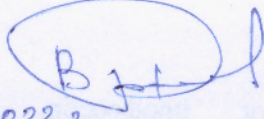


В печать

На правах рукописи

Председатель Диссертационного  
совета 68.1.005.01

18.10.2022 г.



В. А. Баринов

НЕКРАСОВА

Ксения Александровна

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

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства

**Научный руководитель:** **Ищенко Александр Митрофанович**  
кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:** **Шабанов Петр Дмитриевич**  
доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, заведующий отделом нейрофармакологии им. академика С.В. Аничкова  
**Ленская Карина Владимировна**  
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», и. о. заведующего кафедрой фармакологии

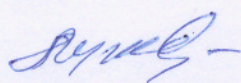
**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 68.1.005.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте (<http://www.toxicology.ru>) Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук,  
профессор



**Луковникова Любовь Владимировна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 [Пирадов М.А. и др., 2019]. К этому следует добавить значительное количество населения, страдающего от черепно-мозговых травм (ЧМТ) [Гусев Е.И. и др., 2009] 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 [Orsini F. et al, 2014].

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 [Dmytrijuk A. et al, 2008; McKeage K., 2019; Risitano A.M., 2015; Berglund M.M. et al, 2016; Hill A. et al, 2017; Leung E. et al, 2013; Drolet D.W. et al, 2014; Badri P. et al, 2021; Merkel P.A. et al, 2020; Ricklin D. et al, 2008].

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 [Dmytrijuk A. et al, 2008]; 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 [McKeage K., 2019].

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. Проводятся исследования нескольких молекул, блокирующих расщепление C5-конвертазой и предотвращающих образование воспалительных молекул C5a и C5b и комплекса литической атаки [Hill A. et al, 2017]. Проводятся клинические испытания III фазы при васкулите, ассоциированном с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, препарата Авакопан (ChemoCentryx) — нового биодоступного при пероральном приеме высокоселективного антагониста C5aR1 человека [Merkel P.A. et al, 2020].

Помимо стратегии ингибирования C5 достаточно активно исследуется стратегия блокирования C3. Один из подходов к нейтрализации C3 связан с использованием препарата Компстатин и его производных [Ricklin D. et al, 2008]. Получены моноклональные антитела к C3 H17, которые распознают фрагменты активированного C3 — C3b/iC3b и эффективно блокируют альтернативный путь активации, прерывая процесс формирования C3-конвертазы [Risitano A.M. et al, 2014, Paixao-Cavalcante D. et al, 2014]. 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 [Картузова В.Е. и др., 2016] 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).

По материалам диссертации опубликовано 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.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава диссертации представляет собой обзор научной литературы, который посвящен ингибированию функции анафилатоксинов комплемента при патологиях центральной нервной системы. Подробно рассмотрены механизмы активации комплемента и опосредованной комплементом патологии центральной нервной системы. Приведены клинические данные, подтверждающие роль системы комплемента в патогенезе инсульта и вторичных повреждений после черепно-мозговой травмы. Рассмотрены результаты исследований специфической активности ингибиторов функции анафилатоксинов комплемента на моделях инсульта и черепно-мозговой травмы *in vivo*. Кратко описано состояние исследований в области разработки лекарственных препаратов, ингибирующих эффекторную функцию системы комплемента.

Во второй главе описаны методы исследования, включающие методики изучения механизма действия *in vitro*, специфической фармакологической активности, фармакокинетики, а также безопасности (острой и хронической токсичности, аллергенности и иммунотоксичности) рекомбинантного гуманизованного антитела hC34. В третьей главе изложены результаты исследований.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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, правил надлежащей лабораторной практики, утвержденных Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г., и руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [Миронов А.Н. и др., 2012].

В исследованиях использовали рекомбинантное гуманизованное антитело hC34, полученное биотехнологическим способом с использованием рекомбинантных технологий на основе клеток-продуцентов CHO-humC34, и лекарственную форму (ЛФ) антитела. Штамм-продуцент, технология выделения и очистки рекомбинантного гуманизованного антитела hC34, а также ЛФ препарата разработаны ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России. Антитело hC34 представляет собой полноразмерный иммуноглобулин субкласса IgG1/каппа, характеризующийся молекулярной массой около 155 кДа и состоящий из двух тяжелых и двух легких цепей. ЛФ рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения. Для изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 в модели травматического поражения головного мозга крысы использовали моноклональное антитело 3A8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы, полученное по гибридомной технологии.

**Методика изучения механизма действия рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 *in vitro*.** Изучение способности антитела hC34 блокировать активацию комплемента по классическому и альтернативному пути проводили с помощью гемолитического теста. Для активации классического пути комплемента использовали сенсibilизированные эритроциты барана, для активации альтернативного пути - эритроциты кролика.

Изучение влияния антитела hC34 на активность магний-зависимых С3- и С5-конвертаз альтернативного пути проводили путем определения генерации продуктов активации комплемента зимозаном (С3а и С5а) в сыворотке крови человека. Степень

активации определяли по содержанию анафилатоксинов C3a и C5a в образцах, которое определяли иммуноферментным анализом (ИФА). 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 потенциальных ингибиторов.

С целью идентификации участка связывания с антителом hC34 на молекуле C3 получали в очищенном виде белки C3, C3i, C3b и C3c с использованием методов хроматографии. Взаимодействие антитела hC34 с различными формами C3 компонента комплемента изучали методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью прибора «Биокор Х100». Расчет равновесных констант диссоциации ( $K_D$ ) взаимодействий hC34 с производными C3 был сделан после трех экспериментальных циклов с последовательным увеличением концентраций аналитов в диапазоне 2,5-40 нМ. Были рассчитаны параметры, характеризующие взаимодействие антител hC34 с производными C3.

**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 ИФА в варианте «сэндвич». В исследовании использовали сыворотки крови человека, крысы, мыши, кролика, свиньи и обезьяны. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку R3, истощенную по C3 компоненту комплемента человека – сыворотку крови человека, пропущенную через сорбент Sepharosa 4B (GE Healthcare) с иммобилизованными моноклональными антителами мыши к C3 человека G10.

**Методика изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 на примере его аналога.** В эксперименте использовали 39 белых беспородных крыс-самцов, которые случайным образом были разделены на 3 равные группы. У всех животных формировали условный рефлекс пассивного избегания с помощью программно-аппаратного комплекса Шелтер (Нейроботикс, Россия), спустя 30 мин всем животным наносили закрытую черепно-мозговую травму. В работе была использована широко распространенная модель ЗЧМТ, известная как модель свободно падающего груза. В результате падения груза (свинцовый шар массой 50 г) крысы получают повреждение головного мозга, сравнимое с ЗЧМТ у человека, сопровождающееся характерной клинической картиной. Повреждение сопровождается нарушением когнитивных функций и морфологическими изменениями в головном мозге. Спустя 15 мин после нанесения травмы животным первой группы внутривенно вводили изучаемый препарат (моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 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 и состояние памяти в тесте сохранности УРПИ, а также определяли концентрацию C3a в плазме крови методом конкурентного ИФА. 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, готовили гистологические препараты. 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 CA1 и CA3. Подсчет количества нейронов производили на 6 срезах в пяти полях зрения у каждого животного.

**Методика изучения фармакокинетики лекарственной формы рекомбинантного гуманизованного антитела hC34.** Фармакокинетика лекарственной формы рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 была изучена на белых беспородных крысах. В эксперименте использовали 18 крыс-самцов, которые были разделены на 3 равные группы. Для инъекций использовали ЛФ 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. Анализ концентрации антитела в сыворотке крови проводили с помощью иммуноферментной тест-системы, специфичной к иммуноглобулину G человека. Анализ фармакокинетических параметров выполняли на основе экспериментально полученных значений концентрации исследуемого антитела в сыворотке крови, измеренных в разное время после введения препарата.

**Методика изучения безопасности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34.** Острая токсичность лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 была изучена на белых беспородных крысах обоего пола. Дозирование осуществляли по действующему веществу. 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, 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 по внутривенному пути 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. Проводили клинический осмотр (ежедневно), взвешивание и измерение температуры тела. На 14-е сутки все животные были подвергнуты эвтаназии и патоморфологическому исследованию.

Хроническая токсичность ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 была изучена на белых беспородных крысах обоего пола при ежедневном внутривенном введении в течение 30 дней. Дозирование ЛФ осуществляли по действующему веществу. Крысы 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 6); максимальная – 500 мг/кг (в 125 раз превышающая терапевтическую дозу для человека); промежуточная – 260 мг/кг. В течение эксперимента регистрировали интегральные показатели состояния организма всех животных (клинический осмотр, измерение массы тела, потребление воды и пищи), проводили физиологические исследования (регистрация структуры поведения крыс в открытом поле, спонтанной двигательной активности, показателей функции внешнего дыхания, электрокардиограммы, артериального давления, болевой чувствительности, ректальной температуры, тест «сила хватки»), лабораторные исследования (гематологический анализ и миелограмма, биохимическое исследование сыворотки крови, исследование мочи), а также патоморфологическое и патогистологическое исследование по окончании эксперимента.

*Дизайн экспериментов по изучению аллергенности.* Реакцию общей анафилаксии (анафилактический шок) проводили на морских свинках, случайным образом разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа получала физиологический раствор (ФР): первая инъекция подкожно (п/к), две последующие – внутримышечно (в/м) через день в область бедра. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. Через 21 день после первого введения всем животным внутрисердечно вводили разрешающую дозу ЛФ антитела hC34, которая составила суммарную сенсibiliзирующую дозу для каждой группы соответственно. Животным контрольной группы вводили разрешающую дозу, используемую для опытной группы 2. Учет интенсивности анафилактического шока проводили в индексах по Weigle [Weigle W.O. et al, 1960].

Реакцию активной кожной анафилаксии проводили на белых беспородных мышках, случайным образом разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа получала ФР: первая инъекция п/к, две последующие – в/м через день в область бедра. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и



250 мг/кг, соответственно. Через 21 день после первой инъекции ЛФ всем животным на выстриженных участках спины внутривенно 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 [Миронов А.Н. и др., 2012].

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили на мышах-гибридах F1 (СВА х С57В1/6), разделенных на 2 равные группы (по 10 самок и 10 самцов). Контрольной группе ежедневно в течение 7 дней в/в вводили ФР, опытной группе по той же схеме вводили изучаемую ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг. Через 5 суток после последней инъекции всем животным в подушечку одной задней лапы вводили 50 мкл ЛФ антитела hC34, в контралатеральную лапу вводили ФР. Через 24 ч, после эвтаназии всех животных, обе лапы равнозначно отрезали выше пяточного сустава и взвешивали. Индекс реакции подсчитывали в процентах прироста массы лапы, в которую вводили препарат, по отношению к массе контрольной лапы.

*Дизайн экспериментов по изучению иммунотоксичности.* Во всех экспериментах по изучению иммунотоксичности мыши-гибриды F1 (СВА х С57В1/6) были разделены на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов): контрольная группа ежедневно, в течение 7 дней в/в получала ФР; опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно.

Для определения числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке на 7-й день все мыши были иммунизированы внутрибрюшинной инъекцией эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе  $5 \times 10^7$  ЭБ на животное. Подсчет числа АОК в селезенке мышей проводили на 5-е сутки после иммунизации. Реакцию ставили на предметных стеклах без поддерживающей среды по Cunningham [Cunningham A.J., 1965]. По количеству зон гемолиза эритроцитов вокруг отдельных АОК, определяемых под микроскопом, подсчитывали число клеток – продуцентов антител в расчете на  $10^6$  спленоцитов.

Для постановки реакции ГЗТ на 7-й день все мыши были сенсibilизированы однократно п/к 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. Через 24 часа проводили оценку реакции и подсчитывали индекс, как описано выше.

Для оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов на следующий день после последней инъекции препарата всех животных забивали и промывали брюшную полость культуральной средой. Ставили реакцию фагоцитоза с опсонизированными дрожжами на чашках Петри по стандартной методике. Чашки фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Под микроскопом подсчитывали процент фагоцитировавших макрофагов, нефагоцитировавших макрофагов, а также процент незавершенных фагоцитозов, кроме того подсчитывали среднее количество фагоцитированных дрожжевых клеток.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel-2007 (Microsoft Corporation). Результаты представлены в таблицах в виде средних значений (M) ± 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  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Результаты изучения механизма действия рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 *in vitro*

*Изучение действия антитела hC34 на активацию классического и альтернативного пути комплемента.* Изучение способности антитела hC34 блокировать активацию комплемента по классическому и альтернативному пути проводили с помощью

гемолитического теста. Антитела hC34 не блокировали активацию комплемента по классическому пути (во всех пробах регистрировали 100 % гемолиз), но блокировали альтернативный путь активации, что выразалось в дозозависимом ингибировании гемолиза от 100 до 5 % с увеличением концентрации антитела (рисунок 1).

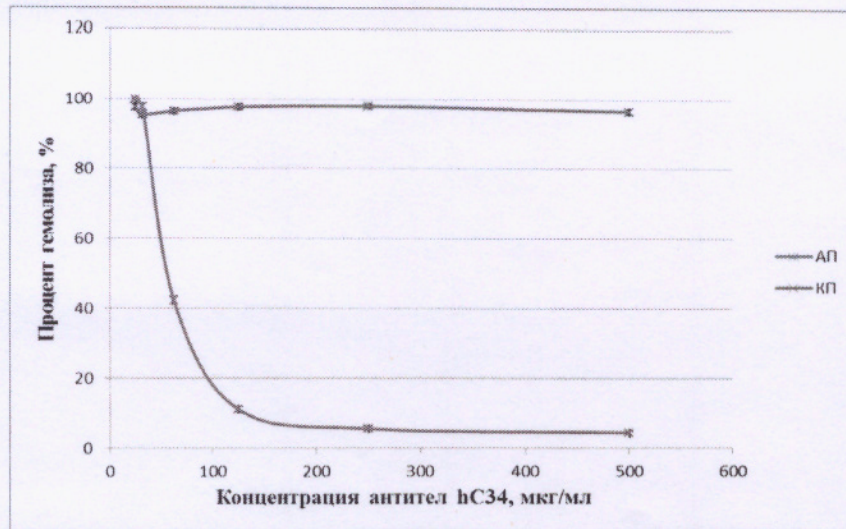


Рисунок 1 – Влияние антитела hC34 на активацию комплемента по классическому (КП) и альтернативному путям (АП) в тесте гемолиза сенсibilизированных эритроцитов барана и нормальных эритроцитов кролика, соответственно

*Изучение ингибирования продукции C3a и C5a in vitro антителом hC34.* Для того чтобы определить, на каком этапе каскада активации происходит ингибирование АП антителом hC34, проводили активацию сыворотки крови человека зимозаном, после чего регистрировали появление продуктов расщепления C3 и C5 компонентов комплемента - C3a и C5a, концентрацию которых определяли посредством специфического ИФА. Подавление альтернативного пути активации выражали в процентах ингибирования (ПИ) и рассчитывали для каждого анафилатоксина отдельно. Результаты, представленные на рисунке 2, показывают, что 100% подавление АП, оцененное по уровням продукции обоих анафилатоксинов, достигается при существенном молярном дефиците антител hC34 по отношению к антигену, то есть для достижения эффективного ингибирования достаточно нейтрализовать лишь часть молекул C3.

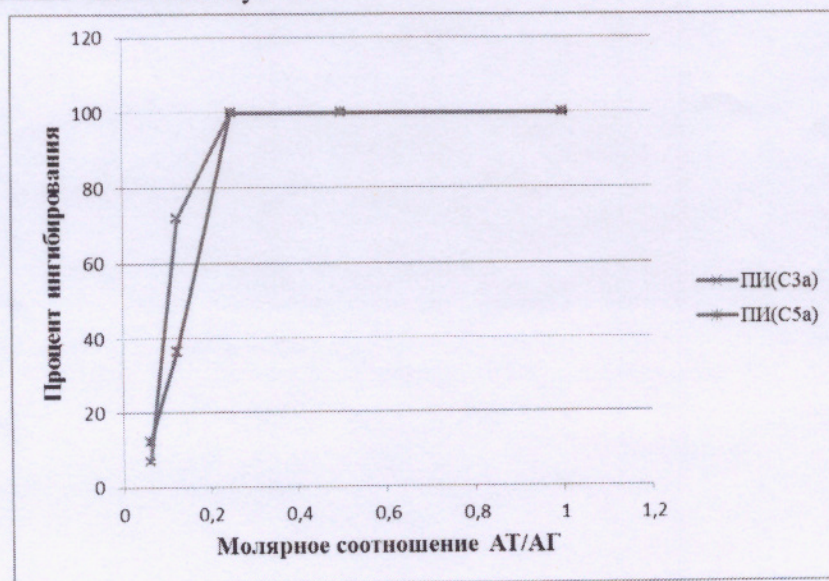


Рисунок 2 – Изучение ингибирования альтернативного пути активации комплемента антителом hC34

*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. Процесс активации АП 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. В течение короткого времени пребывания в активном состоянии C3(H<sub>2</sub>O) вступает в реакцию с другими компонентами комплементарного каскада с образованием C3-конвертаз АП, которые расщепляют C3 на два фрагмента: анафилатоксин C3a и опсонин C3b. Последний подвергается дальнейшему активационному процессингу под действием сериновых протеаз. В результате этого образуются еще более редуцированные формы C3: iC3b и C3c. Все перечисленные преобразования сопровождаются конформационными изменениями и, следовательно, экспозицией неопзитопов на молекуле C3.

Следуя поставленной задаче, три производных C3 компонента - C3i, C3b и C3c - были получены в очищенном виде. Аффинность их взаимодействия с hC34, определяющая их специфичность, была исследована методом SPR. Результаты расчета параметров, характеризующих взаимодействие антител hC34 с производными C3, представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Параметры, характеризующие кинетику взаимодействия hC34 (иммобилизован при концентрации 20 нМ) с различными вариантами C3 (2,5-40 нМ)

Аналит	C3	C3i	C3b	C3c
K <sub>D</sub> , нМ	-	4,5	4,5	8,4
k <sub>a</sub> , 10 <sup>6</sup> /М*с	-	0,22	0,27	0,20
k <sub>d</sub> , 10 <sup>-3</sup> /с	-	0,97	1,22	1,68
R <sub>max</sub> , RU	-	1451	1455	928
U-value	95	2	1	2

На основании полученных результатов был сделан вывод, что взаимодействие нативного C3 с hC34 является очень слабым и лежит за пределами чувствительности приборного метода. C3i и C3b взаимодействуют с антителом практически одинаково (равенство значений K<sub>D</sub> и R<sub>max</sub>), последний чуть быстрее ассоциирует с hC34 и диссоциирует от hC34 (значения k<sub>a</sub> и k<sub>d</sub>). Взаимодействие C3c с антителом хотя и является значительным, но остается слабее по сравнению с C3i и C3b (значения K<sub>D</sub>, k<sub>a</sub>, k<sub>d</sub> и R<sub>max</sub>). Эти исследования указывают на то, что неопзитопа, специфичная для взаимодействия с антителом hC34, возникает на стадии первичного конформационного преобразования C3 в C3(H<sub>2</sub>O), происходящего при гидролизе тиоэфирной связи, и остается фиксированной на других формах: C3i, C3b и C3c.

**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». Если оптическая плотность в разведении 10<sup>4</sup> исследуемых образцов сывороток крови превышала фоновое значение в 10 раз, делали вывод о том, что сыворотка крови взаимодействует с рекомбинантным антителом hC34. В результате проведенных исследований показано, что рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 взаимодействует с сыворотками крови человека и обезьяны (оптическая плотность в разведении 10<sup>4</sup> 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, при отсутствии животных соответствующего вида возможно использование для доклинического изучения МАТ трансгенных животных, либо гомологичных белков, т. е. белков животного происхождения (например, мышей, крыс, кроликов), 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 С5 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 С5 мыши. 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 С3 компоненту комплемента крысы - в модели травматического поражения головного мозга крысы.

**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. 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 (таблица 2). Несмотря на выраженную тенденцию к утрате УРПИ у животных контрольной группы, статистически достоверных различий между группами не наблюдали.

Таблица 2 - Выживаемость и сохранность УРПИ в модели ЧМТ

Контроль			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>								
3/11			0/10			0/13		

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

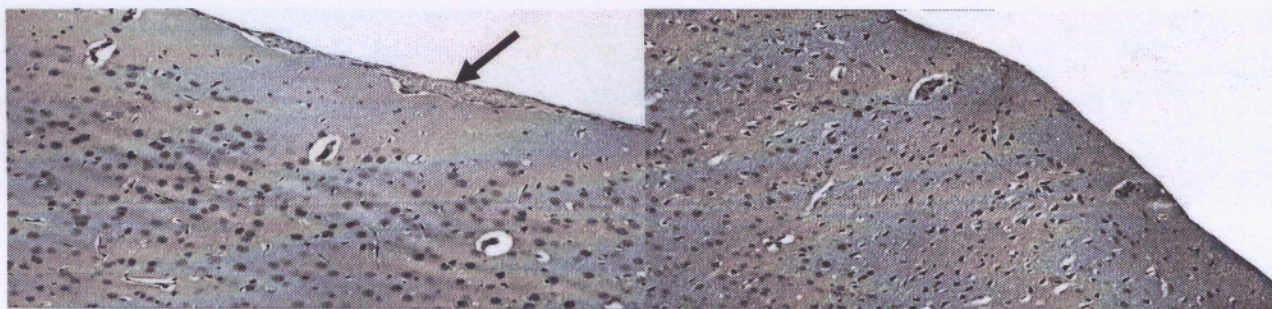


Рисунок 3 - Сравнение областей коры больших полушарий, окраска гематоксилином и эозином, увеличение 320х: слева – животное контрольной группы, справа – животное опытной группы, получавшей препарат в дозе 250 мг/кг. Черной стрелкой отмечено кровоизлияние в мягкую мозговую оболочку

Анализ гистологических препаратов показал, что у контрольных животных (не получавших терапии), получивших ЗЧМТ, в областях гиппокампа 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 (рисунок 4).

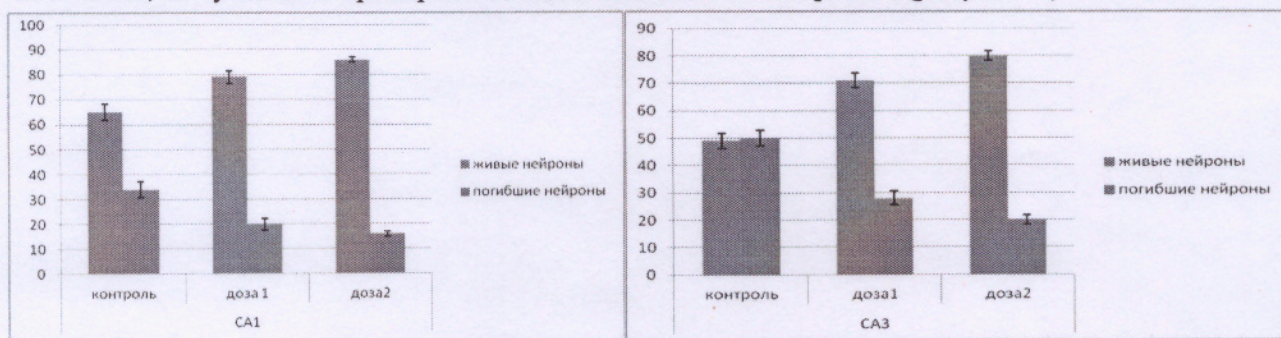


Рисунок 4 - Сравнение процента живых и погибших нейронов в опытных и контрольной группах в областях СА1 (слева) и СА3 (справа) гиппокампа (\* $p < 0,01$  по сравнению с соответствующими значениями контрольной группы). По оси ординат - процент погибших/живых нейронов. Доза 1 – 125 мг/кг, доза 2 – 250 мг/кг

В результате определения концентрации С3а в плазме крови методом конкурентного ИФА показано, что концентрация С3а у интактных животных в среднем составляла 82 нг/мл. В группе контроля, в которую входили крысы с ЗЧМТ, не получавшие защитное антитело ЗА8, концентрация С3а 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 С3а были промежуточными. Концентрация С3а была выше, чем у интактных животных, но достоверно ниже, чем в группе контроля без лечения, наблюдался дозозависимый эффект.

Таким образом, тестируемое моноклональное антитело ЗА8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы – аналог разрабатываемого рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 - 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

снизило выраженность картины ЗЧМТ, а также достоверно и дозозависимо снизило процент погибших нейронов в гипоталамусе. Установлено, что блокирование С3 компонента комплемента с помощью антитела ЗА8 способствует ограничению активации комплемента, о чем можно судить по уменьшению уровня С3а фрагмента С3 в сывороточных пробах.

**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. Усредненные результаты измерений концентрации антитела hC34 в сыворотке крови крыс после внутривенного введения в различных дозах представлены в графической форме на рисунке 5.

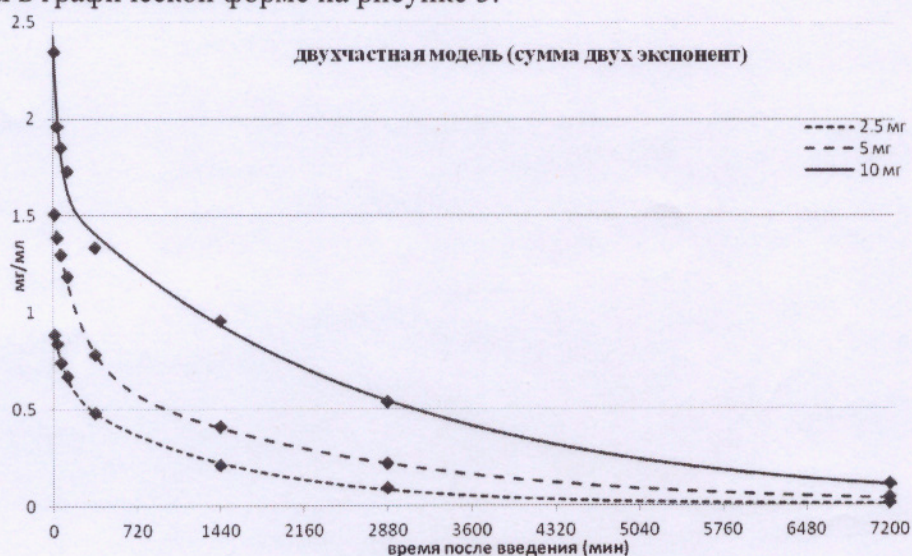


Рисунок 5 – Динамика концентрации hC34 в сыворотке крыс после внутривенного введения в дозах 2,5, 5 и 10 мг на особь

Из рисунка 5 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.

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.

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

*Изучение острой токсичности.* Острая токсичность лекарственной формы была изучена на крысах. Период наблюдения после введения ЛФ составил 14 дней. В процессе экспериментов, помимо летальности, регистрировали интегральные параметры состояния животных, измеряли динамику массы тела, частоту дыхательных движений и сердечных сокращений, 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. 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.

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.

*Изучение хронической токсичности.* 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.

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. 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, 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, никаких значимых различий между экспериментальными группами по данным параметрам не наблюдалось.

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 [Дорофейков В.В. и др., 1999]. Таким образом, можно заключить, что фармакологическая активность разрабатываемого антитела к неопредетерминанте 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. 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 ЭКГ экспериментальных животных отмечено не было, частота сердечных сокращений также не менялась. Средние значения систолического артериального давления колебались от  $(120 \pm 2)$  до  $(123 \pm 3)$  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.

Система комплемента является одной из важнейших полифункциональных систем организма, относящейся к неспецифическим факторам резистентности (система врожденного иммунитета) [Тарасова И.В., 2010]. Кроме того, система комплемента тесно связана с системой свертывания крови, фибринолиза, кининовой системой [Таран Л.Д., 1993]. 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 [Шилова Е.Р., 2022]. 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, 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.

Таким образом, 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.

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. Анализ полученных данных не выявил достоверного воздействия ЛФ на биохимические показатели крови экспериментальных животных.

Таблица 3 - 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
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 4, не выявлено каких-либо различий между контрольной группой, получавшей физиологический раствор, и опытными группами, получавшими ЛФ.

Таблица 4 - Влияние ежедневного внутривенного введения ЛФ на анализ мочи белых крыс ( $M \pm m$ )  $n \approx$

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
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 кровотока.

На 30-й день эксперимента выполняли патоморфологическое исследование для животных всех экспериментальных групп, получавших ЛФ или физиологический раствор. 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. 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). 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). Об отсутствии нежелательных аутоиммунных реакций, способствующих развитию микротромбозов и дегенерации тканей, свидетельствует и отсутствие изменений в сердце. 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.

На основании результатов хронического эксперимента был рассчитан индекс безопасности (ИБ) изученной ЛФ при клиническом применении в соответствии с инструкцией Т.А.Гуськовой [Т.А.Гуськова, 2003]. Расчетный безопасный курс препарата в днях составил 636 дней, а индекс безопасности (ИБ) для трехмесячного терапевтического курса - 21. В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения (ИБ > 5) изученная ЛФ относится к III классу малотоксичных лекарственных препаратов.

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.

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

При оценке реакции активной кожной анафилаксии результаты измерения диаметров цветных пятен, образовавшихся на месте введения разрешающей дозы ЛФ антитела hC34, показали, что размеры пятен составили от 1 до 2 мм. 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 ГЗТ у мышей, приведены на рисунке 6. 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.

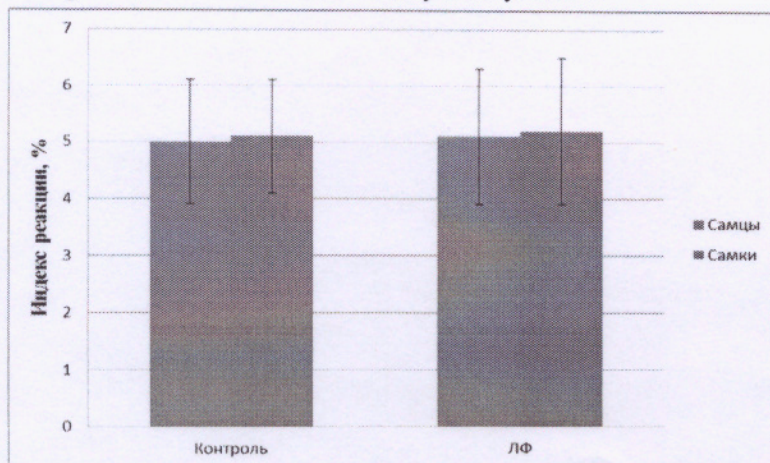


Рисунок 6 - Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей после сенсibilизации ЛФ

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.

*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 F1 (СВА x C57Bl/6), образующихся в ответ на введение эритроцитов барана (рисунок 7). На основании представленных данных можно заключить, что изученные дозы препарата не оказывали негативного воздействия на развитие гуморального иммунного ответа.

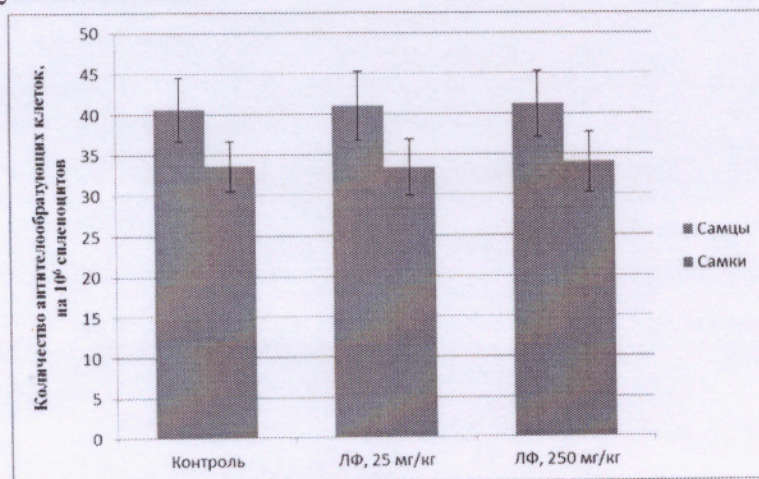


Рисунок 7 - Влияние ЛФ на число антителообразующих клеток (на  $10^6$  спленоцитов) в селезенке мышей F<sub>1</sub> (СВА x C57Bl/6)

Анализ результатов оценки реакции ГЗТ на мышцах 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<sub>1</sub> (СВА х С57В1/6). Выраженная реакция ГЗТ развивалась во всех экспериментальных группах. Таким образом, было показано, что изученные дозы препарата не оказывают значимого угнетающего воздействия на развитие клеточного иммунного ответа.

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<sub>1</sub> (СВА х С57В1/6). 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 гуманизованного 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 гуманизованного антитела hC34 к неопределяемому компоненту комплемента человека с целью обоснования подхода к лечению травматического повреждения головного мозга, основанного на блокировании активации комплемента.

Проведено изучение механизма действия рекомбинантного гуманизованного 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 проб проб 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. Полученные данные свидетельствуют о том, что достаточно нейтрализовать долю молекул C3, участвующих в инициации активации АПК, чтобы практически полностью заблокировать гемолитическую активность АПК, за счет чего терапевтическая доза рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 может быть значительно снижена относительно требуемой и не превышает 3,125 мкг/мл плазмы крови.

В рамках исследования механизма действия также производилась оценка специфичности рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 по отношению к различным молекулярным формам C3 компонента, которые образуются в результате процессинга этой молекулы, обусловленного активацией комплемента. Полученные данные указывают на то, что неопределяемый, специфичная для взаимодействия с антителом hC34, возникает на стадии первичного конформационного перехода C3 в C3(H<sub>2</sub>O), происходящего при гидролизе тиоэфирной связи, и остается фиксированной на других формах: C3i, C3b и C3c. 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 C3 компонента, непрерывно циркулирующего в кровотоке.

Определен релевантный вид животных для проведения экспериментальных исследований рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 путем изучения видовой кросс-реактивности антитела hC34 с сыворотками крови человека и различных животных. Показано, что рекомбинантное гуманизованное 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. С учетом рекомендаций по доклиническому изучению моноклональных антител, приведенных в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н.Миронова, и зарубежной практики, было принято решение доклиническое изучение специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 проводить на примере его аналога - моноклонального антитела 3A8, специфичного С3 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. 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 MAC.

В результате проведенных исследований показано, что моноклональное антитело 3A8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы - аналог разрабатываемого рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 - 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 [Smith D.H., 1997]. В норме области гиппокампа CA1 и CA3 четко выделяются топографически, наблюдается симметричность организации citoархитектоники пирамидного слоя гиппокампа правого и левого полушарий. Анализ гистологических препаратов показал, что у контрольных животных (не получавших терапии), получивших ЗЧМТ, в областях CA1 и CA3 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 CA1, и в области CA3 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.

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.

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.

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.

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

сенсibilизирует 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 С3 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 С3 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 С3 в пробах плазмы крови.

2. Методом плазмонного резонанса установлено, что участок связывания с антителом hC34 локализован на формах С3i, С3b и С3c.

3. Аналог рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 – моноклональное антитело 3А8, специфичное С3 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 гуманизированного 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 гуманизированного 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).



6. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Некрасова К.А.**, Ищенко А.М., Трофимов А.В. Ингибирование функции анафилатоксинов комплемента при патологии центральной нервной системы // Медицинский академический журнал. 2021; 21(2): 37–52. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ71315>.

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

#### Статьи и тезисы, опубликованные в других изданиях

1. Горбунов Н.П., Жахов А.В., Трофимов А.В., **Некрасова К.А.**, Родин С.В., Атанесян Е.А., Карабанова Е.А., Захаров М.С., Симбирцев А.С., Ищенко А.М. Комплемент при патологиях, возможность коррекции с помощью нового гуманизованного антитела, блокирующего альтернативный путь. // Российский иммунологический журнал. 2019; 13(22)(2): 754-756. DOI: <https://doi.org/10.31857/S102872210006712-8>.

2. **Некрасова К.А.**, Трофимов А.В., Жахов А.В., Родин С.В., Горбунов Н.П., Петров А.В., Пигарева Н.В., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Бендт И.В., Крылова А.Э., Ищенко А.М. Доклинические исследования острой и хронической токсичности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизованного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга // Биотехнология: состояние и перспективы развития : Материалы международного конгресса, Москва, 26–29 октября 2021 года. – 2021. – С.48-49. DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-48-49.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

аГУС – атипичный гемолитический синдром

АП, АПК – альтернативный путь (активации комплемента)

ИФА – иммуноферментный анализ

КП – классический путь

ЛП – лектиновый путь

ЛФ – лекарственная форма

МАТ – моноклональное антитело

ПНГ – пароксизмальная ночная гемоглобинурия

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ФР – физиологический раствор

ЦВЗ – цереброваскулярные заболевания

ЦНС – центральная нервная система

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ЭБ – эритроциты барана

ЭФ – электрофорез

hC34 - гуманизованное антитело к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека