

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВИДОВ ТОКСИЧНОСТИ КАНДИДАТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА К НЕОДЕТЕРМИНАНТЕ С3 КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

К.А. Некрасова*, А.В. Трофимов, А.В. Жахов, С.В. Родин, Н.П. Горбунов, А.В. Петров, Н.В. Пигарева, Г.В. Александров, М.С. Захаров, А.С. Кирьянова, О.Э. Хуттунен, И.В. Бендт, А.Э. Крылова, А.М. Ищенко

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
ФМБА России

197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

Целью данной работы являлись доклинические исследования специфических видов токсичности, а именно аллергенности, иммунотоксичности и репродуктивной токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека. В реакциях общей анафилаксии, активной кожной анафилаксии и реакции ГЗТ показано, что препарат не сенсибилизирует экспериментальных животных и не вызывает гиперчувствительности немедленного или замедленного типа. Препарат в дозах, многократно превышающих предполагаемую человеческую терапевтическую дозу, не оказывает негативного воздействия на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа, а также не подавляет фагоцитарную функцию фагоцитов, что говорит об отсутствии у него иммунотоксического действия. Препарат не оказывает негативного воздействия на генеративную функцию самцов и самок, а также не вызывает нарушений эмбрионального развития у потомства, полученного от скрещивания данных животных, и не оказывает достоверного воздействия на пренатальное и постнатальное развитие потомства. Результаты проведенной работы могут быть использованы при изучении клинической безопасности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга.

Ключевые слова: рекомбинантное антитело, С3 компонент комплемента, доклинические исследования, аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансовая поддержка: исследование выполнено по Государственному контракту № 14.N08.11.0121 от 30 сентября 2016 г. «Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к С3 компоненту комплемента человека для лечения травматического повреждения головного мозга» в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Для цитирования: Некрасова К.А., Трофимов А.В., Жахов А.В., Родин С.В., Горбунов Н.П., Петров А.В., Пигарева Н.В., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Бендт И.В., Крылова А.Э., Ищенко А.М. Доклинические исследования специфических видов токсичности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга. *Биомедицина*. 2021;17(4):68–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-68-80>

Поступила 16.03.2021

Принята после доработки 08.07.2021

Опубликована 10.12.2021

PRECLINICAL STUDIES INTO SPECIFIC TOXICITY OF A CANDIDATE DRUG BASED ON COMPLEMENT C3 NEODETERMINANT RECOMBINANT HUMANIZED ANTIBODY FOR TREATING TRAUMATIC BRAIN INJURIES

Kseniya A. Nekrasova*, Alexandr V. Trofimov, Alexandr V. Zhahov, Sergey V. Rodin, Nikolay P. Gorbunov, Alexandr V. Petrov, Nataliya V. Pigareva, Georgiy V. Alexandrov, Mikhail S. Zakharov, Anna S. Kiryanova, Olga E. Khuttunen, Irina V. Bendt, Anna E. Krylova, Alexandr M. Ischenko

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
197110, Russian Federation, Saint Petersburg, Pudozskaia Str., 7

This study aims to assess the specific toxicity (allergenicity, immunotoxicity and reproduction toxicity) of a dosage form of complement C3 neodeterminant recombinant humanized antibody. The reactions of general anaphylaxis, active cutaneous anaphylaxis and delayed-type reaction demonstrated no drug-related signs of experimental animal sensitization and immediate or delayed hypersensitivity in the treated animals. It was found that, in doses exceeding significantly the expected human therapeutic dose, the drug has no effect on humoral and cell-mediated immune responses. In addition, the drug does not suppress the phagocytic cell activity thereby indicating the absence of immunotoxic effect. Moreover, the drug has no adverse effects on male and female reproduction, progeny embryonal development, as well as prenatal and postnatal progeny development. The obtained data can be used in future clinical studies of the drug safety.

Keywords: recombinant antibody, C3 component of the complement, preclinical studies, allergenicity, immunotoxicity, reproduction toxicity

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the study was carried out under State contract No. 14.N08.11.0121 dated September 30, 2016 "Preclinical studies of a drug based on a recombinant humanized antibody to the C3 component of human complement for the treatment of traumatic brain injury" within the framework of the Federal target program "Development of pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond".

For citation: Nekrasova K.A., Trofimov A.V., Zhahov A.V., Rodin S.V., Gorbunov N.P., Petrov A.V., Pigareva N.V., Alexandrov G.V., Zakharov M.S., Kiryanova A.S., Khuttunen O.E., Bendt I.V., Krylova A.E., Ischenko A.M. Preclinical Studies into Specific Toxicity of a Candidate Drug Based on Complement C3 neodeterminant Recombinant Humanized Antibody for Treating Traumatic Brain Injuries. *Journal Biomed.* 2021;17(4):68–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-68-80>

Submitted 16.03.2021

Revised 08.07.2021

Published 10.12.2021

Введение

В рамках ранее проведенного доклинического изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека на модели свободно падающего груза у крыс с использованием его аналога — моноклонального антитела, специфично-

го С3 компоненту комплемента крысы, было показано, что введение высокоаффинных моноклональных антител, блокирующих активацию комплемента крысы по альтернативному пути на стадиях формирования жидкофазной и твердофазной С3-конвертаз и предотвращающих образование С5-конвертазы, экспериментальным животным с черепно-мозговой травмой

приводило к выраженному положительно-му эффекту, проявлявшемуся в сохранении когнитивных функций животных, а также в улучшении гистологической картины мозговой ткани [1].

Целью настоящей работы являлись до-клинические исследования специфических видов токсичности, а именно аллергенности, иммунотоксичности и репродуктивной токсичности лекарственной формы (ЛФ) рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека.

Материалы и методы

Реагенты и дозы,

животные и их содержание

В исследовании использовали лекарственную форму рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека hC34, представляющую собой лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения. Препарат изготавливают из субстанции рекомбинантного гуманизированного антитела hC34, которую получают биотехнологическим способом с использованием клеток-продуцентов CHO-humC34 [3]. Один флакон препарата содержит активный компонент — рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 100 мг; вспомогательные компоненты: натрия хлорид 18,8 мг, натрия дигидрофосфата дигидрат 6,64 мг, натрия гидрофосфата додекагидрат 2,68 мг, поли-

сорбат-800,2 мг, динатрия эдетат 0,36 мг, сахара 20 мг. Предполагаемая среднесуточная терапевтическая доза препарата для человека составляет 2,3 мг/кг, и все дозировки лекарственного средства в данных исследованиях рассчитаны исходя из этой дозы и коэффициента экстраполяции доз с грызунов на человека в соответствии с руководством Т.А. Гуськовой [2].

Исследования проводили на белых беспородных мышах, мышах-гибридах F1 (CBA/lac×C57Bl/6), морских свинках, белых беспородных крысах, полученных из ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.), обоего пола (табл. 1). Основные правила содержания и ухода соответствовали «Санитарно-эпидемиологическим требованиям к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным постановлением Главного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г., а также правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Объем работ и перечень процедур был одобрен биоэтической комиссией института. Доклинические исследования проводили на основе рекомендаций действующих методических документов [4, 5].

Изучение аллергенности

Реакцию общей анафилаксии (анафилактический шок) проводили на морских свинках, случайным образом разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа получала физ. р-р (ФР): первая инъекция подкожно (п/к), две последующие — внутримышечно (в/м) через день в область бедра. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг (минимально возможная доза для введения, среднесуточная терапевтическая доза для человека с учетом коэффициента пересчета 11,8) и 250 мг/кг (10-кратная терапевтическая доза), соответственно. Через 21 день после первого введения всем животным вну-

Таблица 1. Характеристика экспериментальных животных

Table 1. Characterization of experimental animals

Вид животных	Возраст, недели	Масса, г
Белые беспородные мыши	9–10	19–21
Морские свинки	5–6	200–250
Мыши-гибриды F1 (CBA/lac×C57Bl/6)	9–10	19–21
Белые беспородные крысы	9–10	180–200

трисердечно вводили разрешающую дозу ЛФ антитела hC34, которая составила суммарную сенсибилизирующую дозу для каждой группы соответственно. Животным контрольной группы вводили разрешающую дозу, используемую для опытной группы 2. Учет интенсивности анафилактического шока проводили в индексах по Weigle [7].

Реакцию активной кожной анафилаксии проводили на белых беспородных мышах, случайным образом разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа получала ФР: первая инъекция п/к, две последующие — в/м через день в область бедра. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. Через 21 день после первой инъекции ЛФ антитела hC34 всем животным на выстриженных участках спины внутривенно вводили препарат в двукратных разведениях в концентрациях, не вызывающих кожно-раздражающего действия. Через 20 мин после введения препарата всем животным вводили внутривенно (в/в) по 0,5 мл 1% р-ра красителя синего Эванса. Через 30 мин животных умерщвляли в CO₂-камере и определяли размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в месте введения препарата (при положительной реакции диаметр пятна — не менее 6 мм). Для контроля реактивности кожи обязательно вводили тому же животному на другом выстриженном участке 0,05 мл стерильного изотонического р-ра натрия хлорида. Разрешающую инъекцию препарата и синего Эванса делали также животным контрольной группы. У таких животных в месте внутривенного введения препарата диаметр окрашенного пятна не должен превышать 2–3 мм.

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили на мышах-гибридах F1 (CBA/lac×C57Bl/6), разделенных на 2 равные группы (по 10 самок

и 10 самцов). Контрольной группе ежедневно в течение 7-ми дней в/в вводили ФР, опытной группе по той же схеме вводили изучаемую ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг (20-кратная терапевтическая доза). Через 5 сут. после последней инъекции всем животным в подушечку одной задней лапы вводили 50 мкл ЛФ антитела hC34, в контралатеральную лапу вводили растворитель. Через 24 ч, после эвтаназии всех животных, обе лапы равнозначно отрезали выше пяточного сустава и взвешивали. Индекс реакции подсчитывали в процентах прироста массы лапы, в которую вводили препарат (P_о), по отношению к массе контрольной лапы (P_к) по формуле:

$$[(P_o - P_k) / P_k] \times 100.$$

Изучение иммуотоксичности

Для определения числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мыш-гибриды F1 (CBA/lac×C57Bl/6) были разделены на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа ежедневно в течение 7 дней в/в получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. На 7-й день все мыши были иммунизированы внутрибрюшинной инъекцией эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе 5×10⁷ ЭБ на животное. Подсчет числа АОК в селезенке мышей проводили на 5-е сут. после иммунизации. Реакцию ставили на предметных стеклах без поддерживающей среды по Canningham [6]. По количеству зон гемолиза эритроцитов вокруг отдельных АОК, определяемых под микроскопом, подсчитывали число клеток — продуцентов антител — в расчете на 10⁶ спленоцитов.

Реакцию ГЗТ проводили на мышах-гибридах F1 (CBA×C57Bl/6), разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа ежедневно, в течение 7-ми дней в/в получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ

антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. На 7-й день все мыши были сенсибилизированы однократно п/к введением в межлопаточную область 0,05 мл раствора, содержащего 2×10^5 ЭБ. Для выявления гиперчувствительности на 5-е сут. после сенсибилизации всем животным в подушечку задней лапы вводили 10^8 ЭБ в 0,05 мл изотонического р-ра хлорида натрия (разрешающая инъекция). В противоположную лапу вводили изотонический р-р хлорида натрия в том же объеме. Через 24 ч проводили оценку реакции и подсчитывали индекс, как описано выше.

Для оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мыши-гибриды F1 (СВА/Лас $\times$ C57Bl/6) были разделены на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа ежедневно в течение 7-ми дней в/в получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. На следующий день после последней инъекции препарата всех животных забивали и промывали брюшную полость культуральной средой. Ставили реакцию фагоцитоза с опсонизированными дрожжами на чашках Петри по стандартной методике. Чашки фиксировали и окрашивали по Романовскому—Гимзе. Под микроскопом подсчитывали процент фагоцитировавших макрофагов, нефагоцитировавших макрофагов, а также процент незавершенных фагоцитозов, кроме того, подсчитывали среднее количество фагоцитированных дрожжевых клеток.

Изучение репродуктивной токсичности

Исследования репродуктивной токсичности проводили на белых беспородных крысах. ЛФ антитела hC34 вводили самкам ($n=20$) ежедневно в/в в дозе 500 мг/кг (20-кратная терапевтическая доза) в течение 15 дней (3 эстральных цикла). Самцам ($n=10$) препарат вводили в/в в дозе 500 мг/кг в течение всего периода сперматогенеза (48 дней). В качестве контрольных

использовали аналогичные группы самок и самцов, которым по той же схеме вводили ФР. После завершения введения препарата самки были ссажены с самцами в соотношении 2 самки на 1-го самца на 2 эстральных цикла (10 дней). Самок опытной группы ссаживали с самцами опытной группы, самок контрольной группы — с самцами контрольной группы. Взвешивание животных проводили до начала эксперимента, после завершения введения препарата и перед эвтаназией. Забой и морфологическое исследование репродуктивной системы самок проводили на 20-й день после оплодотворения, при этом определяли индекс фертильности — отношение числа беременных самок к числу подсаженных, а также показатели пред- и постимплантационной гибели зародышей. Каждый плод был подвергнут внешнему осмотру и взвешиванию. Половину плодов из каждого помета фиксировали в смеси Буэна для последующего изучения внутренних органов по методу Вильсона [3]. Остальные плоды фиксировали в 96% спирте для изучения состояния костного скелета по модифицированному методу Даусона [3].

Исследование эмбриотоксического действия препарата проводили в 2 этапа. На первом этапе оценивали действие препарата в пренатальный период развития, на втором этапе изучали его возможное постнатальное действие. Спаривание intactных виргинных самок осуществляли с intactными самцами.

На первом этапе ЛФ антитела hC34 в/в вводили двум опытным группам самок (по 15 самок) с 1-го по 19-й день беременности: в 1-й группе — в дозе 24 мг/кг (предполагаемая терапевтическая доза для человека составляет 4 мг/кг, коэффициент пересчета на площадь поверхности тела 5,9), во 2-й группе — в дозе 500 мг/кг. В контрольной группе самкам ($n=15$) в эти же сроки вводили ФР. Вскрытие самок проводили после эвтана-

зии на 20-й день беременности, при этом определяли количество желтых тел в яичниках, подсчитывали количество мест имплантации, резорбции и живых плодов. Каждый плод подвергали внешнему осмотру и взвешиванию. Половину плодов из каждого помета фиксировали в смеси Буэна для последующего изучения внутренних органов по методу Вильсона. Остальные животные из каждого помета фиксировались в 96% спирте для изучения состояния костного скелета по модифицированному методу Даусона.

На втором этапе ЛФ антитела hC34 в/в вводили одной группе самок (n=15) в дозе 500 мг/кг с 1-го по 21-й день беременности, в контрольной группе самкам (n=15) в эти же сроки вводили ФР. После родов в каждом помете оставляли не более 8 крысят для дальнейшего изучения физического развития потомства, скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания, исследования эмоционально-двигательного поведения крысят после окончания периода вскармливания. При изучении физического развития потомства регистрировали размер помета, число живых и мертвых новорожденных, число особей разного пола, массу тела крысят на 4-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после рождения, а также сроки отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз, опускания семенников. Изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания проводили с использованием следующих тестов: переворачивание на плоскости (2–4 дни), отрицательный геотаксис (5–6 дни), избегание обрыва (4–6 дни). Опыты проводили 1 раз в день в одно и то же время до полного формирования рефлексов по указанным тестам. В возрасте 30 дней у потомства изучали эмоционально-двигательное поведение с использованием теста «Открытое поле».

Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel-2007 (Microsoft Corporation). Результаты представляли в виде средних значений и ошибок среднего ($M \pm m$). Сравнение показателей между группами при изучении аллергенности и иммунотоксичности проводили однофакторным дисперсионным анализом (one-way ANOVA) при наличии или отсутствии нормального распределения по Крускал—Уоллес (непараметрический тест). Сравнение показателей между группами при изучении репродуктивной токсичности проводили с помощью непарного Т-критерия Стьюдента с неравными отклонениями, а также по U-критерию Манна—Уитни. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Изучение аллергизирующего действия

При оценке реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактическая реакция) у морских свинок в опытных группах, сенсibilизированных введением ЛФ антитела hC34, не было выявлено никаких проявлений анафилактического шока. Индексы по Weigle у морских свинок после сенсibilизации препаратом в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, а также в контрольной группе были равны нулю.

При оценке реакции активной кожной анафилаксии результаты измерения диаметров цветных пятен, образовавшихся на месте введения разрешающей дозы ЛФ антитела hC34, показали, что размеры пятен составили от 1 до 2 мм (табл. 2).

Поскольку ни у одного животного размер пятна не превысил 3 мм, на основании полученных данных можно заключить, что у животных, сенсibilизированных введением ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, не наблюдали развития активной кожной анафилаксии.

Таблица 2. Оценка реакции активной кожной анафилактики у мышей после сенсibilизации ЛФ антитела hC34
Table 2. Evaluation of the active cutaneous anaphylaxis reaction in hC34 antibody-challenged mice

Экспериментальные группы	Пол	1	Номера животных			
			2	3	4	5
			Диаметр пятен, мм			
Контроль	Самцы	2	1	1	1	1
	Самки	2	2	2	2	2
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	Самцы	1	2	1	2	2
	Самки	1	1	1	1	1
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	Самцы	2	2	1	2	2
	Самки	1	1	2	1	2

Таблица 3. Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа у самцов мышей-гибридов F1 (CBA/лаc×C57Bl/6) после сенсibilизации ЛФ антитела hC34

Table 3. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in hC34 antibody-challenged F1 (CBA/лаc×C57Bl/6) mice (male)

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	5,0±1,1
ЛФ антитела hC34	5,1±1,2

Таблица 4. Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа у самок мышей-гибридов F1 (CBA/лаc×C57Bl/6) после сенсibilизации ЛФ антитела hC34

Table 4. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in hC34 antibody-challenged F1 (CBA/лаc×C57Bl/6) mice (female)

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	5,1±1,0
ЛФ антитела hC34	5,2±1,3

Результаты оценки реакции ГЗТ у мышей после сенсibilизации введением ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг представлены в табл. 3–4. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых отличий между группами в отношении индекса массы лапы мышей-гибридов, самцов и самок, после сенсibilизации ЛФ антитела hC34 (при $p=0,05$), что говорит об отсутствии реакции ГЗТ в ответ на введение ЛФ.

Изучение иммунотоксичности

Результаты определения числа АОК, образующихся в селезенке мышей в ответ на ЭБ после введения ЛФ антитела hC34 в дозах 25 и 250 мг/кг в течение 7-ми дней, представлены в табл. 5–6. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых отличий между группами в отношении числа АОК в селезенке мышей-гибридов F1 (CBAхC57Bl/6), самцов и самок, при введении ЛФ антитела hC34 (при $p=0,05$). Таким образом, показано, что изученные дозы ЛФ

антитела hC34 не оказывали негативного воздействия на развитие гуморального иммунного ответа.

Результаты оценки реакции ГЗТ у мышей после введения ЛФ антитела hC34 в дозах 25 и 250 мг/кг в течение 7-ми дней представлены в табл. 7–8. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых отличий между группами в отношении индекса массы лапы у мышей-гибридов F1 (CBA/лаc×C57Bl/6), самцов и самок, при введении ЛФ антитела hC34 (при $p=0,05$). Выраженная реакция ГЗТ развивалась во всех экспериментальных группах. Показано, что изученные дозы препарата не оказывают значимого угнетающего воздействия на развитие клеточного иммунного ответа.

Результаты оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 в дозах 25 и 250 мг/кг в течение 7-ми дней мышам представлены в табл. 9–10. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статисти-

Таблица 5. Оценка числа АОК в селезенке самцов мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 5. Amount of antibody-forming cells in spleen of F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (male) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Количество антителообразующих клеток (на 10 ⁶ спленоцитов), M±m
Контроль	40,6±3,9
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	41,0±4,2
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	41,2±4,1

Таблица 6. Оценка числа АОК в селезенке самок мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 6. Amount of antibody-forming cells in spleen of F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (female) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Количество антителообразующих клеток (на 10 ⁶ спленоцитов), M±m
Контроль	33,6±3,1
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	33,4±3,5
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	34,0±3,8

Таблица 7. Оценка развития гиперчувствительности замедленного типа у самцов мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 7. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (male) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	54,4±2,4
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	54,6±2,7
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	54,6±2,5

Таблица 8. Оценка развития гиперчувствительности замедленного типа у самок мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 8. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (female) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	56,2±2,4
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	56,8±2,3
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	56,4±2,8

чески значимых отличий между группами в отношении фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 мышам-гибридам F1 (CBA/lac×C57Bl/6), самцам и самкам (при p=0,05). Показано, что изученные дозы препарата не оказывают угнетающего воздействия на фагоцитарную активность макрофагов.

Изучение репродуктивной токсичности

Результаты изучения генеративной функции экспериментальных животных показали, что при введении ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг ни в одной из изуча-

емых групп самцов или самок крыс не наблюдали снижения темпов прироста массы тела, изменений в поведении, гибели животных. Не выявлено никаких патологических изменений в репродуктивной системе самок и состоянии плодов (табл. 11).

Эмбриотоксическое действие препарата изучали в два этапа. На первом этапе проводили оценку возможного действия ЛФ антитела hC34 в пренатальный период развития. При введении ЛФ антитела hC34 в течение 19-ти дней самкам в дозах 24 мг/кг и 500 мг/кг никаких патологических сдвигов в репродуктивной системе

Таблица 9. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 самцам мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6)

Table 9. Phagocytic activities of peritoneal macrophages in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (male) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Фагоцитировавшие МФ (ФИ, %)	Число фагоцитированных дрожжей (ФЧ, у.е.)
Контроль	72±2,4	14±1,0
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	71±2,6	13±1,2
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	73±2,2	15±1,4

Таблица 10. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 самкам мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6)

Table 10. Phagocytic activities of peritoneal macrophages in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (female) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Фагоцитировавшие МФ (ФИ, %)	Число фагоцитированных дрожжей (ФЧ, у.е.)
Контроль	73±2,1	15±1,4
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	74±2,5	14±1,4
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	73±2,6	14±1,2

Таблица 11. Оценка влияния ЛФ антитела hC34 на репродуктивную систему самок и состояние плодов

Table 11. Assessment of hC34 antibody effect on female mice reproduction and embryonal development

Показатель/ Группа животных	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Кол-во беременных самок	19	19
Индекс фертильности	95 %	95 %
Кол-во желтых тел, всего/ %	177/9,3±0,3	178/9,4±0,3
Кол-во мест имплантации, всего/ %	176/9,3±0,3	177/9,3±0,4
Кол-во живых плодов, всего/ %	171/9,0±0,3	172/9,1±0,3
Кол-во резорбций, всего/ %	5/0,26±0,13	5/0,26±0,13
Предимплантационная гибель	0,66±0,66	0,66±0,66
Постимплантационная гибель	2,91±1,50	2,54±1,22
Масса плодов	3,18±0,03	3,15±0,02
Краниокаудальный размер, мм	34,14±0,09	34,15±0,09
Внешний осмотр плодов		
Кол-во обследованных плодов	171	172
Из них с аномалиями, всего/ %	0/0	0/0
Состояние внутренних органов		
Кол-во обследованных плодов	85	86
Из них с аномалиями развития, всего/ %	0/0	0/0
Состояние костного скелета		
Кол-во обследованных плодов	86	86
Из них с аномалиями развития, всего/ %	0/0	0/0
Число центров оссификации метакарпальных костей	справа	3,50±0,05
	слева	3,56±0,05
Число центров оссификации метатарзальных костей	справа	3,44±0,05
	слева	3,51±0,05

самок и состоянии плодов обнаружено не было.

На втором этапе изучали возможное постнатальное действие препарата. При введении ЛФ антитела hC34 с 1-го по 21-й день беременности самкам в дозе 500 мг/кг никаких патологических сдвигов в развитии потомства не было обнаружено. Изучение физического развития потомства, скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания, эмоционально-двигательного поведения крысят после окончания периода вскармливания не выявило различий между контрольными и опытными группами животных (табл. 12–14).

Обсуждение результатов

Изучение аллергизирующего действия лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 в реакциях общей анафилаксии, активной кожной анафилаксии и реакции ГЗТ показало, что в проведенных экспериментах препарат не сенсибилизирует экспериментальных животных и не вызывает гиперчувствительности немедленного или замедленного типа.

Изучение развития иммунного ответа после введения лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 показало, что препарат в дозах, многократно превышающих предполагаемую человеческую терапевтическую дозу,

Таблица 12. Показатели физического развития потомства самок крыс, получавших ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг

Table 12. Physical development of female rat progeny after treatment with hC34 antibody at a dose of 500 mg/kg

Показатели	Группа животных	
	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Кол-во пометов	15	15
Кол-во крысят, всего/ср. в помете	162/10,8±0,4	162/10,8±0,4
В т.ч. живых, всего/ср. в помете	158/10,5±0,4	157/10,5±0,4
Погибло в период вскармливания, всего/ср. в помете	2/0,13±0,09	2/0,13±0,9
Кол-во самцов	83	86
Кол-во самок	75	71
День отлипания ушной раковины	2,98±0,06	2,99±0,06
День появления первичного волосяного покрова	4,69±0,10	4,63±0,09
День прорезывания резцов	8,39±0,10	8,36±0,07
День открытия глаз	14,6±0,1	14,6±0,1
День опускания семенников	28,9±0,3	29,0±0,4
Масса тела крысят, г		
4-й день	7,63±0,09	7,70±0,09
7-й день	14,7±0,1	14,7±0,1
14-й день	36,9±0,2	37,0±0,3
21-й день	57,8±0,3	57,9±0,4

Таблица 13. Показатели скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов потомства самок, получавших ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг

Table 13. The rate of maturation of sensory-motor reflexes in female offspring after treatment with hC34 antibody at a dose of 500 mg/kg

Показатели	Группа животных	
	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Переворачивание на плоскости, ср. знач.	7,14±0,03	7,19±0,04
Отрицательный геотаксис, ср. знач.	6,30±0,04	6,08±0,06
Избегание обрыва, ср. знач.	8,22±0,05	8,28±0,05

Таблица 14. Показатели исследования эмоционально-двигательного поведения потомства самок, получавших ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг

Table 14. Emotional and motor behavior in female offspring after treatment with hC34 antibody at a dose of 500 mg/kg

Показатели	Группа животных	
	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Возраст 30 дней		
Время отсутствия активности, с	1,2±0,1	1,0±0,1
Число пересеченных секторов	34,5±0,3	34,7±0,5
Число вертикальных стоек	12,4±0,4	12,7±0,3
Заглядывания в отверстия	2,1±0,1	2,3±0,1
Акты урикации	1,3±0,1	1,4±0,1
Акты дефекации	1,6±0,1	1,7±0,1

не оказывает негативного воздействия на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа, а также не подавляет фагоцитарную функцию фагоцитов, что говорит об отсутствии у него иммунотоксического действия в использованных экспериментальных моделях.

Изучение генеративной функции экспериментальных животных, получавших в течение гаметогенеза лекарственную форму рекомбинантного гуманизированного антитела hC34, показало, что препарат в дозе 500 мг/кг (в 125 раз превосходящей терапевтическую дозу для человека) не оказывает негативного воздействия на генеративную функцию самцов и самок, а также не вызывает нарушений эмбрионального развития у потомства, полученного от скрещивания данных животных.

Изучение эмбриотоксического действия лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

показало, что изученный препарат в дозах до 500 мг/кг не оказывает достоверного воздействия на пренатальное и постнатальное развитие потомства.

Выводы

В результате доклинических исследований аллергенности, иммунотоксичности и репродуктивной токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека показано, что препарат не обладает специфическими видами токсичности. Результаты, полученные в данном исследовании, могут быть использованы при изучении клинической безопасности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Горбунов Н.П., Ищенко А.М., Жахов А.В., Трофимов А.В., Денисенко Е.С., Александров Г.В., Захаров М.С. Изучение ингибирующего действия анти С3 антител на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Российский иммунологический журнал*. 2018;12(4):641–643. DOI:10.31857/S102872210002623-0 [Gorbunov N.P., Ishchenko A.M., Zhakhov A.V., Trofimov A.V., Denisenko E.S., Aleksandrov G.V., Zakharov M.S. Izuchenie ingibiruyushchego deystviya anti S3 antitel na modeli cherepno-mozgovoy travmy u kryс [Study of the inhibitory effect of anti-C3 antibodies in a model of traumatic brain injury in rats]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal [Russian journal of immunology]*. 2018;12(4):641–643. (In Russian)].
2. Гуськова Т.А. *Токсикология лекарственных средств*. М.: Русский врач, 2003:154. [Gus'kova T.A. *Toksikologiya lekarstvennykh sredstv [Drug toxicology]*. Moscow: Russkiy vrach Publ., 2003:154. (In Russian)].
3. Картузова В.Е., Трофимов А.В., Ищенко А.М., Родин С.В., Жахов А.В., Симбирцев А.С., Климов Н.А., Петров А.В., Карасев М.М. *Гуманизированное антитело к конформационному эпитопу С3 компонента комплемента человека, последовательность ДНК (варианты),*

- экспрессионный вектор, содержащий последовательность ДНК (варианты), и штамм клеток яичников китайского хомячка CHO-humC34 — продуцент данного гуманизированного антитела. Патент РФ № 2630647, 27.05.2016. [Kartuzova V.E., Trofimov A.V., Ishchenko A.M., Rodin S.V., Zhakhov A.V., Simbirtsev A.S., Klimov N.A., Petrov A.V., Karasev M.M. *Gumanizirovannoe antitelo k konformatsionnomu epitopu S3 komponenta komplementa cheloveka, posledovatel'nost' DNK (varianty), ekspressionnyy vektor, soderzhashchiy posledovatel'nost' DNK (varianty), i shtamm kletok yaichnikov kitayskogo khomyachka CHO-humC34 — produtsent dannogo gumanizirovannogo antitela* [Humanized antibody to the conformational epitope C3 of the human complement component, DNA sequence (variants), expression vector containing the DNA sequence (variants), and the Chinese hamster ovary cell strain CHO-humC34 — the producer of this humanized antibody]. Patent RF No. 2630647, 27.05.2016. (In Russian)].
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013:944. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Ed. A.N. Mironov. Part one]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2013:944. (In Russian)].
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть вторая. Иммунобиологические лекарственные препараты. Под ред. А.Н. Миронова М.: Гриф и К, 2012:536. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' vtoraya. Immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part two. Immunobiological drugs]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:536. (In Russian)].
6. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*. 1965;207(5001):1106–1107.
7. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol*. 1960;85:469.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Некрасова Ксения Александровна*, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: k.a.nekrasova@hpb.spb.ru

Трофимов Александр Викторович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

Жахов Александр Владимирович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.v.zachov@hpb.spb.ru

Родин Сергей Владимирович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: s.v.rodin@hpb.spb.ru

Горбунов Николай Петрович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: n.p.gorbynov@hpb.spb.ru

Kseniya A. Nekrasova*, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: k.a.nekrasova@hpb.spb.ru

Alexandr V. Trofimov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

Alexandr V. Zhahov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.v.zachov@hpb.spb.ru

Sergey V. Rodin, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: s.v.rodin@hpb.spb.ru

Niklay P. Gorbunov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: n.p.gorbynov@hpb.spb.ru

Петров Александр Владимирович, к.м.н.,
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: atary@mail.ru

Пигарева Наталья Васильевна, к.м.н., ФГУП
«Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: n.v.pigareva@hpb.spb.ru

Александров Георгий Вячеславович, к.б.н.,
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: labr4@mail.ru

Захаров Михаил Сергеевич, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: m.s.zakharov@hpb.spb.ru

Кирьянова Анна Сергеевна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.s.kirianova@hpb.spb.ru

Хуттунен Ольга Эрнестовна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: o.e.khuttunen@hpb.spb.ru

Бендт Ирина Владимировна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: i.v.bendt@hpb.spb.ru

Крылова Анна Эдуардовна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.e.krylova@hpb.spb.ru

Ищенко Александр Митрофанович, к.б.н.,
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru

Alexandr V. Petrov, Cand. Sci. (Med.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: atary@mail.ru

Nataliya V. Pigareva, Cand. Sci. (Med.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: n.v.pigareva@hpb.spb.ru

Georgiy V. Alexandrov, Cand. Sci. (Biol.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: labr4@mail.ru

Mikhail S. Zakharov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m.s.zakharov@hpb.spb.ru

Anna S. Kiryanova, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.s.kirianova@hpb.spb.ru

Olga E. Khuttunen, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: o.e.khuttunen@hpb.spb.ru

Irina V. Bendt, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: i.v.bendt@hpb.spb.ru

Anna E. Krylova, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.e.krylova@hpb.spb.ru

Alexandr M. Ischenko, Cand. Sci. (Biol.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author