



"УТВЕРЖДАЮ"

Зам. директора ИБХ РАН  
академик

А.И.Мирошников

» 14.08.14 2014 г.

## ОТЧЕТ

### Исследование эффективности внутридермального препарата Repleri №1 с включенным рекомбинантным аналогом природного белка Spider silk protein 1 в различных вариациях в сравнении со стандартным препаратом Repleri №1 и препаратом Repleri №1 после лиофилизации на крысах CD при однократном внутрикожном введении

#### Заказчик:

ООО «НовоНексус»  
Россия, 107076, г. Москва, ул. Потешная д. 2, офис 1

#### Исследовательское учреждение:

Лаборатория биологических испытаний  
Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ФИБХ РАН)  
142290 г. Пущино, Московская обл., проспект Науки 6

Номер исследования: 280/12

Заведующий лабораторией  
биологических испытаний ФИБХ:

  
А.Н. Мурашев, д.б.н.

14.08.14.  
Дата

Руководитель исследования:

  
Н.И. Новикова, к.б.н.

14.08.14.  
Дата

## Содержание

1.	Реферат .....	6
2.	Следование нормативным актам.....	8
2.1.	Обеспечение качества .....	8
3.	Ответственный персонал .....	9
4.	Характеристика и стабильность веществ .....	10
4.1.	Тестируемые препараты .....	10
4.2.	Препараты сравнения .....	12
4.3.	Контрольное вещество .....	13
5.	Основные даты.....	13
6.	Цель и обоснование.....	14
7.	Дизайн исследования .....	14
7.1.	Описание .....	14
7.2.	Группы и дозы .....	15
8.	Материалы и методы.....	15
8.1.	Исследуемые препараты .....	15
8.1.1.	Прием, учет и хранение .....	15
8.1.2.	Подготовка для введения .....	16
8.1.3.	Образцы веществ.....	16
8.1.4.	Действия с остатками веществ .....	16
8.1.5.	Контроль правильности приготовления доз для введения.....	16
8.2.	Животные .....	16
8.2.1.	Источник животных .....	17
8.2.2.	Карантин/Адаптация .....	17
8.2.3.	Распределение по группам.....	17
8.2.4.	Идентификация .....	17
8.2.5.	Содержание и уход.....	17
8.3.	Удаление шерстного покрова в области введения.....	18
8.4.	Наркотизация животных.....	18
8.5.	Процедура введения препаратов .....	19
8.6.	Наблюдения и измерения в ходе исследования.....	19
8.6.1.	Клинические наблюдения .....	19
8.6.2.	Масса тела.....	19
8.6.3.	Накожный осмотр области введения.....	19
8.6.4.	Макросъемка области введения .....	19
8.7.	Патоморфология и гистология.....	20
8.7.1.	Умирающие и умершие животные .....	20
8.7.2.	Эвтаназия .....	20
8.7.3.	Сбор образцов кожи.....	20
8.7.4.	Патоморфологическая техника .....	20
8.7.5.	Гистология .....	20
8.8.	Статистический анализ .....	20
8.9.	Изменения плана исследования .....	21
8.10.	Отклонения в исследовании.....	21
9.	Архив.....	21
10.	Результаты.....	22
10.1.	Наркотизация животных .....	22
10.2.	Процедура введения препаратов .....	22
10.3.	Наблюдения и измерения в ходе исследования .....	22
10.3.1.	Клинические наблюдения и смертность.....	22
10.3.2.	Масса тела.....	23
10.3.3.	Накожный осмотр области введения.....	26
10.3.4.	Макросъемка области введения.....	46
10.4.	Патоморфология .....	47

10.4.1. Подкожный осмотр области введения .....	47
10.4.2. Микроскопический анализ кожи в области введения .....	51
11. Заключение.....	56

### Список таблиц в тексте

Таблица в тексте 1. Методы: группы и дозы.....	15
Таблица в тексте 2. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 стандартный с 1-го по 120-й день.....	28
Таблица в тексте 3. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации с 1-го по 120-й день.....	30
Таблица в тексте 4. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (белок 1F9) с 1-го по 120-й день. ....	32
Таблица в тексте 5. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (смесь белков 2E12+2E12-Linker-RGDS(1:1)) с 1-го по 120-й день. ....	34
Таблица в тексте 6. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (смесь белков 1F9+2E12-Linker-RGDS (3:1)) с 1-го по 120-й день. ....	36
Таблица в тексте 7. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (белок 2E12-linker-RGDS) с 1-го по 120-й день.....	38
Таблица в тексте 8. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 стандартный с 121-го по 180-й день.....	40
Таблица в тексте 9. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации с 121-го по 180-й день.....	41
Таблица в тексте 10. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (белок 1F9) с 121-го по 180-й день. ....	42
Таблица в тексте 11. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (смесь белков 2E12+2E12-Linker-RGDS(1:1)) с 121-го по 180-й день. ....	43
Таблица в тексте 12. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (смесь белков 1F9+2E12-Linker-RGDS (3:1)) с 121-го по 180-й день. ....	44
Таблица в тексте 13. Результаты: накожный осмотр области введения препарата Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (белок 2E12-linker-RGDS) с 121-го по 180-й день.....	45
Таблица в тексте 14. Результаты: подкожный осмотр области введения. ....	49
Таблица в тексте 15. Результаты: микроскопический анализ кожи в области введения. ....	54

## **Список таблиц средних значений**

Таблица средних значений 1. Масса тела.....	24
Таблица средних значений 2. Прирост массы тела.....	25

## Список приложений

Приложение 1.	Индивидуальные данные введения смеси наркотизирующих препаратов .....	57
Приложение 2.	Индивидуальные данные введения препаратов .....	76
Приложение 3.	Индивидуальные данные клинического осмотра и отклонения в состоянии здоровья в ходе исследования .....	79
Приложение 4.	Индивидуальные данные массы тела .....	86
Приложение 5.	Индивидуальные данные кожного осмотра области введения .....	102
Приложение 6.	Индивидуальные данные подкожного осмотра области введения .....	146
Приложение 7.	Индивидуальные данные микроскопического анализа кожи в области введения....	160
Приложение 8.	Регистрационное удостоверение и Протоколы анализа препаратов .....	171
Приложение 9.	План исследования и поправки.....	183
Приложение 10.	Меморандум руководителя исследования.....	206
Приложение 11.	Отчет службы обеспечения качества .....	208

## 1. Реферат

Целью данного исследования являлось выявление морфологических эффектов в коже после однократного внутрикожного введения крысам CD внутридермального препарата Repleri №1 с включенным рекомбинантным аналогом природного белка Spider silk protein 1 в различных вариациях в сравнении со стандартным препаратом Repleri №1 и препаратом Repleri №1, проведенным через лиофилизацию. В ходе исследования также сравнивали между собой специфическую эффективность препаратов сравнения, поскольку для производства тестируемых препаратов необходимо использовать препарат Repleri №1 после предварительной лиофилизации, и в этой связи необходимо было выявить сохранность свойств препарата после лиофилизации. В качестве контрольного вещества использовался физиологический раствор хлорида натрия. В данном исследовании тестированию подлежали четыре вариации внутридермального препарата Repleri №1 с включенным рекомбинантным аналогом природного белка Spider silk protein 1:

1. Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (*белок 1F9*)
2. Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (*смесь белков 2E12+2E12-Linker-RGDS(1:1)*)
3. Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (*смесь белков 1F9+2E12-Linker-RGDS (3:1)*)
4. Repleri №1 после лиофилизации+Spider silk protein 1 (*белок 2E12-linker-RGDS*)

В исследовании было использовано 14 групп по 5 самцов крыс CD в каждой. Половину крыс (группы 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) наблюдали в течение 120 дней после введения, оставшуюся половину (группы 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14) в течение 180 дней.

Тестируемые препараты, препараты сравнения и контрольное вещество вводили однократно внутрикожно в спину на уровне грудного отдела позвоночного столба в две инъекции, по 30-40 мкл на каждую инъекцию и, таким образом, общий объем введения составил 60-80 мкл/крыса. Введение препаратов осуществляли в наркотизированном состоянии животных, для этого использовали легкий наркоз (Золетил 100 с Рометаром 20 мг/мл в соотношении 1:1).

В ходе исследования у животных регистрировали вес, фотографировали область введения, проводили наочный осмотр области введения и осмотр животных в клетках. Половину крыс подвергали эвтаназии на 120 день после введения, оставшуюся половину на 180 день. После эвтаназии проводили подкожный осмотр области введения. Микроскопический анализ кожи в области введения проводили на 120 и 180 день после введения.

В ходе исследования зарегистрирована гибель трех крыс: №68 на 41 день исследования, №39 на 80 день исследования и №59 на 81 день исследования. Причиной гибели этих животных, вероятнее всего, явилось индивидуальное реагирование на введение смеси наркотизирующих препаратов. У ряда животных (№12, №58, №59, №65, №51, №11, №58) наблюдались отклонения в состоянии здоровья, связанные с действием смеси наркотизирующих препаратов. В течение исследования во всех группах отмечена положительная динамика веса тела, при этом прирост массы тела соответствовал возрасту животных. Статистически достоверных отличий по массе тела между группами в течение эксперимента согласно статистическому тесту Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks не выявлено.

Результаты наочного осмотра области введения показали, что после лиофилизации препарата сравнения Repleri №1 его эффективность незначительно снижалась, а из четырех вариаций тестируемых препаратов наиболее выраженной специфической эффективностью обладают вариации тестируемых препаратов смесь белков 2E12+2E12-Linker-RGDS(1:1) и смесь белков 1F9+2E12-Linker-RGDS (3:1).

Результаты подкожного осмотра области введения показали, что после лиофилизации препарата сравнения Repleri №1 его эффективность заметно снижалась, а из четырех вариаций тестируемых препаратов наиболее выраженной специфической эффективностью обладают вариации тестируемых препаратов белок 2E12-linker-RGDS и смесь белков 2E12+2E12-Linker-RGDS(1:1). Результаты подкожного осмотра области введения также позволяют прийти к заключению того, что как препараты сравнения, так и тестируемые препараты не обладают местнораздражающим действием.

Из многочисленного ряда морфологических признаков микроскопической оценки кожи в области введения основными, позволяющими оценить специфическую активность исследуемых препаратов, явились такие как, визуальное количество фибробластоподобных и прочих клеток

соединительной ткани, количество *de novo* образованных тяжёлых коллагеновых волокон и кровоснабжение области распределения внутридермального геля. Результаты микроскопического анализа кожи показали, что после введения вариаций тестируемого препарата смесь белков *2E12+2E12-Linker-RGDS(1:1)* и смесь белков *1F9+2E12-Linker-RGDS(3:1)* степень выраженности основных признаков микроскопической оценки была заметно выше, чем после введения остальных исследуемых препаратов.

На основании проведенного исследования, учитывая результаты накожного и подкожного осмотра области введения, а также результаты микроскопического анализа подкожных папул, можно прийти к заключению того, что из всех исследуемых препаратов наиболее выраженной специфической эффективностью обладает вариация тестируемого препарата смесь белков *2E12+2E12-Linker-RGDS(1:1)*. Несколько менее выраженной специфической эффективностью, по сравнению с первым препаратом, обладает вариация смеси белков *1F9+2E12-Linker-RGDS(3:1)*.

## 2. Следование нормативным актам

Данное исследование выполнялось согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации №708н от 23.08.2010 и Национальный стандарт Российской Федерации, ГОСТ Р 53434 – 2009) и в соответствии с руководством ICH S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology Derived Pharmaceuticals и с принципами GLP OECD (OECD Principles on Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM(98)17)).

Отклонений, влияющих на качество, целостность или интерпретацию данных, не было.

Все процедуры в исследовании выполнялись согласно утвержденному письменному плану и Стандартным операционным процедурам (СОП) лаборатории.

Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФИБХ (Протокол № 334/12).

### 2.1. Обеспечение качества

Служба обеспечения качества лаборатории осуществляла проверку плана, ключевых фаз исследования (введение препаратов, наркотизация, осмотр области введения, фотосъемка, сбор образцов кожи), первичных данных, чернового и итогового отчетов.

Отчет службы обеспечения качества приведен в Приложении 11.



### 3. Ответственный персонал

Ветеринарный контроль:	Семушина С.Г., ветеринарный врач	<u>12.08.14</u>	<u>СГ</u>
		Дата	Подпись
Провизор:	Бондаренко Д.А., к.фарм.н., м.н.с.	<u>12.08.14</u>	<u>Д.А.</u>
		Дата	Подпись
Введение препаратов:	Лобанов А.В., к.б.н., н.с.	<u>12.08.14</u>	<u>А.В.</u>
		Дата	Подпись
Макросъемка, обработка и анализ данных:	Рыков В.А., м.н.с.	<u>12.08.14</u>	<u>В.А.</u>
		Дата	Подпись
Осмотр области введения, патоморфология:	Новикова Н.И., к.б.н., с.н.с.	<u>12.08.14</u>	<u>Н.И.</u>
		Дата	Подпись