

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Том / Volume

№ / No.

24

2

2024

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

ТЕМА НОМЕРА

**Высокотехнологичные
лекарственные препараты**



www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Внедрение технологий генной и таргетной терапии, новых методов лечения, в том числе с применением биомедицинских клеточных продуктов, определено Стратегией развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года в качестве приоритетной задачи. Терапия высокотехнологичными лекарственными препаратами, включающими препараты генной терапии, терапии соматическими клетками и тканевой инженерии, обещает кардинально изменить подходы к лечению тяжелых заболеваний, таких как наследственные мышечные атрофии различного генеза, кистозные фиброзы, нейродегенеративные состояния и многие другие неизлечимые сегодня болезни.

Однако необходимо признать, что они все еще относятся к новым методам лечения, несмотря на достаточно длительную историю этих разработок. Первые зарегистрированные высокотехнологичные препараты внедрены в медицинскую практику совсем недавно. Генная и клеточная терапии вносят пока не-

значительный вклад в общественное здравоохранение, уступая как низкомолекулярным лекарствам, так и терапевтическим рекомбинантным белкам. Это связано с такими проблемами, как недостаток научных данных, несовершенство нормативной базы, отсутствие релевантного опыта в разработках и масштабировании производства. Но темп исследований в этой области растет, поэтому нет оснований не верить, что в ближайшее время будут устранены основные препятствия, чтобы в полной мере реализовать прорывной потенциал высокотехнологичных лекарственных препаратов.

Отечественный регулятор активно поддерживает развивающуюся отрасль. Совсем недавно были установлены регуляторные требования к регистрации высокотехнологичных лекарственных препаратов, что определенно облегчает их продвижение в клиническую практику.

Одним из главных источников научной и практической информации для специалистов в области разработки, производства и применения высокотехнологичных лекарственных препаратов являются специализированные научные издания, в частности, журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», данный номер которого посвящен проблемным вопросам клеточной и генной терапии. Примечательно, что номер содержит научные статьи обзорного характера по наиболее перспективным модальностям генотерапии наследственных и онкологических заболеваний, а также оригинальные статьи, обобщающие опыт клинического использования биомедицинских клеточных продуктов, разработки систем доставки генетических конструкций, технологические вопросы производства и стандартизации аденоассоциированных вирусов, используемых в качестве препаратов генной терапии.

Впечатляет научный потенциал и география исследовательских и производственных коллективов, участвующих в этих исследованиях. Это позволяет надеяться, что накопленный опыт разработки, производства и внедрения новых генно-терапевтических препаратов будет способствовать доступности этих высокотехнологичных лекарственных средств для пациентов.

С уважением,
доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки Российской Федерации

ХАМИТОВ Равиль Авгатович

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 24, № 2, 2024

Научно-практический журнал
Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год)
Основан в 2001 году

Учредитель:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, включен в «Белый список» научных журналов. Журнал принимает статьи по следующим научным специальностям: биотехнология, молекулярная биология, вирусология, микробиология, аллергология и иммунология.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 0,980.

Журнал индексируется в базах данных: Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM каталог, DOAJ, Ulrichsweb и др.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC BY 4.0.

VOLUME 24, NO. 2, 2024

Research and practice journal
Published quarterly (four issues per year)
Founded in 2001

Founder:

Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products)

The journal is included in the White list of Russian scientific journals and in the List of peer-reviewed scientific publications that the State Commission for Academic Degrees and Titles recommends for publishing the main scientific results of theses for Candidate of Science and Doctor of Science degrees. Articles submitted to the journal should cover the following fields of research: biotechnology, molecular biology, virology, microbiology, allergology and immunology.

The journal's two-year RISC impact factor is 0.980.

The journal is indexed in the following databases: Russian Index of Science Citation (RISC), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM Catalog, DOAJ, Ulrichsweb, etc.

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript. The content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0).

На обложке: Молекула ДНК (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX103296960/>)

Cover image: DNA molecule (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX103296960/>)

Главный редактор

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

В журнале публикуются обзорные, оригинальные, дискуссионные статьи по вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов – иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных; а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

Редакционная коллегия

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Агафонов Александр Петрович, д-р биол. наук, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия)

Аракелов Сергей Александрович, канд. биол. наук, ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФМБА России (Москва, Россия)

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

Валента Рудольф, MD, проф., Венский медицинский университет (Вена, Австрия)

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук, доц., ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» (Минск, Республика Беларусь)

Гончаров Андрей Евгеньевич, канд. мед. наук, доц., ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» (Минск, Республика Беларусь)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лакота Ян, д-р мед. наук, Институт нормальной и патологической физиологии Центра экспериментальной медицины Словацкой академии наук (Братислава, Словакия)

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, академик РАН, академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Миронов Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф., ООО «Национальное агентство лекарственных средств» (Москва, Россия)

Мовсисянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., АО «Генериум» (пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия)

Учредитель и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор

Федотова Ольга Федоровна
+7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

**Ответственный редактор
тематического выпуска**

Хамитов Равиль Авгатович,
д-р мед. наук, проф.

Научный редактор

Лукасова Надежда Вадимовна,
канд. биол. наук

Редактор перевода

Балтина Любовь Александровна

Менеджер по развитию

Мжельский Александр Анатольевич

Адрес учредителя и редакции

127051, Москва,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2
тел.: +7 (499) 190-18-18
(доб. 63-42, 63-02, 63-35)
biopreparaty@expmed.ru

Исполнитель

ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,
ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография

ООО «Издательство «Триада»: 170034,
Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

Тираж

150 экз. Цена свободная

Подписано в печать

03.07.2024

Дата выхода в свет

05.07.2024

Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» — 57941,
в каталоге агентства «Урал-Пресс» —
57941

Журнал зарегистрирован в Федераль-
ной службе по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массо-
вых коммуникаций. Свидетельство
ПИ № ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

© Составление. Оформление.
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
2024

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера:

Высокотехнологичные лекарственные препараты

Т.В. Егорова, А.А. Пискунов, Д.А. Потеряев
**Генная терапия наследственных заболеваний на
основе аденоассоциированных вирусных векторов:
современные проблемы применения и пути их решения123**

С.К. Мирошниченко, О.А. Патутина, М.А. Зенкова
**МикроРНК-направленные олигонуклеотидные конструкции
с различным механизмом действия для эффективного
подавления процессов канцерогенеза140**

И.П. Шиловский, Г.Б. Пасихов, В.В. Смирнов, И.А. Кофиади,
М.В. Попова, П.А. Струева, М.Р. Хаитов
**Применение терапевтических нуклеиновых кислот
и интерференции РНК для создания средств
персонализированной медицины157**

А.С. Зоричева, Е.А. Звонова, Л.С. Агапова, М.С. Лыкова,
О.А. Маркова, В.С. Леонов
**Опыт производства и клинического применения
биомедицинского клеточного продукта Изитенс®
для восстановления повреждений хрящевой ткани
коленного сустава человека172**

Е.В. Шмендель, О.В. Марков, М.А. Зенкова, М.А. Маслов
**Кинетика накопления в клетках флуоресцентно-
меченного олигонуклеотида при использовании адресных
фолатсодержащих катионных липосом188**

А.В. Тумаев, Д.Ю. Волошин, Е.С. Бердинских, Е.Л. Сахибгараева,
Е.В. Головин, Е.Н. Субчева, О.О. Васильева, А.А. Галиева,
А.А. Чувашов, Е.С. Новикова, А.В. Карабельский
**Разработка стандартного образца пустых капсидов
рекомбинантного аденоассоциированного вируса
для контроля качества препаратов генной терапии200**

Д.О. Максимов, Д.А. Наумова, Е.А. Астахова, В.В. Артемьев,
С.А. Бирюков, И.С. Абрамов, А.А. Навойкова, Н.В. Рудев,
С.Г. Феоктистова, О.В. Глазова, О.Н. Митяева, П.Ю. Волчков
**Оценка тропизма и биораспределения синтетических
и природных аденоассоциированных вирусных векторов
in vivo методом секвенирования нового поколения215**

Методические материалы

З.Е. Бердникова, А.С. Тихонова
**Рекомендации по разработке методик испытания
стерильности биологических лекарственных препаратов
на основе фармакопейных методов229**

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

The journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* publishes reviews, original articles, and discussion articles on such issues as development of regulatory procedures, standardisation, quality control, production, and use of biological products for disease prevention, diagnosis, and treatment: immunobiological, biotechnological, gene therapy, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and biomedical cell products.

Editorial Board

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Alexander P. Agafonov, Dr. Sci. (Biol.), State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" (Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia)

Sergey A. Arakelov, Cand. Sci. (Biol.), Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia)

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Rudolf Valenta, MD, PhD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

Elena L. Gasich, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Andrei Y. Hancharou, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Minsk, Republic of Belarus)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (Moscow, Russia)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia)

Vladimir I. Klimov, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Alexey S. Korovkin, Cand. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Ján Lakota, MD, PhD, Institute of Normal and Pathological Physiology at the Centre of Experimental Medicine of the Slovak Academy of Sciences (Bratislava, Slovakia)

Denis Yu. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Academician of the RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (Moscow, Russia)

Aleksandr N. Mironov, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Agency of Medicines (Moscow, Russia)

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Generium JSC (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

Founder and publisher

Federal State Budgetary Institution
"Scientific Centre for Expert Evaluation
of Medicinal Products" of the Ministry
of Health of the Russian Federation

Managing Editor

Olga F. Fedotova

+7 (495) 121-06-00 (63-05)

Fedotovaof@expmed.ru

Guest editor for the special issue

Ravil A. Khamitov,

Dr. Sci. (Med.), Prof.

Science Editor

Nadezhda V. Gukasova, Cand. Sci. (Biol.)

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Development Manager

Alexander A. Mzhelsky

Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Tel.: +7 (499) 190-18-18

(63-42, 63-02, 63-35)

biopreparaty@expmed.ru

Contract publisher

NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St.,
Moscow 115114

Printing office

Triada Publishing House LLC:

9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver

170034

Print run

150 copies. Free price

Passed for printing

3 July 2024

Date of publication

5 July 2024

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 57941

The journal is registered as mass media
by the Federal Service for Supervision
of Communications, Information
Technologies and Mass Communications.
Certificate PI No. FS77-82918 dated
14 March 2022

© Compilation, design. Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal
Products, 2024

CONTENTS

Issue topic

Advanced therapy medicinal products

T.V. Egorova, A.A. Piskunov, D.A. Poteryaev

Adeno-associated virus vector-based gene therapy

for hereditary diseases: current problems of application

and approaches to solve them.....123

S.K. Miroshnichenko, O.A. Patutina, M.A. Zenkova

miRNA-targeting oligonucleotide constructs

with various mechanisms of action as effective inhibitors

of carcinogenesis.....140

I.P. Shilovskiy, G.B. Pasikhov, V.V. Smirnov, I.A. Kofiadi,

M.V. Popova, P.A. Strueva, M.R. Khaitov

Application of therapeutic nucleic acids and RNA interference

to create products for personalised medicine157

A.S. Zoricheva, E.A. Zvonova, L.S. Agapova, M.S. Lykova,

O.A. Markova, V.S. Leonov

Experience in the production and clinical application

of the cell-based medicinal product Easytense® for the repair

of cartilage defects of the human knee.....172

E.V. Shmendel, O.V. Markov, M.A. Zenkova, M.A. Maslov

Time course of fluorescent-labelled oligonucleotide

accumulation in cells with the use of folate receptor-targeted

cationic liposomes188

A.V. Tumaev, D.Yu. Voloshin, E.S. Berdinskikh,

E.L. Sakhibgaraeva, E.V. Golovin, E.N. Subcheva, O.O. Vasileva,

A.A. Galieva, A.A. Chuvashov, E.S. Novikova, A.V. Karabelsky

Development of recombinant adeno-associated virus

empty capsids as a reference standard for quality control

of gene therapy products200

D.O. Maksimov, D.A. Naumova, E.A. Astakhova, V.V. Artemev,

S.A. Biryukov, I.S. Abramov, A.A. Navoikova, N.V. Rudev,

S.G. Feoktistova, O.V. Glazova, O.N. Mityaeva, P.Yu. Volchikov

In vivo evaluation of tropism and biodistribution

of synthetic and natural adeno-associated viral vectors

by next-generation sequencing.....215

Methodological materials

Z.E. Berdnikova, A.S. Tikhonova

Recommendations for the development of sterility

testing procedures for biological medicinal products

based on pharmacopoeial methods229



Генная терапия наследственных заболеваний на основе аденоассоциированных вирусных векторов: современные проблемы применения и пути их решения

Т.В. Егорова^{1,2}, А.А. Пискунов³, Д.А. Потеряев³, ✉

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, ул. Вавилова, д. 34/5, Москва, 119334, Российская Федерация

² ООО «Марлин Биотех», Триумфальный проезд, д. 1, пгт. Сириус, Краснодарский край, 354340, Российская Федерация

³ Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время генная терапия на основе аденоассоциированных вирусов (adeno-associated viruses, AAV) сталкивается с рядом барьеров биомедицинского и технологического характера, анализ и преодоление которых необходимо для дальнейшего развития данного направления генной терапии.

ЦЕЛЬ. Провести анализ применения генной терапии ряда наследственных заболеваний с учетом ограничений, связанных с побочными эффектами или недостаточной эффективностью генной терапии, проблемой определения терапевтического окна и индивидуальной спецификой наследственного заболевания, а также рассмотреть подходы для снятия этих ограничений и повышения доступности генной терапии путем усовершенствования технологических подходов производства и снижения себестоимости генотерапевтических препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ. Рассмотрен опыт применения одобренных и находящихся на этапе клинических исследований генотерапевтических препаратов. Проведена оценка применимости генной терапии на примере ряда наследственных заболеваний и показано, что правильное определение терапевтического окна препаратов и своевременная диагностика наследственных заболеваний являются критически важными для эффективной и безопасной генной терапии. Рассмотрены современные стратегии снижения риска возникновения побочных эффектов и увеличения эффективности генной терапии на основе AAV, среди которых наиболее важны следующие: поиск новых серотипов AAV, модификация капсидов и генома AAV, подавление нецелевой экспрессии с помощью микроРНК, изменение содержания CpG, поиск новых промоторов для трансгена. Проведен анализ развития технологии производства генотерапевтических препаратов на основе AAV. Наиболее перспективным представляется переход на суспензионное культивирование, усовершенствование биореакторов, применение новых методов и материалов очистки вирусных частиц, совершенствование систем трансфекции и создание новых клеточных линий-продуцентов, что в конечном счете может привести к снижению затрат на производство препаратов и повышению доступности генной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В настоящее время генная терапия используется только для небольшого количества наследственных заболеваний. Существенные ограничения применения генотерапевтических препаратов связаны с недостаточной эффективностью, риском возникновения побочных эффектов и высокой стоимостью лечения. Ведущиеся в настоящее время биомедицинские и технологические разработки позволят решить указанные проблемы и повысить доступность генной терапии.

Ключевые слова: генная терапия; генотерапевтический лекарственный препарат; аденоассоциированный вирус; AAV; аденоассоциированные вирусные векторы; наследственные заболевания; гемофилия; миодистрофия Дюшенна; эффективность генной терапии; безопасность генной терапии; технология производства AAV; модификация AAV; трехплазмидная технология; очистка вирусных частиц AAV

Для цитирования: Егорова Т.В., Пискунов А.А., Потеряев Д.А. Генная терапия наследственных заболеваний на основе аденоассоциированных вирусных векторов: современные проблемы применения и пути их решения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):123–139. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы являются сотрудниками компаний, занимающихся разработкой генотерапевтических лекарственных средств. Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной и медицинской ценности обсуждаемых материалов и заявляют о беспристрастности оценки рассмотренных данных.

Adeno-associated virus vector-based gene therapy for hereditary diseases: current problems of application and approaches to solve them

Tatiana V. Egorova^{1,2}, Aleksandr A. Piskunov³, Dmitry A. Poteryaev³, ✉

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov St., Moscow 119334, Russian Federation

² Marlin Biotech LLC, 1 Triumfalny Dr., Sirius urban-type settlement, Krasnodar Region 354340, Russian Federation

³ GENERIUM JSC, 14 Vladimirsкая St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, gene therapy based on adeno-associated virus (AAV) vectors faces a number of barriers, both biomedical and technological, which require studying and overcoming for further development of this gene therapy technology.

AIM. This study aimed to analyse the use of gene therapy for a range of hereditary diseases, taking into account the barriers associated with its side effects and insufficient efficacy, the determination of the therapeutic window, and individual characteristics relevant to a particular hereditary disease; additionally, the study aimed to review the approaches to lifting these barriers and increasing the availability of gene therapy through the improvement of technological approaches to production and the reduction of production costs.

DISCUSSION. The authors reviewed the experience accumulated for gene therapy products that were approved or undergoing clinical trials. The study included a gene therapy applicability assessment using several hereditary diseases as a case study. The assessment showed that correct determination of the therapeutic window for a medicinal product and timely diagnosis of a hereditary disease were essential for effective and safe gene therapy. The study considered the strategies used to reduce the risks of adverse events and increase the effectiveness of AAV-based gene therapy. The authors assessed technological advancements in the manufacturing of AAV-based gene therapy products. The most perspective directions were the transition to suspension culture systems, the improvement of bioreactors, the use of new methods and materials for the purification of viral particles, the improvement of transfection systems, and the creation of new host cell lines. Ultimately, this can lead to lower production costs and an increased availability of gene therapy.

CONCLUSION. Currently, gene therapy is used only for a small range of hereditary diseases. Significant barriers to its use are due to insufficient efficacy, risks of adverse events, and high costs for treatment. Ongoing biomedical and technological development should lift many of these barriers and increase access to gene therapy.

Keywords: gene therapy; gene therapy product; adeno-associated virus; AAV; adeno-associated virus vectors; hereditary diseases; haemophilia; Duchenne muscular dystrophy; gene therapy efficacy; gene therapy safety; AAV production technology; AAV modification; triple-plasmid transfection; AAV-particle purification

For citation: Egorova T.V., Piskunov A.A., Poteryaev D.A. Adeno-associated virus vector-based gene therapy for hereditary diseases: current problems of application and approaches to solve them. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):123–139. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors are employees of companies involved in the development of gene therapy products. However, when writing the manuscript, the authors were guided by considerations of the scientific and medical value of the data discussed and declare impartiality in the assessment of the data reviewed.

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия (ГТ) направлена на манипуляцию экспрессией определенного гена или на изменение биологических свойств живых клеток в терапевтических целях¹. В свою очередь, генотерапевтические лекарственные препараты (ГенЛП) – лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности². Основные группы ГенЛП – это вирусные частицы, служащие генетическим вектором, ДНК-олигонуклеотиды и малые интерферирующие РНК, модулирующие экспрессию генов. В данном обзоре авторы осветили направление ГТ с использованием векторов на основе аденоассоциированных вирусов (adeno-associated viruses, AAV).

Несмотря на десятилетия развития данного вида ГТ для лечения наследственных заболеваний, широкому применению ГенЛП препятствует ряд объективных факторов. Одним из значимых факторов является исключительно высокая стоимость, несмотря на то что в большинстве случаев предполагается однократное применение ГенЛП. К другим ограничивающим факторам относятся барьеры биомедицинского характера, такие как небезопасность применения ГенЛП, связанная в первую очередь с иммуногенностью,

ограничения полезной нагрузки в использующихся AAV векторах, недостаточная эффективность целевой доставки и экспрессии трансгена и др. В ряде случаев сопутствующие заболевания, история предшествующей терапии, возраст, упущенное или неоптимальное терапевтическое окно, существующая эффективная и безопасная стандартная терапия также препятствуют применению даже уже одобренного ГенЛП. Экспертная оценка регистрационного досье ГенЛП также представляет собой сложную задачу, особенно в условиях его неполной характеристики по сравнению с традиционными лекарственными средствами [1]. Наконец, технология производства ГенЛП на основе вирусных частиц характеризуется исключительно высокой себестоимостью в расчете на дозу. Данный обзор посвящен описанию этих барьеров и поиску путей их преодоления.

Цель работы – провести анализ применения генной терапии ряда наследственных заболеваний с учетом ограничений, связанных с побочными эффектами или недостаточной эффективностью генной терапии, проблемой определения терапевтического окна и индивидуальной спецификой наследственного заболевания, а также рассмотреть подходы для снятия этих ограничений и повышения доступности генной терапии путем усовершенствования технологических подходов производства и снижения себестоимости генотерапевтических препаратов.

¹ Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). Guidance for industry. 2008-D-0205. FDA; 2020.

² Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Медицинские и биологические ограничения к использованию генотерапевтических препаратов

В настоящее время зарегистрировано несколько ГенЛП для доставки экспрессионных конструкций *in vivo*, которые в большинстве являются препаратами для терапии наследственных заболеваний (табл. 1).

Для терапии гемофилии А применяется однократная инъекция препарата Роктавиан (валоктоген роксапаровек). AAV вектор, применяемый в составе препарата, обеспечивает экспрессию функционального фактора свертываемости крови VIII-SQ (FVIII) в клетках печени. Однако следует отметить, что использование препарата ограничено рядом факторов. Во-первых, препарат не полностью исключил зависимость пациентов от инъекционных факторов свертываемости. Годовая частота кровотечений снизилась с 5,4 до 2,6 случая в год, а среднее число инфузий препаратов свертываемости — со 136 до 5. Время наблюдения после применения ГенЛП составило 3 года³, и пока неизвестно, насколько стабильной будет экспрессия FVIII в долгосрочной перспективе. Вполне вероятно, что может произойти падение уровня трансгенного FVIII и пациент снова будет зависимым от частых инфузий факторов свертываемости. Применение препарата Роктавиан, как и других AAV, имеющих тропизм к клеткам печени, не показано у детей, поскольку их печень еще растет. Также этой терапии не подлежат пациенты, имеющие антитела к серотипу AAV5, а также с хроническими заболеваниями печени, поскольку ГенЛП обладает выраженной гепатотоксичностью. Последнее является серьезным ограничивающим фактором, так как большинство пациентов гемофилией старше 20 лет в России страдают хроническим гепатитом С. Это связано с тем, что до 2005 г. больные гемофилией получали лечение компонентами крови, не прошедшими вирусную инактивацию⁴. Практически все пациенты, получившие Роктавиан, были вынуждены пройти курс иммуносупрессивной терапии для предотвращения аутоиммунной реакции организма, вызванной введением AAV. Опрос участников клинического исследования (КИ) препарата Роктавиан выявил, что для некоторых иммуносупрессивная терапия, которую они получали во время участия в исследовании, либо в профилактических целях, либо для лечения трансамината, была наименее переносимой

частью исследования [2]. Существенная доля пациентов с гемофилией имеет ее ингибиторную форму, характеризующуюся высоким уровнем нейтрализующих антител, например к FVIII, что делает применение ГенЛП неэффективным. Такие пациенты переводятся на терапию препаратами шунтирующего действия (FVII, эмицизумаб), позволяющую запустить каскад свертывания крови в обход FVIII.

Гемофилия является примером, когда эффективная и безопасная ферментозаместительная терапия факторами свертываемости крови или препаратами шунтирующего действия позволяет контролировать болезнь и обеспечивать приемлемое качество жизни пациентов и в отсутствие ГТ. В данном случае ГТ должна доказать свою долгосрочную эффективность и безопасность, а главное, иметь стоимость существенно ниже, чем сейчас, чтобы стать стандартом лечения.

Другими примерами эффективной ферментозаместительной терапии, которая делает назначение ГТ по тому же показанию всего лишь одной из альтернатив, являются некоторые лизосомные болезни накопления (например, болезнь Гоше, Фабри и др.). Однако есть большое количество наследственных заболеваний, где ферментозаместительная терапия невозможна по определению и где только доставка функциональной копии гена в пораженные клетки (или иной способ коррекции мутации) может быть патогенетической терапией. К заболеваниям такого типа относится, например, миодистрофия Дюшенна (МДД).

Одной из серьезных проблем ГТ является недостаточная для восстановления нормального уровня экспрессии гена доза AAV, что связано с ограничением дозы по токсичности, или падение уровня экспрессии со временем. Последнее может иметь различные причины: рост целевой ткани (как отмечалось выше для печени), естественная гибель клеток, иммунный ответ организма, транскрипционный сайленсинг трансгена. Кроме этого, недостаточная эффективность и безопасность ГТ может иметь менее очевидные причины, что может быть проиллюстрировано на примере препарата Лукстурна.

Лукстурна (воретиген непаровек) — первый ГенЛП, одобренный для лечения наследственной дегенерации сетчатки, вызванной биаллельными мутациями в гене *RPE65*. При проведении КИ, включая наблюдательные пострегистрационные,

³ <https://www.roctavian.com/en-us/roctavian-results/>

⁴ <https://medvestnik.ru/content/news/Bolee-90-bolnyh-gemofiliei-starshe-18-let-stradaut-hronicheskim-gepatitom-S.html>

Таблица 1. Одобренные к применению генотерапевтические лекарственные препараты (ГенЛП)

Table 1. Approved gene therapy products (GTP)

Наименование ГенЛП <i>GTP name</i>	Показание <i>Indication</i>	Описание, вектор доставки <i>Description, delivery vector</i>	Промо- тор <i>Promoter</i>	Доза <i>Dose</i>	Год одобре- ния FDA/EMA <i>Year of FDA/ EMA approval</i>	Стоимость ⁵ терапии <i>List price⁵</i>
Глибера (алипоген типарвовек) ⁶ <i>Glybera (alipogene tiparvovec)⁶</i>	Наследственный дефицит липопро- теинлипазы (гипер- липотеинемия I типа) <i>Familial lipoprotein lipase deficiency (hyperlipoproteinaemia type I)</i>	В/м инъекция гена липопротеинлипазы, AAV2 <i>I.m. injection of the lipoprotein lipase gene, AAV2</i>	CMV	1х10 ¹² гк/кг <i>1×10¹² gc/kg</i>	2012*	– (регистраци- онное удосто- верение не продлено) – (marketing authorisation not renewed)
Лукстурна (воретиген непарвовек) ⁷ <i>Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl)⁷</i>	Пигментный ретинит (наследственная дистрофия сетчатки, вызванная мутацией RPE65) <i>Congenital retinitis pigmentosa (inherited blindness due to RPE65 mutations)</i>	Внутриглазная доставка функцио- нального гена RPE65, AAV2 <i>Intra-ocular delivery of the functional RPE65 gene, AAV2</i>	CAG	1,5×10 ¹¹ гк/глаз <i>1.5×10¹¹ gc/eye</i>	2017	425 000 долла- ров США <i>425,000 USD</i>
Золгенсма ⁸ (онасемноген абепарвовек) <i>Zolgensma⁸ (onasemnogene abeparvovec-xioi)</i>	Спинальная мышеч- ная атрофия, вызван- ная мутациями SMN1 <i>Spinal muscular atrophy due to SMN1 mutations</i>	В/в инфузия функци- онального гена SMN1, AAV9 <i>I.v. infusion of the functional SMN1 gene, AAV9</i>	CAG	1,1×10 ¹⁴ гк/кг <i>1.1×10¹⁴ gc/kg</i>	2019	2 100 000 долла- ров США <i>2,100,000 USD</i>
Элевидис ⁹ (деландистро- ген моксепар- вовек) <i>Elevidys⁹ (delandistrogene moxeparvovec- rokl)</i>	Мышечная дистро- фия Дюшенна <i>Duchenne muscular dystrophy</i>	В/в инфузия функци- онального минигена DMD, AAVrh74 <i>I.v. infusion of the functional DMD minigene, AAVrh74</i>	МНСК7	1,33×10 ¹⁴ гк/кг <i>1.33×10¹⁴ gc/kg</i>	2023*	3 200 000 долла- ров США <i>3,200,000 USD</i>
Роктавиан ¹⁰ (валоктокоген роксапарвовек) <i>Roctavian¹⁰ (valoctocogene roxaparvovec- rvox)</i>	Гемофилия А <i>Haemophilia A</i>	В/в инфузия функ- ционального гена фактора FVIII, AAV5 <i>I.v. infusion of the functional FVIII gene, AAV5</i>	HLP	6×10 ¹³ гк/кг <i>6×10¹³ gc/kg</i>	2023*	2 900 000 дол- ларов США <i>2,900,000 USD</i>
Гемгеникс ¹¹ (этранакоген дезапарвовек) <i>Hemgenix¹¹ (etranacogene dezaparvovec- drlb)</i>	Гемофилия В <i>Haemophilia B</i>	В/в инфузия функ- ционального гена фактора FIX, AAV5 <i>I.v. infusion of the functional FIX gene, AAV5</i>	LP1	2×10 ¹³ гк/кг <i>2×10¹³ gc/kg</i>	2022*	3 500 000 долла- ров США <i>3,500,000 USD</i>
Виджувек ¹² (беремаген геперпавек) <i>Vyjuvek¹² (beremagene geperpavec-svdt)</i>	Дистрофический бул- лезный эпидермолиз, вызванный мутация- ми гена COL7A1 <i>Dystrophic epidermolysis bullosa due to mutations in the COL7A1 gene</i>	Топическая накожная доставка функцио- нального гена колла- гена COL7A1, HSV-1 <i>Topical cutaneous delivery of the functional collagen gene COL7A1, HSV-1</i>	COL7A1	4×10 ⁸ – 1,2×10 ⁹ БОЕ <i>4×10⁸– 1.2×10⁹ PFU</i>	2023*	24 250 долларов США за упаковку (631 000 – на пациента в год) <i>24,250 USD per vial (631,000 USD per patient per year)</i>

⁵ <https://www.globaldata.com/>⁶ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/glybera-epar-public-assessment-report_en.pdf⁷ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna>⁸ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf⁹ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevydys>¹⁰ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/roctavian-epar-public-assessment-report_en.pdf¹¹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/hemgenix-epar-public-assessment-report_en.pdf¹² <https://www.fda.gov/media/169435/download>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Наименование ГенЛП <i>GTP name</i>	Показание <i>Indication</i>	Описание, вектор доставки <i>Description, delivery vector</i>	Промо- тор <i>Promoter</i>	Доза <i>Dose</i>	Год одобре- ния FDA/EMA <i>Year of FDA/ EMA approval</i>	Стоимость терапии <i>List price</i>
Неоваскулген ¹³ <i>Neovasculgen</i> ¹³	Ишемия нижних конечностей ате- росклеротического генеза <i>Atherosclerotic ischaemia of the lower limbs</i>	В/м введение гена фактора роста сосудов VEGF-165, плазмиды <i>I.m. injection of the vascular growth factor gene VEGF-165, plasmid</i>	CMV	1,2 мг <i>1.2 mg</i>	2011	78 600 рублей <i>78,600 ₺</i>
Апстаза ¹⁴ (эладокаген экспуарвовек) <i>Upstaza</i> ¹⁴ <i>(eladocagene exuparvovec)</i>	Дефицит декарбок- силазы ароматиче- ских L-аминокислот <i>Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency</i>	Введение внутри базального ядра го- ловного мозга AAV2 с геном декарбокси- лазы <i>Intrapataminal delivery of the decarboxylase gene, AAV2</i>	CMV	1,8×10 ¹¹ гк (общая доза) <i>1.8×10¹¹ gc (total dose)</i>	2022*	3 710 000 долларов США <i>3,710,000 USD</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. * — не зарегистрирован в Российской Федерации; в/м — внутримышечно; в/в — внутривенно; AAV — вектор на основе аденоассоциированного вируса; HSV-1 — вектор на основе человеческого вируса герпеса 1 типа; гк — геномные копии; БОЕ — бляшкообразующие единицы.

Note. *, not approved in Russia; i.m., intramuscular; i.v., intravenous; AAV, adeno-associated virus vector; HSV-1, human herpes simplex type 1 virus vector; gc, genome copies; PFU, plaque forming units.

препарат продемонстрировал приемлемый профиль безопасности и эффективность, позволяя не только остановить прогрессию заболевания, но и во многих случаях даже частично восстановить уже утраченное зрение. Необходимо отметить, что период наблюдения самого масштабного к настоящему моменту пострегистрационного КИ (103 пациента) не превышал 2,3 года [3]. Эта ГТ проводится в виде субретинальной инъекции AAV, несущего функциональный ген *RPE65*. Ген *RPE65* играет ключевую роль в обновлении 11-цис-ретинола, необходимого для функционирования фоторецепторов сетчатки — палочек. Первичная терапевтическая мишень Лукстурна — клетки пигментного эпителия сетчатки, а фоторецепторы являются вторичной мишенью с точки зрения восстановления зрительной функции [4].

После одобрения препарата Лукстурна появились сообщения о хориоретинальной атрофии (ХРА) после применения ГТ, как вокруг места ретиномии (места введения препарата), так и около крупных сосудов сетчатки. ХРА — это атрофия наружных слоев сетчатки, пигментного эпителия и хориокапиллярного слоя сосудистой оболочки сетчатки. Рост очагов ХРА наблюдался в течение нескольких месяцев, особенно у наиболее молодых пациентов, у которых изначально наблюдались наилучшие показатели эффективности ГТ. Степень прогрессии ХРА после

введения препарата Лукстурна превышала естественное течение заболевания при сравнении с историческими морфологическими параметрами пациентов, не получавших данную ГТ. Были исключены несколько причин ХРА, такие как последствия хирургического вмешательства в процессе введения препарата или иммунный ответ и воспаление. Далее была выдвинута гипотеза, основанная на усилении метаболической активности сетчатки после «спасения» фоторецепторов с помощью ГТ [4].

Сетчатка в состоянии дегенерации имеет меньшую потребность в кислороде и меньше снабжается кислородом. Большинство случаев дегенерации сетчатки, включая опосредованные мутациями *RPE65*, сопровождается истощением ее сосудов. Если такое состояние пониженного метаболизма внезапно изменится в результате вмешательства, приводящего к повышению функциональной активности фоторецепторов и, следовательно, всех клеток внутренней сетчатки, может ли дегенерирующая система с низким содержанием кислорода справиться с этим после многих лет дегенерации? То, что случаи ХРА наблюдались преимущественно у молодых взрослых пациентов и подростков с высоким уровнем «спасения» палочек, может указывать на причинно-следственную связь эффективности и безопасности. Если это так, то функциональное восстановление

¹³ <https://neovasculgen.info/instruktsiya-po-primeneniyu>

¹⁴ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/upstaza-epar-public-assessment-report_en.pdf

дегенерированной ткани может привести к метаболическому и окислительному дисбалансу, что впоследствии приведет к гибели клеток [4]. Если эта гипотеза верна, то в худшем случае данная ГТ не просто не позволит сохранить зрение в течение взрослой жизни, но и после первых лет видимой эффективности приведет к ускоренной потере зрения по сравнению с нелечеными пациентами. Безусловно, это предположение требует большего времени наблюдательных КИ и большей выборки пациентов. Однако данный пример подчеркивает как опасность излишне упрощенного взгляда на ГТ, так и то, что восстановление функции дефектного гена должно рассматриваться с позиций системной биологии.

Определение терапевтического окна — важная часть разработки патогенетической терапии наследственных заболеваний

Большие ожидания направлены на ГТ наследственных заболеваний как на универсальный инструмент, позволяющий воздействовать на причину развития патологий. Критически важным для сохранения не только жизни, но и качества жизни пациентов является своевременное применение ГТ. Многие наследственные заболевания прогрессируют достаточно быстро и связаны с потерей функций, навыков, дисрегуляцией нормального клеточного и тканевого обмена, а также разрушением клеток и тканей, в норме экспрессирующих целевой белок. На поздних стадиях развития заболевания применение ГТ может оказаться неэффективным из-за необратимости изменений, произошедших в организме на фоне мутации и потери большей части клеток, являющихся мишенью терапии.

В связи с этим необходимо изучение естественного течения наследственного заболевания в каждом индивидуальном случае и определение «терапевтического временного окна» — наиболее благоприятного периода для лечения с восстановлением функций. В случае орфанных болезней изучение естественного течения осложняется небольшой выборкой и гетерогенностью пациентских групп, характерным для некоторых наследственных заболеваний разнообразием мутаций, влиянием на прогрессирование заболевания генов-модификаторов. Следует отметить, что определение оптимального возрастного периода для применения ГТ практически невозможно предсказать по результатам доклинических исследований. Последствия мутаций, которые вызывают

развитие патологий, не всегда воспроизводятся на животных моделях соответствующих заболеваний. К тому же довольно сложно аппроксимировать возраст животных и возраст пациентов.

Возможности применения ГТ на ранних сроках развития патологии, а тем более на пресимптоматической стадии неразрывно связаны с возможностями диагностики заболевания. Единственный на сегодня препарат Элевидис (деландистроген моксепаровек) для заместительной ГТ миодистрофии Дюшенна одобрен Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) по ускоренному механизму для введения амбулаторным пациентам в возрасте 4–5 лет¹⁵. При этом средний возраст (медиана) установления диагноза среди пациентов с МДД равен 4,9 (4,8) года [7], а от появления первых признаков заболевания до установления диагноза проходит в среднем 2,2 года. Позднее применение ГТ может стать не только неэффективным, но даже опасным для пациентов. Известно о смертельных случаях применения ГТ у пациентов с МДД на поздних стадиях развития заболевания (16 и 27 лет) в рамках КИ (NCT03362502, NCT05514249).

На примере препарата Золгенсма (онасемноген абепаровек) для лечения спинальной мышечной атрофии на группе пациентов в пресимптоматической стадии заболевания была продемонстрирована феноменальная эффективность своевременно проведенной ГТ. У всех 14 пациентов после введения препарата определены показатели по шкалам оценки двигательного развития на уровне здоровых детей на протяжении 18 мес. наблюдения [6]. Таким образом, наиболее адекватной стратегией диагностики редких наследственных заболеваний с целью применения ГТ на пресимптоматической стадии является неонатальный скрининг [6]. Отдельно стоит упомянуть ультраорфанные наследственные заболевания (со встречаемостью менее 1 на 1 000 000 новорожденных), для которых предпринимаются попытки проведения пациент-специфической генной терапии.

Принимая во внимание временные затраты на диагностику, в том числе генетическую, для установления диагноза и связи обнаруженного фенотипа с ультраредкими мутациями в геноме, возможность разработки эффективной ГТ на современном этапе научно-технического развития является труднореализуемой. В связи с этим требуется создание платформенных решений, позволяющих в короткие сроки

¹⁵ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevydys>

создавать и сканировать кандидатные препараты в пациент-специфических моделях и исследовать их безопасность [8].

Стратегии снижения риска возникновения побочных эффектов при введении генотерапевтических препаратов

Развитие тяжелых нежелательных явлений при применении ГенЛП на основе AAV часто ассоциировано с возникновением иммунного ответа на высокую дозу вирусного препарата или наличием у пациентов сопутствующих заболеваний [9]. В связи с этим существуют два направления по предотвращению возможных побочных эффектов: тщательный отбор пациентов и применение фармакотерапии для снижения потенциального иммунного ответа; модификация самого препарата для снижения дозы и удаления провоцирующих иммунитет факторов.

Пациентоориентированный подход

Считается, что AAV не патогенен для человека, тем не менее пациент может иметь историю контакта с природным серотипом AAV, в результате чего в его организме образуются иммунные клетки памяти. Учитывая быстрые и сильные иммунные реакции, которые индуцируются после формирования иммунологической памяти, необходимо идентифицировать и исключить лиц со сформированным адаптивным иммунитетом к конкретному серотипу AAV. Существующий иммунитет определяется путем выявления титров антител к определенному антигену, а пороговые значения титра используются как один из критериев отбора пациентов. Следует отметить, что среди разработчиков ГенЛП нет единого протокола определения предсуществующих антител. Варьируют как вид самого анализа, что приводит к выявлению разного типа антител (нейтрализующие, связывающие), так и пороговые значения [10]. Предельные значения титра антител часто определяются в доклинических исследованиях и после этого проверяются для клинического использования. Например, анализ трансдукции трансгена у макаков-резус после изолированной перфузии конечностей AAVrh74.MCK.micro-dys.FLAG показал, что у животных с ранее существовавшими титрами антител к AAVrh74 $>1:400$ наблюдалась сниженная экспрессия трансгена по сравнению с животными с титрами антител к AAVrh74 $\leq 1:400$ [10]. Эти доклинические исследования на приматах послужили основой для установления критериев отбора в последующих КИ. Разработка универсальных протоколов оценки пороговых значений

позволила бы оптимизировать применение ГТ и, вероятно, расширила бы группы пациентов, для которых такая терапия применима.

Возможные иммунные реакции на рекомбинантные вирусные векторы не ограничиваются адаптивным гуморальным иммунитетом. В связи с разнообразием таких реакций введение AAV препаратов при ГТ проводят в сочетании с системными кортикостероидами. Например, кортикостероиды назначались всем пациентам, получившим препараты Лукстурна, Золгенсма и Элевидис в течение 7, 30 и 60 сут соответственно. При проведении ГТ при гемофилии (Гемгеникс, Роктавиан) иммуносупрессия кортикостероидами проводится при повышении трансаминаз. На фоне такой терапии возможны иммуноопосредованные побочные эффекты, к тому же назначение системных иммуносупрессантов само по себе также может вносить свой вклад в развитие нежелательных явлений. Многие исследовательские работы посвящены подбору более эффективной и безопасной фармакотерапии для снижения иммунного ответа на AAV препараты [11, 12].

Подходы, направленные на модификацию препаратов

Для достижения эффективной трансдукции целевых клеток используется системное введение высоких доз рекомбинантных AAV вплоть до $1,33 \times 10^{14}$ геномных копий на килограмм (гк/кг) в случае препарата Элевидис (табл. 1). Одновременно с трансдукцией целевых клеток вирусный капсид и терапевтический ген могут попадать в нецелевые ткани и органы, провоцируя развитие побочных реакций. Так, нежелательная трансдукция печени может вызывать разрушение гепатоцитов, что клинически выражается в повышении в сыворотке крови уровня трансаминаз (АЛТ, АСТ), наиболее частом побочном эффекте при системном введении препаратов на основе AAV. Гепатотоксичность стала причиной нескольких смертельных случаев применения ГТ на основе AAV в КИ у пациентов с X-сцепленной миотубулярной миопатией и в наблюдательных пострегистрационных исследованиях у пациентов со спинальной мышечной атрофией [9]. В связи с этим в настоящее время проводятся исследования ГенЛП на основе AAV с модификацией капсидов и с введением генетических конструкций для увеличения трансдукции и уровня экспрессии в целевых клетках одновременно со снижением нецелевой доставки. В перспективе такая оптимизация может привести к уменьшению необходимости для достижения терапевтического эффекта

дозы препаратов и снижению связанной с препаратом токсичности, а также потенциально может способствовать сокращению расходов на производство.

Модификация аминокислотной последовательности капсидных белков. Одобренные в настоящее время и находящиеся на продвинутых стадиях КИ препараты ГТ созданы с использованием капсидов природных серотипов AAV человека (2, 5, 9) и приматов (rh74) (табл. 1). Для усиления тропизма к целевым тканям и придания других функций на основе природных серотипов AAV создаются новые генно-инженерные капсиды. Успехи в этом направлении стали возможны благодаря определению трехмерной структуры капсидов AAV [13, 15] и локализации позиций в капсидных белках для вставки экспонируемых пептидов, необходимых для процесса заражения клеток вирусом [15]. Например, положение после аминокислотного остатка Q588 в белке VP1, находящемся в вариабельном регионе VR-VIII капсида AAV9, было охарактеризовано как оптимальное для вставки экспонируемых пептидов для дальнейшей селекции модифицированных вариантов, обладающих повышенным тропизмом к мышечным клеткам. В работах двух исследовательских групп описаны варианты, эффективно трансдуцирующие клетки сердца, диафрагмы и скелетных мышц мышей и приматов: MyoAAV 2A и MyoAAV 4E [15] и AAVMYO [17]. При введении данных капсидов в дозах, на порядок меньших, чем стандартные, удавалось достичь уровня экспрессии трансгена, схожего с AAV9. Все лучшие выбранные варианты капсида включали трипептид Arg-Gly-Asp (RGD) в первых трех позициях встроенного семичленного пептида. Наиболее вероятным кандидатом для связывания RGD-пептида в мышцах является интегрин $\alpha 7 \beta 1$, который присутствует в избытке во всех типах мышц, является рецептором ламинина и играет важную роль в развитии и функционировании мышечных клеток. Однако с антигенными свойствами RGD-пептида может быть связана потенциальная проблема. В связи с этим было высказано опасение о вероятной более высокой иммуногенности MYO модификаций AAV [18]. Иммуногенность полученных капсидов не изучалась экспериментально ни в одной из групп, использующих RGD-экспонирующие варианты AAV, однако в дальнейшем предстоит определить, не нивелирует ли повышенная иммуногенность капсидов с RGD-пептидом эффект, достигнутый снижением дозы.

В пилотных экспериментах на животных моделях заболеваний перечисленные выше и другие генно-инженерные капсиды были

успешно использованы для коррекции фенотипа при МДД [16], X-сцепленной миотубулярной миопатии [19], болезни Помпе [20]. В исследованиях продемонстрировано, что повышение тропизма капсидов к мышцам снижает неспецифическое заражение гепатоцитов, что может иметь положительный эффект при клиническом применении ГенЛП [16].

При модификации капсида AAV2 для увеличения тропизма к сердцу с использованием пептидов THGTPAD и NLPGSGD выявлено значительное повышение эффективности заражения кардиомиоцитов при снижении уровня трансдукции нецелевых тканей, а также более низкая иммуногенность данных серотипов на мышах [21]. В эксперименте *in vivo* этот капсид превосходил широко используемый для доставки трансгенов в сердце AAV9 [21].

Направленная модификация капсидов AAV9 привела к созданию и новых нейротропных серотипов MDV1A и MDV1B, обеспечивающих эффективную доставку в нейроны на модели мышей, а также PAL-капсидов (proline arginine loop), показавших высокий уровень доставки в нейроны на модели приматов [22]. При этом капсиды, эффективные на мышах, не демонстрировали повышенного тропизма у приматов. PAL-серотипы обеспечивали небольшое достоверное увеличение экспрессии трансгена по сравнению с AAV9 при сниженной вирусной нагрузке в нецелевых органах, таких как печень, почки, легкие, тимус.

Следует отметить, что в перечисленных выше работах модификация капсидов для увеличения показателей трансдукции определенных типов клеток приводила также и к снижению уровня заражения нецелевых органов. Одновременно с этим предпринимаются направленные попытки точечных модификаций капсида с целью снижения уровня доставки (детаргетирования, *detargeting*) нецелевых органов, в первую очередь печени. В работе K. Adachi с соавт. [23] на основе данных проведенного скрининга мутантных капсидов AAV были обнаружены аминокислоты на поверхности AAV9, ответственные за трансдукцию тканей, в первую очередь печени. На основе этих данных были предложены новые варианты капсидов AAV, обладающих более низким накоплением в печени, например P504A/G505A-мутанты. При этом модификация снижала эффективность трансдукции и целевых органов, например сердца. Позже было продемонстрировано, что внесение упомянутых мутаций приводит к снижению уровня доставки в печень и в случае других созданных на основе AAV9 генно-инженерных капсидов. Серотип

AAVMYO-LD (liver detargeting, LD) заметно хуже накапливался в печени мышей по сравнению с исходным серотипом AAVMYO, однако вместе с этим снизилась и эффективность трансдукции диафрагмы, сердца и скелетных мышц. Кроме того, внесение LD-мутаций привело к снижению эффективности продукции вирусов в отличие от исходной модификации [17].

С помощью изменения аминокислотной последовательности экспонируемых пептидов удалось добиться того, что предсуществующие антитела к природным серотипам AAV не узнают их модифицированные варианты. В работе J. Nan с соавт. [24] с использованием подхода рационального дизайна получены мутанты с повышенной эффективностью трансдукции в сочетании со сниженной иммуногенностью. В качестве объекта исследования использовали капсиды AAV8 и AAVS3, обладающие естественным тропизмом к печени. Был проведен скрининг мутантов с измененным PLA-мотивом VP1/2, который участвует в высвобождении AAV из эндосом, и мутантов с изменениями последовательности аминокислот, подвергающихся N-гликозилированию. Полученные варианты обеспечивали более высокую эффективность трансдукции в клеточных линиях карциномы печени и первичных гепатоцитах, а также в других клеточных линиях тканей человека. Важно отметить, что все проверенные варианты показали меньшую чувствительность к нейтрализующим антителам *in vitro* и *in vivo*. Более того, профили антител после *in vivo* трансдукции модифицированными капсидами отличались от их родительских капсидов AAV [24].

Один из наиболее популярных подходов для модификации AAV основан на использовании N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Рецептор асиалогликопротеина (ASGP-R), высокоэкспрессируемый на поверхности гепатоцитов, представляет собой углеводсвязывающий белок, который распознает и связывает GalNAc или остатки галактозы. В работе M. Mével с соавт. [25] был разработан метод химической модификации AAV с помощью GalNAc и показано значительное увеличение трансдукции гепатоцитов *in vitro* по сравнению с немодифицированным AAV. При введении мышам модифицированного AAV наблюдалась индукция меньшего уровня антикапсидных антител по сравнению с природными векторами AAV2. Универсальный подход, основанный на биоконъюгации, представляет значительный интерес для регуляции иммунореактивности и тропизма капсида AAV [25]. В другом исследовании также использовался подход химической модификации

реакционноспособных открытых остатков лизина. *In vitro* было показано, что капсид AAV9, модифицированный N-этилмалеимидом (NEM), усиливал экспрессию генов в культуре эндотелиальных клеток человека. *In vivo* при введении AAV9-NEM наблюдалось увеличение уровня трансдукции костного мозга и снижение трансдукции ткани печени по сравнению с немодифицированным AAV9 [26].

Для экранирования эпитопов AAV от нейтрализующих антител был предложен подход по созданию AAV, инкапсулированных во внеклеточные везикулы (EV-AAV). При использовании этого препарата для доставки генов в кардиомиоциты было продемонстрировано, что EV-AAV доставлял значительно больше геномных копий, чем немодифицированный AAV в присутствии нейтрализующих антител в левый желудочек человека, а также в кардиомиоциты, полученные из плюрипотентных стволовых клеток человека *in vitro* и в сердце мыши *in vivo*. Эффективность такой системы доставки была продемонстрирована на мышинной модели инфаркта на фоне предварительной иммунизации AAV [27].

Следует отметить, что за последние несколько лет создание нового генно-инженерного капсида перестало быть трудозатратной и длительной задачей. Все больше разработчиков отдают предпочтение таким вариантам в надежде на более высокую эффективность и безопасность, а также патентную защиту своих разработок.

Модификация генома рекомбинантного AAV.

Изменения генетической конструкции AAV могут быть внесены для увеличения уровня экспрессии, что в конечном счете может привести к снижению необходимой дозы препарата. Минимальными и достаточными элементами для контроля экспрессии трансгена являются промотор и сигнал полиаденилирования. Помимо них широко используются энхансеры, интроны и посттранскрипционные регуляторные элементы, которые в определенных комбинациях могут в разы увеличивать уровень экспрессии трансгена [28].

Эффективность генной терапии напрямую зависит от выбранного промотора, который контролирует экспрессию целевого гена. Сильные конститутивные промоторы небольшого размера способны обеспечивать высокие уровни экспрессии. Однако экспрессия, запускаемая ими в нецелевых клетках, способна вызвать активацию клеточных и гуморальных иммунных ответов на трансген. К тому же вирусные промоторы быстро метилируются во многих типах клеток, что приводит к снижению эффективности со

временем. Для первых одобренных AAV препаратов было характерно использование конститутивных промоторов (Глибера, Лукстурна, Золгенсма), а в более поздних разработках уже применялись тканеспецифичные печеночные (Роктавиан, Гемгеникс) и мышечные (Элевидис) промоторы (табл. 1). Для увеличения специфичности экспрессии трансгенов создаются новые высокоэффективные тканеспецифичные промоторы [29].

В ряде исследований *in vivo* продемонстрировано возникновение иммунной толерантности к трансгену при небольшом уровне его экспрессии в печени [30]. В работе P. Colella с соавт. [31] предложен подход комбинирования различных тканеспецифичных промоторных элементов для экспрессии терапевтических трансгенов как в тканях-мишенях, так и в гепатоцитах. С этой целью использовали энхансер аполипопротеина E, элементы промотора антитрипсина альфа-1 человека и короткий синтетический промотор *spC5.12*, который активен как в сердечной, так и в скелетных мышцах и ранее успешно применялся на крупных животных моделях мышечной дистрофии. Авторы показали, что использование эффективных tandemных промоторов предотвращало формирование иммунных ответов на трансген после системной доставки гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) с помощью AAV у иммунокомпетентных мышей линии *Gaa^{-/-}*. Также было продемонстрировано, что неонатальная генная терапия с помощью AAV8 или AAV9 у мышей *Gaa^{-/-}* приводила к стойкому терапевтическому эффекту при использовании tandemного печеночно-мышечного промотора (LiMP), который обеспечивал высокую и стабильную экспрессию трансгена. Данный промотор использовали также для доставки трансгена в составе генно-инженерного капсида AAV-MT (muscle transduction). Эта комбинация капсида и промотора с улучшенной экспрессией в мышечных клетках и специфичностью позволила обеспечить повышение клиренса гликогена в сердечных и скелетных мышцах взрослых мышей линии *Gaa^{-/-}*. У новорожденных *Gaa^{-/-}* мышей полное восстановление содержания гликогена и мышечной силы наблюдалось через 6 мес. после инъекции AAV [32].

Помимо традиционных подходов, основанных на повышении специфичности трансдукции и транскрипции, микроРНК-зависимое посттранскрипционное подавление становится новой эффективной технологией для регулирования экспрессии трансгена [33, 34]. МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК, чья экспрессия часто специфична для ткани или стадии дифференцировки.

Обычно они регулируют экспрессию генов путем связывания с комплементарными последовательностями в 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК. Для контроля экзогенной экспрессии трансгена tandemные повторы искусственных сайтов-мишеней микроРНК (miR-BS) обычно включают в 3'-UTR область экспрессионной кассеты трансгена, что приводит к последующей деградации транскрипта в клетках, экспрессирующих соответствующую микроРНК. Многие подходящие микроРНК, избирательно представленные в отдельных тканях, уже определены. В частности, микроРНК-122 – микроРНК, почти исключительно экспрессируемая в ткани печени. В нескольких исследованиях было показано успешное подавление экспрессии трансгена в печени, опосредованное микроРНК-122 [33]. Однако специфической экспрессии микроРНК может быть недостаточно для достижения сильного микроРНК-зависимого подавления экспрессии трансгена.

Важным звеном при формировании иммунного ответа являются антигенпрезентирующие клетки. С целью снижения трансгенспецифических иммунных ответов и разработки безопасных генетических конструкций в результате *in vitro* скрининга был подобрана комбинация микроРНК-142BS и микроРНК-652-5pBS, которая значительно подавляла экспрессию трансгена в антигенпрезентирующих клетках, но сохраняла высокий уровень его экспрессии в мышечных клетках. При внутримышечной доставке препаратов AAV1 с элементами микроРНК-142/652-5pBS были достигнуты более высокие уровни экспрессии трансгена, чем предыдущие конструкции, а также выявлено эффективное ингибирование активации цитотоксических Т-лимфоцитов и Th17 [35].

Для регулируемой экспрессии трансгена также предложен подход на основе РНК-интерференции. В работе M. Subramanian с соавт. [36] разработана конструкция, одновременно содержащая как короткую шпилечную РНК, так и сайты ее связывания. Для индукции трансгена использовали технологию REVERSIR – синтетический высокоаффинный олигонуклеотид, комплементарный направляющей цепи короткой шпилечной РНК, позволяющий подавить РНК-интерференцию и быстро восстановить экспрессию трансгена. Полученные результаты создают концептуальную основу для регулируемых переключателей на основе РНК-интерференции и динамической модуляции экспрессии генной терапии с возможностью снижения частоты дозирования в клинических условиях [36]. Для достижения регулируемой экспрессии трансгена

были апробированы и тетрациклин-зависимые промоторные элементы. Так, репортерная система на основе AAV1 была использована для оценки длительности экспрессии трансгена в ответ на доксициклин. Авторы продемонстрировали, что экспрессия целевого белка сохраняется вплоть до 5 лет после введения [37].

В работе X. Wu с соавт. [38] была предложена трансгенная система, индуцируемая мусконом (AAVMUSE), на основе мышинного обонятельного рецептора, связанного с G-белком (MOR215-1), и синтетического промотора, реагирующего на цАМФ. При воздействии триггера мускон связывается с MOR215-1 и активирует сигнальный путь цАМФ, инициируя экспрессию трансгена. Применение AAVMUSE обеспечивало зависимый от дозы и времени воздействия мускона контроль экспрессии люциферазы в печени или легких мышей в течение как минимум 20 нед. Была продемонстрирована эффективность системы AAVMUSE для коррекции фенотипа на моделях мышей с хроническими воспалительными заболеваниями: неалкогольная жировая болезнь печени и аллергическая астма [38].

Активация адаптивного иммунитета возможна посредством распознавания гипометилированных CpG мотивов доставленной генетической конструкции рецептором TLR9 (toll-like receptor 9), что в дальнейшем запускает образование цитотоксических Т-лимфоцитов. Повышение содержания CpG-мотивов часто достигается за счет оптимизации конструкций, например оптимизации кодонов. В доклинических и клинических исследованиях ГенЛП продемонстрирована зависимость развития цитотоксической иммунной реакции от содержания в препарате CpG-мотивов, которая, в свою очередь, приводила к быстрой потере трансгена [39, 40]. В работе J.F. Wright с соавт. [41] предложена методика количественной оценки потенциала генетической конструкции к активации TLR9 на основе содержания CpG-мотивов. Показано, что терапевтические AAV, близкие по содержанию CpG-мотивов к человеческому геному, наиболее безопасны для клинического применения. Помимо снижения содержания CpG-мотивов предложен вариант использования ДНК последовательностей, блокирующих TLR9 рецепторы [42].

Технология производства AAV: прошлое, настоящее и будущее

В настоящее время AAV являются золотым стандартом для препаратов генной терапии.

С момента регистрации первого препарата ГенЛП Глибера (2012, EMA)¹⁶ технология производства претерпела значительное усовершенствование. Основными драйверами модернизации являются ограниченные производственные мощности при текущей низкой производительности процесса, которые не в состоянии обеспечить постоянно растущие потребности в препаратах, и высокая стоимость курса терапии.

Транзиторная трансфекция плазмидной ДНК клеточной линии HEK-293 остается наиболее распространенным методом производства AAV. Обычно для трансфекции используются три плазмиды, первая из которых несет терапевтический ген интереса (gene of interest, *Goi*), вторая — гены капсида AAV и репликации (*rep/cap*) и третья хелперная — дополнительные гены аденовируса, необходимые для репликации AAV внутри клетки-хозяина HEK-293.

Первая технология производства представляла собой культивирование клеток, прикрепленных к стенке сосуда (адгезионная культура), с использованием среды, содержащей фетальную сыворотку крупного рогатого скота [43, 44]. По аналогии с эволюцией технологии производства моноклональных антител (mAb) такая технология трудно масштабируема из-за невозможности культивирования большого количества культуральных флаконов, роллерных бутылей, флаконов типа CellStack и др. [45, 46]. Первым шагом к масштабированию технологии культивирования стало появление биореакторов с неподвижным слоем микроносителей iCELLis™ (Pall), в которых площадь поверхности культуры в одном сосуде достигала 500 м² (эквивалентно 3000 роллерных флаконов площадью 1700 см²), обеспечивая при этом некоторую степень контроля процесса за счет поддержания достаточного газообмена, питательных веществ, а также уменьшения накопления метаболитов клеточной культуры, таких как аммиак и молочная кислота [47].

Тем не менее эти системы ограничены по площади поверхности, плотности клеток, которую можно достичь, и в конечном счете требуют дополнительного масштабирования для удовлетворения потребности в препаратах. Указанные ограничения, а также проблема использования компонентов животного происхождения способствовали дальнейшему совершенствованию технологии, что привело к появлению питательных сред для суспензионных культур клеток HEK-293 и позволило масштабировать технологию культивирования от настольных систем

¹⁶ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>

до биореакторов с осевым перемешиванием промышленного масштаба (до 2000 л) [48].

Параллельно с усовершенствованием технологии культивирования за прошедшее десятилетие в производстве ГенЛП произошли значительные изменения и в стадии очистки вирусных частиц. Можно выделить следующие основные тенденции: повышение доли содержания полных частиц за счет удаления как пустых капсидов, так и частично заполненных; более эффективная очистка от примесей (остаточная РНК и ДНК), связанных с процессом производства; повышение эффективности очистки для снижения производственных затрат. Одним из существенных достижений за последние годы стало появление аффинных сорбентов, позволяющих эффективно выделять вирусные частицы из клеточного лизата, в котором вирусные частицы являются минорным компонентом [49]. Более того, появились новые типы хроматографических сред, такие как монолитные или мембранные сорбенты, которые могут обеспечить более высокую производительность по сравнению с традиционными смолами. Одним из примеров является подход к разделению фаз системы жидкость-жидкость, основанный на связывании гидрофобного аффинного сорбента с вирусными частицами в клеточном лизате. Это сочетается с тангенциальной фильтрацией потока для получения очищенного материала [50]. Другим примером является одноразовая проточная система, в которой в рециркуляционном протоке используется хроматографическая смола. В этой системе различные технологические буферы смешиваются и могут циркулировать в потоке вместе с исходным лизатом. При их применении в оптимальной последовательности очищенный материал элюируется в отдельную емкость [51].

Разделение пустых и полных капсидов также является одним из направлений в очистке AAV, в котором достигнуты определенные успехи. В начале развития технологии единственным методом являлось ультрацентрифугирование в градиенте плотности CsCl или йодиксанола [52, 53], однако этот способ трудномасштабируемый и вызывает сложности с точки зрения требований GMP. Сложности с развитием хроматографических методов были связаны с тем, что разделение различных форм AAV возможно только по заряду, однако значения изоэлектрической точки у пустых, заполненных и частично заполненных крайне близки. Тем не менее за последние годы в этом направлении достигнут прогресс [53]. В частности, в совместном

исследовании АО «ГЕНЕРИУМ» и ООО «Марлин Биотех» по разработке ГенЛП на основе AAV удалось оптимизировать технологию очистки на основе анионообменной хроматографии, позволяющую производить препарат с 90% содержанием заполненных AAV. После этой стадии остается только один раунд препаративного центрифугирования, в гораздо меньшем масштабе, для того чтобы добиться чистоты, установленной разработчиком, в целевом профиле качества продукта. Предложенный подход значительно повышает возможности масштабирования и воспроизводимости процесса, а также отвечает всем современным требованиям GMP.

Несмотря на достигнутые успехи в области производства AAV, нерешенной проблемой по-прежнему остается высокая себестоимость производства, а следовательно, ограниченная доступность терапии для пациентов вследствие ее стоимости. Текущие усилия разработчиков направлены на повышение исходного титра AAV в процессе культивирования. В настоящее время можно выделить несколько основных трендов: совершенствование трехплазмидной технологии; использование модифицированного хелперного аденовируса; получение клеточной линии, в геном которой интегрированы гены для экспрессии AAV (для отхода от трансфекции клеток в каждом цикле производства).

Совершенствование плазмидной технологии заключается в поиске эффективных трансфекционных агентов, культуральных сред и подпиток, подборе клона родительской клеточной линии HEK-293 и оптимизации генетических конструкций плазмид pRepCap и pHelper. Примером такой технологии является платформа Xcite®AAV (Lonza). Согласно данным разработчиков платформа позволяет добиться повышения титра AAV в 2–8 раз в сравнении с коммерчески доступными плазмидами и клеточной линией¹⁷.

Вирусная трансдукция в качестве доставки генетического материала в клетку более эффективна и экономична, чем трансфекция плазмидами. Однако наличие дополнительного вирусного агента в производстве является нежелательным по соображениям безопасности. Исходя из того что жизненный цикл аденовируса состоит из двух фаз: ранней и поздней, разработчики технологии TESSA™ (OXGENE Ltd) сконструировали модифицированные рекомбинантные хелперные аденовирусы, у которых происходит самоингибирование главного позднего промотора (MLP), обеспечивая тем самым блокировку

¹⁷ <https://www.lonza.com/knowledge-center/cellgene/brief/AAV-production-HEK293-cell-line>

собственной репликации. Вставка сайта связывания репрессора тетрациклина (TetR) делает возможной нормальную репликацию вируса только в присутствии доксициклина, в отсутствие же доксициклина происходит только амплификация генома и экспрессия ранних генов хелперных функций. На первом этапе производства получают два хелперных аденовируса (один из которых кодирует гены *rep* и *cap* AAV, а второй – целевой ген AAV) в присутствии доксициклина. На втором этапе путем совместной инфекции клеток HEK-293 двумя хелперными аденовирусами в отсутствие доксициклина происходит наработка только AAV [55]. Важным преимуществом данной технологии является отсутствие необходимости производства большого количества плазмид. По данным разработчиков продуктивность технологии примерно в 30 раз выше, чем подхода на основе плазмид. Из недостатков можно отметить необходимость очистки финального продукта от хелперных аденовирусов.

Создание стабильных клеточных линий, продуцирующих AAV по аналогии с производством МАТ, является перспективным подходом для повышения продуктивности. Существенное техническое ограничение этого подхода – токсичность вирусных генов для самой экспрессионной системы. Разработчики платформы ELEVECTA™ (Cytiva) создали индуцибельные клеточные линии-продуценты AAV, основанные на использовании клеток HEK-293, в геном которых стабильно интегрированы хелперные гены аденовируса (*E2A*, *E4orf6* и *VA PHK*), а токсичный ген *rep* AAV индуцируется добавлением доксициклина (система индукции Tet-on). Интеграция гена *rep* в геном стала возможной благодаря инактивации промотора p19 при сохранении функциональности Rep78/68. Далее для получения финального стабильного продуцента AAV проводится трансфекция этой клеточной линии конструкцией с желаемой серотип-специфической *cap*-последовательностью, а также последовательностью гена интереса. Согласно данным разработчиков продуктивность перфузионного процесса на этой платформе составляет 10^{15} г/л с содержанием 30% заполненных капсидов [56]. Перспективные платформы биосинтеза AAV в сравнении с традиционной трехплазмидной технологией обобщены в таблице 2 (опубликована на сайте журнала¹⁸).

Таким образом, технология производства AAV является относительно молодым направлением,

проходящим все традиционные этапы развития биотехнологического производства рекомбинантных продуктов. В данном контексте уместна аналогия с эволюцией технологии производства МАТ. Технология производства AAV уже претерпела значительные изменения и продолжает совершенствоваться. Получившая наибольшее распространение плазмидная технология является стандартом в настоящее время, но уже заметен тренд на замещение ее новыми подходами с использованием рекомбинантных хелперных вирусов и стабильных клеточных линий. Кроме того, постоянно появляются новые среды, подпитки, сорбенты, фильтры и другое сырье. Возрастающая потребность в препаратах на основе AAV будет и в дальнейшем стимулировать совершенствование технологии, повышение продуктивности и снижение себестоимости, что в конечном счете будет способствовать большей доступности препаратов этого класса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ применения генной терапии наследственных заболеваний позволил выявить ряд барьеров биомедицинского и технологического характера, преодоление которых необходимо для дальнейшего развития данного направления. Для того чтобы сделать применение генной терапии оправданным с медицинской точки зрения и повысить ее доступность для пациентов, необходимо решить комплекс проблем, а именно:

- продемонстрировать долгосрочную эффективность генной терапии;
- определить оптимальное терапевтическое окно для вмешательства, особенно в случаях необратимых изменений при естественном прогрессировании наследственного заболевания;
- внедрить эффективную систему скрининга для раннего выявления наследственных заболеваний, для которых генная терапия возможна;
- разработать программу маршрутизации пациентов, учитывающую соотношение риска и пользы, для принятия решения о введении генотерапевтических лекарственных препаратов;
- путем модификации капсидов вирусов, генома вирусных векторов, подавления нецелевой экспрессии трансгена, применения новых специфичных промоторов повысить безопасность генотерапевтических лекарственных препаратов (в первую очередь путем снижения иммуногенности), увеличить эффективность

¹⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139-table2>

целевой доставки и снизить нецелевую доставку препаратов, достичь оптимального терапевтического уровня долговременной целевой экспрессии трансгена;

- путем разработки новых методов культивирования, очистки и трансфекции, а также путем создания новых клеточных линий-продуцентов повысить качество генотерапевтических препаратов на основе вирусных векторов и снизить себестоимость их производства.

Пути решения данных проблем должны быть определены как на доклинической стадии разработки, так и после первой демонстрации клинической эффективности генотерапевтических препаратов. Без системного решения этих проблем генная терапия на основе вирусных векторов не сможет войти в стандарты лечения не только по причине высокой финансовой нагрузки на здравоохранение, но и по причине ограниченной эффективности.

Литература/References

1. Мельникова ЕВ, Меркулов ВА, Меркулова ОВ. Генная терапия нейродегенеративных заболеваний: достижения, разработки, проблемы внедрения в клиническую практику. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):127–47. Melnikova EV, Merkulov VA, Merkulova OV. Gene therapy of neurodegenerative diseases: achievements, developments, and clinical implementation challenges. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):127–47 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-433>
2. Baas L, van der Graaf R, van Hoorn ES, Bredenoord AL, Meijer K. The ethics of gene therapy for hemophilia: a narrative review. *J Thromb Haemost*. 2023;21(3):413–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.12.027>
3. Fischer MD, Simonelli F, Sahni J, Holz FG, Maier R, Fasser C, et al. Real-world safety and effectiveness of voretigene neparvovec: results up to 2 years from the prospective, registry-based PERCEIVE study. *Biomolecules*. 2024;14(1):122. <https://doi.org/10.3390/biom14010122>
4. Stingl K, Kempf M, Jung R, Kortuem F, Righetti G, Reith M, et al. Therapy with voretigene neparvovec. How to measure success? *Prog Retin Eye Res*. 2023;92:101115. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101115>
5. Thomas S, Conway KM, Fapo O, Street N, Mathews KD, Mann JR, et al. Time to diagnosis of Duchenne muscular dystrophy remains unchanged: findings from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network, 2000–2015. *Muscle Nerve*. 2022;66(2):193–7. <https://doi.org/10.1002/mus.27532>
6. Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with two copies of *SMN2* at risk for spinal muscular atrophy type 1: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med*. 2022;28(7):1381–9. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01866-4>
7. Motyl AAL, Gillingwater TH. Timing is everything: Clinical evidence supports pre-symptomatic treatment for spinal muscular atrophy. *Cell Rep Med*. 2022;3(8):100725. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100725>
8. Crooke ST. A call to arms against ultra-rare diseases. *Nat Biotechnol*. 2021;39(6):671–7. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00945-0>
9. Duan D. Lethal immunotoxicity in high-dose systemic AAV therapy. *Mol Ther*. 2023;31(11):3123–6. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.10.015>
10. Mendell JR, Connolly AM, Lehman KJ, Griffin DA, Khan SZ, Dharia SD, et al. Testing preexisting antibodies prior to AAV gene transfer therapy: rationale, lessons and future considerations. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022;25:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.02.011>
11. Li X, Wei X, Lin J, Ou L. A versatile toolkit for overcoming AAV immunity. *Front Immunol*. 2022;13:991832. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.991832>
12. Arjomandnejad M, Dasgupta I, Flotte TR, Keeler AM. Immunogenicity of recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors for gene transfer. *BioDrugs*. 2023;37(3):311–29. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00585-7>
13. DiMattia MA, Nam HJ, Van Vliet K, Mitchell M, Bennett A, Gurda BL, et al. Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. *J Virol*. 2012;86(12):6947–58. <https://doi.org/10.1128/jvi.07232-11>
14. Govindasamy L, Padron E, McKenna R, Muzyczka N, Kaludov N, Chiorini JA, Agbandje-McKenna M. Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. *J Virol*. 2006;80(23):11556–70. <https://doi.org/10.1128/jvi.01536-06>
15. Börner K, Kienle E, Huang LY, Weinmann J, Sacher A, Bayer P, et al. Pre-arrayed Pan-AAV peptide display libraries for rapid single-round screening. *Mol Ther*. 2020;28(4):1016–32. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.02.009>
16. Tabebordbar M, Lagerborg KA, Stanton A, King EM, Ye S, Tellez L, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell*. 2021;184(19):4919–38.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.028>
17. Weinmann J, Weis S, Sippel J, Tulalamba W, Remes A, El Andari J, et al. Identification of a myotropic AAV by massively parallel *in vivo* evaluation of barcoded capsid variants. *Nat Commun*. 2020;11(1):5432. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19230-w>
18. Zolotukhin S, Trivedi PD, Corti M, Byrne BJ. Scratching the surface of RGD-directed AAV capsid engineering. *Mol Ther*. 2021;29(11):3099–100. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.10.020>
19. El Andari J, Renaud-Gabardos E, Tulalamba W, Weinmann J, Mangin L, Pham QH, et al. Semirational bioengineering of AAV vectors with increased potency and specificity for systemic gene therapy of muscle disorders. *Sci Adv*. 2022;8(38):eabn4704. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn4704>
20. Muñoz S, Bertolin J, Jimenez V, Jaén ML, Garcia M, Pujol A, et al. Treatment of infantile-onset Pompe disease in a rat model with muscle-directed AAV gene therapy. *Mol Metab*. 2024;81:101899. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2024.101899>
21. Rode L, Bär C, Groß S, Rossi A, Meumann N, Viereck J, et al. AAV capsid engineering identified two novel variants with improved *in vivo* tropism for cardiomyocytes. *Mol Ther*. 2022;30(12):3601–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.07.003>
22. Stanton AC, Lagerborg KA, Tellez L, Krunnusz A, King EM, Ye S, et al. Systemic administration of novel engineered AAV capsids facilitates enhanced transgene expression in the macaque CNS. *Med*. 2023;4(1):31–50.e8. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.11.002>

23. Adachi K, Enoki T, Kawano Y, Veraz M, Nakai H. Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing. *Nat Commun.* 2014;5:3075.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4075>
24. Han J, Zhu L, Zhang J, Guo L, Sun X, Huang C, et al. Rational engineering of adeno-associated virus capsid enhances human hepatocyte tropism and reduces immunogenicity. *Cell Prolif.* 2022;55(12):e13339.
<https://doi.org/10.1111/cpr.13339>
25. Mével M, Bouzelha M, Leray A, Pacouret S, Guilbaud M, Penaud-Budloo M, et al. Chemical modification of the adeno-associated virus capsid to improve gene delivery. *Chem Sci.* 2019;11(4):1122–31.
<https://doi.org/10.1039/c9sc04189c>
26. Mulcrone PL, Lam AK, Frabutt D, Zhang J, Chrzanowski M, Herzog RW, Xiao W. Chemical modification of AAV9 capsid with N-ethyl maleimide alters vector tissue tropism. *Sci Rep.* 2023;13(1):8436.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-35547-0>
27. Li X, La Salvia S, Liang Y, Adamiak M, Kohlbrenner E, Jeong D, et al. Extracellular vesicle-encapsulated adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery to the heart. *Circulation.* 2023;148(5):405–25.
<https://doi.org/10.1161/circulationaha.122.063759>
28. Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med.* 2015;19(102):49–57. PMID: PMC4505817
29. Скопенкова ВВ, Егорова ТВ, Бардина МВ. Мышечно-специфические промоторы для генной терапии. *Acta Naturae.* 2021;13(1):47–58.
Skopenkova VV, Egorova TV, Bardina MV. Muscle-specific promoters for gene therapy. *Acta Naturae.* 2021;13(1):47–58 (In Russ.).
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11063>
30. Markusic DM, Hoffman BE, Perrin GQ, Nayak S, Wang X, LoDuca PA, et al. Effective gene therapy for haemophilic mice with pathogenic factor IX antibodies. *EMBO Mol Med.* 2013;5(11):1698–709.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201302859>
31. Colella P, Sellier P, Costa Verdera H, Puzzo F, van Wittenberghe L, Guerchet N, et al. AAV gene transfer with tandem promoter design prevents anti-transgene immunity and provides persistent efficacy in neonate Pompe mice. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;12:85–101.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.11.002>
32. Sellier P, Vidal P, Bertin B, Gicquel E, Bertil-Froidevaux E, Georger C, et al. Muscle-specific, liver-detargeted adeno-associated virus gene therapy rescues Pompe phenotype in adult and neonate *Gaa*^{-/-} mice. *J Inherit Metab Dis.* 2024;47(1):119–34.
<https://doi.org/10.1002/jimd.12625>
33. Qiao C, Yuan Z, Li J, He B, Zheng H, Mayer C, et al. Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver. *Gene Ther.* 2011;18(4):403–10.
<https://doi.org/10.1038/gt.2010.157>
34. Geisler A, Fechner H. MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World J Exp Med.* 2016;6(2):37–54.
<https://doi.org/10.5493/wjem.v6.i2.37>
35. Muhuri M, Zhan W, Maeda Y, Li J, Lotun A, Chen J, et al. Novel combinatorial microRNA-binding sites in AAV vectors synergistically diminish antigen presentation and transgene immunity for efficient and stable transduction. *Front Immunol.* 2021;12:674242.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674242>
36. Subramanian M, McIninch J, Zlatev I, Schlegel MK, Kaitanis C, Nguyen T, et al. RNAi-mediated rheostat for dynamic control of AAV-delivered transgenes. *Nat Commun.* 2023;14(1):1970.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37774-5>
37. Guilbaud M, Devaux M, Couzinié C, Le Duff J, Toromanoff A, Vandamme C, et al. Five years of successful inducible transgene expression following locoregional adeno-associated virus delivery in nonhuman primates with no detectable immunity. *Hum Gene Ther.* 2019;30(7):802–13.
<https://doi.org/10.1089/hum.2018.234>
38. Wu X, Yu Y, Wang M, Dai D, Yin J, Liu W, et al. AAV-delivered muscone-induced transgene system for treating chronic diseases in mice via inhalation. *Nat Commun.* 2024;15(1):1122.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-45383-z>
39. Wright JF. Codon modification and PAMPs in clinical AAV vectors: the tortoise or the hare? *Mol Ther.* 2020;28(3):701–3.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.026>
40. Hamilton BA, Wright JF. Challenges posed by immune responses to AAV vectors: addressing root causes. *Front Immunol.* 2021;12:675897.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.675897>
41. Wright JF. Quantification of CpG motifs in rAAV genomes: avoiding the toll. *Mol Ther.* 2020;28(8):1756–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.07.006>
42. Chan YK, Wang SK, Chu CJ, Copland DA, Letizia AJ, Costa Verdera H, et al. Engineering adeno-associated viral vectors to evade innate immune and inflammatory responses. *Sci Transl Med.* 2021;13(580):eabd3438.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3438>
43. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol.* 1998;72(3):2224–32.
<https://doi.org/10.1128/jvi.72.3.2224-2232.1998>
44. Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther.* 2003;7(6):839–50.
[https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(03\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(03)00095-9)
45. Allay JA, Sleep S, Long S, Tillman DM, Clark R, Carney G, et al. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial. *Hum Gene Ther.* 2011;22(5):595–604.
<https://doi.org/10.1089/hum.2010.202>
46. Wright JF, Wellman J, High KA. Manufacturing and regulatory strategies for clinical AAV2-hRPE65. *Curr Gene Ther.* 2010;10(5):341–9.
<https://doi.org/10.2174/156652310793180715>
47. Powers AD, Piras BA, Clark RK, Lockey TD, Meagher MM. Development and optimization of AAV hFIX particles by transient transfection in an iCELLis® fixed-bed bioreactor. *Hum Gene Ther Methods.* 2016;27(3):112–21.
<https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.021>
48. Taylor N. Pfizer ramps up bioprocessing capacity for DMD gene therapy trial. *BioPharma Reporter*; 2019.
<https://www.biopharma-reporter.com/Article/2019/08/08/Pfizer-ramps-up-bioprocessing-capacity-for-DMD-gene-therapy-trial>
49. Florea M, Nicolaou F, Pacouret S, Zinn EM, Sanmiguel J, Andres-Mateos E, et al. High-efficiency purification of divergent AAV serotypes using AAVX affinity chromatography. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2023;28:146–59.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.12.009>
50. Rebula L, Raspor A, Bavčar M, Štrancar A, Leskovec M. CIM monolithic chromatography as a useful tool for endotoxin reduction and purification of bacteriophage particles supported with PAT analytics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2023;1217:123606.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123606>
51. Haley J, Jones JB, Petraki S, Callander M, Shrestha S, Springfield E, Adamson L, Chilkoti A, Dzuricky MJ, Luginbuhl KM. IsoTag™AAV: an innovative, scalable & non-chro-

- matographic method for streamlined AAV manufacturing. *Cell Gene Ther Insights*. 2022;8(10):1287–1300. <https://doi.org/10.18609/cgti.2022.190>
52. Wada M, Uchida N, Posadas-Herrera G, Hayashita-Kinoh H, Tsunekawa Y, Hirai Y, Okada T. Large-scale purification of functional AAV particles packaging the full genome using short-term ultracentrifugation with a zonal rotor. *Gene Ther*. 2023;30(7–8):641–8. <https://doi.org/10.1038/s41434-023-00398-x>
 53. Strobel B, Miller FD, Rist W, Lamla T. Comparative analysis of cesium chloride- and iodixanol-based purification of recombinant adeno-associated viral vectors for preclinical applications. *Hum Gene Ther Methods*. 2015;26(4):147–57. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.051>
 54. Khanal O, Kumar V, Jin M. Adeno-associated viral capsid stability on anion exchange chromatography column and its impact on empty and full capsid separation. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023;31:101112. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.101112>
 55. Su W, Patricio MI, Duffy MR, Krakowiak JM, Seymour LW, Cawood R. Self-attenuating adenovirus enables production of recombinant adeno-associated virus for high manufacturing yield without contamination. *Nat Commun*. 2022;13(1):1182. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28738-2>
 56. Coronel J, Al-Dali A, Patil A, Srinivasan K, Braß T, Hein K, Wissing S. High titer rAAV production in bioreactor using ELEVECTA™ stable producer cell lines. In: *Proceedings of the ESGCT 2021 Digital Meeting, Virtual*, 19–22 October 2021.
 57. Penaud-Budloo M, François A, Clément N, Ayuso E. Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8:166–80. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.002>
 58. Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):78. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01780-w>
 59. Liu P, Mayer A. Advances in recombinant adeno-associated virus production for gene therapy. *American Pharmaceutical Review*. 2022. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/589113-Advances-in-Recombinant-Adeno-Associated-Virus-Production-for-Gene-Therapy/>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Все авторы участвовали в разработке концепции обзора, написании текста рукописи, формулировке выводов.

Благодарности. Авторы благодарны В.В. Батрак и Р.А. Хамитову за обсуждение концепции обзора.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. All the authors participated in the development of the concept of this review, drafted the manuscript, and formulated the conclusions.

Acknowledgements. The authors are grateful to V.V. Batrak and R.A. Khamitov for discussing the review concept.

Об авторах / Authors

Егорова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук / **Tatiana V. Egorova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3346-3242>

Пискунов Александр Александрович, канд. биол. наук / **Aleksandr A. Piskunov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>

Потеряев Дмитрий Александрович, канд. биол. наук / **Dmitry A. Poteryaev**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>

Поступила 05.04.2024

После доработки 19.06.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 5 April 2024

Revised 19 June 2024

Accepted 21 June 2024



МикроРНК-направленные олигонуклеотидные конструкции с различным механизмом действия для эффективного подавления процессов канцерогенеза

С.К. Мирошниченко, О.А. Патутина, М.А. Зенкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, проспект Академика Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090, Российская Федерация

Зенкова Марина Аркадьевна; marzen@niboch.nsc.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Развитие злокачественных новообразований ассоциировано с изменениями в экспрессии малых некодирующих РНК (микроРНК), что подчеркивает необходимость исследований в области разработки микроРНК-направленных ингибиторов как перспективного подхода к лечению онкологических заболеваний.

ЦЕЛЬ. Сравнительная оценка и определение возможностей практического применения существующих в настоящее время стратегий подавления функциональной активности опухоль-ассоциированных микроРНК, основанных на использовании терапевтических нуклеиновых кислот.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ известных ингибиторов микроРНК на основе олигонуклеотидов, характеризующихся различными механизмами действия. Ингибиторы микроРНК по механизму действия можно условно разделить на две группы. Первая группа соединений оказывает опосредованное ингибирующее влияние либо за счет блокирования функциональных связей между микроРНК и определенными мРНК-мишенями путем использования микроРНК-маскирующих олигонуклеотидов, либо за счет введения мутаций в гены микроРНК и нарушения процессов их биосинтеза с помощью системы CRISPR/Cas. Эти стратегии обладают сравнительно высоким биологическим потенциалом, однако в большинстве случаев используются в качестве поисковых инструментов для изучения функциональной роли микроРНК и определения их молекулярных взаимодействий в процессах канцерогенеза. Вторая группа олигонуклеотидных конструкций взаимодействует с микроРНК-мишенями напрямую, приводя к их стерическому блокированию или деградации. Такие микроРНК-связывающие олигонуклеотидные конструкции представлены множеством структурных вариантов, включая микроРНК-спонжи, РНК-зипперы, антисмысловые олигонуклеотиды и мРНКазы, демонстрирующие высокий терапевтический потенциал *in vitro* и *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Представленный анализ биологических свойств, терапевтического потенциала и ключевых преимуществ разработанных микроРНК-направленных олигонуклеотидных конструкций позволяет обозначить области их потенциального практического применения при лечении злокачественных новообразований.

Ключевые слова: микроРНК; микроРНК-направленные олигонуклеотидные конструкции; канцерогенез; малые некодирующие РНК; злокачественные неоплазии; микроРНК-маскирующие олигонуклеотиды; CRISPR/Cas; микроРНК-спонжи; антисмысловые олигонуклеотиды; мРНКазы

Для цитирования: Мирошниченко С.К., Патутина О.А., Зенкова М.А. МикроРНК-направленные олигонуклеотидные конструкции с различным механизмом действия для эффективного подавления процессов канцерогенеза. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):140–156. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-140-156>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта № 19-74-30011.
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

miRNA-targeting oligonucleotide constructs with various mechanisms of action as effective inhibitors of carcinogenesis

Svetlana K. Miroshnichenko, Olga A. Patutina, Marina A. Zenkova✉

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8 Academician Lavrentyev Ave, Novosibirsk 630090, Russian Federation

✉ Marina A. Zenkova; marzen@niboch.nsc.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The development of malignant neoplasms is associated with changes in the expression of small non-coding RNAs (miRNAs). This emphasises the need for research into the development of miRNA-targeted inhibitors as a promising approach to cancer treatment.

AIM. This study aimed to compare current strategies for suppressing the functional activity of tumour-associated miRNAs based on the use of therapeutic nucleic acids and to determine the application potential of these strategies.

DISCUSSION. This study analysed known oligonucleotide-based miRNA inhibitors with different mechanisms of action. Based on their mechanism of action, miRNA-targeted inhibitors can be classified into two groups. The first group of miRNA-targeted inhibitors exhibits an indirect inhibitory effect, either by blocking functional connections between miRNAs and specific mRNA targets through the use of miRNA-masking oligonucleotides or by introducing mutations into miRNA genes and disrupting gene biosynthesis processes through the use of the CRISPR/Cas system. Despite their relatively high biological potential, these strategies are mostly used as search tools to study miRNA functional roles and molecular interactions in carcinogenesis. The second group of oligonucleotide constructs interacts with miRNA targets directly, which leads to steric blocking or degradation of oncogenic microRNAs. These miRNA-binding oligonucleotide constructs come in a variety of structural variants, including miRNA sponges, RNA zippers, antisense oligonucleotides, and miRNases, which demonstrate high therapeutic potential *in vitro* and *in vivo*.

CONCLUSION. The described analysis of the biological properties, therapeutic potential, and key advantages of the developed miRNA-targeted oligonucleotide constructs helps outline the areas for their potential practical application in cancer treatment.

Keywords:

miRNA; miRNA-targeted oligonucleotide constructs; carcinogenesis; small non-coding RNA; malignant neoplasms; miRNA-masking oligonucleotides; CRISPR/Cas; miRNA sponges; antisense oligonucleotides; miRNases

For citation:

Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Zenkova M.A. miRNA-targeted oligonucleotide constructs with various mechanisms of action as effective inhibitors of carcinogenesis. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):140–156. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-140-156>

Funding. The study reported in this publication was funded by the Russian Science Foundation, Project No. 19-74-30011.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Некодирующие РНК (нкРНК) являются важнейшими элементами системы регуляции в клетке. Среди нкРНК особого внимания заслуживают микроРНК – короткие РНК-транскрипты длиной 18–25 нуклеотидов, осуществляющие посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов [1]. МикроРНК выполняют контроль всех фундаментальных клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз, миграция, адгезия и ангиогенез [2]. Нарушение уровня и функциональной активности микроРНК приводит к глобальной патологической реорганизации метаболизма клеток и часто ассоциировано с развитием широкого спектра заболеваний, в том числе онкологических [3]. В связи с этим ведется активная разработка противоопухолевых препаратов на основе микроРНК-направленных терапевтических нуклеиновых кислот.

Большинство опубликованных в настоящее время работ посвящены изучению роли определенных микроРНК в развитии конкретных типов неоплазий, оценке эффектов различных микроРНК-направленных конструкций *in vitro* и *in vivo* и анализу эффективности систем доставки РНК-направленных препаратов в рамках противоопухолевой терапии [4–6]. Накопленный объем экспериментальных данных в этой области нуждается в критическом анализе, обобщающем достоинства и недостатки основных терапевтических микроРНК-направленных технологий, а также определении перспектив и практического назначения разработанных подходов, что детально рассмотрено в настоящем обзоре. Представлены данные, опубликованные в научных статьях и открытых интернет-ресурсах за период с 2007 г., когда были предложены первые стратегии подавления функций микроРНК, по настоящее время.

Цель работы – сравнительная оценка и определение возможностей практического применения существующих в настоящее время стратегий подавления функциональной активности опухоль-ассоциированных микроРНК, основанных на использовании терапевтических нуклеиновых кислот.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

МикроРНК: от молекулярных механизмов к терапевтическому применению

Геном человека кодирует более 2300 уникальных последовательностей микроРНК [7], при этом до 60% всех генов, кодирующих белки, подвергаются посттранскрипционной регуляции, обеспечиваемой микроРНК [8]. Многообразие

функций микроРНК в организации сложных генных сетей, а также контекстно-зависимая природа управления генами подчеркивает их важность в регуляции и поддержании клеточного гомеостаза, а также развития и функционирования целого организма.

Биогенез и механизм функционирования микроРНК

Синтез зрелых форм микроРНК происходит эндогенно [9–11]. Биогенез микроРНК инициируется РНК-полимеразой II с образованием первичного транскрипта при-микроРНК – сложно разветвленной шпильчатой последовательности длиной до нескольких тысяч нуклеотидов. Далее путем последовательных этапов эндонуклеазного катализа происходит процессинг при-микроРНК. Эндонуклеазный комплекс Drosha-DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) разрезает при-микроРНК с высвобождением микроРНК предшественника – пре-микроРНК, которая экспортируется белком-транспортером Exportin-5 в цитоплазму и подвергается дальнейшему процессингу рибонуклеазой Dicer с образованием дуплекса микроРНК длиной приблизительно 22 нуклеотида (н.). На заключительном этапе биогенеза белки семейства Ago распознают микроРНК-дуплекс, инициируют его плавление, приводящее к деградации «пассажирской» цепи (passenger strand), и осуществляют последующую сборку РНК-индуцируемого комплекса выключения гена RISC (RNA-induced silencing complex), содержащего ведущую эффекторную цепь микроРНК. Описанная выше схема биогенеза характерна для большинства микроРНК, однако возможны альтернативные механизмы [11].

Основная функция микроРНК – ингибирование мРНК-мишеней (посттранскрипционная регуляция), которое осуществляется путем комплементарного связывания затравочной области микроРНК (seed region, 2–8 н. с 5'-конца микроРНК) со специфическими сайтами узнавания, расположенными в 3'-нетранслируемых областях (3'UTR) мРНК генов-мишеней [12, 13]. В ряде случаев это взаимодействие сопровождается образованием дополнительных комплементарных пар между участком микроРНК в области 13–16 н. с мРНК (supplementary interaction region, 13–16 н.) [12, 13]. Далее в сформированном комплексе центральная область (8–12 н.) и 3'-концевой район (17–12/25 н.) микроРНК обеспечивают установление конформации гетеродуплекса, необходимой для последующей инактивации мРНК.

Посттранскрипционная регуляция мРНК-мишеней, индуцируемая микроРНК, может

происходить посредством дестабилизации мРНК либо путем подавления трансляции [12, 14]. Первый способ инактивации мРНК осуществляется путем привлечения комплексом RISC адапторного белка TNRC6 (trinucleotide repeat-containing gene 6) и деаденилаз PAN2-PAN3 (poly(A) specific ribonuclease subunits PAN2-PAN3) и CCR4-NOT (carbon catabolite repression-negative on TATA-less), укорачивающих поли(А)-хвост мРНК, что вызывает ее дестабилизацию при помощи декэпирования и экзонуклеолитической 5'→3' деградации транскрипта. Второй способ основан на привлечении хеликазы DDX6 (DEAD-box helicase 6), которая способствует непосредственному ингибированию трансляции [12, 13, 15].

Накапливается все больше данных о том, что кроме основной функции микроРНК участвуют в активации трансляции, эпигенетической регуляции, активации транскрипции — процессах, включающих в том числе транспорт и функционирование в ядре и митохондриях [16–18].

Стоит отметить, что микроРНК обладают уникальной мультифункциональностью, которая выражается в том, что одна микроРНК имеет широкий спектр мРНК-мишеней и может управлять клеточными сигнальными каскадами [13]. Поскольку каждый сигнальный путь, как правило, регулируется несколькими микроРНК, это приводит к созданию сложной и мощной регуляторной сети, управляющей физиологическими процессами в клетке как в норме, так и при патологии [13].

Роль микроРНК при онкологических заболеваниях

Значительный объем данных, накопленный к данному моменту, однозначно указывает на то, что aberrантно экспрессированные микроРНК играют важную роль в развитии многих заболеваний человека, включая злокачественные новообразования [3], аутоиммунные нарушения [19], нейродегенеративные [20, 21] и сердечно-сосудистые заболевания [22].

Дисрегуляция экспрессии микроРНК при канцерогенезе происходит с вовлечением различных механизмов, включая делеции или амплификации локусов микроРНК, мутации генов микроРНК, эпигенетическую и транскрипционную регуляцию, посттранскрипционную модификацию, а также нарушение регуляции процесса микроРНК [23]. Развитие злокачественных неоплазий сопровождается избытком или дефицитом определенных микроРНК по сравнению с нормальными тканями [24]. Специфическое накопление онкогенных микроРНК способствует канцерогенезу за счет подавления

генов — супрессоров опухолей, тогда как глобальная потеря микроРНК-супрессоров приводит к гиперэкспрессии онкогенов. Следует подчеркнуть, что данная классификация является в определенной степени условной, поскольку в зависимости от типа злокачественного новообразования некоторые микроРНК могут играть прямо противоположную роль [25].

МикроРНК-направленные подходы к управлению процессами канцерогенеза

Для эффективного подавления процессов канцерогенеза активно разрабатываются различные микроРНК-направленные конструкции, целью которых является восстановление уровня онкосупрессорных микроРНК или снижение экспрессии и подавление функциональной активности онкогенных микроРНК. Существуют два основных подхода для восстановления уровня онкосупрессорных микроРНК: векторные вирусные системы, обеспечивающие постоянную выработку зрелых форм или молекул-предшественников онкосупрессорных микроРНК в клетке; микроРНК мимики, представляющие собой синтетические аналоги микроРНК-онкосупрессоров, обеспечивающие после введения временное повышение их уровня в клетках [26]. Следствием индуцированного повышения уровня онкосупрессорных микроРНК является подавление экспрессии онкогенных белков-мишеней и торможение процессов развития опухоли [26].

Активные исследования ведутся в области разработки микроРНК-ингибиторов на основе олигонуклеотидных конструкций. Отличительной особенностью микроРНК является их высокая внутриклеточная копияность (от 1000 до 30000 копий на клетку) в сравнении с мРНК (не превышает 100 копий) [27]. Кроме того, микроРНК отличается высокой скоростью биогенеза, на порядок превосходящая скорость образования мРНК, а также рекордная продолжительность жизни, в среднем составляющая 25 ч, в сравнении с 2,2 ч — для мРНК [28, 29]. Высокая внутриклеточная концентрация микроРНК, достигающая 22 мкМ, в сочетании с их устойчивостью делает их непростой мишенью для подавления под действием терапевтических нуклеиновых кислот.

По механизму действия микроРНК ингибиторы можно условно разделить на две группы: молекулярные конструкции, оказывающие опосредованное воздействие на функциональную активность микроРНК, и олигонуклеотидные агенты, ограничивающие функционирование микроРНК посредством их прямого блокирования или деградации. Вне зависимости от способа воздействия на микроРНК основной задачей

применения микроРНК-ингибиторов является нарушение их взаимодействия с мРНК-мишенями, приводящее к восстановлению синтеза белков – супрессоров опухоли и подавлению процессов канцерогенеза. В *таблице 1* представлены основные преимущества и недостатки различных типов микроРНК-направленных олигонуклеотидных конструкций и данные по актуальной стадии их разработки.

Молекулярные системы и конструкции, оказывающие опосредованное влияние на функциональную активность микроРНК

На *рисунке 1* представлены микроРНК-ингибиторы, обеспечивающие подавление функций микроРНК без непосредственного связывания со зрелыми микроРНК-мишенями.

МикроРНК-маскирующие олигонуклеотиды

Одним из способов подавления функций микроРНК являются микроРНК-маскирующие олигонуклеотиды (далее микроРНК-маски). Эти олигонуклеотиды образуют прочные комплексы с мРНК и блокируют сайты узнавания микроРНК (*рис. 1А, табл. 1*).

В большинстве работ микроРНК-маски используются для подтверждения взаимосвязи микроРНК-мРНК-мишень для определения их

вовлеченности в процессы онкотрансформации. Так, с использованием микроРНК-масок было установлено, что микроРНК-145 негативно регулирует уровень биосинтеза белка CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), низкий уровень которого в клетках аденокарциномы легкого человека связан с повышенным риском развития опухоль-ассоциированного кистозного фиброза [30]. Выявлено, что микроРНК-203 подавляла экспрессию белка LAMP-1 (LIM and SH3 protein 1) и стимулировала пролиферацию опухолевых клеток. В работе T. Colangelo с соавт. показано, что микроРНК-17 обеспечивала NOR-1 (nuclear hormone receptor-1)-опосредованную регуляцию ангиогенеза, а микроРНК-27а обладала анти-апоптотическим эффектом за счет регуляции экспрессии белка CALR (calreticulin) [31]. Было установлено, что микроРНК-маски, блокирующие связывание микроРНК-522 с мРНК гена DENND2D (DENN domain containing 2D), вызывали замедление пролиферации и индукцию апоптоза клеток немелкоклеточного рака легкого в исследовании *in vitro* [32]. Использование микроРНК-масок, препятствующих связыванию микроРНК-30 с мРНК DLL4 (delta like canonical Notch ligand 4), приводило к подавлению ангиогенеза [33], а микроРНК-маски, выключающие взаимодействие микроРНК-9 и мРНК PTCH1A (protein patched homologue 1A),

Таблица 1. Механизм действия и основные характеристики конструкций, подавляющих активность онкогенных микроРНК
Table 1. Mechanisms of action and main characteristics of oligonucleotide constructs aimed at inhibition of oncogenic miRNAs

Тип микроРНК-направленной олигонуклеотидной конструкции <i>Type of miRNA-targeted oligonucleotide construct</i>	Механизм действия <i>Mechanism of action</i>	Преимущества <i>Advantages</i>	Недостатки <i>Disadvantages</i>
МикроРНК-маскирующие олигонуклеотиды ^а <i>miRNA-masking oligonucleotides^a</i>	Формирование комплекса с мРНК мишенями <i>Binding to mRNA targets</i>	Возможность оценить влияние взаимодействия микроРНК с определенной мРНК-мишенью на процессы канцерогенеза <i>Ability to assess the impact of miRNA interaction with a specific mRNA target on carcinogenesis processes</i>	<ul style="list-style-type: none">– Недостаточная универсальность: требует подтверждения функциональной связи пары микроРНК-мРНК в каждом типе клеток.– Воздействие лишь на одну мРНК-мишень из всего пула мРНК, регулируемого целевой микроРНК– <i>Lacks universality and requires confirmation of functional binding of the miRNA-mRNA dyad in each cell type.</i>– <i>Affects only one mRNA target from the entire mRNA pool regulated by the miRNA</i>
МикроРНК-направленные системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 ^б <i>miRNA-targeted CRISPR/Cas9 genome editing systems^b</i>	Нарушение биосинтеза микроРНК путем внесения мутаций в гены микроРНК <i>Disruption of miRNA biosynthesis by introduction of mutations in miRNA genes</i>	<ul style="list-style-type: none">– Высокая селективность метода.– Возможность получения клеточных линий с полным нокаутом по гену микроРНК– <i>High selectivity of the method.</i>– <i>Possibility to obtain cell lines with complete miRNA gene knockout</i>	<ul style="list-style-type: none">– Спектр микроРНК-мишеней ограничен доступностью сайтов посадки систем геномного редактирования в геноме.– Эффективность подавления зависит от количества копий генов микроРНК в геноме– <i>The spectrum of miRNA targets is limited by the availability of target sites in the genome for recognition by genome editing systems.</i>– <i>Suppression efficiency depends on the number of miRNA gene copies in the genome</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Тип микроРНК-направленной олигонуклеотидной конструкции <i>Type of miRNA-targeted oligonucleotide construct</i>	Механизм действия <i>Mechanism of action</i>	Преимущества <i>Advantages</i>	Недостатки <i>Disadvantages</i>
МикроРНК спонжи ^b <i>miRNA sponges^b</i>	Стерическое блокирование микроРНК <i>Steric blocking of miRNAs</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Одновременное подавление большого числа копий микроРНК. – Возможность комбинирования в единой структуре сайтов посадки к нескольким различным микроРНК. – Высокая продолжительность эффектов – <i>Simultaneous suppression of a large number of miRNA copies.</i> – <i>Possibility of combining binding sites of several different miRNAs in a single structure.</i> – <i>Long-lasting effects</i> 	<ul style="list-style-type: none"> – Высокая трудоемкость конструирования. – Иммуногенность – <i>Labour-intensiveness of construction.</i> – <i>Immunogenicity due to the substantial size of the constructs</i>
Малые РНК запперы ^b <i>Small RNA zippers^b</i>	Стерическое блокирование микроРНК <i>Steric blocking of miRNAs</i>	Высокая эффективность подавления онкогенных микроРНК <i>High efficiency of oncogenic miRNA inhibition</i>	Отсутствие исследований биологической активности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> <i>Lack of biological activity studies in vitro and in vivo</i>
Антисмысловые олигонуклеотиды ^c <i>Antisense oligonucleotides^c</i>	Стерическое блокирование или расщепление микроРНК мишени при активации внутриклеточных ферментов <i>Steric blocking or degradation of the target miRNA via activation of intracellular enzymes</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Высокая биологическая активность <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>. – Высокая нуклеазоустойчивость. – Синергическое действие с другими терапевтическими агентами – <i>High biological activity in vitro and in vivo.</i> – <i>High nuclease resistance.</i> – <i>Synergistic action with other therapeutic agents</i> 	<ul style="list-style-type: none"> – Большинство химических модификаций не обеспечивает РНКазы Н-активирующую способность. – Необходимость оптимизации режима введения препаратов – <i>Most chemical modifications do not confer RNase H-activating ability.</i> – <i>Dosing regimens need optimisation</i>
МиРНКазы ^b <i>miRNAses^b</i>	Расщепление микроРНК мишени в каталитическом режиме посредством собственной каталитической группы и активации внутриклеточных ферментов <i>Degradation of the miRNA target in the catalytic mode due to its own ribonuclease activity accompanied by activation of intracellular enzymes</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Наличие собственной каталитической активности. – Синергическое действие с РНКазой Н. – Высокая стабильность к действию нуклеаз – <i>Intrinsic catalytic activity.</i> – <i>Synergistic action with RNase H.</i> – <i>High nuclease stability</i> 	<ul style="list-style-type: none"> – Зависимость эффективности расщепления микроРНК от последовательности мишени. – Высокая чувствительность конструкций к введению химических модификаций – <i>Dependence of miRNA cleavage efficiency on the sequence of the target.</i> – <i>High sensitivity of constructs to chemical modifications</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

^a Конструирование микроРНК-маскирующих олигонуклеотидов возможно на платформе miScript Target Protectors (QIAGEN, США) <https://www.qiagen.com/kr/spotlight-pages/ias/automated-qpcr-workflow/detection/miscript-target-protectors/>^b Данный тип конструкций находится на стадии доклинических исследований.^c На рынке представлены различные варианты коммерческих ингибиторов микроРНК на основе антисмысловых олигонуклеотидов производства ThermoFisher Scientific (США), Integrated DNA Technologies (США), Exiqon (Дания), GenePharma (Китай) и др. На этапе клинических исследований находятся три микроРНК-направленных препарата на основе антисмысловых олигонуклеотидов: LNA-i-miR-221 (Azienda Ospedaliera Universitaria Mater Domini), MRG106 (miRagen therapeutics), RG-012 (Regulus Therapeutics).^a The platform miScript Target Protectors by QIAGEN, USA (<https://www.qiagen.com/kr/spotlight-pages/ias/automated-qpcr-workflow/detection/miscript-target-protectors/>) provides means to construct miRNA-masking oligonucleotides.^b This type of oligonucleotide constructs is at the preclinical development stage.^c At the moment, commercially available variants of miRNA inhibitors based on antisense oligonucleotides include products by Thermo Fisher Scientific (USA), Integrated DNA Technologies (USA), Exiqon (Denmark), GenePharma (China), and other companies. Three miRNA-targeted inhibitors based on antisense oligonucleotides, including LNA-i-miR-221 (Azienda Ospedaliera Universitaria Mater Domini), MRG106 (miRagen Therapeutics), and RG-012 (Regulus Therapeutics), are at the clinical development stage.

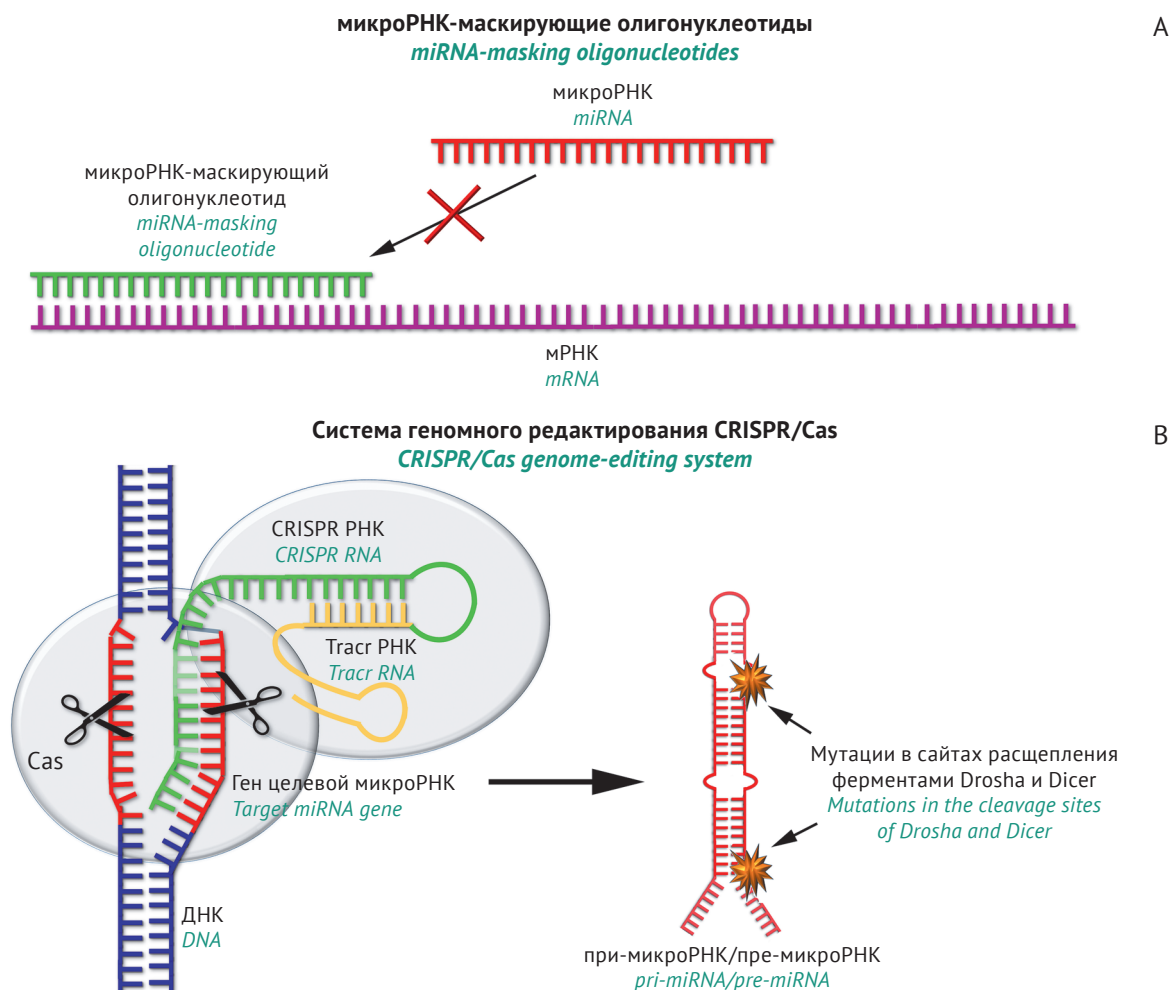


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Олигонуклеотидные конструкции, оказывающие опосредованное действие на функциональную активность микроРНК: А — микроРНК-маскирующие олигонуклеотиды, блокирующие сайты узнавания микроРНК на определенных мРНК-мишенях; В — системы геномного редактирования CRISPR/Cas, вызывающие нарушение биосинтеза микроРНК за счет введения мутаций в гены целевых микроРНК. При-микроРНК — первичный транскрипт, содержащий последовательность зрелой микроРНК, пре-микроРНК — предшественник микроРНК, tracr РНК — trans-activating (транс-активирующая) РНК, CRISPR — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (clustered, regularly interspaced short palindromic repeats).

Fig. 1. Oligonucleotide constructs indirectly influencing the functional activity of miRNAs. (A) miRNA-masking oligonucleotides blocking miRNA recognition sites on mRNA targets. (B) CRISPR/Cas genome-editing systems causing miRNA biosynthesis disruption due to miRNA gene mutations. Pri-miRNA, primary transcript containing mature miRNA sequence; pre-miRNA, precursor miRNA; tracr RNA, trans-activating RNA; CRISPR RNA, clustered regularly interspaced short palindromic repeats RNA.

восстанавливали чувствительность клеток глиобластомы к темозоломиду [34].

Важно отметить, что применение микроРНК-масок имеет большое значение для фундаментальных исследований, поскольку позволяет изучить молекулярные основы канцерогенеза и оценить степень вовлеченности любой пары микроРНК-мРНК в ключевые клеточные процессы. Высокую значимость этого молекулярно-биологического инструмента подтверждает наличие коммерческого препарата miScript Target Protectors

(QIAGEN, США) для конструирования препаратов¹. Однако применение микроРНК-масок в качестве терапевтических агентов весьма ограничено. Существенным недостатком подхода является меньшая эффективность действия микроРНК-масок по сравнению с микроРНК-блокирующими конструкциями — при использовании микроРНК-масок происходит блокирование взаимодействий микроРНК лишь с одной терапевтической мишенью, тогда как молекулярные связи микроРНК с остальными регулируемым мРНК

¹ miScript Target Protectors For miRNA functional studies performed by interfering with miRNA-target interaction. <https://www.qiagen.com/kr/spotlight-pages/ias/automated-qpcr-workflow/detection/miscript-target-protectors/>

сохраняются [32]. Низкая биологическая активность микроРНК-масок на клеточных моделях, вероятно, является причиной отсутствия данных о применении данного типа препаратов на опухолевых моделях *in vivo*.

МикроРНК-направленные системы геномного редактирования CRISPR/Cas

С начала 2010-х гг. активно развивается и применяется технология геномного редактирования с использованием системы CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins) [35]. Система CRISPR/Cas с высокой специфичностью и селективностью вносит двуцепочечные разрывы в выбранных областях ДНК, стимулируя репарацию по механизму неомологичного соединения концов, что способствует возникновению мутаций по типу делеции или инсерции в геномишени и вызывает последующее снижение уровня экспрессии мишени (в данном контексте микроРНК).

Эта технология нашла свое применение и в качестве инструмента подавления функций онкогенных микроРНК. Нарушения в геноме, вносимые с помощью CRISPR/Cas, делают невозможным узнавание при- и пре-микроРНК белками биогенеза Droscha и Dicer, приводят к блокированию процессинга микроРНК, способствуют утилизации мутантных транскриптов и нарушению взаимодействий микроРНК с мРНК-мишенями (рис. 1В, табл. 1). Установлено, что эффективность подавления уровня микроРНК в клетке под действием CRISPR/Cas существенно варьирует в зависимости от количества копий генов микроРНК в геноме, а также доступности протоспейсера PAM (protospacer adjacent motif) вблизи гена микроРНК [36]. Использование CRISPR/Cas9 позволило снизить на 55–96% экспрессию микроРНК-17, микроРНК-200с и микроРНК-141 в клетках колоректального рака *in vitro* [37, 38]. При ингибировании микроРНК-93 в клетках HeLa с применением CRISPR/Cas было показано, что делеция даже одного нуклеотида в 5'-области микроРНК приводила к ее нокауту [39].

В настоящее время системы CRISPR/Cas чаще используются в исследованиях в качестве эффективного инструмента изучения молекулярных механизмов канцерогенеза, так как этот подход позволяет как выделить ключевые микроРНК-драйверы канцерогенеза, так и оценить влияние взаимодействий микроРНК с определенными мРНК-мишенями на изменение фенотипа опухолевых клеток [40, 41]. Широко исследуется и терапевтический потенциал систем CRISPR/Cas. Установлено,

что при использовании CRISPR/Cas9 для ингибирования онкогенных микроРНК (микроРНК-17, микроРНК-21, микроРНК-141 и микроРНК-3188) на опухолевых клетках различного гистогенеза наблюдались следующие эффекты: двукратное снижение пролиферации и инвазии опухолевых клеток; в 5 раз снижались их миграция и эпителиально-мезенхимальный переход; значительно увеличивались чувствительность клеток к цитостатикам и индукция апоптоза [42]. Значительный противоопухолевый эффект был выявлен на трех типах глиом (GL261, CT2A и U87) при использовании системы CRISPR/Cas9, направленной к микроРНК-21. Установлено, что интракраниальное введение опухолевых клеток с нокаутом по микроРНК-21 приводило к многократному снижению скорости роста опухоли и увеличению продолжительности жизни животных-опухоленосителей с 20 до 40 или 60 дней, в зависимости от типа опухоли [43].

Наряду с очевидными достоинствами системы CRISPR/Cas9 следует отметить и ряд существенных недостатков терапии с ее использованием: высокая вероятность неспецифического встраивания в геном; нежелательный иммунный ответ, ассоциированный с иммуногенностью как систем геномного редактирования, так и вирусных векторов, используемых в качестве доставляющих агентов [44]; ограниченный спектр микроРНК, чувствительных к действию CRISPR/Cas9, что определяется доступностью PAM мотивов вблизи генов микроРНК [36]; отсутствие контроля за степенью подавления микроРНК, который меняется в зависимости от копийности мишени в геноме.

Олигонуклеотидные конструкции, обеспечивающие стерическое блокирование или деградацию онкогенных микроРНК

На рисунке 2 представлены микроРНК-направленные конструкции на основе терапевтических нуклеиновых кислот, которые подавляют функциональную активность микроРНК в результате их стерического блокирования или необратимой деградации.

МикроРНК-спонжи

МикроРНК-спонжи представляют собой синтетический транскрипт, содержащий несколько tandemно расположенных сайтов посадки целевой микроРНК, соединенных линкерами [45] (рис. 2А, табл. 1). Были разработаны синтетические микроРНК-спонжи как линейной структуры, так и замкнутой формы, имитирующей природные кольцевые молекулы РНК [46]. Выбор кольцевых

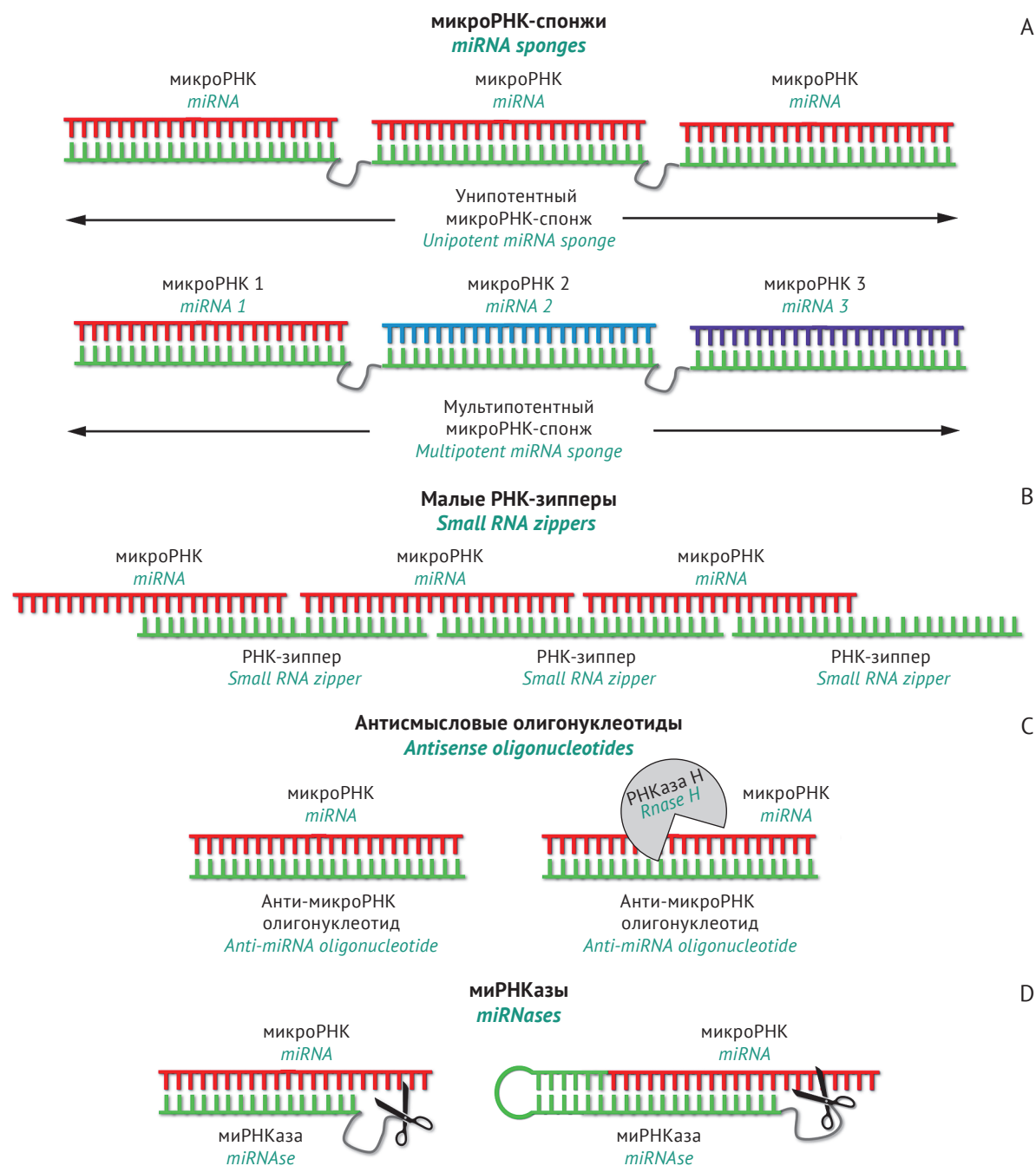


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. МикроРНК-связывающие конструкции, вызывающие стерическое блокирование или деградацию микроРНК. Схематичное изображение комплексов микроРНК с уни- и мультипотентными микроРНК-спонжами (А); малыми РНК-зипперами (В); антисмысловыми олигонуклеотидами, вызывающими стерическое блокирование или деградацию микроРНК под действием РНКазы H (С); миРНКазы (D).

Fig. 2. miRNA-binding constructs exhibiting steric blocking or degradation of miRNAs. Schematic depiction of miRNA complexes with mono- or multipotent miRNA sponges (A), small RNA-zippers (B), antisense oligonucleotides exhibiting steric blocking or RNase H-mediated miRNA degradation (C), miRNases (D).

конструкций микроРНК-спонжей обычно объясняется их повышенной нуклеазоустойчивостью, тогда как для линейных форм увеличение биологической стабильности обеспечивается введением модифицированных звеньев [47].

Существенным достоинством спонжей является способность связывать одновременно до 20 копий микроРНК, что приводит к быстрому подавлению ее функциональной активности и восстановлению уровней белков-мишеней

[48]. Так, использование микроРНК-спонжей к микроРНК-21 привело к двукратному подавлению пролиферации и колониеобразования клеток аденокарциномы легкого и снижению резистентности клеток рака молочной железы к доксорубину [49, 50]. Применение спонжей к микроРНК-10b обеспечивало 1,5-кратное снижение миграции и инвазии клеток рака молочной железы *in vitro* [51]. Спонжи к микроРНК-155 пятикратно подавляли пролиферацию клеток множественной миеломы [52]. В исследовании *in vitro* показано, что введение спонжа к микроРНК-221/222 способствовало двукратному подавлению роста опухоли на модели колоректального рака [53].

Важным преимуществом микроРНК-спонжей является возможность конструировать мульти-таргетные варианты, содержащие сайты посадки различных микроРНК одновременно (рис. 2А). В ряде работ продемонстрировано, что такой подход более эффективен в сравнении с применением как моновалентных спонжей (одна микроРНК), так и комбинаций нескольких разнонаправленных спонжей. Бивалентный спонж к микроРНК-31 и микроРНК-155, а также спонж, блокирующий одновременно 4 микроРНК (микроРНК-17, микроРНК-18а, микроРНК-19 и микроРНК-92), примерно в 2 раза более эффективно снижали пролиферацию клеток рака легкого и лимфомы Ходжкина соответственно по сравнению с моновалентным спонжем [46]. Антипролиферативный эффект на клетках рака молочной железы полифункциональных спонжей, направленных к микроРНК-21, микроРНК-155 и микроРНК-17, был в 4 раза выше, чем у спонжей, направленных к одной микроРНК [54].

Существенным недостатком спонжей является сложность конструирования такого типа микроРНК-ингибиторов: необходимо использование линкера подходящей длины и выбор оптимального количества сайтов посадки микроРНК (не менее 4 и не более 20, что связано с зависимостью эффективности связывания микроРНК от количества сайтов посадки микроРНК на спонже — наибольший рост эффективности инактивации микроРНК наблюдается при последовательном добавлении в структуру спонжа от 1 до 4 таких сайтов, а введение более 20 сайтов связывания не приводит к усилению ингибирующего эффекта) [48, 55]; введение определенного паттерна мисмэтчей в сайты посадки микроРНК для предотвращения расщепления спонжа белком Ago2, которое возникает в случае полной комплементарности спонжа и микроРНК; клонирование последовательности спонжа в структуру вирусного вектора [46].

Данное направление развивается в сторону изучения микроРНК-связывающего потенциала природных длинных кольцевых РНК, о чем свидетельствуют несколько тысяч публикаций на эту тему за последние 5 лет [56, 57].

Малые РНК-зипперы

Перспективным подходом к ингибированию микроРНК является конструирование малых РНК-зипперов — олигонуклеотидов, которые одновременно связываются с двумя молекулами микроРНК, стыкуя их по принципу «голова» к «хвосту» (рис. 2В, табл. 1). Это достигается за счет того, что первые 10–12 н. зиппера комплементарны 3'-концу молекулы целевой микроРНК, а следующие 10–12 н. — ее 5'-концу [58]. В результате в клетке образуется протяженный гетеродуплекс, похожий на застежку типа «молния», приводящий к выведению существенной доли целевой микроРНК из пула функционально активных молекул. На клетках рака молочной железы было установлено, что трансфекция клеток зипперами к микроРНК-17 и микроРНК-221 позволяла снизить уровень этих микроРНК в клетках на 90%, что сопровождалось подавлением миграции и снижением резистентности опухолевых клеток к доксорубину в 1,5 раза [58]. На сегодня это единственный пример использования данного типа конструкций. Очевидным преимуществом этой стратегии является высокая эффективность подавления онкогенных микроРНК в опухолевых клетках. Однако недостаточное количество данных о применении РНК-зипперов на клетках иного гистогенеза или моделях опухоли *in vivo* не позволяет исчерпывающе оценить терапевтический потенциал данных конструкций.

МикроРНК-направленные антисмысловые олигонуклеотиды

Антисмысловые олигонуклеотиды (antisense oligonucleotide, ASO) являются в настоящее время наиболее применяемой технологией подавления онкогенных микроРНК на опухолевых моделях различного гистогенеза *in vitro* и *in vivo*. Данный подход основан на использовании коротких синтетических олигонуклеотидов длиной 15–20 н., комплементарных определенным микроРНК (рис. 2С, табл. 1). Для увеличения продолжительности и эффективности действия антисмысловых олигонуклеотидов в клетке в их структуру вводят различные модификации, что обеспечивает улучшение гибридных свойств и нуклеазоустойчивости соединений, а также во многом определяет механизм действия антисмысловых олигонуклеотидов. Основным механизмом ингибирования

под действием ASO является образование прочного комплементарного комплекса с микроРНК-мишенью. Затем в случае, если используется ASO дезокси-ряда, происходит рекрутирование внутриклеточного фермента РНКазы Н, который способен распознавать гетеродуплекс РНК-ДНК и вызывать эндонуклеазную деградацию РНК в составе гетеродуплекса. Однако часть разработанных модификаций, включая 2'-О-метильную (2'OMe), 2'-фтор-содержащую (2'F), 2'-О-метоксиэтильную (2'MOE), замкнутые нуклеиновые кислоты (locked nucleic acids, LNA) и пептидил-нуклеиновые кислоты (peptidyl nucleic acids, PNA), при введении в структуру олигонуклеотида препятствуют рекрутингу РНКазы Н. В связи с этим олигонуклеотиды, содержащие химические группы, несовместимые с работой РНКазы Н, обеспечивают ингибирование микроРНК за счет ее стерического блокирования.

Оценка биологических эффектов ASO показала, что применение анти-микроРНК-221 и анти-микроРНК-222 2'OMe-ASO способствовало 1,5-кратному подавлению пролиферации клеток глиобластомы [59]. Использование коммерческих 2'MOE-модифицированных ASO против микроРНК-23а и микроРНК-93 приводило к двукратному подавлению миграции клеток карциномы почек и выживаемости клеток рака желудка соответственно [60, 61]. Введение 2'MOE ASO к микроРНК-10b способствовало более чем двукратному снижению роста интракраниальной формы глиобластомы и значительному увеличению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей [62].

Более перспективным представляется использование модификаций ASO, способных активировать РНКазу Н. В связи с этим широкое распространение получили фосфоротиоатные (phosphorothioate, PS) ASO, которые отличаются повышенной нуклеазоустойчивостью и способностью активировать РНКазу Н. Такие ASO эффективны при применении как *in vitro*, так и *in vivo*. Показано, что PS-ASO к микроРНК-182 обеспечивали двукратное снижение количества метастазов в печени при меланоме [63], а PS-ASO к микроРНК-21 способствовали двукратному подавлению роста опухоли эпидермоидной карциномы *in vivo* [64].

Стоит отметить, что основным недостатком PS-ASO является неспецифическая токсичность, ассоциированная с высоким сродством PS-групп к серосодержащим белкам, а также несколько худшие гибридизационные свойства, чем у олигонуклеотидов дезокси-ряда.

Исследовательской группой ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной

медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) впервые были изучены свойства микроРНК-направленных олигонуклеотидов, содержащих новую модификацию межнуклеотидных связей — N(метансульфонил)фосфорамидную (μ). Введение μ -групп по всем межнуклеотидным связям наделяет ASO рядом исключительных характеристик, включая высокие гибридизационные свойства, рекордную нуклеазоустойчивость (168 ч против 96 ч для μ - и PS-ASO соответственно), способность рекрутировать РНКазу Н, двукратно превышающую возможности PS-ASO [65]. Исследование потенциала разработанных олигонуклеотидов на опухолевых клетках подтвердило преимущество μ -ASO над PS-аналогами. μ -ASO к микроРНК-21 обеспечивал 4-кратное (1,3 раза для PS-ASO) снижение пролиферации, 19-кратное (5 раз для PS-ASO) подавление миграции и 3-кратное увеличение количества клеток меланомы B16 в состоянии апоптоза (5-кратное для PS-ASO в основном из-за общей неспецифической токсичности PS-модификации) [65, 66]. Важным результатом применения μ -олигонуклеотидов являлось 8-кратное подавление роста опухоли эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека и 6-кратное подавление метастазирования в легких на модели меланомы B16 мыши [64, 66]. Следует отметить, что μ -олигонуклеотиды практически не оказывали неспецифического токсического действия на организм, при этом было выявлено уменьшение деструктивных изменений в печени животных-опухоленосителей, ассоциированных с развитием неоплазии [64].

Действие ASO может быть усилено при их комбинированном применении, аналогично микроРНК-спонжам. В случае использования комбинаций нескольких микроРНК-направленных ASO происходит одновременное разнонаправленное подавление процессов канцерогенеза за счет восстановления уровня белков супрессоров опухоли. Так, на модели лимфосаркомы RLS40 *in vivo* было установлено, что перитуморальное инъекционное введение парных и тройной комбинации μ -ASO, направленных к микроРНК-21, микроРНК-17 и микроРНК-155, обеспечивало в 3,5 раза более эффективное подавление роста опухоли по сравнению с монотерапией, способствуя практически полному торможению ее роста [66].

Важнейшим достоинством анти-микроРНК-олигонуклеотидов является их выраженное синергическое действие с традиционными химиотерапевтическими агентами. Так, установлено, что использование LNA-ASO

к микроРНК-21 совместно с сунитинибом обеспечивало двукратное усиление противоопухолевого эффекта при терапии глиобластомы *in vivo* [67]. Применение метокси-анти-микроРНК-21 олигонуклеотида на клетках рака поджелудочной железы приводило к снижению значения показателя цитотоксической активности (IC50) для препарата гемцитабин в 6 раз; на модели *in vivo* продемонстрирован в 4 раза более выраженный противоопухолевый эффект и полное блокирование метастазирования в печени по сравнению с терапией олигонуклеотидом или гемцитабином по отдельности [68]. Вероятно, применение анти-микроРНК ASO в таких комбинациях способствует подавлению белков, связанных с формированием резистентности клеток к цитостатическим препаратам, и усиливает эффект последующей химиотерапии.

В настоящее время в клинических исследованиях (КИ) находятся несколько кандидатных противоопухолевых препаратов на основе микроРНК-направленных ASO. Так, в 2022 г. успешно завершена 1 фаза КИ препарата на основе PS и LNA-модифицированного ASO к онкогенной микроРНК-221 для терапии множественной миеломы [69]². В результате проведенных исследований с участием 17 пациентов с прогрессирующими солидными формами неоплазий было показано, что инъекции разработанного препарата LNA-i-miR-221 не вызывают неспецифических токсических эффектов 3–4 степени в дозовом диапазоне 0,5–5,0 мг/кг [69]. Исследование противоопухолевого эффекта LNA-i-miR-221 показало, что у большей части пациентов наблюдается стабильное течение заболевания, а для одного из пациентов был установлен частичный ответ на лечение, выражающийся в увеличении чувствительности к последующей радиотерапии [69]. К настоящему моменту закончена 2 фаза КИ препарата LNA-ASO к микроРНК-155 (miRagen Therapeutics, Inc, США) для терапии лимфосаркомы и Т-клеточной лимфомы³. В результате проведенных исследований лишь у двух пациентов из 19 наблюдались серьезные побочные эффекты, проявившиеся в виде кожных инфекций. Успешно завершена 1 фаза КИ препарата RG-012 (Regulus Therapeutics, США), представляющего собой ASO к микроРНК-21 для терапии патологии почек⁴.

Основную проблему, связанную с терапевтическим использованием микроРНК-направленных олигонуклеотидов, представляет оптимизация способа доставки и режима их введения. В большинстве случаев доставка

микроРНК-направленных ASO происходит с использованием различных доставляющих агентов, включая наночастицы, таргетные лиганды, дендримеры, катионные липосомы, а время их действия определяется скоростью деградации в физиологической среде. Для поддержания стабильного противоопухолевого эффекта требуется многократное введение препаратов. В связи с этим для каждого типа опухолевого заболевания, отличающегося по степени агрессивности и скорости деления клеток, необходимо определять концентрационные и кинетические параметры накопления анти-микроРНК олигонуклеотидов для выбора дозы и периодичности введения препаратов.

МиРНКазы

МикроРНК-направленные искусственные рибонуклеазы (иРНКазы) объединяют в единой структуре олигонуклеотидную компоненту, обеспечивающую связывание с определенной микроРНК-мишенью, и каталитический домен, который может быть представлен коротким пептидом, производными имидазола или аминов, способный катализировать расщепление РНК-субстрата (рис. 2D, 3, табл. 1). Структура каталитического домена определяет механизм действия разработанных иРНКаз. Если каталитическая группа представлена производными имидазола или остатками гистидина, деградация микроРНК происходит по механизму кислотно-основного катализа подобно ферменту РНКазы А [70, 71]. Если в качестве расщепляющей группы выступает пептид на основе остатков аргинина, то расщепление мишени осуществляется посредством реакции трансэтерификации [72].

Конъюгаты, работающие по механизму кислотно-основного катализа, в настоящий момент исследованы только *in vitro*. Так, установлено, что конъюгаты линейных PNA-олигонуклеотидов с трис-(2-аминобензимидазолом) обеспечивали расщепление микроРНК-20a на 85% через 60 ч [71]. иРНКазы на основе линейных PNA-олигонуклеотидов и каталитических групп в виде короткого трипептида [His(Gly)₂] или диэтилен-триамина (ДЭТА) приводили к расщеплению синтетической микроРНК-1323 на 47,5 или 90% через 24 ч соответственно [70]. Активность данных конструкций *in vivo* пока не изучена.

В совместном исследовании ИХБФМ СО РАН и Университета Манчестера были разработаны и изучены конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов и каталитического пептида

² <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04811898?term=NCT04811898&rank=1>

³ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03713320?term=NCT03713320&rank=1>

⁴ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03373786?term=NCT03373786&rank=1>

из чередующихся остатков аргинина, лейцина и глицина $[(\text{LeuArg})_2\text{Gly}]_n$, которые получили название «миРНКазы» (рис. 3). В настоящее время авторами данной статьи разработано несколько структурных вариантов миРНКаз, включая линейные, шпилечные, двойные и петлеобразующие миРНКазы, направленные к онкогенным микроРНК-21, микроРНК-17, микроРНК-18а и микроРНК-155, которые отличаются по структуре олигонуклеотидного домена (рис. 3) [72–74]. Линейные конъюгаты содержали в качестве адресной компоненты 16-звенный олигонуклеотид, полностью комплементарный 5'-концу микроРНК (рис. 3А) [72]. Шпилечные миРНКазы включали олигонуклеотид, содержащий обогащенную пурином шпильку и 14-звенную последовательность, связывающую 5'-конец микроРНК (рис. 3В) [72]. Двойные конъюгаты содержали два олигонуклеотидных плеча длиной 8–10 н., комплементарных 5'- и 3'-области мишени, соединенные между собой гибким линкером, и при связывании с микроРНК формировали центральный свободный гэп в последовательности мишени (рис. 3С) [73]. Структура петлеобразующих миРНКаз включала линейный олигонуклеотид, комплементарный полноразмерной микроРНК, формирующий при связывании с ней тринуклеотидную петлю в ее центральной области (рис. 3Д) [74].

Исследование рибонуклеазных свойств разработанных миРНКаз показало, что эффективность расщепления микроРНК увеличивается в ряду: двойные < петлеобразующие < линейные и шпилечные миРНКазы [72–74]. Среди разработанных миРНКаз наибольшую каталитическую активность продемонстрировали шпилечные аналоги. Дальнейшее исследование их биологических свойств выявило их значительный потенциал в качестве противоопухолевых агентов: для этих миРНКаз наблюдалось двукратное уменьшение уровня целевой микроРНК в клетках, ассоциированное с двукратным снижением пролиферации, трехкратным подавлением инвазии, а также увеличением в 2 раза доли клеток в состоянии апоптоза [75]. Значительным результатом применения шпилечных миРНКаз является 17-кратное подавление роста солидной формы лимфосаркомы RLS40 *in vivo*, достигнутое после трансфекции опухолевых клеток миРНКазой *ex vivo* [75].

Основным преимуществом разработанных миРНКаз является наличие собственной высокой рибонуклеазной активности — они эффективно расщепляют микроРНК, находящуюся в избытке по отношению к миРНКазе, что было продемонстрировано в эксперименте с расщеплением 10-кратного избытка РНК субстрата [75].

Таким образом, миРНКазы работают в истинно каталитическом режиме. Это свойство, характерное для природных рибонуклеаз, подразумевает способность ферментов после совершения акта расщепления микроРНК диссоциировать из комплекса, связываться с новой молекулой субстрата и осуществлять ее расщепление. Стоит отметить, что способность к реакции многооборотного расщепления субстрата труднодостижима при конструировании искусственных ферментов. В настоящее время каталитический режим работы был установлен только для некоторых металл-зависимых иРНКаз и для миРНКаз.

Исключительной характеристикой всех разработанных миРНКаз является их синергическое действие с РНКазой Н. Поскольку олигонуклеотидный домен сконструированных конъюгатов представляет собой ДНК олигонуклеотид, формирование гетеродуплексов миРНКаз с микроРНК-мишенью обеспечивает рекрутинг РНКазы Н и дополнительное расщепление микроРНК в таком комплексе, причем сайты расщепления РНКазой Н и миРНКазой не перекрываются, а расщепление микроРНК происходит по всем функциональным детерминантам [74]. При совместном действии миРНКазы и РНКазы Н скорость и эффективность деградации микроРНК возрастает в 15–20 раз по сравнению с действием только миРНКаз или РНКазы Н (рис. 3Е) [73, 75].

Дополнительным преимуществом сконструированных миРНКаз является их относительно высокая стабильность к действию нуклеаз. На примере шпилечных аналогов установлено, что сочетание обогащенной пурином высокостабильной шпильки на 3'-конце и каталитического пептида на 5'-конце обеспечивает существенное увеличение периода полужизни конъюгатов до 48 ч и более по сравнению с линейным олигонуклеотидом, для которого 50% расщепление наблюдается уже через 1 ч [75].

Таким образом, сочетание высокой каталитической активности, синергического действия с РНКазой Н и высокой нуклеазоустойчивости является основой для достижения значительной продолжительности биологических эффектов миРНКаз в клетках. Показано, что однократное введение миРНКаз мышам с лимфосаркомой обеспечивало существенный противоопухолевый эффект в течение 20 сут [75].

Нерешенные задачи в области разработки микроРНК-направленных олигонуклеотидных ингибиторов

Несмотря на впечатляющие результаты, достигнутые в области разработки микроРНК-направленных олигонуклеотидных конструкций,

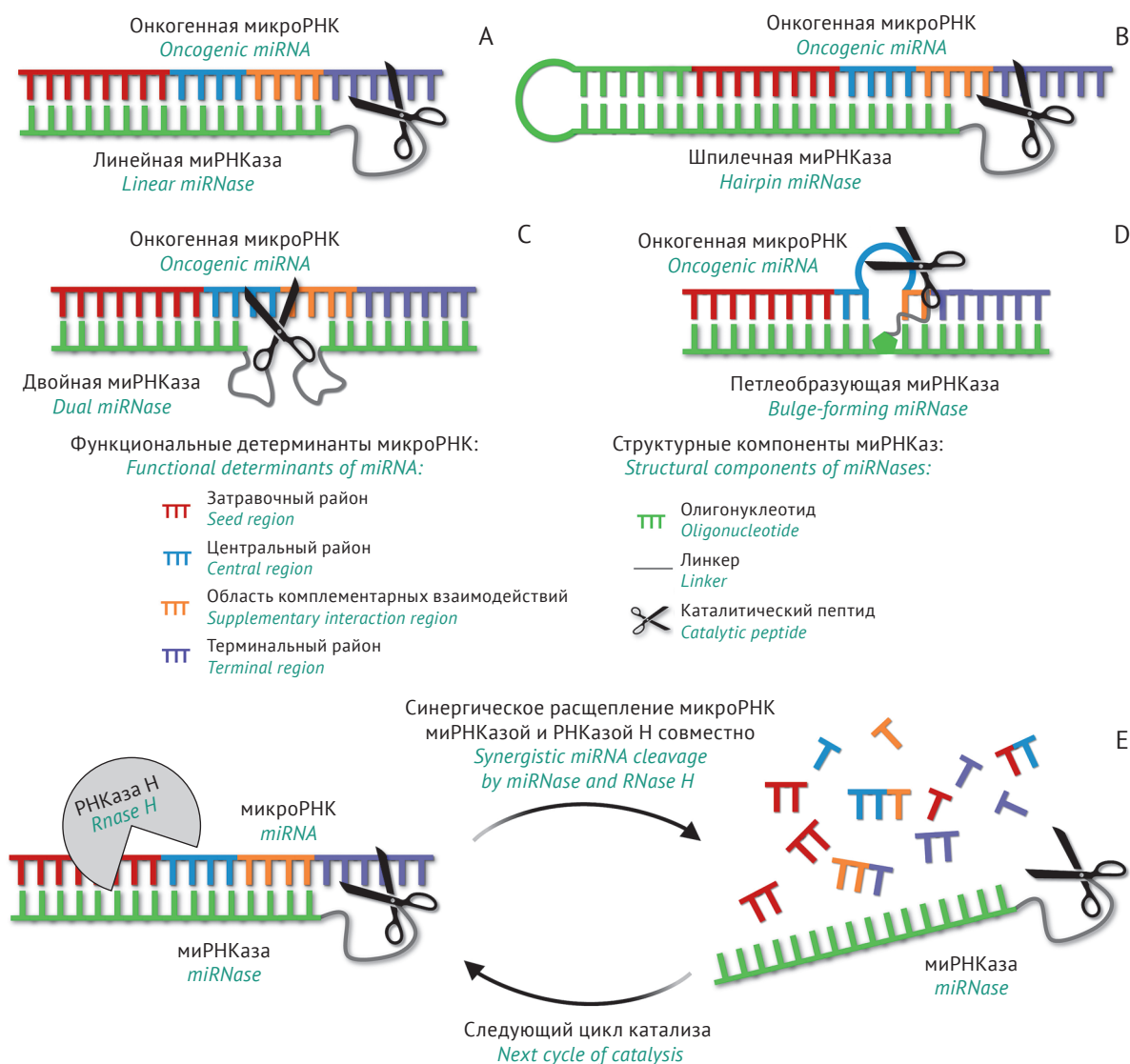


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 3. МикроРНК-направленные искусственные РНКазы (миРНКазы). Структурные варианты миРНКаз, сконструированных на основе микроРНК-связывающих олигонуклеотидов и каталитического пептида $[(\text{LeuArg})_2\text{Gly}]_2$: А — линейная миРНКаз, В — шпильчатая миРНКаз, С — двойная миРНКаз, Д — петлеобразующая миРНКаз. Е — упрощенная схема синергического расщепления микроРНК под действием миРНКазы и РНКазы Н совместно.

Fig. 3. miRNA-targeted artificial RNases (miRNases). Structural variants of miRNases constructed on the basis of miRNA-binding oligonucleotides and the catalytic peptide $[(\text{LeuArg})_2\text{Gly}]_2$: A — linear miRNase, B — hairpin miRNase, C — dual miRNase, D — bulge-forming miRNase. E — simplified representation of synergistic miRNA cleavage by miRNase and RNase H (E).

существуют не решенные на данный момент задачи. Одним из таких вопросов является их таргетная доставка в опухолевые клетки, которая позволяет снизить и непродуктивное расходование препарата, и вероятность возникновения нежелательных побочных эффектов.

Кроме того, остается открытым вопрос специфичности действия олигонуклеотидных агентов. В некоторых случаях олигонуклеотидные конструкции способны связываться неспецифично как с нецелевыми микроРНК (в частности, принадлежащими к одному семейству и имеющими высокое сходство последовательностей),

так и с другими РНК в клетках, в связи с чем требуется дополнительная оптимизация структуры микроРНК-направленных препаратов.

В целом перспективность разработки микроРНК-ингибиторов подтверждается результатами доклинических и клинических исследований, наглядно демонстрирующими, что использование данных препаратов позволяет одновременно регулировать уровень многих белков, инициировать глобальные перестройки в генных сетях и комплексно воздействовать на процессы канцерогенеза. Таргетное выключение микроРНК оказывает высокий

противоопухолевый и антиметастатический эффект, а в случае комбинированной терапии обеспечивает увеличение чувствительности к другим противоопухолевым препаратам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание микроРНК-направленных олигонуклеотидных конструкций является перспективным и быстро развивающимся направлением молекулярной онкологии. Разработанный к настоящему моменту спектр препаратов позволяет как расширить арсенал молекулярно-биологических методов, так и обеспечить в будущем высокоселективную терапию онкологических заболеваний. Выбор микроРНК-направленной конструкции может быть осуществлен в соответствии с ключевыми преимуществами того или иного типа препаратов для решения конкретной исследовательской задачи, в частности:

- микроРНК-маскирующие олигонуклеотиды могут быть использованы для выявления роли определенной пары микроРНК-мРНК в процессах канцерогенеза, что не только способствует расширению фундаментальных знаний о патогенезе злокачественных заболеваний, но и открывает возможности для разработки новых лекарственных препаратов, направленных как к микроРНК, так и к мРНК или белковым формам идентифицированных мишеней;
- микроРНК-направленные системы геномного редактирования CRISPR/Cas ввиду высокой

селективности могут применяться для «выключения» одной определенной онкогенной микроРНК из целого микроРНК-семейства, что может найти применение в случае, если ингибирование других микроРНК-мишеней нежелательно;

- микроРНК-спонжи перспективны для создания средств комплексной терапии, подразумевающей одновременное подавление нескольких онкогенных микроРНК в клетках;
- микроРНК-направленные антисмысловые олигонуклеотиды обладают высоким противоопухолевым потенциалом и могут быть использованы как в рамках монотерапии, так и в составе комбинаций с химиопрепаратами или другими ASO, что может приводить к синергическому усилению ингибирующих эффектов;
- микроРНКазы перспективны в применении в качестве монопрепаратов, используемых в низких концентрациях, ввиду наличия собственной каталитической активности и способности работать в режиме многооборотной реакции, действуя синергически с внутриклеточными ферментативными системами.

Таким образом, применение микроРНК-направленных олигонуклеотидных конструкций представляет собой новую стратегию в борьбе с онкологическими заболеваниями, предоставляя возможность как создания новых протоколов терапии злокачественных новообразований, так и улучшения уже существующих схем лечения.

Литература/References

1. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853–8. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1064921>
2. Kloosterman WP, Plasterk RHA. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 2006;11(4):441–50. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2006.09.009>
3. Ilieva M, Panella R, Uchida S. MicroRNAs in cancer and cardiovascular disease. *Cells*. 2022;11(22):3551. <https://doi.org/10.3390/cells11223551>
4. Tabasi H, Mollazadeh S, Fazeli E, Abnub K, Taghdisi SM, Ramezani M, et al. Transitional insight into the RNA-based oligonucleotides in cancer treatment. *Appl Biochem Biotechnol*. 2024;196(3):1685–711. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04597-5>
5. Raue R, Frank AC, Syed SN, Brüne B. Therapeutic targeting of microRNAs in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2210. <https://doi.org/10.3390/ijms22042210>
6. Reda El Sayed S, Cristante J, Guyon L, Denis J, Chabre O, Cherradi N. MicroRNA therapeutics in cancer: current advances and challenges. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11):2680. <https://doi.org/10.3390/cancers13112680>
7. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(7):3353–64. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ097>
8. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92–105. <https://doi.org/10.1101/GR.082701.108>
9. Dexheimer PJ, Cochella L. MicroRNAs: from mechanism to organism. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:409. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2020.00409>
10. Bofill-De Ros X, Vang Ørom UA. Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol*. 2024;21(1):1–8. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2288741>
11. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):5–20. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0059-1>
12. Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
13. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):21–37. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0045-7>
14. Nakanishi K. Anatomy of four human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(12):6618–38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac519>
15. Chen CYA, Shyu A. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011;2(2):167–83. <https://doi.org/10.1002/WRNA.40>
16. Diener C, Keller A, Meese E. The miRNA-target interactions: an underestimated intricacy. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(4):1544–57. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD1142>
17. Hu X, Yin G, Zhang Y, Zhu L, Huang H, Lv K. Recent advances in the functional explorations of nuclear microRNAs. *Front Immunol*. 2023;14:1097491. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1097491>
18. Liu H, Lei C, He Q, Pan Z, Xiao D, Tao Y. Nuclear functions of mammalian microRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):64. <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0765-5>

19. Failer T, Amponsah-Offeh M, Neuwirth A, Kourtzelis I, Subramanian P, Mirtschink P, et al. Developmental endothelial locus-1 protects from hypertension-induced cardiovascular remodeling via immunomodulation. *J Clin Invest*. 2022;132(6):126155. <https://doi.org/10.1172/JCI126155>
20. Angelucci F, Cechova K, Valis M, Kuca K, Zhang B, Hort J. MicroRNAs in Alzheimer's disease: diagnostic markers or therapeutic agents? *Front Pharmacol*. 2019;10:665. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00665>
21. Li S, Lei Z, Sun T. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review. *Cell Biol Toxicol*. 2023;39(1):53–83. <https://doi.org/10.1007/s10565-022-09761-x>
22. Siasos G, Bletsas E, Stampouloulou PK, Oikonomou E, Tsigkou V, Paschou SA, et al. MicroRNAs in cardiovascular disease. *Hell J Cardiol*. 2020;61(3):165–73. <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2020.03.003>
23. Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004. <https://doi.org/10.1038/SIGTRAN.2015.4>
24. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302(1):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>
25. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Res*. 2016;76(13):3666–70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>
26. Mollaei H, Safarizadeh R, Rostami Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):12369–84. <https://doi.org/10.1002/JCP.28058>
27. Ragan C, Zuker M, Ragan MA. Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations. *PLoS Comput Biol*. 2011;7(2):1001090. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001090>
28. Kingston ER, Bartel DP. Global analyses of the dynamics of mammalian microRNA metabolism. *Genome Res*. 2019;29(11):1777–90. <https://doi.org/10.1101/gr.251421.119>
29. Zlotorynski E. Insights into the kinetics of microRNA biogenesis and turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(9):511. <https://doi.org/10.1038/S41580-019-0164-9>
30. Sultan S, Rozzi A, Gasparello J, Manicardi A, Corradini R, Papi C, et al. A peptide nucleic acid (PNA) masking the miR-145-5p binding site of the 3'UTR of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA enhances CFTR expression in Calu-3 cells. *Molecules*. 2020;25(7):1677. <https://doi.org/10.3390/molecules25071677>
31. Colangelo T, Polcaro G, Ziccardi P, Muccillo L, Galgani M, Pucci B, et al. The miR-27a-calreticulin axis affects drug-induced immunogenic cell death in human colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(2):2108. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.29>
32. Zhang T, Hu Y, Ju J, Hou L, Li Z, Xiao D, et al. Downregulation of miR-522 suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by directly targeting DENN/MADD domain containing 2D. *Sci Rep*. 2016;6(1):19346. <https://doi.org/10.1038/srep19346>
33. Bridge G, Monteiro R, Henderson S, Emuss V, Lagos D, Georgopoulou D, et al. The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis. *Blood*. 2012;120(25):5063–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-423004>
34. Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Ramkissoon SH, Ligon KL, Greco SJ, Rameshwar P. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level. *Oncotarget*. 2015;6(2):1190–201. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2778>
35. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
36. Hussien BM, Rasul MF, Abdullah SR, Hidayat HJ, Faraj GSH, Ali FA, et al. Targeting miRNA by CRISPR/Cas in cancer: advantages and challenges. *Mil Med Res*. 2023;10(1):32. <https://doi.org/10.1186/S40779-023-00468-6>
37. Chang H, Yi B, Ma R, Zhang X, Zhao H, Xi Y. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep*. 2016;6(1):22312. <https://doi.org/10.1038/srep22312>
38. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med*. 2015;21(3):256–62. <https://doi.org/10.1038/NM.3802>
39. Jiang Q, Meng X, Meng L, Chang N, Xiong J, Cao H, et al. Small indels induced by CRISPR/Cas9 in the 5' region of microRNA lead to its depletion and Drosha processing retardance. *RNA Biol*. 2014;11(10):1243–9. <https://doi.org/10.1080/15476286.2014.996067>
40. Kurata JS, Lin RJ. MicroRNA-focused CRISPR-Cas9 library screen reveals fitness-associated miRNAs. *RNA*. 2018;24(7):966–81. <https://doi.org/10.1261/rna.066282.118>
41. Wu Q, Michaels YS, Fulga TA. Interrogation of functional miRNA-target interactions by CRISPR/Cas9 genome engineering. *Methods Mol Biol*. 2023;2630:243–64. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2982-6_16
42. Aquino-Jarquín G. Emerging role of CRISPR/Cas9 technology for microRNAs editing in cancer research. *Cancer Res*. 2017;77(24):6812–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2142>
43. Nieland L, van Solinge TS, Cheah PS, Morsett LM, El Khoury J, Rissman JI, et al. CRISPR-Cas knockout of miR21 reduces glioma growth. *Mol Ther Oncolytics*. 2022;25:121–36. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.04.001>
44. Ahi Y, Bangari D, Mittal S. Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies. *Curr Gene Ther*. 2011;11(4):307–20. <https://doi.org/10.2174/156652311796150372>
45. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007;4(9):721–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth1079>
46. Jie J, Liu D, Wang Y, Wu Q, Wu T, Fang R. Generation of MiRNA sponge constructs targeting multiple MiRNAs. *J Clin Lab Anal*. 2022;36(7):24527. <https://doi.org/10.1002/jcla.24527>
47. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305(5689):1437–41. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
48. Kluiver J, Slezak-Prochazka I, Smigielska-Czepiel K, Halsema N, Kroesen BJ, van den Berg A. Generation of miRNA sponge constructs. *Methods*. 2012;58(2):113–7. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.07.019>
49. Rama AR, Quiñonero F, Mesas C, Melguizo C, Prados J. Synthetic circular miR-21 sponge as tool for lung cancer treatment. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):2963. <https://doi.org/10.3390/ijms23062963>
50. Gao S, Tian H, Guo Y, Li Y, Guo Z, Zhu X, et al. miRNA oligonucleotide and sponge for miRNA-21 inhibition mediated by PEI-PLL in breast cancer therapy. *Acta Biomater*. 2015;25:184–193. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.020>
51. Liang AL, Zhang TT, Zhou N, Wu CY, Lin MH, Liu YJ. miRNA-10b sponge: an anti-breast cancer study *in vitro*. *Oncol Rep*. 2016;35(4):1950–8. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4596>
52. Mignacca L, Saint-Germain E, Benoit A, Bourdeau V, Moro A, Ferbeyre G. Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers. *Cytokine*. 2016;82:80–6. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.015>
53. Liu S, Sun X, Wang M, Hou Y, Zhan Y, Jiang Y, et al. A microRNA 221- and 222-mediated feedback loop maintains constitutive activation of NFκB and STAT3 in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 2014;147(4):847–59. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.006>
54. Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, Wang Z, et al. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(3):24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1053>
55. Mukherji S, Ebert MS, Zheng GXY, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet*. 2011;43(9):854–9. <https://doi.org/10.1038/ng.905>

56. Alkan AH, Akgül B. Endogenous miRNA sponges. *Methods Mol Biol.* 2022;2257:91–104.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_5
57. Olesen MT, Kristensen L. Circular RNAs as microRNA sponges: evidence and controversies. *Essays Biochem.* 2021;65(4):685–96.
<https://doi.org/10.1042/EBC20200060>
58. Meng L, Liu C, Lü J, Zhao Q, Deng S, Wang G, et al. Small RNA zippers lock miRNA molecules and block miRNA function in mammalian cells. *Nat Commun.* 2017;8:13964.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13964>
59. Zhang C, Kang C, You Y, Pu P, Yang W, Zhao P, et al. Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27Kip1 *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol.* 2009;34(6):1653–60.
<https://doi.org/10.3892/ijo.00000296>
60. Quan J, Jin L, Pan X, He T, Lai Y, Chen P, et al. Oncogenic miR-23a-5p is associated with cellular function in RCC. *Mol Med Rep.* 2017;16(2):2309–17.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6829>
61. Zhang R, Li F, Wang W, Wang X, Li S, Liu J. The effect of antisense inhibitor of miRNA 106b–25 on the proliferation, invasion, migration, and apoptosis of gastric cancer cell. *Tumor Biol.* 2016;37(8):10507–15.
<https://doi.org/10.1007/s13277-016-4937-x>
62. Teplyuk NM, Uhlmann EJ, Gabriely G, Volfovsky N, Wang Y, Teng J, et al. Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. *EMBO Mol Med.* 2016;8(3):268–87.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201505495>
63. Huynh C, Segura MF, Gaziel-Sovran A, Menendez S, Darvishian F, Chiriboga L, et al. Efficient *in vivo* microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene.* 2011;30(12):1481–8.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.523>
64. Patutina OA, Gaponova (Miroshnichenko) SK, Sen'kova AV, Savin IA, Gladkikh DV, Burakova EA, et al. Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced *in vivo* therapeutic potency. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117(51):32370–9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2016158117>
65. Miroshnichenko SK, Patutina OA, Burakova EA, Chelobanov BP, Fokina AA, Vlassov VV, et al. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(4):1229–34.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>
66. Gaponova S, Patutina O, Sen'kova A, Burakova E, Savin I, Markov A, et al. Single shot vs. cocktail: a comparison of mono- and combinative application of miRNA-targeted mesyl oligonucleotides for efficient antitumor therapy. *Cancers (Basel).* 2022;14(18):4396.
<https://doi.org/10.3390/cancers14184396>
67. Costa PM, Cardoso AL, Custódia C, Cunha P, Pereira de Almeida L, Pedroso de Lima MC. MiRNA-21 silencing mediated by tumor-targeted nanoparticles combined with sunitinib: a new multimodal gene therapy approach for glioblastoma. *J Control Release.* 2015;207:31–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.002>
68. Li Y, Chen Y, Li J, Zhang Z, Huang C, Lian G, et al. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy. *Cancer Sci.* 2017;108(7):1493–503.
<https://doi.org/10.1111/cas.13267>
69. Tassone P, Di Martino MT, Arbitrio M, Fiorillo L, Staropoli N, Ciliberto D, et al. Safety and activity of the first-in-class locked nucleic acid (LNA) miR-221 selective inhibitor in refractory advanced cancer patients: a first-in-human, phase 1, open-label, dose-escalation study. *J Hematol Oncol.* 2023;16(1):68.
<https://doi.org/10.1186/s13045-023-01468-8>
70. Gaglione M, Milano G, Chambery A, Moggio L, Romanelli A, Messere A. PNA-based artificial nucleases as antisense and anti-miRNA oligonucleotide agents. *Mol Biosyst.* 2011;7(8):2490–9.
<https://doi.org/10.1039/c1mb05131h>
71. Dogandzhiyski P, Ghidini A, Danneberg F, Strömberg R, Göbel MW. Studies on tris(2-aminobenzimidazole)-PNA based artificial nucleases: a comparison of two analytical techniques. *Bioconjug Chem.* 2015;26(12):2514–9.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00534>
72. Patutina OA, Bichenkova EV, Miroshnichenko SK, Mironova NL, Trivoluzzi LT, Burusco KK, et al. miRNases: novel peptide-oligonucleotide bioconjugates that silence miR-21 in lymphosarcoma cells. *Biomaterials.* 2017;122:163–78.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.018>
73. Patutina O, Chiglintseva D, Bichenkova E, Gaponova S, Mironova N, Vlassov V, et al. Dual miRNases for triple incision of miRNA target: design concept and catalytic performance. *Molecules.* 2020;25(10):2459.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25102459>
74. Patutina O, Chiglintseva D, Amirloo B, Clarke D, Gaponova S, Vlassov V, et al. Bulge-forming miRNases cleave oncogenic miRNAs at the central loop region in a sequence-specific manner. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6562.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126562>
75. Patutina OA, Miroshnichenko SK, Mironova NL, Sen'kova AV, Bichenkova EV, Clarke DJ, et al. Catalytic knockdown of MIR-21 by artificial ribonuclease: biological performance in tumor model. *Front Pharmacol.* 2019;10:879.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00879>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.К. Мирошниченко и О.А. Патутина** — работа с источниками литературы, написание текста рукописи; **М.А. Зенкова** — концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.K. Miroshnichenko and O.A. Patutina** worked with literature sources and drafted the manuscripts. **M.A. Zenkova** conceptualized the study, edited the manuscript, and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Мирошниченко Светлана Константиновна, канд. биол. наук / **Svetlana K. Miroshnichenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7767-7712>

Патутина Ольга Александровна, канд. биол. наук / **Olga A. Patutina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1460-4345>

Зенкова Марина Аркадьевна, д-р. биол. наук, проф., член-корр. РАН / **Marina A. Zenkova**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corr. Member of RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4044-1049>

Поступила 10.04.2024

После доработки 03.06.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 10 April 2024

Revised 3 June 2024

Accepted 21 June 2024



Применение терапевтических нуклеиновых кислот и интерференции РНК для создания средств персонализированной медицины

И.П. Шиловский^{1,✉}, Г.Б. Пасихов¹, В.В. Смирнов^{1,2}, И.А. Кофиади¹,
М.В. Попова^{1,3}, П.А. Струева^{1,4}, М.Р. Хаитов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Каширское шоссе, д. 24, Москва, 115522, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), ул. Трубецкая, д. 8 стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Островитянова, д. 1, Москва, 117513, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», ул. Миклухо-Маклая, д. 6, Москва, 117198, Российская Федерация

✉ Шиловский Игорь Петрович; igorshilovski@gmail.com; ip.shilovsky@nrcii.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Малые интерферирующие РНК (миРНК) относятся к типу терапевтических нуклеиновых кислот, направленных на подавление экспрессии патогенетически значимых генов посредством механизма интерференции РНК. Однако потенциал препаратов на основе миРНК и их клиническое применение остаются ограниченными, что связано с проблемами биодоступности и иммуногенности миРНК, а также несовершенством систем доставки.

ЦЕЛЬ. Обобщить основные достижения в области создания лекарственных препаратов на основе миРНК, в том числе систем их доставки, рассмотреть итоги клинических исследований и обозначить перспективы разработки препаратов данной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ. Рассмотрены молекулярные основы РНК-интерференции, особенности разработки миРНК и методы их эффективной доставки. Представлены сведения о системах доставки нуклеиновых кислот до клеток-мишеней. Наиболее перспективны невирусные системы доставки: липосомы, экзосомы, наночастицы, полимеры, клеточно-проникающие пептиды и системы с лигандом GalNAc. К основным преимуществам перечисленных систем доставки относятся простота получения комплексов с нуклеиновыми кислотами, возможность модификации и функционализации систем доставки, благоприятный профиль безопасности, способность прохождения биологических барьеров, тропизм к тканям-мишеням. Обобщены результаты клинических исследований за последние несколько лет миРНК-препаратов для лечения метаболических нарушений, инфекционных, онкологических и наследственных заболеваний, патологий органов зрения, почек, печени. Особое внимание уделено препаратам на основе миРНК, которые проходят клинические исследования (более 10 препаратов), а также одобренным для клинического применения (6 препаратов), в том числе первому зарегистрированному российскому препарату на основе миРНК — МИР 19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Препараты миРНК — перспективные средства персонализированной медицины, демонстрирующие возможности для терапии широкого спектра различных патологий. Дальнейшие исследования препаратов данной группы должны быть направлены на совершенствование технологии получения молекул миРНК — для увеличения биодоступности и периода полувыведения — и систем их доставки в целевые клетки — для снижения риска токсичности и повышения эффективности.

Ключевые слова: терапевтические нуклеиновые кислоты; интерференция РНК; малые интерферирующие РНК; миРНК; персонализированная медицина; системы доставки РНК; GalNAc; клеточно-проникающие пептиды; клинические исследования; безопасность препаратов миРНК; эффективность препаратов миРНК

Для цитирования: Шиловский И.П., Пасихов Г.Б., Смирнов В.В., Кофиади И.А., Попова М.В., Струева П.А., Хаитов М.Р. Применение терапевтических нуклеиновых кислот и интерференции РНК для создания средств персонализированной медицины. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):157–171. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-157-171>

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-45-10031.

Потенциальный конфликт интересов. М.Р. Хаитов — заместитель главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2021 г.). Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Application of therapeutic nucleic acids and RNA interference to create products for personalised medicine

Igor P. Shilovskiy^{1,✉}, George B. Pasikhov¹, Valery V. Smirnov^{1,2}, Ilya A. Kofiadi¹, Maiia V. Popova^{1,3}, Polina A. Strueva^{1,4}, Musa R. Khaitov^{1,3}

¹ National Research Center—Institute of Immunology, 24 Kashirskoe Hwy, Moscow 115522, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanov St., Moscow 117513, Russian Federation

⁴ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, 6 Miklukho-Maklay St., Moscow 117198, Russian Federation

✉ Igor P. Shilovskiy; igorshilovski@gmail.com; ip.shilovsky@nrcii.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Small interfering RNAs (siRNAs) are among the most promising types of therapeutic nucleic acids aiming at the inhibition of pathogenetically relevant gene expression through the RNA interference mechanism. However, the limited bioavailability and immunogenicity of siRNAs and imperfect delivery systems hinder the clinical potential and applicability of siRNA medicinal products.

AIM. This study aimed to summarise recent advances in the development of siRNA medicinal products and the corresponding delivery systems, review clinical trial results, and outline future development prospects for these medicinal products.

DISCUSSION. This article covers the molecular mechanisms underlying RNA interference, the considerations for siRNA development, and the techniques for effective siRNA delivery. The article dwells upon various systems for nucleic acid delivery to targeted cells. The most promising delivery systems are non-viral systems, including liposomes, exosomes, nanoparticles, polymers, cell-penetrating peptides, and GalNAc ligands. Their main advantages include their ease of complexation with nucleic acids, modification and functionalisation

potential, favourable safety profile, ability to cross biological barriers, and tropism to target tissues. The article summarises the information that has accumulated over the past few years in clinical trials of siRNA medicinal products for a range of conditions, including metabolic disorders, infections, and cancers, as well as hereditary, ophthalmic, renal, and hepatic diseases. Special attention is paid to siRNA medicinal products undergoing clinical trials (over 10 products) and approved for clinical use (6 products, including MIR 19, the first authorised Russian siRNA medicinal product).

CONCLUSION. Ultimately, siRNA medicinal products are a promising tool for personalised medicine, exhibiting therapeutic potential for a wide range of pathological conditions. Further studies of siRNA medicinal products should aim at improving siRNA production technology to increase their bioavailability and half-life period. In addition, these studies should aim at enhancing delivery systems for these products to mitigate toxicity risks and maximise efficacy.

Keywords: therapeutic nucleic acids; RNA interference; small interfering RNA; siRNA; personalised medicine; RNA delivery systems; GalNac; cell-penetrating peptides; clinical trials; safety of siRNA medicinal products; efficacy of siRNA medicinal products

For citation: Shilovskiy I.P., Pasikhov G.B., Smirnov V.V., Kofiadi I.A., Popova M.V., Strueva P.A., Khaitov M.R. Application of therapeutic nucleic acids and RNA interference to create products for personalised medicine. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):157–171. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-157-171>

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 23-45-10031).

Disclosure. M.R. Khaitov has been a Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия количество новых лекарственных препаратов, в состав которых в качестве фармацевтических субстанций входят нуклеиновые кислоты (НК), существенно выросло. Благодаря высокой специфичности, функциональному разнообразию и низкой токсичности терапевтические НК имеют значительные перспективы использования в медицине [1]. Терапевтические НК могут отличаться по структуре, стабильности в организме, механизму действия и др. Согласно экспертному мнению среди терапевтических НК наиболее перспективными являются молекулы малых интерферирующих РНК (миРНК) – двухцепочечные молекулы РНК размером 21–25 пар нуклеотидов (пн), способные специфично подавлять экспрессию генов по механизму интерференции РНК [2].

Существует множество заболеваний, которые на данный момент не поддаются лечению низкомолекулярными препаратами и моноклональными антителами, что обусловлено крайне затруднительным поиском биомишеней, по отношению к которым препарат обладал бы высокой активностью, сродством и специфичностью. В то же время любой интересующий ген может стать мишенью для миРНК – для этого необходимо выбрать только правильную нуклеотидную последовательность внутри целевой мРНК. Препараты миРНК могут оказаться эффективным средством для проведения персонализированной терапии,

к тому же они требуют существенно меньше времени на разработку.

Цель работы – обобщить основные достижения в области создания лекарственных препаратов на основе миРНК, в том числе систем их доставки, рассмотреть итоги клинических исследований и обозначить перспективы разработки препаратов данной группы.

Поиск публикаций по разработке и клиническим исследованиям препаратов на основе миРНК был выполнен по базам данных PubMed, eLibrary, clinicaltrials.gov за период 2009–2024 гг.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярный механизм интерференции РНК

Механизм интерференции РНК включает два этапа – этап инициации и эффекторный этап. На первом этапе основная роль принадлежит ферменту Dicer, который находится в цитоплазме и разрезает крупные молекулы двухцепочечной РНК на короткие фрагменты – миРНК. На втором этапе миРНК соединяются с белковыми факторами, образуя мультисубъединичный сайленсинговый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). В состав комплекса входит белок Ago, который расплетает двойную спираль миРНК, при этом направляющая (антисмысловая) цепь остается в комплексе и обеспечивает специфичность взаимодействия с мРНК-мишенью. После связывания

с целевой мРНК комплекс RISC осуществляет ее разрезание, а в дальнейшую деградацию вовлекаются экзонуклеазы клетки [1]. После разрезания мРНК целевого гена антисмысловая цепь миРНК в составе RISC может осуществлять деградацию новой копии мРНК и т.д. Благодаря такой цикличности одна молекула миРНК способна катализировать разрушение большого количества мРНК, что делает механизм интерференции очень эффективным в подавлении активности целевых генов [3].

Учитывая то, что интерференция РНК — это ферментативный процесс, молекулы миРНК являются более эффективными в сравнении с другими терапевтическими НК (антисмысловые олигонуклеотиды, аптамеры, ДНК-ловушки и др.), в механизме которых не задействованы ферменты [1]. Использование синтезированных миРНК (~21 пн) с заданной последовательностью позволяет избежать процессинга ферментом Dicer, в результате чего они сразу же включаются в комплекс RISC и осуществляют специфическое подавление экспрессии гена-мишени [1]. Благодаря относительной простоте и доступности прямого химического синтеза миРНК эту технологию активно используют для создания лекарственных препаратов нового поколения.

Двухцепочечные молекулы миРНК более устойчивы в биологических средах в сравнении с другими терапевтическими РНК-олигонуклеотидами, которые, как правило, представлены лишь одной цепью (рибозимы, EGS, U1-адапторы и мРНК). К тому же для увеличения их устойчивости и эффективности разработаны разные способы модификации нуклеотидов [1, 4].

Действие миРНК основано на полном сопряжении оснований с мРНК-мишенью, в то время как низкомолекулярные препараты и моноклональные антитела должны распознавать определенную пространственную конформацию белков-мишеней. Благодаря этому разработка препаратов миРНК занимает меньше времени и может оказаться весьма эффективной [5].

Способы доставки миРНК

Одно из главных препятствий, ограничивающих широкое применение терапевтических НК, включая миРНК, — это сложность доставки в целевые клетки. Известно, что миРНК самопроизвольно не проникают в цитоплазму клеток, поэтому для их доставки используют векторы (или носители). Вирусные средства доставки НК основаны на использовании ретровирусов, аденоассоциированных вирусов, аденовирусов и др. К невирусным векторам относятся липосомы,

экзосомы, наночастицы различной природы, катионные полимеры, пептиды и др. [1, 6]. В настоящее время наибольшее предпочтение среди разработок препаратов миРНК отдаются именно невирусным векторам.

Липосомы широко используются для доставки НК, в частности, миРНК. Наиболее часто применяют липосомы, состоящие из катионных и/или амфифильных липидов и холестерина. Широкое использование липосом в качестве векторов объясняется простотой образования комплексов с НК, высокой эффективностью доставки в клетки-мишени, а также возможностью функционализации их поверхности различными специфическими к целевым клеткам лигандами, что повышает тропизм к тканям. В настоящее время зарегистрировано не менее трех РНК-препаратов, содержащих липосомы в качестве системы доставки: BNT162b2 (Pfizer), мРНК-1273 (Moderna) и препарат миРНК патисиран (Alnylam Pharmaceuticals) [1, 7].

Экзосомы — везикулы липидного бислоя, секретирующиеся эукариотическими клетками, могут выступать в качестве потенциальных систем доставки. Они обладают более благоприятным в сравнении с липосомами профилем безопасности и могут проходить через биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер. В настоящее время несколько препаратов на основе экзосом проходят КИ, в том числе разработки компаний Codiak Biosciences и Evox Therapeutics [1, 8].

В качестве систем доставки препаратов считаются перспективными носители на основе наночастиц различной природы, например гибридные наночастицы, включающие в свой состав липиды, полимеры и пептиды [6], наночастицы золота [6], диоксида кремния и др. [1, 7].

Полимерные системы доставки имеют ряд характерных преимуществ, в том числе в сравнении с липосомами. Они менее иммуногенны и легко модифицируются, за счет чего формируются прогнозируемые физико-химические свойства итогового препарата, такие как общий заряд, молекулярная масса, гидрофильные/гидрофобные свойства, возможность биодеградации и стабильность. Это позволяет регулировать растворимость, тропность и в целом фармакокинетику лекарственного средства. Полиэтиленимин и его различные химические производные стали применяться как первые полимеры-носители НК [1].

Подходы, направленные на химическую модификацию НК, позволили повысить стабильность препаратов, а также конъюгировать миРНК с клеточно-специфическими лигандами.

Наиболее популярным лигандом для конъюгации мРНК является N-ацетил-D-галактозамин (GalNAc), производное сахара галактозы, которое связывается с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR) с высокой аффинностью и специфичностью. Эти рецепторы гиперэкспрессированы на поверхности гепатоцитов (около 500000 молекул на клетку), что может обеспечить высокий уровень проникновения НК в клетки-мишени даже при однократном введении комплекса GalNAc-мРНК. Конъюгаты GalNAc-мРНК характеризуются приемлемым профилем безопасности, высокой длительностью действия и возможностью оптимизации схемы введения за счет снижения числа инъекций. В настоящее время система GalNAc-мРНК часто используется для создания препаратов против патологий печени (гивосиран, лумасиран, инклизасиран, вутрисиран и недосиран) [1, 9].

В качестве перспективных систем доставки могут использоваться клеточно-проникающие пептиды (cell-penetrating peptides, CPP), как природные (мелиттин, кателицидин и пр.), так и синтетические. CPP имеют размер 5–30 аминокислот, при этом в их составе присутствует значительное количество основных аминокислот (аргинин и лизин), которые обеспечивают положительный заряд в водных растворах при физиологическом pH. Обычно CPP имеют амфипатичную структуру, в результате чего часть пептида обладает гидрофобными свойствами, а другая — гидрофильными. CPP способны проникать внутрь клетки-мишени, транспортируя в цитоплазму различные терапевтические молекулы, включая НК [10, 11].

Ранее авторами данной статьи был описан катионный дендримерный пептид LTP, богатый остатками аргинина и лизина [12], с помощью которого осуществляли доставку молекул мРНК, направленных против генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-4 и IL-13, в клетки респираторного тракта мышей с индуцированным аллергическим ринитом [13]. При помощи пептида LTP также доставляли молекулы мРНК, активные в отношении гена *Stat3*, вовлеченного в нейтрофильное воспаление дыхательных путей при бронхиальной астме [14]. Разветвленный (дендримерный) пептид KK-46 был использован в качестве носителя молекул мРНК, направленных против геномной РНК вируса SARS-CoV-2 [1, 15].

Таким образом, применение невирусных систем доставки мРНК (липосомы, экзосомы, наночастицы, полимеры, GalNAc, CPP) позволило использовать технологии интерференции РНК для создания препаратов нового поколения.

Препараты на основе мРНК в клинических исследованиях

В настоящее время на этапе клинических испытаний (КИ) находится значительное количество мРНК-содержащих препаратов (табл. 1), которые предназначены для лечения заболеваний, связанных с нарушением метаболизма, инфекционных, онкологических и наследственных заболеваний, а также патологий почек, печени, органов зрения, кожных покровов и др. [16].

Лечение заболеваний, связанных с нарушением метаболизма

Препарат цемдисиран (cemdisiran, ALN-CC5, Alnylam Pharmaceuticals) направлен на лечение патологий печени. Препарат представляет собой конъюгат GalNAc и мРНК, нацеленный на инактивацию белка комплемента 5 (C5) [16]. Цемдисиран предназначен для лечения редких угрожающих жизни комплемент-опосредованных заболеваний, к которым относятся пароксизмальная ночная гемоглобинурия, IgA-нефропатия, атипичный гемолитико-уремический синдром и генерализованная миастения гравис. Снижение уровня циркулирующего белка C5 подавляет активацию терминального пути комплемента, что предотвращает образование мембранного атакующего комплекса и высвобождение анафилатоксина C5a [16]. Ранние этапы КИ выявили быстрое и устойчивое подавление C5, сохраняющееся до 13 мес. после курса введения препарата [17]. При проведении КИ фазы II изучалось влияние препарата на уровень протеинурии у взрослых с IgA-нефропатией. Результаты исследования показали, что применение цемдисирана приводит к стабильному улучшению состояния пациентов по уровню протеинурии, а также хорошо переносится пациентами [18].

Препарат фитузиран (fitusiran, ALN-AT3SC, Alnylam Pharmaceuticals) предназначен для лечения гемофилии А и В. Представляет собой конъюгат GalNAc-мРНК, нацеленный на мРНК гена *SERPINC1* белка антитромбина [16]. Под влиянием препарата происходит уменьшение синтеза антитромбина и увеличивается уровень тромбина, что способствует предотвращению кровотечений, связанных с нарушениями коагуляции. В ходе КИ фаз I и II использование фитузирана приводило к значительному дозозависимому снижению уровня антитромбина [19]. В настоящее время продолжаются исследования фитузирана в рамках КИ фазы III. В ходе исследований показано обратимое воздействие препарата на уровень антитромбина и не выявлено образования антител к препарату (в отличие от других

Таблица 1. Препараты на основе миРНК на этапе клинических исследований
Table 1. siRNA medicinal products at the stage of clinical trials

Препарат <i>Medicinal product</i>	Разработчик/ Производитель <i>Developer/ Manufacturer</i>	Мишень <i>Target</i>	Заболевание <i>Indication</i>	Фаза клинических исследований <i>Clinical trial phase</i>
Цемдисиран <i>Cemdisiran</i> (ALN-CC5)	Alnylam Pharmaceuticals	Белок комплемента 5 <i>Complement compo- nent 5</i>	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия; нефропатия иммуноглобу- лина А; атипичный гемоли- тико-уремический синдром; генерализованная миасте- ния гравис <i>Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria; immunoglobulin A nephropathy; atypical haemolytic uraemic syndrome; generalised myasthenia gravis</i>	Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT05744921) Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT05070858)
Фитусиран <i>Fitusiran</i> (ALN-AT3SC)	Alnylam Pharmaceuticals	Антитромбин <i>Antithrombin</i>	Гемофилия А и В <i>Haemophilia A and B</i>	Фаза II/III / <i>Phase II/III</i> (NCT03974113 ATLAS-PEDS) Фаза I / <i>Phase I</i> (NCT06145373) Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT03754790 ATLAS-OLE) Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT05662319 ATLAS-NEO)
Ксалнезиран <i>Xalnesiran</i> (RG6346)	Dicerna Pharmaceuticals	Поверхностный антиген вируса гепатита В <i>Hepatitis B virus surface antigen</i>	Вирусный гепатит В <i>Viral hepatitis B</i>	Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT04225715)
ALN-RSV01	Alnylam Pharmaceuticals	N-белок респираторно- синцитиального вируса <i>Respiratory syncytial virus nucleoprotein</i>	Респираторно- синцитиальная вирусная инфекция <i>Respiratory syncytial virus infection</i>	Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT01065935): завершена / <i>completed</i>
NU-0129	Northwestern University	Белок Bcl2L12 <i>Bcl2L12 protein</i>	Глиобластома <i>Glioblastoma</i>	Фаза I / <i>Phase I</i> (NCT03020017): завершена / <i>completed</i>
Бевасираниб <i>Bevasiranib</i> (Cand5)	ОПКО Ophthalmologics	Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) <i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i>	Диабетический макулярный отек; Возрастная макулярная дегенерация <i>Diabetic macular oedema; Age-related macular degeneration</i>	Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT00499590): отменена / <i>cancelled</i> Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT00557791): отменена / <i>cancelled</i>
Sirna-027 (AGN211745)	Allergan	Рецептор VEGFR1 <i>VEGFR1 receptor</i>	Возрастная макулярная дегенерация <i>Age-related macular degeneration</i>	Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT00395057): отменена из-за проблем с безопасностью / <i>cancelled due to safety concerns</i>
SYL040012	Sylentis, S.A.	β2-адренергический рецептор <i>β2-adrenergic receptor</i>	Глаукома <i>Glaucoma</i>	Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT02250612): завершена / <i>completed</i>
Тиванисиран <i>Tivanisiran</i> (SYL-1001)	Sylentis, S.A.	Капсаициновый рецептор <i>Capsaicin receptor</i>	Глазная боль, синдром сухого глаза <i>Eye pain, dry eye syndrome</i>	Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT05310422): завершена / <i>completed</i> Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT04819269): завершена / <i>completed</i>
STP705	Sirnaomics	Трансформирующий фактор роста β1; циклооксигеназа-2 <i>Transforming growth factor β1; cyclooxygenase-2</i>	Плоскоклеточная карцинома <i>Squamous cell carcinoma</i>	Фаза I/II / <i>Phase I/II</i> (NCT05196373)

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Препарат <i>Medicinal product</i>	Разработчик/ Производитель <i>Developer/ Manufacturer</i>	Мишень <i>Target</i>	Заболевание <i>Indication</i>	Фаза клинических исследований <i>Clinical trial phase</i>
BMT101 (OLX-101A)	Olix Pharmaceuticals	Фактор роста соединительной ткани <i>Connective tissue growth factor</i>	Гипертрофический рубец <i>Hypertrophic scars</i>	Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT04012099): отменена / <i>cancelled</i> Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT03133130): завершена / <i>completed</i>
OLX10010	Olix Pharmaceuticals	Фактор роста соединительной ткани <i>Connective tissue growth factor</i>	Гипертрофический рубец <i>Hypertrophic scars</i>	Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT04877756): завершена / <i>completed</i>
RXI-109	Phio Pharmaceuticals	Фактор роста соединительной ткани <i>Connective tissue growth factor</i>	Гипертрофический рубец <i>Hypertrophic scars</i>	Фаза II / <i>Phase II</i> (NCT02246465) Фаза I/II / <i>Phase I/II</i> (NCT02599064)
Тепрасиран <i>Teprasiran</i> (I5NP, QPI-1002)	Quark Pharmaceuticals	p53	Острая почечная недостаточность <i>Acute renal failure</i>	Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT02610296): завершена / <i>completed</i> Фаза III / <i>Phase III</i> (NCT03510897): отменена / <i>cancelled</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

иммунотерапевтических средств). Важными аспектами применения препарата являются простой режим дозирования (подкожное введение 1 раз в мес.) и благоприятный профиль безопасности [20].

Лечение инфекционных заболеваний

К настоящему моменту расшифрованы геномы многих патогенных вирусов, что открыло больше возможностей в разработке противовирусных средств, реализующих эффект с использованием механизма интерференции РНК. Препараты на основе миРНК, нацеленные на наиболее значимые для жизненного цикла вируса гены, могут быть весьма эффективны для лечения заболеваний, вызванных вирусными инфекциями [5].

Препарат ксалнесиран (xalnesiran, RG6346, Dicerna Pharmaceuticals) содержит молекулы миРНК, направленные против гена, кодирующего поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). В составе препарата миРНК конъюгирована с GalNAc [16]. Результаты КИ фазы I, представленные в 2020 г., показали, что лечение препаратом на протяжении 4 мес. приводило к значительному и стойкому снижению уровня HBsAg, сохраняющемуся до 1 года после окончания лечения. В 2021 г. стартовало КИ фазы II. В исследовании установлено, что, кроме значительного устойчивого снижения уровня HBsAg,

препарат также способствовал уменьшению уровня вирусной РНК и ДНК [21].

Препарат ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals) предназначен для лечения инфекций, вызванных респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ). Препарат содержит миРНК, направленные против консервативного участка гена N-белка РСВ. ALN-RSV01 воздействует на один из самых консервативных генов этого вируса, в связи с чем его активность распространяется на большинство изолятов РСВ [22]. Аэрозольное введение ALN-RSV01 приводило к статистически значимому противовирусному эффекту, снижению частоты инфицирования, а в случае заражения – уменьшению частоты и тяжести симптомов [23]. В период с 2009 по 2012 гг. были завершены два исследования II фазы у пациентов с острой РСВ-инфекцией, перенесших трансплантацию легких. Препарат ALN-RSV01 характеризовался безопасностью и хорошей переносимостью. Несмотря на отсутствие явного противовирусного эффекта, препарат улучшал состояние пациентов, перенесших трансплантацию [24].

Лечение онкологических заболеваний

Возникновение и прогрессия опухоли часто определяются активностью ряда генов (онкогенов), которые регулируют клеточный цикл и пролиферацию. Препарат NU-0129 (Northwestern University) содержит миРНК, подавляющую

экспрессию гена *Bcl2L12*, играющего значительную роль в развитии глиобластомы. Для доставки миРНК в препарате использованы наночастицы золота, которые проникают через гематоэнцефалический барьер и достигают клеток мозга. В небольшом пилотном исследовании с участием пациентов с рецидивом глиобластомы было показано, что применение NU-0129 приводило к значительному снижению уровня белка *Bcl2L12* в опухолевой ткани. При этом не было выявлено серьезных побочных эффектов, связанных с применением препарата [16, 25].

Лечение заболеваний органов зрения

Несколько препаратов на основе миРНК разрабатываются в настоящее время для лечения заболеваний органов зрения, таких как глаукома, возрастная макулярная дегенерация, синдром сухого глаза, диабетический макулярный отек и наследственные заболевания сетчатки [16]. Ввиду относительно короткого периода полувыведения молекул миРНК (особенно немодифицированных) данные препараты изначально рассматривались для местного использования, например в виде глазных капель.

Препарат бевасираниб (*bevasiranib*, Cand5, ОРКО Ophthalmologics) разработан в 2004 г. на основе миРНК, направленной против гена фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), и предназначен для лечения диабетического макулярного отека и возрастной макулярной дегенерации. КИ фазы I и II продемонстрировали перспективные результаты [26], однако исследование III фазы, направленное на подтверждение эффективности бевасираниба, было прекращено из-за недостаточного восстановления зрения у пациентов (NCT00499590). Другое исследование III фазы также было отменено [27].

Препарат *Sirna-027* (Allergan) содержит миРНК, подавляющую экспрессию гена рецептора *VEGF* (*VEGFR1*), и предназначен для лечения возрастной макулярной дистрофии. На этапе КИ выявлено значительное улучшение остроты зрения, но корреляции между изменением этого показателя и дозой препарата не обнаружено. Из-за побочных явлений, связанных с активацией препаратом *TLR3* (толл-подобного рецептора 3) и невозможностью достичь желаемых показателей эффективности, исследование II фазы было приостановлено [28].

Препараты миРНК могут оказаться весьма эффективны при глаукоме. Считается, что главный фактор риска развития глаукомы — повышение внутриглазного давления — является следствием дисбаланса между притоком и оттоком жидкости. Учитывая, что β 2-адренергический

рецептор (*ADRB2*) участвует в притоке жидкости, был разработан препарат *SYL040012* (Sylentis, S.A.), который содержит миРНК, направленную против гена *ADRB2*. КИ фазы II с участием пациентов с глаукомой или повышенным внутриглазным давлением продемонстрировало статистически значимое снижение внутриглазного давления, при этом препарат хорошо переносился как при местном, так и при системном применении [29].

Препараты миРНК могут быть использованы в лечении синдрома сухого глаза — заболевания, характеризующегося нарушением работы слезных желез и повреждением поверхности глаза. Препарат *tivanisiran* (*tivanisiran*, *SYL-1001*, Sylentis, S.A.) содержит миРНК, которая подавляет экспрессию гена капсаицинового рецептора *TRPV1*, участвующего в регуляции воспалительной реакции и передаче болевых сигналов [30]. Исследования показали, что *tivanisiran* является безопасным и эффективным препаратом, уменьшающим глазную боль и покраснение конъюнктивы при местном применении [30].

Лечение заболеваний кожных покровов

В настоящее время проходят КИ четыре препарата миРНК, направленные на лечение гипертрофических рубцов: *STP705*, *BMT101*, *OLX10010* и *RXI-109*. Действие препарата *STP705* (Sirnaomics) нацелено на *TGF- β 1* и *COX-2*, которые регулируют процессы, приводящие к образованию гипертрофических рубцов. Согласно данным КИ фазы IIb у 78% пациентов после применения препарата *STP705* наблюдали регенеративные процессы и гистологически подтвержденное снижение доли рубцовой ткани в сравнении с группой плацебо. Действие препаратов *BMT101*, *OLX10010* и *RXI109* направлено на ген фактора роста соединительной ткани (*CTGF*), участвующего в образовании гипертрофических и келоидных рубцов [31]. Препарат *BMT101* (OliX Pharmaceuticals) в настоящее время проходит II фазу КИ. Данный препарат применяется для терапии гипертрофических рубцов местно, интрадермально и подкожно. Согласно результатам КИ фазы II препарата *OLX10010* (OliX Pharmaceuticals) показано, что через 24 нед. еженедельное внутрикожное введение препарата приводило к значительному улучшению внешнего вида гипертрофических рубцов. В КИ также подтверждена безопасность и переносимость препарата. Результаты КИ фазы II препарата *RXI-109* (Phio Pharmaceuticals) продемонстрировали, что в группе с использованием препарата было достигнуто статистически

значимое улучшение внешнего вида рубцов по сравнению с контролем в 3-, 6- и 9-месячные сроки [16, 31].

Лечение заболеваний почек

Один кандидатный препарат миРНК находится на стадии КИ — тепрасиран (ISNP, QPI-1002, Quark Pharmaceuticals). Это стабильный препарат на основе «голой» молекулы миРНК (без носителя), нацеленный на подавление экспрессии белка p53, предназначен для лечения острого повреждения почек, связанного с нарушением функций после пересадки и кардиохирургических операций. Тепрасиран вызывает снижение экспрессии проапоптотического белка p53, что способствует защите клеток почки от гибели вследствие острого ишемическо-реперфузионного повреждения [16, 32].

Препараты на основе миРНК в клинической практике

В период с 2018 по 2023 гг. ряд препаратов миРНК был одобрен для медицинского применения (табл. 2). В 2018 г. препарат патисиран (patisiran, Onpattro, Alnylam Pharmaceuticals) был одобрен Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) для клинического применения при терапии наследственного транстретинового амилоидоза, что стало отправной точкой в использовании препаратов нового типа, действие которых основано на механизме РНК-интерференции.

Препарат патисиран разработан на основе молекул миРНК с включением 2'-О-метилмодификаций в последовательность нуклеотидов, что позволило улучшить стабильность и пролонгировать биологический эффект препарата. В качестве системы доставки миРНК в препарате используются липидные наночастицы, включающие холестерин, дистеароилфосфатидилхолин, полиэтиленгликоль, которые обеспечивают стабильность комплекса и облегчают транспортировку миРНК к клеткам [33]. После поглощения гепатоцитами молекулы миРНК высвобождаются из эндосом в цитоплазму, где оказывают биологический эффект, вызывая подавление транскрипции гена транстретина (*TTR*), что приводит к снижению уровня белка *TTR* в крови [34].

На этапе КИ патисирана (NCT01559077, NCT02053454) оценивалась его безопасность при дозировке от 0,01 до 0,5 мг/кг [35]. Было показано, что при внутривенном введении препарат не накапливается в нецелевых органах, что позволило предположить, что миРНК патисирана разрушается нуклеазой [35]. В плацебо-

контролируемых КИ фазы II изучались краткосрочные и долгосрочные клинические эффекты препарата. В ходе КИ (NCT01617967) анализировались результаты многократного применения препарата в возрастающих дозах у больных наследственным транстретиновым амилоидозом [35–37]. Для оценки долгосрочных эффектов проводилось открытое плацебо-контролируемое КИ (NCT01961921), в котором было продемонстрировано быстрое и устойчивое снижение (~82%) уровня транстретина у пациентов в сравнении с контролем в течение 24 мес. В исследовании оценивались двигательные функции и общее качество жизни пациентов, которые оставались стабильными на протяжении всего срока исследования. Также не наблюдалось значительных изменений эхокардиографических показателей и уровня биомаркеров сердечных патологий [37].

В плацебо-контролируемых КИ фазы III (NCT1960348) при исследовании патисирана в дозе 0,3 мг/кг один раз каждые 3 нед. в течение полутора лет была продемонстрирована эффективность и безопасность препарата. Препарат благоприятно влиял на функции сердца у пациентов с наследственным транстретиновым амилоидозом — происходило уменьшение толщины сердечной стенки и общей продольной деформации органа, а также увеличение диастолического объема и сердечного выброса [38].

Таким образом, разработка препарата патисирана стала важным вкладом в развитие направления генотерапевтических лекарственных средств. Это первый препарат на основе миРНК, одобренный FDA, реализующий механизм РНК-интерференции для контроля экспрессии белков, связанных с заболеваниями. Создание данного препарата позволило установить стандарты для разработчиков подобных препаратов.

Гивосиран (givosiran, Givlaari, Alnylam Pharmaceuticals) стал вторым препаратом на основе миРНК, получившим одобрение FDA в 2019 г. Препарат предназначен для лечения острой перемежающейся (печеночной) порфирии (ОПП), редкого генетического заболевания печени, вызванного дисфункцией синтеза белка гема. Заболевание связано с активацией гена аминолевулинатсинтазы 1 (*ALAS1*) и увеличением экспрессии белка *ALAS1*, что приводит к последующему повышению уровня нейротоксичных метаболитов, 5-аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена [39]. Механизм действия гивосирана связан с уменьшением уровня белка *ALAS1* путем воздействия на кодирующую часть миРНК гена *ALAS1*. В отличие от патисирана гивосиран вводится подкожно [39]. Препарат состоит

Таблица 2. Препараты на основе миРНК, одобренные для клинического применения

Table 2. siRNA medicinal products approved for clinical use

Название препарата <i>Medicinal product name</i>	Заболевание <i>Indication</i>	Мишень <i>Target</i>	Регуляторный орган, год одобрения <i>Regulatory authority, year of approval</i>	Разработчик/производитель <i>Developer/manufacturer</i>
Патисиран <i>Patisiran</i> (Onpattro)	Наследственный транстиретиновый амилоидоз <i>Hereditary transthyretin amyloidosis</i>	Транстиреин <i>Transthyretin</i>	FDA, 2018 EMA, 2018	Alnylam Pharmaceuticals
Гивосиран <i>Givosiran</i> (Givlaari)	Острая печеночная порфирия <i>Acute hepatic porphyria</i>	5-аминолевулинат-синтаза 1 <i>5-aminolevulinate synthase 1</i>	FDA, 2019 EMA, 2020	Alnylam Pharmaceuticals
Лумасиран <i>Lumasiran</i> (Oxlumo)	Первичная гипероксалурия типа 1 <i>Primary hyperoxaluria type 1</i>	Гидроксикислая оксидаза 1 <i>Hydroxyacid oxidase 1</i>	FDA, 2020 EMA, 2020	Alnylam Pharmaceuticals
Инклисиран <i>Inclisiran</i> (Leqvio)	Гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия; Ишемическая болезнь сердца <i>Heterozygous familial hypercholesterolemia; Coronary heart disease</i>	Пропротейн-конвертаза субтилизин/кексин типа 9 <i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>	FDA, 2021 EMA, 2020	Novartis Pharmaceuticals
Недосиран <i>Nedosiran</i> (Rivfloza)	Первичная гипероксалурия 1, 2 и 3 типа <i>Primary hyperoxaluria type 1, 2 and 3</i>	Печеночная лактатдегидрогеназа <i>Liver lactate dehydrogenase</i>	FDA, 2023	Dicerna Pharmaceuticals
Вутрисиран <i>Vutrisiran</i> (Amvuttra)	Наследственный транстиретиновый амилоидоз <i>Hereditary transthyretin amyloidosis</i>	Транстиреин <i>Transthyretin</i>	FDA, 2022 EMA, 2022	Alnylam Pharmaceuticals
МИР 19 <i>MIR 19</i> (siR-7-EM/KK-46)	COVID-19	РНК-зависимая РНК-полимераза вируса SARS-CoV-2 <i>RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 virus</i>	Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2021 <i>Ministry of Health of the Russian Federation, 2021</i>	ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России <i>National Research Center – Institute of Immunology, Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. FDA – Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США; EMA – Европейское агентство по лекарственным средствам.

Note. FDA, Food and Drug Administration; EMA, European Medicines Agency.

из двухцепочечной миРНК длиной 23 нуклеотида (антисмысловая цепь) и 21 нуклеотида (смысловая цепь), присоединенной к молекуле GalNAc для улучшения доставки в печень. Обе цепи химически модифицированы для улучшения стабильности миРНК.

В ходе плацебо-контролируемого КИ фазы I (NCT02452372) доказана безопасность применения гивосирана [39, 40]. При поведении КИ фазы I/II продемонстрировано, что у пациентов происходило быстрое устойчивое снижение уровня мРНК гена *ALAS1* в печени и уровня

нейротоксичных метаболитов в моче, а также уменьшение частоты обострений ОПП [39, 40]. В ходе КИ фазы III (NCT0338816), проводившегося среди пациентов, получавших еженедельные подкожные инъекции гивосирана в дозе 2,5 мг/кг на протяжении 6 мес., было отмечено устойчивое снижение уровня 5-аминолевулиновой кислоты и нейротоксических метаболитов порфибилиногена в моче, значительное уменьшение риска приступов, обострений ОПП и интенсивности болевого синдрома, а также улучшение качества жизни [39, 41].

Лумасиран (lumasiran, Oxlumo, Alnylam Pharmaceuticals) стал третьим препаратом на основе мРНК, получившим одобрение FDA в 2020 г. Препарат предназначен для лечения первичной гипероксалурии 1 типа (ПГ 1 типа), редкого аутосомно-рецессивного заболевания печени, которое возникает из-за снижения уровня пероксисомального фермента аланин-глиоксилат аминотрансферазы, ответственного за метаболизм глиоксилата. Заболевание приводит к отложению оксалатов кальция в почках и мочевых путях [42]. Терапия препаратом направлена на уменьшение количества оксалатных отложений за счет подавления экспрессии мРНК гена фермента гидроксикислой оксидазы 1 (HAO1), играющего ключевую роль в образовании оксалатных соединений [42]. Лумасиран рассматривается как альтернатива диализу и пересадке почки [42]. Препарат содержит модифицированную двухпочечную миРНК; антисмысловая цепь имеет размер 23 нуклеотида, смысловая цепь – 21 нуклеотид. МиРНК направлена на 3'-нетранслируемую область мРНК гена HAO1 и конъюгирована с GalNAc для доставки в печень. В КИ фазы I/II (NCT02706886) проводилось изучение различных режимов дозирования лумасирана и показана безопасность препарата [43]. Платцебо-контролируемые КИ фазы III были разделены на 3 исследования: ILLUMINATE-A (NCT03681184) – изучение эффектов лумасирана для взрослых и детей старше 6 лет с последующим ежеквартальным введением поддерживающей дозы 3 мг/кг в течение 3 мес. (исследование продолжалось до 54 мес.) [42]; ILLUMINATE-B (NCT03905694) – пациенты в возрасте до 6 лет получали аналогичное лечение лумасираном [44]; ILLUMINATE-C (NCT03681184) – оценка безопасности и эффективности лумасирана у пациентов с поздней стадией ПГ 1 типа при долгосрочном применении (исследование в настоящее время продолжается, предполагаемая дата завершения – июль 2025 г.) [45]. Лумасиран показал хорошую переносимость у детей и взрослых, приемлемый профиль безопасности и эффективное снижение уровня оксалатов вне зависимости от возраста, пола, расовой принадлежности, функциональных нарушений почек, приема витамина B6 и наличия в анамнезе почечных камней.

В 2021 г. FDA был одобрен препарат на основе миРНК инклисиран (inclisiran, Leqvio, Novartis Pharmaceuticals), предназначенный для лечения гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (СГХ) и ишемической болезни сердца, характеризующихся увеличением уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в крови

[46]. СГХ – семейное аутосомно-кодминантное генетическое заболевание, вызванное мутацией гена белка, участвующего в метаболизме липопротеинов, что приводит к накоплению холестерина и ЛПНП в плазме крови. МиРНК в составе препарата направлена против мРНК гена PCSK9, который кодирует пропротеиновую конвертазу субтилизин-кексина типа 9 (PCSK9), участвующую в регулировании уровня холестерина в крови по механизму деградации рецепторов ЛПНП на поверхности клеток. PCSK9 также может играть роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку повышение его уровня связано с повышенным риском развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [47]. Инклисиран включает полностью модифицированную миРНК, конъюгированную с GalNAc [48]. Этот препарат вводится пациентам подкожно и приводит к подавлению синтеза белка PCSK9, уменьшая его влияние на метаболизм ЛПНП [48, 49]. Инклисиран используется в качестве дополнительной терапии к статинам для улучшения их эффективности [46].

Платцебо-контролируемые КИ фазы I (NCT02314442) проводились в две стадии, в ходе которых изучали безопасность инклисирана при однократном и курсовом применении [50]. В платцебо-контролируемых КИ фазы II (NCT02597127) у пациентов с высоким уровнем ЛПНП, холестерина и высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний исследовали различные режимы дозирования. КИ фазы III включали три отдельных исследования: ORION-9 (NCT03397121) – среди взрослых с гетерозиготной СГХ, ORION-10 (NCT0339990) и ORION-11 (NCT0340100) – среди пациентов с ишемической болезнью сердца, получавших статины, и пациентов, принимавших различные дозы инклисирана, соответственно. Результаты КИ показали, что применение инклисирана приводило к снижению уровня ЛПНП и холестерина примерно на 50% при лечении препаратом каждые 6 мес. [51]. Для оценки эффективности, безопасности и переносимости долгосрочного применения инклисирана проводятся дополнительные исследования: ORION-8 (NCT03814187), ORION-13 (NCT04659863) и ORION-16 (NCT04652726) [52]. Инклисиран в настоящее время доступен для применения и обычно назначается в сочетании со статинами.

Недосиран (nedosiran, Rivfloza, Dicerna Pharmaceuticals) – препарат, разработанный для лечения ПГ, представляющий собой конъюгат молекул миРНК, подавляющих экспрессию гена LDHA, и GalNAc. Недосиран был одобрен в 2023 г. в США для снижения уровня оксалатов в моче

у детей в возрасте старше 9 лет и взрослых с ПГ 1 типа и относительно нормальной функцией почек. Препарат вводится подкожно 1 раз в мес. и специфически ингибирует экспрессию основной изоформы лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в печени [53]. Следует отметить, что подавление экспрессии ЛДГ также эффективно для лечения других подтипов первичной гипероксалурии — ПГ 2 и 3 типа. По результатам доклинических исследований доказана безопасность препарата и продемонстрирована его биологическая активность [54]. Результаты КИ подтвердили благоприятный профиль безопасности препарата, а также было продемонстрировано, что он вызывает устойчивое долгосрочное снижение уровня оксалатов в моче у пациентов с ПГ 2 и 3 типа до нормальных или близких к нормальным значениям [55].

Вутрисан (*vutrisiran*, Amvuttra, Alnylam Pharmaceuticals) разработан для лечения наследственного транстретинового амилоидоза и представляет собой конъюгат GalNAc и миРНК, направленной против гена *TTR*, кодирующего белок транстретин. Предполагается, что благодаря улучшенной системе доставки в печень за счет конъюгации с GalNAc вутрисан более эффективен, чем патисан, но при этом действует в гепатоцитах аналогичным образом, воздействуя на консервативную последовательность всех вариантов мРНК гена *TTR* [56]. Вутрисан был одобрен для медицинского применения в США в 2022 г. [57].

В 2021 г. был зарегистрирован препарат МИР 19, предназначенный для лечения COVID-19 (заболевание, вызванное инфекцией SARS-CoV-2). В его составе содержится молекула миРНК, направленная против жизненно важного гена вируса *RdRp*, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. В качестве носителя для миРНК в составе препарата использован дендримерный (разветвленный) пептид КК-46. За счет положительного заряда пептид КК-46 взаимодействует с отрицательно заряженной миРНК, формируя в водных растворах наноструктуры, которые по механизму эндоцитоза проникают в цитоплазму зараженных клеток, где вирус наиболее уязвим [58].

В экспериментах *in vitro* на культуре клеток Vero E6 (при множественности заражения SARS-CoV-2, равной 0,0001) продемонстрировано, что препарат приводил к уменьшению репликации вируса более чем в 10000 раз [59, 15].

В доклинических исследованиях на модели инфекции у сирийских хомячков показа-

но, что ингаляции препаратом МИР 19 (в дозе 3,453 мг/кг) уменьшали вирусную нагрузку в легких более чем в 200 раз, а также происходило снижение выраженности вирус-индуцированного воспаления респираторного тракта [59, 15].

В ходе КИ фазы I была установлена безопасность препарата МИР 19 как при однократном, так и при многократном применении у здоровых добровольцев. Это послужило основанием для проведения многоцентрового рандомизированного контролируемого КИ фазы II (NCT05184127), в ходе которого изучалась эффективность и безопасность препарата МИР 19 у пациентов с COVID-19 средней тяжести. Результаты исследований показали, что получавшие препарат ингаляционно пациенты достигли первичной конечной точки (снижение температуры, нормализация частоты дыхательных движений, уменьшение кашля и восстановления уровня кислорода в крови до 95% в течение 48 ч) значительно быстрее (в среднем за 6 сут) по сравнению с пациентами контрольной группы, получавшими стандартную этиотропную терапию (в среднем за 8 сут) [58].

Таким образом, было продемонстрировано, что препарат МИР 19 безопасен и хорошо переносится пациентами, а также значительно ускоряет период восстановления пациентов, госпитализированных с подтвержденным COVID-19 средней степени тяжести. В настоящее время препарат МИР 19 зарегистрирован (регистрационное удостоверение ЛП-007720), включен в документ «Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»¹ и активно применяется в клинической практике [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные применения препаратов на основе миРНК свидетельствуют об их значительном потенциале для коррекции аномальной экспрессии генов или мутаций, ассоциированных с болезнями, включая онкологические и генетические заболевания, вирусные инфекции и прочие патологии. Важным преимуществом является то, что продолжительность разработки и исследований препаратов на основе миРНК гораздо короче, чем у низкомолекулярных лекарственных веществ, моноклональных антител и белковых препаратов.

Клиническое применение миРНК, несмотря на высокий потенциал данного типа препаратов, остается в настоящее время несколько ограниченным. Это связано с проблемами,

¹ «Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 14 (27.12.2021)» (утв. Минздравом России).

присущими как самим миРНК (короткий период полувыведения и низкая биодоступность), так и системам их доставки (риск токсичности и недостаточная эффективность). Тем не менее возможности миРНК в регуляции любого целевого гена побуждают разработчиков к поиску путей решения обозначенных проблем. Так, для повышения стабильности миРНК применяют различные способы модификаций,

а для увеличения биодоступности создают различные варианты векторов для доставки в целевые ткани и органы.

Несмотря на вышеупомянутые ограничения миРНК, в настоящее время одобрено 6 препаратов, содержащих эти молекулы, и более 10 проходят клинические исследования, что демонстрирует значительные перспективы развития данного направления в ближайшие годы.

Литература/References

1. Тимотиевич ЕД, Шиловский ИП, Хаитов МР. Пептидные носители как средства доставки терапевтических нуклеиновых кислот. Механизмы и потенциал применения в медицине. *Биохимия*. 2023;88(11):2183–205. <https://doi.org/10.31857/S032097252311012X>
2. Timotievich ED, Shilovskiy IP, Khaitov MR. Cell-penetrating peptides as vehicles for delivery of therapeutic nucleic acids. Mechanisms and application in medicine. *Biochemistry (Moscow)*. 2023;88:1800–17. <https://doi.org/10.1134/S0006297923110111>
3. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):657–85. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>
4. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*. 2013;42:217–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
5. Gangopadhyay S, Gore KR. Advances in siRNA therapeutics and synergistic effect on siRNA activity using emerging dual ribose modifications. *RNA Biol*. 2022;19(1):452–67. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2052641>
6. Kang H, Ga YJ, Kim SH, Cho YH, Kim JW, Kim C, et al. Small interfering RNA (siRNA)-based therapeutic applications against viruses: principles, potential, and challenges. *J Biomed Sci*. 2023;30(1):88. <https://doi.org/10.1186/S12929-023-00981-9>
7. Wang Y, Zhang R, Tang L, Yang L. Nonviral delivery systems of mRNA vaccines for cancer gene therapy. *Pharmaceutics*. 2022;14(3):512. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030512>
8. Yan Y, Liu XY, Lu A, Wang XY, Jiang LX, Wang JC. Non-viral vectors for RNA delivery. *J Control Release*. 2022;342:241–79. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008>
9. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(10):673–94. <https://doi.org/10.1038/S41573-020-0075-7>
10. An G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-Conjugated siRNAs. *J Clin Pharmacol*. 2024;64(1):45–57. <https://doi.org/10.1002/JCPH.2337>
11. Khan MM, Filipczak N, Torchilin VP. Cell penetrating peptides: a versatile vector for co-delivery of drug and genes in cancer. *J Control Release*. 2021;330:1220–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.028>
12. Falato L, Gestin M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides delivering siRNAs: an overview. *Methods Mol Biol*. 2021;2282:329–52. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1298-9_18
13. Kozhikhova KV, Shilovskiy IP, Shatilov AA, Timofeeva AV, Turetskiy EA, Vishniakova LI, et al. Linear and dendrimeric antiviral peptides: Design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus. *J Mater Chem B*. 2020;8:2607–17. <https://doi.org/10.1039/C9TB02485a>
14. Shilovskiy I, Nikonova A, Barvinskaia E, Kaganova M, Nikolskii A, Vishnyakova L, et al. Anti-inflammatory effect of siRNAs targeted IL-4 and IL-13 in a mouse model of allergic rhinitis. *Allergy*. 2022;77(9):2829–32. <https://doi.org/10.1111/ALL.15366>
15. Nikolskii AA, Shilovskiy IP, Yumashev KV, Vishniakova LI, Barvinskaia ED, Kovchina VI, et al. Effect of local suppression of Stat3 gene expression in a mouse model of pulmonary neutrophilic inflammation. *Immunologiya*. 2021;42(6):600–14. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-600-614>
16. Khaitov M, Nikonova A, Shilovskiy I, Kozhikhova K, Kofadi I, Vishnyakova L, et al. Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation. *Allergy*. 2021;76(9):2840–54. <https://doi.org/10.1111/ALL.14850>
17. Friedrich M, Aigner A. Therapeutic siRNA: state-of-the-art and future perspectives. *Biodrugs*. 2022;36(5):549–71. <https://doi.org/10.1007/S40259-022-00549-3>
18. Badri P, Jiang X, Borodovsky A, Najafian N, Kim J, Clausen VA, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of cemdisiran, an RNAi therapeutic targeting complement component 5, in healthy subjects and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Pharmacokinet*. 2021;60(3):365–78. <https://doi.org/10.1007/S40262-020-00940-9>
19. Barratt J, Liew A, Yeo SC, Fernström A, Barbour SJ, Sperati CJ, et al. Phase 2 trial of cemdisiran in adult patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2024;19(4):452–62. <https://doi.org/10.2215/CJN.0000000000000384>
20. Pasi KJ, Lissitchkov T, Mamonov V, Mant T, Timofeeva M, Bagot C, et al. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with investigational siRNA therapeutic fitusiran: results of the phase 1 inhibitor cohort. *J Thromb Haemost*. 2021;19(6):1436–46. <https://doi.org/10.1111/JTH.15270>
21. Srivastava A, Rangarajan S, Kavakli K, Klamroth R, Kenet G, Khoo L, et al. Fitusiran prophylaxis in people with severe haemophilia A or haemophilia B without inhibitors (ATLAS-A/B): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2023;10(5):322–32. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(23\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(23)00037-6)
22. Gane EJ, Kim W, Lim TH, Tangkijvanich P, Yoon JH, Sievert W, et al. First-in-human randomized study of RNAi therapeutic RG6346 for chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2023;79(5):1139–49. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.07.026>
23. Gottlieb J, Zamora MR, Hodges T, Musk AW, Sommerwerk U, Dilling D, et al. ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35(2):213–21. <https://doi.org/10.1016/j.HEALUN.2015.08.012>

23. DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(19):8800–5. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0912186107>
24. Zamora MR, Budev M, Rolfe M, Gottlieb J, Humar A, DeVincenzo J, et al. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(4):531–8. <https://doi.org/10.1164/RCCM.201003-0422OC>
25. Kumthekar P, Ko CH, Paunesku T, Dixit K, Sonabend AM, Bloch O, et al. A first-in-human phase 0 clinical study of RNA interference-based spherical nucleic acids in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2021;13(584):3945. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABB3945>
26. Singerman L. Combination therapy using the small interfering RNA bevasiranib. *Retina*. 2009;29(6 Suppl):49–50. <https://doi.org/10.1097/IAE.0B013E3181AD2341>
27. Garba AO, Mousa SA. Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Ophthalmol Eye Dis*. 2010;2:75–85. <https://doi.org/10.4137/OED.S4878>
28. Cho WG, Albuquerque RJC, Kleinman ME, Tarallo V, Greco A, Nozaki M, et al. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(17):7137–42. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0812317106>
29. Lu LJ, Tsai JC, Liu J. Novel pharmacologic candidates for treatment of primary open-angle glaucoma. *Yale J Biol Med*. 2017;90(1):111–18. PMID: PMC5369028
30. Moreno-Montañés J, Bleau AM, Jimenez AI. Tivanisiran, a novel siRNA for the treatment of dry eye disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(4):421–6. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1457647>
31. Ahn I, Kang CS, Han J. Where should siRNAs go: applicable organs for siRNA drugs. *Exp Mol Med*. 2023;55(7):1283–92. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00998-y>
32. Thielmann M, Corteville D, Szabo G, Swaminathan M, Lamy A, Lehner LJ, et al. Tepasiran, a small interfering RNA, for the prevention of acute kidney injury in high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical study. *Circulation*. 2021;144(14):1133–44. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053029>
33. Paunovska K, Loughrey D, Dahlman JE. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2022;23(5):265–80. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
34. Zhang X, Goel V, Robb GJ. Pharmacokinetics of patisiran, the first approved RNA interference therapy in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *J Clin Pharmacol*. 2019;60(5):573–85. <https://doi.org/10.1002/jcph.1553>
35. Suhr OB, Coelho T, Buades J, Pouget J, Conceicao I, Berk J, et al. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:109. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0326-6>
36. Taylor L, Gidal B, Blakey G, Tayo B, Morrison G. A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled, single ascending dose, multiple dose, and food effect trial of the safety, tolerability and pharmacokinetics of highly purified cannabidiol in healthy subjects. *CNS Drugs*. 2018;32(11):1053–67. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0578-5>
37. Kristen AV, Ajroud-Driss S, Conceição I, Gorevic P, Kyriakides T, Obici L. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegener Dis Manag*. 2019;9(1):5–23. <https://doi.org/10.2217/nmt-2018-0033>
38. Solomon SD, Adams D, Kristen A, Grogan M, González-Duarte A, Maurer MS, et al. Effects of patisiran, an RNA interference therapeutic, on cardiac parameters in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Circulation*. 2019;139(4):431–43. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035831>
39. Sardh E, Harper P. RNAi therapy with givosiran significantly reduces attack rates in acute intermittent porphyria. *J Intern Med*. 2022;291(5):593–610. <https://doi.org/10.1111/joim.13443>
40. Sardh E, Harper P, Balwani M, Stein P, Rees D, Bissell DM, et al. Phase 1 trial of an RNA interference therapy for acute intermittent porphyria. *N Engl J Med*. 2019;380(6):549–58. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1807838>
41. Balwani M, Sardh E, Ventura P, Peiró PA, Rees DC, Stölzel U, et al. Phase 3 trial of RNAi therapeutic givosiran for acute intermittent porphyria. *N Engl J Med*. 2020;382(24):2289–301. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1913147>
42. Garrelfs SF, Frishberg Y, Hulton SA, Koren MJ, O’Riordan WD, Cochat P, et al. Lumasiran, an RNAi therapeutic for primary hyperoxaluria type 1. *N Engl J Med*. 2021;384(13):1216–26. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2021712>
43. Frishberg Y, Deschenes G, Groothoff JW, Hulton SA, Magen D, Harambat J, et al. Phase 1/2 study of lumasiran for treatment of primary hyperoxaluria type 1: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021;16(7):1025–36. <https://doi.org/10.2215/CJN.14730920>
44. Sas DJ, Magen D, Hayes W, Shasha-Lavsky H, Michael M, Schulte I, et al. Phase 3 trial of lumasiran for primary hyperoxaluria type 1: a new RNAi therapeutic in infants and young children. *Genet Med*. 2022;24(3):654–62. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2021.10.024>
45. Scott LJ, Keam SJ. Lumasiran: first approval. *Drugs*. 2021;81(2):277–82. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01463-0>
46. Bardolia C, Amin NS, Turgeon J. Emerging non-statin treatment options for lowering low-density lipoprotein cholesterol. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:789931. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.789931>
47. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154–6. <https://doi.org/10.1038/ng1161>
48. Nair JK, Willoughby JLS, Chan A, Charisse K, Alam MR, Wang Q, et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*. 2014;136(49):16958–61. <https://doi.org/10.1021/ja505986a>
49. Lamb YN. Inclisiran: first approval. *Drugs*. 2021;81(3):389–95. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01473-6>
50. Fitzgerald K, White S, Borodovsky A, Bettencourt BR, Strahs A, Clausen V, et al. A highly durable RNAi therapeutic inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med*. 2017;376(1):41–51. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1609243>
51. Ray KK, Wright RS, Kallend D, Koenig W, Leiter LA, Raal FJ, et al. Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1507–19. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1912387>
52. Reijman MD, Schweizer A, Peterson ALH, Bruckert E, Stratz C, Defesche JC, et al. Rationale and design of two trials assessing the efficacy, safety, and tolerability of inclisiran in adolescents with homozygous and heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Prev Cardiol*. 2022;29(9):1361–8. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwac025>
53. Syed YY. Nedosiran: first approval. *Drugs*. 2023;83(18):1729–33. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01976-4>

54. Lai C, Pursell N, Gierut J, Saxena U, Zhou W, Dills M, et al. Specific inhibition of hepatic lactate dehydrogenase reduces oxalate production in mouse models of primary hyperoxaluria. *Mol Ther*. 2018;26(8):1983–95. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.016>
55. Hoppe B, Koch A, Cochat P, Garrelfs SF, Baum MA, Groot-hoff JW, et al. Safety, pharmacodynamics, and exposure-response modeling results from a first-in-human phase 1 study of nedosiran (PHYOX1) in primary hyperoxaluria. *Kidney Int*. 2022;101(3):626–34. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.08.015>
56. Habtemariam BA, Karsten V, Attarwala H, Goel V, Melch M, Clausen VA, et al. Single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of transthyretin targeting N-acetylgalactosamine-small interfering ribonucleic acid conjugate, vutrisiran, in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2021;109(2):372–82. <https://doi.org/10.1002/CPT.1974>
57. Mullard A. FDA approves fifth RNAi drug—Alnylam's next-gen hATTR treatment. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(8):548–9. <https://doi.org/10.1038/D41573-022-00118-X>
58. Хаитов МР, Никонова АА, Кофиади ИА, Шиловский ИП, Смирнов ВВ, Елисютина ОГ и др. Результаты I и II фазы клинических исследований препарата МИР 19®. *Иммунология*. 2023;44(3):291–316. Khaitov MR, Nikonova AA, Kofiadi IA, Shilovskiy IP, Smirnov VV, Elisyutina OG, et al. Results of clinical trials phases I and II of MIR 19®. *Immunologiya*. 2023;44(3):291–316 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2023-44-3-291-316>
59. Khaitov M, Nikonova A, Kofiadi I, Shilovskiy I, Smirnov V, Elisyutina O, et al. Treatment of COVID-19 patients with a SARS-CoV-2-specific siRNA-peptide dendrimer formulation. *Allergy*. 2023;78(6):1639–53. <https://doi.org/10.1111/ALL.15663>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.П. Шиловский, Г.Б. Пасихов, В.В. Смирнов, И.А. Кофиади** — концепция работы, написание и редактирование текста рукописи, формулировка выводов; **М.В. Попова, П.А. Струева** — анализ источников литературы, оформление рукописи; **М.Р. Хаитов** — участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All authors confirm that their authorship meets the ICMJE criteria. The most significant contributions were as follows. **I.P. Shilovskiy, G.B. Pasikhov, V.V. Smirnov, and I.A. Kofiadi** conceptualised the study, drafted and edited the manuscript, and formulated the conclusions. **M.V. Popova and P.A. Strueva** analysed literature sources and designed the manuscript. **M.R. Khaitov** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Шиловский Игорь Петрович, д-р биол. наук / **Igor P. Shilovskiy**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5343-4230>

Пасихов Георгий Борисович / **George B. Pasikhov**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8916-3322>

Смирнов Валерий Валерьевич, д-р фарм. наук / **Valery V. Smirnov**, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

Кофиади Илья Андреевич, д-р биол. наук / **Ilya A. Kofiadi**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9280-8282>

Попова Майя Владиславовна / **Maiia V. Popova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3671-780X>

Струева Полина Александровна / **Polina A. Strueva**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7718-0767>

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН / **Musa R. Khaitov**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corr. Member of RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>

Поступила 12.04.2024

После доработки 13.06.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 12 April 2024

Revised 13 June 2024

Accepted 21 June 2024



Опыт производства и клинического применения биомедицинского клеточного продукта Изитенс® для восстановления повреждений хрящевой ткани коленного сустава человека

А.С. Зоричева¹, Е.А. Звонова², Л.С. Агапова¹, М.С. Лыкова¹, О.А. Маркова²,
В.С. Леонов¹,

¹ Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Заводская, стр. 273, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

² Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Тестовская, д. 10, Москва, 123112, Российская Федерация

Леонов Вячеслав Сергеевич; Leonov@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Существующие клеточные методы восстановления хрящевой ткани, такие как аутологичная трансплантация хондроцитов, недостаточно эффективны, а хирургическое вмешательство болезненно и травматично. Поэтому требуется разработка более эффективного продукта для клеточной терапии с малоинвазивной хирургической процедурой его имплантации пациенту.

ЦЕЛЬ. Разработка технологии производства аутологичного биомедицинского клеточного продукта (БМКП), содержащего трехмерные структуры (3D-сфероиды) на основе хондроцитов, выделенных из хрящевой ткани пациента, и оценка клинической эффективности его применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Аутологичные хондроциты, выделенные из биоптата хрящевой ткани пациента, культивировали в монослойной культуре для получения необходимого количества клеток. Дальнейшее культивирование хондроцитов проводили с использованием неадгезивного покрытия для формирования 3D-сфероидов. Все этапы производства БМКП проводили в асептических условиях в изоляторах клеточных культур. Для характеристики фенотипа хондроцитов на разных этапах культивирования использовали фазово-контрастную микроскопию и иммуногистохимическое окрашивание с применением специфических флуоресцентно меченных антител. Генетическую стабильность контролировали кариологическим методом. В рамках клинического исследования (КИ) проводили оценку эффективности БМКП Изитенс® при помощи специализированных функциональных тестов и по Шкале оценки восстановления хрящевой ткани по результатам магнитно-резонансной томографии (MOCART). Основным критерием эффективности было изменение общего балла по Шкале оценки исхода травмы и остеоартроза коленного сустава (KOOS).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Разработана технология производства аутологичного БМКП Изитенс® из собственных клеток пациента без применения сыворотки животных, ростовых факторов, цитокинов и других добавок. С использованием кариологического метода подтверждено сохранение генетической стабильности хондроцитов на протяжении 3 пассажей культивирования в монослойной культуре. При 3D-культивировании в виде сфероидов хондроциты продуцируют характерные для матрикса хрящевой ткани белки (коллаген типа II, агрекан), приобретая таким образом способность к восстановлению поврежденного хряща. В ходе КИ продемонстрировано статистически значимое улучшение состояния хрящевой ткани коленных суставов через 12 мес. после трансплантации 3D-сфероидов из аутологичных хондроцитов. Среднее изменение общего балла KOOS составило 23,8±15,9.

ВЫВОДЫ. Продemonстрирована высокая эффективность БМКП Изитенс® для восстановления хрящевой ткани. На основании результатов клинических исследований данный БМКП зарегистрирован на территории Российской Федерации, введен в клиническую практику и может стать альтернативой эндопротезированию и дорогостоящим операциям за рубежом.

Ключевые слова: Изитенс®; биомедицинский клеточный продукт; БМКП; хрящевая ткань коленного сустава; хондроциты; аутологичные хондроциты; сфероиды; трансплантация; генетическая стабильность; контроль качества БМКП; клинические исследования БМКП

Для цитирования: Зоричева А.С., Звонова Е.А., Агапова Л.С., Лыкова М.С., Маркова О.А., Леонов В.С. Опыт производства и клинического применения биомедицинского клеточного продукта Изитенс® для восстановления повреждений хрящевой ткани коленного сустава человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):172–187. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-172-187>

Финансирование. Работа выполнена в рамках клинических исследований биомедицинского клеточного продукта Изитенс®, спонсируемых АО «ГЕНЕРИУМ».

Потенциальный конфликт интересов. Существует потенциальный конфликт интересов в связи с аффилиацией авторов данной научной работы с АО «ГЕНЕРИУМ». Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

Experience in the production and clinical application of the cell-based medicinal product Easytense® for the repair of cartilage defects of the human knee

Anastasia S. Zoricheva¹, Elizaveta A. Zvonova², Larissa S. Agapova¹, Mariya S. Lykova¹, Oksana A. Markova², Vyacheslav S. Leonov^{1,✉}

¹ GENERIUM JSC, 273 Zavodskaya St., Volginsky, Petushinsky District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

² GENERIUM JSC, 10 Testovskaya St., Moscow 123112, Russian Federation

✉ Vyacheslav S. Leonov; Leonov@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The current cell-based cartilage repair methods, such as autologous chondrocyte transplantation, are not sufficiently effective, and the surgery is painful and traumatic. Therefore, there is a need for a more effective cell therapy product with a minimally invasive surgical procedure for its implantation into the patient.

AIM. This study aimed to develop a manufacturing technology for the production of an autologous cell-based medicinal product (CBMP) comprising three-dimensional structures (3D-spheroids) based on chondrocytes isolated from the patient's cartilage tissue, as well as to evaluate its clinical efficacy.

MATERIALS AND METHODS. Autologous chondrocytes isolated from the patient's cartilage biopsy were propagated in monolayer culture to obtain the required number of cells. Subsequently, the chondrocytes were cultivated on plates with a non-adhesive coating to form 3D spheroids. All CBMP production steps were performed under aseptic conditions in cell culture isolators. The authors used phase-contrast microscopy and immunohistochemical staining with specific fluorescence-labelled antibodies to characterise chondrocyte phenotypes at different stages of cultivation. Genetic stability was controlled by karyotyping. The efficacy of Easytense® was evaluated in a clinical trial using specialised functional tests and the Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue (MOCART) score. The primary efficacy endpoint was a change in the overall score on the Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS).

RESULTS. A manufacturing technology without using animal sera, growth factors, cytokines, or other additives was developed for the production of the autologous CBMP Easytense®. Karyological data confirmed that the chondrocytes retained genetic stability for 3 passages in monolayer culture. When cultured as 3D spheroids, the chondrocytes produced cartilage extracellular matrix proteins (type II collagen, aggrecan), thus acquiring the ability to repair damaged cartilage. The clinical trial demonstrated a statistically significant improvement in knee cartilage 12 months after the transplantation of 3D spheroids derived from autologous chondrocytes. The mean change in the overall KOOS score was 23.8±15.9.

CONCLUSIONS. The clinical trial results indicate that Easytense® is highly effective for cartilage repair. Based on these results, the CBMP has been granted marketing authorisation and introduced into clinical practice in the Russian Federation. Easytense® has the potential to replace endoprosthetics and expensive surgeries abroad.

Keywords:

Easytense®; cell-based medicinal product; CBMP; knee cartilage; chondrocytes; autologous chondrocytes; spheroids; transplantation; genetic stability; quality control of CBMPs; clinical trials of CBMPs

For citation:

Zoricheva A.S., Zvonova E.A., Agapova L.S., Lykova M.S., Markova O.A., Leonov V.S. Experience in the production and clinical application of the cell-based medicinal product Easytense® for the repair of cartilage defects of the human knee. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):172–187. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-172-187>

Funding. This study was conducted as part of clinical trials of the cell-based medicinal product Easytense® funded by GENERIUM JSC.

Disclosure. There is a potential conflict of interest related to the authors' affiliation with GENERIUM JSC. However, when writing this paper, the authors were guided by considerations of the scientific value of the material obtained and declare impartiality in their data assessment.

ВВЕДЕНИЕ

Основной причиной ограниченной регенеративной способности хряща является малое количество хондроцитов в ткани, а также их низкий пролиферативный потенциал. После повреждения вследствие травмы или заболевания (рассекающий остеохондрит, остеоартроз и др.) хрящевая ткань практически не восстанавливается.

Наиболее часто встречается повреждение хряща коленного сустава, симптомы которого (боль, отек, скованность и ограничение в движении) сильно снижают качество жизни пациентов. Несмотря на существование множества хирургических подходов для восстановления поврежденного хряща сустава, проблема лечения данной патологии требует поиска новых технологических решений.

В последние годы перспективным направлением является разработка клеточных методов восстановления хрящевой ткани, таких как аутологичная трансплантация хондроцитов (АТХ). Принцип АТХ основан на получении собственных клеток пациента, которые наращивают *in vitro*, а затем переносят в область повреждения хряща, где они интегрируются в ткань реципиента, заполняя поврежденную область. Считается, что АТХ значительно превосходит ранее применявшиеся методы терапии [1–3].

Несмотря на прогресс в области развития клеточных технологий для восстановления хрящевой ткани, многие вопросы остаются

нерешенными. Одной из основных проблем АТХ является дедифференцировка хондроцитов в процессе культивирования, проявляющаяся изменением фенотипа и снижением способности синтезировать белки внеклеточного матрикса (агрекан, коллаген типа II и др.). При трансплантации таких дедифференцированных хондроцитов вместо гиалинового хряща формируется волокнистый хрящ с недостаточными для физических нагрузок биомеханическими свойствами [4]. Это стимулировало поиск новых условий культивирования, инициирующих повторную дифференцировку хондроцитов *in vitro*. В литературе описаны различные методические подходы, направленные на индукцию редифференцировки хондроцитов в культуре, включая использование факторов роста [5–7], ингибиторов и индукторов различных сигнальных путей [8], генетические модификации клеток с регулируемой экспрессией генов [9, 10]. Во многих исследованиях продемонстрировано, что использование трехмерных матриц для культивирования хондроцитов индуцирует их редифференцировку в функционально активные хондроциты [11, 12]. Вместе с тем посторонний материал в составе трансплантата может вызывать иммунные и воспалительные реакции. Кроме того, использование объемных матриц часто делает невозможным осуществление операции малоинвазивным методом, усложняя тем самым хирургическое вмешательство.

Следующим этапом развития технологии АТХ стало получение трехмерной культуры клеток без использования матриц или иных стимулирующих воздействий [13–15].

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрирован первый биомедицинский клеточный продукт (БМКП) Изитенс® (АО «ГЕНЕРИУМ»). Клинические исследования (КИ) БМКП проводились в рамках проспективного открытого многоцентрового КИ эффективности и безопасности трансплантации препарата в ходе терапии пациентов с дефектами хряща коленного сустава 1–10 см². БМКП представляет собой сфероиды из аутологичных хондроцитов человека, связанных матриком, синтезированным этими клетками *de novo* (рис. 1). Одним из основных преимуществ БМКП является то, что это полностью аутологичный продукт. При его производстве в качестве исходных материалов используют только биоптаты собственных тканей пациента и сыворотку крови. Применение любых компонентов живот-

ного происхождения в процессе культивирования хондроцитов и формирования сфероидов исключено. Процедура культивирования без использования добавок (факторы роста, ингибиторы и др.) обеспечивает преимущества данного БМКП с точки зрения эффективности и безопасности по сравнению с другими известными продуктами на основе хондроцитов. Еще одним преимуществом препарата является его способность самостоятельно прикрепляться к поверхности поврежденного хряща без какого-либо внешнего воздействия. Это делает метод лечения малоинвазивным и позволяет отказаться от использования дополнительных этапов фиксации, сократить длительность хирургического вмешательства, снизить боль и улучшить течение послеоперационного периода, сократить время пребывания пациента в стационаре.

Цель работы – разработка технологии производства аутологичного БМКП, содержащего трехмерные структуры (3D-сфероиды) на основе хондроцитов, выделенных из хрящевой ткани

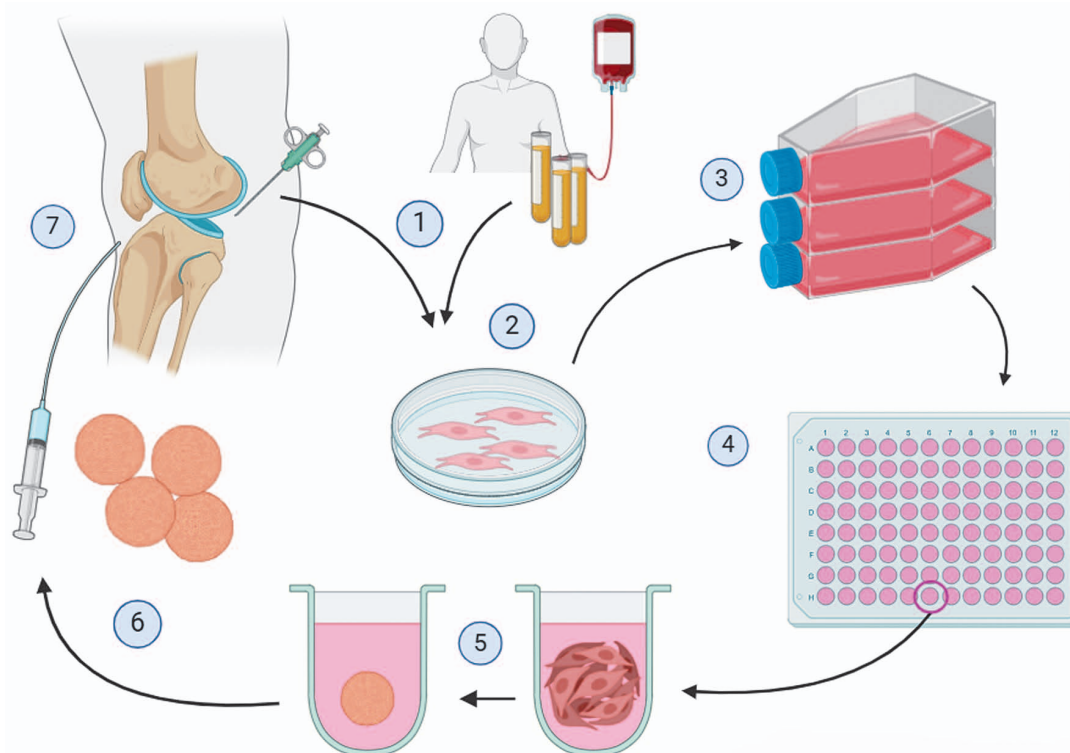


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Схема получения биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе аутологичных хондроцитов человека в виде сфероидов. 1 – отбор биоптата хряща, получение аутологичной сыворотки крови; 2 – выделение хондроцитов из биоптата; 3 – культивирование хондроцитов в монослойной культуре; 4 – пересев хондроцитов в 96-луночный планшет с неадгезивным покрытием для получения сфероидов; 5 – формирование сфероидов из хондроцитов; 6 – изготовление готовой формы БМКП; 7 – трансплантация препарата БМКП пациенту.

Fig. 1. Scheme for the production of a cell-based medicinal product (CBMP) from autologous human chondrocytes formed as spheroids. 1, collection of a cartilage biopsy and autologous serum; 2, isolation of chondrocytes from the biopsy material; 3, cultivation of the chondrocytes in monolayer culture; 4, transfer of the chondrocytes to a 96-well plate with a non-adhesive coating to obtain spheroids; 5, formation of chondrocyte spheroids; 6, production of the finished CBMP dosage form; 7, transplantation of the CBMP into the patient.

пациента, и оценка клинической эффективности его применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все этапы производства БМКП Изитенс® проводили в асептических условиях в изоляторах клеточных культур (Comeser, Италия), оснащенных CO₂-инкубаторами, центрифугами, микроскопами [16].

Выделение хондроцитов из биоптата хрящевой ткани и культивирование *in vitro*

Хондроциты выделяли из биоптата хрящевой ткани человека путем механического измельчения и обработки коллагеназой (Nordmark, Германия) при постоянном перемешивании. После центрифугирования осадок, содержащий хондроциты, инкубировали в культуральных флаконах при 37 °C и 5% CO₂ в среде Ham's F-12 (Corning, США) и αMEM (Corning, США) (в соотношении 1:1) с добавлением 2 мМ L-глутамина (Corning, США) и 10–15% аутологичной сыворотки крови. Среду обновляли каждые 3–4 сут. При достижении субконфлюэнтного состояния (80–90%) клетки диссоциировали TrypLE™ (Gibco, США). Далее проводили следующий пассиваж клеток в плотности 5000–7000 клеток/см². Конфлюэнтность оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа (Nikon, Япония). Для подсчета клеток использовали трипановый синий (Sigma-Aldrich, США) и камеру гемоцитометра (INCYTO, Республика Корея).

Формирование сфероидов на неадгезивной поверхности

Для формирования трансплантата хондроциты 1 или 2 пассажа переносили в лунки 96-луночного планшета с неадгезивным покрытием (Corning, США), где клетки формировали трехмерную структуру — сфероиды. Сфероиды инкубировали в среде Ham's F-12 и αMEM (в соотношении 1:1) с добавлением 2 мМ L-глутамина и 10% аутологичной сыворотки крови пациента при температуре 37 °C и 5% CO₂. Обновление среды проводили каждые 3–4 сут.

Оценка пролиферативной активности, определение времени удвоения популяции культивируемых хондроцитов

Для оценки пролиферативной активности культивируемых хондроцитов рассчитывали количество удвоений популяции (population doubling level, PDL) и время удвоения популяции

(population doubling time, PDT). Для этого учитывали время культивирования, количество клеток при диссоциации монослойной культуры и последующем пассаже. Расчет показателя PDL проводили согласно формуле (1):

$$PDL = \frac{\ln(N/N_0)}{\ln 2}, \quad (1)$$

где N_0 — исходное количество клеток, N — количество клеток через время T .

Расчет показателя PDT проводили согласно формуле (2):

$$PDT = \frac{T}{PDL}, \quad (2)$$

где T — время культивирования.

Кроме того, для оценки пролиферативной активности хондроцитов использовали иммуноцитохимический метод, основанный на выявлении экспрессии маркера пролиферации Ki-67 [17]. С использованием микроскопа подсчитывали количество клеток, положительно окрашенных антителами к Ki-67, и общее количество клеток в нескольких полях зрения, далее вычисляли процентное содержание митотически активных клеток.

Кариологический анализ

Для проведения кариологического анализа препараты метафазных хромосом получали по стандартной методике. Для идентификации отдельных хромосом использовали дифференциальную G-окраску хромосом по методу Мительмана [18]. Анализ проводили с помощью микроскопа Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Ikaros (MetaSystems, Германия). Для хромосомного анализа использовали иммерсионный объектив (×100). Подсчитывали не менее 50 метафаз на пассажах, при этом номер пассажа превышал необходимое число для производства БМКП. Кариотип анализировали в соответствии с критериями Международной цитогенетической номенклатуры¹.

Иммуногистохимическое окрашивание

Для анализа экспрессии хондрогенных маркеров культивированные хондроциты фиксировали в 4% формальдегиде. Сфероиды заключали в среду Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Япония) и замораживали, далее с помощью криостата (CM1520, Leica, Германия) получали срезы толщиной 8 мкм, снимали на теплое

¹ ISCN 2016: An international system for human cytogenomic nomenclature. Reprint of: Cytogenetic and genome research. 2016;149(1–2).

предметное стекло, фиксировали в холодном ацетоне (минус 20 °С).

Зафиксированные препараты окрашивали первичными антителами в течение 12–15 ч при 4 °С. Использовали антитела к следующим белкам: Sox9 (1:200; Abcam, Великобритания), агрекан (1:10; R&D Systems, США), коллаген типа II (1:100; Abcam, Великобритания), коллаген типа I (1:200; Abcam, Великобритания), Ki-67 (1:200; Abcam, Великобритания). После отмывки от первичных антител препараты инкубировали, применяя соответствующие вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546; 1:500; Life Technology, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки препараты покрывали средой Vectashield (Vector Laboratories, США), содержащей краситель 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) для окрашивания ядер. Окрашенные препараты анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.Z2 с использованием подходящих флуоресцентных фильтров.

Клиническое исследование, статистическая обработка

БМКП Изитенс® применялся у пациентов в рамках клинического исследования НАС-КД-III «Проспективное сравнительное открытое многоцентровое клиническое исследование эффективности и безопасности трансплантации препарата GNR-089 (Сфероиды из аутологичных хондроцитов человека, связанных матриксом) (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) в лечении пациентов с дефектами хряща коленного сустава 1–10 см²». Протокол исследования одобрен Минздравом России (разрешение на проведение клинического исследования БМКП № 1 от 12.03.2021), Советом по этике Минздрава России (выписка из протокола № 1 от 10.08.2020) и независимыми локальными этическими комитетами клинических центров. Исследование проводилось в 8 исследовательских центрах Российской Федерации в соответствии с Правилами надлежащей клинической практики², действующими нормативными требованиями и с соблюдением этических принципов медицинских исследований с участием человека, заложенных Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации³.

В исследовании приняли участие 104 пациента в возрасте от 18 до 50 лет с изолированным единичным повреждением хряща коленного

сустава III или IV степени по классификации повреждений хряща Международного общества восстановления хряща (International Cartilage Repair Society, ICRS) [19]. Пациенты были разделены на 2 группы в соответствии с размером дефекта хряща коленного сустава: группа I – 52 пациента с размером дефекта от ≥1 до <4 см², группа II – 52 пациента с размером дефекта от ≥4 до <10 см². Все пациенты предоставили информированное согласие на участие в исследовании до проведения любых процедур в рамках протокола. Дозировка трансплантируемых сфероидов составляла 10–70 сфероидов на 1 см² дефекта хрящевой ткани после хирургической обработки.

Промежуточная оценка была проведена через 12 мес. после трансплантации БМКП. Предусмотренные протоколом клинического исследования наблюдение и оценка функционального состояния будут продолжаться в течение 36 мес. после проведения трансплантации.

Оценка эффективности лечения поврежденного суставного хряща проводилась при помощи батареи специализированных функциональных тестов и по Шкале оценки восстановления хрящевой ткани по результатам магнитно-резонансной томографии (Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue, MOCART) через 12 мес. после введения БМКП. Также 9 пациентам из группы II была проведена контрольная артроскопия. Основным критерием эффективности в исследовании было изменение общего балла по Шкале оценки исхода травмы и остеоартроза коленного сустава (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score, KOOS).

Анализ изменения общего балла и баллов по пяти подшкалам Шкалы KOOS, а также других конечных точек в виде численных переменных в различных временных точках относительно исходного уровня проводился с использованием парного *t*-теста. Для оценки результатов магнитно-резонансной томографии использованы методы описательной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики производственного процесса биомедицинского клеточного продукта

Была разработана технология производства БМКП в изоляторах клеточных культур. Общий вид изолятора клеточных культур, состоящего из трех сообщающихся модулей, представлен на рисунке 2.

² Integrated addendum to ICH E6(R1): Guideline for good clinical practice E6(R2). https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf

³ WMA Declaration of Helsinki — ethical principles for medical research involving human subjects. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by authors

Рис. 2. Изолятор клеточных культур, используемый для производства биомедицинского клеточного продукта Изитенс®.

Fig. 2. Cell culture isolator used for the production of the cell-based medicinal product Easytense®.

Поскольку серии БМКП не проходят стадию финальной стерилизации, в течение всего процесса должны соблюдаться высокие требования асептического производства. Все этапы производства БМКП проходили в асептических условиях в изоляторах клеточных культур. Использование данной технологии для производства серий БМКП позволило обеспечить постоянное соблюдение условий, соответствующих чистоте зон класса А (согласно рекомендациям GMP) во время культивирования, отбора образцов для контроля качества клеток и готового к имплантации продукта. Передача сырья и материалов внутрь изолятора возможна без нарушения асептических условий путем использования шлюза с сопутствующей биодеконтаминацией парами перекиси водорода. Благодаря изоляторной технологии исключен прямой контакт между персоналом и продуктом и снижен риск микробной и перекрестной контаминации БМКП.

Процесс производства БМКП был валидирован в ходе получения серий продукта для КИ. Все контролируемые параметры технологического процесса соответствовали критериям приемлемости. Процесс позволял получать серии БМКП, соответствующего требованиям спецификации на готовый продукт. Спецификация содержит сведения об ауто-

логичном БМКП, его качественном и количественном составе, биологических и иных характеристиках [20].

Основные характеристики производственного процесса и клеточного продукта представлены в *таблице 1*.

Выделение и культивирование хондроцитов

После механического измельчения и ферментативного расщепления матрикса хрящевой ткани из биоптата хряща изолированные хондроциты высевали в культуральные флаконы в среде с добавлением аутологичной сыворотки и культивировали в стандартных условиях. Освобожденные от матрикса хондроциты приобретали способность быстро делиться в культуре (*рис. 3А, Р0*). Высокая пролиферативная активность хондроцитов была подтверждена иммуногистохимическим методом с использованием антител к маркеру пролиферации Ki-67 (*рис. 3В*). На первом пассаже количество клеток (%), находящихся в активной фазе клеточного цикла, составляло более 75%. Показано, что наибольшая скорость пролиферации наблюдалась в культуре хондроцитов на первичном (нулевом) пассаже — время удвоения популяции составляло в среднем 48 ± 15 ч. После субкультивирования скорость деления клеток заметно снижалась и составила 73 ± 13 и 81 ± 16 ч на пассажах 1 и 2 соответственно.

Таблица 1. Основные характеристики производственного процесса и биомедицинского клеточного продукта
Table 1. Main characteristics of the production process and the cell-based medicinal product

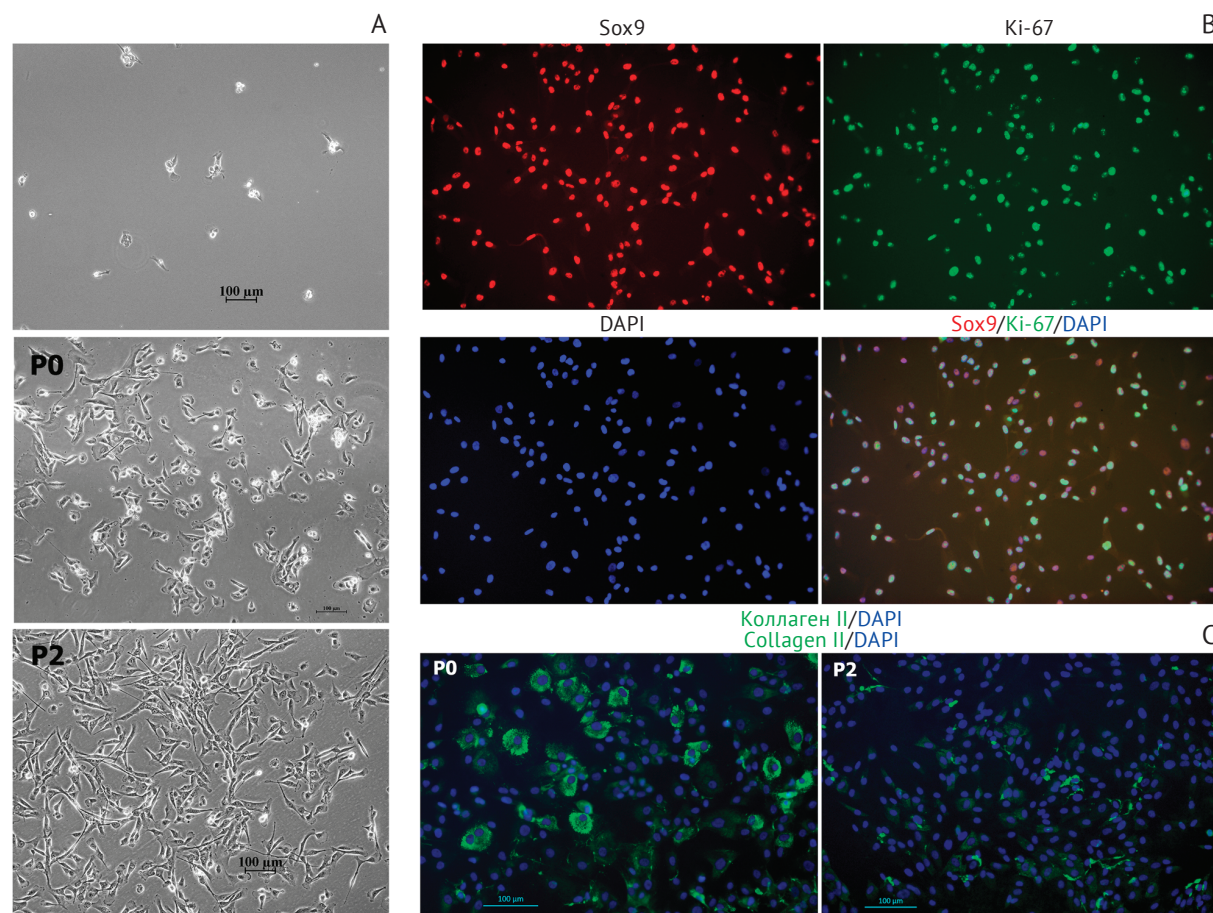
Характеристика <i>Characteristics</i>	Описание <i>Description</i>		
Культура клеток <i>Cell culture</i>	Аутологичные хондроциты человека <i>Human autologous chondrocytes</i>		
Количество пассажей <i>Number of passages</i>	Не более двух <i>Not more than two</i>		
Питательная среда <i>Culture medium</i>	Химически определенная среда (Ham's F-12; αMEM) с аутологичной сывороткой крови человека <i>Chemically defined medium (Ham's F-12; αMEM) with autologous human serum</i>		
Производственная среда <i>Production environment</i>	Изолятор класса cGMP, класс чистоты A/ISO 5 <i>cGMP grade isolator, cleanliness grade A/ISO 5</i>		
Параметры изолятора клеточных культур <i>Cell culture isolator parameters</i>	Концентрация CO ₂ в инкубаторе <i>Incubator CO₂ levels</i>	4–6%	
	Температура в инкубаторе <i>Incubator temperature</i>	36–38 °C	
	Скорость ламинарного потока <i>Laminar flow velocity</i>	0,36–0,54 м/с <i>0.36–0.54 m/s</i>	
	Избыточное давление в камере <i>Chamber overpressure</i>	Не менее 50 Па <i>Not less than 50 Pa</i>	
	Нормы концентрации аэрозольных частиц в зоне чистоты класса А <i>Maximum permitted airborne particle concentration for Grade A clean zones</i>	Частицы размером более 0,5 мкм — не более 3520/м ³ <i>Not more than 3,520 particles above 0.5 μm per m³</i>	
		Частицы размером более 5,0 мкм — не более 20/м ³ <i>Not more than 20 particles above 5.0 μm per m³</i>	
	Пределы микробной контаминации для класса чистоты А <i>Microbial contamination limits for Grade A clean zones</i>	<1 КОЕ/чашку Петри за 4 ч методом седиментации <i><1 CFU/settle plate in 4 h (sedimentation method)</i>	
		<1 КОЕ/м ³ воздуха методом аспирации <i><1 CFU/m³ (aspiration method)</i>	
<1 КОЕ/пластину методом отпечатка <i><1 CFU/contact plate (imprint method)</i>			
Продукт <i>Product</i>	Суспензия сфероидов для внутрисуставного введения в 0,9% растворе натрия хлорида <i>Spheroid suspension for intra-articular injection in 0.9% sodium chloride solution</i>		
Дозировка БМКП <i>CBMP dosage</i>	10–70 сфероидов на 1 см ² дефекта суставного хряща <i>10–70 spheroids per 1 cm² of joint cartilage defect</i>		

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. КОЕ — колониеобразующая единица, БМКП — биомедицинский клеточный продукт.
Note. CFU, colony-forming unit; CBMP, cell-based medicinal product.

Таким образом, культивирование хондроцитов, выделенных из биоптата хряща, позволяет в течение одного-двух пассажей получить необходимое количество клеток для трансплантации и восстановления поврежденной хрящевой ткани. Однако культивирование хондроцитов в виде монослойной культуры имело существенный недостаток — во время пассажей происходила дедифференцировка хондроцитов с утратой характерного фенотипа. Клетки приобретали вытянутую, веретенообразную форму, напоминающую фибробласты (рис. 3А, Р2). Анализ основных хондрогенных маркеров (агрекан, коллаген типа II, Sox9) с помощью иммуноцитохимического окрашивания выявил изменения

уровня их экспрессии при культивировании хондроцитов в монослой. Продукция характерного для гиалинового хряща коллагена типа II снижалась, в то время как продукция коллагена типа I повышалась (рис. 3С). Эти результаты согласуются с описанными в литературе данными [21, 22]. Ранее было показано, что при трансплантации дедифференцированных хондроцитов происходило формирование волокнистого хряща с низкими биомеханическими свойствами [23–25], что ограничило применение клеток, культивируемых в виде монослоя, для восстановления поврежденного хряща и потребовало дополнительной разработки клеточного продукта на основе хондроцитов.



Фотографии выполнены авторами / The photographs are taken by the authors

Рис. 3. Культивирование хондроцитов из биоптата хряща в монослойной культуре. А — прикрепление выделенных хондроцитов к поверхности культурального флакона (верхняя фотография), морфология клеток на первичном (нулевом) пассаже (фотография P0) и втором пассаже (фотография P2); фазово-контрастная микроскопия; В — выявление маркера хондроцитов Sox9 (красный цвет) и маркера пролиферирующих клеток Ki-67 (зеленый цвет); иммуноцитохимическое окрашивание на первом пассаже; ядра клеток докрашены красителем DAPI (синий цвет); С — снижение уровня экспрессии коллагена типа II при культивировании хондроцитов в монослой от нулевого (P0) до второго пассажа (P2), иммуноцитохимическое окрашивание.

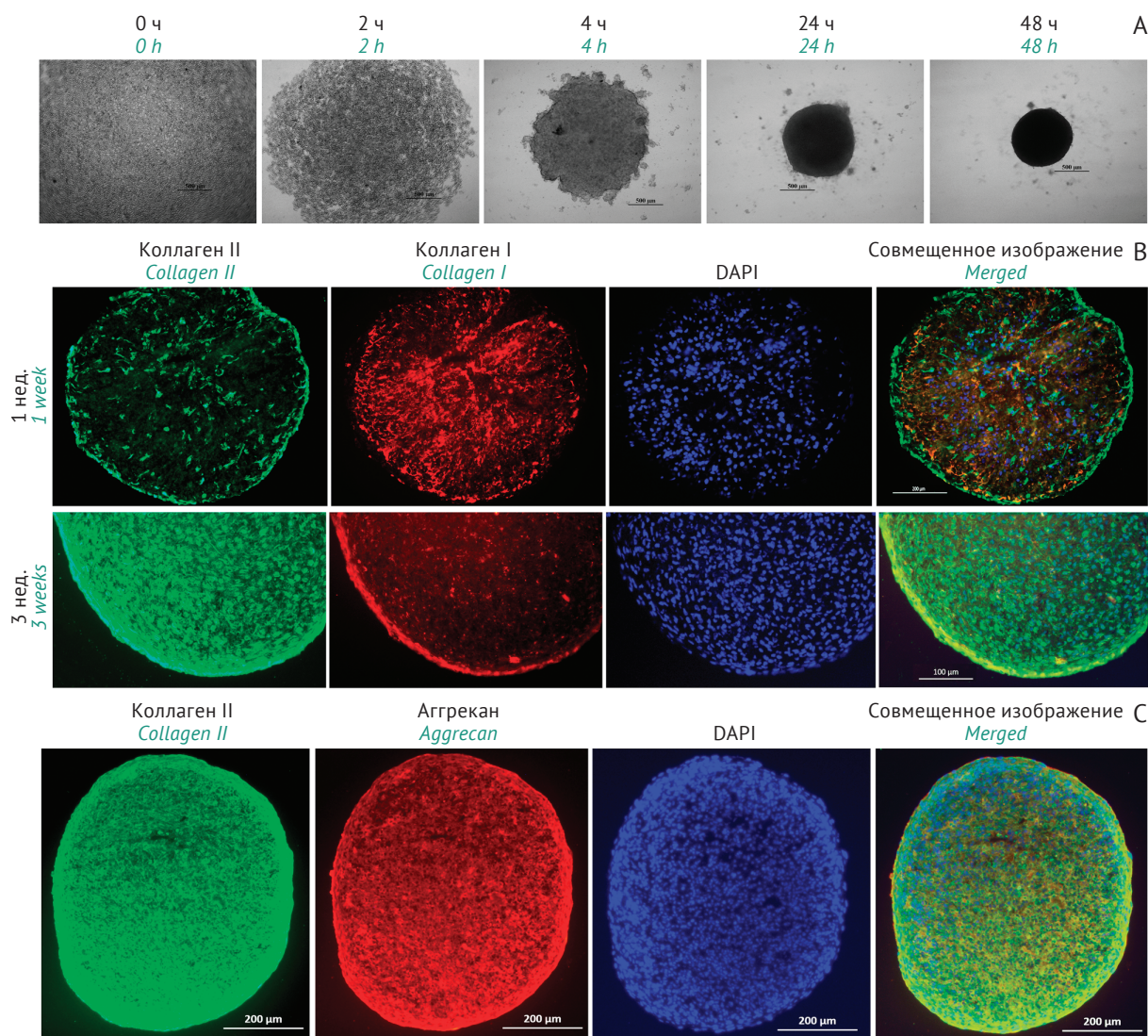
Fig. 3. Cultivation of chondrocytes in monolayer culture. A: attachment of isolated chondrocytes to the culture flask surface (top), cell morphology during the initial (baseline) passage (P0) and the second passage (P2) visualised by phase-contrast microscopy. B: immunocytochemical detection of Sox9, a chondrocyte marker (red), and Ki-67, a cell proliferation marker (green), visualised by immunocytochemical staining at the first passage, with nuclei counterstained with DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). C: reduction of collagen II expression in monolayer culture of chondrocytes from the baseline passage (P0) through the second passage (P2) visualised by immunocytochemical staining.

Получение сфероидов

Одним из способов редифференцировки хондроцитов является помещение их в условия трехмерной модели культивирования с формированием сфероидов, что способствует стимуляции экспрессии ключевых белковых маркеров хрящевой ткани [26–28]. Для производства БМКП хондроциты высевали в лунки с неадгезивным покрытием, которое препятствует прикреплению клеток ко дну лунок, повышая их адгезию друг к другу и, таким образом, способствуя образованию трехмерной клеточной структуры (сфероидов) (рис. 4А). В лунках в течение 2–3 нед. происходила агрегация хондроцитов

и формирование сфероидов без какого-либо физического, химического или иного стимулирующего воздействия.

Переход к культивированию дедифференцированных хондроцитов в трехмерной системе индуцировал их редифференцировку, что сопровождалось восстановлением морфологических и функциональных свойств клеток. В течение 1 нед. культивирования сфероидов интенсивность окрашивания коллагена типа I оставалась более высокой в сравнении с коллагеном типа II, который выявлялся только в отдельных клетках. В течение следующих 2 нед. уровень коллагена типа II значительно



Фотографии выполнены авторами / The photographs are taken by the authors

Рис. 4. Культивирование сфероидов из хондроцитов, выделенных из биоптата хряща. А — формирование сфероидов в лунках с неадгезивным покрытием через 0, 2, 4, 24 и 48 ч; фазово-контрастная микроскопия; В — переключение синтеза с коллагена типа I на коллаген типа II при культивировании сфероидов от 1 до 3 нед.: экспрессия маркера хрящевой ткани коллагена типа II (зеленый цвет) увеличивалась к 3 нед. культивирования, тогда как экспрессия коллагена типа I (красный цвет) снижалась; иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем DAPI (синий цвет); С — экспрессия маркеров хрящевой ткани — коллагена II (зеленый цвет) и агрекана (красный); иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем DAPI (синий цвет).

Fig. 4. Cultivation of spheroids from chondrocytes isolated from a cartilage biopsy. A: formation of spheroids in culture plate wells with a non-adhesive coating in 0, 2, 4, 24, and 48 h, visualised by phase-contrast microscopy. B: switching from collagen I to collagen II synthesis during spheroid cultivation for 1 to 3 weeks with the expression of collagen II, a cartilage marker, increasing (green) and the expression of collagen I declining (red) by week 3, visualised by immunocytochemical staining, with nuclei counterstained with DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). C: expression of the cartilage-specific markers, collagen II (green) and aggrecan (red), visualised by immunocytochemical staining, with nuclei counterstained with DAPI (blue).

повышался, при этом интенсивность окрашивания была равномерной по всему сфероиду — не только в клетках, но и в межклеточном пространстве, что свидетельствует о формировании характерного для хрящевой ткани внеклеточного матрикса. Одновременно с этим снижался уровень экспрессии коллагена типа I, при этом окрашивание наблюдалось,

главным образом, в плоских клетках наружного слоя сфероидов, что имитировало образование слоя, подобного надхрящнице (рис. 4В). Через 2–3 нед. культивирования сфероидов в клетках наблюдалась устойчивая экспрессия характерных белков хрящевой ткани — коллагена типа II и агрекана, при незначительном уровне коллагена типа I (рис. 4С).

Полученные результаты подтверждают, что в сфероиде хондроциты находятся на более высоком уровне дифференцировки по сравнению с клетками в монослойной культуре, продуцируют характерные для матрикса хрящевой ткани белки, приобретая таким образом способность к быстрой адгезии сфероидов к хрящевой ткани и восстановлению поврежденного хряща.

Генетическая стабильность культивируемых хондроцитов

Генетическая стабильность культивируемых клеточных линий, используемых в производстве БМКП, является одним из обязательных условий обеспечения безопасности клеточной терапии [29]. В Европейском союзе в соответствии с Директивой Еврокомиссии 2009/120/ЕС⁴ кариологическая характеристика и генетическая стабильность используемой клеточной линии определены как одни из важнейших показателей при оценке качества и безопасности препарата для клеточной терапии.

Оценку генетической стабильности культивируемых хондроцитов проводили методом кариотипирования дифференциально окрашенных метафазных хромосом, позволяющим выявить численные и крупные структурные хромосомные аномалии. Анализ кариотипа включал подсчет числа хромосом в клетке, а также выявление структурных аномалий (одиночные и парные фрагменты; дицентрические, кольцевые, атипичные моноцентрические хромосомы). Клетки имели диплоидный набор хромосом, кариотип соответствовал нормальному кариотипу человека (46 XX или 46 XY) (рис. 5). При культивировании в течение не менее трех пассажей не было выявлено структурных и численных хромосомных аномалий, носящих клональный характер.

В производстве БМКП использовались хондроциты, культивируемые *in vitro* не более двух пассажей. Анализ кариотипа хондроцитов на третьем пассаже (пассаж 3 превышает лимит культивирования, необходимый для производства препарата) подтвердил хромосомную стабильность культивируемых хондроцитов, что свидетельствует о генетической безопасности БМКП.

При подсчете количества удвоений популяции (показатель PDL) было установлено, что при культивировании хондроцитов в течение двух пассажей происходило

от 7,5 до 10,7 удвоения популяции, в среднем $8,9 \pm 1,24$. Таким образом, значение показателя PDL не более 10 можно считать максимальным для ограничения длительности культивирования хондроцитов с целью сохранения генетической стабильности.

Разработка стратегии контроля качества биомедицинского клеточного продукта

БМКП на основе сфероидов из аутологичных хондроцитов человека, связанных матриксом, имеет короткий срок годности (72 ч) и ограниченный объем серии, предназначенный для введения пациенту, для которого был получен продукт. В связи с этим для выполнения всех испытаний, необходимых для подтверждения качества продукта и соответствия требованиям приказа Минздрава России № 14н⁵, на различных этапах производственного цикла отбирают образцы для проведения контроля по соответствующим показателям.

Стерильность БМКП является критическим показателем качества. Данный показатель контролировали 4 раза на протяжении производственного процесса, начиная с контроля стерильности транспортной среды, в которой поставляется образец хрящевой ткани, и заканчивая ретроспективным контролем стерильности готового продукта. Для исключения возможности получения неверных результатов, вызванных человеческим фактором, и повышения чувствительности метода для контроля стерильности внедрен автоматизированный колориметрический метод (система BacT/ALERT® 3D DualT).

Контроль подлинности и специфической активности продукта проводили путем детекции экспрессии генов, характерных для хондроцитов человека, методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с последующим электрофорезом в агарозном геле. Наличие экспрессии маркерных генов свидетельствует о том, что клетки в составе готового продукта обладают требуемыми характеристиками для восстановления поврежденной хрящевой ткани гиалинового типа. Определение жизнеспособности и количества клеток в составе сфероида проводили параллельно с процедурой упаковки готового продукта [20].

Стратегия контроля качества серии продукта обеспечивает готовность всех показателей качества к моменту отгрузки в медицинскую организацию за исключением завершающего

⁴ Commission directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products.

⁵ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».



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

Рис. 5. Кариотип культивируемых хондроцитов человека, использованных при производстве биомедицинского клеточного продукта, на третьем пассаже (объектив $\times 100$). А – 46 XX; В – 46 XY.

Fig. 5. Karyotype of cultured (third-passage) human chondrocytes used in the production of the cell-based medicinal product ($\times 100$ magnification). A, 46 XX; B, 46 XY.

ретроспективного контроля стерильности готового продукта. По причине технической невозможности получить все результаты контроля к моменту отгрузки, выпуск продукта происходит в два этапа в соответствии с порядком, описанном в приказе Минздрава России № 512н⁶. На первом этапе ответственные за производство и контроль качества проводят оценку записей, относящихся к процессу производства серии БМКП, и результатов мониторинга среды помещений, условий производства, отклонений от установленных процедур и контрольных результатов для первичного выпуска серии БМКП. После получения всех результатов уполномоченное лицо оценивает полностью сформированное досье на серию БМКП для заключительного подтверждения соответствия требованиям, установленным при государственной регистрации.

Клиническое применение биомедицинского клеточного продукта

В клиническое исследование были включены пациенты в возрасте от 18 до 49 лет, средний возраст составил $33,5 \pm 8,7$ года. В соответствии с размером дефекта хряща коленного сустава пациенты были разделены на 2 группы: группа I – 52 пациента с размером дефекта от ≥ 1 до < 4 см², группа II – 52 пациента с размером дефекта от ≥ 4 до < 10 см². Статистически значимых отличий по показателям возраста, роста, массы тела и индекса массы тела между группами не выявлено ($p > 0,05$). Группы были также сопоставимы по причинам формирования дефектов хряща коленного сустава ($p > 0,05$) (табл. 2).

Анализ динамики общего балла по Шкале KOOS через 12 мес. после введения БМКП на основе сфероидов показал статистически значимое улучшение относительно исходного уровня ($p < 0,0001$). Среднее изменение общего

⁶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 8.08.2018 № 512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами».

балла KOOS составило $23,8 \pm 15,91$, более выраженное у пациентов группы II ($28,12 \pm 15,11$) в сравнении с пациентами группы I ($19,14 \pm 15,59$).

При анализе оценок по подшкалам KOOS был получен такой же качественный результат, что и при оценке общего балла KOOS, а именно улучшение оценок по каждой подшкале через 12 мес. после трансплантации по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,0001$). Средние значения изменений по подшкалам KOOS варьировали от $16,1 \pm 14,41$ до $35,1 \pm 28,76$.

Полученные результаты анализа общей оценки MPT по шкале MOCART также продемонстрировали улучшение состояния хрящевой ткани коленных суставов через 12 мес. после трансплантации в обеих группах пациентов и суммарно ($p < 0,0001$).

Оценка состояния суставного хряща в ходе контрольной артроскопии, проведенной у 9 пациентов группы II, показала высокую степень восстановления: у 8 из 9 пациентов степень восстановления дефекта была сравнима с окружающим хрящом и только у 1 пациента наблюдалось восстановление на 75% от глубины дефекта; интеграция относительно пограничной зоны у 5 из 9 пациентов была полной, у остальных 4 пациентов наблюдалось формирование демаркационной линии менее 1 мм. Общая оценка восстановления хряща у всех пациентов была высокой и соответствовала II степени (почти нормальное состояние), что подтверждает факт успешной трансплантации БМКП на основе сфероидов.

Дополнительно проведен анализ пролиферативной активности культивируемых хондроцитов в зависимости от возраста, половой принадлежности, диагноза пациентов.

Пролиферативная активность хондроцитов не зависела от возраста и половой принадлежности. В группах с разными диагнозами (травматическое повреждение хряща, остеоартроз и рассекающий остеохондрит) выявлены межгрупповые статистически значимые различия по показателю времени удвоения популяции ($p < 0,0001$). Наибольшей пролиферативной активностью обладали хондроциты, выделенные из хрящевой ткани пациентов с травматическим повреждением хряща и рассекающим остеохондритом: время удвоения популяции в этих группах составило $62,9 \pm 13,95$ и $67,4 \pm 15,46$ ч соответственно. Наименее активно пролиферировали хондроциты, выделенные из хрящевой ткани пациентов с остеоартрозом: время удвоения популяции в этой группе – $81,3 \pm 25,30$ ч. Однако анализ данных по изменению балла KOOS в этих группах не выявил межгрупповых статистически значимых различий через 12 мес. после трансплантации. Средние значения изменения общего балла KOOS варьировали от $22,2 \pm 19,67$ до $22,9 \pm 16,35$. Это свидетельствует об отсутствии корреляции между пролиферативной активностью культивируемых хондроцитов и эффективностью БМКП на основе этих хондроцитов.

Также не выявлено зависимости эффективности препарата от дозы, определяемой как количество трансплантированных сфероидов на квадратный сантиметр поврежденной поверхности суставного хряща. При трансплантации до 30 сфероидов на 1 см^2 дефекта хряща изменение общего балла по шкале KOOS составило $24,07 \pm 14,48$, при трансплантации 30–40 сфероидов/ см^2 – $21,83 \pm 16,66$, а более 40 сфероидов/ см^2 – $18,86 \pm 20,19$.

Таблица 2. Причины формирования дефектов хряща коленного сустава у пациентов при проведении клинического исследования биомедицинского клеточного продукта

Table 2. Causes of knee cartilage defects in the patients enrolled in the clinical trial of the cell-based medicinal product

Причина дефекта хряща <i>Cartilage defect cause</i>	Группа I, размер дефекта от ≥ 1 до $< 4 \text{ см}^2$, N (% по группе) <i>Group I, defect size from ≥ 1 to $< 4 \text{ cm}^2$, N (% of the group)</i>	Группа II, размер дефекта от ≥ 4 до $< 10 \text{ см}^2$, N (% по группе) <i>Group II, defect size from ≥ 4 to $< 10 \text{ cm}^2$, N (% of the group)</i>	Всего, N (%) <i>Total, N (%)</i>
Травматическое повреждение <i>Traumatic damage</i>	12 (23,07%)	15 (28,84%)	27 (25,96%)
Рассекающий остеохондрит <i>Dissecting osteochondritis</i>	14 (26,92%)	15 (28,84%)	29 (27,89%)
Остеоартроз <i>Osteoarthritis</i>	25 (48,08%)	22 (42,31%)	47 (45,19%)
Аваскулярный некроз <i>Avascular necrosis</i>	1 (1,92%)	0	1 (0,96%)
Всего: <i>Total:</i>	52	52	104

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология производства отечественного препарата Изитенс® (АО ГЕНЕРИУМ», РУ № БМКП № 1) в изоляторах клеточных культур валидирована и обладает повторяемостью и надежностью, что гарантирует получение аутологичного биомедицинского клеточного продукта, соответствующего требованиям спецификации на готовый продукт.

С использованием кариологического метода показано, что при производстве биомедицинского клеточного продукта сохраняется генетическая стабильность клеточной линии хондроцитов.

При проведении клинических исследований препарата продемонстрировано улучшение состояния хрящевой ткани коленных суставов через 12 мес. после трансплантации. Показано, что ни возраст, ни половая принадлежность, ни площадь дефекта не являются ограничивающими факторами для лечения повреждений

хрящевой ткани трансплантацией сфероидов из аутологичных хондроцитов. У пациентов с остеоартрозом было отмечено незначительное снижение характеристик пролиферативной активности хондроцитов по сравнению с пациентами с травматическим повреждением хряща и рассекающим остеохондритом. Производство продукта для пациентов с остеоартрозом может занять больше времени, однако подтверждено, что уровень пролиферативной активности клеток не влияет на результат лечения. Продемонстрирована высокая эффективность препарата для восстановления хрящевой ткани в установленном диапазоне дозировки трансплантируемых сфероидов.

На основании результатов КИ БМКП Изитенс® зарегистрирован биомедицинский клеточный продукт на территории Российской Федерации, введен в клиническую практику и может стать альтернативой эндопротезированию и дорогостоящим операциям за рубежом.

Литература/References

1. Brittberg M, Recker D, Ilgenfritz J, Saris DBF, SUMMIT Extension Study Group. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: five-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med.* 2018;46(6):1343–51. <https://doi.org/10.1177/0363546518756976>
2. Hoburg A, Niemeyer P, Laute V, Zinser W, Becher C, Kolombe T, et al. Sustained superiority in KOOS subscores after matrix-associated chondrocyte implantation using spheroids compared to microfracture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2023;31(6):2482–93. <https://doi.org/10.1007/s00167-022-07194-x>
3. Ibarra C, Villalobos E, Madrazo-Ibarra A, Velasquillo C, Martinez-Lopez V, Izaguirre A, et al. Arthroscopic matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation versus microfracture: a 6-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med.* 2021;49(8):2165–76. <https://doi.org/10.1177/03635465211010487>
4. Mistry H, Connock M, Pink J, Shyangdan D, Clar C, Royle P, et al. Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2017;21(6):1–294. <https://doi.org/10.3310/hta21060>
5. Kikuchi T, Shimizu T. Thickness-wise growth technique for human articular chondrocytes to fabricate three-dimensional cartilage grafts. *Regen Ther.* 2020;14:119–27. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.12.001>
6. Mendes LF, Katagiri H, Tam WL, Chai YC, Geris L, Roberts SJ, et al. Advancing osteochondral tissue engineering: bone morphogenetic protein, transforming growth factor, and fibroblast growth factor signaling drive ordered differentiation of periosteal cells resulting in stable cartilage and bone formation in vivo. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):42. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0787-3>
7. Song H, Du H, Li J, Wang M, Wang J, Ju X, Mu W. Effect of fibroblast growth factor 2 on degenerative endplate chondrocyte: from anabolism to catabolism. *Exp Mol Pathol.* 2021;118:104590. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104590>
8. Wang X, Xue Y, Ye W, Pang J, Liu Z, Cao Y, et al. The MEK-ERK1/2 signaling pathway regulates hyaline cartilage formation and the redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes in vitro. *Am J Transl Res.* 2018;10(10):3068–85. PMID: 30416651
9. Gurusinge S, Bandara N, Hilbert B, Trope G, Wang L, Strappe P. Lentiviral vector expression of Klf4 enhances chondrogenesis and reduces hypertrophy in equine chondrocytes. *Gene.* 2019;680:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.013>
10. Varela-Eirín M, Varela-Vázquez A, Guitián-Caamaño A, Páino CL, Mato V, Largo R, et al. Targeting of chondrocyte plasticity via connexin43 modulation attenuates cellular senescence and fosters a pro-regenerative environment in osteoarthritis. *Cell Death Dis.* 2018;9(12):1166. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1225-2>
11. Bachmann B, Spitz S, Schädli B, Teuschl A, Redl H, Nürnberger S, et al. Stiffness matters: fine-tuned hydrogel elasticity alters chondrogenic redifferentiation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:373. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00373>
12. Hu X, Zhang W, Li X, Zhong D, Li Y, Li J, Jin R. Strategies to modulate the redifferentiation of chondrocytes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:764193. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.764193>
13. Eschen C, Kaps C, Widuchowski W, Fickert S, Zinser W, Niemeyer P, Roël G. Clinical outcome is significantly better with spheroid-based autologous chondrocyte implantation manufactured with more stringent cell culture criteria. *Osteoarthritis Cartil Open.* 2020;2(1):100033. <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100033>
14. Vonk LA, Roël G, Hernigou J, Kaps C, Hernigou P. Role of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroids in the treatment of large chondral defects in the knee: a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):7149. <https://doi.org/10.3390/ijms22137149>
15. Guillén-García P, Guillén-Vicente I, Rodríguez-Iñigo E, Guillén-Vicente M, Fernández-Jaén TF, Navarro R, et al. Cartilage defect treatment using high-density autologous chondrocyte implantation (HD-ACI). *Bioengineering (Basel).* 2023;10(9):1083. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10091083>

16. Шустер АМ, Ручко СВ, Шукин МВ, Александров ВН, Говоров ИВ, Григорьева ОВ и др. Опыт создания промышленной линии для производства клеточных продуктов по изоляторной технологии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2014;(4):37–41.
Shuster AM, Ruchko SV, Schukin MV, Alexandrov VN, Govorov IV, Grigorieva OV, et al. Construction experience of industrial line for the production of cellular products based on isolator technology. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2014;(4):37–41 (In Russ.).
EDN: [TBRITF](#)
17. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710–5.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.133.4.1710>
18. Ozkinay C, Mitelman F. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. 1979;90(1):1–4.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x>
19. van den Borne MP, Rajmakers N, Vanlauwe J, Victor J, de Jong S, Bellemans J, et al. International Cartilage Repair Society. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(12):1397–402.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.05.005>
20. Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Меркулова ОВ, Семенова ИС, Кожевникова ЕО, Меркулов ВА. Методические аспекты разработки нормативной документации на биомедицинский клеточный продукт. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(2):122–35.
Melnikova EV, Rachinskaya OA, Merkulova OV, Semenova IS, Kozhevnikova EO, Merkulov VA. Methodological aspects of the development of product files for biomedical cell products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):122–35 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-122-135>
21. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*. 2005;23(2):425–32.
<https://doi.org/10.1016/j.ortres.2004.08.008>
22. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vécsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(2):286–95.
<https://doi.org/10.1302/0301-620X.86b2.14918>
23. Tew SR, Clegg PD. Analysis of post transcriptional regulation of SOX9 mRNA during in vitro chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(13–14):1801–7.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0579>
24. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(374):212–34.
<https://doi.org/10.1097/00003086-200005000-00020>
25. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison P, et al. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):60–73.
<https://doi.org/10.1186/ar613>
26. Benay PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes re-express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;30(1):215–24.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90027-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90027-7)
27. Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 1994;212(1):97–104.
<https://doi.org/10.1006/excr.1994.1123>
28. Martinez I, Elvenes J, Olsen R, Bertheussen K, Johansen O. Redifferentiation of *in vitro* expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. *Cell Transplant*. 2008;17(8):987–96.
<https://doi.org/10.3727/096368908786576499>
29. Рачинская ОА, Меркулов ВА. Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):25–32.
Rachinskaya OA, Merkulov VA. Use of cytogenetic analysis methods for assessing the quality of cell lines in biomedical cell products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):25–32 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-25-32>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Зоричева** — концепция и дизайн исследования, выполнение экспериментальных работ, обработка и анализ данных, написание текста рукописи, формулировка выводов; **Е.А. Звонова** — дизайн исследования, анализ данных, написание и критическое обсуждение текста рукописи; **Л.С. Агапова** — выполнение экспериментальных работ, написание и критическое обсуждение текста рукописи, формулировка выводов; **М.С. Лыкова** — выполнение экспериментальных работ, критическое обсуждение и доработка текста рукописи; **О.А. Маркова** — планирование эксперимента, обработка данных, написание текста рукописи, формулировка выводов; **В.С. Леонов** — концепция работы, формулировка выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Zoricheva** conceptualised and designed the study, conducted experimental work, processed and analysed data, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **E.A. Zvonova** designed the study, analysed data, drafted and critically discussed the manuscript. **L.S. Agapova** conducted experimental work, drafted and critically discussed the manuscript, and formulated the conclusions. **M.S. Lykova** conducted experimental work, critically discussed and revised the manuscript. **O.A. Markova** designed the experiment, processed data, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **V.S. Leonov** conceptualised the study, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования одобрен Минздравом России (разрешение на проведение клинического исследования БМКП № 1 от 12.03.2021), Советом по этике Минздрава России (выписка из протокола № 1 от 10.08.2020) и независимыми локальными этическими комитетами клинических центров. Клиническое исследование проводилось в соответствии с этическими принципами медицинских исследований с участием человека, изложенными в Хельсинкской декларации.

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие участников исследования на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью, в том числе на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

Благодарности. Авторы благодарны коллективу АО «ГЕНЕРИУМ» за помощь в организации экспериментальной работы и сборе данных.

Ethics approval. The study was approved by the Russian Ministry of Health (cell-based medicinal product clinical trial authorisation No. 1 of 12 March 2021), the Ethics Council of the Ministry of Health (meeting minutes No. 1 of 10 August 2020), and the independent local ethics committees of the clinical centres involved. The study was conducted in full compliance with the ethical principles for medical research involving human subjects described in the Declaration of Helsinki.

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information, as well as for its use and anonymised publication for scientific and educational purposes.

Acknowledgements. The authors are grateful to the team of GENERIUM JSC for their help in experiment organisation and data collection.

Об авторах / Authors

Зоричева Анастасия Сергеевна / Anastasia S. Zoricheva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2851-217X>

Звонова Елизавета Александровна, канд. биол. наук / Elizaveta A. Zvonova, Cand. Sci (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7152-6881>

Агапова Лариса Степановна, канд. биол. наук / Larissa S. Agapova, Cand. Sci (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3727-7406>

Лыкова Мария Сергеевна, канд. биол. наук / Mariya S. Lykova, Cand. Sci (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-2061-321X>

Маркова Оксана Анатольевна / Oksana A. Markova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1179-3881>

Леонов Вячеслав Сергеевич, канд. биол. наук / Vyacheslav S. Leonov, Cand. Sci (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5863-0267>

Поступила 08.04.2024

После доработки 17.05.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 8 April 2024

Revised 17 May 2024

Accepted 21 June 2024



Кинетика накопления в клетках флуоресцентно-меченного олигонуклеотида при использовании адресных фолатсодержащих катионных липосом

Е.В. Шмендель¹, О.В. Марков², М.А. Зенкова², М.А. Маслов^{1,✉}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, просп. Вернадского, д. 86, Москва, 119571, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, проспект Академика Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090, Российская Федерация

✉ Маслов Михаил Александрович; maslov_m@mirea.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Использование катионных липосом является перспективным подходом для доставки терапевтических нуклеиновых кислот (НК) в клетки-мишени, так как позволяет защитить НК от деградации внеклеточными нуклеазами. Однако для обеспечения селективной доставки НК к месту терапевтического действия данный подход нуждается в совершенствовании, в том числе за счет модификации поверхности липосом адресными лигандами.

ЦЕЛЬ. Проведение сравнительного исследования кинетики накопления в клетках флуоресцентно-меченного олигонуклеотида (модельного препарата нуклеиновых кислот) с помощью адресных фолатсодержащих катионных липосом и обычных липосом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Адресные фолатсодержащие катионные липосомы (F) и обычные липосомы (L) готовили с использованием следующих компонентов: поликатионный амфифил 2X3, цвиттер-ионный липид DOPE, фолатный липоконъюгат F12. Физико-химические характеристики липосом изучали с помощью методов динамического светорассеяния и трансмиссионной электронной микроскопии. Комплексы липосом с флуоресцентно-меченым олигонуклеотидом (FITC-ODN) формировали с использованием различных соотношений компонентов (N/P). Кинетика накопления комплексов на клетках рака шейки матки человека (линия KB-3-1) и почки эмбриона человека (линия HEK 293) была изучена с помощью методов проточной цитометрии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Полученные липосомы L и F представляли собой сферические частицы диаметром от 75 до 100 нм. Сформированы комплексы катионных липосом (L и F) с FITC-ODN при оптимальном соотношении N/P, равном 2/1, при котором наблюдается образование однородных (индекс полидисперсности меньше 0,200) частиц с размером 112,4–125,1 нм. Фолатсодержащие липосомы на 25% эффективнее доставляли FITC-ODN в клетки KB-3-1 через 90, 120 и 240 мин после начала трансфекции по сравнению с обычными липосомами, не содержащими адресного лиганда. Согласно данным флуоресцентной и конфокальной микроскопии после начала трансфекции клеток наблюдалась совместная колокализация флуоресцентных сигналов липосом и олигонуклеотида и далее происходило накопление олигонуклеотида в цитоплазме.

ВЫВОДЫ. Показана эффективная доставка флуоресцентно-меченного олигонуклеотида в цитоплазму опухолевых клеток с помощью катионных липосом. Использование адресных фолатсодержащих липосом позволяет увеличить количество трансфицированных клеток и эффективность доставки олигонуклеотида по сравнению с обычными липосомами.

ми, не содержащими адресного лиганда. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшей разработки препаратов направленного действия на основе терапевтических нуклеиновых кислот и липосом.

Ключевые слова: терапевтическая нуклеиновая кислота; антисмысловой олигонуклеотид; флуоресцентно-меченный олигонуклеотид; липосома; фолат; адресная доставка; адресные фолатсодержащие катионные липосомы; кинетика накопления; опухолевые клетки

Для цитирования: Шмендель Е.В., Марков О.В., Зенкова М.А., Маслов М.А. Кинетика накопления в клетках флуоресцентно-меченного олигонуклеотида при использовании адресных фолатсодержащих катионных липосом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):188–199. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-188-199>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-73-10168. Работа Маркова О.В. и Зенковой М.А. поддержана в рамках бюджетного финансирования Российской Федерации, проект № 121031300044-5.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Time course of fluorescent-labelled oligonucleotide accumulation in cells with the use of folate receptor-targeted cationic liposomes

Elena V. Shmendel¹, Oleg V. Markov², Marina A. Zenkova², Mikhail A. Maslov^{1, ✉}

¹ MIREA – Russian Technological University, Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, 86 Vernadsky Ave, Moscow 119571, Russian Federation

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8 Academician Lavrentyev Ave, Novosibirsk 630090, Russian Federation

✉ Mikhail A. Maslov; maslov_m@mirea.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The use of cationic liposomes is a promising approach to the delivery of therapeutic nucleic acids to target cells because liposomes can protect nucleic acids from degradation by extracellular nucleases. However, to ensure selective delivery to the site of action, this approach needs modification, including liposome surface functionalisation with targeting ligands.

AIM. This study aimed to compare the time courses of the accumulation of a fluorescent-labelled oligonucleotide (FITC-ODN), which simulated a nucleic acid-based medicinal product, in cells with the use of folate receptor-targeted (F) and conventional (L) cationic liposomes.

MATERIALS AND METHODS. F- and L-liposomes were prepared using the polycationic amphiphile 2X3, the zwitterionic helper lipid DOPE, and the folate lipoconjugate F12. Physicochemical characterisation of the liposomes was performed using dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Liposome–FITC-ODN complexes were formed at various nitrogen to phosphate (N/P) charge ratios. Flow cytometry, fluorescence microscopy, and confocal microscopy methods were used to study the accumulation of liposome–FITC-ODN complexes in human cervical carcinoma (KB-3-1) and human embryonic kidney (HEK 293) cells.

RESULTS. The prepared F- and L-liposomes were spherical particles with a diameter of 75–100 nm. The authors selected the optimal N/P ratio of 2/1 to obtain complexes of F- and L-liposomes with the FITC-ODN. This N/P ratio yielded homogeneous liposome–FITC-ODN complexes having a polydispersity index below 0.200 and a size of 112.4–125.1 nm. F-liposomes were 25% more efficient than L-liposomes in FITC-ODN delivery to KB-3-1 cells at 90, 120, and 240 minutes after transfection. In the first few minutes of cell transfection, fluorescence and confocal microscopy data on the distribution of liposome–FITC-ODN complexes showed that cationic liposome fluorescence signals colocalised with FITC-ODN signals. Later, FITC-ODN accumulation in the cytoplasm was observed.

CONCLUSIONS. Cationic liposomes demonstrated efficient FITC-ODN delivery into the cytoplasm of cancer cells. F-liposomes enhanced the percentage of transfected cells and improved FITC-ODN delivery compared with L-liposomes. The results obtained can be used in the further development of targeted medicinal products based on therapeutic nucleic acids and liposomes.

Keywords: therapeutic nucleic acids; antisense oligonucleotide; fluorescent-labelled oligonucleotide; liposome; folate; targeted delivery; folate receptor-targeted cationic liposomes; accumulation time course; cancer cells

For citation: Shmendel E.V., Markov O.V., Zenkova M.A., Maslov M.A. Time course of fluorescent-labelled oligonucleotide accumulation in cells with the use of folate receptor-targeted cationic liposomes. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):188–199. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-188-199>

Funding. The study reported in this publication was funded by the Russian Science Foundation, Project No. 23-73-10168. O.V. Markov and M.A. Zenkova received public funding from the government of the Russian Federation, Project No. 121031300044-5.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия — новый подход для лечения наследственных и приобретенных заболеваний, в том числе онкологических, который направлен на исправление функционирования дефектных генов [1]. На основе различных типов терапевтических нуклеиновых кислот (НК) разработаны высокоспецифичные лекарственные средства нового поколения, обладающие потенциалом для перехода к персонализированной терапии. Показано, что введение плазмидной ДНК (pDNA) или мРНК (mRNA) в эукариотические клетки, приводит к экспрессии правильной копии гена и синтезу экзогенного белка. Для подавления сверхэкспрессии гена могут быть использованы антисмысловые олигонуклеотиды (ODN), малые интерферирующие РНК (siRNA), микроРНК, рибозимы и ДНКзимы. Перспективным направлением генной терапии является редактирование генома с помощью технологии CRISPR-Cas [2].

Главным ограничением в использовании терапевтических НК является высокая скорость деградации под действием внеклеточных нуклеаз, что снижает стабильность и терапевтическую эффективность НК [3]. Для решения указанной проблемы перспективной представляется разработка транспортной системы, способной осуществлять доставку НК в эукариотические клетки. Пример реализации такого подхода — препарат Gendicine (SiBiono GeneTech Co. Ltd, Китай), первый одобренный генотерапевтический препарат, предназначенный для терапии плоскоклеточного рака головы и шеи. Препарат представляет собой рекомбинантный аденовирус, содержащий последовательность проапоптотического белка p53 [4]. Вирусные системы доставки обладают рядом недостатков, к которым относятся онкогенность, иммуногенность,

ограниченный размер переносимой НК и высокая стоимость [5]. В связи с этим разрабатываются невирусные системы доставки — катионные липосомы [6, 7], полимеросомы [8], дендримеры [9], магнитные наночастицы [10], экзосомы [11]. Особенно широкое распространение получили системы доставки НК на основе липосом и липидных наночастиц, для формирования которых могут быть использованы природные и синтетические липиды: катионные, анионные, нейтральные или их смеси [12]. Такие системы были применены при создании мРНК-вакцин против COVID-19: mRNA-1273 (Moderna, США) и BNT162b2 (Pfizer/BioNTech, США) на основе мРНК, инкапсулированной в липидные наночастицы, состоящие из ионизируемого липида, холестерина и липидного производного полиэтиленгликоля (ПЭГ) [13].

Для решения проблемы селективного проникновения НК в клетки-мишени поверхность липидных частиц может быть функционализирована различными адресными лигандами. Например, моноклональные антитела или их фрагменты могут быть использованы для нацеливания на рецепторы опухолевых клеток: CD44, CD147, CD133, CD321 [12]. Антитела OX26 и RI7217 применяли для направленной доставки липосом к опухолевым клеткам с высокой экспрессией рецептора трансферрина [14, 15]. Гиалуроновая кислота в качестве адресной молекулы была использована для доставки к рецептору CD44 опухолевых клеток (рак поджелудочной железы, молочной железы и легких) [16]. В качестве низкомолекулярного лиганда для доставки НК в составе липидных частиц перспективным представляется применение фолиевой кислоты, которая связывается с фолатными рецепторами (FR), высокоэкспрессированными на поверхности опухолевых клеток различных

типов: плоскоклеточный рак эндометрия [17, 18], рак яичников [18, 19], шейки матки [18, 20], толстой кишки [21], почек [22], хориокарцинома [18], менингиома [23], остеосаркома [24], неходжкинская лимфома [20].

Фолатсодержащие катионные липосомы были использованы для доставки антисмысловых ODN [25], FITC-ODN [26], pDNA [22, 27], иммуностимулирующих РНК [27] *in vitro* и *in vivo*. Для обеспечения селективности доставки НК при разработке фолатсодержащих катионных липосом необходимо провести подбор соотношения N/P (соотношение между количеством положительно заряженных атомов азота поликатионного липида липосом — N, к количеству отрицательно заряженных фосфатных групп НК — P) [22], оценить физико-химические характеристики как катионных липосом, так и их комплексов с НК.

Ранее авторами была показана возможность эффективной адресной доставки НК в эукариотические клетки *in vitro* и *in vivo* с использованием липосом, в состав которых входили: поликатионный амфифил 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид) [28], необходимый для связывания НК; цвиттер-ионный липид DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин), обеспечивающий эффективное высвобождение НК из эндосом; адресный липоконъюгат F12 (рис. 1А), в котором адресный лиганд — остаток фолиевой кислоты связан через ПЭГ с диглицеридом [22, 26, 27]. Важной особенностью этих липосом является способность трансфицировать эукариотические клетки в присутствии сыворотки крови в культуральной среде. Также было показано, что при соотношениях N/P — 1/1 или 2/1 фолатсодержащие липосомы доставляют НК в клетки, экспрессирующие рецепторы фолиевой кислоты, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза [22]. Однако дополнительных исследований, связанных с изучением кинетики накопления комплексов НК с катионными липосомами и их внутриклеточного распределения, ранее не проводилось.

Цель работы — проведение сравнительного исследования кинетики накопления в клетках флуоресцентно-меченного олигонуклеотида (модельного препарата нуклеиновых кислот) с помощью адресных фолатсодержащих катионных липосом и обычных липосом.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- получение адресных фолатсодержащих и обычных катионных липосом;
- изучение физико-химических характеристик

липосом методами динамического светорассеяния и электронной микроскопии;

- формирование комплексов катионных липосом с FITC-ODN;
- изучение кинетики накопления полученных комплексов на клеточных культурах KB-3-1 и HEK 293 с помощью проточной цитометрии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовались липиды — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин и фосфатидилэтаноламин, меченный родамином В (Avanti Polar Lipids, США); флуоресцеин (FITC, ЛенРеактив, Россия); Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США); органические растворители — хлороформ для ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ (Merck, Sigma-Aldrich, США). Для получения катионных липосом использовался поликатионный липид 2X3 и фолатсодержащий липоконъюгат F12, которые были синтезированы, как описано ранее [28, 26].

Методы

Приготовление фолатсодержащих адресных и обычных катионных липосом. Все липосомы были приготовлены методом гидратации липидной пленки [29]. Для получения обычных катионных липосом (L) раствор поликатионного липида 2X3 в смеси хлороформа и метанола (5:1, об/об) добавляли к раствору DOPE в хлороформе в соотношении 1:2 (мольн.). Для приготовления адресных фолатсодержащих катионных липосом (F) к полученному раствору липидов добавляли раствор фолатного липоконъюгата F12 (2%, мольн.) в смеси хлороформа и метанола (1:1, об/об). В случае родаминов В-меченных липосом к полученному раствору липидов добавляли раствор производного фосфатидилохолина и родамина В (1%, мольн.) в хлороформе. Органические растворители упаривали, образовавшуюся липидную пленку высушивали в вакууме с использованием масляного насоса (0,01 Торр). Через 4 ч к сухой пленке добавляли 1 мл деионизированной воды (Milli-Q, США) и диспергировали при 50–60 °С до полного отслоения пленки со стенок колбы. Полученную дисперсию помещали в ультразвуковую баню (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) на 15 мин при температуре 70 °С. Катионные липосомы L и F с концентраций по поликатионному липиду 2X3 1 мМ фильтровали через стерильный фильтр (0,45 мкм Chromafil® CA-45/25, Macherey-Nagel, Германия) и хранили при 4 °С.

Определение физико-химических характеристик катионных липосом. Гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности липосом измеряли методом динамического светорассеяния (Delsa Nano C, Beckman Coulter, США) при следующих условиях: угол 173° , вязкость 0,890 сП, температура 25°C , время равновесия 3 мин, показатели преломления воды и липосом – 1,33 и 1,45. Измерения проводили при концентрации катионного липида 0,05 мМ в трех повторностях.

Размер и форму липосом определяли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100-CX-II (Jeol, Япония). Каплю липосом помещали на медно-углеродную сетку, оставляли на 2 мин, далее избыток жидкости удаляли и окрашивали сетку каплей 3% водного уранил-ацетата в течение 1,5 мин, после чего сетку сушили на воздухе. Микроскопию проводили при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении в 27000 раз.

Синтез FITC-ODN. Олигодезоксирибонуклеотид длиной 25 нуклеотидных звеньев (5'-TAC AGT GGA ATT GTA TGC CTA TTA T-3'), меченный по 5'-концу флуоресцеином (FITC-ODN), синтезировали твердофазным фосфитамидным методом и выделяли с помощью ВЭЖХ. Чистоту олигонуклеотида анализировали с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях; чистота составила 95–98%. Концентрацию FITC-ODN определили на спектрофотометре BioMate 3 (Thermo Fisher Scientific, США).

Приготовление комплексов катионных липосом с FITC-ODN. Растворы катионных липосом (25 мкл) и FITC-ODN (25 мкл) в концентрациях, соответствующих необходимому соотношению N/P, смешивали в культуральной фолатдефицитной среде FD-RPMI (Gibco, США) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, США) и инкубировали 20 мин при 24°C .

Клеточные культуры. Клетки рака шейки матки человека линии KB-3-1 и клетки почки эмбриона человека линии HEK 293 получены из банка клеточных культур института цитологии РАН (Россия). Клетки KB-3-1 и HEK 293 культивировали с использованием среды FD-RPMI с добавлением 5% FBS, антибиотиков (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,25 мкг/мл амфотерицина) в атмосфере 5% CO_2 при 37°C и регулярно пассировали для поддержания культуры клеток в экспоненциальной фазе роста.

Трансфекция клеток комплексами катионных липосом с FITC-ODN. Клетки HEK 293 и KB-3-1 высаживали в 24-луночные планшеты ($2,0 \times 10^5$ клеток на лунку для HEK 293 и $1,2 \times 10^5$ – для KB-3-1) и инкубировали в течение 24 ч. В день транс-

фекции культуральную среду заменяли на среду FD-RPMI (200 мкл) с 5% FBS (без антибиотиков). К клеткам добавляли комплексы катионных липосом с FITC-ODN (1 мкМ), сформированные при соотношении N/P, равном 2/1, и инкубировали в стандартных условиях в течение 15, 45, 90, 120 и 240 мин. В случае контроля трансфекцию FITC-ODN проводили с использованием Lipofectamine 2000 согласно протоколу производителя.

Проточная цитометрия. После трансфекции FITC-ODN клетки KB-3-1 и HEK 293 дважды промывали PBS, обрабатывали раствором трипсина в PBS (0,5 мг/мл) в течение 2 мин при 37°C , после чего открепившиеся клетки суспендировали в среде с FBS для инактивации действия трипсина, переносили в пробирки и осаждали центрифугированием (Contron T42K, Centricon Instruments, США) при 1000 об/мин (200 г) в течение 10 мин. Супернатант убирали, клетки дважды промывали PBS и фиксировали 2% раствором формальдегида в PBS (600 мкл). Количество трансфицированных клеток и среднее значение интенсивности флуоресценции в клеточной популяции измеряли с помощью цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием программы CXP analysis (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 20000 клеток. Средние значения были получены в результате трех независимых экспериментов. Стандартное отклонение не превышало 7–9%.

Флуоресцентная и конфокальная микроскопия. Клетки KB-3-1 высаживали на покровные стекла в лунках 24-луночного планшета ($2,0 \times 10^5$ клеток на лунку), инкубировали в течение 18 ч для прикрепления и затем трансфицировали комплексами в течение 45, 90 или 120 мин в соответствии с методикой, описанной выше. Далее клетки однократно промывали PBS, фиксировали в 4% растворе формальдегида в PBS в течение 20 мин при 37°C в темноте и двукратно промывали PBS. Покровные стекла с клетками помещали на предметные стекла в каплю среды ProLong™ Glass Antifade Mountant с NucBlue™ (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в течение 18–24 ч при комнатной температуре в темноте для отверждения среды. Анализ образцов проводили с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия), объектив – Plan NEOFLUAR 40×/0,75 Ph2 и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на микроскопе LSM 710 (Zeiss, Германия), объектив – Plan-Apochromat 40×/0,95 Korr M27. Для получения фотографий использовали три

канала: синий канал (B) — визуализация ядер клеток, окрашенных красителем NucBlue (Thermo Fisher Scientific, США); зеленый канал (G) — визуализация FITC-ODN; красный канал (R) — визуализация липосом, окрашенных родамином B.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Приготовление катионных липосом и изучение их физико-химических характеристик

Были приготовлены адресные фолатсодержащие катионные липосомы (F) на основе компонентов: поликатионный амфифил 2X3 [28], цвиттер-ионный липид DOPE и фолатный липоконъюгат F12 [26] (соотношение компонентов — 33:65:2, мольн.) (рис. 1A). В качестве препарата сравнения были использованы обычные липосомы (L) на основе компонентов: 2X3, DOPE (соотношение компонентов — 1:2, мольн.) и Lipofectamine 2000 (Lf 2000). Липосомы получали методом гидратации липидной пленки с последующей обработкой ультразвуком, как описано ранее [29].

Согласно данным динамического светорассеяния размеры обычных липосом составили $75,1 \pm 1,7$ нм, а фолатных липосом — $95,7 \pm 2,5$ нм (рис. 1C), что соответствует интервалу оптимальных размеров наночастиц для использования в медицине (от 30 до 200 нм), обеспечивающему низкий уровень их выведения почками и захвата клетками ретикуло-эндотелиальной системы [30]. Индекс полидисперсности обычных липосом составил 0,280, а фолатных липосом — 0,283, что указывает на формирование однородных по размеру частиц (рис. 1D) и согласуется с данными трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 1B). Электронные микрофотографии липосом L и F показали, что они представляют собой однородные сферические частицы размером от 40 до 144 нм (рис. 1B).

Для изучения влияния физико-химических характеристик на эффективность доставки НК были сформированы комплексы катионных липосом с FITC-ODN при различных соотношениях N/P. При низких соотношениях N/P формировались крупные частицы в случае комплексов FITC-ODN как с обычными, так и фолатными липосомами. При этом максимальные размеры наблюдались при соотношении N/P, равном 1/1, для обычных липосом ($188,9 \pm 1,7$ нм) и при N/P, равном 1,25/1, для фолатных липосом ($280,4 \pm 8,5$ нм) (рис. 1B). С увеличением соотношения N/P до 2/1 и выше размеры комплексов вновь уменьшались до значений 112–125 нм. Представленные данные согласуются с нашими результатами, полученными ранее при формировании комплексов катионных липосом с плазмидной ДНК pEGFP [31].

Индекс полидисперсности комплексов фолатсодержащих липосом с FITC-ODN, начиная с соотношения N/P, равного 1,75/1, не превышал 0,200, что указывает на формирование однородных по размеру частиц (рис. 1D). В случае комплексов FITC-ODN с обычными липосомами при N/P, равном 4/1, наблюдалась большая гетерогенность. Дзета-потенциал комплексов FITC-ODN с липосомами L и F при соотношении N/P, равном 1/1, был отрицательным (-25,2 и -38,2 мВ соответственно), и с увеличением количества катионных липосом в комплексах (соотношении N/P — 2/1) дзета-потенциал становился положительным (36,1 и 42,0 мВ соответственно).

Далее трансфекцию проводили при соотношении N/P, равном 2/1. При данном соотношении механизм транспорта комплексов FITC-ODN с адресными липосомами F опосредован рецептор-опосредованным эндоцитозом, который превалирует над электростатическим взаимодействием положительно заряженных комплексов с отрицательно заряженной поверхностью мембраны клеток [26].

Изучение кинетики накопления в клетках меченного олигонуклеотида при использовании катионных липосом

Ранее нами было показано, что увеличение количества катионных липосом в составе комплекса (рост соотношения N/P) приводит к увеличению эффективности трансфекции, но при этом снижается селективность комплексов в отношении фолатных рецепторов [22]. В рамках данного исследования кинетику накопления комплексов FITC-ODN с катионными липосомами изучали в условиях культивирования клеток KB-3-1 и HEK 293 с использованием фолатдефицитной среды (FD-RPMI), что приводило к увеличению количества фолатных рецепторов на мембране клеток [22, 32]. Трансфекцию клеток осуществляли при соотношении N/P, равном 2/1. Эффективность трансфекции клеток оценивали методом проточной цитометрии, измеряя количество флуоресцентно-окрашенных трансфицированных клеток (%) и среднюю интенсивность флуоресценции в клеточной популяции, что косвенно свидетельствует о количестве FITC-ODN, попавшего в клетки (рис. 2).

Для всех исследуемых липосом было отмечено увеличение эффективности трансфекции в интервале от 15 до 240 мин после начала трансфекции — как по количеству флуоресцентно-окрашенных (FITC-положительных клеток), так и по средней интенсивности флуоресценции клеток.

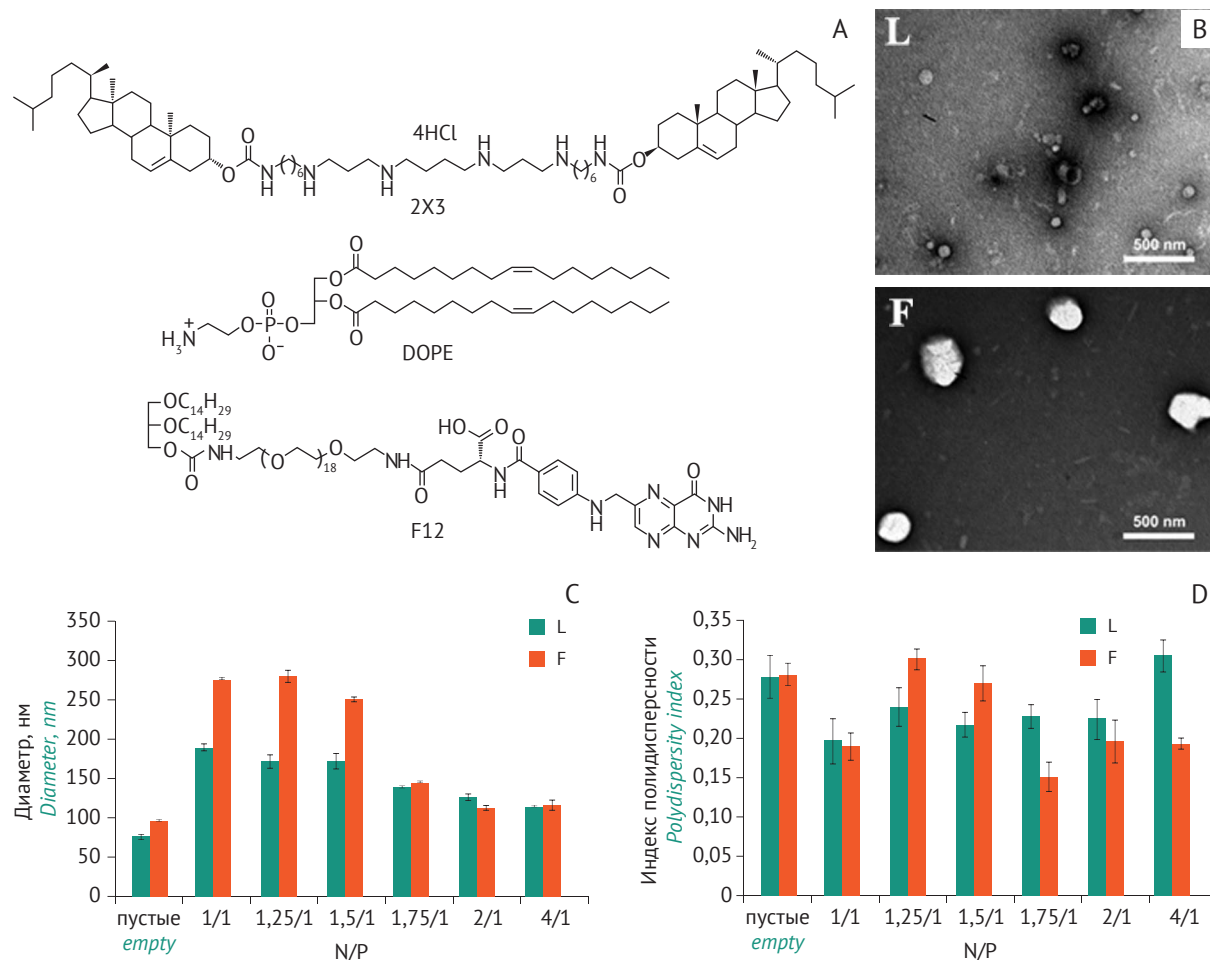


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Структурные формулы компонентов липосом и физико-химические характеристики адресных фолатсодержащих катионных липосом (F) и обычных липосом (L): А — структурные формулы компонентов липосом: поликатионный амфифил 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакосан тетрагидрохлорид), цвиттер-ионный липид DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин), фолатный липоконъюгат F12; В — трансмиссионная электронная микроскопия липосом F и L; С — гидродинамический диаметр липосом; D — индекс полидисперсности липосом F и L: пустых и их комплексов с меченным олигонуклеотидом (FITC-ODN) при различных соотношениях N/P (соотношение между количеством положительно заряженных атомов азота поликатионного амфифила липосом — N, к количеству отрицательно заряженных фосфатных групп НК — P).

Fig. 1. Structural formulas of liposome components and physicochemical characteristics of folate receptor-targeted cationic liposomes (F) and conventional liposomes (L): A, structural formulas of liposome components: polycationic amphiphile 2X3 (1,26-bis(cholest-5-en-3β-yloxy carbonylamino)-7,11,16,20-tetraazahexacosane tetrahydrochloride), zwitterionic helper lipid DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine), and folate lipoconjugate F12. B, transmission electron microscopy images of F- and L-liposomes. C, hydrodynamic diameters of liposomes. D, polydispersity indices of empty F- and L-liposomes and their complexes with a labelled oligonucleotide (FITC-ODN) at different N/P ratios (where N is the number of positively charged nitrogen atoms of polycationic amphiphile liposomes, and P is the number of negatively charged nucleic acid phosphate groups).

Через 15 мин после начала трансфекции количество клеток линии KB-3-1, трансфицированных FITC-ODN, составляло 86 и 87% (для липосом L и F соответственно) (рис. 2А), а в случае клеток линии HEK 293 — 54 и 30% соответственно (рис. 2С). При этом для клеток KB-3-1 средняя интенсивность флуоресценции клеток была выше при использовании адресных липосом по сравнению с обычными липосомами — 20,4 и 15,1 отн. ед. (для липосом F и L

соответственно) (рис. 2В); для клеток HEK 293 липосомы L (12,4 отн. ед.) оказались эффективнее липосом F (8,1 отн. ед.) (рис. 2Д).

Дальнейшая инкубация клеток с комплексами приводила к увеличению внутриклеточного накопления FITC-ODN. Этот процесс достигал плато уже при 90 мин инкубации и далее рос менее интенсивно до конечной точки 240 мин (рис. 2). Было выявлено существенное преимущество адресных фолатсодержащих липосом

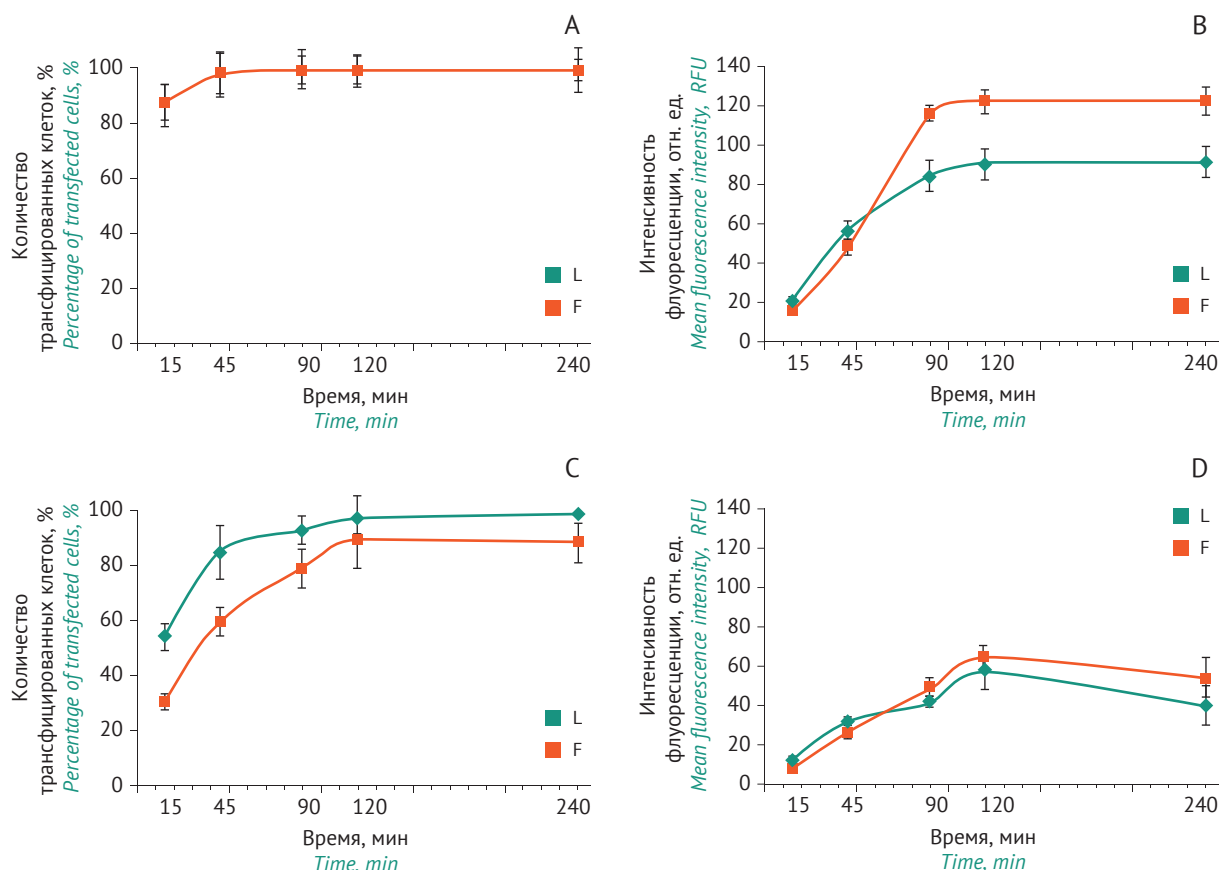


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

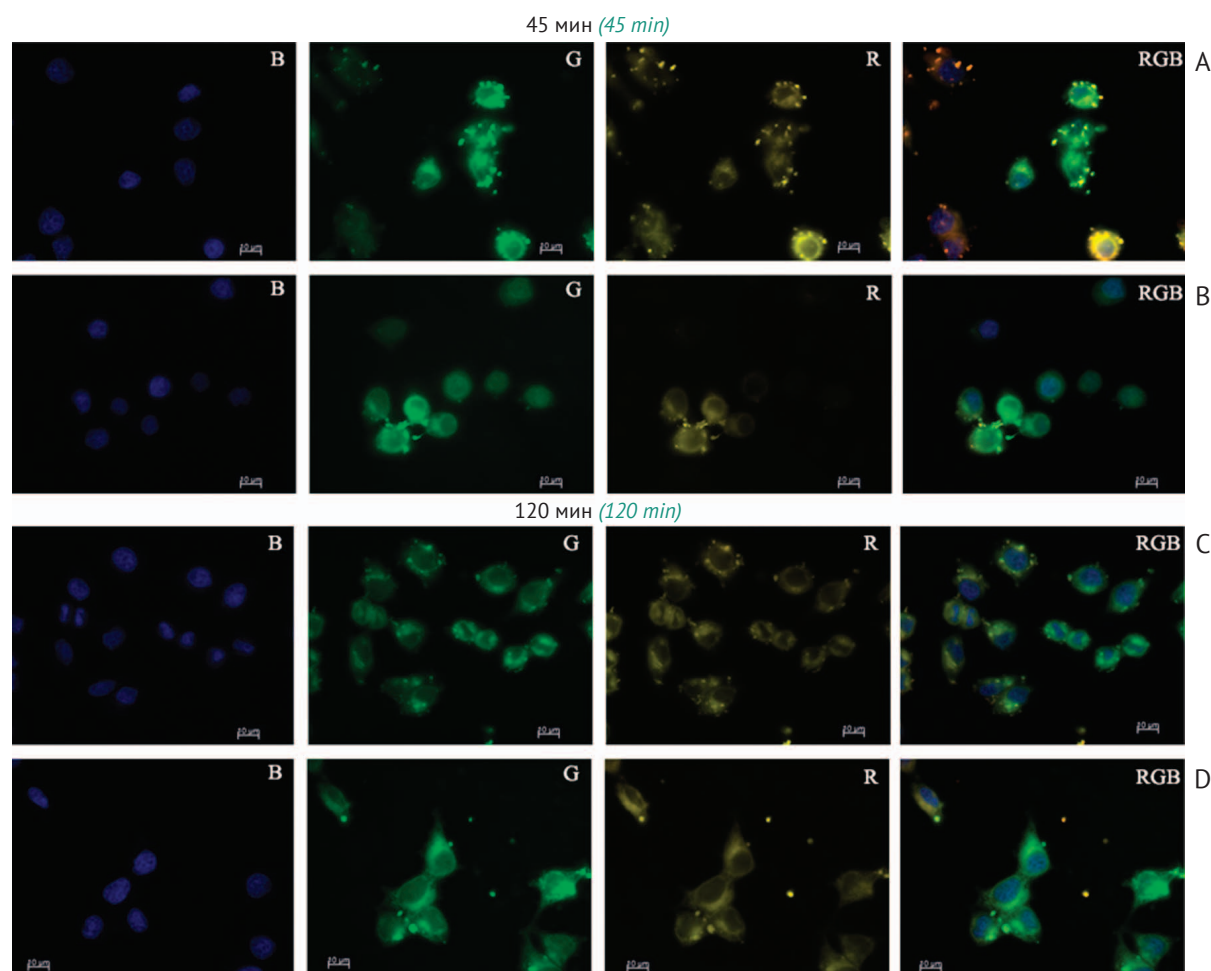
Рис. 2. Накопление комплексов меченного олигонуклеотида (FITC-ODN) с катионными липосомами (F — адресные фолатсодержащие липосомы, L — обычные липосомы) в клеточных культурах KB-3-1 (A, B) и HEK 293 (C, D) согласно данным проточной цитометрии через 15, 45, 90, 120 и 240 мин инкубации клеток с комплексами. A, C — количество флуоресцентно-окрашенных трансфицированных клеток (%). B, D — уровень средней интенсивности флуоресценции клеток в популяции (отн. ед.).

Fig. 2. Accumulation of complexes of a fluorescent-labelled oligonucleotide (FITC-ODN) with cationic liposomes (F, folate-receptor targeted liposomes; L, conventional liposomes) in KB-3-1 (A, B) and HEK 293 (C, D) cell cultures at 15, 45, 90, 120, and 240 minutes of cell incubation with the complexes, according to flow cytometry data. A, C: percentage of fluorescent-labelled transfected cells (%); B, D: mean fluorescence intensities of cell populations (in relative fluorescence units, RFU).

в доставке FITC-ODN по сравнению с обычными липосомами в клетках KB-3-1 — через 90, 120 и 240 мин количество трансфицированных клеток было примерно на 25% выше в случае липосом F (рис. 2B). Уровень накопления фолатсодержащих и обычных липосом в случае клеток линии HEK 293 был приблизительно одинаковый с учетом статистической погрешности (рис. 2C, D), что согласуется с данными исследований, в которых клетки линии HEK 293 были выбраны в качестве негативного контроля для изучения адресной доставки фолатсодержащих катионных липосом [33].

Следует отметить, что результаты контрольной трансфекции клеток FITC-ODN в присутствии реагента Lf 2000 через 240 мин показали низкий уровень значений интенсивности флуоресценции: $13,1 \pm 1,2$ отн. ед. для клеток KB-3-1, $27,2 \pm 2,5$ отн. ед. для клеток HEK 293.

Микроскопический анализ клеток KB-3-1, трансфицированных комплексами липосом с FITC-ODN, был проведен через 45 мин (активная фаза накопления олигонуклеотида в клетках) и 120 мин (момент достижения наибольших показателей количества трансфицированных клеток и интенсивности флуоресценции) при N/P, равном 2/1 (рис. 3). Показано, что через 45 мин комплексы L/FITC-ODN имели небольшие размеры и были прикреплены к мембране клеток, тогда как комплексы F/FITC-ODN имели немного большие размеры и были в меньшей степени локализованы на клеточной мембране (рис. 3A, B). В обоих случаях наблюдается эффективная доставка FITC-ODN в цитоплазму клеток, при этом распределение сигнала для липосом L более дискретное, в отличие от диффузного сигнала при использовании адресных липосом F (рис. 3A). Следует отметить высокую колокализацию



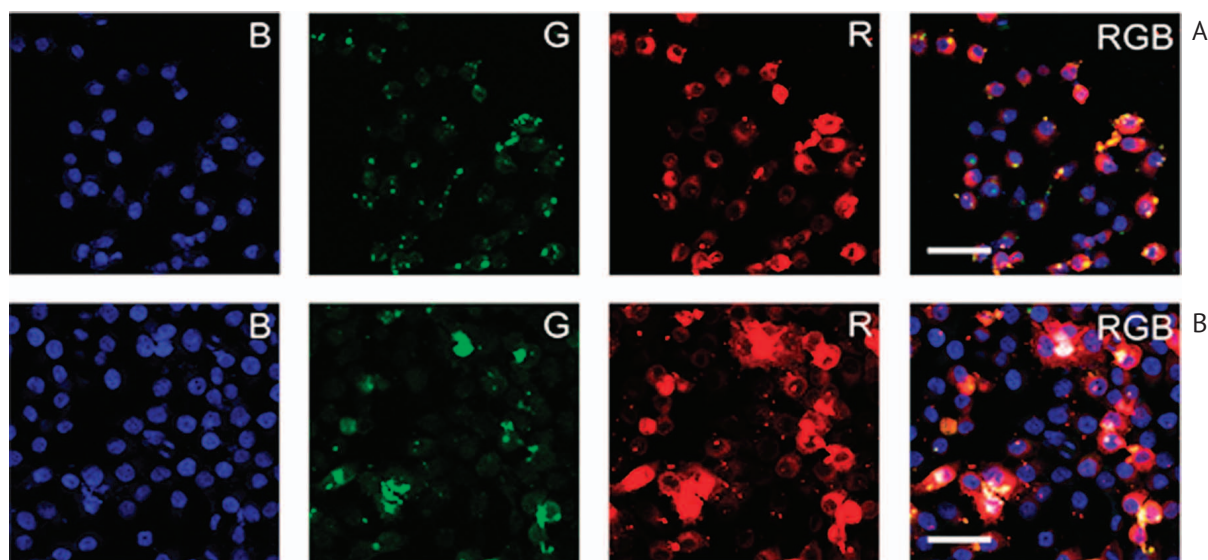
Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 3. Накопление комплексов меченного олигонуклеотида (FITC-ODN) с катионными липосомами (L — обычные липосомы (A, C), F — адресные фолатсодержащие липосомы (B, D)) в клетках линии KB-3-1 через 45 мин (A, B) и 120 мин (C, D) от начала инкубации согласно данным флуоресцентной микроскопии (увеличение $\times 400$). При получении микрофотографий использовали три канала для анализа: синий канал (B) — визуализация ядер клеток, окрашенных красителем NucBlue; зеленый канал (G) — визуализация FITC-ODN; красный канал (R) — визуализация липосом, модифицированных родамином B.

Fig. 3. Accumulation of complexes of a fluorescent-labelled oligonucleotide (FITC-ODN) with cationic liposomes (L, conventional liposomes (A, C); F, folate receptor-targeted liposomes (B, D)) in KB-3-1 cells after 45 min (A, B) and 120 min (C, D) of incubation, according to fluorescence microscopy data ($\times 400$ magnification). Microphotographs used three channels for analysis: blue (B) to visualise cell nuclei stained with NucBlue, green (G) to visualise the FITC-ODN, and red (R) to visualise rhodamine B-labelled liposomes.

сигналов FITC-ODN и родамин B-меченных липосом, что может указывать на незначительное высвобождение олигонуклеотида из комплексов в данной временной точке (рис. 3A, B). Через 120 мин инкубации комплексов с клетками наблюдалось значительное увеличение уровня накопления олигонуклеотида при использовании адресных липосом, при этом внутриклеточная локализация сигнала FITC-ODN оставалась диффузной (рис. 3D). Накопление олигонуклеотида с помощью обычных липосом проходило менее эффективно, при этом локализация комплексов оставалась околочелювной с сохранением дискретности сигнала олигонуклеотида (рис. 3C).

Для более детального анализа клеточной локализации комплексов FITC-ODN с липосомами с использованием конфокальной микроскопии была выбрана временная точка 90 мин при N/P, равном 2/1 (рис. 4). Было подтверждено, что доставка олигонуклеотида с помощью адресных фолатсодержащих липосом проходила более эффективно по сравнению с обычными липосомами, при этом локализация сигнала FITC-ODN имела диффузный характер (рис. 4A, B). В случае использования обычных липосом локализация сигнала FITC-ODN была очень дискретна и представляла собой небольшие сфокусированные участки (рис. 4A). Можно предположить, что при доставке FITC-ODN с помощью адресных



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 4. Накопление комплексов меченного олигонуклеотида (FITC-ODN) с катионными липосомами (L — обычные липосомы (A), F — адресные фолатсодержащие липосомы (B)) в клетках линии KB-3-1 через 90 мин от начала инкубации согласно данным конфокальной микроскопии (увеличение $\times 400$). При получении микрофотографий использовали три канала для анализа: синий канал (B) — визуализация ядер клеток, окрашенных красителем NucBlue; зеленый канал (G) — визуализация FITC-ODN; красный канал (R) — визуализация липосом, модифицированных родамином B. Масштабная линейка — 50 мкм.

Fig. 4. Accumulation of complexes of a fluorescent-labelled oligonucleotide (FITC-ODN) with cationic liposomes (L, conventional liposomes (A); F, folate-receptor targeted liposomes (B)) in KB-3-1 cells after 90 min of incubation, according to confocal microscopy data ($\times 400$ magnification). Microphotographs used three channels for analysis: blue (B) to visualise cell nuclei stained with NucBlue, green (G) to visualise the FITC-ODN, and red (R) to visualise rhodamine B-labelled liposomes. Scalebar: 50 μ m.

липосом задействован механизм рецептор-опосредованного эндоцитоза, который приводит к более эффективной доставке олигонуклеотида в клетки и активному выходу олигонуклеотида из эндосом по сравнению с обычными липосомами. Однако установление точного механизма внутриклеточного транспорта нуждается в дальнейшем исследовании.

ВЫВОДЫ

1. Получены адресные фолатсодержащие катионные липосомы, которые способствовали более эффективной доставке в клетки флуоресцентно-меченного олигонуклеотида (FITC-ODN) в сравнении с контролем (использование коммерческого реагента для трансфекции Lipofectamine 2000) через 240 мин после начала трансфекции.

2. Изучена кинетика накопления комплексов FITC-ODN с катионными липосомами

в клетках линий KB-3-1 и НЕК 293 с использованием метода проточной цитометрии. Показано, что адресные фолатсодержащие катионные липосомы способствовали более эффективному накоплению олигонуклеотида в клетках KB-3-1 по сравнению с обычными липосомами, не содержащими адресного лиганда (примерно на 25%).

3. Проведена оценка внутриклеточной локализации комплексов FITC-ODN с катионными липосомами с помощью методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Высказано предположение о возможной роли в накоплении комплексов механизма рецептор-опосредованного эндоцитоза, опосредованного адресными фолатсодержащими катионными липосомами, однако установление точного механизма внутриклеточного транспорта требует дополнительного изучения.

Литература/References

1. Shchaslyvyi AY, Antonenko SV, Tesliuk MG, Teleguev GD. Current state of human gene therapy: approved products and vectors. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(10):1416. <https://doi.org/10.3390/ph16101416>
2. Mendes BB, Connot J, Avital A, Yao D, Jiang X, Zhou X, et al. Nanodelivery of nucleic acids. *Nat Rev Methods Primers*. 2022;2:24. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00104-y>
3. Zhang H, Vandesompele J, Braeckmans K, De Smedt SC, Remaut K. Nucleic acid degradation as barrier to gene delivery: a guide to understand and overcome nuclease activity. *Chem Soc Rev*. 2024;53(1):317–60. <https://doi.org/10.1039/d3cs00194f>
4. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The first approved gene therapy product for cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 years in the clinic. *Hum Gene Ther*. 2018;29(2):160–79. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>

5. Ghosh S, Brown AM, Jenkins C, Campbell K. Viral vector systems for gene therapy: a comprehensive literature review of progress and biosafety challenges. *Appl Biosaf*. 2020;25(1):7–18.
<https://doi.org/10.1177/1535676019899502>
6. Shmendel EV, Puchkov PA, Maslov MA. Design of folate-containing liposomal nucleic acid delivery systems for antitumor therapy. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1400.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051400>
7. Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, Lind M, Petersson K, Simonsen JB. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;188:114416.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>
8. Iqbal S, Blenner M, Alexander-Bryant A, Larsen J. Polymerosomes for therapeutic delivery of protein and nucleic acid macromolecules: from design to therapeutic applications. *Biomacromolecules*. 2020;21(4):1327–50.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01754>
9. Rai DB, Pooja D, Kulhari H. 9 – Dendrimers in gene delivery. In: *Pharmaceutical applications of dendrimers*. Elsevier; 2019. P. 211–31.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814527-2.00009-3>
10. Mirza Z, Karim S. Nanoparticles-based drug delivery and gene therapy for breast cancer: recent advancements and future challenges. *Semin Cancer Biol*. 2021;69:226–37.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.020>
11. Duan L, Xu L, Xu X, Qin Z, Zhou X, Xiao Y, et al. Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy. *Nanoscale*. 2021;13(3):1387–97.
<https://doi.org/10.1039/d0nr07622h>
12. Luiz MT, Dutra JAP, Tofani LB, de Araújo JTC, Di Filippo LD, Marchetti JM, Chorilli M. Targeted liposomes: a nonviral gene delivery system for cancer therapy. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):821.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040821>
13. Meo SA, Bukhari IA, Akram J, Meo AS, Klonoff DC. COVID-19 vaccines: comparison of biological, pharmacological characteristics and adverse effects of Pfizer/BioNTech and Moderna vaccines. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(3):1663–9.
<https://doi.org/10.26355/eurrev.202102.24877>
14. Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(2):251–6.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.021>
15. Wang B, Zhang J, Song F, Tian M, Shi B, Jiang H, et al. EGFR regulates iron homeostasis to promote cancer growth through redistribution of transferrin receptor 1. *Cancer Lett*. 2016;381(2):331–40.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.006>
16. Mattheolabakis G, Milane L, Singh A, Amiji MM. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *J Drug Target*. 2015;23(7–8):605–18.
<https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1052072>
17. Kim SH, Kim JK, Lim SJ, Park JS, Lee MK, Kim CK. Folate-tethered emulsion for the target delivery of retinoids to cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68(3):618–25.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.010>
18. Siwowska K, Schmid RM, Cohrs S, Schibli R, Müller C. Folate receptor-positive gynecological cancer cells: *in vitro* and *in vivo* characterization. *Pharmaceutics (Basel)*. 2017;10(3):72.
<https://doi.org/10.3390/ph10030072>
19. Kalber TL, Kamaly N, So PW, Pugh JA, Bunch J, McLeod CW, et al. A low molecular weight folate receptor targeted contrast agent for magnetic resonance tumor imaging. *Mol Imaging Biol*. 2011;13(4):653–62.
<https://doi.org/10.1007/s11307-010-0400-3>
20. Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. *Blood*. 1992;79(11):2807–20.
PMID: 1586732
21. Liang X, Luo M, Wei XW, Ma CC, Yang YH, Shao B, et al. A folate receptor-targeted lipoplex delivering interleukin-15 gene for colon cancer immunotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(32):52207–17.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10537>
22. Kabilova TO, Shmendel EV, Gladkikh DV, Chernolovskaya EL, Markov OV, Morozova NG, et al. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;123:59–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.11.010>
23. Pierce JT, Cho SS, Nag S, Zeh R, Jeon J, Holt D, et al. Folate receptor overexpression in human and canine meningiomas – immunohistochemistry and case report of intraoperative molecular imaging. *Neurosurgery*. 2019;85(3):359–68.
<https://doi.org/10.1093/neuros/nyy356>
24. Yang R, Kolb EA, Qin J, Chou A, Sowers R, Hoang B, et al. The folate receptor alpha is frequently overexpressed in osteosarcoma samples and plays a role in the uptake of the physiologic substrate 5-methyltetrahydrofolate. *Clin Cancer Res*. 2007;13(9):2557–67.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1343>
25. Rait AS, Pirollo KF, Xiang L, Ulick D, Chang EH. Tumor-targeting, systemically delivered antisense HER-2 chemosensitizes human breast cancer xenografts irrespective of HER-2 levels. *Mol Med*. 2002;8(8):475–86.
<https://doi.org/10.1007/bf03402027>
26. Shmendel EV, Kabilova TO, Morozova NG, Zenkova MA, Maslov MA. Effects of spacers within a series of novel folate-containing lipoconjugates on the targeted delivery of nucleic acids. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;57:101609.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101609>
27. Bishani A, Makarova DM, Shmendel EV, Maslov MA, Senkova AV, Savin IA, et al. Influence of the composition of cationic liposomes on the performance of cargo immunostimulatory RNA. *Pharmaceutics*. 2023;15(9):2184.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092184>
28. Petukhov IA, Maslov MA, Morozova NG, Serebrennikova GA. Synthesis of polycationic lipids based on cholesterol and spermine. *Russ Chem Bull*. 2010;59:260–8.
<https://doi.org/10.1007/s11172-010-0071-x>
29. Luneva AS, Puchkov PA, Shmendel EV, Zenkova MA, Kuzevanova AY, Alimov AA, et al. Optimization of the technology for the preparation of cationic liposomes for the delivery of nucleic acids. *Russ J Bioorg Chem*. 2018;44:724–31.
<https://doi.org/10.1134/s1068162019010084>
30. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(12):815–23.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2011.166>
31. Mikheev AA, Shmendel EV, Nazarov GV, Maslov MA. Influence of liposome composition on plasmid DNA delivery to eukaryotic cells. *Russ J Bioorg Chem*. 2021;47:1034–42.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021050319>
32. Mornet E, Carmoy N, Lainé C, Lemiègre L, Le Gall T, Laurent I, et al. Folate-equipped nanolipoplexes mediated efficient gene transfer into human epithelial cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):1477–501.
<https://doi.org/10.3390/ijms14011477>
33. Gorle S, Ariatti M, Singh M. Novel serum-tolerant lipoplexes target the folate receptor efficiently. *Eur J Pharm Sci*. 2014;59:83–93.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.012>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Шмендель** – концепция работы, экспериментальная работа по созданию катионных липосом и их комплексов с FITC-ODN, исследование физико-химических параметров липосом, проведение точной цитометрии, флуоресцентной микроскопии, написание текста рукописи, формулировка выводов; **О.В. Марков** – экспериментальная работа по проведению флуоресцентной микроскопии, конфокальной микроскопии, написание текста рукописи; **М.А. Зенкова** – концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **М.А. Маслов** – концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Авторы выражают признательность А.В. Владимировой (ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за помощь в поддержании культур клеток, а также А.С. Алексеевой (ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) за проведение экспериментов по трансмиссионной электронной микроскопии.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Shmendel** conceptualised the study, created cationic liposomes and liposome-FITC-ODN complexes, analysed their physicochemical characteristics by flow cytometry and fluorescence microscopy, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **O.V. Markov** performed fluorescence and confocal microscopy and drafted the manuscript. **M.A. Zenkova** conceptualised the study and approved the final version of the manuscript for publication. **M.A. Maslov** conceptualised the study, drafted the manuscript, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to A.V. Vladimirova (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (RAS)) for her assistance with cell culture maintenance. The authors also express appreciation to A.S. Alekseeva (Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS) for performing transmission electron microscopy experiments.

Об авторах / Authors

Шмендель Елена Васильевна, канд. хим. наук / **Elena V. Shmendel**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3727-4905>

Марков Олег Владимирович, канд. биол. наук / **Oleg V. Markov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8381-1890>

Зенкова Марина Аркадьевна, д-р. биол. наук, проф., член-корр. РАН / **Marina A. Zenkova**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corr. Member of RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4044-1049>

Маслов Михаил Александрович, д-р хим. наук, доц. / **Mikhail A. Maslov**, Dr. Sci. (Chem.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5372-1325>

Поступила 10.04.2024

После доработки 28.05.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 10 April 2024

Revised 28 May 2024

Accepted 21 June 2024



Разработка стандартного образца пустых капсидов рекомбинантного аденоассоциированного вируса для контроля качества препаратов генной терапии

А.В. Тумаев, Д.Ю. Волошин, Е.С. Бердинских, Е.Л. Сахибгараева,
Е.В. Головин, Е.Н. Субчева, О.О. Васильева, А.А. Галиева, А.А. Чувашов,
Е.С. Новикова, А.В. Карабельский

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
«Научно-технологический университет «Сириус», Олимпийский проспект, д. 1, пгт. Сириус,
Краснодарский край, 354340, Российская Федерация

Карабельский Александр Владимирович; karabelskiy.av@talantiuspeh.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. При фармацевтической разработке российских препаратов генной терапии на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) необходимым этапом является создание стандартных образцов (СО), которые используются на протяжении всего цикла разработки препарата, а также установление стабильности СО при хранении. В качестве материала для СО AAV 9 серотипа (AAV9) может выступать препарат пустых капсидов AAV9.

ЦЕЛЬ. Разработка методик оценки физико-химических показателей качества для характеристики стандартного образца пустых капсидов AAV9 и исследование его стабильности при хранении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Нарботку СО пустых капсидов AAV9 проводили в суспензионных клетках НЕК293 с использованием бессывороточной среды при оптимизированных параметрах трансфекции с последующим осветлением, концентрированием, хроматографической очисткой AAV9 на аффинном сорбенте (AAVX) и диафильтрацией. Для анализа образцов применяли электрофорез, трансмиссионную электронную микроскопию, иммуноферментный анализ (ИФА), эксклюзионную хроматографию, динамическое светорассеяние, спектрофотометрию и биослойную интерферометрию. Определение концентрации капсидов проводили методом ИФА. Для разработки методов оценки физического титра использовали СО AAV с известным титром. При исследовании стабильности СО хранили при -80°C в течение 9 мес.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Нарботанный СО AAV9 обладал высокой степенью чистоты по результатам эксклюзионной хроматографии — содержание мономеров вирусных капсидов составляло не менее 98%. С использованием методов динамического светорассеяния, эксклюзионной хроматографии и электронной микроскопии показано отсутствие агрегатов в образце. Установлена стабильность полученного СО пустых капсидов AAV9 в течение 9 мес. Показано, что при определении физического титра СО пустых капсидов AAV9 оптимальными для рутинного анализа качества являются методы динамического рассеяния света и спектрофотометрии; метод биослойной интерферометрии рекомендуется для регулярного анализа. Определенные тремя указанными методами значения титра вирусных частиц варьировали от $1,48 \times 10^{13}$ до $5,6 \times 10^{13}$.

ВЫВОДЫ. Разработан стандартный образец пустых капсидов AAV9, который может быть пригоден для контроля качества препаратов генной терапии на основе AAV9.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус; AAV; пустой капсид; генная терапия; генотерапевтический препарат; фармацевтическая разработка; методы контроля качества; стандартный образец; HEK293; аффинная хроматография; физический титр капсидов; стабильность стандартного образца

Для цитирования: Тумаев А.В., Волошин Д.Ю., Бердинских Е.С., Сахибгараева Е.Л., Головин Е.В., Субчева Е.Н., Васильева О.О., Галиева А.А., Чувашов А.А., Новикова Е.С., Карабельский А.В. Разработка стандартного образца пустых капсидов рекомбинантного аденоассоциированного вируса для контроля качества препаратов генной терапии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):200–214. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-200-214>

Финансирование. Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; проект GTH-RND-2112).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Development of recombinant adeno-associated virus empty capsids as a reference standard for quality control of gene therapy products

Artem V. Tumaev, Danil Yu. Voloshin, Evgenii S. Berdinskikh, Elena L. Sakhibgaraeva, Evgenii V. Golovin, Elena N. Subcheva, Olga O. Vasileva, Alima A. Galieva, Anton A. Chuvashov, Ekaterina S. Novikova, Alexander V. Karabelsky✉

Sirius University of Science and Technology, 1 Olimpiyskiy Ave, Sirius urban-type settlement, Krasnodar Region 354340, Russian Federation

✉ Alexander V. Karabelsky; karabelskiy.av@talantiuspeh.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The development of adeno-associated virus (AAV)-based gene therapy products in Russia requires establishing reference standards, which are used throughout the pharmaceutical development cycle, and monitoring their stability during the storage period. A preparation of empty capsids of AAV serotype 9 (AAV9) is an appropriate material for a reference standard for empty AAV9 capsids (AAV9 RS).

AIM. This study aimed to develop analytical procedures to evaluate the AAV9 RS physicochemical quality parameters for its characterisation and to study its storage stability.

MATERIALS AND METHODS. Empty AAV9 capsids were produced in HEK293 suspension culture using serum-free medium and optimised transfection parameters. The next steps involved AAV9 clarification, concentration, and purification by affinity chromatography with AAVx resin and diafiltration. The analysis of AAV9 samples used electrophoresis, transmission electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), size-exclusion chromatography, dynamic light scattering, spectrophotometry, and bio-layer interferometry. The concentration of capsids was measured by ELISA. Analytical procedures for physical titre determination were developed using an AAV9 standard with a known physical titre. The stability study of the AAV9 RS involved storage at -80°C for 9 months.

RESULTS. Size-exclusion chromatography demonstrated the high purity of the established AAV9 RS, with at least 98% content of the viral capsid monomer. Dynamic light scattering, size-exclusion chromatography, and electron microscopy confirmed that the AAV9 RS was free of aggregates. The stability study showed that the AAV9 RS remained stable for 9 months. Dynamic light scattering and spectrophotometry were deemed optimal methods for routine quality analysis measuring the AAV9 RS physical titre, and bio-layer interferometry was recommended for regular analysis. The viral particle titres determined by these methods ranged from 1.48×10^{13} to 5.6×10^{13} .

CONCLUSIONS. The AAV9 RS established in this study is suitable for quality control of AAV9-based gene therapy products.

Keywords: adeno-associated virus; AAV; empty capsid; gene therapy; gene therapy product; pharmaceutical development; quality control methods; reference standard; HEK293; affinity chromatography; physical capsid titre; reference standard stability

For citation: Tumaev A.V., Voloshin D.Y., Berdinskikh E.S., Sakhibgaraeva E.L., Golovin E.V., Subcheva E.N., Vasileva O.O., Galieva A.A., Chuvashov A.A., Novikova E.S., Karabelsky A.V. Development of recombinant adeno-associated virus empty capsids as a reference standard for quality control of gene therapy products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):200–214. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-200-214>

Funding. The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-10-2021-093, Research Project No. GTH-RND-2112).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Результаты клинических исследований подтверждают безопасность и эффективность использования препаратов на основе рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (adeno-associated viruses, AAV) в генной терапии тяжелых наследственных заболеваний [1]. Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) в 2022–2023 гг. были одобрены к применению препараты для лечения дефицита декарбоксилазы ароматических аминокислот (Upstaza®, eladocogene exuparvovec), гемофилии А (Roctavian®, valoctocogene roxaparvovec) и Б (Hemgenix®, etranacogene dezaparvovec), мышечной дистрофии Дюшенна (Elevidys®, delandistrogene toxeparvovec). Одним из самых востребованных препаратов для лечения спинальной мышечной атрофии 1 типа является препарат на основе AAV серотипа 9 (AAV9) – Zolgensma® (onasemnogene aeparvovec), одобренный в США в 2019 г. Природный серотип AAV9 широко используется, так как способен эффективно трансдуцировать клетки нейронального происхождения, как, например, моторные нейроны, повреждающиеся при спинальной мышечной атрофии [2], или ганглиозные клетки сетчатки, дефекты которых приводят к атрофии зрительного нерва и потере зрения [3].

Технология получения AAV9 как в лабораторном, так и в промышленном масштабе требует разработки физико-химических и биологических методов для определения количества векторных частиц (титр) в образце (количество вирусных геномов; количество вирусных капсидов, физический титр), наличия примесей

и родственных соединений, в том числе агрегатов, остаточных белков и ДНК, соотношения пустых и полных капсидов и др.

Основные подходы к оценке показателей качества биотехнологических препаратов в Российской Федерации представлены в Решении Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 89¹. Препараты на основе AAV напрямую не относятся к сфере применения этого документа, тем не менее описанные в нем требования в наибольшей степени соответствуют структурным и функциональным особенностям вирусных векторов. Также целесообразно учитывать гармонизированные с ICH требования EMA, сформулированные в руководстве ICH Q6B². В обоих руководствах содержатся следующие характеристики продукта: чистота, физико-химические, биологические и иммунохимические характеристики. В свою очередь, физико-химические характеристики соответствуют таким показателям качества биотехнологических продуктов, как подлинность, чистота и примеси, количественное содержание.

Для аналитической и фармацевтической разработки препаратов на основе AAV требуются создание и аттестация стандартных образцов (СО), в том числе СО примесей родственных соединений, что необходимо для разработки технологического процесса выделения и очистки целевого продукта, а также для валидации методик количественного определения чистоты продукта. Например, СО пустых капсидов AAV позволяет оценить фактор отклика и селективность хроматографической системы по отношению к аналитическому сигналу, соответствующему полным капсидам AAV [4]. Такие СО используются на протяжении всего цикла фармацевтической разработки препарата, в связи с чем критическими этапами являются задачи

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

контроля стабильности СО и своевременного получения новых стандартов по истечении срока годности СО.

Цель работы — разработка методик оценки физико-химических показателей качества для характеристики СО пустых капсидов AAV9 и исследование его стабильности при хранении.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- наработка СО пустых капсидов AAV9 в суспензионной культуре HEK293 и его характеристика;
- оценка титра вирусных частиц с помощью ортогональных методов анализа;
- изучение стабильности СО при хранении в течение 9 мес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Лабораторный инкубационный шейкер Multitron (INFORS HT, Швейцария); хроматографическая система среднего давления NGC Quest 10 с коллектором фракций (Bio-Rad, США); центрифуга Eppendorf Centrifuge 5418 R (Eppendorf, Германия); сканирующий электронный микроскоп Crossbeam 550 (Carl Zeiss, Германия); спектрофотометр NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США); анализатор размера частиц Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания); система ВЭЖХ Vanquish Flex (Thermo Fisher Scientific, США); гель-документирующая станция ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, США); мультимодальный ридер CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия); интерферометр Octet QKe ForteBio (Sartorius AG, Германия).

Методы

Получение плазмид. Для получения AAV векторов использовали: хелперную плазмиду pHelper Vector (кат. № 340202, Cell Biolabs Inc., США); упаковочную плазмиду pAAV2/9n (кат. № 112865, AddGene, США), кодирующую последовательность белков капсида и репликативных белков AAV; плазмиду pAAV-GFP (кат. № VP-401, Cell Biolabs Inc., США), содержащую ген зеленого флуоресцентного белка. Концентрацию и чистоту плазмидной ДНК определяли спектрофотометрически по протоколам, рекомендованным производителем. Соответствие плазмид картам (структуру плазмид) проверяли с помощью рестрикционного анализа, для чего использовали специфические эндонуклеазы рестрикции *HincII* (кат. № R0103S, NEB, США), *PstI* (кат. № R0140T, NEB, США) и *SapI* (кат. № R0569S, NEB, США). Для подтверждения количества и размера

рестрикционных фрагментов ДНК плазмид полученные рестрикционные смеси наносили на 1% агарозный гель и визуализировали с помощью гель-документирующей станции ChemiDoc Imaging System. Если структура плазмиды не соответствовала плазмидной карте, то ее далее не использовали в работе.

Культивирование клеток HEK293 и подготовка к трансфекции. Для получения AAV использовали адаптированную к суспензионному культивированию клеточную линию HEK293 (ECACC; № 85120602). Криопробирки с клетками (50×10^6 кл/мл) размораживали, помещали в бессывороточную среду BalanCD HEK293 (Irvine Scientific, США) с добавлением 4 мМ L-глутамина и проводили инкубацию при 37 °С, влажности 80%, содержании CO₂ 5%. При культивировании использовали лабораторный инкубационный шейкер Multitron, скорость вращения платформы — 100 об/мин. На этапе роста и накопления биомассы проводили трехкратное пассирование культурального материала для выхода клеток на достаточный уровень пролиферации после заморозки при сохранении уровня жизнеспособности не ниже 95%. Далее клетки засеивали в колбы Эрленмейера объемом 500 мл и растили до плотности жизнеспособных клеток $(6-9) \times 10^6$ кл/мл. Затем клетки пересевали в колбы объемом 500 мл в конечной концентрации $0,5 \times 10^6$ кл/мл.

Трансфекция и наработка AAV9. Через 24 ч после посева клеток HEK293 в колбе проводили трансфекцию клеток плазмидами в следующих условиях: концентрация клеток 1×10^6 кл/мл; уровень жизнеспособных клеток выше 95%; количество плазмидной ДНК 1,5 мкг на 1×10^6 клеток; соотношение pHelper Vector:pAAV2/9n — 1:5; соотношение ДНК:PEI 40000 (Polysciences, США) — 1:5; объем трансфицирующей смеси составлял 5% от стартового объема культуральной жидкости. Трансфицирующую смесь готовили в питательной среде Opti-Mem (Gibco, США). Клетки культивировали 120 ч при температуре 37 °С, влажности 80% и концентрации CO₂ 5% на шейкере при скорости вращения 100 об/мин. Для получения СО AAV9-GFP проводили трансфекцию и культивирование клеток в аналогичных условиях, но при соотношении плазмид pHelper Vector:pAAV2/9n:pAAV-GFP, равном 2:5:2.

Лизис клеток, осветление и концентрирование культуральной жидкости. После культивирования в колбу с клетками добавляли Tween-20 (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 0,05% и инкубировали в течение 1 ч. Далее добавляли бензонуклеазу — препарат,

выделенный из штамма *Escherichia coli*, экспрессирующего ген нуклеазы из микроорганизма *Serratia marcescens* (Sigma-Aldrich, Германия), до 30 МЕ/мл и $MgCl_2$ до 1–2 мМ и инкубировали в течение 1 ч. Затем полученный лизат центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g. Полученный супернатант переливали в чистую емкость с последующим добавлением диатоми-та Celite® 503 (Merck, Германия) в количестве 1 г на 100 мл культурального материала. После перемешивания культуральную жидкость фильтровали (полиэфирсульфонный (PES) мембранный фильтр, 0,22 мкм) и концентрировали в 10 раз с помощью кассеты Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) площадью 200 см² со скоростью диализа 7 мл/мин и входным давлением не более 1,5 бар. Полученный концентрат фильтровали через PES фильтр 0,22 мкм.

Хроматографическая очистка. Аффинную хроматографию проводили с помощью сорбента POROS CaptureSelect AAVX Affinity Resin (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием колонки Diba Omnifit EZ (Thermo Fisher Scientific, США). На этапе подготовки сорбент уравнивали буфером, содержащим 50 мМ трис-HCl, 0,05% Tween 20, 0,15 М NaCl, pH 8,0, а затем полученный концентрат после этапа тангенциальной фильтрации наносили на колонку. Элюцию проводили буфером 0,1 М глицин-HCl, 0,05% Tween 20, 0,5 М L-аргинин, pH 2,0. Все работы по препаративной очистке AAV проводили с использованием хроматографической системы NGC Quest 10.

Концентрирование и диафильтрация. Очищенный препарат концентрировали с помощью центрифужного концентратора Vivaspin® 500 Centrifugal Concentrator Polyethersulfone 100 kDa (кат. № VS0141, Sartorius, Германия). После концентрирования вирусные частицы ресуспендировали в 450 мкл буфера для хранения – 0,37 М NaCl, 0,001% Pluronic F-68 (Gibco, США) в фосфатно-солевом буфере (PBS). Полученный образец стерилизовали фильтрацией с использованием шприцевого фильтра (0,22 мкм, кат. № 99722, TPR, Швейцария), отбирали аликвоты для последующих аналитических операций и хранения (–80 °C).

Электрофорез в полиакриламидном геле. Контроль белкового состава образца (подлинность капсида и наличие примесей пептидной природы) проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с восстановлением (SDS-PAGE) [5, 6].

Аликвоту препарата непосредственно перед анализом смешивали с буфером (Laemmli Sample Buffer, кат. № 161-0747, Bio-Rad, США),

инкубировали при 95 °C в течение 5 мин и наносили 10 мкл на дорожку. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (концентрирование – 4% гель, 50 В; разделение – 10% гель, 150 В, длина геля – 7,3 см). Использовали маркер молекулярного веса белков (Precision Plus Protein Dual Color Standards, 10–250 кДа, кат. № 161-0394, Bio-Rad, США). Окрашивали гель с помощью Coomassie G-250 (кат. № 1610436, Bio-Rad, США). Визуализацию проводили с применением гель-документирующей станции ChemiDoc Imaging System. Нахождение капсидных белков на электрофореграмме определяли визуально, ориентируясь на маркер молекулярного веса белков.

Просвечивающая электронная микроскопия. Морфологию вирусных капсидов и наличие пустых капсидов изучали с помощью сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (scanning transmission electron microscopy, STEM) с использованием микроскопа Crossbeam 550 с детектором для просвечивающей электронной микроскопии при ускоряющем напряжении 30 кВ. Для равномерного распределения частиц предварительно проводили обработку сеток плазмой воздуха в течение 10 с на лабораторной плазменной установке Zepto (Diener Electronic, Германия). Образец разводили бидистиллированной водой в соотношении 1:5 и 10 мкл исследуемых частиц наносили на поддерживающую сетку (Carbon/Formvar 300 mesh, Agar Scientific, Великобритания), затем инкубировали 2 мин, дважды промывали водой и контрастировали 1% водным раствором уранилацетата (кат. № 0379, Polysciences, США) в течение 1 мин. Высушивание сеток проводили на воздухе при комнатной температуре.

Количество пустых капсидов (%) оценивали визуально путем подсчета на микрофотографиях суммарного количества и процентного содержания вирусных частиц, числа пустых, полных и частично заполненных капсидов с последующим расчетом среднего арифметического значения (не менее 15 микрофотографий на каждый образец).

Определение физического титра вирусных частиц и оценка наличия агрегатов методом динамического рассеяния света. Анализ проводили методом динамического рассеяния света (ДРС) с применением анализатора Zetasizer Ultra. Для измерения использовали образцы объемом 65 мкл и кварцевую кювету малого объема (кат. № ZEN2112, Malvern Panalytical Ltd, Великобритания). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ZS XPLORER (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания),

которое позволяет учитывать статистику повторных измерений (среднее значение, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение, минимальные и максимальные значения).

Эксклюзионная хроматография. Определение относительного содержания мономера AAV, высокомолекулярных фракций (агрегатов) и низкомолекулярных фракций (фрагментов AAV) проводили методом эксклюзионной хроматографии (size-exclusion chromatography, SEC) с помощью жидкостного хроматографа Vanquish Flex. Разделение фракций осуществляли в изократическом режиме с помощью хроматографической колонки XBridge Protein BEH SEC (2,5 μ m, 4,6 мм×300 мм, кат. № 186009180, Waters, США) и подвижной фазы – 20 mM Na₂HPO₄, 150 mM KCl, pH 7,0 при скорости потока 0,5 мл/мин. Детектирование осуществлялось с использованием флуориметрического детектора с длиной волны возбуждения 280 нм и длиной волны эмиссии 350 нм. Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, США), при этом проводилась общая базовая линия от начала выхода высокомолекулярных фракций до окончания выхода низкомолекулярных фракций, после чего фракции разделяли и определяли их относительное содержание. Для идентификации мономера AAV9 использовали значение времени удерживания пика мономера CO полных капсидов (RS-AAV9-FL, Vigene Biosciences, США).

Определение физического титра вирусных частиц с помощью метода УФ-спектрофотометрии. Для определения физического титра использовали спектрофотометр NanoDrop OneC при длине волны 260 нм. Проводили не менее трех последовательных измерений оптической плотности и рассчитывали среднее арифметическое значение и относительное стандартное отклонение (relative standard deviation, RSD). Физический титр рассчитывали как отношение среднего значения оптической плотности к коэффициенту экстинкции. Для AAV9 коэффициент экстинкции был установлен экспериментально с использованием образца AAV9-GFP с известным физическим титром, определенным методами иммуноферментного анализа (ИФА) с применением набора реагентов PRAAV9XP (Progen, Германия) и динамического светорассеяния.

Определение физического титра вирусных частиц методом биослойной интерферометрии. Исследование проводили с помощью

интерферометра Octet QKe ForteBio с использованием калибровочной кривой стандартного препарата с известной концентрацией. Измеряемым параметром выступала скорость связывания вирусных капсидов с антителами, которые были иммобилизованы на сенсоре. При проведении анализа антитело Biotin Anti-AAVX Conjugate (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 5 мкг/мл иммобилизовали на биосенсоры Octet SA Biosensors (Sartorius, Германия) в PBS (ПанЭко, Россия) с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BCA, Sigma-Aldrich, Германия), затем стабилизировали сенсоры в буфере и проводили связывание с калибровочными образцами, далее отмывали (трижды в 0,5М фосфорной кислоте и PBS с 1% BCA), затем снова стабилизировали сенсоры и загружали измеряемые образцы. Для построения калибровочной кривой был использован образец AAV9-GFP с известным физическим титром, определенным методом ИФА с помощью набора реагентов (PRAAV9XP, Progen, Германия). Для построения калибровочной кривой были использованы следующие концентрации: $1,00 \times 10^{12}$ вирусных капсидов (вк)/мл, $0,50 \times 10^{12}$ вк/мл, $2,50 \times 10^{12}$ вк/мл, $1,25 \times 10^{12}$ вк/мл, $0,62 \times 10^{12}$ вк/мл. Анализируемый CO AAV9 испытывали в разведениях 1:20 и 1:40. На основании калибровочной кривой рассчитывали концентрацию исследуемого образца² [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение стандартных образцов пустых капсидов AAV9

Наработку CO пустых капсидов AAV9 проводили по схеме, представленной на рисунке 1, включающей в себя этапы трансфекции и культивирования суспензионной культуры HEK293 в колбах объемом до 500 мл в бессывороточной среде с последующим осветлением, концентрированием и хроматографической очисткой на аффинном сорбенте.

Для получения рекомбинантных AAV часто используют трансфекцию с эквимольным соотношением трех плазмид (херперная плазмида; плазмида с генами *rep* и *cap*; плазмида с геном интереса – 1:1:1) в трансфекционной смеси [8]. Для получения AAV в данной работе применяли оптимизированный протокол трансфекции (для наработки CO AAV9 проводили трансфекцию двумя плазмидами – хелперной и плазмидой с генами *rep* и *cap*), ориентируясь на наиболее критичные параметры этого процесса (количество клеток, ДНК, соотношение

² <https://www.sartorius.com/en/products/protein-analysis/octet-bli-detection/biosensors-and-kits/octet-aavx-biosensors>

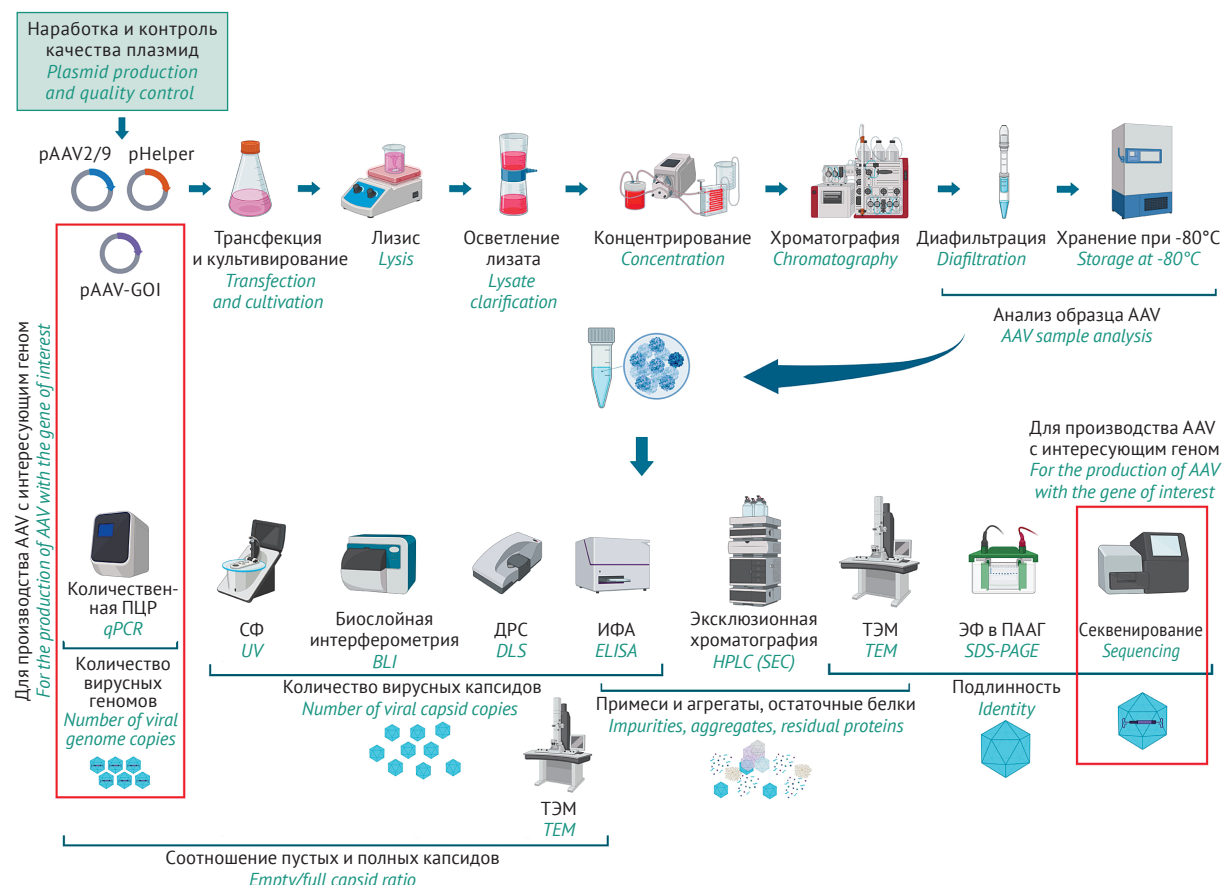


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Общая схема наработки, выделения и анализа образцов аденоассоциированного вируса (adeno-associated virus, AAV). Красной рамкой отмечены этапы, необходимые при наработке образцов AAV, содержащих интересующий ген. ПЦР – полимеразная цепная реакция, ИФА – иммуноферментный анализ, СФ – спектрофотометрия, ДРС – динамическое рассеяние света, ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия, ЭФ в ПААГ – денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.

Fig. 1. General outline of production, isolation, and analysis of adeno-associated virus (AAV) samples. Red boxes indicate the steps required for the production of AAV samples containing the gene of interest. qPCR, quantitative polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; UV, ultraviolet spectrophotometry; BLI, bio-layer interferometry; DLS, dynamic light scattering; HPLC (SEC), size-exclusion high-performance liquid chromatography; TEM, transmission electron microscopy; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

плазмид, соотношение ДНК:PEI и др.) [9]. Это позволило достигнуть высокой продуктивности суспензионных клеток HEK293 (до 10^5 продуцируемых вирусных частиц на клетку, или до 10^{14} частиц на 1 л).

Очистку СО пустых капсидов AAV9 проводили с помощью аффинной хроматографии с помощью сорбента POROS CaptureSelec AAVX Affinity Resin, содержащего AAV-специфичный лиганд (молекулярная масса 15 кДа). В структуре лиганда фрагмента находятся три комплементарных области, которые определяют антигенсвязывающую способность и селективность сорбента [10, 11]. На рисунке 2А представлена хроматограмма процесса очистки СО AAV9. Высокая

селективность сорбента и его пористая структура позволили провести быструю одноступенчатую очистку препарата. Данные электрофореза свидетельствуют о присутствии в очищенном препарате трех белков вирусного капсида: VP1, VP2, VP3 (рис. 2В). Показано отсутствие низкомолекулярных примесей, что позволило сделать вывод о получении образца высокой чистоты (рис. 2В)³.

Оценка качества стандартного образца AAV методом электронной микроскопии

После концентрирования и диализа анализировали СО пустых капсидов AAV9 с помощью электронной микроскопии [12]. Данный

³ https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100038399_POROS_CapSel_AAV8_AAV9_Resins_UG.pdf

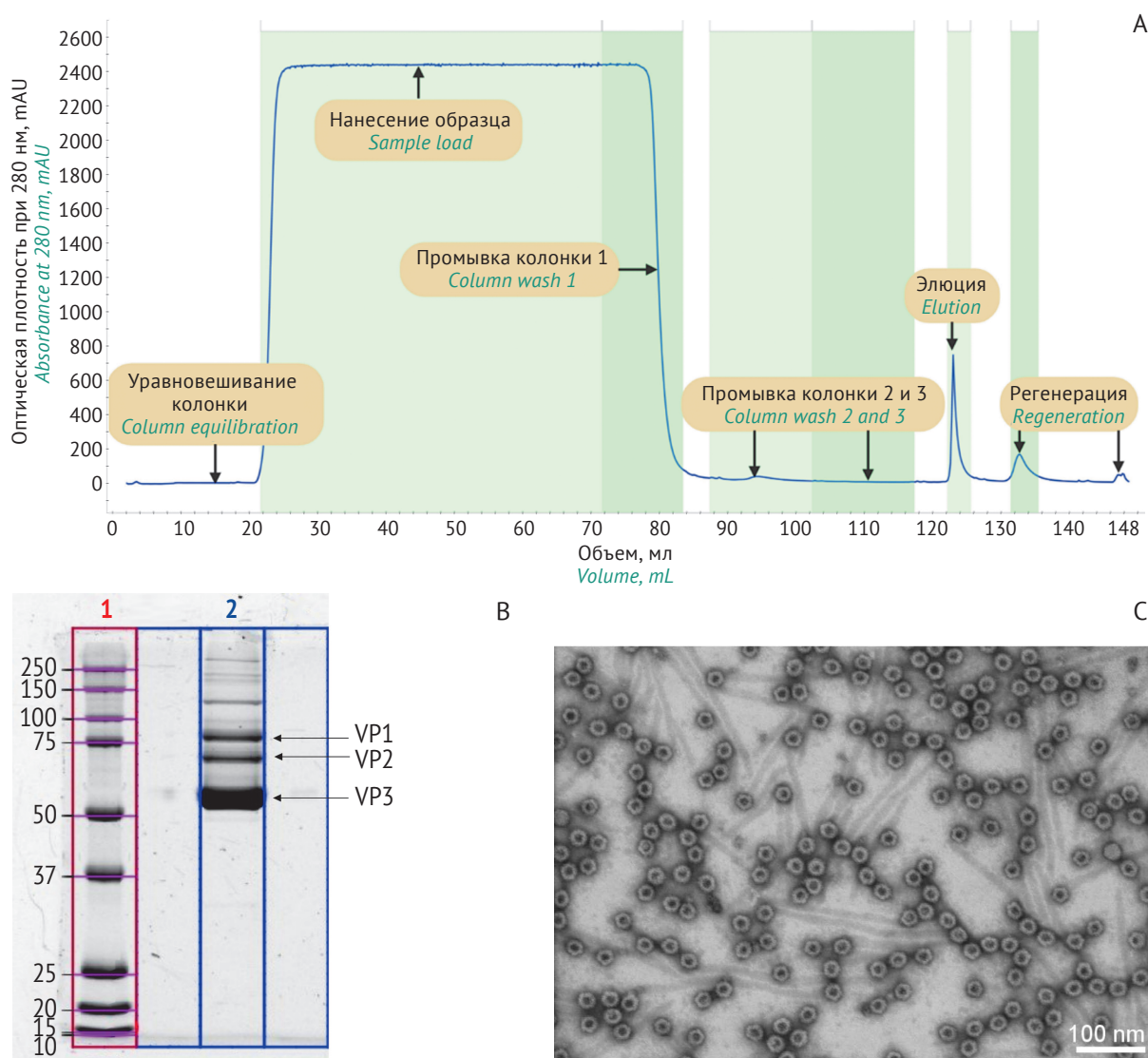


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Очистка и анализ стандартного образца (СО) пустых капсидов аденоассоциированного вируса 9 серотипа (AAV9): А – хроматограмма процесса очистки СО AAV9 с помощью аффинного сорбента. Зеленым выделены границы начала и окончания сбора фракций при нанесении образца, при промывках колонки, при элюции и при регенерации сорбента; В – оценка подлинности СО с использованием электрофореза: дорожка 1 – белковый маркер (10–250 кДа), дорожка 2 – препарат СО AAV9. Стрелками отмечены три белка капсида AAV (viral proteins – VP1, VP2, VP3); С – микрофотография СО AAV9, метод сканирующей просвечивающей электронной микроскопии, увеличение $\times 160000$.

Fig. 2. Purification and analysis of the reference standard for empty capsids of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9 RS): А) A chromatogram of the AAV9 RS purification with affinity resin. Green highlights indicate the beginning and end of fraction collection during sample application, column washing, elution, and sorbent regeneration. В) Electrophoretic RS identification: lane 1, protein marker kit (10–250 kDa); lane 2, AAV9 RS. Arrows indicate three AAV capsid proteins (viral proteins VP1, VP2, and VP3). С) A scanning transmission electron microscope photo of the AAV9 RS at a magnification of $\times 160,000$.

метод позволяет оценить ряд важных показателей: морфология и размеры, наличие дефектных частиц, белковых или мембранных клеточных остатков, агрегатов, содержимое капсидов (полный или пустой), наличие разрушенных капсидов. Визуализацию СО пустых капсидов AAV9 проводили с использованием метода негативного контрастирования 1% водным раствором уранилацетата. Равномерность

распределения образцов обеспечивали за счет модификации поверхности поддерживающих медных сеток с углеродной подложкой плазмой воздуха, которая значительно увеличивает ее гидрофильность. На полученных микрофотографиях идентифицировали частицы правильной формы с размерами порядка 25 нм с выраженными осями симметрии, характерными для AAV (рис. 2С). Дополнительных примесей, в том числе

белковых, обнаружено не было. В ходе визуального анализа полученных микрофотографий для определения соотношения пустых и полных капсидов процентное содержание пустых капсидов можно было принять равным 100% (в полях зрения встречаются единичные частично заполненные капсиды при общем количестве вирусных частиц порядка 100).

Оценка количества агрегатов с помощью эксклюзионной хроматографии

Количественное определение агрегированных частиц имеет важное значение при оценке качества препаратов на основе AAV для обеспечения их безопасности и эффективности, так как агрегаты могут вызывать нежелательные иммунные реакции в организме и снижать эффективность терапии [13]. В биофармацевтических исследованиях эксклюзионная хроматография является основным методом определения агрегатов из-за простоты, высокой производительности и скорости анализа. Метод основан на различии гидродинамических объемов растворенных веществ [14].

Для определения относительного содержания фракций AAV9 использовали флуориметрический детектор, что позволило достичь предельных значений количественного определения — 5×10^8 капсидов за один анализ; стандартное отклонение относительного содержания фракции менее 1,5%. Относительное стандартное отклонение времени удерживания пика мономера не превышало 0,2%. При выборе подвижной фазы особое внимание уделяли ионной силе раствора, что оказывает влияние на разделение и относительное содержание фракций. В подвижной фазе без добавления хлорида калия наблюдали низкое разрешение между фракциями, а также высокую асимметрию хроматографических пиков. Однако при увеличении концентрации хлорида калия в составе подвижной фазы со 150 до 350 мМ относительное содержание низкомолекулярных фракций возрастало на 10%. Хроматограмма анализа СО пустых капсидов AAV9 представлена на рисунке 3В. Относительное содержание мономера для данной серии СО составило 99,1%, а доля агрегатов — 0,9%.

Учитывая ряд ограничений данного метода, таких как фильтрация крупных агрегатов неподвижной фазой и неспецифические взаимодействия между агрегатами и фриттой (фильтр,

предотвращающий попадание крупных частиц или загрязнений из образца или фазы) колонки⁴, требуется дополнительная характеристика образца ортогональными (взаимно-подтверждающими) методами: аналитическое ультрацентрифугирование, метод динамического рассеяния света (для оценки наличия более крупных агрегатов, $d > 100$ нм).

Метод эксклюзионной хроматографии может быть дополнительно использован совместно с многоугловым детектором светорассеяния, что позволит определять молекулярные массы разделенных соединений. Кроме того, возможно применение диодно-матричного детектора вместо флуориметрического, что, в свою очередь, позволит одновременно производить оценку соотношения пустых и полных капсидов. Однако данные методы имеют низкую чувствительность, что не позволяет широко их использовать при производстве AAV⁵.

Определение физического титра AAV

Метод ИФА используется для определения физического титра вирусных частиц на ранних стадиях разработки препаратов на основе AAV. Метод позволяет работать с низкими концентрациями капсидов, например при разработке способов очистки вирусных векторов из культуральной жидкости. Недостатком ИФА является высокая стоимость и низкая доступность наборов для исследователей в настоящее время, а также достаточно длительная процедура анализа. Возможен вариант разработки собственного набора для ИФА, но это рационально осуществлять лишь в случае дальнейшего масштабирования производства. По этой причине поиск ортогональных методов определения титра вирусных частиц является в настоящее время крайне актуальной и востребованной задачей. В данной работе с этой целью использовали методы динамического рассеяния света, биослойной интерферометрии и спектрофотометрии для оценки физического титра СО пустых капсидов AAV9.

Определение физического титра вирусных частиц, а также оценка содержания агрегатов методом динамического рассеяния света

Метод динамического рассеяния света, предназначенный для измерения размеров нано- и субмикронных частиц дисперсной фазы, позволяет проводить измерения образца

⁴ <https://www.chromatographyonline.com/view/protein-aggregates-and-gel-filtration-chromatography-improving-quantitation-and-throughput-uhplc-m-0>

⁵ <https://www.chromatographyonline.com/view/quantifying-aav-quality-attributes-using-sec-mals>

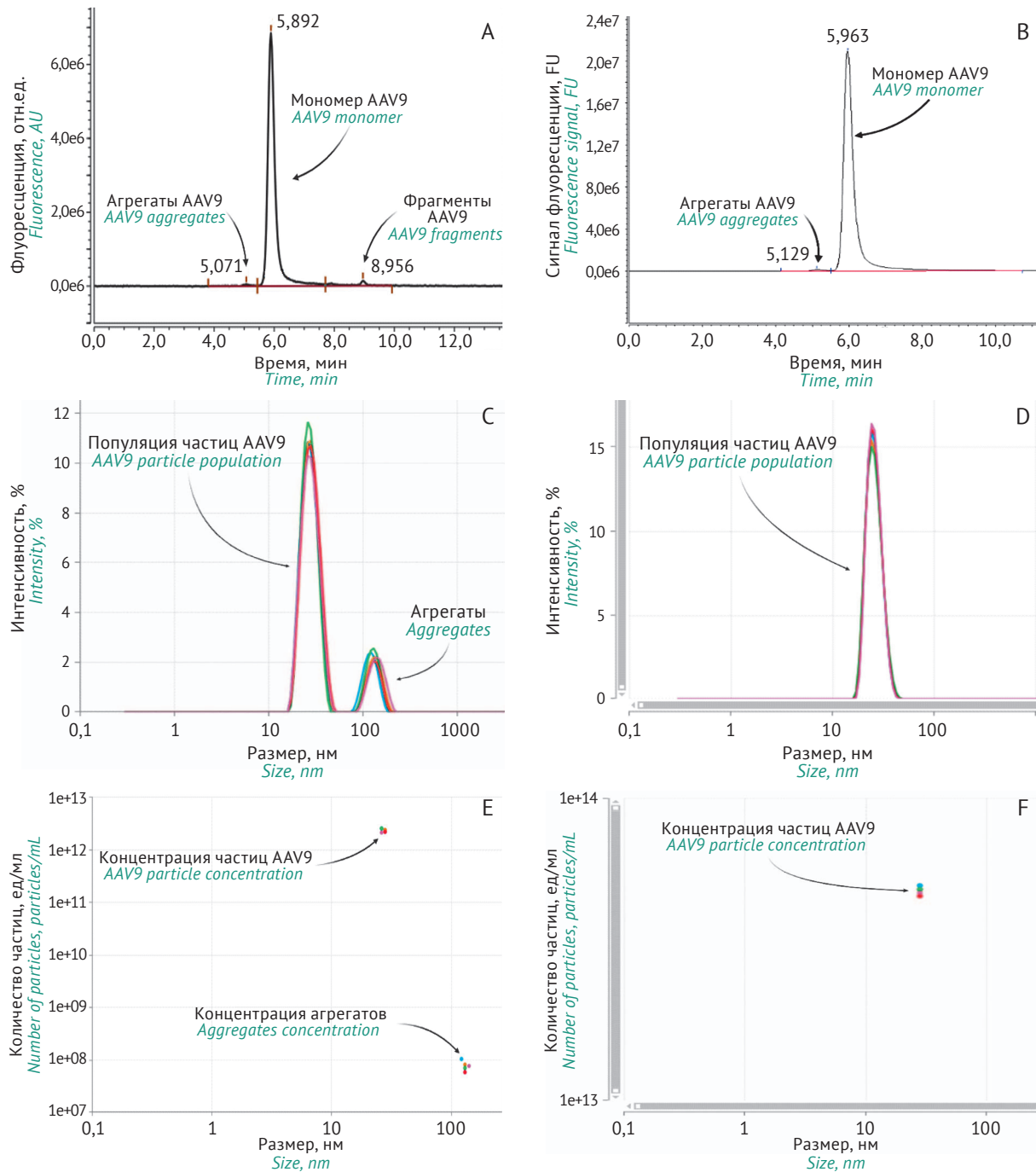


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 3. Анализ аденоассоциированного вируса 9 серотипа (AAV9) методами эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ) и динамического рассеяния света (ДРС): А – пример хроматограммы ЭЖХ для препарата AAV9, содержащего агрегаты и низкомолекулярные примеси; В – хроматограмма ЭЖХ стандартного образца (СО) пустых капсидов AAV9; С – пример графика интенсивности сигнала ДРС препарата AAV9, содержащего агрегаты и низкомолекулярные примеси; D – график интенсивности сигнала ДРС СО пустых капсидов AAV9; E – пример графика распределения количества частиц по размеру, рассчитанный по результатам ДРС препарата AAV, содержащего агрегаты и низкомолекулярные примеси; F – график распределения количества частиц по размеру, рассчитанный по результатам ДРС СО пустых капсидов AAV9.

Fig. 3. Analysis of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) by size-exclusion chromatography (SEC) and dynamic light scattering (DLS): A) An example of SEC chromatogram of an AAV9 sample containing aggregates and low molecular weight (LMW) impurities. B) A SEC chromatogram of the AAV9 reference standard (RS). C) An example of a DLS signal intensity graph for the AAV9 sample containing aggregates and LMW impurities. D) A DLS signal intensity graph for the AAV9 RS. E) An example of DLS graph of particle size distribution for the AAV preparation containing aggregates and LMW impurities. F) A DLS graph of particle size distribution for the AAV9 RS. RS, reference standard; AAV, adeno-associated virus; SEC, size-exclusion high-performance liquid chromatography; DLS, dynamic light scattering.

в нативной форме на основе многоугольного рассеяния света и осуществлять оценку гидродинамического диаметра, модальности распределения вирусных капсидов и их долевых соотношений⁶. Исследование СО пустых капсидов AAV9 проводили при 25 °С с помощью анализатора Zetasizer Ultra, оснащенного He-Ne-лазером (длина волны 633 нм, максимальная мощность 10 мВт). Показано, что концентрация СО пустых капсидов AAV9 составила $4,7 \times 10^{13}$ вк/мл ($RSD=8,04\%$); значение среднего гидродинамического диаметра – 29 нм ($RSD=1,05\%$) (рис. 3D). При этом в СО отсутствовали агрегаты вирусных капсидов большего размера (рис. 3D, F).

Определение физического титра вирусных частиц методом спектрофотометрии

При измерении оптической плотности раствора вирусных частиц поглощение в ультрафиолетовой области обусловлено аминокислотными остатками белков, находящихся во внешней сфере капсида [15, 16]. Коэффициент экстинкции был вычислен при длине волны 260 нм на основании оптической плотности образца раствора вирусных капсидов AAV9-GFP (раствор в 50 мМ Tris-HCl), физический титр которого определяли методами ИФА и динамического рассеяния света, и составил 3×10^{14} . В диапазоне разведений раствора образца AAV9-GFP 8×10^{11} – 4×10^{13} вк/мл наблюдали линейную зависимость оптической плотности раствора от физического титра (рис. 4A). Физический титр СО пустых капсидов AAV9 составил $1,48 \times 10^{13}$ вк/мл ($RSD=1,01\%$).

Определение физического титра пустых капсидов AAV методом биослойной интерферометрии

Следует отметить, что нижний предел количественного определения вирусных капсидов AAV9 методами динамического рассеяния света и спектрофотометрии достаточно высокий, что ограничивает возможность применения этих методов, особенно на начальных этапах разработки. В качестве альтернативного и достаточно точного метода оценки титра помимо ИФА в последнее время используется метод биослойной интерферометрии (bio-layer interferometry) [15]⁷. Метод основан на определении в реальном времени кинетики специфического взаимодействия антитела, иммобилизованного на биосенсоре, с белками капсида AAV в исследуемом образце,

что позволяет регистрировать кинетику образования комплекса антитела с антигеном и не требует внесения вторичных антител или дополнительных меток [17].

Для проведения анализа в работе применялись универсальные биосенсоры со стрептавидином и биотинилированные VHH-домены антител, специфичных к AAV – AAVX (рис. 4B). При апробации методики с использованием СО AAV9-GFP с известным титром, определенным методом ИФА, был установлен динамический диапазон методики ($6,2 \times 10^{10}$ – $1,0 \times 10^{12}$ вк/мл) и построена калибровочная кривая (рис. 4C). Установленная в эксперименте скорость связывания (в диапазоне титра $6,2 \times 10^{10}$ – $1,0 \times 10^{12}$ вк/мл) была сопоставима со скоростью связывания с использованием коммерчески доступных сенсоров⁸. Было показано, что концентрация пустых капсидов AAV9 в образце с 20-кратным разведением капсидов была выше предела детекции прибора, а концентрация капсидов в образце с 40-кратным разведением составила $0,774 \times 10^{12}$ вк/мл, что соответствовало титру СО AAV9 – $3,1 \times 10^{13}$ вк/мл.

Следует отметить, что в данной работе представлена проверка концепции методики (proof-of-concept), так как к моменту написания статьи достаточного количества повторностей не было набрано и статистика анализа не была проведена в полной мере. Постановка полного эксперимента с большим количеством измерений на точку запланирована на следующем этапе работы.

Оценка физического титра стандартного образца пустых капсидов AAV9 и анализ стабильности препаратов при хранении

Исследование стабильности СО пустых капсидов AAV9 проводили каждые три месяца в течение первого года хранения при температуре –80 °С. Проводили определение следующих показателей: физический титр AAV методами динамического рассеяния света и спектрофотометрии, методом биослойной интерферометрии (последняя точка контроля); относительное содержание мономера, низко- и высокомолекулярных фракций методом эксклюзионной хроматографии; концентрация агрегатов методом динамического рассеяния света; подлинность капсида подтверждали методом электрофореза в ПААГ. Результаты исследования представлены

⁶ [https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/poster%20aav%20concentration%20comparison%20mads%20concentration%20with%20elisa%20with%20allergan%20\(1\)_tcm50-65801.pdf](https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/poster%20aav%20concentration%20comparison%20mads%20concentration%20with%20elisa%20with%20allergan%20(1)_tcm50-65801.pdf)

⁷ <https://acs.digitellinc.com/sessions/571925/view>

⁸ <https://www.sartorius.com/download/1323012/octet-aavx-biosensors-quantitation-aav-capsids-protein-analy-1--data.pdf>

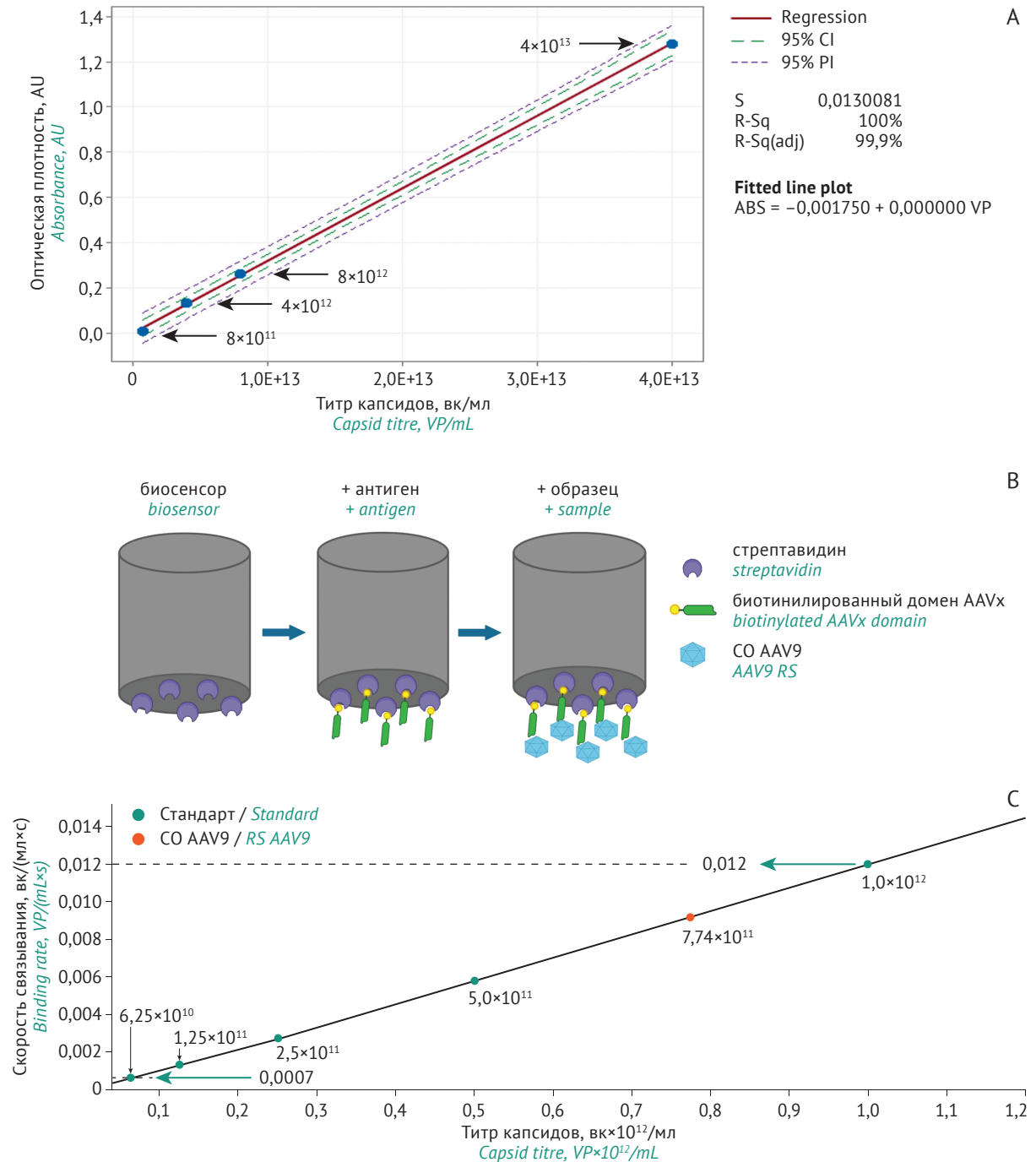


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 4. Определение физического титра аденоассоциированного вируса (AAV) с помощью методов спектрофотометрии и биослойной интерферометрии: А – линейная зависимость оптической плотности раствора образца AAV9-GFP при длине волны 260 нм от физического титра вирусных капсидов; В – последовательность нанесения молекул на биосенсор при определении количества вирусных капсидов AAV методом биослойной интерферометрии; С – зависимость скорости связывания антитела на биосенсоре с капсидами от используемого титра (голубыми стрелками указана скорость связывания в двух выбранных точках). CO AAV9 – стандартный образец аденоассоциированного вируса 9 серотипа, AAVX – анти-AAV антитела, вк – вирусные капсиды.

Fig. 4. Determination of the physical titre of adeno-associated virus (AAV) by spectrophotometry and bio-layer interferometry: A) The linear function of the AAV9-GFP solution absorbance at 260 nm vs the physical titre of viral capsids. B) The order of molecule application to the biosensor during viral capsid quantification. C) The rate of binding between the antibodies immobilised on the biosensor and the capsids as a function of the titre used (blue arrows indicate binding rates at two selected points). AAV9 RS, reference standard for adeno-associated virus serotype 9; GFP, green fluorescent protein; AAVx, anti-AAV antibodies; VP, viral particles.

Таблица 1. Результаты определения физического титра и содержания примесей стандартного образца (СО) пустых капсидов аденоассоциированного вируса 9 серотипа (AAV9) при исследовании стабильности
Table 1. Physical titre and impurity content values for the reference standard (RS) for empty capsids of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) measured during stability studies

Метод <i>Method</i>	Параметр, единицы измерения <i>Parameter</i>	Значение параметра <i>Parameter value</i>			
		СО на этапе получения <i>After production</i>	СО при сроке хранения <i>After storage for</i>		
			3 мес. <i>3 months</i>	6 мес. <i>6 months</i>	9 мес. <i>9 months</i>
Динамическое рассеяние света <i>Dynamic light scattering</i>	Концентрация капсидов, вк/мл <i>Capsid concentration, VP/mL</i>	4,7×10 ¹³ <i>RSD=8,042%</i>	5,2×10 ¹³ <i>RSD=6,408%</i>	5,6×10 ¹³ <i>RSD=4,871%</i>	4,0×10 ¹³ <i>RSD=3,612%</i>
Спектрофотометрия <i>Spectrophotometry</i>	Концентрация капсидов, вк/мл <i>Capsid concentration, VP/mL</i>	1,48×10 ¹³ <i>RSD=1,01%</i>	1,56×10 ¹³ <i>RSD=1,64%</i>	1,65×10 ¹³ <i>RSD=3,63%</i>	1,52×10 ¹³ <i>RSD=3,66%</i>
Биослойная интерферометрия <i>Bio-layer interferometry</i>	Концентрация капсидов, вк/мл <i>Capsid concentration, VP/mL</i>	–	–	–	3,1×10 ¹³
Динамическое рассеяние света <i>Dynamic light scattering</i>	Концентрация агрегатов, ед/мл <i>Aggregate concentration, units/mL</i>	<1,0×10 ⁵	<1,0×10 ⁵	<1,0×10 ⁵	<1,0×10 ⁵
Эксклюзионная хроматография <i>Size-exclusion chromatography</i>	Относительное содержание высокомолекулярной фракции, % <i>Relative HMWS content, %</i>	0,88	0,98	1,81	0,86
	Относительное содержание фракции мономеров, % <i>Relative monomer content, %</i>	99,12	99,02	98,19	99,14
	Относительное содержание низкомолекулярной фракции, % <i>Relative LMWS content, %</i>	0	0	0	0

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. вк/мл — количество вирусных капсидов в 1 мл; *RSD* — относительное стандартное отклонение.
Note. VP/mL, viral particles per 1 mL; *RSD*, relative standard deviation; HMWS, high molecular weight species; LMWS, low molecular weight species.

в таблице 1. Данные анализа концентрации СО пустых капсидов AAV9 методом биослойной интерферометрии представлены только для образцов после хранения в течение 9 месяцев (данная методика применялась в исследовании на последнем этапе). Было показано, что СО пустых капсидов AAV9 обладает высокой стабильностью при хранении. При этом значения титров, определенные тремя разными методами, варьировали от 1,48×10¹³ до 5,6×10¹³.

ВЫВОДЫ

1. Проведена наработка стандартного образца пустых капсидов AAV9 в клетках HEK293, адаптированных к росту в суспензионной культуре, а также его очистка и характеристика. Физический титр полученного препарата составил ~10¹³ вк/мл. Нарботанный стандартный образец пустых капсидов AAV9 обладал высокой степенью чистоты по результатам эксклюзионной хроматографии — содержание мономеров

вирусных капсидов составляло не менее 98%. С использованием методов динамического светорассеяния, эксклюзионной хроматографии и электронной микроскопии было показано отсутствие агрегатов в образце.

2. Показана стабильность полученного стандартного образца пустых капсидов AAV9 в течение 9 месяцев, что свидетельствует о его пригодности для оценки селективности хроматографического разделения пустых и полных капсидов.

3. Наиболее оптимальным представляется использование методов динамического рассеяния света и спектрофотометрии как наиболее доступных для рутинного анализа стандартного образца пустых капсидов AAV9 при определении физического титра (рабочий диапазон методик от 1,0×10¹⁰ до 1,0×10¹² вк/мл в образце). Для регулярного анализа качества (контрольные точки — раз в шесть месяцев) предлагается использовать метод биослойной интерферометрии.

Литература/References

1. Minskaia E, Galieva A, Egorov AD, Karabelsky AV. Viral vectors in gene replacement therapy. *Biochemistry (Mosc)*. 2023;88(12):2157–78. <https://doi.org/10.1134/s0006297923120179>
2. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377(18):1713–22. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1706198>
3. Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 1997;6(8):1205–14. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.8.1205>
4. Wang C, Mulagapati SHR, Chen Z, Du J, Zhao X, Xi G, et al. Developing an anion exchange chromatography assay for determining empty and full capsid contents in AAV6.2. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;15:257–63. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.006>
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680A0>
6. Hofmann A, Clokie S, eds. *Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 8th ed. Griffith University; 2018. <https://doi.org/10.1017/9781316677056>
7. Petersen RL. Strategies using bio-layer interferometry biosensor technology for vaccine research and development. *Biosensors (Basel)*. 2017;7(4):49. <https://doi.org/10.3390/BIOS7040049>
8. Рябова ЕИ, Деркаев АА, Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Довгий МА, Бырихина ДВ и др. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного адено-ассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):266–78. Ryabova EI, Derkaev AA, Esmagamбетov IB, Shcheblyakov DV, Dovgij MA, Byrikhina DV, et al. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):266–78 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
9. Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector. *Mol Ther*. 2016;24(2):287. <https://doi.org/10.1038/MT.2015.187>
10. Terova O, Soltys S, Hermans P, De Rooij J, Detmers F. Overcoming downstream purification challenges for viral vector manufacturing: enabling advancement of gene therapies in the clinic. *Cell and Gene Therapy Insights*. 2018;4(2):101–11. <https://doi.org/10.18609/CGTI.2018.017>
11. Florea M, Nicolaou F, Pacouret S, Zinn EM, Sanmiguel J, Andres-Mateos E, et al. High-efficiency purification of divergent AAV serotypes using AAVX affinity chromatography. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023;28:146–59. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.12.009>
12. Richert-Pöggeler KR, Franzke K, Hipp K, Kleespies RG. Electron microscopy methods for virus diagnosis and high-resolution analysis of viruses. *Front Microbiol*. 2019;9:3255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03255>
13. Yang TY, Braun M, Lembke W, McBlane F, Kamerud J, DeWall S, et al. Immunogenicity assessment of AAV-based gene therapies: an IQ consortium industry white paper. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022;26:471–94. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.07.018>
14. Deb PK, Kokaz SF, Abed SN, Paradkar A, Tekade RK. Chapter 6. Pharmaceutical and biomedical applications of polymers. In: Tekade RK, ed. *Basic fundamentals of drug delivery. A volume in advances in pharmaceutical product development and research*. Amsterdam: Elsevier; 2019. P. 203–67. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03215-6>
15. Sommer JM, Smith PH, Parthasarathy S, Isaacs J, Vijay S, Kieran, et al. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Mol Ther*. 2003;7(1):122–8. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(02)00019-9)
16. Grimm D, Storm TA, Hammami N, Graf M, Kay MA, Mahe-shri N, et al. 899. Directed evolution of the AAV-2 capsid yields novel mutants. *Mol Ther*. 2003;7(5):S347–8. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(16\)41341-9](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(16)41341-9)
17. Ульянова КВ, Казаров АА, Пантюшенко МС, Оленев АА, Лягоскин ИВ, Симонов ВМ. Разработка и валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1 с лигандами, в сыворотке крови яванского макака методом биослойной интерферометрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):257–67. Ulyanova KV, Kazarov AA, Pantushenko MS, Olenov AA, Lyagoskin IV, Simonov VM. Development and validation of a biolayer interferometry method for determination of human anti-PD-1 monoclonal antibody concentration in cynomolgus serum. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):257–67 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-257-267>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.В. Тумаев** — культивирование и трансфекция клеток, выделение и очистка пустых капсидов AAV; **Д.Ю. Во-лошин** — хроматографическая очистка образцов, анализ полученных результатов, редактирование и форматирование текста рукописи; **Е.С. Бердинских** — разработка методов анализа AAV с помощью эксклюзионной хроматографии и иммуноферментного анализа, характеристика образцов, анализ полученных результатов; **Е.Л. Сахибгараева** — проведение работ, связанных с характеристикой полученных образцов пустых капсидов AAV методами спектрофотометрии, динамического светорассеяния и эксклюзионной хроматографии, выполнение работ по исследованию стабильности, анализ полученных результатов;

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.V. Tumaev** performed cell culture and transfection, isolated and purified AAV capsids. **D.Yu. Voloshin** performed chromatographic purification of the samples, analysed the results obtained, edited and formatted the manuscript. **E.S. Berdinskikh** developed the methodology for AAV analysis by size-exclusion chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay, characterised the samples, and analysed the results obtained. **E.L. Sakhibgaraeva** characterised the samples of empty AAV capsids by spectrophotometry, dynamic light scattering, and size-exclusion chromatography; conducted the stability study; and analysed the results obtained. **E.V. Golovin** developed analytical procedures for AAV physical titre determination by ultraviolet

Е.В. Головин — разработка методик определения физического титра AAV методами спектрофотометрии и иммуноферментного анализа, анализ полученных результатов; **Е.Н. Субчева** — проведение просвечивающей электронной микроскопии, анализ полученных результатов; **О.О. Васильева** — разработка методики анализа количества частиц методом биослойной интерферометрии, анализ полученных результатов, редактирование текста рукописи; **А.А. Галиева** — проведение электрофореза, подготовка образцов для трансмиссионной электронной микроскопии, разработка образцов AAV9-GFP; редактирование и форматирование текста рукописи, участие в подготовке иллюстраций; **А.А. Чувашов** — руководство аналитической разработкой, редактирование и форматирование текста рукописи, анализ полученных данных, формулирование выводов; **Е.С. Новикова** — редактирование и форматирование текста рукописи, анализ полученных результатов, формулирование выводов; **А.В. Карабельский** — формирование концепции статьи, руководство проведением работ, редактирование и форматирование текста рукописи, систематизация информации на основании источников литературы, формулирование выводов.

spectrophotometry and enzyme-linked immunosorbent assay and analysed the results obtained. **E.N. Subcheva** performed transmission electron microscopy and analysed the resulting images. **O.O. Vasileva** developed analytical procedures for particle quantification by bio-layer interferometry, analysed the results obtained, and edited the manuscript. **A.A. Galieva** conducted electrophoresis, prepared the samples for transmission electron microscopy, produced the AAV9-GFP samples, edited and formatted the manuscript, participated in the preparation of figures. **A.A. Chuvashov** supervised the analytical development, edited and formatted the manuscript, analysed the results obtained, and formulated the conclusions. **E.S. Novikova** edited and formatted the manuscript, analysed the results obtained, and formulated the conclusions. **A.V. Karabelsky** conceptualised and supervised the study, edited and formatted the manuscript, collated the information presented in the literature, and formulated the conclusions.

Об авторах / Authors

Тумаев Артем Валериевич / Artem V. Tumaev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-1826-4091>

Волошин Данил Юрьевич / Danil Yu. Voloshin

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2201-2082>

Бердинских Евгений Сергеевич / Evgenii S. Berdinskikh

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1421-8931>

Сахибгараева Елена Любомировна / Elena L. Sakhibgaraeva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0252-3267>

Головин Евгений Валерьевич / Evgenii V. Golovin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4008-8433>

Субчева Елена Николаевна / Elena N. Subcheva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9282-3582>

Васильева Ольга Олеговна / Olga O. Vasileva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-3726-2261>

Галиева Алина Абдураимовна / Alima A. Galieva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8190-0710>

Чувашов Антон Андреевич / Anton A. Chuvashov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5528-150X>

Новикова Екатерина Сергеевна / Ekaterina S. Novikova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1817-9256>

Карабельский Александр Владимирович, канд. биол. наук / Alexander V. Karabelsky, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6391-5182>

Поступила 03.11.2023

После доработки 24.05.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 3 November 2023

Revised 24 May 2024

Accepted 21 June 2024

УДК 578.22:577.29

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228>

Оригинальная статья | Original article



Оценка тропизма и биораспределения синтетических и природных аденоассоциированных вирусных векторов *in vivo* методом секвенирования нового поколения

Д.О. Максимов^{1,2,4}, Д.А. Наумова¹, Е.А. Астахова¹, В.В. Артемьев¹,
С.А. Бирюков¹, И.С. Абрамов^{1,3,4}, А.А. Навойкова¹, Н.В. Рудев^{1,4},
С.Г. Феоктистова^{1,4}, О.В. Глазова^{1,4}, О.Н. Митяева^{1,2,4}, ✉, П.Ю. Волчков^{1,2,3,4}

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Институтский переулок, д. 9, Долгопрудный, Московская область, 141700, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы», ул. Новогиреевская, д. 1, Москва, 111123, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», ул. Балтийская, д. 8, Москва, 125315, Российская Федерация

✉ Митяева Ольга Николаевна; mitiaeva.on@mipt.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Создание синтетических векторов на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ) при разработке препаратов для генной терапии является трудоемким и дорогостоящим процессом. Для ускорения и снижения стоимости разработки генотерапевтических препаратов оптимальным представляется совершенствование методов оценки биораспределения и эффективности трансдукции *in vivo* ААВ векторов.

ЦЕЛЬ. Разработка методики биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе ААВ для анализа биораспределения и эффективности трансдукции ААВ *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Конструировали синтетические ААВ векторы путем добавления специальной метки (баркода), специфичной для каждого исследуемого серотипа ААВ — 12-нуклеотидной последовательности, фланкированной с 5'-конца кодирующей последовательностью репортерного белка (зеленый флуоресцентный белок). Плазмиды с уникальными баркодами нарабатывали в компетентных клетках *Escherichia coli* XL10-Gold и использовали для сборки ААВ-библиотек: ААВ-библиотека L1 — с количеством вирусных геномов (вг) 10^{10} ; библиотека L2 с количеством вг — 10^{11} . Для продукции ААВ проводили трансфекцию клеток НЕК293Т. Векторы в виде двух ААВ-библиотек вводили внутривенно мышам линии C57B1/6N. Из органов и тканей животных выделяли ДНК и РНК для последующего анализа методом секвенирования нового поколения. Анализировали количество ДНК- и РНК-баркодов в органах мышей для оценки биораспределения и эффективности трансдукции ААВ. Баркоды идентифицировали с помощью выравнивания на ожидаемые последовательности, затем подсчитывали их количество и нормировали на количество в исходной библиотеке.

© Д.О. Максимов, Д.А. Наумова, Е.А. Астахова, В.В. Артемьев, С.А. Бирюков, И.С. Абрамов, А.А. Навойкова, Н.В. Рудев, С.Г. Феоктистова, О.В. Глазова, О.Н. Митяева, П.Ю. Волчков, 2024

РЕЗУЛЬТАТЫ. Созданы 7 вирусных конструкций на основе AAV различных серотипов, 6 из которых — синтетические (sAAB1, sAAB2, sAAB3, sAAB4, sAAB5, sAAB6), в составе двух AAV-библиотек. При проведении секвенирования образцов из органов мышей обнаружено значимое количество ДНК-баркодов обеих AAV-библиотек в образцах всех органов, за исключением мозга. Для библиотеки L1 детектированы РНК-баркоды на достаточном уровне в четырех органах: скелетная мускулатура, сердце, печень и надпочечники; для библиотеки L2 — дополнительно к перечисленным органам в гонадах и почках. При анализе эффективности трансдукции (по уровню РНК-баркодов с поправкой на ДНК-баркоды) показано, что наиболее перспективными вариантами для генной терапии заболеваний печени является sAAB5, а для заболеваний надпочечников — sAAB2 и sAAB6.

ВЫВОДЫ. Разработанная методика биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе AAV позволяет проводить анализ биораспределения и эффективности трансдукции AAV векторов в организме. Предложенный подход является перспективным для подбора оптимальных AAV векторов для конкретных органов и тканей при разработке генотерапевтических препаратов.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус; AAV; синтетический вектор; библиотека синтетических векторов; AAV-библиотека; баркодирование; ДНК-баркод; РНК-баркод; серотипы AAV; секвенирование нового поколения; биоинформатический анализ; биораспределение; эффективность трансдукции *in vivo*; тропизм; генная терапия

Для цитирования: Максимов Д.О., Наумова Д.А., Астахова Е.А., Артемьев В.В., Бирюков С.А., Абрамов И.С., Навойкова А.А., Рудев Н.В., Феоктистова С.Г., Глазова О.В., Митяева О.Н., Волчков П.Ю. Оценка тропизма и биораспределения синтетических и природных аденоассоциированных вирусных векторов *in vivo* методом секвенирования нового поколения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):215–228. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228>

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-64-00002).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

In vivo evaluation of tropism and biodistribution of synthetic and natural adeno-associated viral vectors by next-generation sequencing

Denis O. Maksimov^{1,2,4}, Daria A. Naumova¹, Ekaterina A. Astakhova¹,
Valentin V. Artemev¹, Stanislav A. Biryukov¹, Ivan S. Abramov^{1,3,4},
Anna A. Navoikova¹, Nikolai V. Rudev^{1,4}, Sofia G. Feoktistova^{1,4}, Olga V. Glazova^{1,4},
Olga N. Mityaeva^{1,2,4}, ✉, Pavel Yu. Volchikov^{1,2,3,4}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, 9 Institutsky Ln., Dolgoprudny, Moscow region 141700, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, 1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

³ A.S. Loginov Moscow Clinical Research Center, 1 Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russian Federation

⁴ Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation

✉ Olga N. Mityaeva; mitiaeva.on@mipt.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The creation of synthetic adeno-associated virus (AAV) vectors during gene therapy development is a labour-intensive and expensive process. The optimal solution to minimise the time and costs associated with gene therapy development lies in the improvement of methods aimed at assessing AAV vector biodistribution and transduction efficiency *in vivo*.

AIM. This study aimed to develop a new bioinformatics-based assessment method for synthetic AAV vector libraries to analyse AAV vector biodistribution and transduction efficiency *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS. The production of synthetic AAV vectors involved assigning AAV serotype-specific barcodes (12-nucleotide tags flanked at the 5' end with a sequence encoding the green fluorescent reporter protein). Plasmids carrying unique barcodes were propagated in competent *Escherichia coli* XL10-Gold cells and used to create two AAV libraries: L1 with a viral genome count of 10^{10} and L2 with a viral genome count of 10^{11} . AAV production involved HEK293T cell transfection. L1 and L2 library vectors were administered to C57BL/6N mice by intravenous injection. DNA and RNA were isolated from transduced organs for analysis by next-generation sequencing. The obtained data on DNA and RNA barcode quantities in different murine organs were analysed to assess the biodistribution and transduction efficiency of synthetic AAVs. Barcodes were identified by aligning them to the expected sequences and counted. The resulting values were normalised to the quantity of barcodes in the original library.

RESULTS. Seven viral constructs based on different AAV serotypes were created as part of two AAV libraries. Six of the AAV serotypes were synthetic (sAAV1, sAAV2, sAAV3, sAAV4, sAAV5, and sAAV6). Sequencing of murine organ samples revealed significant quantities of DNA barcodes from both AAV libraries in all organs except the brain. For the L1 library, RNA barcodes were detected at a sufficient level in 4 organs, including the skeletal muscles, the heart, the liver, and the adrenal glands. For the L2 library, in addition to the listed organs, sufficient RNA-barcode levels were observed in the gonads and the kidneys. According to transduction efficiency analysis based on RNA barcode levels adjusted for DNA barcodes, sAAV5 was considered the most promising variant for gene therapy of liver-related diseases, whereas sAAV2 and sAAV6 were recognised as holding the most promise for adrenal diseases.

CONCLUSIONS. The developed bioinformatics-based assessment method for synthetic AAV vector libraries can analyse AAV vector biodistribution and transduction efficiency in the body. The presented approach has the potential for selecting optimal AAV vectors for specific organs and tissues in further gene therapy development.

Keywords: adeno-associated virus; AAV; synthetic vector; synthetic vector library; AAV library; barcoding; DNA barcode; RNA barcode; AAV serotypes; next-generation sequencing; NGS; bioinformatics analysis; biodistribution; transduction efficiency *in vivo*; tropism; gene therapy

For citation: Maksimov D.O., Naumova D.A., Astakhova E.A., Artemev V.V., Biryukov S.A., Abramov I.S., Navoikova A.A., Rudev N.V., Feoktistova S.G., Glazova O.V., Mityaeva O.N., Volchkov P.Yu. *In vivo* evaluation of tropism and biodistribution of synthetic and natural adeno-associated viral vectors by next-generation sequencing. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):215–228. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228>

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 23-64-00002).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Векторы на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ) являются перспективным инструментом для генной терапии благодаря способности эффективно доставлять генетический материал в клетки-мишени и низкой иммуногенности [1]. Разные серотипы ААВ имеют различные показатели эффективности трансдукции и биораспределения в органах и тканях [2–4]. Наиболее перспективны для генной терапии те серотипы ААВ, которые селективно трансдуцируют целевые органы-мишени, не затрагивая остальные ткани [5]. Разработка синтетических векторов на основе серотипов ААВ актуальна для достижения оптимальных показателей биораспределения и трансдукции, а также для снижения риска нежелательных

токсических эффектов, в частности иммунных реакций [6–9].

Внесение изменений в гены, кодирующие белки капсида ААВ, при создании синтетических векторов влияет на сродство капсида к рецепторам клеток и, следовательно, на параметры биораспределения вируса в организме [10–12]. В связи с этим при создании синтетических ААВ необходимо проводить их тестирование для изучения показателей биораспределения в тканях и эффективности трансдукции. Для исследования этих показателей наиболее информативными являются методы с использованием животных моделей: биоимиджинг в живом организме; определение сигнала от репортера в извлеченных органах и тканях; количественное определение вирусных частиц (например, с помощью

количественной ПЦР) [13]. Реализация этих подходов подразумевает необходимость тестирования на животных каждого синтетического вектора на основе ААВ по отдельности, что является ресурсо- и трудозатратным процессом и препятствует ускоренной разработке векторов для генной терапии [14, 15].

Для решения описанной проблемы авторами данной работы предлагается создание высокопроизводительной скрининговой системы на основе ААВ-библиотек, состоящих из нескольких серотипов ААВ, что позволит быстро отбирать варианты ААВ с интересующими характеристиками биораспределения и трансдукции.

В настоящее время существует несколько систем молекулярного баркодирования ААВ-библиотек [16]. В работе K. Adachi с соавт. [17] впервые показано применение технологии баркодирования ДНК с последующим использованием метода секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS) в отношении ААВ. Полученные результаты позволили построить функциональную карту капсида ААВ, которая выявила аминокислотные замены, влияющие на функциональную активность капсида. Подход, направленный на анализ биораспределения ААВ в организме с использованием технологии баркодирования ААВ-библиотек, был впервые предложен сотрудниками лаборатории С. Золотухина (Университет Флориды, США) [18]. Анализ биораспределения ААВ в тканях после инъекции проводится по оценке ДНК, а анализ тропизма — способности экспрессировать трансген в тканях, регистрируется по оценке уровня РНК [19].

Несмотря на значительный прогресс в области разработки методов для массовой характеристики вариантов капсидов ААВ с помощью

NGS-секвенирования [16–18], биоинформатические подходы для анализа данных молекулярного баркодирования в тканях организма остаются несовершенными. В данной работе применялась обобщенная линейная регрессия, что позволило учесть тот факт, что для различных повторов неизбежно получается разное покрытие, а значит и разная достоверность. Это учитывается моделью при оценке среднего. Кроме того, важным новым аспектом данного исследования являлась оценка эффективности трансдукции (тропизм с учетом биораспределения), так как эта оценка имеет важное значение для подбора стратегии проведения генотерапии. Так, например, если вариант вируса обладает высокой эффективностью трансдукции, но из-за особенностей профиля биораспределения в малой степени попадает в целевую ткань, то в этом случае локальная инъекция препарата вируса может быть более предпочтительной.

Цель работы — разработка методики биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе ААВ для анализа биораспределения и эффективности трансдукции ААВ *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента

Схема дизайна эксперимента представлена на рисунке 1.

Баркодирование ААВ-библиотек

Для изучения свойств векторов на основе различных серотипов ААВ проводили добавление специальной метки (баркода), специфичной для каждого исследуемого серотипа ААВ (табл. 1). Баркод представлял собой 12-нуклеотидную последовательность, фланкированную с 5'-конца кодирующей последовательностью

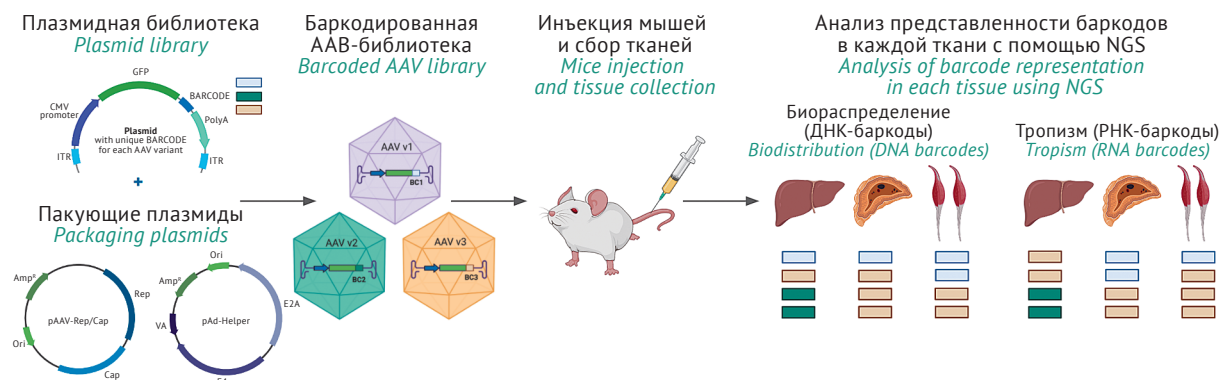


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Дизайн эксперимента. ААВ — аденоассоциированный вирус, NGS — секвенирование нового поколения.

Fig. 1. Experiment design. AAV, adeno-associated virus; NGS, next-generation sequencing.

Таблица 1. Серотипы аденоассоциированных вирусных векторов (AAB) и использованные для них баркоды
Table 1. Serotypes of adeno-associated virus (AAV) vectors and the corresponding barcodes

ААВ-библиотека <i>AAV library</i>	Серотип ААВ <i>AAV serotype</i>	Последовательность ДНК баркода (5'–3') <i>DNA barcode sequence (5'–3')</i>
L1, L2	sAAB1/ <i>sAAV1</i>	TTT GTA GTC GAC
L1, L2	sAAB2/ <i>sAAV2</i>	TCA CCT CAA GAC
L1, L2	sAAB3/ <i>sAAV3</i>	GTG AGA TAA TGT
L1, L2	sAAB4/ <i>sAAV4</i>	ATC ATA AAA GTT
L1	sAAB5/ <i>sAAV5</i>	CAT GAT AAT ATG
L1, L2	sAAB6/ <i>sAAV6</i>	TCG ACC TCC CCG
L1	AAB2/ <i>AAV2</i>	GCA ATT GTG ATG

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

репортерного белка (улучшенный зеленый флуоресцентный белок, enhanced green fluorescent protein, EGFP) и с 3'-конца сигналом полиаденилирования мРНК (poly(A) signal) (рис. 2).

Для баркодирования плазмид предварительно амплифицировали репортерный ген (eGFP) с использованием Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NEB, США) согласно рекомендациям производителя с помощью пула праймеров, из которых обратные праймеры дополнительно несли различные последовательности баркода. Амплифицированные фрагменты клонировали по методу Гибсона с использованием NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, США) согласно рекомендациям производителя. Полученными плазмидами, содержащими репортерный ген с баркодом, трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* XL10-Gold (Aligent) и рассевали их на чашки Петри с агаризованной селективной средой LB (Диаэм, Россия) с антибиотиком. Далее проводили скрининг колоний для подтверждения правильности целевой вставки, после чего наращивали клеточную массу в жидкой питательной среде LB (Диаэм, Россия), выделяли плазмидную ДНК и проводили рестрикционный анализ. Плазмиды, соответствующие требуемой рестрикционной карте, секвенировали (при участии ЗАО «Евроген», Россия).

Всего было собрано 30 конструкций. Плазмиды с уникальными баркодами использовались для сборки ААВ-библиотек: ААВ-библиотека L1 — с количеством вирусных геномов (вг) 10^{10} ; библиотека L2 с количеством вг — 10^{11} .

Сборка ААВ векторов

Для продукции ААВ проводили трансфекцию клеток HEK293T в присутствии PEI 25K (Polysciences, Индия) тремя плазмидами, несущими следующие гены: 1 — целевой ген eGFP; 2 — гены *rep* и *cap* ААВ (Cell Biolabs, США); 3 — гены-помощники ААВ (гены аденовируса E4, E2, VA) (Cell Biolabs, США) в соотношении 1:1:1 [20].

Подготовка и проверка плазмид выполнялась по стандартным протоколам культивирования и трансформации *E. coli*. После трансфекции и инкубации клетки лизировали в щелочном буфере в присутствии бензоназы (ГенТерра, Россия). Очистку клеточного лизата проводили в градиенте йодоксанола (60, 40, 25, 15%) (Sigma-Aldrich, США) с последующим ультрацентрифугированием на центрифуге Optima XPN-80 Ultracentrifuge (Beckman Coulter, США) в течение 90 мин при температуре 10 °C и 360000 g, с последующей стерилизацией фильтрованием.

Для подсчета количества выделенного ААВ (вг/мкл) использовали количественную

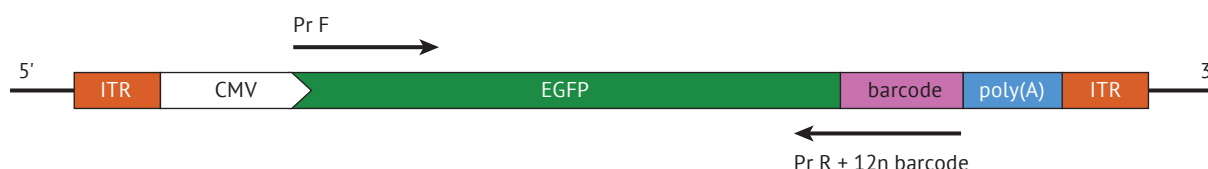


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Общая схема баркодирования плазмид. ITR — инвертированные терминальные повторы; CMV — промотор цитомегаловируса; EGFP — улучшенный зеленый флуоресцентный белок; barcode — баркод; poly(A) — сигнал полиаденилирования; Pr F — прямой праймер; Pr R + 12n barcode — обратный праймер с последовательностью баркода.

Fig. 2. General plasmid barcoding scheme. ITR, inverted terminal repeats; CMV, cytomegalovirus promoter; poly(A), polyadenylation signal; Pr F, forward primer; Pr R + 12n barcode, reverse primer and barcode sequence.

полимеразную цепную реакцию (qPCR) со специфическими к инвертированным терминальным повторам праймерами (fwd ITR primer, 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT; rev ITR primer, 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA) с красителем Sybr Green (ЗАО «Евроген», Россия). В качестве стандартов использовали серию разведений лианеризованной плазмиды с трансгеном, упакованной в капсид ААВ. Перед началом реакции образец обрабатывали ДНКазой (NEB, США) и подвергали последующему термическому воздействию для разрушения капсидов (95 °C, 10 мин).

Исследование с экспериментальными животными

Исследование проводили на мышах-самцах линии C57Bl/6N в возрасте 7 нед. (животные предоставлены НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен локальным Биоэтическим комитетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 62-д-з от 16.05.2023). Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях¹.

Было сформировано 3 группы животных, в каждой из которых было по 4 мыши: контрольная группа и две экспериментальные. Животным из контрольной группы водили инъекционно PBS, а животным из экспериментальных групп проводили инъекции ААВ-библиотек (L1 и L2).

Подготовка препарата ААВ и инъекции производились в асептических условиях. Препарат разводили в PBS, конечный объем для инъекции составлял 50 мкл. Готовили растворы ААВ для введения мышам в дозах: векторы ААВ-библиотеки L1 — концентрация 10^{10} вг/животное, ААВ-библиотеки L2 — концентрация 10^{11} вг/животное. Инъекция проводилась в хвостовую вену со скоростью 1 мл/мин.

Через месяц после инъекций животных подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков. Проводили отбор следующих органов: гонады, легкие, головной мозг, скелетная мускулатура, надпочечники, печень, почки, селезенка, сердце, сетчатка глаза, тимус. После извлечения органы помещались в пробирки типа «Эппендорф» объемом 2 мл для последующего анализа.

Подготовка библиотек ДНК и кДНК

ДНК и РНК из органов мышей выделяли с помощью набора для параллельного выделения нуклеиновых кислот HiPure DNA/RNA kit (Magen, Китай). Концентрацию нуклеиновых кислот и наличие примесей оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop™ 2000c (Thermo, США). В качестве опытных образцов для анализа использовали образцы нуклеиновых кислот, выделенных из органов: 88 образцов РНК, 88 образцов ДНК. В качестве контрольных образцов использовали: образцы ААВ-библиотек L1 и L2, которые не вводили животным; отрицательный контроль — 4 образца ДНК и 4 образца РНК, выделенные из органов животных, которым вводили PBS без ААВ; отрицательные контроли всех стадий пробоподготовки — обратная транскрипция (ОТ), 1 стадия ПЦР, 2 стадия ПЦР.

Для получения кДНК использовали набор HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) для синтеза кДНК и удаления геномной ДНК (Vazyme, Китай). Для реакции использовали 1 мкг РНК каждого образца; проводили постановку 1 раунда ПЦР. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы 3'-концы были комплементарны фланкирующей баркод области GFP, а 5'-концы несли последовательности универсальных адаптеров, аналогичных последовательностям набора Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, США).

ПЦР проводили с помощью Q5® High-Fidelity PCR Kit (NEB, США) согласно инструкции производителя. Количество циклов амплификации составляло 20 и было определено в рамках контрольных экспериментов с помощью постановки ПЦР в реальном времени — 200 нг геномной ДНК, выделенной из разных органов, в присутствии флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, США). Для образцов всех органов показатель количества циклов амплификации (Cq) не превышал 20.

Секвенирование

Секвенирование полученных библиотек проводили с использованием платформы MiSeq (Illumina, США) с помощью набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles).

Биоинформатический анализ результатов секвенирования

Парные чтения, полученные после секвенирования в формате fastq, были картированы на референс с помощью программы

¹ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

minimap2 v.2.26-r1175 [21]. Референс содержал последовательность исходной плазмиды, кодирующей последовательность EGFP и регуляторных элементов (EGFP, ITR), в котором последовательность баркода длиной 12 нуклеотидов кодировалась с помощью 12 символов N (табл. 1). Полученные bam-файлы были отсортированы и индексированы с помощью программы Samtools v.1.17², а затем анализировались с использованием программного обеспечения Jupyter Notebook (python v.3.10.11, библиотеки pysam v.0.21.0, biopython v.1.81 [22]). Сначала выделялись участки чтений, картированные на баркод, затем проводилось попарное выравнивание каждого из этих участков (с длиной больше 5 нуклеотидов) с каждой из референсных последовательностей баркодов с помощью класса PairwiseAligner (параметры scoring = «blastn», mode = «global») из модуля Align пакета Biopython³. Чтобы отсеять возможные баркоды низкого качества, было сгенерировано 100 случайных баркодов и осуществлялось выравнивание с каждым из этих вариантов. В случае если участок чтения имел скор выравнивания (числовая оценка, отражающая степень сходства между двумя последовательностями) на баркод вируса выше, чем на случайный, то вариант вируса считался детектированным. Для каждой библиотеки (ДНК исходной AAB-библиотеки; ДНК или РНК, выделенные из ткани или органа мыши) оценивалось количество каждого из вариантов вируса, при этом в случае, когда левое и правое прочтение детектировали отличающиеся баркоды (таких оказалось всего 3 пары чтений для всех библиотек), пара исключалась из рассмотрения.

Оценка относительного количества баркодов в AAB-библиотеке

Оценка относительного количества производилась независимо для каждого органа или ткани с учетом распределения вирусов (баркодов) исходной AAB-библиотеки. Анализ проводился в RStudio (R v.4.3.1)⁴ с помощью пакетов stats v.4.3.1 и ggplot2 v.3.4.2. Оценка числа детектированных баркодов проводилась с помощью обобщенной линейной модели (функция glm, family = «poisson») по формуле (1):

$$B \approx V + L + \ln(N_{\text{ткань}}) + \ln(N_{\text{Лвирус}}/N_{\text{Лобщ}}) - 1, \quad (1)$$

где, B — число детектированных баркодов конкретного варианта вируса (число ДНК-баркодов

при оценке биораспределения; число РНК-баркодов при оценке тропизма); V — категориальная переменная, которая отражает эффективность варианта вируса в ткани или органе (усредненную по двум AAB-библиотекам); L — поправка на AAB-библиотеку ($L1 = 10^{10}$ вг, $L2 = 10^{11}$ вг); $N_{\text{ткань}}$ — общее количество баркодов, детектированных в образце ткани; $N_{\text{Лвирус}}$ и $N_{\text{Лобщ}}$ — количество баркодов варианта вируса и общее количество баркодов, соответственно, в исходной AAB-библиотеке.

Эффективность трансдукции — способность вируса проникать в клетки и приводить к экспрессии трансгена — величина, представляющая собой тропизм с коррекцией на биораспределение, а в логарифмическом масштабе — разность между вирусной нагрузкой на ткань и показателем эффективности трансдукции вирусом этой ткани. Для лучшей оценки эффективности трансдукции, позволяющей определить стандартную ошибку как в отдельных дата поинтах, так и среднюю, применялась следующая формула (2):

$$B \approx V + RNA_v + L + \ln(N_{\text{ткань}}) + \ln(N_{\text{Лвирус}}/N_{\text{Лобщ}}) - 1, \quad (2)$$

где B — число детектированных баркодов конкретного варианта вируса (ДНК-баркоды и РНК-баркоды варианта вируса в ткани); V и RNA_v — категориальные переменные, отражающие биораспределение и эффективность трансдукции, соответственно, серотипа вируса в ткани/органе (усредненную по двум библиотекам). Переменная RNA_v имеет ненулевое значение, только когда B — РНК-баркоды (для ДНК-баркодов всех вирусов переменная имеет одно значение — «DNA»). Параметры L, $N_{\text{ткань}}$, $N_{\text{Лвирус}}$ и $N_{\text{Лобщ}}$ те же, что и в предыдущей модели.

При сравнении вирусов между собой проводилась оценка отдельно для каждой библиотеки и мыши (без параметра L в формуле, с оценкой параметра V на соответствующем подмножестве данных). Стандартные ошибки оценки параметров определяли с помощью функции «summary» в RStudio (R v.4.3.1)⁵. При графической визуализации значения биораспределения (рис. 5, 6) или тропизма (рис. 7, 8) менее минус 5 были обрезаны до этой точки, а стандартная ошибка установлена как 0. В каждом графике (диаграмма «ящик с усами») (рис. 3–10) использовали следующие элементы: центральная линия — медиана; границы «ящика» — верхний и нижний квартили;

² <https://www.htslib.org/>

³ <https://biopython.org/>

⁴ <https://posit.co/download/rstudio-desktop/>

⁵ Там же.

черные линии («усы») — 1,5-интерквартильный размах; вертикальные красные линии — стандартная ошибка среднего; черные точки — статистические выбросы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сборка баркодированных AAB-библиотек

Секвенирование показало, что 15 из 30 отправленных на секвенирование плазмид, кодирующих EGFP, содержали подтвержденные 12-нуклеотидные баркоды. Среди этих 15 образцов плазмид не было обнаружено повторения баркода. Далее из этих подтвержденных секвенированием образцов были отобраны 7 плазмид с баркодами, которые в дальнейшем использовались для сборки различных серотипов AAB векторов (табл. 1).

Указанные серотипы использовались для составления двух AAB-библиотек (L1 и L2): L1 включала в себя 7 серотипов AAB, L2 — 5 серотипов (табл. 1). Для составления обеих библиотек использовались различные серотипы векторов в равном соотношении. Для инъекционного введения мышам использовали количество вирусных геномов, равное в случае AAB-библиотеки L1 — 10^{10} вг на животное, для L2 — 10^{11} вг на животное.

Контроль качества AAB-библиотек для секвенирования

Перед пробоподготовкой проводилась спектрофотометрическая оценка качества ДНК и РНК по показателю соотношений длин волн. Значения поглощения (A) 260/280 и 260/230 нм соответствовали приемлемым для ампликоновой пробоподготовки образцов высокопроизводительного секвенирования (1,8–2,0 и 2,0–2,2 соответственно). Финальный контроль размера AAB-библиотек проводили с помощью капиллярного электрофреза (биоанализера) Qsep 100 (BiOptic, Китай). Размер AAB-библиотек соответствовал ожидаемому для продукта второго раунда амплификации (продукт 1 раунда + размер индекс-адаптерных последовательностей) с учетом погрешности измерения. В результате оптимизированной пробоподготовки удалось избавиться от коротких димеров праймеров и адаптеров (~150 пб), критически влияющих на расчет реакции секвенирования и дальнейший анализ данных.

Анализ биораспределения и тропизма

В связи с тем что активность используемого в данной работе CMV промотора (рис. 2) варьирует в различных тканях организма, подход, предложенный авторами, заключался в сравне-

нии биораспределения и тропизма различных серотипов AAB в пределах отдельной ткани.

В настоящей работе термин «биораспределение» используется для описания способности вируса достигать ткани и оценивается по количеству ДНК. Достижение вирусом ткани не означает его проникновение в клетки, так как вирусы могут находиться на поверхности клеток. Термин «тропизм» в данной работе используется для описания способности вируса заражать ткань (достигать клетки, проникать в ядро и приводить к экспрессии трансгена) и оценивается по количеству РНК. Термин «эффективность трансдукции» обозначает способность вируса, достигнув ткани, заразить ее, и оценивается по количеству РНК с поправкой на количество ДНК вируса в ткани.

В рамках данного подхода количественное сравнение биораспределения и тропизма используемых серотипов AAB между различными тканями/органами представлялось невозможным.

Для исследования биораспределения оценивалось количество вирусных ДНК-баркодов в целевых тканях и органах мышей (как описано в разделе «Материалы и методы»). По результатам анализа секвенирования удалось обнаружить ДНК-баркоды каждой из AAB-библиотек в каждом из проанализированных образцов органов/тканей (рис. 3). Полученный результат свидетельствует о том, что количество вирусной ДНК в каждом образце оказалось достаточным для проведения амплификации и дальнейшего секвенирования ампликонов.

Следует отметить, что количество ДНК-баркодов в образцах мозга мышей было достаточное для анализа, однако оно было меньше (статистически значимо) относительно среднего числа ДНК-баркодов, обнаруженных в других органах ($p=0,002$, двусторонний тест Вилкоксона). Вероятно, обнаруженные в образцах мозга ДНК-баркоды являются остаточной ДНК, локализованной на стенках сосудов головного мозга мышей. Таким образом, протестированные в данной работе серотипы AAB не способны преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Для исследования тропизма проводилась оценка количества вирусных РНК-баркодов в целевых тканях и органах мышей (рис. 4). Был установлен порог минимального количества детектированных баркодов, равный 10 (красная пунктирная линия на рис. 4), и в рассмотрение включались только те ткани, для которых нижний квартиль числа детектированных баркодов был выше 1. Таким образом, для AAB-библиотеки L1, содержащей меньшее количество AAB (10^{10} вг), удалось детектировать

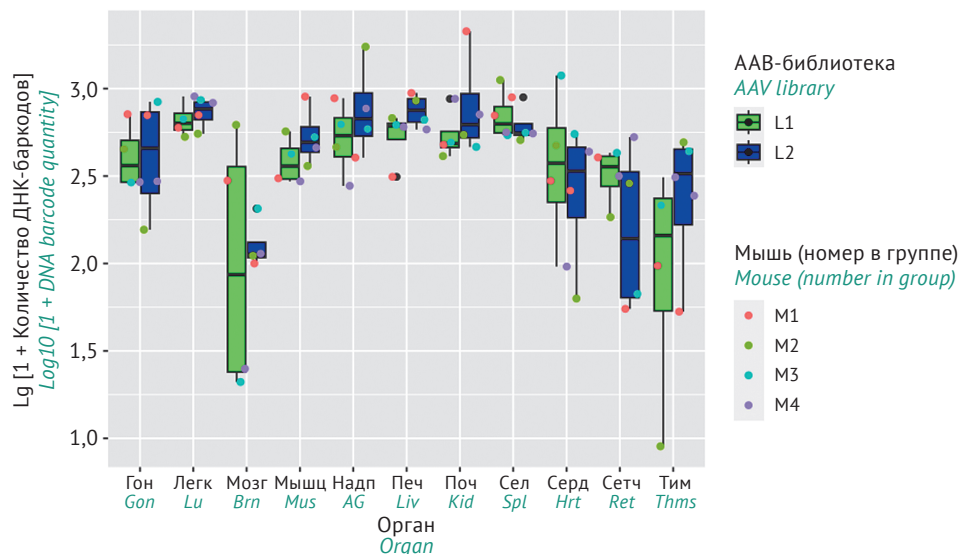


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Биораспределение аденоассоциированного вируса (AAV) в образцах органов и тканей мышей по количеству ДНК-баркодов после инъекционного введения AAV-библиотек L1 или L2. По оси X указаны органы/ткани: Гон — гонады, Легк — легкие, Мозг — головной мозг, Мышц — скелетная мускулатура, Надп — надпочечники, Печ — печень, Поч — почка, Сел — селезенка, Серд — сердце, Сетч — сетчатка глаза, Тим — тимус. По оси Y указан десятичный логарифм количества ДНК-баркодов каждой из AAV-библиотек в каждом из проанализированных образцов органов/тканей. В легенде указаны AAV-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Черными линиями показан 1,5-интерквартильный размах.

Fig. 3. Adeno-associated virus (AAV) biodistribution in mouse organs and tissues by the quantity of DNA barcodes after injection of AAV libraries L1 or L2. The X-axis indicates organs/tissues: Gon, gonads; Lu, lungs; Brn, brain; Mus, skeletal muscles; AG, adrenal glands; Liv, liver; Kid, kidney; Spl, spleen; Hrt, heart; Ret, retina; Thms, thymus. The Y-axis indicates the decimal logarithm of the quantity of DNA barcodes from each AAV library in each of the organ/tissue samples analysed. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Black lines show the 1.5-interquartile range.

РНК-баркоды на достаточном уровне только в случае четырех тканей: скелетная мускулатура, сердце, печень и надпочечники. Для AAV-библиотеки L2, содержащей 10^{11} вг, как и ожидалось, эффективная трансдукция по детектируемому количеству РНК-баркодов (у всех мышей группы) зарегистрирована в большем количестве органов/тканей — дополнительно к вышеуказанным, в почках и гонадах (рис. 4).

Показано практически полное отсутствие экспрессии вирусной РНК в образцах головного мозга и селезенки мышей при использовании обеих AAV-библиотек. В случае головного мозга отсутствие экспрессии связано, по-видимому, с неспособностью используемых AAV преодолевать ГЭБ; в случае селезенки возможно влияние других факторов, так как проникновение AAV в селезенку было подтверждено высоким содержанием ДНК-баркодов в органе.

Анализ биораспределения и тропизма в печени и надпочечниках

Результаты анализа биораспределения показывают высокую согласованность результатов как внутри, так и между AAV-библиотеками (рис. 5, 6), что позволяет определить се-

ротипы AAV, способные наиболее эффективно достигать печени и надпочечников (sAAB5 и sAAB2 соответственно).

Результаты анализа тропизма продемонстрировали высокую согласованность для большей части серотипов AAV (рис. 7, 8). Следует отметить, что для серотипа sAAB2 в надпочечниках и печени имеется значительное расхождение результатов между библиотеками L1 и L2, что, возможно, объясняется небольшим количеством повторов.

Оценка тропизма имеет большое прикладное значение для выбора серотипа AAV, позволяющего добиться наибольшей экспрессии трансгена в ткани-мишени. Так, среди протестированных серотипов AAV наиболее перспективным для генной терапии заболеваний, связанных с печенью (например, гемофилии А, В и С), является sAAB5 (рис. 7), а для заболеваний, связанных с надпочечниками (например, для врожденной дисфункции коры надпочечников) — sAAB2 и sAAB6 (рис. 8).

Анализ эффективности трансдукции в печени и надпочечниках

Численные значения, полученные в результате оценки биораспределения и тропизма,

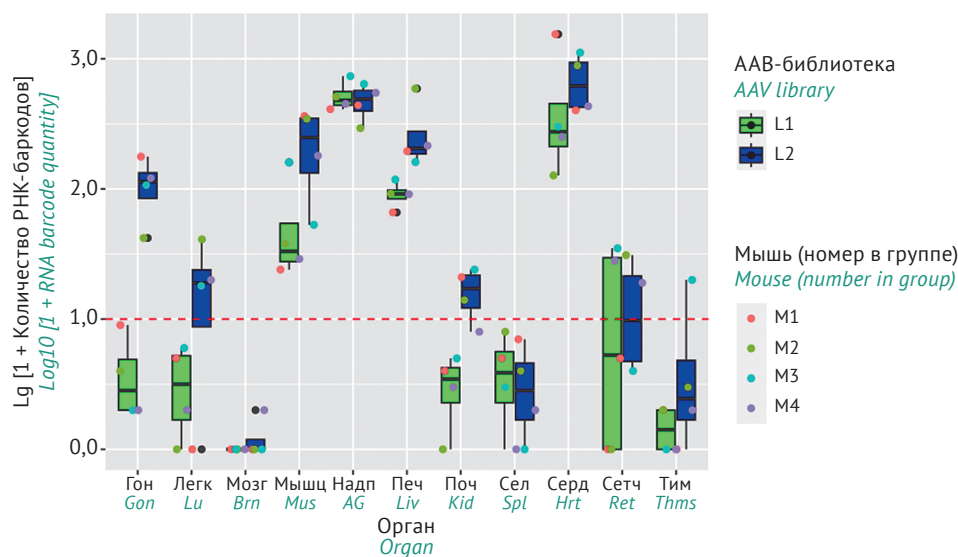


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Тропизм вариантов аденоассоциированного вируса (AAV) к органам и тканям мышей после инъекционного введения AAV-библиотек L1 или L2. По оси X указаны органы/ткани: Гон — гонады, Легк — легкие, Мозг — головной мозг, Мышц — скелетная мускулатура, Надп — надпочечники, Печ — печень, Поч — почка, Сел — селезенка, Серд — сердце, Сетч — сетчатка глаза, Тим — тимус. По оси Y указан десятичный логарифм количества РНК-баркодов каждой из AAV-библиотек в каждом из проанализированных образцов органов/тканей. В легенде указаны AAV-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Черными линиями показан 1,5-интерквартильный размах. Красная пунктирная линия соответствует 9 детектированным баркодам — условная отсечка минимального количества баркодов, допускающая сравнение между серотипами вируса.

Fig. 4. Tropism of adeno-associated virus (AAV) variants to mouse organs and tissues after injection of AAV libraries L1 or L2. The X-axis indicates organs/tissues: Gon, gonads; Lu, lungs; Brn, brain; Mus, skeletal muscles; AG, adrenal glands; Liv, liver; Kid, kidney; Spl, spleen; Hrt, heart; Ret, retina; Thms, thymus. The Y-axis indicates the decimal logarithm of the quantity of RNA barcodes from each AAV library in each of the organ/tissue samples analysed. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Black lines show the 1.5-interquartile range. The red dotted line corresponds to 9 detected barcodes and represents a cutoff for the minimum quantity of barcodes that allows for comparison between virus serotypes.

представлены в логарифмическом масштабе, поэтому положительные значения указывают на повышенную эффективность трансдукции относительно ожидаемой, а отрицательные — на пониженную.

На рисунке 9 (опубликован на сайте журнала⁶) можно видеть, что серотип sAAB3 обладает пониженной эффективностью трансдукции в печени относительно ожидаемой. Не удалось выявить варианты AAV, обладающие достоверно повышенной эффективностью трансдукцией печени. Так, несмотря на положительные медианные значения эффективности трансдукции у sAAB1, наблюдались большие разбросы между образцами, полученными от разных животных. Вариант sAAB6 обладал повышенной эффективностью трансдукции в надпочечниках (рис. 10, опубликован на сайте журнала⁷), что делает его одним из наиболее эффективных для этого органа, несмотря на низкое количество ДНК (рис. 6). Представленные результаты указывают

на принципиальную важность проведения исследований по характеристике AAV-библиотек не только на уровне ДНК, но и на уровне матричной РНК.

Результаты оценки биораспределения и эффективности трансдукции *in vivo* при использовании AAV векторов

Разработанная методика оценки биораспределения, тропизма и эффективности трансдукции AAV-библиотек позволяет эффективно выявлять серотипы AAV, наиболее перспективные для терапии конкретного органа или ткани. Однако получаемые численные значения, характеризующие эти параметры, могут быть сравнены друг с другом только в рамках конкретного органа или ткани, но не между ними. Это является ограничением данной работы. В связи с этим в дальнейших исследованиях планируется оценивать абсолютные количества вирусной ДНК и РНК с помощью количественной ПЦР с нормализацией на единицу

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228-suppl>

⁷ Там же.

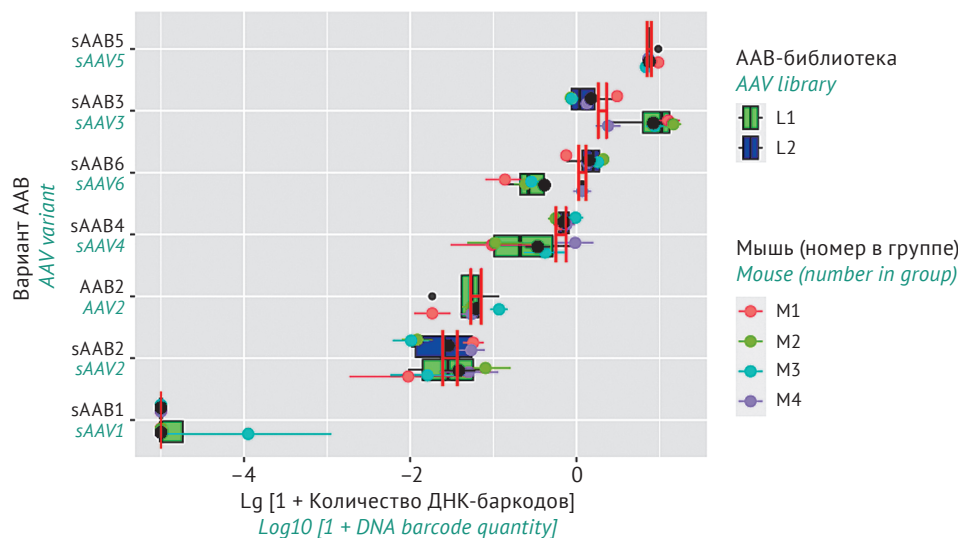


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Количество детектированных ДНК-баркодов в образцах печени после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (AAB) L1 или L2. Вертикальные красные линии отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов AAB. В легенде указаны AAB-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены по убыванию вирусной нагрузки.

Fig. 5. Quantity of detected DNA barcodes in liver samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). The Y-axis lists virus serotypes in descending order by viral load.

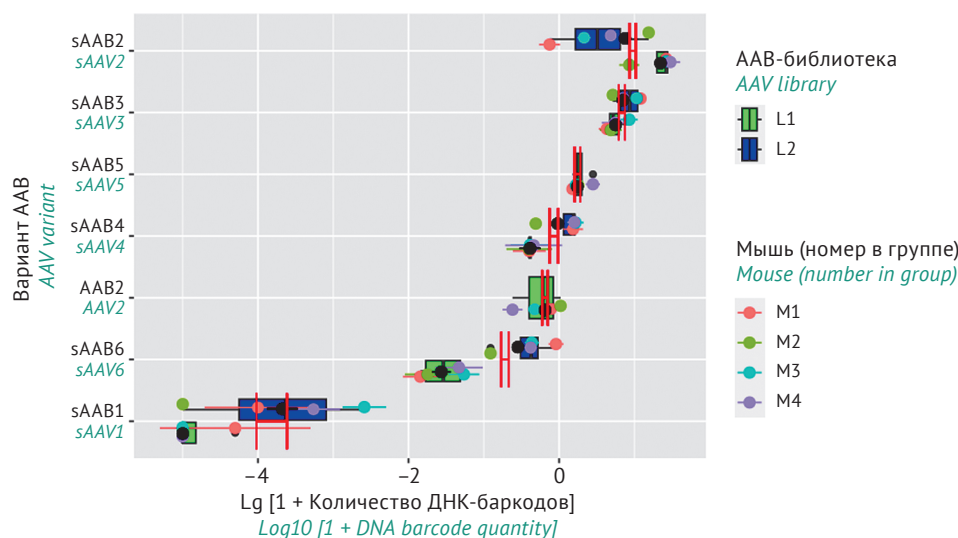


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Количество детектированных ДНК-баркодов в образцах надпочечников после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (AAB) L1 или L2. Вертикальные красные линии отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов AAB. В легенде указаны AAB-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены по убыванию вирусной нагрузки.

Fig. 6. Quantity of detected DNA barcodes in adrenal samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). The Y-axis lists virus serotypes in descending order by viral load.

генома клетки и экспрессию генов домашнего хозяйства (например, GAPDH) соответственно. Однако различные ткани обладают разными уровнями экспрессии GAPDH, что может

привести к систематической ошибке. Несмотря на наличие различных подходов к характеристике AAB, описанных в литературе [16–19], эта проблема остается нерешенной.

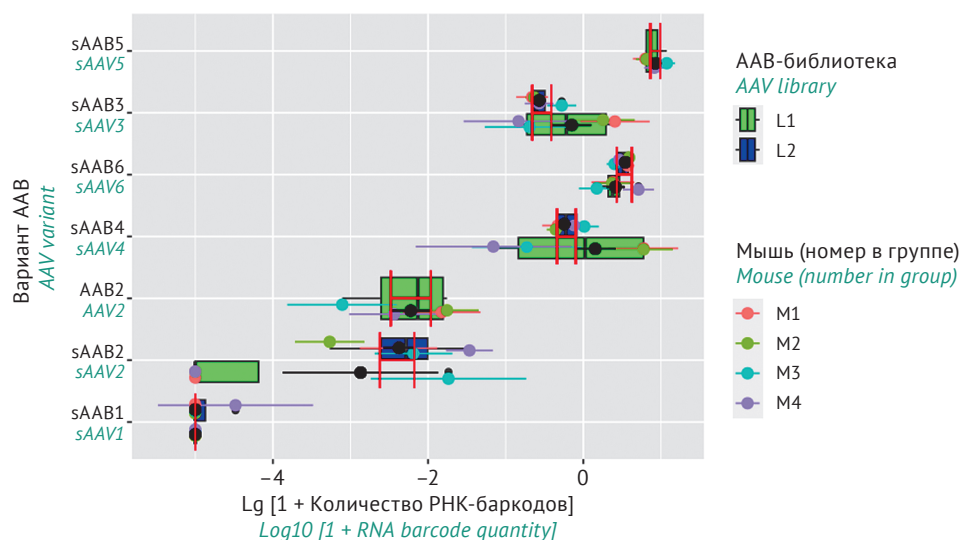


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Количество детектированных РНК-баркодов в образцах печени после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (ААВ) L1 или L2. Вертикальные красные полосы отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов ААВ. В легенде указаны ААВ-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены как на рис. 5.

Fig. 7. Quantity of detected RNA barcodes in liver samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Virus serotypes on the Y-axis are ordered as in Fig. 5.

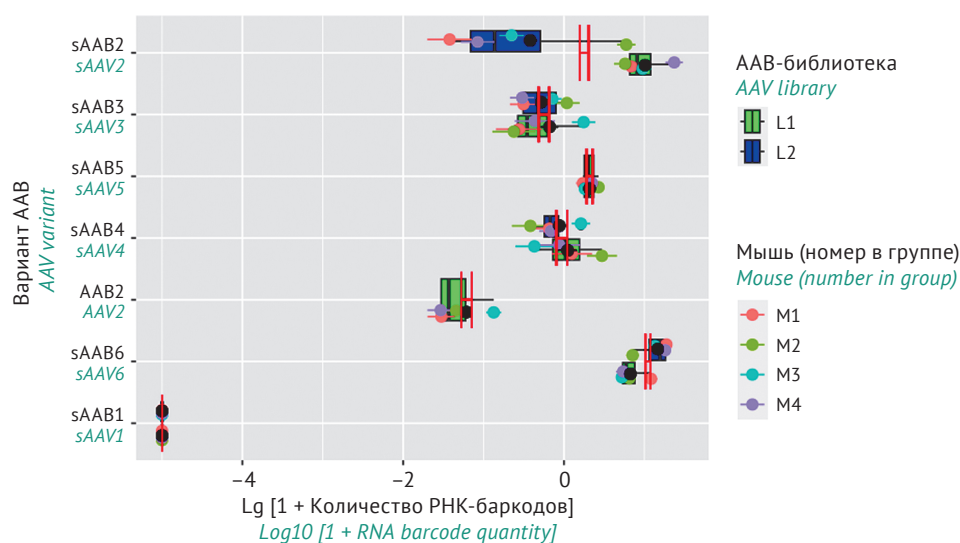


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 8. Количество детектированных РНК-баркодов в образцах надпочечников после инъекционного введения мышам библиотек аденоассоциированного вируса (ААВ) L1 или L2. Вертикальные красные полосы отражают стандартную ошибку среднего для каждого из серотипов ААВ. В легенде указаны ААВ-библиотеки и порядковый номер мыши в группе (для каждой экспериментальной группы $n=4$). Серотипы вирусов по оси Y упорядочены как на рис. 6.

Fig. 8. Quantity of detected RNA barcodes in adrenal samples after injection of adeno-associated virus (AAV) libraries L1 or L2 into mice. Vertical red lines represent the standard error of the mean for each AAV serotype. The legend indicates the AAV library and the sequential number of the mouse in the group (for each experimental group, $n=4$). Virus serotypes on the Y-axis are ordered as in Fig. 6.

На рисунках 11 и 12 (опубликованы на сайте журнала⁸) представлены обобщенные данные по биораспределению и тропизму вариантов

ААВ в исследованных органах и тканях. При интерпретации графиков необходимо иметь в виду, что они построены на основе сравнения

⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228-suppl>

вариантов вирусов в каждом органе/ткани не-зависимо. Графики не отражают абсолютных значений, поэтому прямое сравнение значений по отдельным органам между собой невозможно. Из представленных данных видно, что некоторые серотипы AAV обладают широким биораспределением и тропизмом (например, sAAB5, *рис. 11⁹*), в то время как другие обладают относительной специфичностью, например sAAB2 более эффективен для трансдукции в надпочечниках (*рис. 11¹⁰*). В целом серотипы с широким биораспределением демонстрируют и широкий тропизм.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод биоинформатической оценки библиотек синтетических векторов на основе аденоассоциированного вируса различных серотипов для исследования биораспределения и эффективности трансдукции *in vivo*.

Литература/References

- Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(5):358–78. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
- Srivastava A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol*. 2016;21:75–80. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.003>
- Pañeda A, Vanrell L, Mauleon I, Crettaz JS, Berraondo P, Timmermans EJ, et al. Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther*. 2009;20(8):908–17. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.031>
- Hauck B, Xiao W. Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *J Virol*. 2003;77(4):2768–74. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.4.2768-2774.2003>
- Han J, Zhu L, Zhang J, Guo L, Sun X, Huang C, et al. Rational engineering of adeno-associated virus capsid enhances human hepatocyte tropism and reduces immunogenicity. *Cell Prolif*. 2022;55(12):e13339. <https://doi.org/10.1111/cpr.13339>
- Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2020;21(4):255–72. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>
- Rode L, Bär C, Groß S, Rossi A, Meumann N, Viereck J, et al. AAV capsid engineering identified two novel variants with improved *in vivo* tropism for cardiomyocytes. *Mol Ther*. 2022;30(12):3601–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.07.003>
- Ghuri MS, Ou L. AAV engineering for improving tropism to the central nervous system. *Biology (Basel)*. 2023;12(2):186. <https://doi.org/10.3390/biology12020186>
- Drouyer M, Chu TH, Labit E, Haase F, Navarro RG, Nazareth D, et al. Novel AAV variants with improved tropism for human Schwann cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2024;32(2):101234. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101234>
- Gigout L, Rebollo P, Clement N, Warrington KH, Muzyczka N, Linden RM, et al. Altering AAV tropism with mosaic viral capsids. *Mol Ther*. 2005;11(6):856–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.03.005>
- Wu Z, Asokan A, Grieger JC, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. *J Virol*. 2006;80(22):11393–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.01288-06>
- Asokan A, Conway JC, Phillips JL, Li C, Hegge J, Sinnott R, et al. Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol*. 2010;28(1):79–82. <https://doi.org/10.1038/nbt.1599>
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(18):11854–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.182412299>
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol*. 2004;78(12):6381–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6381-6388.2004>
- Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, et al. *In silico* reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep*. 2015;12(6):1056–8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.019>
- Szumaska J, Grimm D. Boosters for adeno-associated virus (AAV) vector (r)evolution. *Cytotherapy*. 2023;25(3):254–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.07.005>
- Adachi K, Enoki T, Kawano Y, Veraz M, Nakai H. Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing. *Nat Commun*. 2014;5:3075. <https://doi.org/10.1038/ncomms4075>
- Marsic D, Govindasamy L, Currllin S, Markusic DM, Tseng YS, Herzog RW, et al. Vector design Tour de Force: integrating combinatorial and rational approaches to derive novel adeno-associated virus variants. *Mol Ther*. 2014;22(11):1900–9. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.139>
- Weinmann J, Weis S, Sippel J, Tulalamba W, Remes A, El Andari J, et al. Identification of a myotropic AAV by massively parallel *in vivo* evaluation of barcoded capsid variants. *Nat Commun*. 2020;11(1):5432. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19230-w>
- Grimm D, Lee JS, Wang L, Desai T, Akache B, Storm TA, et al. *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-asso-

⁹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-215-228-suppl>

¹⁰ Там же.

- ciated viruses. *J Virol.* 2008;82(12):5887–911.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00254-08>
21. Li H. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018;34(18):3094–3100.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
22. Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, et al. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1422–3.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Д.О. Максимов** — концепция работы, обработка экспериментальных результатов, подготовка иллюстративного материала; **Д.А. Наумова** — анализ и систематизация источников литературы, формулировка выводов; **Е.А. Астахова** — анализ источников литературы, участие в формулировке выводов; **В.В. Артемьев** — анализ источников литературы, сборка баркодированных конструкций; **С.А. Бирюков** — сборка векторов на основе аденоассоциированного вируса; **И.С. Абрамов** — проведение секвенирования; **А.А. Навойкова** — подготовка плазмид, отработка методов; **Н.В. Рудев** — проведение исследований с лабораторными животными; **С.Г. Феоктистова** — сборка баркодированных конструкций, подготовка рукописи; **О.В. Глазова** — организация и проведение экспериментов с животными, забор биоматериала, выделение и анализ нуклеиновых кислот; **О.Н. Митяева** — планирование экспериментов; утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **П.Ю. Волчков** — утверждение окончательной версии рукописи для публикации. **Соответствие принципам этики.** Экспериментальные исследования с животными проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU. Протокол исследования был одобрен локальным Биоэтическим комитетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 62-д-з от 16.05.2023).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **D.O. Maksimov** conceptualised the study, processed the experimental results, and prepared the illustrative material. **D.A. Naumova** analysed and collated literature and formulated the conclusions. **E.A. Astakhova** analysed literature and formulated the conclusions. **V.V. Artemev** analysed literature and assembled the barcoded constructs. **S.A. Biryukov** assembled the AAV vectors. **I.S. Abramov** performed sequencing. **A.A. Navoikova** prepared the plasmids and refined the methods. **N.V. Rudev** conducted the experiments with laboratory animals. **S.G. Feoktistova** assembled the barcoded constructs and prepared the manuscript. **O.V. Glazova** organised and conducted the experiments with laboratory animals, collected biomaterial specimens, isolated and analysed nucleic acids. **O.N. Mityaeva** planned the experiments, approved the final version of the manuscript for publication. **P.Yu. Volchkov** approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The animals were housed and used for experimental procedures in compliance with Directive 2010/63/EU and the recommendations of the Local Bioethics Committee, Lomonosov Moscow State University (Ethics Approval 62-d-z of 16.05.2023).

Об авторах / Authors

Максимов Денис Олегович / Denis O. Maksimov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2937-6082>

Наумова Дарья Алексеевна / Daria A. Naumova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1242-2046>

Астахова Екатерина Андреевна / Ekaterina A. Astakhova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-5892>

Артемьев Валентин Владимирович / Valentin V. Artemev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-1774-6656>

Бирюков Станислав Анатольевич, д-р физ.-мат. наук / Stanislav A. Biryukov, Dr. Sci. (Phys. and Math.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5662-3651>

Абрамов Иван Сергеевич / Ivan S. Abramov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6954-1564>

Навойкова Анна Александровна / Anna A. Navoikova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0224-1396>

Рудев Николай Валерьевич / Nikolai V. Rudev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2379-0218>

Феоктистова Софья Гумаровна / Sofia G. Feoktistova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-439X>

Глазова Ольга Владимировна / Olga V. Glazova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7199-1866>

Митяева Ольга Николаевна, канд. биол. наук / Olga N. Mityaeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9252-1601>

Волчков Павел Юрьевич, канд. биол. наук / Pavel Yu. Volchkov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9794-6297>

Поступила 15.04.2024

После доработки 11.06.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 15 April 2024

Revised 11 June 2024

Accepted 21 June 2024



Рекомендации по разработке методик испытания стерильности биологических лекарственных препаратов на основе фармакопейных методов

З.Е. Бердникова✉, А.С. Тихонова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Бердникова Зинаида Евтропиевна; berdnikova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Особенности биологических лекарственных препаратов (БЛП), связанные с их природой или составом, вызывают определенные трудности при выявлении микробной контаминации, что влияет на оценку достоверности результатов контроля стерильности БЛП. К основным проблемам проведения испытаний БЛП относятся изменение внешнего вида и физического состояния питательной среды или образца, увеличенный риск контаминации и получения ложноположительного результата при испытании методом прямого посева, затруднения при проведении процедуры фильтрации и др. При разработке производителями БЛП нормативной документации на препарат, материалов регистрационного досье (раздел валидации аналитических методик) имеется необходимость в создании адекватных и воспроизводимых методик испытания по показателю «Стерильность» на основе фармакопейных методов для конкретных препаратов (вакцины живые и инактивированные, вирусные и бактериальные, одно- и многокомпонентные, бактериофаги и интерфероны, сыворотки и иммуноглобулины). Решением указанных проблем могут служить рекомендации по разработке методик на основе фармакопейных методов прямого посева и мембранной фильтрации.

ЦЕЛЬ. Предложить основные рекомендации по разработке методик испытания стерильности биологических лекарственных препаратов на основе фармакопейных методов.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен ретроспективный анализ результатов экспертизы нормативной документации на БЛП, поступившей в испытательный центр ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России в 2021–2023 гг. Рассмотрены ключевые проблемные аспекты методик, изложенных в разделе «Стерильность» в нормативных документах, и представлены способы их решения. Предложены следующие рекомендации: при испытании препаратов крови методом прямого посева не рекомендуется использовать питательную среду Сабуро с низким значением pH; испытание препаратов, содержащих ртутные консерванты, проводить с использованием тиогликолевой среды при двух температурных режимах; при испытании различных групп БЛП исключить применение ватно-марлевых пробок, использовать питательные среды, разлитые в стеклянные флаконы, закрытые резиновыми пробками и завальцованные; испытание препаратов в большой первичной упаковке (от 10 мл и более) проводить методом мембранной фильтрации. При испытании БЛП методом мембранной фильтрации рекомендовано использовать растворитель и промывочную жидкость, подобранные в результате проведения валидационных испытаний, а также установить максимально возможный объем препарата, фильтруемый через один мембранный фильтр; при проведении испытания препаратов крови для уменьшения пенообразования проводить фильтрацию при более низкой скорости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Представленные рекомендации могут служить руководством при разработке методик испытания стерильности БЛП для соответствующего раздела нормативной документации и могут быть использованы предприятиями-изготовителями, контрольными лабораториями, а также в работе экспертных организаций для унификации подхода при контроле качества БЛП по показателю «Стерильность».

Ключевые слова: стерильность; биологический лекарственный препарат; нормативная документация; метод мембранной фильтрации; метод прямого посева; питательные среды; контаминация микроорганизмами

Для цитирования: Бердникова З.Е., Тихонова А.С. Рекомендации по разработке методик испытания стерильности биологических лекарственных препаратов на основе фармакопейных методов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):229–236. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-229-236>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Recommendations for the development of sterility testing procedures for biological medicinal products based on pharmacopoeial methods

Zinaida E. Berdnikova ✉, Aleksandra S. Tikhonova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Zinaida E. Berdnikova; berdnikova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The distinctive nature and composition of biological medicinal products present certain challenges for the detection of microbial contamination, which affects the reliability of sterility control results. The main challenges associated with testing biologicals include changes in the appearance and physical properties of culture media or samples, an increased risk of contamination or false-positive results in direct inoculation tests, filtration issues, etc. When drafting product specification files and analytical method validation reports in dossiers for biologicals, manufacturers need adequate, reproducible, and pharmacopoeia-based sterility testing procedures for specific medicinal products, including live and inactivated, viral and bacterial, single- and multi-component vaccines, bacteriophages and interferons, sera and immunoglobulins. These challenges can be addressed through providing recommendations for developing analytical procedures based on compendial methods of direct inoculation and membrane filtration.

AIM. This study aimed to offer key recommendations for the development of sterility testing procedures for biologicals based on pharmacopoeial methods.

DISCUSSION. This article presents a retrospective analysis of the results of reviewing regulatory documentation for biological medicinal products submitted to the testing centre of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products in 2021–2023. Having considered major issues with the analytical procedures described in the Sterility section of regulatory submissions, the authors offer the following recommendations for addressing these issues. The authors advise against using low-pH Sabouraud culture media to test blood products by direct inoculation. Biologicals containing mercury preservatives should be tested using a thioglycolate medium at two temperature settings. When testing various biologicals, analysts should refrain from plugging vials with cotton gauze. Instead, they should pour culture media into

glass vials with rubber stoppers and crimps. Biologicals in large primary packaging (≥ 10 mL) should be tested by membrane filtration. Membrane filtration tests for biologicals should use solvents and rinsing agents selected in validation studies. It is also recommended to set the maximum volume of a biological medicinal product that can be filtered through a membrane filter. A reduction in the filtration speed is recommended to minimise foaming when testing blood products.

CONCLUSION. The recommendations presented in this article can guide the development of sterility testing procedures for inclusion in the relevant section of regulatory submissions for biologicals. Manufacturers, control laboratories, and regulatory authorities may implement these recommendations to harmonise their approach to sterility testing of biologicals.

Keywords: sterility; biological medicinal product; membrane filtration; direct inoculation; culture media; microbial contamination

For citation: Berdnikova Z.E., Tikhonova A.S. Recommendations for the development of sterility testing procedures for biological medicinal products based on pharmacopoeial methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):229–236. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-229-236>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Некоторые особенности биологических лекарственных препаратов (БЛП), связанные с их природой или составом, могут вызывать определенные сложности при проведении испытаний на стерильность. Так, присутствующие в составе БЛП стабилизаторы (алюминия гидроксид, сквалан), консерванты (мертиолят, формальдегид) могут препятствовать выявлению микробной контаминации, что влияет на достоверность результатов контроля стерильности [1–3].

Основные требования, изложенные в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ)¹, Фармакопее Евразийского экономического союза (ЕАЭС)², Европейской фармакопее³ и Фармакопее США⁴, не в полной мере отражают специфику проведения испытаний на стерильность отдельных групп БЛП, связанную с природой или составом препаратов, а содержат лишь общие положения по проведению испытаний.

Анализ результатов испытаний более 3000 серий 200 наименований различных групп БЛП (вакцины живые и инактивированные, вирусные и бактериальные, одно- и многокомпонентные, бактериофаги и интерфероны, сыворотки и иммуноглобулины) по показателю «Стерильность» в 2021–2023 гг. в испытательном центре (ИЦ) экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр

экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) указывает на необходимость решения ряда проблемных практических вопросов, связанных с различной природой исследуемого образца, выбором наиболее подходящего фармакопейного метода и разработкой на его основе воспроизводимой адекватной методики контроля стерильности. К основным проблемам проведения испытаний БЛП относятся изменение внешнего вида и физического состояния питательной среды или образца, увеличенный риск контаминации и получения ложноположительного результата при испытании методом прямого посева, затруднения при проведении процедуры фильтрации и др.

Решению этих проблем будет способствовать разработка производителями БЛП верифицированной, воспроизводимой методики контроля стерильности на основе фармакопейных методов, установление порядка проведения испытания с учетом особенностей конкретного БЛП, а также подробное и последовательное изложение раздела «Стерильность» нормативной документации (НД) на препарат, материалов регистрационного досье (раздела валидации аналитических методик), что позволит повысить точность воспроизведения методики и достоверность оценки качества препарата [4].

¹ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

² ОФС 2.1.6.1. Стерильность. Фармакопея Евразийского экономического союза.

³ 2.6.1. Sterility. European Pharmacopoeia 11th ed.

⁴ USP 43–NF 38 <71> Sterility Test.

В национальных и международных фармакопеях — ГФ РФ (ОФС.1.2.4.0003.15)⁵, Фармакопее ЕАЭС (ОФС 2.1.6.1)⁶, Европейской фармакопее⁷ и Фармакопее США⁸ регламентированы условия проведения испытаний методом прямого посева или методом мембранной фильтрации. При выборе метода и разработке методики контроля стерильности рекомендуется провести анализ природы препарата, состава и его физико-химических свойств, в том числе растворимости и способности свободно проходить через мембранные фильтры [5, 6].

При рассмотрении раздела «Стерильность» НД в ходе проведения экспертизы в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России установлено, что только 15% НД на БЛП содержат схему контроля стерильности, включающую оба фармакопейных метода. Для повышения качества испытания на стерильность и расширения возможности выбора метода в зависимости от тестируемого материала, наличия необходимого оборудования и расходных материалов (питательных сред, фильтроэлементов) рекомендуется разрабатывать схему контроля стерильности, включающую оба метода, как наиболее доступную, рациональную и обеспечивающую всесторонний подход к оценке результатов испытания [4, 7, 8].

Цель работы — предложить основные рекомендации по разработке методик испытания стерильности биологических лекарственных препаратов на основе фармакопейных методов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Метод прямого посева

При проведении экспертизы качества по показателю «Стерильность» различных БЛП методом прямого посева был выявлен ряд проблемных аспектов.

При испытании отдельной категории БЛП — высокобелковых препаратов крови и сывороток — методом прямого посева с использованием питательной среды Сабуро, обладающей низким значением pH ($5,6 \pm 0,2$), после внесения испытуемой пробы наблюдалось изменение внешнего вида и физического состояния питательной среды или образца, а именно, появлялись хлопья, осадок, изменение цвета,

не связанные с качеством среды или самого образца, что свидетельствует об отрицательном влиянии условий испытания на жизнеспособность возможных микроорганизмов-контаминантов, при этом достоверность полученных результатов сомнительна. Подобные явления наблюдали при испытании 13% наименований БЛП (например, Иммуноглобулиновый комплексный препарат (КИП)⁹, Габриглобин®-IgG¹⁰, Иммуноглобулин человека нормальный¹¹ и др.). Присутствие в толще питательной среды Сабуро посторонних включений и изменение цвета не позволяло наблюдать рост возможных микроорганизмов и вызывало затруднения и неопределенность при предварительном просмотре посевов и окончательном учете и интерпретации результатов контроля. Как правило, процедура испытания подобных препаратов включает пересев на свежую питательную среду для подтверждения достоверности результатов контроля.

В связи с этим при разработке методики рекомендуется исключить использование питательной среды Сабуро при проведении испытания на стерильность препаратов, вызывающих изменение внешнего вида среды, не связанное с качеством испытуемого материала¹². В этом случае испытание на стерильность рекомендуется проводить с использованием тиогликолевой или жидкой соево-казеиновой питательных сред.

Испытания БЛП, содержащих ртутные консерванты, рекомендуется проводить методом прямого посева с использованием свежеприготовленной (1–3 сут), обладающей нейтрализующими свойствами тиогликолевой среды в качестве универсальной для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов, при условии соответствия ее ростовых и нейтрализующих свойств в отношении тестовых микроорганизмов, а инкубацию посевов проводить при двух температурных режимах¹³. В настоящее время, учитывая данные рекомендации, испытания стерильности 10% наименований препаратов, содержащих ртутный консервант, проводят на тиогликолевой среде при двух температурных режимах инкубации.

В действующих НД на ряд БЛП (Анатоксин стафилококковый очищенный¹⁴, КОКАВ Вакцина

⁵ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ ОФС 2.1.6.1. Стерильность. Фармакопея Евразийского экономического союза.

⁷ 2.6.1. Sterility. European Pharmacopoeia 11th ed.

⁸ USP 43–NF 38 <71> Sterility Test.

⁹ Иммуноглобулиновый комплексный препарат (КИП). НД ЛС-001690-201218. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁰ Габриглобин®-IgG. НД ЛС-000412-211020. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹¹ Иммуноглобулин человека нормальный. НД ЛСР-003765/08-130617. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹² ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹³ Там же.

¹⁴ Анатоксин стафилококковый очищенный. НД Р N000648/01-200120. <https://grls.rosminzdrav.ru>

антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная¹⁵, Вакцина Е сыпнотифозная комбинированная живая (ЖКСВ-Е)¹⁶ и др.) методика испытания предусматривает использование питательных сред, разлитых в емкости (пробирки), укупоренные ватно-марлевыми пробками, предназначенные для внесения, как правило, одного испытуемого образца небольшого объема (1–2 мл). Процедура откупорки и внесения испытуемого образца является критической точкой испытания, увеличивающей риск контаминации и получения ложноположительного результата.

В этом случае рекомендуется предусмотреть в методике испытаний использование питательных сред, разлитых в стеклянные флаконы большого объема, закрытые резиновыми пробками и завальцованные, что сокращает количество емкостей с питательными средами, снижает риск контаминации и повышает надежность испытания. Кроме того, рекомендуется высевать содержимое каждого образца или общую объединенную пробу, полученную в отдельной емкости или шприце большого объема (20–50 мл), непосредственно в емкость с питательной средой и внесение образца проводить через «окошко» алюминиевого колпачка, осторожно перемешивая до равномерного распределения препарата в питательной среде, исключая риск контаминации из внешней среды¹⁷.

Ретроспективный анализ результатов экспертизы НД (первичные данные, протоколы валидации) на препараты за последние три года показал, что в 50% случаев процедура испытания БЛП включала один метод прямого посева и 15% из этих случаев составляли препараты в жидкой лекарственной форме в емкостях большого объема, от 10 мл и более (Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная очищенная концентрированная¹⁸, 10 мл; Иммуновенин[®]¹⁹, 25 мл; Габриглобин[®]-IgG²⁰, 25 мл и 50 мл; Бактериофаги специфичные к *Pseudomonas aeruginosa*²¹, 1000 мл). Учитывая, что согласно

требованиям ГФ РФ (ОФС.1.2.4.0003.15²²) для проведения испытания используют не весь материал, а только 1/2 объема первичной упаковки, что уменьшает выборку, испытание методом прямого посева следует считать малоинформативным. Кроме того, процедура испытания методом прямого посева перечисленных препаратов, выпускаемых большими сериями, весьма трудоемка и экономически нецелесообразна, поскольку требует использования значительного количества емкостей и питательных сред. Так, например, для проведения испытания 20 емкостей препарата объемом упаковки 25 мл методом прямого посева в соотношении 1:20 потребуется 480 пробирок с объемом питательной среды 20 мл или 48 флаконов с объемом среды 200 мл. В этом случае при анализе БЛП в большой первичной упаковке (от 10 мл и более) по показателю «Стерильность» рекомендуется разработать и верифицировать методику, включающую метод мембранной фильтрации²³.

Метод мембранной фильтрации

Возможность использования метода мембранной фильтрации для испытания стерильности определяется природой, составом испытуемого образца, его способностью растворяться и проходить через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм [5]. Следует отметить, что производители в 35% случаев включают этот метод в схему испытания по показателю «Стерильность». Однако основные проблемы, выявляемые экспертами ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при испытании методом мембранной фильтрации, касаются затруднений при проведении процедуры фильтрации.

Выполнение процедуры фильтрации согласно методике, изложенной в НД, трудновыполнимо, что связано с использованием неподходящего растворителя, неверной температуры, неустоявшегося времени растворения, а также высокой белковой нагрузки на мембрану (Киовиг[®]²⁴, Вилате[®] Нео²⁵, ОКТАПЛЕКС[®]²⁶).

¹⁵ КОКАВ Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная. НД ЛС-001202-290817. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁶ Вакцина Е сыпнотифозная комбинированная живая (ЖКСВ-Е). НД ЛП-№(002662)-(РГ-РУ)-300623. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁷ Порядок проведения испытания биологических лекарственных препаратов на стерильность. Методические рекомендации. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М.; 2022.

¹⁸ Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная очищенная концентрированная. НД ЛП-№(001261)-(РГ-РУ)-270922. <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁹ Иммуновенин[®]. НД РН000296/01-310117. <https://grls.rosminzdrav.ru>

²⁰ Габриглобин[®]-IgG. НД ЛС-000412-211020. <https://grls.rosminzdrav.ru>

²¹ Бактериофаги специфичные к *Pseudomonas aeruginosa*. ФС-002385-05122. <https://grls.rosminzdrav.ru>

²² ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²³ Там же.

²⁴ Киовиг[®], Такеда Мануфекчуриг Австрия АГ, НД ЛП-004856-170622. <https://grls.rosminzdrav.ru>

²⁵ Вилате[®] Нео, Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х., Австрия, НД ЛП-007434-220921. <https://grls.rosminzdrav.ru>

²⁶ ОКТАПЛЕКС[®], Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х., НД ЛП-004107-300117. <https://grls.rosminzdrav.ru>

В этих случаях при разработке методики испытания методом мембранной фильтрации и описании процедуры растворения лиофилизированных образцов БЛП рекомендуется предусмотреть использование растворителя в соответствии с инструкцией по применению или других подходящих жидкостей, не обладающих антимикробным действием, рекомендованных ГФ РФ (ОФС.1.2.4.0003.15)²⁷, а также предусмотреть увеличение времени растворения труднорастворимых образцов или использование растворителя, нагретого до температуры не выше 44–45 °С²⁸. Также в методике необходимо указать максимально возможный объем пробы, фильтруемый через один мембранный фильтр, определить количество мембранных фильтров, необходимое для испытания отобранных образцов.

Для увеличения скорости фильтрации вязких белковых препаратов рекомендуется предварительно развести испытуемый образец. Разведение следует готовить непосредственно в канистрах для фильтрации или в отдельной стерильной емкости в установленном соотношении, используя стерильную промывочную жидкость.

При проведении испытаний БЛП в ходе экспертизы на этапе фильтрации некоторых образцов препаратов, содержащих в составе стабилизаторы (алюминия гидроксид, сквалан) или консерванты (формальдегид), возникали проблемы, связанные с образованием на поверхности мембранных фильтров плотного труднопроницаемого осадка/«пласта», затрудняющего фильтрование и отмывку (АДАСЕЛЬ®²⁹, Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая³⁰) или образование в толще питательной среды мутности при использовании недостаточного количества промывочной жидкости (Конвасэл®³¹).

В этом случае при разработке методики испытания рекомендуется экспериментально определить и указать количество мембранных фильтров, необходимых для фильтрации отобранных образцов, с учетом особенностей

испытуемого материала и упаковки препарата. В ходе верификации методики испытания необходимо подобрать промывочную жидкость, определить ее объем и количество циклов промывки, обеспечивающих устранение потенциального антимикробного действия, восстановление значения pH и освобождение мембранных фильтров от испытуемой пробы препарата³².

При испытании образцов БЛП, относящихся к препаратам крови (Иммуноглобулин Сигардис МТ³³, Иммуновенин®³⁴, Иммуноглобулин антирабический³⁵), процедура фильтрации сопровождалась нежелательным явлением — пенообразованием, которое приостанавливало ход фильтрации и не устранялось в процессе отмывки, что затрудняло внесение питательных сред в канистры для фильтрации.

В связи с этим при разработке методики испытания стерильности препаратов крови методом мембранной фильтрации для уменьшения явления пенообразования рекомендуется предусмотреть проведение фильтрации при более низких значениях.

Рекомендации к содержанию раздела «Стерильность» нормативной документации

В случае применения метода прямого посева рекомендуется привести подробное и последовательное описание методики, условия проведения испытания, сведений об антимикробном действии препарата, способах его устранения и в разделе «Стерильность» НД указать следующую информацию³⁶:

- наименование используемых питательных сред;
- количество испытуемого материала или образцов препарата, необходимое для проведения испытания с учетом объема серии и упаковки;
- наименование растворителя и условия растворения лиофилизированного образца;
- количественное соотношение испытуемой пробы и питательной среды;
- обоснование пересева на 5–7 сут инкубации в случае посева мутных препаратов или вызывающих помутнение питательных сред;

²⁷ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁸ ОФС.42.0066.07 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Т. 1; 2007.

²⁹ АДАСЕЛЬ®. НД ЛП-№(004364)-(РГ-RU)-220124. <https://grls.rosminzdrav.ru>

³⁰ Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая. НД Р N000738/01-190218. <https://grls.rosminzdrav.ru>

³¹ Конвасэл® Вакцина субъединичная рекомбинантная для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. НД ЛП-007967-180322. <https://grls.rosminzdrav.ru>

³² Порядок проведения испытания биологических лекарственных препаратов на стерильность. Методические рекомендации. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М.; 2022.

³³ Иммуноглобулин Сигардис МТ. НД ЛП-003709-021120. <https://grls.rosminzdrav.ru>

³⁴ Иммуновенин®. НД Р N000296/01-310117. <https://grls.rosminzdrav.ru>

³⁵ Иммуноглобулин антирабический. НД ЛСР-010494/08-240418. <https://grls.rosminzdrav.ru>

³⁶ Порядок проведения испытания биологических лекарственных препаратов на стерильность. Методические рекомендации. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М.; 2022.

³⁷ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

- количественное соотношение отобранной пробы и питательной среды при пересеве;
- возможные изменения внешнего вида питательной среды в зоне посева и при пересеве в период инкубации при предварительном и окончательном учете результатов испытания;
- в случае отклонений от процедуры учета результатов, изложенной в ГФ РФ (ОФС.1.2.4.0003.15)³⁷, рекомендуется привести подробное описание порядка учета, позволяющее правильно интерпретировать результаты испытания.

В случае применения метода мембранной фильтрации рекомендуется в разделе «Стерильность» НД указать следующую информацию³⁸:

- наименование используемых питательных сред;
- количество испытуемого материала или образцов препарата, необходимое для проведения испытания, с учетом объема серии и упаковки;
- наименование растворителя и условия растворения лиофилизированного образца;
- наименование промывочной жидкости;
- необходимость разведения испытуемой пробы (с указанием соотношения) перед фильтрацией;
- максимально допустимый объем испытуемого

образца, фильтруемый через один мембранный фильтр;

- наименование и объем промывочной жидкости (количество циклов отмывки), используемый для смачивания и отмывки одного (каждого) мембранного фильтра;
- в случае отклонений от процедуры учета результатов, изложенной в ГФ РФ (ОФС.1.2.4.0003.15)³⁹, рекомендуется привести подробное описание порядка учета, позволяющее правильно интерпретировать результаты испытания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлены рекомендации по разработке производителями биологических лекарственных препаратов методик испытания стерильности препаратов на основе фармакопейных методов, позволяющие унифицировать подход к контролю качества препаратов по показателю «Стерильность».

Рекомендации могут быть использованы предприятиями-изготовителями, контрольными лабораториями, экспертными организациями и учитываться при разработке методик испытаний различных по своим свойствам биологических лекарственных препаратов.

Литература/References

1. Молдагулова СУ, Калимолда ЭЖ, Садикалиева СО, Токаркина ГБ, Воронина ЕП, Еспембетов БА и др. Оценка микробиологических методов определения стерильности иммунобиологических препаратов. *Биобезопасность и биотехнология*. 2022;(12):56–66. Moldagulova SU, Kalimolda EZ, Sadikaliyeva SO, Tokkarina GB, Voronina EP, Espembetov BA, et al. Microbiological control of water quality for the production of biological products. *Biosafety and Biotechnology*. 2022;(12):56–66 (In Russ.). <https://doi.org/10.58318/2957-5702-2022-12-56-66>
2. Bertoletti da Silva S, Rebello Lourenço F. Risk of false compliance/non-compliance decisions for sterility test due to false-negative and false-positive test results. *Chemometr Intell Lab Syst*. 2020;200:104005. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104005>
3. Camaró-Sala ML, Martínez-García R, Olmos-Martínez P, Catalá-Cuenca V, Ocete-Mochón MD, Gimeno-Cardona C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(7):e31–6 (In Span.). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
4. Mukherjee S, Mukherjee S, Mahto R, Basu D, Javed R, Goel G, et al. Importance and results of sterility testing of various products in a microbiology laboratory of eastern India. *Indian J Med Microbiol*. 2022;40(1):138–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.10.008>
5. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ. Разработка подходов к проведению испытания гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(2):103–9. Sukhanova SM, Berdnikova ZE. Development of new approaches to sterility testing of heterologous serum products by membrane filtration method. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(2):103–9 (In Russ.). EDN: ZGVOXZ
6. Кулешова СИ, Процак СА, Романюк ГЮ, Лисунова СА, Семенова ЕН. Оценка возможности выявления микробной контаминации антимикробных препаратов методом фильтрации. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021;66(11–12):4–8. Kuleshova SI, Protsak SA, Romanyuk GYu, Lisunova SA, Semenova EN. Evaluation of the possibility of detecting microbial contamination of microbial drugs via filtration. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2021;66(11–12):4–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-4-8>
7. Суханова СМ, Тихонова АС, Бердникова ЗЕ. Анализ подходов к проведению испытания вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):65–75. Sukhanova SM, Tikhonova AS, Berdnikova ZE. Analysis of approaches to sterility testing of COVID-19 prevention vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):65–75 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-65-75>
8. Tidswell EC, Agalloco JP, Tirumalai R. Sterility assurance-current and future state. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2022;76(3):263–77. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2020.012526>

³⁸ Порядок проведения испытания биологических лекарственных препаратов на стерильность. Методические рекомендации. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М.; 2022.

³⁹ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **З.Е. Бердникова** — концепция исследования, написание текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **А.С. Тихонова** — анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **Z.E. Berdnikova** conceptualised the study, drafted the manuscript, and approved the final version for publication. **A.S. Tikhonova** analysed and summarised literature data and drafted the manuscript.

Об авторах / Authors

Бердникова Зинаида Евтропиевна, канд. биол. наук / **Zinaida E. Berdnikova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

Тихонова Александра Сергеевна / **Aleksandra S. Tikhonova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>

Поступила 03.04.2024

После доработки 07.05.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 3 April 2024

Revised 7 May 2024

Accepted 21 June 2024

ISSN 2221-996X



9 772221 996004