










УДК 604.4

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-171-182>

Оригинальная статья | Original article



## Получение клонов-продуцентов фермента кислой альфа-глюкозидазы на основе клеток линии СНО-К1

С.С. Тимонова , С.С. Шубина , Ю.С. Снегирева ,  
Р.Л. Анисимов , Н.В. Никифорова , Д.А. Третьяк , М.А. Королева ,  
М.Ю. Неронова , Р.А. Хамитов 

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский,  
городской округ Покров, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Тимонова Софья Сергеевна; [Timonova@ibcgenerium.ru](mailto:Timonova@ibcgenerium.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Разработка биофармацевтического препарата для ферментной заместительной терапии на основе рекомбинантной кислой  $\alpha$ -1,4-глюкозидазы ( $\alpha$ -глюкозидаза) является актуальной задачей, решение которой может позволить обеспечить пациентов с болезнью Помпе необходимым количеством препарата в Российской Федерации. В работе показан эффективный способ получения стабильного промышленного клона-продуцента на основе клеток линии СНО-К1, продуцирующего активную  $\alpha$ -глюкозидазу.

**ЦЕЛЬ.** Получение моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы и оценка стабильности ростовых показателей и продуктивности в ходе культивирования в течение 60 генераций.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Суспензионную клеточную линию СНО-К1 (ЕСАСС) культивировали в среде BalanCD Growth A. Трансфекцию клеток проводили электропорацией на системе MaxCyte (по протоколу СНО). Селекцию продуцентов проводили с использованием пуромицина (5 мкг/мл). Клонирование осуществляли с помощью системы дозирования клеток на основе микрофлюидной технологии (C.SIGHT). Моноклональность клеточных линий подтверждали с применением автоматизированной системы визуализации клеток (Cell Metric CLD). Концентрацию  $\alpha$ -глюкозидазы в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. Активность фермента измеряли колориметрически с субстратом 4-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид (pNP- $\alpha$ -D-Glc).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Проведен скрининг 1000 продуцентов, в результате которого отобраны 22 клеточные линии с продуктивностью 0,14–0,65 г/л. Лидерный продуцент  $\alpha$ -глюкозидазы GAA-14 клонировали с последующим подтверждением моноклональности. Получена панель из 20 моноклональных линий. Удельная активность фермента и содержание остатков маннозо-6-фосфата (М6Р) ( $4,3 \pm 0,9$  ЕД/мг;  $0,99 \pm 0,10$  моль М6Р/моль белка соответственно) не отличались от референтного препарата. При изучении стабильности лидерного клона в течение 60 генераций показано сохранение ростовых характеристик: жизнеспособность  $98,5 \pm 1,5\%$ , время удвоения популяции  $20,0 \pm 1,3$  ч, продуктивность  $450 \pm 20$  мг/л при периодическом культивировании в течение 7 сут.

**ВЫВОДЫ.** Получена стабильная моноклональная клеточная линия-продуцента  $\alpha$ -глюкозидазы на основе СНО-К1, обеспечивающая продукцию активного фермента 0,45 г/л на 7 сут. Полученный клон-продуцент пригоден для масштабирования и наработки субстанции для доклинических исследований.










**Ключевые слова:** клеточная линия СНО-К1; моноклональная клеточная линия; кислая  $\alpha$ -глюкозидаза; лизосомальная кислая  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза; 4-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид; GAA; болезнь Помпе; гликогеноз II типа; рекомбинантные ферменты

**Для цитирования:** Тимонова С.С., Шубина С.С., Снегирева Ю.С., Анисимов Р.Л., Никифорова Н.В., Третьяк Д.А., Королева М.А., Неронова М.Ю., Хамитов Р.А. Получение клонов-продуцентов фермента кислой альфа-глюкозидазы на основе клеток линии CHO-K1. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):171–182. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-171-182>

**Финансирование.** Работа проводилась при финансировании АО «ГЕНЕРИУМ».

**Потенциальный конфликт интересов.** Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2013 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Development of acid alpha-glucosidase-producing clones based on the CHO-K1 cell line

Sofia S. Timonova , Sofia S. Shubina , Julia S. Snegireva ,  
Roman L. Anisimov , Natalya V. Nikiforova , Danila A. Tretyak ,  
Mariya A. Koroleva , Maria Yu. Neronova , Ravil A. Khamitov 

GENERIUM JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky, Pokrov, Vladimir Region 601125,  
Russian Federation

✉ Sofia S. Timonova; [Timonova@ibcgenerium.ru](mailto:Timonova@ibcgenerium.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The development of a biopharmaceutical drug for enzyme replacement therapy based on recombinant acid  $\alpha$ -1,4-glucosidase ( $\alpha$ -glucosidase) is a pressing task, the solution of which could provide patients with Pompe disease in the Russian Federation with the necessary amount of the drug. This study demonstrates an effective method for developing, from the CHO-K1 cell line, a stable industrial producer clone that produces active  $\alpha$ -glucosidase.

**AIM.** This study aimed to develop monoclonal cell lines producing recombinant acid  $\alpha$ -glucosidase and to evaluate the stability of growth characteristics and productivity during cultivation over 60 generations.

**MATERIALS AND METHODS.** The suspension CHO-K1 cell line (ECACC) was cultured in BalanCD Growth A medium. Cell transfection was performed by electroporation using the MaxCyte system (according to the CHO protocol). Selection of producers was carried out using puromycin (5  $\mu$ g/mL). Cloning was performed using a cell dispensing system based on microfluidic technology (C.SIGHT). The monoclonality of the cell lines was confirmed using an automated cell imaging system (Cell Metric CLD). The concentration of  $\alpha$ -glucosidase in the culture fluid was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Enzyme activity was measured by a colorimetric method using the substrate 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNP- $\alpha$ -D-Glc).

**RESULTS.** Screening of 1000 producers was performed, resulting in the selection of 22 cell lines with a productivity of 0.14–0.65 g/L. The lead  $\alpha$ -glucosidase producer GAA-14 was cloned, followed by confirmation of monoclonality. A panel of 20 monoclonal lines was obtained. The specific activity of the enzyme and the mannose-6-phosphate residue (M6P) content did not differ from those of the reference drug (4.3 $\pm$ 0.9 U/mg and 0.99 $\pm$ 0.10 mol M6P/mol protein, respectively). When studying the stability of the lead clone over 60 generations, preservation of growth characteristics (viability, 98.5 $\pm$ 1.5%; population doubling time, 20.0 $\pm$ 1.3 h; and productivity, 450 $\pm$ 20 mg/L) was demonstrated under batch cultivation over 7 days.

**CONCLUSIONS.** A stable monoclonal  $\alpha$ -glucosidase producer cell line based on CHO-K1 cells has been developed, yielding the active enzyme at 0.45 g/L on day 7. The resulting producer clone is suitable for scale-up and manufacture of the drug substance for preclinical studies.

### Keywords:

CHO-K1 cell line; monoclonal cell line; acid alpha-glucosidase; lysosomal acid alpha-1,4-glucosidase; 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside; glycogen storage disease type II; GSD II; recombinant enzymes

**For citation:** Timonova S.S., Shubina S.S., Snegireva J.S., Anisimov R.L., Nikiforova N.V., Tretyak D.A., Koroleva M.A., Neronova M.Yu., Khamitov R.A. Development of acid alpha-glucosidase-producing clones based on the CHO-K1 cell line. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):171–182. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-171-182>

**Funding.** The study was funded by GENERIUM JSC.

**Disclosure.** R.A. Khamitov has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2013. The other authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Гликогенозы – группа орфанных заболеваний, при которых нарушается синтез или распад гликогена из-за дефицита ферментов. Болезнь Помпе (гликогеноз II типа) – редкая наследственная мультисистемная лизосомная болезнь накопления, связанная с дефицитом лизосомальной кислой  $\alpha$ -1,4-глюкозидазы ( $\alpha$ -глюкозидаза). Заболевания вызывают мутации в гене *GAA*, кодирующем  $\alpha$ -глюкозидазу. Обнаружено более 500 мутаций в гене *GAA*, которые могут приводить к нарушению синтеза  $\alpha$ -глюкозидазы [1–3].

Для замедления прогрессирования болезни Помпе применяют пожизненную ферментную заместительную терапию (ФЗТ) [4] препаратами рекомбинантной человеческой кислой  $\alpha$ -глюкозидазы: алглюкозидаза альфа (Myozyme, Sanofi Genzyme) и авалглюкозидаза альфа (Nexviazyme, Sanofi Genzyme) [5].

Разработка клеточных линий, продуцирующих активные лизосомальные ферменты, представляет собой высокотехнологичную задачу в области клеточной инженерии. Это связано с уникальными требованиями к посттрансляционной модификации, компартиментализации, внутриклеточному транспорту, активности ферментов, их рН-зависимому протеолитическому процессингу и выбору системы экспрессии. Выбор системы экспрессии критичен для производства рекомбинантных лизосомальных гидролаз, поскольку необходимо обеспечить паттерн гликозилирования, соответствующий нативному человеческому белку. Клеточные линии млекопитающих, в частности CHO-K1, широко используются в биофармацевтике для получения различных белков, включая ферменты. Это обусловлено их ферментативным аппаратом, который обеспечивает посттрансляционную модификацию и присоединение метки – остатка маннозо-6-фосфата (М6Р) к олигосахаридам белка [6, 7]. Получение активной  $\alpha$ -глюкозидазы показано с использованием растительных клеточных линий: клеток риса (титр до 45 мг/л, удельная активность 3,092 Ед/мг [8]); трансгенных клеток риса (выход  $\alpha$ -глюкозидазы – 37 мг/л [9]); клеток линии *Arabidopsis alg3*, дефицитной по  $\alpha$ -1,3-маннозилтрансферазе (максимальный

выход  $\alpha$ -глюкозидазы – 228±21,1 мкг/л [10]). Несмотря на применение гликоинженерных растительных систем экспрессии, их продуктивность остается низкой (менее 50 мг/л), тогда как CHO-клетки обеспечивают промышленно значимые титры.

Лизосомальные ферменты имеют уникальный паттерн посттрансляционного гликозилирования. Критически важные остатки М6Р на терминальных участках N-связанных гликанов обеспечивают специфическое узнавание лизосомального фермента рецепторами и его последующий транспорт в лизосомы. Именно терминальные М6Р-остатки фермента обуславливают рецепторно-опосредованный эндоцитоз препарата и его биологическую функцию в лизосоме [11]. Для повышения содержания М6Р применяют различные стратегии, такие как: котрансфекция генов-модуляторов (например, коэкспрессия фосфотрансферазы GlcNAc-1-PT [12]); нокаут генов кислых фосфатаз *Asp2* и *Asp5*; химическая конъюгация очищенного фермента с бис-маннозо-6-фосфатом [13]; сайт-селективное ферментативное М6Р-гликановое ремоделирование с использованием эндогликозидаз *Endo-A/Endo-F3* и синтетического оксазолитетрасахарида М6Р [14].

При получении линий-продуцентов лизосомальных ферментов важно учитывать вышеперечисленные аспекты, а также особенности строения и функции получаемого фермента для оптимизации стратегии отбора. Многие исследования сосредоточены на максимизации титра. Однако недостаточное внимание к удельной активности и генетической стабильности клеточной линии в долгосрочной перспективе ведет к нарушению посттрансляционных модификаций и, как следствие, к снижению терапевтической эффективности конечного препарата.

Предлагаемый авторами подход включает многофакторный контроль критических параметров на каждом этапе отбора клеточных линий: выявление клеточных линий с высоким титром целевого фермента и оценку их удельной активности фермента во время скринингов. Лидерные моноклональные линии изучают в ходе длительного пассирования (60 генераций)

для оценки стабильности ростовых и продукционных характеристик, а также комплексного анализа профиля гликозилирования и физико-химических свойств рекомбинантного фермента  $\alpha$ -глюкозидазы. Преимущество данной стратегии заключается в возможности получить не только высокопродуктивную, но и стабильную моноклональную линию, синтезирующую фармакологически активный продукт с предсказуемыми параметрами.

Цель работы – получение моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы и оценка стабильности ростовых показателей и продуктивности в ходе культивирования в течение 60 генераций.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: трансфекция клеток линии CHO-K1 плазмидой, кодирующей ген *GAA*; отбор продуцентов с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и оценки активности  $\alpha$ -глюкозидазы с использованием хромогенного субстрата pNP- $\alpha$ -D-Glc; получение моноклональных линий-продуцентов; изучение стабильности ростовых и продукционных характеристик лидерного клона в течение 60 генераций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Плазида, кодирующая ген *GAA*

Кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность гена *GAA* для экспрессии в клетках CHO-K1, фланкированная специфическими сайтами рестрикции, была клонирована в составе экспрессионного вектора, содержащего ген пурамицин-N-ацетилтрансферазы (селективный маркер). Экспрессия гена *GAA* находилась под транскрипционным контролем конститутивного химерного промотора CMVe/EF1 $\alpha$  (рис. 1).

### Условия культивирования клеток

Клеточную линию CHO-K1 культивировали в питательной среде BalanCD Growth A (FujiFilm, США), не содержащей компонентов животного происхождения, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Германия) в спин-тьюбах TubeSpin (конические биореакторы) (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария) при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, влажности >75%, перемешивании со скоростью 200 об/мин (рабочий объем 10–20 мл).

### Оценка жизнеспособности и подсчет клеток

Клеточную плотность и жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием трипановым синим (0,4%; NeoFroxx GmbH, Германия) с использованием автоматизированной системы подсчета клеток Countess II FL Automated Cell

Counter (Thermo Fisher Scientific, США) и одноразовых слайдов (объем образца 10 мкл).

### Трансфекция клеток электропорацией

Клетки CHO-K1 засеивали в концентрации  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл за 24 ч до трансфекции (экспоненциальная фаза роста). Отбирали 200 млн клеток, осаждали центрифугированием (200 г, 5 мин), дважды промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления компонентов среды, ресуспендировали клеточный осадок в 1 мл буфера для электропорации (MaxCyte, США) до достижения концентрации  $2,0 \times 10^8$  клеток/мл. Плазмиду, кодирующую ген *GAA*, смешивали с клетками CHO-K1 в объеме 100 мкл и вносили в кювету OC-100 (MaxCyte, США) для проведения трансфекции на системе MaxCyte STX (MaxCyte, США) по протоколу «CHO» (программа производителя) [15].

### Селекция

Пул трансфицированных клеток засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты (200 мкл/лунку) в среде BalanCD Growth A в присутствии селективного агента – пурамицина (5 мг/л).

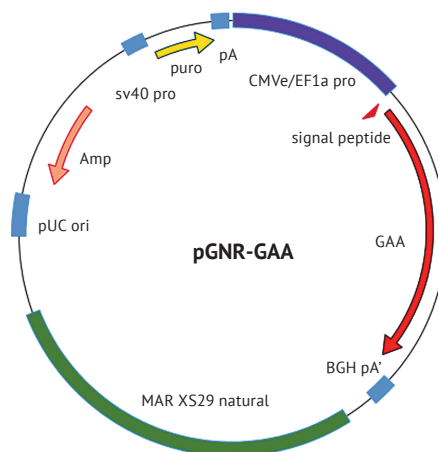


Рисунок подготовлен авторами / The figure was prepared by the authors

**Рис. 1.** Генетическая карта экспрессионного вектора pGNR-GAA. Вектор содержит целевой ген человеческой кислой альфа-глюкозидазы (*GAA*) под управлением гибридного промотора CMVe/EF1 $\alpha$ . Элементы конструкции: signal peptide – сигнальный пептид; BGH pA – терминатор транскрипции целевого гена; MAR XS29 – область прикрепления к ядерному матриксу; *puro* – ген устойчивости к пурамицину под промотором SV40; pA – сигнал полиаденилирования селективного маркера; *Amp* – ген устойчивости к ампицилину; pUC ori – точка начала репликации для *E. coli*.

**Fig. 1.** Schematic map of the pGNR-GAA expression vector. The vector contains the target human acid alpha-glucosidase (*GAA*) gene under the control of the CMVe/EF1 $\alpha$  hybrid promoter. Key elements: signal peptide; BGH pA, transcription terminator of the target gene; MAR XS29, matrix attachment region; *puro*, puromycin resistance gene driven by the SV40 promoter; pA, polyadenylation signal for the selection marker; *Amp*, ampicillin resistance gene; pUC ori, origin of replication for *E. coli*.

Инкубацию проводили в стационарном режиме до формирования устойчивых продуцентов в течение 14 сут (частичная смена селективной среды каждые 5–6 сут) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, влажности >75%.

#### **Получение клонов-продуцентов α-глюкозидазы**

Клеточную линию, продуцирующую фермент α-глюкозидазу, клонировали с применением системы дозирования единичных клеток C.SIGHT (CYTENA, Германия) в 96-луночные плоскодонные планшеты с использованием среды BalanCD Growth A и культивировали в стационарных условиях в течение 14 сут при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, влажности >75%. Моноклональность клеточных линий подтверждали с помощью автоматизированной системы визуализации (фотодокументации) клеток Cell Metric CLD (Solentim, Великобритания) путем сканирования всей площади лунки в день 0 (единичная клетка) и в последующие дни роста (мониторинг формирования колонии).

#### **Криоконсервация**

Клетки в экспоненциальной фазе роста (жизнеспособность >95%) осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин), удаляли супернатант, ресуспендировали осадок в криопротекторной смеси (ростовая среда с 10% диметилсульфоксидом) до концентрации 1,0×10<sup>7</sup> клеток/ампула, разливали в стерильные криопробирки, медленно охлаждали (1 °С/мин) в контейнере Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, США) до минус 80 °С в течение 24 ч, затем переносили в пары жидкого азота CryoExtra 20 (Thermo Scientific, США) для длительного хранения.

#### **Иммуноферментный анализ**

Специфическую сорбцию проводили на планшетах Maxi-sorb (Nunc, Дания) с использованием поликлональных кроличьих антител к hGAA (5 мг/л; АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) в карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6) в течение 16 ч при 4 °С. Для построения калибровочной кривой применяли коммерческий стандарт рекомбинантного фермента Recombinant human lysosomal alpha-glucosidase (Cusabio, КНР). Для детекции антигена использовали конъюгат крысиных анти-hGAA антител с пероксидазой хрена (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия). Оптическую плотность измеряли при λ=450 нм на фотометре Benchmark Plus (Bio-Rad, США) после остановки реакции 1 М серной кислотой.

#### **Культивирование продуцентов α-глюкозидазы**

Клетки культивировали в колбах Эрленмейера (125 мл, Corning, США) в рабочем объеме 20 мл

среды BalanCD Growth A с добавлением подкормки BalanCD CHO Feed 4 (IrvineScientific, США; 4% от объема культуры) в течение 7 сут в шейкер-инкубаторе Infors HT Multitron (INFORS HT, Швейцария) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, влажности >75%, при перемешивании 150 об/мин. Посевная концентрация клеток составляла 0,3×10<sup>6</sup> клеток/мл.

#### **Очистка фермента α-глюкозидазы**

Хроматографическую очистку α-глюкозидазы проводили с использованием препаративной системы АКТА Pure 25 (Cytiva, США). Для аффинного связывания целевого белка из культуральной жидкости (КЖ) использовали металл-хелатный сорбент IMAC 6FF (Cytiva, США), предварительно насыщенный ионами Cu<sup>2+</sup>. В ходе пробоподготовки в КЖ, содержащую целевой фермент, вносили раствор сульфата меди до конечной концентрации 1 мМ, доводили рН до 6,5 (0,3 М HCl или 0,5 М, NaOH), затем наносили КЖ на аффинный сорбент. После сорбции целевого фермента сорбент последовательно промывали фосфатными буферами с последовательным снижением ионной силы и рН: 25 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 175 мМ NaCl, рН 6,5 и 25 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 мМ NaCl, рН 6,0. Десорбцию α-глюкозидазы проводили промывкой сорбента буферным раствором (25 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ имидазола, рН 6,0) для мягкой элюции и сохранения активности фермента. Содержание белка в элюате определяли спектрофотометрически (λ=280 нм); расчет проводили с использованием коэффициента экстинкции ε=1,51 мл/(мг×см).

#### **Измерение активности фермента α-глюкозидазы**

Активность α-глюкозидазы определяли колориметрически с использованием субстрата – 4-нитрофенил-α-D-глюкопиранозида (pNP-α-D-Glc). Реакционную смесь (0,2–2,5 мкг/мл фермента, 35 мМ субстрата в ацетатном буфере, рН 4,3), инкубировали в течение 20 мин при 37 °С. Реакцию останавливали 0,3 М глициновым буфером, рН 10,6. Концентрацию высвободившегося 4-нитрофенола (pNP) измеряли при λ=405 нм на планшетном ридере Synergy HTX (BioTek, США) по калибровочной кривой pNP. За единицу активности (1 U) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата в минуту при 37 °С. Ферментативную активность (A, в ЕД/мл) рассчитывали по формуле (1):

$$A = \frac{(\text{ОП}_{\text{обр}} - \text{ОП}_{\text{бланк}}) \times C \times \text{Dil}}{(\text{ОП}_{\text{со}} - \text{ОП}_{\text{бланк}}) \times t}, \quad (1)$$

где  $OP_{обр}$  – оптическая плотность разведения испытуемого образца;  $OP_{со}$  – оптическая плотность разведения стандарта 4-нитрофенола;  $OP_{бланк}$  – оптическая плотность раствора сравнения;  $C$  – концентрация 4-нитрофенола в разведении стандарта, мкмоль/мл;  $Dil$  – коэффициент разведения испытуемого образца;  $t$  – время ферментативной реакции, мин.

### Измерение М6Р

Количественное определение остатков М6Р в  $\alpha$ -глюкозидазе проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ после селективного кислотного гидролиза олигосахаридов до свободных моносахаридов и последующей дериватизации флуоресцентной меткой [16]. Испытуемый раствор (250 мкл) – 125 мкг белка в 50% (об./об.) трифторуксусной кислоте (Merck, Германия). Гидролиз проводили при температуре 100 °С в течение 1,5 ч. Калибровочные растворы М6Р (Sigma-Aldrich, США) – от 0 до 2,5 нмоль в 75 мкл воды. В каждую пробу вносили 25 мкл (1,5 нмоль) внутреннего стандарта ксилозы (Ludger, Великобритания) и упаривали досуха в вакуумном концентраторе CentriVar (Labconco, США). Дериватизацию проводили добавлением 30 мкл раствора, содержащего 0,3 М цианоборогидрида натрия (Ludger, Великобритания), 0,1 М антралиновой кислоты (Ludger, Великобритания) в натрий-ацетатном буферном растворе (Ludger, Великобритания) с инкубацией при температуре 80 °С в течение 45 мин. После охлаждения добавляли 700 мкл подвижной фазы А (ПФ А).

Хроматографическое разделение выполняли на колонке Symmetry C18 (3,9×150 мм, размер частиц 5 мкм; Waters, США), термостатированной при 30 °С. Подвижные фазы (ПФ): ПФ А – 0,2% бутиламин (Sigma-Aldrich, США), 0,5% ортофосфорная кислота (PanReac AppliChem, Испания), 1% тетрагидрофуран (J.T. Baker, США) в воде; ПФ В – ацетонитрил (Merck, Германия). Скорость потока 0,5 мл/мин. Градиентный режим: 0–7 мин – 2,5% ПФ В (изократически); 7–25 мин – линейный градиент от 2,5 до 9% ПФ В; 25–40 мин – линейный градиент от 9 до 10% ПФ В; промывка 60% ПФ В и повторное уравнивание в начальных условиях. Объем инъекции – 10 мкл. Детектирование флуоресценции – при длинах волн возбуждения 360 нм и эмиссии 425 нм. Использовали хроматографическую систему Alliance e2695, оснащенную детектором флуоресценции FLR 2475 (Waters, США).

Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Empower 3 (Waters)

и MS Excel 2010 (Microsoft, США). По калибровочным растворам строили график зависимости отношения площади пика М6Р к площади пика ксилозы от содержания М6Р. Для испытуемых образцов рассчитывали количество остатков М6Р на одну молекулу белка.

**Статистическую обработку результатов** выполняли в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США)<sup>1</sup>. Достоверность межгрупповых различий оценивали с применением непараметрического  $U$ -критерия Манна – Уитни или  $t$ -критерия Стьюдента. Результаты представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения. Уровень статистической значимости: \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \* –  $p < 0,05$ , ns – статистически незначимы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Получение продуцентов $\alpha$ -глюкозидазы

Для получения продуцентов  $\alpha$ -глюкозидазы клетки линии CHO-K1 трансфицировали электропорацией, после чего проводили селекцию. При скрининге в 96-луночных планшетах по содержанию целевого белка в КЖ проанализировано 1000 кандидатов (рис. 2А). Доля клеточных линий, прошедших селекцию, составила около 20%, максимальная продуктивность – до 40 мг/л. Лидерные кандидаты были переведены в больший объем среды, где подтверждено наличие целевого фермента в КЖ. Максимальный выход белка на этом этапе составил до 30 мг/л (рис. 2В).

Лидерные продуценты переводили в спин-тьюбы для восстановления жизнеспособности и последующей криоконсервации. Далее осуществляли отбор продуцентов по ростовым показателям и продуктивности (рис. 3). В течение 7 сут проводили периодическое культивирование 22 продуцентов  $\alpha$ -глюкозидазы, в ходе которого оценивали жизнеспособность клеточных линий (рис. S1А, опубликован в Приложении 1 на сайте журнала<sup>2</sup>), концентрацию жизнеспособных клеток (рис. S1В, Приложение 1), продуктивность (рис. S1А), удельную продуктивность (рис. S1С, Приложение 1) и активность фермента (рис. S1В). Жизнеспособность клеточных линий начала снижаться на 7 сут, после чего культивирование было остановлено. Максимальную концентрацию жизнеспособных клеток наблюдали на 6 сут: биомасса продуцентов GAA-21 и GAA-8 достигала пиковой плотности более  $25 \times 10^6$  клеток/мл (рис. S1В, Приложение 1). Максимальную волюметрическую продуктивность ( $>0,6$  г/л) выявили у продуцентов GAA-7,

<sup>1</sup> <https://cdn.graphpad.com/docs/prism/6/Prism-6-User-Guide.pdf>

<sup>2</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-171-182-annex>

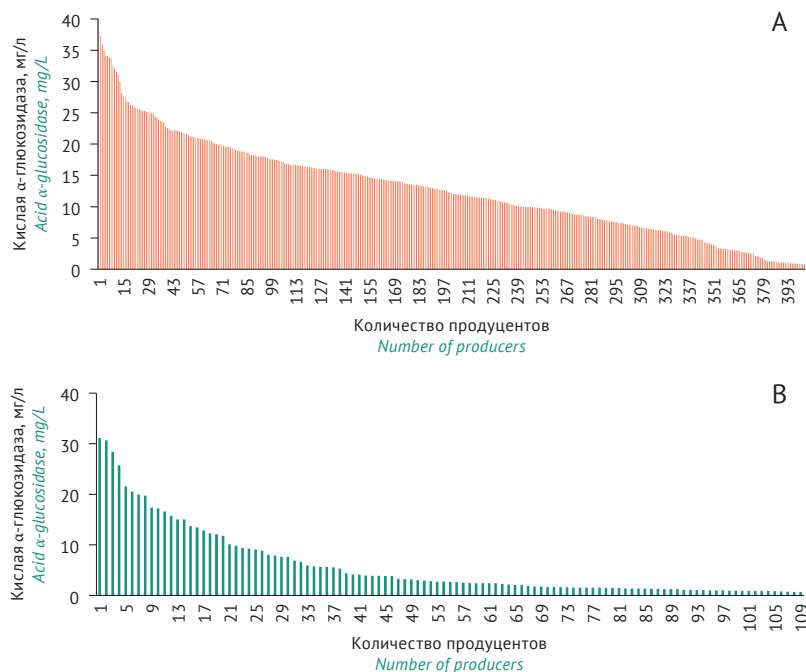


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

**Рис. 2.** Распределение продуцентов α-глюкозидазы по продуктивности при скрининге методом иммуноферментного анализа: А – 96-луночные планшеты; В – 6-луночные планшеты.

**Fig. 2.** Distribution of α-glucosidase producers by productivity in ELISA screening: A, 96-well plates; B, 6-well plates.

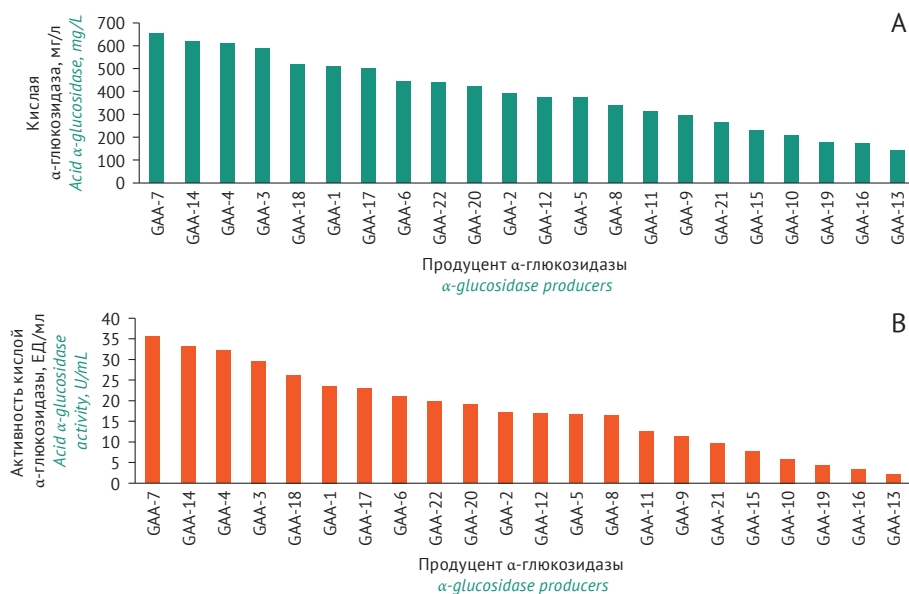


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

**Рис. 3.** Распределение продуцентов α-глюкозидазы при периодическом культивировании: А – волюметрическая продуктивность продуцентов на 7 сут, мг/л; В – активность кислой α-глюкозидазы на 7 сут, ЕД/мл.

**Fig. 3.** Distribution of α-glucosidase producers under batch cultivation: A, volumetric productivity of producers on day 7, mg/L; B, acid α-glucosidase activity on day 7, U/mL.

GAA-14 и GAA-4 (рис. 3А). Максимальную удельную продуктивность (>15 пг/клетка/сут) наблюдали у GAA-3, GAA-5, GAA-1, GAA-2 (рис. 3Б, Приложение 1). Максимальную активность целевого фермента в КЖ (>30 ЕД/мл) выявили

у GAA-7, GAA-14 и GAA-4 (рис. 3В). Таким образом, для клонирования выбран продуцент GAA-14, обладающий как высокой способностью к экспрессии целевого гена, так и максимальной удельной активностью синтезируемого фермента.

### Получение моноклональных клеточных линий-продуцентов

Процедуру клонирования проводили в соответствии с принципами обеспечения моноклональности клеточных линий (FDA Q5D<sup>3</sup>), поскольку при производстве биофармацевтических продуктов использование моноклональной клеточной линии является ключевым фактором, гарантирующим постоянство, предсказуемое качество синтезируемых рекомбинантных белков и стабильность клеточных линий.

Лидерный продуцент GAA-14 клонировали с помощью системы дозирования клеток C.SIGHT. Пример отбора единичной клетки представлен на рисунке S2A (Приложение 1). Всего получено 880 клонов в десяти 96-луночных планшетах. Моноклональность подтверждали с помощью системы Cell Metric. Время деления клеток CHO-K1 составляет примерно 18–22 ч, поэтому фотодокументацию (Cell Metric CLD) проводили так, чтобы в день посева (клонирования) детектировать единичную клетку, через 24 ч – две клетки, на 2 сут роста – четыре клетки. Визуализацию роста моноклонов выполняли в течение 12 сут (рис. S2B, Приложение 1).

Далее проведена серия скринингов на наличие целевого фермента и его активности для полученных клонов (аналогично процедуре, представленной на рис. 2). Получено 20 подтвержденных моноклональных клеточных линий, продуцирующих α-глюкозидазу. Удельная активность фермента в панели клонов не отличалась от референтного препарата и составила 4,3±0,9 ЕД/мг (рис. 4A). Количественное определение остатков М6Р на молекулу целевого фермента для ряда

лидерных клонов показало среднее значение 0,99±0,10 моль М6Р/моль белка, что сопоставимо с референтным препаратом (рис. 4B).

### Изучение стабильности ростовых и продукционных характеристик клон-продуцента α-глюкозидазы в течение 60 генераций и более

Оценивали стабильность восьми лидерных моноклональных клеточных линий α-глюкозидазы в течение 60 генераций. На рисунке 5 представлены характеристики лидерного промышленного клон-продуцента. Пересевы проводили в течение 2 мес. через каждые 3–4 сут с подсчетом концентрации жизнеспособных клеток, определением жизнеспособности и отбором проб для анализа продуктивности фермента. Характеристики культуры в течение 60 генераций оставались стабильными: жизнеспособность – 98,5±1,5% (рис. 5D), концентрация жизнеспособных клеток на 3 и 4 сут пересева – (3,8±0,6)×10<sup>6</sup> и (8,3±1,8)×10<sup>6</sup> клеток/мл соответственно (рис. 5E). Время удвоения популяции составляло 20,0±1,3 ч (рис. 5F).

После длительного пассирования клонов-продуцентов (60 генераций) проводили периодическое культивирование одного и того же клон-продуцента на ранних (5–10 генераций) и поздних (>60 генераций) пассажах в течение 7 сут. На последние сутки клеточная плотность достигла максимума – (23,3±1,2)×10<sup>6</sup> клеток/мл (рис. 5A). Жизнеспособность клон-продуцента во время периодического культивирования была стабильно высокой и варьировалась от 94 до 99% (рис. 5B). Продуктивность составила 450±20 мг/л целевого белка (рис. 5C). Полученная моноклональная

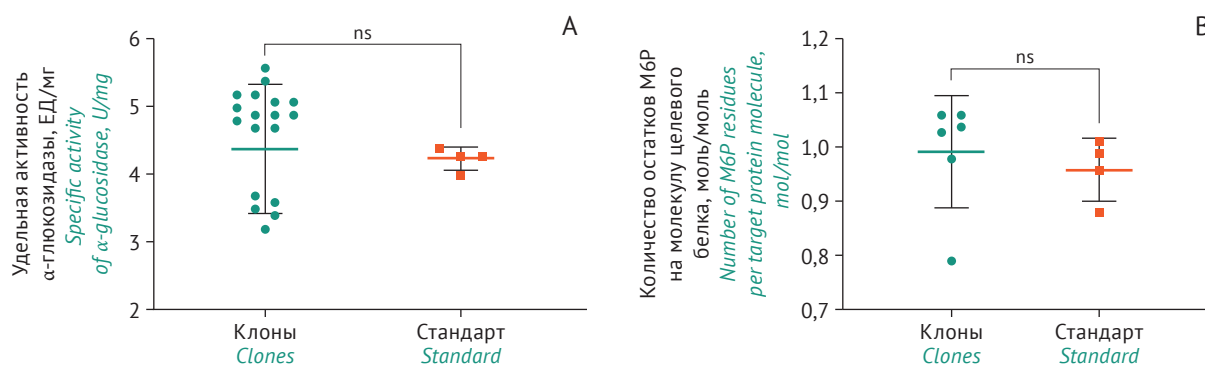


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

**Рис. 4.** Удельная активность α-глюкозидазы (A) и количество остатков маннозо-6-фосфата (М6Р) (B). Клоны – моноклональные клеточные линии-продуценты α-глюкозидазы; стандарт – референтный препарат сравнения на основе рекомбинантной α-глюкозидазы. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. ns – нет статистической разницы.

**Fig. 4.** Specific activity of α-glucosidase (A) and the mannose-6-phosphate (M6P) residue content (B). Clones, monoclonal α-glucosidase-producing cell lines; standard, reference comparator product based on recombinant α-glucosidase. Data are presented as the mean and standard deviation. ns – no statistically significant difference.

<sup>3</sup> Q5D Quality of biotechnological/biological products: Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products; Availability. FDA; 1998.

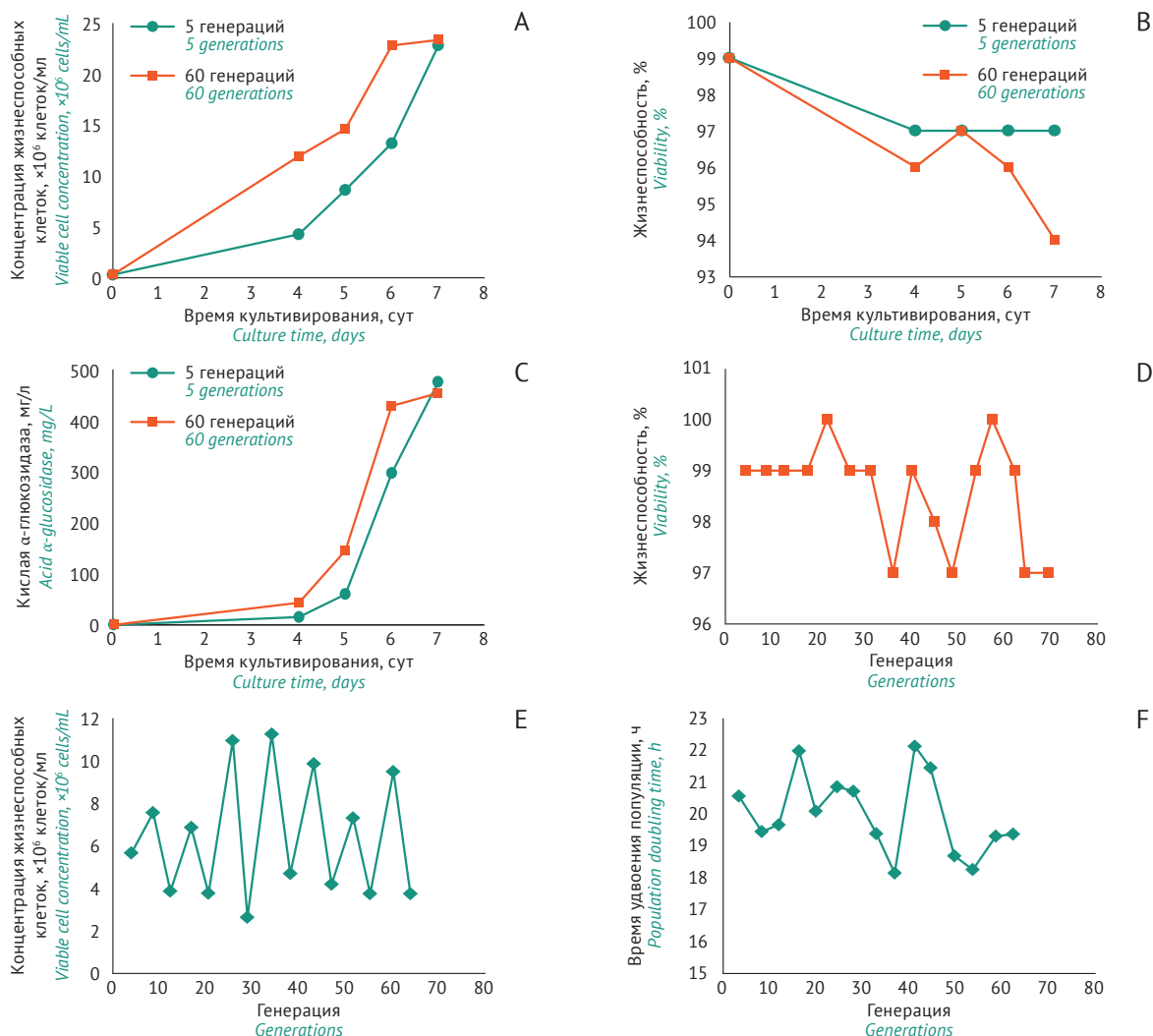


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

**Рис. 5.** Исследование стабильности лидерного клона-продуцента  $\alpha$ -глюкозидазы на основе клеток линии CHO-K1: А–С – периодическое культивирование на ранней и поздней генерации (А – концентрация жизнеспособных клеток; В – жизнеспособность; С – волюметрическая продуктивность); D–F – характеристики клона в течение 60 поколений на 3 и 4 сут пересева (D – жизнеспособность; E – концентрация жизнеспособных клеток; F – время удвоения популяции).

**Fig. 5.** Stability study of the lead  $\alpha$ -glucosidase producer clone based on the CHO-K1 cell line: A–C, batch cultivation at early and late generations (A, viable cell concentration; B, viability; C, volumetric productivity); D–F, clone characteristics over 60 generations on days 3 and 4 after subculturing (D, viability; E, viable cell concentration; F, population doubling time).

линия  $\alpha$ -глюкозидазы охарактеризована как стабильная по совокупности критических параметров качества (critical quality attributes, CQAs) для технологических промышленных процессов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе получена панель продуцентов кислой  $\alpha$ -глюкозидазы на основе клеток линии CHO-K1, продуцирующих активный фермент с титром до 0,65 г/л.

Лизосомальные ферменты, в частности гидролазы, включая  $\alpha$ -глюкозидазу, в процессе биосинтеза проявляют каталитическую активность при низких pH (4,5–5,0) и синтезируются как неактивные формы (проферменты) [17, 18].

При разработке клеточных линий-продуцентов мы проводили отбор не только по титру белка (ИФА), но и по активности фермента (рис. 3, 6). Этот подход критически важен для лизосомальных гидролаз, поскольку высокопродуктивные клоны могут продуцировать белок с нарушенной конформацией и низкой активностью. Из 1000 исходных продуцентов после последовательных этапов скрининга (в 96- и 6-луночных планшетах) отобрано 22 продуцента, протестированных в условиях периодического культивирования. Титр фермента варьировал от 140 до 650 мг/л. Выход целевого фермента продуцентов на основе CHO-K1 более чем на порядок превышал выход  $\alpha$ -глюкозидазы

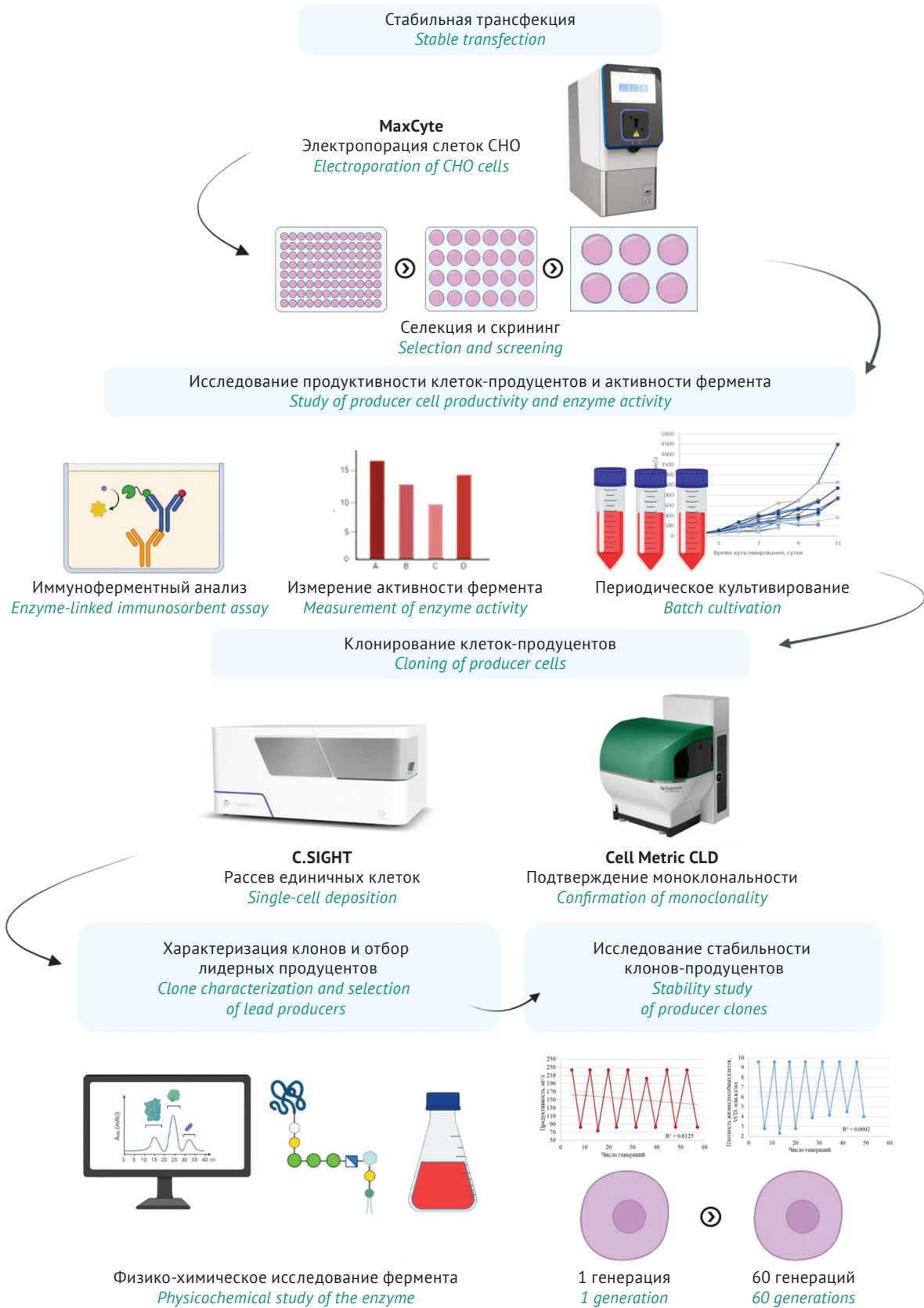


Рисунок подготовлен авторами с использованием шаблонов biorender.com / This figure was prepared by the authors using the templates from biorender.com

Рис. 6. Схема получения продуцентов  $\alpha$ -глюкозидазы на основе клеток линии CHO-K1.

Fig. 6. Scheme for the development of  $\alpha$ -glucosidase producers based on the CHO-K1 cell line.

в растительных клетках: в 14–18 раз выше по сравнению с клетками риса [8, 9] и более чем в 2000 раз выше по сравнению с культурой клеток *Arabidopsis alg3* [10]. На основе комплексной оценки физико-химических свойств, гликопрофиля и ростовых параметров был выбран продуцент GAA-14 для клонирования с использованием систем C.SIGHT и Cell Metric.

В процессе создания клеточных линий для производства рекомбинантных терапевтических лизосомальных ферментов удельная активность является одним из главных критериев качества, отражая его функциональность. Удельная активность фермента у итоговой панели лидерных клонов-продуцентов α-глюкозидазы ( $4,3 \pm 0,9$  ЕД/мг) соответствует референтному препарату ( $4,2 \pm 0,2$  ЕД/мг) (рис. 4А).

Особое значение имеет профиль гликозилирования фермента – критический параметр качества (CQA), определяющий рецептор-опосредованную интернализацию, конформационную стабильность, фармакокинетический профиль (включая период полувыведения) и низкую иммуногенность препарата. Уровень М6Р полученных белков составил  $0,99 \pm 0,10$  моль М6Р/моль белка, что сопоставимо с референтным препаратом ( $0,96 \pm 0,06$  моль М6Р/моль белка) (рис. 4В).

Важнейшим этапом разработки промышленного продуцента является подтверждение его фенотипической стабильности. Для получения качественного продукта в производственных условиях клеточная линия должна стабильно продуцировать фермент длительное время. В ходе исследования изучена стабильность полученных клонов-продуцентов α-глюкозидазы при длительном пассировании (60 генераций) с мониторингом клеточного роста, жизнеспособности и продуктивности. В отличие от большинства работ, сосредоточенных на отдельных задачах (повышение активности, продуктивности, оптимизация гликопрофиля и др.), в настоящей работе предложен комплексный подход, включающий не только стандартные этапы, но и комплексное изучение стабильности клеточных линий-продуцентов в процессе длительного культивирования в течение 60 генераций (рис. 6). Такой подход является преимуществом нашей работы и гарантирует предсказуемость свойств целевого фермента в промышленном масштабе.

К ограничениям работы можно отнести то, что представленные результаты по экспрессии целевого гена и стабильности клона GAA-14 получены в условиях лабораторного культивирования, что налагает определенные ограничения на экстраполяцию данных. В частности, для перехода в промышленные биореакторы необходимо учитывать гидродинамический профиль, коэффициент массопередачи кислорода и другие особенности [19].

Несмотря на указанные ограничения, полученные результаты имеют высокую практическую значимость. Представленный подход позволил отобрать стабильный клон-продуцент α-глюкозидазы с продуктивностью 0,45 г/л, пригодный для масштабирования. Полученный фермент по удельной активности и уровню М6Р не уступает референтному препарату и может быть использован для наработки субстанции и доклинических исследований. Дальнейшие работы будут направлены на оптимизацию промышленного масштабирования в биореакторах. Описанная схема разработки клеточной линии (рис. 6) позволит получать различные рекомбинантные белки подобного класса, в частности лизосомальные гидролазы.

## Выводы

1. Получена панель из 20 моноклональных клеточных линий-продуцентов активной α-глюкозидазы на основе CHO-K1. Максимальная продуктивность линий составила 0,14–0,65 г/л, удельная активность полученного фермента –  $4,3 \pm 0,9$  ЕД/мг, уровень остатков М6Р –  $0,99 \pm 0,10$  моль М6Р/моль белка, что сопоставимо с референтным препаратом ( $4,2 \pm 0,2$  ЕД/мг и  $0,96 \pm 0,06$  моль М6Р/моль белка соответственно).
2. Изучение стабильности лидерного клона в течение 60 генераций показало сохранение ростовых характеристик (жизнеспособность  $98,5 \pm 1,5\%$ , время удвоения популяции  $20,0 \pm 1,3$  ч) и продуктивности. Для лидерного клона GAA-14 продуктивность активного фермента составила  $450 \pm 20$  мг/л на 7 сут.
3. Клон-продуцент с подтвержденной стабильностью может быть использован для наработки экспериментальных серий α-глюкозидазы, пригодных для проведения доклинических исследований.

## Литература/References

1. Herzog A, Hartung R, Reuser AJ, et al. A cross-sectional single-centre study on the spectrum of Pompe disease, German patients: molecular analysis of the GAA gene, manifestation and genotype-phenotype correlations. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-35>
2. Wan L, Lee CC, Hsu CM, et al. Identification of eight novel mutations of the acid alpha-glucosidase gene causing the infantile or juvenile form of glycogen storage disease type II. *J Neurol.* 2008;255(6):831–8. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-0714-0>
3. Taverna S, Cammarata G, Colomba P, et al. Pompe disease: Pathogenesis, molecular genetics and diagnosis. *Aging (Albany NY).* 2020;12(15):15856–74. <https://doi.org/10.18632/aging.103794>

- Risi B, Caria F, Bertella E, et al. Management of Pompe disease alongside and beyond ERT: A narrative review. *Acta Myol.* 2025;44(1):11–22. <https://doi.org/10.36185/2532-1900-1106>
- Chien YH, Chen HA, Hsu RH, et al. Efficacy of transitioning from alglucosidase alfa to avalglucosidase alfa in infantile-onset Pompe disease: A single-center cohort analysis. *Genet Med.* 2025;27(5):101373. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2025.101373>
- Kishnani PS, Díaz-Manera J, Illarioshkin S, et al. Efficacy and safety of avalglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease after 145 weeks of treatment during the COMET trial. *J Neurol.* 2025;272(9):581. <https://doi.org/10.1007/s00415-025-13266-y>
- Le Bras A, De Lonlay P, Attarian S, et al. Medical expenses and care pathways of patients with Pompe receiving myozyme: an observational study based on the French national healthcare database. *Orphanet J Rare Dis.* 2025;20(1):554. <https://doi.org/10.1186/s13023-025-03866-2>
- Jung JW, Huy NX, Kim HB, et al. Production of recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase with high-mannose glycans in Gnt1 rice for the treatment of Pompe disease. *J Biotechnol.* 2017;249:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.033>
- Jung JW, Kim NS, Jang SH, et al. Production and characterization of recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase in transgenic rice cell suspension culture. *J Biotechnol.* 2016;226:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.031>
- Sariyatun R, Florence, Kajiura H, et al. Production of human acid-alpha glucosidase with a paucimannose structure by glycoengineered arabidopsis cell culture. *Front Plant Sci.* 2021;12:703020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.703020>
- Bohnsack RN, Misra SK, Liu J, et al. Lysosomal enzyme binding to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor is regulated allosterically by insulin-like growth factor 2. *Sci Rep.* 2024;14(1):26875. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75300-9>
- Liu L, Lee WS, Doray B, Kornfeld S. Engineering of GlcNAc-1-phosphotransferase for production of highly phosphorylated lysosomal enzymes for enzyme replacement therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;5:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.03.006>
- Caval T, Zhu J, Tian W, et al. Targeted analysis of lysosomal directed proteins and their sites of mannose-6-phosphate modification. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18(1):16–27. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000967>
- Zhang X, Liu H, Meena N, et al. Chemoenzymatic glycan-selective remodelling of a therapeutic lysosomal enzyme with high-affinity M6P-glycan ligands. Enzyme substrate specificity is the name of the game. *Chem Sci.* 2021;12(37):12451–62. <https://doi.org/10.1039/d1sc03188k>
- Steger K, Brady J, Wang W, et al. CHO-S antibody titers >1 gram/liter using flow electroporation-mediated transient gene expression followed by rapid migration to high-yield stable cell lines. *J Biomol Screen.* 2015;20(4):545–51. <https://doi.org/10.1177/1087057114563494>
- Anumula KR. Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal Biochem.* 1994;220(2):275–85. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1338>
- Trivedi PC, Bartlett JJ, Puliniikunnil T. Lysosomal biology and function: Modern view of cellular debris bin. *Cells.* 2020;9(5):1131. <https://doi.org/10.3390/cells9051131>
- Feng X, Liu S, Xu H. Not just protons: Chloride also activates lysosomal acidic hydrolases. *J Cell Biol.* 2023;222(6):e202305007. <https://doi.org/10.1083/jcb.202305007>
- Neuss A, Steimann T, Tomas Borges JS, et al. Scale-up of CHO cell cultures: From 96-well-microtiter plates to stirred tank reactors across three orders of magnitude. *J Biol Eng.* 2025;19(1):5. <https://doi.org/10.1186/s13036-024-00475-8>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликовано Приложение 1. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-171-182-annex>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.С. Тимонова** – разработка клеточной линии, анализ результатов, статистическая обработка данных, формирование концепции статьи, написание текста рукописи; **С.С. Шубина** – оформление иллюстраций и редактирование текста рукописи; **Ю.С. Снегирева** – анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; **Р.Л. Анисимов** – дизайн экспрессионных векторов; **Н.В. Никифорова** – получение плазмид; **Д.А. Третяк** – очистка фермента; **М.А. Королева** – измерение активности фермента; **М.Ю. Неронова** – определение маннозо-6-фосфатных остатков; **Р.А. Хамитов** – научная экспертиза, координация работ, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

**Использование генеративного искусственного интеллекта.** Авторы заявляют, что не использовали генеративный ИИ при подготовке рукописи.

**Supplementary information.** Supplementary material 1 is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-171-182-annex>

**Author contributions.** All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.S. Timonova** developed the cell line, analyzed the results, performed statistical data processing, conceptualized the article, and drafted the manuscript. **S.S. Shubina** prepared the illustrations and edited the manuscript. **J.S. Snegireva** analyzed the literature and edited the manuscript. **R.L. Anisimov** designed the expression vectors. **N.V. Nikiforova** obtained the plasmids. **D.A. Tretyak** purified the enzyme. **M.A. Koroleva** measured the enzyme activity. **M.Yu. Neranova** determined the mannose-6-phosphate residue content. **R.A. Khamitov** provided scientific expertise, coordinated the work, and approved the final version of the article for publication.

**Use of generative artificial intelligence.** The authors declare that no generative AI was used during the preparation of this manuscript.

## Об авторах / Authors

Тимонова Софья Сергеевна, канд. биол. наук / Sofia S. Timonova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>

Шубина Софья Сергеевна / Sofia S. Shubina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5762-2193>

Снегирева Юлия Сергеевна / Julia S. Snegireva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0343-8993>

Анисимов Роман Львович, канд. биол. наук / Roman L. Anisimov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9131-3464>

Никифорова Наталья Владимировна / Natalya V. Nikiforova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8151-5758>

Третяк Данила Алексеевич / Danila A. Tretyak

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7987-3513>

Королева Мария Александровна / Mariya A. Koroleva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0557>

Неронова Мария Юрьевна / Maria Yu. Neranova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6029-4563>

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф. / Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Поступила 19.02.2026

После доработки 22.05.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Received February 19, 2026

Revised May 22, 2026

Accepted June 19, 2026