

重组人促红素注射液(CHO细胞)食蟹猴重复给药毒性试验研究

吴玉娥[#], 贾欢欢[#], 李云峰, 李航, 高洪彬, 龚宝勇, 罗挺, 刘晓霖, 梁十, 黄仁, 凌雪莹, 郭扬清, 麦冬梅, 刘婵, 曾业文, 梁金强^{*}, 关业枝^{*}

广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广东广州 510663

摘要: 目的 研究重组人促红素注射液(CHO细胞)对食蟹猴的长期毒性, 预测各组织器官的潜在毒性反应。方法 18只普通级成年食蟹猴根据体重随机分为阴性对照组(生理盐水)和重组人促红素注射液(CHO细胞)低(每周500 IU/kg)、高剂量(每周1500 IU/kg)组, 每组6只, 雌雄各半; 受试品经后肢大腿外侧sc注射给药, 每周3次, 连续4周; 给药结束后, 每组处死4只动物(雌雄各半), 其余动物停药后进行4周恢复期观察; 观察指标包括动物外观体征、行为活动、精神状态等情况, 并进行体重、体温、眼科、心电图、血常规、凝血指标、血生化、免疫细胞检测及组织病理学检查。结果 在8周观察期内, 各组动物外观体征、行为活动、精神状态、体重、体温、眼科、心电图、凝血指标、血生化、大体解剖等均未见异常; 血常规检查发现, 与阴性对照组比较, 受试品低、高剂量组红细胞(RBC)、网织红细胞(RET)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板数(PLT)给药后显著升高($P < 0.05$), 淋巴细胞数(LYMPH)显著降低($P < 0.05$), 停药4周后RET、PLT及LYMPH恢复正常水平, 而RBC、HGB及HCT仍维持较高水平; 免疫细胞检查发现, 与阴性对照组比较, 给药4周后高剂量组CD3⁺T细胞比例显著减少, 4周后恢复正常水平; 病理检查发现, 高剂量组3只动物出现股骨髓轻度红系增生。结论 给予食蟹猴每周1500 IU/kg(相当于10倍临床剂量)重组人促红素注射液(CHO细胞)未发现明显毒性反应, 血常规指标及病理学的改变与其药理作用相关。

关键词: 重组人促红素注射液(CHO细胞); 食蟹猴; 重复给药毒性试验;

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)07-1289-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.07.013

Study on repeated administration toxic effect of recombinant human erythromycin injection (CHO cells) in cynomolgus monkey

WU Yu'e, JIA Huanhuan, LI Yunfeng, LI Hang, GAO Hongbin, GONG Baoyong, LUO Ting, LIU Xiaolin, LIANG Shi, HUANG Sa, LING Xueying, GUO Yangqing, MAI Dongmei, LIU Chan, ZENG Yewen, LIANG Jinqiang, GAUN Yezhi

Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China

Abstract: Objective To study the four week repeated dose toxicity of recombinant human erythromycin injection(CHO cells) in cynomolgus monkey. **Methods** Eighteen monkeys were randomly divided into three groups (six each, half male and half female) to receive the dose of 0, 500, 1500 IU/kg of EPO by sc injection three times a week for four weeks. On dosing termination, one third of the animals in each group were left to observe four weeks recovery. Daily observation of animal appearance and sign, behavior and mental state were carried out. And body weights, body temperature, ophthalmology, ECG, hematology, clinical chemistry, T lymphocyte subset and histopathology were examined in different points in administration period and recovery period. **Results** No abnormalities were found in the examinations of clinical symptoms, body weight, body temperature, ophthalmology, ECG, coagulation index, clinical chemistry and gross anatomy. RBC, RET, HGB, HCT and PLT were observed significantly increased and LYMPH obviously decreased in high and medium dose groups after four weeks dosing as compared to control group. RET and PLT returned to normal level and RBC, HGB and HCT remained at a high level after four weeks recovery. The proportion of CD3⁺T cells

收稿日期: 2020-01-18

基金项目: 广东省科技计划项目(2017B020231001, 2017A070701003, 2017A070702001)

[#]共同第一作者: 吴玉娥, 女, 副主任药师, 研究方向为疾病动物模型制作及药物非临床评价研究。E-mail: wye@gdlami.com

贾欢欢, 男, 助理研究员, 研究方向为疾病动物模型制作及药物非临床评价研究。E-mail: jhh@gdlami.com

^{*}通信作者: 关业枝, 女, 研究员, 研究方向为药物非临床评价研究。E-mail: 331665249@qq.com

梁金强, 男, 高级工程师, 研究方向为药物非临床评价研究。E-mail: 267151490@qq.com

decreased significantly in high dose groups and returned to normal level after 4 weeks recovery, the mild erythroid hyperplasia of femur were observed in high dose group in three animals after 4 weeks dosing on histopathology examination. **Conclusion** The dose of 15 00 IU/kg of Recombinant human erythromycin injection (CHO cells) for 4 weeks shows no obvious toxic effect in cynomolgus monkey. The changes of hematology and pathology are related to their pharmacological effects.

Key words: Recombinant human erythromycin injection (CHO cells); cynomolgus monkey; toxicology; repeated administration toxicity test

重组人促红素注射液(CHO细胞)是利用基因工程技术人工合成的一种促人红细胞生成素,能促进骨髓中红细胞系列的增殖、分化、成熟和释放,并能维持血中红细胞数和血红蛋白的稳态。目前重组人促红素注射液(CHO细胞)主要用于肾功能不全所致的贫血,外科围手术期的红细胞动员、非骨髓恶性肿瘤化疗引起的贫血、早产儿贫血等^[1-3]。在其广泛应用于临床的同时所引起的不良反应也被陆续发现,如高血压、高血钾、纯红细胞再生障碍性贫血等^[4-6]。非人灵长类动物与人类的遗传物质有75%~85%的同源性,在亲缘关系、生理结构及免疫代谢等方面与人类高度相似,在药物的药效及安全性评价方面明显优于大小鼠、犬、兔等^[7-8]。目前,关于重组人促红素注射液(CHO细胞)的非人灵长类安全性评价研究资料较少,本研究拟通过考察重组人促红素注射液(CHO细胞)对食蟹猴的长期毒性,预测其对各组织器官的潜在毒性反应,为临床用药提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

普通级食蟹猴,3~4周岁,18只,雌雄各半,购自广东春盛生物科技发展有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2014-0027,合格证号44410900000216。动物饲养于广东省实验动物监测所普通级动物房,实验动物使用许可证号SYXK(粤)2016-0122。温度20~26℃,相对湿度40~70%,光照采用12 h/12 h昼夜明暗交替。本试验的动物使用经广东省实验动物监测所实验动物使用和管理委员会(IACUC)批准,批准编号为IACUC2017032。

1.2 药物及主要试剂

受试品:重组人促红素注射液(CHO细胞),10 000 IU/1.0 mL/支,无色澄明液体,深圳赛保尔生物药业有限公司,2~8℃避光保存,批号201706058。血常规检测试剂(日本sysmex公司);血液生化检测试剂(广州科方生物技术有限公司);血凝检测试剂(日本sysmex公司);流式检测试

剂(美国BD公司)。

1.3 主要仪器

XT-2000iv型全自动五分类血液分析仪、CS1300型血凝仪(日本Sysmex公司);7020型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司);FACSCantoII型流式细胞仪(美国BD公司);TP1020型全自动组织脱水机、EG1150H+C型石蜡包埋机、RM2255型全自动轮转切片机、DM2500型生物显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

动物适应性饲养28 d后,不同性别分别按体重随机分为3组,每组6只,雌雄各半,分别为阴性对照组(给予与高剂量组相同体积的灭菌生理盐水)和受试品低、高剂量组(每周500、1 500 IU/kg,相当于临床剂量的3.3、10.0倍)。各组动物经后肢大腿外侧sc给药,每周给药3次,连续4周,分别于给药4周及恢复期4周结束后,每组取4只(给药期结束)及2只(恢复期),雌雄各半,进行各项指标检查。

2.2 指标检测

(1)一般观察:试验期间每天对动物的外观体征、行为活动、精神状态、粪便性状、呼吸和注射部位等进行观察;(2)体质量:每周称量体质量1次;(3)体温、眼科、心电图、血常规、血液生化、凝血指标及免疫细胞:于给药前、给药中(给药2周)、给药期结束、恢复期结束时,盐酸氯胺酮(10 mg/kg)与速眠新II(1 mg/kg)联合im麻醉动物后进行检查或检测。其中,免疫细胞仅在给药前、给药期结束和恢复期结束时检测。(4)大体剖检与组织病理学检查:给药期结束和恢复期结束动物麻醉、放血安乐死后进行大体解剖检查,测定心脏、肝脏、脾脏、肾脏、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胸腺、肾上腺、甲状腺、脑的脏器质量,计算脏器系数,并对心脏、肝脏、脾脏等40多种脏器进行组织病理学检查。

2.3 统计学方法

使用SPSS25.0对试验数据进行统计学描述和

分析,先进行正态性检验,若服从正态分布,则进行方差齐性检验;若总体方差齐性,则进行 One-Way ANOVA 方差分析,非正态分布或方差不齐,则进行 Kruskal-wallis 检验。如方差分析检验结果显著,则进一步用 Dunnett 参数检验法将各剂量组与对照组进行两两比较检验,如方差分析检验结果不显著,则计算结束。如 Kruskal-wallis 检验结果显著,则进一步用 Mann-Whitney-U 检验法进行两两比较检验,如 Kruskal-wallis 检验结果不显著,则计算结束。试验第8周每组动物数仅2只,未进行统计分析。

3 结果

3.1 一般观察

给药期和恢复期各组动物外观体征、行为活动、精神状态、排泄物、注射部位等均未见异常。

3.2 体质量和体温

在给药期和恢复期,与阴性对照组比较,受试品低、高剂量组动物体质量和体温变化均未见统计学差异。见图1。

3.3 眼科、心电图

各组动物眼外观、眼睑、结膜、巩膜等均未见异常,眼底检查视神经乳头的形状、大小正常,黄斑部无水肿、出血、渗出,视网膜无水肿、渗出、出血、剥离及新生血管等异常表现。各组动物心率、P-R 间期、QRS 时间、Q-T 间期、校正 Q-T 间期、P 波时间、T 波时间均未见统计学差异。

3.4 血常规指标

与阴性对照组比较,受试品低、高剂量组动物红细胞(RBC)、网织红细胞(RET)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)于给药后2~4周均显著升高($P < 0.05$),血小板数(PLT)水平于给药后4周显著上升($P < 0.05$),淋巴细胞数(LYMPH)于给药后2~4周均明显降低($P < 0.05$),RET、PLT 及 LYMPH 于停药4周后恢复正常水平,而 RBC、HGB 及 HCT 仍维持较高水平。结果见图2。

3.5 血液生化指标

给药期和恢复期结束,与阴性对照组比较,受

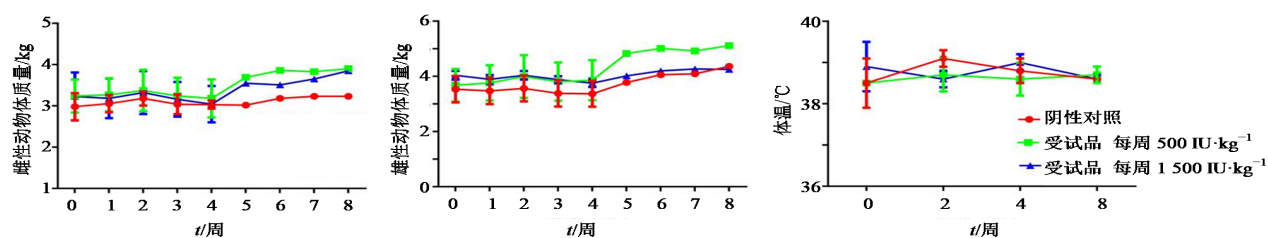
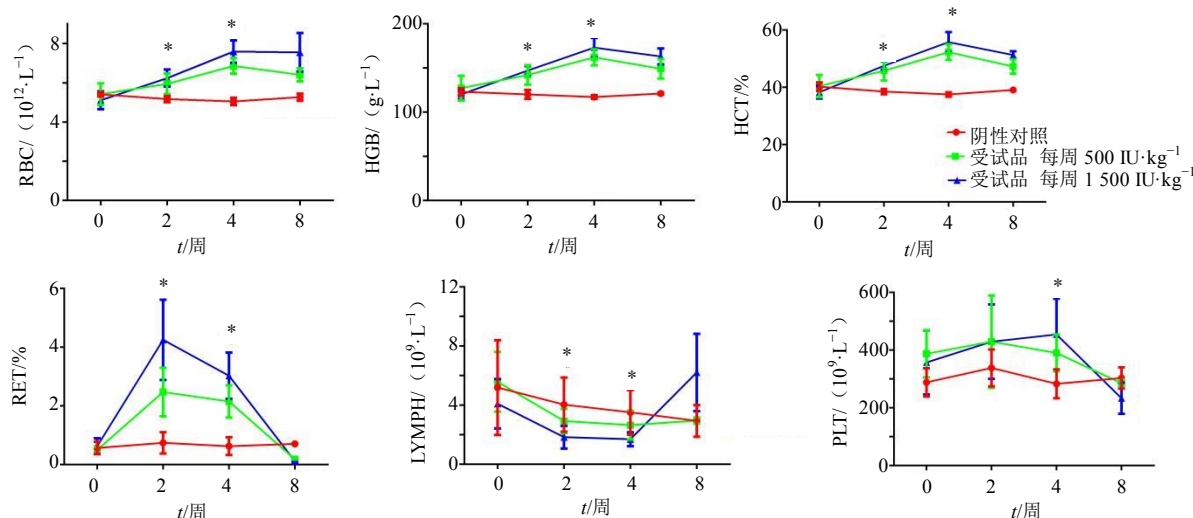


图1 重组人促红素注射液对食蟹猴体质量和体温的影响

Fig. 1 Effects of rHuEPO injection on body weight and body temperature of cynomolgus monkey



与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs negative control group

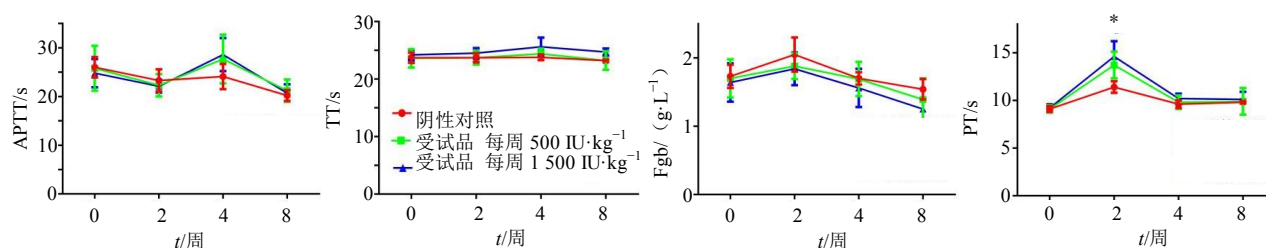
图2 重组人促红素注射液对食蟹猴血常规指标的影响

Fig. 2 Effects of rHuEPO injection on hematology of cynomolgus monkey

试品低、高剂量组动物血生化指标白蛋白(ALB)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(CREA)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆红素(TBIL)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TCHO)、总蛋白(TP)、尿素氮(UREA)、钾离子(K^+)、钠离子(Na^+)、氯离子(Cl^-)均未见显著变化。

3.6 凝血指标

给药期和恢复期结束,与阴性对照组比较,受试品低、高剂量组凝血酶原时间(PT)在给药2周出现一过性延长($P<0.05$),凝血酶原时间(TT)、活化的部分凝血活酶时间(APTT)和纤维蛋白原(Fgb)变化未见统计学差异。结果见图3。

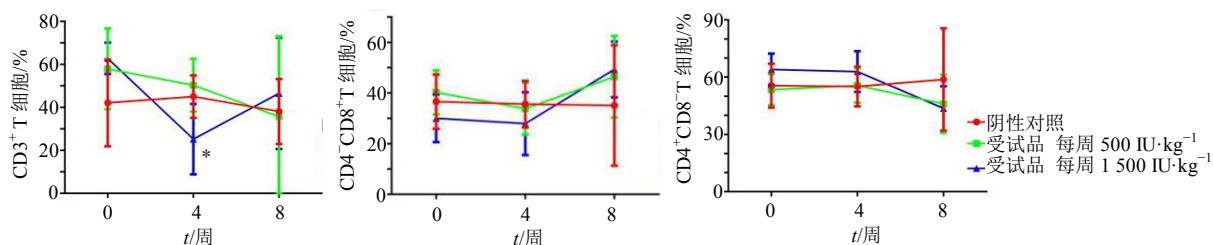


与阴性对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs negative control group

图3 重组人促红素注射液对食蟹猴凝血指标的影响

Fig. 3 Effects of rHuEPO injection on coagulation index of cynomolgus monkey



与阴性对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs negative control group

图4 重组人促红素注射液对食蟹猴T淋巴细胞亚群的影响

Fig. 4 Effects of rHuEPO injection on T lymphocyte subset of cynomolgus monkey

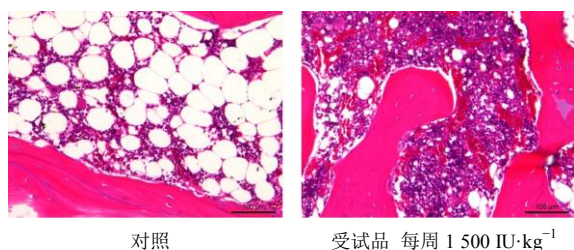


图5 股骨轻度红系增生(HE染色, bar=100 μm)

Fig. 5 Mild erythroid hyperplasia of femur(HE, bar=100 μm)

4 讨论

人促红素是由肝脏和肾脏分泌的一种活性糖蛋白,其基本生理功能是促进红系祖细胞向红细胞

3.7 淋巴细胞亚群

与阴性对照组比较,高剂量组给药4周后外周血总T细胞(CD3⁺T)比例明显降低($P<0.05$),停药4周后恢复,T辅助细胞(CD4⁺CD8⁻T)及T抑制细胞(CD4⁺CD8⁺T)比例无显著性变化,结果见图4。

3.8 大体剖检和组织病理学

与阴性对照组比较,给药期及恢复期结束,各剂量组心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胸腺、甲状腺、脑、子宫、卵巢脏器质量、脏器系数未见明显改变。大体剖检各剂量组各组织器官均未见受试品相关异常。组织病理学检查,给药期结束高剂量组股骨骨髓出现轻度红系增生(3/4)。结果见图5。

分化^[10-11]。随着基因技术的发展,目前已有多种重组人促红素产品上市,且多由CHO细胞表达,主要用于治疗各类贫血。目前人促红素制剂对部分患者的治疗反应仍不理想,且随着重组人促红素在临床的广泛应用,由其引起的严重不良反应也逐渐增多^[12],因此对重组人促红素的系统性安全评价研究显得尤为重要,特别是使用非人灵长类动物开展的安全性评价,对于该产品的临床应用的风险评估具有较高的参考价值。

本研究发现经sc给予食蟹猴500、1500 IU/kg剂量的重组人促红素注射液(CHO细胞),会导致动物血常规指标RBC、RET、HGB、HCT及PLT显著升

高,上述结果与富岩和张欣等研究结果一致^[13-14],属于重组人促红素的药理学作用。病理检查结果显示,给药期结束高剂量组有3例动物股骨骨髓出现轻度红系增生,雌性1例,雄性2例,未见明显性别差异,其它组织器官和系统未见受试品相关病理改变。促红素是一种作用于骨髓造血细胞,促进红系祖细胞增生、分化和成熟的内分泌激素,因此该病理改变是其药理作用机制的表现。研究发现,重组人促红素能通过提高患者CD4⁺T细胞以及CD4⁺/CD8⁺T细胞的比例,提高患者的免疫功能^[15]。本研究中1500 IU/kg重组人促红素连续给药4周,食蟹猴CD4⁺T细胞以及CD4⁺/CD8⁺T细胞比例未见明显变化,CD3⁺T细胞比例明显降低,同时血常规指标LYMPH显著降低,该结果与富岩等在注射用重组人血清白蛋白/促红素融合蛋白食蟹猴长期毒性试验的研究结果相一致^[13],提示长期注射重组人促红素注射液对食蟹猴淋巴细胞有一定的影响。

本研究给予食蟹猴1500 IU/kg(相当于10倍临床剂量)重组人促红素注射液(CHO细胞)未发现新的不良反应。

参考文献

- [1] Beiraghdar F, Panahi Y, Einollahi B, et al. Evaluation of a biosimilar recombinant alpha epoetin in the management of anemia in hemodialysis patients [J]. Saudi Pharm J, 2015, 23(5): 544-548.
- [2] 郭代红,李念稚,刘述文,等.重组人促红细胞生成素应用评价及影响因素分析[J].药物流行病学杂志,2010,19(6): 333-336.
- [3] 富岩,杨小楠,魏开华,等.具创新分子结构的更优长效性重组人血清白蛋白/促红素融合蛋白的表达、准备和特性研究[J].中国医药生物技术,2017,12(1): 6-18.
- [4] 杨元勋,钱正刚,李刚,等.109例重组人促红细胞生成素药物不良反应文献分析[J].药学服务与研究,2014,14(1): 45-48.
- [5] 张林,周云,任亚萍,等.重组生物技术类药物不良反应研究进展[J].医药导报,2018,37(8): 977-981.
- [6] Del Vecchio L, Locatelli F. Safety issues related to erythropoiesis-stimulating agents used to treat anemia in patients with chronic kidney disease [J]. Expert Opin Drug Saf, 2012, 11(6): 923-931.
- [7] 治疗用生物制品非临床安全性技术审评一般原则[S]. GPT1-1, 2007.
- [8] 黄瑛,姜华,李路路,等.生物技术药物免疫原性评价的技术发展概述[J].药物评价研究,2017,40(7): 999-1004.
- [9] 王智斌,谭太昌.酶联免疫吸附试验临界值验证的方法和意义[J].检验医学与临床,2010,7(3): 224-226.
- [10] 廖飞龙,杨仲璠,刘煜,等.促红细胞生成素的研究进展[J].中国新药杂志,2016,25(1): 64-70.
- [11] Liang R, Ghaffari S. Advances in understanding the mechanisms of erythropoiesis in homeostasis and diseases [J]. Br J Haematol, 2016, 174(5): 661-673.
- [12] 李璐璐,黄铁花,卫四宝,等.重组人促红细胞生成素不良反应149例文献分析[J].中国药师,2018,21(3): 438-440.
- [13] 富岩,马金玲,李开通,等.注射用重组人血清白蛋白/促红素融合蛋白的药效学、药代动力学及安全性评价研究[J].中国医药生物技术,2017,12(2): 97-110.
- [14] 张欣.重组EPO-Fc融合蛋白对恒河猴的长期毒性和免疫原性研究[D].成都:四川大学,2007.
- [15] 饶毅峰,朱平,何川鄂,等.重组人促红细胞生成素对血液透析患者营养状况和免疫功能的影响[J].现代生物医学进展,2017,17(15): 2888-2891.