

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490234 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.26

(22) Дата подачи заявки
2022.07.14

(51) Int. Cl. *A61K 38/39* (2006.01)
A23L 2/39 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)
A61K 8/65 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(54) ПОРОШОК КОЛЛАГЕНА, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 102021000018647

(32) 2021.07.14

(33) IT

(86) PCT/IB2022/056508

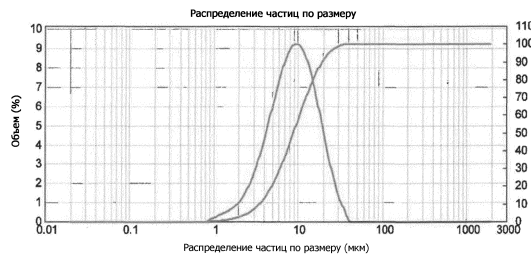
(87) WO 2023/286012 2023.01.19

(71) Заявитель:
ТАЙПУАН БАЙОМАТИРИАЛЗ С.Р.Л.
(IT)

(72) Изобретатель:
Сальваторе Лука, Лауренца Массимо
(IT)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение, в частности, относится к порошку гидролизованного коллагена, обладающему специфическими характеристиками, к способу его получения и к его применению в терапии.



A1

202490234

202490234

A1

ПОРОШОК КОЛЛАГЕНА, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к порошку гидролизованного коллагена, имеющему специфические характеристики, к способу его получения и к его применению в терапии и т.д.

Предшествующий уровень техники

Коллаген является преобладающим белком в соединительной ткани животных, включая человека, и является наиболее распространенным белком у млекопитающих (примерно 25% от общей массы белка), составляющим около 6% массы тела человека, и содержится во всех поддерживающих структурах, таких как связки, мышцы, суставы, синовиальные оболочки, хрящи, кости и кожа.

Коллаген состоит из волокон, ориентированных параллельно друг другу таким образом, чтобы гарантировать хорошую механическую поддержку, а также высокую прочность на растяжение.

Существует несколько типов коллагена; коллаген «I типа» составляет 90% от общего количества коллагена и участвует в составе основных соединительных тканей, таких как кожа, сухожилия, кости и роговица. Структурная единица коллагена представлена тропоколлагеном, который представляет собой белок массой примерно 285 кДа, образованный тремя левозакрученными полипептидными цепями, которые объединяются, образуя правозакрученную тройную спираль.

С возрастом количество коллагена в тканях организма уменьшается, в то время как различные заболевания и некоторые травмы могут изменить состав коллагеновых волокон, что приводит к дегенерации соединительных тканей и снижению прочности на растяжение. Синовиальные оболочки и сухожилия становятся хрупкими, менее устойчивыми к растяжению, а хрящ истончается или даже полностью исчезает. Применение и инъекции коллагена могут замедлить этот процесс, а в некоторых случаях ускорить регенерацию после травмы. Коллагеновые инъекции применяют при мышечных травмах и повреждениях суставно-связочной системы (например, растяжениях мышц или связок), при процессах дегенерации суставов, позвонков и сухожилий, например, при тендините.

Различные добавки, кремы и порошки, содержащие коллаген, коммерчески доступны для различных применений, от фармацевтического до пищевого. Однако все еще существует потребность в создании новых композиций на основе коллагена, которые являются универсальными и позволяют использовать его в широком диапазоне

применения.

Задачи, решаемые изобретением

Задачей изобретения является получение нового порошка гидролизованного коллагена, имеющего определенный размер частиц.

Другой задачей изобретения является получение нового порошка гидролизованного коллагена, где указанный коллаген состоит из олигомеров, имеющих определенные молекулярные массы.

Другой задачей изобретения является создание фармацевтических и нутрацевтических композиций, содержащих указанный коллагеновый порошок.

Другой задачей изобретения является создание медицинских устройств для введения указанного коллагенового порошка и/или композиций, содержащих его.

Дополнительной задачей изобретения является обеспечение применения в терапии указанного коллагенового порошка и/или фармацевтических композиций, содержащих его.

Наконец, другой задачей изобретения является обеспечение нутрацевтического и/или косметического применения коллагенового порошка по изобретению.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано распределение частиц коллагенового порошка по размерам в Примере 1 в виде логарифмического (колоколообразная кривая) и кумулятивного процентного распределения.

На фиг. 2 показаны экспериментальные численные данные распределения частиц по размерам с фиг. 1.

На фиг. 3 показан структурированный подход к выбору способа получения образца [Выдержка из стандарта ISO 10993-3:2014].

Описание изобретения

Согласно одному из аспектов, объектом изобретения является порошок гидролизованного коллагена, далее также просто «коллагеновый порошок»), имеющий следующее распределение частиц по размерам:

- не более 10% частиц имеют средний диаметр ($d_{0,1}$) менее 2,5 микрон;
- по меньшей мере 50% частиц имеют средний диаметр ($d_{0,5}$) менее 10 микрон;
- по меньшей мере 90% частиц имеют средний диаметр ($d_{0,9}$) менее 20 микрон.

Средний диаметр здесь означает средний диаметр одиночной частицы коллагена, полученной описанным ниже способом, форма которой в первом приближении сопоставима со сферой.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, в порошке коллагена по

изобретению 100% частиц имеют средний диаметр от 0,5 до 50 микрон, предпочтительно от 0,6 до 40 микрон.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, в порошке коллагена по изобретению, имеющем указанный выше размер частиц, олигопептиды коллагена характеризуются следующими молекулярными массами:

- по меньшей мере 30% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 80 до 120 кДа;
- по меньшей мере 25% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 50 до 70 кДа;
- по меньшей мере 25% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 25 до 45 кДа;
- по меньшей мере 85% указанного коллагена имеет молекулярную массу от 25 до 120 кДа.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, в порошке коллагена по изобретению, имеющем указанный выше размер частиц, олигопептиды коллагена характеризуются следующими молекулярными массами:

- по меньшей мере 30% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 80 до 120 кДа;
- по меньшей мере 25% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 50 до 70 кДа;
- по меньшей мере 25% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 25 до 45 кДа;
- по меньшей мере 14,5% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 100 до 110 кДа;
- по меньшей мере 11,5% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 80 до 90 кДа;
- по меньшей мере 8,0% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 40 до 45 кДа;
- по меньшей мере 85% указанного коллагена имеет молекулярную массу от 25 до 120 кДа.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, в порошке коллагена по изобретению, имеющем указанный выше размер частиц, олигопептиды коллагена характеризуются следующими молекулярными массами:

- по меньшей мере 3,0% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу примерно 120 кДа;

- по меньшей мере 14,5% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 100 до 110 кДа;
- по меньшей мере 11,5% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 80 до 90 кДа;
- по меньшей мере 7,0% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу примерно 70 кДа;
- по меньшей мере 8,0% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу примерно 60 кДа;
- по меньшей мере 10,5% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу примерно 50 кДа;
- по меньшей мере 8,0% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 40 до 45 кДа;
- по меньшей мере 9,5% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу примерно 35 кДа;
- по меньшей мере 6,5% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу примерно 25 кДа;
- по меньшей мере 85% указанного коллагена имеет молекулярную массу от 25 до 120 кДа.

Молекулярные массы определяли с помощью электрофореза белков. Электрофорез белков является широко используемым аналитическим методом для анализа белковых экстрактов и их целостности. Оборудование и условия, используемые для оценки молекулярных масс с помощью электрофореза белков, изложены в экспериментальном разделе ниже.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, порошок гидролизованного коллагена по изобретению получают путем протеолиза из ателоколлагена, который, в свою очередь, получают путем удаления телопептидных концов коллагена I типа. Предпочтительно, коллаген по изобретению имеет лошадиное происхождение. Предпочтительно биологической тканью лошади, из которой извлекают коллаген, является сухожилие, в частности сухожилие сгибателя.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, коллагеновый порошок по изобретению показывает распределение частиц по размерам, представленное на фиг. 1.

Согласно другому из его аспектов, предметом изобретения является способ получения коллагенового порошка по изобретению, который включает:

- (i) суспендирование коллагена типа I, лишённого телопептидных фракций, в подкисленной воде и обеспечение его протеолиза; и

(ii) сушку указанного коллагена в микронизированной форме.

На стадии (i) концентрированные кислотные суспензии коллагена, имеющие массовую концентрацию от 3% до 5% (масс./об.) коллагена, инкубируют с протеолитическими ферментами, такими как пепсин, для модуляции молекулярных масс полипептидных цепей коллагена. На этой стадии макромолекулы коллагена (т.е. тройные спирали) частично неструктурированы и раскрываются. Такая обработка повышает его биодоступность, биоабсорбцию. Затем суспензию распыляют в виде аэрозоля, который затем быстро сушат с получением порошка; этот способ известен в промышленной практике как «распылительная сушка».

В качестве примера, протеолиз может быть осуществлен с использованием кислотного раствора, такого как уксусная кислота в деминерализованной воде, при pH между 3,0 и 4,0, содержащего 1,0-10,0 (масс.%) пепсина (масса пепсина/массу коллаген) при температуре примерно 37°C, в течение несколько часов, например, 2-24 часов.

В качестве альтернативы для получения порошка коллагена по изобретению могут быть использованы другие способы.

Порошок коллагена по изобретению доказал свою особую эффективность при различных применениях, таких как, например, в качестве пищевой добавки, в косметологии и в области медицины. В частности, было обнаружено, что его характерное распределение по молекулярной массе способствует превосходной регенерации на уровне кожи и слизистых оболочек.

Для его применения коллагеновый порошок по изобретению может быть использован как таковой, или при необходимости, после соответствующей стерилизационной обработки (например, с использованием β - или γ -облучения, согласно известным методикам). Например, коллагеновый порошок по изобретению можно распылять или наносить на раны, ожоги, язвы и т.п., или, альтернативно, его можно вводить в фармацевтическую, нутрацевтическую или косметическую композицию, или включать в медицинские устройства.

«Фармацевтическая, нутрацевтическая или косметическая композиция» означает композицию, содержащую порошок коллагена по изобретению в сочетании по меньшей мере с одним носителем, приемлемым для применения, для которого предназначена такая композиция. «Фармацевтически приемлемый носитель» включает разбавители, консерванты, наполнители, дезинтегранты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, отдушки, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, смазки и средства для дозирования. Описания фармацевтически приемлемых носителей и факторов, участвующих в их выборе, известны

в данной области техники.

В зависимости от применения, для которого предназначена композиция по изобретению, она может быть жидкой или твердой, или может быть приготовлена в виде гелей, кремов, мазей, паст и т.п., которые также могут быть стерильными, если требуется, например, в случае препаратов для инъекций или препаратов для использования на открытых ранах.

Как указано, коллагеновый порошок по изобретению также может быть использован в сочетании с медицинскими устройствами, такими как, среди прочего, медикаментозные пластыри и марли для лечения ран, ожогов и язв любой природы, или он может быть упакован в виде стерильного раствора в предварительно заполненные шприцы.

Использование порошка коллагена по изобретению или композиций, содержащих его, в терапии, в косметике и в качестве пищевой добавки составляет дальнейший предмет изобретения.

В качестве примера, коллагеновый порошок по изобретению может быть использован для лечения ран и язв путем непосредственного нанесения или с помощью медицинских устройств, или его можно использовать для лечения заболеваний суставов, например, путем инъекции, для лечения интерстициального цистита, например, путем инъекции вязких и/или адгезивных композиций, для вагинального применения, например, при лечении вульвовагинита, и т.д.

Коллагеновый порошок по изобретению также может быть использован для регенерации и биоревитализации кожи и для восполнения вязкости и регенерации синовиальной оболочки в случаях костно-хрящевого повреждения.

Фактически, коллагеновый порошок по изобретению очень полезен для профилактики и лечения старения кожи и может применяться в виде кремов, лосьонов, гелей и т.п. или вводиться под кожу в качестве филлера, например, среди прочего, для разглаживания морщин или для решения других эстетических проблем.

Как указано, коллагеновый порошок по изобретению также можно принимать перорально в качестве пищевой добавки или включать в косметические композиции.

Композиция по изобретению может содержать, в дополнение к порошку по изобретению и любым подходящим носителям и добавкам, другие активные ингредиенты, такие как гиалуроновая кислота или ее соли, например, гиалуронат натрия, различной молекулярной массы, хондроитин или его соли, например, хондроитин сульфат, пробиотики, пребиотики, постбиотики, витамины, такие как витамин С, противомикробные средства, такие как серебро, и тому подобное.

Согласно другому из его аспектов, предметом изобретения является способ лечения язв, ожогов или ран, заболеваний суставов, старения кожи, интерстициального цистита и вульвовагинита, который включает введение эффективного количества порошка или композиции по изобретению индивидууму, нуждающемуся в этом.

Индивидуум, получающий порошок или композицию по изобретению, как правило, является млекопитающим, включая людей, но не ограничиваясь ими.

Изобретение далее будет подробно описано в следующих примерах в иллюстративных целях, но не для ограничения.

Экспериментальный раздел

Оборудование и условия анализа размера частиц приведены ниже:

Материал:	Порошок коллагена
Оборудование:	Hydro 2000S (A)
Показатель преломления:	1,6
Поглощение:	0,01
Диапазон размеров:	0,02-2000 мкм
Диспергатор:	Тегилоксан
Скорость перемешивания:	2800 об/мин
Концентрация:	0,0171 об.%
Диапазон:	1,778
Единица:	Объем

Оборудование и условия для определения молекулярных масс методом электрофореза белков приведены ниже:

Электрофоретический аппарат Mini-Protean Tetra Cell (BioRad Laboratories, Inc.) с полиакриламидным гелем. Полиакриламидный гель готовили вручную (8% разделительный гель, 5% концентрирующий гель) с использованием раствора акриламида/бисакриламида в соотношении 37,5:1. Образцы массой примерно 5 мг суспендировали в 0,2 мл 0,5 М уксусной кислоты. Затем к каждому образцу добавляли восстанавливающий раствор (0,1 мл), состоящий из буфера Лэммли (62,5 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 10% глицерина, 2% ДСН, 0,01% бромфенолового синего, 5% β-меркаптоэтанол) и 2 М мочевины (0,1 мл). Все образцы подвергали термической обработке при 50°C в течение 1 часа, а затем подвергали центрифугированию в течение 1 минуты при 10000 об/мин. В каждую электрофоретическую лунку добавляли приблизительно 5-15 мкл надосадочной жидкости. Для правильного определения молекулярных масс белков с неизвестными молекулярными массами были также использованы белковые стандарты с точными молекулярными массами (маркеры) от 10 до 250 кДа. Электрофорез проводили

при 70 В течение примерно 10 минут в концентрирующем геле и при 120 В течение примерно 2 часов в разделительном геле. В конце электрофоретического цикла гель погружали в фиксирующий раствор на основе Кумасси (0,125% Coomassie Blue R 250, 40% метанола, 10% уксусной кислоты) на 1 час. Наконец, гель погружали в обесцвечивающий раствор (40% метанол, 10% уксусная кислота) на ночь при температуре 4°C и фиксировали.

Примеры

Пример 1

Способ получения коллагенового порошка по изобретению

Точное количество гомогенизированных неочищенных коллагеновых волокон переносят в контейнер лабораторного миксера, внутрь которого затем добавляют раствор АсОН (1,5%) в деионизированной воде (в соотношении 0,25 мл АсОН на грамм коллагена) для получения коллагеновой суспензии с концентрацией 3% масса/объем. Суспензию перемешивают не менее 1 часа при 50 об/мин при комнатной температуре. Полученный гель помещают во второй миксер и дополнительно перемешивают при 200 об/мин в течение 1 часа при температуре 37°C. На этом этапе в гель для смешивания добавляют протеолитический раствор пепсина (5% от массы коллагена) в АсОН (0,07%), и систему выдерживают при перемешивании (200 об/мин) при температуре 37°C в течение 4 часов. По окончании ферментативной инкубации коллагеновый гель сушат методом «распылительной сушки». Наконец, полученный таким образом микрометрический порошок дополнительно сушат методом «воздушной сушки» в течение 12 часов при комнатной температуре и хранят для дальнейшей обработки.

Полученный таким образом порошок имеет размер частиц, указанный на фиг. 1, экспериментальные данные которого приведены в таблице на фиг. 2.

Пример 2

Раствор для инъекций готовят в предварительно заполненных шприцах, содержащих на каждый шприц объемом 50 мл 80 мг порошка коллагена из Примера 1, водно-солевой раствор, гиалуроновую кислоту, хондроитинсульфат, буферы до pH 4,5.

Пример 3

Готовят лечебную марлю, содержащую 20 мг порошка коллагена из Примера 1, смешанного с 2%/г/25 см³ водного раствора глицерина.

Пример 4

Смесь из 100 мг порошка коллагена из Примера 1, добавленного с рисовым или кукурузным крахмалом, смесью триглицеридов, изопропанола и медицинского вазелина, готовят для получения композиции для распыления - содержание 10 г в баллончиках с

распылителем объемом 100 мл.

Пример 5

Готовят основу из медицинского силикона с высокой пористостью, объединенную с тонким слоем коллагеновой фольги, загруженной 100 мг порошка коллагена из Примера 1 на площадь 100 см².

Пример 6

Готовят раствор продукта для вагинального орошения в ампулах, содержащих на каждую ампулу объемом 10 мл 10 мг порошка коллагена из Примера 1, водно-солевой раствор и, в зависимости от необходимых рекомендаций по применению, один или несколько компонентов, выбранных из пробиотиков, постбиотиков и пребиотиков; буферный раствор до pH 4,5 добавляют в полученную композицию.

Пример 7

Раствор продукта готовят в вагинальных овулах, содержащих 5 мг коллагенового порошка из Примера 1, воду, глицерин, молочную кислоту и, в зависимости от необходимых рекомендаций по применению, один или несколько компонентов, выбранных из пробиотиков, постбиотиков и пребиотиков.

Пример 8

Готовят флакон с 80 мг порошка из Примера 1, который будет использоваться для регенерации/биоревитализации кожи. Перед использованием порошок следует разбавить водой для инъекций.

Пример 9

Готовят флакон с 80 мг порошка из Примера 1, который будет использоваться для восполнения вязкости и регенерации синовиальной оболочки в случаях костно-хрящевого повреждения. Перед использованием порошок следует разбавить водой для инъекций.

Экспериментальные тесты

Коллаген по изобретению был подвергнут нескольким экспериментальным испытаниям.

Тестируемый продукт в настоящей заявке ниже упоминается как «BIO ACTIVE COLL», который представляет собой порошок коллагена типа I, полученный способом по изобретению, Пример 1.

Экспериментальный тест 1

Тестирование цитотоксичности «BIO ACTIVE COLL» методом прямого контакта

Краткое описание

Было проведено токсикологическое испытание тестируемого продукта «BIO ACTIVE COLL» с целью оценки цитотоксического эффекта.

Был проведен следующий тест:

- цитотоксичность методом прямого контакта в соответствии со стандартом ISO 10993-5:2009.

Для проведения испытания использовали субконфлюентную культуру клеток BALB/3T3 в экспоненциальной фазе роста.

Тестируемый образец наносили на монослой клеток BALB/3T3 и инкубировали при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере $(5\pm 1)\%$ CO_2 в течение 24 часов.

Качественную оценку проводили, наблюдая за культурой клеток с помощью инвертированного микроскопа, в то время как количественную оценку проводили с использованием метода поглощения красителя нейтрального красного (NRU).

NRU - это метод оценки жизнеспособности клеток с использованием их способности поглощать и связывать краситель, предназначенный для определения жизнеспособности клеток, нейтральный красный.

Качественная оценка

После инкубации клетки исследовали под световым микроскопом для оценки биологических реакций.

После 24 часов контакта в клетках, обработанных тестируемым образцом, не наблюдалось заметной зоны вокруг образца или под ним (степень реактивности 0).

Количественная оценка

После качественной оценки клетки обрабатывали в течение 3 часов средой, содержащей краситель для определения жизнеспособности клеток, а затем десорбирующим раствором, который позволяет получить клеточный лизат. Затем рассчитывали оптическую плотность после спектрофотометрического анализа при 540 нм.

Клетки, обработанные тестируемым образцом, показали снижение жизнеспособности клеток на 3%.

На основании результатов, интерпретированных в соответствии со стандартом ISO 10993-5:2009, тестируемый продукт «BIO ACTIVE COLL» следует считать не цитотоксичным.

Библиография

- ISO 10993-5:2009 Биологическая оценка медицинских изделий, часть 5: Испытания на цитотоксичность *in vitro*.

Экспериментирование

Отчет об эксперименте

Eurofins Biolab аккредитована ACCREDIA («Ente Italiano di Accreditamento») в соответствии с UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Применяемый метод испытаний, описанный в

этом документе, включен в список аккредитованных испытаний (см. <http://www.eurofins.it/pharma/accreditamenti/>).

Характеристика

Фибробласты млекопитающих BALB/3T3 клон А31 (ATCC® CCL163™).

Источник: ATCC.

Обоснование системы анализа

Фибробласты млекопитающих BALB/3T3 были использованы для этого испытания в соответствии с рекомендациями ISO 10993-5:2009, Приложение А.

Материалы и оборудование

Среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM), физиологический раствор с фосфатным буфером по Дульбекко (DPBS), пенициллин-стрептомицин (Pen-Strep, P/S), эмбриональная телячья сыворотка (FBS), вода для инъекций (WFJ), ледяная уксусная кислота, краситель нейтральный красный (NR), этанол (EtOH), трипсин, ЭДТА, краситель трипановый синий.

Обычное лабораторное оборудование, ламинарно-поточная рабочая зона с вытяжкой, защищенная от биологической опасности

Инвертированный микроскоп, ридер микропланшетов Diavert, CO₂ инкубатор, орбитальный шейкер, хронометр, холодильник

Инертная 6 мм фильтровальная бумага Whatman

Контроли

Физиологический раствор с фосфатным буфером Дульбекко (DPBS, отрицательный контроль)*, додецилсульфат натрия (SDS/SLS, положительный контроль)*

*наносили на 6 мм инертную фильтровальную бумагу Whatman

Среды	DMEM 10% FBS
Обычная питательная среда: (питательная среда с добавками)	100 Ед/мл пеницилина 100 Ед/мл стрептомицина
Исходный раствор нейтрального красного (4 мг\мл)	0,4 г красителя нейтрального красного на 100 мл воды для инъекций
Среда с нейтральным красным (0,05 мг/мл)	Исходный раствор нейтрального красного в DMEM (1:80)
Раствор этанола/уксусной кислоты: (раствор для отмывания от нейтрального красного)	Ледяная уксусная кислота (1 об.%) Этанол (50 об.%) Вода для инъекций (45 об.%)

Экспериментальный дизайн

Подготовка планшетов

Из культуры фибробластов млекопитающих BALB/3T3 готовили суспензию 1×10^5 клеток/мл и разливали в два 12-луночных планшета, разделяя на следующие группы (в трех повторях).

ГРУППЫ НА ПЛАНШЕТЕ №1				ГРУППЫ НА ПЛАНШЕТЕ №2			
Холостая проба	Контрольный раствор	Отрицательный контроль	Опытный образец	Холостая проба	Контрольный раствор	Положительный контроль	Опытный образец
Холостая проба	Контрольный раствор	Отрицательный контроль	Опытный образец	Холостая проба	Контрольный раствор	Положительный контроль	Опытный образец
Холостая проба	Контрольный раствор	Отрицательный контроль	Опытный образец	Холостая проба	Контрольный раствор	Положительный контроль	Опытный образец

- 1,2 мл клеточной суспензии ($1,2 \times 10^5$ клеток/лунку) вносили пипеткой в лунки для контрольного раствора, отрицательного/положительного контроля и опытных образцов.

- 1,2 мл одной питательной среды с добавками (без клеток) вносили пипеткой в лунки с холостой пробой.

Два планшета инкубировали при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере $(5 \pm 1)\% \text{CO}_2$, обеспечивая осаждение клеток и образование субконфлюентного монослоя.

Обработка

Через 24 часа после посева клеток наблюдали за планшетами, чтобы убедиться в наличии субконфлюентного монослоя (конфлюентность примерно 80%).

Питательную среду с добавками заменяли свежей из расчета 1,2 мл/лунку.

Лунки для холостой пробы, контрольного раствора, отрицательного/положительного контроля и опытных образцов обрабатывали следующим образом:

Холостая проба:

Только питательная среда с добавками (без клеток). [6 повторов].

Контрольный раствор

Питательную среду с добавками с инертной фильтровальной бумагой помещали в середину каждой лунки [6 повторов].

Препарат опытного образца

По запросу Спонсора порошок, содержащийся во флаконе (80 мг), суспендировали с 2 мл WFI до достижения концентрации 40 мг/мл.

50 мкл тестируемого образца наносили на инертную фильтровальную бумагу, помещенную затем в середину каждой лунки [3 повтора].

Препарат отрицательного контроля

Отрицательный контроль представлял собой 50 мкл DPBS, нанесенной на инертную фильтровальную бумагу, помещенную в середину каждой лунки [3 повтора].

Препарат положительного контроля

Положительный контроль был представлен 50 мкл 0,4% раствора SOS/SLS, нанесенного на инертную фильтровальную бумагу, помещенную в середину каждой

лунки [3 повтора].

Затем планшеты инкубировали в термостате при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере $(5 \pm 1)\%$ CO_2 в течение 24 часов.

По истечении этого времени контакта планшеты анализировали под инвертированным микроскопом и оценивали биологические реакции по шкале от 0 до 4 в соответствии со стандартом ISO 10993-5:2009. Каждую лунку опорожняли, промывали DPBS и обрабатывали 1200 мкл среды с нейтральным красным в течение 3 часов при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере $(5 \pm 1)\%$ CO_2 . После этого каждую лунку промывали DPBS, полностью осушали, а затем обрабатывали 1800 мкл раствора для десорбции NR. Планшет подвергали перемешиванию в течение не менее 15 минут для гомогенизации раствора.

Поглощение полученного раствора измеряли при 540 нм с помощью ридера для микропланшетов.

Наблюдения

Качественная оценка

Биологическую реактивность (дегенерацию клеток и деформации) оценивали после 24 часов инкубации по шкале от 0 до 4 в соответствии со стандартом ISO 10993-5, как показано в следующей таблице:

Степень	Реактивность	Описание зоны реактивности
0	Нет	Нет обнаруживаемой зоны вокруг образца или под ним
1	Слабая	Незначительное количество деформированных или дегенерированных клеток под образцом
2	Умеренная	Зона, ограниченная областью под образцом
3	Средняя	Зона, выходящая за размер образца до 1,0 см
4	Высокая	Зона, выходящая более чем на 1,0 см за пределы образца

Количественная оценка

Оптическую плотность измеряли при 540 нм (Gen5 - Biotek). Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ жизнеспособности клеток} = \frac{\text{ОП}_{\text{тестированного препарата}} - \text{ОП}_{\text{жизнеспособные клетки}}}{\text{ОП}_{\text{клеточный растворитель}} - \text{ОП}_{\text{жизнеспособные клетки}}} \times 100$$

Интерпретация результатов

Качественная оценка

Достижение числовой оценки более 2 считалось цитотоксическим эффектом.

Количественная оценка

Снижение жизнеспособности клеток $>30\%$ считалось цитотоксическим эффектом.

Критерии приемлемости

Качественная оценка

Контрольный раствор = 0

Отрицательный контроль = 0

Положительный контроль ≥ 3

Количественная оценка

Среднее значение ОП контрольного раствора должно составлять $\geq 0,3$.

Отрицательный контроль - % жизнеспособности клеток должен составлять $\geq 90\%$.

Положительный контроль - % жизнеспособности клеток должен составлять $< 70\%$.

Коэффициент вариации в каждой группе должен составлять $\leq 15\%$.

Выводы

На основании результатов, интерпретированных в соответствии со стандартом ISO 10993-5:2009, тестируемый продукт «BIO ACTIVE COLL» признан не цитотоксичным.

Экспериментальный тест 2

Тест «BIO ACTIVE COLL» на гиперчувствительность замедленного типа

Краткое описание

Для тестируемого продукта «BIO ACTIVE COLL» была проведена биологическая оценка, направленная на выявление его потенциальных сенсibiliзирующих эффектов с помощью следующего теста:

- Тест на гиперчувствительность замедленного типа (GPMТ-тест) в соответствии со стандартом ISO 10993-10:2021.

В максимизационной сенсibiliзирующей пробе на морских свинках было использовано 15 морских свинок для основного испытания, 10 из которых получали тестируемое вещество, 5 были использованы в качестве контрольной группы и 3 для предварительного теста.

Максимизационная проба состоит из предварительного теста, фазы индукции и теста-провокации.

Предварительное испытание

Предварительный тест предназначен для определения концентрации исследуемого образца, который будет использоваться в основном тесте.

Для фазы местной индукции была выбрана самая высокая концентрация, которая вызывает легкую или умеренную эритему, но в остальном не оказывает неблагоприятного воздействия на животное. Для фазы провокации была выбрана самая высокая концентрация, которая не вызывает эритемы.

Чтобы выбрать разведение образца, четыре окклюзионных пластыря с 0,5 мл неразбавленного образца и разбавленного образца (90%, 80% и 70% в растворе хлорида натрия для инъекций) были нанесены на спину еще трем животным. Повязку оставляли на месте на 24 часа.

Основной тест

Фаза индукции

Морским свинкам сделали 3 пары интрадермальных инъекций (каждая доза по 0,1 мл), разделенных таким образом:

1-я – стабильная эмульсия полного адьюванта Фрейнда (FCA) в растворе хлорида натрия для инъекций 50:50 (об:об);

2-я – тестируемый образец для опытных животных, раствор хлорида натрия для инъекций для контрольных животных;

3-я – тестируемый образец, разбавленный 50:50 (об:об) стабильной эмульсией FCA и раствором хлорида натрия для инъекций (50%) для опытных животных, раствор хлорида натрия для инъекций, разведенный 50:50 (об:об) стабильной эмульсией FCA в растворе хлорида натрия для инъекций (50%) для контрольных животных.

Через 6 дней после выполнения интрадермальных инъекций – у опытных и контрольных животных – у всех животных местно применяли путем втирания 0,5 мл 10% раствора лаурилсульфата натрия в вазелине.

Через 7 дней после выполнения интрадермальных инъекций 0,5 мл тестируемого образца на животное наносили на кожу 10 опытных животных на 48 часов.

Такую же обработку проводили в контрольной группе с использованием хлорида натрия для инъекций.

Тест-провокация

Через 13 дней после фазы местной индукции у всех животных, как опытных, так и контрольных, был проведен тест-провокация путем нанесения 0,5 мл тестируемого образца на правый бок и 0,5 мл хлорида натрия для инъекций на левый бок. Повязку оставляли на 24 часа.

Через 48 и 72 часа после начала теста-провокации оценивали реакции как у опытных, так и контрольных животных.

У животных, получавших тестируемый образец, не наблюдалось никаких отклонений. У контрольных животных не наблюдалось никаких отклонений.

На основании результатов, интерпретированных в соответствии со стандартом ISO 10993-10, тестируемый продукт «BIO ACTIVE COLL» следует считать не вызывающим сенсibilизации.

Введение

Это исследование было проведено в испытательном центре Eurofins Biolab S.r.l. от имени Спонсора на тестируемом продукте «BIO ACTIVE COLL».

Библиография

-ISO 10993-10:2021 Биологическая оценка медицинских изделий, часть 10: Тесты на сенсibilизацию кожи

- ISO 10993-2:2006 Биологическая оценка медицинских изделий: Часть 2: Требования к благополучию животных

Метод испытания

Характеристика	
Вид	Морские свинки-альбиносы
Штамм	Данкин-Хартли
Количество	15+3
Масса тела	Согласно ISO 10993-10, пункт 6.5.3, в начале испытания (300-500 г)
Возраст	Молодой
Пол	Самцы
Поставщик	Envigo - Bresso (MI) – Италия
Номер поставки	034
Корм	Серия 8GP22: 380001 (с 07/03/2022 по 27/03/2022) Серия 8GP22: 383201 (с 28/03/2022 по 31/03/2022)

Обоснование системы анализа

Для этого теста использовали морских свинок в соответствии с рекомендацией стандарта ISO 10993-10 – текущая редакция.

Карантин

Перед выделением для исследования животные содержались на карантине в соответствии с внутренней процедурой. В течение этого периода за ними ежедневно наблюдал ветеринар. По окончании периода карантина животные были тщательно осмотрены, чтобы оценить их пригодность для исследования.

Отбор животных

Животные, использованные в исследовании, были случайным образом отобраны из числа имеющихся на момент проведения исследования.

Содержание в клетках

Животных содержали в клетках в соответствии с внутренней процедурой.

Помещение для содержания освещалось люминесцентными лампами и поддерживалось в циклах по 12 часов света и 12 часов темноты. Температура и влажность в помещении регулировались установкой кондиционирования и контролировались ежедневно. Непрерывная регистрация условий содержания хранятся в файлах Eurofins Biolab S.r.l.

Уборка и дезинфекция

Клетки и помещение для содержания мыли перед размещением животных, затем периодически мыли и дезинфицировали.

Кормление

Животных кормили стандартным полноценным рационом в гранулах, поставляемым авторизованным заводчиком.

Подача воды

Отфильтрованная водопроводная вода из местной сети подавалась в неограниченном количестве

Идентификация животных

Животные были идентифицированы с помощью несмываемой окраски на различных участках тела как:

Хвост	(C)	3
Голова-хвост	(TC)	4
Правая передняя лапа	(ZAD)	5
Левая передняя лапа	(ZAS)	6
Правая задняя лапа	(ZPD)	7
Левая задняя лапа	(ZPS)	8
Живот	(P)	9
Голова-живот	(TP)	10

Предварительный тест

Предварительный тест был предназначен для определения концентрации исследуемого образца, который будет использоваться в основном тесте.

Для фазы местной индукции была выбрана самая высокая концентрация, которая вызывает легкую или умеренную эритему, но в остальном не оказывает неблагоприятного воздействия на животное. Для теста-провокации была выбрана самая высокая концентрация, которая не вызывает эритемы.

Чтобы выбрать разведение образца, четыре окклюзионных пластыря с 0,5 мл неразбавленного образца и разбавленного образца (90%, 80% и 70% в растворе хлорида натрия для инъекций) были нанесены на спину еще трех животных; шерсть была удалена за 24 часа до обработки.

Повязки оставляли на месте на 24 часа.

Результаты:

№ животного	24 часа после снятия пластыря			
	Неразбавленный (100%)	Разбавленный до 90%	Разбавленный до 80%	Разбавленный до 70%
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0

0 = Отсутствие симптомов

Через 24 часа после снятия повязки ни на одном из обработанных участков эритемы не наблюдалось.

Подготовка образца

Порошок, содержащийся во флаконе (80 мг), перед использованием суспендировали в 2 мл WFI (номер серии: 1902401) до достижения концентрации 40 мг/мл.

Схема эксперимента

Схема эксперимента состояла из одной группы из 10 опытных животных (группа 1), и одной группы из 5 контрольных животных (группа 2).

Животные были распределены на группы следующим образом:

Группа	Индукция		Провокация
	Интрадермальная инъекция	Местное применение	Провокация
1	1. Стабильная эмульсия полного адьюванта Фрейнда (FCA) в растворе хлорида натрия для инъекций 50:50 (об:об) 2. Опытный образец 3. Опытный образец, разбавленный 50:50 (об:об) стабильной эмульсией FCA в растворе хлорида натрия для инъекций (50%)	Опытный образец	Опытный образец
2	1. Стабильная эмульсия полного адьюванта Фрейнда (FCA) в растворе хлорида натрия для инъекций 50:50 (об:об) 2. Раствор хлорида натрия для инъекций 3. Раствор хлорида натрия для инъекций с добавлением 50:50 (об:об) стабильной эмульсии FCA в растворе хлорида натрия для инъекций (50%)	Хлорид натрия для инъекций	Опытный образец

Максимум 10 животных в каждой клетке; клетки были идентифицированы с помощью бирки.

Обработка

Основной тест состоял из фазы индукции и теста-провокации.

Подготовка кожи

Примерно за 7 часов до интрадермальной инъекции и примерно за 23 часа до местного применения фазы индукции шерсть удаляли путем выбривания участка шириной 50 см² в межлопаточной области животных.

Примерно за 23 часа до теста-провокации шерсть с обоих боков животных была удалена.

Введение

Фаза индукции

День 0 - опытная и контрольная группы

В межлопаточную область каждому животному были сделаны три пары интрадермальных инъекций по 0,1 мл с каждой стороны от средней линии в соответствии с планом эксперимента.

6-й день – опытная группа и контрольная группа

Через 6 дней после начала обработки всем животным наносили местно, слегка втирая 0,5 мл 10% лаурилсульфата натрия в вазелине.

7-й день - опытная и контрольная группа

Через 7 дней после интрадермальных инъекций каждому животному наносили по 0,5 мл тестируемого образца и удерживали на месте с помощью окклюзионного пластыря. Аппликацию наносили таким образом, чтобы покрыть места внутрикожных инъекций.

Повязку оставляли на месте на 48 часов.

Такую же обработку проводили в контрольной группе, с использованием хлорида натрия для инъекций вместо тестируемого вещества.

Тест-провокация

13-й день после фазы местной индукции – опытная группа и контрольная группа.

Окклюзионный пластырь с 0,5 мл тестируемого образца накладывали на правый бок всех 15 морских свинок, в то время как раствор хлорида натрия наносили на левый бок. Повязку оставили на месте на 24 часа.

Наблюдение

Через 24±2 и 48±2 часа после удаления пластырей у всех опытных и контрольных животных оценивали кожную реакцию.

Интенсивность эритемы и/или отека оценивали по следующей шкале (Magnusson and Kligman -18010993-10):

Реакция на патч-тест	Шкала оценки
Отсутствие видимых изменений	0
Дискретная или пятнистая эритема	1
Умеренная и сливающаяся эритема	2
Интенсивная эритема и отек	3

Интерпретация результатов

Как правило, показатели по шкале Magnusson and Kligman 1 или выше в тестируемой группе указывают на сенсibilизацию, при условии, что показатели менее 1 наблюдаются у контрольных животных. Если у контрольных животных отмечены оценки 1 или выше, предполагается, что реакции подопытных животных, превышающие наиболее тяжелую реакцию у контрольных животных, обусловлены сенсibilизацией.

Если ответ неоднозначен, рекомендуется повторное тестирование для подтверждения результатов первого тестирования. Результат теста представлен в виде частоты положительных результатов тестирования у опытных и контрольных животных.

Результаты

Кожные реакции у опытных животных после удаления пластыря провокационной фазы

№ животного	Время после удаления пластыря	
	24 часа	48 часов
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

У животных, получивших тестируемый образец, не наблюдалось никаких отклонений.

Кожные реакции у контрольных животных после удаления пластыря теста-провокации

№ животного	Время после удаления пластыря	
	24 часа	48 часов
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

У контрольных животных не наблюдалось никаких отклонений.

% сенсibilизированных морских свинок опытной группы: 0%

Выводы

На основании результатов, интерпретированных в соответствии со стандартом ISO 10993-10, тестируемый продукт «BIO ACTIVE COLL» следует считать не вызывающим сенсibilизации.

Экспериментальный тест 3

Тест «BIO ACTIVE COLL» на острую системную токсичность

Краткое описание

Для тестируемого продукта «BIO ACTIVE COLL» была проведена биологическая оценка его токсичности с помощью следующего теста:

- Испытание на системную токсичность в соответствии с ISO 10993-11:2017

Для проведения испытания на системную токсичность тестируемый образец

вводили интраперитонеально в дозе 50 мл/кг массы животного одной группе из 5 мышей.

Раствор хлорида натрия для инъекций использовали в качестве контроля и вводили тем же способом другой группе из 5 животных.

За животными наблюдали сразу после инъекции и через 4, 24, 48 и 72 часа. Регистрировали клинические признаки, системные эффекты и смертность.

Массу тела измеряли непосредственно перед инъекциями, через 24, 48 и 72 часа после инъекций.

Клинические симптомы

Ни у одного из опытных и контрольных животных токсических признаков или симптомов не наблюдалось.

Смертность

Ни у одного из опытных и контрольных животных не наблюдалось смерти.

Увеличение массы тела

Ни у одного из опытных и контрольных животных не было зарегистрировано снижения массы тела.

На основании результатов, интерпретированных в соответствии с ISO 10993-11:2017, тестируемый продукт «BIO ACTIVE COLL» НЕ ВЫЗЫВАЕТ токсических симптомов и удовлетворяет требованиям теста.

Метод тестирования

Вид:	Мыши
Штамм:	ICR (CD-1®)
Количество:	10 (5+5)
Пол:	Мужской
Масса тела:	17,2 - 19,5 г в начале теста
Возраст:	Молодые
Поставщик:	Charles River - Calco (LC) - Италия
Номер поставщика:	033
Корм:	4RF1, серия 382703
Подстилка:	PF3903, серия 70965

Обоснование системы анализа

Для этого теста использовали мышей в соответствии с рекомендациями стандарта ISO 10993-11 - текущая редакция.

Содержание в клетках

Животные содержались в клетках в соответствии с внутренней процедурой.

Помещение для содержания освещалось люминесцентными лампами 12 часов в

день. Температуру и влажность в помещении регулировали в соответствии с планом кондиционирования и постоянно контролировали. Записи об условиях содержания хранятся в файлах Eurofins Biolab S.r.l.

Уборка и дезинфекция

Клетки и помещение для содержания мыли перед размещением животных, затем периодически мыли и дезинфицировали.

Кормление

Животных кормили стандартным полноценным рационом в гранулах, поставляемым авторизованным заводчиком.

Подача воды

Отфильтрованную водопроводную воду из местной сети подавали в неограниченном количестве.

Идентификация животных

Каждое животное было идентифицировано с помощью несмываемого рисунка на разных частях тела:

Без знака	1
Голова	2
Спина	3
Хвост	4
Голова-хвост	5

Клетки были идентифицированы с помощью бирки.

Карантин

Перед использованием в данном испытании животных содержали на карантине в соответствии с внутренней процедурой. В течение этого периода за ними ежедневно наблюдали.

В конце периода карантина животные были тщательно осмотрены, чтобы оценить их пригодность для исследования.

Отбор животных

Животные, использованные для этого испытания, были случайным образом отобраны из числа подходящих и доступных на тот момент.

Схема эксперимента

Схема эксперимента включала 2 группы (1 опытная и 1 контрольная), каждая из которых состояла из пяти мышей-самцов. Животные были разделены на группы следующим образом:

Группа	Вводимая жидкость	Путь введения	Доза (мл/кг)	Количество животных
Опытная	Опытный образец	И/П	50	5
Контрольная	Натрия хлорид для инъекций	И/П	50	5

И/П - интраперитонеально

Подготовка образца

По запросу Спонсора порошок, содержащийся во флаконе (80 мг), был разбавлен 2 мл WFI до достижения концентрации 40 мг/мл перед использованием.

Обработка

Животным вводили однократную инъекцию тестируемого образца (опытные группы) и инъекцию хлорида натрия (контрольные группы) в дозе 50 мл/кг.

Измерение массы тела

Массу тела всех животных измеряли непосредственно перед инъекциями, через 24, 48 и 72 часа после инъекций.

Наблюдения

За всеми животными наблюдали после инъекции и через 4, 24, 48 и 72 часа.

Возможные клинические признаки (время начала, степень и продолжительность) и/или возможную смертность регистрировали для каждого животного.

У животных оценивали следующие системные эффекты: тремор, ошетиивание шерсти, диарея, боль в животе, слюнотечение, угнетение чувствительности, состояние возбуждения, полипноэ, гипопноэ, тахикардию, цианоз, атаксию, судороги, носовое кровотечение.

Были зарегистрированы другие клинические признаки, описанные в стандарте ISO 10993-11, приложение С (если они присутствуют).

Интерпретация результатов

Условия испытания выполняются, если ни одно из животных, получавших образец, не проявляет значительно большей биологической реактивности, чем контрольная группа.

Если у кого-либо из животных, получавших образец, проявляются незначительные признаки биологической реактивности, и не более чем у одного животного проявляются грубые симптомы биологической реактивности или оно умирает, тест необходимо повторить с использованием групп по 10 мышей.

Условия повторного теста выполняются, если в течение периода наблюдения ни одно из животных, получавших образец, не проявляет биологической реактивности, большей, чем животные в контрольной группе.

Если две или более мышей умирают, если у двух или более мышей проявляются

аномальные симптомы в виде судорог или слабости, или если потеря массы тела превышает 10% у 3 или более животных, тестируемое вещество не удовлетворяет требованиям теста.

Результаты

Масса тела и клинические симптомы животных, получавших 50 мл/кг тестируемого образца

№ животного	Исходная масса (г)	Итоговая масса Г)	Клинические симптомы (часы)				
			0	4	24	48	72
1	17,2	21,0	0	0	0	0	0
2	18,4	22,2	0	0	0	0	0
3	17,2	20,3	0	0	0	0	0
4	17,3	21,0	0	0	0	0	0
5	17,4	21,7	0	0	0	0	0

0: Нет симптомов, 1: тремор, 2: выпадение волос, 3: диарея, 4: боль в животе, 5: слюнотечение, 6: угнетение чувствительности, 7: состояние возбуждения, 8: полипноэ, 9: гипопноэ, 10: тахикардия, 11: цианоз, 12: атаксия, 13: судороги, 14: носовое кровотечение, М: смерть.

Масса тела и клинические симптомы животных, получавших 50 мл/кг хлопкового масла

№ животного	Исходная масса (г)	Итоговая масса Г)	Клинические симптомы (часы)				
			0	4	24	48	72
1	18,0	21,5	0	0	0	0	0
2	18,1	20,7	0	0	0	0	0
3	17,2	19,8	0	0	0	0	0
4	17,7	22,2	0	0	0	0	0
5	19,5	21,9	0	0	0	0	0

0: Нет симптомов, 1: тремор, 2: выпадение волос, 3: диарея, 4: боль в животе, 5: слюнотечение, 6: угнетение чувствительности, 7: состояние возбуждения, 8: полипноэ, 9: гипопноэ, 10: тахикардия, 11: цианоз, 12: атаксия, 13: судороги, 14: носовое кровотечение, М: смерть.

Обсуждение результатов

Увеличение массы тела

Ни у одного обработанного и контрольного животного не было зарегистрировано снижения массы тела.

Смертность

Ни у одного из опытных и контрольных животных смерти не наблюдалось.

Клинические симптомы

Ни у одного из опытных и контрольных животных токсических признаков или симптомов не наблюдалось.

Выводы

На основании результатов, интерпретированных в соответствии с ISO 10993-11:2017, тестируемый продукт «BIO ACTIVE COLL» не вызывает токсических симптомов и удовлетворяет требованиям теста.

Экспериментальный тест 4

Обоснование анализа пирогенности, опосредованной материалом, для «BIO ACTIVE COLL».

Объем

Цель этого документа - предоставить обоснование конечной точки пирогенности, опосредованной материалом, для препарата Bio Active Coll.

Введение

Пирогенность входит в число биологических конечных точек, предлагаемых для оценки в контексте биологической оценки медицинского изделия в соответствии со стандартом ISO 10993-1:2018.

Стандарт ISO 10993-11:2017 описывает подход, который следует использовать для оценки пирогенности медицинских изделий, и гласит, что «Пирогенность - это способность химического агента или другого вещества вызывать лихорадочную реакцию. Пирогенные реакции могут быть опосредованы материалом, эндотоксином или другими веществами, такими как компоненты грамположительных бактерий и грибов».

Согласно определению стандарта ISO 10993-11:2017, для выявления пирогенности медицинских изделий, обусловленной материалом, рекомендуется испытание на пирогенность на кроликах. Испытание следует проводить в соответствии с методом, описанным в Фармакопее Соединенных Штатов, Европейской фармакопее и Японской фармакопее.

Описание препарата

Основываясь на информации, предоставленной Спонсором, «Bio Active Coll – TYPE 1 PROFIL» предназначен для регенерации дермальных и субдермальных кожных тканей. Препарат предназначен для местного нанесения на кожу.

Препарат представляет собой водорастворимый стерильный порошок, изготовленный из коллагена (тип I) лошадиного происхождения. Во время использования препарат должен быть растворен в воде для инъекций или физиологическом растворе в концентрации 20-40 мг/мл.

Препарат поставляется во флаконах, содержащих 80 мг порошка.

Оценка пирогенности, опосредованной материалом, для «Bio Active Coll»

Согласно USP <151>, тест следует проводить с использованием экстракта из

препарата, который следует ввести в ушную вену 3 кроликам.

Этот тест не проводился на препарате и не планировался, учитывая его характеристики (смесь на основе вещества - коллагена лошадиного происхождения), чтобы избежать какой-либо боли, страданий, дистресса или длительного вреда животным в соответствии с требованиями стандарта ISO 10993-2:2006.

Фактически, из-за физической природы оцениваемого медицинского препарата требуемая внутривенная инъекция кролику (в соответствии со стандартом ISO 10993-11 и USP <151>) имеет высокую вероятность привести к смерти животного и страданиям животного без получения соответствующих данных, которые можно использовать для характеристики потенциального риска пирогенности, связанного с составляющими компонентами препарата. Следовательно, в целях благополучия животных крайне нецелесообразно и не рекомендуется проводить тест на пирогенность, опосредованный материалом, с использованием медицинского препарата как такового.

Альтернативой могло бы быть дополнительное разбавление образца для получения тестируемого раствора, пригодного для внутривенного введения. Однако такой подход приводит к получению тестируемого раствора, не представляющего медицинский препарат, контактирующий с пациентом. Следовательно, результаты испытаний бесполезны для характеристики потенциального риска пирогенности медицинского препарата, обусловленной материалом.

Кроме того, в приложении G стандарта ISO 10993-11:2017 указано:

«Нет необходимости тестировать все новые медицинские препараты на пирогенность *in vivo*. Однако материалы, содержащие вещества, которые ранее вызывали пирогенную реакцию, и/или новые химические соединения, пирогенный потенциал которых неизвестен, должны быть оценены на предмет пирогенности, опосредованной материалом».

Кроме того, коллаген не указан в Приложении G стандарта ISO 10993-11:2017 среди веществ, которые, как известно, вызывают пирогенную реакцию, поэтому для коллагена не ожидается пирогенной реакции, опосредованной материалом.

Выводы

Основываясь на приведенных выше наблюдениях, и поскольку в соответствии со стандартом ISO 10993-2 «Испытания на животных считаются оправданными только в том случае, если доказано, что они являются актуальными и надежными для целей, для которых они проводятся», тест на опосредованную материалом пирогенность на кроликах *in vivo* считается неприменимым для оцениваемого препарата «Bio Active Coll».

Экспериментальный тест 5

Оценка генных мутаций клеток млекопитающих *in vitro* (локус тимидинкиназы/TK+/-) в клетках лимфомы мыши L5178Y с «BIO ACTIVE COLL»

Резюме

Тестируемый препарат BIO ACTIVE COLL был оценен на предмет его способности индуцировать мутации в локусе тимидинкиназы лимфомы мыши (tk+/-) с использованием клеточной линии L5178Y.

Для краткосрочных экспериментов (STE) растворенный тестируемый продукт метаболической активацией (STE(+)) и без нее (STE(-)). Для долгосрочного эксперимента (LTE) растворенный тестируемый продукт инкубировали с клетками в течение 24 часов. LTE проводили без метаболической активации.

Растворенный тестируемый продукт исследовали при следующих концентрациях:

STE(-): 0,25; 0,50; 1; 3 и 5 мг/мл

STE(+): 0,25; 0,50; 1; 3 и 5 мг/мл

LTE: 0,25; 0,50; 1; 3 и 5 мг/мл

В экспериментах не было отмечено преципитации растворенного тестируемого вещества. В STE(-) не наблюдалось ингибирования роста.

В STE(+) наблюдалось ингибирование роста. Относительный общий рост (RTG) составил 69% при самой высокой оцененной концентрации (5 мг/мл).

Также наблюдалось ингибирование роста при LTE. Относительный общий рост (RTG) составил 26% при самой высокой оцененной концентрации (5 мг/мл).

Ни в одном эксперименте не было обнаружено биологически значимого увеличения числа мутантов. Частота индуцированных мутаций не превышала фактор общей оценки (GEF).

EMS, MMS и B[a]P были использованы в качестве положительного контроля и продемонстрировали отчетливые и биологически значимые реакции по частоте мутаций. Кроме того, MMS и B[a]P значительно увеличили количество мелких колоний, тем самым доказав эффективность тест-системы для выявления потенциально кластогенных эффектов.

Краткое заключение

В заключение, в этом анализе генных мутаций клеток млекопитающих *in vitro* (локус тимидинкиназы/tk+/-) в клетках лимфомы мыши L5178Y в описанных экспериментальных условиях тестируемый BIO ACTIVE COLL признан немутагенным.

Таблица 1. STE(-) – Резюме

Экспериментальная группа	Концентрация (мг/мл)	RCE ^a (%)	RTG ^b (%)	MF ^c (мутанты/10 ⁶ клеток)	IMF ^d (мутанты/10 ⁶ клеток)	GEF ^e превышение фактора общей оценки
NC	0	89	84	151	/	/
	0	109	103		/	/
SC	0	100	100	150	/	/
	0				/	/
Предмет анализа	0,25	112	90	132	-18	-
	0,5	114	116	159	9	-
	1	81	85	174	24	-
	3	90	84	173	23	-
	5	81	78	191	40	-
EMS	300 мкг/мл	60	49	1524	1373	+
MMS	10 мкг/мл	85	64	816	665	+

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

a: Относительная эффективность клонирования, $RCE = [(CE_{\text{опытной группы}}/CE_{\text{соответствующих контролей)}) \times 100]$, Эффективность клонирования, $CE = ((-\ln(((96 - (\text{среднее значение Планшета 1, Планшета 2}))/ 96))/ 1,6) \times 100)$

b: Относительный общий рост, $RTG = (RSG \times RCE) / 100$

c: Частота мутантов, $MF = \{-\ln [\text{отрицательные культуры/общие лунки (селективная среда)}] / -\ln [\text{отрицательные культуры/общие лунки (не-селективная среда)}]\} \times 800$

d: Частота индуцированных мутаций, $IMF = \text{частота мутантов в образце} - \text{среднее значение частоты мутантов, соответствующее контролям}$

e: Фактор общей оценки, GEF (126 мутантов/10⁶ клеток); +: GEF превышен; -: GEF не превышен.

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

Таблица 2. STE(+) – Резюме

Экспериментальная группа	Концентрация (мг/мл)	RCE ^a (%)	RTG ^b (%)	MF ^c (мутанты/10 ⁶ клеток)	IMF ^d (мутанты/10 ⁶ клеток)	GEF ^e превышение фактора общей оценки
NC	0	102	106	128	/	/
	0	99	105		/	/
SC	0	100	100	123	/	/
	0				/	/
Предмет анализа	0,25	95	92	168	45	-
	0,5	113	104	122	-1	-
	1	110	127	155	32	-

	3	115	115	112	-1	-
	5	64	69	233	110	-
B(a)	3,5 мкг/мл	71	39	791	668	+

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

a: Относительная эффективность клонирования, $RCE = [(CE_{\text{опытной группы}}/CE_{\text{соответствующих контролей}}) \times 100]$, Эффективность клонирования, $CE = ((-\ln(((96 - (\text{среднее значение Планшета 1, Планшета 2}))/96))/1,6) \times 100)$

b: Относительный общий рост, $RTG = (RSG \times RCE) / 100$

c: Частота мутантов, $MF = \{-\ln [\text{отрицательные культуры/общие лунки (селективная среда)}] / -\ln [\text{отрицательные культуры/общие лунки (не-селективная среда)}]\} \times 800$

d: Частота индуцированных мутаций, $IMF = \text{частота мутантов в образце} - \text{среднее значение частоты мутантов, соответствующее контролям}$

e: Фактор общей оценки, GEF (126 мутантов/ 10^6 клеток); +: GEF превышен; -: GEF не превышен.

B[a]P: Бензо[a]пирен

Таблица 3. LTE – Резюме

Экспериментальная группа	Концентрация (мг/мл)	RCE ^a (%)	RTG ^b (%)	MF ^c (мутанты/ 10^6 клеток)	IMF ^d (мутанты/ 10^6 клеток)	GEF ^e превышение фактора общей оценки
NC	0	84	79	71	/	/
	0	101	113		/	/
SC	0	100	100	58	/	/
	0				/	/
Предмет анализа	0,25	87	88	95	37	-
	0,5	112	105	49	-9	-
	1	101	93	70	13	-
	3	103	35	71	13	-
	5	86	26	112	54	-
EMS	200 мкг/мл	56	28	2418	2361	+
MMS	10 мкг/мл	60	48	657	599	+

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

a: Относительная эффективность клонирования, $RCE = [(CE_{\text{опытной группы}}/CE_{\text{соответствующих контролей}}) \times 100]$, Эффективность клонирования, $CE = ((-\ln(((96 - (\text{среднее значение Планшета 1, Планшета 2}))/96))/1,6) \times 100)$

b: Относительный общий рост, $RTG = (RSG \times RCE) / 100$

c: Частота мутантов, $MF = \{-\ln [\text{отрицательные культуры/общие лунки (селективная среда)}] / -\ln [\text{отрицательные культуры/общие лунки (не-селективная среда)}]\} \times 800$

среда)]] × 800

d: Частота индуцированных мутаций, IMF = частота мутантов в образце – среднее значение частоты мутантов, соответствующее контролям

e: Фактор общей оценки, GEF (126 мутантов/10⁶ клеток); +: GEF превышен; -: GEF не превышен.

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

Цель исследования

Системы культивирования клеток млекопитающих используют для выявления мутаций, индуцированных химическими веществами. Этот эксперимент *in vitro* проводят для оценки способности тестируемого объекта индуцировать генные мутации с помощью анализа тимидинкиназы (tk) с использованием клеточной линии лимфомы мыши L5178Y. Анализ тимидинкиназы выявляет мутации пар оснований, мутации со сдвигом рамки считывания, малые, большие и нелетальные делеции и перестройки соответствующих хромосом.

Киназа катализирует реакцию тимидина и АТФ с образованием ТМФ (5'-монофосфата тимидина) и АДФ. Однако она также фосфорилирует аналог пиридина трифтортимидин (ТФТ) до его цитостатического и цитотоксического производного трифтортимидина монофосфата. При инактивации функционального аллеля tk^{+/-} клетки становятся устойчивыми к ТФТ. Таким образом, мутантные клетки (tk^{-/-}) способны к пролиферации в присутствии ТФТ, тогда как нормальные клетки (tk^{+/-}) не способны.

Клетки в суспензии подвергают воздействию тестируемого химического вещества, как с экзогенным источником метаболической активации (МА), так и без него, в течение подходящего периода времени, а затем подвергают субкультивированию для определения цитотоксичности и обеспечения возможности фенотипической экспрессии перед отбором мутантов.

Цитотоксичность определяют по относительному общему росту (RTG). Обработанные культуры выдерживают в питательной среде в течение достаточного периода времени, чтобы обеспечить почти оптимальную фенотипическую экспрессию индуцированных мутаций.

После фенотипической экспрессии определяют частоту мутаций (MF) путем посева известного количества клеток в среду, содержащую селективный агент, для выявления мутантных колоний и в среду без селективного агента для определения эффективности клонирования. По истечении подходящего времени инкубации подсчитывают колонии. Частоту мутаций рассчитывают на основе количества мутантных колоний с поправкой на

эффективность клонирования на момент отбора мутантов.

Обоснование выбора тест-системы

OECD (2016), Тест № 490 (Тесты на мутацию генов клеток млекопитающих *in vitro* с использованием гена тимидинкиназы) и ISO/TR 10993-33:2015 (Руководство по тестам для оценки генотоксичности – дополнение к ISO 10993-3) рекомендуют использовать клеточную линию L5178Y

Характеристика предмета анализа

Идентификация предмета анализа была проверена при доставке в испытательный центр (например, название тестируемого изделия, номер серии и дополнительные данные были сопоставлены с этикеткой) на основе следующих спецификаций, предоставленных спонсором.

Приведенная ниже информация относится к полученному образцу.

Название:	BIO ACTIVE COLL
Номер серии:	03/21
Стерильность:	да
Процедура стерилизации:	γ -облучение
Тип материала:	Натуральный полимер
Условия хранения:	Комнатная температура, сухое прохладное место
Срок годности:	не применяется
Меры предосторожности:	Обычных гигиенических процедур было достаточно для обеспечения здоровья и безопасности персонала

Подготовка

Подготовку проводили в соответствии со стандартом ISO 10993-3:2014 «Испытания на генотоксичность, канцерогенность и репродуктивную токсичность»:

- Можно ли растворить/суспендировать исследуемый образец в соответствующем растворителе, совместимом с тест-системой?

Да: Используйте метод А

Нет: Определите процентное содержание экстрагируемых веществ в тестируемом образце (метод предварительного тестирования В – А.3.3.4).

- Составляет ли процентное содержание экстрагируемых веществ $\geq 0,5\%$ для препаратов массой $\geq 0,5$ г или $\geq 1\%$ для препаратов массой $< 0,5$ г?

- Да: Используйте метод В

Нет: Используйте метод С

Растворитель был совместим с выживаемостью клеток и активностью S9.

Контроли

В каждый эксперимент включают отрицательные контроли или контроли растворителей, а также положительные контроли.

Отрицательный контроль

Отрицательные контроли (RPMI) обрабатывают так же, как и все тестируемые группы.

Контроль растворителя

Название: Вода (10%), Поставщик: Cayman Chemical, Номер серии: 0634617-1

Положительные контроли

	Без метаболической активации		С метаболической активацией
Название	EMS, этилметансульфонат	MMS, метилметансульфонат	B[a]P, бензо[а]пирен
CAS №	62-50-0	66-27-3	50-32-7
Поставщик	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich
№ серии	BCCF09000	MKCL6261	SLBW7628
Растворен в	Среда для культивирования клеток	0,9% NaCl	DMCO, диметилсульфоксид; итоговая концентрация в среде RPMI; 1%
Итоговая концентрация	200 и 300 мкг/мл	8 и 10 мкг/мл	3,5 мкг/мл

Разведения исходных растворов положительного контроля готовили в день эксперимента и использовали немедленно. Стабильность веществ положительного контроля в растворе подтверждается мутагенной реакцией в ожидаемом диапазоне.

Тест-система

Клетки

Клеточная линия L5178Y tk⁺/- 3.7.2C успешно используется в экспериментах *in vitro* в течение многих лет. Эти клетки характеризуются высокой скоростью пролиферации (время удвоения исходных культур Eurofins Munich составляет 10-12 часов) и эффективностью клонирования, обычно превышающей 50%. Клетки приобретают почти диплоидный кариотип (40±2 хромосомы) и являются гетерозиготными по локусу тимидинкиназы (tk).

Чтобы предотвратить высокие фоновые показатели, возникающие в результате спонтанной мутации, tk⁻/-клетки могут быть удалены путем культивирования в RPMI 1640 с добавлением: 9,0 мкг/мл гипоксантина, 15,0 мкг/мл тимидина, 22,5 мкг/мл глицина, 0,1 мкг/мл метотрексата.

Клетки ресуспендируют в среде без метотрексата, но с тимидином, гипоксантином и глицином в течение 1-3 дней.

Большие исходные культуры очищенной клеточной линии L5178Y tk+/- 3.7.2C хранят в жидком азоте (в паровой фазе) в банке клеток Eurofins в Мюнхене. Это позволяет многократно использовать одну и ту же серию клеток в экспериментах. Каждую серию клеток регулярно проверяют на отсутствие микоплазмы.

Размороженные исходные культуры выдерживают в пластиковых флаконах для культивирования в полной среде RPMI 1640 и подвергают субкультивированию при необходимости.

Пост-митохондриальная фракция (S9)

Вещества могут проявлять мутагенный потенциал только тогда, когда они метаболизируются организмом млекопитающих. Клеточная линия L5178Y tk+/- 3.7.2C обладает недостаточной эндогенной метаболической способностью, и поэтому необходима экзогенная система МА. Наиболее часто используемой системой является пост-митохондриальная фракция с добавлением кофактора (S9), полученная из печени грызунов.

Фракцию S9 готовили в Eurofins в Мюнхене. Крысам-самцам линии Вистар вводили фенобарбитал (80 мг/кг м.т.) и α -нафтофлавон (100 мг/кг м.т.) перорально в течение трех дней подряд. Подготовку проводили в соответствии с Ames et al.

Были проведены следующие определения контроля качества:

а) Биологическая активность в анализе *Salmonella typhimurium* с использованием 2-аминоантрацена и бензо[а]пирена.

б) Тест на стерильность

Исходную надосадочную жидкость, содержащую фракцию S9, замораживали в аликвотах по 2 и 4 мл и хранили при температуре $\leq -75^{\circ}\text{C}$. Концентрация белка во фракции S9 составляла 35 мг/мл (серия: 191121).

Приготовление смеси S9

Приготовление смеси S9 проводили в соответствии с Ames et al.

Соответствующее количество фракции S9 размораживали и смешивали с раствором кофактора для получения конечной концентрации белка в культурах 0,75 мг/мл. В 100 мМ натрий-фосфатном буфере с pH 7,4 были достигнуты следующие концентрации: 8 мМ MgCl_2 , 33 мМ KCl, 5 мМ глюкозо-6-фосфата, 5 мМ NADP. Во время эксперимента смесь S9 хранили на льду.

Схема эксперимента

Экспозиционные концентрации

Критериями для определения наивысшей концентрации были цитотоксичность, растворимость в тест-системе и изменения pH или осмоляльности. Цитотоксичность

определяли с метаболической активацией и без нее.

Было установлено несколько концентраций тестируемого вещества.

В STE(-), STE(+), LTE в качестве наивысшей концентрации было выбрано 5 мг/мл. Контрольный растворитель или отрицательные контроли тестировали в двух экземплярах.

Экспериментальные показатели

Для STE 10^7 клеток суспендировали в среде RPMI объемом 11 мл с 5% лошадиной сывороткой (флаконы объемом 25 см²) и подвергали воздействию определенных концентраций растворенного тестируемого вещества в присутствии или в отсутствие МА. Через 4 часа растворенный тестируемый элемент удаляли центрифугированием ($200 \times g$, 7 минут) и клетки дважды промывали PBS. Затем клетки суспендировали в 30 мл полной питательной среды и инкубировали в течение периода экспрессии и роста в общей сложности в течение двух дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% влажности. Плотность клеток определяли каждый день и, при необходимости, корректировали до 3×10^5 клеток/мл.

Для LTE 5×10^6 клеток суспендировали в среде RPMI объемом 25 мл с 7,5% лошадиной сывороткой (флаконы объемом 75 см²) и подвергали воздействию определенных концентраций растворенного тестируемого вещества в отсутствие МА. Через 24 часа растворенный тестируемый элемент удаляли центрифугированием ($200 \times g$, 7 минут) и клетки дважды промывали PBS. Затем 3×10^5 клеток/мл суспендировали в 14 мл полной питательной среды и инкубировали в течение периода экспрессии и роста в течение 2 дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% влажности. Плотность клеток определяли каждый день и при необходимости корректировали до 3×10^5 клеток/мл.

После периода экспрессии относительную эффективность клонирования (RCE; процентная эффективность клонирования опытной группы по отношению к контрольным носителям) клеток определяли путем посева статистического количества 1,6 клеток/лунку в два 96-луночных планшета. Клетки инкубировали не менее семи дней при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% влажности. Анализ результатов был основан на количестве культур с ростом клеток (положительные лунки) и культур без роста клеток (отрицательные лунки) по сравнению с общим количеством посеянных культур. Относительный рост суспензии (RSG) и RTG ($RTG = [RSG \times RCE] / 100$) обработанных клеточных культур рассчитывали в соответствии с методом Clive and Spector. Дополнительно культуры высевали в селективную среду. Клетки из каждой экспериментальной группы высевали в четыре 96-луночных планшета с плотностью приблизительно 2000 клеток/лунку в 200 мкл селективной среды с ТФТ. Планшеты оценивали после инкубационного периода от 11 до 14 дней при температуре 37°C в

атмосфере 5% CO₂/95% влажности.

MF рассчитывали путем деления количества колоний, устойчивых к ТФТ, на количество клеток, посеянных для селекции, с поправкой на эффективность посева клеток из той же культуры, выращенной в отсутствие ТФТ. Распределение Пуассона использовали для расчета эффективности посева для клеток, клонированных без ТФТ-селекции и с ТФТ-селекцией. Основываясь на нулевой гипотезе распределения Пуассона, вероятное число клонов/лунку (P) равно $-\ln$ (отрицательные лунки/общее количество лунок), а эффективность посева (PE) равна $P/(\text{количество клеток, посеянных в лунку})$. Затем MF рассчитывали как $MF = (PE (\text{культуры в селективной среде})/PE (\text{культуры в неселективной среде}))$. MF обычно выражают как «мутанты на 10^6 жизнеспособных клеток».

$$\text{Частота мутантов} = \frac{-\lg \left(\frac{\text{отрицательные лунки}}{\text{общие лунки [селективная среда]}} \right)}{-\lg \left(\frac{\text{отрицательные лунки}}{\text{общие лунки [не - селективная среда]}} \right)} \times 100$$

Рост суспензии (SG) клеточных культур отражает, во сколько раз увеличивается количество клеток по сравнению с исходной плотностью клеток. При проведении STE учитывали двухдневный период роста, при проведении LTE учитывали период обработки в 24 часа и двухдневный период роста. RTG является результатом произведения RSG (рассчитанного путем сравнения SG тестируемых групп с SG контрольной группы) и RCE для каждой культуры: $RTG = RSG \times RCE / 100$.

Чтобы уточнить GEF, международный семинар по тестированию на генотоксичность (IWGT) проанализировал распределение частот мутаций с отрицательным контролем/контролем растворителя в десяти лабораториях. GEF определяется как среднее значение MF с отрицательным контролем/контролем растворителя плюс одно стандартное отклонение. Применяя это определение к собранным данным, GEF составляет 126 мутантов на 10^6 клеток для метода с микролуночным планшетом.

Размер колоний был охарактеризован следующим образом: маленькие колонии приблизительно $\leq 1/4$ диаметра лунки. Крупные колонии составляют приблизительно $> 1/4$ диаметра лунки. Размер является ключевым фактором, а морфология должна быть второстепенной.

Среды для культивирования клеток

Перед приготовлением различных сред лошадиную сыворотку (HS) подвергали термической инактивации в течение 30 минут при 56°C .

	Полная питательная среда	Среда для обработки	Селективная среда
HS	10%	STE: 5% LTE: 7,5%	20%
Пенициллин/ стрептомицин	100 Ед/100 мкг/мл	100 Ед/100 мкг/мл	100 Ед/100 мкг/мл
Натрия пируват	1 мМ	1 мМ	1 мМ
L-глутамат	2 мМ	2 мМ	2 мМ
HEPES	25 мМ	25 мМ	25 мМ
Амфотерицин В	2,5 мкг/мл	2,5 мкг/мл	2,5 мкг/мл
ТФТ	-	-	5 мкг/мл

Селективный агент (ТФТ) был получен от Sigma-Aldrich (номер серии: BCCD1996).

Регистрация данных

Полученные данные были занесены в протокол планирования эксперимента. Результаты представлены в табличной форме, включая экспериментальные группы с тестируемым объектом, отрицательный и положительный контроль. Количество отдельных колоний для опытной и контрольной групп представлено как для индукции мутации, так и для выживания. Для соответствующих тестируемых групп были определены мелкие колонии и крупные колонии.

Статистика

Только в тех случаях, когда превышен GEF:

Непараметрический критерий Манна-Уитни был применен к данным о мутациях, чтобы определить, существуют ли статистические различия между частотами мутаций в опытных тестируемых группах по сравнению с отрицательным контролем/ контролем растворителя.

Только для полных исследований: был проведен статистический анализ тенденций.

Приемлемость анализа

Анализ мутаций считается приемлемым, если он соответствует критериям, определенным в действующих международных руководствах и текущих рекомендациях IWGT.

- По меньшей мере три из четырех 96-луночных планшетов из эксперимента по отбору ТФТ поддаются анализу;
- Эффективность клонирования отрицательного контроля или контроля с использованием растворителя находится в диапазоне 65-120%;
- Спонтанная MF в отрицательном контроле или контроле растворителя находится в диапазоне 50-170 мутантов на 10^6 клеток;
- Количество клеток в отрицательном контроле/ контроле растворителя увеличивается в 8-32 раза в течение двухдневного периода роста (STE) или в 32-180 раз в

течение трехдневного периода роста (LTE);

- Положительные контроли (MMS и B[a]P) на кластогенность дают значение индуцированной MF (общая MF минус MF в одновременном отрицательном контроле) не менее 300 мутантов на 10^6 клеток, при этом по меньшей мере 40% колоний являются мелкими колониями, или с индуцированными мелкими колониями MF составляет не менее 150 мутантов на 10^6 клеток;

- Значение RTG должно составлять 10% или более.

Оценка результатов

Тестируемый объект считается мутагенным, если выполняются следующие критерии:

- Индуцированная MF соответствует GEF или превышает его;
- RTG должен составлять 10% или более;
- Зависящее от концентрации увеличение MF обнаруживается с помощью соответствующего статистического анализа тенденций (не для исследования лимита).

Кроме того, в сочетании с положительным эффектом в MF увеличение количества мелких колоний ($\geq 40\%$ от общего количества колоний) является показателем потенциально кластогенных эффектов.

Испытуемый предмет считается не-мутагенным, если индуцированная MF ниже GEF или тенденция испытания является отрицательной.

Интерпретация результатов

Нет требования для верификации четкого положительного ответа.

Неоднозначные результаты должны быть уточнены путем дальнейшего тестирования, предпочтительно с использованием модификации условий эксперимента.

Отрицательные результаты должны подтверждаться в каждом конкретном случае.

Параметры исследования, которые могут быть изменены, - это интервал между концентрациями, продолжительность обработки (LTE без MA) или условия метаболической активации.

Результаты STE(-)

Таблица 4. STE(-) – Данные по токсичности

Тестируемая группа	Концентрация (мг/мл)	Количество клеток спустя 4 часа после обработки	Количество клеток спустя 24 часа после обработки	Количество клеток спустя 48 часов после обработки	SG ^a	RSG ^b (%)	RCE ^c (%)	RTG ^d (%)
NC	0	422000	1360000	1360000	18	94	89	84
	0	398000	1480000	1260000	19	95	109	103
SC	0	426000	1350000	1380000	19	100	100	100
	0	380000	1480000	1400000	21			

Предмет анализа	0,25	401000	1490000	1060000	16	80	112	90
	0,5	279000	1470000	1360000	20	102	114	116
	1	378000	1410000	1470000	21	105	81	85
	3	376000	1300000	1400000	18	93	90	84
	5	404000	1460000	1310000	19	97	81	78
EMS	300 мкг/мл	403000	1210000	1330000	16	82	60	49
MMS	10 мкг/мл	392000	1070000	1380000	15	75	85	64

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

a: Рост в суспензии, $SG = [((\text{значение } 24 \text{ часа} \times 30) / 1 \times 10^7) \times ((\text{значение } 48 \text{ часов} \times 20) / (\text{значение } 24 \text{ часа} \times 20))];$ *: для значения 24 часа $>3 \times 10^5$, которое больше значения 24 часа $>3 \times 10^5$

b: Относительный рост в суспензии, $RSG = [(\text{значение } SG / \text{значение } SG \text{ соответствующих контролей}) \times 100]$

c: Относительная эффективность клонирования, $RCE = [(\text{CE опытной группы} / \text{CE соответствующих контролей}) \times 100];$ Эффективность клонирования, $CE = ((-\ln(((96 - (\text{Среднее значение Планшета 1, Планшета 2}))/ 96)) / 1,6) \times 100)$

d: Относительный общий рост, $RTG = (RSG \times RCE) / 100$

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

Таблица 5. STE(-) – Данные по мутагенности

Тестируемая группа	Концентрация (мг/мл)	Эффективность клонирования (CE)			Данные по мутагенности						
		Планшет 1 ^e	Планшет 2 ^e	CE (%) ^f	Количество культур/96 лунок					MF ^g Му-танты/ 10 ⁶ клеток	IMF ^h Му-танты/ 10 ⁶ клеток
					Планшет 1 ^e	Планшет 2 ^e	Планшет 3 ^e	Планшет 4 ^e	Среднее значение		
NC	0	59	65	65	24	16	19	17	19,0	171	/
	0	72	66	79	16	14	22	20	18,0	131	/
SC	0	69	66	76	16	23	21	12	18,0	138	/
	0	67	62	70	27	10	19	21	19,3	163	/
Предмет анализа	0,25	68	72	82	22	22	12	18	18,5	132	-18,4
	0,5	81	60	83	25	24	19	21	22,3	159	9,1
	1	60	57	59	19	19	17	16	17,8	174	23,8
	3	68	57	66	17	18	19	24	19,5	173	22,7
	5	55	62	59	19	22	18	18	19,3	191	40,3
EMS	300 мкг/мл	44	53	44	68	69	74	72	70,8	1524	1373,3
MMS	10 мкг/мл	64	57	62	64	51	66	62	60,8	816	665,4

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

e: Количество культур с клеточным ростом

f: Эффективность клонирования, $CE = ((-\ln(((96 - (\text{среднее значение Планшета 1,}$

Планшета 2)) / 96 / (1,6) × 100)

g: Частота мутантов; MF = $(-\ln[\text{отрицательные культуры}/\text{общие лунки (селективная среда)}]) / -\ln[\text{отрицательные культуры}/\text{общие лунки (не-селективная среда)}]) \times 800$

h: частота мутантов при индукции, IMF = частота мутантов в образце – среднее значение мутантов в соответствующих контролях.

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

Таблица 6. STE(-) – Определение размера колоний

Тестируемая группа*	Концентрация [мкг/мл]	Лунки по меньшей мере с одной колонией	Большие колонии	Мелкие колонии	% мелких колоний
NC	0	76	62	14	18
	0	72	59	13	18
SC	0	72	56	16	22
	0	77	63	14	18
EMS	300 мкг/мл	283	245	38	13
MMS	10 мкг/мл	243	122	121	50

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

* На основе немутагенных эффектов предмета анализа, оценка кластогенности была неосуществимой.

Результаты STE(+)

Таблица 7. STE(+)- Данные по токсичности

Тестируемая группа	Концентрация (мг/мл)	Количество клеток спустя 4 часа после обработки	Количество клеток спустя 24 часа после обработки	Количество клеток спустя 48 часов после обработки	SG ^a	RSG ^b (%)	RCE ^c (%)	RTG ^d (%)
NC	0	423000	1240000	1420000	18	104	102	106
	0	464000	1340000	1340000	18	106	99	105
SC	0	396000	1320000	1230000	18	100	100	100
	0	436000	1320000	1330000	18			
Предмет анализа	0,25	421000	1280000	1280000	16	97	95	92
	0,5	384000	1260000	1230000	15	92	113	104
	1	410000	1410000	1390000	20	116	110	127
	3	406000	1380000	1230000	17	100	115	115
	5	423000	1390000	1310000	18	108	64	69
B(a)P	3,5 мкг/мл	386000	743000	1240000	9	55	71	39

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

a: Рост в суспензии, SG = $(((\text{значение 24 часа} \times 30) / 1 \times 10^7) \times ((\text{значение 48 часов} \times$

20) / (значение 24 часа* × 20)); *: для значения 24 часа >3×10⁵, которое больше значения 24 часа >3 × 10⁵

b: Относительный рост в суспензии, RSG = [(значение SG / значение SG соответствующих контролей) × 100]

c: Относительная эффективность клонирования, RCE = [(CE опытной группы/ CE соответствующих контролей) × 100]; Эффективность клонирования, CE = ((-ln (((96 - (Среднее значение Планшета 1, Планшета 2))/ 96)) / 1,6) × 100)

d: Относительный общий рост, RTG = (RSG × RCE) / 100

B[a]P: бензо[а]пирен

Таблица 8. STE(+) – Данные по мутагенности

Тестируемая группа	Концентрация (мг/мл)	Эффективность клонирования (CE)			Данные по мутагенности						
		Планшет 1 ^e	Планшет 2 ^e	CE (%) ^f	Количество культур/96 лунок					MF ^g Мутанты/ 10 ⁶ клеток	IMF ^h Мутанты/ 10 ⁶ клеток
					Планшет 1 ^e	Планшет 2 ^e	Планшет 3 ^e	Планшет 4 ^e	Среднее значение		
NC	0	72	66	79	22	20	19	18	19,8	145	/
	0	68	68	77	12	20	12	16	15,0	111	/
SC	0	70	71	83	20	16	14	16	16,5	114	/
	0	69	63	73	14	15	19	19	16,8	132	/
Предмет анализа	0,25	66	67	74	23	20	17	24	21,0	168	45
	0,5	68	77	88	23	17	14	20	18,5	122	-1
	1	71	72	85	22	20	27	20	22,3	155	32
	3	73	73	89	17	19	11	22	17,3	112	-11
	5	52	53	49	21	17	19	22	19,8	233	110
B(a)P	3,5 мкг/мл	56	57	56	52	60	56	56	56,0	791	668

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

e: Количество культур с клеточным ростом

f: Эффективность клонирования, CE = ((-ln (((96 - (среднее значение Планшета 1, Планшета 2))/96//1,6)×100)

g: Частота мутантов; MF= (-ln[отрицательные культуры/общие лунки (селективная среда)] / -ln[отрицательные культуры/общие лунки (не-селективная среда)]×800

h: частота мутантов при индукции, IMF = частота мутантов в образце – среднее значение мутантов в соответствующих контролях.

B[a]P: бензо[а]пирен

Таблица 9. STE(+) – Размер колоний

Тестируемая группа*	Концентрация [мкг/мл]	Лунки по меньшей мере с одной колонией	Большие колонии	Мелкие колонии	% мелких колоний
NC	0	79	66	13	16
	0	60	48	12	20
SC	0	66	57	9	14
	0	67	59	8	12

B[a]P	3,5 мкг/мл	224	132	92	41
-------	------------	-----	-----	----	----

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

B[a]P: бензо[а]пирен

* На основе немутагенных эффектов предмета анализа, оценка кластогенности была неосуществимой.

Результаты LTE

Таблица 10. LTE – Данные по токсичности.

Тестируемая группа	Концентрация (мг/мл)	Количество клеток спустя 24 часа после обработки	Количество клеток спустя 48 часа после обработки	Количество клеток спустя 72 часов после обработки	SG ^a	RSG ^b (%)	RCE ^c (%)	RTG ^d (%)
NC	0	1730000	1260000	1330000	161	94	84	79
	0	1740000	1290000	1540000	192	112	101	113
SC	0	1620000	1430000	1290000	166	100	100	100
	0	1710000	1310000	1430000	178			
Предмет анализа	0,25	1660000	1350000	1390000	173	101	87	88
	0,5	1600000	1380000	1310000	161	93	112	105
	1	1420000	1420000	1410000	158	92	101	93
	3	973000	828000	1320000	59	34	103	35
	5	777000	907000	1330000	52	30	86	26
EMS	200 мкг/мл	1150000	1170000	1160000	87	50	56	28
MMS	10 мкг/мл	1260000	1360000	1440000	137	80	60	48

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

a: Рост в суспензии, $SG = [((\text{значение 24 часа} \times 25) / 5 \times 10^6) \times ((\text{значение 48 часов} \times 14) / (\text{значение 24 часа}^* \times 14)) \times (\text{значение 72 часа} \times 14) / (\text{значение 48 часов}^* \times 14)]$; *: для значения 24 часа и 48 часов $> 3 \times 10^5$, значение 24 часа и 48 часов = 3×10^5

b: Относительный рост в суспензии, $RSG = [(\text{значение SG} / \text{значение SG соответствующих контролей}) \times 100]$

c: Относительная эффективность клонирования, $RCE = [(\text{CE опытной группы} / \text{CE соответствующих контролей}) \times 100]$; Эффективность клонирования, $CE = ((-\ln(((96 - (\text{Среднее значение Планшета 1}, \text{Планшета 2}))/ 96)) / 1,6) \times 100)$

d: Относительный общий рост, $RTG = (RSG \times RCE) / 100$

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

Таблица 11. LTE – данные по мутагенности

Тестируемая группа	Концентрация (мг/мл)	Эффективность клонирования (СЕ)			Данные по мутагенности						
		Планшет 1 ^e	Планшет 2 ^e	СЕ (%) ^f	Количество культур/96 лунок					MF ^g Мутанты/10 ⁶ клеток	IMF ^h Мутанты/10 ⁶ клеток
					Планшет 1 ^e	Планшет 2 ^e	Планшет 3 ^e	Планшет 4 ^e	Среднее значение		
NC	0	73	75	92	10	13	14	12	12,3	74	/
	0	79	80	110	16	16	8	13	13,3	68	/
SC	0	76	76	98	10	11	13	14	12,0	68	/
	0	88	76	120	16	7	6	12	10,3	47	/
Предмет анализа	0,25	73	77	95	14	11	17	21	15,8	95	37,1
	0,5	83	82	123	11	15	12	5	10,8	49	-9,0
	1	78	81	110	10	15	15	15	13,8	70	12,6
	3	76	84	112	14	12	19	11	14,0	71	12,9
	5	70	79	94	11	21	16	24	18,0	112	54,3
EMS	200 мкг/мл	59	61	61	91	90	91	92	91,0	2,418	2360,7
MMS	10 мкг/мл	66	59	66	59	55	52	56	55,5	657	599,5

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

e: Количество культур с клеточным ростом

f: Эффективность клонирования, $CE = ((-\ln(((96 - (\text{среднее значение Планшета 1, Планшета 2}))))/96/1,6) \times 100)$

g: Частота мутантов; $MF = (-\ln[\text{отрицательные культуры/общие лунки (селективная среда)}] / -\ln[\text{отрицательные культуры/общие лунки (не-селективная среда)}]) \times 800$

h: частота мутантов при индукции, $IMF = \text{частота мутантов в образце} - \text{среднее значение мутантов в соответствующих контролях}$.

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

Таблица 12. Определение размера колоний LTE

Тестируемая группа*	Концентрация [мкг/мл]	Лунки по меньшей мере с одной колонией	Большие колонии	Мелкие колонии	% мелких колоний
NC	0	49	39	10	20
	0	53	41	12	23
SC	0	48	37	11	23
	0	41	33	8	20
EMS	200 мкг/мл	364	343	21	6
MMS	10 мкг/мл	222	116	106	48

NC: отрицательный контроль

SC: контроль растворителя (Вода (10%))

EMS: этилметансульфонат

MMS: метилметансульфонат

* На основе немутагенных эффектов предмета анализа, оценка кластогенности

была неосуществимой.

Обсуждение

Тестируемый препарат BIO ACTIVE COLL был оценен на предмет его способности индуцировать мутации в локусе тимидинкиназы лимфомы мыши (tk+/-) с использованием клеточной линии L5178Y.

Для краткосрочных экспериментов (STE) растворенный тестируемый продукт инкубировали с клетками в течение 4 часов. STE проводили независимо: с метаболической активацией (STE(+)) и без (STE(-)) метаболической активации. Для долгосрочного эксперимента (LTE) растворенный тестируемый продукт инкубировали с клетками в течение 24 часов. LTE проводили без метаболической активации.

Растворенный тестируемый продукт исследовали при следующих концентрациях:

STE(-): 0,25; 0,50; 1; 3 и 5 мг/мл

STE(+): 0,25; 0,50; 1; 3 и 5 мг/мл

LTE: 0,25; 0,50; 1; 3 и 5 мг/мл

Свойства предмета анализа

Измеренное значение pH растворенного тестируемого вещества находилось в пределах физиологического диапазона. В экспериментах не было отмечено выпадения в осадок растворенного тестируемого вещества.

Токсичность

В STE(-), STE(+), LTE 5 мг/мл была выбрана в качестве самой высокой концентрации. Ингибирования роста не наблюдалось в STE(-) (таблица 4).

Ингибирование роста наблюдалось в STE(+) и LTE. В STE(+) относительный общий рост (RTG) составил 69% при самой высокой оцененной концентрации (таблица 7). В LTE относительный общий рост (RTG) составил 26% для самой высокой оцененной концентрации (таблица 10).

Мутагенность

Частоты индуцированных мутаций, полученные из всех экспериментов, сравнивали с GEF. Частота индуцированных мутаций не превышала глобальный коэффициент оценки (GEF). GEF определяется как среднее значение частоты мутаций в группах отрицательного контроля/контроля растворителя плюс одно стандартное отклонение; данные собраны из десяти лабораторий. Для метода на микролуночных планшетах GEF был определен как 126 мутантов на 10^6 клеток. Критерием мутагенности является превышение GEF индуцированной частотой мутаций, а также зависящее от концентрации увеличение частоты мутаций. EMS (200 и 300 мкг/мл), MMS (8 и 10 мкг/мл) и B[a]P (3,5 мкг/мл) положительных контролей показали отличные ответы по частоте мутаций,

демонстрируя, таким образом, способность тест-системы обнаруживать потенциально мутагенные эффекты.

Все критерии правильности были выполнены (10.9), за исключением частоты мутаций для 1 отрицательного контроля STE(-):171 и 1 контроля растворителя LTE:47 (допустимый диапазон 50-170 мутантов/ 10^6 клеток, согласно критериям IWGT). Тем не менее, значения отрицательного контроля и контроля растворителя были сочтены приемлемыми для включения в набор исторических контрольных данных (таблица 13), поскольку они лишь незначительно выходили за пределы исторического диапазона и не было выявлено никаких технических причин или человеческих ошибок.

Ни в одном эксперименте не было обнаружено биологически значимого увеличения мутантов, значение GEF не было превышено (таблица 5, таблица 8, таблица 11).

Кластогенность

Повышенное количество мелких колоний (определяемое медленным ростом и морфологическими изменениями клеточного клона) в сочетании с превышением частоты индуцированных мутаций GEF является признаком потенциально кластогенных эффектов. Размер колоний подсчитывали для всех концентраций тестируемого вещества, а также для отрицательного и положительного контроля.

Положительные контроли MMS и B[a]P индуцировали значительное увеличение частоты мутаций и биологически значимое увеличение количества мелких колоний ($\geq 40\%$), что подтверждает способность тест-системы указывать на потенциально кластогенные эффекты (таблица 6, таблица 9, таблица 12). Во всех экспериментах процент мелких колоний в отрицательном контроле и контроле с растворителем был ниже 40%.

Исходя из не-мутагенных эффектов BIO ACTIVE COLL, оценка кластогенности была невозможна.

Вывод

В заключение, в этом анализе генных мутации клеток млекопитающих *in vitro* (локус тимидинкиназы/tk+/-) в клетках лимфомы мыши L5178Y в описанных экспериментальных условиях тестируемый BIO ACTIVE COLL считается не-мутагенным.

Экспериментальный тест 6

анализ обратных мутаций с использованием бактерий (SALMONELLA TYPHIMURIUM и ESCHERICHIA COLI) с BIO ACTIVE COLL

Резюме результатов

Чтобы исследовать потенциал BIO ACTIVE COLL на предмет его способности индуцировать генные мутации, был проведен тест на внесение в чашки с штаммами

Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 и *E. coli* WP2 uvrA (pKM101).

В эксперименте использовали несколько концентраций тестируемого вещества. Анализ проводили с метаболической активацией и без нее. Концентрации, включая контрольные, тестировали в трех экземплярах. Были получены следующие концентрации тестируемого вещества:

31,6; 100; 316; 1000; 2500 и 5000 мкг/чашку.

Ни у одного из использованных тестируемых штаммов (с метаболической активацией и без нее) не наблюдалось выпадения тестируемого вещества в осадок.

Токсических эффектов тестируемого вещества не было отмечено ни у одного из пяти использованных тестируемых штаммов вплоть до группы с наибольшей дозой, оцененной с метаболической активацией и без нее.

Не наблюдалось биологически значимого увеличения числа ревертантных колоний ни у одного из пяти тестируемых штаммов после обработки BIO ACTIVE COLL при любом уровне концентрации, ни при наличии, ни при отсутствии метаболической активации.

Все критерии правильности были соблюдены (см.).

Вывод

В заключение можно констатировать, что во время описанного теста на мутагенность и в описанных экспериментальных условиях BIO ACTIVE COLL не вызывал генных мутаций путем замены пар оснований или сдвига рамки считывания в геноме используемых тест-штаммов.

Таким образом, BIO ACTIVE COLL считается не-мутагенным в этом анализе обратных мутаций у бактерий.

Цель исследования

Бактериальные анализы обратных мутаций используют штаммы *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* (*E. coli*), требующие аминокислот, для выявления точечных мутаций, которые включают замену, добавление или делецию одной или нескольких пар оснований ДНК. Принцип этих бактериальных анализов обратных мутаций заключается в том, что они выявляют мутации, которые функционально обращают мутации, присутствующие в тестируемых штаммах, и восстанавливают способность синтезировать незаменимую аминокислоту.

Целью данного исследования является установление способности тестируемого продукта индуцировать генные мутации у бактерий с помощью анализа обратных мутаций *S. typhimurium* и *E. coli*. Дальнейшее подтверждающее тестирование в случае явно отрицательных или положительных результатов теста обычно не требуется.

Неоднозначные результаты должны быть уточнены путем дальнейшего тестирования, предпочтительно с использованием модификации условий эксперимента. В последующих экспериментах следует рассмотреть возможность модификации параметров исследования для расширения диапазона оцениваемых условий. Параметры исследования, которые могут быть изменены, включают интервал концентраций и/или метод обработки (метод предварительной инкубации). В случае сильной токсичности тестируемого вещества или использования, например, этанола, ацетона или тетрагидрофурана в качестве наиболее подходящего растворителя, подтверждающий эксперимент проводят в соответствии с методом внесения в чашки с другим интервалом между уровнями дозы.

Из-за явных отрицательных результатов в первом эксперименте этого исследования независимое повторение не проводили, как описано в 10993-33.

Система реверсии гистидина (*his*) *S. typhimurium* и системы реверсии триптофана (*trp*) *E. coli* измеряют реверсии *his*-→*his*⁺ и *trp*-→*trp*⁺. Штаммы *S. typhimurium* сконструированы таким образом, чтобы различать мутации замены пар оснований (TA100, TA1535) и мутации сдвига рамки считывания (TA98, TA1537). Штамм *E. coli* обнаруживает только мутагены для замены оснований.

Эти анализы позволяют непосредственно оценить наследуемые мутации ДНК того типа, который связан с побочными эффектами. Точечные мутации являются причиной многих генетических заболеваний человека, и имеются существенные доказательства того, что точечные мутации соматических клеток в онкогенах и генах-супрессорах опухолей вовлечены в развитие рака у людей и в экспериментальных системах.

Тест-штаммы обладают рядом особенностей, которые делают их более чувствительными для обнаружения мутаций. Специфичность штаммов может предоставить полезную информацию о типах мутаций, индуцируемых мутагенными агентами.

В соответствии с методом прямого внесения в чашки бактерии подвергают воздействию тестируемого продукта с метаболической активацией и без нее и высевают на селективную среду. После подходящего периода инкубации подсчитывают ревертантные колонии.

При первоначальном тестировании испытывают по меньшей мере пять различных концентраций тестируемого вещества с интервалами примерно в половину логарифма (т.е. $\sqrt{10}$) между контрольными точками. Более узкий интервал между уровнями дозы может быть целесообразным при исследовании реакции на дозу. Для растворимых, нетоксичных тестируемых соединений рекомендуемая максимальная концентрация составляет 5 мг/чашку или 5 мкл/чашку.

Для валидации теста эталонные мутагены анализируют параллельно с тестируемым продуктом.

Обоснование выбора тест-системы

Руководство OECD по тестированию химических веществ, раздел 4, № 471 – Испытание на обратный мутации бактерий - рекомендует использовать комбинацию штаммов *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 и TA102 или *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101).

Материалы и методы

Характеристика предмета анализа

Идентичность предмета анализа была проверена при доставке в испытательный центр (например, название предмета анализа, номер серии и дополнительные данные были сопоставлены с этикеткой) на основе следующих спецификаций, предоставленных спонсором. Приведенная ниже информация относится к полученному образцу.

Наименование:	BIO ACTIVE COLL
Номер серии:	03/21
Код:	TYPE 1 PROFIL
Дата изготовления:	ноябрь 2021
Срок годности:	не применяется
Условия хранения:	при комнатной температуре, в сухом прохладном месте, защищенном от света
Тип материала:	Натуральный полимер
Стерильность:	стерильно
Процедура стерилизации:	γ-облучение
Меры предосторожности:	Рутинных гигиенических процедур достаточно для обеспечения здоровья и безопасности персонала

Подготовка предмета анализа

Предмет анализа готовили в соответствии со стандартом ISO 10993-3:2014 «Испытания на генотоксичность, канцерогенность и репродуктивную токсичность». Подготовка образца должна осуществляться в соответствии с диаграммой решений, показанной на фиг. 3. На этой фигуре показан процесс принятия решения, используемый для выбора метода экстракции (метод А, В или С).

Если тестируемый образец может быть растворен или суспендирован в соответствующем растворителе в пределах тест-системы, тестируемый образец может быть внесен непосредственно в тест-систему (метод А) в максимальной концентрации 5 мг/мл (тест-система для млекопитающих *in vitro*) или 5 мг/чашку (анализ обратных

мутаций бактерий).

Поскольку тестируемый продукт может быть растворен (см. исследование Eurofins Munich 150459 «In vitro Cytotoxicity Assay: Evaluation of Materials for Medical Devices by Extraction Method and XTT Dye with BIO ACTIVE COLL»), был выбран метод А.

Исследуемый препарат растворяли в дистиллированной воде, обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут при 37°C и разбавляли перед обработкой. Растворитель был совместим с выживаемостью бактерий и активностью S9.

Контроли

В эксперимент были включены как отрицательные, так и положительные контрольные группы. В анализ были включены положительные контроли, специфичные для штамма, которые продемонстрировали эффективность теста.

Отрицательные контроли/Контроль растворителя

Отрицательные контроли (дистиллированная вода, Eurofins Munich, серия № 220218, 220304) обрабатывали так же, как и все группы доз.

Положительные контроли

Без метаболической активации

Тест-штаммы: *S. typhimurium*: TA100, TA1535

Название: NaN₃; азид натрия

Номер CAS: 26628-22-8

Поставщик: Sigma

Номер серии: STBF8665V

Растворяют в дистиллированной воде.

Концентрация: 10 мкг/чашку

Тест-штаммы: *S. typhimurium*: TA98, TA1537

Название: 4-NOPD; 4-нитро-о-фенилендиамин

Номер CAS: 99-56-9

Поставщик: Sigma

Номер серии: MKCF1418

Растворяют в ДМСО

Концентрации: 10 мкг/чашку для TA98, 40 мкг/чашку для TA1537

Тестируемый штамм: *E. coli* WP2 uvrA (pKM101)

Название: MMS; метилметансульфонат

Номер CAS: 66-27-3

Поставщик: Sigma

Номер серии: MKCG1346

Растворяют в дистиллированной воде

Концентрация: 1 мкл/планшет

С метаболической активацией:

Тестируемые штаммы: *S. typhimurium*: TA98, TA100, TA1535, TA1537 и *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101)

Название: 2-АА; 2-аминоантрацен

Номер CAS: 613-13-8

Поставщик: Alfa Aesar

Номер серии: 102181359-A

Растворяют в ДМСО

Концентрации: 2,5 мкг/чашку для TA98, TA100, TA1535 и TA1537;

10 мкг/чашку для *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101)

Стабильность веществ положительного контроля в растворе неизвестна, но мутагенный ответ в ожидаемом диапазоне является достаточным доказательством биологической стабильности.

Тест-система

Бактерии

Использовали четыре штамма *S. typhimurium* и один штамм *E. coli* со следующими характеристиками:

TA98: his D 3052, rfa-; uvrB-; R-фактор	Мутации со сдвигом рамки считывания
TA100: his G 46, rfa-; uvrB-	Замены пар оснований
TA1535: his G 46, rfa-; uvrB-	Замены пар оснований
TA1537: his C 3076, rfa-; uvrB-	Мутации со сдвигом рамки считывания
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101); trp-; uvrA-	Замены пар оснований

Тест-штаммы TA98, TA1535 и *E. coli* были получены от MOLTOX, INC., NC 28607, США. Тест-штаммы TA100 и TA1537 были получены от Xenometrix AG, Швейцария. Их хранили в качестве исходных культур в ампулах с питательным бульоном (OXOID), с добавлением ДМСО (приблизительно 8 об.%) в атмосфере жидкого азота.

Все штаммы сальмонелл содержат мутации в гистидиновом опероне, что создает потребность в гистидине в питательной среде. Они содержат мутацию «deep rough» (rfa), которая удаляет полисахаридную боковую цепь липополисахаридов поверхности бактериальных клеток. Это увеличивает проницаемость клеток для более крупных веществ. Другая мутация представляет собой делецию гена *UvrB*, кодирующего белок системы эксцизионной репарации нуклеотидов ДНК, что приводит к повышенной

чувствительности при детекции многих мутагенов. Эта делеция также включает гены нитратредуктазы (*chl*) и биотина (*bio*) (бактерии нуждаются в биотине для роста).

Тест-штаммы TA98, TA100 и *E. coli* содержат плазмиду R-фактора pKM101. Эти штаммы подвергаются реверсии под действием ряда мутагенов, которые слабо обнаруживаются или вообще не обнаруживаются у родительских штаммов, не обладающих R-фактором. pKM101 повышает химический и спонтанный мутагенез, усиливая подверженную ошибкам систему репарации ДНК, которая обычно присутствует в этих организмах.

Тест-штамм *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101) несет дефект в одном из генов биосинтеза триптофана. Триптофан-независимые мутанты (ревертанты) могут возникать либо в результате изменения основания в месте первоначального изменения, либо в результате изменения основания в другом месте хромосомы таким образом, что первоначальный дефект подавляется. Эта вторая возможность может проявляться несколькими различными способами, так что система, по-видимому, способна обнаруживать все типы мутагенов, которые заменяют одно основание другим. Кроме того, у штамма отсутствует система эксцизионной репарации нуклеотидов ДНК.

Свойства штаммов *S. typhimurium* и *E. coli* в отношении проницаемости мембран, устойчивости к ампициллину и тетрациклину, а также нормальной частоты спонтанных мутаций регулярно проверяли в соответствии с Ames et al. Таким образом, обеспечивается выполнение экспериментальных условий, установленных Эймсом.

Приготовление бактерий

Образцы каждого тест-штамма выращивали путем культивирования в течение 12 часов при 37°C в среде *S. typhimurium* (питательный бульон) и среде *E. coli* (Лурия-Бертани), соответственно, до поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазы роста (приблизительно 10⁹ клеток/мл).

Среда для *S. typhimurium* (питательный бульон) содержит на литр очищенной воды:

8 г питательного бульона

5 г NaCl

Среда для *E. coli* (Лурия-Бертани) содержит на литр очищенной воды:

10 г триптона

10 г NaCl

5 г дрожжевого экстракта

Для сохранения фенотипических характеристик штамма добавляли раствор ампициллина в количестве 125 мкл (10 мг/мл) (TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101)).

Чашки с агаром

Чашки с агаром со средой Е Фогеля-Боннера с 2% глюкозой, использованные в тесте Эймса, были изготовлены Eurofins Munich или предоставлены соответствующим поставщиком. Был проведен контроль качества.

Содержание солей Фогеля-Боннера на литр очищенной воды:

10 г	MgSO ₄ × 7 H ₂ O
100 г	лимонная кислота
175 г	NaNH ₄ HPO ₄ × H ₂ O
500 г	K ₂ HPO ₄

Стерилизацию проводили в течение 20 минут при температуре 121°C в автоклаве.

В чашках с агаром со средой Е Фогеля-Боннера на литр очищенной воды содержится:

15 г	агар-агар
20 мл	солей Фогеля-Боннера
50 мл	раствор глюкозы (40%)

Стерилизацию проводили в течение 20 минут при температуре 121°C в автоклаве.

Верхний слой агара

Количество верхнего слоя агара на литр очищенной воды:

S. typhimurium

7,0 г	агар-агар
6,0 г	NaCl
10,5 мг	L-гистидин × HCl × H ₂ O
12,2 мг	биотин

E. coli

7,0 г	агар-агар
6,0 г	NaCl
10,2 мг	триптофан

Стерилизацию проводили в течение 20 минут при температуре 121°C в автоклаве.

Смесь микросомальной фракции S9 млекопитающих

Бактерии, наиболее часто используемые в этих анализах обратных мутаций, не обладают ферментативной системой, которая, как известно, у млекопитающих превращает промутагены в активные метаболиты, повреждающие ДНК. Чтобы преодолеть этот существенный недостаток, была добавлена экзогенная метаболическая система в виде смеси для активации ферментов микросом млекопитающих.

Гомогенат S9

Микросомальная фракция печени S9 была получена в Eurofins в Мюнхене. Крысам-

самцам линии Вистар вводили фенобарбитал (80 мг/кг массы тела) и β -нафтофлавон (100 мг/кг массы тела) перорально в течение трех дней подряд.

Выполнены следующие определения контроля качества:

а) Биологическая активность в анализе *Salmonella typhimurium* с использованием 2-аминоантрацена и бензо[а]пирена

б) Тест на стерильность

Исходную надосадочную жидкость, содержащую микросомы, замораживали в аликвотах по 2 и 4 мл и хранили при температуре $\leq -75^\circ\text{C}$.

Концентрация белка в препарате S9 (серия: 191121) составила 35,0 мг/мл.

Приготовление смеси S9

Приготовление смеси S9 проводили в соответствии с Ames et al.

100 мМ натрий-ортофосфатный буфер с рН 7,4 добавляли в охлажденном виде со льдом к следующим предварительно взвешенным стерилизованным реагентам для получения конечных концентраций в смеси S9:

8 мМ	MgCl ₂
33 мМ	KCl
5 мМ	глюкозо-6-фосфат
4 мМ	НАДФ

Этот раствор смешивали с надосадочной жидкостью от центрифугирования печени при 9000 \times g в следующей пропорции:

раствор кофактора	9,5 частей
препарат печени	0,5 частей

Во время эксперимента смесь S9 хранили на льду.

Буфер для замены смеси S9

Буфер для замены смеси S9 использовали в исследовании в качестве замены смеси S9 без метаболической активации (-S9).

Фосфатный буфер (0,2 М) содержит на литр очищенной воды:

0,2 М NaH ₂ PO ₄ \times H ₂ O	120 мл
0,2 М Na ₂ HPO ₄	880 мл

Два раствора смешивали и доводили рН до 7,4. Стерилизацию проводили в течение 20 минут при температуре 121 $^\circ\text{C}$ в автоклаве.

Этот 0,2 М фосфатный буфер смешивали с 0,15 М раствором KCl (стерильным) в следующей пропорции:

0,2 М фосфатный буфер	- 9,5 частей
0,15 М раствор KCl	- 0,5 частей

Этот буфер для замещения смеси S9 хранили при температуре 4°C.

Схема эксперимента

Предварительный эксперимент на токсичность

Токсичность тестируемого продукта определяли с помощью тестируемых штаммов TA98 и TA100 в ходе предварительного эксперимента. Восемь концентраций были протестированы на токсичность и индукцию мутаций с использованием трех чашек для каждой. Экспериментальные условия в этом предварительном эксперименте были такими же, как описано ниже для основного эксперимента (испытание на внесение в чашку).

Токсичность может быть обнаружена путем очистки или, скорее, уменьшения фонового газона, или уменьшения количества ревертантов до фактора мутации приблизительно $\leq 0,5$ по отношению к контролю растворителя.

Предмет анализа был протестирован в ходе предварительного эксперимента при следующих концентрациях:

3,16; 10,0; 31,6; 100; 316; 1000; 2500 и 5000 мкг/чашку

Концентрации экспозиции

Концентрации тестируемого вещества, которые будут применяться в основном эксперименте, были выбраны в соответствии с результатами предварительного эксперимента. В качестве максимальной концентрации было выбрано 5000 мкг/чашку. Диапазон концентраций охватывал две логарифмические декады. Эксперимент проводили со следующими концентрациями:

31,6; 100; 316; 1000; 2500 и 5000 мкг/чашку

Поскольку результаты предварительного эксперимента соответствовали критериям правильности, они были представлены как часть основного эксперимента.

Результаты эксперимента

Для метода внесения в пластину следующие материалы смешивали в пробирке и выливали на поверхность чашки с минимальным агаром:

100 мкл	Испытуемый раствор на каждом уровне дозы, контроль растворителя, отрицательный контроль или эталонный раствор мутагена (положительный контроль)
500 мкл	Смесь S9 (для испытания с метаболической активацией) или буфер, заменяющий смесь S9 (для испытания без метаболической активации)
100 мкл	Бактериальная суспензия (см. Приготовление бактерий, предварительная культура штамма)
2000 мкл	Верхний слой агара

Из-за явных отрицательных результатов в первом эксперименте этого исследования независимое повторение не проводили, как описано в 10993-33.

Для каждого штамма и уровня дозы, включая контрольные, использовали три чашки.

После затвердевания чашки переворачивали и инкубировали при 37°C не менее 48 часов в темноте.

Регистрация данных

Колонии подсчитывали с помощью счетчика протоколов (Meintrup DWS Laborgeräte GmbH). Если осаждение тестируемого объекта исключало автоматический подсчет, колонии ревертантов подсчитывали вручную. Кроме того, тест-штаммы с низкой частотой спонтанных мутаций, такие как TA1535 и TA1537, подсчитывали вручную.

Оценка цитотоксичности

Цитотоксичность может быть обнаружена путем очистки или, скорее, уменьшения фонового бактериального газона (обозначенного как «N» или «B», соответственно, в таблицах результатов) или уменьшения количества ревертантов до коэффициента мутации приблизительно $\leq 0,5$ по отношению к контролю растворителя.

Критерии валидности

Тест считается приемлемым, если для каждого штамма:

- бактерии демонстрируют свои типичные реакции на ампициллин (TA98, TA100, E. coli WP2 uvrA (pKM101))
- отрицательные контрольные чашки (с дистиллированной водой) со смесью S9 и без нее находятся в следующих диапазонах (средние значения частоты спонтанной реверсии находятся в пределах диапазона исторических контрольных данных (январь – декабрь 2020 г. для всех тест-штаммов)):

	-S9		+S9	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
TA98	13	71	26	68
TA100	55	155	53	176
TA1535	5	34	4	37
TA1537	7	32	7	46
E.coli WP2 uvrA (pKM101)	108	327	122	355

- наблюдается соответствующий фоновый рост на отрицательном контроле, контроле растворителя и опытных чашках;
- в положительных контролях наблюдается отчетливое повышение показателей ревертантности по сравнению с контрольной чашкой;
- поддаются анализу по меньшей мере пять различных концентраций каждого тест-штамма.

Оценка мутагенности

Коэффициент мутации рассчитывают путем деления среднего значения количества ревертантов на средние значения контроля растворителя (для расчета используют точные, а не округленные значения).

Предмет анализа считается мутагенным, если:

- происходит явное и зависящее от дозы увеличение числа ревертантов; и/или
- биологически значимый положительный ответ по меньшей мере для одной из групп доз наблюдается по меньшей мере у одного тест-штамма с метаболической активацией или без нее.

Биологически значимое увеличение описано следующим образом:

- если в тест-штаммах TA98, TA100 и E. coli количество реверсий как минимум в два раза выше;
- если у тест-штаммов TA1535 и TA1537 количество реверсий по меньшей мере в три раза превышает уровень реверсии для контроля растворителя.

Согласно указаниям OECD, биологическая значимость результатов является критерием для интерпретации результатов, статистическая оценка результатов не считается необходимой.

Предмет анализа, не вызывающий ни связанного с дозой увеличения числа ревертантов, ни воспроизводимого биологически значимого положительного ответа ни в одной из групп доз, считается в этой системе не-мутагенным

Результаты

Предварительный эксперимент

Токсичность может быть обнаружена путем очистки или, скорее, уменьшения фонового бактериального газона или снижения количества ревертантов до коэффициента мутации приблизительно $\leq 0,5$ по отношению к контролю растворителя.

Обсуждение

Тестируемый продукт BIO ACTIVE COLL был исследован на предмет его способности индуцировать генные мутации в соответствии с тестом внесения в чашки с использованием штаммов Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 и тест-штамма E. coli WP2 uvrA (pKM101).

В эксперименте использовали несколько концентраций тестируемого вещества. Каждый анализ проводили с метаболической активацией и без нее. Концентрации, включая контрольные, тестировали в трех экземплярах. Были получены следующие концентрации тестируемого вещества:

31,6; 100; 316; 1000; 2500 и 5000 мкг/чашку

Ни у одного из использованных тест-штаммов (с метаболической активацией и без нее) не наблюдалось преципитации тестируемого вещества.

Токсических эффектов тестируемого вещества не было отмечено ни у одного из пяти использованных тест-штаммов вплоть до группы с наибольшей дозой, оцененной с

метаболической активацией и без нее.

После обработки BIO ACTIVE COLL ни при каком уровне концентрации, ни при наличии, ни при отсутствии метаболической активации, не наблюдалось биологически значимого увеличения числа ревертантных колоний ни у одного из пяти тест-штаммов.

Снижение числа ревертантов до коэффициента мутации $\leq 0,5$, обнаруженное у тест-штамма TA 1537 в концентрации 316 мкг/чашку (с метаболической активацией), было расценено как биологически не значимое из-за отсутствия зависимости доза-эффект.

Микробная контаминация, наблюдаемая на одной чашке (TA98, 316 мкг/чашку, без метаболической активации), не повлияла на качество или целостность результатов, поскольку микробную контаминацию можно было четко отличить от ревертантов *Salmonella typhimurium* и, таким образом, не повлияла на оценку.

Все критерии правильности были соблюдены.

Вывод

В заключение можно констатировать, что во время описанного испытания на мутагенность и в описанных экспериментальных условиях BIO ACTIVE COLL не вызывал генных мутаций путем замены пар оснований или сдвига рамки считывания в геноме используемых тест-штаммов.

Таким образом, BIO ACTIVE COLL считается немутагенным в этом анализе обратных мутаций бактерий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Порошок гидролизованного коллагена со следующим распределением частиц по размерам:

- не более 10% частиц имеют средний диаметр менее 2,5 микрон;
- по меньшей мере 50% частиц имеют средний диаметр менее 10 микрон;
- по меньшей мере 90% частиц имеют средний диаметр менее 20 микрон.

2. Порошок коллагена по п. 1, отличающийся тем, что указанный гидролизированный коллаген состоит из олигопептидов, имеющих следующие молекулярные массы:

- по меньшей мере 30% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 80 до 120 кДа;
- по меньшей мере 25% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 50 до 70 кДа;
- по меньшей мере 25% молекул олигопептидов имеют средневесовую молекулярную массу от 25 до 45 кДа;
- по меньшей мере 85% указанного коллагена имеет молекулярную массу от 25 до 120 кДа.

3. Порошок коллагена по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный коллаген относится к типу I.

4. Порошок коллагена по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанный коллаген является лошадиным.

5. Порошок коллаген по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что он демонстрирует распределение частиц по размерам, показанное на фиг. 1.

6. Фармацевтическая, нутрицевтическая или косметическая композиция, содержащая порошок коллагена по любому из пп. 1-5, вместе по меньшей мере с одним подходящим носителем.

7. Применение порошка коллагена по любому из пп. 1-5 в качестве пищевой добавки или косметического продукта.

8. Порошок коллагена по любому из пп. 1-5 для его применения в терапии.

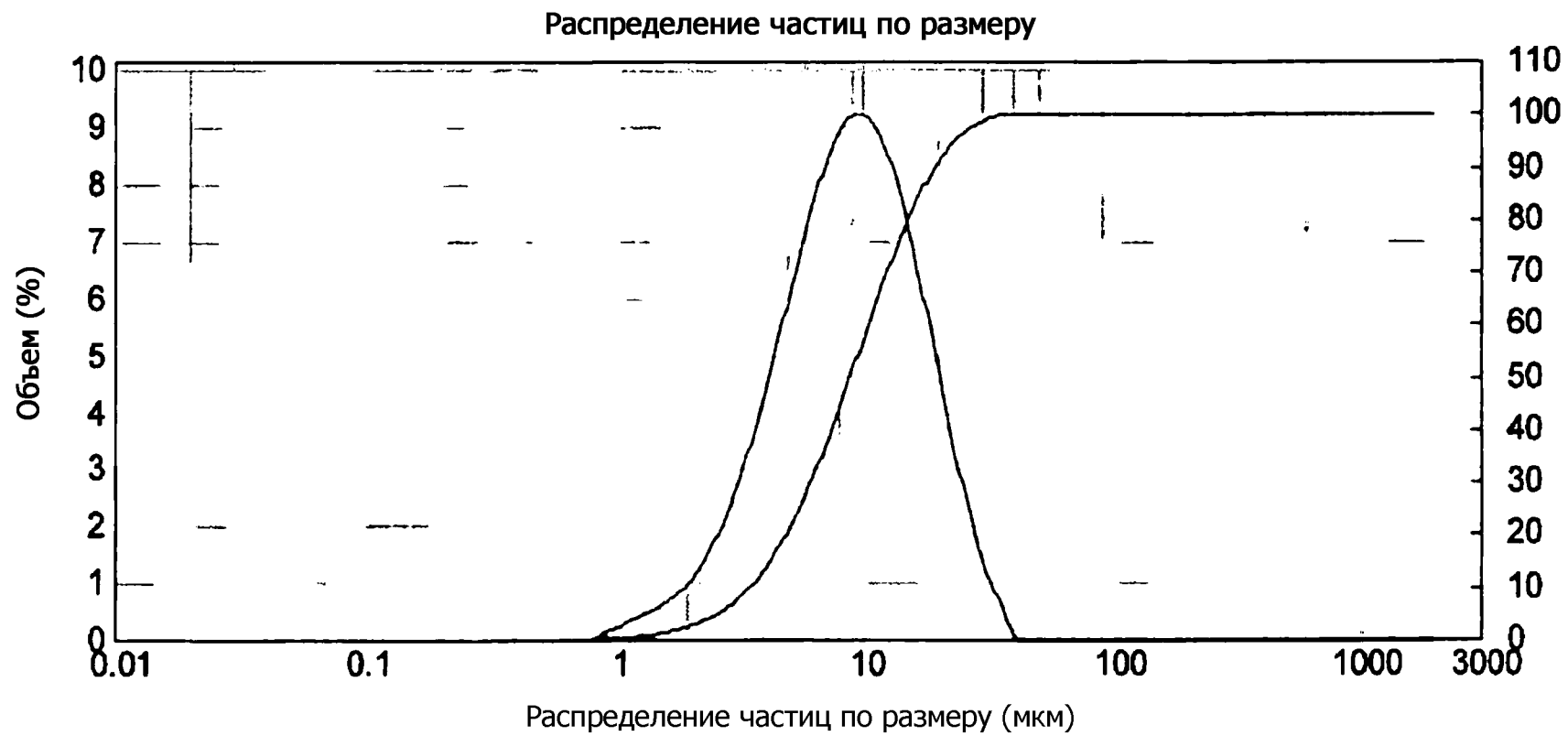
9. Порошок коллагена по п. 8 для применения при лечении язв, ожогов, ран, заболеваний суставов, старения кожи, интерстициального цистита и вульвовагинита; для регенерации и биоревитализации кожи и для восполнения вязкости и регенерации синовиальной оболочки в случае костно-хрящевых повреждений.

10. Способ получения порошка коллагена по любому из пп. 1-5, включающий:

- (i) суспендирование коллагена типа I, лишенного телопептидных фракций, в

подкисленной воде, и обеспечение его протеолиза; и

(ii) сушку указанного коллагена в микронизированной форме.



ФИГ. 1

Размер (мкм)	Объем (%)
0.010	0.00
0.011	0.00
0.013	0.00
0.015	0.00
0.017	0.00
0.020	0.00
0.023	0.00
0.026	0.00
0.030	0.00
0.035	0.00
0.040	0.00
0.046	0.00
0.052	0.00
0.060	0.00
0.069	0.00
0.079	0.00
0.091	0.00

Размер (мкм)	Объем (%)
0.105	0.00
0.120	0.00
0.138	0.00
0.158	0.00
0.182	0.00
0.209	0.00
0.240	0.00
0.275	0.00
0.316	0.00
0.363	0.00
0.417	0.00
0.479	0.00
0.550	0.00
0.631	0.00
0.724	0.00
0.832	0.00
0.955	0.06

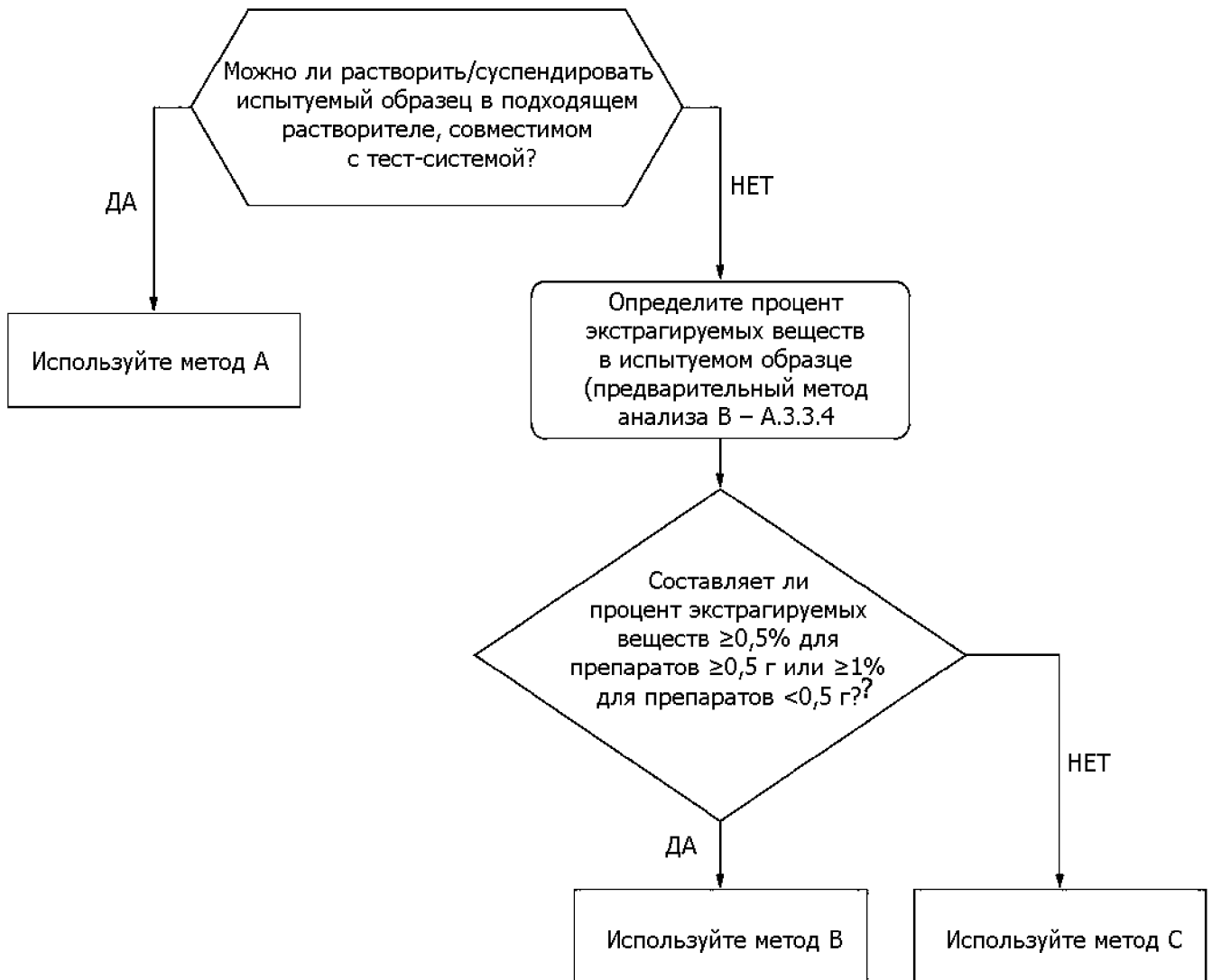
Размер (мкм)	Объем (%)
1.098	0.25
1.259	0.56
1.445	0.98
1.680	1.52
1.905	2.23
2.188	3.17
2.512	4.45
2.884	6.19
3.311	8.54
3.802	11.64
4.365	15.58
5.012	20.47
5.754	26.32
6.607	33.08
7.586	40.62
8.710	48.71
10.000	57.04

Размер (мкм)	Объем (%)
11.482	65.27
13.183	73.06
15.136	80.08
17.378	86.09
19.953	90.93
22.909	94.59
26.303	97.15
30.200	98.76
34.674	99.66
39.811	100.00
45.709	100.00
52.481	100.00
60.256	100.00
69.183	100.00
79.433	100.00
91.201	100.00
104.713	100.00

Размер (мкм)	Объем (%)
120.226	100.00
138.038	100.00
158.489	100.00
181.970	100.00
208.930	100.00
239.883	100.00
275.423	100.00
316.228	100.00
363.078	100.00
416.869	100.00
478.630	100.00
549.541	100.00
630.957	100.00
724.436	100.00
831.764	100.00
954.993	100.00
1096.478	100.00

Размер (мкм)	Объем (%)
1258.925	100.00
1445.440	100.00
1659.587	100.00
1905.461	100.00
2187.762	100.00
2511.886	100.00
2884.032	100.00
3311.311	100.00
3801.894	100.00
4365.158	100.00
5011.872	100.00
5754.399	100.00
6606.934	100.00
7585.776	100.00
8709.636	100.00
10000.000	100.00

Фиг. 2



Фиг. 3