活性, 与人血管内皮抑制素比较, 活性明显提高。体内药代学研究表明, M2ES 能有效的减缓药物在体内的代谢, 延长体内半衰期。与市场上同类产品比较, 可以明显减少用药频率, 降低用药成本, 减轻病人的经济负担。

因此, 本实验根据新药申报的要求, 开展 M2ES 的一般药理学研究, 通过给 BALB/c 小鼠单次 iv M2ES, 观察供试品对小鼠自主活动和协同睡眠的影响, 以确定供试品可能关系到人安全性的非期望药理作用, 评价供试品在毒理学研究中的不良反应或病理生理作用^[2]。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

M2ES 注射液 (批号 M2070120, 规格 5 mL/瓶, 北京普罗吉生物科技发展有限公司); 氯化钠注射液 (批号 20060121, 北京紫竹药业有限公司); 戊巴比妥钠 (批号 WS20051129, 国药集团化学试剂公司)。

1.2 主要仪器

小鼠自主活动监测系统 (日本 Muromachi Kikai 公司)。

1.3 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 120 只, 雌雄各半, 6~7 周龄, 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2012-0001。饲养于 PC 聚碳酸酯鼠盒, 饲养室条件控制要求: 温度 20~25 °C, 日温差 ≤ 3 °C; 湿度 40%~70%; 换气次数每小时 10~20 次; 照明时间每天 12 h。

2 方法

2.1 分组及给药

检疫 7 d 后, 将 120 只小鼠按体质量随机分为 4 组: 对照组和 M2ES 低、中、高剂量组, 每组 30 只, 雌雄各半。其中每组 10 只用于小鼠自主活动次数测定, 另外 20 只用于协同睡眠影响的研究。M2ES 给药剂量分别为 6、12、24 mg/kg, 其中 M2ES 24 mg/kg 剂量按体表面积换算约为临床人拟用剂量的 5.27 倍。使用 1 mL 无菌注射器进行小鼠尾 iv, 单次给药, 给药体积为 10 mL/kg。对照组给予等体积的氯化钠注射液。

2.2 临床症状观察

在检疫期及给药当天的给药前后, 参照“化学药物一般药理学研究技术指导原则”的要求, 分别观察动物的呼吸情况、运动功能、反射情况、眼睑指征、心血管指征、唾液分泌情况等, 及时记录动物的异常症状反应, 直至症状反应消失。

2.3 对小鼠自主活动次数的影响

对照组及 M2ES 低、中、高剂量组每组取 10 只小鼠, 使用小鼠自主活动监测系统分别测定给药前和给药后 15、60、120、240、360 min, 小鼠在各个时间点 5 min 内的自主活动次数^[3]。为了保证组别及动物性别的均衡性和结果的准确性, 40 只动物在每个时间点均分成 5 轮测定, 每轮 8 只 (4 个剂量组, 每组雌雄各 1 只), 各组内按照动物编号从小到大的顺序依次进行测定, 测定前所有动物均预先环境适应 5 min。

2.4 对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的影响

正式试验前进行预试验, 确定戊巴比妥钠阈下催眠剂量约为 30 mg/kg, 即 80%~90% 小鼠翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大阈下剂量。对照组及 M2ES 低、中、高剂量组每组取 20 只小鼠, 给药 15 min 后, 各组动物均 ip 30 mg/kg 戊巴比妥钠, 记录 30 min 内入睡动物数 (即翻正反射消失达 1 min 以上者), 试验期间保持环境安静。通过比较对照组与给药组入睡动物数之间的差异, 判断 M2ES 对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的影响^[4]。

2.5 统计学处理

小鼠自主活动试验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间的比较, 首先用 Bartlett 方法进行数据均一性检验, 然后进行方差分析 (F 检验), 最后使用 Dunnett 参数检验法进行多重比较检验。在小鼠协同睡眠试验中, 入睡动物数为计数资料, 用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对小鼠临床症状的影响

检疫期及给药当天的给药前后, 对照组和给药组全部动物的呼吸情况、运动功能、反射情况、眼睑指征、心血管指征和唾液分泌等与神经系统、呼吸系统和心血管系统相关的临床症状观察结果均未见异常。

3.2 对小鼠自主活动次数的影响

在给药后不同观察时间点, 各给药组小鼠在 5 min 内的自主活动次数与对照组比较, 均差异不显著。结果见表 1。结果表明, M2ES 注射液在 24 mg/kg 及其以下剂量对小鼠自主活动无显著性影响。不同

个体小鼠之间的活动数差异较大,此外,与给药前比较,各剂量组小鼠给药后的自主活动次数呈下降趋势,可能是因为动物经过多次测定已逐步适应环境,探究行为减少。

3.3 对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的影响

ip 戊巴比妥钠后 30 min 内,对照组、M2ES 低、中、高剂量组分别有 2/20、2/20、4/20 和 4/20 小鼠

进入睡眠,尽管中、高剂量组与对照组比较睡眠率略有增加,但差异不显著,结果见表 2。结果提示,M2ES 注射液在 24 mg/kg 及其以下剂量与阈下催眠剂量的戊巴比妥钠无明显协同催眠作用。

4 讨论

本研究在 GLP 条件下使用 6~7 周龄 BALB/c 小鼠,分别单次尾 iv 6、12、24 mg/kg 的 M2ES 注

表 1 M2ES 对小鼠自主活动的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects on independent activity of mice after M2ES administration ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药前	自主活动次数/次				
			给药后 15 min	给药后 60 min	给药后 120 min	给药后 240 min	给药后 360 min
对照	—	791.0±330.5	518.3±339.1	506.2±318.2	640.9±287.4	716.8±379.4	531.4±369.2
M2ES	6	865.0±215.7	612.1±271.9	662.7±303.3	590.3±261.9	624.1±286.3	410.3±382.4
	12	944.0±121.8	751.6±394.4	807.9±460.1	749.8±269.9	906.3±315.4	638.9±407.2
	24	974.1±136.9	767.2±299.7	836.9±549.0	890.9±389.1	883.4±374.1	735.1±358.1

表 2 M2ES 对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effects on hypnosis with pentobarbital sodium of subthreshold dose on mice after M2ES administration ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	睡眠动物数/只	睡眠率/%
对照	—	2	10
M2ES	6	2	10
	12	4	20
	24	4	20

射液。结果表明,在 24 mg/kg 及其以下剂量对小鼠自主活动无显著性影响,与阈下催眠剂量(30 mg/kg)的戊巴比妥钠无明显协同催眠作用,提示 M2ES 24 mg/kg 及其以下剂量对小鼠神经系统无显著性影响,具有较好的安全性。

内皮抑制素是一种文献广泛报道的内源性血管再生抑制因子,1997 年由 O' Reilly 发现^[5]。尽管在结构功能和分子机制上开展了大量的研究,但其临床效应却出现了很大的变化^[6]。毕赤酵母表达的内皮抑制素由于疗效差和生产方面问题在 II 期临床时以失败告终^[7];然而大肠杆菌表达的内皮抑制素 YH-16 则通过了我国国家食品药品监督管理局(CFDA)的批准,具有较好的临床疗效^[8]。对毕赤酵母和大肠杆菌表达的内皮抑制素进行结构差异分析,结果发现,几乎 93% 毕赤酵母表达的内皮抑制素出现了结构断裂,并丧失与锌的结合能力,从而

导致其稳定性和抗肿瘤活性下降。而大肠杆菌表达的内皮抑制素则具有完整的结构和良好的抗血管生成活性^[9]。因此,本研究中使用的 M2ES 是大肠杆菌表达的内皮抑制素,并且通过末端聚乙二醇化处理,显著的延长了 M2ES 在体内的半衰期,减少了临床的给药次数,对于减轻病人经济负担和精神负担具有很大的作用。

M2ES 发挥活性的机制在于它直接作用于肿瘤组织的血管内皮细胞,通过抑制血管内皮细胞的生长,抑制肿瘤组织附近新生血管的生成,使得肿瘤组织得不到生长所必需的大量营养和氧气,最后停止生长或坏死。因此,M2ES 具有明确的靶向性。此外,结合其他毒理学试验研究发现,在食蟹猴的心电图和血压连续监测中也未见 M2ES 相关的心血管系统方面的毒性反应^[10]。

综上所述,M2ES 在 24 mg/kg 及其以下剂量对小鼠自主活动无显著性影响,与阈下催眠剂量的戊巴比妥钠无明显协同催眠作用。该研究数据与急性毒性、长期毒性、制剂安全性等数据一起支持了 M2ES 的临床资料申报,并通过 CFDA 批准进入 I 期临床试验研究,用于治疗非小细胞肺癌。

参考文献

- [1] Nie Y, Zhang X, Wang X, *et al.* Preparation and stability of N-terminal mono-PEGylated recombinant human endostatin [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17(4): 995-999.
- [2] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 治疗用生物

- 制品非临床安全性技术审评一般原则. 2007.
- [3] 章元沛. 药理学实验 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 44.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 657-658.
- [5] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.
- [6] Fu Y, Tang H, Huang Y, *et al.* Unraveling the mysteries of endostatin [J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(6): 613-626.
- [7] Whitworth A. Endostatin: are we waiting for Godot? [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(11): 731-733.
- [8] Cui C, Mao L, Chi Z, *et al.* A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of Endostar in patients with metastatic melanoma [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(7): 1456-1463.
- [9] Fu Y, Luo Y. The N-terminal integrity is critical for the stability and biological functions of endostatin [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(30): 6420-6429.
- [10] Guo L, Geng X, Chen Y, *et al.* Pre-clinical toxicokinetics and safety study of M2ES, a PEGylated recombinant human endostatin, in rhesus monkeys [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2014, 69(3): 512-523.