

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ОСОБО ЧИСТЫХ БИОПРЕПАРАТОВ»  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

*На правах рукописи*

НЕКРАСОВА КСЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО  
АНТИТЕЛА, БЛОКИРУЮЩЕГО АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА,  
ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
Ищенко Александр Митрофанович,  
кандидат биологических наук

Санкт-Петербург - 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Механизмы активации комплемента и опосредованной комплементом патологии центральной нервной системы.....	15
1.2 Ингибирование анафилатоксинов комплемента при ишемическом инсульте.....	25
1.3 Ингибирование анафилатоксинов комплемента при черепно-мозговой травме.....	31
1.4 Разработка лекарственных препаратов, ингибирующих эффекторную функцию системы комплемента.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
2.1 Объекты исследования.....	40
2.1.1 Рекомбинантное гуманизированное антитело к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека.....	40
2.1.2 Лекарственная форма рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека.....	40
2.1.3 Моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы.....	41
2.2 Экспериментальные животные.....	41
2.3 Методика изучения механизма действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 <i>in vitro</i> .....	43
2.3.1 Методика изучения действия антитела hC34 на активацию классического и альтернативного пути комплемента.....	43
2.3.2 Методика изучения ингибирования продукции C3a и C5a <i>in vitro</i> антителом hC34.....	44
2.3.3 Методика идентификации участка связывания с антителом hC34 на молекуле C3 .....	45
2.3.3.1 Получение нативного C3 и его производных C3i, C3b и C3c.....	46
2.3.3.2 Методика изучения взаимодействия антитела с различными формами C3 компонента комплемента методом плазмонного резонанса.....	47

2.4 Методика определения релевантного вида животных для проведения экспериментальных исследований рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	49
2.4.1 Методика изучения видовой кросс-реактивности антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных.....	49
2.4.2 Электрофорез в полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом.....	50
2.5 Методика изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на примере его аналога.....	53
2.5.1 Дизайн экспериментов.....	53
2.5.2 Моделирование закрытой черепно-мозговой травмы .....	53
2.5.3 Выработка и оценка сохранности условного рефлекса пассивного избегания.....	54
2.5.4 Гистологическое и патоморфологическое исследование.....	55
2.5.5 Определение концентрации C3a в плазме крови методом конкурентного иммуноферментного анализа.....	56
2.6 Методика изучения фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	57
2.7 Методика изучения безопасности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 .....	59
2.7.1 Методика изучения острой токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	59
2.7.2 Методика изучения хронической токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	61
2.7.3 Методика изучения аллергенности и иммунотоксичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34..	67
2.7.3.1 Дизайн экспериментов по изучению аллергизирующего действия.....	67
2.7.3.2 Дизайн экспериментов по изучению иммунотоксического действия.....	69
2.8 Статистическая обработка полученных результатов.....	70

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
3.1 Результаты изучения механизма действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 <i>in vitro</i> .....	71
3.1.1 Изучение действия антитела hC34 на активацию классического и альтернативного пути комплемента.....	72
3.1.2 Изучение ингибирования продукции C3a и C5a <i>in vitro</i> антителом hC34.....	74
3.1.3 Идентификация участка связывания с антителом hC34 на молекуле C3 .....	79
3.2 Определение релевантного вида животных для проведения экспериментальных исследований рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	83
3.3 Результаты изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на примере его аналога.....	87
3.4 Результаты изучения фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	97
3.5 Результаты изучения безопасности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	101
3.5.1 Изучение острой токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	101
3.5.2 Изучение хронической токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	104
3.5.3 Изучение аллергенности и иммунотоксичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.....	122
3.5.3.1 Аллергизирующее действие.....	122
3.5.3.2 Иммунотоксическое действие.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	128
ВЫВОДЫ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** В структуре смертности населения России цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) занимают второе место после ишемической болезни сердца и составляют около 20% от всех смертей [3]. К этому следует добавить значительное количество населения, страдающего от черепно-мозговых травм (ЧМТ) [11] и других заболеваний, связанных с нарушением мозгового кровообращения.

Установлено, что одной из причин развития патологического воспаления в центральной нервной системе (ЦНС), вызванного ишемическими процессами, черепно-мозговыми травмами и другими патологиями, является нерегулируемая активация комплемента, сопровождающаяся генерацией анафилатоксинов C3a и C5a и образованием мембраноатакующего комплекса, направленного на повреждение собственных клеток и тканей мозга и окружающего эндотелия [28].

В настоящее время разработаны различные подходы к лечению острых ишемических и травматических повреждений головного мозга, а также к постинсультному восстановлению его функций, среди которых обоснованной является стратегия блокирования системы комплемента, в частности за счет нейтрализации активности ее ключевого компонента C3. Разработка препаратов, блокирующих активацию комплемента по всем трем известным путям - классическому, лектиновому и альтернативному, за рубежом ведется достаточно интенсивно [172-191].

Цереброваскулярные заболевания, в том числе инсульт, черепно-мозговые травмы, вызванные ими последствия, приводящие к инвалидизации пострадавших из-за частой потери памяти, нарушений функций опорно-двигательного аппарата, являются важной социально-экономической проблемой здравоохранения. Повышение эффективности лечения ЦВЗ и снижение стоимости лекарственного обеспечения за счет создания современных импортозамещающих препаратов является важной государственной задачей.

**Степень разработанности темы.** На данный момент зарегистрировано несколько лекарственных препаратов, являющихся ингибиторами комплемента: препарат экулизумаб на основе терапевтических антител к C5 под названием Soliris® (Alexion Pharmaceuticals) одобрен для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) и атипичного гемолитико-уремического синдрома [172-173]; препарат Равулизумаб (Ultomiris®, Alexion Pharmaceuticals) — ингибитор C5 2-го поколения, гуманизированное моноклональное антитело, специфически связывающееся с белком комплемента C5, одобрен для лечения взрослых с ПНГ [176].

Развивается стратегия прерывания каскада активации за счет блокирования расщепления компонента C5 под действием C5-конвертазы. Завершена II фаза клинических испытаний полностью человеческих антител LFG316 (Tesidolumab, Novartis Pharmaceuticals), полученных по комбинаторной технологии и предназначенных для лечения возрастной макулярной дегенерации [178]. Проводятся исследования нескольких молекул, блокирующих расщепление C5-конвертазой и предотвращающих образование воспалительных молекул C5a и C5b и комплекса литической атаки [180]. Проводятся клинические испытания III фазы при васкулите, ассоциированном с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, препарата Авакопан (ChemoCentryx) — нового биодоступного при пероральном приеме высокоселективного антагониста C5aR1 человека [185].

Помимо стратегии ингибирования C5 достаточно активно исследуется стратегия блокирования C3. Один из подходов к нейтрализации C3 связан с использованием препарата Компстатин и его производных [186]. Получены моноклональные антитела к C3 H17, которые распознают фрагменты активированного C3 — C3b/iC3b и эффективно блокируют альтернативный путь активации, прерывая процесс формирования C3-конвертазы [196,198]. Эти антитела — наиболее близкий аналог рекомбинантных гуманизированных антител к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека (hC34), разработанных в ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов»

ФМБА России, но значительно отличаются по специфичности, распознают другие домены C3 и уступают в эффективности антителам hC34. Гуманизированные антитела hC34 [199] являются оригинальными и в отличие от многих других ингибиторов комплемента избирательно блокируют активацию только альтернативного пути, не затрагивают каскады классического и лектинового пути, сохраняя противоинфекционную активность и другие полезные функции системы комплемента.

Несмотря на то, что многие стратегии ингибирования комплемента были испытаны на животных с многообещающими результатами, исследования при ЦВЗ (в частности, при инсульте) и вторичных повреждениях после ЧМТ у человека до сих пор не проводились. Это обосновывает необходимость изучения эффективности и безопасности разрабатываемых препаратов на соответствующих моделях.

**Цели и задачи.** Цель работы — экспериментальное обоснование подхода к лечению травматического повреждения головного мозга, основанного на блокировании активации комплемента с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Исследовать механизм действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 *in vitro*.

2. Изучить специфическую фармакологическую активность рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на примере его аналога при травматическом повреждении головного мозга.

3. Рассчитать основные фармакокинетические параметры рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 при однократном внутривенном введении.

4. Оценить безопасность лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 по показателям острой и хронической токсичности, аллергенности и иммунотоксичности.

**Научная новизна.** Впервые изучен механизм действия инновационного рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека. В экспериментах *in vitro* в гемолитическом тесте показано, что антитело не блокирует классический путь активации комплемента, но блокирует альтернативный путь активации в молярном недостатке по отношению к общему количеству C3 в пробах плазмы крови. Методом плазмонного резонанса установлено, что участок связывания с антителом hC34 локализован на формах C3i, C3b и C3c.

Впервые показано, что аналог рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 – моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы – обладает фармакологической активностью в модели закрытой черепно-мозговой травмы (ЗЧМТ), выражающейся в четкой тенденции к сохранению памятного следа у животных, перенесших ЗЧМТ, в тесте оценки сохранности условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), в снижении выраженности картины ЗЧМТ и достоверном и дозозависимом снижении процента погибших нейронов в гипоталамусе.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании проведенных экспериментальных исследований обоснован подход к лечению травматического повреждения головного мозга, основанный на блокировании активации комплемента с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека.

В результате изучения острой и хронической токсичности, а также аллергенности и иммунотоксичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 показано, что лекарственная форма при внутривенном введении в дозах, в сотни раз превосходящих терапевтическую дозу для человека, не оказывает токсического действия на лабораторных животных и не обладает аллергизирующими и иммунотоксическими свойствами. Созданный лекарственный препарат, по данным проведенных исследований, относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов, что позволяет рекомендовать его в качестве основы для разработки средств лечения травмы



головного мозга и профилактики осложнений, ассоциированных с избыточной активацией системы комплемента.

Использованный в ходе исследования механизма действия *in vitro* метод оценки ингибирования антителом hC34 продукции анафилатоксинов C3a и C5a был положен в основу метода определения специфической активности антитела hC34, вошедшего в состав проекта нормативной документации на препарат в качестве методики контроля качества специфической активности фармацевтической субстанции и лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.

**Методология и методы исследования.** Набор использованных методов исследования, в том числе методов статистической обработки данных, соответствует современному методическому уровню экспериментальных и лабораторных исследований.

Экспериментальные исследования проводились на основании требований Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и Приказа Минздрава России от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 блокирует альтернативный путь активации комплемента в молярном недостатке по отношению к общему количеству C3 в пробах плазмы крови.

2. Аналог рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 – моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы – проявляет церебропротекторную активность в модели закрытой черепно-мозговой травмы у крысы.

3. Лекарственная форма рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 при внутривенном введении в дозах, превосходящих терапевтическую дозу для человека, не токсична для лабораторных животных в остром и хроническом

эксперименте и не обладает аллергизирующими и иммунотоксическими свойствами.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов исследования и адекватным выбором методов статистического анализа.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (23-25 мая 2018 г., Москва), IV научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия иммунозависимых и инфекционных болезней) (30 сентября - 05 октября 2018 г., Сочи), Международном объединенном иммунологическом форуме - 2019 (24-29 июня 2019 г., Новосибирск), Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (26-29 октября 2021 г., Москва).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 4 печатных работы, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Личный вклад автора.** Личный вклад соискателя состоял в непосредственном участии на всех этапах проведения научной работы, включая получение исходных данных, обработку и интерпретацию полученных данных, подготовку публикаций по результатам выполненной работы. Соискатель являлся исполнителем научно-исследовательской работы «Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к C3 компоненту комплемента человека для лечения травматического повреждения головного мозга» по Государственному контракту № 14.N08.11.0121 от 30 сентября 2016 г. Доля личного участия соискателя при проведении экспериментов *in vitro*, планировании исследований, получении и обработке исходных данных по всем разделам диссертации составила не менее 90 %, при интерпретации результатов и подготовке публикаций – 95 %.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертация изложена на 168 страницах печатного текста, включает 18 рисунков и 27 таблиц и состоит из введения, трех глав (обзор научной литературы, материалы и методы, результаты исследований), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, включающего 217 источников.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) остаются важнейшей медико-социальной проблемой, что обусловлено их высокой долей в структуре заболеваемости и смертности населения, значительными показателями временных трудовых потерь и первичной инвалидности. Термином «инсульт» характеризуется множество различных состояний. Ишемические инсульты составляют 70-85 % от общего числа инсультов, внутримозговые кровоизлияния — 20-25 %, нетравматические субарахноидальные кровоизлияния — 5 %. По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируют около 17 млн. случаев инсульта, причем около 50 % больных умирают после перенесенного инсульта [1]. Среди выживших пациентов у трети в течение недели наступает улучшение состояния, у 40% степень инвалидизации остается прежней, а у 20% в течение недели наступает ухудшение состояния [2]. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, в 2016 г. в России ЦВЗ были диагностированы в 950,9 случаях на 100 тыс. населения в возрасте 18 лет и старше, из них примерно у четверти выявлен ишемический инсульт. Смертность от ЦВЗ в 2016 г. составила 190,8 случая на 100 тыс. населения, смертность от инсульта - 123 случая на 100 тыс. населения [3].

В настоящее время достигнут ряд значительных успехов в профилактике и лечении инсульта, в частности, за счет широкого распространения современной антитромбоцитарной терапии, терапии статинами и высокоэффективной антигипертензивной терапии [4], а также за счет разработки внутривенного фармакологического тромболиза и внутриартериальной механической тромбэктомии [5]. При этом от 25 до 50% пациентов, которым назначена внутривенная терапия в течение 9 часов после инсульта, получают как минимум среднюю степень инвалидности [6-8]. Существенная реперфузия достигается у

85% пациентов с окклюзией крупных сосудов бассейна сонной артерии, в некоторых случаях уже через 24 часа после инсульта. Тем не менее, 30–50% пациентов, которым подходит эта терапия, также остаются инвалидами, несмотря на довольно небольшой объем инфарктной зоны [9-10].

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) - одна из главных причин инвалидизации и смертности населения, особенно у лиц молодого возраста. Термином «черепно-мозговая травма» обозначают сочетанное повреждение черепа и мозга. Однако нередко возможна тяжелая травма мозга без сопутствующего повреждения костей черепа. Тяжесть травмы и прогноз определяются в первую очередь повреждением мозга. Следствием ЧМТ часто бывает повреждение сосудов самого мозга, его оболочек и черепа. Эти сосудистые изменения могут быть чрезвычайно переменными по характеру и степени выраженности. Вследствие размозжения мозга, разрыва его сосудов изливающаяся кровь может попасть в субарахноидальное пространство, и возникают так называемые субарахноидальные кровоизлияния. Вторичные повреждения мозга развиваются у пострадавших с тяжелой ЧМТ, то есть примерно в 20% случаев. Они сами по себе могут быть причиной опасных осложнений и летального исхода [11].

Основные причины ЧМТ зависят от ряда факторов (социальных, географических, демографических и т.д.) и варьируют в разных странах, однако частота ЧМТ примерно одинакова и составляет 300-400 случаев на 100 тыс. населения в год. В России частота ЧМТ - 400 на 100 тыс. населения в год, т.е. ежегодно ЧМТ получают примерно 600 тыс. человек, из них около 50 тыс. погибают и столько же становятся инвалидами [11]. Несмотря на то, что медицинские достижения, в том числе в догоспитальной и интенсивной терапии, в значительной степени способствовали снижению смертности от ЧМТ [12], она по-прежнему является ведущей причиной инвалидности в развитом мире.

На основании приведенных данных можно заключить, что поиск новых препаратов и терапевтических подходов к лечению и профилактике инсультов, а также к устранению последствий ЧМТ может иметь значительную клиническую ценность.

Общей чертой основных заболеваний, поражающих центральную нервную систему (ЦНС), является воспаление, причем считается, что хроническое непроходящее воспаление вносит вклад в прогрессию заболевания и/или ухудшает его исход [13]. Острое воспаление начинается с экспрессии молекул адгезии эндотелием сосудов и миграции лейкоцитов из крови в паренхиму мозга. Активированные сигналами опасности клетки иммунной системы синтезируют и освобождают в окружающую среду цитокины, что в свою очередь приводит к экспрессии и продукции в кровь множества воспалительных молекул. В ЦНС провоспалительные цитокины стимулируют синтез и секрецию компонентов комплемента. Наибольший вклад в этиологию воспаления вносят продукты активации комплемента, особенно анафилатоксины C3a и C5a, которые, являясь хемоаттрактантами, поддерживают воспалительный ресурс за счет привлечения миграции лейкоцитов в мозг. Кроме того, они активируют как прибывшие, так и собственные клетки мозга, экспрессирующие на своих мембранах специфические C3a и C5a рецепторы (C3aR и C5aR), и способствуют дополнительному высвобождению многих воспалительных молекул, включая провоспалительные цитокины [14-18].

Система комплемента вместе с различными факторами врожденного и адаптивного иммунитета помогает поддерживать барьерные функции и защищать организм от вторжения микроорганизмов, паразитов и последствий травматических повреждений [19-20]. В активации системы комплемента задействованы многочисленные белки, циркулирующие в растворимой форме и фиксированные на мембранах различных клеток хозяина. В их число входят компоненты, которые активируются сигналами опасности и, действуя по каскадному принципу, моментально атакуют чужеродную мишень. В то же время, клетки хозяина защищены от подобной атаки регуляторными растворимыми и мембраносвязанными белками, которые сдерживают активирующий потенциал комплемента [21-22].

Однако считается, что та же самая система играет важную роль в развитии вторичной патологии нервной системы при опосредующем участии иммунной

системы. Предшественники белков комплемента синтезируются, главным образом, гепатоцитами, а затем высвобождаются в кровоток, готовые к активации различными путями [21,23]. В настоящее время показано, что, помимо гепатоцитов, многие белки комплемента дифференцированно индуцируются в нескольких типах клеток, включая иммунные, эндотелиальные, эпителиальные клетки, перициты, а также клетки ЦНС [24-26].

При нарушении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) белки системы комплемента могут мигрировать в мозг и формировать потенциально действенный цитолитический комплекс на поверхности нейронов и глиальных клеток, который при недостатке регуляторных белков может вызывать их повреждение и влиять на этиологию нейродегенеративных, демиелинизирующих заболеваний и ишемического инсульта [27].

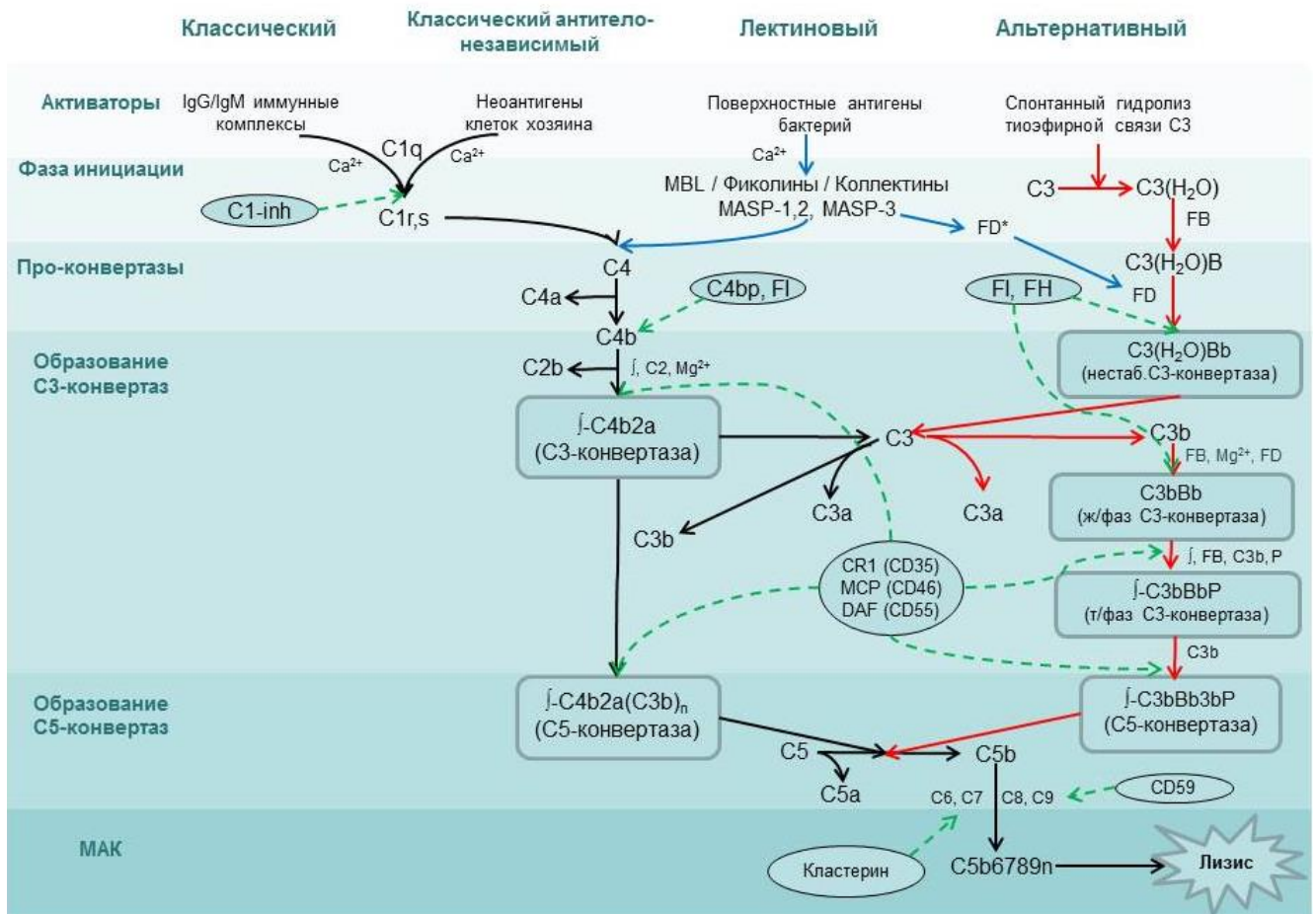
Таким образом, при заболеваниях ЦНС неконтролируемая, патологическая активация комплемента играет важную негативную роль, опосредуя вымирание нейронов, повреждение аксонов, демиелинизацию и нарушение ГЭБ и гематоспинномозгового барьера (ГСМБ) [28].

Блокирование активации системы комплемента стало одним из стратегических подходов к лечению не только комплемент-зависимых заболеваний, таких как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), возрастная макулярная дегенерация (ВМД), гломерулонефриты, но и к коррекции ряда других патологических состояний, в том числе, аутоиммунных заболеваний, сепсиса, полиорганной недостаточности [29].

В обзоре рассмотрены фармакологические подходы к лечению инсульта и повреждений головного мозга при ЧМТ путем ингибирования эффекторной функции системы комплемента, а именно, анафилатоксинов C3a и C5a.

## 1.1 Механизмы активации комплемента и опосредованной комплементом патологии центральной нервной системы

Система комплемента, помимо особых случаев, может быть активирована тремя каноническими путями: классическим, лектиновым и альтернативным (рисунок 1.1.1), которые инициируются разными индукторами – факторами опасности (DAMP), хотя в течение последних 10-15 лет обнаружено, что существуют неканонические пути активации комплемента [30-32], что указывает на многогранность механизмов действия и функций одной из самых эволюционно древних систем врожденного (неадаптивного) иммунитета.



Обозначения на рисунке: черные стрелки – классический путь активации комплемента, синие стрелки – лектиновый путь, красные стрелки – альтернативный путь, зеленые стрелки – отрицательная регуляция конвертаз и сборки МАК,  $\beta$  - активирующая поверхность, FD\* - предшественник фактора D

Рисунок 1.1.1 – Механизмы активации системы комплемента



Пути активации системы комплемента отличаются тем, что в фазе инициации мишени-индукторы распознают разные молекулы. Для запуска классического пути (КП) сложный, субъединичный белок C1q, циркулирующий в кальций-зависимом комплексе с проферментами C1r и C1s C1, своими глобулярными доменами (gC1q) связывается с Fc-фрагментами иммуноглобулинов (Ig) G или M в составе иммунных комплексов, фиксированных на активирующей поверхности. После этого взаимодействия происходит конформационное изменение в части коллагеновых доменов C1q, в результате которого иницируется цепочка процессов последовательной активации в тетрамере C1r<sub>2</sub>-C1s<sub>2</sub>, и превращение профермента C1s в активную протеазу, которая расщепляет находящиеся в микроокружении компоненты C4 и C2 [33-34].

C1q, помимо IgG и IgM, может связываться более чем со 100 различными молекулами-мишенями, несущими отрицательно заряженные группы. В их число входят связанные с патогенами молекулярные структурные элементы, включая липополисахарид (ЛПС) [35] и порины [36]; молекулы, экспонированные на поверхности умирающих клеток [37-38], включая фосфатидилсерин [39-40], двухцепочечную ДНК [41-42], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) [43], аннексины A2 и A5 [44] и кальретикулин [40,45-47], также C-реактивный белок (CRP), пентраксин 3 (PTX-3) [48] и другие. Следовательно, КП может быть активирован, как зависимым от иммунных комплексов, так и независимым образом.

Запуск лектинового пути (ЛП) происходит за счет взаимодействия структурных элементов бактериальных поверхностей с маннозосвязывающим лектином (MBL), коллектинами (CL-K1 и CL-L1) или фиколинами. Все эти распознающие белки также имеют сложные структуры. Домены узнавания наиболее хорошо охарактеризованного MBL распознают углеводную структуру бактериальных поверхностей, фиколины 1, 2 и 3 связываются с ацетилированными соединениями (обычно с ацетилированными сахарами бактерий), CL-K1 и CL-L1 также распознают сахара и другие сигналы

потенциальной опасности. MBL, фиколины, CL-K1 и CL-L1 существуют в различных состояниях олигомеризации - от димера до гексамера, циркулируют в комплексе с сериновыми протеазами - зимогенами MASP-1, MASP-2, MASP-3. После взаимодействия с комплементарной поверхностью-мишенью связанные зимогены активируются и инициируют протеолитическую каскадную систему, в результате которой активированные в комплексе MBL/фиколин ферменты MASP-1, MASP-2 так же, как и C1s, расщепляют C4 и C2 [49-50]. MASP-3 выполняет более сложные функции, которые являются предметом изучения [50].

Активированные C1s или MASP-2 расщепляют сначала C4 на меньший фрагмент C4a и больший C4b, который, за счет открывшейся в результате протеолитического расщепления C4 тиоэфирной связи, ковалентно связывается с активирующей поверхностью (J) через сложноэфирную или амидную связь. После этого C4b  $Mg^{2+}$ -зависимым образом связывает C2, который расщепляется теми же активированными ферментами на C2a и C2b. Более крупный фрагмент C2a, обладающий активностью сериновой протеазы, остается нековалентно связанным с C4b, образуя комплексный фермент C3-конвертазу классического пути (C4b2a), а меньший фрагмент C2b поступает в раствор. C3-конвертаза расщепляет тиоэфирный белок C3, близкий C4, также на большой C3b и малый C3a фрагменты. C3b, за счет активированной тиоэфирной связи, ковалентно связывается с активирующей поверхностью, становясь опсоном, а анафилатоксин C3a поступает в циркуляцию. Часть молекул C3b, которые быстро нарабатывает C3-конвертаза, связываются вблизи фиксированных на поверхности J-C4b2a, что приводит к количественному накоплению конвертазных комплексов J-C4b2aC3b. Когда же к такому комплексу дополнительно присоединяются молекулы C3b, образуя комплекс J-C4b2aC3b<sub>n</sub>, то происходит конформационная перестройка в домене C4b и фермент изменяет специфичность C3-конвертазы, приобретая свойство расщеплять C5 компонент, то есть становится C5-конвертазой КП [51].

Вместе с тем, в плазме при нормальных физиологических условиях доминирующим путем активации комплемента является альтернативный путь

(АП), посредством которого происходит отслеживание инвазии патогенов. Активация АП сильно отличается от активации КП и ЛП. В физиологических условиях активация АП осуществляется за счет медленного спонтанного гидролиза тиоэфирной связи, непрерывно циркулирующего в кровотоке С3. Как только происходит разрыв тиоэфирной связи, С3 изменяет конформацию и принимает форму так называемого С3(Н<sub>2</sub>О), обнажая в одном из доменов сайт для взаимодействия с фактором В (FB). В течение короткого времени жизни тиоэфирной связи (около 8-60 мсек) часть молекул С3(Н<sub>2</sub>О) связывает FB, образуя комплекс С3(Н<sub>2</sub>О)В. FB в комплексе претерпевает конформационный переход, экспонируя сайт для протеолитической атаки строго специфичной сериновой протеазой фактора D (FD), отщепляющей от него фрагмент Ва, что приводит к образованию инициирующей С3-конвертазы С3(Н<sub>2</sub>О)Вb, которая способна расщеплять нативный С3 на фрагменты С3b и С3а. Образование этой короткоживущей нестабильной С3-конвертазы С3(Н<sub>2</sub>О)Вb называется «tick-over» процессом или «тикающей активацией», и представляет собой постоянно действующий в норме механизм запуска полноценного каскада активации АП [52-53].

После удаления С3а от циркулирующего в растворе или фиксированного на активирующей поверхности С3 оставшийся фрагмент С3b претерпевает резкие структурные изменения, что приводит к появлению сайтов связывания с FB, который связывается с этим фрагментом Mg<sup>2+</sup>-зависимым образом и образует проконвертазу С3bВ. После отщепления от связанного в комплексе FB фрагмента Ва под действием фактора FD, как и в случае образования инициирующей конвертазы, С3bВ превращается в жидкофазную С3-конвертазу С3bВb. Далее, как только С3-конвертаза появляется у поверхности активатора, на которой находятся гидроксильные радикалы (или аминокгруппы), вновь генерируемые ею молекулы С3b могут ковалентно связываться с активирующей поверхностью через сложноэфирную или амидную связь, находясь от нее на расстоянии не более 60 нм [54]. Фактор В присоединяется теперь уже к фиксированному на активаторе С3b, после чего от комплекса также отщепляется Ва и таким образом образуется

более стабильная по сравнению с жидкофазной - твердофазная C3-конвертаза  $\text{I-C3bBb}$  с периодом полураспада около 90 сек. Для стабилизации этого фермента, а также жидкофазной C3-конвертазы, которые обеспечивают эффективную защиту хозяина от патогена, в системе комплемента предусмотрен механизм, при котором секретируемый моноцитами/макрофагами [55-57] тетрамерный белок пропердин (P) связывает конвертазы C3bBb, а также проконвертазу C3bB [58], изменяя структуру C3b и тем самым защищая его от действия регуляторного белка - фактора H, действие которого направлено на распад C3-конвертазы. За счет участия фактора P стабильность C3-конвертаз возрастает в 5-10 раз [59].

Как только к этому комплексному ферменту присоединяется следующая молекула C3b ( $\text{I-(C3bBb)C3b}$ ), происходит конформационная перестройка в ее домене, и фермент теряет способность расщеплять C3 и начинает расщеплять C5. В результате действия C5-конвертаз компонент C5 расщепляется на фрагменты C5b и мощный биологически активный C5a. C5b взаимодействует с компонентом C6, с чего начинается заключительный каскад сборки мембраноатакующего комплекса (MAC). После следующего взаимодействия с компонентом C7 образовавшийся комплекс C5b67 за счет гидрофобных взаимодействий внедряется в поверхностную мембрану клетки-мишени. Комплекс дополняется присоединением компонента C8, что приводит к связыванию финального компонента C9, его полимеризации до 10-16 молекул и образованию поры (C5b6789n) в мембране [60]. В результате нарушения целостности липидного бислоя перфорированная клетка гибнет за счет осмотического лизиса [21].

Процессы ферментативных преобразований, приводящих к сборке и накоплению C3- и C5-конвертаз, называются стадией амплификации. Главной молекулой в цепочках амплификации является C3 компонент и его конвертированный фрагмент C3b, причем усиление конверсии и образование дополнительных конвертаз происходит за счет активации всех трех путей [61]. Эта цепная реакция активации комплемента усиливает опсонизацию мишеней молекулами C3b, которые подвергаются атакам фагоцитов, и увеличивает образование анафилатоксинов.

Таким образом, КП и ЛП играют решающую роль в распознавании патогенов и инициации каскада комплемента. Однако АП с учетом амплификации (или петли обратной связи) за счет конвертаз КП и ЛП и постоянного надзора за инвазией патогенов обеспечивает более 80% активации С5 и образования терминального комплекса на мембранах мишеней [62].

Система комплемента строго сбалансирована. Процессы активации практически на каждом участке контролируют регуляторные растворимые и мембраносвязанные белки. В растворе на стадиях инициации КП активацию прерывает ингибитор комплекса С1 (С1-Inh). На этапе формирования С3-конвертаз КП и ЛП действует С4b-связывающий белок (С4bp), который иммобилизует С4b, а ход АП контролирует фактор Н, который, как и С4bp, сдвигает равновесие реакций в сторону инактивирующего действия протеазы - фактора I (FI). Мембраносвязанные регуляторные белки CR1(CD35), MCP(CD46) и DAF(CD55), экспрессированные на мембранах клеток хозяина, препятствуют сборке конвертаз или их быстрой диссоциации, а растворимый белок кластерин и экспрессированный на мембранах множества клеток хозяина гликопротеин CD59 являются последними «дежурными», которые не дают возможности правильной сборке MAC и защищают хозяйские клетки от повреждения [20,63].

Благодаря регуляторным белкам развивается отрицательная регуляция конвертаз. Произойдет ли амплификация активации комплемента зависит от баланса между скоростями связывания каждой реакции [61]. Сдвиг баланса в ту или иную сторону зависит от количественных уровней регуляторных белков, а также от молекулярной структуры активирующей поверхности [22]. В норме действие ингибиторов сдерживает запуск активации системы комплемента. Нарушение баланса системы комплемента вследствие генетического дефицита ряда регуляторных белков является главной причиной очень серьезных заболеваний, которые приводят к разрушению собственных клеток и в конечном счете к более раннему летальному исходу [64-67].

В норме ГЭБ/ГСМБ отделяют ЦНС от белков комплемента плазмы, но нарушения целостности астроцитов, перицитов или эндотелия, которые

поддерживают этот барьер, позволяют попадать циркулирующим компонентам комплемента в ЦНС. ГЭБ может быть нарушен в результате травмы, геморрагического инсульта, повреждений эндотелия, а также ослаблен при ишемии, в результате отека мозга в силу других причин. В этих случаях в мозг устремляются белки комплемента, циркулирующие в плазме крови. Однако нарушение ГЭБ/ГСМБ не является необходимым для присутствия комплемента в головном и спинном мозге. В настоящее время признано, что резидентные клетки ЦНС могут синтезировать функциональный набор белков комплемента в условиях гомеостаза [68]. Кроме иммунного надзора, физиологические функции комплемента в ЦНС включают участие в ее развитии, выведение избыточных нейротрансмиттеров, старых и гликированных белков, а также поддержание жизнеспособности нейронов, удаление лишних синапсов и нейрогенез у взрослых [69]. Однако при заболевании синтез и/или повышение экспрессии белков комплемента нейронами и глией вносит вклад в комплемент-ассоциированную нейропатологию, в том числе и на ранних стадиях нейродегенеративных заболеваний, когда ГЭБ/ГСМБ еще не нарушен.

В состоянии гомеостаза ЦНС баланс системы комплемента благодаря собственным регуляторным белкам сдвинут в сторону ингибирования активации, и спонтанная активация комплемента обычно не происходит. В частности, микроглия и астроциты экспрессируют поверхностную форму C1-Inh, который отделяет C1r, C1s и MASP от распознаваемых ими молекул и тем самым ингибирует классический и лектиновый пути активации комплемента, соответственно [68]. Астроциты также регулируют альтернативный путь, экспрессируя фактор Н, который служит кофактором для протеазы FI, инактивирующей C3-конвертазы AP [70], и рецептор 1 типа комплемента (CR1/CD35), который подобно фактору Н способствует редукции C3b и C4b к неактивным формам iC3b и iC4b под действием FI [71]. Астроциты и микроглия также экспрессируют белок CD59 – ингибитор MAC, который препятствует полимеризации C9 [72]. К числу других поверхностных регуляторов комплемента относят фактор ускорения распада факторов комплемента (DAF/CD55), который

является ингибитором конвертазы C3 и C5, и мембранный белковый кофактор (MCP/CD46), который вместе с фактором I осуществляет конверсию C3b и C4b в неактивные формы iC3b и iC4b. В отличие от астроцитов и микроглии, нейроны лишь слабо экспрессируют регуляторные белки CR1, C1-Inh, фактор H, MCP, CD59 и не экспрессируют DAF [68,73]. Как известно, олигодендроциты также экспрессируют лишь в небольших количествах CD59, C4b-связывающий белок (C4bp) [71,74] и CR1 [71]. Наконец, при апоптозе в нейронах снижается экспрессия поверхностных молекул, ингибирующих комплемент, что усиливает порочный цикл, запускаемый активацией комплемента при нейродегенеративных заболеваниях.

Кроме того, считается, что продукты активации комплемента - анафилатоксины C3a и C5a, являясь хемоаттрактантами, приводят в действие мощные механизмы воспаления, нацеленные на широкий спектр иммунных и неиммунных клеток. В эозинофилах C3a и C5a регулируют продукцию катионного белка эозинофилов, их адгезию к эндотелиальным клеткам, а также их миграцию [75-76]. Базофилы [77] и тучные клетки [78] реагируют на стимуляцию антител высвобождением гистамина.

C3a действует на связанный с G-белками рецептор C3aR, который находится в большинстве миелоидных клеток. Иммуномодулирующие эффекты этой оси включают регуляцию окислительного взрыва у макрофагов [79], нейтрофилов [80], эозинофилов [81] и продукцию провоспалительных цитокинов, хотя становится известно все больше других физиологических функций стимуляции C3aR [82]. C3a дополнительно способствует высвобождению серотонина из тромбоцитов морских свинок [83] и модулирует синтез интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей- $\alpha$  из В-клеток и моноцитов [84-85]. В ЦНС C3aR экспрессирован на астроцитах и микроглии [86-87].

C5a - мощный хемоаттрактант для макрофагов [88], нейтрофилов [89], активированных В- [90] и Т-клеток [91], базофилов [92] и тучных клеток, последние из которых также мигрируют в направлении градиента C3a [93]. Активность C5a реализуется через два типа специфических рецепторов C5aR1

(CD88) и C5aR2 (C5L2, GPR77), которые часто экспрессируются совместно [94]. В ЦНС рецептор C5aR1 выявлен на большинстве клеток миелоидного ряда, а также микроглие, астроцитах и некоторых нейронах ЦНС [26,95]. Сигналинг C5aR1 способствует воспалению, которое может приводить к разрушительным последствиям для ЦНС, поскольку включает активацию фагоцитоза, окислительный взрыв, продукцию провоспалительных цитокинов, усиление экспрессии интегринов, нужных для адгезии лейкоцитов и их выхода из сосудов и для привлечения большинства разновидностей лейкоцитов к месту воспаления [95]. Известно также о нейропротективном физиологическом действии C5a [96-97], что может быть результатом взаимодействия с рецептором C5aR2, биологические эффекты которого сложны и включают как противовоспалительное, так и провоспалительное действие.

Отложение C5b, более крупного фрагмента расщепления C5, инициирует терминальный путь и образование МАС (C5b-9). Считается, что МАС, образовавшийся в мозге вследствие патологической активации комплемента, способствует демиелинизации [98-99] и дегенерации аксонов [98] нейронов.

Таким образом, при повреждениях центральной нервной системы за счет опсонизации некротизированных клеток, рекрутинга лейкоцитов, усиленной генерации C3a и C5a и более низкой экспрессии регуляторных белков сдвиг баланса в системе комплемента происходит в сторону неконтролируемой активации, что делает ЦНС более уязвимой к собственному локальному и пришедшему из плазмы комплементу по сравнению с другими органами. В связи с этим особенно актуальным становится поиск терапевтических агентов – ингибиторов системы комплемента - для лечения патологии ЦНС.

Как следует из механизмов активации системы комплемента, можно выбрать довольно много участков для потенциального ингибирования. Наиболее эффективное средство блокирования комплемента - нейтрализующие антитела против ключевых молекул каскада активации. КП и ЛП можно заблокировать с помощью антител к протеазам C1s и MASP-2, соответственно. Для блокирования АП могут быть использованы антитела к факторам В и D, а также химерные



рекомбинантные молекулы регуляторных белков, усиливающих их активность. Однако особенный интерес представляет поиск агентов, блокирующих функциональные домены сложной молекулы C3, которая является центральной при активации системы комплемента любым из трех путей.

## **1.2 Ингибирование анафилатоксинов комплемента при ишемическом инсульте**

Инсульт является массовой причиной инвалидности взрослых [100]. Более 70 % случаев инсульта являются результатом ишемии/реперфузии вследствие тромботической или эмболической закупорки церебральных сосудов [101]. Реперфузия травмированного участка мозга вызывает его дальнейшее повреждение вследствие окислительного стресса, дисфункции ГЭБ, воспаления и апоптоза, что приводит к образованию ишемического ядра, окруженного слабо перфузируемой областью «полутени» (пенумбры), с последующей потерей функциональной способности всей этой зоны [102].

Развитие инсульта неизменно коррелирует с активацией комплемента [102]. В участках ишемического повреждения мозга всегда присутствуют компоненты системы комплемента и продукты ее активации C1q, MBL, C3, C3a, C3c, C4d, C5a и C9 [15,103], и у пациентов, перенесших инсульт, повышены уровни C3, C3a, C4, C4d, C5, C5a, C5b-9, фактора B, MBL, MASP-1/2 и MAC в плазме крови, а уровни фиколинов снижены [104-107]. Интересно, что при умеренном инсульте снижение уровня C5b-9 в плазме может отражать возросшее потребление этого фактора [105]. Повышенные уровни C3, C3c, C4 и MBL в сыворотке связаны с увеличением тяжести инсульта, а у пациентов с достаточным уровнем MBL наблюдаются более высокие уровни C3 в плазме и худшие исходы инсульта [108-109]. Снижение уровня фиколина-1, маркера активации лектинового пути, в течение 6 часов от начала инсульта связано с неблагоприятным исходом заболевания [110]. Наличие минимальных уровней экспрессии DAF и CD69 и накопление комплемента и IgM в участках ишемического повреждения в

посмертных препаратах головного мозга может говорить о нарушении регуляции комплемента при инсульте [103].

Хотя геморрагический инсульт встречается реже, чем ишемический, он связан с еще более худшими исходами, и также проявляется активацией системы комплемента. Это важно с учетом того, что реваскуляризация пациентов с ишемическим инсультом может вызвать внутримозговое или субарахноидальное кровоизлияние. При субарахноидальном кровоизлиянии уровни C3a и М-фиколина повышены в сыворотке, спинномозговой жидкости и паренхиме головного мозга, и они коррелируют с вторичным ишемическим повреждением и функциональным исходом [111-113].

Расщепление C3 и образование анафилатоксина C3a, также как опсонинов (iC3b, C3dg и C3d), и образование C5-конвертазы (из C3 и C3b), которая, в свою очередь, генерирует C5a и C5b, который вступает во взаимодействие с C6, C7, C8 и несколькими C9 с формированием MAC (C5b-9), потенциально могут быть вовлечены в поражение тканей, обусловленное реперфузией при инсульте. Однако большинство исследователей предполагают, что сразу после реперфузии повреждение тканей опосредовано в основном C3a и в меньшей степени C5a, в то время как MAC является просто маркером активации каскада комплемента [114-116]. В связи с этим большой интерес вызывает возможность воздействия при инсульте на более поздние медиаторы активации системы комплемента, а именно на анафилатоксины.

Исследования показали, что антагонисты C3aR смягчают ишемическое повреждение головного мозга, в основном за счет уменьшения инфильтрации нейтрофилов и воспалительного ответа на острой стадии ишемического инсульта [114-115]. Воздействие на C3aR антагонистом (SB290157) приводит к уменьшению зоны инсульта, снижению экспрессии молекул клеточной адгезии ICAM-1 на эндотелиальных клетках и уменьшению числа гранулоцитов, позитивных по C3aR, у мышей с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) в течение 30 минут, но не с постоянной ОСМА [115].

Однако до сих пор ведутся дискуссии о влиянии антагонистов C3aR на нейрогенез после ишемического инсульта. В исследовании транзиторного ишемического инсульта у взрослых самцов мышей C57BL/6 при использовании в течение 3 дней после ишемии низкой дозы антагониста C3aR (1 мг/кг) возрастала пролиферация DCX<sup>+</sup> нейробластов в субвентрикулярной зоне через 7 дней после ишемии, тогда как в высокой дозе антагонист C3aR (40 мг/кг) подавлял пролиферацию нервных клеток-предшественников [117]. По данным A.F. Ducruet и соавт. (2012), при ишемии происходит замедленная инфильтрация мозга Т-лимфоцитами, экспрессирующими C3aR, и применение антагониста C3aR спустя 72 ч после поражения приводит к значительному снижению подкоркового повреждения. Это говорит о том, что активированные Т-клетки могут препятствовать эндогенному нейрогенезу, хотя механизм этого эффекта неизвестен.

На модели перманентной ишемии у мышей было показано, что инъекция антагониста C3aR два раза в день в течение 10 дней после операции подавляла пролиферацию нейробластов в субгранулярной зоне (SGZ) гиппокампа и в слое гранулярных клеток зубчатой извилины (GCL) с 7-го по 21-й день после ишемии [118].

Кроме того, на моделях тромбоэмболического инсульта, которые больше соответствуют инсульту у человека, было продемонстрировано, что через 6 ч после поражения в плазме повышается уровень C3a и увеличивается цереброваскулярная экспрессия C3aR, которая сохраняется до 4 нед. На модели фототромботического инсульта у мышей с быстрой спонтанной реперфузией при введении через 1 ч после поражения антагониста C3aR (SB290157) наблюдали улучшение нейрофункции и уменьшение инфаркта через 48 ч. На модели эмболического инсульта при введении SB290157 через 2 ч после поражения отмечено улучшение гистологических и функциональных показателей, а при использовании SB290157 совместно с внутривенным тромболизом - уменьшение кровотечения и отека и улучшение показателей в отличие от использования только тромболизиса через 4,5 ч после поражения [119].

Важно отметить, что SB290157 действует как антагонист в клеточных линиях, в которых плотность рецепторов низкая, и как частичный агонист в клеточных линиях, экспрессирующих более высокие уровни C3aR [120-121]. Таким образом, есть необходимость в разработке более специфических антагонистов C3aR.

В противовес описанным выше исследованиям, подтверждающим позитивную роль ингибирования C3aR при инсульте, существуют данные, что C3a регулирует миграцию и дифференциацию клеток-предшественников нейронов и увеличивает выживаемость астроцитов [118,122-123]. Также показано, что клетки-предшественники и незрелые нейроны экспрессируют C3aR.

На модели неонатальной гипоксии-ишемической энцефалопатии наблюдали снижение нарушений памяти после поражения у трансгенных мышей, экспрессирующих C3a, и у мышей дикого типа, которым вводили экзогенный C3a [124].

В другом исследовании при недостатке C3aR снижались прорастание и пластичность аксонов в периинфарктной зоне после инсульта, которые могут быть восстановлены путем интраназального введения C3a [123].

Кроме того, считается, что C3a обладает нейропротективными и нейротрофическими свойствами [26].

Из всего вышесказанного можно заключить, что для того, чтобы лучше охарактеризовать роль C3a и C3aR при инсульте и оптимизировать терапевтические стратегии, необходимы дополнительные исследования на мышах с тканеспецифической делецией C3aR, разработка более специфичных антагонистов C3aR и дальнейшие исследования агонистов C3aR.

Анафилатоксин C5a - продукт расщепления C5, постоянно образующийся во время активации комплемента [125]. C5a является основным провоспалительным медиатором при широком спектре заболеваний, поскольку регулирует как воспалительный процесс врожденного иммунитета, так и адаптивный иммунный ответ [126]. C5a влияет на воспаление, индуцируя высвобождение цитокинов и хемокинов, повышая экспрессию молекул адгезии и

увеличивая проницаемость сосудов [127-128].

По сравнению с C3a, C5a при связывании с его каноническим рецептором C5aR1 является действующим началом при многих опосредованных компонентом воспалительных заболеваниях, включая атеросклероз, артрит, ишемию-реперфузию почек, ишемию-реперфузию тонкого кишечника, ишемию миокарда и ишемический инсульт [125,129-133]. Считают, что ингибирование C5a препятствует повреждению мозга при ишемии/реперфузии [134-135].

Из всех фармакологических ингибиторов C5a на настоящий момент лучше всего изучен антагонист C5aR1 - вводимый перорально циклический пептид AcF-[OPdChaWR] (PMX53) [136-138]. У мышей, которым препарат PMX53 вводили за 30 мин до ишемии, наблюдали умеренное улучшение исходов после 60-минутной ОСМА [139]. Введение PMX53 даже в более низкой дозе за 45 мин до ишемии также приводило к уменьшению объема инфаркта головного мозга у мышей через 24 ч после поражения [140].

Так как препарат PMX53 имеет короткое время полувыведения, при его использовании до повреждающего воздействия важно увеличить это время для преодоления препаратом гематоэнцефалического барьера [141]. С этой целью был получен аналог PMX53 - гидроциннамат OPdChaWR (PMX205) - путем замены в PMX53 дополнительного циклического фенилаланина гидроксициннаматом, что позволило повысить липофильность, силу антагонистического действия на C5aR1, метаболическую стабильность и способность препарата проникать через ГЭБ [137-138].

На модели ишемического инсульта у крыс было изучено моноклональное антитело к C5, специфически блокирующее образование C5a и C5b-9 [134,142]. Введение моноклональных антител к C5 (18A10.62) крысам вызывало снижение нарушений моторики и развития инсультной зоны (на 40 % при введении до и на 30 % – после ишемии), отека и инфильтрации мозга у крыс при 90-минутной ОСМА [134].

Кроме того, на модели ОСМА у мышей было показано, что C5a образуется через день после ишемического поражения и преимущественно вырабатывается

нейронами головного мозга [114,143]. Блокирование C5a-сигналинга посредством генетического нокаута C5aR1 у мышей улучшало неврологические показатели и уменьшало размер инфаркта через день после ишемического инсульта. Исследование *in vitro* подтвердило, что в культивируемых нейронах экспрессируется C5a, и его экспрессия повышается при ишемическом стрессе; в культивируемых астроцитах и микроглии в ишемических условиях экспрессия C5a не повышается. На модели кислородно-глюкозной депривации (КГД) при применении C5a наблюдали апоптоз нейронов, в то время как при дефиците C5aR1 нейроны были защищены от апоптоза, что указывает на нейропротекторный эффект при ингибировании взаимодействия между C5a и C5aR1 в острой фазе ишемического инсульта [143]. Несмотря на наличие ряда свидетельств, указывающих на то, что активация C5a оказывает вредное воздействие на ранней стадии ишемического инсульта, установлено, что C5a проявляет нейропротекторные свойства при нейротоксичности, вызванной глутаматом у мышей [144-145]. Именно поэтому, вероятно, C5a может действовать как защитный фактор, ингибируя повреждение тканей на поздней стадии ишемического инсульта.

Описанные выше исследования подтверждают, что модуляция C5a/C5aR-сигналинга обладает потенциалом на ранней стадии ишемического инсульта. Однако эффект моноклональных антител к C5 и антагонистов C5aR1 при ишемическом инсульте ограничен. Остается недостаточно изученным вопрос, будут ли они выполнять защитные функции на более поздней стадии ишемического инсульта, и каков механизм их действия. Таким образом, необходима разработка новых стратегий модуляции активности C5a/C5aR при ишемическом инсульте.

### 1.3 Ингибирование анафилатоксинов комплемента при черепно-мозговой травме

К причинам повреждения головного мозга при травмах относят микрокровоотечения, нарушения ГЭБ, экспонирование антигенов ЦНС и клеточных остатков, что вызывает активацию системы комплемента. Также наблюдается приток различных клеток врожденного и адаптивного иммунитета, которые способны вносить вклад в активацию комплемента [69].

Вторичное повреждение головного мозга после ЧМТ тесно связано с активацией воспалительной реакции. Система комплемента - важная ветвь реакции врожденного иммунитета - является главным координатором посттравматического нейровоспаления и вторичной нейропатологии после ЧМТ [146-150]. После активации белки системы комплемента увеличивают проницаемость гематоэнцефалического барьера через C3a и C5a, способствуют инфильтрации лейкоцитов в поврежденный мозг и последующему образованию свободных радикалов, индуцируют апоптоз нейронов и глии посредством связывания C3a и C5a с их рецепторами и способствуют лизису нейронов через MAC [28,69,150]. Таким образом, терапевтические стратегии, направленные на блокирование активации комплемента, потенциально могут уменьшить нейровоспаление и нейродегенерацию у пациентов с ЧМТ [151-154].

При черепно-мозговой травме уровни C5b-9 в вентрикулярной жидкости в 1800 раз превышают контрольные и хорошо коррелируют со степенью нарушения ГЭБ [150]. При исследовании тканей лобной и височной долей мозга пациентов с ЧМТ, прооперированных в связи со стойким повышением внутричерепного давления, выявлены повышенные уровни C1q, C3, C3b, C3d и MAC в области пенумбры [146]. Подобные результаты были получены также на животных моделях ЧМТ [155]. Эти данные подтверждаются тем, что содержание ряда компонентов комплемента, например, C3, C1q и fB было увеличено в спинномозговой жидкости пациентов с ЧМТ по сравнению с контролем [156-157].

Точно так же уровни MAC были значительно повышены в спинномозговой

жидкости пациентов с ЧМТ по сравнению с контролем [150]. Роль МАС в острой потере нейронов после ЧМТ была подтверждена на модели контролируемого коркового повреждения у взрослых самцов мышей, но одновременно было показано, что вышестоящие продукты активации комплемента, образующиеся преимущественно по альтернативному пути, усугубляют хроническое нейровоспаление [158].

В посмертных пробах мозга пациентов с САК найдены отложения C9 на нейронах в сочетании с инфильтрацией гранулоцитами [159]. Важно отметить, что модель САК на грызунах воспроизводит эти результаты: показано, что отложения C9 возрастают в 6 раз в области гематомы по сравнению с нормальной тканью [160].

Данные, полученные на нокаутных мышах, показывают, что в патогенезе последствий ЧМТ играют роль классический и альтернативный пути активации комплемента. Меньшие повреждения после травмы были выявлены у мышей  $C4^{-/-}$  [161],  $CR2^{-/-}$  [162],  $B^{-/-}$  [163],  $C3^{-/-}$  [164-165], тогда как в случае  $CD59^{-/-}$  проявления нейропатологии были усилены [150] по сравнению с мышами дикого типа.

Доказательства вовлечения системы комплемента в патогенез черепно-мозговой травмы получены на различных моделях *in vivo*, в частности, модели внутримозгового кровоизлияния (ВМК), имитирующей геморрагический инсульт, модели холодовой травмы, модели контролируемого коркового повреждения (ККП) и модели падающего груза [166]. Все эти модели различаются по способности имитировать различные аспекты ЧМТ. Например, холодовая травма сопровождается отеком головного мозга и нарушением ГЭБ, что является особенностями ЧМТ [28], но эта травма не является механической. Напротив, стандартизованные модели падающего груза более точно имитируют механическую травму, но у них есть такой недостаток, как низкая воспроизводимость [167], поэтому результаты, полученные с использованием таких моделей, в контексте ЧМТ человека следует интерпретировать с большой осторожностью. Модель ККП так же, как и стандартизованные модели



падающего груза, имитирует механический характер ЧМТ и имеет преимущество перед другими моделями за счет универсальности в применении и воспроизводимости результатов, так как глубину и скорость удара в этой модели легче контролировать [167]. Более того, патологические изменения, наблюдаемые в этой модели, точно имитируют те, которые наблюдаются при ЧМТ [168].

Перечисленные животные модели использовались для исследования роли анафилатоксинов C3a и C5a в черепно-мозговой травме. На модели внутримозгового кровоизлияния у мышей было показано, что при введении антагониста C3aR (SB290157) за 45 мин до ВМК уменьшались неврологические нарушения, отек и инфильтрация гранулоцитами на сроке до 3 дней после повреждения, нарушения также ослаблялись при введении препарата через 6 ч после кровоизлияния [169]. Хотя это убедительно свидетельствует о негативной роли C3aR-сигналинга при ЧМТ, интерпретация результатов осложнена тем, что препарат SB290157 может действовать как агонист [120-121].

Кроме того, на модели свободно падающего груза на крысах было показано, что введение экспериментальным животным с ЧМТ высокоаффинных моноклональных антител, блокирующих активацию комплемента крысы по альтернативному пути на стадиях формирования жидкофазной и твердофазной C3-конвертаз, предотвращающих образование C5-конвертазы и таким образом точно ингибирующих функцию системы комплемента, в частности, образование анафилатоксинов C3a и C5a, приводило к выраженному положительному эффекту, проявлявшемуся в сохранении когнитивных функций животных, а также в улучшении гистологической картины мозговой ткани животных [170].

Нарушение функции C5a, например, путем использования нокаутных мышей C5<sup>-/-</sup> или введения антагониста C5aR, вызывало уменьшение вторичного повреждения на модели холодовой травмы [164]. Более убедительные свидетельства общей повреждающей роли анафилатоксинов комплемента были получены при введении специфического антагониста C5aR1 (PMX53) мышам с кровоизлиянием в мозг. PMX53 значительно улучшал неврологические функции,

оцениваемые по сохранению пространственной памяти, и уменьшал отек и количество гранулоцитов [135]. При использовании антагониста C5aR в сочетании с антагонистом C3aR (SB290157) наблюдали синергический нейропротекторный эффект [135]. На модели внутримозгового кровоизлияния было также показано, что PMX53 в комбинации с антагонистом тромбина действовал лучше, чем каждый из препаратов в отдельности [171].

Эти исследования подтверждают, что ингибирование C3a и C5a и их взаимодействия с рецепторами можно рассматривать в качестве компонента комплексного лечения черепно-мозговой травмы.

#### **1.4 Разработка лекарственных препаратов, ингибирующих эффекторную функцию системы комплемента**

На данный момент зарегистрировано несколько лекарственных препаратов, являющихся ингибиторами комплемента. Препарат экулизумаб на основе терапевтических антител к C5 под названием Солирис (Soliris®) производит компания Alexion Pharmaceuticals, Inc. Препарат одобрен для лечения ПНГ и аГУС [172-174], которые относятся к группе орфанных и являются тяжелыми заболеваниями со значительным ограничением продолжительности жизни. Механизм действия препарата основан на ингибировании расщепления C5 компонента на C5a и C5b и предотвращении сборки мембраноатакующего комплекса C5b-C8 на мембранах эритроцитов в случае ПНГ и разрушения тромбоцитов при аГУС.

В настоящее время проводятся клинические испытания III фазы биосимиляра экулизумаба - BCD-148, разработанного ЗАО «БИОКАД», по протоколу «Рандомизированное открытое международное многоцентровое сравнительное исследование эффективности и безопасности BCD-148 (ЗАО «БИОКАД», Россия) и Soliris® у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией [175].

Одобен FDA для лечения взрослых с ПНГ препарат Равулизумаб (Ultomiris<sup>®</sup>, Alexion Pharmaceuticals, Inc.) – ингибитор C5 2-го поколения, гуманизированное моноклональное антитело так же, как и экулизумаб, специфически и с высоким сродством связывающееся с белком комплемента C5, с увеличенным периодом полувыведения [176].

По данным литературы, в настоящее время разрабатывается достаточно много препаратов, действие которых направлено на прерывание каскадов активации комплемента на различных стадиях [177]. По аналогии с препаратом Солирис, развивается стратегия прерывания каскада активации за счет блокирования расщепления компонента C5 под действием C5-конвертазы. Завершена II фаза клинических исследований полностью человеческих антител LFG316 (tesidolumab, Novartis Pharmaceuticals), полученных по комбинаторной технологии и предназначенных для лечения ВМД [178].

Шведская компания Аффибоди (Affibody AB) развивает комбинаторные технологии, связанные с получением низкомолекулярных молекул неиммуноглобулиновой природы, имеющих высокий аффинитет к белкам комплемента, включая C5. Несколько препаратов на основе этих молекул прошли доклинические исследования и испытывались на добровольцах [179].

Проводятся исследования нескольких молекул, блокирующих расщепление C5-конвертазой и предотвращающих образование воспалительных молекул C5a и C5b и комплекса литической атаки. Среди них небольшой белок ОмСI (около 16 кДа) из семейства липокалинов – Коверсин (Coversin, AKARI Therapeutics). Препарат Коверсин прошёл клинические исследования II фазы для лечения ПНГ [180].

Ведутся клинические исследования нескольких препаратов, полученных по технологиям аптамеров – больших нуклеотидов и пептидов, которые связываются с молекулой-мишенью C5 и нейтрализуют каскады активации комплемента (лечение ВМД), а также СОМАмеров (SOMAmers) – усовершенствованных лекарственных форм аптамеров, полученных по технологии SELEX [181-183].

Завершены клинические исследования I-II фазы безопасности,

переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики препарата Cemdisiran (Alnylam Pharmaceuticals), представляющего собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc), конъюгированный с интерферирующей РНК (RNAi), подавляющего продукцию C5 печенью, у здоровых добровольцев и пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией [184].

Проводятся клинические исследования III фазы при васкулите, ассоциированном с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), препарата Авакопан (ChemoCentryx) - нового биодоступного при пероральном приеме высокоселективного антагониста C5aR1 человека [185]. Авакопан не препятствует образованию C5b или MAC и не блокирует связывание C5a с рецептором C5L2 (C5aR2).

Следует отметить, что препараты, ингибирующие C5, блокируют каскады комплемента, следующие по любому из трех известных путей активации: классическому, лектиновому и альтернативному.

Помимо стратегии ингибирования C5 достаточно активно исследуется стратегия блокирования активации комплемента на более ранних стадиях. В этом случае ключевым компонентом является C3, который расщепляется C3-конвертазой на C3b и C3a и, следовательно, является наиболее очевидной мишенью для блокирования.

Один из подходов к нейтрализации C3 связан с использованием препарата Компстатин (Compstatin) и его производных, входящих в семейство компстатинов [186]. Компстатин представляет собой циклический пептид, стабилизированный 13 внутримолекулярными дисульфидными связями, который селективно связывается с нативным C3 компонентом и его фрагментом C3b, являющимся субстратом для C3-конвертазы. В настоящее время различные производные Компстатина, такие как Cp40, 4(1MeW) и другие, проходят клинические исследования, поскольку и Европейский (EMA), и Американский (FDA) фармакологические комитеты гарантировали возможность их применения для лечения ПНГ, аГУС и ВДС. Клинические исследования этих препаратов проводят такие компании как Потенция (Potentia Pharmaceuticals, Inc.), Апеллис (Apellis

Pharmaceuticals, Inc.), Амндас (Amyndas Pharmaceuticals SA) [187-191].

Проблема нейтрализации С3 с помощью использования терапевтических антител является наиболее трудной, поскольку С3 представляет собой большой мультидоменный белок, концентрация которого в плазме крови составляет около 1 мг/мл, что затрудняет поиск нейтрализующих антител и предусматривает высокие терапевтические дозы. Тем не менее, разработка нейтрализующих антител к С3 интенсивно проводилась и проводится разными исследователями и компаниями, о чем свидетельствует значительное количество публикаций и патентов [192-195].

Получены моноклональные антитела к С3 Н17, которые распознают фрагменты активированного С3 – С3b/iC3b и эффективно блокируют АП активации, прерывая процесс формирования С3-конвертазы [196-198]. На текущий момент американская компания Элюсис Терапевтикс (Elusys Therapeutics) проводит доклинические исследования антител Н17 для лечения заболеваний, связанных с почечной недостаточностью.

Эти антитела являются наиболее близким аналогом антител hC34, разработанных во ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, но значительно отличаются по специфичности, распознают другие домены С3 и уступают в эффективности антителам hC34. Гуманизированные антитела hC34 [199] являются оригинальными и в отличие от многих других ингибиторов комплемента избирательно блокируют активацию только альтернативного пути, не затрагивают каскады классического и лектинового пути, сохраняя противомикробную активность и другие полезные функции системы комплемента.

Все описанные выше ингибиторы комплемента, находящиеся в настоящее время в клинической разработке и потенциально эффективные при лечении патологий центральной нервной системы, перечислены в таблице 1.4.1.

Таблица 1.4.1 - Потенциально эффективные при лечении патологий центральной нервной системы ингибиторы комплемента, находящиеся в клинической разработке

Препарат	Разработчик	Мишень	Стадия разработки	Ссылка на публикацию
Eculizumab (Soliris®)	Alexion Pharmaceuticals, Inc.	C5	Зарегистрирован для лечения ПНГ и аГУС	[172-174]
Ravulizumab (Ultomiris®)	Alexion Pharmaceuticals, Inc.	C5	Зарегистрирован для лечения ПНГ. Клинические исследования III фазы при аГУС	[176]
LFG316 (tesidolumab)	Novartis Pharmaceuticals	C5	Клинические исследования II фазы при ВМД	[178]
Coversin	AKARI Therapeutics	C5	Клинические исследования II фазы при ПНГ	[180]
ARC1905 (Anti-C5 Aptamer)	Ophthotech Corporation	C5	Клинические исследования I фазы при ВМД	[182]
ALN-CC5 (cemdisiran)	Alnylam Pharmaceuticals	C5	Клинические исследования I-II фазы при ПНГ	[184]
CCX168 (Avacopan)	Chemocentryx	C5a/C5aR	Клинические исследования III фазы при ANCA	[185]
APL-2 (Pegcetacoplan)	Apellis Pharmaceuticals	C3	Клинические исследования II фазы при ВМД и географической атрофии. Клинические исследования I фазы при ПНГ.	[187-189]
AMY-101	Amyndas Pharmaceuticals	C3	Клинические исследования I фазы	[190]
POT-4	Potentia Pharmaceuticals, Inc.	C3	Клинические исследования I фазы при ВМД	[191]

К настоящему моменту стратегии ингибирования комплемента не тестировали при инсульте у человека. С учетом данных, представленных выше, можно было бы ожидать, что при лечении инсульта может оказаться полезным ингибирование альтернативного пути, а также ингибирование C3-конвертазы или анафилатоксинов C3a и C5a. Например, экулизумаб хорошо изучен и доказал свою полезность при различных заболеваниях как в центральной нервной системе, так и за ее пределами, но его неспособность блокировать связывание C3a с C3aR и чрезвычайно длительный период полувыведения (более 10 дней) делает

его использование при ишемическом инсульте менее привлекательным. Селективные ингибиторы альтернативного пути также могут оказаться полезными. Наиболее многообещающими из ингибиторов системы комплемента являются аналоги компстатина, блокирующие образование C3a и C5a, независимо от пути активации каскада комплемента. Показано, что они безопасны при различных заболеваниях человека и обладают коротким периодом полувыведения, что позволит обеспечить защиту от ишемии [200].

При вторичных повреждениях после ЧМТ у человека ингибиторы системы комплемента также не исследовали, но многие из них, в частности, ингибиторы анафилатоксинов комплемента, описанные выше, были испытаны на животных моделях ЧМТ с многообещающими результатами. Таким образом, существуют предпосылки для использования этих препаратов в клинической практике.

В настоящем диссертационном исследовании в качестве модели для обоснования подхода к терапии патологий центральной нервной системы, основанного на блокировании активации комплемента с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека, была выбрана модель закрытой черепно-мозговой травмы, так как патогенез ишемического инсульта и вторичных повреждений после ЧМТ сходен, но модель ЧМТ более показательна по своим проявлениям.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

2.1.1 Рекомбинантное гуманизированное антитело к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека

Рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека получают биотехнологическим способом с использованием рекомбинантных технологий на основе клеток-продуцентов CHO-humC34.

Рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 представляет собой полноразмерный иммуноглобулин субкласса IgG1/каппа, характеризующийся молекулярной массой около 155 кДа и состоящий из двух тяжелых и двух легких цепей. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 включают 447 и 213 аминокислотных остатков, соответственно.

Антитело производится путем суспензионного культивирования клеток-продуцентов CHO-humC34 и последующей хроматографической очистки из культуральной жидкости. Штамм-продуцент, технология выделения и очистки рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 [199] разработаны ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России.

2.1.2 Лекарственная форма рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека

Лекарственная форма (ЛФ) рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 была разработана в рамках государственного контракта от 30 сентября 2016 г. № 14.N08.11.0121 по теме «Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к C3 компоненту комплемента человека для лечения травматического повреждения головного мозга».



Лекарственная форма рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 - лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения - по внешнему виду представляет собой порошок белого цвета, после регидратации в дистиллированной воде превращается в прозрачную жидкость.

Один флакон препарата содержит: активный компонент - рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 100 мг; вспомогательные компоненты: натрия хлорид 18,8 мг, натрия дигидрофосфата дигидрат 6,6 мг, натрия гидрофосфата додекагидрат 2,7 мг, полисорбат-80 0,2 мг, динатрия эдетат 0,36 мг, сахароза 20,0 мг. Флаконы вскрывали асептически, содержимое флакона растворяли до необходимой концентрации дистиллированной водой или стерильным забуференным физиологическим раствором.

**2.1.3 Моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы**

Доклиническое изучение специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 в модели травматического поражения головного мозга крысы проводили на примере его аналога - моноклонального антитела 3A8, специфичного C3 компоненту комплемента крысы и обладающего кросс-реактивностью с C3 компонентом комплемента человека.

Для получения моноклональных антител 3A8 использовали гибридную технологию. Иммунизация мышей комплексными антигенами повторяла ту же стратегию иммунизации, по которой были получены нейтрализующие антитела со специфичностью hC34.

## **2.2 Экспериментальные животные**

Экспериментальные исследования на животных были выполнены на базе ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях,

ГОСТ 33044-2014 [201], правил надлежащей лабораторной практики, утвержденных Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г. [202], и руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [203-204].

Изучение специфической фармакологической активности и фармакокинетики рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, возраст 9-10 недель.

Изучение острой и хронической токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 180-200 г, возраст 9-10 недель.

Изучение аллергенности и иммунотоксичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 проводили на белых беспородных мышах, мышах-гибридах F<sub>1</sub> (СВА х С57В1/6) обоего пола массой 19-21 г, возраст 9-10 недель, и морских свинок обоего пола массой 200-250 г, возраст 5-6 недель.

Животных содержали при искусственном освещении, они получали гранулированный корм и питьевую воду *ad libitum*.

Животные каждого вида содержались в условиях обычного вивария, каждый вид отдельно в одной из комнат барьерного типа, предназначенных для содержания животных. 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, 1986г.). Все процедуры по рутинному уходу за животными выполнялись в соответствии с СОП лаборатории.

## 2.3 Методика изучения механизма действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 *in vitro*

2.3.1 Методика изучения действия антитела hC34 на активацию классического и альтернативного пути комплемента

Изучение способности антитела hC34 блокировать активацию комплемента по классическому пути проводили с помощью гемолитического теста. Для активации классического пути комплемента использовали сенсibilизированные эритроциты барана. Для приготовления сенсibilизированных эритроцитов барана 300 мкл эритроцитарной массы, содержащей  $3 \times 10^9$  эритроцитов, трижды отмывали в вероналовом солевом буферном растворе, содержащем 0,1% желатина, 2,5 мМ хлорида магния, 0,75 мМ хлорида кальция (буферный раствор К). Осадок эритроцитов после отмывки ресуспендировали в 3 мл буферного раствора К и добавляли 3 мл реактива «Комплемент» (лиофилизат сыворотки морской свинки, иммунизированной эритроцитами барана), разведенного в 200 раз в буферном растворе К. Инкубировали суспензию 30 мин при температуре плюс 37 °С при постоянном перемешивании. По окончании инкубации сенсibilизированные эритроциты трижды отмывали центрифугированием в буферном растворе К. Осадок эритроцитов разводили в 14 мл буферного раствора К.

В круглодонный планшет для иммунологических работ вносили в каждую ячейку по 50 мкл пулированной сыворотки человека, разведенной в 10 раз в буферном растворе К, и 50 мкл растворов антитела hC34 с концентрациями 500 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл в буферном растворе К, содержащем 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА). После предварительной инкубации в течение 5 мин вносили в ячейки по 100 мкл суспензии эритроцитов. Инкубировали планшет 60 мин при постоянном перемешивании при температуре плюс 37 °С. По окончании активации эритроциты осаждали центрифугированием, супернатанты переносили в чистые

плоскодонные планшеты для измерения оптической плотности (ОД) при длине волны 415 нм.

Изучение блокирования альтернативного пути активации комплемента (АПК) антителом hC34 также проводили с использованием гемолитического метода. Для активации альтернативного пути комплемента использовали эритроциты кролика. Для получения эритроцитов кролика использовали вакутейнеры с гепарином. Эритроциты осаждали центрифугированием при 1000 rpm и эритроцитарную массу трижды отмывали вероналовым солевым буферным раствором, содержащим 0,1% желатина, 2,5 мМ хлорида магния, 10 мМ этиленгликольтетраацетата (ЭГТА) (буферный раствор А1). Осадок эритроцитов после отмывки ресуспендировали в буферном растворе А1 в концентрации  $2 \cdot 10^8$  кл/мл.

В каждую ячейку круглодонного планшета для иммунологических работ вносили по 50 мкл пулированной сыворотки человека, разведенной в 2 раза в буферном растворе А1 и 50 мкл растворов антитела hC34 с концентрациями 500 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл в буферном растворе А1, содержащем 1 мг/мл БСА. После предварительной инкубации в течение 5 мин вносили в ячейки по 100 мкл суспензии эритроцитов. Инкубировали планшет 60 мин при постоянном перемешивании при температуре плюс 37 °С. По окончании активации эритроциты осаждали центрифугированием, супернатанты переносили в чистые плоскодонные планшеты для измерения ОД при длине волны 415 нм.

2.3.2 Методика изучения ингибирования продукции C3a и C5a *in vitro* антителом hC34

Изучение влияния антитела hC34 на активность магний-зависимых C3-конвертазы ( $\beta$ -C3b,  $\beta$ -C3bBbP) и C5-конвертазы ( $\beta$ -C3bBbC3bP) альтернативного пути проводили путем определения генерации продуктов активации комплемента зимозаном (C3a и C5a) в сыворотке крови человека. С этой целью в ячейки 96-луночного планшета для анализа вносили по 80 мкл буферного раствора HEPES (pH 7,2-7,4), содержащего 150 мМ хлорида натрия,

1 мг/мл БСА, 10 мМ ЭГТА, 5 мМ хлорида магния (буферный раствор А2), 20 мкл сыворотки крови человека, содержащей 1 М  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты и 10 мкл суспензии зимозана в буферном растворе А2 с концентрацией 10 мг/мл и инкубировали при температуре плюс 37°C и постоянном перемешивании на шейкере в течение 1 ч. По истечении часа в ячейки вносили по 10 мкл раствора, содержащего 0,2 М этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Степень активации определяли по содержанию анафилатоксинов С3а и С5а в образцах, которое определяли иммуноферментным анализом (ИФА).

Для количественных расчетов полагали, что 100% активации комплемента и его компонентов С3 и С5 соответствуют концентрациям С3а и С5а, измеряемым в пробах, не содержащих антитела hC34, т.е. в отсутствии потенциальных ингибиторов. Подавление альтернативного пути активации выражали в процентах ингибирования (ПИ) и рассчитывали для каждого анафилатоксина отдельно по формуле (1):

$$\text{ПИ} = ((A-C) - (B-C)) / (A-C) \times 100\%, \quad (1)$$

где А – концентрация анафилатоксина в образце, не содержащем антитело hC34, мкг/мл;

В – концентрация анафилатоксина в данном образце, мкг/мл;

С – концентрация анафилатоксинов, получаемая за счет спонтанной активации, мкг/мл.

2.3.3 Методика идентификации участка связывания с антителом hC34 на молекуле С3

Для более детальной характеристики специфичности антитела hC34 было изучено его взаимодействие с нативным С3 и производными С3i, С3b и С3c методом плазмонного резонанса. Метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR, ППР) позволяет произвести кинетические измерения взаимодействия биомолекул и определить параметры, характеризующие это взаимодействие. Образование межмолекулярных комплексов на границе раздела двух сред сопровождается изменением показателя преломления одной из них, что

приводит к модуляции параметров ППР, регистрируемой детектором. Методы, основанные на ППР, характеризуются возможностью регистрации взаимодействий без использования меток, высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью результатов. Процессы массопереноса между средой и сенсорной поверхностью в ходе образования и диссоциации межмолекулярных комплексов регистрируются в виде зависимости сигнала сенсора от времени (сенсограммы). На основании этих зависимостей можно рассчитать кинетические и равновесные константы реакции комплексообразования.

#### 2.3.3.1 Получение нативного СЗ и его производных СЗі, СЗb и СЗс

С целью идентификации участка связывания с антителом hC34 на молекуле СЗ были получены в очищенном виде белки СЗ, СЗі, СЗb и СЗс.

СЗ получали с использованием иммуноаффинной хроматографии, пропуская нормальную сыворотку человека через колонку с иммобилизованными антителами G10. После этого проводили дополнительную очистку СЗ и удаление инактивированной части молекул этого белка с помощью ионообменной хроматографии.

Для приготовления СЗі нативный СЗ инкубировали 60 мин при комнатной температуре с 0,1М гидразин гидратом в 20 мМ буферном растворе HEPES, рН 7,2.

СЗb получали инкубацией СЗ с ТРСК-трипсином (соотношение фермент-белок 1:5000 w/w) в течение 2 ч при температуре плюс 37 °С. Полученную смесь белков фракционировали на колонке с гидроксилпатитом (СНТ Ceramic Hydroхуаратite Type I 40 μm). На колонку, содержащую 5 мл гидроксилпатита, наносили 20 мг смеси производных СЗ после обработки трипсином. Сорбированные белки элюировали линейным градиентом хлорида натрия 0-1 М. Фракцию с СЗb отбирали в соответствии с результатом электрофоретического анализа, осаждали сульфатом аммония, растворяли в объеме 1 мл, осветляли центрифугированием.

Для получения С3с использовали плазму крови человека, взятую от пациентов после гемодиализа. Белки из плазмы осаждали сульфатом аммония при конечной концентрации 40%. После выдерживания смеси в течение 16 ч при температуре плюс 4 °С осадок отделяли центрифугированием, растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), диализовали против дистиллированной воды и осветляли центрифугированием. Фракцию иммуноглобулинов удаляли на сорбенте MabSelect Xtra. Белки из проскока осаждали сульфатом аммония при конечной концентрации 50% и очищали посредством иммуноаффинной хроматографии на hC34-сефарозе. Элюцию белка с иммуноаффинной колонки проводили глицин-HCl буферным раствором, рН 2,2 (немедленно нейтрализовали) или диализовали против ФСБ. Полученные препараты С3 характеризовали методами электрофореза и иммуноблоттинга.

2.3.3.2 Методика изучения взаимодействия антитела с различными формами С3 компонента комплемента методом плазмонного резонанса

Взаимодействие антитела hC34 с различными формами С3 компонента комплемента изучали методом SPR с помощью прибора «Биокор Х100».

Выбор концентрации hC34 для стабильной сорбции производили на чипе с anti-Human IgG (Fc) antibody. Чип с anti-Human IgG (Fc) antibody был получен с помощью набора Human Antibody Capture Kit (GE Helthcare – BR-1008-39) согласно инструкции производителя: на оптический сенсор CM5 были иммобилизованы anti-Human IgG (Fc) antibody с помощью метода амидной иммобилизации. Чип активировали эквимольной смесью N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимида (0,2 М), затем со скоростью 5 мкл/мин в течение 18 мин инъецировали раствор anti-Human IgG (Fc) antibody (20 мкг/мл) в 10 мМ натрий-ацетатном буферном растворе, рН 5,0. Свободные группы чипа блокировали 1 М этаноламином, рН 8,5.

Для оценки аффинности hC34 (аналит) к чипу с anti-Fc инъецировали увеличивающиеся концентрации аналита со скоростью 10 мкл/мин в буферном растворе HBS-EP+ (150 мМ NaCl, 10 мМ Hepes-NaOH, 3mM ЭДТА, рН 7,5, 0,05% полиоксиэтиленсорбитан).

Анализ сорбции проводили по следующей схеме:

- 1) 1 минуту чип уравнивали буферным раствором HBS-EP+;
- 2) 1 минуту над чипом пропускали hC34 в HBS-EP+ (8, 40, 200 и 1000 нМ);
- 3) 5 минут промывали чип буферным раствором HBS-EP+ без анализата;
- 4) 1 минуту проводили десорбцию с помощью 3М раствора хлорида магния.

Часть проточной ячейки без anti-Fc использовали как контроль для определения неспецифического связывания анализата с CM5-чипом. В итоге для каждой концентрации hC34 контрольная кривая связывания вычиталась из соответствующей кривой связывания с иммобилизованными anti-Human IgG (Fc) antibody. После 4 циклов с последовательным увеличением концентрации hC34 (8, 40, 200 и 1000 нМ) анализировали стабильность сигнала на стадии 3 и рассчитывали равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) hC34 и anti-Human IgG (Fc) antibody. Равновесная константа диссоциации,  $K_D$ , комплекса [hC34]-[anti-Human IgG (Fc) antibody] была определена по зависимости установившегося значения ответа сенсора (RU – соответствует 1 пг анализата связанного с 1 мм<sup>2</sup> поверхности сенсора) от концентрации hC34, при этом данные соответствовали уравнению Ленгмюра для модели одноцентрового связывания (2):

$$\frac{R_{eq}}{R_{max}} = \frac{[hC3-4]}{[hC3-4] + K_D}, \quad (2)$$

где  $R_{eq}$  – значение RU для [hC34] при достижении равновесия,

$R_{max}$  – значение RU при насыщении [hC34].

Анализ взаимодействия вариантов C3 с hC34 проводили по следующей схеме:

- 1) 1 минуту чип уравнивали буферным раствором HBS-EP+;
- 2) 1,5 минуты над чипом пропускали hC34 в HBS-EP+ (20 нМ);
- 3) 3 минуты промывали чип буферным раствором HBS-EP+ без анализата;
- 4) 1 минуту наносили C3/C3i/C3b/C3c (2,5, 10 и 40 нМ);
- 5) 3 минуты промывали чип HBS-EP+ без анализата;
- 6) 1 минуту проводили десорбцию с помощью 3М раствора хлорида магния.



После 3 циклов с последовательным увеличением концентраций различных вариантов С3 (2,5-40 нМ) рассчитывали равновесную константу диссоциации hC34 и различных вариантов С3.

## **2.4 Методика определения релевантного вида животных для проведения экспериментальных исследований рекомбинантного гуманизированного антитела hC34**

2.4.1 Методика изучения видовой кросс-реактивности антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных

Видовую кросс-реактивность антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных оценивали методом иммуноферментного анализа в варианте «сэндвич». В исследовании использовали сыворотки крови человека, крысы (питомник лабораторных животных «Рапполово»), мыши (питомник «Рапполово»), кролика (питомник «Рапполово»), свиньи и обезьяны (ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», Сочи). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку R3, истощенную по С3 компоненту комплемента человека – сыворотку крови человека, пропущенную через сорбент Sepharosa 4В (GE Healthcare) с иммобилизованными моноклональными антителами мыши к С3 человека G10.

Рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 в концентрации 5 мкг/мл в посадочном буферном растворе (0,02М боратный буферный раствор, рН 8,0) вносили в ячейки планшета для ИФА и инкубировали в течение 18 ч во влажной камере при температуре плюс 4 °С. Затем ячейки планшета промывали трехкратным внесением 300 мкл промывочного буферного раствора (посадочный буферный раствор с добавлением твина-20 до 0,05%). Данную операцию проводили после каждого этапа ИФА.

После стадии промывки в ячейки планшета вносили 100 мкл промывочного буферного раствора и 100 мкл предварительно приготовленных исследуемых проб сывороток крови в разведениях  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  в промывочном буферном

растворе, и инкубировали 2 ч при температуре плюс 37 °С при постоянном перемешивании с использованием шейкера.

На следующем этапе в ячейки планшета вносили 100 мкл раствора поликлональных кроличьих антител к С3 компоненту комплемента человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, в промывочном буферном растворе с концентрацией антител 0,1 мкг/мл и инкубировали 1 ч при температуре плюс 37 °С и постоянном перемешивании с использованием шейкера.

На заключительном этапе после промывки ячеек планшета по вышеуказанной схеме производили их дополнительную трехкратную промывку дистиллированной водой для удаления неспецифически связавшегося конъюгата поликлональных кроличьих антител к С3 компоненту комплемента человека с пероксидазой хрена.

Затем во все ячейки планшета вносили раствор субстрата для ферментативной реакции пероксидазы хрена – тетраметилбензидин (ТМБ) и наблюдали развитие окраски раствора в ячейках планшета. Время окрашивания составляло 15-20 мин, после чего в ячейки вносили стоп-реагент - 1М серную кислоту. Проводили измерение оптической плотности раствора в ячейках планшета при длине волны 450 нм.

2.4.2 Электрофорез в полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом

Электрофорез исследуемых образцов сывороток крови человека и различных животных в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли на приборе MiniProtean (Bio-Rad, США). Полимеризацию геля (толщиной 0,75 мм) проводили между пластинами из стекла и окиси алюминия в специальном приспособлении для заливки геля, входящем в комплект прибора.

Растворы А (0,25 мл 30% раствора акриламид/метиленабисакриламид; 0,48 мл 1,5 М раствора трис-НСl, рН 8,8; 1,16 мл воды; 0,02 мл 10% раствора додецилсульфата натрия (ДСН); 0,001 мл N,N,N\*,N' - тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) и 0,01 мл 10% раствора аммония персульфата (ПСА)) и Б (1,25 мл 30% раствора акриламид/метиленабисакриламид; 0,48 мл 1,5 М раствора трис-НСl, рН

8,8; 0,14 мл глицерина, 0,02 мл 10% раствора ДСН; 0,001 мл ТЕМЕД и 0,01 мл 10% раствора ПСА) помещали в резервуары градиентного смесителя и на магнитную мешалку, подключали к перистальтическому насосу и заливали со скоростью около 25 мл/ч между пластин градиентный гель с концентрацией 4-20% акриламида. Сверху наслаивали 50 мкл воды. После окончания полимеризации (через 15-20 мин при температуре плюс 18-20 °С) воду удаляли с помощью фильтровальной бумаги и заливали сверху раствор концентрирующего геля (0,17 мл 30% раствора акриламида/метиленбисакриламида; 0,31 мл 0,5 М раствора трис-НСl, рН 6,8; 0,76 мл воды; 0,012 мл 10% раствора ДСН; 0,001 мл ТЕМЕД, и 0,006 мл 10 % раствора ПСА).

Для формирования лунок в гель до полимеризации вставляли гребенку с 10 зубьями толщиной равной толщине прокладок (0,75 мм). После полимеризации (через 15-20 мин при температуре плюс 18-20 °С) гребенку удаляли и лунки промывали водой, затем несколько раз электродным буферным раствором (трис-НСl, глицин, ДСН). Пластины с готовым гелем присоединяли к прибору для электрофореза и заполняли верхнюю и нижнюю камеры электродным буферным раствором.

Готовили образцы сывороток крови человека и различных животных, для этого к 20 мкл сывороток добавляли такое же количество буферного раствора для нанесения образцов в восстанавливающих условиях (4 мл 10% раствора ДСН, 4 мг бромфенолового голубого, 2 мл глицерина, 2,5 мл 0,5 М раствора трис-НСl с рН 6,8, 1 мл β-меркаптоэтанола, вода). В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор белков 2-250 кДа (Bio-Rad, кат. № 1610377).

Исследуемые образцы сывороток и маркеры осторожно наносили по 2 мкл в лунку под электродный буферный раствор с помощью микрошприца.

Сразу после нанесения образцов аппарат для электрофореза подключали к источнику питания постоянного тока, напряжение 200 В. Процесс заканчивали, когда лидирующий краситель достигал нижней границы стеклов. Длительность электрофореза - (45±5) мин. По окончании процесса отключали источник

питания, разбирали электрофоретическую установку и освобождали гель.

Электроперенос белка осуществляли с использованием электрофоретической системы Мультифор Новаблот. 5 листов фильтровальной бумаги смачивали буферным раствором для переноса (трис-НСI, глицин, вода, спирт этиловый) и помещали на графитную пластину модуля для переноса. Поверх фильтровальной бумаги помещали предварительно вырезанную пластину нитроцеллюлозы. На нитроцеллюлозную мембрану помещали полиакриламидный гель после электрофореза. Поверх полиакриламидного геля помещали 5 листов фильтровальной бумаги, смоченной буферным раствором для переноса. Поверх фильтровальной бумаги помещали графитовый электрод и подключали к источнику питания. Устанавливали ток  $0,8 \text{ мА/см}^2$  поверхности геля. Проводили перенос в течение 50 мин. Источник питания отключали.

Нитроцеллюлозную пластину извлекали и помещали в ванночку с 40 мл блокирующего раствора, содержащего 0,02 М боратный буферный раствор, рН 8,0, твин-20 0,05%, молоко 3%. Инкубацию в блокирующем растворе проводили в течение 1 ч при постоянном перемешивании при комнатной температуре, а затем в течение 18-20 ч без перемешивания при температуре плюс  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . После завершения инкубации нитроцеллюлозную пластину отмывали 3 раза при постоянном перемешивании, используя каждый раз 40 мл промывочного раствора, содержащего 0,02М боратный буферный раствор, рН 8,0, твин-20 0,05%. Затем нитроцеллюлозную пластину помещали в 20 мл раствора конъюгата поликлональных кроличьих антител к С3 компоненту комплемента человека в 0,02М боратном буферном растворе, рН 8,0, твин-20 0,05%, молоко 3%, с концентрацией конъюгата 0,5 мкг/мл. Время инкубации составило 1 ч при постоянном перемешивании при комнатной температуре. После завершения инкубации нитроцеллюлозную пластину снова отмывали 3 раза при постоянном перемешивании, используя каждый раз 40 мл промывочного раствора. Затем операцию по отмывке нитроцеллюлозной мембраны повторяли, используя для этого фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) без добавления твина-20. На завершающем этапе анализа нитроцеллюлозную мембрану помещали в 20 мл

окрашивающего раствора, содержащего ФСБ, 10 мг 3,3'-диаминобензидина, 1 % диметилсульфоксида, 0,03% пероксида водорода. Время окрашивания составляло 10 мин до проявления полос. Реакцию останавливали, промывая дистиллированной водой, пластину нитроцеллюлозы извлекали и высушивали ее между двумя листами фильтровальной бумаги.

## **2.5 Методика изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на примере его аналога**

### **2.5.1 Дизайн экспериментов**

В эксперименте использовали 39 крыс-самцов, которые случайным образом были разделены на 3 равные группы. У всех животных формировали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) с помощью программно-аппаратного комплекса Шелтер (Нейроботикс, Россия), спустя 30 мин всем животным наносили закрытую черепно-мозговую травму. Спустя 15 мин после нанесения травмы животным первой группы внутривенно вводили изучаемый препарат (моноклональное антитело 3A8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы) в количестве 125 мг/кг, животным второй группы - в количестве 250 мг/кг, животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Помимо контрольной группы для оценки интенсивности поражения в эксперименте использовались интактные животные (n=10).

У животных оценивали выживаемость, состояние памяти в тесте сохранности УРПИ, массовый коэффициент головного мозга, микроскопические изменения в головном мозге через 24 ч после нанесения черепно-мозговой травмы, а также определяли концентрацию С3а в плазме крови методом конкурентного иммуноферментного анализа.

### **2.5.2 Моделирование закрытой черепно-мозговой травмы**

В работе была использована широко распространенная модель закрытой черепно-мозговой травмы (ЗЧМТ), известная как модель свободно падающего груза. Для нанесения повреждения животное наркотизировали пропофолом в дозе

10 мг/кг, укладывали на брюхо на твердой поверхности и фиксировали голову. Над теменной областью черепа крысы слева, на 10 мм фронтальной линии, соединяющей наружные слуховые проходы, устанавливали металлическую трубку диаметром 20 мм и высотой 550 мм, закрепленную на штативе. Трубка направляет падение груза, представляющего собой свинцовый шар массой 50 г. В результате падения груза крысы получают повреждение головного мозга, сравнимое с ЗЧМТ у человека, сопровождающееся характерной клинической картиной, включающей судороги, нарушение ритма дыхания, в некоторых случаях длительное апноэ и носовое кровотечение. Повреждение сопровождается нарушением когнитивных функций и морфологическими изменениями в головном мозге, подлежащими оценке на микроскопическом уровне.

### 2.5.3 Выработка и оценка сохранности условного рефлекса пассивного избегания

Данный метод является базисной моделью для оценки действия фармакологических средств на формирование, воспроизведение и сохранность памятного следа, а также для оценки состояния когнитивных функций ЦНС. В работе был использован аппаратно-программный комплекс «Шелтер» производства ООО «Нейроботикс», Россия.

Обучение животных (крыса, мышь) проводят в установке, состоящей из двух отсеков: затемненного и освещенного, соединенных отверстием. Помещенное в освещенный отсек (хвостом к дверце) животное довольно быстро переходит через дверь в затемненный отсек (норковый рефлекс) и получает там электрокожное раздражение через электродный пол. Электроболевое раздражение наносится до тех пор, пока животное не возвратится в освещенный отсек через оставшуюся открытой дверцу. Обучившиеся животные при последующих посещениях в светлый отсек избегают посещать темную камеру. По мере угасания памятного следа, обученные животные начинают вновь посещать темный отсек в силу врожденного отрицательного фототаксиса.

Реализация метода осуществляется в 3 этапа: предварительный отбор животных (проводящих в светлой камере не более 40 из 120 секунд наблюдения),

процедура выработки УРПИ, оценка сохранности приобретенного УРПИ на фоне введения тестируемого препарата в сроки, установленные условиями эксперимента. Для оценки сохранности УРПИ животное помещают в светлый отсек камеры и в течение 180 секунд регистрируют поведение животного. Животное, зашедшее в темный отсек, считается не обученным или забывшим факт электроболевого раздражения, животное, не зашедшее в темный отсек, считается обученным. Для каждой экспериментальной группы фиксируют количество обученных и необученных животных.

#### 2.5.4 Гистологическое и патоморфологическое исследование

Через сутки после нанесения ЗЧМТ крыс подвергали эвтаназии путем декапитации под наркозом. Головной мозг извлекали из полости черепа, рассчитывали его массовый коэффициент относительно массы тела животного.

Для гистологического исследования головной мозг разрезали на четыре участка во фронтальной плоскости: первая линия разреза – на уровне прегиазматической области, вторая – на уровне задней поверхности сосцевидных тел, третьей линией отсекали мозжечок со стволом мозга. Материал фиксировали в 10% растворе формалина. Для получения препаратов гиппокампа использовали второй участок.

После проводки по изопропиловым спиртам и выдержки в смеси изопропанол/минеральное масло, образцы помещали в минеральное масло и выдерживали в термостате при температуре плюс 55 °С в течение 12 ч. Далее образцы последовательно помещали в парафины для проводки «Блик» («Блик», Россия).

Из парапластовых блоков на санном микротоме (Reichert, Австрия) изготавливали срезы толщиной 6 мкм так, чтобы плоскость среза проходила перпендикулярно к поверхности ткани. Срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали полученные препараты гематоксилином и эозином. Срезы заключали под покровные стекла в канадский бальзам. Готовые препараты изучали, используя световой микроскоп DMLB (Leica Microsystems AG, Германия). Микрофотографии срезов получали с помощью цифровой камеры DC

300 (Leica Microsystems A.G, Германия). Изображения сохраняли на жестком диске персонального компьютера.

На гистологических препаратах исследовали степень травматического повреждения путем анализа выраженности кровоизлияний, отека и других признаков ЗЧМТ. Отдельно анализировали соотношение живых и погибших нейронов в областях гиппокампа СА1 и СА3. Подсчет количества нейронов производили на 6 срезах в пяти полях зрения у каждого животного. Затем при помощи ПО Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, США) производили подсчет соотношения нормальных и пораженных нервных клеток.

2.5.5 Определение концентрации С3а в плазме крови методом конкурентного иммуноферментного анализа

Через сутки после нанесения ЗЧМТ крыс декапитировали под наркозом и отбирали у них кровь. Для того, чтобы предотвратить спонтанную активацию комплемента, кровь собирали в пробирки, содержащие 0,5 М раствор ЭДТК 1:10 от объема. После этого кровь центрифугировали, отбирали супернатант и замораживали.

Концентрацию С3а в плазме крови определяли методом конкурентного ИФА. С этой целью готовили планшет для ИФА с иммобилизованным С3а. При этом в каждую ячейку планшета вносили 0,5 мкг С3а человека в объеме 100 мкл и инкубировали 1 ч при температуре плюс 37 °С, после чего лунки планшета промывали промывочным буферным раствором для удаления избытка С3а. Параллельно в планшете для иммунологических реакций проводили реакцию взаимодействия С3а с антителом в смеси экспериментальной плазмы крысы или С3а и конъюгата моноклональных антител G10 с пероксидазой хрена (G-10-пх), обладающего одинаковой специфичностью к С3а человека и крысы. С этой целью в ячейки планшета вносили равные объемы (по 50 мкл) плазмы крысы (в разведении 1:20) и 0,25 нг G-10-пх. Для построения калибровочной кривой готовили смесь растворов с различными количествами С3а человека (в разведении от 25 нг до 0 с шагом) и G-10-пх. Планшет инкубировали 1 ч при температуре плюс 37 °С, после чего содержимое ячеек переносили из планшета



для иммунологических исследований в планшет для ИФА с иммобилизованным С3а. Последний инкубировали еще 1 час, после чего ячейки отмывали, добавляли субстрат ТМБ для пероксидазы хрена, выдерживали планшет при комнатной температуре, добиваясь интенсивного окрашивания, останавливали реакцию и определяли оптическую плотность в ячейках с помощью планшетного спектрофотометра - ридера. Остаточную концентрацию в реакционных пробах рассчитывали, используя данные по полученной в этом же эксперименте калибровочной кривой.

## **2.6 Методика изучения фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34**

Фармакокинетика лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 была изучена на белых беспородных крысах. В эксперименте использовали 18 крыс-самцов, которые были разделены на 3 равные группы. Крыс для экспериментов подбирали приблизительно одинакового веса. Непосредственно перед экспериментом у животных убирали корм и питьевую воду, возвращая доступ к ней после забора крови через 2 ч после введения исследуемого препарата. Кормили животных в день эксперимента после забора крови через 4 ч после введения препарата.

Для инъекций использовали лекарственную форму рекомбинантного антитела hC34 для внутривенного введения. Раствор препарата вводили внутривенно (в/в) в латеральную хвостовую вену крысы в дозах 2.5, 5 и 10 мг/животное. Забор крови производили из сонной артерии до введения препарата, через 10, 30 мин, через 1, 2, 6 ч, через 1, 2 и 5 суток после введения, в каждую временную точку брали кровь у 6 животных.

После забора крови отделяли сыворотку и замораживали при минус 20°C до определения уровня антитела hC34. Анализ концентрации антитела в сыворотке крови проводили с помощью иммуноферментной тест-системы, специфичной к иммуноглобулину G человека (клоны моноклональных антител И-4 и И-5,

полученные в ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России). Для постановки теста в ячейки планшета для ИФА с высокой сорбционной емкостью (Costar) вносили специфичные Fc-фрагменту IgG человека моноклональные антитела И-4, в посадочном 0,02М боратном буферном растворе, рН 8,0, в концентрации 1,5 мкг/мл в объеме 100 мкл на ячейку. Планшет инкубировали при комнатной температуре 12-14 ч, после чего отмывали промывочным буферным раствором (0,02М боратный буферный раствор с 0,05% твин-20). Далее во все ячейки вносили по 100 мкл промывочного буферного раствора и в ряд ячеек для получения стандартной кривой добавляли по 25 мкл рекомбинантных антител hC34 человека в концентрации от 40 до 0,1 нг/мл. В другие ряды ячеек вносили также по 25 мкл исследуемых сывороток, приготовленных в серийных разведениях. Разведение контрольных антител и сывороточных проб проводили в промывочном буферном растворе с 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Планшет инкубировали на шейкере 2 ч, затем отмывали промывочным буферным раствором, после чего вносили специфичные Fab-фрагменту IgG человека моноклональные антитела И-5, конъюгированные с пероксидазой хрена, в концентрации 25 нг/мл. После инкубации в течение 1 ч планшеты отмывали, вносили 100 мкл раствора субстрата (тетраметилбензидин, «Хема») на 30 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10% серной кислоты и результат учитывали на планшетном ридере Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer) при длине волны 450 нм. По калибровочной кривой с учетом разбавления определяли концентрацию антитела hC34 в сывороточных пробах. Чувствительность тест-системы составляла около 0,1 нг/мл.

Анализ фармакокинетических параметров выполняли на основе экспериментально полученных значений концентрации исследуемого антитела в сыворотке крови, измеренных в разное время после введения препарата. Для описания фармакокинетики препарата hC34 использовали следующие показатели: D – введенная доза (мг/крыса или мг/кг); C(t<sub>i</sub>) - концентрация в момент t<sub>i</sub> (мг/мл); C<sub>max</sub> – максимальная концентрация (мг/мл); T<sub>max</sub> – время достижения максимальной концентрации (мин); T<sub>half</sub> – время полувыведения препарата (мин);

$AUC_{\infty}$  - полная площадь под кривой концентраций (мин·мг/мл);  $AUCM_{\infty}$  - полная площадь под одномоментной кривой концентраций (мин<sup>2</sup>·мг/мл);  $MRT = AUCM_{\infty} / AUC_{\infty}$  – среднее время удерживания (мин);  $Cl = D / AUC_{\infty}$  – общий клиренс (мл/мин·особь или мл/мин·кг);  $V_d = D / C_{max}$  – объем распределения (мл).

Показатели оценивали двумя общепринятыми способами [205-207]. Во-первых, использовали модельно-независимую оценку, не опирающуюся на согласование экспериментальных данных с какой-либо фармакологической моделью, то есть не предполагающую конкретный тип функции концентрации от времени, значениями которой должны быть экспериментально измеренные значения концентрации. Кроме того, использовали двухчастную модель, предполагающую функцию концентрации суммой двух экспонент, а именно:  $C(t) = A_1 \cdot \exp(\alpha_1 t) + A_2 \cdot \exp(\alpha_2 t)$ .

Применялись два варианта усреднения. В одном варианте фармакокинетические параметры определяли отдельно для каждой особи, после чего усредняли по всем особям. В другом варианте, сначала по всем особям усредняли одновременно измеренные концентрации, а затем по ним определяли параметры (параметры «средней особи»).

## **2.7 Методика изучения безопасности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34**

### **2.7.1 Методика изучения острой токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34**

Острая токсичность лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 была изучена на крысах, период наблюдения после введения возрастающих доз ЛФ составил 14 дней. Дозирование ЛФ осуществляли по действующему веществу, содержание которого составляет 50 мг на 1 мл препарата. Для достижения высоких доз ЛФ вводили многократно в течение 10 часов.

Животные были случайным образом разделены на 5 групп, каждая из которых состояла из 5 самок и 5 самцов. Животным контрольной группы внутривенно вводили физиологический раствор (ФР), животным четырех опытных групп внутривенно вводили ЛФ в дозах 40 мг/кг; 400 мг/кг; 1000 мг/кг; 2000 мг/кг. Поскольку предполагаемая терапевтическая доза препарата у человека составляет 4 мг/кг, максимальная доза ЛФ, введенная внутривенно крысам, превысила терапевтическую в 500 раз.

Для оценки токсического влияния ЛФ на органы и системы органов во всех экспериментах за лабораторными животными было проведено наблюдение в течение 14 суток после введения препарата. На 14-е сутки все животные были подвергнуты эвтаназии и патоморфологическому исследованию.

Клинический осмотр каждого животного проводили один раз до введения препарата и в последующем ежедневно во всех экспериментах. Выполняли подробный осмотр животного в клетке содержания, в руках и на стандартной открытой площадке. Отмечали поведение (активность — повышенная или пониженная), походку (мышечный тонус, тремор, балансирование), темперамент (вялость, возбудимость, агрессивность); внешний вид (истощение, ожирение), состояние шерстного покрова (выпадение шерсти, шерсть торчащая, пятнистая, тусклая, гладкая, блестящая), состояние глаз (слезотечение, воспаление, помутнение роговицы), ушей (воспаление, цвет: бледность или покраснение, выделение секрета, чувствительность, подергивание), конечностей (цвет, отек), зубов (цвет, выпадение); оценивали такие физиологические функции, как дыхание (число дыхательных движений в минуту, характер, особенности), слюноотделение (консистенция и объем выделения слюны), мочеиспускание (цвет мочи), экскрет (цвет, консистенция). Перечисленные характеристики фиксировались только в случае их отклонения от нормальных показателей.

В эксперименте по изучению острой токсичности определяли массу тела крыс до начала эксперимента (фоновое значение), а также на 2-е, 7-е и 14-е сутки после введения изучаемых препаратов.

Патоморфологическое исследование включало некропсию,

макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов. Некропсию выполняли под непосредственным наблюдением патоморфолога. После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет наружных патологических признаков. При осмотре мест введения оценивали местно-раздражающее действие исследуемого препарата. Было проведено исследование состояния грудной и брюшной полости, макро- и микроскопическое исследование внутренних органов.

Перечень органов, подлежавших макроскопическому исследованию: лимфатические узлы, аорта, сердце, полость рта, глотка, гортань, трахея, легкие с бронхами (два), тимус, пищевод, желудок (железистый и агранулярный отделы), 12-перстная кишка, тонкий кишечник, толстый кишечник, печень, поджелудочная железа, селезенка, почки (две), надпочечники, мочевого пузыря, семенники — самцы, яичники и матка — самки, подчелюстная слюнная железа с лимфатическими узлами, щитовидная/паращитовидная железа, головной мозг (3 отдела: передний, средний и задний).

Перечень органов, подлежавших взвешиванию: сердце, легкие с трахеей, тимус, печень, селезенка, почки, надпочечники, семенники (два) — самцы, яичники (два) — самки, головной мозг. Парные органы взвешивали вместе, однако, если присутствовали аномалии в массе или размерах, парные органы взвешивали по отдельности. Рассчитывали отношение массы органа к массе тела, определенной непосредственно перед некропсией.

2.7.2 Методика изучения хронической токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизованного антитела hC34

Хроническая токсичность ЛФ рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 была изучена на крысах, самцах и самках, при ежедневном внутривенном введении в течение 30 дней. Дозирование ЛФ осуществляли по действующему веществу.

Животные были случайным образом разделены на 4 группы, каждая из которых состояла из 10 самок и 10 самцов. ЛФ вводили ежедневно на протяжении 30 дней в 3 дозах: терапевтическая — 24 мг/кг (предполагаемая терапевтическая доза для человека составляет 4 мг/кг, коэффициент пересчета на площадь

поверхности тела для крысы б); максимальная - 500 мг/кг (в 125 раз превышающая терапевтическую дозу для человека); промежуточная - 260 мг/кг. Животным контрольной группы по той же схеме вводили ФР.

За животными наблюдали в течение всего периода введения препарата (30 дней). В течение эксперимента регистрировали интегральные показатели состояния организма всех животных, проводили физиологические исследования, лабораторные исследования, а также патоморфологическое и патогистологическое исследование по окончании эксперимента.

Отставленные группы не анализировали, поскольку не было обнаружено никаких значительных токсических эффектов ЛФ ни в одной из экспериментальных групп.

Клинический осмотр каждого животного проводили один раз до введения препарата и в последующем ежедневно во всех экспериментах, как описано выше в п.2.7.1.

В эксперименте по изучению хронической токсичности определяли массу тела крыс до начала исследования, затем 1 раз в неделю. Фиксировали количество съеденного корма и выпитой воды за сутки, потребление воды и пищи животными определяли до начала исследования, затем 1 раз в неделю.

До начала исследования, а также через 1 месяц после начала введения препарата проводили физиологические исследования, в частности регистрировали структуру поведения крыс в открытом поле, спонтанную двигательную активность, «силу хватки», болевую чувствительность, показатели функции внешнего дыхания, электрокардиограмму (ЭКГ), частоту сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление (АД) и ректальную температуру.

Регистрацию структуры поведения крыс в открытом поле осуществляли с помощью круглой арены с бортами по периметру диаметром 100 см, снабженной источником света и регистратором. Регистрировали 6 компонентов поведения в течение 5 мин наблюдения: латентный период выхода, вертикальную и горизонтальную активность, количество заглядываний в норки, груминг и акты

дефекации. Для определения выраженности возможных эффектов препарата использовали отношение количества движений в опыте/контроле.

Спонтанную двигательную активность (СДА) регистрировали с помощью автоматической системы регистрации движений «Opto-M4 Activity Meter» (Columbus Instruments, США). Крысу помещали в камеру прибора, где в течение 3 мин в автоматическом режиме регистрировали локомоторную активность животного.

Тест «сила хватки» проводили с использованием силомера Grip Strength Meter (ИТС Life Science, США), предназначенного для изучения нервно-мышечной функции у грызунов. Животное держали за хвост и позволяли ухватиться за металлическую решетку или треугольную рамку прибора, который затем регистрировал максимальную силу хватки, развиваемую животным при его смещении относительно прибора.

Болевую чувствительность крыс определяли с помощью прибора анальгезиметра Tail Flick Analgesia Meter Model 33 (ИТС Life Science, США). Животных помещали в специальные пеналы. На хвост животного направляли лазерный луч возрастающей интенсивности. Момент отдергивания хвоста фиксировался прибором в автоматическом режиме. Прибор вычисляет отрезок времени от начала воздействия до отдергивания хвоста.

Эксперименты по оценке показателей функции внешнего дыхания проводили на ненаркотизированных животных с помощью комплекса оценки кардиореспираторной системы мелких лабораторных животных КОКС-2 (Медицинские компьютерные системы, Россия). Животных помещали в специальные пеналы, затем подносили к области носа датчик, который проецировал кривую дыхания на компьютер. Затем производили качественный и количественный анализ полученной кривой, рассчитывали частоту дыхательных движений (ЧДД).

Регистрацию ЭКГ проводили на ненаркотизированных животных электрокардиографом для ветеринарии «Поли-Спектр-8В» («Нейрософт», Россия). Анализ ЭКГ проводили при помощи пакета прикладных программ

(«Нейрософт»), предназначенных для мелких млекопитающих. ЭКГ регистрировали во 2-ом стандартном отведении с помощью атравматических электродов типа «крокодил».

Определение систолического АД у ненаркотизированных крыс проводили с помощью системы неинвазивного измерения кровяного давления у мелких животных Non-Invasive Blood Pressure NIBP-8 (Columbus Instruments, США). Крыс помещали в специальные пеналы. АД регистрировали на хвосте крысы с помощью пьезоэлектрического датчика и манжетки соответствующего размера через 10-15 мин после помещения животного в специальный бокс, обеспечивающий поддержание температуры в пределах 26-27 °С.

Также в эксперименте по изучению хронической токсичности проводили следующие лабораторные исследования: гематологический анализ и миелограмма, биохимическое исследование сыворотки крови, исследование мочи. Забор крови, костного мозга, а также образцов тканей у животных осуществлялся по окончании курса введения препаратов. После 14-15-часового голодания животных умерщвляли в CO<sub>2</sub>-камере и после декапитации собирали кровь.

Для гематологического анализа кровь в количестве 50 мкл отбирали в пробирки типа эппендорф с ЭДТА объемом 1,5 мл. Пробу крови тщательно перемешивали и анализировали в течение 2 ч после забора. Для общеклинического анализа крови использовали автоматический гематологический анализатор Abacus Junior Vet (Diatron). Гематологический анализатор полностью автоматизирован для подсчета клеток крови и эритроцитарных индексов.

Гематологическое исследование включало анализ следующих параметров: количество лейкоцитов (WBC), 10<sup>9</sup>/л; количество эритроцитов (RBC), 10<sup>12</sup>/л; концентрация гемоглобина (HGB), г/л; гематокрит (HCT), %; средний объем эритроцита (MCV), фл; среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг; средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/дл; широта распределения эритроцитов (RDWc), %; количество тромбоцитов (PLT), 10<sup>9</sup>/л; средний объем тромбоцита (MPV), фл; тромбоциты, (PCT), %; широта



распределения тромбоцитов (PDWc), %; нейтрофилы,  $10^9/\text{л}$ ; базофилы,  $10^9/\text{л}$ ; эозинофилы,  $10^9/\text{л}$ ; моноциты,  $10^9/\text{л}$ ; лимфоциты,  $10^9/\text{л}$ .

Анализ миелограммы осуществлялся на мазках смывов костного мозга, полученных из бедренных костей. Мазок высушивали на воздухе до исчезновения влажного блеска, затем фиксировали спиртом и окрашивали приготовленной *ex tempore* краской Романовского. После окраски краситель смывали водой, мазки ставили в сушильный шкаф для просушивания. Приготовленные мазки анализировали с использованием светооптического микроскопа Leika DMLB при увеличении 1600X и подсчитывали соотношение различных клеток костного мозга (подсчитывали 500 клеток на каждое стекло). Абсолютное число клеток в ККМ крысы подсчитывали для 1 бедренной кости, которую промывали 1 мл физиологического раствора.

Миелограмма включала анализ следующих параметров: эритробласты, проэритробласты, базофильные эритробласты, полихроматофильные эритробласты, оксифильные эритробласты, мегакариобласты, мегакариоциты, миелобласты, промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты, палочкоядерные нейтрофилы, сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты, моноциты.

Для биохимического исследования цельную кровь центрифугировали со скоростью 3000 об/мин при температуре плюс 40 °C в течение 10 мин. Для дальнейших исследований отбирали надосадочную жидкость - сыворотку. Исследовали прозрачную сыворотку без признаков гемолиза. Биохимический анализ сыворотки крови включал в себя определение следующих анализов: аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспаратаминотрансфераза (АсАТ), билирубин, глюкоза, креатинин, мочевины, общий белок, холестерин, щелочная фосфатаза,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , протромбиновое время. Определение биохимических показателей производили на полуавтоматическом анализаторе Chem-7 Erba Mannheim (Германия) с использованием наборов производства «Вектор-Бест»: «Трансаминаза-АЛТ-Ново», «Трансаминаза-АСТ-Ново», «Билирубин-Ново», «Глюкоза-УФ-Ново», «Креатинин-Ново-А», «Мочевина-Ново», «Протеин-Ново»,

«Холестерин-Ново», «Щелочная фосфатаза-Ново жидкая форма», «Калий-Ново», «Натрий-Колор» (Абрис+, Россия). Протромбиновое время в плазме крови определяли с помощью скринингового теста, выявляющего нарушения во внешнем пути свертывания крови при добавлении к цитратной плазме избытка тканевого тромбoplastина и ионов кальция.

Исследование мочи включало определение физико-химических свойств (цвет, прозрачность, рН, относительная плотность), микроскопию осадка, изучение содержания конечных продуктов метаболизма и патологических компонентов (билирубин, уробилиноген, кетоны, глюкоза, белок, эритроциты, нитриты, лейкоциты). Анализ проводили для получения фоновых значений (до начала введения препаратов) и через 4 недели после первого введения изучаемого препарата. Для сбора мочи при проведении исследований животных помещали в обменные клетки. Исследования проводили со свежесобранной мочой. В случае необходимости мочу хранили в холодильнике не более 1,5 ч. Исследование мочи проводили на экспресс-анализаторе мочи DocUReader (ANALYTICON Biotechnologies AG, Германия) с помощью индикаторных полосок labstrip u11plus. В случае обнаружения каких-либо отклонений от физиологической нормы проводилось микроскопическое изучение осадка следующим образом: мочу центрифугировали, из осадка готовили мазки для счета под микроскопом эритроцитов, лейкоцитов, эпителиальных клеток и цилиндров.

Патоморфологическое исследование включало некропсию, макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов, выполняли, как описано ранее в п. 2.7.1.

Для патогистологического исследования материал фиксировали в 10% растворе формалина. После проводки по изопропиловым спиртам и выдержки в смеси изопропанол/минеральное масло, образцы помещали в минеральное масло и выдерживали в термостате при температуре плюс 55 °С в течение 12 ч. Далее образцы последовательно помещали в парафины для проводки «Блик» («Блик», Россия) и заливали в парафин. Из парафиновых блоков на санном микротоме

Reichert (Австрия) изготавливали срезы толщиной 6 мкм так, чтобы плоскость среза проходила перпендикулярно к поверхности ткани. Срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали полученные препараты гематоксилином и эозином. Срезы заключали под покровные стекла в канадский бальзам. Готовые препараты изучали, используя световой микроскоп DMLB (Leica Microsystems AG (Германия)).

Патогистологическое исследование проводили в эксперименте по изучению хронической токсичности после завершения курса введения препарата. Анализу подвергали в первую очередь образцы, полученные от группы животных, получавших изучаемый препарат в максимальной дозе, и контрольной группы животных. Перечень органов, подлежащих гистологическому исследованию: сердце, легкие с бронхами, тимус, желудок, поджелудочная железа, печень, селезенка, почки, надпочечники, семенники - самцы, яичники – самки, щитовидная железа, головной мозг (3 отдела: передний, средний и задний).

2.7.3 Методика изучения аллергенности и иммунотоксичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

2.7.3.1 Дизайн экспериментов по изучению аллергизирующего действия

Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок) на морских свинках

Для проведения эксперимента морские свинки были случайным образом разделены на 3 равные группы, состоявшие из 5 самок и 5 самцов каждая:

- контрольная группа получала ФР - первая инъекция подкожно, две последующие - внутримышечно через день в область бедра;
- первая опытная группа по той же схеме получала ЛФ в дозе 25 мг/кг;
- вторая опытная группа по той же схеме получала ЛФ в дозе 250 мг/кг.

Через 21 день после первого введения всем животным внутрисердечно вводили разрешающую дозу ЛФ, которая составила суммарную сенсibilизирующую дозу для каждой группы соответственно. Животным контрольной группы вводили разрешающую дозу, используемую для второй опытной группы. Учет интенсивности анафилактического шока проводили в индексах по Weigle [208].

### Реакция активной кожной анафилаксии на мышах

Для проведения эксперимента белые беспородные мыши были случайным образом разделены на 3 равные группы, состоявшие из 5 самок и 5 самцов каждая:

- контрольная группа получала ФР - первая инъекция подкожно, две последующие - внутримышечно через день в область бедра;
- первая опытная группа по той же схеме получала ЛФ в дозе 25 мг/кг;
- вторая опытная группа по той же схеме получала ЛФ в дозе 250 мг/кг.

Через 21 день после первой инъекции ЛФ всем животным на выстриженных участках спины внутрикожно вводили препарат в двукратных разведениях в концентрациях, не вызывающих кожно-раздражающего действия. Далее реакцию проводили, как описано в главе 2 руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [203].

### Реакция гиперчувствительности замедленного типа на мышах

Для проведения эксперимента мыши-гибриды F<sub>1</sub> (СВА x С57В1/6) были разделены на 2 равные группы, состоявшие из 10 самок и 10 самцов каждая:

- контрольной группе ежедневно в течение 7 дней внутривенно вводили ФР;
- опытной группе по той же схеме вводили изучаемую ЛФ в дозе 500 мг/кг.

Через 5 суток после последней инъекции всем животным в подушечку одной задней лапы вводили 50 мкл изучаемой ЛФ, в контралатеральную лапу вводили ФР. Через 24 ч, проведя эвтаназию всех животных, обе лапы равнозначно отрезали выше пяточного сустава, но ниже сустава мало-большеберцовой костей (ориентировка на костный выступ). Индекс реакции (ИР) выражали в процентах прироста массы лапки, в которую вводили препарат (P<sub>0</sub>), по отношению к массе контрольной лапки (P<sub>к</sub>) и вычисляли по формуле (3):

$$\text{ИР} = \frac{P_0 - P_k}{P_k} \times 100 \% \quad (3)$$

### 2.7.3.2 Дизайн экспериментов по изучению иммунотоксического действия

Во всех экспериментах по изучению иммунотоксичности мыши-гибриды F<sub>1</sub> (СВА х С57В1/6) были разделены на 3 равные группы, каждая из которых состояла из 5 самок и 5 самцов:

- контрольная группа ежедневно, в течение 7 дней внутривенно получала физиологический раствор;

- первая опытная группа по той же схеме получала ЛФ в дозе 25 мг/кг;

- вторая опытная группа по той же схеме получала ЛФ в дозе 250 мг/кг.

#### Определение числа антителообразующих клеток в селезенке мыши

На 7-й день все животные были проиммунизированы внутрибрюшинной инъекцией эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе  $5 \times 10^7$  эритроцитов на животное. Подсчет числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей производили на 5-е сутки после иммунизации. Реакцию ставили на предметных стеклах без поддерживающей среды по Cunningham. По количеству зон гемолиза эритроцитов вокруг отдельных АОК, определяемых под микроскопом, подсчитывали число клеток-продуцентов антител в расчете на  $10^6$  спленоцитов.

#### Реакция гиперчувствительности замедленного типа на мышцах

На 7-й день все животные были сенсibilизированы однократным, подкожным введением в межлопаточную область 0,05 мл раствора, содержащего  $2 \times 10^5$  ЭБ. Для выявления гиперчувствительности на 5-е сутки после сенсibilизации всем животным в подушечку задней лапы вводили  $10^8$  ЭБ в 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия (разрешающая инъекция). В противоположную лапу вводили изотонический раствор хлорида натрия в том же объеме. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч по разнице массы опытной (P<sub>о</sub>) и контрольной (P<sub>к</sub>) лап. Обе лапы отрезали сразу же после забоя животных по выступу кости ниже сочленения мало- и большеберцовой кости и выше пяточного сустава. Индекс реакции вычисляли для каждой мыши по формуле (3).

### Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

На следующий день после последней инъекции препарата всех животных забивали и промывали брюшную полость культуральной средой. Концентрацию клеток в смывах доводили до 2 миллионов/мл, после чего 2 мл раствора вносили в 40 мм чашки Петри и инкубировали в термостате при температуре плюс 37 °С в течение 1 ч. Отмывали неадгезировавшиеся клетки, добавляли в среду опсонизированные дрожжи и инкубировали еще 1 ч. После завершения реакции клетки 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.

### **2.8 Статистическая обработка полученных результатов**

Результаты представлены в таблицах в виде средних значений ( $M$ )  $\pm$  ошибка среднего ( $m$ ). Сравнение показателей между группами проводили с помощью непарного Т-критерия Стьюдента с неравными отклонениями, а также по U-критерию Манна-Уитни. Отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel-2007 (Microsoft Corporation).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Результаты изучения механизма действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 *in vitro*

Компонент С3 является центральным белком всех путей активации комплемента, поэтому его блокирование в случаях патологий, связанных с гиперактивацией системы комплемента, представляет наибольший интерес. Однако, учитывая его высокую концентрацию в крови (1-1,5 мг/мл), блокирование С3 компонента комплемента посредством нейтрализующих антител оставляет эту проблему с позиций фармакологии неразрешимой. В связи с этим было принято решение о получении антител к неопределяемым С3 компонента, которые формируются на стадии инициации активации этой молекулы.

Моноклональное антитело, которое стало прототипом антитела hC34, было получено специальным образом. Антигеном для иммунизации мышей Balb/c служил зимозан, опсонизированный молекулами активированного комплемента человека, полученный инкубацией зимозана с нормальной сывороткой человека в условиях активации АПК. Методами гибридной технологии в ответ на введенный антиген была получена панель гибридом, из которых в результате избирательного скрининга было отобрано 9 клонов гибридом, продуцирующих антитела, специфичные к инактивированной форме С3 компонента комплемента (С3i), и не вступающие во взаимодействие с нативным С3. При отборе антител опирались на их способность подавлять генерацию С3а и С5а в пробах с нормальной (пулированной) сывороткой человека, активированной зимозаном. Таким образом был отобран клон антител СС3-4, обладающих наибольшей нейтрализующей активностью, который был использован для получения генов, кодирующих переменные участки производимого моноклонального антитела, и для дальнейшего конструирования рекомбинантного, а затем и гуманизированного антитела hC34 [199].

В рамках изучения механизма действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 *in vitro* были проведены эксперименты по изучению действия антитела на активацию классического и альтернативного пути комплемента и продукцию C3a и C5a, а также изучена специфичность полученного нового рекомбинантного гуманизированного антитела по отношению к различным молекулярным формам C3 компонента.

### 3.1.1 Изучение действия антитела hC34 на активацию классического и альтернативного пути комплемента

В первой серии экспериментов было проведено изучение ингибирования активации комплемента по классическому пути антителом hC34. Для активации классического пути комплемента использовали сенсibilизированные эритроциты барана. Тестирование проводили в планшете для иммунологических исследований. В ячейках планшета инкубировали пулированную сыворотку человека в разведении, при котором достигался 100% гемолиз эритроцитов, и, параллельно, различные концентрации антитела hC34 в интервале от 10 до 500 мкг/мл.

Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.1.1. Как видно из рисунка 3.1.1, антитела hC34 не блокировали активацию комплемента по классическому пути, поскольку во всех ячейках планшета регистрировался 100 % гемолиз.



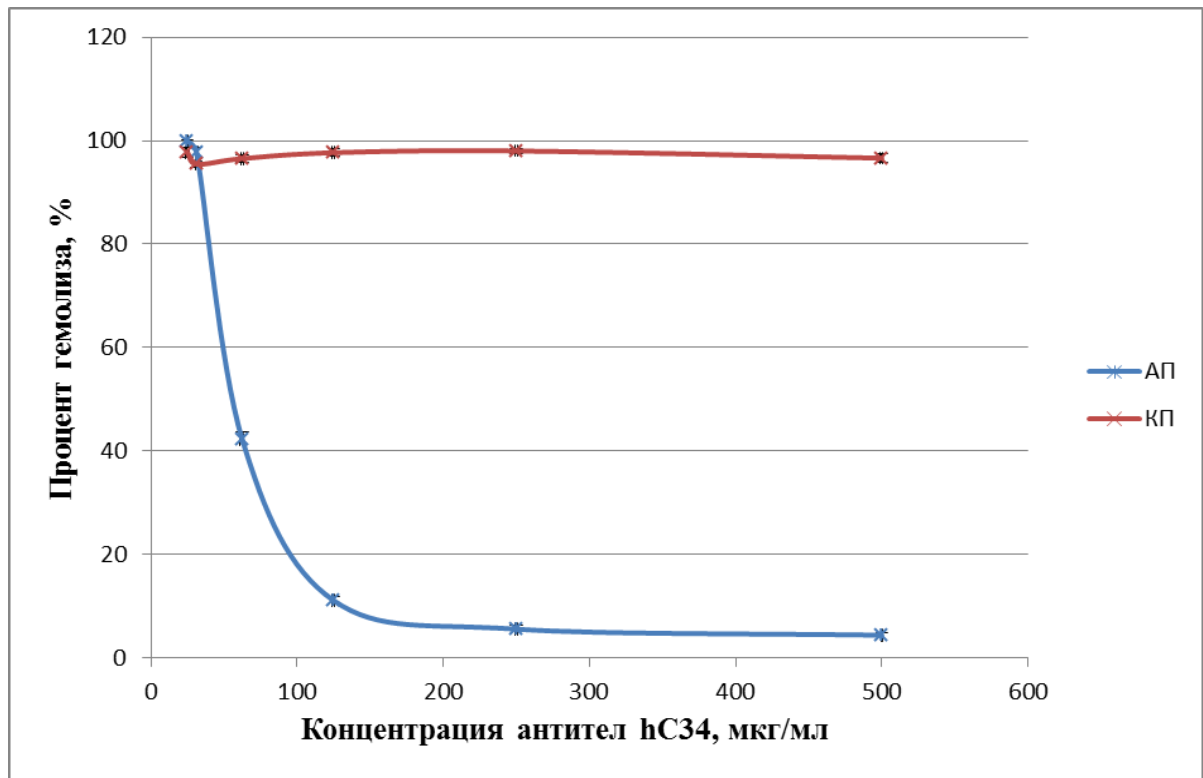


Рисунок 3.1.1 – Влияние антитела hC34 на активацию комплемента по классическому (КП) и альтернативному путям (АП) в тесте гемолиза сенсibilизированных эритроцитов барана и нормальных эритроцитов кролика, соответственно

Во второй серии экспериментов изучали способность антитела hC34 дозозависимо ингибировать активацию альтернативного пути, стимулированную добавлением нормальной пулированной сыворотки крови человека к эритроцитам кролика ( $\text{Э}_{\text{кр}}$ ). Предварительно соотношение сыворотки и эритроцитов подбирали таким образом, чтобы вызвать 100 % гемолиз последних. Реакцию также проводили в иммунологическом планшете, заполняя ячейки смесями сыворотки с  $\text{Э}_{\text{кр}}$  или такой же смесью с антителом hC34 в разведениях концентраций от 10 до 500 мкг/мл. Результаты, представленные на рисунке 3.1.1, отчетливо демонстрируют дозозависимое ингибирование гемолиза от 100 до 5 процентов с увеличением концентрации антитела.

### 3.1.2 Изучение ингибирования продукции C3a и C5a *in vitro* антителом hC34

Для того чтобы определить, на каком этапе каскада активации происходит ингибирование АПК антителом hC34, проводили активацию сыворотки крови человека зимозаном, после чего регистрировали появление продуктов расщепления C3 и C5 компонентов комплемента - C3a и C5a. C3a генерируется под действием C3 конвертаз АПК  $\beta$ -C3b и  $\beta$ -C3bBbP, в то время как для генерации C5a необходима сборка и действие C5 конвертазы  $\beta$ -C3bBbC3bP.

Поскольку жидкофазная и твердофазная C3-конвертазы альтернативного пути являются Mg-зависимыми, реакцию активации альтернативного пути проводили в присутствии реагента ЭГТА, связывающего только Ca<sup>++</sup>, и, добавляя к реакционной смеси раствор хлорида магния до конечной концентрации 5 мМ. Остановку реакции осуществляли добавлением ЭДТА. Реакцию проводили в иммунологической планшете, инкубируя смешанные растворы зимозана с пулированной сывороткой человека в отсутствии или в присутствии различных концентраций антитела hC34. О степени активации судили по уровню генерации C3a и C5a в образцах, концентрацию которых определяли посредством специфического ИФА, используя коммерческие наборы. Для количественных расчетов полагали, что 100% активации комплемента и его компонентов C3 и C5 соответствуют концентрациям C3a и C5a, измеряемым в пробах, не содержащих антитела hC34, т.е. в отсутствии потенциального ингибитора.

Результаты, представленные на рисунке 3.1.2, показывают, что 100% подавление АПК, оцененное по уровням продукции обоих анафилатоксинов, достигается при существенном молярном дефиците антител hC34 по отношению к антигену. Поскольку ингибирование достигается при соотношении АТ/АГ меньше единицы, то становится очевидным, что для достижения эффективного ингибирования достаточно нейтрализовать лишь часть молекул C3. Этот факт позволил предположить, что антитела нейтрализуют долю молекул C3, участвующих на стадии инициации активации комплемента по альтернативному пути, либо фрагмент C3-конвертазы альтернативного пути.

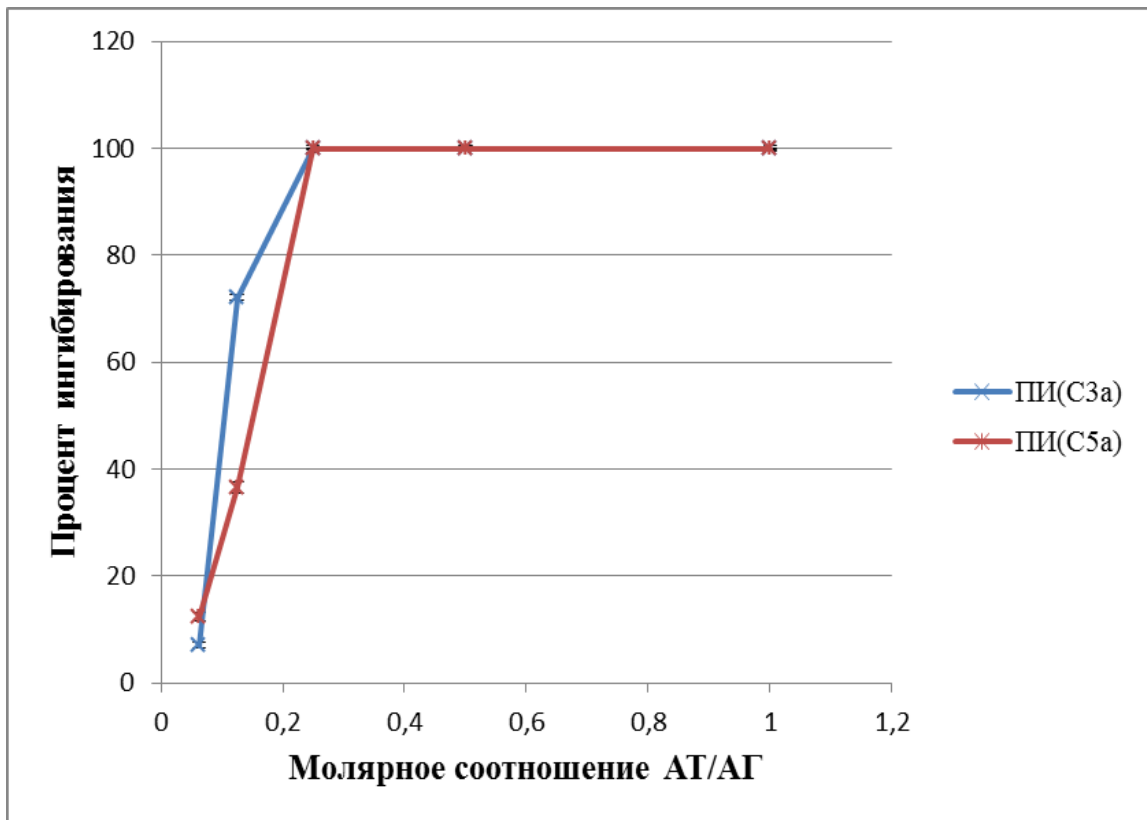


Рисунок 3.1.2 – Изучение ингибирования альтернативного пути активации комплемента антителом hC34

Этот метод был положен в основу определения специфической активности антитела hC34 – одного из принципиальных показателей, определяющих качество препаратов антител - и использован как метод контроля качества фармацевтической субстанции и лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.

Согласно разработанной методике, уровень активации комплемента количественно оценивался по концентрации полипептида С3а. Активацию комплемента по альтернативному пути индуцировали зимозаном, который добавляли к пробам нормальной сыворотки человека, содержащей 1 мг/мл С3 компонента и различные количества антитела hC34. Реакцию проводили в планшете для ИФА следующим образом. Во все лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили по 50 мкл буферного раствора для альтернативного пути активации и по 50 мкл раствора сыворотки крови человека. В 94 из 96 лунок вносили по 50 мкл растворов антител с различной концентрацией, а в 2 лунки из

96 добавляли буферный раствор для разведения антител (отрицательный контроль на антитела). Схема расположения образцов на планшете приведена в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1 – Схема расположения проб для анализа нейтрализующей активности антител hC34 на планшете для ИФА

Лунка планшета	Концентрация антитела hC34, мкг/мл	Молярное соотношение антитело/антиген
A1	25	1:8
B1	12,5	1:16
C1	6,25	1:32
D1	3,125	1:64
E1	1,563	1:128
F1	0,781	1:256
G1	0	-

Планшет инкубировали в термостате при постоянном перемешивании на шейкере в течение 5 мин. Далее в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора зимозана А и в одну из контрольных лунок сразу вносили 20 мкл реагента для остановки активации комплемента. После этого планшет инкубировали в термостате при постоянном перемешивании на шейкере в течение 1 ч. По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета добавляли по 20 мкл реагента для остановки активации комплемента (кроме контрольной лунки, где этот реагент был внесен в начале активации).

После остановки реакции активации комплемента в каждом образце определяли концентрацию C3a с помощью иммуноферментной тест-системы для определения анафилатоксина C3a комплемента человека. С этой целью пробы разводили в 10 раз и переносили в планшет тест-системы для проведения ИФА в соответствии с инструкцией к тест-системе. Анализ проводили в дубликатах, усредняя данные по дубликатам.

Процент ингибирования (ПИ, %) для каждой инкубационной пробы, в которой варьируется соотношение антиген: антитело рассчитывали по формуле (4):

$$ПИ(\%) = \frac{(A - X)}{A - B} \times 100, \quad (4)$$

где А - концентрация С3а в образце, в котором проводилась активация комплемента по альтернативному пути в отсутствие антител hC34 (лунка G1 на схеме 1) – соответствует максимальной степени активации;

Х - концентрация С3а в образце, соответствующая определенному соотношению антиген : антитело (лунки В1 – F1 на схеме 1);

В - концентрация С3а в образце, к которому в нулевой момент времени был добавлен реагент для остановки активации комплемента (лунка Н1 на схеме 1) - соответствует спонтанной активации.

Методика устанавливает нормативные требования, согласно которым рекомбинантное антитело hC34 должно ингибировать активацию комплемента зимозаном не менее чем на 90 % (ПИ > 90%) при молярном соотношении антитела к С3, равном 1 : 32 и менее.

В качестве иллюстрации повторяемости разработанной методики ниже представлены результаты определения с ее помощью специфической (ингибирующей) активности трех опытных образцов лекарственной формы антитела hC34 (таблицы 3.1.2-3.1.4).

Таблица 3.1.2 – Определение специфической (ингибирующей) активности лекарственной формы антитела hC34, образец № 01-0517

Лунка планшета	Дорожка планшета	Дорожка планшета	ПИ, %
	Концентрация препарата антитела hC34 в ячейке, мкг/мл	Концентрация C3a в ячейке, нг/мл	
A1	25	984	98,4
B1	12,5	1009	98,4
C1	6,25	1144	98,2
D1	3,125	1335	97,9
E1	1,563	59215	5,0
F1	0,781	60556	2,8
G1	0	62327	0,0

Таблица 3.1.3 – Определение специфической (ингибирующей) активности лекарственной формы антитела hC34, образец № 02-0517

Лунка планшета	Дорожка планшета	Дорожка планшета	ПИ, %
	Концентрация препарата антитела hC34 в ячейке, мкг/мл	Концентрация C3a в ячейке, нг/мл	
A1	25	992	98,27
B1	12,5	1006	98,25
C1	6,25	1184	97,94
D1	3,125	1269	97,79
E1	1,563	52887	7,88
F1	0,781	54231	5,54
G1	0	57412	0,0

Таблица 3.1.4 – Определение специфической (ингибирующей) активности лекарственной формы антитела hC34, образец № 03-0517

Лунка планшета	Дорожка планшета	Дорожка планшета	ПИ, %
	Концентрация препарата антитела hC34 в ячейке, мкг/мл	Концентрация C3a в ячейке, нг/мл	
A1	25	956	98,47
B1	12,5	1100	98,23
C1	6,25	1427	97,71
D1	3,125	1546	97,52
E1	1,563	56644	9,10
F1	0,781	59022	5,28
G1	0	62312	0,0

Было показано, что опытные образцы лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34, № 01-0517, 02-0517 и 03-0517, ингибируют активацию комплемента зимозаном при соотношении антитела к C3, равном 1:64 (или в концентрации 3,125 мкг/мл), а разработанная методика позволяет получать стабильные результаты и может быть включена в проект нормативной документации на препарат в качестве методики контроля качества специфической активности антитела hC34.

### 3.1.3 Идентификация участка связывания с антителом hC34 на молекуле C3

В рамках настоящего иммунофармакологического исследования производилась оценка специфичности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 по отношению к различным молекулярным формам C3 компонента, которые образуются в результате процессинга этой молекулы, обусловленного активацией комплемента. В ряду реакций комплемента молекула C3 претерпевает ряд последовательных преобразований (рисунок 3.1.3). Процесс активации AP инициируется вследствие спонтанного конформационного изменения C3 в водной среде и гидролиза тиоэфирной связи. Молекула C3 с активной тиоэфирной связью, обозначаемая как C3(H<sub>2</sub>O), имеет очень короткое время жизни, после чего переходит в форму C3i. Идентичную форму C3i можно

получить обработкой С3 моноаминами. В течение короткого времени пребывания в активном состоянии  $C3(H_2O)$  вступает в реакцию с другими компонентами комплементарного каскада с образованием С3-конвертаз АП, которые атакуют нативный С3 по специфической связи и расщепляют его на два фрагмента: анафилатоксин С3а и опсонин С3б. Последний подвергается дальнейшему активационному процессингу под действием сериновых протеаз, в частности, катепсина G, протеазы комплемента фактора I вкупе с кофакторами Н и CR1. В результате этого образуются еще более редуцированные формы С3: iС3b и С3с. Все перечисленные преобразования сопровождаются конформационными изменениями и, следовательно, экспозицией неоэпитопов на молекуле С3.

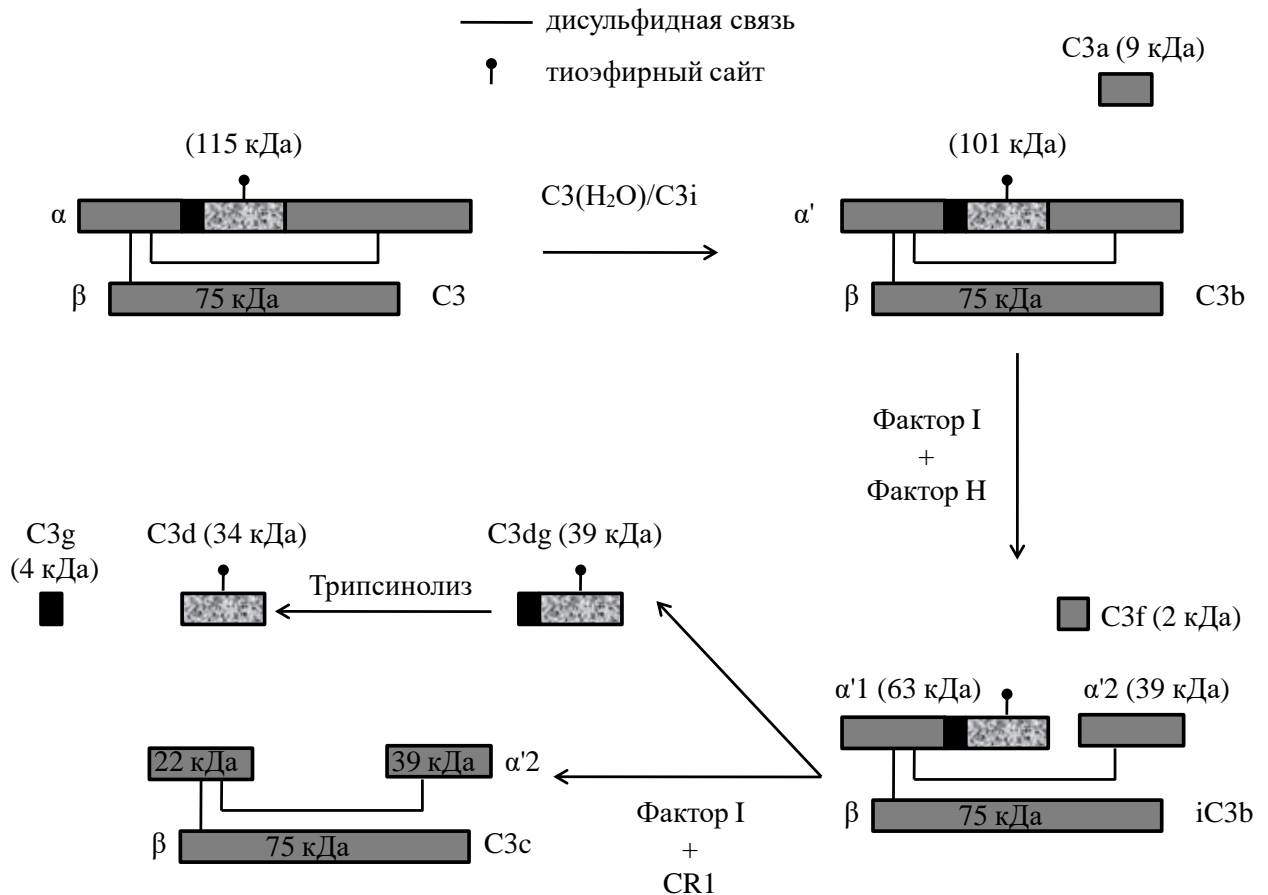


Рисунок 3.1.3 – Процессинг С3 компонента комплемента при запуске АП с образованием фрагментов С3i, С3b и С3с



Следуя поставленной задаче, три производных СЗ компонента - СЗi, СЗb и СЗc - были получены в очищенном виде в соответствии с описанными выше методиками. Аффинность их взаимодействия с hСЗ4, определяющая их специфичность, была исследована методом SPR на приборе «Биокор Х100». Расчет равновесных констант диссоциации ( $K_D$ ) взаимодействий hСЗ4 с производными СЗ был сделан после трех экспериментальных циклов с последовательным увеличением концентраций аналитов в диапазоне 2,5-40 нМ (сенсограммы не приводятся). Были рассчитаны следующие параметры, характеризующие взаимодействие антител hСЗ4 с производными СЗ:

- $K_D$  – равновесная константа диссоциации (чем меньше, тем выше аффинность);
- $k_a$  – константа скорости ассоциации (чем выше, тем быстрее формируется комплекс);
- $k_d$  – константа скорости диссоциации (чем меньше, тем медленнее диссоциирует комплекс);
- $R_{max}$  – максимальная связывающая способность поверхностью аналита (чем больше, тем больше комплекса);
- U-value рассчитывается прибором «Биокор Х100». Значение U выше 25 указывает на то, что абсолютные значения для двух или более параметров (константы скорости и  $R_{max}$ ) не могут быть определены.

Результаты проведенных расчетов представлены в таблице 3.1.5.

Таблица 3.1.5 - Параметры, характеризующие кинетику взаимодействия hСЗ4 (иммобилизован при концентрации 20 нМ) с различными вариантами СЗ (2,5-40 нМ)

Аналит	СЗ	СЗi	СЗb	СЗc
$K_D$ , нМ	-	4,5	4,5	8,4
$k_a$ , $10^6/M \cdot c$	-	0,22	0,27	0,20
$k_d$ , $10^{-3}/c$	-	0,97	1,22	1,68
$R_{max}$ , RU	-	1451	1455	928
U-value	95	2	1	2

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Взаимодействие нативного C3 с hC34 является очень слабым и лежит за пределами чувствительности приборного метода.

2. C3i и C3b взаимодействуют с антителом практически одинаково (равенство значений  $K_D$  и  $R_{max}$ ), последний чуть быстрее ассоциирует с hC34 и диссоциирует от hC34 (значения  $k_a$  и  $k_d$ ).

3. Взаимодействие C3c с антителом хотя и является значительным, но остается слабее по сравнению с C3i и C3b (значения  $K_D$ ,  $k_a$ ,  $k_d$  и  $R_{max}$ ).

Эти исследования указывают на то, что неопределяемый, специфичная для взаимодействия с антителом hC34, возникает на стадии первичного конформационного преобразования C3 → C3(H<sub>2</sub>O), происходящего при гидролизе тиоэфирной связи, и остается фиксированной на других формах: C3i, C3b и C3c. Снижение аффинитета C3c к антителу по сравнению с таковым для двух других фрагментов может свидетельствовать о том, что отсутствующий на этой молекуле фрагмент C3d,g стабилизирует структурную архитектуру C3i и C3b, в состав которых он входит. В то же время его отсутствие не разрушает неопределяемый.

Таким образом, проведенные *in vitro* исследования продемонстрировали, что изученное антитело блокирует альтернативный путь активации комплемента, не затрагивая классический.

Методом плазмонного резонанса установлено, что участок связывания с антителом hC34 локализован на формах C3i, C3b и C3c.

### **3.2 Определение релевантного вида животных для проведения экспериментальных исследований рекомбинантного гуманизированного антитела hC34**

Видовую кросс-реактивность антитела hC34 с сыворотками человека и различных животных оценивали методом ИФА в варианте «сэндвич». Использованная тест-система ИФА включала рекомбинантное гуманизированное антитело hC34, иммобилизованное на поверхности ячеек планшета, исследуемые образцы - сыворотки крови человека и животных в различных разведениях, поликлональные кроличьи антитела к C3 компоненту комплемента человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

На первой стадии анализа неопределяемого C3 компонента комплемента, содержащегося в исследуемых образцах сывороток крови, связывается с моноклональным антителом hC34, иммобилизованным на внутренней поверхности ячеек планшета. На второй стадии анализа C3 компонент комплемента, связавшийся с иммобилизованным моноклональным антителом hC34, взаимодействует с поликлональными кроличьими антителами к C3 компоненту комплемента человека, конъюгированными с пероксидазой хрена. Затем в ячейки планшета вносят субстрат для ферментативной реакции пероксидазы хрена, наблюдают развитие окраски раствора и проводят измерение оптической плотности раствора в ячейках планшета. Если оптическая плотность в разведении  $10^4$  исследуемых образцов сывороток крови превышает фоновое значение в 10 раз, делают вывод о том, что сыворотка крови взаимодействует с рекомбинантным антителом hC34.

Поликлональные кроличьи антитела к компоненту C3 комплемента человека связываются с C3 компонентом во всех сыворотках крови, использованных в данном эксперименте, что было подтверждено методом электрофореза в ПААГ с последующим иммуноблоттингом (рисунок 3.2.1).

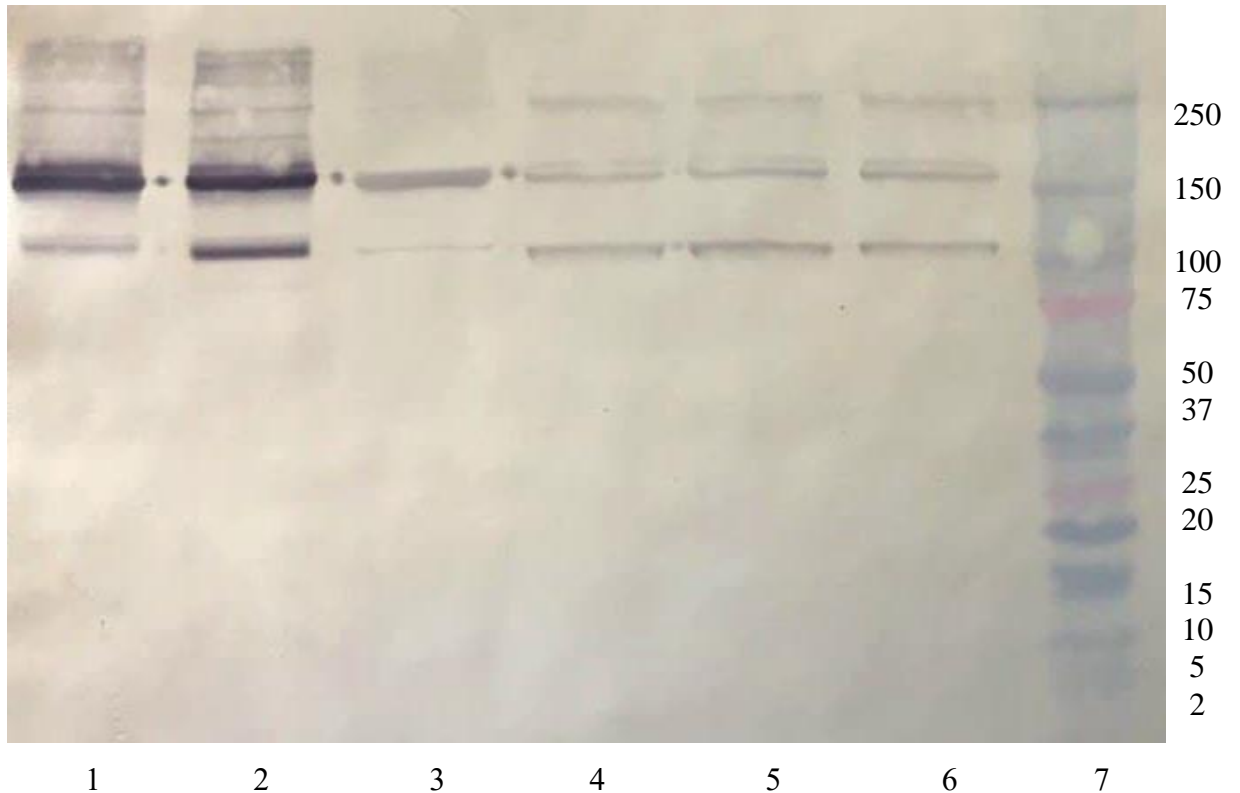


Рисунок 3.2.1 – Электрофорез в ПААГ сывороток крови человека и различных животных с последующим иммуноблоттингом с поликлональными кроличьими антителами к С3 компоненту комплемента человека, конъюгированными с пероксидазой хрена

Дорожки:

- 1 – сыворотка крови человека
- 2 – сыворотка крови обезьяны
- 3 – сыворотка крови крысы
- 4 – сыворотка крови мыши
- 5 – сыворотка крови кролика
- 6 – сыворотка крови свиньи
- 7 – маркерные белки 2 – 250 кДа (Bio-Rad, кат.№ 1610377)

Результаты оценки кросс-реактивности антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных методом иммуноферментного анализа представлены в таблице 3.2.1 и на рисунке 3.2.2.

Таблица 3.2.1 – Результаты оценки кросс-реактивности антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных методом иммуноферментного анализа

№	Объект исследования	Оптическая плотность при 450 нм, о.е.			
		Разведение проб сывороток крови			
		10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
1	Отриц. контроль	1,6232±0,0179	0,3066±0,0038	0,0534±0,0011	0,032±0,0007
2	Крыса	0,1454±0,0011	0,0976±0,0018	0,0428±0,0008	0,0324±0,0011
3	Мышь	0,1136±0,0015	0,0716±0,0036	0,0344±0,0021	0,0284±0,0015
4	Человек	2,825±0,0016	2,8266±0,0105	2,095±0,0016	0,5292±0,0044
5	Обезьяна	2,1614±0,0091	2,077±0,0024	1,617±0,0291	0,453±0,0016
6	Кролик	0,0326±0,0011	0,026±0,0016	0,0264±0,0036	0,0336±0,0015
7	Свинья	0,042±0,0032	0,0326±0,0011	0,0304±0,0011	0,0324±0,0021

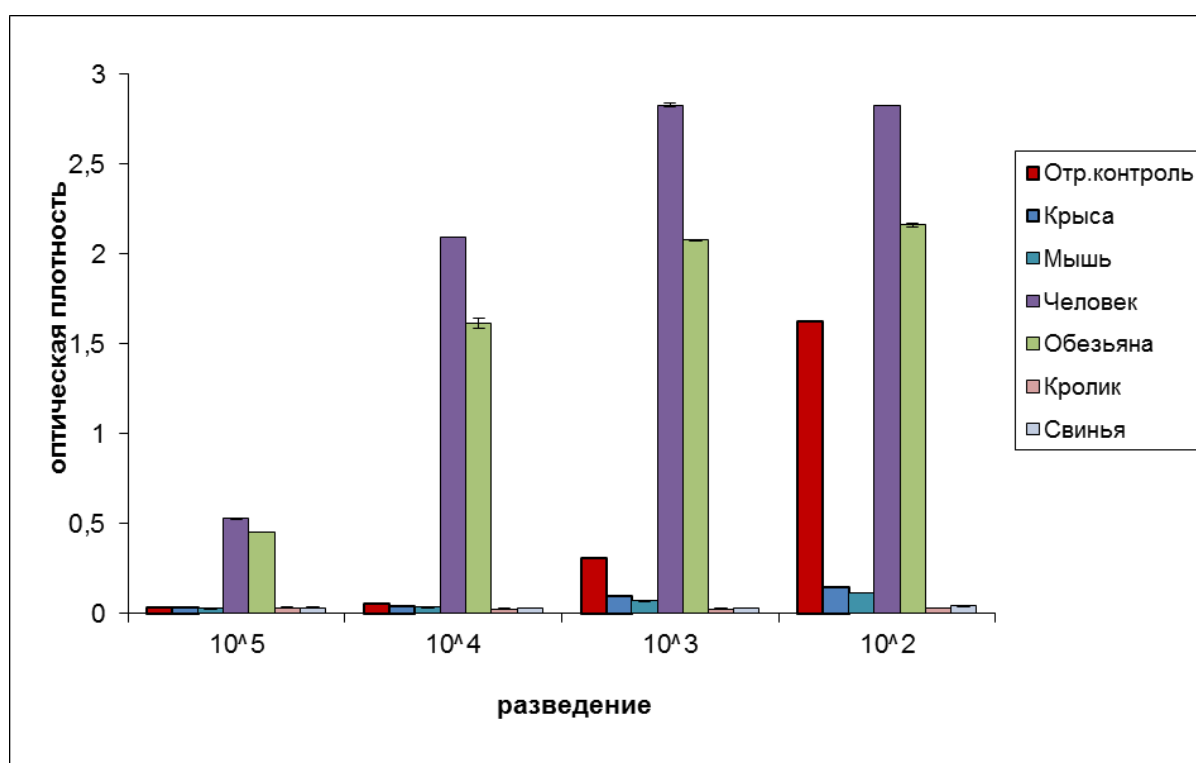


Рисунок 3.2.2 – Результаты оценки кросс-реактивности антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных методом иммуноферментного анализа

В результате проведенных исследований показано, что рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 взаимодействует с сыворотками крови человека и обезьяны (оптическая плотность в разведении  $10^4$  равна 2,095 и 1,617, соответственно), что свидетельствует о видоспецифичности исследуемого антитела.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что релевантным видом животных для проведения экспериментальных исследований рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 являются приматы.

Однако в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению моноклональных антител (МАТ), приведенными в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н.Миронова [204], при отсутствии животных соответствующего вида возможно использование для доклинического изучения МАТ трансгенных животных, либо гомологичных белков, т. е. белков животного происхождения (например, мышей, крыс, собак, кроликов или нечеловекообразных приматов), которые распознают антигены-мишени у соответствующего вида животных с той же эффективностью, с какой препарат, предназначенный для клинических исследований, распознает соответствующую мишень у человека. Доклиническое изучение МАТ с использованием гомологичных белков на так называемых суррогатных моделях считается приемлемым и в зарубежной практике, в частности препарат терапевтических антител к C5 экулизумаб с учетом его видовой специфичности был допущен к клиническим исследованиям на основании фармакодинамических исследований, проведенных только *in vitro*, и токсикологических исследований, проведенных на мышах с использованием суррогатного мышинового антитела к C5 мыши [209]. В связи с этим было принято решение изучение специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 проводить на примере его аналога (гомологичного белка) - моноклонального антитела 3A8, специфичного C3 компоненту комплемента крысы - в модели травматического поражения головного мозга крысы.

Кроме того, при отсутствии релевантного вида животных в соответствии с Руководством [204] общие проявления потенциальной токсичности препарата могут быть оценены в рамках ограниченных исследований на нерелевантном виде животных. На основании этого и с учетом предположения, что рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 при проявлении своих иммунобиологических свойств не должно оказывать специфической токсичности, исследования безопасности препарата были проведены в экспериментах на грызунах при моделировании острого и повторного воздействия.

### **3.3 Результаты изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на примере его аналога**

В рамках изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 проведены эксперименты на модели травматического поражения головного мозга у крыс. В качестве объекта исследования в данных экспериментах использовали видоспецифический аналог антитела hC34 - моноклональное антитело 3A8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы.

В эксперименте были использованы 39 крыс-самцов, которые случайным образом были разделены на 3 равные группы. У всех животных формировали условный рефлекс пассивного избегания, спустя 30 мин всем животным наносили закрытую черепно-мозговую травму. Спустя 15 мин после нанесения травмы животным первой группы внутривенно вводили изучаемый препарат в количестве 125 мг/кг, животным второй группы - в количестве 250 мг/кг, животным контрольной группы вводили физиологический раствор. При расчете доз препарата исходили из количества антитела, необходимого для нейтрализации всего С3 компонента комплемента, циркулирующего в крови крысы (концентрация С3 в крови - 1 мг/мл, объем крови крысы – 50 мл). Помимо контрольной группы для оценки интенсивности поражения в эксперименте использовались интактные животные (n=10).

Поскольку гибель животных в результате моделирования ЗЧМТ наблюдалась в течение первых минут после нанесения поражения, количество погибших и выживших животных не зависело от введения изучаемого препарата. Анализ сохранности УРПИ (интерпретируемой как сохранение когнитивных функций экспериментальных животных) показал, что в обеих экспериментальных группах, получавших изучаемый препарат, сохранность рефлекса составила 100%. В контрольной группе, получавшей ФР, УРПИ был сохранен у 70% животных, данные приведены в таблице 3.3.1. Несмотря на выраженную тенденцию к утрате УРПИ у животных контрольной группы, статистически достоверных различий между группами не наблюдали.

Таблица 3.3.1 - Выживаемость и сохранность УРПИ в модели ЧМТ

Контроль (ЗЧМТ)			Группа 1 (125 мг/кг)			Группа 2 (250 мг/кг)		
Всего	Гибель	Выжившие	Всего	Гибель	Выжившие	Всего	Гибель	Выжившие
13	2	11	13	3	10	13	0	13
<b>Зашли в темную камеру/всего животных</b>								
<b>3/11</b>			<b>0/10</b>			<b>0/13</b>		

Массовый коэффициент головного мозга отражает интенсивность воспалительной реакции, развивающейся в ответ на повреждение и сопровождающейся отеком. Результаты расчета массовых коэффициентов головного мозга животных всех экспериментальных групп представлены в таблице 3.3.2.

Таблица 3.3.2 - Массовые коэффициенты головного мозга животных (г/кг массы тела)

Интактные животные	Контроль (ЗЧМТ)	Группа 1 (125 мг/кг)	Группа 2 (250 мг/кг)
7,2±0,2	7,85±0,42	7,60±0,13	7,41±0,11



Анализ данных в таблице 3.3.2 показывает, что присутствует определенная тенденция к снижению массовых коэффициентов мозга у животных, получивших изучаемый препарат на фоне черепно-мозговой травмы, по сравнению с контрольными животными, получившими травму, однако эти различия не являются достоверными.

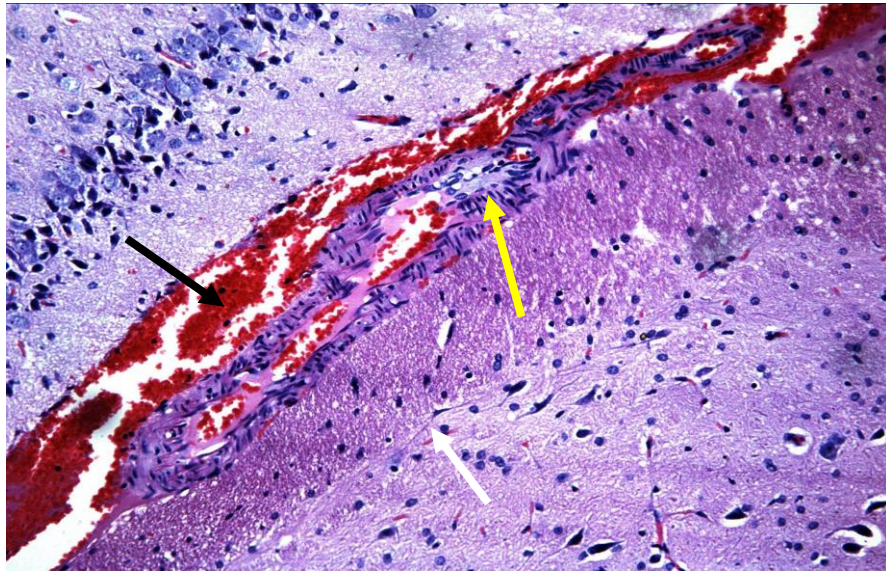
Анализ микропрепаратов показал, что у интактных животных, не получавших закрытую черепно-мозговую травму, не выявляются признаки отека оболочек и вещества головного мозга, кровоизлияния, полнокровия сосудов и лейкоцитарной инфильтрации.

У животных контрольной группы, получивших ЗЧМТ, но не получивших лечение, наблюдались типичные признаки ЗЧМТ: периваскулярные кровоизлияния и инфильтрация лейкоцитами, вазоспазм, отек, полнокровие сосудов (рисунок 3.3.1А).

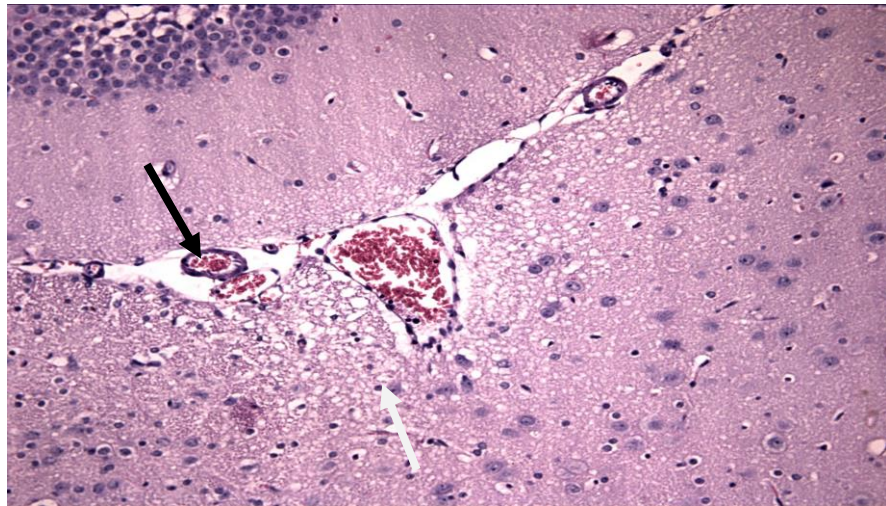
У животных опытных групп, получавших препарат в дозах 125 и 250 мг/кг, было выявлено лишь небольшое полнокровие сосудов и очаги отека ткани (рисунок 3.3.1Б и 3.3.1В).

Помимо этого, в ряде случаев у животных контрольной группы наблюдали очаговые кровоизлияния в толще мозговых оболочек; в опытных группах состояние мозговых оболочек было нормальным (рисунок 3.3.2).

А



Б



В

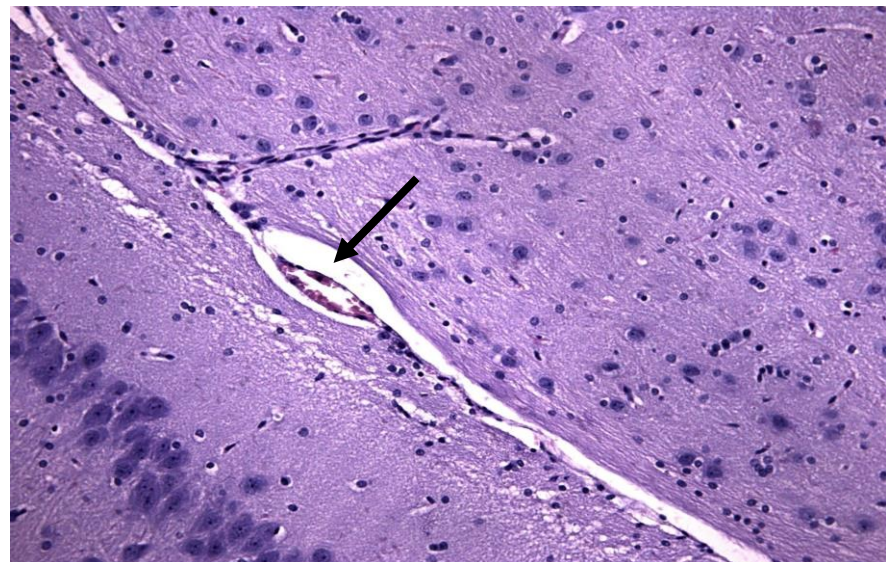


Рисунок 3.3.1 - Репрезентативные срезы супрагиппокампальных областей головного мозга животных из контрольной группы (А) и опытных групп 125 мг/кг (Б) и 250 мг/кг (В). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 320х. Черной стрелкой отмечен полнокровный сосуд, белой - область отека, желтой - вазоспазм



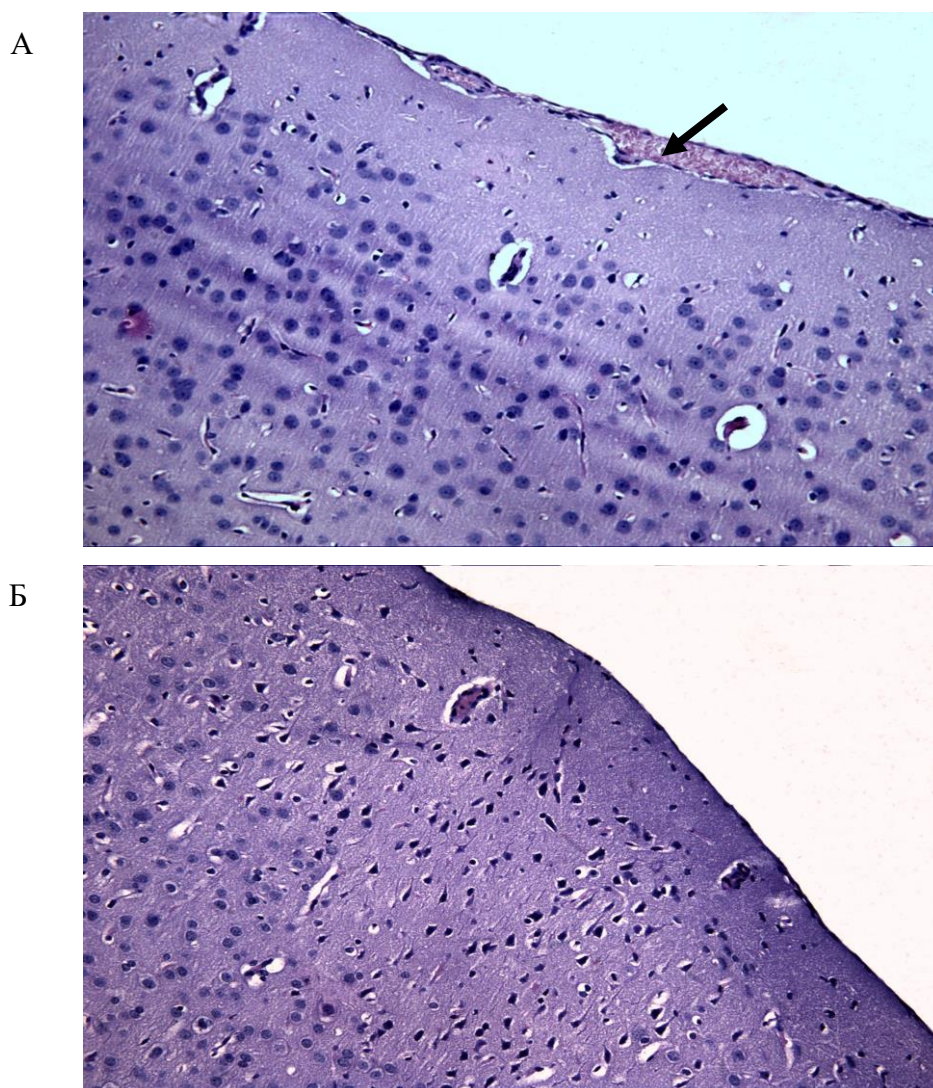


Рисунок 3.3.2 - Сравнение областей коры больших полушарий, окраска гематоксилином и эозином, увеличение 320х. А – животное контрольной группы, Б – животное опытной группы, получавшей препарат в дозе 250 мг/кг. Черной стрелкой отмечено кровоизлияние в мягкую мозговую оболочку

На рисунках 3.3.3 и 3.3.4 приведены репрезентативные фотографии микропрепаратов, иллюстрирующие состояние ткани головного мозга в областях СА1 и СА3 у животных контрольной и опытной групп.



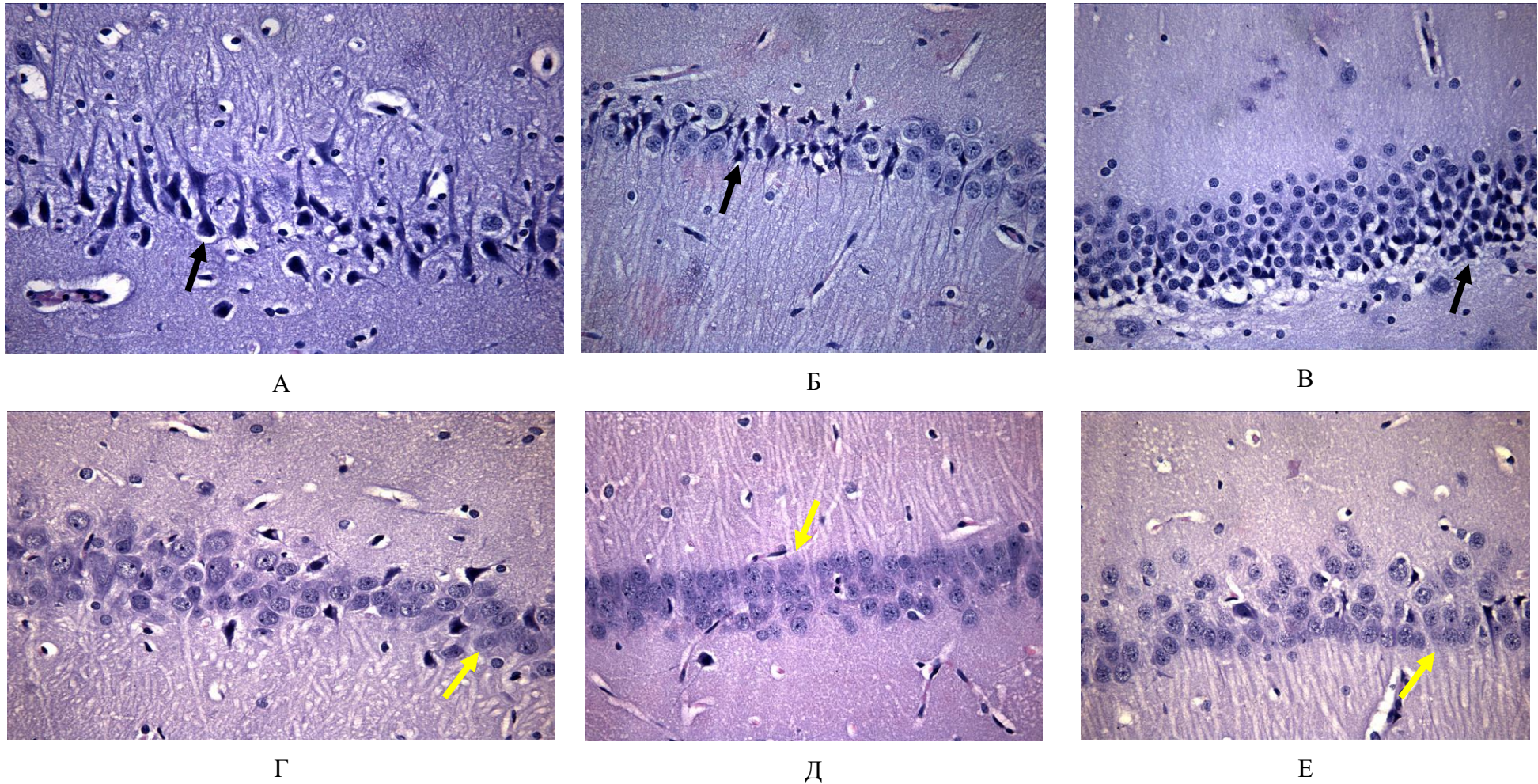


Рисунок 3.3.3 - Сравнение СА1 участков пирамидного слоя гиппокампа, окраска гематоксилином и эозином, увеличение 640х. А, Г – животное контрольной группы, Б, Д – животное опытной группы, получавшей препарат в дозе 125 мг/кг, В, Е - животное опытной группы, получавшей препарат в дозе 250 мг/кг. Черной стрелкой выделены гиперхромные погибающие нейроны, желтой стрелкой – клетки-«тени»



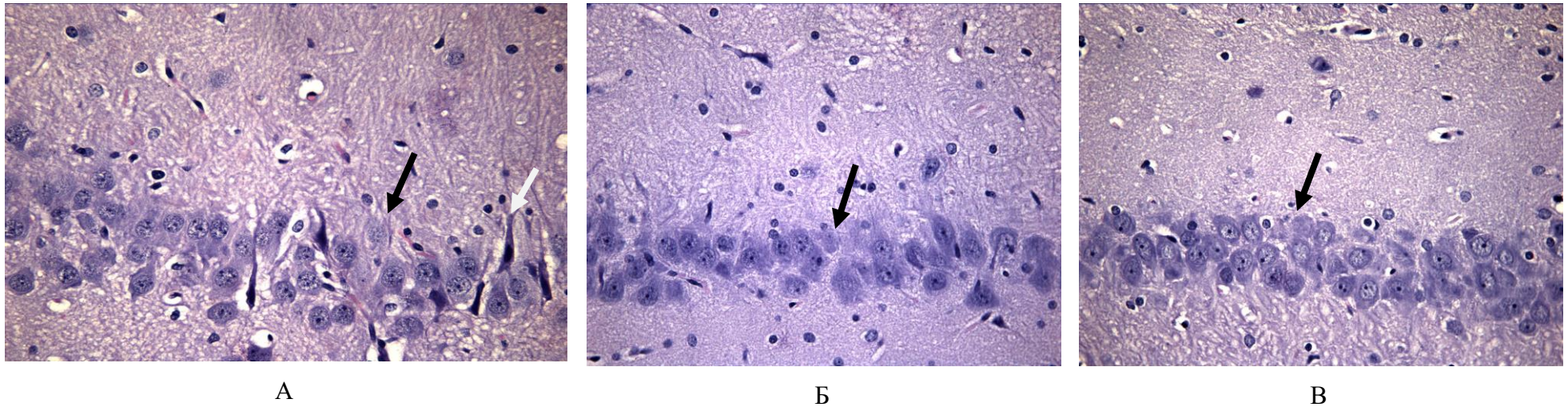


Рисунок 3.3.4 - Сравнение СА3 участков пирамидного слоя гиппокампа, окраска гематоксилином и эозином, увеличение 640х. А – животное контрольной группы, Б – животное опытной группы, получавшей препарат в дозе 125 мг/кг, В - животное опытной группы, получавшей препарат в дозе 250 мг/кг. Черная стрелка – клетки-«тени», белая стрелка – гиперхромные погибающие нейроны

Анализ гистологических препаратов показал, что у контрольных животных (не получавших терапии), получивших ЗЧМТ, в областях СА1 и СА3 наблюдаются полиморфные изменения ядер (гипохромия и гиперхромия) нейронов, увеличение количества клеток-«теней», то есть наблюдаются все стадии апоптоза нервных клеток. У животных опытных групп, получавших препарат в дозах 125 и 250 мг/кг, патологические изменения значительно менее выражены.

Подсчет соотношения живых и погибающих нейронов показал, что и в области СА1, и в области СА3 гиппокампа наблюдается достоверное увеличение процента живых нейронов в опытной группе животных, получавших препарат в дозе 250 мг/кг, по сравнению с группой животных, получавших препарат в дозе 125 мг/кг, и с контролем (рисунки 3.3.5 и 3.3.6).

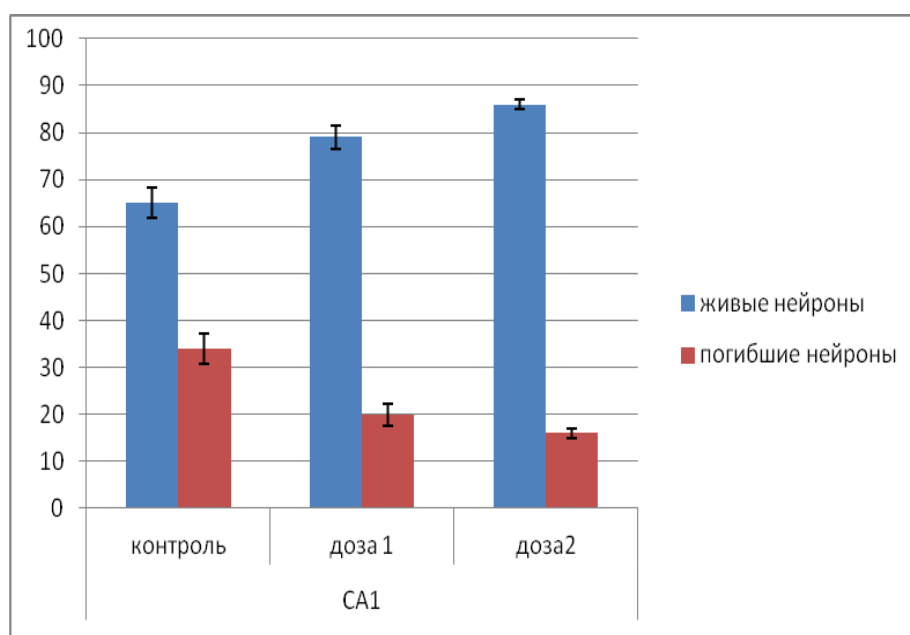


Рисунок 3.3.5 - Сравнение процента живых и погибших нейронов в опытных и контрольной группах в области СА1 гиппокампа (\* $p < 0,01$  по сравнению с соответствующими значениями контрольной группы). По оси ординат - процент погибших/живых нейронов. Доза 1 – 125 мг/кг, доза 2 – 250 мг/кг

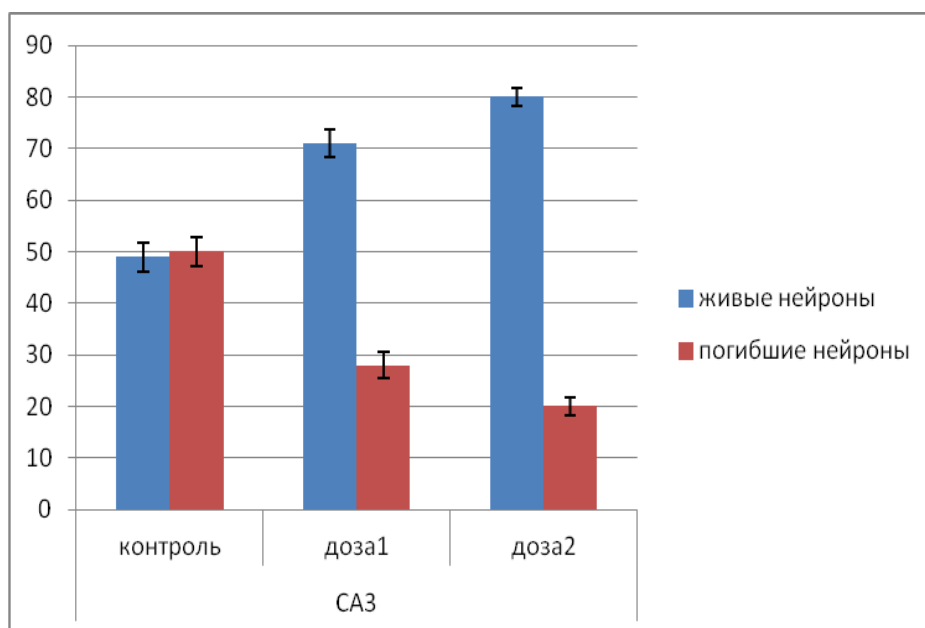


Рисунок 3.3.6 - Сравнение процента живых и погибших нейронов в опытных и контрольной группах в области СА3 гиппокампа (\* $p < 0,01$  по сравнению с соответствующими значениями контрольной группы). По оси ординат - процент погибших/живых нейронов. Доза 1 – 125 мг/кг, доза 2 – 250 мг/кг

При ЧМТ у крыс развивается воспаление в головном мозге, о чем свидетельствуют описанные выше результаты. Воспаление может быть вызвано множеством факторов, в том числе оно может быть обусловлено активацией системы комплемента по альтернативному пути. Инициаторами комплемент-зависимого воспаления, главным образом, являются анафилатоксины C3a и C5a, которые являются продуктами активации C3 и C5 компонентов комплемента.

В таблице 3.3.3 приведены средние значения концентраций C3a в плазме крови экспериментальных животных по группам. Как видно из таблицы, концентрация C3a у интактных животных в среднем составляла 82 нг/мл. В группе контроля, в которую входили крысы с ЗЧМТ, не получавшие защитное антитело 3A8, концентрация C3a почти втрое превышала таковую у интактных животных и была равна 220 нг/мл. В группах 1 и 2 - у животных, получавших исследуемое антитело в двух различных дозах 125 и 250 мг/кг, значения концентрации C3a были промежуточными. Концентрация C3a была выше, чем у интактных животных, но достоверно ниже, чем в группе контроля без лечения.

Наблюдался дозозависимый эффект, причем концентрация С3а была тем ниже, чем выше доза антитела.

Таблица 3.3.3 – Концентрация С3а в плазме крови экспериментальных животных

Концентрация С3а (нг/мл)			
Интактные животные	Контроль (ЗЧМТ)	Группа 1 (125 мг/кг)	Группа 2 (250 мг/кг)
82±7	220±22	150±13	91±10

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что тестируемое моноклональное антитело 3А8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы – аналог разрабатываемого рекомбинантного гуманизированного антитела hС34 – обладает фармакологической активностью в модели закрытой черепно-мозговой травмы, что подтверждается функциональным и гистологическим исследованием.

Анализ сохранности когнитивных функций экспериментальных животных в методике оценки сохранности УРПИ показал, что введение изучаемого препарата вызывает четкую тенденцию к сохранению памятного следа у животных, перенесших ЗЧМТ.

Гистологический анализ показал, что введение препарата уменьшило выраженность картины ЗЧМТ, а также достоверно и дозозависимо снизило процент погибших нейронов в гипоталамусе.

Установлено, что блокирование С3 компонента комплемента с помощью антитела 3А8 способствует ограничению активации комплемента, о чем можно судить по уменьшению уровня С3а фрагмента С3 в сывороточных пробах. Эти результаты являются показателем того, что блокирование комплемента на уровне С3 компонента оказывает положительное влияние на улучшение функционального состояния животных и снижение показателей воспаления в головном мозге при ЧМТ, которые продемонстрированы при изучении специфической активности.



### 3.4 Результаты изучения фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

Изучение фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 было проведено на белых беспородных крысах. Расчет фармакокинетических параметров, проведенный двумя различными способами с двумя вариантами усреднения, дал достаточно близкие результаты, что подтверждает высокое совпадение выбранной модели при модельно-зависимом подходе с экспериментальными данными.

Экспериментальные данные, полученные после внутривенного введения рекомбинантного антитела hC34 крысам в дозах 2,5, 5 и 10 мг на особь, были аппроксимированы суммой двух экспонент. Такая двухчастная модель позволила описать изменение концентрации препарата во времени с высокой точностью: значение  $R^2$  составило 0,999 при дозах 2,5 и 5 мг на особь и 0,993 при дозе 10 мг.

Усредненные результаты измерений концентрации антитела hC34 в сыворотке крови крыс после внутривенного введения в различных дозах представлены в таблице 3.4.1 и в графической форме на рисунке 3.4.1.

Таблица 3.4.1 - Динамика концентрации hC34 в сыворотке крови крыс после внутривенного введения (мг/мл, среднее  $\pm$  стандартное отклонение)

№ п/п	Время после введения (мин)	Доза 2,5 мг	Доза 5 мг	Доза 10 мг
1	10	0.8815 $\pm$ 0.0436	1.5066 $\pm$ 0.1205	2.3423 $\pm$ 0.1596
2	30	0.8348 $\pm$ 0.0334	1.3862 $\pm$ 0.0523	1.9580 $\pm$ 0.3286
3	60	0.7369 $\pm$ 0.0843	1.2976 $\pm$ 0.0582	1.8489 $\pm$ 0.5906
4	120	0.6646 $\pm$ 0.0519	1.1812 $\pm$ 0.1923	1.7263 $\pm$ 0.0942
5	360	0.4805 $\pm$ 0.0161	0.7807 $\pm$ 0.1743	1.3358 $\pm$ 0.2533
6	1440	0.2098 $\pm$ 0.0450	0.4065 $\pm$ 0.1067	0.9530 $\pm$ 0.2411
7	2880	0.0946 $\pm$ 0.0084	0.2195 $\pm$ 0.0437	0.5345 $\pm$ 0.0297
8	7200	0.0154 $\pm$ 0.0058	0.0398 $\pm$ 0.0266	0.1105 $\pm$ 0.0027

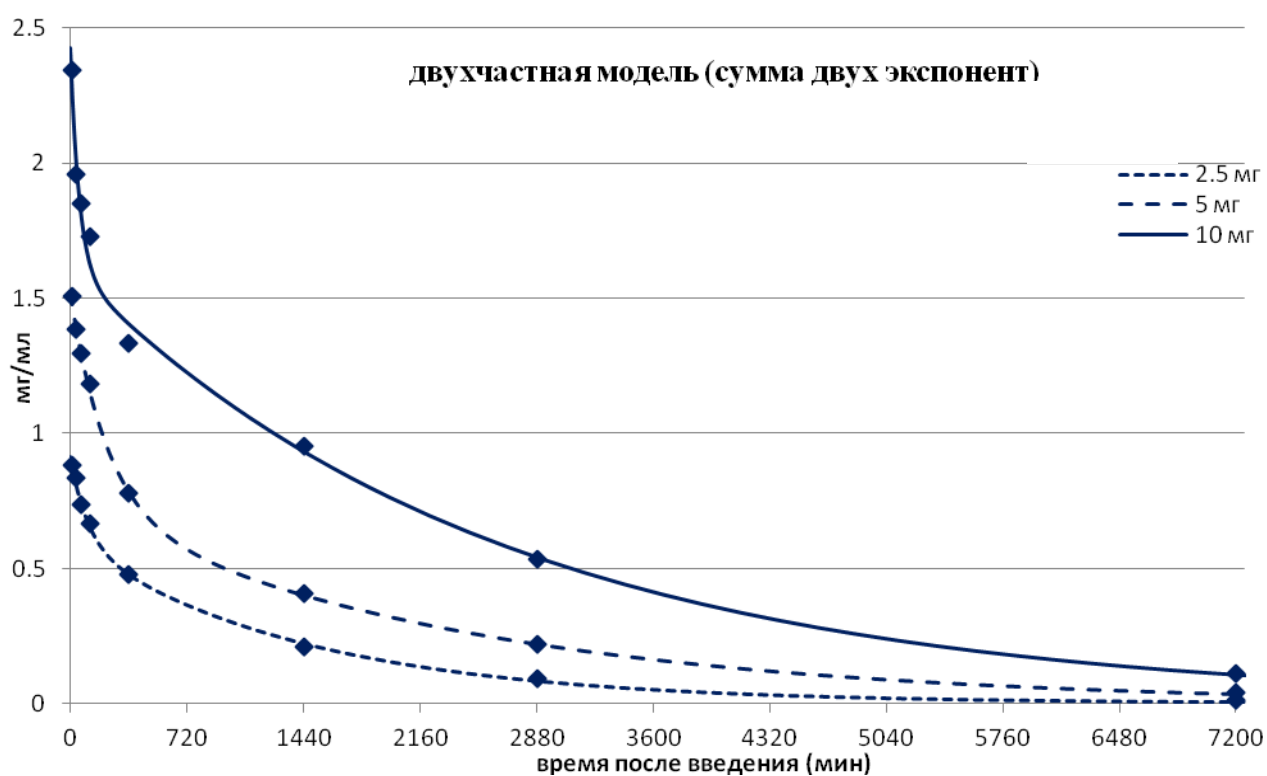
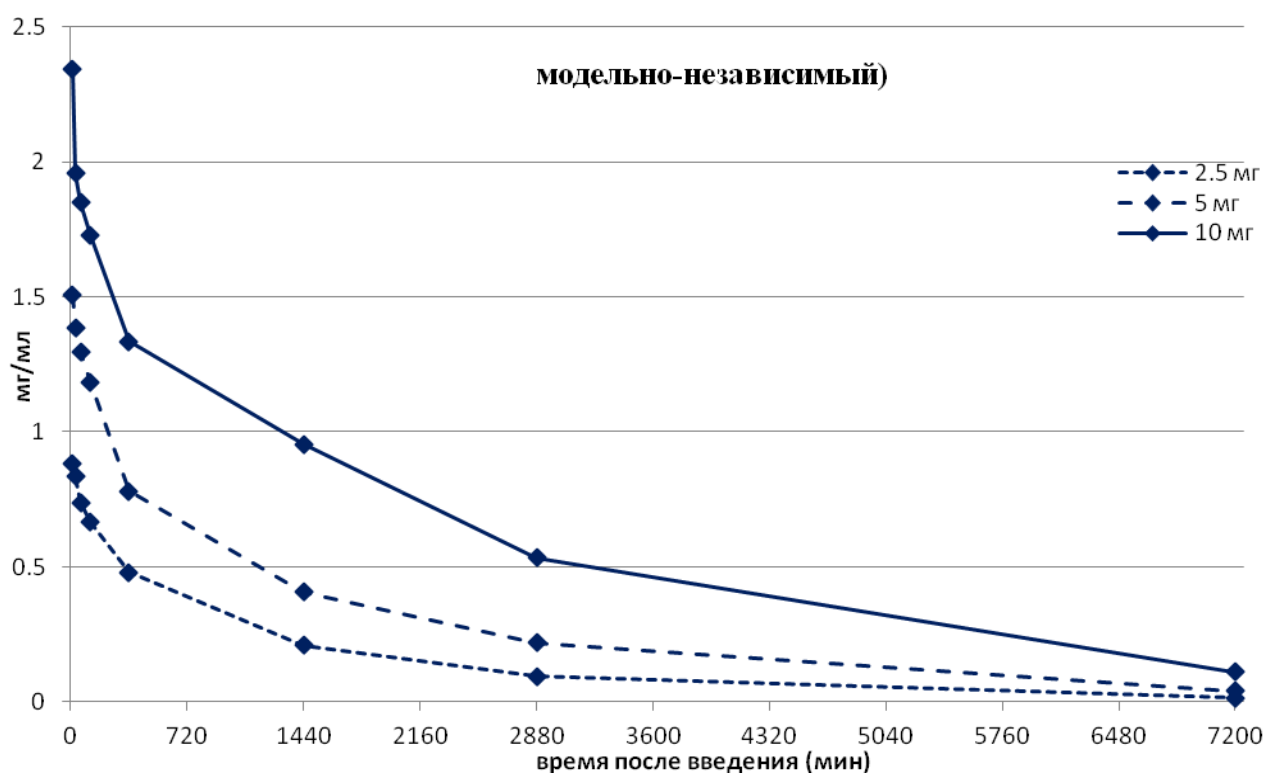


Рисунок 3.4.1 – Динамика концентрации hC34 в сыворотке крыс после внутривенного введения в дозах 2.5, 5 и 10 мг на особь

Из таблицы 3.4.1 и рисунка 3.4.1 видно, что после внутривенного введения крысам лекарственной формы рекомбинантного антитела hC34 наблюдается

экспоненциальное снижение его концентрации. Скорость снижения при всех дозах примерно одинакова и невелика – наибольшее снижение в 1,2 раза зафиксировано в первый промежуток наблюдения 10-30 мин для дозы 10 мг. Только через 5 суток (последнее измерение) концентрация hC34 приблизилась к нулевой при всех использованных дозах.

На рисунке 3.4.1 видно, что графики функций концентрации, полученные двумя разными способами, близки между собой. При этом для оценки фармакологических параметров двухчастная модель предпочтительнее моделью независимого способа, так как последний дает несколько завышенное значение основного параметра  $AUC_{\infty}$ . В таблице 3.4.2 приведены фармакокинетические параметры, рассчитанные обоими способами на основании экспериментальных данных.

Таблица 3.4.2 - Фармакокинетические параметры для «особи» со средней концентрацией, рассчитанные для внутривенного введения hC34 крысам

Фармакокинетический параметр	Модельно-независимый			Двухчастная модель (сумма двух экспонент)		
	2.5	5	10	2.5	5	10
Dose (мг)	2.5	5	10	2.5	5	10
Vd (мл)	2.76	3.18	3.90	2.74	3.29	4.12
C <sub>max</sub> (мг/мл)	0.91	1.57	2.56	0.91	1.52	2.43
T <sub>max</sub> (мин)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T <sub>half</sub> (мин)	1187.4	1535.4	1972.2	950.2	1452.0	1803.2
AUC (мг×мин/мл)	1081.9	2147.3	4602.7	902.2	1945.7	4295.4
AUMC (мг×мин <sup>2</sup> /мл)	1496558	3389547	8237231	1263957	4335503	11229990
MRT (мин)	1383.3	1578.5	1789.6	1401.0	2228.3	2614.4
Cl (мл/мин)	0.0023	0.0023	0.0022	0.0028	0.0026	0.0023

При в/в введении использованных доз объем распределения при обоих способах оценки составил примерно 2.8, 3 и 4 мл при дозах 2.5, 5 и 10 мг, соответственно, и не превышал объема циркулирующей крови. Это указывает на то, что исследуемый препарат в равновесном состоянии остается в кровяном

русле. В двухчастной модели полувыведение для дозы 5 мг происходит через сутки, для дозы 2.5 мг на 8 часов раньше, а для дозы 10 мг на 6 часов позже. Модельно-независимый способ дает несколько завышенные значения времен полувыведения. Оба способа моделирования дают для всех трёх доз примерно одинаковое значение клиренса 0,0025 мл/мин (таблица 3.4.2).

Таким образом, изучение фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на крысах показало, что:

- Кривые элиминации препарата при внутривенном введении носят типичный характер.
- При введении во всех использованных дозах объем распределения у крыс составляет от 2,5 мл до 4 мл и не превышает объем циркулирующей крови. Это указывает на то, что исследуемый препарат в равновесном состоянии остается в кровяном русле.
- После внутривенного введения препарат очень медленно выводится из организма животных – время полувыведения составляет около суток.
- Значение клиренса для всех использованных доз препарата составляет около 0,0025 мл/мин.

### 3.5 Результаты изучения безопасности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

При комплексной оценке эффективности лекарственного препарата необходимо учитывать его системное влияние на организм. Особенно важно это в случае разработки биотехнологических препаратов на основе антител, потенциально способных активировать воспалительные и аутоиммунные реакции, нарушения обменных процессов. Самостоятельная биологическая активность и особенно риск возникновения перекрестных реакций с другими белками человека, частично антигенно идентичными «мишени», может привести к системным нарушениям, которые невозможно предсказать в тестах *in vitro*. В числе органов и систем, потенциально подверженных риску возникновения побочных эффектов при применении лекарственных препаратов на основе рекомбинантных антител – система кроветворения, пищеварительная система, печень, почки, сердце. При этом важно оценить не только проявления токсичности исследуемого препарата, но и последствия его биологической активности.

Поэтому на данном этапе диссертационного исследования была проведена ограниченная оценка профиля безопасности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34, а именно воздействия разработанной ЛФ на системы и органы грызунов (крыс) в остром и хроническом эксперименте, а также потенциальных аллергенных и иммунотоксических свойств препарата.

#### 3.5.1 Изучение острой токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

Острая токсичность лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 была изучена на крысах. Период наблюдения после введения ЛФ составил 14 дней. В процессе экспериментов, помимо общего состояния животных и летальности, оценивали динамику массы тела, а по завершении экспериментов проводили патоморфологическое исследование.

Ежедневный клинический осмотр не выявил каких-либо симптомов интоксикации животных при внутривенном введении ЛФ крысам в дозах до 2000 мг/кг, ни в одной из групп не выявлено летальных эффектов в течение эксперимента. Таким образом, можно заключить, что уровни доз препарата, вызывающие возможные летальные эффекты при внутривенном введении, находятся заведомо выше 2000 мг/кг.

Общее воздействие изучаемого препарата на организм экспериментальных животных оценивали путем измерения динамики массы тела. Массу тела экспериментальных животных измеряли до начала эксперимента (фоновые значения), а также на 2-й, 7-й и 14-й день после введения изучаемого препарата. Результаты измерения массы тела животных, получивших ЛФ в максимальной дозе 2000 мг/кг, представлены в таблице 3.5.1.

Таблица 3.5.1 - Влияние внутривенного введения ЛФ в дозе 2000 мг/кг на массу тела крыс, грамм ( $M \pm m$ )

Время наблюдения (дни)	Экспериментальная группа и пол			
	Контроль		ЛФ	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Фон	189,8±1,4	189,6±1,4	190,0±1,5	189,8±1,5
2-й день	191,0±1,7	191,6±1,3	191,6±1,7	190,8±1,4
7-й день	216,0±1,4	216,2±1,4	215,2±1,6	215,4±1,4
14-й день	227,2±1,7	226,2±1,5	227,4±1,6	226,2±1,4

Согласно полученным данным, во всех группах наблюдался естественный прирост массы тела. Не выявлено достоверных различий между контрольной группой и животными, получавшими ЛФ в разных дозах, что является косвенным подтверждением отсутствия негативного влияния на обменные процессы в целом, даже при применении очень высоких доз препарата. Не выявлено достоверных изменений между подгруппами самцов и самок, что подтверждает отсутствие взаимной зависимости активности препарата от уровня половых гормонов в организме.

Патоморфологическое исследование крыс всех экспериментальных групп, проведенное в конце эксперимента (через 14 дней после введения ЛФ), не выявило каких-либо значимых различий между всеми экспериментальными группами.

С целью оценки изменений массы отдельных внутренних органов был проведен расчет массовых коэффициентов внутренних органов крыс всех экспериментальных групп, который также не выявил каких-либо значимых различий между группами животных, получавшими ЛФ или физиологический раствор. В таблице 3.5.2 приведены средние значения массовых коэффициентов внутренних органов крыс из контрольных групп и групп, получавших максимальную дозу ЛФ - 2000 мг/кг.

Таблица 3.5.2 - Массовые коэффициенты (МК) органов у белых крыс при внутривенном введении ЛФ в дозе 2000 мг/кг (г/кг веса тела,  $M \pm m$ )

Орган	Экспериментальная группа и пол			
	Контроль		ЛФ	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Сердце	4,4±0,1	4,3±0,1	4,2±0,1	4,1±0,1
Легкие с трахеей	7,1±0,1	6,9±0,2	6,9±0,1	7,0±0,2
Тимус	1,38±0,02	1,36±0,04	1,36±0,03	1,34±0,03
Печень	36,4±0,3	38,0±0,4	37,9±0,3	37,8±0,4
Селезенка	4,8±0,1	4,9±0,1	4,8±0,1	4,9±0,1
Почки	5,8±0,1	5,8±0,1	5,9±0,1	6,0±0,2
Надпочечники	0,14±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01	0,13±0,01
Головной мозг	7,3±0,1	7,3±0,2	7,3±0,1	7,3±0,2
Яички или яичники	7,0±0,2	0,27±0,01	7,2±0,2	0,25±0,01

Исходя из того, что разовая терапевтическая доза изучаемого препарата для человека при внутривенном введении составляет в среднем 4 мг/кг, можно заключить, что препарат в дозах, в 500 раз превышающих терапевтическую дозу для человека, не токсичен для грызунов (крыс), а именно, не вызывает летальных

эффектов и симптомов интоксикации у животных, не оказывает негативного воздействия на жизненно важные органы, обменные процессы в организме и организм в целом.

### 3.5.2 Изучение хронической токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

Хроническая токсичность ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 была изучена на крысах (самцах и самках) при ежедневном внутривенном введении в течение 30 дней в дозах 24 мг/кг, 260 мг/кг и 500 мг/кг. Дозирование осуществлялось по содержанию в ЛФ активного компонента. В течение эксперимента регистрировали интегральные показатели состояния организма всех животных, проводили физиологические исследования, лабораторные исследования, а также патоморфологическое и патогистологическое исследование по окончании эксперимента.

Клинический осмотр животных всех экспериментальных групп, проводившийся ежедневно на протяжении всего эксперимента, не выявил каких-либо значимых различий между группами. Гибели подопытных животных не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии материальной кумуляции исследуемой ЛФ в организме.

Измерение массы тела показало, что данный параметр равномерно увеличивался на протяжении всего срока исследования, как в контрольной, так и во всех опытных группах. Каких-либо достоверных различий между группами, связанных с введением изучаемой ЛФ, не наблюдалось, что так же, как и в остром эксперименте, может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния препарата на обменные процессы. Результаты взвешивания животных представлены в таблице 3.5.3.



Таблица 3.5.3 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на массу тела белых крыс (грамм,  $M \pm m$ )

Сроки изучения	Экспериментальная группа и пол							
	Контроль		24 мг/кг		260 мг/кг		500 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Фон	191,5±1,7	190,3±1,6	191,0±1,5	190,4±1,5	191,6±1,6	190,7±1,5	191,0±1,3	190,7±1,7
7-й день	214,3±2,0	212,4±2,0	214,0±1,9	212,4±1,8	213,7±1,9	212,9±1,7	214,0±2,0	212,1±2,0
14-й день	229,7±2,0	225,4±2,0	229,5±2,3	224,9±2,1	230,1±2,1	225,9±1,9	229,5±1,9	225,2±2,3
21-й день	243,1±2,0	233,3±2,4	243,7±2,5	233,8±2,3	243,7±2,4	234,0±2,1	242,7±2,1	233,0±2,1
30-й день	252,9±2,3	239,7±2,5	253,1±2,3	239,3±2,1	253,1±2,3	240,2±2,3	252,6±2,1	240,6±2,2

Оценивали влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на потребление корма и воды экспериментальными животными, что, наряду с данными клинического осмотра и динамикой массы тела, является одним из основных показателей, характеризующих токсическое действие препарата на общее состояние животных. Анализ потребления корма и воды показал, что достоверные различия в показателях между всеми экспериментальными группами отсутствуют.

С учетом того, что разрабатываемый препарат предполагается применять при повреждении головного мозга, необходимо было изучить его влияние на функции головного мозга в нормальных условиях, в частности на такие их проявления, как поведенческие реакции, двигательная активность, нервно-мышечная функция и проведение болевой чувствительности.

Регистрация структуры поведения крыс в открытом поле была проведена до начала эксперимента (фоновые значения) и через 4 недели после начала введения препарата. Данные по влиянию ЛФ на структуру поведения крыс в арене открытого поля представлены в таблице 3.5.4.

Таблица 3.5.4 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на структуру поведения крыс в открытом поле ( $M \pm m$ )

Показатель	Экспериментальные группы и пол			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
<b>Фон, самцы</b>				
Горизонтальная активность	44,6±1,3	45,4±1,2	44,5±1,4	45,5±1,4
Вертикальная активность	13,9±1,2	14,2±1,3	13,7±1,3	14,1±1,1
Заглядывания	5,2±0,5	5,3±0,3	5,2±0,5	5,3±0,4
Груминг	2,2±0,2	2,3±0,2	2,2±0,2	2,3±0,2
Акты дефекации	2,0±0,2	2,2±0,2	2,0±0,2	2,2±0,2
<b>4 недели, самцы</b>				
Горизонтальная активность	45,3±,5	45,0±1,4	45,5±1,3	45,4±1,4
Вертикальная активность	14,5±1,3	14,4±1,4	14,5±1,2	14,6±1,2
Заглядывания	5,3±0,5	5,5±0,4	5,2±0,3	5,2±0,3
Груминг	2,3±0,2	2,2±0,3	2,3±0,2	2,1±0,2
Акты дефекации	2,3±0,2	2,3±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2
<b>Фон, самки</b>				
Горизонтальная активность	45,1±1,4	45,6±1,3	46,0±1,3	44,8±1,3
Вертикальная активность	14,3±1,3	13,8±1,2	14,8±1,1	14,1±1,2
Заглядывания	5,2±0,5	5,4±0,4	5,2±0,4	5,3±0,3
Груминг	2,1±0,2	2,1±0,3	2,2±0,2	2,3±0,2
Акты дефекации	1,9±0,3	2,1±0,2	2,3±0,3	2,1±0,3
<b>4 недели, самки</b>				
Горизонтальная активность	45,5±1,3	45,0±1,4	46,1±1,3	45,9±1,4
Вертикальная активность	14,8±1,1	14,1±1,1	14,0±1,1	15,0±1,3
Заглядывания	5,3±0,4	5,2±0,4	5,0±0,4	5,2±0,4
Груминг	2,1±0,2	2,2±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2
Акты дефекации	2,1±0,3	2,1±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2

Как видно из представленных данных, достоверных различий в структуре поведения животных между всеми экспериментальными группами не наблюдалось. Отмечалось характерное для животных, вторично помещаемых в ситуацию «открытого поля», изменение поведенческого рисунка, проявляющееся

в тенденции к уменьшению количества горизонтальных пересечений и вертикальных стоек по сравнению с фоновыми значениями, в силу угасания ориентировочного рефлекса. Никаких достоверных эффектов ЛФ на структуру поведения животных отмечено не было.

Регистрация спонтанной двигательной активности была проведена до начала эксперимента (фоновые значения) и через 4 недели после начала введения препарата, результаты представлены в таблице 3.5.5.

Таблица 3.5.5 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на спонтанную двигательную активность крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Экспериментальные группы и пол			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
<b>Фон, самцы</b>				
Горизонтальная активность	142,3±10,5	139,6±10,5	143,4±10,2	142,5±10,3
Вертикальная активность	38,8±3,5	38,9±3,6	39,0±3,8	38,5±3,8
<b>4 недели, самцы</b>				
Горизонтальная активность	130,6±9,4	129,7±9,1	131,4±9,4	130,1±9,5
Вертикальная активность	29,3±2,8	28,5±2,6	30,1±2,6	29,4±2,2
<b>Фон, самки</b>				
Горизонтальная активность	138,4±10,6	137,9±10,7	137,9±10,7	137,5±10,5
Вертикальная активность	37,9±3,5	36,5±3,4	36,8±3,6	36,8±3,4
<b>4 недели, самки</b>				
Горизонтальная активность	128,6±9,3	127,3±9,3	127,4±9,2	127,6±9,5
Вертикальная активность	24,6±2,2	24,3±2,4	24,4±2,1	24,3±2,3

Как видно из представленных данных, достоверных различий в двигательной активности между животными всех экспериментальных групп не наблюдалось.

Тест «сила хватки», позволяющий оценить влияние ЛФ на нервно-мышечную функцию организма, и регистрация болевой чувствительности были проведены до начала эксперимента (фоновые значения) и через 4 недели после

начала введения препарата в возрастающих дозах. Средние значения силы хватки (таблица 3.5.6) колебались от  $(923 \pm 16)$  до  $(928 \pm 18)$  г у самок и от  $(979 \pm 15)$  до  $(986 \pm 18)$  г у самцов; средние значения болевой чувствительности крыс через 4 недели после начала введения препарата (таблица 3.5.7) составляли от  $(5,41 \pm 0,15)$  до  $(5,48 \pm 0,11)$  секунд у самок и от  $(5,44 \pm 0,13)$  до  $(5,53 \pm 0,14)$  секунд у самцов; без выраженных отличий между группами, достоверных зависимостей от дозы не выявлено.

Таблица 3.5.6 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на силу хватки крыс (г,  $M \pm m$ )

Сроки изучения	Экспериментальная группа и пол							
	Контроль		24 мг/кг		260 мг/кг		500 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Фон	770 $\pm$ 15	725 $\pm$ 18	768 $\pm$ 12	729 $\pm$ 17	765 $\pm$ 15	721 $\pm$ 18	778 $\pm$ 16	731 $\pm$ 17
4 недели	981 $\pm$ 17	926 $\pm$ 16	979 $\pm$ 15	924 $\pm$ 16	985 $\pm$ 19	923 $\pm$ 16	986 $\pm$ 18	928 $\pm$ 18

Таблица 3.5.7 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на болевую чувствительность крыс (секунд,  $M \pm m$ )

Сроки изучения	Экспериментальная группа и пол							
	Контроль		24 мг/кг		260 мг/кг		500 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Фон	4,53 $\pm$ 0,12	4,39 $\pm$ 0,13	4,60 $\pm$ 0,15	4,37 $\pm$ 0,14	4,52 $\pm$ 0,13	4,42 $\pm$ 0,13	4,56 $\pm$ 0,15	4,36 $\pm$ 0,13
4 недели	5,49 $\pm$ 0,12	5,41 $\pm$ 0,15	5,53 $\pm$ 0,14	5,43 $\pm$ 0,15	5,44 $\pm$ 0,13	5,45 $\pm$ 0,12	5,51 $\pm$ 0,14	5,48 $\pm$ 0,11

Полученные результаты подтверждают отсутствие негативного влияния исследуемого препарата даже при применении в высоких дозах на нервную проводимость и функции головного мозга. Это особенно важно в связи с тем, что в проведении нервного импульса участвует альфа-2-макроглобулин, частично сходный по структуре с С3, С4 компонентами комплемента [210]. Таким образом, можно заключить, что фармакологическая активность разрабатываемого антитела к неопределяемому С3 компонента комплемента ограничивается воздействием на

систему комплемента и не влияет на изученные проявления функций головного мозга и центральной нервной системы.

Кроме того, было изучено влияние ЛФ антитела hC34 на дыхательную функцию экспериментальных животных, а именно на частоту дыхательных движений, которая регулируется дыхательным центром, расположенным в головном мозге. Регистрация частоты дыхательных движений была проведена до начала эксперимента (фоновые значения) и через 4 недели после начала введения препарата, результаты представлены в таблице 3.5.8.

Таблица 3.5.8 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на частоту дыхательных движений белых крыс (дых. движений/мин,  $M \pm m$ )

Сроки изучения	Экспериментальная группа и пол							
	Контроль		24 мг/кг		260 мг/кг		500 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Фон	113±3	113±3	114±3	115±4	113±3	113±3	112±4	115±2
4 недели	114±2	115±3	115±3	114±3	115±2	114±3	114±3	114±3

Приведенные результаты говорят об отсутствии значимого воздействия 30-дневного введения ЛФ на частоту дыхательных движений крыс, что также косвенно может свидетельствовать об отсутствии негативного воздействия ЛФ на дыхательный центр.

С целью изучения влияния ЛФ на работу сердца и сердечно-сосудистой системы (ССС) в целом была проведена оценка таких параметров ССС, как частота сердечных сокращений, параметры электрокардиограммы (ЭКГ) и артериальное давление до начала эксперимента (фоновые значения) и через 4 недели после начала введения препарата. Никаких достоверных эффектов ЛФ на параметры кардиограммы экспериментальных животных отмечено не было (данные не показаны). Частота сердечных сокращений также не менялась (таблица 3.5.9). Средние значения систолического артериального давления колебались от (120±2) до (123±3) мм рт.ст., без достоверных различий между группами (как по полу, так и по применяемому препарату и его дозировке), что

подтверждает отсутствие влияния гормонального фона на безопасность препарата.

Таблица 3.5.9 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на частоту сердечных сокращений белых крыс (ударов/минуту,  $M \pm m$ )

Сроки изучения	Экспериментальная группа и пол							
	Контроль		24 мг/кг		260 мг/кг		500 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Фон	416±8	425±7	418±8	428±7	417±8	428±8	418±7	429±9
4 недели	419±7	426±8	420±6	427±8	419±6	426±7	416±7	425±8

Система комплемента является одной из важнейших полифункциональных систем организма, относящейся к неспецифическим факторам резистентности (система врожденного иммунитета) [211]. Кроме того, система комплемента тесно связана с системой свертывания крови, фибринолиза, кининовой системой [212]. Постоянная, неконтролируемая и избыточная активация комплемента вызывает хроническую активацию тромбоцитов, лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Известно, что одним из системных проявлений заболеваний, обусловленных нарушением регуляции системы комплемента, являются тромботические микроангиопатии – патологические состояния, характеризующиеся тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией [213]. Поэтому особенно важно было изучить влияние разработанного антитела на состав периферической крови и показатели миелограммы экспериментальных животных.

Гематологическое исследование было проведено после 30 дней ежедневного введения ЛФ изучаемого препарата у животных всех групп. Подсчет субпопуляций лейкоцитов, проведенный на мазках крови, а также результаты анализа крови, полученные с помощью гематологического анализатора, представлены в таблице 3.5.10.

Таблица 3.5.10 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на показатели периферической крови белых крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
<b>30 сутки, самцы</b>				
Количество лейкоцитов (WBC), $10^9/\text{л}$	8,28±0,40	8,24±0,46	7,57±0,61	8,14±0,45
Количество эритроцитов (RBC), $10^{12}/\text{л}$	9,02±0,32	8,84±0,16	9,90±0,34	8,78±0,20
Концентрация гемоглобина (HGB), г/л	152,6±3,3	149,0±3,3	147,5±3,3	159,4±4,4
Гематокрит (HCT), %	57,84±1,73	56,29±1,52	58,35±1,64	59,62±1,27
Средний объем эритроц. (MCV), фл	61,1±0,9	63,3±1,0	61,8±1,0	62,9±0,9
Средн. содерж. гемоглоб. в эритроц. (MCH), пг	16,9±0,3	17,0±0,4	16,2±0,3	17,5±0,3
Ср. концентрация гемоглобина в эритроц. (MCHC), г/дл	265,0±11,1	257,3±0,5	248,2±13,5	237,6±9,7
Широта распределения эритроцитов (RDWc), %	15,7±0,2	16,3±0,3	16,6±0,4	16,0±0,1
Кол-во тромбоцитов (PLT), $10^9/\text{л}$	492,0±32,8	523,6±11,7	439,4±29,1	464,4±31,9
Средний объем тромбоцита (MPV), фл	6,5±0,3	6,3±0,2	6,5±0,2	6,5±0,1
Тромбокрит, (PCT), %	0,27±0,03	0,39±0,05	0,30±0,05	0,33±0,05
Широта распределения тромбоцитов (PDWc), %	31,6±0,3	31,3±0,4	30,9±0,4	31,0±0,3
Нейтрофилы, $10^9/\text{л}$	2,48±0,28	2,42±0,2	2,11±0,27	2,29±0,24
Базофилы, $10^9/\text{л}$	0	0	0	0
Эозинофилы, $10^9/\text{л}$	0	0	0	0
Моноциты, $10^9/\text{л}$	0,39±0,22	0,56±0,18	0,44±0,10	0,60±0,23
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	5,41±0,47	5,25±0,36	5,02±0,53	5,25±0,35
<b>30 сутки, самки</b>				
Количество лейкоцитов (WBC), $10^9/\text{л}$	7,77±0,42	8,15±0,44	8,22±0,41	7,83±0,44
Количество эритроцитов (RBC), $10^{12}/\text{л}$	8,24±0,33	9,06±0,25	8,41±0,38	8,63±0,25
Концентрация гемоглобина (HGB), г/л	151,4±3,9	145,9±3,3	162,7±4,1	155,4±4,0
Гематокрит (HCT), %	56,23±1,63	56,64±1,54	59,90±1,06	56,98±1,28
Средний объем эритроц. (MCV), фл	64,1±0,8	65,1±0,9	62,5±0,8	65,3±1,0

Продолжение таблицы 3.5.10

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
Средн. содерж. гемоглоб. в эритроц. (MCH), пг	17,1±0,3	16,3±0,4	17,0±0,4	16,8±0,4
Ср. концентрация гемоглобина в эритроц. (MCHC), г/дл	250,8±9,9	243,6±9,7	251,4±8,2	229,8±8,5
Ширина распределения эритроцитов (RDWc), %	15,7±0,2	15,3±0,1	15,1±0,3	16,1±0,2
Кол-во тромбоцитов (PLT), 10 <sup>9</sup> /л	528,2±26,5	543,5±10,2	532,3±23,8	518,2±6,8
Средний объем тромбоцита (MPV), фл	6,6±0,3	6,8±0,2	6,8±0,2	6,8±0,2
Тромбокрит, (PCT), %	0,28±0,07	0,15±0,03	0,42±0,03	0,38±0,02
Ширина распределения тромбоцитов (PDWc), %	29,8±0,3	30,5±0,4	29,4±0,1	29,0±0,4
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	2,22±0,26	2,07±0,08	2,45±0,19	2,27±0,14
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0	0	0	0
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0	0	0	0
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,56±0,12	0,54±0,16	0,36±0,10	0,47±0,12
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	4,99±0,41	5,54±0,36	5,41±0,31	5,09±0,44

Представленные данные говорят о том, что ежедневное введение ЛФ в дозах от 24 до 500 мг/кг в течение 30 дней не оказало достоверных воздействий на состав периферической крови крыс.

Анализ миелограммы был проведен на 30-й день эксперимента по ежедневному введению ЛФ в дозах от 24 до 500 мг/кг. Подсчет абсолютного числа клеток костного мозга с использованием гематологического анализатора показал, что введение ЛФ не оказывает достоверного воздействия на состояние красного костного мозга экспериментальных животных (таблица 3.5.11).



Таблица 3.5.11 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на показатели миелограммы белых крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
<b>30 сутки, самцы</b>				
Кол-во клеток в 1 мл пунктата (бедре), $\times 10^6$	182,4 $\pm$ 5,5	173,5 $\pm$ 4,9	172,9 $\pm$ 4,9	181,6 $\pm$ 4,9
Недифференцированные бласты, %	0,20 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,07	0,09 $\pm$ 0,04
Эритробласты и Прозэритробласты, %	0,78 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,15	0,69 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,21
Базофильные эритробласты, %	9,01 $\pm$ 0,65	8,69 $\pm$ 0,69	8,31 $\pm$ 0,69	8,53 $\pm$ 0,67
Полихроматофильные эритробласты, %	12,96 $\pm$ 0,39	12,51 $\pm$ 0,86	11,86 $\pm$ 0,64	12,63 $\pm$ 0,86
Эозинофильные эритробласты, %	13,94 $\pm$ 0,79	14,13 $\pm$ 0,74	14,07 $\pm$ 0,85	14,39 $\pm$ 1,14
Миелобласты, %	1,06 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 0,16	0,99 $\pm$ 0,09
Промиелоциты, %	2,32 $\pm$ 0,32	2,68 $\pm$ 0,26	2,25 $\pm$ 0,36	2,65 $\pm$ 0,39
Миелоциты, %	4,84 $\pm$ 0,38	4,06 $\pm$ 0,18	4,58 $\pm$ 0,49	4,21 $\pm$ 0,09
Метамиелоциты, %	4,20 $\pm$ 0,44	4,02 $\pm$ 0,34	3,80 $\pm$ 0,27	4,38 $\pm$ 0,25
Палочкоядерные нейтрофилы, %	6,78 $\pm$ 0,74	7,90 $\pm$ 0,57	8,13 $\pm$ 0,63	8,27 $\pm$ 0,57
Сегментоядерные нейтрофилы, %	12,49 $\pm$ 0,92	12,93 $\pm$ 0,74	13,02 $\pm$ 1,17	12,10 $\pm$ 0,78
Эозинофилы, %	1,91 $\pm$ 0,11	2,27 $\pm$ 0,15	2,16 $\pm$ 0,12	2,06 $\pm$ 0,22
Базофилы, %	1,21 $\pm$ 0,29	0,73 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,07	1,28 $\pm$ 0,11
Лимфоциты и лимфобласты, %	18,92 $\pm$ 1,03	17,74 $\pm$ 0,97	18,55 $\pm$ 0,76	17,52 $\pm$ 0,74
Плазматические кл, %	1,26 $\pm$ 0,25	1,52 $\pm$ 0,05	1,58 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,24
Моноциты и монобласты, %	9,11 $\pm$ 0,42	8,88 $\pm$ 0,34	8,68 $\pm$ 0,31	8,81 $\pm$ 0,29
Мегакариоциты и -бласты, %	0,07 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,04
<b>30 сутки, самки</b>				
Кол-во клеток в 1 мл пунктата (бедре), $\times 10^6$	179,4 $\pm$ 4,9	178,8 $\pm$ 5,6	171,9 $\pm$ 4,9	176,9 $\pm$ 5,6

Продолжение таблицы 3.5.11

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
Недифференцированные бласты, %	0,11±0,04	0,25±0,06	0,21±0,08	0,10±0,04
Эритробласты и Проэритробласты, %	1,27±0,08	1,34±0,25	0,87±0,21	1,07±0,12
Базофильные эритробласты, %	8,32±0,80	9,41±0,71	8,39±0,61	8,41±0,60
Полихроматофильные эритробласты, %	11,91±0,78	11,76±0,49	13,11±0,86	11,76±0,54
Эозинофильные эритробласты, %	14,35±0,82	13,49±0,64	13,11±0,62	13,45±0,37
Миелобласты, %	0,85±0,19	1,15±0,05	0,81±0,16	1,07±0,06
Промиелоциты, %	1,86±0,29	2,04±0,16	2,44±0,13	2,37±0,13
Миелоциты, %	4,43±0,23	4,04±0,19	4,82±0,11	4,52±0,38
Метамиелоциты, %	4,06±0,40	4,17±0,20	3,68±0,15	4,35±0,34
Палочкоядерные нейтрофилы, %	7,95±0,34	8,01±0,63	7,50±0,33	7,80±0,40
Сегментоядерные нейтрофилы, %	12,74±0,82	13,01±0,83	13,86±0,90	13,17±0,77
Эозинофилы, %	2,01±0,16	1,67±0,43	2,23±0,15	2,30±0,13
Базофилы, %	1,00±0,39	1,15±0,16	0,44±0,06	0,69±0,13
Лимфоциты и лимфобласты, %	18,74±0,61	17,86±0,70	18,50±1,06	18,35±0,96
Плазматические кл, %	0,94±0,09	1,13±0,16	1,17±0,10	1,23±0,13
Моноциты и монобласты, %	9,36±0,39	9,42±0,18	8,79±0,48	9,28±0,39
Мегакариоциты и бласты, %	0,10±0,05	0,10±0,03	0,07±0,03	0,08±0,03

Таким образом, разработанный препарат не влияет на количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, то есть не оказывает воздействия на противомикробную функцию системы комплемента, что подтверждает механизм действия антитела hC34 – избирательную блокировку альтернативного пути активации комплемента. Также антитело не влияет на количество эритроцитов, тромбоцитов и распределение форменных элементов в костном

мозге, что может говорить о том, что препарат не вмешивается во внутреннюю систему регуляции комплемента, в частности не влияет на содержание нативных ингибиторов системы комплемента, дисбаланс которых может вызывать описанные выше нарушения системы крови.

Чтобы оценить влияние ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на функциональную активность печени и почек, был проведен биохимический анализ крови и анализ мочи экспериментальных животных. Результаты биохимического анализа крови, проведенного после 30 дней ежедневного введения ЛФ антитела, представлены в таблице 3.5.12. Анализ полученных данных не выявил достоверного воздействия ЛФ на биохимические показатели крови экспериментальных животных.

Таблица 3.5.12 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на биохимические показатели сыворотки крови белых крыс (M±m)

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
<b>30 сутки, самцы</b>				
Общий белок, г/л	70,8±3,5	70,4±3,4	71,0±3,6	70,6±3,4
Глюкоза, ммоль/л	6,5±0,2	6,4±0,3	6,5±0,2	6,4±0,3
АлАТ, ЕД/л	64,5±3,3	65,0±2,9	64,8±3,3	64,3±2,9
АсАТ, ЕД/л	185,6±8,4	185,3±8,4	185,3±8,4	185,2±7,9
ЩФ, ЕД/л	270,4±21,7	271,1±22,0	270,1±21,6	270,5±21,5
Креатинин, мкмоль/л	52,9±1,4	53,2±1,2	52,7±1,3	52,9±1,5
Холестерин, ммоль/л	1,60±0,12	1,59±0,14	1,59±0,12	1,59±0,12
Билирубин общий, мкмоль/л	10,6±0,2	10,7±0,3	10,3±0,3	10,7±0,2
Мочевина, ммоль/л	7,0±0,2	7,1±0,2	6,9±0,2	6,9±0,3
Протромбиновое время, с	21,6±0,7	22,4±0,8	22,5±0,7	21,2±0,8
<b>30 сутки, самки</b>				
Общий белок, г/л	71,2±3,6	71,4±3,7	70,8±3,7	71,3±3,6
Глюкоза, ммоль/л	6,5±0,2	6,6±0,3	6,4±0,3	6,5±0,2
АлАТ, ЕД/л	65,2±3,2	65,8±3,2	64,7±3,2	65,0±3,5
АсАТ, ЕД/л	185,4±8,5	185,8±8,3	184,9±8,2	185,6±8,0

Продолжение таблицы 3.5.12

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
ЩФ, ЕД/л	270,9±21,6	270,5±22,1	270,3±22,4	271,2±22,1
Креатинин, мкмоль/л	52,9±1,5	53,2±1,2	52,4±1,4	53,4±1,3
Холестерин, ммоль/л	1,60±0,11	1,58±0,13	1,58±0,14	1,59±0,13
Билирубин общий, мкмоль/л	10,5±0,2	10,6±0,3	10,8±0,2	10,7±0,2
Мочевина, ммоль/л	7,0±0,3	7,1±0,3	7,1±0,2	6,9±0,2
Протромбиновое время, с	21,5±0,7	22,5±0,6	21,5±0,7	21,7±0,8

В анализе мочи экспериментальных животных, проведенном на 30-й день эксперимента, не выявлено наличия билирубина, уробилиногена, кетоновых тел, глюкозы, нитритов, эритроцитов и лейкоцитов, что свидетельствует об отсутствии влияния препарата на функции почек даже в дозе, значительно превышающей терапевтическую. По остальным показателям анализа мочи, представленным в таблице 3.5.13, не выявлено каких-либо различий между контрольной группой, получавшей физиологический раствор, и опытными группами, получавшими ЛФ.

Таблица 3.5.13 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на анализ мочи белых крыс (M±m)

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
<b>Фон, самцы</b>				
Кол-во выведенной мочи, мл	13,0±0,9	13,2±0,9	13,3±0,8	12,9±0,9
Белок, г/л	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1
pH	6,8±0,1	6,7±0,2	6,6±0,2	6,7±0,2
Удельная плотность, г/мл	1,026±0,001	1,028±0,001	1,027±0,001	1,028±0,001
Цвет	От светло-желтого до желтого			
Прозрачность	Прозрачная			
<b>30 сутки, самцы</b>				
Кол-во выведенной мочи, мл	12,9±0,8	13,3±0,9	13,5±1,0	13,1±0,7

Продолжение таблицы 3.5.13

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	24 мг/кг	260 мг/кг	500 мг/кг
Белок, г/л	0,3±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,4±0,1
pH	6,6±0,2	6,7±0,2	6,8±0,1	6,7±0,2
Удельная плотность, г/мл	1,028±0,001	1,028±0,001	1,028±0,001	1,029±0,001
Цвет	От светло-желтого до желтого			
Прозрачность	Прозрачная			
<b>Фон, самки</b>				
Кол-во выведенной мочи, мл	12,9±0,7	13,1±1,0	13,2±0,8	13,1±1,2
Белок, г/л	0,3±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1
pH	6,6±0,2	6,7±0,2	6,7±0,2	6,8±0,1
Удельная плотность, г/мл	1,028±0,001	1,028±0,001	1,028±0,001	1,028±0,001
Цвет	От светло-желтого до желтого			
Прозрачность	Прозрачная			
<b>30 сутки, самки</b>				
Кол-во выведенной мочи, мл	12,9±0,8	13,4±0,9	13,4±0,9	13,1±1,0
Белок, г/л	0,4±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1
pH	6,7±0,2	6,8±0,1	6,7±0,2	6,7±0,2
Удельная плотность, г/мл	1,027±0,001	1,028±0,001	1,029±0,001	1,028±0,001
Цвет	От светло-желтого до желтого			
Прозрачность	Прозрачная			

Таким образом, по результатам лабораторных исследований, не было выявлено воздействия ЛФ препарата на клинические и биохимические показатели крови, а также на показатели анализа мочи, что говорит об отсутствии негативного влияния препарата на функцию печени, почек и систему кроветворения.

На 30-й день эксперимента выполняли патоморфологическое исследование для животных всех экспериментальных групп, получавших ЛФ или физиологический раствор. В описании результатов патоморфологического анализа приведена усредненная картина, характерная для животных всех

экспериментальных групп. Патогистологическое исследование было проведено с использованием образцов тканей, полученных от животных, которым вводили ЛФ в максимальной дозе - 500 мг/кг, а также для образцов тканей от животных контрольной группы. Помимо визуального исследования, в эксперименте было проведено взвешивание внутренних органов животных всех экспериментальных групп и рассчитаны их массовые коэффициенты относительно общей массы тела.

В результате проведенного патоморфологического и патогистологического исследования показано, что разработанный препарат не оказывает негативного воздействия на головной мозг экспериментальных животных. Оболочка головного мозга гладкая, прозрачная, тонкая. Мозг обычной плотности, гладкий на разрезе. На фронтальных разрезах мозга отчетливо выделяются серое и белое вещество. Желудочки мозга обычной величины, расширений нет. Конфигурация мозга анатомически правильная. Цитоархитектоника коры больших полушарий не нарушена. Сосуды мозговых оболочек не изменены, умеренно полнокровны. Деструктивных изменений, признаков глиоза, воспалительной инфильтрации не выявлено. Нейроны без признаков дистрофических изменений. Средние значения массовых коэффициентов (МК) головного мозга крыс ( $M \pm m$ ;  $n=10$ ), самцов и самок, колебались от  $(7,3 \pm 0,2)$  до  $(7,5 \pm 0,3)$  без достоверных различий между группами. Отсутствие достоверных изменений в показателях массы головного мозга свидетельствует о том, что при преодолении гематоэнцефалического барьера разработанные антитела не приводят к развитию воспалительных, аутоиммунных и нейродегенеративных процессов.

Не выявлено патологического влияния антитела hC34 на иммунокомпетентные органы (тимус, селезенка). Селезенка имеет вытянутую форму, темно-вишневого цвета, умеренно плотной консистенции. Поверхность органа гладкая, блестящая, капсула тонкая. Фолликулярная структура селезенки сохранена. Кровенаполнение умеренное. Лимфатические фолликулы средней величины. Стенки центральных артерий фолликулов без патологических изменений. Подчелюстные лимфатические узлы не увеличены, овальной формы, бледно-розового цвета с гладкой поверхностью, поверхность разреза однородной

окраски. Тимус треугольной формы, беловатого цвета, умеренно плотной консистенции, размер без изменений. Тимус имеет выраженное дольчатое строение. Граница между корковым и мозговым веществом отчетливая. Средние значения МК селезенки и тимуса крыс обоего пола составили от  $(4,4 \pm 0,3)$  до  $(4,5 \pm 0,2)$  и от  $(1,28 \pm 0,05)$  до  $(1,32 \pm 0,05)$ , соответственно, без достоверных различий между группами.

Выведение лекарственного вещества из организма не создает дополнительной нагрузки на функции печени и почек даже в очень высоких дозах (в 125 раз превосходящих терапевтическую дозу для человека). Печень имеет округлую форму, не увеличена. Поверхность печени гладкая, однородной темно-красной окраски, капсула тонкая, прозрачная. Ткань печени на разрезе полнокровная, умеренно плотная. Трабекулярное строение печени сохранено. Кровенаполнение умеренное. Гепатоциты без признаков дистрофических изменений. Портальная зона не расширена, признаков воспаления и склероза не выявлено. Средние значения МК печени колебались от  $(37,8 \pm 0,4)$  до  $(38,3 \pm 0,5)$  у самок и от  $(38,4 \pm 0,6)$  до  $(38,9 \pm 0,5)$  у самцов без выраженных отличий между группами, достоверных зависимостей от дозы не выявлено. Почки не увеличены: после продольного рассечения их половинки совмещаются. Поверхность почек коричневатого цвета, гладкая, капсула легко снимается. На разрезе органа хорошо видны границы коркового и мозгового вещества. Кровоизлияния отсутствуют. Гистологическая картина почек соответствует норме. Средние значения МК почек крыс, самцов и самок, составили от  $(5,4 \pm 0,3)$  до  $(5,5 \pm 0,3)$  без достоверных различий между группами.

Об отсутствии нежелательных аутоиммунных реакций, способствующих развитию микротромбозов и дегенерации тканей, свидетельствует и отсутствие изменений в сердце. Интима аорты гладкая, блестящая, беловатого цвета, диаметр не изменен. Сердечная сорочка гладкая, тонкая, в ее полости нет жидкости. Сердце свободно лежит в полости сердечной сорочки. Величина и форма сердца не изменены. Левый желудочек сокращен, правый желудочек содержит незначительное количество темной жидкой крови. Клапаны сердца тонкие,

блестящие, гладкие. Эпикард и эндокард блестящие, гладкие. Мышца сердца при разрезе коричневого цвета, умеренно плотная. Сердечная мышца демонстрирует нормальное строение. Сосуды умеренно полнокровны. Поперечная исчерченность миофибрилл сохранена. Дистрофических изменений ядер и кардиомиоцитов не выявлено. Средние значения МК сердца крыс обоего пола составили от  $(4,4 \pm 0,3)$  до  $(4,6 \pm 0,2)$  без достоверных различий между группами.

Патологических изменений также не было выявлено во внешнем виде и структуре всех остальных органов экспериментальных животных, а именно легких, органов желудочно-кишечного тракта, щитовидной и поджелудочной желез, надпочечников, половых желез. Отсутствие достоверных различий по массовым коэффициентам органов между всеми экспериментальными группами говорит о том, что разработанный препарат не приводит к развитию воспаления, гипертрофии, патологической пролиферации, отека внутренних органов.

На основании проведенного патогистологического исследования можно заключить, что хроническое введение изучаемого препарата в дозах, в десятки и сотни раз превосходящих терапевтическую дозу для человека, не вызывает воспаления или деструкции тканей в месте введения, а также не приводит к развитию дистрофических, деструктивных и прочих патологических изменений в органах и тканях экспериментальных животных. Таким образом, ежедневное в течение 30 дней внутривенное введение ЛФ изучаемого препарата в дозе 500 мг/кг не вызывает патогистологических изменений внутренних органов.

Таким образом, оценка системного влияния лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на организм экспериментальных животных по результатам патоморфологического и патогистологического исследований не выявила негативного воздействия на структуру головного мозга, иммунокомпетентные органы, выделительную систему, даже при использовании очень высоких доз препарата (до 125 терапевтических доз), что является косвенным подтверждением высокой специфичности разрабатываемого антитела к целевому лиганду и отсутствия перекрестных реакций с другими белками.



На основании результатов хронического эксперимента был рассчитан индекс безопасности (ИБ) изученной ЛФ при клиническом применении в соответствии с инструкцией Т.А.Гуськовой [214]: крысы – доза 500 мг/кг; длительность введения – 30 дней, гибели нет. Расчетный безопасный курс (РБК) препарата в днях равен:

$$\text{РБК} = \frac{500 \text{ мг/кг} \times 30}{4 \text{ мг/кг} \times 5.9} = 636 \text{ дней,}$$

а индекс безопасности (ИБ) для трехмесячного терапевтического курса составляет:

$$\text{ИБ} = \frac{636}{30} = 21$$

В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения (ИБ > 5) изученная ЛФ относится к III классу малотоксичных лекарственных препаратов (таблица 3.5.14).

Таблица 3.5.14 - Классы токсичности (опасности) лекарственных препаратов для клинического применения по Т.А.Гуськовой

Классы токсичности	Значение ИБ
I класс (высокотоксичные)	(ИБ < 1)
II класс (умеренно токсичные)	(ИБ от 1 до 5)
III класс (малотоксичные)	(ИБ > 5)

Таким образом, изучение хронической токсичности ЛФ рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 на крысах показало, что дозы препарата до 500 мг/кг (в 125 раз превосходящие терапевтическую дозу для человека) при ежедневном введении в течение 30 дней не токсичны для лабораторных животных, в частности не вызывают гибели и симптомов интоксикации у животных, не оказывают негативного воздействия на обменные процессы в организме, нервную проводимость и функции головного мозга, работу сердца и сердечно-сосудистой системы, функцию печени, почек и систему кроветворения, что говорит о высокой безопасности изученного препарата при длительном

применении. В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения, ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 имеет индекс безопасности более 5 и относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов.

### 3.5.3 Изучение аллергенности и иммунотоксичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

Моноклональные антитела представляют собой большие молекулы, предназначенные для связывания со специфическими мишенями, часто экспрессируемыми в иммунной системе, и для лечения различных иммунопатологических состояний. Таким образом, можно считать, что МАТ обладают высоким потенциалом иммунотоксичности, что отражено в накопленном клиническом опыте в отношении вызываемых МАТ побочных эффектов, связанных с иммуносупрессией, иммуностимуляцией и гиперчувствительностью (иммуногенностью) [215]. Известно, что проявление нежелательной иммуногенности лекарственных препаратов на основе моноклональных антител является значительной проблемой в случае их длительного использования, особенно в лечении больных с тяжелыми хроническими заболеваниями (онкологическими, воспалительными ревматическими, инфекционными, аллергическими, сердечно-сосудистыми и др.) [216].

Кроме того, сами разработанные антитела hC34 являются ингибиторами системы комплемента, которая, как уже было сказано выше, относится к системе врожденного иммунитета. Поэтому в рамках данной диссертационной работы необходимо было оценить также потенциальное влияние ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на функциональную активность иммунной системы лабораторных животных, а именно его иммунотоксические и аллергизирующие свойства.

#### 3.5.3.1 Аллергизирующее действие

Аллергизирующее действие ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 изучали в реакциях общей анафилаксии у морских свинок,

активной кожной анафилаксии и гиперчувствительности замедленного типа у мышей.

Оценку реакции общей анафилаксии проводили в индексах по Weigle (данные не показаны). У всех экспериментальных животных, как контрольных, так и сенсibilизированных изучаемой ЛФ в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, реакцию общей анафилаксии оценили как нулевую (0 - шок не развился, патологические признаки отсутствуют), то есть какие-либо проявления анафилактического шока полностью отсутствовали.

Результаты оценки реакции активной кожной анафилаксии на мышах приведены в таблице 3.5.15.

Таблица 3.5.15 - Оценка реакции активной кожной анафилаксии у мышей после сенсibilизации ЛФ (приведены диаметры пятен в мм)

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

Поскольку ни у одного животного размер цветного пятна, образовавшегося на месте введения разрешающей дозы препарата, не превысил 3 мм, на основании полученных данных можно заключить, что у животных, сенсibilизированных ЛФ в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, активная кожная анафилаксия в ответ на введение разрешающей дозы препарата не развивалась.

Индексы изменения массы лапы, рассчитанные на основании данных, полученных при постановке реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у мышей, приведены на рисунке 3.5.1. Каких-либо статистически

достоверных различий в индексах массы лапы между группами обнаружено не было, что говорит об отсутствии реакции ГЗТ в ответ на изучаемую ЛФ.

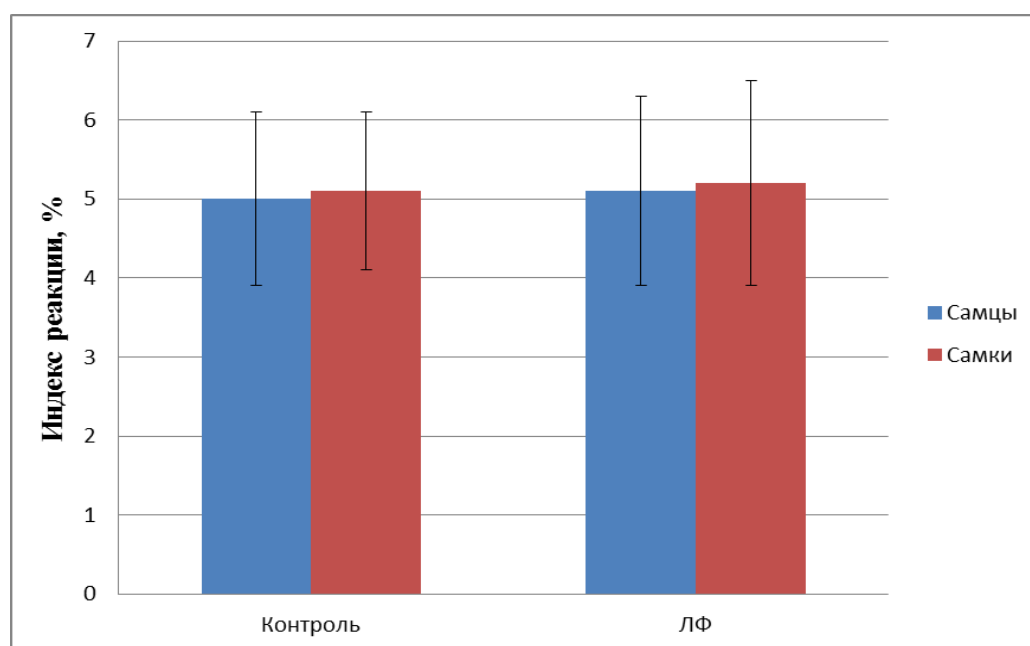


Рисунок 3.5.1 - Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей после сенсibilизации ЛФ

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

#### 3.5.3.2 Иммунотоксическое действие

Иммунотоксичность ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 оценивали по влиянию на гуморальный иммунный ответ (по антителообразованию у экспериментальных животных в ответ на введение модельного антигена), клеточный иммунный ответ (в реакции гиперчувствительности замедленного типа) и активность фагоцитов.

Введение ЛФ в дозах 25 и 250 мг/кг в течение 7 дней не оказало статистически значимого воздействия на количество антителообразующих клеток

в селезенке мышей гибридов  $F_1$  (СВА x С57В1/6), образующихся в ответ на введение эритроцитов барана. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.5.2. На основании представленных данных можно заключить, что изученные дозы препарата не оказывали негативного воздействия на развитие гуморального иммунного ответа.

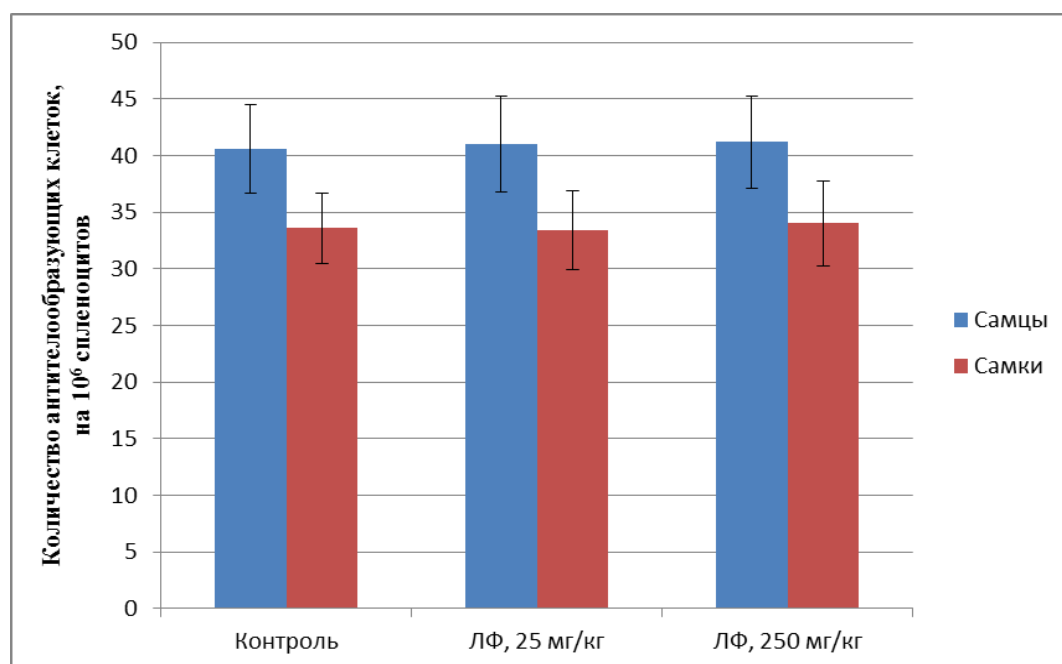


Рисунок 3.5.2 - Влияние ЛФ на число антителообразующих клеток (на  $10^6$  спленоцитов) в селезенке мышей  $F_1$  (СВА x С57В1/6)

Анализ результатов оценки реакции ГЗТ на мышах показал, что 7-дневное введение ЛФ в дозах 25 и 250 мг/кг не оказало какого-либо значимого воздействия на развитие реакции ГЗТ к эритроцитам барана у мышей гибридов  $F_1$  (СВА x С57В1/6). Выраженная реакция ГЗТ развивалась во всех экспериментальных группах, индексы реакции приведены на рисунке 3.5.3. Таким образом, было показано, что изученные дозы препарата не оказывают значимого угнетающего воздействия на развитие клеточного иммунного ответа.

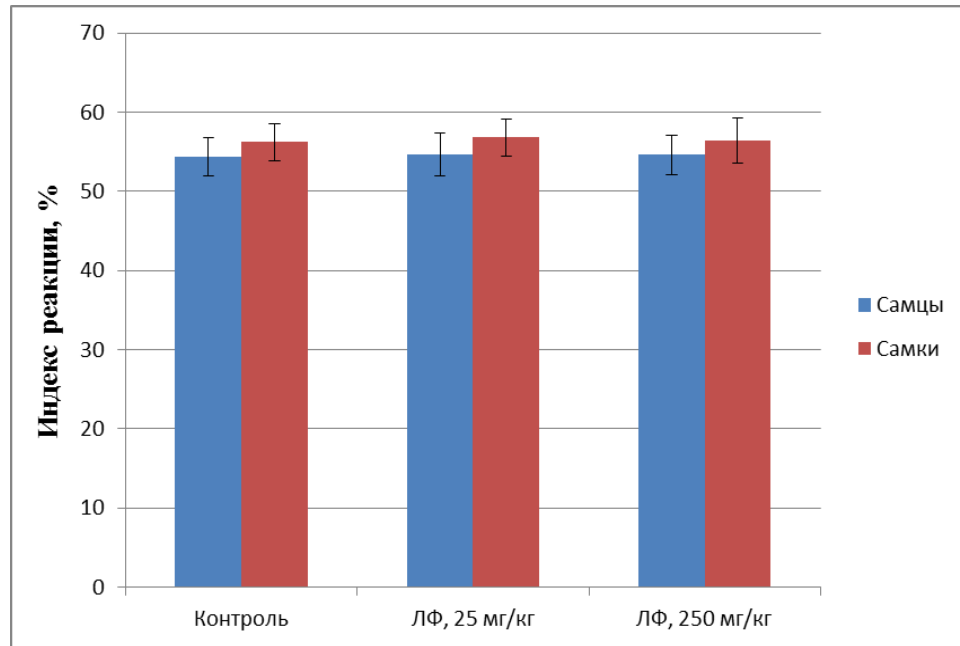


Рисунок 3.5.3 – Влияние ЛФ на развитие гиперчувствительности замедленного типа у мышей  $F_1$  (СВА х С57В1/6)

Анализ результатов оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов показал, что 7-дневное введение ЛФ в дозах 25 и 250 мг/кг не оказывало какого-либо статистически достоверного воздействия на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов у мышей гибридов  $F_1$  (СВА х С57В1/6), данные приведены на рисунках 3.5.4-3.5.5.

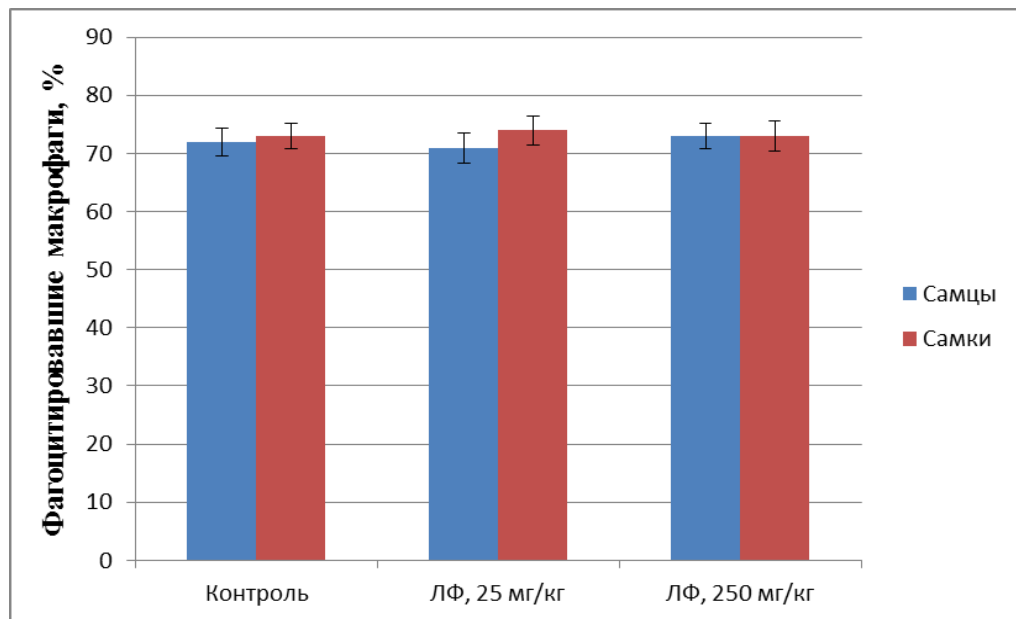


Рисунок 3.5.4 – Влияние ЛФ на содержание фагоцитировавших макрофагов (%)

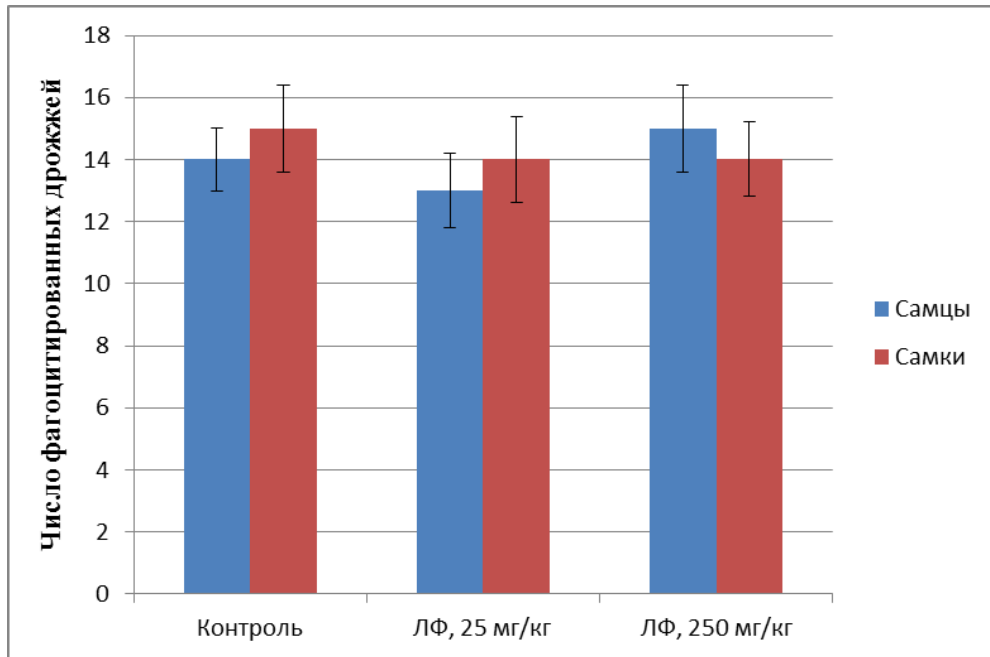


Рисунок 3.5.5 – Влияние ЛФ на число фагоцитированных дрожжей

Исходя из результатов эксперимента, можно сделать вывод, что изученные дозы препарата не оказывают угнетающего воздействия на фагоцитарную активность макрофагов.

Таким образом, изучение развития иммунного ответа после введения лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 показало, что препарат в дозах, многократно превышающих предполагаемую терапевтическую дозу для человека, 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Итоги работы.** В рамках диссертационной работы проведено экспериментальное исследование рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к недетерминанте C3 компонента комплемента человека с целью обоснования подхода к лечению травматического повреждения головного мозга, основанного на блокировании активации комплемента.

Проведено изучение механизма действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 *in vitro*. В экспериментах *in vitro* в гемолитическом тесте и по ингибированию продукции C3a и C5a показано, что антитело не блокирует классический путь активации комплемента, но блокирует альтернативный путь активации в молярном недостатке по отношению к общему количеству C3 в дозе пробах плазмы крови. Известно, что проблема нейтрализации C3 с помощью терапевтических антител является достаточно трудной, поскольку C3 представляет собой большой мультидоменный белок, концентрация которого в плазме крови составляет около 1 мг/мл, что затрудняет поиск нейтрализующих антител и предусматривает высокие терапевтические дозы [192-198]. Полученные данные свидетельствуют о том, что достаточно нейтрализовать долю молекул C3, участвующих в инициации активации АПК, чтобы практически полностью блокировать гемолитическую активность АПК, за счет чего терапевтическая доза рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 может быть значительно снижена относительно требуемой и не превышает 3,125 мкг/мл плазмы крови.

Использованный в ходе исследования механизма действия *in vitro* метод оценки ингибирования антителом hC34 продукции анафилатоксинов C3a и C5a был положен в основу метода определения специфической активности антитела hC34 – одного из принципиальных показателей, определяющих качество препаратов антител. Согласно разработанной методике, уровень активации комплемента количественно оценивался по концентрации C3a. Методика устанавливает нормативные требования, согласно которым рекомбинантное антитело hC34 должно ингибировать активацию комплемента зимозаном не менее



чем на 90 % в концентрации не более 6,25 мкг/мл плазмы крови человека. В результате определения с помощью разработанной методики специфической (ингибирующей) активности трех опытных образцов лекарственной формы антитела hC34 показано, что проанализированные опытные образцы ингибируют активацию комплемента зимозаном в концентрации 3,125 мкг/мл, что соответствует соотношению антитела к С3, равному 1:64. Таким образом, разработанная методика позволяет получать стабильные результаты и может быть включена в проект нормативной документации на препарат в качестве методики контроля качества специфической активности фармацевтической субстанции и лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.

В рамках исследования механизма действия также производилась оценка специфичности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 по отношению к различным молекулярным формам С3 компонента, которые образуются в результате процессинга этой молекулы, обусловленного активацией комплемента. Полученные данные указывают на то, что неопредетерминанта, специфичная для взаимодействия с антителом hC34, возникает на стадии первичного конформационного перехода С3 в С3(Н<sub>2</sub>О), происходящего при гидролизе тиоэфирной связи, и остается фиксированной на других формах: С3i, С3b и С3c. Полученные данные согласуются с выводом о том, что изученное антитело эффективно блокирует альтернативный путь активации комплемента, поскольку в отличие от классического и лектинового пути активация АП осуществляется за счет постоянно существующего медленного гидролиза тиоэфирной связи С3 компонента, непрерывно циркулирующего в кровотоке [52-53].

Определен релевантный вид животных для проведения доклинических исследований рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 путем изучения видовой кросс-реактивности антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных. Показано, что рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 взаимодействует только с сыворотками крови человека и обезьяны, но не взаимодействует с аналогичными антигенами других

видов млекопитающих, что свидетельствует о видоспецифичности исследуемого антитела. На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что для проведения доклинических исследований рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 релевантным видом животных являются приматы. Аналогичные данные были получены для препарата терапевтических антител к C5 экулизумаб, который с учетом его видовой специфичности был допущен к клиническим исследованиям на основании фармакодинамических исследований, проведенных только *in vitro*, и токсикологических исследований, проведенных на мышах с использованием суррогатного мышинового антитела к C5 мыши [209]. С учетом рекомендаций по доклиническому изучению моноклональных антител, приведенных в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н.Миронова [204], и зарубежной практики, было принято решение доклиническое изучение специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 проводить на примере его аналога - моноклонального антитела 3A8, специфичного C3 компоненту комплемента крысы, которое блокирует альтернативный путь активации комплемента крысы аналогично действию hC34 - в модели травматического поражения головного мозга крысы.

Вторичное повреждение головного мозга после ЧМТ тесно связано с активацией воспалительной реакции. Система комплемента - важная ветвь реакции врожденного иммунитета - является главным координатором посттравматического нейровоспаления и вторичной нейропатологии после ЧМТ [146-150]. После посттравматической активации как внутритканевого, так и системного комплемента, образующиеся в избытке провоспалительные фрагменты - анафилатоксины C3a и C5a - увеличивают проницаемость гематоэнцефалического барьера, способствуют инфильтрации лейкоцитов в поврежденный мозг и последующей генерации свободных радикалов, индуцируют апоптоз нейронов и глии посредством их связывания со

специфическими рецепторами и опосредуют усиленный лизис нейронов через МАС [28,69,150].

В результате проведенных исследований показано, что моноклональное антитело 3А8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы – аналог разрабатываемого рекомбинантного гуманизированного антитела hС34 - обладает фармакологической активностью в модели закрытой черепно-мозговой травмы, что подтверждается функциональным и гистологическим исследованием. Анализ сохранности когнитивных функций экспериментальных животных в методике оценки сохранности УРПИ показал, что введение изучаемого препарата вызывает четкую тенденцию к сохранению памятного следа у животных, перенесших ЗЧМТ.

Известно, что некоторые отделы мозга особенно уязвимы при травматическом повреждении. Удобным объектом для изучения в данном случае является гиппокамп, нейрональная депопуляция которого является одним из критериев тяжести ЧМТ как у человека, так и у экспериментальных животных [217]. В норме области гиппокампа СА1 и СА3 четко выделяются топографически, наблюдается симметричность организации цитоархитектоники пирамидного слоя гиппокампа правого и левого полушарий. Область СА1 образована средними плотно расположенными нейронами, область СА3 состоит из крупных редко расположенных нейронов. Анализ гистологических препаратов показал, что у контрольных животных (не получавших терапии), получивших ЗЧМТ, в областях СА1 и СА3 наблюдаются полиморфные изменения ядер (гипохромия и гиперхромия) нейронов, увеличение количества клеток-«теней», то есть наблюдаются все стадии апоптоза нервных клеток. У животных опытных групп, получавших препарат в дозах 125 и 250 мг/кг, патологические изменения значительно менее выражены. Подсчет соотношения живых и погибающих нейронов показал, что и в области СА1, и в области СА3 гиппокампа наблюдается достоверное увеличение процента живых нейронов в опытной группе животных, получавших препарат в дозе 250 мг/кг, по сравнению с группой животных, получавших препарат в дозе 125 мг/кг, и с контролем.

При ЧМТ у крыс развивается воспаление в головном мозге, о чем свидетельствуют описанные выше результаты. Воспаление может быть вызвано множеством факторов, в том числе оно может быть обусловлено активацией системы комплемента по альтернативному пути. Инициаторами комплемент-зависимого воспаления, главным образом, являются анафилатоксины C3a и C5a, которые являются продуктами активации C3 и C5 компонентов комплемента. Установлено, что блокирование C3 компонента комплемента с помощью антитела 3A8 способствует ограничению активации комплемента, о чем можно судить по уменьшению уровня C3a фрагмента C3 в сывороточных пробах.

Полученные результаты являются показателем того, что блокирование комплемента на уровне C3 компонента оказывает положительное влияние на улучшение функционального состояния животных и снижение показателей воспаления в головном мозге при ЧМТ. Это согласуется с данными, полученными ранее М.А. Rynkowski на модели внутримозгового кровоизлияния у мышей при использовании антагониста C3aR (SB290157). Было показано, что при введении антагониста C3aR за 45 мин до ВМК и через 6 ч после кровоизлияния уменьшались неврологические нарушения, отек и инфильтрация мозга гранулоцитами [169].

Изучение фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на крысах показало, что при введении в дозах 2.5, 5 и 10 мг/животное объем распределения составляет от 2,5 мл до 4 мл и не превышает объем циркулирующей крови. Это указывает на то, что исследуемый препарат в равновесном состоянии остается в кровяном русле. После внутривенного введения препарат очень медленно выводится из организма животных – время полувыведения составляет около суток. Полученные данные согласуются с результатами фармакокинетических исследований экулизумаба на мышах, показавшими, что гуманизированные моноклональные антитела к C5 функционируют в сосудистой системе мышей в течение по крайней мере 48 часов после инъекции [209].

При комплексной оценке эффективности лекарственного препарата необходимо учитывать его системное влияние на организм. Особенно важно это в случае разработки биотехнологических препаратов на основе антител, потенциально способных активировать воспалительные и аутоиммунные реакции, нарушения обменных процессов. Самостоятельная биологическая активность и особенно риск возникновения перекрестных реакций с другими белками человека, частично антигенно идентичными «мишени», может привести к системным нарушениям, которые невозможно предсказать в тестах *in vitro*. В числе органов и систем, потенциально подверженных риску возникновения побочных эффектов при применении лекарственных препаратов на основе рекомбинантных антител – система кроветворения, пищеварительная система, печень, почки, сердце. При этом важно оценить не только проявления токсичности исследуемого препарата, но и последствия его биологической активности. Поэтому в рамках диссертационного исследования была проведена ограниченная оценка профиля безопасности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34, а именно воздействия разработанной ЛФ на системы и органы грызунов (крыс) в остром и хроническом эксперименте, а также потенциальных аллергенных и иммунотоксических свойств препарата.

Изучение острой токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 при внутривенном введении показало, что доза в 2000 мг/кг (в 500 раз превосходящая терапевтическую дозу для человека) не токсична для грызунов (крыс), а именно, не вызывает летальных эффектов и симптомов интоксикации у животных, не оказывает негативного воздействия на жизненно важные органы, обменные процессы в организме и организм в целом, что говорит о низкой токсичности и высокой безопасности изученного препарата при его однократном применении.

В рамках изучения токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 при повторном введении оценивали воздействие препарата на жизненно важные системы и органы по результатам

физиологических, лабораторных исследований, а также патоморфологического и патогистологического исследования.

С учетом того, что разрабатываемый препарат предполагается применять при повреждении головного мозга, необходимо было изучить его влияние на функции этого органа в нормальных условиях, в частности на такие их проявления, как поведенческие реакции, двигательная активность, нервно-мышечная функция и проведение болевой чувствительности. Полученные результаты подтверждают отсутствие негативного влияния исследуемого препарата даже при применении в высоких дозах на нервную проводимость и функции головного мозга. Это особенно важно в связи с тем, что в проведении нервного импульса участвует альфа-2-макроглобулин, частично сходный по структуре с C3, C4 компонентами комплемента [210]. Таким образом, можно заключить, что фармакологическая активность разрабатываемого антитела к неопределяемому C3 компонента комплемента ограничивается воздействием на систему комплемента и не влияет на изученные проявления функций головного мозга и центральной нервной системы.

Система комплемента является одной из важнейших полифункциональных систем организма, относящейся к неспецифическим факторам резистентности (система врожденного иммунитета) [211]. Кроме того, система комплемента тесно связана с системой свертывания крови, фибринолиза, кининовой системой [212]. Постоянная, неконтролируемая и избыточная активация комплемента вызывает хроническую активацию тромбоцитов, лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Известно, что одним из системных проявлений заболеваний, обусловленных нарушением регуляции системы комплемента, являются тромботические микроангиопатии – патологические состояния, характеризующиеся тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией [213]. Поэтому необходимо было изучить влияние разработанного антитела на состав периферической крови и показатели миелограммы экспериментальных животных. Показано, что разработанный препарат не влияет на количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, то есть не оказывает воздействия на

противоинфекционную функцию системы комплемента, что подтверждает механизм действия антитела hC34 – избирательную блокировку альтернативного пути активации комплемента. Также антитело не влияет на количество эритроцитов, тромбоцитов и распределение форменных элементов в костном мозге, что может говорить о том, что препарат не вмешивается во внутреннюю систему регуляции комплемента, в частности не влияет на содержание нативных ингибиторов системы комплемента, дисбаланс которых может вызывать описанные выше нарушения системы крови. По результатам лабораторных исследований не было выявлено воздействия ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на клинические и биохимические показатели крови, а также на показатели анализа мочи, что говорит об отсутствии негативного влияния препарата на функцию печени, почек и систему кроветворения.

Оценка системного влияния лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на организм экспериментальных животных по результатам патоморфологического и патогистологического исследований не выявила негативного воздействия на структуру головного мозга, иммунокомпетентные органы, выделительную систему, даже при использовании очень высоких доз препарата (до 125 терапевтических доз), что является косвенным подтверждением высокой специфичности разрабатываемого антитела к целевому лиганду и отсутствия перекрестных реакций с другими белками.

Таким образом, изучение хронической токсичности ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на крысах показало, что дозы препарата до 500 мг/кг (в 125 раз превосходящие терапевтическую дозу для человека) при ежедневном введении в течение 30 дней не токсичны для лабораторных животных, в частности не вызывают гибели и симптомов интоксикации у животных, не оказывают негативного воздействия на обменные процессы в организме, нервную проводимость и функции головного мозга, работу сердца и сердечно-сосудистой системы, функцию печени, почек и систему кроветворения, что говорит о высокой безопасности изученного препарата при длительном

применении. В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения, ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 имеет индекс безопасности более 5 и относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов.

Считается, что моноклональные антитела обладают высоким потенциалом иммунотоксичности, что отражено в накопленном клиническом опыте в отношении вызываемых МАТ побочных эффектов, связанных с иммуносупрессией, иммуностимуляцией и гиперчувствительностью (иммуногенностью) [215]. Кроме того, сами разработанные антитела hC34 являются ингибиторами системы комплемента, которая, как уже было сказано выше, относится к системе врожденного иммунитета. Поэтому в рамках данной диссертационной работы необходимо было оценить также потенциальное влияние ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на функциональную активность иммунной системы лабораторных животных, а именно его иммунотоксические и аллергизирующие свойства.

Аллергизирующее действие ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 изучали в реакциях общей анафилаксии у морских свинок, активной кожной анафилаксии и гиперчувствительности замедленного типа у мышей. Иммунотоксичность ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 оценивали по влиянию на гуморальный иммунный ответ (по антителообразованию у экспериментальных животных в ответ на введение модельного антигена), клеточный иммунный ответ (в реакции гиперчувствительности замедленного типа) и активность фагоцитов.

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 сенсibiliзирует 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 терапевтическую дозу для человека, 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.

Данные экспериментального изучения острой и хронической токсичности, а также аллергенности и иммунотоксичности лекарственной формы инновационного рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 получены впервые и ранее в литературе не описывались. Созданный лекарственный препарат, по результатам проведенных исследований, относится к малоопасным лекарственным препаратам.

**Перспективы дальнейшей разработки темы, рекомендации.** В целом, полученные результаты проведенного экспериментального исследования рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека при травматическом повреждении головного мозга позволяют рекомендовать его для проведения дальнейших исследований с целью подтверждения специфической фармакологической активности на релевантном виде животных (приматы) и последующих клинических испытаний.

Кроме того, существуют перспективы дальнейшей разработки темы в части исследования специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека на модели ишемического инсульта.

## ВЫВОДЫ

1. В экспериментах *in vitro* показано, что антитело hC34 не блокирует классический путь активации комплемента и блокирует альтернативный путь активации в молярном недостатке по отношению к общему количеству C3 в пробах плазмы крови.

2. Методом плазмонного резонанса установлено, что участок связывания с антителом hC34 локализован на формах C3i, C3b и C3c.

3. Аналог рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 – моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы – обладает фармакологической активностью в модели закрытой черепно-мозговой травмы, выражающейся в четкой тенденции к сохранению памятного следа у животных, перенесших ЗЧМТ, в тесте оценки сохранности УРПИ, в снижении выраженности гистологической картины ЗЧМТ и достоверном ( $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой) и дозозависимом снижении процента погибших нейронов в гипоталамусе (с 50 % погибших нейронов в области СА3 гиппокампа в контрольной группе до 28 % - в группе животных, получавших препарат в дозе 125 мг/кг, и 20 % - в группе животных, получавших препарат в дозе 250 мг/кг).

4. Фармакокинетика рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 после однократного внутривенного введения крысам лекарственной формы антитела в дозах 2,5, 5 и 10 мг/животное характеризуется следующими основными параметрами: объем распределения - от 2,74 мл до 4,12 мл, период полувыведения - от 15,8 до 30 часов, клиренс – от 0,0023 до 0,0028 мл/мин.

5. Лекарственная форма рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 не оказывает токсического действия на грызунов (крыс) как при однократном внутривенном введении дозы 2000 мг/кг (в 500 раз превосходящей терапевтическую дозу для человека), так и при ежедневном введении (в течение 30 дней) доз до 500 мг/кг (в 125 раз превосходящих терапевтическую дозу для

человека), что позволяет отнести ЛФ к III классу малоопасных лекарственных препаратов (индекс безопасности - более 5).

б. Лекарственная форма рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 не сенсибилизирует экспериментальных животных, не вызывает гиперчувствительности немедленного или замедленного типа, а также в дозах, многократно превышающих предполагаемую терапевтическую дозу для человека, не оказывает негативного воздействия на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа и не подавляет фагоцитарную функцию фагоцитов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- аГУС – атипичный гемолитический синдром
- АП, АПК – альтернативный путь (активации комплемента)
- ВМД – возрастная макулярная дегенерация
- ВМК – внутримозговое кровоотечение
- ГСМБ – гематоспинномозговой барьер
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДКИ – доклинические исследования
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КП – классический путь
- ЛП – лектиновый путь
- ЛПС – липополисахарид
- ЛФ – лекарственная форма
- МАТ – моноклональное антитело
- ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПНГ – пароксизмальная ночная гемоглобинурия
- ППР – поверхностный плазмонный резонанс
- УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
- ФС – фармацевтическая субстанция
- ФР – физиологический раствор
- ЦВЗ – цереброваскулярные заболевания
- ЦНС – центральная нервная система
- ЧМТ – черепно-мозговая травма
- ЭБ – эритроциты барана
- ЭФ – электрофорез
- hC34 – гуманизированное антитело к неопредетерминанте C3 компонента комплемента человека

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Parmar, P. The Stroke Riskometer (TM) App: validation of a data collection tool and stroke risk predictor / P. Parmar, R. Krishnamurthi, M.A. Ikram [et al.] // *Int J Stroke*. – 2015. – Vol.10(2). – P.231-44. DOI: 10.1111/ij.s.12411.
2. Lozano, R. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010 / R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman [et al.] // *Lancet*. – 2012. – Vol.380. – P.2095–128. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.
3. Пирадов М.А. Инсульт. Пошаговая инструкция / М.А. Пирадов, М.Ю. Максимова, М.М. Танащян - М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2019. – 272 с.
4. Sarikaya, H. Stroke prevention—medical and lifestyle measures / H. Sarikaya, J. Ferro, M. Arnold // *Eur Neurol*. – 2015. – Vol.73. – P.150-7. DOI: 10.1159/000367652.
5. National Institute of Neurological Disorders. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke / National Institute of Neurological Disorders, Stroke rt-PA Stroke Study Group // *N Engl J Med*. – 1995. – Vol.333. – P.1581–7. DOI: 10.1056/NEJM199512143332401.
6. Thomalla, G. MRI-guided thrombolysis for stroke with unknown time of onset / G. Thomalla, C.Z. Simonsen, F. Boutitie [et al.] // *N Engl J Med*. – 2018. – Vol.379. – P.611–22. DOI: 10.1056/NEJMoa1804355.
7. Campbell, B.C.V. Tenecteplase versus alteplase before thrombectomy for ischemic stroke / B.C.V. Campbell, P.J. Mitchell, L. Churilov [et al.] // *N Engl J Med*. – 2018. - Vol.378. – P.1573–82. DOI: 10.1056/NEJMoa1716405.
8. Ma, H. Thrombolysis guided by perfusion imaging up to 9 hours after onset of stroke / H. Ma, B.C.V. Campbell, M.W. Parsons [et al.] // *N Engl J Med*. – 2019. – Vol.380. – P.1795–803. DOI: 10.1056/NEJMoa1813046.
9. Goyal, M. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a metaanalysis of individual patient data from five randomised trials / M. Goyal, B.K. Menon, W.H. van Zwam [et al.] // *Lancet*. – 2016. - Vol.387. – P.1723–31. DOI:

10.1016/S0140-6736(16)00163-X.

10. Turk, A.S. III Aspiration thrombectomy versus stent retriever thrombectomy as first-line approach for large vessel occlusion (COMPASS): a multicentre, randomised, open label, blinded outcome, non-inferiority trial / A.S. III Turk, A. Siddiqui, J.T. Fifi [et al.] // *Lancet*. – 2019. - Vol.393. – P.998-1008. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30297-1.

11. Гусев Е.И., Коновалов А.Н., Скворцова В.И. Неврология и нейрохирургия / под ред. Коновалова А.Н., Козлова А.В.: учебник: в 2 т. - т. 2. - М: «ГЭОТАР-Медиа», 2009. – 420 с.

12. Gabbe, B.J. Comparison of mortality following hospitalisation for isolated head injury in England and Wales, and Victoria, Australia / B.J. Gabbe, R.A. Lyons, F.E. Lecky, O. Bouamra, M. Woodford, T.J. Coats, P.A. Cameron // *PLoS One*. – 2011. – Vol.6. - e20545. DOI: 10.1371/journal.pone.0020545.

13. Amor, S. Inflammation in neurodegenerative diseases / S. Amor, F. Puentes, D. Baker, P. van der Valk // *Immunology*. – 2010. – Vol.129. – P.154–169. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x.

14. Francis, K. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement / K. Francis, J. van Beek, C. Canova, J.W. Neal, P. Gasque // *Expert Rev Mol Med*. – 2003. – Vol.5, №15. - P.1-19. DOI: 10.1017/S1462399403006252.

15. Van Beek, J. Expression of receptors for complement anaphylatoxins C3a and C5a following permanent focal cerebral ischemia in the mouse / J. Van Beek, M. Bernaudin, E. Petit, P. Gasque, A. Nouvelot, E.T. MacKenzie, M. Fontaine // *Exp Neurol*. – 2000. – Vol.161, №1. – P.373-382. DOI: 10.1006/exnr.1999.7273.

16. Gasque, P. Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes / P. Gasque, P. Chan, M. Fontaine, A. Ischenko, M. Lamacz, O. Götze, B.P. Morgan // *J Immunol*. – 1995. - Vol.155, №10. – P.4882-4889.

17. Gasque, P. The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis / P. Gasque, S.K. Singhrao,

J.W. Neal, P. Wang, S. Sayah, M. Fontaine, B.P. Morgan // *J Immunol.* – 1998. – Vol.160, №7. – P.3543-3554.

18. Gasque, P. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system / P. Gasque, S.K. Singhrao, J.W. Neal, O. Götze, B.P. Morgan // *Am J Pathol.* – 1997. – Vol.150, №1. – P.31-41.

19. Merle, N.S. Complement system part II: role in immunity / N.S. Merle, R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi, L.T. Roumenina // *Front Immunol.* – 2015. – Vol.6. – P.257. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00257.

20. Shao, S. Complement evasion: an effective strategy that parasites utilize to survive in the host / S. Shao, X. Sun, Y. Chen, B. Zhan, X. Zhu // *Front Microbiol.* – 2019. – Vol.10. – P.532. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00532.

21. Ricklin, D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis / D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, J.D. Lambris // *Nat Immunol.* – 2010. – Vol.11. – P.785–797. DOI: 10.1038/ni.1923.

22. Merle, N.S. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation / N.S. Merle, S.E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, L.T. Roumenina // *Front Immunol.* – 2015. – Vol.6. – P.262. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00262.

23. Alper, C.A. Human C<sub>3</sub>: evidence for the liver as the primary site of synthesis / C.A. Alper, A.M. Johnson, A.G. Birtch, F.D. Moore // *Science.* – 1969. – Vol.163, №3684. – P.286–288. DOI: 10.1126/science.163.3864.286.

24. Morgan, B.P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? / B.P. Morgan, P. Gasque // *Clin Exp Immunol.* – 1997. – Vol.107, №1. – P.1–7. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1997.d01-890.x.

25. Lubbers, R. Production of complement components by cells of the immune system / R. Lubbers, M.F. van Essen, C. van Kooten, L.A. Trouw // *Clin Exp Immunol.* – 2017. – Vol.188, №2. – P.183–194. DOI: 10.1111/cei.12952.

26. Veerhuis, R. Complement in the brain / R. Veerhuis, H.M. Nielsen, A.J. Tenner // *Mol Immunol.* – 2011. – Vol.48. – P.1592–1603. DOI:

10.1016/j.molimm.2011.04.003.

27. Singhrao, S.K. Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis / S.K. Singhrao, J.W. Neal, N.K. Rushmere, B.P. Morgan, P. Gasque // *Am J Pathol.* – 2000. – Vol.157, №3. – P.905–918. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64604-4.

28. Orsini, F. Versatility of the complement system in neuroinflammation, neurodegeneration and brain homeostasis / F. Orsini, D. De Blasio, R. Zangari, E.R. Zanier, M.G. De Simoni // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – Vol.8. – P.380. DOI: 10.3389/fncel.2014.00380.

29. Harris, C.L. Expanding horizons in complement drug discovery: challenges and emerging strategies / C.L. Harris // *Semin Immunopathol.* – 2018. – Vol.40. – P.125–40. DOI: 10.1007/s00281-017-0655-8.

30. Reis, E.S. New insights into the immune functions of complement / E.S. Reis, D.C. Mastellos, G. Hajishengallis, J.D. Lambris // *Nat Rev Immunol.* – 2019. – Vol.19, №8. – P.503–516. DOI: 10.1038/s41577-019-0168-x.

31. Lo, M.W. Complement: bridging the innate and adaptive immune systems in sterile inflammation / M.W. Lo, T.M. Woodruff. // *J Leukoc Biol.* – 2020. – Vol.108, №1. – P.339-351. DOI: 10.1002/JLB.3MIR0220-270R.

32. Liszewski, M.K. Complement's hidden arsenal: New insights and novel functions inside the cell / M.K. Liszewski, M. Elvington, H.S. Kulkarni, J.P. Atkinson // *Mol Immunol.* – 2017. – Vol.84. - P.2-9. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.01.004.

33. Bally, I. Identification of the C1q-binding sites of human C1r and C1s: a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement / I. Bally, V. Rossi, T. Lunardi, N.M. Thielens, C. Gaboriaud, G.J. Arlaud // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol.284. – P.19340–8. DOI: 10.1074/jbc.M109.004473.

34. Gaboriaud, C. Deciphering the fine details of C1 assembly and activation mechanisms: “mission impossible”? / C. Gaboriaud, W.L. Ling, N.M. Thielens, I. Bally, V. Rossi // *Front Immunol.* – 2014. – Vol.5. – P.565. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00565.

35. Roumenina, L.T. Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide / L.T. Roumenina, K.T. Popov, S.V.



Bureeva, M. Kojouharova, M. Gadjeva, S. Rabheru, R. Thakrar, A. Kaplunc, U. Kishore // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – Vol.1784. – P.1271–6. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.04.029.

36. Albertí, S. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36 / S. Albertí, G. Marqués, S. Hernández-Allés, X. Rubires, J.M. Tomás, F. Vivanco, V.J. Benedí // *Infect Immun*. – 1996. – Vol.64. – P.4719–25. DOI: 10.1128/iai.64.11.4719-4725.1996.

37. Gaboriaud, C. The human c1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands / C. Gaboriaud, P. Frchet, N.M. Thielens, G.J. Arlaud // *Front Immunol*. – 2011. – Vol.2. – P.92. DOI: 10.3389/fimmu.2011.00092.

38. Nauta, A.J. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation / A.J. Nauta, L.A. Trouw, M.R. Daha, O. Tijms, R. Nieuwland, W.J. Schwaeble, A.R. Gingras, A. Mantovani, E.C. Hack, A. Roos // *Eur J Immunol*. – 2002. – Vol.32. – P.1726–36. DOI: 10.1002/1521-4141(200206)32:6<1726::AID-IMMU1726>3.0.CO;2-R.

39. Païdassi, H. C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition / H. Païdassi, P. Tacnet-Delorme, V. Garlatti, C. Darnault, B. Ghebrehiwet, C. Gaboriaud, G.J. Arlaud, P. Frchet // *J Immunol*. – 2008. – Vol.180, №4. – P.2329–38. DOI: 10.4049/jimmunol.180.4.2329.

40. Païdassi, H. Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition / H. Païdassi, P. Tacnet-Delorme, M. Verneret, C. Gaboriaud, G. Houen, K. Duus, W.L. Ling, G.J. Arlaud, P. Frchet // *J Mol Biol*. – 2011. – Vol.408. – P.277–90. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.02.029.

41. Païdassi, H. The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition / H. Païdassi, P. Tacnet-Delorme, T. Lunardi, G.J. Arlaud, N.M. Thielens, P. Frchet // *FEBS Lett*. – 2008. – Vol.582. – P.3111–6. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.08.001.

42. Tissot, B. Interaction of the C1 complex of complement with sulfated polysaccharide and DNA probed by single molecule fluorescence microscopy / B. Tissot, R. Daniel, C. Place // *Eur J Biochem*. – 2003. – Vol.270. – P.4714–20. DOI:

10.1046/j.1432-1033.2003.03870.x.

43. Terrasse, R. Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein / R. Terrasse, P. Tacnet-Delorme, C. Moriscot, J. Pérard, G. Schoehn, T. Vernet, N.M. Thielens, A.M. Di Guilmi, P. Frchet // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol.287. – P.42620–33. DOI: 10.1074/jbc.M112.423731.

44. Martin, M. Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells / M. Martin, J. Leffler, A.M. Blom // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol.287. – P.33733–44. DOI: 10.1074/jbc.M112.341339.

45. Ogden, C.A. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells / C.A. Ogden, A. deCathelineau, P.R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V.A. Fadok, P.M. Henson // *J Exp Med.* – 2001. – Vol.194. – P.781–95. DOI: 10.1084/jem.194.6.781.

46. Steinø, A. Interaction of C1q with the receptor calreticulin requires a conformational change in C1q / A. Steinø, C.S. Jørgensen, I. Laursen, G. Houen // *Scand J Immunol.* – 2004. – Vol.59. – P.485–95. DOI: 10.1111/j.0300-9475.2004.01425.x.

47. Verneret, M. Relative contribution of c1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis / M. Verneret, P. Tacnet-Delorme, R. Osman, R. Awad, A. Grichine, J.-P. Kleman, P. Frchet // *J Innate Immun.* – 2014. – Vol.6. - P.426–34. DOI: 10.1159/000358834.

48. Kishore, U. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q / U. Kishore, R. Ghai, T.J. Greenhough, A.K. Shrive, D.M. Bonifati, M.G. Gadjeva, P. Waters, M.S. Kojouharova, T. Chakraborty, A. Agrawal // *Immunol Lett.* – 2004. – Vol.95. – P.113–28. DOI: 10.1016/j.imlet.2004.06.015.

49. Héja, D. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2 / D. Héja, A. Kocsis, J. Dobó, K. Szilágyi, R. Szász, P. Závodszy, G. Pál, P. Gál // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – Vol.109, №26. - P.10498–10503. DOI:

10.1073/pnas.1202588109.

50. Dobó, J. Be on target: strategies of targeting alternative and lectin pathway components in complement-mediated diseases / J. Dobó, A. Kocsis, P. Gál // *Front Immunol.* – 2018. – Vol.9. – P.1851. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01851.

51. Rawal, N. Formation of high affinity C5 convertase of the classical pathway of complement / N. Rawal, M.K. Pangburn // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol.278. – P.38476–38483. DOI: 10.1074/jbc.M307017200.

52. Pangburn, M.K. Spontaneous reformation of the intramolecular thioester in complement protein C3 and low temperature capture of a conformational intermediate capable of reformation / M.K. Pangburn // *J Biol Chem.* – 1992. – Vol.267. – P.8584–8590. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)42483-0.

53. Chen, Z.A. Structure of Complement C3(H<sub>2</sub>O) Revealed By Quantitative Cross-Linking/Mass Spectrometry And Modeling / Z.A. Chen, R. Pellarin, L. Fischer, A. Sali, M. Nilges, P.N. Barlow, J. Rappsilber // *Mol Cell Proteomics.* – 2016. – Vol.15, №8. – P.2730-2743. DOI: 10.1074/mcp.M115.056473.

54. Law, S.K. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4 / S.K. Law, A.W. Dodds // *Protein Sci.* – 1997. – Vol.6. – P.263–74. DOI: 10.1002/pro.5560060201.

55. Kouser, L. Properdin and factor h: opposing players on the alternative complement pathway “see-saw” / L. Kouser, M. Abdul-Aziz, A. Nayak, C.M. Stover, R.B. Sim, U. Kishore // *Front Immunol.* – 2013. – Vol.4. – P.93. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00093.

56. Schwaeble, W. Properdin, a positive regulator of complement activation, is expressed in human T cell lines and peripheral blood T cells / W. Schwaeble, W.G. Dippold, M.K. Schäfer, H. Pohla, D. Jonas, B. Luttig, E. Weihe, H.P. Huemer, M.P. Dierich, K.B.M. Reid // *J Immunol.* - 1993. – Vol.151. – P.2521–8.

57. Schwaeble, W. Expression of properdin in human monocytes / W. Schwaeble, H.P. Huemer, J. Möst, M.P. Dierich, M. Ströbel, C. Claus, B. Kenneth, M. Reid, H.W.L. Ziegler-Heitbrock // *Eur J Biochem.* – 1994. – Vol.219. – P.759–64. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18555.x.

58. Hourcade, D.E. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement / D.E. Hourcade // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol.281. – P.2128–32. DOI: 10.1074/jbc.M508928200.
59. Fearon, D.T. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase / D.T. Fearon, K.F. Austen // *J Exp Med.* – 1975. – Vol.142. – P.856–63. DOI: 10.1084/jem.142.4.856.
60. Parker, C.L. Role of the human C8 subunits in complement-mediated bacterial killing: evidence that C8 gamma is not essential / C.L. Parker, J.M. Sodetz // *Mol Immunol.* – 2002. - Vol.39. – P.453–458. DOI: 10.1016/S0161-5890(02)00121-9.
61. Lachmann, P.J. The amplification loop of the complement pathways / P.J. Lachmann // *Adv Immunol.* – 2009. – Vol.104. – P.115–49. DOI: 10.1016/S0065-2776(08)04004-2.
62. Harboe, M. The alternative complement pathway revisited / M. Harboe, T.E. Mollnes // *J Cell Mol Med.* – 2008. – Vol.12, №4. – P.1074–1084. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00350.x.
63. Walport, M.J. Complement / M.J. Walport // *N Engl J Med.* – 2001. – Vol.344. – P.1058–1066. DOI: 10.1056/NEJM200104053441406.
64. Sánchez-Corral, P. Functional analysis in serum from atypical hemolytic uremic syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H / P. Sánchez-Corral, C. González-Rubio, S. Rodríguez de Córdoba, M. López-Trascasa // *Mol Immunol.* – 2004. – Vol.41. – P.81–4. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.01.003.
65. Marinozzi, M.C. Complement factor B mutations in atypical hemolytic uremic syndrome-disease-relevant or benign? / M.C. Marinozzi, L. Vergoz, T. Rybkine, S. Ngo, S. Bettoni, A. Pashov, M. Cayla, F. Tabarin, M. Jablonski, C. Hue, R.J. Smith, M. Noris, L. Halbwachs-Mecarelli, R. Donadelli, V. Fremeaux-Bacchi, L.T. Roumenina // *J Am Soc Nephrol.* – 2014. – Vol.25. – P.2053–65. DOI: 10.1681/ASN.2013070796.
66. Malina, M. Genetics of hemolytic uremic syndromes / M. Malina, L.T. Roumenina, T. Seeman, M. Le Quintrec, M.-A. Dragon-Durey, F. Schaefer, V. Fremeaux-Bacchi // *Presse Méd.* – 2012. – Vol.41, №3. – P.e105–14. DOI:

10.1016/j.lpm.2011.10.028.

67. Noris, M. Atypical hemolytic-uremic syndrome / M. Noris, G. Remuzzi // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol.361. – P.1676–87. DOI: 10.1056/NEJMra0902814.

68. Gasque, P. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS / P. Gasque, Y.D. Dean, E.P. McGreal, J. VanBeek, B.P. Morgan // *Immunopharmacology.* - 2000. – Vol.49. – P.171–186. DOI: 10.1016/S0162-3109(00)80302-1.

69. Brennan, F.H. Complement activation in the injured central nervous system: another dual-edged sword? / F.H. Brennan, A.J. Anderson, S.M. Taylor, T.M. Woodruff, M.J. Ruitenber // *J Neuroinflammation.* – 2012. – Vol.9. – P.137. DOI: 10.1186/1742-2094-9-137.

70. Gasque, P. Expression of complement components of the alternative pathway by glioma cell lines / P. Gasque, N. Julien, A.M. Ischenko, C. Picot, C. Mauger, C. Chauzy, J. Ripoche, M. Fontaine // *J Immunol.* – 1992. – Vol.149. – P.1381–1387.

71. Gasque, P. Complement regulatory protein expression by a human oligodendrocyte cell line: cytokine regulation and comparison with astrocytes / P. Gasque, B.P. Morgan // *Immunology.* - 1996. – Vol.89. – P.338–347. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-756.x.

72. Yang, C. Expression of decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 in the human astrogloma cell line, D54-MG, and primary rat astrocytes / C. Yang, J.L. Jones, S.R. Barnum // *J Neuroimmunol.* – 1993. – Vol.47. – P.123–132. DOI: 10.1016/0165-5728(93)90022-Q.

73. Gasque, P. Complement activation on human neuroblastoma cell lines in vitro: route of activation and expression of functional complement regulatory proteins / P. Gasque, A. Thomas, M. Fontaine, B.P. Morgan // *J Neuroimmunol.* – 1996. – Vol.66. – P.29–40. DOI: 10.1016/0165-5728(96)00015-X.

74. Wing, M.G. Oligodendrocytes lack glycolipid anchored proteins which protect them against complement lysis. Restoration of resistance to lysis by incorporation of CD59 / M.G. Wing, J. Zajicek, D.J. Seilly, D.A. Compston, P.J. Lachmann // *Immunology.* – 1992. – Vol.76. – P.140–145.

75. Takafuji, S. Effects of interleukin (IL)-3 and IL-5 on human eosinophil degranulation induced by complement components C3a and C5a / S. Takafuji, K. Tadokoro, K. Ito // *Allergy*. – 1996. – Vol.51. – P.563–568. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1996.tb04669.x.
76. DiScipio, R.G. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo / R.G. DiScipio, P.J. Daffern, M.A. Jagels, D.H. Broide, P. Sriramarao // *J Immunol*. – 1999. – Vol.162. – P.1127–1136.
77. Kretzschmar, T. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a / T. Kretzschmar, A. Jeromin, C. Gietz, W. Bautsch, A. Klos, J. Köhl, G. Rechkemmer, D. Bitter-Suermann // *Eur J Immunol*. – 1993. – Vol.23. – P.558–561. DOI: 10.1002/eji.1830230239.
78. el Lati, S.G. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells / S.G. el Lati, C.A. Dahinden, M.K. Church // *J Invest Dermatol*. – 1994. – Vol.102. – P.803–806. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12378589.
79. Murakami, Y. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages / Y. Murakami, T. Imamichi, S. Nagasawa // *Immunology*. – 1993. – Vol.79. – P.633–638.
80. Elsner, J. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins / J. Elsner, M. Oppermann, W. Czech, A. Kapp // *Blood*. – 1994. – Vol.83, №11. – P.3324–3331. DOI: 10.1182/blood.V83.11.3324.3324.
81. Elsner, J. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils / J. Elsner, M. Oppermann, W. Czech, G. Dobos, E. Schopf, J. Norgauer, A. Kapp // *Eur J Immunol*. – 1994. – Vol.24. – P.518–522. DOI: 10.1002/eji.1830240304.
82. Coulthard, L.G. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth / L.G. Coulthard,

T.M. Woodruff // *J Immunol.* – 2015. – Vol.194. – P.3542–3548. DOI: 10.4049/jimmunol.1403068.

83. Fukuoka, Y. Demonstration of a specific C3a receptor on guinea pig platelets / Y. Fukuoka, T.E. Hugli // *J Immunol.* – 1988. – Vol.140. – P.3496–3501.

84. Fischer, W.H. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response / W.H. Fischer, T.E. Hugli // *J Immunol.* – 1997. – Vol.159. – P.4279–4286.

85. Fischer, W.H. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg) / W.H. Fischer, M.A. Jagels, T.E. Hugli // *J Immunol.* – 1999. – Vol.162. – P.453–459.

86. Ischenko, A. Expression of a functional anaphylatoxin C3a receptor by astrocytes / A. Ischenko, S. Sayah, C. Patte, S. Andreev, P. Gasque, M.T. Schouft, H. Vaudry, M. Fontaine // *J Neurochem.* – 1998. – Vol.71. – P.2487–2496. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062487.x.

87. Klos, A. The role of the anaphylatoxins in health and disease / A. Klos, A.J. Tenner, K.-O. Johswich, R. Rahasson, R.R. Ager, E.S. Reis, J. Köhl // *Mol Immunol.* – 2009. – Vol.46, №14. – P.2753–2766. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.04.027.

88. Aksamit, R.R. Chemotaxis by mouse macrophage cell lines / R.R. Aksamit, W. Falk, E.J. Leonard // *J Immunol.* – 1981. – Vol.126. – P.2194–2199.

89. Ehrenguber, M.U. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst / M.U. Ehrenguber, T. Geiser, D.A. Deranleau // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol.346. – P.181–184. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00463-3.

90. Ottonello, L. rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues / L. Ottonello, A. Corcione, G. Tortolina, I. Airoidi, E. Albesiano, A. Favre, R. D'Agostino, F. Malavasi, V. Pistoia, F. Dallegri // *J Immunol.* - 1999. – Vol.162. – P.6510–6517.

91. Nataf, S. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to

C5a / S. Nataf, N. Davoust, R.S. Ames, S.R. Barnum // *J Immunol.* – 1999. – Vol.162. – P.4018–4023.

92. Lett-Brown, M.A. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a / M.A. Lett-Brown, E.J. Leonard // *J Immunol.* – 1977. – Vol.118. – P.815–818.

93. Hartmann, K. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells / K. Hartmann, B.M. Henz, S. Kruger-Krasagakes, J. Köhl, R. Burger, S. Guhl, I. Haase, U. Lippert, T. Zuberbier // *Blood.* – 1997. – Vol.89. – P.2863–2870. DOI: 10.1182/blood.V89.8.2863.

94. Schartz, N.D. The good, the bad, and the opportunities of the complement system in neurodegenerative disease / N.D. Schartz, A.J. Tenner // *J Neuroinflammation.* – 2020. – Vol.17. – P.354. DOI: 10.1186/s12974-020-02024-8.

95. Guo, R.F. Role of C5a in inflammatory responses / R.F. Guo, P.A. Ward // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol.23. – P.821–852. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835.

96. Mukherjee, P. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of caspase 3 / P. Mukherjee, G.M. Pasinetti // *J Neurochem.* – 2001. – Vol.77. – P.43–49. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00167.x.

97. Brennan, F.H. The complement receptor C5aR controls acute inflammation and astrogliosis following spinal cord injury / F.H. Brennan, R. Gordon, H.W. Lao, P.J. Biggins, S.M. Taylor, R.J.M. Franklin, T.M. Woodruff, M.J. Ruitenber // *J Neurosci.* – 2015. – Vol.35. – P.6517–6531. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5218-14.2015.

98. Ramaglia, V. The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration / V. Ramaglia, R.H. King, M. Nourallah, R. Wolterman, R. de Jonge, M. Ramkema, M.A. Vigar, S. van der Wetering, B.P. Morgan, D. Troost, F. Baas // *J Neurosci.* – 2007. – Vol.27. – P.7663–7672. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5623-06.2007.

99. Huber-Lang, M. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway / M. Huber-Lang, J.V. Sarma, F.S. Zetoune, D.



Rittirsch, T.A. Neff, S.R. McGuire, J.D. Lambris, R.L. Warner, M.A. Flierl, L.M. Hoesel, F. Gebhard, J.G. Younger, S.M. Drouin, R.A. Wetsel, P.A. Ward // *Nat Med.* – 2006. – Vol.12. – P.682–687. DOI: 10.1038/nm1419.

100. Adamson, J. Is stroke the most common cause of disability? / J. Adamson, A. Beswick, S. Ebrahim // *J Stroke Cerebrovasc Dis.* – 2004. – Vol.13. – P.171–177. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2004.06.003.

101. Feigin, V.L. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century / V.L. Feigin, C.M. Lawes, D.A. Bennett, C.S. Anderson // *Lancet Neurol.* – 2003. – Vol.2. – P.43–53. DOI: 10.1016/S1474-4422(03)00266-7.

102. Deb, P. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis / P. Deb, S. Sharma, K.M. Hassan // *Pathophysiology.* – 2010. – Vol.17. – P.197–218. DOI: 10.1016/j.pathophys.2009.12.001.

103. Pedersen, E.D. In situ deposition of complement in human acute brain ischaemia / E.D. Pedersen, E.M. Loberg, E. Vege, M.R. Daha, J. Mæhlen, T.E. Mollnes // *Scand J Immunol.* – 2009. – Vol.69. – P.555–562. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02253.x.

104. Szeplaki, G. Strong complement activation after acute ischemic stroke is associated with unfavorable outcomes / G. Szeplaki, R. Szegedi, K. Hirschberg, T. Gombos, L. Varga, I. Karádi, L. Entz, Z. Széplaki, P. Garred, Z. Prohászka, G. Füst // *Atherosclerosis.* – 2009. – Vol.204. – P.315–320. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.044.

105. Mocco, J. Alterations in plasma complement levels after human ischemic stroke / J. Mocco, D.A. Wilson, R.J. Komotar, M.E. Sughrue, K. Coates, R.L. Sacco, M.S.V. Elkind, E.S. Connolly Jr. // *Neurosurgery.* – 2006. – Vol.59. – P.28–33 (discussion 28–33). DOI: 10.1227/01.NEU.0000219221.14280.65.

106. Tsakanova, G. Serine proteases of the complement lectin pathway and their genetic variations in ischaemic stroke / G. Tsakanova, A. Stepanyan, K. Nahapetyan, R.B. Sim, A. Arakelyan, A. Boyajyan // *J Clin Pathol.* – 2018. – Vol.71. – P.141–7.

DOI: 10.1136/jclinpath-2017-204403.

107. Fust, G. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke / G. Fust, L. Munthe-Fog, Z. Illes, G. Szeplaki, T. Molnar, G. Pusch, K. Hirschberg, R. Szegedi, Z. Széplaki, Z. Prohászka, M.-O. Skjoedt, P. Garred // *J Neuroinflamm.* – 2011. – Vol.8. – P.185. DOI: 10.1186/1742-2094-8-185.

108. Cervera, A. Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke / A. Cervera, A.M. Planas, C. Justicia, X. Urra, J.C. Jensenius, F. Torres, F. Lozano, A. Chamorro // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol.5. – P.e8433. DOI: 10.1371/journal.pone.0008433.

109. Zhang, Z.G. Prognostic value of mannose-binding lectin: 90-day outcome in patients with acute ischemic stroke / Z.G. Zhang, C. Wang, J. Wang, Z. Zhang, Y.L. Yang, L. Gao, X.-Y. Zhang, T. Chang, G.-D. Gao, L.-H. Li // *Mol Neurobiol.* – 2015. – Vol.51. – P.230–9. DOI: 10.1007/s12035-014-8682-0.

110. Zangari, R. Early ficolin-1 is a sensitive prognostic marker for functional outcome in ischemic stroke / R. Zangari, E.R. Zanier, G. Torgano [et al.] // *J Neuroinflamm.* – 2016. – Vol.13. – P.16. DOI: 10.1186/s12974-016-0481-2.

111. Mack, W.J. Early plasma complement C3a levels correlate with functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage / W.J. Mack, A.F. Ducruet, Z.L. Hickman, M.C. Garrett, E.J. Albert, C.P. Kellner, J. Mocco, E.S. Connolly Jr. // *Neurosurgery.* – 2007. – Vol.61. – P.255–61. DOI: 10.1227/01.NEU.0000255518.96837.8E.

112. Kasuya, H. Activated complement components C3a and C4a in cerebrospinal fluid and plasma following subarachnoid hemorrhage / H. Kasuya, T. Shimizu // *J Neurosurg.* – 1989. – Vol.71, №5, Pt 1. – P.741–6. DOI: 10.3171/jns.1989.71.5.0741.

113. Llull, L. Ficolin 1 levels in patients developing vasospasm and cerebral ischemia after spontaneous subarachnoid hemorrhage / L. Llull, S. Thiel, S. Amaro, A. Cervera, A.M. Planas, A. Chamorro // *Mol Neurobiol.* – 2017. – Vol.54. – P.6572–80.

DOI: 10.1007/s12035-016-0180-0.

114. Mocco, J. Complement component C3 mediates inflammatory injury following focal cerebral ischemia / J. Mocco, W.J. Mack, A.F. Ducruet, S.A. Sosunov, M.E. Sughrue, B.G. Hassid, M.N. Nair, I. Laufer, R.J. Komotar, M. Claire, H. Holland, D.J. Pinsky, E.S. Connolly Jr. // *Circ Res.* - 2006. - Vol.99. - P.209–217. DOI: 10.1161/01.RES.0000232544.90675.42.

115. Ducruet, A.F. C3a receptor modulation of granulocyte infiltration after murine focal cerebral ischemia is reperfusion dependent / A.F. Ducruet, B.G. Hassid, W.J. Mack, S.A. Sosunov, M.L. Otten, D.J. Fusco, Z.L. Hickman, G.H. Kim, R.J. Komotar, J. Mocco, E.S. Connolly Jr. // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 2008. - Vol.28. - P.1048–58. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600608.

116. Ducruet, A.F. The complement cascade as a therapeutic target in intracerebral hemorrhage / A.F. Ducruet, B.E. Zacharia, Z.L. Hickman, B.T. Grobelny, M.L. Yeh, S.A. Sosunov, E.S. Connolly Jr. // *Exp Neurol.* - 2009. - Vol.219. - P.398–403. DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.07.018.

117. Ducruet, A.F. Complement inhibition promotes endogenous neurogenesis and sustained anti-inflammatory neuroprotection following reperfused stroke / A.F. Ducruet, B.E. Zacharia, S.A. Sosunov, P.R. Gigante, M.L. Yeh, J.W. Gorski, M.L. Otten, R.Y. Hwang, P.A. DeRosa, Z.L. Hickman, P. Sergot, E.S. Connolly Jr. // *PLoS One.* - 2012. - Vol.7. - P.e38664. DOI: 10.1371/journal.pone.0038664.

118. Rahpeymai, Y. Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis / Y. Rahpeymai, M.A. Hietala, U. Wilhelmsson, A. Fotheringham, I. Davies, A.K. Nilsson, J. Zwirner, R.A. Wetsel, C. Gerard, M. Pekny, M. Pekna // *EMBO J.* - 2006. - Vol.25. - P.1364-1374. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601004.

119. Ahmad, S. C3a receptor antagonist therapy is protective with or without thrombolysis in murine thromboembolic stroke / S. Ahmad, C. Pandya, A. Kindelin, K. Bhatia, R. Chaudhary, A.K. Dwivedi, J.M. Eschbacher, Q. Liu, M.F. Waters, N. Hoda, A.F. Ducruet // *Br J Pharmacol.* - 2020. - Vol.177. - P.2466–2477. DOI: 10.1111/bph.14989.

120. Mathieu, M.C. The C3a receptor antagonist SB290157 has agonist activity

/ M.C. Mathieu, N. Sawyer, G.M. Greig, M. Hamel, S. Kargman, Y. Ducharme, C.K. Lau, R.W. Friesen, G.P. O'Neill, F.G. Gervais, A.G. Therien // *Immunol Lett.* – 2005. – Vol.100. – P.139–145. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.03.003.

121. Therien, A.G. Agonist activity of the small molecule C3aR ligand SB 290157 / A.G. Therien // *J Immunol.* – 2005. – Vol.174, №12. – P.7479–80. DOI: 10.4049/jimmunol.174.12.7479.

122. Shinjyo, N. Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells / N. Shinjyo, A. Stahlberg, M. Dragunow, M. Pekny, M. Pekna // *Stem Cells.* – 2009. – Vol.27, №11. – P.2824–2832. DOI: 10.1002/stem.225.

123. Stokowska, A. Complement peptide C3a stimulates neural plasticity after experimental brain ischaemia / A. Stokowska, A.L. Atkins, J. Mora'n, T. Pekny, L. Bulmer, M.C. Pascoe, S.R. Barnum, R.A. Wetsel, J.A. Nilsson, M. Dragunow, M. Pekna // *Brain.* – 2017. – Vol.140. – P.353–369. DOI: 10.1093/brain/aww314.

124. Jarlestedt, K. Receptor for complement peptide C3a: a therapeutic target for neonatal hypoxic-ischemic brain injury / K. Jarlestedt, C.I. Rousset, A. Stahlberg, H. Sourkova, A.L. Atkins, C. Thornton, S.R. Barnum, R.A. Wetsel, M. Dragunow, M. Pekny, C. Mallard, H. Hagberg, M. Pekna // *FASEB J.* – 2013. – Vol.27. – P.3797–3804. DOI: 10.1096/fj.13-230011.

125. Wezel, A. Complement factor C5a induces atherosclerotic plaque disruptions / A. Wezel, M.R. de Vries, H.M. Lagraauw, A.C. Foks, J. Kuiper, P.H. Quax, I. Bot // *J Cell Mol Med.* - 2014. – Vol.18. – P.2020-2030. DOI: 10.1111/jcmm.12357.

126. Li, K. Anaphylatoxins in organ transplantation / K. Li, W. Zhou // *Semin Immunol.* - 2013. – Vol.25. – P.20-28. DOI: 10.1016/j.smim.2013.04.013.

127. Mulligan, M.S. C5a-dependent up-regulation in vivo of lung vascular P-selectin / M.S. Mulligan, E. Schmid, G.O. Till, T.E. Hugli, H.P. Friedl, R.A. Roth, P.A. Ward // *J Immunol.* – 1997. – Vol.158. – P.1857-1861.

128. Foreman, K.E. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells / K.E. Foreman, M.M. Glovsky, R.L.

Warner, S.J. Horvath, P.A. Ward // *Inflammation*. – 1996. – Vol.20. – P.1-9. DOI: 10.1007/BF01487740.

129. Pischke, S.E. Complement factor 5 blockade reduces porcine myocardial infarction size and improves immediate cardiac function / S.E. Pischke, A. Gustavsen, H.L. Orrem, K.H. Egge, F. Courivaud, H. Fontenelle, A. Despont, A.K. Bongoni, R. Rieben, T.I. Tønnessen, M.A. Nunn, H. Scott, H. Skulstad, A. Barratt-Due, T.E. Mollnes // *Basic Res Cardiol*. – 2017. – Vol.112. – P.20. DOI: 10.1007/s00395-017-0610-9.

130. Mehta, G. A new approach for the treatment of arthritis in mice with a novel conjugate of an anti-C5aR1 antibody and C5 small interfering RNA / G. Mehta, R.I. Scheinman, V.M. Holers, N.K. Banda // *J Immunol*. – 2015. – Vol.194. – P.5446-5454. DOI: 10.4049/jimmunol.1403012.

131. de Vries, B. Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils / B. de Vries, J. Kohl, W.K. Leclercq, T.G. Wolfs, A.A. van Bijnen, P. Heeringa, W.A. Buurman // *J Immunol*. – 2003. – Vol.170. – P.3883-3889. DOI: 10.4049/jimmunol.170.7.3883.

132. Tuboly, E. C5a inhibitor protects against ischemia/reperfusion injury in rat small intestine / E. Tuboly, M. Futakuchi, G. Varga, D. Erces, T. Tokes, A. Meszaros, J. Kaszaki, M. Suzui, M. Imai, A. Okada, N. Okada, M. Boros, H. Okada // *Microbiol Immunol*. – 2016. – Vol.60. – P.35-46. DOI: 10.1111/1348-0421.12338.

133. Fletcher, M.P. C5a-induced myocardial ischemia: role for CD18-dependent PMN localization and PMN-platelet interactions / M.P. Fletcher, G.L. Stahl, J.C. Longhurst // *Am J Physiol*. – 1993. – Vol.265. – P.H1750-1761. DOI: 10.1152/ajpheart.1993.265.5.h1750.

134. Costa, C. Role of complement component C5 in cerebral ischemia/reperfusion injury / C. Costa, L. Zhao, Y. Shen, X. Su, L. Hao, S.P. Colgan, G.L. Stahl, T. Zhou, Y. Wang // *Brain Res*. – 2006. – Vol.1100. – P.142-151. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.05.029.

135. Garrett, M.C. Synergistic neuroprotective effects of C3a and C5a receptor blockade following intracerebral hemorrhage / M.C. Garrett, M.L. Otten, R.M. Starke,

R.J. Komotar, P. Magotti, J.D. Lambris, M.A. Rynkowski, E.S. Connolly // *Brain Res.* – 2009. – Vol.1298. – P.171-177. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.04.047.

136. Finch, A.M. Low-molecular-weight peptidic and cyclic antagonists of the receptor for the complement factor C5a / A.M. Finch, A.K. Wong, N.J. Paczkowski, S.K. Wadi, D.J. Craik, D.P. Fairlie, S.M. Taylor // *J Med Chem.* – 1999. – Vol.42. – P.1965–1974. DOI: 10.1021/jm9806594.

137. March, D.R. Potent cyclic antagonists of the complement C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Relationships between structures and activity / D.R. March, L.M. Proctor, M.J. Stoermer, R. Sbaglia, G. Abbenante, R.C. Reid, T.M. Woodruff, K. Wadi, N. Paczkowski, J.D.A. Tyndall, S.M. Taylor, D.P. Fairlie // *Mol Pharmacol.* – 2004. – Vol.65. – P.868–879. DOI: 10.1124/mol.65.4.868.

138. Woodruff, T.M. Increased potency of a novel complement factor 5a receptor antagonist in a rat model of inflammatory bowel disease / T.M. Woodruff, S. Pollitt, L.M. Proctor, S.Z. Stocks, H.D. Manthey, H.M. Williams, I.B. Mahadevan, I.A. Shiels, S.M. Taylor // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2005. – Vol.314. – P.811–817. DOI: 10.1124/jpet.105.086835.

139. Arumugam, T.V. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death / T.V. Arumugam, S.C. Tang, J.D. Lathia, A. Cheng, M.R. Mughal, S. Chigurupati, T. Magnus, S.L. Chan, D.-G. Jo, X. Ouyang, D.P. Fairlie, D.N. Granger, A. Vortmeyer, M. Basta, M.P. Mattson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – Vol.104. – P.14104–14109. DOI: 10.1073/pnas.0700506104.

140. Kim, G.H. Protective effect of C5a receptor inhibition after murine reperfused stroke / G.H. Kim, J. Mocco, D.K. Hahn, C.P. Kellner, R.J. Komotar, A.F. Ducruet, W.J. Mack, E.S. Connolly // *Neurosurgery.* – 2008. – Vol.63. – P.122-126. DOI: 10.1227/01.NEU.0000335079.70222.8D.

141. Morgan, M. Pharmacokinetics of a C5a receptor antagonist in the rat after different sites of enteral administration / M. Morgan, A.C. Bulmer, T.M. Woodruff, L.M. Proctor, H.M. Williams, S.Z. Stocks, S. Pollitt, S.M. Taylor, I.A. Shiels // *Eur J Pharm Sci.* – 2008. – Vol.33. – P.390–398. DOI: 10.1016/j.ejps.2008.01.009.

142. Vakeva, A.P. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy / A.P. Vakeva, A. Agah, S.A. Rollins, L.A. Matis, L. Li, G.L. Stahl // *Circulation*. – 1998. – Vol.97. – P.2259-2267. DOI: 10.1161/01.cir.97.22.2259.

143. Pavlovski, D. Generation of complement component C5a by ischemic neurons promotes neuronal apoptosis / D. Pavlovski, J. Thundyil, P.N. Monk, R.A. Wetsel, S.M. Taylor, T.M. Woodruff // *FASEB J*. // 2012. – Vol.26. – P.3680-3690. DOI: 10.1096/fj.11-202382.

144. Mukherjee, P. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through regulation of glutamate receptor subunit 2 in vitro and in vivo / P. Mukherjee, S. Thomas, G.M. Pasinetti // *J Neuroinflammation*. – 2008. – Vol.5. – P.5. DOI: 10.1186/1742-2094-5-5.

145. Persson, M. The complement-derived anaphylatoxin C5a increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake in a TNF-alpha-independent manner / M. Persson, M. Pekna, E. Hansson, L. Ronnback // *Eur J Neurosci*. – 2009. – Vol.29. – P.267-274. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06575.x.

146. Bellander, B.M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury / B.M. Bellander, S.K. Singhrao, M. Ohlsson, P. Mattsson, M. Svensson // *J Neurotrauma*. – 2001. – Vol.18. – P.1295–1311. DOI: 10.1089/08977150152725605.

147. Burk, A.-M. Early complementopathy after multiple injuries in humans / A.-M. Burk, M. Martin, M.A. Flierl, D. Rittirsch, M. Helm, L. Lampl, U. Bruckner, G.L. Stahl, A.M. Blom, M. Perl, F. Gebhard, M. Huber-Lang // *Shock*. – 2012. – Vol.37. – P.348–354. DOI: 10.1097/shk.0b013e3182471795.

148. Leinhase, I. Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and neurological outcome after traumatic brain injury / I. Leinhase, O.I. Schmidt, J.M. Thurman, A.M. Hossini, M. Rozanski, M.E. Taha, A. Scheffler, T. John, W.R. Smith, V.M. Holers, P.F. Stahel // *Exp Neurol*. – 2006. – Vol.199. – P.454–464. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.01.033.

149. Stahel, P.F. Absence of the complement regulatory molecule CD59a leads

to exacerbated neuropathology after traumatic brain injury in mice / P.F. Stahel, M.A. Flierl, B.P. Morgan, I. Persigehl, C. Stoll, C. Conrad, B.M. Touban, W.R. Smith, K. Beauchamp, O.I. Schmidt, W. Ertel, I. Leinhase // *J Neuroinflammation*. – 2009. – Vol.6. – P.2. DOI: 10.1186/1742-2094-6-2.

150. Stahel, P.F. Intrathecal levels of complement-derived soluble membrane attack complex (sC5b-9) correlate with blood-brain barrier dysfunction in patients with traumatic brain injury / P.F. Stahel, M.C. Morganti-Kossmann, D. Perez, C. Redaelli, B. Gloor, O. Trentz, T. Kossmann // *J Neurotrauma*. – 2001. – Vol.18. – P.773–781. DOI: 10.1089/089771501316919139.

151. De Blasio, D. Pharmacological inhibition of mannose-binding lectin ameliorates neurobehavioral dysfunction following experimental traumatic brain injury / D. De Blasio, S. Fumagalli, L. Longhi, F. Orsini, A. Palmioli, M. Stravalaci, G. Vegliante, E.R. Zanier, A. Bernardi, M. Gobbi, M.-G. De Simoni // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2017. – Vol.37. – P.938–950. DOI: 10.1177/0271678x16647397.

152. Longhi, L. Mannose-binding lectin is expressed after clinical and experimental traumatic brain injury and its deletion is protective / L. Longhi, F. Orsini, D. De Blasio, S. Fumagalli, F. Ortolano, M. Locatelli, N. Stocchetti, M.-G. De Simoni // *Crit Care Med*. – 2014. – Vol.42. – P.1910–1918. DOI: 10.1097/ccm.0000000000000399.

153. Longhi, L. C1-inhibitor attenuates neurobehavioral deficits and reduces contusion volume after controlled cortical impact brain injury in mice / L. Longhi, C. Perego, F. Ortolano, E.R. Zanier, P. Bianchi, N. Stocchetti, T.K. McIntosh, M.G. De Simoni // *Crit Care Med*. – 2009. – Vol.37. – P.659–665. doi: 10.1097/ccm.0b013e318195998a.

154. Ruseva, M.M. An anticomplement agent that homes to the damaged brain and promotes recovery after traumatic brain injury in mice / M.M. Ruseva, V. Ramaglia, B.P. Morgan, C.L. Harris // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2015. – Vol.112. – P.14319–14324. DOI: 10.1073/pnas.1513698112.

155. Bellander, B.-M. Activation of the complement cascade and increase of clusterin in the brain following a cortical contusion in the adult rat / B.-M. Bellander, H.



von Holst, P. Fredman, M. Svensson // *J Neurosurg.* – 1996. – Vol.85. – P.468–75. DOI: 10.3171/jns.1996.85.3.0468.

156. Stahel, P.F. The role of the complement system in traumatic brain injury / P.F. Stahel, M.C. Morganti-Kossmann, T. Kossmann // *Brain Res Rev.* – 1998. – Vol.27. – P.243–56. DOI: 10.1016/s0165-0173(98)00015-0.

157. Kossmann, T. Elevated levels of the complement components C3 and factor B in ventricular cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury / T. Kossmann, P.F. Stahel, M.C. Morganti-Kossmann, J.L. Jones, S.R. Barnum // *J Neuroimmunol.* – 1997. – Vol.73. – P.63–9. DOI: 10.1016/s0165-5728(96)00164-6.

158. Alawieh, A. Identifying the role of complement in triggering neuroinflammation after traumatic brain injury / A. Alawieh, E.F. Langley, S. Weber, D. Adkins, S. Tomlinson // *J Neurosci.* - 2018. – P.38, №10. – P.2519- 2532. DOI: 10.1523/jneurosci.2197-17.2018.

159. Lindsberg, P.J. Complement activation in the central nervous system following blood–brain barrier damage in man / P.J. Lindsberg, J. Ohman, T. Lehto, T. Wuorimaa, S. Meri, M.-L. Karjalainen-Lindsberg, A. Paetau, O. Carpén, M. Kaste // *Ann Neurol.* – 1996. – Vol.40. – P.587–596. DOI: 10.1002/ana.410400408.

160. Hua, Y. Complement activation in the brain after experimental intracerebral hemorrhage / Y. Hua, G. Xi, R.F. Keep, J.T. Hoff // *J Neurosurg.* – 2000. – Vol.92. – P.1016–1022. DOI: 10.3171/jns.2000.92.6.1016.

161. You, Z. Reduced tissue damage and improved recovery of motor function after traumatic brain injury in mice deficient in complement component C4 / Z. You, J. Yang, K. Takahashi, P.H. Yager, H.-H. Kim, T. Qin, G.L. Stahl, R.A.B. Ezekowitz, M.C. Carroll, M.J. Whalen // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol.27. – P.1954–1964. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600497.

162. Neher, M.D. Deficiency of complement receptors CR2/CR1 in Cr2(-)/(-) mice reduces the extent of secondary brain damage after closed head injury / M.D. Neher, M.C. Rich, C.N. Keene, S. Weckbach, A.L. Bolden, J.T. Losacco, J. Patane, M.A. Flierl, L. Kulik, V. Holers, P.F. Stahel // *J Neuroinflammation.* – 2004. – Vol.11. – P.95. DOI: 10.1186/1742-2094-11-95.

163. Leinhase, I. Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation / I. Leinhase, V.M. Holers, J.M. Thurman, D. Harhausen, O.I. Schmidt, M. Pietzcker, M.E. Taha, D. Rittirsch, M. Huber-Lang, W.R. Smith, P.A. Ward, P.F. Stahel // *BMC Neurosci.* – 2006. – Vol.7. – P.55. DOI: 10.1186/1471-2202-7-55.

164. Sewell, D.L. Complement C3 and C5 play critical roles in traumatic brain cryoinjury: blocking effects on neutrophil extravasation by C5a receptor antagonist / D.L. Sewell, B. Nacewicz, F. Liu, S. Macvilay, A. Erdei, J.D. Lambris, M. Sandor, Z. Fabry // *J Neuroimmunol.* – 2004. – Vol.155. – P.55–63. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.06.003.

165. Yang, S. The role of complement C3 in intracerebral hemorrhage-induced brain injury / S. Yang, T. Nakamura, Y. Hua, R.F. Keep, J.G. Younger, Y. He, J.T. Hoff, G. Xi // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. – Vol.26. – P.1490–1495. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600305.

166. Hammad, A. The role of the complement system in traumatic brain injury: a review / A. Hammad, L. Westacott, M. Zaben // *J Neuroinflammation.* – 2018. – Vol.15. – P.24. DOI 10.1186/s12974-018-1066-z.

167. Xiong, Y. Animal models of traumatic brain injury / Y. Xiong, A. Mahmood, M. Chopp // *Nat Rev Neurosci.* – 2013. – Vol.14, №2. – P.128–42. DOI: 10.1038/nrn3407.

168. Manley, G.T. Controlled cortical impact in swine: pathophysiology and biomechanics / G.T. Manley, G. Rosenthal, M. Lam, D. Morabito, D. Yan, N. Derugin, A. Bollen, M.M. Knudson, S.S. Panter // *J Neurotrauma.* – 2006. – Vol.23, №2. – P.128–39. DOI: 10.1089/neu.2006.23.128.

169. Rynkowski, M.A. C3a receptor antagonist attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage / M.A. Rynkowski, G.H. Kim, M.C. Garrett, B.E. Zacharia, M.L. Otten, S.A. Sosunov, R.J. Komotar, B.G. Hassid, A.F. Ducruet, J.D. Lambris, E.S. Connolly // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2009. – Vol.29. – P.98–107. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.95.

170. Горбунов, Н.П. Комплемент при патологиях, возможность коррекции

с помощью нового гуманизованного антитела, блокирующего альтернативный путь / Н.П. Горбунов, А.В. Жахов, А.В. Трофимов, К.А. Некрасова, С.В. Родин, Е.А. Атанесян, Е.А. Карабанова, М.С. Захаров, А.С. Симбирцев, А.М. Ищенко // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т.13, №22 (2). – С. 754-756. DOI: 10.31857/S102872210006712-8.

171. Li, G. Neuroprotective effects of argatroban and C5a receptor antagonist (PMX53) following intracerebral haemorrhage / G. Li, R.M. Fan, J.L. Chen, C.-M. Wang, Y.-C. Zeng, C. Han, S. Jiao, X.-P. Xia, W. Chen, S.-T. Yao // Clin Exp Immunol. – 2014. – Vol.175. – P.285–295. DOI: 10.1111/cei.12220.

172. Dmytrijuk, A. FDA report: Eculizumab (Soliris) for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / A. Dmytrijuk, K. Robie-Suh, M.H. Cohen, D. Rieves, K. Weiss, R. Pazdur // Oncologist. – 2008. – Vol.13. – P.993–1000. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0086.

173. US Food and Drug Administration (2015) Soliris (eculizumab) [Электронный ресурс]. Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire. Режим доступа: <https://www.fda.gov/media/79369/download>. Дата обращения: 2.06.2021.

174. European Medicines Agency. Soliris (eculizumab): EU summary of product characteristics [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_\\_Product\\_Information/human/000791/WC500054208.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/000791/WC500054208.pdf). Дата обращения: 2.06.2021.

175. Clinical Trial of BCD-148 and Soliris® for the Treatment of Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04060264?term=BCD-148&draw=2&rank=1>. Дата обращения: 2.06.2021.

176. McKeage, K. Ravulizumab: First Global approval / K. McKeage // Drugs. – 2019. – Vol.79. – P.347–352. DOI: 10.1007/s40265-019-01068-2.

177. Risitano, A.M. Current and future pharmacologic complement inhibitors / A.M. Risitano // Hematol Oncol Clin N Am. – 2015. – Vol.29, №3. – P.561-582. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.01.009.

178. Intravitreal LFG316 in Patients With Age-related Macular Degeneration

(AMD) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01527500?term=LFG316&draw=2&rank=4>. Дата обращения: 2.06.2021.

179. Berglund, M.M. The clinical potential of Affibody-based inhibitors of C5 for therapeutic complement disruption / M.M. Berglund, P. Strömberg // *Expert Rev Proteomics*. – 2016. – Vol.13, №3. – P.241-243. DOI: 10.1586/14789450.2016.1148604.

180. Hill, A. Coversin, a novel C5 complement inhibitor, is safe and effective in the treatment of PNH: results of a phase II clinical trial / A. Hill, W. Weston-Davies, M. Nunn, T. Robak, J. Windyga, A. Hellmann, A.G. Kulasekararaj, A. Piekarska, A. Szmigielska-Kaplon, M. Griffin, T. Munir // *Blood*. – 2017. – Vol.130 (Supplement 1). – P.4747. DOI: 10.1182/blood.V130.Suppl\_1.4747.4747.

181. Leung, E. Update on current and future novel therapies for dry age-related macular degeneration / E. Leung, G. Landa // *Expert Rev Clin Pharmacol*. – 2013. – Vol.6, №5. – P.565–79. DOI: 10.1586/17512433.2013.829645.

182. A Study of ARC1905 (Anti-C5 Aptamer) in Subjects With Dry Age-related Macular Degeneration [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00950638>. Дата обращения: 2.06.2021.

183. Drolet D.W., Zhang C., O’Connell D.J., et al. SOMAmer inhibitors of the complement system. Paper presented at: 7th International Conference on Complement Therapeutics. Olympia, June 6–11, 2014. Aegean Conferences 82, abs 23.

184. Badri, P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of Cemdisiran, an RNAi therapeutic targeting complement component 5, in healthy subjects and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / P. Badri, X. Jiang, A. Borodovsky, N. Najafian, J. Kim, V.A. Clausen, V. Goel, B. Habtemariam, G.J. Robbie // *Clin Pharmacokinet*. – 2021. – Vol.60. – P.365-378 DOI: 10.1007/s40262-020-00940-9.

185. Merkel, P.A. Evaluation of the safety and efficacy of Avacopan, a C5a receptor inhibitor, in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis treated concomitantly with Rituximab or Cyclophosphamide/Azathioprine: protocol for a randomized, double-blind, active-controlled, phase 3 trial / P.A. Merkel, D.R. Jayne, C. Wang, J. Hillson, P. Bekker // *JMIR Res Protoc*. // 2020. – Vol.9, №4. –

P.e16664. DOI: 10.2196/16664.

186. Ricklin, D. Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application / D. Ricklin, J.D. Lambris // *Adv Exp Med Biol.* – 2008. – Vol.632. – P.262-281. DOI: 10.1007/978-0-387-78952-1\_20.

187. Pegcetacoplan (APL-2) in Neovascular AMD [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03465709?term=Apellis&draw=2&rank=1>. Дата обращения: 2.06.2021.

188. Study of Pegcetacoplan (APL-2) Therapy in Patients With Geographic Atrophy [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02503332?term=Apellis&draw=2>. Дата обращения: 2.06.2021.

189. Pilot Study to Assess Safety, Preliminary Efficacy and Pharmacokinetics of S.C. Pegcetacoplan (APL-2) in PNH Subjects [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02588833?term=Apellis&draw=2>. Дата обращения: 2.06.2021.

190. First-In-Human Clinical Study of the C3 Complement Inhibitor AMY-101 in Healthy Male Volunteers [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03316521?term=Compst %D0 %B0tin&draw=2&rank=1>. Дата обращения: 2.06.2021.

191. Safety of Intravitreal POT-4 Therapy for Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration (AMD) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00473928?term=NCT00473928&draw=2&rank=1>. Дата обращения: 2.06.2021.

192. De Winter H., Buysse M.-A., Hack E., inventors. Monoclonal antibody anti-C3-2 directed against the third component of complement (C3) and its use in methods to inhibit complement activation. World patent WO/2004/031240. 2002 Oct 4. EP.

193. Hostetter M.K., Finkel D.J., Cheng Q., Green B.A., Masi A.W., inventors. Human complement C3-degrading polypeptide from *Streptococcus pneumoniae*. World patent WO/2000/017370. 1998 Sep 24. US.

194. Nilsson U.R., Nilsson S.I.B., Svensson K.-E., inventors. Antibody preparation directed against neoantigens in human C3 and use and manufacture thereof. World patent WO/1987/06344. 1986 Apr 11. SE.

195. Basi G.S., Barbour R., inventors. Compositions and methods for treating diseases of protein aggregation involving iC3b deposition. World patent WO/2012/139069. 2011 Apr 7. US.

196. Risitano, A.M. Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / A.M. Risitano, D. Ricklin, Y. Huang, E.S. Reis, H. Chen, P. Ricci, Z. Lin, C. Pascariello, M. Raia, M. Sica, L. Del Vecchio, F. Pane, F. Lupu, R. Notaro, R.R.G. Resuello, R.A. DeAngelis, J.D. Lambris // *Blood*. – 2014. – Vol.123, №13. – P.2094–101. DOI: 10.1182/blood-2013-11-536573.

197. Lindorfer, M.A. A novel approach to preventing the hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: both complement mediated cytolysis and C3 deposition are blocked by a monoclonal antibody specific for the alternative pathway of complement / M.A. Lindorfer, A.W. Pawluczko, E.M. Peek, K. Hickman, R.P. Taylor, C.J. Parker // *Blood*. – 2010. – Vol.115, №11. – P.2283–91. DOI: 10.1182/blood-2009-09-244285.

198. Paixao-Cavalcante, D. A humanized antibody that regulates the alternative pathway convertase: potential for therapy of renal disease associated with nephritic factors / D. Paixao-Cavalcante, E. Torreira, M.A. Lindorfer, S.R. de Cordoba, B.P. Morgan, R.P. Taylor, O. Llorca, C.L. Harris // *J Immunol*. – 2014. – Vol.192, №10. – P.4844–51. DOI: 10.4049/jimmunol.1303131.

199. 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., патент РФ № 2630647, Гуманизированное антитело к конформационному эпитопу C3 компонента комплемента человека, последовательность ДНК (варианты), экспрессионный вектор, содержащий последовательность ДНК (варианты), и штамм клеток яичников китайского хомячка CHO-humC34 – продуцент данного гуманизированного антитела, дата приоритета 27.05.2016.

200. Huang, Y. Evolution of compstatin family as therapeutic complement inhibitors / Y.Huang // Expert Opin Drug Discov. – 2018. – Vol.13. – P.435–44. DOI: 10.1080/17460441.2018.1437139.

201. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики : межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст : введен впервые : дата введения 2015-08-01 / подготовлен ФГУП «ВНИЦСМВ» на основе собственного перевода англоязычной версии международного документа OECD, Guide 1:1998 «Принципы надлежащей лабораторной практики». – Москва : Стандартинформ, 2019. - 16 с.

202. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» : зарегистрирован в Минюсте РФ 15.08.2016 г. : регистрационный № 43232. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/420350679>. Дата обращения: 03.03.2022.

203. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова: в 2 ч. - ч. 1. - М.: «Гриф и К», 2012. - 944 с.

204. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты) / под ред. А.Н. Миронова: в 2 ч. – ч. 2. – М: «Гриф и К», 2012. - 536 с.

205. Каркищенко Н.Н. Фармакокинетика / Н.Н. Каркищенко, В.В. Хоронько, С.А. Сергеева, В.Н. Каркищенко // под ред. Г. И. Должич. - Ростов н/Д: Феникс, 2001. – 381 с.

206. Пиотровский, В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики / В.К Пиотровский // Фармакология и токсикология. – 1986. – Т.49, № 5. – с.118–127.

207. Соловьев В.Н. Фармакокинетика / В.Н. Соловьев, А.А. Фирсов, В.А. Филов - М.: «Медицина», 1980. - 423 с.

208. Weigle, W.O. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in guinea pig and rabbit / W.O. Weigle, C.G. Cochrane, F.J. Dixon // *J.Immunol.* – 1960. – Vol.85. – P.469-477.
209. European Medicines Agency. Soliris (eculizumab): EPAR – Scientific Discussion [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/soliris-epar-scientific-discussion\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/soliris-epar-scientific-discussion_en.pdf). Дата обращения: 13.01.2022.
210. Дорофейков, В.В. Альфа-2-макроглобулин как главный цитокин-связывающий белок плазмы крови / В.В. Дорофейков, Т.С. Фрейдлин, И.Г. Щербак // *Медицинская иммунология.* – 1999. - Т. 1, № 5. – С. 5-12.
211. Тарасова, И.В. Система комплемента / И.В. Тарасова // *Аллергология и иммунология в педиатрии.* – 2010. – № 2 (21). – С. 45-48.
212. Таран, Л.Д. Система комплемента / Л.Д. Таран // *Биохимия.* – 1993. – Т. 58, вып. 5. – С. 780-787.
213. Шилова, Е.Р. Гематологические заболевания и синдромы, обусловленные нарушением регуляции системы комплемента. Современный взгляд на проблему [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://openhematology.ru/wp-content/uploads/2016/04/Шилова-Е.Р.-Гематологические-заболевания-и-синдромы.pdf>. Дата обращения: 22.04.2022.
214. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств - М: «Русский врач», 2003. - с.99-116.
215. Descotes, J. Immunotoxicity of monoclonal antibodies / J. Descotes // *MAbs.* – 2009. - Vol.1, № 2. – P.104-11. DOI: 10.4161/mabs.1.2.7909.
216. Авдеева, Ж.И. Безопасность лекарственных препаратов моноклональных антител, связанная с проявлением их иммуногенности / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, А.А. Солдатов, В.П. Бондарев, В.Д. Мосягин, Н.В. Медуницын // *Иммунология.* – 2015. – Т. 36 (4). – С. 247-256.
217. Smith, D.H. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat / D.H. Smith, X.H. Chen, J.E.S. Pierce [et al.] // *J. Neurotrauma.* - 1997. - Vol.14. - P.715–727.